

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktorin: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich, FANA, FEAN

Rolle purinerger Signalwege in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis



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

vorgelegt von
Marco Matthäus Zierhut
aus Straubing

2019

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Ködel

Mitberichterstatter: PD Dr. Stefan Kastenbauer
Prof. Dr. Roman Haberl

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2019

Eidesstattliche Versicherung

Zierhut, Marco Matthäus

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Rolle purinerger Signalwege in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 10.10.2019

Marco Zierhut

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie der bakteriellen Meningitis	1
1.2	Therapie der Pneumokokkenmeningitis	2
1.3	Komplikationen der Pneumokokkenmeningitis	4
1.4	Pathogenese und Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis	5
1.4.1	Neuropathologische Grundlagen der Gewebeschädigung	5
1.4.2	Von der Kolonisation zur Infektion	7
1.4.3	Aktivierung und Verstärkung der Immunreaktion im Liquorraum	9
1.5	ATP und purinerge Signalwege bei der Pneumokokkenmeningitis	15
1.5.1	ATP als möglicher Regulator der Immunreaktion	15
1.5.2	Die Funktion der P2-Rezeptoren	16
1.5.3	Die Rolle von ATP bei der Pneumokokkenmeningitis	18
2	Zielsetzung	19
3	Material und Methoden	20
3.1	<i>In-vivo</i>-Versuche am Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis	20
3.1.1	Tierversuchsgenehmigung	21
3.1.2	Versuchstiere	21
3.1.3	Klinischer Score und klinische Untersuchung	21
3.1.3.1	Beam Balance Test	22
3.1.3.2	Postural-Reflex-Test	23
3.1.3.3	Fellstatus, motorische Anfälle und Vigilanz	23
3.1.3.4	Körpergewicht und Körpertemperatur	23
3.1.3.5	Open Field Test	23
3.1.3.6	Klinischer Beurteilungsbogen	24
3.1.4	Infektion	25
3.1.5	Antibiotische Therapie	25
3.1.6	Versuchsgruppen	26
3.1.6.1	Effekt von P2R-Antagonisten auf die Krankheitsentwicklung der PM	26
3.1.6.2	Effekt von P2R-Antagonisten im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf der PM	27
3.1.6.3	ATP-Konzentration und P2R-Expression im Zeitverlauf der PM	28
3.1.6.4	Effekt von Ektonukleotidaseinhibitoren und Adenosinrezeptor-Antagonisten	29
3.1.7	Präparation der Versuchstiere	29
3.1.8	Bestimmung der Leukozytenzahl im Liquor	31
3.1.9	Bestimmung bakterieller Titer in Gehirn und Blut	31

3.1.10	Herstellung von Hirnschnitten und Quantifizierung intrazerebraler Blutungen	32
3.1.11	Messung der IL-1 β -Konzentration im Liquor	33
3.1.12	Real Time RT-PCR-Analysen der P2-Rezeptor-Expression im Gehirn	34
3.1.13	Bestimmung der ATP-Konzentration im Liquor	35
3.2	<i>In-vitro</i>-Zellkulturversuche im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis	35
3.2.1	Versuchsbedingungen	35
3.2.2	Zelltypen und Zellgewinnung	36
3.2.2.1	Murine Knochenmarks-Makrophagen	36
3.2.2.2	Murine neutrophile Knochenmarks-Granulozyten	38
3.2.3	Versuchsreihen	38
3.2.3.1	Effekt des P2R-Antagonismus auf die Aktivierung von BMDM	38
3.2.3.2	Darstellung des ATP-Katabolismus <i>in vitro</i>	39
3.2.4	Photometrische Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH) - Aktivität	40
3.2.5	Messung der IL-1 β - und IL-6-Konzentrationen im Zellüberstand	41
3.2.6	Bestimmung der ATP-Konzentrationen im Zellüberstand	41
3.3	Statistische Methoden	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Inhibition der Makrophagen-Aktivierung durch P2R-Antagonismus	43
4.2	Effekte des P2R-Antagonismus im Verlauf der PM	45
4.2.1	Effekt des P2R-Antagonismus auf die Entwicklung der PM	45
4.2.2	Effekt des P2R-Antagonismus im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf der PM	46
4.3	Abnahme der P2R-Expression und Liquor-ATP-Level im Verlauf der PM	49
4.4	Möglicher Beitrag von CD39 zum eATP-Abbau	51
4.5	Effekt von Ektonukleotidase-Inhibitoren und Adenosinrezeptor-Antagonisten	54
5	Diskussion	57
5.1	Rolle von eATP bei der IL-1 β -Freisetzung	57
5.2	Fehlender Effekt des P2R-Antagonismus auf den Verlauf der PM <i>in vivo</i>	58
5.3	Abnahme der P2R-Expression und Liquor-ATP-Konzentrationen	61
5.4	Rolle des Abbaus und der Abbauprodukte von ATP bei der PM	65
5.5	Rolle von ATP in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis	69
6	Zusammenfassung	72
7	Ausblick	76
8	Anhang	78
8.1	Etablierungsversuche	78
8.1.1	Überblick der Versuchsansätze zur Etablierung der ATP-Messung <i>in vitro</i>	78
8.1.2	Spezifische Aspekte der Etablierungsversuche	79

8.1.2.1	Einfluss verschiedener Immunzellen auf die ATP-Konzentration.....	79
8.1.2.2	Einfluss verschiedener Pneumokokken-Formen auf die ATP-Konzentration.....	80
8.1.2.3	Einfluss verschiedener Stimulationsmedien auf die ATP-Konzentration.....	82
8.1.2.4	Einfluss von Antagonisten des purinergen Signalwegs auf die ATP-Messung	83
8.1.3	Schlussfolgerungen aus den Etablierungsversuchen	86
8.2	Quellenverzeichnis	87
9	Literaturverzeichnis.....	93
10	Veröffentlichungen	116
11	Danksagung	117
12	Lebenslauf.....	Error! Bookmark not defined.

Abkürzungsverzeichnis

aCSF	Künstlicher Liquor (<i>artificial cerebrospinal fluid</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
<i>Aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser
ARDS	<i>Adult Respiratory Distress Syndrome</i>
AP	Aktivatorprotein
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Einfaktorielle Varianzanalyse (<i>one way analysis of variance</i>)
ASC	<i>apoptosis associated speck like protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BBG	Brillantblau G (<i>Brilliant Blue G</i>)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMDM	Knochenmarksmakrophagen (<i>bone marrow derived macrophages</i>)
BMN	Neutrophile Knochenmarks-Granulozyten (<i>bone marrow-derived neutrophils</i>)
Casp1	Caspase-1
CbP	Cholin-bindendes Protein
cfu	<i>Colony forming unit</i>
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	(C-X-C motif) ligand
DAMP	Schaden-assoziiertes molekulares Muster (<i>damage associated pathogen pattern</i>)
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle`s medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eATP	Extrazelluläres Adenosintriphosphat
EKPs	Ethanol abgetötete Pneumokokken (<i>Ethanol killed pneumococci</i>)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FCS	<i>Fetal bovine calf serum</i>
HDGF	<i>Hepatoma-derived growth factor</i>
HEPES	(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfon-säure)
<i>Hib</i>	<i>Haemophilus influenzae Typ B</i>
HKPs	Hitze-inaktivierte Pneumokokken (<i>Heat killed pneumococci</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High performance</i>

	<i>liquid chromatography)</i>
HMGB1	High mobility group box 1 protein
ICP	intrakranielle Druck (<i>intracranial pressure</i>)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.c.	intrazisternal (<i>intracisternal</i>)
i.p.	intraperitoneal
KBE	Kolonie bildende Einheit
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
et	<i>Myeloid-related protein 14</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i>
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NF-κB	Nuklearfaktor κB
NLR	NOD-like-Rezeptor (<i>nucleotide binding oligomerization domain-like receptor</i>)
NLRP3	<i>NOD-like receptor family pyrin domain containing 3</i>
NO	Stickstoffmonoxid
ox-ATP	oxidiertes Adenosintriphosphat
PAF	Plättchenaktivierungsfaktor
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCV	<i>Pneumococcal conjugate vaccine</i>
PG	Peptidoglykan
pIgR	Polymerischer Immunglobulinrezeptor
Pkt.	Punkt
PLY	Pneumolysin
PM	Pneumokokkenmeningitis
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat

PPADS	Pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid
PRR	Mustererkennungszepatoren (<i>pathogen recognition receptors</i>)
P2R	P2-Rezeptor
P/S	Penicillin/Streptomycin
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
rM-CSF	rekombinanter Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>recombinant macrophage colony stimulating factor</i>)
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
WBC	Leukozyten (<i>white blood cells</i>)
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WST	Wasserlösliches Tetrazolium-Salz (<i>water soluble tetrazolium</i>)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der bakteriellen Meningitis

Die bakterielle Meningitis ist *per definitionem* eine Infektion des mit Liquor gefüllten Subarachnoidalraums, wobei die daraus resultierende Entzündung von Liquorraum und Meningen zu den klassischen Symptomen Kopfschmerz, Fieber, Nackensteifigkeit und Vigilanzstörungen führt (Kastenbauer, S. und Pfister, H. W., 2003; Klein, M. et al., 2016; Koedel, U. et al., 2009b; Pfister, H.-W., 2015; Van de Beek, D. et al., 2004; Van de Beek, D. et al., 2016). Nach neuesten Schätzungen der *World Health Organisation* (WHO) zählt die bakterielle Meningitis mit etwa 315.000 Todesfällen jährlich zu den weltweit zehn häufigsten Todesursachen, welche auf infektiöse und parasitäre Krankheiten zurückzuführen sind. Dies macht 0,6% der gesamten Todesfälle weltweit aus (World Health Organization, 2016).

Neben Gesundheitszustand und Lebensbedingungen sind das Erregerspektrum und die Inzidenz der bakteriellen Meningitis insbesondere vom Lebensalter abhängig. Im Erwachsenenalter wird die Hälfte der eitrigen Meningitiden durch *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) und ein Drittel durch *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), mit großem Abstand gefolgt von *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), Staphylokokken, gramnegativen Enterobakterien, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) und *Haemophilus influenzae* verursacht. Auch im Kindesalter sowie im höheren Alter über 65 Jahren führt *S. pneumoniae* gefolgt von *N. meningitidis* beziehungsweise *L. monocytogenes* die Liste der häufigsten Erreger einer eitrigen Meningoenzephalitis an (Chávez-Bueno, S. und McCracken, G. H., Jr.; Hussein, A. S. und Shafran, S. D., 2000; Klein, M. et al., 2016; Koedel, U. et al., 2009b; Pfister, H.-W., 2015; Schuchat, A. et al., 1997; Thigpen, M. C. et al., 2011; Van de Beek, D. et al., 2004). Insgesamt finden sich die höchsten Inzidenzen der bakteriellen Meningitis insbesondere bei Personengruppen unter 5 und über 60 Jahren (Koedel, U. et al., 2009b; Schuchat, A. et al., 1997).

In Folge der Einführung des Konjugat-Impfstoffes gegen *Haemophilus influenzae Typ B* (*Hib*) aus Kapselpolysacchariden und Trägerproteinen in den frühen 1990ern hatte sich die Epidemiologie der bakteriellen Meningitis in den Industriestaaten gravierend gewandelt. War die Meningitis, ausgelöst durch *Hib*, bis Ende der 80er Jahre noch vorherrschend im Kindesalter, so hat ihre Inzidenz in den Ländern mit Impfprävention daraufhin so stark abgenommen, dass sie mittlerweile fast nur noch eine Erkrankung des Erwachsenenalters darstellt und auch insgesamt von den vorderen Plätzen der häufigen Erreger verdrängt wurde (Dawson, K. G. et al., 1999; Klein, M. et al., 2016; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Kries, R. v., 1994; Pfister, H.-W., 2015; Schuchat, A. et al., 1997). Somit stellt *S. pneumoniae* in Westeuropa und Nordamerika als Auslöser von mehr als zwei Drittel aller bakteriellen Meningitisfälle mittlerweile den häufigsten und gleichzeitig auch gefährlichsten

Erreger dieser Krankheit dar (Bijlsma, M. W. et al., 2016; Klein, M. et al., 2016; Koedel, U. et al., 2002a; Lucas, M. J. et al., 2016; Pfister, H.-W., 2015; Schuchat, A. et al., 1997; Thigpen, M. C. et al., 2011; Van de Beek, D. et al., 2016). Es versterben nach wie vor 6 bis 18% aller Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis (PM) in der Altersgruppe der Erwachsenen (Bewersdorf, J. P. et al., 2018; Buchholz, G. et al., 2016; Klein, M. et al., 2016; Pfister, H.-W., 2015). Neben *N. meningitidis* konzentriert sich die Impfstoffentwicklung daher mittlerweile insbesondere auf *S. pneumoniae*. Im Jahr 2000 wurde in den USA und 2001 in Deutschland erstmals der heptavalente Konjugat-Impfstoff PCV7 (*Pneumococcal conjugate vaccine 7*) gegen einzelne Pneumokokken-Serotypen zugelassen (Koedel, U. et al., 2009b; Van der Linden, M. et al., 2015). Insgesamt existieren über 90 verschiedene Serotypen von *S. pneumoniae*, von denen 23 für 90% der Pneumokokken-Infektionen verantwortlich sind (Artz, A. S. et al., 2003; Henrichsen, J., 1995; Koedel, U. et al., 2009b). Farrell, D. et al. (2004) konnten zeigen, dass durch PCV7 etwa 70% der in den USA vorherrschenden Serotypen abgedeckt werden konnten (Koedel, U. et al., 2009b). 2010 wurden zudem die zwei neuen Impfstoffe PVC10 und PVC13 eingeführt, so dass nun bis zu 13 Pneumokokken-Serotypen abgedeckt werden, bei welchen seitdem folglich eine Abnahme der Inzidenz zu beobachten ist. Jedoch zeigte sich stets eine Zunahme der nicht durch die Impfungen abgedeckten Serotypen in der Bevölkerung (Koedel, U. et al., 2009b; Van der Linden, M. et al., 2015). Aufgrund der hohen Serotypendiversität, dem Serotypenwechsel, dem Auftreten neuer Serotypen mit Hilfe von Transformation und homologer Rekombination von Kapselgenen sowie der breiten Altersverteilung der Erreger wird nicht erwartet, dass ein ähnlicher Impferfolg wie bei *Hib* eintreten wird. Dies führt dazu, dass die Akutbehandlung weiterhin eine wichtige Säule im Umgang mit der Pneumokokkenmeningitis darstellt (Koedel, U. et al., 2009b; Van de Beek, D. et al., 2016), wobei man hierbei immer stärker mit Antibiotika-Resistenzen insbesondere in Ost- und Südeuropa konfrontiert wird (Hoban, D. et al., 2001; Klein, M. et al., 2016; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Pfister, H.-W., 2015; Van De Sande-Bruinsma, N. et al., 2008).

1.2 Therapie der Pneumokokkenmeningitis

Trotz Zunahme resistenter Stämme stellen die Antibiotika immer noch den wichtigsten Pfeiler in der Therapie der Pneumokokkenmeningitis dar (Hoban, D. et al., 2001; Klein, M. et al., 2016; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Pfister, H.-W., 2002; 2015; Van De Sande-Bruinsma, N. et al., 2008). Dies wird auch daran deutlich, dass bis zur Einführung der Behandlung mit antimikrobiellen Therapeutika die Patienten fast ausnahmslos verstarben (Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Ribble, J. C. und Braude, A. I., 1958; Schuchat, A. et al., 1997; Tripoli, C. J., 1936). Grundsätzlich richtet sich die Art des zu

verabreichenden Antibiotikums nach dem jeweiligen Erreger. Da dieser aber bei Aufnahme des Patienten meist noch nicht bekannt ist, wird empirisch mit Berücksichtigung von Patientenalter und prädisponierenden Faktoren behandelt, um so die wahrscheinlichsten Pathogene abzudecken (Klein, M. et al., 2016; Koedel, U. et al., 2009b; Pfister, H.-W., 2002; 2015). Da die meisten ambulanten Meningitiden im Erwachsenenalter durch *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* und *L. monocytogenes* verursacht werden (Klein, M. et al., 2016; Koedel, U. et al., 2009b; Pfister, H.-W., 2015; Schuchat, A. et al., 1997; Van de Beek, D. et al., 2004), wird bei entsprechendem Verdacht und fehlenden Hinweisen auf eine mögliche Penicillinresistenz, die initiale Antibiotikatherapie mit einem Cephalosporin der dritten Generation plus Ampicillin eingeleitet. Wie in mehreren Studien gezeigt werden konnte, ist dabei die rechtzeitige Verabreichung der antimikrobiellen Medikamente für die Prognose der Erkrankung von entscheidender Bedeutung (Klein, M. et al., 2016; Koedel, U. et al., 2009b; Pfister, H.-W., 2015). Die aktuellen Leitlinien empfehlen daher, dass die Antibiotikagabe möglichst innerhalb der ersten drei Stunden (h) nach Krankenhausaufnahme erfolgen sollte (Klein, M. et al., 2016; Pfister, H.-W., 2015). Dabei wird unter anderem auf eine prospektive multizentrische Beobachtungsstudie von Auburtin im Jahr 2006 verwiesen, im Rahmen der gezeigt werden konnte, dass eine verzögerte Antibiotikaverabreichung mit erhöhter Letalität und vermehrt neurologischen Folgeschäden vergesellschaftet ist (Auburtin, M. et al., 2006; Klein, M. et al., 2016; Pfister, H.-W., 2015). So wurde nur bei einem Anteil von 35% der Überlebenden eine verspätete Therapie eingeleitet, wohingegen dies bei 73% der Verstorbenen der Fall war (Auburtin, M. et al., 2006; Koedel, U. et al., 2009b).

Als adjuvante Therapie wird nach den aktuellen therapeutischen Richtlinien in Deutschland die Verabreichung von Dexamethason bei Verdacht auf Pneumokokken-Meningitis empfohlen (Klein, M. et al., 2016; Koedel, U. et al., 2009b; Pfister, H.-W., 2015), da bei dieser Meningitisform in mehreren Studien ein günstiger Effekt auf die Letalität und den Krankheitsverlauf einschließlich neurologischer Folgeschäden und Hörminderung nachgewiesen werden konnte (Brouwer, M. C. et al., 2010; Brouwer, M. C. et al., 2013; Brouwer, M. C. et al., 2015; De Gans, J. und Van de Beek, D., 2002; Klein, M. et al., 2016; Pfister, H.-W., 2015; Van de Beek, D. et al., 2004; Van de Beek, D. et al., 2010; Van de Beek, D. et al., 2016). Allerdings ist dies nur der Fall, wenn die Dexamethasongabe vor oder zeitgleich mit der Antibiotikaverabreichung erfolgte (De Gans, J. und Van de Beek, D., 2002; Koedel, U. et al., 2009b; McIntyre, P. B. et al., 1997; Van de Beek, D., 2009). Grund für den Nutzen von Dexamethason ist vermutlich seine antiinflammatorische Wirkung als Steroid (Löwenberg, M. et al., 2008), welche die durch die Immunreaktion ausgelösten, gefürchteten Komplikationen im Liquorraum (Kim, K. S., 2003; Klein, M. et al., 2006a; Koedel, U. et al., 2002a; Nau, R. und Brück, W., 2002; Weber, J. R. und Tuomanen, E. I., 2007) verringert (Koedel, U. et al., 2009b). Trotz gezielter Therapie und stetiger Verbesserung der

intensivmedizinischen Behandlung bleiben Letalität und Häufigkeit von neurologischen Folgeschäden bei der bakteriellen Meningitis jedoch hoch (Bohr, V. et al., 1983; Durand, M. L. et al., 1993; Klein, M., 2004; Klein, M. et al., 2016; Koedel, U. et al., 2002a; Schuchat, A. et al., 1997), sodass die Behandlungssituation weiterhin als unzureichend beschrieben und die Notwendigkeit zusätzlicher adjuvanter Therapieansätze, basierend auf den Erkenntnissen der Pathophysiologie, auch von Seiten der Wissenschaft betont wird (Koedel, U. et al., 2009b; Tyler, K. L., 2008).

1.3 Komplikationen der Pneumokokkenmeningitis

Die ungünstige Prognose der bakteriellen Meningitis besteht vorwiegend aufgrund intrakranieller aber auch extrakranieller Komplikationen unterschiedlichen Schweregrades, die in der Akutphase der Erkrankung bei etwa der Hälfte der Patienten auftreten (Durand, M. L. et al., 1993; Kastenbauer, S. und Pfister, H. W., 2003; Klein, M. et al., 2016; Koedel, U. et al., 2009b; Pfister, H.-W. et al., 1993; Pfister, H.-W., 2015; Van de Beek, D. et al., 2004; Weisfelt, M. et al., 2006) und ein intensivmedizinisches Management erfordern (Klein, M. et al., 2016; Pfister, H.-W., 2015). Kastenbauer und Pfister analysierten zwischen 1984 und 2002 87 Patientenfälle mit einer Pneumokokkenmeningitis, wovon 24,1% verstarben, 37,9% extrakranielle und 74,7% intrakranielle Komplikationen zeigten (Höhne, C. L., 2015; Kastenbauer, S. und Pfister, H. W., 2003). Zu den häufigsten extrakraniellen, systemischen Komplikationen in der Akutphase der bakteriellen Meningitis zählen unter anderem insbesondere der septische Schock, der in bis zu 30% der Pneumokokkenmeningitiden auftritt, die Verbrauchskoagulopathie bei etwa 20% der Fälle sowie das *Adult Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) (Klein, M. et al., 2016; Koedel, U. et al., 2009b; Pfister, H.-W. et al., 1993; Pfister, H.-W., 2015). Wie auch an den Ergebnissen der Studie von Kastenbauer, S. und Pfister, H. W. (2003) erkennbar ist, erreichen die intrakraniellen Komplikationen jedoch ein weitaus größeres Ausmaß an Folgeschäden, was dazu führt, dass ein Großteil der Überlebenden mit signifikanten, langfristigen neurologischen und neuropsychologischen Beeinträchtigungen leben muss (Christie, D. et al., 2011; Edmond, K. et al., 2010; Kastenbauer, S. und Pfister, H. W., 2003; Koedel, U. et al., 2010b; Lucas, M. J. et al., 2016; Ramakrishnan, M. et al., 2009; Schmidt, H. et al., 2005; Smith, A. L., 1988; Weisfelt, M. et al., 2006). In Tabelle 1 werden die häufigsten zerebralen Komplikationen der bakteriellen Meningitis bei Erwachsenen gemäß den aktuellen Leitlinien der „Deutschen Gesellschaft für Neurologie“ aufgeführt (Klein, M. et al., 2016; Pfister, H.-W., 2015).

Tabelle 1: Zerebrale Komplikationen der Pneumokokkenmeningitis

Die häufigsten zerebralen Komplikationen der bakteriellen Meningitis bei Erwachsenen gemäß den aktuellen Leitlinien der „Deutschen Gesellschaft für Neurologie“ (Klein, M. et al., 2016; Pfister, H.-W., 2015).

zerebrale Komplikation	Häufigkeit
Hirnödem mit Einklemmungsgefahr	10 – 15%
zerebrovaskuläre Beteiligung <ul style="list-style-type: none"> • arterielle Gefäßkomplikationen (Arteriitis, Vasospasmus, fokale kortikale Hyperperfusion, zerebrale Autoregulationsstörung) • venöse Gefäßkomplikationen (septische Sinusthrombosen, kortikale Venenthrombose) 	15 – 20%
Hydrozephalus	10 – 15%
Vestibulocochleäre Beteiligung (Hörstörungen, Vestibulopathie)	10 – 20%
Hirnnervenparesen	ca. 10%
Zerebritis	< 5%
Epileptische Anfälle und sekundäre Epilepsie	2 – 15%
seltene Folgen: Hirnabszess, Subduralempyem	

1.4 Pathogenese und Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis

1.4.1 Neuropathologische Grundlagen der Gewebeschädigung

Das neuropathologische Korrelat der Folgeschäden der Pneumokokkenmeningitis sind Gewebeuntergänge in verschiedenen Hirnregionen und dem Innenohr, welche sowohl direkt als auch indirekt entstehen können. Eine direkte Schädigung kann dabei sowohl durch bakterielle zytotoxische Produkte wie Pneumolysin (PLY) als auch die körpereigene überschießende Immunreaktion („Hyperinflammation“) verursacht werden (Gerber, J. und Nau, R., 2010; Hirst, R. et al., 2004; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010a; b; Nau, R. und Brück, W., 2002; Weber, J. R. und Tuomanen, E. I., 2007). Pneumolysin als Virulenzfaktor der Pneumokokken kann neben seiner eigenen zytotoxischen Wirkung auch die Produktion von inflammatorischen Mediatoren stimulieren (Braun, J. S. et al., 1999a; Braun, J. S. et al., 2002; Grandgirard, D. et al., 2007; Houldsworth, S. et al., 1994; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Stucki, A. et al., 2007) und somit zur körpereigene Toxizität beitragen, welche insbesondere auf einer starken protrahierten neutrophilen Entzündungsreaktion basiert. Diese bedingt eine direkte Gewebeschädigung von Nervenzellen, Gefäßen und der Blut-Hirn-Schranke (BHS) im Sinne von „Kollateralschäden“ durch freigesetzte zytotoxische Moleküle (Gerber, J. und Nau, R.,

2010; Henriques-Normark, B. und Tuomanen, E. I., 2013; Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010a; b; Liechti, F. D., Grandgirard, D. & Leib, S. L. , 2015; Nau, R. und Brück, W., 2002; Van de Beek, D. et al., 2016; Weber, J. R. und Tuomanen, E. I., 2007). Dazu zählen neben Oxidantien wie Peroxynitrit, freien Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid, proteolytische Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen sowie exzitatorische Aminosäuren aus aktivierten Leukozyten aber auch ortsständigen Zellen wie Glia- und Endothelzellen (Kim, K. S., 2003; Klein, M. et al., 2006a; Koedel, U. et al., 1995; Koedel, U. und Pfister, H.-W., 1999; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Nau, R. und Brück, W., 2002; Pfister, H.-W. et al., 1999). Die toxischen Moleküle führen über Mechanismen wie DNA-Strangbrüche, Lipidperoxidation oder mitochondriale Schädigung (Klein, M. et al., 2006a; Koedel, U. et al., 2002a) und somit Endothelschädigung und -dysfunktion zu einem Verlust der zerebrovaskulären Autoregulation, zerebralen Gefäßkomplikationen wie thrombotischen Gefäßverschlüssen sowie einer Störung der Blut-Hirn-/Liquor-Schranke (Kastenbauer, S. und Pfister, H. W., 2003; Klein, M. et al., 2006a; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b).

Der Zusammenbruch der BHS ermöglicht es Plasmabestandteilen in das zerebrale Gewebe überzutreten, wodurch ein vasogenes Hirnödem entstehen kann (Kempinski, O., 2001; Koedel, U. et al., 1994; Koedel, U. et al., 2002a). Ein Hirnödem kann aber auch im Sinne eines zytotoxischen Ödems durch den Verlust der Zell-Homöostase und folglich einer Zunahme intrazellulärer Flüssigkeit durch Toxine (Braun, J. S. et al., 2002; Koedel, U. et al., 2002a) oder Ischämie bedingt sein. Aufgrund einer Blockierung der Liquorresorption bei entzündeten Arachnoidalzotten kann zudem ein Hydrozephalus beziehungsweise ein interstitielles Ödem in Folge entstehen (Koedel, U. et al., 2002a; Scheld, W. M. et al., 1980). Neben dem Hirnödem kann eine Vielzahl weiterer Komplikationen wie ein vermehrtes Blutvolumen im Gehirn einen erhöhten intrakraniellen Druck verursachen. Dieser resultiert wiederum oftmals in einer zerebralen Herniation sowie einer Perfusionsabnahme mit Untergang von Hirngewebe im Sinne einer indirekten Zytotoxizität, was letztendlich zum Tode führen kann (Gerber, J. und Nau, R., 2010; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2010a; b; Rorke, L. B. und Pitts, F. W., 1963; Weber, J. R. und Tuomanen, E. I., 2007).

In den vergangenen Jahren hat sich das Verständnis der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis, wie im Folgenden dargestellt, als Grundlage für die Entstehung dieser Komplikationen, insbesondere aufgrund von tierexperimentellen Studien erheblich verbessert (Höhne, C. L., 2015; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010b; Wache, C., 2015).

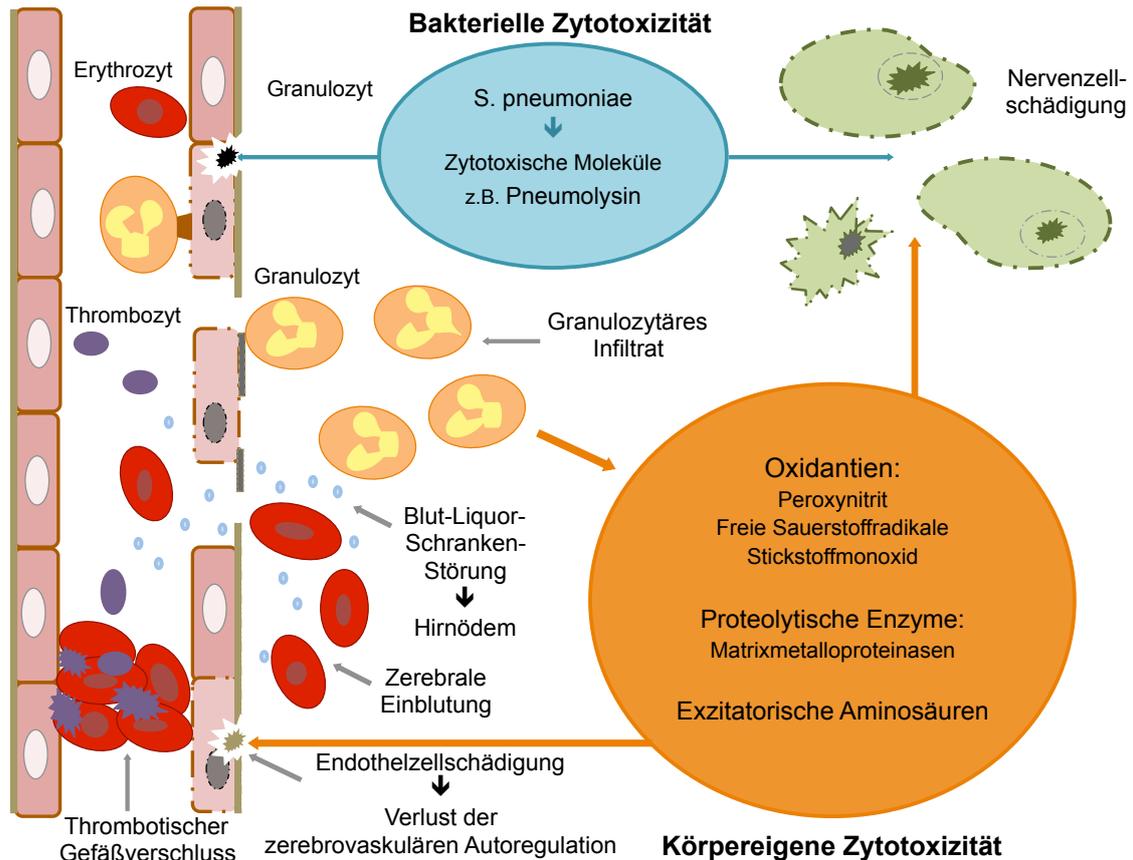


Abbildung (Abb.) 1: Neuropathologische Grundlagen der Gewebeschädigung bei der Pneumokokkenmeningitis (auf Grundlage von Koedel, U. et al., 2009b).

Das neuropathologische Korrelat der Folgeschäden bei der Pneumokokkenmeningitis sind Gewebeuntergänge in verschiedenen Hirnregionen, welche einerseits direkt durch bakterielle zytotoxische Produkte wie Pneumolysin (PLY) und andererseits durch eine körpereigene Toxizität verursacht werden. Insbesondere eine protrahierte neutrophile Entzündungsreaktion bedingt die direkte Gewebeschädigung der Nervenzellen, Gefäße und der Blut-Hirn-Schranke (BHS) im Sinne von „Kollateralschäden“ durch zytotoxische Moleküle in Form von Oxidantien, proteolytischen Enzymen sowie exzitatorischen Aminosäuren. Neben der resultierenden Störung der Blut-Hirn-/Liquor-Schranke kommt es zu zerebralen Gefäßkomplika­tionen wie thrombotischen Gefäßverschlüssen sowie einem Verlust der zerebrovaskulären Autoregulation. Nach Zusammenbruch der BHS können Plasmabestandteile in das Gewebe übertreten und ein Hirnödem verursachen. Aus der Vielzahl an Komplikationen kann ein erhöhter intrakranieller Druck resultieren, welcher die Gefahr einer indirekten Schädigung des Hirngewebes und letztendlich des Todes mit sich bringt. Details siehe Text.

1.4.2 Von der Kolonisation zur Infektion

In einer Vielzahl der Fälle ist die Kolonisation des Nasopharynx durch *S. pneumoniae* die Voraussetzung für die Entstehung der bakteriellen Meningitis (Koedel, U. et al., 2002a). Die Ausbreitung der Pneumokokken erfolgt anschließend entweder hämatogen im Rahmen einer Bakteriämie oder kontinuierlich über einen Infektionsherd wie einer Sinusitis, Otitis oder Mastoiditis (Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010b; Liechti, F. D., Grandgirard, D. & Leib, S. L., 2015). Man hat herausgefunden, dass die Infektion des Liquorraums bei Kindern meist über eine Streuung in die Blutbahn erfolgt,

während bei Erwachsenen oft ein zwischengeschalteter Infektionsherd vorliegt (Fuglsang-Damgaard, D. et al., 2008; Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010b). In seltenen Fällen kann eine Infektion auch auf direktem Weg über ein Duraleck posttraumatisch oder nach neurochirurgischen Eingriffen entstehen (Koedel, U. et al., 2002a; Van de Beek, D. et al., 2010).

Zur Kolonisation der Mukosa im Nasopharynx über Adhäsion und für den anschließenden Übertritt in die Blutbahn als Voraussetzung für eine hämatogene Streuung bedarf es des Zusammenspiels einer Vielzahl von bakteriellen Oberflächenproteinen. Insgesamt sind davon mehr als 500 bei *S. pneumoniae* vorhanden (Koedel, U. et al., 2002a; Wizemann, T. M. et al., 2001). Zum Überleben in der Blutbahn dienen den Pneumokokken anschließend verschiedene Virulenzfaktoren, wobei eine den Erreger umgebende Polysaccharid-Kapsel vermutlich den wichtigsten dieser Gruppe darstellt. Sie schützt das Bakterium vor der Wirtsabwehr durch Verhinderung der Opsonophagozytose (Austrian, R., 1981; Koedel, U. et al., 2002a; Morona, J. K. et al., 2000), welche durch das Zusammenwirken von Faktoren wie C-reaktives Protein (CRP), Teilen des Komplementsystems wie C3b und immunkompetenten Zellen wie neutrophilen Granulozyten erfolgt (Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Morona, J. K. et al., 2000; Thomas-Rudolph, D. et al., 2007; Van de Beek, D. et al., 2016). Um schließlich Zugang zu den Meningen zu erhalten, müssen die Erreger die physiologische Barriere zwischen Blutstrom und Zentralem Nervensystem (ZNS), bestehend aus der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Liquor-Schranke, überwinden (Koedel, U. et al., 2002a; Li, J. Y. et al., 2001; Owens, T. et al., 2008; Palmer, A. M., 2010; Rubin, L. und Staddon, J., 1999; Wong, A. D. et al., 2013). Studien legen nahe, dass dabei der transzelluläre Transport durch die Endothelzellen der BHS über Internalisierung mit Hilfe von Phosphorylcholin und dem Plättchenaktivierungsfaktor (PAF) - Rezeptor den bevorzugten Weg der Pneumokokken darstellt (Cundell, D. R. et al., 1995; Koedel, U. et al., 2002a; Mook-Kanamori, B. B. et al., 2011; Ring, A. et al., 1998).

Im Subarachnoidalraum angekommen, bietet sich den Pneumokokken ein äußerst günstiges Milieu zur ungestörten Vermehrung bis zum Erreichen hoher Bakterientiter (Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010b; Small, P. et al., 1986). Das Immunsystem kann offensichtlich gegen die bekapselten Erreger nicht effizient genug vorgehen (Koedel, U. et al., 2002a; Liechti, F. D., Grandgirard, D. & Leib, S. L., 2015; Van de Beek, D. et al., 2016). Dies ist dem Umstand geschuldet, dass bis zum Zeitpunkt der Infektion nur wenige Abwehrmechanismen im Liquorraum vorhanden sind. Es mangelt an immunkompetenten Zellen wie polymorphkernigen Leukozyten, ortständigen Makrophagen und dendritischen Zellen (Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Niederkorn, J. Y., 2006). Es gibt zudem einen Mangel an löslichen Mustererkennungsrezeptoren (*pathogen recognition receptors*, PRRs) wie CRP und Komplementfaktoren, welche dem Erkennen der Erreger

dienen und als unspezifische Opsonine eine Phagozytose ermöglichen (Dujardin, B. et al., 1985; Ekdahl, K. et al., 1995; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010b; Roy, S. et al., 2002; Simberkoff, M. S. et al., 1980; Stahel, P. F. et al., 1997). Aber auch pathogenspezifische Opsonine wie Immunglobuline sind im Liquorraum kaum vorzufinden (Janoff, E. N. und Rubins, J. B., 1997; Koedel, U. et al., 2002a; Simberkoff, M. S. et al., 1980; Smith, H. et al., 1973). Die Blut-Hirn-/Liquorschranke hindert den Großteil derartiger Bestandteile im Blut am Übertritt in den Liquorraum, sodass die Abwehrmechanismen stets nur mit Verzögerung in Kraft treten können (Koedel, U. et al., 2010b; Pachter, J. S. et al., 2003). Außerdem verfügt der Liquor über eine Vielzahl an anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Faktoren, durch welche eine Immunreaktion wiederum aktiv unterdrückt werden kann (Koedel, U. et al., 2010b; Niederkorn, J. Y., 2006). Somit kann man das ZNS und den umgebenden Liquorraum als eine Körperregion bezeichnen (Koedel, U. et al., 2010b; Niederkorn, J. Y., 2006; Ransohoff, R. M. und Brown, M. A., 2012), deren Umgebungsfaktoren den Pneumokokken ein nahezu ungehindertes Wachstum ermöglichen (Koedel, U. et al., 2010b; Small, P. et al., 1986).

1.4.3 Aktivierung und Verstärkung der Immunreaktion im Liquorraum

Gegen Ende dieser Wachstumsphase und als Reaktion auf schlechtere Wachstumsbedingungen durch Mangel an Nährstoffen und einem sauren zytotoxischen Milieu bei erhöhter Bakteriendichte wird bei den Bakterien eine Autolyse durch Zellwandenzyme initiiert (Kadioglu, A. et al., 2008; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010b; Lewis, K., 2000; Shockman, G. et al., 1996; Tomasz, A. et al., 1988). Durch diese Selbstaflösung der Erreger kommt es zur Freisetzung subkapsulärer Zellwandbestandteile wie Peptidoglykan (PG), Lipoteichonsäure (LTA), bakterieller DNA und dem Virulenzfaktor Pneumolysin (Fischer, H. und Tomasz, A., 1984; Grandgirard, D. et al., 2007; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010b; Moscoso, M. und Claverys, J. P., 2004). Die freigesetzten Bakterienbestandteile dienen als sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs), welche durch PRRs auf und in immunkompetenten Zellen erkannt werden können, was letztendlich eine Immunreaktion initiiert (Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010a; b; Van de Beek, D. et al., 2016). Zu den PRRs zählen unter anderem die Mitglieder der Toll-like-Rezeptor (TLR) - Familie wie insbesondere TLR2, TLR4 und TLR9 (Beutler, B. A., 2009; Bsibsi, M. et al., 2002; Hanke, M. L. und Kielian, T., 2011; Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U., 2009; Koedel, U. et al., 2010a; b; Letiembre, M. et al., 2007; Van de Beek, D. et al., 2016) sowie die NOD-like-Rezeptoren (*nucleotide binding oligomerization domain-like receptors*, NLRs) wie NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) (Chen, G. et al.,

2009; Koedel, U. et al., 2009b; Schroder, K. und Tschopp, J., 2010; Van de Beek, D. et al., 2016). Beispielsweise werden die Zellwandbestandteile Peptidoglykan und Lipoteichonsäure von TLR2 erkannt (Echchannaoui, H. et al., 2002; Klein, M. et al., 2008; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2003; Koedel, U., 2009; Koedel, U. et al., 2010a; b; Schroder, N. et al., 2003; Yoshimura, A. et al., 1999), während Pneumolysin als Ligand für TLR4 und NLRP3 fungiert (Klein, M. et al., 2008; Malley, R. et al., 2003; McNeela, E. A. et al., 2010; Witzentrath, M. et al., 2011) und TLR9 wiederum mit der Bakterien-DNA interagiert (Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U., 2009; Koedel, U. et al., 2010a; b; Mogensen, T. H. et al., 2006). Vermutlich ist jedoch das Zusammenspiel der Rezeptorgruppen für die Immunantwort von Bedeutung. Klein et al. konnten 2008 im Mausmodell zeigen, dass lediglich bei Tieren mit gleichzeitiger Defizienz sowohl an TLR2 als auch TLR4, aber nicht bei reinem Fehlen jeweils einer der beiden Rezeptortypen oder anderer Rezeptoren wie TLR9, eine verminderte Immunantwort im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen resultierte (Klein, M. et al., 2008; Koedel, U. et al., 2010a).

Andere Studien zeigten, dass es neben den PAMPs noch eine weitere Gruppe molekularer Muster gibt, welche die Entzündungsreaktion auf verschiedenste Weise fördern können: die Schaden-assoziierten molekularen Muster, genannt DAMPs (*damage associated pathogen patterns*) (Bianchi, M. E., 2007; Höhne, C. et al., 2013; Kono, H. und Rock, K. L., 2008; Matzinger, P., 2007; Meylan, E. et al., 2006; Wache, C. et al., 2015). Während PAMPs als exogene Muster und somit insbesondere bei infektiologischen Erkrankungen eine Rolle spielen, können die DAMPs als endogene Alarmsignale aufgefasst werden (Bianchi, M. E., 2007). Deren Freisetzung aus körpereigenen Zellen resultiert als Reaktion auf jegliche Gewebeschädigung wie Ischämie oder Trauma, extreme Temperaturen oder Chemotherapeutika und führt letztendlich zu einer Entzündung (Bianchi, M. E., 2007; Wache, C. et al., 2015). Aber auch immunkompetente Zellen wie Makrophagen und Granulozyten können endogene Alarmsignale stressbedingt oder durch Kontakt mit Entzündungsmediatoren sezernieren (Dumitriu, I. E. et al., 2005; Höhne, C. L., 2015; Ryckman, C. et al., 2003; Voganatsi, A. et al., 2001; Wache, C., 2015). Da die Freisetzung unabhängig von der Ursache sowohl Erreger-bedingt als auch nicht-infektiös ausgelöst werden kann, kann man den Begriff der DAMPs auch als übergeordnete Bezeichnung für Alarmsignale auffassen (Bianchi, M. E., 2007). Im engeren Sinne versteht man unter den DAMPs aber endogene Alarmsignale, zu welchen unter anderem High mobility group box 1 (HMGB1), die S100-Proteine wie *Myeloid-related protein 14* (MRP14), Hitzeschockproteine, *Hepatoma-derived growth factor* (HDGF), IL-1 α und Harnsäure gezählt werden können (Bianchi, M. E., 2007; Höhne, C. et al., 2013; Wache, C. et al., 2015).

Über die Interaktion zwischen den PAMPs mit TLRs kommt es mit Hilfe des intrazellulären Adaptermoleküls *Myeloid differentiation primary response protein 88* (Myd88) (Koedel, U. et

al., 2004; Von Bernuth, H. et al., 2008) zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie dem Nuklearfaktor (NF) - κ B (Koedel, U. et al., 2000) und dem Aktivatorprotein (AP) - 1 (Koedel, U. et al., 2009b; Tsuchiya, K. et al., 2007). Koedel, U. et al. (2004) konnten im Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis zeigen, dass MyD88-defiziente Mäuse 24 Stunden nach intrazisternaler (*intracisternal*, i.c.) Infektion eine eingeschränkte Immunabwehr beziehungsweise verminderte Entzündungsreaktion aufwiesen mit einer geringeren Einwanderung von Leukozyten und verminderten Expression von Immunmodulatoren und folglich höheren Bakterientitern (Koedel, U. et al., 2004; Koedel, U. et al., 2010b). Grund ist, dass die Myd88-Defizienz zu einer verringerten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt, die zunächst die Expression zahlreicher Gene steuern, welche wiederum für entzündungsfördernde Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Chemokine wie (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) und einzelne Adhäsionsmoleküle kodieren (Hatada, E. N. et al., 2000; Hoegen, T. et al., 2011; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2002b; Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010b; Nau, R. und Brück, W., 2002; Tak, P. P. und Firestein, G. S., 2001; Weber, J. R. und Tuomanen, E. I., 2007; Zwijnenburg, P. J. G. et al., 2003; Zwijnenburg, P. J. et al., 2006). So ist IL-1 β eines der Zytokine, welche die Entzündungsreaktion in der Entstehungsphase der Pneumokokkenmeningitis initiieren und auch bei IL-6 wird eine Produktion in den ersten 24 Stunden beobachtet (Klein, M. et al., 2006b; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2002b; Paul, R. et al., 2003; Waage, A. et al., 1989). Ausgelöst durch eine Interaktion mit PAMPs kommt es über eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, welches unter anderem aus NLRP3 und dem Adaptermolekül *Apoptosis associated speck like protein* (ASC) gebildet wird, wiederum zu einer Aktivierung der Cysteinprotease Caspase-1 (Casp1) (Franchi, L. et al., 2009; Hoegen, T. et al., 2011; Koedel, U. et al., 2002b; McNeela, E. A. et al., 2010; Tschopp, J. und Schroder, K., 2010). Die aktivierte Casp1 überführt anschließend das biologisch inaktive Vorläufermolekül pro-IL-1 β durch Spaltung in seine aktive Form (Hoegen, T. et al., 2011; Koedel, U. et al., 2002b; McNeela, E. A. et al., 2010). Aufgrund dieser Schritte kann man bei IL-1 β im Gegensatz zu anderen Interleukinen wie etwa IL-6, bei denen keine Zwischenschritte geschaltet sind, von einer Zweistufen-Aktivierung in Abhängigkeit von NLRP3 sprechen (Ferrari, D. et al., 2006; Franchi, L. et al., 2009; Hoegen, T. et al., 2011; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2002b; Tschopp, J. und Schroder, K., 2010). Durch Bindung an spezifische IL-1-Rezeptoren trägt die aktive Form des IL-1 β im Sinne eines positiven Rückkopplungs-Mechanismus zur Aufrechterhaltung und Verstärkung der MyD-88-abhängigen Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und dadurch zu einer fortlaufenden Bildung von Immunmediatoren bei (Koedel, U. et al., 2010b). Als Konsequenz der hohen Konzentrationen dieser Mediatoren werden ursprünglich im Blut lokalisierte

aktivierte Leukozyten – vordergründig Neutrophile – in großer Zahl mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen in die Leptomeningen rekrutiert (Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2004; Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010b; Kubes, P. und Ward, P. A., 2000; Wagner, J. G. und Roth, R. A., 2000).

Über einen weiteren MyD88 abhängigen Signalweg kommt es parallel zur Neutrophileninfiltration zu einer Hochregulation der zerebralen Expression von Komplementfaktoren wie C3, welche insbesondere bei Primärfektionen mit Pneumokokken entscheidend für Opsonierung und Phagozytose sind (Brown, J. S. et al., 2002; Koedel, U. et al., 2009b; Rupprecht, T. A. et al., 2007). Jedoch gelingt den Abwehrzellen nur eine partielle Eliminierung der Erreger, so dass dieser Abwehrmechanismus im Liquorraum lediglich beschränkt zum Erfolg führt (Ernst, J. D. et al., 1983; Koedel, U. et al., 2009b). Durch die Produktion von terminalen Komplementfaktoren, insbesondere Anaphylatoxin C5a, wird die Immunreaktion jedoch kontinuierlich weiter verstärkt (Ernst, J. et al., 1984; Woehrl, B. et al., 2011). Die aktivierten Neutrophilen setzen als weitere Waffen, wie bereits erwähnt, eine Vielzahl zytotoxischer Faktoren wie Matrixmetalloproteinasen und reaktive Sauerstoffspezies frei, mit dem Ziel die Erreger abzutöten, wodurch große Schäden an den benachbarten Wirtszellen verursacht werden können (Kim, K. S., 2003; Klein, M. et al., 2006a; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010b; Nau, R. und Brück, W., 2002). In Folge der Erregerpersistenz, der folglich andauernden Produktion proinflammatorischer Moleküle und einer niedrigen Apoptoserate der eingewanderten Leukozyten (Coxon, A. et al., 1999; Klein, M. et al., 2006a; Koedel, U. et al., 2009b) entwickeln sich schließlich die neuropathologisch charakteristischen granulozytären Infiltrate im Subarachnoidalraum.

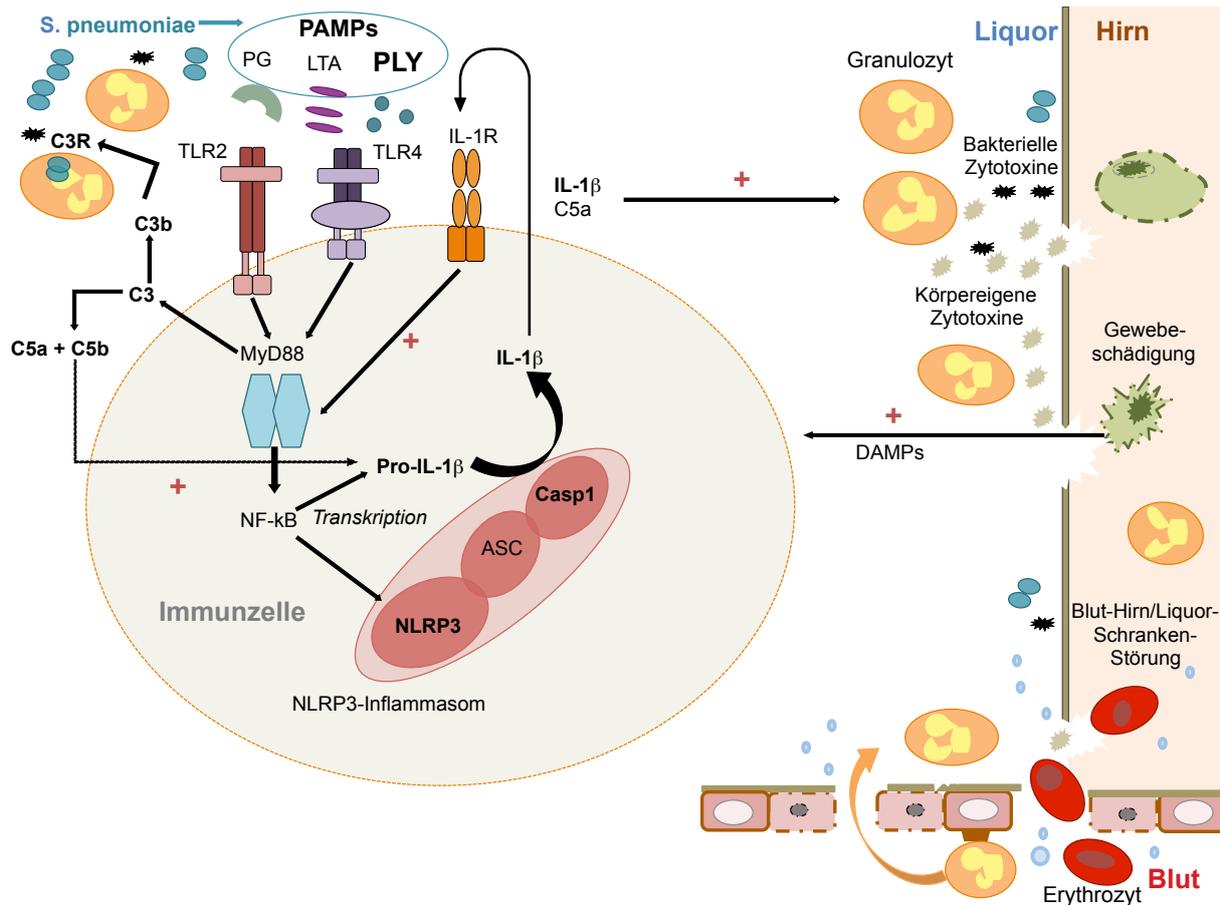


Abb. 2: Pathophysiologie der Immunreaktion im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis (auf Grundlage von Koedel, U. et al., 2010b)

Bakterienbestandteile wie Peptidoglykan (PG), Lipoteichonsäure (LTA) oder Pneumolysin (PLY) dienen als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), welche durch Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) auf Immunzellen erkannt werden und eine Immunreaktion initiieren. Zu den PRRs zählen Mitglieder der Toll-like-Rezeptor (TLR) - Familie insbesondere TLR2 und TLR4 sowie NOD-like-Rezeptoren wie NLRP3. Folglich kommt es über das intrazelluläre Adaptermolekül Myd88 zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Nuklearfaktor (NF)- κ B. Darüber wird die Expression von Genen, kodierend für NLRP3 oder entzündungsfördernde Zytokine wie Interleukin (IL) - 1β gesteuert. Die Interaktion der PAMPs mit dem NLRP3-Inflammasom hat eine Aktivierung von Caspase-1 (Casp1) zur Folge. Dieses spaltet pro-IL- 1β in seine aktive Form. IL- 1β trägt durch Bindung an IL-1-Rezeptoren (IL-1R) über eine positive Rückkopplung zur Verstärkung der MyD-88-abhängigen Bildung von Immunmediatoren bei. Als Konsequenz auf deren hohe Konzentrationen werden Leukozyten aus dem Blut in die Leptomeningen rekrutiert. Über einen weiteren MyD88-abhängigen Signalweg kommt es parallel zur Hochregulation der Expression von Komplementfaktoren wie C3, welche entscheidend für Opsonierung und Phagozytose sind. Durch terminale Komplementfaktoren wie C5a wird die Immunreaktion weiter verstärkt. Auch die Freisetzung von Schaden-assoziierten molekularen Mustern (DAMPs) bei Gewebeschädigung sowie durch immunkompetente Zellen kann die Entzündungsreaktion auf verschiedenste Weise fördern. Aktivierte Neutrophile setzen schließlich zytotoxische Faktoren mit möglichen Folgeschäden benachbarter Zellen frei. Details siehe Text.

Da die Pathogene durch die körpereigene Immunabwehr nicht ausreichend eliminiert werden können, führen unbehandelte Meningitiden durch Pneumokokken grundsätzlich zum Tod (Gerber, J. et al., 2001; Koedel, U. et al., 2009b; Toomey, J. und Roach, F., 1939; Tripoli, C.

J., 1936). Indem man das Immunsystem durch eine Therapie mit Antibiotika unterstützt, resultiert aus der induzierten bakteriellen Lyse eine weitere Freisetzung großer Mengen an PAMPs und daraus folgend sogar eine vorübergehende Entzündungsverstärkung („inflammatory burst“) (Klein, M. et al., 2006b; Koedel, U. et al., 2009b; Tuomanen, E. et al., 1985). Trotz einer effizienten antimikrobiellen Behandlung kommt es somit nur sehr verzögert zu einem Abklingen der Entzündungsreaktion im Liquorraum, was eine fortlaufende Ausweitung der Gewebeschädigung bedingt (Arevalo, C. E. et al., 1989; Blazer, S. et al., 1983; Gerber, J. et al., 2001; Klein, M. et al., 2006b; Koedel, U. et al., 2009b; Viallon, A. et al., 2005).

Wie durch Daten von Patienten (Mustafa, M. M. et al., 1989) und aus Tierexperimenten (Saukkonen, K. et al., 1990; Zwijnenburg, P. J. G. et al., 2003) belegt worden ist, spielt die exzessive Produktion des Zytokins IL-1 β eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis. So konnte beispielsweise eine Korrelation erhöhter Konzentrationen an IL-1 β in Liquorproben von Patienten mit einem ungünstigem Krankheitsverlauf nachgewiesen werden (Lopez-Cortes, L. et al., 1993; McCracken Jr, G. H. et al., 1989; Mustafa, M. M. et al., 1989; Ramilo, O. et al., 1989; Täuber, M. G. und Moser, B., 1999). Damit übereinstimmend wurde von unserer Arbeitsgruppe in früheren Untersuchungen herausgefunden, dass Mäuse mit einem Mangel an Casp1 eine stark verminderte, körpereigene Entzündungsantwort auf die Pneumokokken im Liquor aufweisen (Koedel, U. et al., 2002b). Es wurde weiterhin gezeigt, dass ein Mangel an den Inflammasom-Bestandteilen NLRP3 oder ASC, welche wesentlich an der Casp1-Aktivierung beteiligt sind, in einer reduzierten Entzündung des Gehirns bei der murinen Pneumokokkenmeningitis resultiert (Hoegen, T. et al., 2011). Darüber hinaus wurde in zellkulturellen Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus des NLRP3-Inflammasoms bei der Verwendung der humanen differenzierten Monozyten-Zelllinie THP-1 beobachtet, dass die Freisetzung von IL-1 β zeitlich mit einem Anstieg der Casp1-Aktivität und der Konzentration von extrazellulärem Adenosintriphosphat (eATP) assoziiert ist sowie die Inhibierung des ATP-Signalweges durch Behandlung mit dem Purinorezeptor-Antagonisten oxidiertes ATP (ox-ATP) (Colomar, A. et al., 2003; Di Virgilio, F., 2003) die IL-1 β -Bildung abschwächt (Hoegen, T. et al., 2011).

Karmakar, M. et al. (2016) konnten kürzlich zeigen, dass humane und murine neutrophile Granulozyten über einen NLRP3-Inflammasom abhängigen Signalweg IL-1 β als Antwort auf die Detektion von eATP während einer Pneumokokkeninfektion der Kornea sezernieren.

1.5 ATP und purinerge Signalwege bei der Pneumokokkenmeningitis

1.5.1 ATP als möglicher Regulator der Immunreaktion

ATP ist ein natürliches Nukleotid, welches normalerweise in jeder lebenden Zelle in relativ hohen Mengen vorkommt, wohingegen seine extrazellulären Konzentrationen im gesunden Gewebe deutlich geringer sind (Bours, M. J. et al., 2006; Idzko, M. et al., 2014b; Vitiello, L. et al., 2012). Unter physiologischen Umständen dient ein vorübergehender Anstieg der extrazellulären ATP-Konzentration zur interzellulären Kommunikation im Gefäß-, Nerven-, und Immunsystem (Abbraccio, M. P. et al., 2009; Junger, W. G., 2011). Unter pathologischen Bedingungen wie Trauma (Choo, A. M. et al., 2013; Davalos, D. et al., 2005; Franke, H. et al., 2006; Wang, X. et al., 2004), Ischämie, Hypoxie (Dale, N. und Frenguelli, B. G., 2009; Jurányi, Z. et al., 1999; Lutz, P. L. und Kabler, S., 1997; Melani, A. et al., 2006), Epilepsie-assoziierten Anfällen (Dale, N. und Frenguelli, B. G., 2009; Wieraszko, A. et al., 1989) und Inflammation (Vitiello, L. et al., 2012) können hingegen große Mengen an ATP aus intrazellulären Speichern in den Extrazellulärraum freigesetzt werden (Rodrigues, R. J. et al., 2015). Die Translokation von ATP vom inneren in den äußeren Raum kann dabei über zwei separate Mechanismen bewerkstelligt werden. Einerseits können Entzündungszellen wie Granulozyten und Makrophagen, aber auch andere aktivierte beziehungsweise gestresste Zellen ATP über Pannexin- oder Connexin-Membrankanäle reguliert sezernieren. Zum anderen kann ATP passiv aus sterbenden Zellen nach Zerfall der Kern- und Zellmembran freigesetzt werden. Ein Konzentrationsanstieg kann aber auch indirekt durch eine reduzierte Expression und Aktivität von Ektonukleotidasen verursacht werden (Idzko, M. et al., 2014a; Junger, W. G., 2011; Vitiello, L. et al., 2012). Ektonukleotidasen wie CD39, welches ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP), und CD73, welches schließlich AMP zu Adenosin dephosphoryliert, dienen dadurch der physiologischen Regulation der extrazellulären Nukleotid-Spiegel (Burnstock, G., 2008; Fang, F. et al., 2016; Trincavelli, M. et al., 2010; Vitiello, L. et al., 2012; Yegutkin, G. G., 2008). Die akute Freisetzung großer Mengen an ATP kann vom Immunsystem schließlich als Zeichen einer Gefahrensituation aufgefasst werden. Extrazelluläres ATP kann somit die Rolle eines endogenen Alarmsignals einnehmen und die Aktivierung von Immunzellen sowie eine Entzündungsreaktion fördern (Bours, M. J. et al., 2006; Kaufmann, A. et al., 2005; Ramakers, B. P. et al., 2011; Vitiello, L. et al., 2012; Willart, M. A. und Lambrecht, B. N., 2009). Zusammenfassend sieht man, dass ATP alle notwendigen Eigenschaften eines Alarmsignals besitzt: Es liegt im Zellinneren in hohen Konzentrationen von etwa 5 - 10 mM vor, während die Konzentrationen im Extrazellulärraum mit weniger als 1 μ M niedrig sind. Darüber hinaus kann ATP sowohl reguliert als auch passiv schnell aus dem Zellinneren freigesetzt werden. Im extrazellulären Raum kann es wiederum schnell durch spezifische

Enzyme degradiert werden, was für eine Terminierung des Alarmsignals wichtig ist, und seine extrazelluläre Präsenz wird durch spezifische Rezeptoren erkannt, welche mitunter auf Immunzellen exprimiert werden (Di Virgilio, F. et al., 2009).

1.5.2 Die Funktion der P2-Rezeptoren

Seine Funktion als Warnsignal im extrazellulären Raum kann ATP direkt durch Aktivierung von zwei verschiedenen Unterfamilien von Plasmamembran-Rezeptoren aus der Gruppe der P2-Rezeptoren (P2R) erfüllen, den P2X- und P2Y-Rezeptoren (Idzko, M. et al., 2014a; Vitiello, L. et al., 2012). Die ionotropen P2X-Rezeptoren wie *P2X4* und *P2X7* funktionieren dabei als ATP-gesteuerte Kationenkanäle. Dahingegen können die metabotropen G-Proteingekoppelten P2Y-Rezeptoren wie *P2Y2* und *P2Y6* neben ATP auch mit anderen Nukleotiden wie Uridintriphosphat (UTP) interagieren. Die Purinorezeptoren werden dabei von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert, sodass das jeweilige Expressionsmuster einen bedeutenden Einfluss auf die vermittelten Effekte des Nukleotids hat (Bours, M. J. et al., 2006; Gessi, S. et al., 2011; Vitiello, L. et al., 2012). Neben den P2-Rezeptoren exprimiert ein Großteil der immunkompetenten Zellen aber auch P1-Rezeptoren (P1R), welche extrazelluläres Adenosin als Abbauprodukt von ATP mit jeweils unterschiedlichen Effekten binden (Bours, M. J. et al., 2006). Grundsätzlich scheint die Wirkung extrazellulärer Nukleotide letztlich neben der freigesetzten Menge an ATP und seinem Abbau durch Ektonukleotidasen (Blackburn, M. R. et al., 2009; Bours, M. J. et al., 2006; Di Virgilio, F. et al., 2009) stark von der Rezeptordichte abzuhängen, welche im Verlauf der Immunreaktion auch variieren kann (Bours, M. J. et al., 2006; Gessi, S. et al., 2011; Vitiello, L. et al., 2012). Wie bereits angesprochen, wird der P2R-Signalweg schließlich durch Diffusion des Liganden von der Bindestelle und der anschließenden Phosphohydrolyse, welche unter Kontrolle der spezifischen Ektonukleotidasen CD39 und CD73 steht, terminiert (Idzko, M. et al., 2014b; Idzko, M. et al., 2014a; Vitiello, L. et al., 2012). Die Mitglieder beider P2R-Familien sind in der Modulierung der Immunantwort durch eine Vielzahl von Mechanismen involviert. Dies schließt sowohl die Regulierung der Funktion von Neutrophilen wie Adhärenz, Chemotaxis, Phagozytose und Freisetzung oxidativer Sauerstoffspezies als auch von Makrophagen wie nicht-gerichtete Migration, phagozytäre Beseitigung von apoptotischen Zellen und Zytokin-Freisetzung insbesondere von IL-1 β ein (Idzko, M. et al., 2014b; Idzko, M. et al., 2014a; Vitiello, L. et al., 2012).

Der *P2X7*-Rezeptor nimmt in der Gruppe oder Familie an Purinorezeptoren eine Sonderstellung ein. Bei niedrigen Konzentrationen extrazellulären ATPs im mikromolaren Bereich übernimmt der *P2X7*-Rezeptor die Funktion eines Ionenkanals, wohingegen er bei Konzentrationen im millimolaren Bereich irreversible Membranporen ausbildet. Dadurch wird

ein unspezifischer Einstrom von Molekülen mit einer Größe bis zu 1 Kilodalton (kDa) in das Zytoplasma ermöglicht (Friedle, S. A. et al., 2010). Durch diesen Einstrom geht die intrazelluläre Homöostase verloren, was letztlich im Zelltod resultieren kann. Wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, ist dieser Mechanismus etwa an der Entstehung des sekundären Gewebeschadens nach Rückenmarkstrauma mitbeteiligt (Peng, W. et al., 2009; Wang, X. et al., 2004). Darüber hinaus werden über *P2X7*-Rezeptoren verschiedene entzündungsfördernde Effekte vermittelt. So fördert die Interaktion von eATP mit *P2X7*-Rezeptoren die Freisetzung zahlreicher Zytokine wie insbesondere IL-1 β und IL-6 und Chemokine sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch Makrophagen und Mikrogliazellen (Kahlenberg, J. M. und Dubyak, G. R., 2004a; Kahlenberg, J. M. und Dubyak, G. R., 2004b; Kawamura, H. et al., 2012; Parvathenani, L. K. et al., 2003; Solle, M. et al., 2001). Wie durch Untersuchungen im Tiermodell nachgewiesen werden konnte, tragen ATP-*P2X7*-abhängige Signalwege entscheidend sowohl zur Inflammationsreaktion als auch zur Gewebedestruktion nach Ischämie oder Hypoxie, bei Hypersensitivitätsreaktionen, Transplantatabstoßungen, Tabakrauch-induziertem Lungenemphysem oder Bleomycin-induzierter Lungenfibrose bei (Cicko, S. et al., 2010; Kharlamov, A. et al., 2002; Muller, T. et al., 2011; Riteau, N. et al., 2010; Weber, F. C. et al., 2010; Wilhelm, K. et al., 2010; Yu, Y. et al., 2009).

Andere Vertreter aus der P2-Rezeptorfamilie, wie *P2X4*, *P2Y2*, oder *P2Y6*, sind ebenfalls an immunregulatorischen Prozessen beteiligt. Über die Aktivierung von *P2X4*-Rezeptoren ist eATP an der Auslösung der gerichteten Wanderung von Mikrogliazellen zu und in Läsionsareale mitbeteiligt (Haynes, S. E. et al., 2006; Ohsawa, K. et al., 2007), wobei gezeigt werden konnte, dass *P2X4*-Rezeptoren auch *P2X7*-vermittelte Effekte wie die Freisetzung von IL-1 β oder HMGB1 modulieren können (Kawano, A. et al., 2012). Der *P2Y2*-Rezeptor-Subtyp steuert mitunter die Migration von Neutrophilen entlang eines chemotaktischen Gradienten und ist auch an der Aktivierung der Zellen involviert (Chen, Y. et al., 2006; Chen, Y. et al., 2010). Die mikrogliale Phagozytose von Zelldebris wird durch den *P2Y6*-Rezeptor durch Bindung von Uridindiphosphat (UDP) angestoßen (Koizumi, S. et al., 2007), wohingegen die Stimulation von *P2Y6*-Rezeptoren auf Makrophagen beziehungsweise Monozyten zu einer verstärkten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und somit einer vermehrten Expression von Immunmediatoren wie IL-1 β oder CXCL-2 führen kann (Bar, I. et al., 2008). Wie Riegel, A. K. et al. (2011) zeigen konnten, ist naheliegend, dass *P2Y6*-Rezeptoren auf Endothelzellen auch eine wichtige Rolle bei der vaskulären Entzündungsreaktionen nach systemischer Applikation bakterieller Lipopolysaccharide (LPS) im Mausmodell spielen.

1.5.3 Die Rolle von ATP bei der Pneumokokkenmeningitis

Die Rolle des P2R-Signalweges bei bakteriellen Infektionen des Gehirns und der Meningen ist noch weitestgehend unbekannt, da Untersuchungen zur diesbezüglichen ATP-Freisetzung in den Extrazellulärraum, zur Expression von Purinorezeptoren und zur Wirkung von P2-Rezeptorantagonisten fast vollständig fehlen. Studien in experimentellen Modellen dazu haben lediglich demonstriert, dass kortikale ATP-Spiegel dabei um etwa ein Viertel abnahmen und dieser Verlust von intrazellulärem ATP positiv mit dem Ausmaß der neuronalen Schädigung korrelierte (Ghielmetti, M. et al., 2003; Park, W. S. und Chang, Y. S., 2000). Wie bereits erwähnt, weisen einige Studien auf eine Rolle von eATP bei der Antwort von Makrophagen und Neutrophilen während der Pneumokokkeninfektion der Kornea und *in vitro* hin (Hoegen, T. et al., 2011; Karmakar, M. et al., 2016). Die vorliegende Studie zielte nun darauf ab, die funktionelle Relevanz von eATP in der Pneumokokkenmeningitis aufzuzeigen, welche eine verbreitete und sehr ernsthafte Form der Entzündung des Gehirns darstellt (World Health Organization, 2016). Dabei erhoffte man sich dadurch weitere Informationen bezüglich therapeutischer Ansatzpunkte bezogen auf die Pathophysiologie der Erkrankung zu erhalten.

2 Zielsetzung

Wie eingangs dargestellt, spielt neben bakteriellen zytotoxischen Produkten insbesondere die körpereigene überschießende Entzündungsreaktion eine Rolle bei den Gewebeschädigungen im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis (Gerber, J. und Nau, R., 2010; Hirst, R. et al., 2004; Koedel, U. et al., 2002a; Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010a; b; Nau, R. und Brück, W., 2002; Weber, J. R. und Tuomanen, E. I., 2007). Dies bedingt die teils massiven intrakraniellen Komplikationen, aufgrund derer der Großteil der Patienten mit signifikanten, neurologischen Langzeitfolgen leben muss und welche auch entscheidend zu tödlichen Verläufen beitragen (Christie, D. et al., 2011; Edmond, K. et al., 2010; Kastenbauer, S. und Pfister, H. W., 2003; Lucas, M. J. et al., 2016; Ramakrishnan, M. et al., 2009; Smith, A. L., 1988; Weisfelt, M. et al., 2006).

Eine wesentliche Schlüsselrolle bei der Immunpathogenese spielt das NLRP3-Inflammasom und seine Funktion bei der Aktivierung des IL-1 β mit Hilfe von Casp1 (Franchi, L. et al., 2009; Hoegen, T. et al., 2011; Koedel, U. et al., 2002b; McNeela, E. A. et al., 2010; Tschopp, J. und Schroder, K., 2010). Unsere Arbeitsgruppe konnte *in vitro* zeigen, dass neben dem Anstieg der Casp1-Aktivität zeitlich auch eine Zunahme der Konzentration von extrazellulärem ATP mit der Freisetzung von IL-1 β korreliert und die Inhibierung des ATP-Signalweges durch Behandlung mit dem Purinorezeptor-Antagonisten ox-ATP (Colomar, A. et al., 2003; Di Virgilio, F., 2003) die IL-1 β -Bildung abschwächt (Hoegen, T. et al., 2011).

Während es in Studien Hinweise auf eine Beteiligung von ATP bei der IL-1 β -Sekretion bei Pneumokokkeninfektionen der Kornea gab (Karmakar, M. et al., 2016), war die Rolle von ATP und der P2R-Signalwege bei der bakteriellen Meningitis noch weitestgehend unbekannt. Aus diesem Grund setzte man sich bei dieser Arbeit folgende Punkte zum Ziel:

- 1) Charakterisierung der ATP - Freisetzung und Purinorezeptor-Expression im Krankheitsverlauf einer experimentellen Pneumokokkenmeningitis (etabliertes Mausmodell).
- 2) Analyse der funktionellen Bedeutung purinerger Signalwege bei der Regulation der Entzündungsreaktion und der Entstehung Meningitis-assoziiertes intrakranieller Komplikationen.

3 Material und Methoden

Eine ausführliche Auflistung sämtlicher verwendeter Materialien im Rahmen der Studie ist dem Anhang der Dissertation zu entnehmen (siehe 8.2).

3.1 *In-vivo*-Versuche am Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis

Für die Experimente dieser Studie wurde ein gut etabliertes Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis verwendet, welches die entzündlichen Veränderungen und Meningitis-assoziierten intrakraniellen Komplikationen beim Menschen gut veranschaulicht und im Folgenden – in Anlehnung an Vorarbeiten der Arbeitsgruppe – näher beschrieben wird (Hoegen, T. et al., 2011; Höhne, C. et al., 2013; Höhne, C. L., 2015; Klein, M., 2004; Klein, M. et al., 2006b; Klein, M. et al., 2008; Koedel, U. et al., 2004; Koedel, U. et al., 2009a; Malipiero, U. et al., 2006; Murr, C., 2015; Oldenburg, M. et al., 2012; Rupprecht, T. A. et al., 2007; Tremel, N., 2014; Wache, C. et al., 2015; Wache, C., 2015; Woehrl, B. et al., 2011).

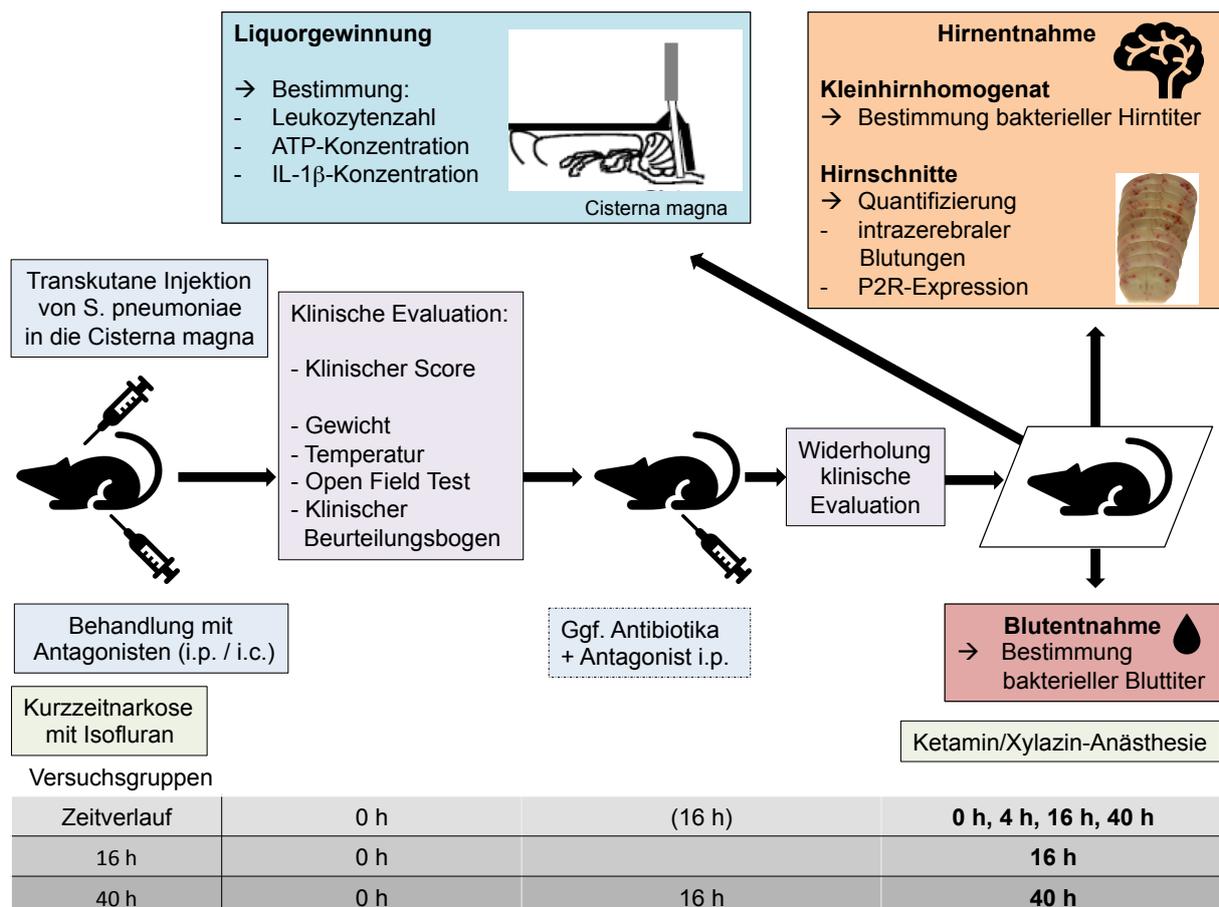


Abb. 3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs *in vivo* am Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis (auf Grundlage von Höhne, C. L., 2015)

Zu Beginn eines jeden Versuches (0 h), am jeweiligen Versuchsende vor Präparation der Tiere (0 h, 4 h, 16 h, 40 h) sowie in regelmäßigen Abständen dazwischen wurden die Mäuse einer klinischen Evaluation unterzogen. Nach Inhalationsnarkose mit Isofluran erfolgte die transkutane Injektion von *S.*

pneumoniae in die *Cisterna magna*. Danach wurde je nach Versuchsreihe der jeweilige Antagonist intraperitoneal (i.p.) oder intrazisternal (i.c.) verabreicht. Die Präparation der Versuchstiere wurde je nach Versuchsgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach tiefer Anästhesie mit Ketamin/Xylazin durchgeführt. Bei Präparation außerhalb eines 24 Stunden - Zeitfensters erhielten die Mäuse zudem 16 Stunden *post infectionem* eine antibiotische Therapie mit Ceftriaxon i.p. Über ein Bohrloch wurde ein Katheter in die Cisterna magna eingeführt, womit Liquorproben zur Bestimmung der Leukozytenzahl sowie den Konzentrationen an Interleukin-1 β (IL-1 β) und Adenosintriphosphat (ATP) gewonnen wurden. Die bakteriellen Titer wurden sowohl im Hirn als auch im Blut der Versuchstiere bestimmt. Aus den Großhirnen wurden mit Hilfe eines Kryomikrotoms koronare Gefrierschnitte zur Quantifizierung intrazerebraler Blutungen sowie zur Bestimmung der P2-Rezeptor (P2R) - Expression angefertigt.

3.1.1 Tierversuchsgenehmigung

Die Durchführung dieser Studie erfolgte unter strikter Einhaltung der Richtlinien zur Behandlung und Verwendung von Labortieren („*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*“, *Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA*) sowie dem Deutschen Tierschutzgesetz. Das Tierversuchsvorhaben wurde von der Tierschutzkommission der Regierung von Oberbayern genehmigt (Genehmigungsnummer: 55.2-1-54-2531-143-12).

3.1.2 Versuchstiere

Für sämtliche Versuche wurden ausschließlich ausgewachsene männliche Wildtypmäuse vom Stamm C57BL6/n von Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) verwendet.

3.1.3 Klinischer Score und klinische Untersuchung

Zu Beginn eines jeden Versuches (0 h), eine Stunde nach Infektion (1 h), am jeweiligen Versuchsende vor der Präparation der Tiere (0 h, 4 h, 16 h, 40 h) sowie in regelmäßigen Abschnitten dazwischen wurden die Mäuse einer klinischen Evaluation unterzogen.

Hierbei wurde zum einen ein klinischer Score erhoben, welcher (i) den Beam-Balance-Test, (ii) den Postural-Reflex-Test, (iii) den Fellstatus beziehungsweise die Piloerektion, (iv) das Auftreten von motorischen Anfällen sowie (v) die Vigilanz umfasste. Die Punktevergabe erfolgte dabei anhand eines modifizierten Punktesystems angelehnt an Vorarbeiten von Garcia, J. H. et al. (1995). Bei gesunden Tieren betrug der Score 0 Punkte. Maximal waren 12 Punkte erreichbar, wobei ab 11 Punkten die Tiere als terminal erkrankt eingestuft wurden und in Folge dessen aufgrund ethischer Gesichtspunkte innerhalb des Beobachtungszeitraums euthanisiert werden mussten.

Zum anderen wurden Körpergewicht und -temperatur der Tiere gemessen, der Open Field Test und eine regelmäßige klinische Überwachung anhand eines klinischen Beurteilungsbogens durchgeführt.

Tabelle 2: Klinischer Score

Klinische Evaluation	Scorepunkte (Pkt.)	Bedeutung
Beam-Balance-Test	0	Laufen möglich auf Ø 4,5 mm Balken für 15 sek
	1	Stehen möglich auf Ø 4,5 mm Balken für 15 sek
	2	Laufen möglich auf Ø 9 mm Balken für 15 sek
	3	Stehen möglich auf Ø 9 mm Balken für 15 sek
	4	Laufen möglich auf Ø 13,5 mm Balken für 15 sek
	5	Stehen möglich auf Ø 13,5 mm Balken für 15 sek
	6	Kein Laufen möglich
Postural-Reflex-Test	0	Alle 4 Extremitäten symmetrisch extendiert
	1	Flexion des Rumpfes
	2	Kreiseln
	4	Keine motorische Aktivität
Piloerektion	0	Nein
	1	Ja
Motorische Anfälle	0	Nein
	1	Ja
Vigilanz	0	wach
	1	lethargisch

sek = Sekunden



Abb. 4: Versuchsaufbau zur Erhebung des klinischen Scores und zur klinischen Untersuchung

3.1.3.1 Beam Balance Test

Zur Testung der motorischen Koordination und des Gleichgewichts, angelehnt an Feeney, D. M. et al. (1982), wurde die Maus auf drei unterschiedlich dicke Balken mit den Durchmessern 13,5 mm, 9 mm und 4,5 mm gesetzt und beobachtet, ob sie darauf jeweils für 15 Sekunden

(sek) laufen oder sitzen kann. Je nachdem bei welchem Durchmesser Laufen beziehungsweise Sitzen noch möglich war, wurden Punkte vergeben. Die höchste Punktzahl von 6 Punkten war dementsprechend zu erreichen, wenn die Maus für weniger als 15 sek auf dem 13,5 mm dicken Balken sitzen konnte. Die Punktzahl von 0 wurde vergeben, wenn die Maus mindestens 15 sek auf dem 4,5 mm dicken Holzstab laufen konnte,

3.1.3.2 Postural-Reflex-Test

Beim Postural-Reflex-Test in Anlehnung an Bederson, J. B. et al. (1986) wurde nach dem Hochheben der Mäuse am Schwanz, deren reaktive Körperhaltung beobachtet. Vermerkt wurde, wenn die Maus dabei anstatt einer symmetrischen Streckung aller vier Extremitäten, den Rumpf flektierte, sich um die eigene Körperachse drehte oder keine motorische Aktivität zeigte.

3.1.3.3 Fellstatus, motorische Anfälle und Vigilanz

Im Rahmen der Erhebung des klinischen Scores wurden die Kriterien Fellstatus, Auftreten motorischer Anfälle und Vigilanz beurteilt, welche auch im Rahmen des klinischen Beurteilungsbogens (siehe 3.1.3.6) miterhoben wurden. Der Fellstatus wurde nach Fehlen (0 Scorepunkte, Pkt.) oder Auftreten von Piloerektion (1 Pkt.) eingeteilt. Ebenso unterschied man zwischen fehlendem (0 Pkt.) und vorhandenem Auftreten motorischer Anfälle (1 Pkt.). Die Vigilanz wurde eingeteilt nach wach (0 Pkt.) oder lethargisch (1 Pkt.), wobei tiefere Bewusstseinsstörungen bei keinem der Versuchstiere beobachtet wurden.

3.1.3.4 Körpergewicht und Körpertemperatur

Bei jeder Maus wurden das Körpergewicht mit Hilfe einer Präzisionswaage (Kern&Sohn, Balingen) sowie die Körpertemperatur mit einer rektalen Temperatursonde (Durchmesser 1,5 mm; GTH1160 Digitalthermometer, Greisinger electronic GmbH, Regenstauf), welche zuvor mit Vaseline bestrichen worden war, gemessen.

3.1.3.5 Open Field Test

Beim Open Field Test, angelehnt an Gould, T. D. et al. (2009), wurde die jeweilige Maus zur Evaluation der spontanen motorischen Aktivität mittig in eine Kiste (42 x 42 x 20 cm) mit neun gleich großen quadratischen Feldern (14 x 14 cm) gesetzt und die Anzahl der betretenen Felder in einem Zeitfenster von zwei Minuten (min) gezählt. Ein Feld wurde jeweils als betreten gezählt, sobald die Maus mit zwei Pfoten darauf stand.

3.1.3.6 Klinischer Beurteilungsbogen

Bei jeder umfassenden klinischen Untersuchung und zu weiteren definierten Zeitpunkten (0, 1, 2, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 und 40 h *post infectionem*) wurde auf Basis eines klinischen Beurteilungsbogens der Arbeitsgruppe (vgl. Wache, C., 2015) ein zusätzlicher Punktwert erhoben, welcher Aufschluss über den klinischen Status und folglich auch die Notwendigkeit eines Versuchsabbruchs (aufgrund einer zu großen Belastung der Mäuse) lieferte. Die bei der Punktevergabe miteinbezogenen Bereiche mit den jeweiligen Scorepunkten können Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: Kriterien des klinischen Beurteilungsbogens mit den jeweiligen Scorepunkten

Kriterien	Scorepunkte (Pkt.)	Bedeutung
Fellstatus	0	normal
	1	struppig, ungepflegt, schmutzig
Motorische Anfälle	0	keine
	1	kurzzeitige Anfälle
	6	Status epilepticus > 5 min
Vigilanz	0	normal
	1	somnolent
	6	komatös
Augenstatus	0	normal
	1	verklebt
	6	eingesunken
Körperstellung	0	normal
	1	gekrümmt
	3	Seitenlage
Atembewegungen	0	normal
	1	verstärkte thorakale Atemexkursionen
	3	verstärkte und verlangsamte thorakale Atemexkursionen
Gewichtsabnahme	0	<10%
	1	10 - 13,9%
	2	14 - 19,9%
	6	>20%

Aus den Einzelpunktwerten ließ sich ein Gesamtscore berechnen. Gesunde Tiere wiesen einen Scorewert von 0 auf. Bei einem Gesamtscorewert von 5 Punkten wurde eine 30

minütige Überwachung des Versuchstieres angesetzt, bei 7 Scorepunkten eine 10 minütige Überwachung und ab einem Wert von 9 Punkten musste das Tier euthanisiert werden, was aber bei keinem der Tiere der Versuchsreihen der Fall war.

3.1.4 Infektion

Nach der klinischen Beurteilung zu Beginn einer jeden Versuchsreihe wurde den Mäusen jeweils 0,1 ml Buprenorphin (Buprenorphinhydrochlorid, Temgesic[®], Reckitt Benckiser Healthcare (UK) Ltd., Berkshire, Großbritannien) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Anschließend wurden die Tiere nach einer 30 minütigen Einwirkzeit des Schmerzmittels mit Hilfe eines Verdampfers (Vet.Med.Vapor Dräger, Lübeck, Deutschland) in einer Plexiglaskammer mit 3,5% Isofluran (Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Deutschland) durch Inhalation in Kurzzeitnarkose versetzt. Im nächsten Schritt erfolgte die transkutane Injektion von 20 µl von 10⁷ Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) pro ml von *S. pneumoniae* Serotyp 2, Stamm D39 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Abteilung Genetik der Mikroorganismen, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald) in die *Cisterna magna*. Hierfür erfolgte eine Flexion des Kopfes um etwa 60°. Mit einer Spritze (Braun Omnican[®] F 30G x1/2") tastete man sich vom *Os occipitale* nach kaudal und sobald man bei der gespannten *Membrana atlanto-occipitalis* angekommen war, erfolgte die transkutane Injektion der Bakterien. Kontrolltieren wurden auf gleiche Weise 20 µl einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS, *Phosphate buffered saline*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) injiziert.

Nach der Infektion wurden die Tiere in Käfige gegeben, welche sich zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur auf Heizkissen befanden und mit ausreichend Futter und Wasser *ad libitum* ausgestattet waren. Sobald die Narkose abgeklungen war, wurden die Tiere auf Zeichen einer verursachten Hirnstammläsion inspiziert und bei diesbezüglich positivem Befund umgehend euthanasiert. Eine klinische Hirnstammsymptomatik zeigte sich unter anderem durch eine Extremitätenschwäche oder ein Drehen um die eigene Achse. Zudem wurde jeweils eine Stunde nach Infektion nochmals eine klinische Evaluation inklusive Score-Erhebung jeder Maus durchgeführt.

3.1.5 Antibiotische Therapie

Je nach Versuchsgruppe wurde die Präparation der Versuchstiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Die Mäuse, bei denen eine Präparation außerhalb eines 24 Stunden-Zeitfenster erfolgte, erhielten 16 Stunden *post infectionem* im Anschluss an die klinische Untersuchung eine antibiotische Therapie mit 100 mg/kg Körpergewicht (KG)

Ceftriaxon (MIP Pharma, Polen) intraperitoneal, um einem tödlichen Ausgang der Infektion vor Ende der Versuchsdauer vorzubeugen.

3.1.6 Versuchsgruppen

Im Rahmen der *in-vivo*-Experimente wurden verschiedene Versuchsreihen durchgeführt. Die ersten beiden Versuchsreihen dienten der Analyse der funktionellen Bedeutung purinerger Signalwege in der Entwicklungsphase beziehungsweise im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf der Pneumokokkenmeningitis mit Hilfe des nicht-selektiven P2R-Antagonisten Suramin (*Suramin hexasodium salt*, Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien) (Kim, J. E. et al., 2009; Light, A. R. et al., 2006; Naviaux, J. C. et al., 2014) sowie des P2X7R-Antagonisten Brilliantblau G (BBG, *Brilliant Blue G*, Sigma Aldrich GmbH, Darmstadt, Deutschland) (Chen, S. et al., 2013; Peng, W. et al., 2009). Eine weitere Versuchsreihe hatte die Charakterisierung der ATP-Freisetzung im Zeitverlauf der Pneumokokkenmeningitis zum Zweck. In einer zusätzlichen Versuchsreihe verwendete man den Ektonukleotidase-Inhibitor ARL 67156 (ARL 67156 trisodium salt, Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien) (Levesque, S. et al., 2007) sowie den nicht-selektiven Adenosinrezeptor-Antagonisten Theophyllin (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) (Biaggioni, I. et al., 1991; Daly, J. W. et al., 1985; Fredholm, B. B., 1979; Rall, T. W., 1982), um herauszufinden, ob durch eine Hemmung des ATP-Abbaus beziehungsweise der Wirkung von ATP-Abbauprodukten der Krankheitsverlauf einer experimentellen Pneumokokkenmeningitis beeinflusst werden kann.

3.1.6.1 Effekt von P2R-Antagonisten auf die Krankheitsentwicklung der PM

Zur Analyse der funktionellen Bedeutung der purinerger ATP-abhängigen Signalwege in der Pneumokokkenmeningitis wurde zunächst die Entstehungsphase der Erkrankung näher beleuchtet. Dabei wurden den Versuchstieren - je nach Versuchsgruppe randomisiert - unmittelbar nach der intrazisternalen (i.c.) Infektion mit 20 µl 10⁷ KBE/ml *S. pneumoniae*, intraperitoneal (i.p.) 20 mg/kg KG Suramin (n = 11) (Kim, J. E. et al., 2009; Naviaux, J. C. et al., 2014) oder 50 mg/kg KG BBG (n = 11) (Chen, S. et al., 2013; Peng, W. et al., 2009) jeweils in Verdünnung mit sterilem Wasser (Aqua dest., Endotoxin-frei, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) verabreicht. Die Tiere der Positivkontrollgruppe erhielten intraperitoneal in entsprechender Menge die Vehikelsubstanz in Form von sterilem Wasser nach Infektion mit *S. pneumoniae* (n = 21). Den Negativkontrolltieren wurden intrazisternal anstelle der Bakteriensuspension 20 µl PBS verabreicht (n = 8).

Es gibt Berichte, dass Suramin im Gegensatz zu BBG (Chen, S. et al., 2013; Peng, W. et al., 2009) die intakte Blut-Hirn-Schranke schlecht penetriert und somit nur zu einem geringen

Teil ins Gehirn gelangt (Hawking, F., 1940; Naviaux, J. C. et al., 2014; Sanderson, L. et al., 2007). Die Permeabilität der BHS bei der Pneumokokkenmeningitis wird gewöhnlich erhöht, so dass der Transport von Suramin über die BHS kein Problem darstellen sollte (Paul, R. et al., 1998). Nichtsdestotrotz, um sicher zu gehen, dass kein Effekt des Therapeutikums aufgrund eingeschränkter Bioverfügbarkeit übersehen wird, wurden in einer zusätzlichen Experimentalgruppe den Mäusen 20 mg/kg Gehirngewicht Suramin jeweils 2 Stunden vor der Infektion über einen intrazisternalen Zugang verabreicht (n = 11). Vollständigweise sollte erwähnt werden, dass die angesprochene geringe Penetration nicht auf die circumventrikulären Organe zutrifft, bei welchen die BHS weniger stark ausgeprägt ist (Hawking, F., 1940; Naviaux, J. C. et al., 2014; Sanderson, L. et al., 2007; Sisó, S. et al., 2010). Das Gesamthirngewicht wurde dabei gemäß den Daten von Wahlsten, D. et al. (2006) auf 0,5 Gramm geschätzt. Um jeglichen Einfluss der intrazisternalen Injektion auf den Krankheitsverlauf auszuschließen, wurde eine Kontrollgruppe an Mäusen (n = 4) 2 Stunden vor der Pneumokokkeninfektion intrazisternal mit 20 µl sterilem Wasser - einem dem Suramin entsprechenden Volumen - behandelt.

Es ergaben sich somit folgende Versuchsgruppen:

Tabelle 4: Versuchsgruppen der Versuchsserie „Effekt von P2R-Antagonisten auf die Entwicklung der PM“

Antagonist	Verabreichung	i.c. Infektion (20 µl)	Versuchsende (<i>post infectionem</i>)	Anzahl (n)
Suramin	i.p.	<i>S. pneumoniae</i>	16 h	11
Suramin	i.c.	<i>S. pneumoniae</i>	16 h	11
BBG	i.p.	<i>S. pneumoniae</i>	16 h	11
Steriles Wasser	i.p.	<i>S. pneumoniae</i>	16 h	21
-	-	<i>PBS</i>	16 h	8
Steriles Wasser	i.c.	<i>S. pneumoniae</i>	16 h	4

3.1.6.2 Effekt von P2R-Antagonisten im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf der PM

Um die Rolle der purinergen Signalwege im Rahmen des fortgeschrittenen Krankheitsverlaufs einer Pneumokokkenmeningitis näher beleuchten zu können, wurde in einer weiteren Versuchsserie die Präparation zur Probengewinnung jeweils 40 Stunden *post infectionem* durchgeführt. Im Vorfeld wurden den Tiere jeweils entsprechend dem vorhergehendem Versuchsaufbau (siehe 3.1.6.1) 20 µl 10⁷ KBE/ml *S. pneumoniae* beziehungsweise den Negativkontrolltieren 20 µl PBS intrazisternal injiziert. Um einem vorzeitigen letalen Verlauf der Meningitis entgegenzuwirken, erhielten die Mäuse dieser

Versuchsreihe jeweils 16 Stunden *post infectionem* eine Antibiotika-Behandlung mit 100 mg/kg KG Ceftriaxon. Ebenfalls 16 Stunden *post infectionem* wurden den Versuchstieren dieser Versuchsserie intraperitoneal 20 mg/kg KG Suramin in Verdünnung mit sterilem Wasser verabreicht. Den Positivkontrollen wurde intraperitoneal die Vehikelsubstanz „steriles Wasser“ verabreicht. Da die Tiere im fortgeschrittenen Krankheitsstadium regelhaft eine Blut-Hirn-Schranken-Störung und eine signifikante Erhöhung des intrakraniellen Druckes aufweisen (Paul, R. et al., 1998), wurde auf eine intrazisternale Verabreichung von Suramin in dieser Versuchsserie verzichtet.

Einen Überblick über die Gruppen dieser Versuchsreihe bietet Tabelle 5:

Tabelle 5: Versuchsgruppen der Versuchsserie „Effekt von P2R-Antagonisten im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf der PM“

Antagonist	Verabreichung	i.c. Infektion (20 µl)	Versuchsende (<i>post infectionem</i>)	Anzahl (n)
Suramin	i.p.	<i>S. pneumoniae</i>	40 h	10
Steriles Wasser	i.p.	<i>S. pneumoniae</i>	40 h	12
-	-	PBS	40 h	4

3.1.6.3 ATP-Konzentration und P2R-Expression im Zeitverlauf der PM

Zur Charakterisierung der ATP-Konzentration im Liquor sowie der P2R-mRNA-Expression in den Mäusehirnen erfolgte die Präparation und Parametergewinnung bei den Mäusen je nach Versuchsgruppenzugehörigkeit vor der Infektion (0 h, n = 4) beziehungsweise 4 (n = 4), 16 (n = 5) oder 40 (n = 3) Stunden nach der Infektion mit 20 µl 10⁷ KBE/ml *S. pneumoniae*. Die 40 Stunden-Versuchstiere erhielten wiederum 16 Stunden *post infectionem* eine Antibiotika-Behandlung mit 100 mg/kg Ceftriaxon.

So ergaben sich folgende Versuchsgruppen im Rahmen der Zeitverlaufsversuchsserie:

Tabelle 6: Versuchsgruppen der Versuchsserie „Zeitverlauf“

Antagonist	Verabreichung	i.c. Infektion (20 µl)	Versuchsende (<i>post infectionem</i>)	Anzahl (n)
-	-	<i>S. pneumoniae</i>	0 h	4
-	-	<i>S. pneumoniae</i>	4 h	4
-	-	<i>S. pneumoniae</i>	16 h	5
-	-	<i>S. pneumoniae</i>	40 h	3

3.1.6.4 Effekt von Ektonukleotidaseinhibitoren und Adenosinrezeptor-Antagonisten

In dieser Versuchsreihe wollte man sich nach Beleuchtung der Effekte von Antagonisten der P2-Purinorezeptoren insbesondere auf Mechanismen in Zusammenhang mit der Hemmung des ATP-Abbaus beziehungsweise der Wirkung von ATP-Abbauprodukten im Krankheitsverlauf einer experimentellen Pneumokokkenmeningitis konzentrieren. So verabreichte man den Versuchstieren entsprechend den vorhergehenden Versuchsreihen intraperitoneal jeweils in Verdünnung mit sterilem Wasser entweder 20 mg/kg KG des Ektonukleotidase-Inhibitors ARL 67156 (*ARL 67156 trisodium salt*, Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien, n = 11) (Levesque, S. et al., 2007; Li, P. et al., 2015) oder 50 mg/kg KG des Adenosinrezeptor-Antagonisten Theophyllin (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland, n = 11) (Biaggioni, I. et al., 1991; Daly, J. W. et al., 1985; Fredholm, B. B., 1979; Rall, T. W., 1982; Saleh, T. S. F. et al., 1996). Mit Hilfe von ARL 67156 sollte durch Verhinderung des Abbaus von ATP (Levesque, S. et al., 2007) die Konzentration des Nukleotids erhöht werden, um die daraus resultierenden pathophysiologische Effekte zu untersuchen. Andererseits inhibierte man mit dem nicht-selektiven Adenosinrezeptor-Antagonisten Theophyllin (Biaggioni, I. et al., 1991; Daly, J. W. et al., 1985; Fredholm, B. B., 1979; Rall, T. W., 1982) Rezeptoren für ein Abbauprodukt von ATP, welches ebenfalls eine Rolle im Rahmen der purinergen Signalwege spielen könnte.

Die Tiere der Positivkontrollgruppe erhielten intraperitoneal die entsprechender Menge der Vehikelsubstanz, nämlich „steriles Wasser“, kurz nach Infektion mit *S. pneumoniae* (n = 21). Den Negativkontrolltieren wurden anstelle der Bakteriensuspension intrazisternal 20 µl PBS verabreicht (n = 8).

Tabelle 7: Versuchsgruppen der Versuchsserie „Effekt von Ektonukleotidase-Inhibitoren und Adenosinrezeptor-Antagonisten“

Antagonist	Verabreichung	i.c. Infektion (20 µl)	Versuchsende (<i>post infectionem</i>)	Anzahl (n)
ARL 67156	i.p.	<i>S. pneumoniae</i>	16 h	11
Theophyllin	i.p.	<i>S. pneumoniae</i>	16 h	11
Steriles Wasser	i.p.	<i>S. pneumoniae</i>	16 h	21
-	-	<i>PBS</i>	16 h	8

3.1.7 Präparation der Versuchstiere

Am jeweiligen Versuchsende wurde eine letzte klinische Untersuchung vor der Präparation der Tiere durchgeführt, wobei die Mäuse anschließend durch eine intraperitoneale Gabe von 100mg/kg KG Ketamin (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland) zusammen mit 10 mg/kg KG Xylazin (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) narkotisiert wurden. Die

Tiefe der Narkose wurde dabei durch eine Reaktion in Form von Abwehrbewegungen und Atemveränderungen auf das Zuführen von Schmerzreizen überprüft und Ketamin/Xylazin wurden bei Bedarf nachinjiziert. Fortan verblieben die Mäuse in Narkose. Sobald eine ausreichende Narkosetiefe erreicht worden war, wurde der Kopf des Tieres in einem stereotaktischen Rahmen über Halterungen an den *Ossa temporales* und einer Klemme am *Os nasale* fixiert. Damit sollte eine Positionsänderung des Kopfes während der Präparation vermieden werden. Nach Gabe des Lokalanästhetikums Lidocain (Xylocain® 1%, AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) wurde die Schädelkalotte freipräpariert, um am Übergang des *Os interparietale* zum *Os occipitale* in Verlängerung der *Sutura sagittalis* mit Hilfe eines Handbohrers (Micromot 50 Proxxon, Föhren, Deutschland) ein Bohrloch anzulegen. Über dieses Loch wurde ein aus einer Stahlkanüle (22G x 1¼", 0,7 x 30 mm) und einem Polyethylenschlauch (Länge ca. 1 cm, Innendurchmesser 0,58 mm, Außendurchmesser 0,98 mm) selbst angefertigter Katheter in die *Cisterna magna* eingeführt, womit Liquorproben zur Bestimmung der Leukozytenzahl sowie der Konzentrationen an IL-1 β und ATP gewonnen wurden. Mit Hilfe eines weiteren Katheters, welcher mit Histoacryl-Gewebekleber (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) fixiert worden war, wurde die zuvor entnommene Liquormenge durch PBS ersetzt und der intrakranielle Druck (ICP) über 90 Sekunden mit Hilfe eines Druckwandlers (Siemens AG München, Deutschland) erfasst.

Nach tiefer Anästhesie mit Ketamin/Xylazin wurde der Thorax des Tieres eröffnet und aus dem rechten Ventrikel des freipräparierten Mäuseherzens wurden mit einer Heparin-benetzen (Heparin-Natrium 25000 I.E., ratiopharm, Ulm, Deutschland) Spritze etwa 0,4 ml Blut entnommen und in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) auf Eis gestellt. Zum Zwecke einer besseren Darstellung des Gehirns wurde ein Polyethylenschlauch in der Aorta ascendens fixiert, die Leber eröffnet und das Hirn mit 15 ml eiskaltem, heparinisiertem (10 U/ml Heparin) PBS transkardial perfundiert.

Nach Öffnen des Schädeldaches, Entfernung der *Dura mater* und vorsichtiger Entnahme des Hirns wurde das Kleinhirn abgetrennt und in sterilem PBS zur Bakterientiterbestimmung homogenisiert. Am Großhirn wurden die oberflächlichen Einblutungen quantifiziert, die Qualität der Perfusion beurteilt und das Hirn anschließend umgehend bei -80° Celsius (°C) bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.



Abb. 5: Entnommenes murines Großhirn in vergrößerter Darstellung

Die entnommenen Liquor- und Blutproben wurden für 10 min bei 2900 Umdrehungen pro Minute (UpM) bei Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und die Überstände anschließend bei -20°C eingefroren.

3.1.8 Bestimmung der Leukozytenzahl im Liquor

Die Leukozytenzahl im Liquor wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland) bestimmt.

Hierzu wurden 2 µl des gewonnenen Liquors zu 18 µl Türk'scher Lösung (Merck KGaA, Steinheim, Deutschland) hinzugegeben und mit der erstellten Suspension die Zählkammer unter Zuhilfenahme einer Pipette gefüllt. Im Anschluss wurden die Zellen unter einem Lichtmikroskop (Nikon TMS, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Mit Hilfe der ausgezählten Zellzahl konnte die Leukozytenzahl / µl berechnet werden. Zur Umrechnung diente folgende Formel:

$$Zb = Za \times VF / KV$$

Dabei ist Zb = berechnete Zellzahl (n/µl), Za = ausgezählte Zellzahl in der Kammer, VF = Verdünnungsfaktor 10 und KV = Kammervolumen = Kammertiefe 0,2 mm x Gesamtfläche 16 mm² = 3,2 µl.

3.1.9 Bestimmung bakterieller Titer in Gehirn und Blut

Die bakteriellen Titer wurden sowohl im Hirn als auch im Blut der Versuchstiere bestimmt.

Zur Titerbestimmung im Hirn wurde das zuvor abgetrennte Mäusekleinhirn in 1 ml sterilem PBS in einem ebenfalls sterilen Rundboden-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit Hilfe eines Ultra-Turrax® (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Unter Berücksichtigung der Versuchsdauer der jeweiligen

Versuchsreihe von entweder unter (0 h, 4 h, 16 h) oder über 24 Stunden (40 h) wurden die Kleinhirnhomogenate unterschiedlichen Verdünnungsreihen mit PBS unterzogen. Bei den Versuchen mit einer Dauer unter 24 Stunden wurden vom Homogenat jeweils 100 µl in 10^3 - und 10^5 -facher Verdünnung mit Hilfe eines sterilen Drigalskispatels auf einer Blutagarplatte (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) ausgestrichen. Auf gleiche Weise wurde bei den 40 h-Versuchen das Kleinhirnhomogenat 10- und 10^3 -fach verdünnt ausgestrichen.

Die gewonnenen Blutproben wurden ebenfalls mit PBS verdünnt und im Anschluss davon jeweils 10 µl bei Versuchen mit einer Dauer unter 24 Stunden in einer Verdünnung von 1:10- und 1:1000 beziehungsweise bei den 40 Stunden-Versuchen 100 µl unverdünnt und in einer Verdünnung von 1:100 ausgestrichen.

Für 24 Stunden wurden die Platten bei 37°C und 5% Kohlendioxid bebrütet, anschließend die darauf gewachsenen Bakterienkolonien ausgezählt und die Titer unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungen berechnet.



Abb. 6: Blutagarplatte mit Pneumokokkenkolonien

Ausstrich eines Kleinhirnhomogenats in 10- (linke Hälfte) und 10^3 -facher (rechte Hälfte) Verdünnung nach Bebrütung bei 37°C und 5% Kohlendioxid.

3.1.10 Herstellung von Hirnschnitten und Quantifizierung intrazerebraler Blutungen

Aus den nach der Präparation tiefgefrorenen Großhirnen wurden mit Hilfe eines Kryomikrotoms (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) bei einer Kammer- und Objektträgertemperatur von -20°C koronare Gefrierschnitte angefertigt. Nach dem Aufblocken der Hirne auf einen gekühlten Schneideblock, mit der Hirnbasis auf der von der Klinge abgewandten Seite, wurden daraus jeweils mehrere Schnitte nach einem

vorgegebenem Schneideprotokoll angefertigt (vgl. Höhne, C. L., 2015; Koedel, U. et al., 2009a; Wache, C., 2015; Woehrl, B. et al., 2011).

Zur Quantifizierung der intrazerebralen Blutungen wurden von den Hirnen der Versuchstiere, beginnend auf Höhe des Vorderhorns der Seitenventrikel nach rostral gehend, jeweils zehn Fotos im Abstand von jeweils 300 µm, mit einer Digitalkamera vom Typ Easy Share DX 4330 (Kodak, Stuttgart, Deutschland) angefertigt und digitalisiert.

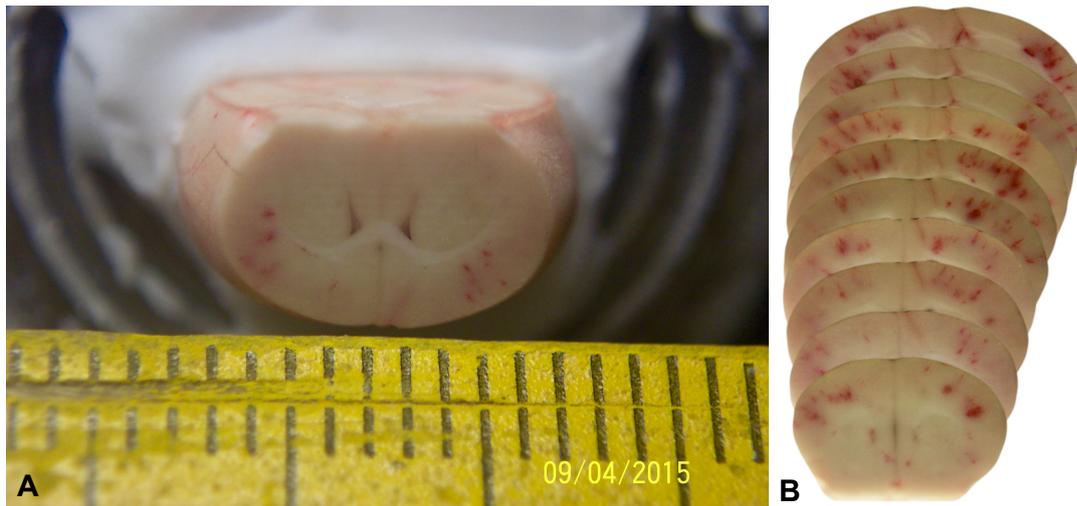


Abb. 7: Digitalisierung und Bildverarbeitung der Hirnschnitte.

A) Anfertigung von Hirnschnitten mit Hilfe eines Kryomikrotoms. **B)** Angefertigte Hirnschnitte zur Auszählung intrazerebraler Blutungen und zu Veranschaulichung mit Hilfe von Adobe Photoshop CC 2018.

Anhand dieser Fotos wurden die sichtbaren intrazerebralen Blutungen auf jedem Schnittbild gezählt, so dass für jedes Gehirn eine summierte Gesamtzahl an Blutungen angegeben werden konnte. Dabei waren insbesondere die Auswertungen der Hirnblutungen bei den Tieren aus den Versuchsreihen mit Schwerpunkt auf den Zeitverlauf und im fortgeschrittenen Stadium der Pneumokokkenmeningitis von Interesse, da die Anzahl der Blutungen mit Erkrankungsdauer verstärkt auftreten und sichtbar sein sollten. Zur Veranschaulichung wurden die Hirnschnitte jeweils mit dem Programm Adobe Photoshop (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland) bearbeitet.

Die entstandenen Hirnschnipsel wurden bis zur weiteren Verwendung im Rahmen der RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) bei -80°C aufbewahrt.

3.1.11 Messung der IL-1 β -Konzentration im Liquor

Im Rahmen der Versuche *in vivo* wurde die Konzentration des Zytokins IL-1 β mittels eines kommerziell erhältlichen ELISAs (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, R&D Systems, Deutschland) für Maus-IL-1 β gemäß den Herstellerangaben in den Liquorproben bestimmt.

Bei diesem Sandwich-ELISA wurde zunächst eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit einem Fängerantikörper versehen und die restliche Probenlösung in mehreren Waschschrritten wieder entfernt. Anschließend wurden die Liquorproben sowie Detektor-Antikörper hinzugegeben, sodass eine Verbindung zwischen IL-1 β als Antigen und den beiden Antikörpern entstehen konnte. Durch Markierung mit dem Enzym Meerrettichperoxidase war nach Inkubation durch eine Blaufärbung eine Bestimmung der IL-1 β -Konzentration mit Hilfe eines Mikroplattenlesers und anhand einer Kalibrierungskurve möglich (vgl. Herstellerangaben).

Man beschränkte sich bei der Interleukin-Messung auf IL-1 β , da von den Mäusen jeweils nur eine geringe Menge an Liquor (ca. 10 μ l) gewonnen werden konnte. Grund für die Auswahl waren Vorbefunde, welche gezeigt haben, dass IL-1 β insbesondere in der Entwicklungsphase der Pneumokokkenmeningitis als wichtiger Entzündungsmediator freigesetzt (Klein, M. et al., 2006b; Koedel, U. et al., 2002a) und dessen Freisetzung *in vitro* durch einen P2R-Antagonisten signifikant moduliert werden konnte (Hoegen, T. et al., 2011; Koedel, U. et al., 2002a).

3.1.12 Real Time RT-PCR-Analysen der P2-Rezeptor-Expression im Gehirn

Zur Bestimmung der P2-Rezeptor-Expression wurden die tiefgefrorenen Hirne extern dankenswerterweise unter der Leitung von Prof. Dr. Marco Idzko an der Klinik für Pneumologie der Universitätsklinik Freiburg mit Hilfe einer Real Time RT-PCR analysiert.

Dabei wurde die gesamte RNA mit Hilfe eines RNeasy Mini-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Hersteller-Empfehlungen vom homogenisierten Hirngewebe isoliert. Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe der Stratascript reverse Transcriptase (Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA) und verschiedenen Primern (Invitrogen, Deutschland). Eine quantitative PCR wurde mit dem Taqman Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) und vorgefertigten Primern und Probenmischungen (Assays on Demand, Applied Biosystems, Carlsfeld, Kalifornien, USA) durchgeführt. Die Versuchsbedingungen bei der Durchführung der PCR unter Zuhilfenahme eines Thermocyclers (iCycler, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA) stellten sich wie folgt dar: jeweils 2 min bei 50°C und 10 min bei 95°C, gefolgt von 45 Zyklen von je 15 sek bei 95°C und 60°C für 1 min. Eine PCR-Amplifikation eines Haushaltsgens, welches für β 2-Mikroglobulin kodiert, wurde während eines jeden Durchlaufs je Probe durchgeführt, um eine Normierung zwischen den Proben zu ermöglichen.

3.1.13 Bestimmung der ATP-Konzentration im Liquor

Die Quantifizierung der ATP-Konzentrationen der jeweiligen Liquorproben erfolgte indirekt mit Hilfe des ATP Determination Kits von Molecular Probes (A22066, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA). Die Messungen wurden den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

Das Testverfahren beruht auf der Reaktion von ATP, Luciferin und O₂ zu Oxyluciferin, AMP, Pyrophosphat und CO₂, wobei Licht mit einem Emissionsmaximum von etwa 560 nm bei einem pH von 7,8 freigesetzt wird. Die Reaktion wird durch Magnesium (Mg²⁺) und das Enzym Luciferase katalysiert (vgl. Herstellerangaben).

Die nötigen Bestandteile für eine Standardreaktionslösung waren im ATP-Determination Kit enthalten und wurden nach Vorgabe unmittelbar vor den einzelnen Messreihen in deionisiertem Wasser zusammengeführt.

Aufgrund der quantitativ jeweils geringen Menge der Liquorproben wurden nach vorhergehender Zugabe von jeweils 10 µl PBS, jeweils 5 µl der Probenmenge zur Messung verwendet und in eine der Vertiefungen einer weißen 96-Well-Platte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) pipettiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl der angefertigten Reaktionslösung dazugegeben.

Das durch die Reaktion freigesetzte Licht wurde unmittelbar im Anschluss mit Hilfe eines Luminometers (Tristar LB 941, Multimode Mikroplattenleser, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland) gemessen. Für jede Lumineszenzmessung wurde zudem jeweils eine ATP-Standarddeichkurve erstellt, indem Proben von je 5 µl reinen ATPs in absteigenden Konzentrationen bei jeweils fünffacher Verdünnung mit PBS beginnend mit 1 µM mitgemessen wurden. Nach Abzug der Hintergrund-Lumineszenzen aus vorausgehenden Messungen der leeren 96-Well-Platten ließen sich mit Hilfe der Standarddeichkurven die in den Proben jeweils vorhandenen ATP-Konzentrationen berechnen.

3.2 In-vitro-Zellkulturversuche im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis

3.2.1 Versuchsbedingungen

Zur Gewährleistung steriler Bedingungen wurden die Zellkulturexperimente unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (HERAsafe®, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt. Zur Kultivierung der Zellpopulationen und Inkubation der Zellen während der verschiedenen Versuchsschritte wurden diese zeitweise in einem Brutschrank (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) bei einer Temperatur von 37°C und 5%iger Kohlendioxidbegasung (CO₂) aufbewahrt.

3.2.2 Zelltypen und Zellgewinnung

Für die Zellkulturexperimente wurden Knochenmarkszellen wie primär murine Makrophagen (*bone marrow-derived macrophages*, BMDM) sowie neutrophile Knochenmarks-Granulozyten (*bone marrow-derived neutrophils*, BMN) zur weiteren Behandlung aus den *Femores* von C57BL6/n-Wildtypmäusen gewonnen, wie in der Arbeitsgruppe etabliert und auch in Vorarbeiten beschrieben (vgl. Frommhold, D. et al., 2007; Hoegen, T. et al., 2011; Höhne, C. L., 2015; Wache, C., 2015).

3.2.2.1 Murine Knochenmarks-Makrophagen

C57BL6/n-Mäuse wurden mit Hilfe eines Verdampfers (Vaporisateur, Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland) in einer Plexiglaskammer mit 3,5% Isofluran (Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Deutschland) durch Inhalation narkotisiert und anschließend unmittelbar euthanasiert. Nach Desinfektion mit Ethanol wurden Fell und Muskeln unter einer Sterilbank nacheinander abgetrennt, die beiden *Femores* entnommen und vorübergehend in einer Petrischale mit PBS aufbewahrt.

Jeder der beiden Knochen wurde unter sterilen Bedingungen jeweils mit 5 ml gekühlter PBS durchgespült und das gewonnene Knochenmark im Anschluss in einem 50 ml Falcon mit einer 1000 ml Pipette zerkleinert und als Suspension über ein Sieb mit Porengröße 70 µm (Falcon Cell Strainers, BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA) filtriert. Dadurch wurden größere Gewebs- und Zellfragmente abgetrennt. Das gewonnene Filtrat wurde für 5 min bei 1500 UpM und 10°C zentrifugiert (Zentrifuge Hermle Z360K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland) und der Überstand in Folge verworfen.

Zur Lyse von Erythrozyten wurden 3 ml einer 0,2 %-igen Natriumchlorid (NaCl) - Lösung (Natriumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben und diese nach 40 sek mit 7 ml einer 1,2%-igen NaCl-Lösung wieder neutralisiert. Das Gemisch wurde erneut zentrifugiert (5 min, 1500 UpM, 10°C), das dabei gewonnene Zellpellet in 4 ml PBS resuspendiert und im nächsten Schritt auf einen Percoll-Gradienten (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) geschichtet. Hierbei wies die untere der beiden Percoll-Lösungen im 15 ml-Falcon, verdünnt mit 1,5 M NaCl und sterilem Wasser (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland), eine Dichte von 1,1 g/ml, die obere von 1,08 g/ml auf. Nach Zentrifugation für 30 min bei 2300 UpM und 10°C ohne Bremsen waren an den Grenzbereichen der Percoll-Lösungen jeweils zwei Banden identifizierbar, von welchen die obere Bande von mononukleären Zellen gebildet und zur Herstellung der Makrophagenkulturen verwendet wurde.

Hierzu wurden die Zellen sorgfältig abpipettiert und zentrifugiert (5 min, 1500 UpM, 10°C). Das gewonnene Zellpellet wurde mit 10 ml Makrophagenmedium bestehend aus DMEM

(*Dulbecco's modified eagle's medium*, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland), 1% inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS; *Fetal bovine calf serum*, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland), 1 Vol.-% HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) – Puffer (*HEPES solution*, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) mit 10 µg/ml Penicillin plus Streptomycin (P/S, im Verhältnis 1:100; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) resuspendiert, wobei zusätzlich 50 ng/ml rekombinanter Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (rM-CSF, *recombinant macrophage colony stimulating factor*, Peprotech Germany, Hamburg, Deutschland) zur Zelldifferenzierung beigefügt wurden. In einer Petrischale (Umfang 10 cm) wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutkasten kultiviert. Nach jeweils einem und vier Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, wobei beim ersten Mediumwechsel die Fibroblasten an der Petrischale haften blieben und somit von den restlichen Zellen getrennt werden konnten. Nach Abnahme des Mediums mit den suspendierten Makrophagen mit einer 10 ml - Pipette, Zentrifugation (10 min, 1200 UpM, 20°C) und Resuspension des Pellets wurde die Zellsuspension erneut inkubiert. Am siebten Tag wurde das Medium durch 5 ml einer Accutase-Lösung (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) ersetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert, bis sich unter dem Mikroskop sichtbar die Zellen von der Schale abgelöst hatten. Die Zellsuspension wurde zusammen mit 5 ml des Mediums in ein 50 ml - Falcon pipettiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 1200 UpM, 20°C). Im Anschluss wurde das Zellpellet für die Stimulation in 2 ml des für den jeweiligen Versuch gewünschten Mediums ohne M-CSF resuspendiert und die Zellmenge mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter dem Mikroskop (Leica LEITZ DM IL, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) bestimmt. Dazu wurden 20 µl der 2 ml Zell-Medium-Suspension mit 80 µl Trypan-Blau (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) vermischt, die Zählkammer mit dem Gemisch gefüllt und jeweils ein Quadrat, bestehend aus 16 kleineren Einzelquadrate, ausgezählt.

Durch dieses Verfahren waren auch tote Zellen differenzierbar, die den blauen Farbstoff aufnahmen, im Gegensatz zu lebenden Zellen jedoch nicht wieder aktiv hinausschleusen konnten und sich so anfärben ließen (vgl. Herstellerangaben).

Die somit im Rahmen der Aufbereitung gewonnene Zellmenge konnte mit folgender Formel aus den ausgezählten Zellen berechnet werden:

$$Z \text{ (gewonnen Zellzahl)} = Z_a \text{ (ausgezählte Zellzahl)} \times 5 \text{ (Verdünnung)} \times 4 \text{ (Anzahl Großquadrate)} \times 1,25 \text{ (Fläche Großquadrat 4 / Rauminhalt 3,2)} \times 2000$$

Im Anschluss wurde durch Zugabe von weiterem Medium die gewünschte Zellkonzentration erstellt, sodass die Zellen je nach Versuchsaufbau in der jeweilig gewünschten Konzentration pro Well in einer sterilen 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät werden konnten.

Vor Abnahme der suspendierten Zellen von der Petrischale fand im Verlauf der Zellkultivierung zur Kontrolle stets eine optische Begutachtung unter dem Mikroskop statt.

3.2.2.2 Murine neutrophile Knochenmarks-Granulozyten

Die Gewinnung muriner neutrophiler Knochenmarksgranulozyten (BMN) verlief in den ersten Schritten identisch zur Gewinnung von murinen Knochenmarksmakrophagen (siehe 3.2.2.1). Nach Zentrifugation der Percoll-Schichtungen wurden allerdings die Zellen der jeweils unteren Bande, bestehend aus neutrophilen Granulozyten, sorgfältig abpipettiert, mit PBS versetzt und anschließend erneut zentrifugiert (5 min, 1500 UpM, 10°C). Das gewonnene Neutrophilen-Zellpellet wurde mit dem jeweils verwendeten Medium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer entsprechend der Gewinnung der Makrophagen bestimmt. Die jeweils gewünschte Konzentration an Zellen wurde durch eine weitere Zellkulturmedium-Zugabe erreicht und die suspendierten Zellen in gewünschter Konzentration pro Well für die Stimulationsversuche ausgesät, wobei man die BMN vor der Stimulation jeweils für zwei Stunden ruhen ließ.

3.2.3 Versuchsreihen

3.2.3.1 Effekt des P2R-Antagonismus auf die Aktivierung von BMDM

Aufgrund der Vorbefunde der Arbeitsgruppe, welche eine Beteiligung von ATP bei der NLRP-3-Inflammasom-abhängigen Freisetzung von IL-1 β bei humanen Makrophagen aufzeigten (Hoegen, T. et al., 2011), entschied man sich, auch die folgenden Stimulationsexperimenten mit *S. pneumoniae* an Makrophagen durchzuführen.

In dieser Versuchsreihe wurden die gewonnenen Knochenmarksmakrophagen am siebten Tag nach Aufbereitung im beschriebenen Makrophagenmedium (siehe 3.2.2.1) bei einer Konzentration von 200 000 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit 100 nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA; Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) zur weiteren Ausdifferenzierung für 24 Stunden im Inkubator vorbehandelt. Am achten Tag nach Beginn der Zellkultivierung erfolgten eine Abnahme des alten Mediums und ein Ersatz durch neues Makrophagen-Medium. Die Zellen in den Vertiefungen der Well-Platte wurden *S. pneumoniae* Serotyp 2 vom D39-Wildtyp-Stamm bei einer Konzentration von 10^7 Colony forming units (cfu) / ml für sechs Stunden ausgesetzt. Zur näheren Betrachtung der Rolle der purinergeren Signalwege bei der Pneumokokkenmeningitis wurden die P2-Rezeptor-Antagonisten Suramin, BBG sowie oxidiertes Adenosintri-phosphat (ox-ATP; Adenosine 5'-triphosphat, periodate oxidized sodium salt, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Dabei wurde Suramin als nicht-selektiver P2R-Antagonist (Kim,

J. E. et al., 2009; Light, A. R. et al., 2006; Naviaux, J. C. et al., 2014) in Konzentrationen von 10, 100 und 1000 μM und BBG – gebräuchlicherweise als spezifischer *P2X7*-Rezeptor-Antagonist verwendet (Chen, S. et al., 2013; Peng, W. et al., 2009) – in Konzentrationen von 1, 10 und 100 μM eingesetzt. Der nicht-selektive Purinorezeptorantagonist ox-ATP mit vornehmlicher Antagonisierung des *P2X7*-Rezeptors (Colomar, A. et al., 2003; Di Virgilio, F., 2003; Hoegen, T. et al., 2011; Liu, J. S. et al., 2000) wurde in einer Konzentration von 1 mM hinzugegeben (Hoegen, T. et al., 2011). Es wurde stets eine Mediumkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle dienten *S. pneumoniae* ausgesetzte, unbehandelte Makrophagen.

Am Ende eines jeden Experimentes wurde der Zellkulturüberstand zur Bestimmung von LDH, IL-1 β und IL-6 gesammelt.

Tabelle 8: Versuchsgruppen der Versuchsserie „Effekt des P2R-Antagonismus auf die Aktivierung von BMDM“

Antagonist	Konzentration	<i>S. pneumoniae</i>
/ (Medium-Kontrolle)	/	/
/ (unbehandelt)	/	10^7 cfu/ml
Suramin	10 μM	10^7 cfu/ml
Suramin	100 μM	10^7 cfu/ml
Suramin	1000 μM	10^7 cfu/ml
BBG	1 μM	10^7 cfu/ml
BBG	10 μM	10^7 cfu/ml
BBG	100 μM	10^7 cfu/ml
ox-ATP	1 mM	10^7 cfu/ml

3.2.3.2 Darstellung des ATP-Katabolismus *in vitro*

In einer weiteren Versuchsreihe wurden murine Makrophagen am siebten Tag der Kultivierung und neutrophile Granulozyten nach Isolierung jeweils in künstlichem Liquor (*artificial cerebrospinal fluid*, aCSF) bestehend aus 1 % FCS, 0,1 g/l D-Laktat, 0,75 g/dl D-Glukose sowie 10 nM ATP (*Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate*; jeweils von Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland), was der ATP-Konzentration in normalem Nager-Liquor entspricht, suspendiert (Lewis, R. und Elliott, K., 1950). Die Zellen wurden anschließend bei einer Konzentration von 100 000 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. In Folge wurden die Zellen lebenden *S. pneumoniae* Serotyp 2, Stamm D39, bei einer Konzentration von entweder 10^6 cfu/ml oder 10^7 cfu/ml für 30 beziehungsweise 120 min in An- oder Abwesenheit von 1 mM des Ektonukleotidaseinhibitors ARL 67156 (Levesque, S. et al., 2007) ausgesetzt. Diese Versuchsreihe wurde zur näheren Beleuchtung des ATP-

Katabolismus im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis durchgeführt, sodass jeweils Proben ohne Knochenmarkszellen zum Vergleich dienten. Am Ende jeder Versuchsrunde wurden die Zellkulturüberstände für die ATP-Bestimmungen gesammelt.

Um auszuschließen, dass die Knochenmarkszellen die eATP-Konzentrationen indirekt durch ein Einschränken des Pneumokokken-Wachstums beeinflussten, wurden zudem am Ende jedes Experiments durch Kultivierung serieller Verdünnungen von aCSF-Proben auf Agar-Platten die Pneumokokkentiter bestimmt.

Tabelle 9: Versuchsgruppen der Serie „ATP Katabolismus bei BMDM und BMN *in vitro*“

Antagonist (Konzentration)	<i>S. pneumoniae</i>	Zellen
/	/	/
/	10 ⁶ cfu/ml	/
/	10 ⁷ cfu/ml	/
ARL 67156 (1 mM)	10 ⁷ cfu/ml	/
/	/	BMDM
ARL 67156 (1 mM)	/	BMDM
/	10 ⁷ cfu/ml	BMDM
ARL 67156 (1 mM)	10 ⁷ cfu/ml	BMDM
/	/	BMN
ARL 67156 (1 mM)	/	BMN
/	10 ⁷ cfu/ml	BMN
ARL 67156 (1 mM)	10 ⁷ cfu/ml	BMN

3.2.4 Photometrische Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH) - Aktivität

Das Ausmaß des Zelluntergangs bei den jeweiligen Versuchsdurchgängen wurde indirekt durch die extrazelluläre Menge von Lactatdehydrogenase (LDH) in den Überständen der einzelnen Proben gemessen. Ermöglicht wird diese Messmethode dadurch, dass LDH als zytoplasmatisches Enzym bei Zelluntergang und Plasmamembranschädigung, wie es bei der Zellnekrose der Fall ist, in den Extrazellulärraum freigesetzt wird und somit mit der Zellzytotoxizität in Korrelation gesetzt werden kann. Eine Quantifizierung der LDH-Menge war mit Hilfe des „LDH Cytotoxicity Assay Kit II“ von Biovision (Biovision Inc., Milpitas Kalifornien, USA) im Rahmen eines kolorimetrischen Nachweisverfahrens möglich (vgl. Herstellerangaben).

Die Messung wurde den Herstellerangaben entsprechend vorbereitet. Von den zu messenden Proben wurden jeweils 10 µl in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert und jeweils 100 µl der Reaktionslösung aus einem LDH-Assay-Puffer und dem WST-Substrat

(*water soluble tetrazolium*, 20 µl WST / 1 ml LDH-Assay) dazugegeben. Bei Versuchen mit Makrophagen wurde die Lösung für 30 min und mit neutrophilen Granulozyten für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

In diesem Testverfahren katalysiert die freie LDH die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, wobei NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Das so entstandene NADH reagiert wiederum mit dem zugegebenen WST unter Bildung eines gelblich-orangen Farbstoffes. Mit Hilfe eines Mikroplattenlesers (Tristar LB 941, Multimode Mikroplattenleser, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland) wurde die Absorption bei einem Maximum von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

Neben den Messungen der einzelnen Versuchsproben (*V*) diene als Positivkontrolle (*P*) die Lyse unbehandelter Zellen mit Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) und als Negativkontrolle (*N*) das jeweils verwendete Zellkulturmedium in Reinform.

Die Zytotoxizität (*Z*) wurde schließlich als prozentualer Anteil der maximalen LDH-Freisetzung mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$Z = (V - P / P - N) \times 100$$

3.2.5 Messung der IL-1 β - und IL-6-Konzentrationen im Zellüberstand

Die Konzentrationen der Zytokine IL-1 β und IL-6 wurden in Zellkulturversuchen mit Knochenmarksmakrophagen entsprechend der *in-vivo*-Versuche (siehe 3.1.11) mittels kommerziellen ELISAs für das jeweilige Interleukin (DuoSet[®] Elisa, R&D Systems, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben bestimmt. Aufgrund der größeren Probenmenge konnte im Vergleich zu den *in-vivo*-Versuchen neben IL-1 β zusätzlich auch IL-6 gemessen werden, welchem ebenfalls eine entscheidende Rolle als Entzündungsmediator in der Anfangsphase der Pneumokokkenmeningitis zukommt (Klein, M. et al., 2006b; Koedel, U. et al., 2002a; Rupprecht, T. A. et al., 2007).

3.2.6 Bestimmung der ATP-Konzentrationen im Zellüberstand

Die photometrischen Messungen der ATP-Konzentrationen in den Zellkulturproben erfolgten entsprechend der Bestimmungen des ATP-Gehalts in den Liquorproben der *in-vivo*-Versuche (siehe 3.1.12) mit Hilfe des ATP Determination Kits von Molecular Probes. Hierbei wurden zu je 10 µl der zu messenden Zellkulturüberstand-Proben jeweils 100 µl der Reaktionslösung zugegeben. Die jeweiligen ATP-Standardkurven wurden entsprechend aus Proben je 10 µl reinen ATPs in absteigenden Konzentrationen bei jeweils fünffacher Verdünnung beginnend mit 1 µM erstellt.

Als Positiv- und Negativkontrollen dienten jeweils durch Triton lysierte, unbehandelte Knochenmarkszellen beziehungsweise Zellkulturmedium in Reinform.

3.3 Statistische Methoden

Zur Auswertung der Daten wurde das Programm Systat 9.0 (Systat Software, Inc., San Jose, Kalifornien, USA) verwendet. Die führenden statistischen Testverfahren waren die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, *one way analysis of variance*) sowie der Student-Newman-Keuls-Test für Post-Hoc-Analysen. Unterschiede wurden bei einem p-Wert < 0.05 als signifikant betrachtet. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Inhibition der Makrophagen-Aktivierung durch P2R-Antagonismus

Kürzlich gewonnene Daten unserer Arbeitsgruppe legten eine Beteiligung von extrazellulärem ATP bei der NLRP-3-Inflammasom-abhängigen Freisetzung von IL-1 β aus differenzierten menschlichen THP-1-Zellen nach Exposition mit *S. pneumoniae* nahe (Hoegen, T. et al., 2011). Um diesem Befund nachzugehen, wurden im Rahmen dieser Studie Knochenmarks-Makrophagen (BMDM) mit lebenden *S. pneumoniae* Serotyp 2 vom Stamm D39 in Ab- oder Anwesenheit von Suramin, BBG oder ox-ATP stimuliert (siehe 3.2.3.1). Diese sind jeweils als P2R-Antagonisten bekannt, wenn auch mit signifikanten Unterschieden in der Rezeptor-Subtyp-Spezifität. Wie in Abb. **8A**) erkennbar, inhibierten sowohl Suramin als auch BBG konzentrationsabhängig die Pneumokokken-abhängige IL-1 β -Sekretion. Ebenso wies ox-ATP eine starke Inhibition auf. Entsprechend wurde auch die Pneumokokken-induzierte Produktion von IL-6 durch alle drei Substanzen verhindert (Abb. **8B**).

Ergebnisse

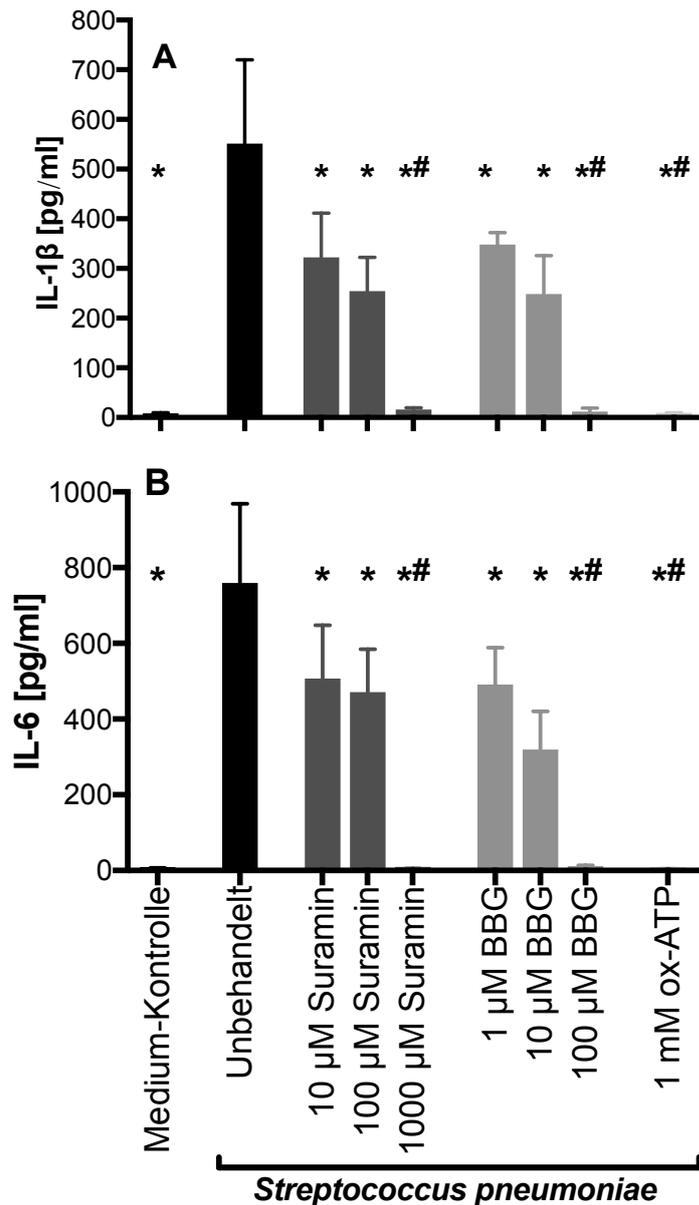


Abb. 8: P2R-Antagonismus moduliert die Aktivierung von murinen BMDM nach Exposition mit *S. pneumoniae* *in vitro*

Um die Rolle des P2R-Signalweges bei der *S. pneumoniae*-induzierten Makrophagen-Aktivierung darzustellen, wurden murine Knochenmarksmakrophagen (BMDM) in Ab- oder Anwesenheit von Suramin, BBG oder ox-ATP mit D39-Pneumokokken (10^7 cfu/ml) exponiert. Sechs Stunden später wurden Medium-Proben entnommen und auf die Anwesenheit von IL-1 β (**A**) und IL-6 (**B**) mit Hilfe kommerziell erhältlicher Assay-Kits untersucht. Alle Experimente wurden mindestens zweimal in dreifacher Ausföhrung durchgeföhrt. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SD aufgeföhrt. *P < 0.05, verglichen mit *S. pneumoniae* exponierten, unbehandelten Makrophagen (Positivkontrolle), #P < 0.05, verglichen mit *S. pneumoniae* exponierten Makrophagen, behandelt mit der jeweils niedrigeren Dosis des betreffenden Inhibitors, mittels ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test für Post-hoc-Analysen.

4.2 Effekte des P2R-Antagonismus im Verlauf der PM

4.2.1 Effekt des P2R-Antagonismus auf die Entwicklung der PM

Um die funktionelle Signifikanz des P2R-Signalweges bei der Pneumokokkenmeningitis zu testen, wurden die Mäuse unmittelbar im Anschluss an die Infektion mit Suramin oder BBG behandelt und 16 Stunden später untersucht (siehe 3.1.6.1). Vom P2R-Antagonisten Suramin wurde berichtet, dass er unter normalen Bedingungen nur zu einem geringen Teil die Blut-Hirn/Liquor-Schranke überwinden kann (Hawking, F., 1940; Naviaux, J. C. et al., 2014; Sanderson, L. et al., 2007). Um sicher zu gehen, dass kein Effekt des Therapeutikums aufgrund eingeschränkter Bioverfügbarkeit übersehen wird, wurde Suramin in einer zusätzlichen Experimentalgruppe auch über den intrazisternalen Verabreichungsweg gegeben. Weder eine Behandlung mit Suramin – unabhängig vom Verabreichungsweg – noch mit BBG hatten jedoch einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung einer Meningitis. 16 Stunden nach Infektion war die Anzahl der Leukozyten im Liquor (CSF) bei den Mäusen, welche einen P2R-Antagonisten erhalten hatten, und denen, welchen das Vehikel „steriles Wasser“ injiziert worden war, vergleichbar (Abb. **9A**). Entsprechend wurden die Liquor-Konzentrationen von IL-1 β durch die Behandlung mit Suramin oder BBG nicht beeinflusst (Abb. **9B**). Übereinstimmend mit dem fehlenden Einfluss auf die Entzündungsreaktion des Gehirns zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich des Ausmaßes intrakranieller Komplikationen wie einem Anstieg des ICP oder der Zahl intrakranieller Blutungen (Abb. **9C, D**). Dementsprechend waren der klinische Scorewert, erhoben 16 Stunden nach Infektion, sowie die Abnahme von Körpergewicht und Körpertemperatur zwischen den behandelten und den Kontrolltieren ähnlich (Abb. **9E-G**). Des Weiteren ergaben die Behandlung mit Suramin oder BBG keine Veränderungen der Pneumokokkentiter in Hirn und Blut (Abb. **9H, I**).

Ergebnisse

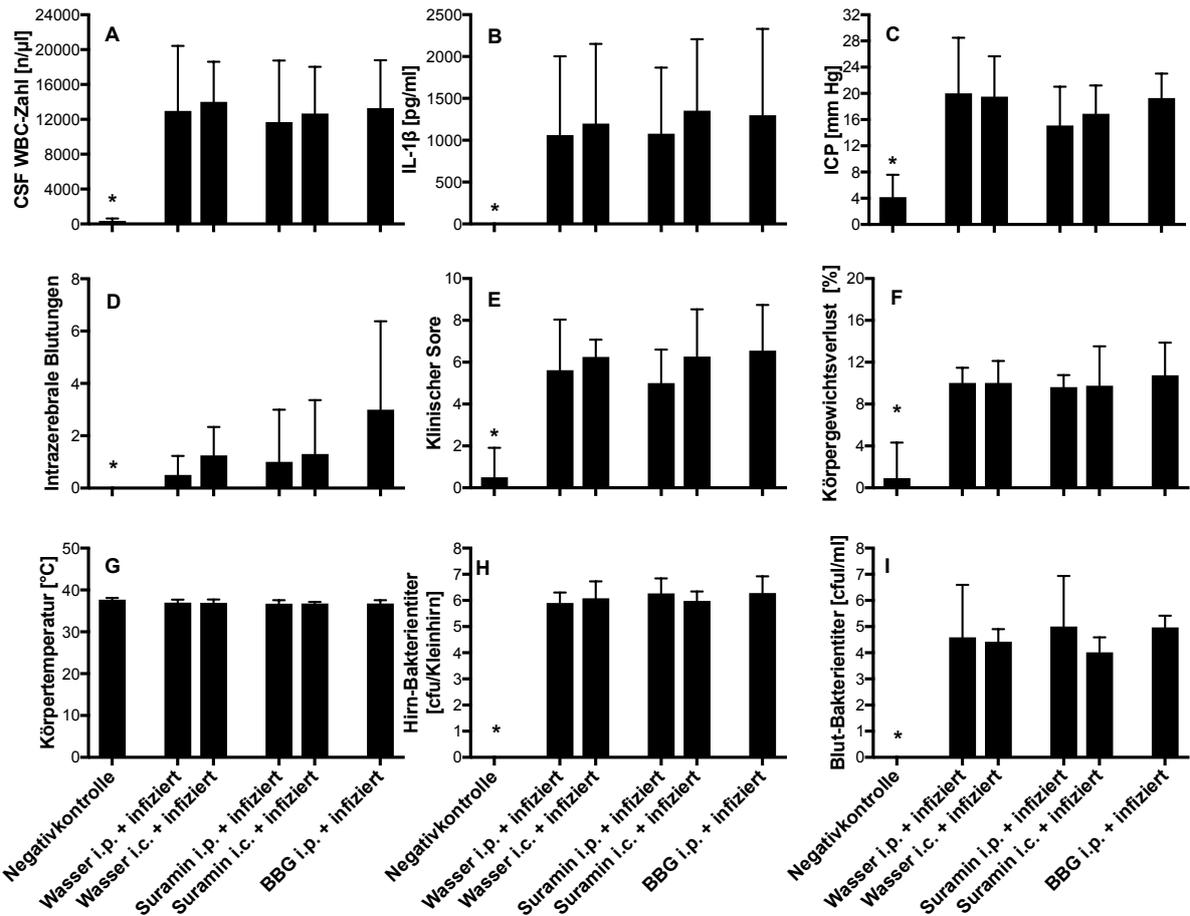


Abb. 9: Kein Effekt des P2R-Antagonismus auf die Entwicklung der PM

Mäuse wurden mit Suramin (Verabreichung i.p. oder i.c. von jeweils 20 mg/kg KG beziehungsweise Hirngewicht; n = 11 für jede Gruppe), BBG (Verabreichung i.p. von 50 mg/kg KG; n = 11) oder dem Vehikel „steriles Wasser“ (Verabreichung i.p.; unbehandelte, infizierte Tiere, Positivkontrollen; n = 21) behandelt. In einer zusätzlichen entsprechenden Kontrollgruppe wurde den Mäusen das Vehikel „steriles Wasser“ intrazisternal zwei Stunden vor der Infektion verabreicht (n = 4). Eine Pneumokokkenmeningitis wurde durch eine intrazisternale Injektion von *S. pneumoniae* Serotyp 2 (Stamm D39) induziert. Als Negativkontrolle diente die intrazisternale Injektion der entsprechenden Menge an PBS (n = 8). 16 Stunden später wurden die Tiere evaluiert. **A, B**) Die Anzahl der Leukozyten (*white blood cells*, WBC) sowie die Konzentrationen von IL-1 β im Liquor war vergleichbar zwischen Mäusen, welche einen P2R-Antagonisten erhalten hatten, und Mäusen, welchen das Vehikel injiziert worden war. **C, D**) Der Meningitis-induzierte Anstieg des intrakraniellen Drucks (*intracranial pressure*, ICP) sowie die Anzahl intrazerebraler Blutungen wurden ebenfalls nicht durch Behandlung mit P2R-Antagonisten beeinflusst. **E-G**) Es gab auch keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich des klinischen Scorewerts, der Abnahme des Körpergewichts und der Temperatur. **H, I**) Darüber hinaus wurde das Pneumokokken-Wachstum im Hirn – festgestellt anhand der Titer im Kleinhirn – und im Blut durch eine Behandlung mit P2R-Antagonisten nicht beeinflusst. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SD aufgeführt. *P < 0.05, verglichen mit infizierten Tieren, mittels ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test für Post-hoc-Analysen.

4.2.2 Effekt des P2R-Antagonismus im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf der PM

Zur Testung der Rolle der purinergen Signalwege im fortgeschrittenen Stadium der Pneumokokkenmeningitis wurden die Mäuse 16 Stunden *post infectionem* mit Suramin

Ergebnisse

behandelt und erst nach 40 Stunden die gewünschten Parameter gewonnen (n = 10; siehe 3.1.6.2). Um einem vorzeitigen letalen Verlauf entgegenzuwirken, wurden die Tiere zudem 16 Stunden *post infectionem* einer Antibiotika-Therapie mit Ceftriaxon unterzogen. Die Positivkontrollen erhielten entsprechend dem vorhergehenden Versuchsaufbau statt einer Behandlung mit Suramin eine intraperitoneale Injektion des Vehikels „steriles Wasser“ (n = 12). Als Negativkontrolle dienten Tiere, welchen statt *S. pneumoniae* intrazisternal PBS injiziert wurde (n = 4).

Es ergaben sich im Versuchsaufbau zur fortgeschrittenen Pneumokokkenmeningitis jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parametern der Suramin-Behandlungsgruppe und der Gruppe der Positivkontrollen, bestehend aus Vehikel-behandelten, infizierten Tieren (Abb. **10A-G**).

Ergebnisse

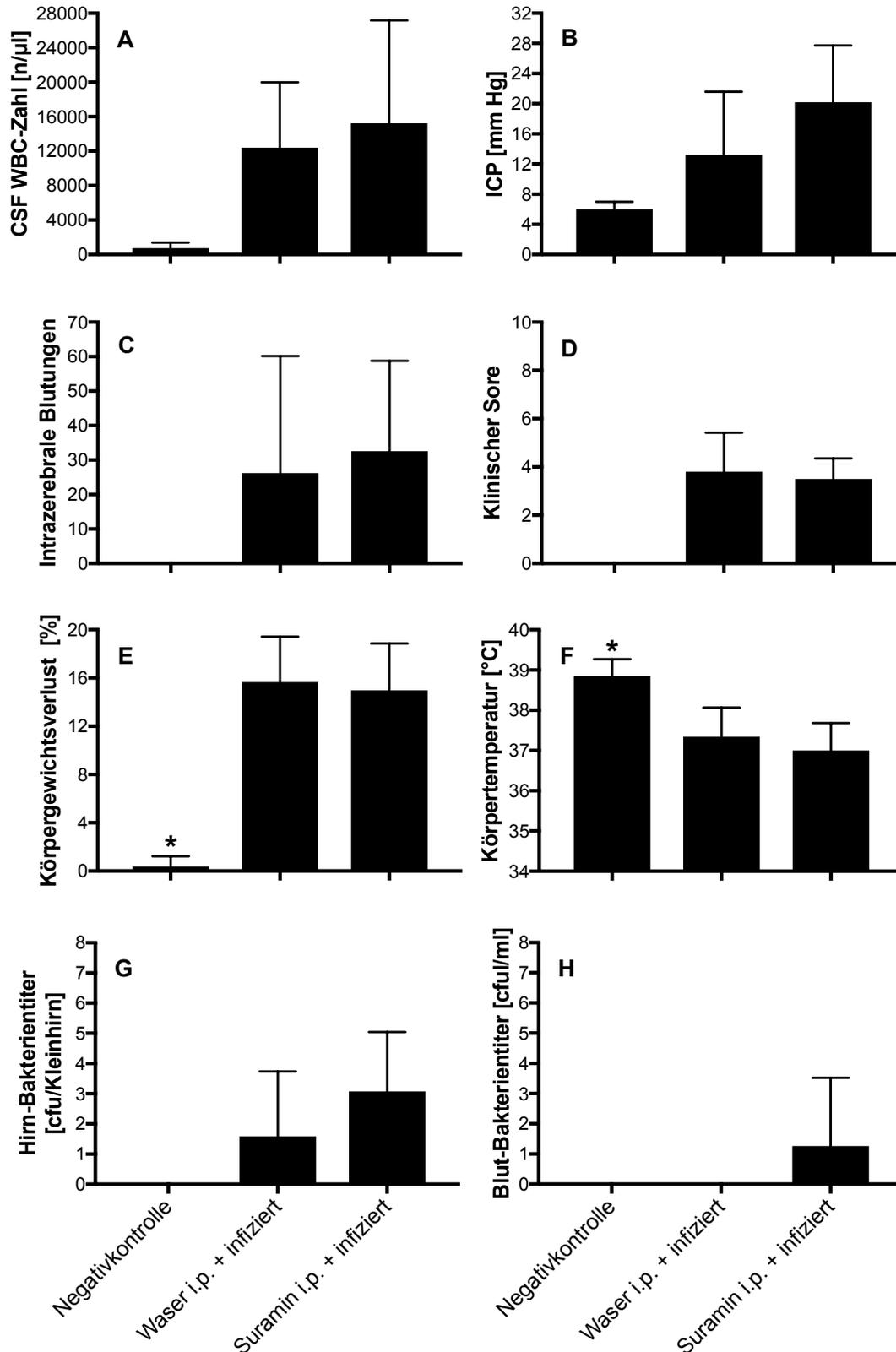


Abb. 10: Kein Effekt des P2R-Antagonismus im fortgeschrittenen Stadium der PM

Intraperitoneale Verabreichung von Suramin (20 mg/kg KG; behandelte, infizierte Tiere, n= 10) oder dem Vehikel (unbehandelte, infizierte Tiere, Positivkontrolle; n= 12) 16 Stunden nach Infektion. Die Pneumokokkenmeningitis wurde durch intrazisternale Injektion von *S. pneumoniae* Serotyp 2 (Stamm D39) induziert. Als Negativkontrolle diente die intrazisternale Injektion der entsprechenden Menge an

PBS (n = 4). Endgültige Evaluation der Tiere 40 h später. **A)** Die Anzahl der Leukozyten (*white blood cells*, WBC) im Liquor war vergleichbar zwischen den Mäusen, welche den P2R-Antagonisten erhalten hatten, und solchen, denen das Vehikel injiziert worden war. **B, C)** Beim Meningitis-induzierten Anstieg des intrakraniellen Drucks (*intracranial pressure*, ICP) sowie der Anzahl intrazerebraler Blutungen gab es durch die Behandlung ebenfalls keinen Unterschied im Vergleich zu den Positivkontrollen. **D-F)** Es gab ebenfalls keine Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten, infizierten Gruppen hinsichtlich des klinischen Score, der Abnahme des Körpergewichts und der Körpertemperatur. **G, H)** Darüber hinaus wurden auch die Bakterientiter im Gehirn und im Blut durch eine Behandlung mit dem P2R-Antagonisten im Vergleich zu den Positivkontrollen nicht beeinflusst. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SD aufgeführt. *P < 0.05, verglichen mit infizierten Tieren, mittels ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test für Post-hoc-Analysen.

4.3 Abnahme der P2R-Expression und Liquor-ATP-Level im Verlauf der PM

Um eine mögliche Erklärung für den mangelnden Effekt der P2R-Antagonisierung *in vivo* zu finden, wurde als nächstes die Expression von P2R im Mäusehirn im Verlauf der Pneumokokkenmeningitis untersucht (siehe 3.1.12). Wie in Abb. 11 dargestellt, führte die Pneumokokkenmeningitis zu einer erheblichen Abnahme der meisten P2R-Subtypen eingeschlossen *P2X1*, *P2X4*, *P2X7*, *P2Y4*, *P2Y12* und *P2Y14* (Abb. **11A-C, E, G, H**). Die Expression des *P2Y2*-Subtypen blieb während des Beobachtungszeitraums durchgehend auf einem niedrigen Level (Abb. **11D**), wohingegen ein leichter Anstieg in der *P2Y6*-mRNA-Expression im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung zu beobachten war (Abb. **11F**).

Ergebnisse

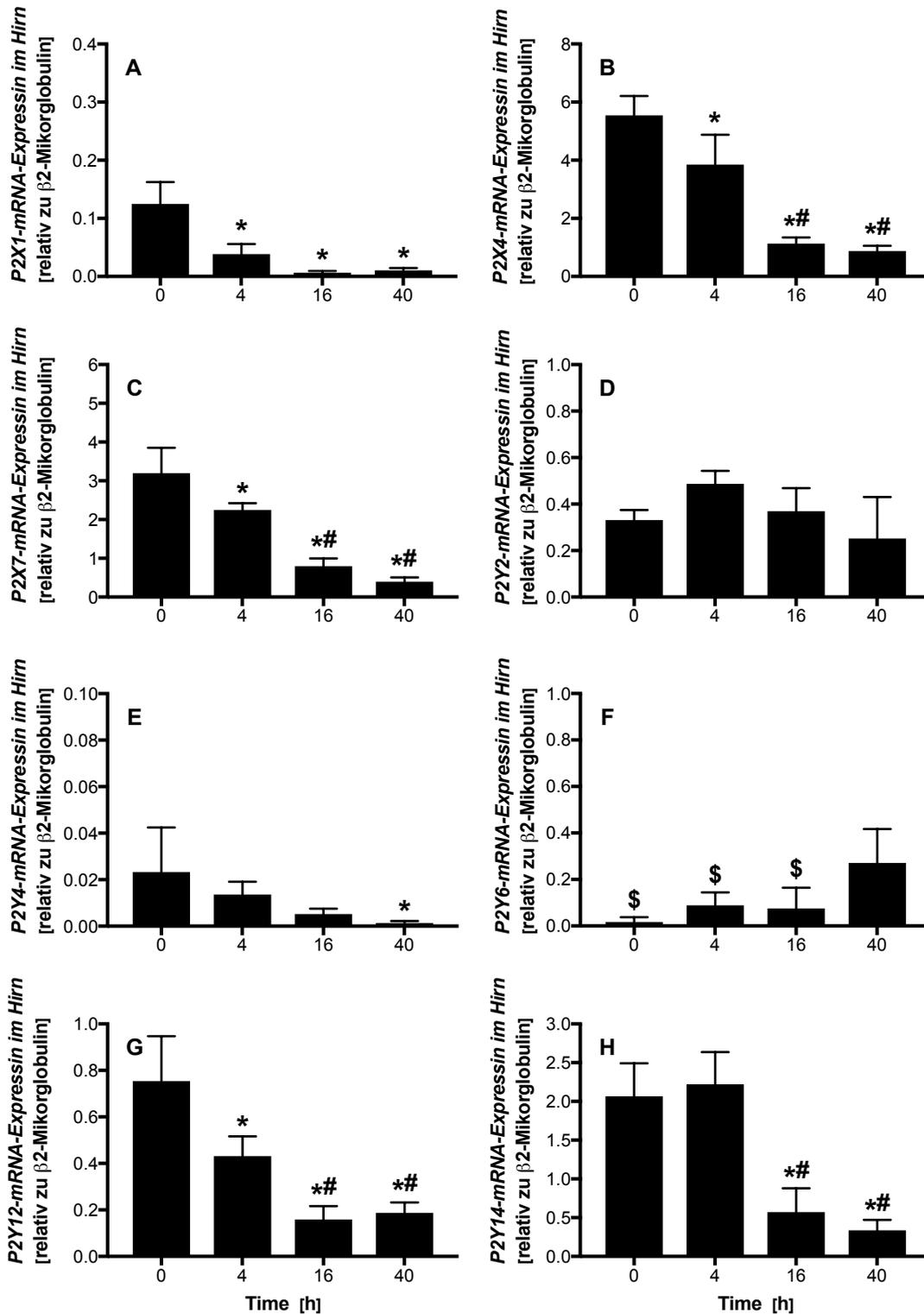


Abb. 11: Expression von P2R im Gehirn im Verlauf der PM

Expression von P2R-Subtypen im Hirngewebe von Mäusen vor (0 h), 4 Stunden (h), 16 h und 40 h nach der Induktion einer Pneumokokkenmeningitis (jeweils n = 4 in jeder Gruppe). Die relative Expression der verschiedenen P2R (A-H) wurde im Vergleich zum Haushaltsgen $\beta 2$ -Mikroglobulin unter Verwendung einer quantitativen RT-PCR untersucht. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SD aufgeführt. *P < 0.05, verglichen mit nicht-infizierten Kontrollen, #P < 0.05, verglichen mit 4 h nach der Infektion, \$P < 0.05, verglichen mit 40 h nach der Infektion, mittels ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test für Post-hoc-Analysen.

Abgesehen von der P2R-Expression ist die extrazelluläre Nukleotid-Konzentration ein wesentlicher Faktor für das Ausmaß, in welchem die purinergen Signalwege zur Immunantwort beitragen können. Infolgedessen wurden zusätzlich ATP-Konzentrationen in den Liquorproben von Mäusen gemessen, die vor und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Pneumokokkeninfektion gewonnen worden waren (siehe 3.1.13). Die Liquor-ATP-Spiegel nahmen signifikant im Verlauf der Erkrankung ab und waren 16 und 40 Stunden nach der Inokulation der Pneumokokken nahezu nicht mehr messbar (Abb. 12).

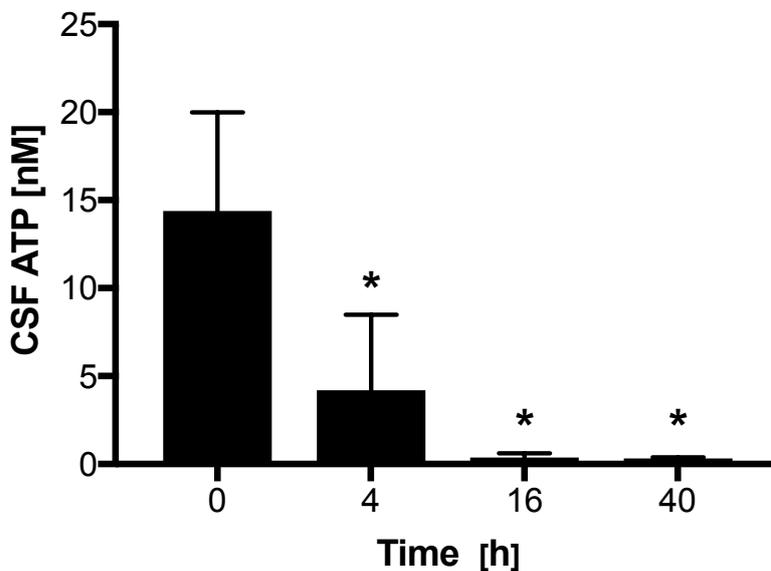


Abb. 12: Liquor-ATP-Konzentrationen im Verlauf der PM

ATP-Konzentrationen wurden in Liquor-Proben von Mäusen, welche vor (0 h, n = 4) beziehungsweise 4 Stunden (h; n = 4), 16 h (n = 5) oder 40 h (n = 3) nach der Infektion mit *S. pneumoniae* Serotyp 2 vom Stamm D39 entnommen worden waren, unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Biolumineszenz-Kits gemessen. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SD aufgeführt. *P < 0.05, im Vergleich mit Liquorproben, die vor Infektion mit *S. pneumoniae* (0 h) gewonnen wurden, mittels ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test für Post-hoc-Analysen.

4.4 Möglicher Beitrag von CD39 zum eATP-Abbau

Da Makrophagen und Neutrophile die Hauptakteure bei der Entzündungsantwort im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis darstellen, stellten wir uns die Frage, ob diese Zellen eine Rolle in der Abnahme der ATP-Konzentrationen im Liquor spielen. Um diesen Aspekt näher zu beleuchten, ließ man lebende *S. pneumoniae* Serotyp 2 vom Stamm D39 in Ab- oder Anwesenheit von murinen BMDM oder BMN in aCSF, substituiert mit 10 nM ATP – was der ATP-Konzentration in normalem Nager-Liquor entspricht – wachsen (siehe 3.2.3.2). Nach jeweils 30 und 120 min Kultivierung wurden die aCSF-Proben entnommen und für die ATP-

Ergebnisse

Bestimmungen verwendet. Das Pneumokokkenwachstum in zellfreiem aCSF wurde von einer zeitabhängigen Zunahme der ATP-Level begleitet. Diese Zunahme wurde durch die Anwesenheit von BMDM beziehungsweise BMN jeweils abgeschwächt oder sogar komplett verhindert (Abb. 13). Die Aktivität der ATP-Degradierung von BMDM und BMN konnte – zumindest teilweise – durch die Behandlung mit ARL 67156 blockiert werden. Dies weist auf eine mögliche Rolle der Ektonukleotidase CD39 in der Meningitis-assoziierten Abnahme des Liquor-ATP hin.

Um auszuschließen, dass weder BMDM noch BMN die eATP-Konzentrationen indirekt durch eine Inhibition des Pneumokokken-Wachstums im aCSF beeinflussen, wurden darüber hinaus die Pneumokokkentiter am Ende jedes Experiments durch Kultivierung serieller Verdünnungen von aCSF-Proben auf Agar-Platten bestimmt. Es konnten dabei keine Unterschiede im Pneumokokkenwachstum festgestellt werden, unabhängig davon, ob diese in Ab- oder Anwesenheit von BMDM oder BMN gewachsen sind. So weisen zum Beispiel die Pneumokokkentiter in Ab- und Anwesenheit von BMDM nach jeweils 30 min Kultivierung, 7.14 ± 0.08 versus $7.06 \pm 0.14 \log_{10}\text{cfu/ml}$, und 120 min Kultivierung, 7.67 ± 0.07 versus $7.71 \pm 0.12 \log_{10}\text{cfu/ml}$, keine signifikanten Unterschiede auf.

Ergebnisse

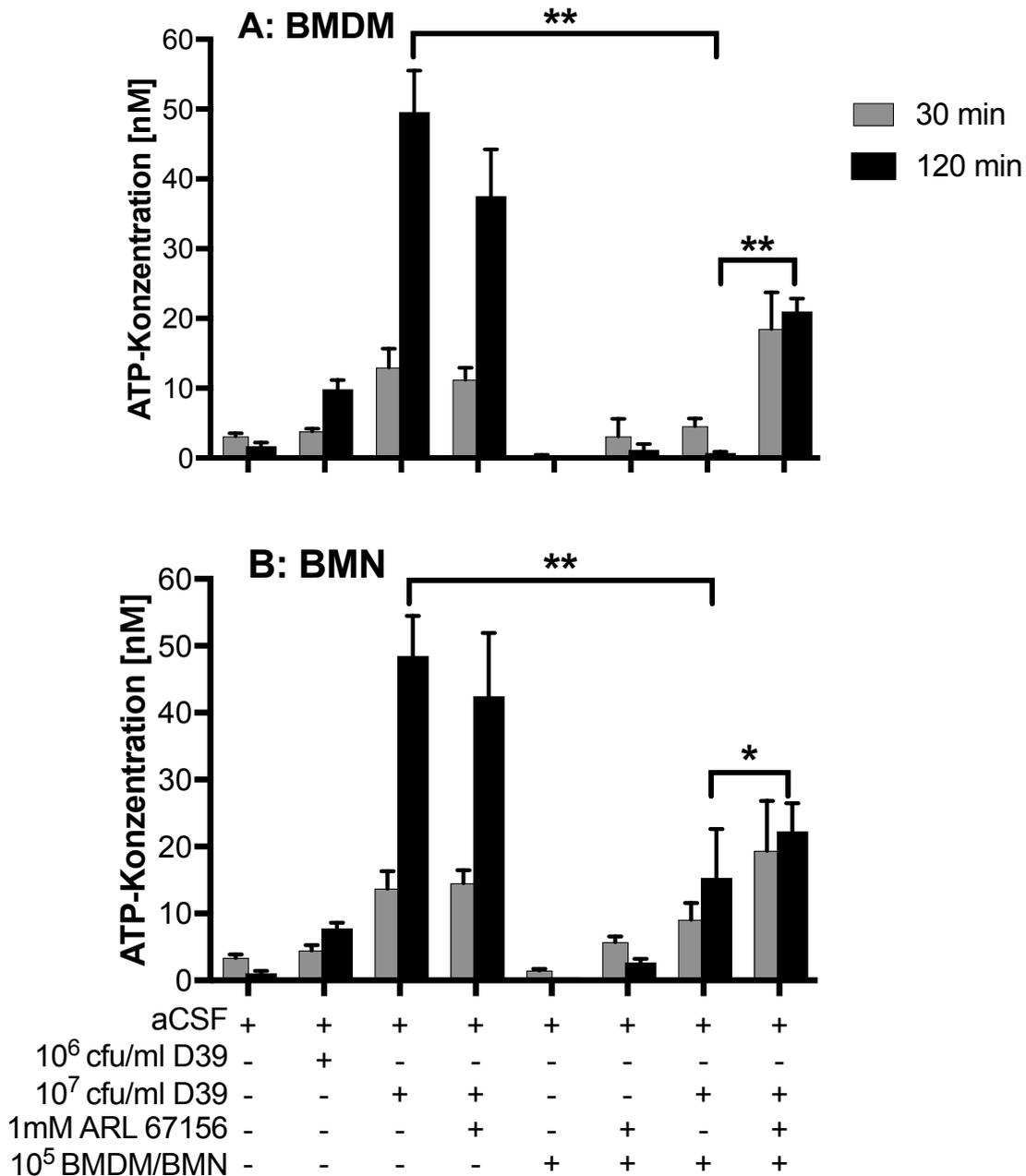


Abb. 13: ATP-Katabolismus bei BMDM und BMN *in vitro*

S. pneumoniae wurden in Ab- oder Anwesenheit von murinen **A)** BMDM oder **B)** BMN (100.000 Zellen pro Well) in künstlichem Liquor herangezüchtet, welchem ATP in seiner physiologischen Konzentration zugefügt wurde. Nach 30 min (graue Balken) und 120 min (schwarze Balken) Kultivierung wurden die aCSF-Proben entnommen und zur Bestimmung von ATP mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Biolumineszenz Kits verwendet. Teilweise wurde der Ektonukleotidase-Inhibitor ARL 67156 (1 mM) vor dem Zufügen von *S. pneumoniae* und murinen Immunzellen zum Kulturmedium gegeben. Alle Versuche wurden mindestens zweimal in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SD aufgeführt. **P < 0.001 und *P < 0.01, verglichen mit der jeweilig dargestellten Gruppe, mittels ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test für Post-hoc-Analysen.

4.5 Effekt von Ektonukleotidase-Inhibitoren und Adenosinrezeptor-Antagonisten

Da *in vivo* keine Wirkung der Blockierung von P2R im Verlauf der Meningitis zu sehen war (siehe 4.2), jedoch eine Rolle der Ektonukleotidase CD39 beim Abbau von ATP nachgewiesen werden konnte (siehe 4.4), sollte in weiteren Versuchsreihen geklärt werden, ob (i) anstelle von ATP dessen Abbauprodukte, insbesondere Adenosin, eine größere Rolle im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis spielen beziehungsweise (ii) welche Auswirkungen eine Blockierung des Abbaus von ATP und somit ein Überangebot des Nukleotids auf die klinischen Parameter hat.

Wir verabreichten den Mäusen hierfür entsprechend den vorhergehenden *in-vivo*-Versuchsreihen (siehe 3.1.6.1) intraperitoneal den Ektonukleotidase-Inhibitor ARL 67156 (n = 11) (Levesque, S. et al., 2007) beziehungsweise den Adenosinrezeptor-Antagonisten Theophyllin (n = 11) (Biaggioni, I. et al., 1991; Daly, J. W. et al., 1985; Fredholm, B. B., 1979; Rall, T. W., 1982; Saleh, T. S. F. et al., 1996). Die Tiere der Positivkontrollgruppe erhielten intraperitoneal anstelle einer Behandlung in entsprechender Menge die Vehikelsubstanz „steriles Wasser“ (n = 21).

Beim Vergleich der Versuchsgruppen untereinander fanden sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der Leukozyten (*white blood cells*, *WBC*) im Liquor (Abb. **14A**), dem Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP, Abb. **14C**), dem klinischen Score (Abb. **14D**) sowie der Körpertemperatur der Tiere (Abb. **14F**). Die IL-1 β -Konzentration im Liquor hingegen war bei Mäusen unter Behandlung mit ARL 67156 mit 2179.97 ± 1019.39 pg/ml im Vergleich zu den Tieren ohne Behandlung mit 1061.65 ± 979.07 pg/ml und denen mit einer Behandlung mit Theophyllin mit 745.73 ± 587.00 pg/ml signifikant erhöht (Abb. **14B**). Die Abnahme des Körpergewichts war bei Verabreichung von Theophyllin mit $8.52 \pm 1.23\%$ sowohl gegenüber den Tieren der Positivkontrolle mit $10.03 \pm 1.47\%$ als auch den Mäusen nach Verabreichung von ARL 67156 mit $10.38 \pm 1.75\%$ signifikant geringer ausgeprägt (Abb. **14E**). Die Bakterientiter im Gehirn waren im Vergleich zur Positivkontrollgruppe mit 5.90 ± 0.41 cfu/Kleinhirn jeweils sowohl bei der Behandlung mit ARL 67156 mit 6.33 ± 0.54 cfu/Kleinhirn als auch mit Theophyllin mit 6.24 ± 0.28 cfu/Kleinhirn signifikant erhöht (Abb. **14G**). Bei den Bluttitern hingegen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Titer nach Behandlung mit ARL 67156 mit 6.83 ± 0.91 cfu/ml sowohl im Vergleich zu den Positivkontrolltieren mit 4.59 ± 2.07 cfu/ml als auch denen unter Behandlung mit Theophyllin mit 4.66 ± 0.53 cfu/ml (Abb. **14H**).

Ergebnisse

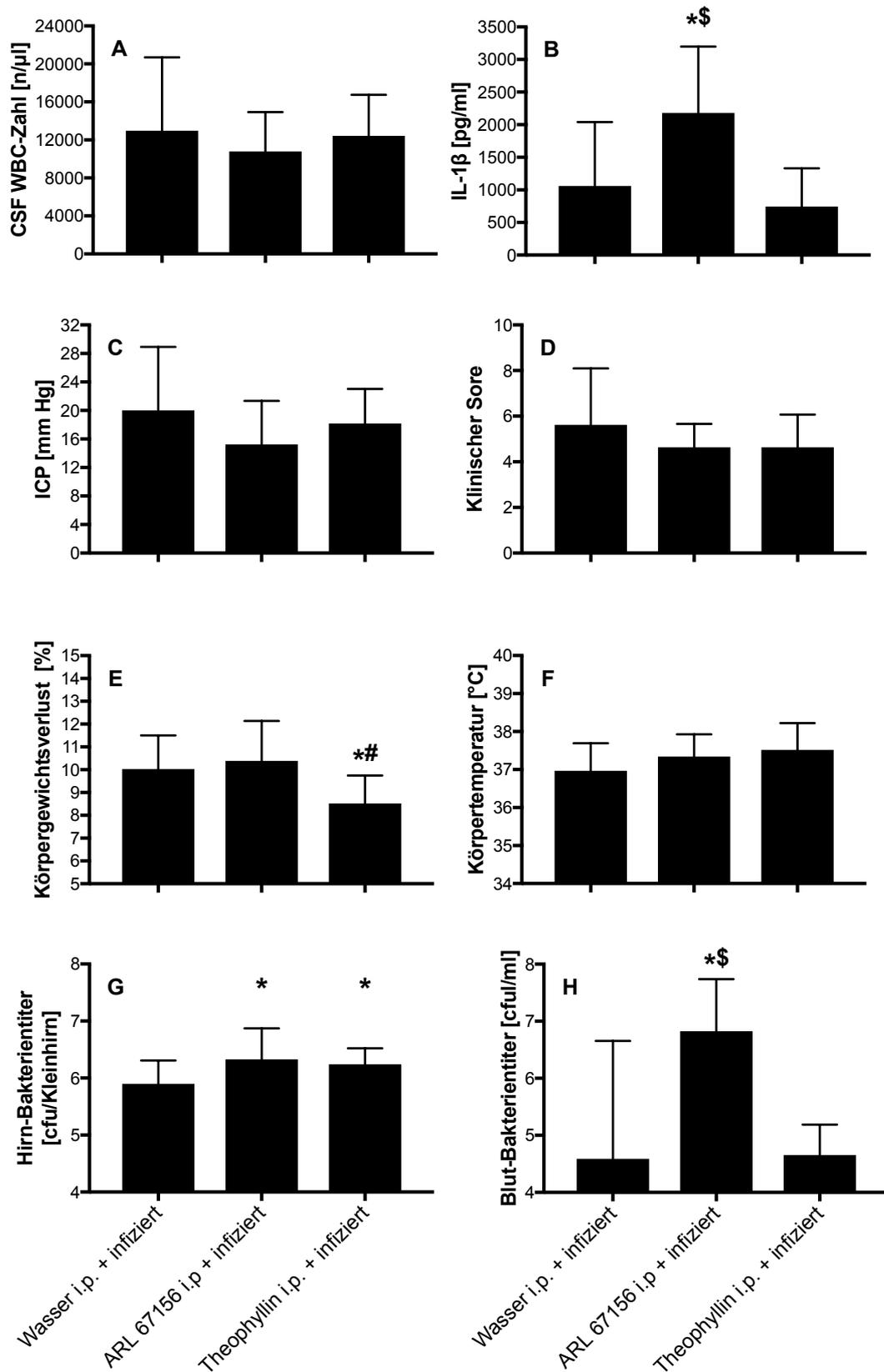


Abb. 14 Effekte eines Ektonukleotidase-Inhibitors und Adenosinrezeptor-Antagonisten auf die experimentelle PM

Intraperitoneale Verabreichung von ARL 67156 (20 mg/kg KG; n= 11), Theophyllin (50mg/kg KG, n = 11) oder dem Vehikel „steriles Wasser“ (unbehandelte, infizierte Tiere, Positivkontrolle; n= 21) nach Infektion. Die Pneumokokkenmeningitis wurde durch intrazisternale Injektion von *S. pneumoniae*

Ergebnisse

Serotyp 2 (Stamm D39) induziert. Untersuchung der Tiere 16 h später. **A)** Die Anzahl der Leukozyten (*white blood cells*, WBC) im Liquor war in allen Gruppen nahezu identisch. **B)** Die IL-1 β -Konzentrationen im Liquor waren bei Behandlung mit ARL 67156 im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsgruppen signifikant erhöht. **C, D)** Beim Meningitis-induzierten Anstieg des intrakraniellen Drucks (*intracranial pressure*, ICP) sowie beim klinischen Score führten die Behandlungen zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zur Positivkontrolle. **E)** Die Abnahme des Körpergewichts war bei den Mäusen, denen Theophyllin verabreicht worden war, sowohl gegenüber den Tieren der Positivkontrolle als auch denen, die mit ARL 67156 behandelt worden waren, signifikant geringer ausgeprägt. **F)** Hinsichtlich der Körpertemperatur fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. **G)** Die Bakterientiter im Gehirn waren im Vergleich zur Positivkontrollgruppe sowohl bei der Behandlung mit ARL 67156 als auch mit Theophyllin signifikant erhöht. **H)** Bei den Bluttitern zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Titer nach Behandlung mit ARL 67156 sowohl im Vergleich zu den Positivkontrolltieren als auch zu denen unter Behandlung mit Theophyllin. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SD aufgeführt. *P < 0.05 verglichen mit unbehandelten, infizierten Tieren (Wasser i.p. + infiziert), #P < 0.05 verglichen mit der Behandlung mit ARL 67156, §P < 0.05 verglichen mit der Behandlung mit Theophyllin, mittels ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test für Post-hoc-Analysen.

5 Diskussion

Eine übermäßige neutrophile Entzündungsreaktion trägt zu den eingangs beschriebenen neuropathologischen Schäden und in Folge zu einem ungünstigen Ausgang der Pneumokokkenmeningitis bei (Gerber, J. und Nau, R., 2010; Henriques-Normark, B. und Tuomanen, E. I., 2013; Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010a; b; Liechti, F. D., Grandgirard, D. & Leib, S. L. , 2015; Nau, R. und Brück, W., 2002; Weber, J. R. und Tuomanen, E. I., 2007). Bei zellkulturellen Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus des NLRP3-Inflammasoms bei humanen THP-1 Makrophagen konnte eine enge zeitliche Korrelation zwischen der Aktivität der Casp1, die an der Produktion des entzündungsfördernden Zytokins IL-1 β beteiligt ist (Koedel, U. et al., 2002b), und der Freisetzung von ATP beobachtet werden. Darüber hinaus verhinderte die Zugabe des unspezifischen Purinorezeptor-Antagonisten ox-ATP die Aktivierung von Casp1 (Hoegen, T. et al., 2011). Da extrazelluläres ATP grundsätzlich über P2R die Aktivierung von Immunzellen sowie Entzündungsreaktionen fördern kann (Bours, M. J. et al., 2006; Idzko, M. et al., 2014a; Kaufmann, A. et al., 2005; Ramakers, B. P. et al., 2011; Vitiello, L. et al., 2012; Willart, M. A. und Lambrecht, B. N., 2009), wurde von unserer Arbeitsgruppe angenommen, dass eATP auch als Modulator der Entzündung und des Gewebeschadens bei der Pneumokokkenmeningitis fungiert.

Aus diesem Grund lag der Fokus der vorliegenden Arbeit auf

- 1) der Charakterisierung der ATP-Freisetzung und Purinorezeptor-Expression im Krankheitsverlauf der Pneumokokkenmeningitis sowie
- 2) der Analyse der funktionellen Bedeutung purinerger Signalwege bei der Regulation der Entzündungsreaktion und der Entstehung Meningitis-assoziiierter intrakranieller Komplikationen.

Letztendlich zeigte sich, dass der P2R-Antagonismus sowie eine Inhibition des ATP-Abbaus und der biologischen Wirkung des ATP-Abbauprodukts Adenosin keinen wesentlichen Effekt auf Entzündungsreaktion, intrakranielle Komplikationen und den Verlauf der Pneumokokkenmeningitis haben. Dies könnte auf einer signifikanten Reduktion der zerebralen Expression von P2R-Subtypen und einem Mangel an eATP im Liquor – vermutlich aufgrund eines verstärkten Katabolismus durch residente Makrophagen und Granulozyten – im Krankheitsverlauf beruhen.

5.1 Rolle von eATP bei der IL-1 β -Freisetzung

Wie durch Daten von Patienten (Mustafa, M. M. et al., 1989) und aus Tierexperimenten (Saukkonen, K. et al., 1990; Zwijnenburg, P. J. G. et al., 2003) belegt wurde, spielt die exzessive Produktion des Zytokins IL-1 β eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der

Pneumokokkenmeningitis. So wurde eine Korrelation erhöhter Konzentrationen an IL-1 β in Liquorproben von Meningitis-Patienten mit der Leukozyten-Zahl im Liquor und den neurologischen Folgeschäden beobachtet (Lopez-Cortes, L. et al., 1993; McCracken Jr, G. H. et al., 1989; Mustafa, M. M. et al., 1989; Ramilo, O. et al., 1989; Täuber, M. G. und Moser, B., 1999). In Tierversuchen reichte eine i.c. Injektion von rekombinantem IL-1 β per se aus, um eine Meningitis zu induzieren (Quagliarello, V. J. et al., 1991). Darüber hinaus ging in tierexperimentellen Studien die pharmakologische und genetische Blockade der IL-1 β -Produktion oder seines Signalwegs mit einer Reduktion der meningealen Entzündung und einer Verbesserung des klinischen Verlaufs der Pneumokokkenmeningitis einher (Braun, J. S. et al., 1999b; Hoegen, T. et al., 2011; Koedel, U. et al., 2002b). In einem anderem Tiermodell der hämatogen-induzierten Pneumokokkenmeningitis entwickelten IL-1 β -defiziente Mäuse häufiger als entsprechende Wildtypiere eine eitrige Meningitis. Ursächlich hierfür war eine eingeschränkte Immunantwort und Immunabwehr, die zu einer verstärkten Bakteriämie und folglich einer häufigeren bakteriellen Besiedlung des Leptomeningealraums führte (Zwijnenburg, P. J. G. et al., 2003).

Eine wesentliche Schlüsselrolle bei der Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis spielt das NLRP3-Inflammasom durch seine Funktion bei der Umwandlung von pro-IL-1 β in seine reife, biologisch aktive Form mit Hilfe von Casp1 (Franchi, L. et al., 2009; Hoegen, T. et al., 2011; Koedel, U. et al., 2002b; McNeela, E. A. et al., 2010; Tschopp, J. und Schroder, K., 2010).

In zellkulturellen Untersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe demonstrieren, dass eATP entscheidend zur Freisetzung von aktivem IL-1 β aus THP-1-Makrophagen nach einer Stimulation mit Pneumokokken beiträgt (Hoegen, T. et al., 2011). Ferrari, D. et al. (1997) konnten eine IL-1 β -Freisetzung aus menschlichen Makrophagen mit Hilfe von eATP nachweisen, wobei hierbei insbesondere die Aktivierung des P2Z-Rezeptors eine Rolle spielte. In Einklang mit unseren Befunden berichteten kürzlich Karmakar, M. et al. (2016), dass eATP im Mausmodell der Korneainfektion ein zentraler Regulator der NLRP3-Inflammasom-Aktivität und konsekutiven IL-1 β -Bildung in neutrophilen Granulozyten ist.

Die Rolle von ATP und P2R-Signalwegen bei der bakteriellen Meningitis war jedoch bisher weitgehend unbekannt. Die Beobachtungen an THP-1-Makrophagen und im Modell der Korneainfektion deuteten aber darauf hin, dass eATP als möglicher Modulator der Entzündung und des Gewebeschadens bei der Pneumokokkenmeningitis fungieren könnte.

5.2 Fehlender Effekt des P2R-Antagonismus auf den Verlauf der PM *in vivo*

Wie bereits erwähnt, zeigten frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass unter Zellkulturbedingungen eine Exposition mit lebenden Pneumokokken [i] neben einer erhöhten

Casp1-Aktivität und IL-1 β -Freisetzung zu einem Anstieg der extrazellulären ATP-Konzentration führen und [ii] die Inhibierung des ATP-Signalweges durch Behandlung mit dem relativ unselektiven Purinorezeptor-Antagonisten ox-ATP (Colomar, A. et al., 2003; Di Virgilio, F., 2003) die IL-1 β -Bildung signifikant abschwächen kann (Hoegen, T. et al., 2011). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen an einer humanen Monozyten/Makrophagen-Zelllinie ließen sich im Rahmen dieser Studie bestätigen: sowohl eine Behandlung mit ox-ATP (Colomar, A. et al., 2003; Di Virgilio, F., 2003) als auch mit den P2R-Antagonisten Suramin (Kim, J. E. et al., 2009; Light, A. R. et al., 2006; Naviaux, J. C. et al., 2014) und BBG (Chen, S. et al., 2013; Peng, W. et al., 2009) führten zu einer signifikanten Abnahme der IL-1 β -Freisetzung und einer daraus folgenden verminderten Expression von Zytokinen wie IL-6 aus murinen Knochenmarks-Makrophagen nach einer Exposition mit Antibiotika-abgetöteten Pneumokokken. Die vorliegenden Befunde decken sich auch mit Ergebnissen anderer Studien, wie etwa von Liu, J. S. et al. (2000) beziehungsweise John, G. R. et al. (2001), bei welchen die IL-1 β -Freisetzung und daraus resultierende IL-6-Expression durch Suramin und ox-ATP bei Astrozyten inhibiert werden konnten. Friedle, S. A. et al. (2010) geben eine Übersicht hinsichtlich des Potenzials von P2X7-Rezeptor-Antagonisten wie ox-ATP, Suramin oder BBG bei der Reduktion von Entzündungen des zentralen Nervensystem, wobei insbesondere die verminderte Freisetzung von IL-1 β bei Makrophagen-ähnlichen Zellen eine wesentliche Rolle spielt.

Obwohl Zytokinproduktion und Zelltod bei kultivierten BMDM nach Stimulation durch Pneumokokken mit Hilfe der Antagonisten inhibiert werden konnten, beeinflusste die pharmakologische Beeinträchtigung des eATP-Signalweges bei Mäusen *in vivo* weder die körpereigene Immunantwort noch die klinischen Parameter im Rahmen der Entwicklung der Pneumokokkenmeningitis. In einer weiteren ergänzenden Versuchsreihe wollten wir die Auswirkungen auf die bereits fortgeschrittene Meningitis untersuchen. Hintergrund war, dass wir zuerst eruieren wollten, ob die Interaktion von eATP und P2R zur Entwicklung der Entzündungsreaktion beiträgt und im zweiten Schritt testen, ob der eATP-P2R-Signalweg für die Aufrechterhaltung der Immunantwort nach Beginn der Antibiotikabehandlung wichtig ist. In dieser zweiten Phase hatten frühere Untersuchungen hinsichtlich HMGB1 und MRP14 Hinweise dafür geliefert, dass DAMPs im Vergleich zu PAMPs zunehmend an Bedeutung gewinnen (Höhne, C. et al., 2013; Wache, C. et al., 2015). Dies könnte auch für eATP gelten, welches wie eingangs erwähnt als DAMP angesehen werden kann. Hierbei kam der nicht-selektive Antagonist Suramin (Kim, J. E. et al., 2009; Light, A. R. et al., 2006; Naviaux, J. C. et al., 2014) zum Einsatz, welcher bei den *in-vitro*-Versuchen die Zytokin-Freisetzung effektiv blockierte. Doch auch im fortgeschrittenen Stadium konnte weder die Immunantwort noch der klinische Verlauf der Erkrankung durch die Behandlung mit Suramin beeinflusst werden.

Die vorliegenden *in-vivo*-Befunde stehen im Gegensatz zu zahlreichen Studien, die eine kritische Funktion von eATP als autokrines und parakrines Signalmolekül bei der Regulation von Immunantworten demonstriert haben; entscheidend für diese biologische Aktivität war dabei die eATP-induzierte Aktivierung zellmembrangebundener P2R (vgl. Cekic, C. und Linden, J., 2016; Fiebich, B. L. et al., 2014; Idzko, M. et al., 2014a). Zum Beispiel konnte in Modellen einer akuten Neurodegeneration, wie zum Beispiel der zerebralen Ischämie, traumatischer Hirn- oder Rückenmarksverletzungen, Subarachnoidalblutung und von epileptischen Anfällen gezeigt werden, dass eine pharmakologisch oder genetisch induzierte ATP-Hydrolyse beziehungsweise eine Inhibierung von P2R – insbesondere von *P2X7* – die mikrogliale Aktivierung, neutrophile Entzündungsreaktion und Zytokinexpression hemmen kann (Chen, S. et al., 2013; Choo, A. M. et al., 2013; Chu, K. et al., 2012; Davalos, D. et al., 2005; Peng, W. et al., 2009). Diese Reduktion der Neuroinflammation wurde üblicherweise von Neuroprotektion und einem besseren klinischen Ausgang begleitet (Choo, A. M. et al., 2013; Engel, T. et al., 2012; Kimbler, D. E. et al., 2012; Yu, Q. et al., 2013).

In ähnlicher Weise wurde gezeigt, dass purinerge Signalwege über P2R einen immunstimulierenden Effekt in diversen Modellen zur bakteriellen Infektion haben. Zum Beispiel erhöhte die lokale Applikation von Nukleotiden die Konzentrationen von Zytokinen, Chemokinen und Neutrophilen in der durch Peritoneallavage gewonnenen Flüssigkeit in einem Maus - *Escherichia coli* - Peritonitis-Modell (Xiang, Y. et al., 2013; Zhang, Z. et al., 2011). Genetische Defizienzen an *P2Y1* und *P2Y2* wiederum wurden mit einer geringeren angeborenen Immunantwort in Tiermodellen der Lungeninfektion (beispielsweise mit *P. aeruginosa*; Geary, C. et al., 2005), der Sepsis nach CLP (*cecal ligation and puncture*) (Santana, P. T. et al., 2015) sowie der septischen Enzephalopathie in Verbindung gebracht (Wang, H. et al., 2015). Darüber hinaus verstärkte die pharmakologische Hemmung beziehungsweise die genetische Ausschaltung von Enzymen, welche Nukleotide wie ATP abbauen, die Entzündung bei der Pneumokokkenpneumonie dramatisch (Bou Ghanem, E. N. et al., 2015b). Hingegen schwächte eine Behandlung mit ATP-abbauenden Enzymen die Immunantwort nach einer intratrachealen Verabreichung von Lipopolysacchariden (Shah, D. et al., 2014) und bei der experimentellen polymikrobiellen Sepsis ab (Csoka, B. et al., 2015). Diese durch ATP angetriebene, angeborene Immunantwort kann den Körper schließlich sowohl schützen als auch schädigen, abhängig davon, ob die Vorteile in Form einer effizienten Bakterienbeseitigung gegenüber den negativen Konsequenzen – nämlich einer kollateralen Schädigung körpereigenen Gewebes – überwiegen (Braun, J. S. et al., 1999b; Hoegen, T. et al., 2011; Koedel, U. et al., 2002b; Zwijnenburg, P. J. G. et al., 2003). Mit dieser Annahme übereinstimmend führte die Blockierung des ATP-Abbaus zu einer erhöhten Letalität in der experimentellen Pneumokokkenpneumonie durch verstärkte schädigende Effekte der Entzündung (Bou Ghanem, E. N. et al., 2015b). Entsprechend wurde gezeigt,

dass der P2R-Signalweg – insbesondere über *P2X7* – die durch Entzündung induzierten Hirnschäden während einer septischen Enzephalopathie fördert (Wang, H. et al., 2015), wohingegen dessen Rolle in der polymikrobiellen Sepsis noch kontrovers diskutiert wird. Einige Studien berichten dabei von einem negativen Effekt des P2R-Signalweges hinsichtlich des Outcomes, da bei Fehlen des *P2X7*-Rezeptors die Überlebensrate stieg, korrelierend mit einer verringerten Immunantwort bei verringerter Immunzellrekrutierung und vermindertem Anstieg von Stickstoffmonoxid (NO) und proinflammatorischen Zytokinen sowie einer reduzierten peritonealen Zellapoptose und geringerer Lungenschädigung (Santana, P. T. et al., 2015). Andere berichteten von protektiven Effekten der purinergen Signalwege durch CD39 über den Abbau von ATP und die erhöhte Verfügbarkeit von Adenosin (Csoka, B. et al., 2015). Günstige Effekte von ATP und dem P2R-Signalweg wurden bei der *Escherichia coli* (*E. coli*) - Peritonitis (Xiang, Y. et al., 2013; Zhang, Z. et al., 2011) und bakteriellen Lungeninfektionen, wie etwa mit *P. aeruginosa*, gesehen (Geary, C. et al., 2005). Diese positiven Effekte wurden mit der Verbesserung der Bakterienbeseitigung in Verbindung gebracht. Somit spricht das Gros der gegenwärtigen Fachliteratur dafür, dass eATP als Schlüsselregulator steriler und mikrobieller Entzündungsprozesse dient (Cekic, C. und Linden, J., 2016; Fiebich, B. L. et al., 2014; Idzko, M. et al., 2014a).

Allerdings findet sich dort auch eine Hand voll Studien, die von einem fehlenden Effekt von ATP beziehungsweise dem P2R-Signalweg bei akuten neurodegenerativen oder infektiösen Erkrankungen berichten. Zum Beispiel wurde herausgefunden, dass die Deletion des *P2X7*-Rezeptors weder den ischämischen oder exzitotoxischen neuronalen Zelltod beeinflusst (Le Feuvre, R. A. et al., 2003), noch zur Kontrolle der pulmonalen *Mycobacterium tuberculosis* - Infektion beiträgt (Myers, A. J. et al., 2005). Die vergleichsweise geringe Anzahl sogenannter „Negativstudien“ könnte auf einen Publikationsbias durch eine Präferenz von Studien mit positiven Ergebnissen zurückzuführen sein. Die wahrscheinlichere Ursache dürfte jedoch sein, dass eATP und der P2R-Signalweg eine beinahe universelle Rolle bei der Aktivierung und Regulation von Immunantworten infolge von Verletzungen und Infektionen spielen. Die Ergebnisse der *in-vivo*-Befunde wurden von unserer Arbeitsgruppe daher als unerwartet gewertet und es wurde nach möglichen Erklärungsansätzen gesucht.

5.3 Abnahme der P2R-Expression und Liquor-ATP-Konzentrationen

Das Ausmaß und die Art der purinergen Signalwirkung wird durch verschiedene intra- und extrazelluläre Faktoren beeinflusst; unter anderem hängt diese von den extrazellulären Nukleotid-Konzentrationen und dem Expressionsmuster der P2R und P1R ab (Cekic, C. und Linden, J., 2016; Coutinho-Silva, R. und Ojcius, D. M., 2012; Idzko, M. et al., 2014a). Um mögliche Ursachen der fehlenden Wirkung von P2R-Antagonisten bei der experimentellen

Pneumokokkenmeningitis zu identifizieren, analysierten wir zunächst das mRNA-Expressionsprofil diverser P2R im murinen Hirngewebe im Krankheitsverlauf einer Pneumokokkenmeningitis.

Die Pneumokokkenmeningitis führte dabei zu einer Reduktion der zerebralen Expression der meisten P2R-Subtypen. Lediglich der *P2Y2*-Rezeptor wurde im Verlauf der Meningitis relativ gleichmäßig auf einem niedrigen Niveau exprimiert; die Transkription des *P2Y6*-Rezeptors stieg im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (nach 40 Stunden *post infectionem*) sogar leicht an. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass das Ausmaß der zerebralen Expression beider P2Y-Rezeptoren im Vergleich zu anderen P2R, wie z.B. dem *P2X7*-Rezeptor, insgesamt aber verschwindend gering war.

Eine Reduktion der Expression war bei unseren Analysen auch bei dem *P2X7*-Rezeptor zu beobachten. Einige Studien weisen auf eine wesentliche Rolle des *P2X7*-Rezeptors im Rahmen von Entzündungsreaktionen und der Freisetzung von Zytokinen wie insbesondere IL-1 β als Reaktion auf den Kontakt mit eATP hin (Di Virgilio, F. et al., 2009; Ferrari, D. et al., 2006; Kahlenberg, J. M. und Dubyak, G. R., 2004a; Kahlenberg, J. M. und Dubyak, G. R., 2004b; Karmakar, M. et al., 2016; Kawamura, H. et al., 2012; Solle, M. et al., 2001; Weber, F. C. et al., 2010). In zahlreichen früheren Untersuchungen im Tiermodell war beobachtet worden, dass ATP-*P2X7*-abhängige Signalwege entscheidend zur Inflammationsreaktion als auch zur Gewebedestruktion bei verschiedensten Krankheitsbildern wie der fokalen zerebralen Ischämie (Kharlamov, A. et al., 2002), Kälteschäden des Gehirns (Yu, Y. et al., 2009), der Rauch-induzierten Lungenschädigung (Cicko, S. et al., 2010), allergischen Atemwegsentzündung (Muller, T. et al., 2011), Lungenentzündung und -fibrose (Riteau, N. et al., 2010), Kontakt-Hypersensitivität (Weber, F. C. et al., 2010) und Graft-versus-Host-Reaktion (Wilhelm, K. et al., 2010) beisteuern. In der überwiegenden Mehrzahl dieser Studien war eine Hochregulierung der *P2X7*-Rezeptor-Expression im betroffenen Gewebe beschrieben worden. So konnten Yu, Y. et al. (2009) bei Kälteschäden des Gehirns von Ratten zeigen, dass nach Zufügen des Schadens die Expression des *P2X7*-Rezeptors kontinuierlich anstieg und nach 48 h ihren Höhepunkt erreicht hatte. Ebenso kam es sowohl bei der akuten als auch chronischen allergischen Atemwegsentzündung zu einer Hochregulation der *P2X7*-Rezeptoren im Lungengewebe und auf Immunzellen nach Kontakt mit dem Allergen (Muller, T. et al., 2011). Auch bei der Graft-versus-Host-Reaktion konnte eine erhöhte *P2X7*-Rezeptor-Expression sowohl auf den Zielorganen der Reaktion als auch Antigenpräsentierenden Zellen und Blutzellen gesehen werden (Wilhelm, K. et al., 2010).

In vorhergehenden Studien konnte auch bereits eine gewisse Schwankung hinsichtlich der Expression der *P2X7*-Rezeptoren im Krankheitsverlauf festgestellt werden (Choi, H. B. et al., 2007; Karmakar, M. et al., 2016), wie dies auch im Rahmen unserer Untersuchungen beobachtet wurde. So konnten Choi, H. B. et al. (2007) zeigen, dass nach einer Injektion von

LPS die Expression von *P2X7*-Rezeptoren nach 12 Stunden maximal ausgeprägt war, wohingegen nach 48 Stunden keine oder lediglich noch eine geringe Rezeptor-Expression vorzufinden war. Die ausgeprägte Reduktion der Expression der meisten *P2R* und insbesondere der *P2X7*-Rezeptoren bei der Pneumokokkenmeningitis war jedoch ein ebenso überraschender wie ungewöhnlicher Befund, der eine mögliche Erklärung für das „Therapieversagen“ der *P2R*-Antagonisten bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis sein könnte.

Wie oben erwähnt, stellt ferner die eATP- Konzentration eine wichtige Determinante für die purinerge Signalwirkung dar (Karmakar, M. et al., 2016). Dies ist bereits daran ersichtlich, dass der *P2X7*-Rezeptor bei niedrigen eATP-Konzentrationen im mikromolaren Bereich die Funktion eines Ionenkanals übernimmt, wohingegen er bei Konzentrationen im millimolaren Bereich irreversible Membranporen ausbildet. Über einen Moleküleinstrom kann Letzteres aufgrund von Homöostasestörungen und konsekutivem Zelltod zu einem sekundären Gewebeschaden führen (Friedle, S. A. et al., 2010; Peng, W. et al., 2009; Wang, X. et al., 2004). Zur weiteren Abklärung der fehlenden Effekte der *P2R*-Antagonisten bei unseren *in-vivo*-Untersuchungen wurden daher die ATP-Konzentrationen in den Liquorproben von Mäusen mit einer Pneumokokkenmeningitis analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass im Verlauf der Erkrankung das ATP im Liquor nach etwa 16 h beinahe nicht mehr nachweisbar war. Eltzschig, H. K. et al. (2009) konnten zeigen, dass es auch im Rahmen von Gewebehypoxie und -ischämie zu einer Abnahme der ATP-Konzentrationen aufgrund einer vermehrten Expression von CD39 kommt, welches ATP zu ADP und AMP dephosphoryliert. Die dramatische Abnahme der eATP-Spiegel und der *P2R*-Expression erklären vermutlich die Wirkungslosigkeit eines *P2R*-Antagonismus bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis sowie die Unterschiede zwischen Pneumokokkenmeningitis und einigen anderen neurologischen Krankheitsbildern wie Ischämie, Hirnverletzungen oder der septischen Enzephalopathie (Choo, A. M. et al., 2013; Chu, K. et al., 2012; Wang, H. et al., 2015).

Wie bereits erwähnt wird die Wirkung extrazellulärer Nukleotide abgesehen von der Rezeptordichte (Bours, M. J. et al., 2006; Gessi, S. et al., 2011; Vitiello, L. et al., 2012) und den extrazellulären Nukleotid- (z.B. ATP-) Konzentrationen von der Aktivität von Ektonukleotidasen, also dem Nukleotid-Abbau, bestimmt (Blackburn, M. R. et al., 2009; Bours, M. J. et al., 2006; Di Virgilio, F. et al., 2009). Beim Abbau des extrazellulären ATP spielen die Ektonukleotidasen CD39, welche ATP zu ADP und AMP, sowie CD73, welche AMP zu Adenosin dephosphorylieren, eine entscheidende Rolle (Burnstock, G., 2008; Fang, F. et al., 2016; Trincavelli, M. et al., 2010; Vitiello, L. et al., 2012; Yegutkin, G. G., 2008). Cekic, C. und Linden, J. (2016) versuchten anhand eines allgemeinen Stufenmodells den zeitlichen Verlauf der ATP-Konzentration nach einer Gewebeschädigung zu

veranschaulichen. In der Akutphase einer Entzündung, welche Minuten bis Stunden andauert, werden große Mengen an ATP freigesetzt. Dieser folgt eine subakute Phase, in welcher sich die Entzündung innerhalb von Stunden bis Tagen wieder auflöst, die ATP-Freisetzung abnimmt und dessen Abbau eingeleitet wird. Eine moderate ATP-Freisetzung und dessen Abbau werden in einer chronischen Phase noch aufrechterhalten, welche bis zu Wochen andauern kann. Die zeitlichen Abläufe dieses Konzepts stimmen mit unseren Befunden insofern überein, dass nach 4 h eine Abnahme der ATP-Konzentration zu beobachten und 16 h und 40 h *post infectionem* ATP fast nicht mehr nachweisbar war.

In einem weiteren Versuchsansatz versuchten wir den zugrundeliegenden Mechanismus für den massiven Abfall der eATP-Konzentrationen im Verlauf der Meningitis zu klären. In einer kürzlich publizierten Studie hatten George, J. et al. (2015) gezeigt, dass *E. coli* - LPS den extrazellulären Katabolismus von ATP in Adenosin über Ektonukleotidasen bei kultivierten mikroglialen Zellen steigern kann. Um herauszufinden, ob lokal vorhandene Immunzellen zu dem Abfall der Liquor-ATP-Spiegel bei der Pneumokokkenmeningitis beitragen, kultivierten wir lebende *S. pneumoniae* in Ab- oder Anwesenheit von murinen BMDM beziehungsweise BMN in aCSF, welchem eATP in seiner physiologischen Konzentration zugefügt wurde (Pegg, C. C. et al., 2010). In Abwesenheit von BMDM oder BMN führte das Pneumokokkenwachstum zu einer signifikanten Zunahme der eATP-Level. Dies deckt sich mit Befunden von Mempin, R. et al. (2013), welche eine Zunahme extrazellulärer ATP-Level im Überstand bei verschiedensten Bakterienspezies - insbesondere in der Wachstumsphase - nachweisen konnten, wobei sie diskutieren, dass eATP eine wesentliche Rolle für das Überleben von Bakterienkolonien in Form eines Nährstoffes oder Signalmoleküls spielt.

Die ATP-Zunahme war in der Anwesenheit von BMDM und BMN allerdings kaum oder nicht mehr nachweisbar. Der „ATP verbrauchende/degradierende“ Effekt der BMDM und BMN konnte durch zusätzliche Hinzugabe des Ektonukleotidase CD39-Hemmstoffs ARL 67156 - zumindest teilweise – verhindert werden. Somit sind die Ergebnisse in Einklang mit denen von George, J. et al. (2015) und lassen auf einen Beitrag von CD39 zur Meningitis-assoziierten Abnahme des Liquor-ATP schließen. Di Virgilio, F. (2005) schlussfolgerte, dass insbesondere in einer Situation mit bakteriellen Pathogenen die Exposition gegenüber hohe Mengen an ATP als mögliches wachstumsförderndes Agens für Bakterien (Mempin, R. et al., 2013) durch den Organismus limitiert werden muss, um einen Gewebeschaden durch proinflammatorische Zytokine zu vermeiden. Dabei muss beachtet werden, dass im Subarachnoidalraum wie eingangs erläutert, ohnehin ein äußerst günstiges Milieu zur ungestörten Vermehrung von Bakterien aufgrund der Umgebungsbedingungen wie verminderter Abwehrmechanismen und immunsuppressiver Faktoren vorliegt (Koedel, U. et al., 2009b; Koedel, U. et al., 2010b; Niederkorn, J. Y., 2006; Ransohoff, R. M. und Brown, M. A., 2012; Small, P. et al., 1986).

5.4 Rolle des Abbaus und der Abbauprodukte von ATP bei der PM

Im Mausmodell war sowohl im Früh- als auch im fortgeschrittenen Stadium der Pneumokokkenmeningitis die Gabe von P2R-Antagonisten wirkungslos. Als eine mögliche Erklärung hierfür konnten wir unter anderem den Abbau extrazellulären ATPs durch Ektonukleotidasen identifizieren. Daher wollten wir in einer abschließenden Versuchsreihe untersuchen, ob der Krankheitsverlauf einer Pneumokokkenmeningitis einerseits durch eine Hemmung der Aktivität von Ektonukleotidasen und einer somit resultierenden Erhöhung des eATP-Spiegels und Verringerung des Adenosinspiegels als ATP-Abbauprodukt im Liquor und/oder andererseits durch eine Hemmung der Adenosinrezeptoren beeinflusst werden kann. Zur Beantwortung dieser Fragen evaluierten wir die Wirkung des Ektonukleotidase-Inhibitors ARL 67156 (Levesque, S. et al., 2007; Westfall, T. D. et al., 1997) sowie des unselektiven Adenosin-Rezeptor-Antagonisten Theophyllin (Biaggioni, I. et al., 1991) in unserem Mausmodell (nur in der sogenannten Frühphase).

Grundsätzlich konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass Adenosin im Gegensatz zu ATP eine immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung hat (Alam, M. S. et al., 2015; Dou, L. et al., 2017). Während eATP über die P2R eine proinflammatorische Wirkung durch Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie IL-1 β sowie chemotaktischen Einfluss auf Entzündungszellen wie Neutrophile entfaltet (Chen, Y. et al., 2006; Di Virgilio, F. et al., 2017; Ferrari, D. et al., 2016; Lee, J. S. und Yilmaz, Ö., 2018), zeigt Adenosin einen eher entgegengesetzten Effekt (Burnstock, G., 2017; Dou, L. et al., 2017; Ferrari, D. et al., 2016; Idzko, M. et al., 2014a; Lee, J. S. und Yilmaz, Ö., 2018; Ohta, A. und Sitkovsky, M., 2001). ATP scheint bei Infektionserkrankungen insbesondere zur Abwehr von eindringenden Pathogenen beizutragen, wobei die ausgelöste Entzündungsreaktion jedoch ab einem gewissen Grad dem Körper schadet. Durch den Abbau von ATP zu Adenosin kann die Entzündung somit eingedämmt werden, um diesem Schaden vorzubeugen. Da Adenosin durch seine immunsuppressive Wirkung jedoch andererseits wiederum zu einer Abschwächung der Pathogenabwehr führen kann, gilt es die richtige Balance zwischen Immunaktivierung und -suppression zu erhalten (Alam, M. S. et al., 2015; Antonioli, L. et al., 2013; Dou, L. et al., 2017; Ferrari, D. et al., 2016; Idzko, M. et al., 2014a; Ledderose, C. et al., 2016; Lee, J. S. und Yilmaz, Ö., 2018; Ohta, A. und Sitkovsky, M., 2001).

Grundsätzlich wirkt Adenosin über die verschiedenen P1R mit mehr oder weniger großen Unterschieden in deren Funktionen, wobei man 4 Gruppen der Rezeptoren unterscheidet: A1R, A2AR, A2BR und A3R (Dou, L. et al., 2017; Eltzschig, H. K. et al., 2006; Ferrari, D. et al., 2016; Ledderose, C. et al., 2016; Lee, J. S. und Yilmaz, Ö., 2018; Safarzadeh, E. et al., 2016). Der Abbau von ATP zu Adenosin erfolgt durch die Ektonukleotidasen CD39 und CD73 (Alam, M. S. et al., 2015; Dou, L. et al., 2017; Lee, J. S. und Yilmaz, Ö., 2018; St. Hilaire, C. et al., 2009; Zimmerman, M. A. et al., 2013).

Burnstock, G. (2017) gab eine Übersicht über die Bedeutung der purinergen Signalwege einschließlich der Rolle von Adenosin bei verschiedenen Krankheitsbildern des ZNS oder im Rahmen von Infektionskrankheiten. So konnte in verschiedensten Studien eine Beteiligung von Adenosin unter anderem bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer (Cunha, R., 2015; Li, S. et al., 2015), Parkinson (Jenner, P., 2014), Amyotropher Lateralsklerose (Volonté, C. et al., 2016) oder Multipler Sklerose (Lavrnja, I. et al., 2015; Safarzadeh, E. et al., 2016) sowie auch im Rahmen von Neuroprotektion und -regeneration nach Verletzungen des Gehirns nachgewiesen werden (Burnstock, G., 2016; 2017; Ribeiro, F. F. et al., 2016; Rodrigues, R. J. et al., 2015). Wie Safarzadeh, E. et al. (2016) zeigen konnten, ist Adenosin beispielsweise als Molekül mit immunsuppressiver Aktivität ein wichtiger Kompensations-Mechanismus zur Reduzierung der Entzündung und der unangemessenen Immunantwort bei der Multiplen Sklerose. Aber auch bei Infektionskrankheiten wie der Sepsis oder Pneumonie spielen die purinergen Signalwege inklusive Adenosin eine nicht unwesentliche Rolle (Bou Ghanem, E. N. et al., 2015b; Burnstock, G., 2017; Ledderose, C. et al., 2016; Santana, P. T. et al., 2015). Ledderose, C. et al. (2016) zeigten die Bedeutung der Balance zwischen den Effekten von ATP und Adenosin insbesondere bei der Sepsis auf. In Patienten mit einem systemischen Schock sei eine 10-fach höhere Adenosin-Plasma-Konzentration als bei Gesunden vorzufinden (Martin, C. et al., 2000). Dieser Anstieg wird über eine Abnahme der enzymatischen Aktivität der Adenosin-Deaminase und -Kinase und einer Zunahme der Ektonukleotidase CD73 unter hypoxischen Bedingungen erklärt (Kobayashi, S. et al., 2000). Während eine Verringerung der Immunzellaktivierung durch A2A- oder A2B-Rezeptoren in der hyperdynamen initialen Phase der Sepsis und Endotoxämie hilfreich sein kann (Ledderose, C. et al., 2016; Ohta, A. und Sitkovsky, M., 2001; Schingnitz, U. et al., 2010; Sullivan, G. W. et al., 2004), können selbige Rezeptoren letztendlich auch eine kritische Immunsuppression bewirken. Dementsprechend kann durch eine Inhibierung von A2A-Rezeptoren wiederum ein vermehrtes Überleben im experimentellen Modell der Sepsis unter anderem durch eine verbesserte Bakterien-Beseitigung durch Immunzellen erklärt werden (Ledderose, C. et al., 2016; Németh, Z. H. et al., 2006).

Bou Ghanem, E. N. et al. (2015b) konnten zeigen, dass Adenosin vor einer durch *S. pneumoniae* induzierten Pneumonie durch Regulierung der Rekrutierung von Neutrophilen schützen kann.

In unserem Mausmodell zur Pneumokokkenmeningitis hatte die Verabreichung des Ektonukleotidase-Inhibitors ARL 67156 keinen Effekt auf die Zellzahl im Liquor, den ICP, den Klinischen Score, den Verlust von Körpergewicht sowie die Körpertemperatur, allerdings ging die Gabe von ARL 67156 mit einer signifikanten Erhöhung der IL-1 β Konzentration und der Pneumokokken-Titer im Hirn und Blut einher.

In Übereinstimmung mit vorhergehenden Studien (vgl. Ferrari, D. et al., 2006; Hoegen, T. et al., 2011) konnte infolge der CD39-Blockade ein signifikanter Anstieg der IL-1 β -Freisetzung als Entzündungsmediator in den Liquorraum festgestellt werden. Dies wirkte sich in unseren Versuchsansätzen jedoch nicht auf die klinischen Parameter oder die Zellzahl im Liquor aus. Eine Hypothese diesbezüglich wäre, dass bei einer bereits deutlichen Erhöhung von IL-1 β ein weiterer Anstieg keine zusätzlichen messbaren Effekte auf die Pneumokokkenmeningitis entfalten kann. Der definitive Grund ist und bleibt jedoch unklar und könnte in zukünftigen Untersuchungen analysiert werden.

Die Beobachtung der Zunahme der Bakterientiter stimmt mit den Ergebnissen von Studien überein, welche zeigen konnten, dass ATP als Energielieferant und wichtiger Baustein für physiologische Abläufe bei nahezu allen Bakterienstämmen – insbesondere in deren Wachstumsphase – fungiert (Higgins, C. F. et al., 1986; Mempin, R. et al., 2013). Folglich könnten durch ein vermehrtes Angebot an ATP die Wachstumsbedingungen für die Pneumokokken im Rahmen der Meningitis verbessert werden.

Csoka, B. et al. (2015) konnten bei der mikrobiellen Sepsis mit Hilfe von CD39 über die Degradierung von ATP zu Adenosin letztendlich eine Verminderung der Inflammation, des Organschadens, der Immunzellapoptose und aber auch der Bakterienkonzentration beobachten. Auch in unserer Studie konnten entsprechend zumindest eine Zunahme von IL-1 β als Entzündungsmediator sowie ein Anstieg der Bakterientiter bei Inhibition von CD39 beobachtet werden. Csoka, B. et al. (2015) geben als möglichen Erklärungsansatz für die verstärkte Entzündungsreaktion bei Fehlen von CD39 die Unfähigkeit des Körpers zur Kontrolle des Bakterienwachstums aufgrund einer verstärkten Immunzellapoptose an. Jedoch wird auch hier die Notwendigkeit weiterer Studien zur genaueren Klärung der Mechanismen der Wirkung von CD39 auf Inflammation und Bakterienwachstum betont. Es wird deutlich, wie auch Alam, M. S. et al. (2015) schildern, dass eATP beziehungsweise CD39 bei unterschiedlichen Infektionen verschiedene, teils sogar gegensätzliche Aufgaben und Funktionen haben können, was bedeutet, dass die Wirkung zumindest vom Erreger und dem Infektionsort abhängt.

Bei den Untersuchungen mit Verabreichung von Theophyllin konnte kein Effekt hinsichtlich der IL-1 β Konzentration, der Liquorzellzahl, des ICP, des Klinischen Scores, der Körpertemperatur und den Bakterientitern im Blut festgestellt werden. Jedoch waren ein geringerer Verlust des Körpergewichts sowie eine signifikante Zunahme der Hirn-Bakterientiter durch Blockierung der Adenosinrezeptoren mit Theophyllin zu beobachten.

Wie bereits erwähnt widmeten sich Bou Ghanem, E. N. et al. (2015b) der Rolle von Adenosin bei der Pneumokokken-Pneumonie und fanden heraus, dass Adenosin durch die Regulierung der Neutrophilen-Rekrutierung einen Schutz gegen die Infektion darstellt. Dabei wurden zu unserer Studie ähnliche Versuchsansätze verwendet, wie etwa die Inhibition des

ATP-Abbaus durch Ektonukleotidasen – in diesem Fall von CD73, welches AMP zu Adenosin abbauen (Barletta, K. E. et al., 2012; Bou Ghanem, E. N. et al., 2015b) sowie eine Blockade der Adenosin-Rezeptoren durch einen unspezifischen Adenosin-Rezeptor-Antagonisten. Bei der Inhibition von CD73 durch α,β -Methylen-ADP (Bou Ghanem, E. N. et al., 2015b; Thompson, L. F. et al., 2004) zeigte sich entsprechend unserer Ergebnisse eine Erhöhung der Bakterientiter, welche drei Tage nach Infektion um das 100 bis 1000-fache auftrat sowie eine systemische Ausbreitung und damit verbundene neurologische Ausfälle. Dies wurde als Hinweis dafür gesehen, dass Neutrophile in der frühen Phase der Infektion zur Beseitigung der Erreger nötig sind, jedoch nach einer gewissen Zeit bei längerer Anwesenheit für den Körper schädlich sein können. Bereits in vorhergehenden Studien zeigte sich, dass eine Verzögerung der Neutrophilen-Einwanderung oder ein Mangel an Neutrophilen im Vorfeld einer Infektion zur einer erhöhten Bakterienkonzentration sowie einer letalen Sepsis führen können (Bou Ghanem, E. N. et al., 2015b; Garvy, B. A. und Harmsen, A. G., 1996; Hahn, I. et al., 2011; Kadioglu, A. et al., 2011; Nieminen, J. et al., 2008). Paradoxerweise führte jedoch auch eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten einige Tage nach Beginn der Infektion zu einer verstärkten systemischen Infektion und einer verringerten Überlebenschance (Bou Ghanem, E. N. et al., 2015b; Bou Ghanem, E. N. et al., 2015a; Boyd, A. R. et al., 2012; Narayana Moorthy, A. et al., 2013; Neill, D. R. et al., 2012). Erklärt wurde dies dadurch, dass Neutrophile ab einer bestimmten Bakterienkonzentration die Infektion nicht mehr kontrollieren können und stattdessen unter anderem zu besseren Wachstumsbedingungen der Erreger beitragen. Wie Burnaugh, A. M. et al. (2008) darstellten, ist anzunehmen, dass *S. pneumoniae* für sie wachstumslimitierende Nährstoffe, welche auch von Neutrophilen im Rahmen der Inflammation und Pathogenabwehr produziert werden, aus dem entzündetem Gewebe metabolisieren können (Bou Ghanem, E. N. et al., 2015b). Dies ist insofern naheliegend, da auch andere Bakterienspezies wie *Salmonella enterica* metabolische Quellen im Zuge der Entzündung nutzen (Bou Ghanem, E. N. et al., 2015b; Winter, S. E. et al., 2010) und insbesondere für *S. pneumoniae* die metabolische Nutzung von Zucker und anderen Nährstoffen als wesentlicher Virulenzfaktor nachgewiesen werden konnte (Bou Ghanem, E. N. et al., 2015b; Shelburne, S. A. et al., 2008). Für diese Befunde spielt extrazelluläres Adenosin vermutlich erst in der späteren Phase der Infektion eine Rolle (Bou Ghanem, E. N. et al., 2015b; Burnaugh, A. M. et al., 2008).

Erhöhte Bakterienkonzentrationen zeigten sich – wie auch bei uns – bei der Blockade der Adenosin-Rezeptoren, wobei hierbei nicht Theophyllin sondern der unspezifische Adenosin-Rezeptor-Antagonist CGS-15943 (Bou Ghanem, E. N. et al., 2015b; Williams, M. et al., 1987) verwendet wurde. Dies nahm man als Hinweis dafür, dass, obwohl ein direkter Effekt von Adenosin auf die Bakterien selbst nicht vollständig ausgeschlossen werden kann (Bou

Ghanem, E. N. et al., 2015b; Mahamed, D. A. et al., 2012; Marks, L. R. et al., 2013), bei der Pneumokokken-Infektion die Interaktion zwischen Adenosin und seinen Rezeptoren eine wichtigere Rolle über eine Regulierung der Neutrophilen-Einwanderung und letztendlich der Pathogen-Beseitigung durch diese über Phagozytose und Degranulation von Serin-Proteasen spielt (Barletta, K. E. et al., 2012; Bou Ghanem, E. N. et al., 2015b; Standish, A. J. und Weiser, J. N., 2009).

Grundsätzlich decken sich unsere Befunde somit mit solchen, welche eine positive Wirkung von Adenosin auf die Fähigkeit von Neutrophilen zur Beseitigung von Pneumokokken nahe legen (Bou Ghanem, E. N. et al., 2015b). Jedoch konnte in unseren Untersuchungen abgesehen von den Bakterientitern weder eine Änderung der Leukozyten-Zellzahl noch weiterer relevanter Parameter festgestellt werden. Zudem wurden unsere Untersuchungen nur zu einem Zeitpunkt, nämlich 16 Stunden *post infectionem* durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt spielte Adenosin im Modell der *S. pneumoniae*-induzierten Lungenentzündung noch keine wesentliche Rolle (vgl. Bou Ghanem, E. N. et al., 2015b). Allerdings müsste dies aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsbedingungen für die Entstehung und den Verlauf der Infektion im Liquorraum gesondert untersucht werden. Daher sollte eine Wiederholung dieser Versuchsansätze mit weiteren Zeitfenstern hinsichtlich der Erkrankungsdauer der Versuchstiere zum Vergleich in Erwägung gezogen werden.

Bou Ghanem, E. N. et al. (2015b) betonten auch, dass bevor über therapeutische Interventionen mit Hilfe von Adenosin nachgedacht werden kann, erst die Charakterisierung der Rolle der einzelnen Rezeptoren der P1R-Familie nötig ist, deren Rolle und Zusammenspiel bei der Meningitis bisher noch nicht näher erforscht sind. Da unsere Untersuchungen mit ARL 67156 sowie Theophyllin jedoch jeweils keinen Einfluss auf das klinische Outcome der Tiere hatten, sind diese Ergebnisse für einen direkten Therapieansatz von geringer Relevanz.

5.5 Rolle von ATP in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis

Obwohl der purinerge Signalweg essentiell für die NLRP3-Inflammasom-abhängige IL-1 β -Sekretion von Makrophagen *in vitro* ist, scheint er unter *in-vivo*-Bedingungen der Pneumokokkenmeningitis für das klinische Outcome unwesentlich zu sein. Bislang wird ein Zwei-Signal-Modell für die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung vorgeschlagen. In diesem Modell wird das erste Signal (= Priming-Signal) durch mikrobielle und endogene Moleküle wie Pneumokokken-PAMPs repräsentiert, welche die NLRP3- und pro-IL-1 β -Expression durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B induzieren. Das zweite Signal (= Aktivierungssignal) wird durch eine Unmenge an Stimuli ausgelöst wie Poren-bildende Toxine oder ATP. Letzteres entfaltet seine Wirkung vermutlich über einen P2X7-Rezeptor

vermittelten K^+ -Ausstrom (de Vasconcelos, N. M. et al., 2016; He, Y. et al., 2016; Muñoz-Planillo, R. et al., 2013; Prochnicki, T. et al., 2016; Xiang, Y. et al., 2013). Das extrazelluläre ATP könnte dabei einerseits von den Pneumokokken freigesetzt werden (Atarashi, K. et al., 2008; Mempel, R. et al., 2013), wie auch im Rahmen der Studie gezeigt werden konnte; andererseits könnte es aus körpereigenem Gewebe und Immunzellen stammen und als Alarmsignal fungieren (Chen, Y. et al., 2006; Rodrigues, R. J. et al., 2015; Xiang, Y. et al., 2013), wobei anzumerken ist, dass das ATP bei uns nur *in vitro* aber nicht *in vivo* eine wesentliche Rolle spielte. Bei der Pneumokokkenmeningitis dürfte das Poren-bildende Toxin Pneumolysin und nicht eATP entscheidend zur NLRP3-Inflammasom-Aktivierung beitragen. Dafür sprechen Beobachtungen von signifikant geringeren Hirn-IL-1 β -Konzentrationen bei Mäusen, bei denen die Meningitis mit Pneumolysin-defizienten Pneumokokken induziert worden war, im Vergleich zu Tieren, die mit dem entsprechenden Wildtyp-Stamm infiziert worden waren (Hoegen, T. et al., 2011).

Zusammenfassend zeigte die vorliegende Studie, dass weder durch eine pharmakologische Blockade von P2R noch durch eine unselektive Hemmung von P1R oder des enzymatischen Abbaus von ATP die Entzündungsreaktion, die intrakraniellen Komplikationen und der kurzfristige sowie langfristige Ausgang bei der Pneumokokkenmeningitis beeinflusst werden konnte. Als mögliche Ursachen für dieses „Therapieversagen“ konnten [i] eine signifikant reduzierte Expression zentraler P2R-Subtypen im Hirn und [ii] eine massive Abnahme der eATP-Konzentrationen im Liquor – vermutlich über einen verstärkten Katabolismus durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten – identifiziert werden.

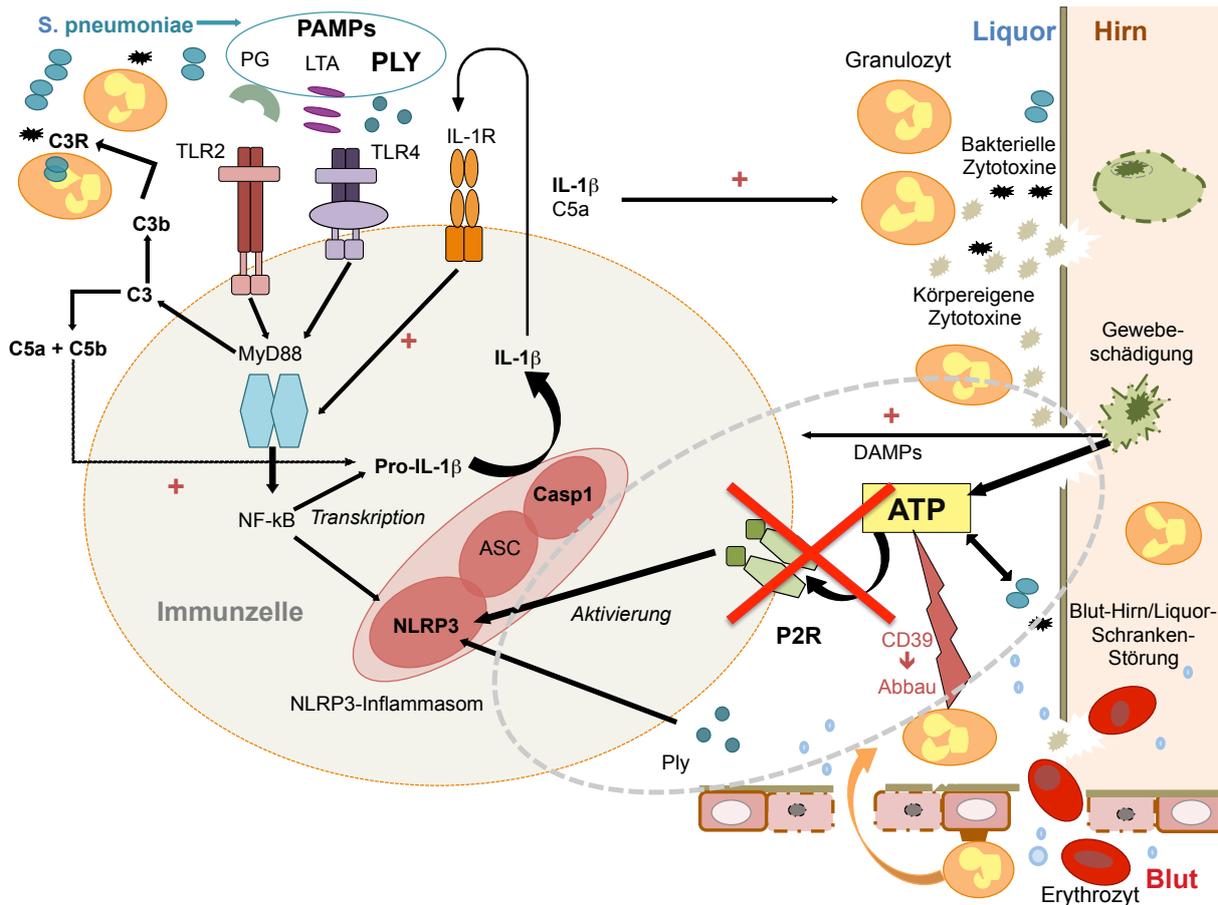


Abb. 15: Rolle von ATP in der Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis (auf Grundlage von Koedel, U. et al., 2010b)

Diese Abbildung dient in Ergänzung zu Abb. 2 zur Darstellung der Rolle von ATP in der Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis. Für die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung wird ein Zwei-Signal-Modell vorgeschlagen. In diesem Modell wird das erste Signal (= Priming-Signal) durch mikrobielle und endogene Moleküle wie Pneumokokken-PAMPs repräsentiert, welche die NLRP3- und pro-IL-1 β -Expression durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B induzieren. Das zweite Signal (= Aktivierungssignal) wird durch etliche Stimuli wie Pneumolysin oder ATP insbesondere über den P2X7-Rezeptor ausgelöst. Das extrazelluläre ATP (eATP) kann dabei vermutlich sowohl von den Pneumokokken als auch aus körpereigenem Gewebe und Immunzellen freigesetzt werden. eATP scheint jedoch nur im Zellkultursystem (humane THP-1-Zellen und bei Makrophagen) funktionell relevant zu sein. Bei der Pneumokokkenmeningitis dürfte letztendlich jedoch das Poren-bildende Toxin Pneumolysin am wesentlichsten zur NLRP3-Inflammasom-Aktivierung beitragen. Details siehe Text.

6 Zusammenfassung

Die Pneumokokkenmeningitis stellt die häufigste und gefährlichste Form der bakteriellen Meningitis in der Altersgruppe der Erwachsenen dar. Es versterben dabei nach wie vor 6 bis 18 % der Patienten (Buchholz, G. et al., 2016). Ein Großteil der Überlebenden muss zudem mit neurologischen Residuen leben, welche vorwiegend aufgrund intrakranieller Komplikationen auftreten (Koedel, U. et al., 2009b). Das neuropathologische Korrelat dieser Folgeschäden sind Gewebeuntergänge in verschiedenen Hirnregionen. Neben bakteriellen zytotoxischen Produkten wie Pneumolysin (PLY) werden diese insbesondere durch eine körpereigene, ausgeprägte neutrophile Entzündungsreaktion verursacht (Koedel, U. et al., 2010b).

Eine wesentliche Schlüsselrolle in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis spielt die exzessive Produktion des Zytokins Interleukin 1 β (IL-1 β), an dessen Aktivierung das NLRP3-Inflammasom beteiligt ist. Bei Untersuchungen an differenzierten menschlichen THP-1 Zellen konnte beobachtet werden, dass mit der Freisetzung von IL-1 β zeitlich eine Zunahme der Konzentration von extrazellulärem Adenosintriphosphat (eATP) korreliert und die Inhibierung des ATP-Signalweges durch Behandlung mit dem Purinorezeptor-Antagonisten oxidiertes ATP (ox-ATP) die IL-1 β -Bildung abschwächt (Hoegen, T. et al., 2011). In seiner Eigenschaft als potentielles endogenes Alarmsignal kann eATP über die beiden Rezeptor-Familien der P2X- und P2Y-Rezeptoren aus der Gruppe der P2-Rezeptoren (P2R) und dabei insbesondere über den P2X7-Rezeptor die Aktivierung von Immunzellen sowie eine Entzündungsreaktion fördern (Idzko, M. et al., 2014a). Karmakar, M. et al. (2016) konnten kürzlich zeigen, dass humane und murine neutrophile Granulozyten über den NLRP3-Inflammasom abhängigen Signalweg IL-1 β als Antwort auf die Detektion von eATP während einer Pneumokokkeninfektion der Kornea sezernieren. Die Rolle von ATP und der P2R-Signalwege bei der Pneumokokkenmeningitis war hingegen bisher noch unbekannt. Der thematische Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag daher auf 1) der Charakterisierung der ATP-Freisetzung und Purinorezeptor-Expression im Krankheitsverlauf der Pneumokokkenmeningitis sowie 2) der Analyse der funktionellen Bedeutung purinerger Signalwege bei der Regulation der Entzündungsreaktion und der Entstehung Meningitis-assoziiierter intrakranieller Komplikationen.

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an humanen THP1-Makrophagen (Hoegen, T. et al. (2011) hatten gezeigt, dass durch Einsatz des relativ unselektiven P2R-Antagonisten ox-ATP die Pneumokokken-induzierte Zytokinfreisetzung signifikant reduziert werden konnte. In der aktuellen Studie konnte diese Beobachtung an primären murinen Knochenmarks-Makrophagen (BMDM) nachvollzogen werden. Darüber hinaus konnten wir eine

konzentrationsabhängige Inhibition dieser Zytokinfreisetzung durch den unselektiven P2R-Antagonisten Suramin und den relativ selektiven P2X7-Antagonisten BBG demonstrieren. Die Zellen für die *in-vitro*-Experimente wurden aus den Femores von C57BL6/n-Wildtypmäusen gewonnen und mit lebenden *S. pneumoniae* Serotyp 2 vom Stamm D39 in An- oder Abwesenheit der Antagonisten stimuliert.

Zur Testung der funktionellen Relevanz des P2R-Signalweges bei der Pneumokokkenmeningitis wurde ein gut etabliertes Mausmodell verwendet. Männliche C57BL/6n-Mäuse wurden zu Beginn eines jeden Versuches, am jeweiligen Versuchsende vor der Präparation der Tiere und in regelmäßigen Abschnitten dazwischen einer klinischen Evaluation unterzogen. Es wurde ein klinischer Score erhoben, welcher (i) den Beam-Balance-Test, (ii) den Postural-Reflex-Test, (iii) den Fellstatus, (iv) das Auftreten motorischer Anfälle sowie (v) die Vigilanz umfasste. Die Punktevergabe erfolgte anhand eines modifizierten Punktesystems nach Garcia, J. H. et al. (1995). Bei gesunden Tieren betrug der Score 0 Punkte; 11 Punkte erhielten Tiere, welche terminal erkrankt waren und aufgrund ethischer Gesichtspunkte innerhalb des Beobachtungszeitraums euthanisiert werden mussten. Zusätzlich wurden Körpergewicht und -temperatur gemessen, der Open Field Test und eine weitere Bewertung anhand eines klinischen Beurteilungsbogens durchgeführt. Nach der klinischen Beurteilung wurde die bakterielle Meningitis induziert, indem unter Kurzzeit-Narkose mit Isofluran transkutan die Injektion von *S. pneumoniae* in die *Cisterna magna* erfolgte. 16 Stunden nach der Infektion wurden die Mäuse durch intraperitoneale Verabreichung von Ketamin/Xylazin narkotisiert und der Kopf des Tieres in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Unter Lokalanästhesie mit Lidocain wurde die Schädelkalotte freipräpariert, um am Übergang des *Os interparietale* zum *Os occipitale* mit Hilfe eines Handbohrers ein Bohrloch anzulegen. Über einen selbst angefertigten Katheter wurden Liquorproben zur Bestimmung der Leukozytenzahl sowie der Konzentrationen von IL-1 β und ATP aus der *Cisterna magna* gewonnen. Mit Hilfe eines weiteren Katheters und eines Druckwandlers wurde der intrakranielle Druck (ICP) erfasst. Anschließend wurde das Tier thorakotomiert und aus dem rechten Herzventrikel Blut zur bakteriellen Titerbestimmung entnommen. Zur besseren Darstellung des Gehirns wurde dieses mit eiskalter, heparinierter, phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) transkardial perfundiert. Das Kleinhirn wurde anschließend für die Bestimmung der Bakterientiter im Hirn abgetrennt und homogenisiert. Aus den tiefgefrorenen Großhirnen wurden koronare Gefrierschnitte zur Quantifizierung intrazerebraler Blutungen angefertigt. Die Konzentration des Zytokins IL-1 β wurde mittels ELISA in den Liquorproben bestimmt. In der Versuchsreihe zur Rolle purinerger Signalwege in der Entwicklungsphase der Pneumokokkenmeningitis wurden die Mäuse unmittelbar nach der Infektion mit Suramin oder BBG behandelt. Die Verabreichung

erfolgte intraperitoneal (i.p.), bei Suramin in einer zusätzlichen Versuchsgruppe auch intrazisternal (i.c.), um einer eingeschränkten Bioverfügbarkeit bei möglicherweise schlechter Penetration der Blut-Hirn-Schranke vorzubeugen. Die wesentliche Erkenntnis dieser Versuchsreihe war, dass weder eine Behandlung mit Suramin – unabhängig vom Verabreichungsweg – noch mit BBG einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung einer Meningitis hatte (wie z.B. das Ausmaß der Liquorpleozytose, die IL-1 β -Spiegel und den klinischen Status der Tiere).

In einer weiteren Versuchsreihe sollte die Auswirkung einer P2R-Blockade auf die bereits fortgeschrittene Pneumokokkenmeningitis untersucht werden. Die Tiere wurden hierbei jeweils intraperitoneal mit Suramin behandelt und die nötigen Parameter nach 40 Stunden gewonnen. Um einem vorzeitigen letalen Verlauf entgegenzuwirken, wurden die Mäuse zudem 16 Stunden *post infectionem* zusätzlich einer Antibiotika-Therapie mit Ceftriaxon unterzogen. Doch auch bei diesen Experimenten ergaben sich keine signifikanten Einflüsse auf Immunantwort und den klinischen Verlauf der Erkrankung.

Obwohl der purinerge Signalweg essentiell für die NLRP3-Inflammasom-abhängige IL-1 β -Sekretion von Makrophagen nach einer Pneumokokken-Exposition *in vitro* ist, scheint er unter *in-vivo*-Bedingungen – zumindest bei der Pneumokokkenmeningitis – für das klinische Outcome und die Immunregulation unwesentlich zu sein. Zur Klärung dieser Befunde wurden in weiteren Analysen die mRNA-Expressionsmuster diverser P2-Rezeptoren im Hirngewebe von Mäusen im Krankheitsverlauf mit Hilfe einer Real Time RT-PCR analysiert. Die Erkrankung ging mit einer signifikanten Reduktion der Expression der Rezeptoren *P2X1*, *P2X4*, *P2X7*, *P2Y4*, *P2Y12* und *P2Y14* einher. Da Ausmaß und Art der purinergen Signalwirkung zudem entscheidend von der extrazellulären Nukleotidkonzentration abhängen, wurden des Weiteren die ATP-Konzentrationen in den Liquorproben analysiert. Die Quantifizierung erfolgte indirekt mit Hilfe eines Lumineszenz-ATP-Determination-Kits. Dabei stellte sich heraus, dass die ATP-Spiegel im Liquor im Verlauf der Erkrankung massiv abfallen. Die dramatische Abnahme der eATP-Level und der P2R-Expression erklären vermutlich den Mangel jeglichen Effekts des P2R-Antagonismus im Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis.

Um herauszufinden, ob Immunzellen zum Abfall der Liquor-ATP-Level bei der Pneumokokkenmeningitis beitragen, wurden in einer zusätzlichen *in-vitro*-Versuchsreihe lebende *S. pneumoniae* in Ab- oder Anwesenheit von murinen Makrophagen (BMDM) oder neutrophilen Granulozyten (BMN) in künstlichem Liquor (aCSF) kultiviert, welchem ATP in physiologischer Konzentration zugegeben wurde. In Abwesenheit von BMDM oder BMN führte das Pneumokokkenwachstum zu einer zeitabhängigen Zunahme der eATP-Level.

Diese Zunahme wurde durch die Anwesenheit von Immunzellen nicht nur verhindert, die eATP-Konzentrationen waren im Vergleich zum Kontrollmedium sogar deutlich reduziert. Diese ATP-Abnahme konnte durch die Behandlung mit dem Ektonukleotidase CD39-Inhibitor ARL 67156 - zumindest teilweise - blockiert werden.

Da *in vivo* keine Wirkung der P2R-Blockierung im Verlauf der Meningitis zu sehen war, jedoch eine Rolle der Ektonukleotidase CD39 beim ATP-Abbau nachgewiesen werden konnte, sollte in einer finalen Versuchsserie ein erster Einblick in die funktionelle Rolle des ATP-Abbaus und von ATP-Abbauprodukten bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis gewonnen werden. Dabei verabreichte man den Tieren einerseits intraperitoneal ARL 67156, andererseits versuchte man die Adenosin-Rezeptoren durch eine intraperitoneale Gabe des Adenosinrezeptor-Antagonisten Theophyllin zu blockieren. Weder durch eine Behandlung mit ARL 67156 noch mit Theophyllin konnte der Krankheitsverlauf der experimentellen Pneumokokkenmeningitis signifikant beeinflusst werden. Es fanden sich aber bei beiden Behandlungsgruppen signifikant höhere Bakterientiter als bei unbehandelten Mäusen. Die Ursache dieser Titer-Erhöhung konnte noch nicht ausreichend geklärt werden.

Zusammenfassend zeigte die vorliegende Studie, dass der ATP-P2R-Signalweg bei der Pneumokokkenmeningitis nur von untergeordneter Relevanz ist: seine pharmakologische Modulation zeigte keinen signifikanten Effekt auf Entzündung, intrakranielle Komplikationen und kurzfristigen sowie langfristigen Ausgang. Dies könnte auf eine im Krankheitsverlauf zu beobachtende Reduktion der zerebralen Expression von P2R- und einem Abfall von eATP im Liquor – vermutlich aufgrund eines verstärkten Katabolismus durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten – zurückzuführen sein.

7 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass purinerge Signalwege, obwohl sie unter zellkulturellen Bedingung entscheidend zur Aktivierung von Makrophagen nach einer Pneumokokken-Exposition beitragen, keine wichtige Rolle in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis *in vivo* spielen. Als mögliche Ursachen für die fehlenden Effekte *in vivo* konnten eine Reduktion der Expression von P2R im Hirn und ein Abfall von eATP im Liquor identifiziert werden. Es stellt sich die Frage, ob diesen (patho)physiologischen Mechanismen eine über die Pneumokokken-Meningitis hinausgehende Bedeutung bei infektiösen ZNS-Erkrankungen zukommt, und zwar im folgenden Sinn: die eATP-Degradierung ist der Versuch des Organismus, sich vor einer ungebremsten, autodestruktiven Entzündungsreaktion zu schützen und/oder den Bakterien eine Grundlage für günstige Wachstumsbedingungen zu entziehen. Daher scheint es sinnvoll, in weiteren Modell infektiöser ZNS-Erkrankungen (wie z.B. der Meningokokken-Meningitis oder der HSV-Enzephalitis) zu überprüfen, ob das purinerge System bei diesen Infektionen auf ähnliche Weise reagiert. Zur Prüfung der Hypothese, dass ein ATP-Verlust protektiv wirkt, könnte in weiteren *in-vivo*-Experimenten die Wirkung einer ATP-Supplementierung oder der Einsatz von ATP-Agonisten getestet werden. Des Weiteren könnten zur weiteren Charakterisierung des ATP-Abbaus Chimären verwendet werden, deren ZNS-residente Makrophagenpopulationen keine CD39 und/oder CD73 exprimieren oder deren (periphere) Granulozyten/Monozyten Ektonukleotidase-defizient sind (Antonioli, L. et al., 2013; O'Connor, S. E. et al., 1991; Ring, S. et al., 2009).

Noch nicht ins Detail geklärt ist die Rolle der P1R-Rezeptoren im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis. Wenn die Blockade der Adenosin-Rezeptoren durch Theophyllin *in vivo* auch keine großen Effekte zeigte, besteht nichtsdestotrotz die Möglichkeit, dass ein einzelner spezifischer P1-Rezeptor eine wichtige Rolle spielt und gesondert blockiert werden müsste.

Darüber hinaus gab es durch die verwendete ATP-Messmethode mit Hilfe des Biolumineszenz-Kits erhebliche Einschränkungen in der Verwendbarkeit von Reagenzien und insbesondere P2R-Antagonisten aufgrund von Interaktionen, wie im Anhang näher erläutert wird. Daher sollten für weitere Versuche alternative ATP-Messmethoden in Betracht gezogen werden, wie elektrochemische Methoden zur ATP-Detektion (Pani, A. K. et al., 2014). Ein mögliches Verfahren zur Detektion von ATP sowie auch von ADP stellt dabei die HPLC (*high performance liquid chromatography*) - die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie – dar. Die Gruppe um von Papen, M. et al. (2013) verwendete dieses Verfahren beispielsweise, um die Sekretion von ATP und ADP aus Thrombozyten von Menschen und Mäusen zu detektieren, da die Nukleotide auch für die Plättchenaggregation eine wesentliche Rolle

spielen (King, S. M. et al., 2009; Nurden, A. und Nurden, P., 2011; von Papen, M. et al., 2013). Durch die HPLC war eine quantitative Bestimmung sowohl von ATP als auch ADP möglich, indem deren Konzentrationen im Überstand von gewaschenen Plättchen und Plättchen-reichem Plasma gemessen wurden. Durch eine interne Standardmessung erfolgte die Kalibrierung der Daten zur Kompensation von Analyten-Verlust, Erkennungssensitivität und Interferenzen mit der Biomatrix. Dabei ist auch bei nur geringen Probenmengen, wie es bei tierexperimentellen Versuchen mit Mäusen meist der Fall ist, eine leistungsreiche Messung möglich. Der Vorteil dieser Methodik gegenüber anderen Verfahren wie der Luminiszenz-Messung ist nach Aussage der Autoren, dass dabei insbesondere auf extensive Voranalysen oder eine Probenvorbereitung zum Großteil verzichtet werden kann und keine hohe Störanfälligkeiten der Datenqualität durch Enzymaktivität, Substratqualität und insbesondere interferierende Substanzen besteht. Diese können bei der Luminiszenzmessung das freigesetzte Licht löschen oder absorbieren, wie dies zum Teil auch bei manchen Reagenzien unserer Etablierungsversuche zu Störanfälligkeiten führte (von Papen, M. et al., 2013). Bhatt, D. P. et al. (2012) beschrieben eine noch sensitivere HPLC-basierte Methode, mit welcher in *in-vitro*-Zellkulturmodellen wie in primären Astrozytenzellkulturen simultan die Konzentrationen von Nukleotiden wie AMP, ADP und ATP sowie die Adenylat-Energie-Ladung quantifiziert werden konnten. Dies ist daher möglich, da bei der konventionellen HPLC aufgrund des niedrigen picomolaren Vorkommens der Nukleotide, diese schwer zu messen sind, sodass häufig ein Pooling von Proben oder indirekte Detektionsmethoden nötig sind.

8 Anhang

8.1 Etablierungsversuche

Im Rahmen dieses Anhangs soll auf Schwierigkeiten und Erkenntnisse hinsichtlich der ATP-Quantifizierung hingewiesen werden, auf die wir bei der Etablierung der zellkulturellen Experimente aufmerksam wurden. Die ATP-Konzentrationen wurden, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, mit Hilfe eines in wissenschaftlichen Studien oft genutzten, kommerziell erhältlichen ATP Determination Kits von Molecular Probes durchgeführt. Dieser Kit basiert auf einer Biolumineszenz-Reaktion. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind rein deskriptiv zu werten und sollen in erster Linie einen Überblick über potentielle Einfluß- bzw. Störgrößen bei den ATP-Messungen liefern.

8.1.1 Überblick der Versuchsansätze zur Etablierung der ATP-Messung *in vitro*

Um einen ersten Einblick in Validität und Reliabilität der ATP-Messung in den von uns geplanten Versuchsreihen zu bekommen, bestimmten wir die intra- und vor allem extrazellulären ATP-Konzentrationen unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Im Einzelnen verwendeten wir zwei primäre Knochenmarkszellpräparationen, nämlich BMDM und BMN, unterschiedliche Zellkulturmedien, unterschiedliche *S. pneumoniae*-Präparationen und -Konzentrationen, variierende Stimulationszeiten sowie diverse Pharamaka, welche an bekannten Stellen in den purinergeren Signalweg eingreifen (siehe Tabelle 10). Aus Gründen der Übersicht darf hierbei freundlicherweise auf das Abkürzungsverzeichnis verwiesen werden.

Tabelle 10: Übersicht über wesentliche Variablen der Etablierungsversuche

Variable	Form	Konzentration / Zusammensetzung
Zellen	BMN, BMDM	5×10^4 , 10^5 , 2×10^5 , 4×10^5
Stimulationsmedien	BMDM-Medium	DMEM + HEPES-Puffer + Nutridoma SP + P/S, DMEM + HEPES-Puffer + FCS (1%, 10%) + P/S
	BMN-Medium	Opti-MEM TM + Nutridoma SP +/- P/S, Opti-MEM TM + FCS (1%, 10%) +/- P/S
Pneumokokken	<i>S. pneumoniae</i> (lebend)	10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 8×10^6 , 10^7 , 2×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 8×10^7 , 10^8 (KBE/ml)
	HKPs	$2,2 \times 10^7$, $4,4 \times 10^7$, 5×10^7 , $8,8 \times 10^7$, 10^8 (KBE/ml)
	EKPs	5×10^7 , 10^8
Antagonisten	Suramin	0,1 mM, 1 mM
	ARL 67156	

	ox-ATP	
	Natrium-orthovanadat	
	PPADS	
Stimulationsdauer		5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 24 h

8.1.2 Spezifische Aspekte der Etablierungsversuche

8.1.2.1 Einfluss verschiedener Immunzellen auf die ATP-Konzentration

Im Rahmen der Stimulationsversuche *in vitro* wurden unterschiedliche Konzentrationen an BMDM und BMN verwendet. Die zentralen Erkenntnisse im Rahmen der Etablierungsversuche waren dabei: (i) Nur BMN, nicht aber BMDM geben ATP ins Zellkulturmedium ab – aber nur in geringen Mengen. (ii) Die beiden Zellarten der BMDM und der BMN degradieren ATP, wie auch in einem der endgültigen Versuche signifikant dargestellt werden konnte (siehe 4.4). (iii) Das Ausmaß des ATP-Abbaus variiert dabei offensichtlich in Abhängigkeit von der jeweiligen Zellart.

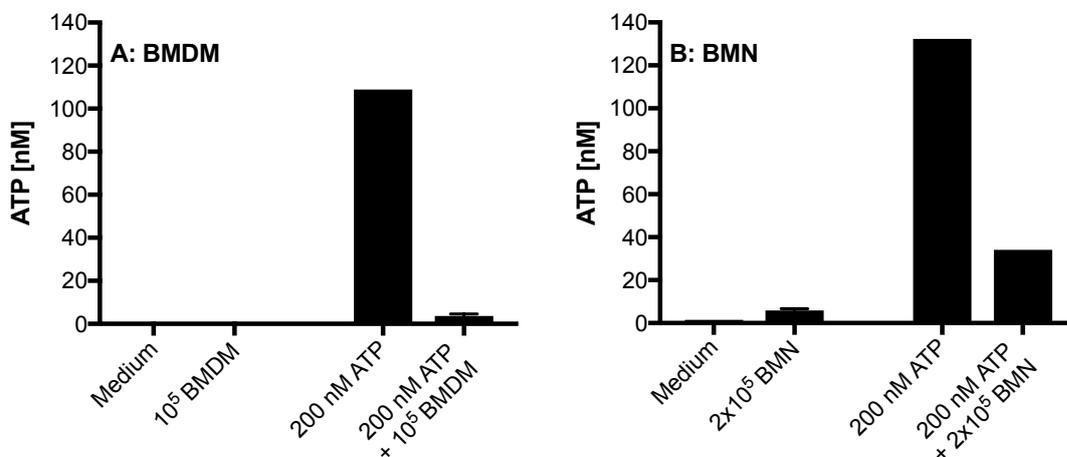


Abb. 16: Einfluss verschiedener Immunzellen auf die ATP-Konzentration

Bei diesen Etablierungsversuchen wurden die ATP-Konzentrationen jeweils in Ab- oder Anwesenheit von murinen **A)** BMDM (100.000 Zellen pro Well) oder **B)** BMN (200.000 Zellen pro Well) jeweils mit oder ohne Zugabe von externem ATP (200 nM) nach 30 min Kultivierung mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Biolumineszenz-Kits gemessen. Da es sich dabei lediglich um Etablierungsversuche handelte, wurden die Versuchsgruppen mit Medium, 200 nM ATP und 200 nM ATP + 2x10⁵ BMN jeweils nur in zweifacher Ausführung durchgeführt (n = 2). Diese Daten wurden daher nur als Mittelwerte ohne SD aufgeführt. Die Versuchsgruppen mit 10⁵ BMDM, 200 nM ATP + 10⁵ BMDM und 2x10⁵ BMN wurden jeweils in dreifacher Ausführung durchgeführt (n = 3). Diese Daten wurden als Mittelwerte ± SD aufgeführt. Es handelte sich dabei um eine rein deskriptive Untersuchung ohne Berechnung von Signifikanzen zwischen den Gruppen.

8.1.2.2 Einfluss verschiedener Pneumokokken-Formen auf die ATP-Konzentration

Wie aus Abb. 17A ersichtlich ist, setzen die lebenden *S. pneumoniae* ATP konzentrationsabhängig in die Umgebung frei. Dies war insbesondere im Überstand der Versuchsansätze detektierbar, bei welchen sich lediglich die Bakterien ohne weitere Zusätze an ATP oder Zellen im Stimulationsmedium befanden. Wenn hingegen ATP von extern hinzugegeben wurde, trugen die Pneumokokken zum einem Abbau des Nukleotids bei (Abb. 17B). Diese Effekte wurden jedoch bei Hinzugabe von Immunzellen durch deren starke Degradierungstendenz von eATP überlagert (Abb. 17A, B).

Man versuchte den Einfluss von *S. pneumoniae* auf die ATP-Messung zu verringern, indem man abgetötete Pneumokokken verwendete, wobei einerseits durch Ethanol abgetötete (*Ethanol killed pneumococci*, EKPs) und zum anderen durch Hitze-inaktivierte (bei 60°C für 60 min) Pneumokokken (*Heat killed pneumococci*, HKPs) - kapsellose isogene Mutanten von *S. pneumoniae* (Stamm D39Δcps) - in verschiedenen Konzentrationen zur Anwendung kamen. Sämtliche genannte Bakterien wurden ebenfalls freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Abteilung für Genetik der Mikroorganismen, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, zur Verfügung gestellt. Bei den Versuchsansätzen mit EKPs und HKPs stellte sich jedoch heraus, dass große Mengen ATP bei den verschiedenen Abtötungsverfahren aus den Pneumokokken passiv freigesetzt wurden (Abb. 17C, E). Die abgetöteten Pneumokokken sind jedoch offensichtlich nicht mehr zum Abbau von extern hinzugefügtem ATP fähig. Dies ist daran zu erkennen, dass bei Zugabe von externem ATP sich dies zu dem aus den Bakterien freigesetzten ATP addiert (Abb. 17D, F). Wie man in Abb. 17A-F sieht, verringern sich diese Effekte wiederum bei Hinzugabe von Immunzellen durch deren starke Degradierung des extrazellulären ATP.

Letztendlich entschied man sich, zu Versuchsansätzen mit lebenden *S. pneumoniae* zurückzukehren, da dies der *in-vivo*-Situation am ehesten entsprach.

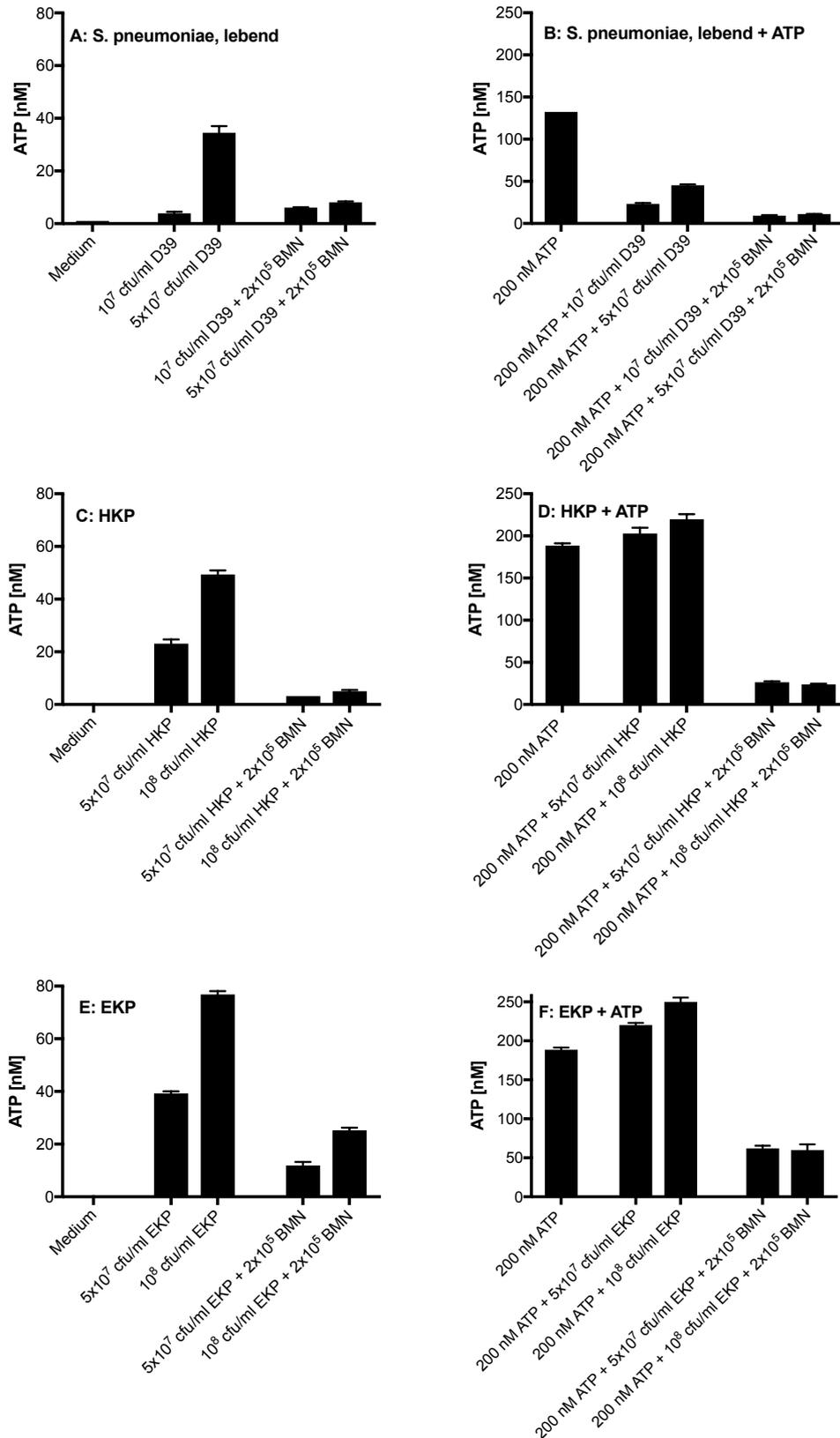


Abb. 17: Einfluss verschiedener Pneumokokken-Präparationen auf die ATP-Messung

Bei diesen Etablierungsversuchen wurden die ATP-Konzentrationen in Ab- oder Anwesenheit **A)** lebender *S. pneumoniae* (Serotyp 2, Stamm D39; 10⁷ und 5x10⁷ cfu/ml) oder der „Abtötungsformen“ **C)** EKPs (*Ethanol killed pneumococci*) und **E)** HKPs (*Heat killed pneumococci*) (jeweils 5x10⁷ und 10⁸

cfu/ml) nach 30 min Kultivierung mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Biolumineszenz-Kits gemessen. Die Messungen wurden zudem in Ab- oder Anwesenheit von murinen BMN (200.000 Zellen pro Well) durchgeführt. In weiteren Experimenten wurde externes ATP (200 nM) zu den jeweiligen Versuchsansätzen mit **B**) lebenden *S. pneumoniae* D39, **D**) EKP's und **F**) HKP's zugefügt. Da es sich dabei lediglich um Etablierungsversuche handelte, wurden die Versuchsgruppen mit **A**) Medium und **B**) 200 nM ATP sowie **C**) 5×10^7 cfu/ml HKP + 2×10^5 BMN jeweils nur in zweifacher Ausführung durchgeführt. Diese Daten wurden somit nur als Mittelwerte ohne SD aufgeführt. Die restlichen Versuchsgruppen wurden jeweils in dreifacher Ausführung durchgeführt (n = 3). Diese Daten wurden daher als Mittelwerte \pm SD dargestellt. Es handelte sich dabei um eine rein deskriptive Untersuchung ohne Berechnung von Signifikanzen.

8.1.2.3 Einfluss verschiedener Stimulationsmedien auf die ATP-Konzentration

Im Rahmen der Etablierungsversuche waren die Zellen während der Stimulationsphasen in jeweils verschiedenen Medien suspendiert. Die BMDM beziehungsweise BMN wurden je nach Versuchsansatz in den zellspezifischen Medien, welche zuvor beschrieben wurden (siehe 3.2.2) mit jeweils 1% beziehungsweise 10% inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS, Fetalem Kälberserum, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) oder Nutridoma SP (Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland) resuspendiert.

Bei den verschiedenen Versuchsansätzen zeigte sich, dass die Medien selbst keinen wesentlichen Einfluss auf die ATP-Messungen haben. Wie im direkten Vergleich aus Abb. 18 jedoch ersichtlich ist, trägt Nutridoma SP im Medium zu einer geringeren ATP-Freisetzung aus *S. pneumoniae* als FCS bei, was an ungünstigeren Wachstumsbedingungen für die Bakterien liegen könnte. Bei Zugabe von BMN zu den Medien ist bei Verwendung von Nutridoma SP im Vergleich zu FCS hingegen eine größere Menge an ATP im Überstand messbar. Dies könnte wiederum daran liegen, dass FCS protektiv auf die Zellen hinsichtlich eines Zelltodes wirkt und folglich eine passive ATP-Freisetzung verhindert wird. Protektive Eigenschaften von Serum auf Zellen konnten bereits in vorhergehenden Studien festgestellt werden (Kunas, K. und Papoutsakis, E., 1989). Grundsätzlich hat das jeweils verwendete Medium jedoch einen eher geringen Einfluss auf die gemessene ATP-Konzentration.

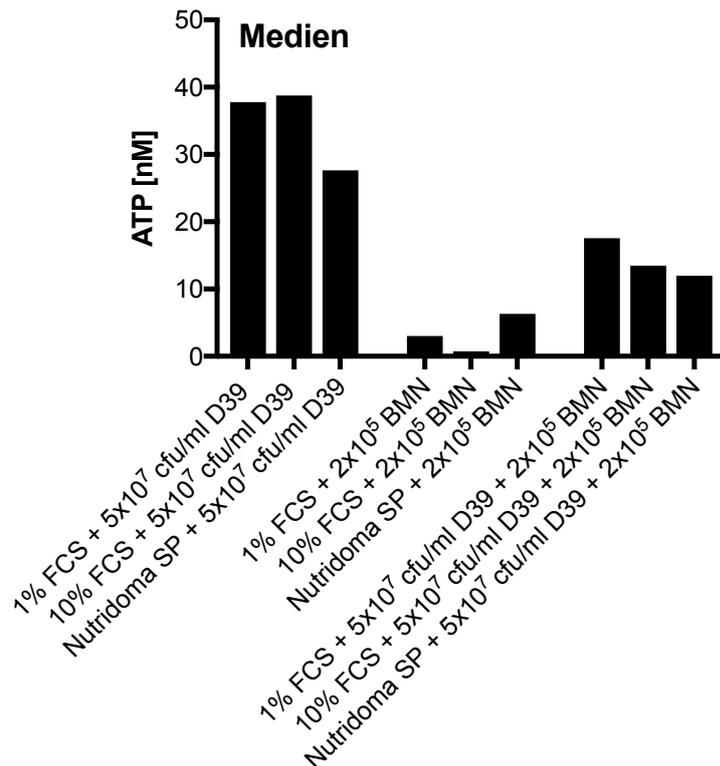


Abb. 18: Einfluss verschiedener Stimulationsmedien auf die ATP-Messung

Um einen Einfluss der verschiedenen Stimulationsmedien auf die ATP-Konzentration festzustellen, wurde diese bei Versuchsansätzen mit 1% beziehungsweise 10% FCS oder Nutridoma SP als Bestandteil der Stimulationsmedien in der Anwesenheit von Pneumokokken (5×10^7 cfu/ml), murinen BMN (200.000 Zellen pro Well) oder D39-Pneumokokken (5×10^7 cfu/ml) plus murinen BMN (200.000 Zellen pro Well) nach 30 min Kultivierung mittels Biolumineszenz-Kits gemessen. Da es sich dabei lediglich um Etablierungsversuche handelte, wurden die Versuchsgruppen jeweils nur in zweifacher Ausführung durchgeführt ($n = 2$). Die Daten wurden daher nur als Mittelwerte ohne SD aufgeführt. Es handelte sich dabei um eine rein deskriptive Untersuchung ohne Berechnung von Signifikanzen der Gruppen im Vergleich anhand statistischer Testmethoden.

8.1.2.4 Einfluss von Antagonisten des purinergen Signalwegs auf die ATP-Messung

In weiteren Pilotversuchen testeten wir die Wirkung verschiedener Antagonisten der purinergen Signalwege, um deren jeweiligen Einfluss auf die Zellen nach Exposition gegenüber *S. pneumoniae* zu untersuchen. Dabei wurden einerseits die P2R-Antagonisten oxidiertes Adenosintriphosphat (ox-ATP) (Colomar, A. et al., 2003; Di Virgilio, F., 2003), Suramin (Kim, J. E. et al., 2009; Light, A. R. et al., 2006; Naviaux, J. C. et al., 2014) und Pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure (PPADS) (Lambrecht, G. et al., 1992) sowie Inhibitoren des ATP-Abbaus über Ektonukleotidasen wie ARL 67156 (Levesque, S. et al., 2007) und Natriumorthovanadat (*Sodium orthovanadate*) (Cantley, L. et al., 1977) in Konzentrationen von 0,1 beziehungsweise 1 mM eingesetzt. Da es sich dabei um Pilotversuche handelte, ist die Vergleichbarkeit insofern eingeschränkt, dass bei den Versuchsansätzen mit ox-ATP, Suramin und PPADS jeweils Nutridoma und bei den

Versuchsansätzen mit ARL 67156 und Natriumorthovanadat 10% FCS hinzugefügt worden waren. Daher soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass die Ergebnisse rein deskriptiv zu werten sind.

Bei diesen Experimenten stellte man fest, dass manche der verwendeten Reagenzien mit dem ATP-Luminiszenz-Assay selbst interagieren, was zu Fehlinterpretationen führen kann. So sieht man anhand von Abb. **19A**, dass die Zugabe von ox-ATP zu reinem Medium konzentrationsabhängig zu erhöhten ATP-Werten bei der Messung mit Hilfe des ATP-Luminiszenz-Assays führt. Dahingegen wird der Messwert der ATP-Konzentration durch Zugabe von Suramin immens verringert. Dies ist insbesondere bei Zugabe von Suramin zu Medium mit externem ATP in Abhängigkeit von der Konzentration des Antagonisten gut erkennbar (Abb. **19C, D**). Auch bei PPADS ist eine Verringerung der Messwerte bei Zugabe zu ATP von extern zu beobachten, jedoch in einem weitaus geringeren Maße und erst bei einer Konzentration von 1 mM PPADS (Abb. **19F**). Der ATP-ase-Inhibitor Natriumorthovanadat führte hingegen zu erhöhten ATP-Messwerten (Abb. **19H**). Dabei ist anzumerken, dass bei Zugabe des Inhibitors zu reinem Medium lediglich eine geringe Erhöhung der ATP-Werte feststellbar ist, sodass sich die Effekte nicht durch eine Autolumineszenz erklären lassen, sondern die Ektonukleotidase-Aktivität im Medium als wahrscheinliche Ursache angesehen werden kann (Abb. **19G**). Bei ARL 67156 sind geringe Messwerterhöhungen erkennbar, wobei deren Ausmaße bei Zugabe zu externem ATP im Vergleich zu den anderen genannten Antagonisten jedoch vernachlässigbar gering sind (Abb. **19I, J**) und ähnlich zu Natriumorthovanadat nur eine geringe Autolumineszenz zu beobachten ist. Da Störeffekte von ARL 67156 auf die ATP-Messung verhältnismäßig gering ausgeprägt waren, konnte der Inhibitor im Rahmen der endgültigen Versuchsansätze *in vitro* ohne Bedenken verwendet werden.

Letztendlich wurde mit Hilfe der Etablierungsversuche ersichtlich, dass die verschiedenen Reagenzien, welche Einfluss auf die purinergen Signalwege nehmen, in unterschiedlich starkem Ausmaß und auf verschiedene Weise direkt auf die verwendete ATP-Luminiszenzmessung Einfluss nehmen können.

Anhang

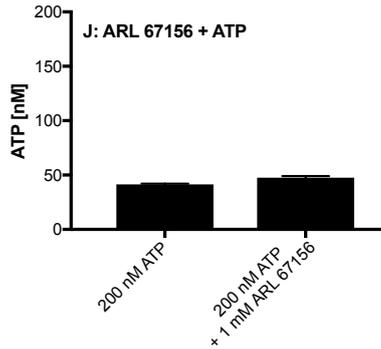
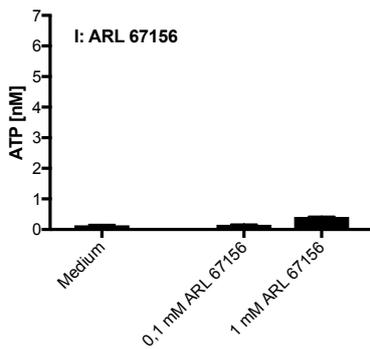
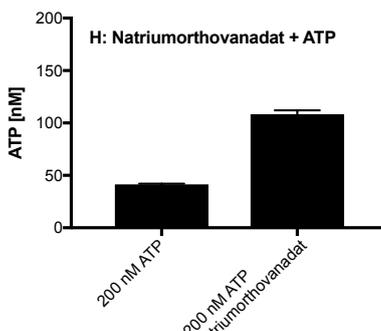
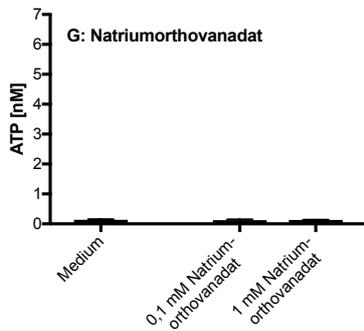
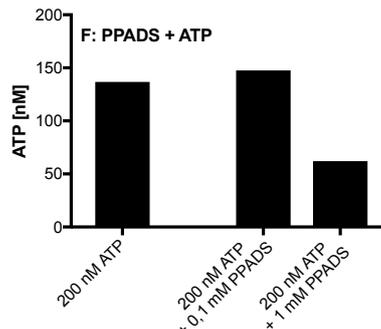
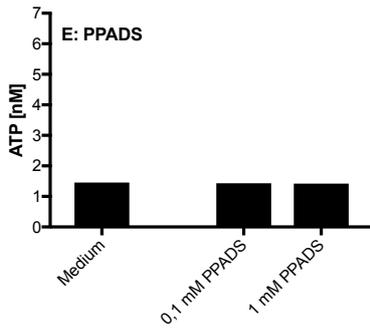
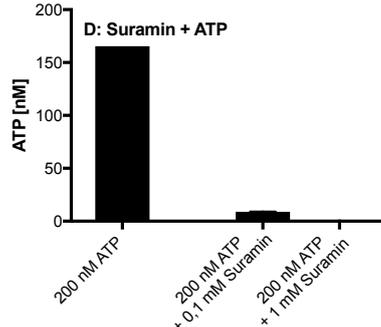
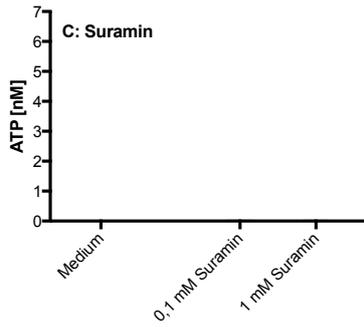
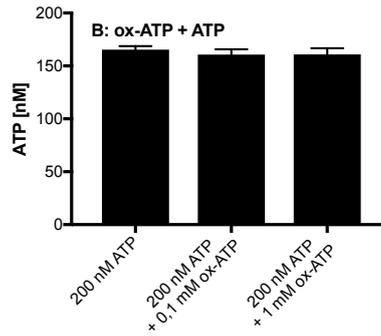
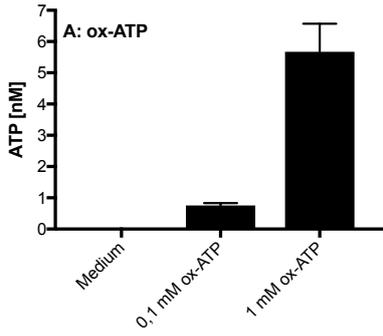


Abb. 19: Einfluss von Antagonisten des purinergen Signalwegs auf die ATP-Messungen

Bei diesen Pilotversuchen sollten die Einflüsse verschiedener Antagonisten des purinergen Signalwegs auf die ATP-Messungen ermittelt werden. Dabei wurden die ATP-Konzentrationen in Ab- oder Anwesenheit von **A)** ox-ATP, **C)** Suramin, **E)** PPADS, **G)** Natriumorthovanadat oder **I)** ARL 67156 (jeweils 0,1 und 1 mM) nach 30 min Kultivierung mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Biolumineszenz-Kits gemessen. In weiteren Versuchen wurde ATP (200 nM) zu den jeweiligen Versuchsansätzen mit **B)** ox-ATP, **D)** Suramin, **F)** PPADS (jeweils 0,1 und 1 mM), **H)** Natriumorthovanadat und **J)** ARL 67156 (jeweils 1 mM) zugefügt und die resultierende ATP-Konzentration im Anschluss auf gleiche Weise quantifiziert. Da es sich dabei lediglich um Etablierungsversuche handelte, wurden einzelne Versuchsgruppen mit Medium (A, C) sowie die Versuchsansätze mit PPADS (E, F) jeweils nur in zweifacher Ausführung durchgeführt. Den Versuchsansätzen mit ox-ATP, Suramin und PPADS (A-F) war jeweils Nutridoma und den Versuchsansätzen mit ARL 67156 und Natriumorthovanadat (G-J) 10% FCS hinzugefügt worden. Diese Daten wurden daher nur als Mittelwerte ohne SD aufgeführt. Die restlichen Versuchsgruppen wurden jeweils in dreifacher Ausführung durchgeführt (n = 3). Diese Daten wurden als Mittelwerte \pm SD aufgeführt. Es handelte sich dabei um eine rein deskriptive Untersuchung ohne Berechnung von Signifikanzen.

8.1.3 Schlussfolgerungen aus den Etablierungsversuchen

Unsere Pilotversuche zeigten eine Vielzahl an Einflussgrößen auf die ATP-Messung auf, die bei der Planung von ATP-Messungen im Zellkultursystem beachtet werden sollten. Im Einzelnen waren dies der unterschiedliche Einfluss verschiedener Immunzellen und Pneumokokken-Formen, der Einfluss verschiedener Stimulationsmedienbestandteile sowie die verschiedenen Effekte der Antagonisten des purinergen Signalweges, wie bei der Verwendung von ox-ATP, Suramin, PPADS, Natriumorthovanadat und ARL 67156 gezeigt werden konnte. Die Vielzahl der potentiellen Störfaktoren zeigte, dass die ATP-Messung mittels Biolumineszenz-Kit als störanfällig betrachtet werden muss. Können einzelne Störfaktoren nicht umgangen werden, sollten alternative ATP-Messmethoden wie die HPLC zur Anwendung kommen. In unserem Forschungsprojekt waren diese Pilotversuche äußerst hilfreich, wiesen sie uns doch den Weg zu einem Erklärungsansatz für die fehlende Wirkung der P2R-Antagonisten im Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis, nämlich zur ATP-degradierenden Eigenschaft muriner Immunzellen im Liquorraum.

8.2 Quellenverzeichnis

Tabelle 11: Reagenzien, Chemikalien und Zellkulturmedien

Material, Typ	Hersteller
Accutase®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Alkalische Phosphatase (AP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Aqua dest.</i> , Endotoxin-frei	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
ARL 67156	Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien
Adenosin-5-triphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
ATP Determination Kit	Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA
Brilliant Blau G (BBG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Buprenorphin (Buprenorphinhydrochlorid, Temgesic®)	Reckitt Benckiser Healthcare (UK) Ltd., Berkshire, Großbritannien
Ceftriaxon	MIP Pharma GmbH, Blieskastel-Niederwürzbach, Deutschland
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dulbecco`s modifiziertes Eagle`s Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Mouse IL-1 beta/IL-1F2 Duoset ELISA Development System	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Mouse IL-6 Duoset ELISA Development System	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Heparin-Natrium 25000 IE	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
HEPES-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Isofluran, Forene® 100%, 250 ml	Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Deutschland
Ketamin	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland
LDH Cytotoxicity Assay Kit II	Biovision Research Products, Milpitas, Kalifornien, USA
Lidocain (Xylocain® 1 %)	AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Nutridoma SP	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
Opti-MEM™	Life Technologies™, Darmstadt, Deutschland

Anhang

ox-ATP; Adenosin-5'-triphosphat, periodiertes oxidiertes Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natrium-D-Laktat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumorthovanadat (<i>Sodium orthovanadate</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Percoll®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Pyridoxal phosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure (PPADS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Rekombinanter Makrophagen koloniestimulierender Faktor (rM-CSF)	Peprotech Germany, Hamburg, Deutschland
Suramin hexasodium salt	Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien
Theophyllin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypan-Blau Lösung 0.4%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Türk'sche Lösung	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Xylazin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien

Material, Typ	Hersteller
Blutagar BD Columbia, Agar mit 5 % Schafsblut	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Cellulose-Acetat-Membran 0,20 µm	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Corning® Primaria™ 96-Mikrotest-Mikroplatten, klar, steril	Corning Incorporated, One Riverfront Plaza, Corning, New York, 14831, USA
Corning® 96-Well-Mikroplatten, weiß, nicht-steril	Corning Incorporated, One Riverfront Plaza, Corning, New York, 14831, USA

Anhang

Deckgläser, 24 x 50 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Einmalinjektionsspritzen ohne Nadel, steril, Omnifix®-F, Luer 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Handschuhe Manufix® Sensitiv	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Histoacryl®, 0,5 ml, Gewebekleber	B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Kanüle BD, Microlance™ 3, 22G x 1¼" 0.7 mm x 30 mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mikrosieb, Falcon™, 70 µm, steril (Cell Strainer)	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
Mikrotomklingen, High-profile disposable microtome blades 818	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Multiwell Primaria 6-well	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mundschutzmaske Klinion® Protection	Medeco B.V., Oud-Beijerland, Niederlande
Objektträger, Menzel-Gläser Superfrost® 76 x 26 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Parafilm M, Verschlussfolie	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, USA
Plastikschälchen „Plastic Tissue Dispomolds“ 24 x 24 x 5 mm	DIAPATH S.p.A., Martinengo, Italien
Petrischale 100 x 15 mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S., 0.5-20 µl, 2-200 µl, 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 5 ml, 10 ml, serologisch	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Polyethylen-Schlauch (0.58 mm ID, 0.96 mm OD)	Sims Portex Ltd., Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn
Polypropylen-Röhrchen, Rundboden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Polyvinylidenfluorid-Membran	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Anhang

(PVDF)	
Reaktionsgefäß 1.5 ml, 3810X Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Röhrchen, 50 ml, Falcon Blue Max, konisch, Polypropylen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Röhrchen, 15 ml, Falcon Blue Max, konisch, Polypropylen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Spritze 5 ml BD Discardit™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Spritze 20 ml BD Discardit™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Spritze Omnican® F 30, G x 1/2" (Einmal-Feindosierungs- spritze mit integrierter Kanüle, 0.01 – 1 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Fisher Scientific GmbH, Im Heiligen Feld 17, 58239 Schwerte
Thermo Scientific™ Nunc™ Microwell™ 96-Well Mikrotiterplatten	Fisher Scientific GmbH, Im Heiligen Feld 17, 58239 Schwerte
Vaseline, Balea Pflegecreme	Dm-drogerie Mark GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zellstofftupfer Maicell® 4 x 5 cm	MaiMed GmbH, Neuenkirchen, Deutschland

Tabelle 13: Geräte und Apparaturen

Material, Typ	Hersteller
Analysenwaage Kern ABJ	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Antirollplatte Glas, 70 mm	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Autoklav Systec DX-23	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
Brutschränke	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Digitalkamera Kodak EasyShare DX4330	Kodak GmbH, Stuttgart, Deutschland
Druckwandler Sirecust 403 R	Siemens AG, München, Deutschland
Feinbohrschleifer Proxxon, Micromot 50	Proxxon GmbH, Föhren, Deutschland
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Rhön, Deutschland
Heizkissen Beurer HK 20	Beurer GmbH, Ulm, Deutschland
Homogenisator, Ultra-Turrax®	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland

Anhang

Kühltruhe -20 °C	Liebherr International S.A., Bulle, Schweiz
Kühlschränke	AEG AG Frankfurt am Main, Deutschland
Kryostat Leica CM3050	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Lichtmikroskop Nikon TMS	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Lichtmikroskop Leica LEITZ DM IL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mehrkanalpipette 10-100 µl, Eppendorf Research plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroplattenleser TriStar LB 941	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
Multipipette plus, Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Perfusor	HT Precidor Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Pinzette	INOX, Biologie No. 5 Dumont®
Pipetten 10, 200, 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage Kern KB	Kern KB, Kern & Sohn GmbH, Balingen Frommern, Deutschland
Probenhalter, Aluminium, geriffelt, rund, 40 mm	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Rüttelmixer	Cenco, Breda, Niederlande
Schere, groß, stumpf	Aesculap AG, Tuttlingen Deutschland
Schere, klein	Quadrolab, Meckenheim, Deutschland
Sicherheitswerkbänke	Hera Safe, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Skalpell	Feather® Safety Razer Co. Ltd., Osaka, Japan
Stoppuhr	Junghans, Schramberg, Deutschland
Temperatursonde (GTH1160 Digitalthermometer)	Greisinger electronic GmbH, Regenstauf, Deutschland)
Thermobad Haake L	Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tiefkühlschrank -80 °	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Vaporisateurs (Isofluran Vet. Med. Vapor.)	Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland
Vortexer Mixer UZUSIO VTX-	LMS, Tokio, Japan

Anhang

3000L	
Zentrifuge Hermle Z360K	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tabelle 14: Versuchstiere und Bakterienstämme

Material, Typ	Hersteller
C57BL/6N Mäuse, männlich	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland, Artikel Bezeichnung C57/6-M
EKPs (Ethanol-inaktivierte Pneumokokken)	Prof. Sven Hammerschmidt, Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald, Abteilung Genetik der Mikroorganismen, Greifswald, Deutschland
HKPs, Hitze-inaktivierte (bei 60°C für 60 min), kapsellose isogene Mutanten von <i>S.</i> <i>pneumoniae</i> , D39Δcps Stamm	Prof. Sven Hammerschmidt, Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald, Abteilung Genetik der Mikroorganismen, Greifswald, Deutschland
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Serotyp 2, D39 Stamm	Prof. Sven Hammerschmidt, Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald, Abteilung Genetik der Mikroorganismen, Greifswald, Deutschland

Tabelle 15: Software

Material, Typ	Hersteller
Adobe Photoshop CC 2018	Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornien, USA
Microsoft Office	Microsoft Ireland Operations Limited, Dublin, Irland
Systat 9.0	Systat Software, Inc., San Jose, Kalifornien, USA

9 Literaturverzeichnis

- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A. und Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci*, 32(1), 19-29.
- Alam, M. S., Costales, M. G., Cavanaugh, C. und Williams, K. (2015). Extracellular adenosine generation in the regulation of pro-inflammatory responses and pathogen colonization. *Biomolecules*, 5(2), 775-792.
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S. und Haskó, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine*, 19(6), 355-367.
- Arevalo, C. E., Barnes, P. F., Duda, M. und Leedom, J. M. (1989). Cerebrospinal fluid cell counts and chemistries in bacterial meningitis. *Southern medical journal*, 82(9), 1122-1127.
- Artz, A. S., Ershler, W. B. und Longo, D. L. (2003). Pneumococcal vaccination and revaccination of older adults. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 308-318.
- Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R. und Honda, K. (2008). ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature*, 455(7214), 808-812.
- Auburtin, M., Wolff, M., Charpentier, J., Varon, E., Le Tulzo, Y., Girault, C., Mohammedi, I., Renard, B., Mourvillier, B. und Bruneel, F. (2006). Detrimental role of delayed antibiotic administration and penicillin-nonsusceptible strains in adult intensive care unit patients with pneumococcal meningitis: the PNEUMOREA prospective multicenter study. *Critical care medicine*, 34(11), 2758-2765.
- Austrian, R. (1981). Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. *Reviews of infectious diseases*, 3(Supplement_1), S1-S17.
- Bar, I., Guns, P. J., Metallo, J., Cammarata, D., Wilkin, F., Boeynants, J. M., Bult, H. und Robaye, B. (2008). Knockout mice reveal a role for P2Y6 receptor in macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, 74(3), 777-784.
- Barletta, K. E., Ley, K. und Mehrad, B. (2012). Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(4), 856-864.
- Bederson, J. B., Pitts, L. H., Tsuji, M., Nishimura, M. C., Davis, R. L. und Bartkowski, H. (1986). Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *stroke*, 17(3), 472-476.
- Beutler, B. A. (2009). TLRs and innate immunity. *Blood*, 113(7), 1399-1407.
- Bewersdorf, J. P., Grandgirard, D., Koedel, U. und Leib, S. L. (2018). Novel and preclinical treatment strategies in pneumococcal meningitis. *Current opinion in infectious diseases*, 31(1), 85-92.
- Bhatt, D. P., Chen, X., Geiger, J. D. und Rosenberger, T. A. (2012). A sensitive HPLC-based method to quantify adenine nucleotides in primary astrocyte cell cultures. *Journal of Chromatography B*, 889, 110-115.

- Biaggioni, I., Paul, S., Puckett, A. und Arzubiaga, C. (1991). Caffeine and theophylline as adenosine receptor antagonists in humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 258(2), 588-593.
- Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology*, 81(1), 1-5.
- Bijlsma, M. W., Brouwer, M. C., Kasanmoentalib, E. S., Kloek, A. T., Lucas, M. J., Tanck, M. W., van der Ende, A. und van de Beek, D. (2016). Community-acquired bacterial meningitis in adults in the Netherlands, 2006–14: a prospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 339-347.
- Blackburn, M. R., Vance, C. O., Morschl, E. und Wilson, C. N. (2009). Adenosine receptors and inflammation. *Adenosine receptors in health and disease*, 215-269.
- Blazer, S., Berant, M. und Alon, U. (1983). Bacterial meningitis: effect of antibiotic treatment on cerebrospinal fluid. *American journal of clinical pathology*, 80(3), 386-387.
- Bohr, V., Hansen, B., Jessen, O., Johnsen, N., Kjersem, H., Kristensen, H. S., Nyboe, J. und Rasmussen, N. (1983). Eight hundred and seventy-five cases of bacterial meningitis Part I of a three-part series: Clinical data, prognosis, and the role of specialised hospital departments. *Journal of Infection*, 7(1), 21-30.
- Bou Ghanem, E. N., Clark, S., Du, X., Wu, D., Camilli, A., Leong, J. M. und Meydani, S. N. (2015a). The α -tocopherol form of vitamin E reverses age-associated susceptibility to streptococcus pneumoniae lung infection by modulating pulmonary neutrophil recruitment. *The Journal of Immunology*, 194(3), 1090-1099.
- Bou Ghanem, E. N., Clark, S., Roggensack, S. E., McIver, S. R., Alcaide, P., Haydon, P. G. und Leong, J. M. (2015b). Extracellular Adenosine Protects against Streptococcus pneumoniae Lung Infection by Regulating Pulmonary Neutrophil Recruitment. *PLoS Pathog*, 11(8), e1005126.
- Bours, M. J., Swennen, E. L., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N. und Dagnelie, P. C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*, 112(2), 358-404.
- Boyd, A. R., Shivshankar, P., Jiang, S., Berton, M. T. und Orihuela, C. J. (2012). Age-related defects in TLR2 signaling diminish the cytokine response by alveolar macrophages during murine pneumococcal pneumonia. *Experimental gerontology*, 47(7), 507-518.
- Braun, J. S., Novak, R., Gao, G., Murray, P. J. und Shenep, J. L. (1999a). Pneumolysin, a protein toxin of Streptococcus pneumoniae, induces nitric oxide production from macrophages. *Infection and immunity*, 67(8), 3750-3756.
- Braun, J. S., Novak, R., Herzog, K. H., Bodner, S. M., Cleveland, J. L. und Tuomanen, E. I. (1999b). Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med*, 5(3), 298-302.
- Braun, J. S., Sublett, J. E., Freyer, D., Mitchell, T. J., Cleveland, J. L., Tuomanen, E. I. und Weber, J. R. (2002). Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *The Journal of clinical investigation*, 109(1), 19.
- Brouwer, M. C., McIntyre, P., Prasad, K. und Beek, D. v. d. (2015). Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *The Cochrane Library*, 9.

- Brouwer, M. C., McIntyre, P., Prasad, K. und van de Beek, D. (2013). Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(6), 6: Cd004405.
- Brouwer, M. C., Tunkel, A. R. und van de Beek, D. (2010). Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clinical microbiology reviews*, 23(3), 467-492.
- Brown, J. S., Hussell, T., Gilliland, S. M., Holden, D. W., Paton, J. C., Ehrenstein, M. R., Walport, M. J. und Botto, M. (2002). The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16969-16974.
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D. und Van Noort, J. M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 61(11), 1013-1021.
- Buchholz, G., Koedel, U., Pfister, H.-W., Kastenbauer, S. und Klein, M. (2016). Dramatic reduction of mortality in pneumococcal meningitis. *Critical Care*, 20(1), 312.
- Burnaugh, A. M., Frantz, L. J. und King, S. J. (2008). Growth of *Streptococcus pneumoniae* on human glycoconjugates is dependent upon the sequential activity of bacterial exoglycosidases. *Journal of bacteriology*, 190(1), 221-230.
- Burnstock, G. (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov*, 7(7), 575-590.
- Burnstock, G. (2016). An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. *Neuropharmacology*, 104, 4-17.
- Burnstock, G. (2017). Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Frontiers in pharmacology*, 8, 661.
- Cantley, L., Josephson, L., Warner, R., Yanagisawa, M., Lechene, C. und Guidotti, G. (1977). Vanadate is a potent (Na, K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 252(21), 7421-7423.
- Cekic, C. und Linden, J. (2016). Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 16(3), 177-192.
- Chávez-Bueno, S. und McCracken, G. H., Jr. Bacterial Meningitis in Children. *Pediatric Clinics*, 52(3), 795-810.
- Chen, G., Shaw, M. H., Kim, Y.-G. und Nuñez, G. (2009). NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annual Review of Pathological Mechanical Disease*, 4, 365-398.
- Chen, S., Ma, Q., Krafft, P. R., Hu, Q., Rolland, W., Sherchan, P., Zhang, J., Tang, J. und Zhang, J. H. (2013). P2X7R/cryopyrin inflammasome axis inhibition reduces neuroinflammation after SAH. *Neurobiology of disease*, 58, 296-307.
- Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., Nizet, V., Insel, P. A. und Junger, W. G. (2006). ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science*, 314(5806), 1792-1795.

- Chen, Y., Yao, Y., Sumi, Y., Li, A., To, U. K., Elkhali, A., Inoue, Y., Woehrle, T., Zhang, Q., Hauser, C. und Junger, W. G. (2010). Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. *Sci Signal*, 3(125), ra45.
- Choi, H. B., Ryu, J. K., Kim, S. U. und McLarnon, J. G. (2007). Modulation of the purinergic P2X7 receptor attenuates lipopolysaccharide-mediated microglial activation and neuronal damage in inflamed brain. *Journal of Neuroscience*, 27(18), 4957-4968.
- Choo, A. M., Miller, W. J., Chen, Y. C., Nibley, P., Patel, T. P., Goletiani, C., Morrison, B., 3rd, Kutzing, M. K., Firestein, B. L., Sul, J. Y., Haydon, P. G. und Meaney, D. F. (2013). Antagonism of purinergic signalling improves recovery from traumatic brain injury. *Brain*, 136(Pt 1), 65-80.
- Christie, D., Viner, R. M., Knox, K., Coen, P. G., Wang, H., El Bashir, H., Legood, R., Patel, B. C. und Booy, R. (2011). Long-term outcomes of pneumococcal meningitis in childhood and adolescence. *European journal of pediatrics*, 170(8), 997-1006.
- Chu, K., Yin, B., Wang, J., Peng, G., Liang, H., Xu, Z., Du, Y., Fang, M., Xia, Q. und Luo, B. (2012). Inhibition of P2X7 receptor ameliorates transient global cerebral ischemia/reperfusion injury via modulating inflammatory responses in the rat hippocampus. *Journal of neuroinflammation*, 9(1), 69.
- Cicko, S., Lucattelli, M., Muller, T., Lommatzsch, M., De Cunto, G., Cardini, S., Sundas, W., Grimm, M., Zeiser, R., Durk, T., Zissel, G., Boeynaems, J. M., Sorichter, S., Ferrari, D., Di Virgilio, F., Virchow, J. C., Lungarella, G. und Idzko, M. (2010). Purinergic receptor inhibition prevents the development of smoke-induced lung injury and emphysema. *J Immunol*, 185(1), 688-697.
- Colomar, A., Marty, V., Médina, C., Combe, C., Parnet, P. und Amédée, T. (2003). Maturation and release of interleukin-1 β by lipopolysaccharide-primed mouse Schwann cells require the stimulation of P2X7 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 30732-30740.
- Coutinho-Silva, R. und Ojcius, D. M. (2012). Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect*, 14(14), 1271-1277.
- Coxon, A., Tang, T. und Mayadas, T. N. (1999). Cytokine-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis in vitro and in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 190(7), 923-934.
- Csoka, B., Nemeth, Z. H., Toro, G., Kocsso, B., Kokai, E., Robson, S. C., Enyoloji, K., Rolandelli, R. H., Erdelyi, K., Pacher, P. und Hasko, G. (2015). CD39 improves survival in microbial sepsis by attenuating systemic inflammation. *FASEB J*, 29(1), 25-36.
- Cundell, D. R., Gerard, N. P., Craig, G., Idanpaan-Heikkila, I. und Tuomanen, E. I. (1995). Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*, 377(6548), 435.
- Cunha, R. (2015). Hippocampal adenosine A2a receptor up-regulation is necessary and sufficient to trigger memory dysfunction in Alzheimer's disease: Wth12-05. *Journal of neurochemistry*, 134, 322.
- Dale, N. und Frenguelli, B. G. (2009). Release of adenosine and ATP during ischemia and epilepsy. *Current neuropharmacology*, 7(3), 160-179.

- Daly, J. W., Padgett, W., Shamim, M., Butts-Lamb, P. und Waters, J. (1985). 1, 3-Dialkyl-8-(p-sulfophenyl) xanthines: potent water-soluble antagonists for A1-and A2-adenosine receptors. *Journal of medicinal chemistry*, 28(4), 487-492.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L. und Gan, W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*, 8(6), 752-758.
- Dawson, K. G., Emerson, J. C. und Burns, J. L. (1999). Fifteen years of experience with bacterial meningitis. *The Pediatric infectious disease journal*, 18(9), 816-822.
- De Gans, J. und Van de Beek, D. (2002). Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *New England Journal of Medicine*, 347(20), 1549-1556.
- de Vasconcelos, N. M., Van Opdenbosch, N. und Lamkanfi, M. (2016). Inflammasomes as polyvalent cell death platforms. *Cell Mol Life Sci*, 73(11-12), 2335-2347.
- Di Virgilio, F. (2003). Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X7 receptor is not the only target. *British journal of pharmacology*, 140(3), 441-443.
- Di Virgilio, F. (2005). Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signalling*, 1(3), 205.
- Di Virgilio, F., Ceruti, S., Bramanti, P. und Abbracchio, M. P. (2009). Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends Neurosci*, 32(2), 79-87.
- Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L. und Falzoni, S. (2017). The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity*, 47(1), 15-31.
- Dou, L., Chen, Y.-F., Cowan, P. J. und Chen, X.-p. (2017). Extracellular ATP signaling and clinical relevance. *Clinical Immunology*.
- Dujardin, B., Driedijk, P., Roijers, A. und Out, T. (1985). The determination of the complement components C1q, C4 and C3 in serum and cerebrospinal fluid by radioimmunoassay. *Journal of immunological methods*, 80(2), 227-237.
- Dumitriu, I. E., Baruah, P., Manfredi, A. A., Bianchi, M. E. und Rovere-Querini, P. (2005). HMGB1: guiding immunity from within. *Trends in immunology*, 26(7), 381-387.
- Durand, M. L., Calderwood, S. B., Weber, D. J., Miller, S. I., Southwick, F. S., Caviness Jr, V. S. und Swartz, M. N. (1993). Acute Bacterial Meningitis in Adults--A Review of 493 Episodes. *New England Journal of Medicine*, 328(1), 21-28.
- Echchannaoui, H., Frei, K., Schnell, C., Leib, S. L., Zimmerli, W. und Landmann, R. (2002). Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *The Journal of infectious diseases*, 186(6), 798-806.
- Edmond, K., Clark, A., Korczak, V. S., Sanderson, C., Griffiths, U. K. und Rudan, I. (2010). Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 10(5), 317-328.
- Ekdahl, K., Truedsson, L., Sjöholm, A. G. und Braconier, J. H. (1995). Complement analysis in adult patients with a history of bacteremic pneumococcal infections or recurrent pneumonia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 27(2), 111-117.

- Eltzschig, H. K., Eckle, T., Mager, A., Kueper, N., Karcher, C., Weissmueller, T., Boengler, K., Schulz, R., Robson, S. C. und Colgan, S. P. (2006). ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circulation research*, 99(10), 1100-1108.
- Eltzschig, H. K., Köhler, D., Eckle, T., Kong, T., Robson, S. C. und Colgan, S. P. (2009). Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. *Blood*, 113(1), 224-232.
- Engel, T., Gomez-Villafuertes, R., Tanaka, K., Mesuret, G., Sanz-Rodriguez, A., Garcia-Huerta, P., Miras-Portugal, M. T., Henshall, D. C. und Diaz-Hernandez, M. (2012). Seizure suppression and neuroprotection by targeting the purinergic P2X7 receptor during status epilepticus in mice. *FASEB J*, 26(4), 1616-1628.
- Ernst, J., Hartiala, K., Goldstein, I. und Sande, M. (1984). Complement (C5)-derived chemotactic activity accounts for accumulation of polymorphonuclear leukocytes in cerebrospinal fluid of rabbits with pneumococcal meningitis. *Infection and immunity*, 46(1), 81-86.
- Ernst, J. D., Decazes, J. M. und Sande, M. A. (1983). Experimental pneumococcal meningitis: role of leukocytes in pathogenesis. *Infection and immunity*, 41(1), 275-279.
- Fang, F., Yu, M., Cavanagh, M. M., Saunders, J. H., Qi, Q., Ye, Z., Le Saux, S., Sultan, W., Turgano, E. und Dekker, C. L. (2016). Expression of CD39 on activated T cells impairs their survival in older individuals. *Cell reports*, 14(5), 1218-1231.
- Farrell, D., Jenkins, S. und Reinert, R. (2004). Global distribution of Streptococcus pneumoniae serotypes isolated from paediatric patients during 1999–2000 and the in vitro efficacy of telithromycin and comparators. *Journal of medical microbiology*, 53(11), 1109-1117.
- Feeney, D. M., Gonzalez, A. und Law, W. A. (1982). Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. *Science*, 217(4562), 855-857.
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Dal Susino, M., Melchiorri, L., Baricordi, O. R. und Di Virgilio, F. (1997). Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *The Journal of Immunology*, 159(3), 1451-1458.
- Ferrari, D., McNamee, E. N., Idzko, M., Gambari, R. und Eltzschig, H. K. (2016). Purinergic signaling during immune cell trafficking. *Trends in immunology*, 37(6), 399-411.
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R. M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E. und Di Virgilio, F. (2006). The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. *The Journal of Immunology*, 176(7), 3877-3883.
- Fiebich, B. L., Akter, S. und Akundi, R. S. (2014). The two-hit hypothesis for neuroinflammation: role of exogenous ATP in modulating inflammation in the brain. *Front Cell Neurosci*, 8, 260.
- Fischer, H. und Tomasz, A. (1984). Production and release of peptidoglycan and wall teichoic acid polymers in pneumococci treated with beta-lactam antibiotics. *Journal of bacteriology*, 157(2), 507-513.

- Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R. und Nuñez, G. (2009). The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nature immunology*, 10(3), 241-247.
- Franke, H., Krügel, U. und Illes, P. (2006). P2 receptors and neuronal injury. *Pflügers Archiv*, 452(5), 622-644.
- Fredholm, B. B. (1979). Are methylxanthine effects due to antagonism of endogenous adenosine? *Trends in Pharmacological Sciences*, 1(1), 129-132.
- Friedle, S. A., Curet, M. A. und Watters, J. J. (2010). Recent patents on novel P2X7 receptor antagonists and their potential for reducing central nervous system inflammation. *Recent patents on CNS drug discovery*, 5(1), 35-45.
- Frommhold, D., Mannigel, I., Schymeinsky, J., Mocsai, A., Poeschl, J., Walzog, B. und Sperandio, M. (2007). Spleen tyrosine kinase Syk is critical for sustained leukocyte adhesion during inflammation in vivo. *BMC immunology*, 8(1), 31.
- Fuglsang-Damgaard, D., Pedersen, G. und Schønheyder, H. C. (2008). Positive blood cultures and diagnosis of bacterial meningitis in cases with negative culture of cerebrospinal fluid. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 40(3), 229-233.
- Garcia, J. H., Wagner, S., Liu, K.-F. und Hu, X.-j. (1995). Neurological Deficit and Extent of Neuronal Necrosis Attributable to Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Statistical Validation*, 26(4), 627-635.
- Garvy, B. A. und Harmsen, A. G. (1996). The importance of neutrophils in resistance to pneumococcal pneumonia in adult and neonatal mice. *Inflammation*, 20(5), 499-512.
- Geary, C., Akinbi, H., Korfhagen, T., Fabre, J. E., Boucher, R. und Rice, W. (2005). Increased susceptibility of purinergic receptor-deficient mice to lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289(5), L890-895.
- George, J., Goncalves, F. Q., Cristovao, G., Rodrigues, L., Meyer Fernandes, J. R., Goncalves, T., Cunha, R. A. und Gomes, C. A. (2015). Different danger signals differently impact on microglial proliferation through alterations of ATP release and extracellular metabolism. *Glia*, 63(9), 1636-1645.
- Gerber, J. und Nau, R. (2010). Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr Opin Neurol*, 23(3), 312-318.
- Gerber, J., Raivich, G., Wellmer, A., Noeske, C., Kunst, T., Werner, A., Brück, W. und Nau, R. (2001). A mouse model of *Streptococcus pneumoniae* meningitis mimicking several features of human disease. *Acta neuropathologica*, 101(5), 499-508.
- Gessi, S., Merighi, S., Varani, K. und Andrea Borea, P. (2011). Adenosine receptors in health and disease. *Advances in pharmacology*, 61, 41.
- Ghielmetti, M., Ren, H., Leib, S. L., Täuber, M. G. und Christen, S. (2003). Impaired cortical energy metabolism but not major antioxidant defenses in experimental bacterial meningitis. *Brain Research*, 976(2), 139-148.
- Gould, T. D., Dao, D. T. und Kovacsics, C. E. (2009). The Open Field Test. In Gould, T. D. (Ed.), *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests* (pp. 1-20). Totowa, NJ: Humana Press.

- Grandgirard, D., Schürch, C., Cottagnoud, P. und Leib, S. L. (2007). Prevention of brain injury by the nonbacteriolytic antibiotic daptomycin in experimental pneumococcal meningitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(6), 2173-2178.
- Hahn, I., Klaus, A., Steinwede, K., Ding, N., Bohling, J., Gauthier, F., Welte, T. und Maus, U. (2011). Cathepsin G and neutrophil elastase play critical and non-redundant roles in lung protective immunity against *S. pneumoniae* in mice. *Pneumologie*, 65(02), A10.
- Hanke, M. L. und Kielian, T. (2011). Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science*, 121(9), 367-387.
- Hatada, E. N., Krappmann, D. und Scheidereit, C. (2000). NF- κ B and the innate immune response. *Current opinion in immunology*, 12(1), 52-58.
- Hawking, F. (1940). Concentration of Bayer 205 (Germanin) in human blood and cerebrospinal fluid after treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 34(1), 37-52.
- Haynes, S. E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M. E., Gan, W. B. und Julius, D. (2006). The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci*, 9(12), 1512-1519.
- He, Y., Hara, H. und Nunez, G. (2016). Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci*, 41(12), 1012-1021.
- Henrichsen, J. (1995). Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology*, 33(10), 2759.
- Henriques-Normark, B. und Tuomanen, E. I. (2013). The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(7), a010215.
- Higgins, C. F., Hiles, I. D., Salmond, G. P., Gill, D. R., Downie, J. A., Evans, I. J., Holland, I. B., Gray, L., Buckel, S. D. und Bell, A. W. (1986). A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature*, 323(6087), 448-450.
- Hirst, R., Kadioglu, A., O'callaghan, C. und Andrew, P. (2004). The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 138(2), 195-201.
- Hoban, D., Doern, G., Fluit, A., Roussel-Delvallez, M. und Jones, R. (2001). Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clinical infectious diseases*, 32(Supplement_2), S81-S93.
- Hoegen, T., Tremel, N., Klein, M., Angele, B., Wagner, H., Kirschning, C., Pfister, H. W., Fontana, A., Hammerschmidt, S. und Koedel, U. (2011). The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release. *J Immunol*, 187(10), 5440-5451.
- Höhne, C., Wenzel, M., Angele, B., Hammerschmidt, S., Häcker, H., Klein, M., Bierhaus, A., Sperandio, M., Pfister, H.-W. und Koedel, U. (2013). High mobility group box 1 prolongs inflammation and worsens disease in pneumococcal meningitis. *Brain*, 136(6), 1746-1759.
- Höhne, C. L. (2015). Die Rolle von High Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis (Doctoral dissertation, LMU).

- Houldsworth, S., Andrew, P. und Mitchell, T. (1994). Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes. *Infection and immunity*, 62(4), 1501-1503.
- Hussein, A. S. und Shafran, S. D. (2000). Acute bacterial meningitis in adults: a 12-year review. *Medicine*, 79(6), 360-368.
- Idzko, M., Ferrari, D. und Eltzschig, H. K. (2014a). Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*, 509(7500), 310-317.
- Idzko, M., Ferrari, D., Riegel, A.-K. und Eltzschig, H. K. (2014b). Extracellular nucleotide and nucleoside signaling in vascular and blood disease. *Blood*, 124(7), 1029-1037.
- Janoff, E. N. und Rubins, J. B. (1997). Invasive pneumococcal disease in the immunocompromised host. *Microbial Drug Resistance*, 3(3), 215-232.
- Jenner, P. (2014). An overview of adenosine A2A receptor antagonists in Parkinson's disease *International review of neurobiology* (Vol. 119, pp. 71-86): Elsevier.
- John, G. R., Simpson, J. E., Woodroffe, M. N., Lee, S. C. und Brosnan, C. F. (2001). Extracellular nucleotides differentially regulate interleukin-1 β signaling in primary human astrocytes: implications for inflammatory gene expression. *Journal of Neuroscience*, 21(12), 4134-4142.
- Junger, W. G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol*, 11(3), 201-212.
- Jurányi, Z., Sperlág, B. und Vizi, E. S. (1999). Involvement of P 2 purinoceptors and the nitric oxide pathway in [3H] purine outflow evoked by short-term hypoxia and hypoglycemia in rat hippocampal slices. *Brain Research*, 823(1), 183-190.
- Kadioglu, A., De Filippo, K., Bangert, M., Fernandes, V. E., Richards, L., Jones, K., Andrew, P. W. und Hogg, N. (2011). The integrins Mac-1 and $\alpha 4\beta 1$ perform crucial roles in neutrophil and T cell recruitment to lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *The Journal of Immunology*, 1001533.
- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C. und Andrew, P. W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 288-301.
- Kahlenberg, J. M. und Dubyak, G. R. (2004a). Differing caspase-1 activation states in monocyte versus macrophage models of IL-1 β processing and release. *J Leukoc Biol*, 76(3), 676-684.
- Kahlenberg, J. M. und Dubyak, G. R. (2004b). Mechanisms of caspase-1 activation by P2X 7 receptor-mediated K⁺ release. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 286(5), C1100-C1108.
- Karmakar, M., Katsnelson, M. A., Dubyak, G. R. und Pearlman, E. (2016). Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. *Nat Commun*, 7, 10555.
- Kastenbauer, S. und Pfister, H. W. (2003). Pneumococcal meningitis in adults: Spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain*, 126(5), 1015-1025.

- Kaufmann, A., Musset, B., Limberg, S. H., Renigunta, V., Sus, R., Dalpke, A. H., Heeg, K. M., Robaye, B. und Hanley, P. J. (2005). "Host tissue damage" signal ATP promotes non-directional migration and negatively regulates toll-like receptor signaling in human monocytes. *J Biol Chem*, 280(37), 32459-32467.
- Kawamura, H., Kawamura, T., Kanda, Y., Kobayashi, T. und Abo, T. (2012). Extracellular ATP-stimulated macrophages produce macrophage inflammatory protein-2 which is important for neutrophil migration. *Immunology*, 136(4), 448-458.
- Kawano, A., Tsukimoto, M., Mori, D., Noguchi, T., Harada, H., Takenouchi, T., Kitani, H. und Kojima, S. (2012). Regulation of P2X7-dependent inflammatory functions by P2X4 receptor in mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 420(1), 102-107.
- Kempski, O. (2001). *Cerebral edema*. Paper presented at the Seminars in nephrology.
- Kharlamov, A., Jones, S. C. und Kim, D. K. (2002). Suramin reduces infarct volume in a model of focal brain ischemia in rats. *Exp Brain Res*, 147(3), 353-359.
- Kim, J. E., Kwak, S. E., Jo, S. M. und Kang, T. C. (2009). Blockade of P2X receptor prevents astroglial death in the dentate gyrus following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurol Res*, 31(9), 982-988.
- Kim, K. S. (2003). Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(5), 376.
- Kimble, D. E., Shields, J., Yanasak, N., Vender, J. R. und Dhandapani, K. M. (2012). Activation of P2X7 promotes cerebral edema and neurological injury after traumatic brain injury in mice. *PLoS One*, 7(7), e41229.
- King, S. M., McNamee, R. A., Hough, A. K., Patel, R., Brands, M. und Reed, G. L. (2009). Platelet dense-granule secretion plays a critical role in thrombosis and subsequent vascular remodeling in atherosclerotic mice. *Circulation*, 120(9), 785-791.
- Klein, M. (2004). Pathophysiologie des Hörschadens bei experimenteller Pneumokokkenmeningitis (Doctoral dissertation, lmu).
- Klein, M., Bühler, R., Eiffert, H., Grabein, B., Linn, J., Nau, R., Salzberger, B., Tumani, H., Weber, J. und Pfister, H.-W. (2016). Ambulant erworbene bakterielle (eitrig) Meningoenzephalitis im Erwachsenenalter. *Aktuelle Neurologie*, 43(06), 358-368.
- Klein, M., Koedel, U. und Pfister, H.-W. (2006a). Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy? *Progress in neurobiology*, 80(6), 269-280.
- Klein, M., Obermaier, B., Angele, B., Pfister, H. W., Wagner, H., Koedel, U. und Kirschning, C. J. (2008). Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Infect Dis*, 198(7), 1028-1036.
- Klein, M., Paul, R., Angele, B., Popp, B., Pfister, H. W. und Koedel, U. (2006b). Protein expression pattern in experimental pneumococcal meningitis. *Microbes Infect*, 8(4), 974-983.
- Kobayashi, S., Zimmermann, H. und Millhorn, D. E. (2000). Chronic hypoxia enhances adenosine release in rat PC12 cells by altering adenosine metabolism and membrane transport. *Journal of neurochemistry*, 74(2), 621-632.
- Koedel, U. (2009). Toll-like receptors in bacterial meningitis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 336, 15-40.

Koedel, U., Angele, B., Rupprecht, T., Wagner, H., Roggenkamp, A., Pfister, H.-W. und Kirschning, C. J. (2003). Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis. *The Journal of Immunology*, 170(1), 438-444.

Koedel, U., Bayerlein, I., Paul, R., Sporer, B. und Pfister, H. (2000). Pharmacologic Interference with NF- κ B Activation Attenuates Central Nervous System Complications in Experimental Pneumococcal Meningitis. *The Journal of infectious diseases*, 182(5), 1437-1445.

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

Koedel, U., Frankenberg, T., Kirschnek, S., Obermaier, B., Hacker, H., Paul, R. und Hacker, G. (2009a). Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis. *PLoS Pathog*, 5(5), e1000461.

Koedel, U., Klein, M. und Pfister, H.-W. (2009b). Acute Bacterial Meningitis: Current Trends in Research and Clinical Practice. *Aktuelle Neurologie*, 36(08), 381-396.

Koedel, U., Klein, M. und Pfister, H. W. (2010a). Modulation of brain injury as a target of adjunctive therapy in bacterial meningitis. *Curr Infect Dis Rep*, 12(4), 266-273.

Koedel, U., Klein, M. und Pfister, H. W. (2010b). New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis*, 23(3), 217-223.

Koedel, U. und Pfister, H.-W. (1999). Oxidative Stress in Bacterial Meningitis. *Brain Pathology*, 9(1), 57-67.

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

Koedel, U., Rupprecht, T., Angele, B., Heesemann, J., Wagner, H., Pfister, H. W. und Kirschning, C. J. (2004). MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS. *Brain*, 127(Pt 6), 1437-1445.

Koedel, U., Scheld, W. M. und Pfister, H.-W. (2002a). Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(12), 721-736.

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

Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B. V., Jacobson, K. A., Kohsaka, S. und Inoue, K. (2007). UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature*, 446(7139), 1091-1095.

Kono, H. und Rock, K. L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology*, 8(4), 279-289.

Kries, R. v. (1994). Preventing *Haemophilus influenzae* meningitis: Germany's experience. *Lancet*, 344(8920), 469.

- Kubes, P. und Ward, P. A. (2000). Leukocyte recruitment and the acute inflammatory response. *Brain Pathology*, 10(1), 127-135.
- Kunas, K. und Papoutsakis, E. (1989). Increasing serum concentrations decrease cell death and allow growth of hybridoma cells at higher agitation rates. *Biotechnology letters*, 11(8), 525-530.
- Lambrecht, G., Friebe, T., Grimm, U., Windscheif, U., Bungardt, E., Hildebrandt, C., Bäumer, H. G., Spatz-Kümbel, G. und Mutschler, E. (1992). PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses. *European journal of pharmacology*, 217(2-3), 217-219.
- Lavrnja, I., Laketa, D., Savic, D., Bozic, I., Bjelobaba, I., Pekovic, S. und Nedeljkovic, N. (2015). Expression of a second ecto-5' -nucleotidase variant besides the usual protein in symptomatic phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Molecular Neuroscience*, 55(4), 898-911.
- Le Feuvre, R. A., Brough, D., Touzani, O. und Rothwell, N. J. (2003). Role of P2X7 receptors in ischemic and excitotoxic brain injury in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23(3), 381-384.
- Ledderose, C., Bao, Y., Kondo, Y., Fakhari, M., Slubowski, C., Zhang, J. und Junger, W. G. (2016). Purinergic signaling and the immune response in sepsis: a review. *Clinical therapeutics*, 38(5), 1054-1065.
- Lee, J. S. und Yilmaz, Ö. (2018). Unfolding Role of a Danger Molecule Adenosine Signaling in Modulation of Microbial Infection and Host Cell Response. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 199.
- Letiembre, M., Hao, W., Liu, Y., Walter, S., Mihaljevic, I., Rivest, S., Hartmann, T. und Fassbender, K. (2007). Innate immune receptor expression in normal brain aging. *Neuroscience*, 146(1), 248-254.
- Levesque, S., Lavoie, É. G., Lecka, J., Bigonnesse, F. und Sévigny, J. (2007). Specificity of the ecto - ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. *British journal of pharmacology*, 152(1), 141-150.
- Lewis, K. (2000). Programmed death in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 503-514.
- Lewis, R. und Elliott, K. (1950). Clinical uses of an artificial cerebrospinal fluid. *Journal of neurosurgery*, 7(3), 256-260.
- Li, J. Y., Boado, R. J. und Pardridge, W. M. (2001). Blood—brain barrier genomics. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 21(1), 61-68.
- Li, P., Gao, Y., Cao, J., Wang, W., Chen, Y., Zhang, G., Robson, S., Wu, Y. und Yang, J. (2015). CD39+ regulatory T cells attenuate allergic airway inflammation. *Clinical & Experimental Allergy*, 45(6), 1126-1137.
- Li, S., Geiger, N. H., Soliman, M. L., Hui, L., Geiger, J. D. und Chen, X. (2015). Caffeine, Through Adenosine A 3 Receptor-Mediated Actions, Suppresses Amyloid-β Protein Precursor Internalization and Amyloid-β Generation. *Journal of Alzheimer's Disease*, 47(1), 73-83.

- Liechti, F. D., Grandgirard, D. & Leib, S. L. . (2015). Bacterial meningitis: insights into pathogenesis and evaluation of new treatment options: a perspective from experimental studies. *Future Microbiology*, 10(7), 1195-1213.
- Light, A. R., Wu, Y., Huguen, R. W. und Guthrie, P. B. (2006). Purinergic receptors activating rapid intracellular Ca²⁺ increases in microglia. *Neuron glia biology*, 2(2), 125-138.
- Liu, J. S., John, G. R., Sikora, A., Lee, S. C. und Brosnan, C. F. (2000). Modulation of interleukin-1 β and tumor necrosis factor α signaling by P2 purinergic receptors in human fetal astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 20(14), 5292-5299.
- Lopez-Cortes, L., Cruz-Ruiz, M., Gomez-Mateos, J., Jimenez-Hernandez, D., Palomino, J. und Jimenez, E. (1993). Measurement of levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in the CSF of patients with meningitis of different etiologies: utility in the differential diagnosis. *Clinical infectious diseases*, 16(4), 534-539.
- Löwenberg, M., Stahn, C., Hommes, D. W. und Buttgereit, F. (2008). Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. *Steroids*, 73(9), 1025-1029.
- Lucas, M. J., Brouwer, M. C. und van de Beek, D. (2016). Neurological sequelae of bacterial meningitis. *J Infect*, 73(1), 18-27.
- Lutz, P. L. und Kabler, S. (1997). Release of adenosine and ATP in the brain of the freshwater turtle (*Trachemys scripta*) during long-term anoxia. *Brain Research*, 769(2), 281-286.
- Mahamed, D. A., Mills, J. H., Egan, C. E., Denkers, E. Y. und Bynoe, M. S. (2012). CD73-generated adenosine facilitates *Toxoplasma gondii* differentiation to long-lived tissue cysts in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201205589.
- Malipiero, U., Koedel, U., Pfister, H. W., Leveen, P., Burki, K., Reith, W. und Fontana, A. (2006). TGF β receptor II gene deletion in leucocytes prevents cerebral vasculitis in bacterial meningitis. *Brain*, 129(Pt 9), 2404-2415.
- Malley, R., Henneke, P., Morse, S. C., Cieslewicz, M. J., Lipsitch, M., Thompson, C. M., Kurt-Jones, E., Paton, J. C., Wessels, M. R. und Golenbock, D. T. (2003). Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1966-1971.
- Marks, L. R., Davidson, B. A., Knight, P. R. und Hakansson, A. P. (2013). Interkingdom signaling induces *Streptococcus pneumoniae* biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to disease. *MBio*, 4(4), e00438-00413.
- Martin, C., Leone, M., Viviani, X., Ayem, M.-L. und Guieu, R. (2000). High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. *Critical care medicine*, 28(9), 3198-3202.
- Matzinger, P. (2007). Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nature immunology*, 8(1), 11-13.
- McCracken Jr, G. H., Mustafa, M. M., Ramilo, O., Olsen, K. D. und Risser, R. C. (1989). Cerebrospinal fluid interleukin 1-beta and tumor necrosis factor concentrations and outcome from neonatal gram-negative enteric bacillary meningitis. *The Pediatric infectious disease journal*, 8(3), 155-159.

- McIntyre, P. B., Berkey, C. S., King, S. M., Schaad, U. B., Kilpi, T., Kanra, G. Y. und Perez, C. M. O. (1997). Dexamethasone as adjunctive therapy in bacterial meningitis: a meta-analysis of randomized clinical trials since 1988. *Jama*, 278(11), 925-931.
- McNeela, E. A., Burke, Á., Neill, D. R., Baxter, C., Fernandes, V. E., Ferreira, D., Smeaton, S., El-Rachkidy, R., McLoughlin, R. M. und Mori, A. (2010). Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS pathogens*, 6(11), e1001191.
- Melani, A., Amadio, S., Gianfriddo, M., Vannucchi, M. G., Volontè, C., Bernardi, G., Pedata, F. und Sancesario, G. (2006). P2X7 receptor modulation on microglial cells and reduction of brain infarct caused by middle cerebral artery occlusion in rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26(7), 974-982.
- Mempin, R., Tran, H., Chen, C., Gong, H., Ho, K. K. und Lu, S. (2013). Release of extracellular ATP by bacteria during growth. *BMC microbiology*, 13(1), 301.
- Meylan, E., Tschopp, J. und Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*, 442(7098), 39-44.
- Mogensen, T. H., Paludan, S. R., Kilian, M. und Østergaard, L. (2006). Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *Journal of leukocyte biology*, 80(2), 267-277.
- Mook-Kanamori, B. B., Geldhoff, M., van der Poll, T. und van de Beek, D. (2011). Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clinical microbiology reviews*, 24(3), 557-591.
- Morona, J. K., Paton, J. C., Miller, D. C. und Morona, R. (2000). Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology*, 35(6), 1431-1442.
- Moscoso, M. und Claverys, J. P. (2004). Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Molecular microbiology*, 54(3), 783-794.
- Muller, T., Vieira, R. P., Grimm, M., Durk, T., Cicko, S., Zeiser, R., Jakob, T., Martin, S. F., Blumenthal, B., Soricter, S., Ferrari, D., Di Virgillio, F. und Idzko, M. (2011). A potential role for P2X7R in allergic airway inflammation in mice and humans. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 44(4), 456-464.
- Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B. L., Rajendiran, T. M. und Núñez, G. (2013). K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*, 38(6), 1142-1153.
- Murr, C. (2015). Die Rolle des terminalen Komplementwegs bei der Pneumokokken-Meningitis (Doctoral dissertation, Imu).
- Mustafa, M. M., Lebel, M. H., Ramilo, O., Olsen, K. D., Reisch, J. S., Beutler, B. und McCracken, G. H. (1989). Correlation of interleukin-1 β and cachectin concentrations in cerebrospinal fluid and outcome from bacterial meningitis. *The Journal of Pediatrics*, 115(2), 208-213.

- Myers, A. J., Eilertson, B., Fulton, S. A., Flynn, J. L. und Canaday, D. H. (2005). The purinergic P2X7 receptor is not required for control of pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun*, 73(5), 3192-3195.
- Narayana Moorthy, A., Narasaraju, T., Rai, P., Perumalsamy, R., Tan, K., Wang, S., Engelward, B. und Chow, V. T. (2013). In vivo and in vitro studies on the roles of neutrophil extracellular traps during secondary pneumococcal pneumonia after primary pulmonary influenza infection. *Frontiers in immunology*, 4, 56.
- Nau, R. und Brück, W. (2002). Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends in neurosciences*, 25(1), 38-45.
- Naviaux, J. C., Schuchbauer, M. A., Li, K., Wang, L., Risbrough, V. B., Powell, S. B. und Naviaux, R. K. (2014). Reversal of autism-like behaviors and metabolism in adult mice with single-dose antipurinergic therapy. *Transl Psychiatry*, 4, e400.
- Neill, D. R., Fernandes, V. E., Wisby, L., Haynes, A. R., Ferreira, D. M., Laher, A., Strickland, N., Gordon, S. B., Denny, P. und Kadioglu, A. (2012). T regulatory cells control susceptibility to invasive pneumococcal pneumonia in mice. *PLoS pathogens*, 8(4), e1002660.
- Németh, Z. H., Csóka, B., Wilmanski, J., Xu, D., Lu, Q., Ledent, C., Deitch, E. A., Pacher, P., Spolarics, Z. und Haskó, G. (2006). Adenosine A2A receptor inactivation increases survival in polymicrobial sepsis. *The Journal of Immunology*, 176(9), 5616-5626.
- Niederhorn, J. Y. (2006). See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat Immunol*, 7(4), 354-359.
- Nieminen, J., St-Pierre, C., Bhaumik, P., Poirier, F. und Sato, S. (2008). Role of galectin-3 in leukocyte recruitment in a murine model of lung infection by Streptococcus pneumoniae. *The Journal of Immunology*, 180(4), 2466-2473.
- Nurden, A. und Nurden, P. (2011). Advances in our understanding of the molecular basis of disorders of platelet function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9, 76-91.
- O'Connor, S. E., Dainty, I. A. und Leff, P. (1991). Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12, 137-141.
- Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K. und Kohsaka, S. (2007). Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia*, 55(6), 604-616.
- Ohta, A. und Sitkovsky, M. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*, 414(6866), 916.
- Oldenburg, M., Kruger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., Bathke, B., Lauterbach, H., Suter, M., Dreher, S., Koedel, U., Akira, S., Kawai, T., Buer, J., Wagner, H., Bauer, S., Hochrein, H. und Kirschning, C. J. (2012). TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science*, 337(6098), 1111-1115.
- Owens, T., Bechmann, I. und Engelhardt, B. (2008). Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 67(12), 1113-1121.
- Pachter, J. S., De Vries, H. E. und Fabry, Z. (2003). The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 62(6), 593-604.

- Palmer, A. M. (2010). The role of the blood–CNS barrier in CNS disorders and their treatment. *Neurobiology of disease*, 37(1), 3-12.
- Pani, A. K., Jiao, Y., Sample, K. J. und Smeyne, R. J. (2014). Neurochemical measurement of adenosine in discrete brain regions of five strains of inbred mice. *PLoS One*, 9(3), e92422.
- Park, W. S. und Chang, Y. S. (2000). Effects of decreased cerebral perfusion pressure on cerebral hemodynamics, brain cell membrane function and energy metabolism during the early phase of experimental Escherichia coli meningitis in the newborn piglet. *J Korean Med Sci*, 15(2), 203-210.
- Parvathenani, L. K., Tertysnikova, S., Greco, C. R., Roberts, S. B., Robertson, B. und Posmantur, R. (2003). P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 278(15), 13309-13317.
- Paul, R., Koedel, U., Winkler, F., Kieseier, B. C., Fontana, A., Kopf, M., Hartung, H. P. und Pfister, H. W. (2003). Lack of IL - 6 augments inflammatory response but decreases vascular permeability in bacterial meningitis. *Brain*, 126(8), 1873-1882.
- Paul, R., Lorenzl, S., Koedel, U., Sporer, B., Vogel, U., Frosch, M. und Pfister, H.-W. (1998). Matrix metalloproteinases contribute to the blood—brain barrier disruption during bacterial meningitis. *Annals of neurology*, 44(4), 592-600.
- Pegg, C. C., He, C., Stroink, A. R., Kattner, K. A. und Wang, C. X. (2010). Technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in rat. *J Neurosci Methods*, 187(1), 8-12.
- Peng, W., Cotrina, M. L., Han, X., Yu, H., Bekar, L., Blum, L., Takano, T., Tian, G.-F., Goldman, S. A. und Nedergaard, M. (2009). Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(30), 12489-12493.
- Pfister, H.-W. (2002). Meningitis: Klinik-Differenzialdiagnose-Pathophysiologie-Therapie.
- Pfister, H.-W. (2015). S2k-Leitlinie Ambulant erworbene bakterielle (eitrige) Meningoenzephalitis im Erwachsenenalter. In: *Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Hrsg. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.*, Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 01.07.2017).
- Pfister, H.-W., Feiden, W. und Einhäupl, K.-M. (1993). Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults: results of a prospective clinical study. *Archives of Neurology*, 50(6), 575-581.
- Pfister, H.-W., Koedel, U. und Paul, R. (1999). Acute meningitis. *Current Infectious Disease Reports*, 1(2), 153-159.
- Prochnicki, T., Mangan, M. S. und Latz, E. (2016). Recent insights into the molecular mechanisms of the NLRP3 inflammasome activation. *F1000Res*, ;5.
- Quagliarello, V. J., Wispelwey, B., Long Jr, W. J. und Scheld, W. (1991). Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *Journal of Clinical Investigation*, 87(4), 1360.

- Rall, T. W. (1982). Evolution of the mechanism of action of methylxanthines: from calcium mobilizers to antagonists of adenosine receptors. *Pharmacologist*, 24, 277-287.
- Ramakers, B. P., Riksen, N. P., van der Hoeven, J. G., Smits, P. und Pickkers, P. (2011). Modulation of innate immunity by adenosine receptor stimulation. *Shock*, 36(3), 208-215.
- Ramakrishnan, M., Ulland, A. J., Steinhardt, L. C., Moisi, J. C., Were, F. und Levine, O. S. (2009). Sequelae due to bacterial meningitis among African children: a systematic literature review. *BMC Med*, 7(1), 47.
- Ramilo, O., Mustafa, M. M., Sáez-Ilorens, X., Mertsola, J., Ohkawara, S., Yoshinaga, M., Hansen, E. J. und MCCracken JR, G. H. (1989). Role of interleukin 1-beta in meningeal inflammation. *The Pediatric infectious disease journal*, 8(12), 909.
- Ransohoff, R. M. und Brown, M. A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *The Journal of clinical investigation*, 122(4), 1164.
- Ribble, J. C. und Braude, A. I. (1958). ACTH and adrenal steroids in the treatment of pneumococcal meningitis in adults. *The American journal of medicine*, 24(1), 68-79.
- Ribeiro, F. F., Xapelli, S., Miranda-Lourenco, C., Tanqueiro, S. R., Fonseca-Gomes, J., Diogenes, M. J., Ribeiro, J. A. und Sebastiao, A. M. (2016). Purine nucleosides in neuroregeneration and neuroprotection. *Neuropharmacology*, 104, 226-242.
- Riegel, A. K., Faigle, M., Zug, S., Rosenberger, P., Robaye, B., Boeynaems, J. M., Idzko, M. und Eltzschig, H. K. (2011). Selective induction of endothelial P2Y6 nucleotide receptor promotes vascular inflammation. *Blood*, 117(8), 2548-2555.
- Ring, A., Weiser, J. N. und Tuomanen, E. I. (1998). Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 102(2), 347.
- Ring, S., Oliver, S. J., Cronstein, B. N., Enk, A. H. und Mahnke, K. (2009). CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions through a CD39, adenosine-dependent mechanism. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(6), 1287-1296. e1282.
- Riteau, N., Gasse, P., Fauconnier, L., Gombault, A., Couegnat, M., Fick, L., Kanellopoulos, J., Quesniaux, V. F., Marchand-Adam, S., Crestani, B., Ryffel, B. und Couillin, I. (2010). Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 182(6), 774-783.
- Rodrigues, R. J., Tome, A. R. und Cunha, R. A. (2015). ATP as a multi-target danger signal in the brain. *Front Neurosci*, 9, 148.
- Rorke, L. B. und Pitts, F. W. (1963). Purulent Meningitis: The Pathologic Basis of Clinical Manifestations. *Clinical pediatrics*, 2(2), 64-71.
- Roy, S., Knox, K., Segal, S., Griffiths, D., Moore, C. E., Welsh, K. I., Smarason, A., Day, N. P., McPheat, W. L. und Crook, D. W. (2002). MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study. *The Lancet*, 359(9317), 1569-1573.
- Rubin, L. und Staddon, J. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annual review of neuroscience*, 22(1), 11-28.

- Rupprecht, T. A., Angele, B., Klein, M., Heesemann, J., Pfister, H.-W., Botto, M. und Koedel, U. (2007). Complement C1q and C3 are critical for the innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the central nervous system. *The Journal of Immunology*, 178(3), 1861-1869.
- Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M. und Tessier, P. A. (2003). Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *The Journal of Immunology*, 170(6), 3233-3242.
- Safarzadeh, E., Jadidi-Niaragh, F., Motalebnezhad, M. und Yousefi, M. (2016). The role of adenosine and adenosine receptors in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Inflammation Research*, 65(7), 511-520.
- Saleh, T. S. F., Calixto, J. B. und Medeiros, Y. S. (1996). Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *British journal of pharmacology*, 118(3), 811-819.
- Sanderson, L., Khan, A. und Thomas, S. (2007). Distribution of suramin, an antitrypanosomal drug, across the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid interfaces in wild-type and P-glycoprotein transporter-deficient mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(9), 3136-3146.
- Santana, P. T., Benjamim, C. F., Martinez, C. G., Kurtenbach, E., Takiya, C. M. und Coutinho-Silva, R. (2015). The P2X7 Receptor Contributes to the Development of the Exacerbated Inflammatory Response Associated with Sepsis. *J Innate Immun*, 7(4), 417-427.
- Saukkonen, K., Sande, S., Cioffe, C., Wolpe, S., Sherry, B., Cerami, A. und Tuomanen, E. (1990). The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *The Journal of Experimental Medicine*, 171(2), 439-448.
- Scheld, W. M., Dacey, R. G., Winn, H. R., Welsh, J. E., Jane, J. und Sande, M. (1980). Cerebrospinal fluid outflow resistance in rabbits with experimental meningitis. Alterations with penicillin and methylprednisolone. *Journal of Clinical Investigation*, 66(2), 243.
- Schingnitz, U., Hartmann, K., MacManus, C. F., Eckle, T., Zug, S., Colgan, S. P. und Eltzschig, H. K. (2010). Signaling through the A2B adenosine receptor dampens endotoxin-induced acute lung injury. *The Journal of Immunology*, ji_0903035.
- Schmidt, H., Heimann, B., Djukic, M., Mazurek, C., Fels, C., Wallesch, C.-W. und Nau, R. (2005). Neuropsychological sequelae of bacterial and viral meningitis. *Brain*, 129(2), 333-345.
- Schroder, K. und Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, 140(6), 821-832.
- Schroder, N., Morath, S., Alexander, C., Hamann, L., Hartung, T., Zahringer, U., Gobel, U., Weber, J. und Schumann, R. (2003). Lipoteichoic acid (LTA) of *S. pneumoniae* and *S. aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide (LPS) binding protein (LBP) and CD14 while TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem*, 278(18), 15587-15594.
- Schuchat, A., Robinson, K., Wenger, J. D., Harrison, L. H., Farley, M., Reingold, A. L., Lefkowitz, L. und Perkins, B. A. (1997). Bacterial meningitis in the United States in 1995. *New England Journal of Medicine*, 337(14), 970-976.

- Shah, D., Romero, F., Stafstrom, W., Duong, M. und Summer, R. (2014). Extracellular ATP mediates the late phase of neutrophil recruitment to the lung in murine models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 306(2), L152-161.
- Shelburne, S. A., Davenport, M. T., Keith, D. B. und Musser, J. M. (2008). The role of complex carbohydrate catabolism in the pathogenesis of invasive streptococci. *Trends in microbiology*, 16(7), 318-325.
- Shockman, G., Daneo-Moore, L., Kariyama, R. und Massidda, O. (1996). Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. *Microbial Drug Resistance*, 2(1), 95-98.
- Simberkoff, M. S., Moldover, N. H. und Rahal, J. J. (1980). Absence of detectable bactericidal and opsonic activities in normal and infected human cerebrospinal fluids. *Translational Research*, 95(3), 362-372.
- Sisó, S., Jeffrey, M. und González, L. (2010). Sensory circumventricular organs in health and disease. *Acta neuropathologica*, 120(6), 689-705.
- Small, P., Täuber, M. G., Hackbarth, C. und Sande, M. (1986). Influence of body temperature on bacterial growth rates in experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Infection and immunity*, 52(2), 484-487.
- Smith, A. L. (1988). Neurologic sequelae of meningitis: Mass Medical Soc.
- Smith, H., Bannister, B. und O'Shea, M. (1973). Cerebrospinal-fluid immunoglobulins in meningitis. *The Lancet*, 302(7829), 591-593.
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., Griffiths, R. J. und Gabel, C. A. (2001). Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem*, 276(1), 125-132.
- St. Hilaire, C., Carroll, S. H., Chen, H. und Ravid, K. (2009). Mechanisms of induction of adenosine receptor genes and its functional significance. *Journal of cellular physiology*, 218(1), 35-44.
- Stahel, P. F., Nadal, D., Pfister, H.-W., Paradisis, P. M. und Barnum, S. R. (1997). Complement C3 and factor B cerebrospinal fluid concentrations in bacterial and aseptic meningitis. *The Lancet*, 349(9069), 1886-1887.
- Standish, A. J. und Weiser, J. N. (2009). Human neutrophils kill *Streptococcus pneumoniae* via serine proteases. *The Journal of Immunology*, 183(4), 2602-2609.
- Stucki, A., Cottagnoud, M., Winkelmann, V., Schaffner, T. und Cottagnoud, P. (2007). Daptomycin produces an enhanced bactericidal activity compared to ceftriaxone, measured by [³H] choline release in the cerebrospinal fluid, in experimental meningitis due to a penicillin-resistant pneumococcal strain without lysing its cell wall. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(6), 2249-2252.
- Sullivan, G. W., Fang, G., Linden, J. und Scheld, W. M. (2004). A2A adenosine receptor activation improves survival in mouse models of endotoxemia and sepsis. *Journal of Infectious Diseases*, 189(10), 1897-1904.
- Tak, P. P. und Firestein, G. S. (2001). NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 107(1), 7.

- Täuber, M. G. und Moser, B. (1999). Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications. *Clinical infectious diseases*, 1-11.
- Thigpen, M. C., Whitney, C. G., Messonnier, N. E., Zell, E. R., Lynfield, R., Hadler, J. L., Harrison, L. H., Farley, M. M., Reingold, A. und Bennett, N. M. (2011). Bacterial meningitis in the United States, 1998–2007. *New England Journal of Medicine*, 364(21), 2016-2025.
- Thomas-Rudolph, D., Du Clos, T. W., Snapper, C. M. und Mold, C. (2007). C-reactive protein enhances immunity to *Streptococcus pneumoniae* by targeting uptake to FcγR on dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 178(11), 7283-7291.
- Thompson, L. F., Eltzschig, H. K., Ibla, J. C., Van De Wiele, C. J., Resta, R., Morote-Garcia, J. C. und Colgan, S. P. (2004). Crucial role for ecto-5' -nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *Journal of Experimental Medicine*, 200(11), 1395-1405.
- Tomasz, A., Moreillon, P. und Pozzi, G. (1988). Insertional inactivation of the major autolysin gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 170(12), 5931-5934.
- Toomey, J. und Roach, F. (1939). Pneumococcus meningitis. *Ohio State MJ*, 35(Aug.), 841-847.
- Tremel, N. (2014). Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms bei der Pneumokokkenmeningitis (Doctoral dissertation, lmu).
- Trincavelli, M., Daniele, S. und Martini, C. (2010). Adenosine receptors: what we know and what we are learning. *Current topics in medicinal chemistry*, 10(9), 860-877.
- Tripoli, C. J. (1936). Bacterial meningitis: a comparative study of various therapeutic measures. *Journal of the American Medical Association*, 106(3), 171-177.
- Tschopp, J. und Schroder, K. (2010). NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nature reviews. Immunology*, 10(3), 210.
- Tsuchiya, K., Toyama, K., Tsuprun, V., Hamajima, Y., Kim, Y., Ondrey, F. G. und Lin, J. (2007). Pneumococcal Peptidoglycan - Polysaccharides Induce the Expression of Interleukin - 8 in Airway Epithelial Cells by way of Nuclear Factor - κ B, Nuclear Factor Interleukin - 6, or Activation Protein - 1 Dependent Mechanisms. *The Laryngoscope*, 117(1), 86-91.
- Tuomanen, E., Liu, H., Hengstler, B., Zak, O. und Tomasz, A. (1985). The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *Journal of Infectious Diseases*, 151(5), 859-868.
- Tyler, K. L. (2008). Bacterial meningitis An urgent need for further progress to reduce mortality and morbidity. *Neurology*, 70(22 Part 2), 2095-2096.
- Van de Beek, D. (2009). Corticosteroids for acute adult bacterial meningitis. *Medecine et maladies infectieuses*, 39(7), 531-538.
- Van de Beek, D., Brouwer, M., Hasbun, R., Koedel, U., Whitney, C. G. und Wijdicks, E. (2016). Community-acquired bacterial meningitis. 2(3), 16074.
- Van de Beek, D., de Gans, J., Spanjaard, L., Weisfelt, M., Reitsma, J. B. und Vermeulen, M. (2004). Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *New England Journal of Medicine*, 351(18), 1849-1859.

- Van de Beek, D., Drake, J. M. und Tunkel, A. R. (2010). Nosocomial bacterial meningitis. *New England Journal of Medicine*, 362(2), 146-154.
- Van De Sande-Bruinsma, N., Grundmann, H., Verloo, D., Tiemersma, E., Monen, J., Goossens, H., Ferech, M. und System, E. A. R. S. (2008). Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerging infectious diseases*, 14(11), 1722.
- Van der Linden, M., Falkenhorst, G., Perniciaro, S. und Imöhl, M. (2015). Effects of Infant Pneumococcal Conjugate Vaccination on Serotype Distribution in Invasive Pneumococcal Disease among Children and Adults in Germany. *PLoS One*, 10(7), e0131494.
- Viallon, A., Guyomarc'h, P., Guyomarc'h, S., Tardy, B., Robert, F., Marjollet, O., Caricajo, A., Lambert, C., Zeni, F. und Bertrand, J. C. (2005). Decrease in serum procalcitonin levels over time during treatment of acute bacterial meningitis. *Crit Care*, 9(4), R344-350.
- Vitiello, L., Gorini, S., Rosano, G. und la Sala, A. (2012). Immunoregulation through extracellular nucleotides. *Blood*, 120(3), 511-518.
- Voganatsi, A., Panyutich, A., Miyasaki, K. T. und Murthy, R. K. (2001). Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. *Journal of leukocyte biology*, 70(1), 130-134.
- Volonté, C., Apolloni, S., Parisi, C. und Amadio, S. (2016). Purinergic contribution to amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology*, 104, 180-193.
- Von Bernuth, H., Picard, C., Jin, Z., Pankla, R., Xiao, H., Ku, C.-L., Chrabieh, M., Mustapha, I. B., Ghandil, P. und Camcioglu, Y. (2008). Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science*, 321(5889), 691-696.
- von Papen, M., Gambaryan, S., Schütz, C. und Geiger, J. (2013). Determination of ATP and ADP Secretion from Human and Mouse Platelets by an HPLC Assay. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 40(2), 109-116.
- Waage, A., Halstensen, A., Shalaby, R., Brandtzaeg, P., Kierulf, P. und Espevik, T. (1989). Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *Journal of Experimental Medicine*, 170(6), 1859-1867.
- Wache, C. (2015). Rolle von S100A8/A9 in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis (Doctoral dissertation, Imu).
- Wache, C., Klein, M., Ostergaard, C., Angele, B., Häcker, H., Pfister, H.-W., Pruenster, M., Sperandio, M., Leanderson, T. und Roth, J. (2015). Myeloid-related protein 14 promotes inflammation and injury in meningitis. *The Journal of infectious diseases*, 212(2), 247-257.
- Wagner, J. G. und Roth, R. A. (2000). Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacological reviews*, 52(3), 349-374.
- Wahlsten, D., Bachmanov, A., Finn, D. A. und Crabbe, J. C. (2006). Stability of inbred mouse strain differences in behavior and brain size between laboratories and across decades. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), 16364-16369.
- Wang, H., Hong, L. J., Huang, J. Y., Jiang, Q., Tao, R. R., Tan, C., Lu, N. N., Wang, C. K., Ahmed, M. M., Lu, Y. M., Liu, Z. R., Shi, W. X., Lai, E. Y., Wilcox, C. S. und Han, F. (2015). P2RX7 sensitizes Mac-1/ICAM-1-dependent leukocyte-endothelial adhesion and promotes neurovascular injury during septic encephalopathy. *Cell Res*, 25(6), 674-690.

- Wang, X., Arcuino, G., Takano, T., Lin, J., Peng, W. G., Wan, P., Li, P., Xu, Q., Liu, Q. S., Goldman, S. A. und Nedergaard, M. (2004). P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med*, 10(8), 821-827.
- Weber, F. C., Esser, P. R., Muller, T., Ganesan, J., Pellegatti, P., Simon, M. M., Zeiser, R., Idzko, M., Jakob, T. und Martin, S. F. (2010). Lack of the purinergic receptor P2X(7) results in resistance to contact hypersensitivity. *J Exp Med*, 207(12), 2609-2619.
- Weber, J. R. und Tuomanen, E. I. (2007). Cellular damage in bacterial meningitis: an interplay of bacterial and host driven toxicity. *J Neuroimmunol*, 184(1-2), 45-52.
- Weisfelt, M., van de Beek, D., Spanjaard, L., Reitsma, J. B. und de Gans, J. (2006). Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series. *The Lancet Neurology*, 5(2), 123-129.
- Westfall, T. D., Kennedy, C. und Sneddon, P. (1997). The ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 enhances parasympathetic neurotransmission in the guinea-pig urinary bladder. *European journal of pharmacology*, 329(2), 169-173.
- Wieraszko, A., Goldsmith, G. und Seyfried, T. (1989). Stimulation-dependent release of adenosine triphosphate from hippocampal slices. *Brain Research*, 485(2), 244-250.
- Wilhelm, K., Ganesan, J., Muller, T., Durr, C., Grimm, M., Beilhack, A., Krempl, C. D., Sorichter, S., Gerlach, U. V., Juttner, E., Zerweck, A., Gartner, F., Pellegatti, P., Di Virgilio, F., Ferrari, D., Kambham, N., Fisch, P., Finke, J., Idzko, M. und Zeiser, R. (2010). Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med*, 16(12), 1434-1438.
- Willart, M. A. und Lambrecht, B. N. (2009). The danger within: endogenous danger signals, atopy and asthma. *Clin Exp Allergy*, 39(1), 12-19.
- Williams, M., Francis, J., Ghai, G., Braunwalder, A., Psychoyos, S., Stone, G. A. und Cash, W. D. (1987). Biochemical characterization of the triazoloquinazoline, CGS 15943, a novel, non-xanthine adenosine antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 241(2), 415-420.
- Winter, S. E., Thiennimitr, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., Russell, J. M., Bevins, C. L., Adams, L. G. und Tsois, R. M. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for Salmonella. *Nature*, 467(7314), 426.
- Witzenrath, M., Pache, F., Lorenz, D., Koppe, U., Gutbier, B., Tabeling, C., Reppe, K., Meixenberger, K., Dorhoi, A. und Ma, J. (2011). The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *The Journal of Immunology*, 187(1), 434-440.
- Wizemann, T. M., Heinrichs, J. H., Adamou, J. E., Erwin, A. L., Kunsch, C., Choi, G. H., Barash, S. C., Rosen, C. A., Masure, H. R. und Tuomanen, E. (2001). Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against Streptococcus pneumoniae infection. *Infection and immunity*, 69(3), 1593-1598.
- Woehrl, B., Brouwer, M. C., Murr, C., Heckenberg, S. G., Baas, F., Pfister, H. W., Zwinderman, A. H., Morgan, B. P., Barnum, S. R., van der Ende, A., Koedel, U. und van de Beek, D. (2011). Complement component 5 contributes to poor disease outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis. *J Clin Invest*, 121(10), 3943-3953.

Wong, A. D., Ye, M., Levy, A. F., Rothstein, J. D., Bergles, D. E. und Searson, P. C. (2013). The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Frontiers in neuroengineering*, 6, .

World Health Organization. (2016). , Geneva, Switzerland. Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015., www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html (abgerufen am 01.07.2017).

Xiang, Y., Wang, X., Yan, C., Gao, Q., Li, S. A., Liu, J., Zhou, K., Guo, X., Lee, W. und Zhang, Y. (2013). Adenosine-5'-triphosphate (ATP) protects mice against bacterial infection by activation of the NLRP3 inflammasome. *PLoS One*, 8(5), e63759.

Yegutkin, G. G. (2008). Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica ACTA (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(5), 673-694.

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

Yu, Q., Guo, Z., Liu, X., Ouyang, Q., He, C., Burnstock, G., Yuan, H. und Xiang, Z. (2013). Block of P2X7 receptors could partly reverse the delayed neuronal death in area CA1 of the hippocampus after transient global cerebral ischemia. *Purinergic Signal*, 9(4), 663-675.

Yu, Y., Ishida, Y., Ugawa, S., Ueda, T., Oka, Y., Yamada, K. und Shimada, S. (2009). Upregulation of the P2X7 receptor after cryogenic injury to rat brain. *Neuroreport*, 20(4), 393-397.

Zhang, Z., Wang, Z., Ren, H., Yue, M., Huang, K., Gu, H., Liu, M., Du, B. und Qian, M. (2011). P2Y(6) agonist uridine 5'-diphosphate promotes host defense against bacterial infection via monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocytes/macrophages recruitment. *J Immunol*, 186(9), 5376-5387.

Zimmerman, M. A., Grenz, A., Tak, E., Kaplan, M., Ridyard, D., Brodsky, K. S., Mandell, M. S., Kam, I. und Eltzschig, H. K. (2013). Signaling through hepatocellular A2B adenosine receptors dampens ischemia and reperfusion injury of the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), 12012-12017.

Zwijnenburg, P. J., van der Poll, T., Roord, J. J. und van Furth, A. M. (2006). Chemotactic factors in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis. *Infect Immun*, 74(3), 1445-1451.

Zwijnenburg, P. J. G., van der Poll, T., Florquin, S., Roord, J. J. und van Furth, A. M. (2003). IL-1 Receptor Type 1 Gene-Deficient Mice Demonstrate an Impaired Host Defense Against Pneumococcal Meningitis. *The Journal of Immunology*, 170(9), 4724-4730.

Anmerkung:

Teile dieser Arbeit beruhen auf Vorarbeiten von Mitgliedern der Arbeitsgruppe wie Prof. Dr. Uwe Ködel und Prof. Dr. Hans-Walter Pfister im Rahmen des dazugehörigen Tierversuchsantrags und des Antrags auf Bewährung einer Sachbeihilfe.

10 Veröffentlichungen

Inhalte dieser Arbeit wurden bereits in der folgenden Originalarbeit aus Gründen der Aktualität veröffentlicht:

Zierhut, M. Dyckhoff, S. , Masouris, I., Klein, M., Hammerschmidt, S., Pfister, H.-W., Ayata, K., Idzko, M. und Koedel, U. *Role of purinergic signaling in experimental pneumococcal meningitis*. Scientific Reports 2017; 7: 44625.

11 Danksagung

Besonders herzlichen Dank möchte ich hiermit an meinen Doktorvater und Betreuer Herrn apl. Prof. Dr. med. Uwe Ködel richten, durch welchen ich stets große Unterstützung und eine ausgesprochen gute Betreuung erfahren durfte. Ich möchte ihm auch dafür danken, dass er es mir ermöglichte, in der Arbeitsgruppe tätig zu sein und für seine Einarbeitung in die Methodik der tierexperimentellen Versuche. Er stand mir jederzeit geduldig mit Rat und Tat zur Seite und hatte für sämtliche Fragen meinerseits stets ein offenes Ohr.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Hans-Walter Pfister für die Aufnahme in seine neuroinfektiologische Arbeitsgruppe und die Möglichkeit in seinem Labor tätig sein zu dürfen. Ich konnte dadurch sehr viel lernen und einen wichtigen Grundstein für meine berufliche Laufbahn legen.

Mein Dank geht auch an Frau Barbara Angele, die mich bei der Einarbeitung und Durchführung der *in-vitro*-Experimente sowie mit hilfreichen Ratschlägen unterstützte. Zudem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der neuroinfektiologischen Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme und Hilfe jeglicher Art bedanken.

Mein Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt aus der Abteilung Genetik der Mikroorganismen der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald, der freundlicherweise sämtliche Bakterien für die Versuche zur Verfügung stellte sowie Prof. Dr. med. Marco Idzko an der Klinik für Pneumologie der Universitätsklinik Freiburg, der dankenswerterweise die P2-Rezeptor-Expression mit Hilfe einer Real Time RT-PCR analysierte.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern, meiner Familie und Freunden für ihre Unterstützung bedanken. Insbesondere meinen Eltern bin ich zu großem Dank verpflichtet, da sie mir das Studium der Humanmedizin erst ermöglicht haben und ich ohne ihre Unterstützung nicht an diesem Punkt angekommen wäre.