

CORE FACILITY FÜR ZELLSORTIERUNG UND ZELLANALYSE | AG KLINISCHE IMMUNOLOGIE

CHRONISCH ENTZÜNDLICHE UND  
VIRALE VORERKRANKUNGEN SIND RISIKOFAKTOREN DER  
STREPTOKOKKEN-INDUZIERTEN SEPTISCHEN ARTHRITIS

KOMPLEMENTÄRE *IN VIVO* UND *IN VITRO* STUDIEN

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZINWISSENSCHAFTEN

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

BETREUUNG: PROF. DR. RER. NAT. BRIGITTE MÜLLER-HILKE, MME

EINRICHTUNG: CORE FACILITY FÜR ZELLSORTIERUNG UND ZELLANALYSE

VORGELEGT VON

JOHANN VOLZKE | GEB. AM 14.12.1989 IN GREIFSWALD

AUS ROSTOCK

ROSTOCK | 14.09.2021

[https://doi.org/10.18453/rosdok\\_id00003162](https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003162)



Dieses Werk ist lizenziert unter einer  
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine  
Bearbeitungen 4.0 International Lizenz.



UNIVERSITÄT GREIFSWALD  
Wissen lockt. Seit 1456



Europäische Fonds EFRE, ESF und ELER  
in Mecklenburg-Vorpommern 2014-2020



EUROPÄISCHE UNION  
Europäischer Sozialfonds



**Teile der Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:**

**Volzke J**, Schultz D, Kordt M, Müller M, Bergmann W, Methling K, Kreikemeyer B, **Müller-Hilke B**; Kolnfekt Study Group. Inflammatory Joint Disease Is a Risk Factor for Streptococcal Sepsis and Septic Arthritis in Mice. *Front Immunol.* 2020 Oct 7;11:579475. doi: 10.3389/fimmu.2020.579475. PMID: 33117382; PMCID: PMC7576673.

**Gutachter:innen:**

Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke, Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse, Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Kreikemeyer, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. rer. nat. Michael Lalk, Institut für Biochemie, Universität Greifswald

**Jahr der Einreichung:** 2020

**Jahr der Verteidigung:** 2021

Für Elsi.

## I. ZUSAMMENFASSUNG

---

Die septische Arthritis (SA) ist eine infektiöse Erkrankung der Gelenke, die mit einer hohen Mortalität assoziiert ist und innerhalb weniger Tage zu irreversiblen Schäden des Bewegungsapparats und somit zur Invalidität der betroffenen Patienten führt. Obwohl die SA weltweit zu gesundheitlichen Problemen führt, gibt es nur wenige experimentelle Modelle, welche die Ätiopathogenese dieses rheumatologischen Notfalls erkunden. So ist bislang ungeklärt, inwieweit die Synovia und infektionsbedingte, degenerative oder autoimmune Vorschädigungen zum Auslösen der SA beitragen. Zur Etablierung der SA *in vivo* wurden Mäuse mit Gruppe A Streptokokkus (GAS) – einem wichtigen Auslöser der Erkrankung – intravenös infiziert. Die Krankheitsaktivitäten der Sepsis und der SA wurden daraufhin für 14 Tage klinisch beurteilt. Die invasive Infektion mit GAS führte zu schweren Krankheitsverläufen mit hoher Mortalität und induzierte fulminante Schwellungen der Gelenke. GAS kolonisierte das periartikuläre Mikromilieu, was mit einer massiven Infiltration durch Immunzellen und Inflammation einherging. Die *in vitro* Infektion von synovialen Fibroblasten induzierte die Überexpression von inflammatorischen Zytokinen (*Tnf, Il6*), Chemokinen (*Ccl2, Cxcl2*) und Integrin-Liganden (ICAM-1, VCAM-1). Die chronischen Vorerkrankungen der Gelenke wurden mit Hilfe von primärer oder sekundärer Arthrose und Kollagen-induzierter Arthritis (*collagen-induced arthritis, CIA*) modelliert. Durch intranasale Infektion mit Influenza A Virus (IAV) vor beziehungsweise nach GAS-Applikation wurde die SA im Kontext von bakto-viralen Ko-Infektionen analysiert. Die Arthrose hatte im Tiermodell weder einen Einfluss auf die Schwere der SA noch wurde eine Verschlimmerung von degenerativen Knochenerosionen festgestellt. Im Gegensatz dazu bedingten sowohl eine IAV-Infektion als auch eine chronisch entzündliche Gelenkerkrankung eine signifikante Exazerbation der GAS-induzierten Sepsis und SA. Insbesondere die CIA begünstigte hierbei die unopponierte Dissemination von GAS und damit eine verschlimmerte Bakteriämie, was ultimativ in der exzessiven Überproduktion von inflammatorischen Zytokinen und Eicosanoiden resultierte. Darüber hinaus förderte die CIA die beschleunigte Destruktion von Knochen, deren Ausmaß mit dem Umfang der Gelenkentzündung korrelierte. Synoviale Fibroblasten aus CIA-Mäusen waren mit Immunzellen infiltriert und GAS induzierte in diesen Zellen den Verlust von ICAM-1<sup>+</sup> VCAM-1<sup>+</sup> Subpopulationen. Die Exazerbation der SA durch eine vorhergehende IAV-Infektion legt die Empfehlung nahe, Risikopatienten mit Hilfe der saisonalen Gripeschutzimpfung vor lebensbedrohlichen Krankheitsverläufen zu schützen. Die hier dargelegten Ergebnisse indizieren außerdem, dass Autoimmunität ein kritischer Risikofaktor der SA ist und dass insbesondere Patienten, die an rheumatoider Arthritis (RA) leiden, einer hohen Gefahr ausgesetzt sind, besonders schwere Verläufe der lebensbedrohlichen Erkrankung zu entwickeln.

---

## II. ABSTRACT

---

Septic Arthritis (SA) is an infectious disorder of the joint associated with high mortality and morbidity. This aggressive disease leads to irreversible damage of the locomotor system within a few days of its progression causing disability in a considerable amount of patients. Despite SA being a global health burden, experimental models addressing the etiopathogenesis of this rheumatological emergency remain scarce. In particular, it is not defined to what extent the synovial membrane contributes to the onset of inflammation. Furthermore, the interdependencies between SA and prior viral infections or preceding degenerative and autoimmune joint damage are not sufficiently investigated. In order to establish SA *in vivo*, mice were intravenously infected with Group A Streptococcus (GAS), which is an important causative agent of the disease. Subsequently, infected mice were monitored for the disease activities of sepsis and SA for 14 days. Invasive GAS infection led to fatal disease and comprehensively induced the swelling of joints. GAS invaded the periarticular microenvironment leading to massive infiltration of immune cells which consequently caused inflammation. Upon *in vitro* GAS infection, Fibroblast-like synoviocytes (FLS) upregulated the expression of inflammatory cytokines (*Tnf*, *Il6*), chemokines (*Ccl2*, *Cxcl2*) and integrin ligands (ICAM-1, VCAM-1). Chronic joint diseases were elicited using murine models for primary or secondary osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA), respectively, prior to GAS infection. In order to analyze SA in the context of bacto-viral co-infections, mice were intranasally infected with Influenza A virus (IAV) before and after GAS application, respectively. Interestingly, preceding OA did not influence on SA severity. In contrast, both IAV infection and inflammatory joint disease significantly promoted GAS-induced Sepsis and SA. In detail, collagen-induced arthritis (CIA) – a murine model for RA – facilitated the unopposed dissemination of GAS leading to exacerbated bacteremia which ultimately caused the excessive release of inflammatory cytokines and eicosanoids. Moreover, CIA expedited bone tissue deterioration whose severity was controlled by the extent of joint inflammation. FLS isolated from CIA mice were infiltrated by immune cells and GAS induced the loss of ICAM-1<sup>+</sup> VCAM-1<sup>+</sup> subpopulations. Conclusively, the exacerbation of SA due to prior IAV infection suggests the advice for seasonal influenza vaccination in order to circumvent exacerbated SA in high-risk patients. Finally, the results also suggest that autoimmunity is a critical risk factor for SA and especially patients suffering from RA are in jeopardy to develop severely progressing and life threatening disease.

---

## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>I. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>I</b>
<b>II. ABSTRACT</b>	<b>II</b>
<b>III. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
3.1 Gruppe A Streptokokkus führt weltweit zu invasiven Infektionen	1
3.2 Die septische Arthritis ist mit einer hohen Mortalität und Morbidität assoziiert	3
3.3 Risikofaktoren der septischen Arthritis	5
3.3.1 Epidemiologische Studien über die septische Arthritis unterliegen Limitationen	5
3.3.2 Chronische Gelenkerkrankungen prädisponieren für die septische Arthritis	5
3.4 Virusinfektionen sind ein möglicher Risikofaktor der septischen Arthritis	6
3.5 Die septische Arthritis im Kontext von chronischen Vorerkrankungen der Gelenke und bakto-viralen Ko-Infektionen	8
<b>IV. MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>9</b>
4.1 Kleintier-Krankheitsmodelle	9
4.1.1 Versuchstiere	9
4.1.2 Gruppe A Streptokokkus-Infektion	9
4.1.3 Primäre und sekundäre Arthrose	11
4.1.4 Kollagen-induzierte Arthritis	12
4.1.5 Ko-Infektion mit Gruppe A Streptokokkus und Influenza A Virus	13
4.1.6 Klinische Beurteilung der Krankheitsaktivität	14
4.2 Mikro-computertomographische Knochenmorphometrie	16
4.3 Histologie und Immunhistochemie	17
4.4 Lipidomics	19
4.4.1 Eicosanoid-Extraktion	19
4.4.2 Tandem-Massenspektrometrie	20
4.5 Serologie	21
4.6 <i>In vitro</i> -Krankheitsmodelle	22
4.6.1 Primärkultur und Infektion synovialer Fibroblasten	22
4.6.2 Durchflusszytometrische Einzelzell-Analyse	23
4.6.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	25
4.6.4 Quantifizierung sekretierter Zytokine	26
4.7 Statistik	27

---

## **V. ERGEBNISSE** **28**

---

5.1 Die Septische Arthritis war mit der Infektion von Gelenken und mit der Infiltration von periartikulärem Gewebe mit neutrophilen Granulozyten assoziiert	28
5.2 GAS verursachte die erhöhte Produktion von Eicosanoiden in den Pfoten	30
5.3 Synoviale Fibroblasten induzierten nach GAS-Infektion die Überexpression von Mediatoren für die Rekrutierung und die Retention von Immunzellen	32
5.4 Eine sekundäre Arthrose hatte keinen Einfluss auf die Inzidenz der SA	33
5.5 GAS induzierte bei Tieren mit einer primären Arthrose eine lebensbedrohliche SA ohne die Knochenstruktur zu beeinflussen	37
5.6 Eine chronisch entzündliche Vorerkrankung begünstigte das Auftreten der septischen Arthritis und verschlimmerte deren Verlauf	39
5.7 Die Schwere der septischen Arthritis bestimmte den Umfang von Knochendestruktionen in Mäusen mit einer chronisch entzündlichen Vorerkrankung	43
5.8 Die CIA war durch infiltrierende Leukozyten gekennzeichnet und begünstigte eine verstärkte Immunparalyse von FLS nach <i>in vitro</i> GAS-Infektion	47
5.9 Eine vorhergehende Infektion mit Influenza A Virus begünstigte das Auftreten der GAS-induzierten septischen Arthritis	51

## **VI. DISKUSSION** **55**

---

6.1 Neutrophile sind an der Pathogenese der septischen Arthritis beteiligt	55
6.2 Synoviale Fibroblasten tragen zur Pathogenese der septischen Arthritis bei	56
6.3 Synoviale Fibroblasten und infiltrierende Immunzellen orchestrieren die Pathogenese der septischen Arthritis	58
6.4 Osteoklasten und biomechanische Abnutzung als mögliche Ursachen von Knochenerosionen bei einer septischen Arthritis	59
6.5 Die SA induziert die Synthese anti-inflammatorischer Eicosanoide	61
6.6 Die Arbeitshypothese als Grundlage für nachfolgende Studien	62
6.7 Alter und Gelenkersatz als Risikofaktoren für die SA bei Patienten mit Arthrose	64
6.8 Influenza A Virus beeinflusst die Immunabwehr gegen eine Bakteriämie	65
6.9 Limitationen	66
6.10 Schlussfolgerungen	67

## **VII. LITERATURVERZEICHNIS** **X**

---

## **VIII. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG** **XXXVI**

---



<b><u>IX. WISSENSCHAFTLICHER LEBENS LAUF</u></b>	<b><u>XXXVII</u></b>
<b><u>X. FÖRDERUNG</u></b>	<b><u>XXXVIII</u></b>
<b><u>XI. DANKSAGUNG</u></b>	<b><u>XXXVIII</u></b>
<b><u>XII. ANHANG</u></b>	<b><u>XXXIX</u></b>

## **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

---

Abbildung 1: Virulenzfaktoren erlauben es GAS, sich ungehindert im Wirt zu verbreiten. _____	1
Abbildung 2: Welche Faktoren prädisponieren für die septische Arthritis? _____	7
Abbildung 3: Mikro-operative Durchschneidung des <i>Ligamentum cruciatum anterius</i> . _____	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung für das Scoring der Arthritis-Aktivität. _____	16
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Selektion der Analysen-Bereiche am Femur. _____	18
Abbildung 6: Expression von CD45 und CD31 durch Zellen aus synovialen Isolaten _____	24
Abbildung 7: Strategie für das hierarchische Gating von synovialen Fibroblasten. _____	25
Abbildung 8: Eine Infektion mit Gruppe A Streptokokken (GAS) führte bei Mäusen zu einer aggressiv voranschreitenden, septischen Arthritis (SA). _____	29
Abbildung 9: GAS induzierte die Überproduktion von Eicosanoiden in den Pfoten von infizierten Mäusen. _____	31
Abbildung 10: Synoviale Fibroblasten (FLS) induzierten nach GAS-Infektion die Überexpression von Chemokinen, pro-inflammatorischen Zytokinen und Integrin-Liganden. _____	32
Abbildung 11: Die GAS-Infektion löste in FLS die zeitabhängige Überproduktion sowie Sekretion von Chemokinen und Zytokinen aus. _____	34
Abbildung 12: Eine chirurgisch induzierte Arthrose (OA) hatte keinen Einfluss auf die GAS-induzierte Sepsis und septische Arthritis. _____	35
Abbildung 13: Die Arthrose und die GAS-Infektion induzierten die Erosion von Knorpel sowie den Abbau von extrazellulärer Matrix. _____	36
Abbildung 14: GAS führte in Tieren mit genetisch bedingter Arthrose zu keinem Knochenverlust. _____	38
Abbildung 15: Die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) ist eine monophasische Erkrankung. _____	39
Abbildung 16: Eine vorangehende CIA verschlimmerte die GAS-induzierte Sepsis und septische Arthritis. _____	40
Abbildung 17: Die Infektion von CIA Mäusen mit GAS induzierte die exzessive Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen. _____	42
Abbildung 18: Die CIA-induzierte Entartung der Knochenmorphologie wurde bei Kombination der chronisch entzündlichen Gelenkerkrankung mit einer GAS-Infektion signifikant. _____	44
Abbildung 19: Eine erhöhte Krankheitsaktivität der Arthritis in CIA und SA war mit einem osteoporotischen Phänotyp assoziiert. _____	46

---

Abbildung 20 Die Synovia von Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis war durch infiltrierende Immunzellen und durch eine verringerte Expression von Integrin-Liganden gekennzeichnet. __	49
Abbildung 21: Eine Infektion mit Influenza A Virus (IAV) verschlimmerte die GAS-induzierte Sepsis und septische Arthritis. _____	52
Abbildung 22: Eine Infektion mit IAV induzierte in Mäusen den Verlust von Körpergewicht und die Abnahme der Produktion von CCL2. _____	53
Abbildung 23: Die These als Modell: Die Kollagen-induzierte Arthritis begünstigt eine verschlimmerte Sepsis und septische Arthritis nach GAS-Infektion. _____	63

## ERGÄNZENDE ABBILDUNGEN

---

Abbildung A1: Etablierung des Kleintier-Modells für Sepsis und septische Arthritis. _____	XXXIX
Abbildung A2: Eine akute GAS-Infektion hatte keinen Einfluss auf die Knochenstruktur von C57BL/6J Mäusen. _____	XL
Abbildung A3: Qualitätskontrolle der Depletion von Leukozyten aus FLS Kulturen. _____	XLI
Abbildung A4: Die Expression von Zytokin-Genen wurde in FLS aus F1 Mäusen nach <i>in vitro</i> Infektion nicht beeinflusst. _____	XLII
Abbildung A5: GAS induzierte den Verlust der Expression von Integrin-Liganden durch FLS aus F1 Mäusen <i>in vitro</i> . _____	XLIII

## TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 1: Zeitlicher Ablauf der Ko-Infektionsversuche. _____	14
Tabelle 2: Muriner Sepsis Score zur Beurteilung der Krankheitsaktivität nach GAS-Infektion. _____	15
Tabelle 3: Auflistung der Parameter für die Rekonstruktion der Röntgen-Projektionen mit NRecon. _____	17
Tabelle 4: Auflistung der Ionenquellen-Parameter für die MRM-MS/MS-Analyse von Eicosanoiden. _____	21
Tabelle 5: Auflistung der Antikörper für die durchflusszytometrische Einzelzell-Analyse von FLS. _____	24
Tabelle 6: Temperatur-Sequenz für die RT-PCR. _____	26
Tabelle 7: Bakterielle Belastung in Kniegelenken, Blut, Leber und Milz nach GAS-Infektion. _____	41
Tabelle 8: Korrelationsanalyse der Plasmakonzentrationen von IL-6 mit Pfoten-Eicosanoiden. _____	43
Tabelle 9: Auflistung einer Auswahl von Morphometrie-Parametern der Knochen. _____	45
Tabelle 10: Korrelationsanalyse der Knochen-Parameter mit den Arthritis Scores. _____	47

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

<b>μCT</b>	Mikro-Computertomographie
<b>ACL</b>	Durchschneidung des vorderen Kreuzbands ( <i>anterior cruciate ligament transection</i> )
<b>AP1</b>	GAS M1 Stamm
<b>AU</b>	Arbiträre Einheiten ( <i>arbitrary units</i> )
<b>B6</b>	Mausstamm C57BL/6J
<b>BMD</b>	Knochenmineraldichte ( <i>bone mineral density</i> )
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>CCL2</b>	CC-Motiv Chemokin-Ligand 2
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>cDNA</b>	komplementäre DNA
<b>CIA</b>	Kollagen-induzierte Arthritis ( <i>collagen induced arthritis</i> )
<b>CXCL2</b>	CXC-Motiv Chemokin-Ligand 2
<b>CXCR2</b>	CXC-Motiv Chemokin-Rezeptor 2
<b>DMARD</b>	<i>Disease-modifying anti-rheumatic drug</i>
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>F1</b>	Mausstamm F1 Generation DBA/1J × B10.Q
<b>FLI</b>	Friedrich-Löffler-Institut
<b>FLS</b>	Synoviale Fibroblasten ( <i>fibroblast-like synoviocytes</i> )
<b>GAS</b>	Gruppe A Streptokokkus
<b>H&amp;E</b>	Hämatoxylin und Eosin-Färbung
<b>IAV</b>	Influenza A Virus
<b>ICAM-1</b>	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 ( <i>intercellular adhesion molecule 1</i> )
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IgG</b>	Immunglobulin G

<b>IL</b>	Interleukin
<b>KBE</b>	Kolonie-bildende Einheiten
<b>KID</b>	Kulturinfektiöse Dosis
<b>MDCK II</b>	Mardin-Darby Hunde-Nierenkanälchen-Zellen ( <i>Mardin-Darby Canine Kidney II cells</i> )
<b>MEM</b>	Minimal-essentielles Medium
<b>MMP</b>	Matrixmetalloprotease
<b>MS/MS</b>	Tandemmassenspektrometrie
<b>MSCRAMM</b>	<i>Components recognizing adhesive matrix molecules</i>
<b>MTX</b>	Methotrexat
<b>NET</b>	Neutrophile extrazelluläre Falle ( <i>neutrophil extracellular trap</i> )
<b>OA</b>	Arthrose ( <i>osteoarthritis</i> )
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>OPG</b>	Osteoprotegerin
<b>PAMP</b>	Pathogen-assoziierte molekulares Muster ( <i>pathogen-associated molecular pattern</i> )
<b>PBE</b>	Plaque-bildende Einheiten
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>qPCR</b>	Quantitative Polymerasekettenreaktion ( <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
<b>R</b>	Pearson Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient
<b>RA</b>	Rheumatoide Arthritis
<b>RANK</b>	<i>Receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B</i>
<b>RANKL</b>	<i>Receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B Ligand</i>
<b>SA</b>	septische Arthritis
<b>ssRNA</b>	Einzelsträngige RNA
<b>TBS</b>	TRIS-gepufferte Salzlösung ( <i>TRIS-buffered saline</i> )
<b>THB</b>	Tod-Hewitt-Bouillon
<b>TLR</b>	Toll-like-Rezeptor
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor

<b>TNFR</b>	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
<b>tSNE</b>	<i>t-distributed stochastic neighbor embedding</i>
<b>VCAM-1</b>	Vaskulärzellen Adhäsionsmolekül 1 ( <i>vascular cell adhesion molecule 1</i> )

## Mikro-Computertomographie-Parameter

---

<b>BV</b>	Knochenvolumen ( <i>bone volume</i> )
<b>BV/TV</b>	Relatives Knochenvolumen
<b>Ct.Ar</b>	Kortikalfäche ( <i>cortical area</i> )
<b>Ct.Ar/Tt.Ar</b>	Relative Kortikalfäche
<b>Ct.Th</b>	Kortikaldicke ( <i>cortical thickness</i> )
<b>MMI</b>	polares Flächenträgheitsmoment ( <i>polar moment of inertia</i> )
<b>SMI</b>	<i>Structure model index</i>
<b>Tb.N</b>	Trabekelzahl ( <i>trabecular number</i> )
<b>Tt.Ar</b>	Gewebefläche ( <i>total tissue area</i> )
<b>TV</b>	Gewebevolumen ( <i>tissue volume</i> )

## Eicosanoide

---

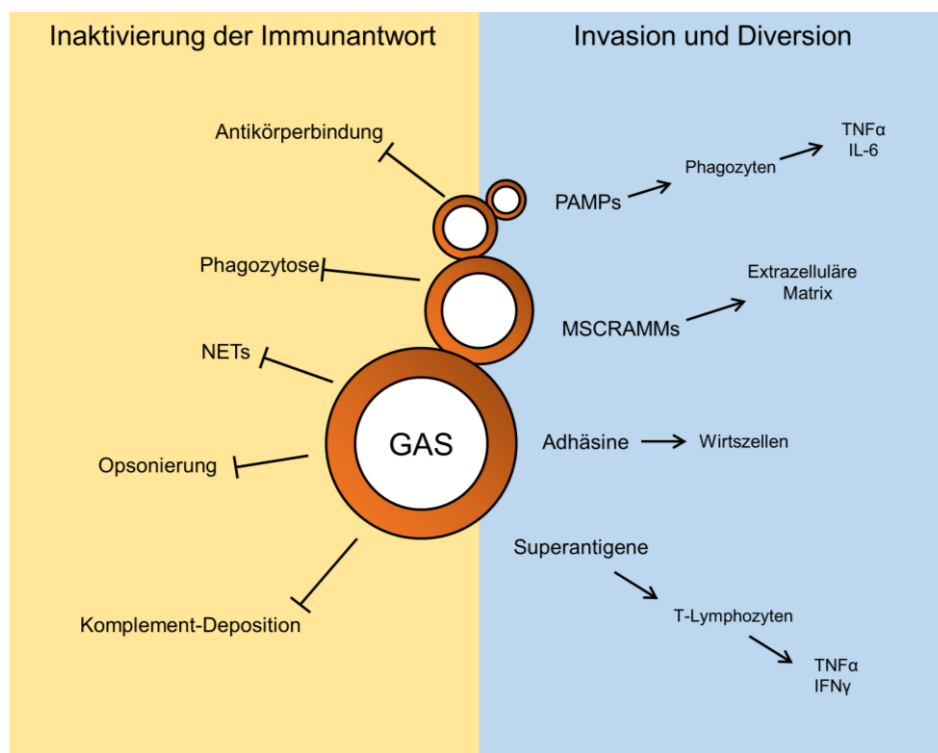
<b>AA</b>	Arachidonsäure ( <i>arachidonic acid</i> )
<b>EET</b>	Epoxyeicosatriensäure
<b>HDHA</b>	Hydroxydocosahexaensäure
<b>HEPE</b>	Hydroxyeicosapentaensäure
<b>HETE</b>	Hydroxyeicosatetraensäure
<b>HODE</b>	Hydroxyoctadecadiensäure
<b>HOTrE</b>	Hydroxyoctadecatriensäure
<b>PG</b>	Prostaglandin
<b>TXB</b>	Thromboxan B

---

### III. EINLEITUNG

#### 3.1 Gruppe A Streptokokkus führt weltweit zu invasiven Infektionen

*Streptococcus pyogenes* ist ein gram-positives Bakterium, welches auf Grund der serologischen Eigenschaften der mit der Zellwand verankerten Kohlenhydrat-Polymere weitläufig als Gruppe A Streptokokkus (GAS) bekannt ist (Lancefield, 1933). GAS ist ein strikt auf den menschlichen Wirt spezialisiertes Pathogen, welches in der Lage ist, die Nasopharynx und



**Abbildung 1: Virulenzfaktoren erlauben es Gruppe A Streptokokkus (GAS), sich ungehindert im Wirt zu verbreiten.** GAS ist durch die Ausnutzung unterschiedlichster Mechanismen in der Lage, der aktiven Beseitigung durch das Immunsystems zu entkommen. Mittels Ausbildung einer dichten Hyaluronsäure-Kapsel können einige Serotypen oder Stämme die Bindung von Antikörpern auf ihrer Oberfläche oder die Deponierung von Bestandteilen des Komplementsystems verhindern, um dadurch der Osponophagozytierung zu entgehen. Darüber hinaus werden über das M-Protein Komplementinhibitoren auf der Bakterienoberfläche rekrutiert oder Peptidasen, welche Opsonine oder Chemokine abbauen, sekretiert. Das führt schließlich zu einer stark eingeschränkten Akute-Phase-Reaktion und dämmt die Rekrutierung von Immunzellen ein. Selbst bei Kontakt mit Phagozyten und deren Aktivierung durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) ist GAS fähig, über die Sekretion von pro-apoptischen Peptiden den programmierten Tod in Zellen des angeborenen Immunsystems auszulösen oder erhält mit Hilfe von abgesonderten DNAsen die Fähigkeit, in neutrophilen extrazellulären Fallen (NETs) zu persistieren. Des Weiteren ist GAS unter Zuhilfenahme von *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs) oder Adhäsinen wie etwa Lipoteichonsäure beziehungsweise das M-Protein in der Lage, sich an Wirtszellen anzulagern und anschließend in das Gewebe einzudringen. Bei unkontrollierbarer Kolonisierung und Vermehrung in sonst sterilen Kompartimenten des Wirtes löst GAS lebensbedrohliche Erkrankungen aus, die durch eine exzessive Aktivierung von Immunzellen charakterisiert sind. So sezerniert GAS Superantigene wie beispielsweise SpeA, welche bis zu 20 % der zirkulierenden T-Lymphozyten aktivieren und somit einen tödlichen Zytokinsturm auslösen.

die Haut zu kolonisieren (Walker et al., 2014). Das  $\beta$ -hämolisierende Bakterium exprimiert zahlreiche, membranale präsentierte oder sekretierbare Virulenzfaktoren, die es GAS ermöglichen, den Mechanismen der Immunabwehr durch den Wirt zu entgehen (**Abbildung 1**). Somit löst GAS eine große Bandbreite verschiedenster, milder Erkrankungen wie Pharyngitis oder Impetigo contagiosa aus (Cunningham, 2000). Einer der wichtigsten Faktoren, der die Pathogenität von GAS bestimmt, ist das M-Protein. Dieser Virulenzfaktor vermittelt im Konzent mit Lipoteichonsäure die Adhäsion von GAS an Wirtszellen oder an die extrazelluläre Matrix von Schleimhäuten (Cue et al., 2001; Nobbs et al., 2009; Ofek et al., 1982). Des Weiteren verhindert das M-Protein durch die Rekrutierung von Faktor H sowie Fibrinogen die Deponierung von C3b auf der Bakterien-Oberfläche, wodurch schließlich die Aktivierung der Komplementkaskade des alternativen Wegs eingeschränkt wird (Berggard et al., 2001; Ermert et al., 2013; Horstmann et al., 1992). Im Zusammenspiel mit der Hyaluronsäure-Kapsel, welche die Bindung von Antikörpern an die Oberfläche des Bakteriums verhindert (Dinkla et al., 2007), vermittelt das M-Protein demnach die Resistenz von GAS gegenüber der Opsonophagozytose durch Wirtszellen des angeborenen Immunsystems (Dale et al., 1996; Johnsson et al., 1998; Perez-Casal et al., 1995). Des Weiteren ist das M-Protein hoch variabel und bedingt damit die enorme serologische Heterogenität in der GAS-Population (Gherardi et al., 2018). In diesem Zusammenhang sind zum November 2020 in den *Centers for Disease Control and Prevention* mehr als 260 M-Protein-Serotypen bekannt ([ftp.csc.gov/pub/infectious\\_diseases/biotech/tsemm](ftp.csc.gov/pub/infectious_diseases/biotech/tsemm)).

Das Bouquet der Virulenzfaktoren ist neben den Bedingungen in den unterschiedlichen Mikromilieus von Wirtsgeweben auch maßgeblich von der genetischen Ausstattung des Serotypen abhängig (Aziz et al., 2010; Walker et al., 2014). So ist in etwa GAS vom M1 Serotypen mit einem ausgeprägten Vermögen assoziiert, nach Durchbrechen von zellulären Barrieren des Wirtes invasive Infektionen zu verursachen (Dombek et al., 1999; Holm, 1996; Jadoun et al., 1998). Besonders virulente M1 Stämme haben durch den hohen Selektionsdruck in den sonst sterilen Wirtskompartimenten von infizierten Patienten verfeinerte Strategien entwickelt, die es dem Pathogen erlauben, sich beispielsweise während einer Bakteriämie unkontrolliert zu vermehren (Åkesson et al., 1996; Fiebig et al., 2015; Hoe et al., 1999). In diesem Zusammenhang exprimiert das Bakterium Peptidasen, welche durch die Spaltung von C5a die Rekrutierung neuer Immunzellen einschränken und gleichzeitig die anti-mikrobielle Abwehr durch reaktive Sauerstoffspezies behindern (Cleary et al., 1992; Riedemann et al., 2003; Terao et al., 2006). Darüber hinaus induziert GAS M1 durch die Absonderung von Streptolysin O in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen den programmierten Zelltod durch Apoptose (Timmer et al., 2009), und kann durch die Sekretion von DNAsen sein Über-

---

leben in neutrophilen extrazellulären Fallen gewährleisten (Cole et al., 2010). Als Folge ist GAS in der Lage, sich ungehindert im Wirt auszubreiten und durch seine Pathogen-assoziierten molekularen Muster sowie durch sezernierte Superantigene Immunzellen im gesamten Organismus zu aktivieren, was ultimativ in einem fatalen Zytokinsturm und septischen Schock resultiert (Cunningham, 2000; Norrby-Teglund et al., 1994; Proft et al., 1999).

Die durch invasive GAS-Infektionen ausgelösten Erkrankungen verlaufen in etwa 8 – 23 % der Fälle innerhalb von sieben Tag tödlich (O’Loughlin et al., 2007). Seit den 1980er Jahre wurde ein bislang unerklärlicher, globaler Anstieg dieser lebensbedrohlichen GAS-Infektionen in den Industrieländern festgestellt (Kaplan, 1991). Prospektiv ist mit keiner Verbesserung dieser besorgniserregenden Situation zu rechnen, zumal bis heute kein sicherer und kommerziell erhältlicher Impfstoff gegen GAS existiert (McKenna et al., 2020). Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation aus dem Jahre 2005 gibt es jährlich etwa 18,1 Millionen Fälle von schweren GAS-Erkrankungen mit über 500.000 Toten weltweit (World Health Organization, 2005). Damit ist GAS auf Platz 9 der meisten durch Infektionserreger verursachten Todesfälle (Carapetis et al., 2005). Aus diesem Grund erfordert es dringend neuartige Erkenntnisse aus experimentellen Modellen, welche die Ätiopathogenese von GAS-induzierten und lebensbedrohlichen Erkrankungen wie das toxische Schocksyndrom, die nekrotisierende Faszitis und die septische Arthritis illuminieren.

### **3.2 Die septische Arthritis ist mit einer hohen Mortalität und Morbidität assoziiert**

---

Die septische Arthritis (SA) ist eine aggressive Erkrankung von einem oder mehreren Gelenken und GAS ist mit 8 bis 12 % der verursachten Fälle der zweitwichtigste Auslöser dieses rheumatologischen Notfalls (Goldenberg, 1998; McBride et al., 2020). Der Erreger löst hierbei nach Infektion von exponierten Schleimhäuten, offenen Wunden oder der Haut eine Bakteriämie aus und gelangt schließlich nach Überwindung der physikalischen Barriere von Endothelien in die Synovia (Bremell et al., 1991; Morgan et al., 1996). Die Synovialmembran ist ein niedrig-zelluläres Stratum und es wird vermutet, dass sie auf Grund ihrer stark ausgeprägten Vaskularisation und einer fehlenden, protektiven Basalplatte anfällig für Infektionen durch hämatogene Bakterien ist (Shirliff & Mader, 2002). Die Kolonisierung der Synovia durch das Pathogen führt nach Aktivierung von lokalen Makrophagen zu einer akuten, durch inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF) $\alpha$  und Interleukin (IL-)6 vermittelten Entzündungsreaktion (García-Arias et al., 2011), wobei der Beitrag von synovialen Fibroblasten zur Pathologie von SA in diesem Zusammenhang bislang ungeklärt ist. Trotz Rekrutierung von neuen Immunzellen an den Infektionsherd kann es zu einer unkontrollierten Ver-

---



mehrung des Bakteriums und einer fulminanten und rasch voranschreitenden, chronischen Inflammation kommen, was in der typischen Symptomatik der SA resultiert (Goldenberg & Cohen, 1976; Ispahani et al., 1999).

Nach den modifizierten Kriterien von Newman wird eine SA anhand von vier Eigenschaften diagnostiziert: (i) nach Isolation vom Pathogen aus dem betroffenen Gelenk; (ii) nach Isolation vom Pathogen aus anderen Kompartimenten des Patienten, wobei dieser ein gerötetes, heißes, geschwollenes und stark schmerzendes Gelenk präsentiert; (iii) nach Präsentation der typischen Klinik und einer eingetrübten Synovialflüssigkeit oder (iv) nach pathologischer Analyse *post mortem* (Mathews et al., 2010; Newman, 1976). Demnach ist die Diagnose nicht immer eindeutig und so werden als Indikatoren für die invasive Infektion einschließlich der systemischen Entzündung häufig Parameter wie eine hämatogene oder synoviale Leukozytose, ein Anstieg der Serum-Konzentration von C-reaktivem Protein und eine erhöhte Erythrozytensedimentationsrate zu Rate gezogen (Gupta et al., 2001; Weston et al., 1999).

Die Diagnose der SA indiziert eine unverzügliche Therapie mit intravenös verabreichten Antibiotika, erfordert jedoch zur vollständigen Beseitigung der Infektionslast darüber hinaus bei bis zu 40 % der Patienten einen invasiven Eingriff mitsamt Drainage der Gelenkflüssigkeit und dem Ausschaben von etwaigen, antibiotikaresistenten Biofilmen (García-Arias et al., 2011; Gupta et al., 2001; Kasper et al., 2014). Auf Grund der nicht immer eindeutigen Identifizierung einer SA-Erkrankung und dem Mangel an spezifischen, biologischen Markern bleibt in vielen Fällen eine angemessene Therapie aus oder erfolgt verzögert (Mathews et al., 2010). Die Folge ist eine fortlaufende Entzündung, welche innerhalb von wenigen Tagen nach dem Eintritt der ersten Symptome in der irreversiblen Erosion der Knochen- und Knorpelsubstanz der Gelenke resultiert (García-De La Torre, 2003). So erleiden etwa 30 % der betroffenen Patienten chronische Schäden am Bewegungsapparat, was ultimativ zu einer lebenslangen Invalidität führt (García-Arias et al., 2011). Zwar ist die SA mit einer Inzidenz von jährlich vier bis zehn pro 100.000 Patientenjahre eine verhältnismäßig seltene Infektionskrankheit (Geirsson et al., 2007; Kaandorp et al., 1997; Weston et al., 1999), jedoch ist sie mit einer hohen Mortalitätsrate von etwa 10 % assoziiert, die in den letzten 30 Jahren epidemiologischer Forschung nicht verringert werden konnte (Abram et al., 2020; Gupta et al., 2001; Morgan et al., 1996). Bis heute fehlen innovative Interventionsstrategien und spezifische sowie sensitive diagnostische Werkzeuge, welche eine zielgerichtete Therapie der SA erlauben.

### **3.3 Risikofaktoren der septischen Arthritis**

#### **3.3.1 Epidemiologische Studien über die septische Arthritis unterliegen Limitationen**

---

Die Wahrscheinlichkeit an einer septischen Arthritis zu erkranken ist in der Bevölkerung nicht gleichmäßig verteilt. Epidemiologische Studien weisen in diesem Zusammenhang auf etliche Risikofaktoren hin, die für die Entwicklung einer SA prädisponieren. So ist die Inzidenz dieser lebensbedrohlichen Erkrankung bei sehr jungen Patienten unter zwei Jahren beziehungsweise bei Patienten mit einem Alter von über 70 Jahren besonders hoch (Elsissy et al., 2020; Mignemi et al., 2012; Monsalve et al., 2015). Im Falle der erstgenannten Bevölkerungsgruppe wurde argumentiert, dass der schwergängige Blutfluss in den Kapillaren der Metaphyse des wachsenden Knochens die Infektion der Gelenke fördert, da die niedrigen Scherkräfte die Adhäsion von Bakterien an das periartikuläre Gewebe begünstigen (Pääkkönen, 2017). In Bezug auf Patienten hohen Alters ist das erhöhte Risiko an einer SA zu erkranken auf die Immunseneszenz zurückführbar, die eine eingeschränkte Immunabwehr oder eine fehlgeschaltete Immunregulation verursacht (Boldizar et al., 2010). Eine Immunschwäche beispielsweise bei Patienten mit Diabetes mellitus oder bei Alkoholikern ist mit einem verminderten Vermögen assoziiert, Infektionen abzuwehren und demnach ein ausgesprochen wichtiger Risikofaktor der SA (Gupta et al., 2001; McBride et al., 2020; Morgan et al., 1996).

Zwar sind epidemiologische Studien hilfreich bei der Identifikation der genannten Risikofaktoren, jedoch unterliegen sie auf Grund ihrer fast ausschließlich retrospektiven Datenerfassung zahlreichen Limitationen. Zum einen werden durch solche Studien die Zusammenhänge und Mechanismen, die der Identifizierung prädisponierender Faktoren zugrunde liegen nicht aufgeklärt. Des Weiteren besteht die Gefahr, dass alternative Rahmenbedingungen, welche eine SA begünstigen können, entweder unterrepräsentiert sind beziehungsweise gar nicht erst erfasst werden.

#### **3.3.2 Chronische Gelenkerkrankungen prädisponieren für die septische Arthritis**

---

Die rheumatoide Arthritis (RA) wird als einer der wichtigsten Risikofaktoren der SA deklariert. Die RA ist eine entzündliche, progressiv verlaufende und chronische Erkrankung der Gelenke mit weitestgehend unbekannter Ätiologie, von der schätzungsweise 1 % der gesamten Weltbevölkerung betroffen sind (Mateen et al., 2016). Die Pathogenese der RA ist durch eine aberrante Reaktivität von Lymphozyten und Antikörpern gegen Autoantigene gekennzeichnet bei der immunregulatorische Mechanismen versagen, was ultimativ in der Erosion von Gelenkstrukturen resultiert (Smolen & Steiner, 2001). Die Behandlung dieser Autoimmuner-

---

krankung beinhaltet demnach die Anwendung von immunsupprimierenden Therapeutika: den niedermolekularen oder biologischen *Disease-modifying anti-rheumatic drugs* (DMARDs) wie in etwa Methotrexat (MTX) beziehungsweise dem TNF $\alpha$ -Inhibitor Infliximab (Abbasi et al., 2019; Oh et al., 2017). TNF $\alpha$  ist unerlässlich für eine kompetente, antibakterielle Abwehr durch das Immunsystem und die Verwendung von anti-TNF $\alpha$  Antikörpern bei der Therapie von RA bedingt bekanntermaßen ein erhöhtes Risiko an invasiven Infektionen und damit an der SA zu erkranken (Ali et al., 2013; Galloway et al., 2011).

Jedoch erfolgt die Behandlung mit biologischen DMARDs nicht bei jedem RA-Patienten und die Anwendung von konventionellen Therapeutika wie MTX ist nicht immer mit einem erhöhten Infektionsrisiko assoziiert (McLean-Tooke et al., 2009). Demzufolge wurde postuliert, dass nicht allein die Therapie der RA für die SA prädisponiert, sondern die Autoimmunität selbst die Immunabwehr beeinträchtigt (Doran et al., 2002; Myllykangas-Luosujärvi et al., 1995). Jedoch ist diese Hypothese bislang noch nicht durch experimentelle Modelle gestützt und bedarf demnach einer wissenschaftlichen Überprüfung, zumal auch die Arthrose als Risikofaktor der SA gehandelt wird (Kaandorp et al., 1995; Mathews et al., 2010; Singh & Yu, 2018). Die Arthrose (*osteoarthritis*, OA) ist die häufigste Gelenkerkrankung und eine der Hauptursachen von Invalidität (Jaeger et al., 2008). Die Ätiologie der OA ist oftmals unbekannt und die Pathogenese ist eine Kombination verschiedenster Krankheiten, die in Kumulation zu einem Zusammenbruch des dynamischen Gleichgewichts zwischen Abbau und Reparatur von artikulärem Gewebe führen (Nuki, 1999). Da die OA eine degenerative Erkrankung ohne autoimmunen Charakter ist, erfolgt die Therapie im Gegensatz zur RA nicht mit Immunsuppressiva sondern rein palliativ unter Anwendung nicht-steroidaler Schmerzmittel oder in besonders gravierenden Fällen durch Gelenkersatz (Cibulka et al., 2009; Dziedzic, 2011). Demnach wird hier die Hypothese aufgestellt, dass Gelenkschäden, die entweder durch eine chronisch entzündliche beziehungsweise degenerative Erkrankung der Gelenke verursacht werden, für die SA prädisponieren (**Abbildung 2**).

### **3.4 Virusinfektionen sind ein möglicher Risikofaktor der septischen Arthritis**

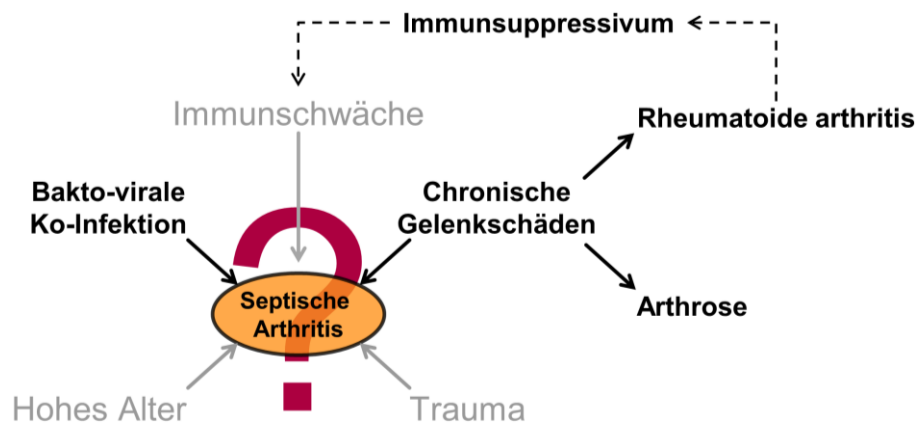
---

Virusinfektionen sind schon seit mindestens 60 Jahren im Verdacht, das Immunsystem zu unterdrücken (Denman, 1983; Louria et al., 1959), jedoch wurden sie bislang in keiner Weise als Risikofaktor der septischen Arthritis berücksichtigt. Dabei sind saisonale Erkrankungen wie die Grippe, die nahezu ausschließlich nach Infektionen durch das Influenza A Virus (IAV) ausgelöst werden, laut statistischer Untersuchungen des Robert Koch-Institut allein in Deutschland während der Saison 2018/2019 für 18.000 hospitalisierte Patienten verantwort-

---

lich (Buda et al., 2019). Weltweit sind fünf bis zehn Prozent der Bevölkerung während einer Grippewelle betroffen, die jährlich etwa 250.000 bis 500.000 Todesopfer fordert (Tjon-Kon-Fat et al., 2016). IAV wird auf Grund seines segmentierten ssRNA Genoms negativer Polarität dem Phylum der *Negarnaviricota* zugeordnet (Hutchinson et al., 2010). Das Genom von RNA-Viren ist oftmals durch eine hohe Mutationsrate gekennzeichnet und im Falle von IAV führt das zu Veränderung der Antigenität der Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuramidase, wodurch neue Varianten oder Stämme mit ausgesprochen hohem endemischen oder gar pandemischen Potential hervortreten (Neumann et al., 2009).

Das wohl bekannteste Beispiel einer IAV-Pandemie ist die Spanische Grippe des Jahres 1918, die weltweit etwa 50 Millionen Todesfälle hervorrief (Brundage & Shanks, 2007; Chien et al., 2009). Neueren Modellen zu Folge war die Ursache der besonders fulminanten Krankheitsverläufe in über 95 % der Patienten eine sekundäre Superinfektion mit Bakterien, die eine lebensbedrohliche Pneumonie auslösten (Morens et al., 2008). Während einer weiteren folgenreichen Pandemie aus dem Jahre 2009 wurden 25 bis 30 % der tödlich verlaufenden Fälle einer bakteriellen Superinfektion zugeschrieben (Domínguez-Cherit, 2009; Estenssoro et al., 2010; Shieh et al., 2010), wobei in einigen Regionen GAS der hauptsächliche Verursacher fataler Erkrankungen war (Ampofo et al., 2010). Aktuelleren Studien zu Folge indu-



**Abbildung 2: Welche Faktoren prädisponieren für die septische Arthritis?** Epidemiologische Studien sind zwar in der Lage, Zusammenhänge zwischen Risikofaktoren und dem Auftreten der septischen Arthritis in besonders gefährdeten Patientengruppen aufzuzeigen, jedoch sind experimentelle Modelle für die Betrachtung des Zusammenspiels von unterschiedlichen Krankheitsentitäten erforderlich. So soll durch die hier dargelegten Experimente geklärt werden, ob Gelenkschäden, welche durch chronische Erkrankungen wie die degenerative Arthrose oder die autoimmune rheumatoide Arthritis tatsächlich die Schwere und das Auftreten der septischen Arthritis begünstigen. Besonders im Falle der rheumatoiden Arthritis ist bislang nicht geklärt, ob allein die Therapie mit Immunsuppressiva das Infektionsrisiko erhöht oder ob die Autoimmunität selbst das Gefährdungspotential steigert. Des Weiteren gibt es bis heute keine Hinweise ob sich bakto-virale Ko-Infektionen auf die Inzidenz der septischen Arthritis auswirken beziehungsweise dessen Verlauf verschlimmert.

ziert IAV in der Lunge ein Zytokin-Milieu, welches dem Wirten zwar eine effektive, anti-virale Immunabwehr erlaubt, Bakterien jedoch nach Infektion der oberen Atemwege einen erleichterten Eintritt in sonst sterile Kompartimente des Wirtes ermöglicht, wodurch invasive Infektionen begünstigt werden (Durbin et al., 2013; Iwasaki & Pillai, 2014; N. Li et al., 2015; Sun & Metzger, 2008). Trotz zahlreicher Untersuchungen im Kontext von bakto-viralen Ko-Infektionen ist dennoch bislang ungeklärt, inwieweit sich eine IAV-Infektion auf den Verlauf einer bereits etablierten Bakteriämie, bei der das Bakterium andere Gewebe als die Lunge infiziert, auswirkt. Aus diesem Grund soll hier die Hypothese überprüft werden, ob in den oberen Atemwegen lokalisierte Influenzaviren die durch hämatogenes GAS induzierte SA verschlimmern (**Abbildung 2**).

### **3.5 Die septische Arthritis im Kontext von chronischen Vorerkrankungen der Gelenke und bakto-viralen Ko-Infektionen**

---

In dieser Arbeit wurde GAS für die Etablierung eines Kleintier-Modells von SA intravenös appliziert. Die Tiere wurden klinisch begutachtet, um die makroskopischen Manifestationen von Sepsis und SA zu analysieren. Die SA wurde anhand von Schwellungen der Pfoten und mittels bakteriologischer Untersuchungen an der Synovialflüssigkeit von tibiofemorale Gelenken identifiziert. In einem *in vitro* Infektionsmodell von synovialen Fibroblasten wurde erkundet, inwieweit die Synovia zu den Entzündungsreaktionen während einer SA und demzufolge zur Pathogenese der lebensbedrohlichen Erkrankung beiträgt. Um den Einfluss von chronischen Gelenkerkrankungen auf die Inzidenz und die Schwere der SA zu erforschen, wurden Tiermodelle der Arthrose sowie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt und mit der GAS-Infektion kombiniert. Die klinischen Untersuchungen wurden durch histologische Analysen, durch die Ermittlung von serologischen Entzündungsparametern sowie durch die Quantifizierung von immunrelevanten Eicosanoiden im Gewebe komplementiert. Des Weiteren wurden die Auswirkungen der chronischen Vorerkrankungen auf die GAS-induzierten Knochenerosionen mittels mikro-Computertomographie analysiert. Schließlich erfolgte die Etablierung eines Ko-Infektionsmodells in dem die Applikation von GAS mit einer intranasalen Infektion von IAV verbunden wurde. Ziel dieser Studie war es, bereits postulierte und darüber hinaus mögliche Risikofaktoren der SA zu erkunden und experimentell zu beschreiben.

## IV. MATERIALIEN UND METHODEN

### 4.1 Kleintier-Krankheitsmodelle

#### 4.1.1 Versuchstiere

---

Die Mäuse vom Stamm C57Bl/6J (B6) wurden ursprünglich von Charles River bezogen (Wilmington, MA, USA). Die Stämme STR/ort, DBA/1J und B10.Q wurden von Harlan Winkelmann erworben (Borchen, Deutschland). Für die Experimente über die chronisch entzündliche Vorerkrankung der Gelenke wurden die Nachkommen erster Generation (F1) aus der Verpaarung von weiblichen DBA/1 und männlichen B10.Q verwendet. Die verschiedenen Mausstämme wurden kontinuierlich in der zentralen Versuchstierhaltung am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie (IEC) gezüchtet. Die Haltung der Mäuse erfolgte in einzelbelüfteten Käfigen unter spezifisch Pathogen-freien Bedingungen mit einem artifiziellen und vollautomatisierten Tag-/Nacht-Zyklus von 12 Stunden. Das Umgebungsklima wurde auf  $21 \pm 2$  °C reguliert bei einer Luftfeuchtigkeit von  $60 \pm 10$  %. Die Tiere erhielten Trinkwasser und ssniff R/M-H Futter *ad libitum* (sniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland). Alle Tierversuchsvorhaben, welche den Daten dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden gemäß §8 Absatz 1 TierSchG vom Tierschutzdienst des Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern geprüft und bewilligt (Aktenzeichen 7221.3-1.1-063/17 und 7221.3-1-017/19).

#### 4.1.2 Gruppe A Streptokokkus-Infektion

---

Für alle bakteriellen Infektionsexperimente wurde der Gruppe A Streptokokkus (GAS) Stamm AP1 vom M1 Serotyp verwendet. Der Stamm wurde ursprünglich vom *World Health Organization Center for Reference and Research on Streptococci* (Prag, Tschechische Republik) bezogen und mit freundlicher Unterstützung von Dr. Sonja Oehmcke-Hecht aus der Stammsammlung vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Auf Grund des Selektionsdrucks während der Infektion in seinem ursprünglichen, humanen Wirt enthält das Genom von AP1 inaktivierende Mutationen im *covS* Gen, was eine verringerte Repression von Streptokokken-Virulenzfaktoren bewirkt (Fiebig et al., 2015). Als Resultat wird AP1 mit invasiven Infektionen assoziiert und ist bekanntermaßen hoch virulent in Mäusen (Oehmcke et al., 2009, 2013).

Die Bakterien wurden mittels Vereinzelausstrich aus dem Bestand auf Columbia Agar mit 5 % Schafsblut aufgetragen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) und über Nacht

---

bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die Agar-Kultur wurde für maximal drei Wochen bei 4 °C gelagert und für die Vorkultur verwendet, welche durch das Eintragen von drei Bakterien-Kolonien mittels Impföse in 5 mL Todd-Hewitt-Bouillon angesetzt wurde (THB, Becton Dickinson). Anschließend wurde die Suspension etwa 16 h bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase im Brutschrank inkubiert. Durch eine 1:20 Verdünnung der Suspension mit THB wurde die Hauptkultur angesetzt, welche für drei bis vier Stunden im Brutschrank kultiviert wurde. Das Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase wurde durch Bestimmung einer optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 0,4 bis 0,6 bestätigt. Die Bakterien wurden zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) gewaschen. Die Suspension wurde dann durch Verdünnung mit PBS auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 ± 0,05 eingestellt, was mit (1,0 ± 0,1) • 10<sup>8</sup> koloniebildenden Einheiten (KBE) je mL korrespondierte. Die tatsächliche Quantifizierung lebender Bakterien erfolgte am Folgetag nach Ausstrich sequentieller Verdünnung der Stammsuspension auf Blut-Agar und Inkubation über Nacht im Brutschrank.

Für die Infektion wurden 100 µL verdünnter Bakteriensuspension – wie bereits beschrieben (Sakurai et al., 2003) – intravenös (i.v.) mit einer 30 G Kanüle in die laterale Schwanzvene von 20 bis 22 Wochen alten, männlichen Tieren appliziert, sodass die Dosis 0,5 • 10<sup>6</sup> KBE für B6, 1,5 • 10<sup>6</sup> KBE für STR/ort oder 2,0 • 10<sup>6</sup> KBE für F1 Mäuse betrug. Als Applikationskontrolle wurde separaten Gruppen von Tieren über dieselbe Route PBS verabreicht. Die Mäuse wurden nach der i.v. Applikation für bis zu 14 Tage mindestens dreimal täglich begutachtet. Mäuse mit augenscheinlich schweren Krankheitsverläufen wurden an strikt definierten, humanen Endpunkten geopfert (siehe 4.1.6). Am Endpunkt jedes individuellen Infektionsexperiments wurden die Tiere mit 75 mg Ketamin (Pharmanovo, Hannover, Deutschland) und 5 mg Xyalzin (Bayer, Leverkusen, Deutschland) pro kg Körpergewicht anästhesiert. Anschließend wurde Blut durch kardiale Punktion entnommen und die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet. Die Blutproben wurden – zusammen mit der Milz und der Hälfte der Leber – zur Bestimmung der bakteriellen Last nach Ausstrich auf Blut-Agar verwendet. Zur Gewinnung von Plasmaproben wurde das restliche Blut mit EDTA (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) in einer finalen Konzentration von 1 % (w/v) versetzt und bei 1.500 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die übrige Hälfte der Leber wurde in flüssigen Stickstoff gegeben und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Zur Bestimmung der bakteriellen Last in der Synovialflüssigkeit wurde an den Tieren posthum eine mediale Arthrotomie an beiden Kniegelenken durchgeführt und die Gelenkflüssigkeit mittels Impföse auf Blut-Agar ausgestrichen. Hinter- und Vorderläufe wurden anschließend ektomiert und zur Fixierung für nachfolgende histologische Analysen für maximal zwei Wochen in 4 % Formal-

---

dehyd (Formafix, Düsseldorf, Deutschland) asserviert oder in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

### 4.1.3 Primäre und sekundäre Arthrose

---

Um die primäre Arthrose (*osteoarthritis*, OA) von Menschen im Kleinterversuch zu modellieren, wurde der Mausstamm STR/ort verwendet. In männlichen Tieren treten in hoher Inzidenz ab einem Alter von etwa 18 Wochen chronisch voranschreitende, degenerative Erosionen an Knie- und Sprunggelenken auf (Mahr et al., 2003; Staines et al., 2017; Walton, 1978), die in Bezug auf ihre histopathologische Manifestation dem Krankheitsbild im Menschen ähneln (Evans et al., 1994; Staines et al., 2016). Da diese Form der Arthrose spontan auftritt, mussten bis zum Auslösen der GAS-Infektion keine Behandlungen an STR/ort Mäusen vorgenommen werden. Um OA durch chirurgisch eingeleitete Destabilisierung des rechten tibiofemorales Gelenks zu induzieren, wurde eine Durchschneidung des vorderen Kreuzbands (*anterior cruciate ligament transection*, ACLT) – nach einem bereits in der Literatur beschriebenen Protokoll (Kamekura et al., 2005) – durchgeführt. Sechs bis acht Wochen alte männliche B6 Tiere wurden – wie unter Absatz 4.1.2 beschrieben – mit Ketamin und Xylazin anästhesiert und auf eine Wärmeplatte mit einer konstanten Temperatur von 37 °C gelegt. Der Eingriff wurde nach Überprüfung der vollständigen Narkosetiefe aseptisch unter einem Stereomikroskop mit 4- bis 16-facher Vergrößerung vorgenommen.

Zunächst wurde der rechte Hinterlauf unter Aufrechterhaltung einer leichten Flexion des Kniegelenks immobilisiert und das Fell von der Operationsstelle entfernt. Zur Entfernung der Haut erfolgte ein 1 bis 2 mm großer, longitudinaler Einschnitt vom proximalen Ende der Tibia bis zum distalen Ende der Patella (Abbildung 3A). An der medialen Seite der nun sichtbaren Patella erfolgte im Anschluss die Kapselinzision. Das Gelenk wurde durch Fixierung und Aufspannen der Patella an einem 4-0 Kunststoffaden freigelegt (Resorba, Nürnberg, Deutschland) und nach Exzision vom infrapatellaren Fettkörperchen wurde das vordere Kreuzband sichtbar (Abbildung 3B & C). Mit einer No. 11 Skalpell-Klinge wurde dann das Kreuzband durchtrennt, ohne dabei den umliegenden Knorpel oder den Knochen zu verletzen. Unter Verwendung von resorbierbaren 6-0 Punktkopf-Nähten (Ethicon, Somerville, NJ, USA) wurde das Gelenk und die Haut verschlossen. Als Kontrolle wurden an einer separaten Gruppe von Tieren *sham*-Operationen durchgeführt, bei denen direkt nach der medialen Arthrotomie das Kniegelenk wieder verschlossen wurde. Die Analgesie wurde den Tieren mit Hilfe von 1,25 mg/mL Metamizol (Zentiva, Prag, Tschechien) perioperativ am Vortag des Eingriffs bis drei Tage nach der Operation über das Trinkwasser zur Verfügung gestellt. Bis

---



zum Auslösen der GAS-Infektion wurden die Tiere für 14 Wochen bei Standardbedingungen gehalten und regelmäßig begutachtet. Laut Literatur treten innerhalb von acht Wochen nach Abschluss des Eingriffs durch die erhöhte mechanische Belastung chronisch voranschreitende und sowohl radiologisch als auch histologisch erkennbare Gelenkschäden am Knie auf (Kamekura et al., 2005; Shen et al., 2011). Auf Grund der kausalen Verknüpfung vom induzierten Trauma und dem Auftreten der degenerativen Gelenkerkrankung ist die chirurgisch induzierte Gelenkdestabilisierung ein Modell für die sekundäre OA im Menschen (Fang & Beier 2014).

#### 4.1.4 Kollagen-induzierte Arthritis

---

Die Kollagen-induzierte Arthritis (*collagen-induced arthritis*, CIA) wurde in männlichen DBA/1 × B10.Q (F1) Tieren durch Immunisierung mit bovinem Kollagen Typ II (Chondrex, Redmond, WA, USA) ausgelöst. F1 Mäuse exprimieren den H2<sup>q</sup> Haplotyp vom Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) Klasse II und entwickeln als Resultat dieser genetischen Ausstattung nach der Immunisierung mit allogenen Kollagen

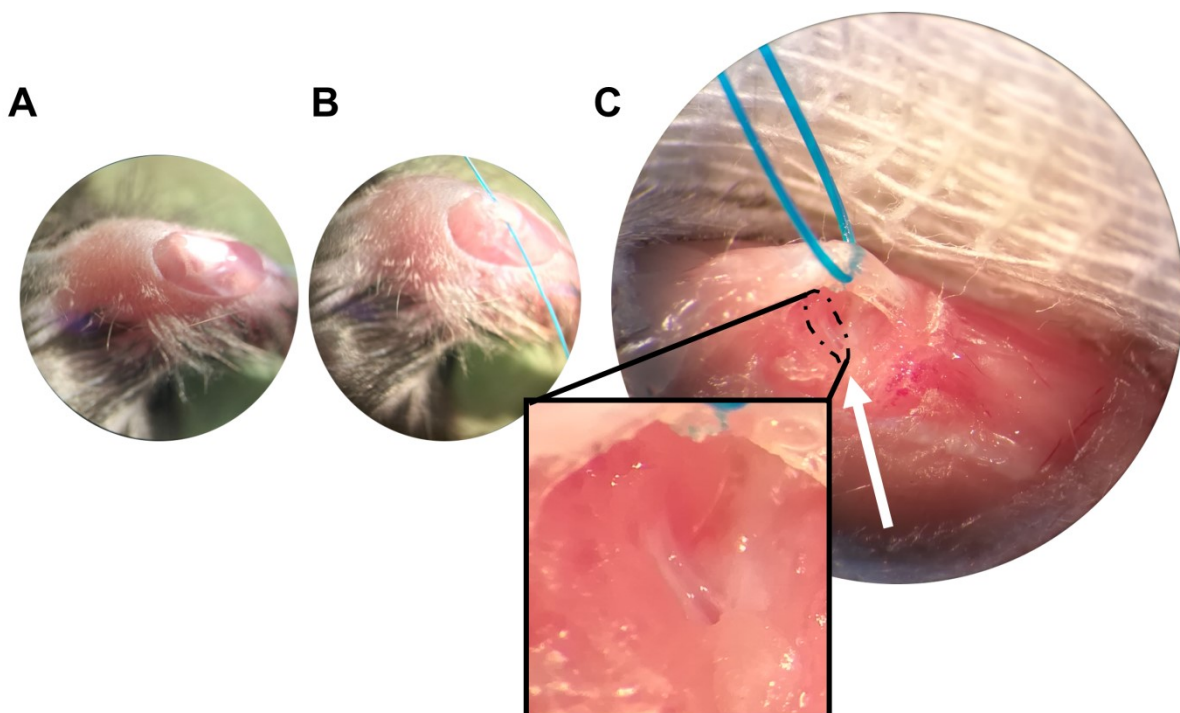


Abbildung 3: Mikro-operative Durchschneidung des *Ligamentum cruciatum anterius*. **(A)** Durch Entfernung der Haut wird die Patella freigelegt. **(B)** Nach medialer Arthrotomie wird ein Kunststoffaden unter die Patella geführt. **(C)** Die Gelenkkapsel wird nach Aufspannen der Patella freigelegt. Nach Exzision vom infrapatellaren Fettgewebe ist das vordere Kreuzband sichtbar (Pfeil) und kann durchtrennt werden.

---

eine verstärkte Autoimmunität gegen autologes Kollagen, was mit chronischen Entzündungsreaktionen in den Gelenken einhergeht (Campbell et al., 2000; Ebbers et al., 2018; Wooley et al., 1983). Für die Immunisierung von sechs bis acht Wochen alten Mäusen wurde zunächst eine Emulsion bestehend aus Kollagen, das in 0,1 M Essigsäure gelöst wurde und Freund's Adjuvanz mit inaktiviertem *M. tuberculosis* (Becton Dickinson) hergestellt. Die Emulsion wurde subkutan (s.c.) 5 mm distal von der Schwanzbasis appliziert und enthielt je Bolus 140 µg Kollagen und 280 µg *M. tuberculosis*. Drei Wochen nach der Primärimmunisierung erfolgte 2 mm distal von der vormaligen Injektionsstelle die erneute s.c. Applikation von 140 µg Kollagen in Freund's Adjuvanz ohne Bakterien. Auf Grund der Nebenwirkungen durch die Verabreichung von Adjuvanz und der durch die CIA herbeigeführten Schmerzen wurde den Tieren Tramadol (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) in einer Konzentration von 1 mg/mL im Trinkwasser zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden nach Sekundärimmunisierung bis zur Infektion mit GAS täglich für 11 Wochen beobachtet. Die entscheidenden pathophysiologischen Merkmale von CIA sind synoviale Hyperplasie und die Infiltration von mononukleären Zellen in das artikuläre Gewebe, welche auch bei der rheumatoiden Arthritis auftreten (Brondello et al., 2019; Y. Li et al., 2019). Aus diesem Grund gilt CIA als wichtiges Kleintiermodell für die menschliche Krankheitsentität (Brand et al., 2007).

### 4.1.5 Ko-Infektion mit Gruppe A Streptokokkus und Influenza A Virus

---

Das Influenza A Virus (IAV) A/Bayern/74/2009 (H1N1pdm09) wurde für diese Arbeit vom Friedlich-Löffler-Institut für Tiergesundheit (FLI, Insel Riems, Greifswald) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung und Bestimmung des Virus-Titers erfolgte, wie bereits beschrieben, durch die Mitarbeiter des FLI (Schultz et al., 2019). Im Detail wurde IAV in Kulturen von Mardin-Darby Hunde-Nierenkanälchen-Zellen (*Mardin-Darby Canine Kidney II cells*, MDCK II) vermehrt. Zur Bestimmung der ulturinfektösen Dosis 50 (KID<sub>50</sub>) wurden serielle 1:10 Verdünnungen der Virussuspension mit Infektionsmedium (minimal-essentielles Medium [MEM]; 0,2% bovines Serumalbumin [BSA]; 1 IE/mL Penicillin; 1 µg/mL Streptomycin; 2 µg/mL N-Tosyl-L-Phenylalanin-Chlormethylketon) hergestellt und den MDCK II in 96-Well-Platten zugesetzt. Anschließend wurden die Infektionskulturen für drei Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und jedes einzelne Well auf zytopathische Effekte untersucht. Die Virus-Titer-Bestimmung erfolgte nach der Spearman-Kärber-Methode (Kärber, 1931; Spearman, 1908). Die Bestimmung der tatsächlichen Viruskonzentration erfolgte aus den Kulturüberständen vom MDCK II Inokulum unter Berücksichtigung der Poisson-Verteilung nach folgender Formel:

$$\text{Viruskonzentration [PBE]} = \text{KID}_{50} \cdot 0,69$$

---

Tabelle 1: Zeitlicher Ablauf der Ko-Infektionsversuche.

Gruppe	n	Zeitpunkt der Behandlung		
		Tag -2	Tag 0	Tag 2
PBS	3	i.n. PBS	i.v. PBS	–
GAS	10	–	i.v. GAS	i.n. PBS
IAV	8	i.n. IAV	i.v. PBS	–
GAS+IAV	10	–	i.v. GAS	i.n. IAV
IAV+GAS	10	i.n. IAV	i.v. GAS	–

Für die Infektionsversuche wurde Infektionsmedium mit einer Viruskonzentration von  $6 \cdot 10^6$  Plaque-bildenden Einheiten (PBE) verwendet. Durch eine 1:1,2 Verdünnung mit PBS wurde die Viruskonzentration auf  $5 \cdot 10^6$  PBE eingestellt und 20  $\mu$ L dieser Suspension den Versuchstieren mittels Pipette tröpfchenweise intranasal (i.n.) appliziert, sodass die Infektionsdosis  $1 \cdot 10^5$  PBE je Tier betrug. Als Applikationskontrolle wurde PBS i.n. verabreicht. Durch Verwendung von Volumina in dieser Größenordnung wurde gewährleistet, dass die gesamte Flüssigkeit in die unteren Atemwege aufgenommen wurde. Die zeitliche Abfolge der Ko-Infektion wurde entsprechend Tabelle 1 gestaltet. Die bakterielle Dosis für die Infektion von 20 bis 22 Wochen alten B6 Mäusen mit GAS betrug in dieser Versuchsreihe  $1 \cdot 10^5$  KBE. Die Applikation von GAS, die zeitliche Begrenzung der Infektion und die Gewinnung von murinem Probenmaterial erfolgte wie unter Abschnitt 4.1.2 beschrieben. Die praktischen Arbeiten an diesem Tiermodell, sowie Teile der Datenanalyse wurden durch den von mir betreuten Herrn Erik Weipert durchgeführt. Einige Ergebnisse aus diesen Versuchen wurden in seiner Abschlussarbeit (Master of Science) mit dem Titel „*In vivo* Untersuchungen im Kontext von septischer Arthritis“ dokumentiert.

#### 4.1.6 Klinische Beurteilung der Krankheitsaktivität

Die GAS-vermittelte Sepsis wurde täglich nach der Infektion, abgesehen von einigen Modifikationen, entsprechend eines bereits beschriebenen Systems für Mäuse beurteilt (Shrum et al., 2014). Dieses System nutzt makroskopisch deutlich erkennbare Anzeichen für eine klinische Belastung der Mäuse aus, die stellvertretend für die Krankheitsaktivität quantifiziert wurden (Tabelle 2). Der kumulative Wert aus vier verschiedenen Kategorien (Körpergewicht, Erscheinungsbild, Spontanverhalten, Entzündungsanzeichen), mit jeweils maximal 25 Punkten, bezifferte demnach die Schwere der Sepsis. Ein Sepsis Score  $\geq 5$  wurde als Auftreten

Tabelle 2: Muriner Sepsis Score zur Beurteilung der Krankheitsaktivität nach GAS-Infektion.

Kategorie	Score	Beschreibung
Relatives Körpergewicht	0	keine Reduktion oder Zunahme
	5	Reduktion um $\geq 5\%$
	10	Reduktion um $\geq 10\%$
	25	Reduktion um $\geq 20\%$
Äußeres Erscheinungsbild	0	glattes und glänzendes Fell, saubere Körperöffnungen
	5	Piloerektion, Augentrübung, ungepflegte Körperöffnungen
	10	verklebte Körperöffnungen, hoher Muskeltonus, Augensekret
	25	Krämpfe, Lähmungen, Tier ist kalt/moribund
Spontanverhalten	0	Tier ist aktiv, zeigt normales Verhalten
	5	eingeschränkte Aktivität, Motorik und Reaktion auf Stimuli
	10	Selbstisolation, Lethargie, Koordinationsstörungen
	25	Schmerzlaute bei leichter Berührung, Apathie
Entzündung, Atemfrequenz und -qualität	0	keine Auffälligkeiten
	5	Rötungen/Schwellungen an kleinen Körperarealen
	10	großflächige Schwellungen, erschwerte und langsame Atmung
	25	offene Wunden, Schnappatmung, schwache Atmung

der Sepsis betrachtet und ein Sepsis Score  $\geq 25$  wurde als humaner Endpunkt oder septischer Schock definiert bei dem Mäuse übermäßiger Belastung ausgesetzt waren und das Überleben der Tiere in den folgenden 24 Stunden nicht mehr garantiert werden konnte. Aus diesem Grund wurden diese Tiere aus dem Experiment genommen und – wie unter 4.1.2 beschrieben – narkotisiert und erlöst, was in die statistische Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit eingebracht wurde.

Im Anschluss an die Sekundärimmunisierung (siehe 4.1.4) erfolgte an jedem zweiten Tag die klinische Beurteilung der CIA-Aktivität mit Hilfe eines bereits etablierten Arthritis-Scoring-Systems (Ebbers et al., 2018). Die Schwere der CIA wurde nach folgendem Schema quantifiziert: es wurde jeweils 1 Punkt bei Rötung bzw. Schwellung an jedem betroffenen Finger oder jeder betroffene Zehe, 5 Punkte für jede von Rötungen oder Schwellungen betroffene Mittelfote und 5 Punkte für jeden geschwollenen bzw. geröteten Bereich um Carpus oder Tarsus vergeben (Abbildung 4). Für die klinische Beurteilung der Schwere der septischen Arthritis (SA) nach Infektion mit GAS wurde nach dem gleichen Schema verfahren. Hierbei wurden zusätzlich 5 Punkte für jedes tibiofemorale Gelenk, aus dem  $\beta$ -hämolisierende Bakterien isoliert wurden, vergeben. Das Scoring der SA erfolgte nach dem Auslösen der GAS-Infektion einmal täglich. Ein Scoring-Wert  $\geq 1$  wurde als Auftreten der Erkrankung gewertet und wurde demnach bei der statistischen Analyse der Inzidenz von SA berücksichtigt.

## 4.2 Mikro-computertomographische Knochenmorphometrie

Ektomierte, in Formaldehyd fixierte und anschließend für 30 min in Leitungswasser gewaschene Maus-Pfoten und Femora wurden über Nacht in 154 mM NaCl inkubiert. Diese Lösung diente als Medium für die anschließende Messung am SkyScan 1076 mikro-Computertomographen (Bruker, Antwerpen, Belgien). Die Bildaufnahme erfolgte bei einer Voxelgröße von 9  $\mu\text{m}$  mit Hilfe einer Strahlungsquelle, die bei 49 kVp und 200  $\mu\text{A}$  betrieben wurde. Die Rotationsintervalle wurden während der Akquirierung auf 0,6 ° eigengestellt. Durchschnittsberechnungen für drei separate Prüfkörper-Projektionen erfolgten bei einem Integrationsintervall von 1700 ms. Die Kalibration der Knochenmineraldichte (*bone mineral density*, BMD) erfolgte durch die Bestimmung der Absorptionskoeffizienten analog gemessener Knochenphantome mit bekannter BMD von 0,25 und 0,75  $\text{g}/\text{cm}^2$ . Die Verarbeitung der Einzelaufnahmen zu dreidimensionalen Knochenmodellen wurde nach Literaturvorgaben in der Software-Pipeline von Bruker durchgeführt (Hollinski et al., 2018). Die Röntgenbilder wurden in der Software NRecon (Version 1.6.9.18) durch Anwendung eines Gauss'schen Filters und der in Tabelle 3 gelisteten Parameter rekonstruiert. Die räumliche Ausrichtung der Knochen erfolgte in der DataViewer Software (Version 1.5.1.2). Die Selektion der *Regions of Interest* und *Volumes of Interest* wurde in der CTAn Software vorgenommen (Version 1.15.4.0).

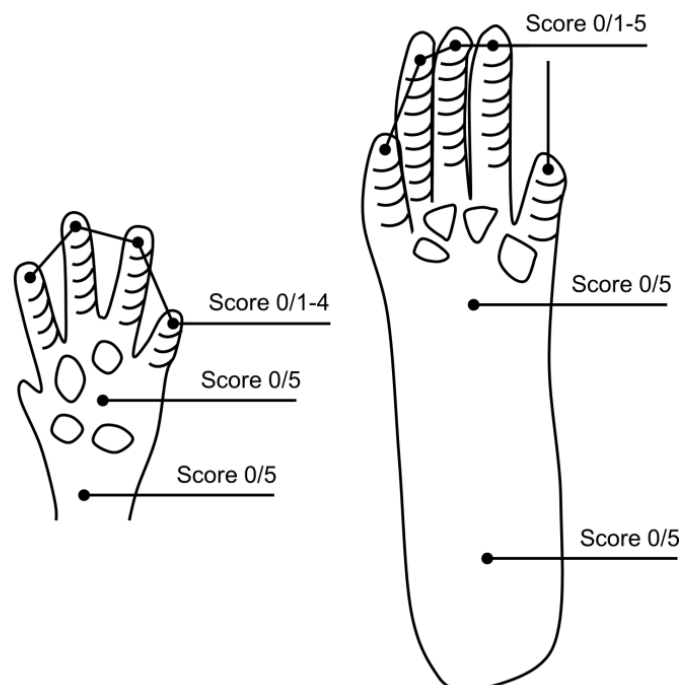


Abbildung 4: Schematische Darstellung für das Scoring der Arthritis-Aktivität. Die Beurteilung der Entzündungserscheinungen erfolgten an Vorder-(links) und Hinterpfoten (rechts) bei CIA und SA. Für Schwellungen bzw. Rötungen der Finger oder Zehen wurde jeweils 1 Scoring-Punkt vergeben. Für Rötungen oder Schwellungen der palmaren bzw. plantaren Flächen und der karpal- bzw. tarsal-Bereiche wurden jeweils 5 Scoring-Punkte zugeordnet.

Tabelle 3: Auflistung der Parameter für die Rekonstruktion der Röntgen-Projektionen mit NRecon.

Parameter	Arbiträrer Wert
Kerndichteglättung	2
Maskierung defekter Pixel	≤ 20 %
Reduktion von Ringartefakten	6
Korrektur der Strahlenaufhärtung	30 %
Kompensation von Ausrichtungsfehlern	empirisch je nach Bildqualität

Die Festlegung des oberen Referenzniveaus zur Bestimmung der Länge des Femurs erfolgte an der *Fossa intertrochanterica* am Oberschenkelkopf. Die Wachstumsfuge der distalen Metaphyse wurde als unteres Referenzniveau definiert (Abbildung 5). Die Analyse der morphometrischen Parameter wurde in einem Bereich vorgenommen, der 10 % der Länge des Femurs entsprach. Die femorale Kortikalis wurde an der Diaphyse und der Epiphyse in der Nähe des Kniegelenks beurteilt. Der trabekuläre Knochen wurde ebenfalls an der distalen Epiphyse analysiert. Die Analyse der Parameter für den kortikalen sowie trabekulären Knochen der Pfoten erfolgte im Bereich des Tarsus und umfasste im Referenzbereich den *Os cuboideum*, die *Ossa cuneiforma* und den *Os naviculare*. Die Bestimmung der BMD wurde in allen genannten Arealen an Femur und Pfote durchgeführt. Die vom Entwickler in die CTAn Software integrierten Algorithmen wurden für die Berechnung der Knochenmorphometrie-Daten aus dichotomisierten Projektionen verwendet. Die Dichotomisierung für das 2D-Scheiben-Modell zur Ermittlung kortikaler Knochenparameter erfolgte mit einem globalem Schwellenwert-Bereich von 64 bis 255 beziehungsweise von 75 bis 255 für das 3D-Modell zur Bestimmung der Parameter am trabekulären Knochen. Die drei-dimensionalen Rekonstruktionen der Röntgenprojektionen wurden abschließend in der CTVol Software angefertigt (Version 2.3.1.0).

### 4.3 Histologie und Immunhistochemie

Die Maus-Pfoten und Kniegelenke wurden durch Inkubation in EDTA-Lösung (Mediate, Burgdorf, Deutschland) über mehrere Wochen vollständig entkalkt. Die Proben wurden anschließend mittels organischer Lösungen mit aufsteigendem  $K_{OW}$ -Wert dehydriert und in Paraffin eingebettet. Die Anfertigung von seriellen Gewebeschnitten mit 3 bis 5  $\mu\text{m}$  Dicke erfolgte für die Pfoten in der Koronal- und für die Kniegelenke in der Transversalebene mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Für die nachfolgenden histolo-

gischen und immunhistochemischen Färbungen wurden die Schnitte in einer Limonen-Lösung (Carl Roth) entparaffiniert und anschließend in organischen bzw. wässrigen Lösungen mit absteigenden  $K_{OW}$ -Werten rehydriert.

Für die Untersuchung von Immunzell-Infiltraten und Gewebeschäden wurde die Färbung mittels Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Eosin (Carl Roth) nach einem Standardprotokoll durchgeführt (Cardiff et al., 2014). Zur Beurteilung von Veränderungen von Knorpelgewebe wurde die Färbung von Proteoglykanen durch Safranin O (Carl Roth) zusammen mit der Färbung durch Fast Green FCF angewendet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die Kolonisierung von murinem Gewebe durch GAS wurde mittels Immunhistochemie verifiziert. Die Gewebeschnitte wurden dafür nach Rehydrierung zunächst in TBS-T (50 mM TRIS-HCl [pH 7,6]; 150 mM NaCl; 0,2 % Tween; von Carl Roth) äquilibriert. Endogene Peroxidasen wurden anschließend durch 15 min Inkubation in 3 %  $H_2O_2$  inaktiviert (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Nach mehrmaligem Eintauchen in Leitungswasser wurden die Gewebeschnitte für 3 • 5 min in TBS-T gewaschen. Unspezifische Antikörper-

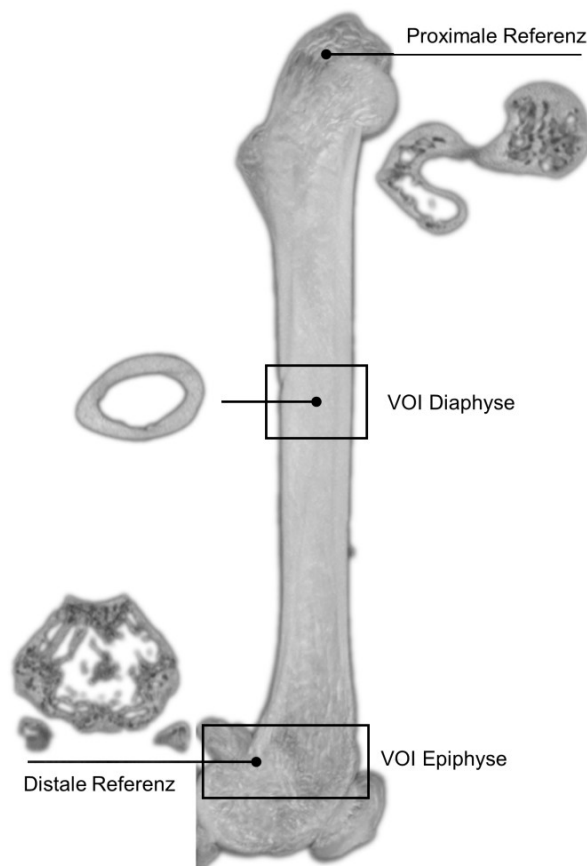


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Selektion der Referenz- und Analysen-Bereiche am Femur. Der Knochen wurde anhand der proximalen und distalen Referenz normiert, sodass für die VOIs immer ein Bereich, welcher 10 % der Gesamtlänge des Femurs entsprach, betrachtet wurde. VOI: *Volume of Interest*

---

Bindungsstellen wurden durch eine zweistündige Inkubation mit 5 % Kaninchen-Normalserum bei Raumtemperatur blockiert (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Nach Waschen in TBS-T erfolgte die Inkubation mit 0,5 µg/mL polyklonalem Ziege IgG anti-*Streptococcus pyogenes* Gruppe A Kohlenhydrat (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtekammer. Als Isotyp-Kontrolle wurde Ziegen IgG (Abcam) in der gleichen Konzentration verwendet. Am folgenden Tag erfolgte die Inkubation mit Kaninchen IgG anti-Ziege IgG Meerrettich-Peroxidase-Konjugat für 1 h bei Raumtemperatur (Invitrogen). Die enzymatische Farbreaktion wurde mittels DAB Substrat Kit initiiert (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) und nach 1 bis 10 min durch Waschen in TBS-T beendet. Die Gegenfärbung erfolgte durch Inkubation der Gewebeproben in Hämatoxylin. Die histologischen Schnitte wurden auf dem Axioplan 2 mikroskopiert und mittels der Axiocam fotografiert (Carl Zeiss).

### 4.4 Lipidomics

---

Die Extraktion und Quantifizierung von Eicosanoiden erfolgte durch Herrn Daniel Schultz an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald im Institut für Biochemie in der Arbeitsgruppe Metabolomics von Prof. M. Lalk. Das dafür bereitgestellte Probenmaterial wurde aus den unter Abschnitt 4.1 beschriebenen Tierversuchen generiert.

#### 4.4.1 Eicosanoid-Extraktion

---

Gefrorene Pfoten und Leber-Proben wurden in flüssigen Stickstoff eingetaucht und automatisiert in einer CP02 cryoPREP pulverisiert (Covaris, Woburn, MA, USA). Das resultierende Pulver wurde anschließend für die spätere Daten-Normalisierung gewogen. Es wurden unverzüglich 50 mg Material in eine Lösung bestehend aus 500 µL eiskaltem Methanol mit 0,1 % Butylhydroxytoluol, sowie 500 µL eiskaltem Reinstwasser gegeben. Für die Extraktion aus dem Leber-Pulver enthielt das Gemisch zudem 30 nM AUDA. Als interner Standard, bestehend aus deuterierten Referenzverbindungen, wurde jeder Probe 100 µL einer Mischung aus 12-HETE-d<sub>8</sub>, 13-HODE-d<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>-d<sub>4</sub>, Resolvin D1-d<sub>5</sub> und AA-d<sub>11</sub> beigelegt (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Für die Pfoten wurde ein zusätzlicher Lyse-Schritt mittels Homogenisierung in Lyse-Matrix B für 45 s bei 6 m/s im Fastprep™ durchgeführt (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). Die Leber-Proben wurden in 300 µL einer 10 M Natriumhydroxid-Lösung für 30 min bei 60 °C hydrolysiert. Direkt im Anschluss wurde 300 µL einer 1 M Natriumacetat-Lösung auf Eis zugegeben und der pH-Wert mit einer 10 M Essigsäure-Lösung auf 6 eingestellt. Danach erfolgte die Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) mit

---



Hilfe der Bond Elut Certify II Kartuschen (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Die SPE-Kartuschen wurden mit 3 mL Methanol konditioniert und dann mit 3 mL einer 0,1 M Natriumacetat-Lösung mit 5 % Methanol bei einem pH-Wert von 6 äquilibriert. Die Proben wurden auf die Kartuschen aufgetragen und anschließend mit 3 mL einer 50 % Methanol-Lösung gewaschen. Die Elution der Eicosanoide erfolgte durch Zugabe von 2 mL eines Hexan-Ethylacetat-Gemischs (3 zu 2 Teilen) mit 0,1 M Essigsäure.

### 4.4.2 Tandem-Massenspektrometrie

---

Die Proben-Extrakte wurden unter kontinuierlichem Stickstoff-Strom mittels TurboVap<sup>®</sup> getrocknet (Biotage, Uppsala, Schweden) und in 70 µL einer 80 % (Leber) beziehungsweise einer 25 % Acetonitril-Lösung (Pfoten) rekonstituiert. Die Auftrennung der komplexen, biologischen Proben erfolgte mittels HPLC (1200 Serie, Agilent) auf einer NX-C18 Säule von 100 mm Länge und 2 mm Durchmesser und einer äquivalenten Vorsäule (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Das Säulenmaterial der stationären Phase hatte eine Porengröße von 3 µm. Die mobile Phase bestand aus Laufmittel A (0,05 % wässrige Essigsäure-Lösung) und Laufmittel B (Acetonitril) bei einer Flussrate von 0,4 mL/min. Die Eluat-Zusammensetzung war zu Beginn der Chromatographie 25 % B, wurde innerhalb von 10 min auf 30 % B und nach 15 min auf 70 % B erhöht. Bis 20 min wurde B auf 100 % gesteigert, was für 5 min aufrechterhalten wurde. Nach einer Laufzeit von insgesamt 31 min wurde das System wieder auf die Ausgangsbedingungen eingestellt.

Die an die HPLC gekoppelte, dynamische *multiple reaction monitoring* Tandemmassenspektrometrie (MS/MS-)Analyse wurde auf dem Agilent 6460 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit Elektronenspray-Ionisation im Negativmodus realisiert. Die Ionenquelle wurde mit den in Tabelle 4 aufgelisteten Parameter betrieben. Für die absolute Quantifizierung wurden für die MS/MS zertifizierte, externe Standards beziehungsweise die unter 4.4.1 genannten deuterierten, internen Standards genutzt (Quadratische Kalibrationskurve mit 1/x-Gewichtung). Der Bestimmungsbereich war 0,5 bis 50 ng/mL für HETEs und EETs; 0,25 bis 50 ng/mL für Prostaglandine und 5 bis 1000 ng/mL für Vorläufer-Verbindungen. Eicosanoide für die keine für Massenspektrometrie zertifizierten, externen Standards erhältlich waren (HEPE, HODE, HDHA) wurden auf die Signalstärke der internen Standards normiert und die Quantitäten in den Abbildungen als arbiträre Einheiten (AU) angegeben. Die Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis Software und die Agilent Mass Hunter Quantitative Analysis Software wurden für die Auswertung der MS/MS-Daten verwendet (Version B.07.00).

---

Tabelle 4: Auflistung der Ionenquellen-Parameter für die MRM-MS/MS-Analyse von Eicosanoiden.

Parameter	Wert
Gas-Temperatur	310 °C
Gas-Flussrate	13 L/min
Zerstäuber-Druck	276 kPa
Mantelgas-Temperatur	400 °C
Mantelgas-Flussrate	12 L/min
Kapillar-Spannung	3500 V
Zerstäuberdüsen-Spannung	1600 V
Verstärker-Spannung	400 V

#### 4.5 Serologie

Für die Bestimmung von Maus IgG anti-GAS Titern wurde ein eigens entwickelter *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) verwendet. Zunächst wurden  $10^8$  KBE GAS in 1 mL PBS für 5 min in einer Bestrahlungskammer (Bio-Rad Laboratories) mit UV-Licht behandelt. Die vollständige Inaktivierung der Bakterien wurde durch Ausstrich auf Blut-Agar überprüft. Nach Bestrahlung wurde die Suspension für 10 min bei 4000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 50 mM Carbonat-Bicarbonat-Puffer bei pH 9,4 aufgenommen und 100  $\mu$ L der Suspension mit  $10^7$  UV-inaktivierten Bakterien wurde für die Beschichtung auf 96-Well Platten (Invitrogen) über Nacht bei 4 °C eingesetzt. Unspezifische Protein-Bindungsstellen wurden nach dreimaligem Waschen mit 200  $\mu$ L PBS-T (PBS; 0,05 % Tween 20) am Folgetag mit 200  $\mu$ L 2 % BSA in PBS für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Plasma-Proben aus den Tierversuchen wurden 1:800 in Probenpuffer (PBS, 1 % BSA) verdünnt und zu jeweils 100  $\mu$ L für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde 100  $\mu$ L polyklonales Kaninchen F(ab')<sub>2</sub> anti-Maus IgG Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (Bio-Rad) in einer Konzentration von 0,5  $\mu$ g/mL eingesetzt. Für die enzymatische Farbreaktion wurde das TMB Substrate Kit verwendet (BioLegend, San Diego, CA, USA). 100  $\mu$ L Substratlösung wurde für 10 min inkubiert mit anschließendem Abstoppen der enzymatischen Katalyse durch Zugabe von 100  $\mu$ L einer 0,5 M Schwefelsäure-Lösung. Die Extinktionswerte wurden durch Messung mit dem automatisierten Platten-Fotometer HT III ermittelt (Anthos Mikrosysteme, Krefeld, Deutschland).

Zur Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen in Plasma-Proben wurde das LEGENDplex Mouse Inflammation Panel Kit verwendet (BioLegend), in dem Capture-Beads und Detektionsantikörper zur Immobilisierung sowie Quantifizierung von Interleukin (IL-)1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, CCL2, IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und GM-CSF implementiert waren. Das Protokoll wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Datenakquirierung erfolgte auf dem FACSVerse Durchflusszytometer (Becton Dickinson), welches mit der FACSSuite Software (Version 1.0.6.5230) betrieben wurde. Die Auswertung der Daten wurde in der LEGENDplex Software ausgeführt (BioLegend, Version 8.0).

### 4.6 *In vitro*-Krankheitsmodelle

#### 4.6.1 Primärkultur und Infektion synovialer Fibroblasten

---

Die synovialen Fibroblasten (*fibroblast-like synoviocytes*, FLS) wurden aus den Pfoten von naiven B6 Mäusen oder naiven beziehungsweise mit Rinder-Kollagen Typ II immunisierten F1 Mäusen isoliert (siehe 4.1.4). Zunächst wurden die Mäuse narkotisiert und geopfert. Das Fell wurde dann mit 70 % Ethanol getränkt. Die Hinter- und Vorderläufe wurden entnommen und in kaltes FLS-Kultur-Medium überführt, bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 10 % fetales Kälberserum, 5 IE/mL Penicillin, 5  $\mu$ g/mL Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 4500 mg/L D-Glucose (Life Technologies), 10 mM HEPES und 1 mM Natriumpyruvat (Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland). Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Haut wurde vollständig von den Pfoten entfernt und die Sehnen der Finger beziehungsweise Zehen wurden durchtrennt. Nach der Entfernung jeglichen Weichgewebes wurden die Pfoten durch Überdehnen der Handwurzel- oder Sprunggelenke von den Röhrenknochen abgetrennt. Im Anschluss wurden die Pfoten von jedem individuellen Tier jeweils in einer Verdauungslösung aus Kollagenase Typ IV (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada) in FLS-Kultur-Medium ohne Serum bei 37 °C und leichter Agitation für 1 h verdaut. Organ-Trümmer wurden über einen Filter mit 70  $\mu$ m Maschengröße entfernt (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) und die Zellen wurden in FLS-Kultur-Medium aufgenommen, wodurch die enzymatische Reaktion beendet wurde. Nach Ermittlung der Zellzahlen in einem Neubauer-Hämozytometer (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) wurden etwa  $10^6$  FLS in einer T75 Zellkulturflasche eingesät (TPP, Trasadingen, Schweiz) und bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Im Falle der aus naiven oder immunisierten F1 Mäusen isolierten FLS wurden  $10^5$  Zellen für die durchflusszytometrische Einzellzell-Analyse verwendet (siehe Absatz 4.6.2).

---

Für die Expansion und das Passagieren der Kulturen wurden die Zellen mit 5 mL warmen PBS gewaschen und durch Inkubation mit 1 mL einer Trypsin-EDTA-Lösung (Life Technologies) für 3 min im Brutschrank abgelöst. Der tryptische Verdau wurde durch Zugabe von FLS-Kultur-Medium abgestoppt. Die Anreicherung von FLS aus der heterogenen Kultur wurde durch Anwendung von CD45 S-pluriBead (pluriSelect, Leipzig, Deutschland) und der damit einhergehenden Depletion von Leukozyten nach dem Größenausschluss-Prinzip realisiert. Die Überprüfung der FLS-Reinheit ist unter Absatz 4.6.2 beschrieben. Die FLS wurden abermals bis zur vollständigen Konfluenz expandiert und nach tryptischen Verdau sowie dreimaligem Waschen mit PBS zu  $3 \cdot 10^5$  Zellen in FLS-Infektionsmedium – bestehend aus  $\alpha$ MEM mit 10 % fetalem Kälberserum – auf 6-Well-Platten ausgesät. Am nachfolgenden Tag wurden die FLS-Kulturen mit  $3 \cdot 10^6$  KBE GAS für 4, 6, 8, 12 oder 24 h infiziert. Nicht-infizierte FLS und FLS, die mit UV-inaktivierten Bakterien (siehe Absatz 4.5) stimuliert wurden, dienten als Kontrollen. Für die nachfolgende Analysen mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurden die Zellen nach Entfernung des Infektionsmediums mit 700  $\mu$ L RLT Puffer versetzt (Qiagen, Hilden, Deutschland) und durch Abschaben sowie kräftiges Schütteln lysiert. Das Lysat und das Infektionsmedium wurden unverzüglich in flüssigen Stickstoff gegeben und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80$  °C asserviert. Für die durchflusszytometrische Einzelzell-Analyse wurden die Zellen gewaschen und mittels tryptischen Verdau von der Zellkulturplatte abgelöst.

### 4.6.2 Durchflusszytometrische Einzelzell-Analyse

---

Alle hier genannten Antikörper wurden von BioLegend bezogen. Zur Bestimmung der leukozytären Zusammensetzung der aus Pfoten von F1 Mäusen isolierten, heterogenen Zellgemische wurde ein Antikörper-Cocktail aus anti-B220:APC (Klon RA3-6B2), anti-CD3 $\epsilon$ :PE/Cy-7 (145-2C11) und anti-CD45:FITC (30-F11) verwendet. Dafür wurden die Zellen zunächst bei 300 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und anschließend in autoMACS Running Buffer resuspendiert (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). TruStain FcX (BioLegend) und fetales Kälberserum wurden zum Blockieren von CD16, CD32 und weiterer, unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen für 10 min auf Eis angewendet. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem Antikörper-Cocktail für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe von 1,4 mL Running Buffer wurden die Zellen gewaschen, zentrifugiert und dann für die durchflusszytometrische Einzelzell-Analyse in 200  $\mu$ L Running Buffer resuspendiert.

Tabelle 5: Auflistung der Antikörper für die durchflusszytometrische Einzelzell-Analyse von FLS.

Antikörper:Fluorophor	Klon	Zellpopulation
CD45:FITC	30-F11	Hämatopoetische Zellen
CD11b:PE	M1/70	Hämatopoetische Zellen
CD31:APC	390	Endothelzellen
CD54(ICAM-1):APC/Fire 750	YN1/1.7.4	FLS
CD90.2:BV605	30-H12	FLS
CD106(VCAM-1):PerCP/Cy5.5	429	FLS
Gr-1:PE/Cy5	RB-8C5	FLS/ Hämatopoetische Zellen

Für die Bestimmung der Effizienz der Leukozytendepletion und der Bestimmung der FLS-Expressionsmuster wurde das in Tabelle 5 aufgelistete Antikörper-Panel verwendet. Die Markierung der Oberflächenproteine erfolgte wie oben beschrieben. Zur Diskriminierung von toten Zellen wurde kurz vor der Messung DAPI in einer finalen Konzentration von 0,1 µg/mL eingesetzt. Die Einzelzell-Analyse erfolgte am FACS Aria IIIu Durchflusszytometer unter Verwendung der FACSDiva Software Version 8.0.2 (Becton Dickinson). Die Datenauswertung wurde mit der FlowJo Software Version 10.7.1 durchgeführt (FlowJo, Ashland, OR, USA). Alle CD31<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> Zellen wurden als FLS definiert wodurch die Reinheit der Kulturen überprüft werden konnte (Abbildung 6). Zur Ermittlung der Expressionsmuster von GAS-infizierten FLS wurde die in Abbildung 7 dargestellte Strategie für das hierarchische Gating eingesetzt.

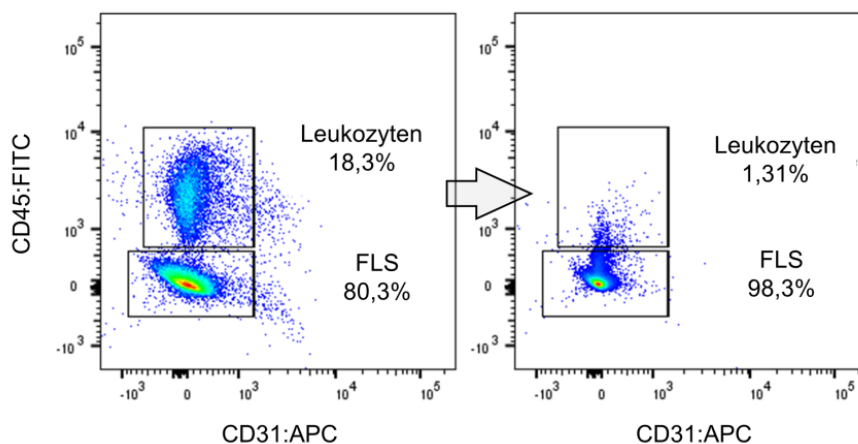


Abbildung 6: Dichtediagramme der Expression der Oberflächenmarker CD45 und CD31 durch Zellen aus den synovialen Isolaten vor (links) und nach (rechts) Depletion der Leukozyten.

Für die explorative Beurteilung der Zusammensetzung von FLS aus Sub-Populationen wurde der in FlowJo integrierte Algorithmus für maschinelles Lernen und Clusterfindung *t-distributed stochastic neighbor embedding* (tSNE) verwendet. Der exakte tSNE-Algorithmus wurde nach Downsampling der Rohdaten aus den Einzelproben auf jeweils 5.000 Messereignisse auf einen Datensatz verketteter Einzeldateien angewendet. Die nichtlineare Reduktion der Multi-Dimensionalität erfolgte in maximal 1.000 Iterationen, wurde jedoch unter Verwendung von opt-SNE bei Überspitzung der Gradienten-Entscheidungen unter Berücksichtigung der Kullback-Leibler-Divergenz frühzeitig abgebrochen (Belkina et al., 2019). Die Einteilung in konkrete FLS-Subpopulationen erfolgte anhand des tSNE-Plots durch beaufsichtigtes Clustering.

#### 4.6.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die RNA aus den FLS-Kulturexperimenten wurde unter Verwendung des RNeasy Plus Mini Kit nach den Angaben des Herstellers isoliert (Qiagen). Die RNA-Qualität und -Konzentration

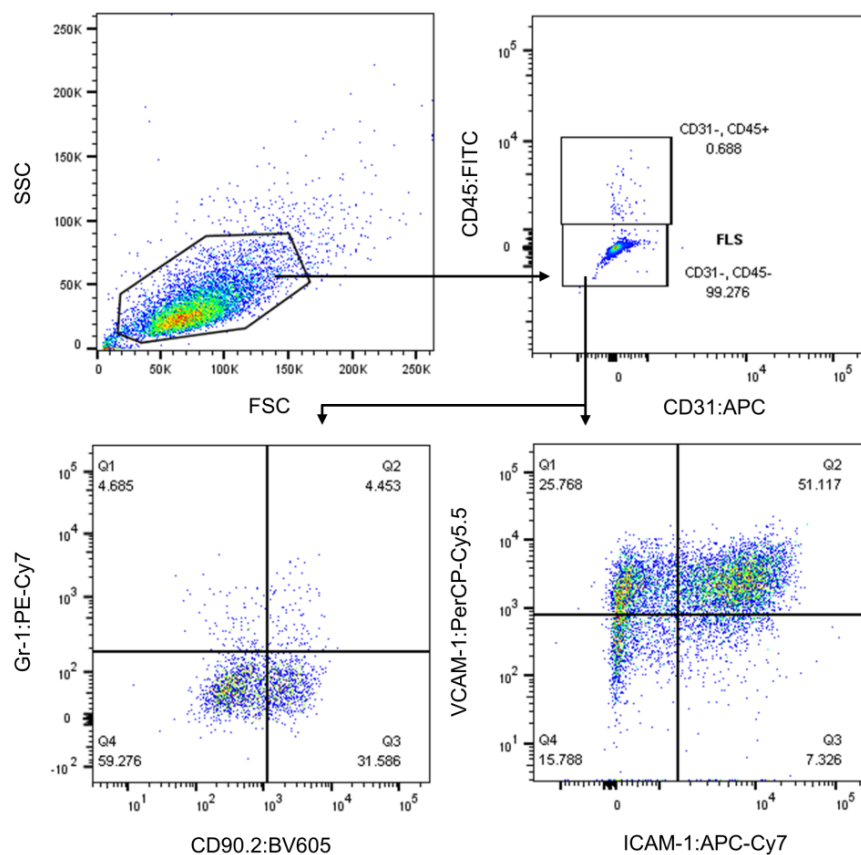


Abbildung 7: Strategie für das hierarchische Gating von synovialen Fibroblasten (FLS). Oben links: Dichtediagramm für *forward scatter* (FSC) und *sideward scatter* (SSC). Oben rechts: Selektion der FLS aus der vitalen CD31<sup>-</sup> CD45<sup>+</sup> Zellpopulation. Unten links: Expression von CD90.2 und Gr-1 durch FLS. Unten rechts: Expression von IVAM-1 und VCAM-1 durch FLS.

Tabelle 6: Temperatur-Sequenz für die RT-PCR.

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zeit	10 min	120 min	5 min	anhaltend

wurden spektralphotometrisch mit dem NanoDrop ND100 gemessen (Thermo Fisher Scientific). Für die Amplifikation und Synthese der cDNA mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase- Kettenreaktion (RT-PCR, Kit von Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) wurden 500 ng RNA eingesetzt. Die enzymatische Reaktion wurde mit den in Tabelle 6 gelisteten Parametern auf einem Gradienten-Thermoblock durchgeführt (Eppendorf, Hamburg, Germany). Für die qPCR wurden TaqMan Primer-Paare und mit 6-Carboxyfluorescein gekoppelte Sonden verwendet (Applied Biosystems).

Folgende Assays wurden für die revers transkribierte mRNA verwendet: *Ccl2* (Assay ID: Mm00441242\_m1), *Cxcl2* (Mm00436450\_m1), *Il6* (Mm00446190\_m1), *Il10* (Mm00439614\_m1), *Mmp1a* (Mm00473485\_m1), *Mmp13* (Mm00439491\_m1), *Opg* (*Tnfrsf11b*; Mm01205928\_m1), *Rankl* (*Tnfsf11*; Mm00441906\_m1), *Tgfb1* (Mm01178820\_m1) und *Tnf* (Mm00443258\_m1) mit *Gapdh* (Mm05724508\_g1) als Referenz-Haushaltsgen. Alle Reaktionen wurden mit Hilfe des TaqMan Gene Expression Master Mix nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und am Applied Biosystems 7900 Fast Real-Time PCR System analysiert. Zunächst wurde die Temperatur vollautomatisiert auf 95 °C erhöht und für 15 min gehalten wodurch die Aktivierung der Taq-Polymerase garantiert wurde. Im Anschluss erfolgten 45 Amplifikationszyklen mit Aufschmelzen der cDNA durch 15 s Inkubation bei 95 °C und dem Primer-Annealing sowie Elongation der PCR-Produkte durch 1 min Inkubation bei 60 °C. Die Detektion des Fluoreszenz-Signals erfolgte am Ende jedes Zyklus. Die Ermittlung der relativen Genexpression erfolgte über die Normierung der Ct-Werte gegen die PBS-Kontrolle und das Referenzgen nach der  $2 \cdot (\Delta\Delta Ct)^{-1}$  Methode.

#### 4.6.4 Quantifizierung sekretierter Zytokine

Die Quantifizierung sekretierter Zytokine aus unverdünntem Infektionsmedium erfolgte an den Überständen der unter Absatz 4.6.1 beschriebenen FLS-Kulturen. Das Chemokin CXCL2 wurde mittels ELISA nach Herstellerangaben quantifiziert (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). CCL2, IL-6 und TNF $\alpha$  wurden mittels LegenPlex Assay (BioLegend) in Analogie zu den Beschreibungen unter Absatz 4.5 analysiert.

## 4.7 Statistik

---

Die Visualisierung der Daten und die statistische Auswertung erfolgten mit R (Version 3.5.1) in der R Studio Software (Version 1.2.5033). Die Analyse der Überlebens- und Inzidenz-Wahrscheinlichkeiten unterschiedlicher Gruppen erfolgte unter Anwendung des Logrank-Tests. Der Zusammenhang bivariabler, intervallskalierender Merkmale wurde unter Zuhilfenahme der Pearson Produkt-Moment-Korrelation ( $R$ ) bewertet. Bei  $R \geq 0,6$  wurde die Korrelation entsprechend den Empfehlungen aus der Literatur als stark interpretiert (Taylor, 1990). Die statistische Analyse univariater Stichproben mit mindestens zwei korrespondierenden, qualitativen Variablen (*i.e.* Gruppen) erfolgte, mit wenigen Ausnahmen, unter der Annahme nicht-normalverteilter Datenmengen. Die Mediane wurden in Boxplots dargestellt mit Visualisierung der Interquartilsabstände (IQR) und Whiskers, welche die Bereiche um das 1,5-fache der IQR anzeigten. Der Vergleich multipler Gruppen erfolgte unter Anwendung des Kruskal-Wallis Tests kombiniert mit dem *post hoc* Mann-Whitney  $U$  Test für Einzelvergleiche und einer  $p$ -Wert-Korrektur mit der Bonferroni-Holm-Methode. Für den Vergleich von Medianen mit einem nicht-variablen Standardwert wurde der Einstichproben-Wilcoxon-Rangsummen-Test verwendet. Für Stichproben geringen Umfangs ( $n = 3$ ) wurde auf Grund fehlender, kritischer  $U$ -Werte der  $t$ -Test eingesetzt. Der exakte Fisher-Test wurde zur Überprüfung der Unabhängigkeit von  $m \times n$  Kontingenztafeln verwendet. Die Signifikanzniveaus für die Ablehnung der Nullhypothese wurden in dieser Arbeit für  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$  und  $***p < 0,001$  deklariert.



## V. ERGEBNISSE

### 5.1 Die Septische Arthritis war mit der Infektion von Gelenken und mit der Infiltration von periartikulärem Gewebe mit neutrophilen Granulozyten assoziiert

---

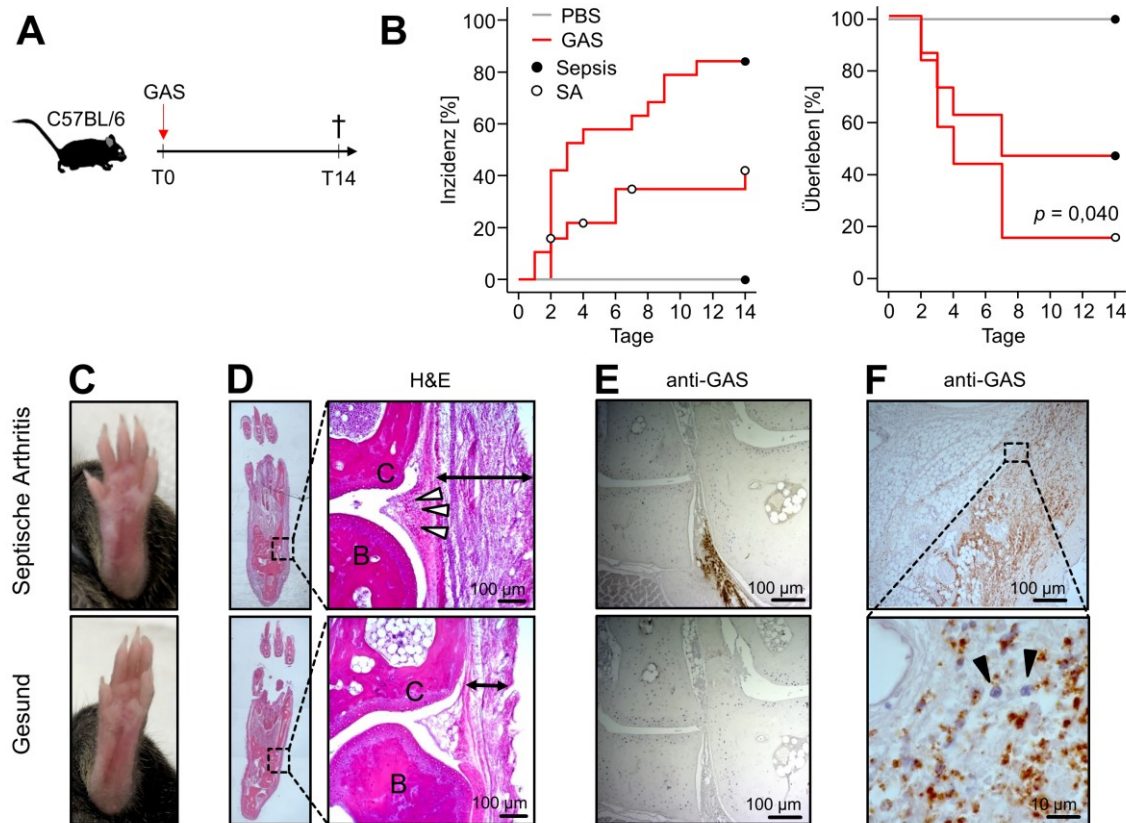
Um zu untersuchen, inwieweit Gruppe A Streptokokken (GAS) in der Lage sind, Sepsis zu induzieren, wurden 20 bis 22 Wochen alte männliche C57BL/6J Mäuse (B6) intravenös mit dem Stamm AP1 vom M1 Serotypen infiziert und für maximal 14 Tage beobachtet (**Abbildung 8A**). Das Auftreten und die Schwere der Sepsis wurde in den Tieren durch Anwendung eines Scoring-Systems für die Beurteilung von makroskopisch erkennbaren Anzeichen klinischer Belastung bewertet (siehe 4.1.6 und Tabelle 2, Materialien und Methoden). Diesem System entsprechend wurde ein Score von  $\geq 5$  als Sepsis-Inzidenz erachtet. Die Mortalität wurde anhand von strikt definierten, humanen Endpunkten gedeutet, an denen die weitere Beobachtung der Tiere, auf Grund einer zu hohen Belastung und der damit einhergehenden Gefahr eines tödlichen Schocks, nicht mehr vertretbar war. In diesem Zusammenhang wurden Mäuse mit einem Sepsis Score von  $\geq 25$  frühzeitig erlöst.

Bei Applikation einer Dosis von  $5 \cdot 10^5$  Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) GAS, wurde innerhalb des Beobachtungszeitraums bei über 80 % (16/19) der Tiere eine Sepsis identifiziert (**Abbildung 8B**, links). Das Krankheitsbild war bei den Tieren durch ein ungepflegtes Erscheinungsbild und atypisches Spontanverhalten in Form von Hypomotilität oder Apathie in unterschiedlich starker Ausprägung gekennzeichnet. Interessanterweise wurden als Folge lokaler Entzündungsreaktionen bei etwa 40 % (7/19) der Tiere Rötungen und Schwellungen an den Pfoten identifiziert, die als Anzeichen einer septischen Arthritis (SA) gewertet wurden (**Abbildung 8B**, links & **Abbildung 8C**). Das Auftreten von Schwellungen ging, im Vergleich zu Mäusen ohne erkennbare Anzeichen einer SA, mit einer signifikanten Reduktion der Überlebenschance von 50 % auf unter 20 % einher (**Abbildung 8B**, rechts).

Bei Applikation einer leicht reduzierten, bakteriellen Dosis von  $4 \cdot 10^5$  KBE kam es erstaunlicherweise zu einer Reduktion der SA-Inzidenz auf unter 20 % wobei 90 % der Tiere bis zum Ende der Beobachtungszeit überlebten (**Abbildung A1A**). Durch eine weitere Reduktion der Infektionsdosis auf  $1 \cdot 10^5$  KBE GAS waren keine klinische Anzeichen einer Belastung mehr feststellbar. Bei diesen Tieren wurde keine SA induziert und jedes Einzelne überlebte bis zum Ende der Beobachtungszeit (**Abbildung A1A & B**). In **Abbildung A1C** ist gezeigt, dass Mäuse, die mit der höchsten Dosis infiziert wurden und bis zum Ende der Beobachtungszeit überlebten, eine Immunantwort gegen das Pathogen in Form von GAS-spezifischen IgG

---

entwickelten. Im Falle der Tiere mit schwerwiegenden Krankheitsverläufen war die Mortalität wohl durch eine ungenügende Beseitigung von GAS bedingt, was zu einer tödlichen Infektion von Blut, Leber und Milz führte. Zwar war die Anzahl von vitalen Bakterien, die aus diesen Wirtskompartimenten isoliert wurden, bei Anwendung von  $5 \cdot 10^5$  KBE GAS tendenziell am höchsten, jedoch erreichte der Anstieg beim Vergleich mit den niedrigeren Dosen auf Grund der hohen Varianz in der Datenmenge nicht die statistische Signifikanz (**Abbildung A1D**).



**Abbildung 8: Eine Infektion mit Gruppe A Streptokokken (GAS) führte bei Mäusen zu einer aggressiv vorschreitenden, septischen Arthritis (SA).** Die Erkrankung war mit der Kolonisierung von periartikulärem Weichgewebe mit Bakterien assoziiert und durch eine damit einhergehende Infiltration von Immunzellen gekennzeichnet. **(A)** Experimentelles Schema für die Infektion von 20 bis 22 Wochen alten männlichen C57BL/6J Mäusen mit  $5 \cdot 10^5$  KBE GAS. **(B)** Links: Kaplan-Meier-Schätzer der Inzidenz-Funktion für Sepsis und SA infizierter Tiere (GAS,  $n = 19$ ) und der nicht-infizierten Kontrollen (PBS,  $n = 4$ ). Rechts: Überlebenswahrscheinlichkeit von Mäusen mit Symptomen der SA ( $n = 7$ ) und Mäusen ohne Anzeichen einer SA ( $n = 12$ ). Weiße und schwarze Punkte stellen jeweils zensierte Daten dar. **(C)** Repräsentative Abbildungen einer geschwollenen Pfote (oben) im Vergleich mit einer gesunden Pfote (unten). **(D)** Mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Gewebe-Schnitte in der Frontalebene von Pfoten zeigen, dass die mit der Infektion assoziierte Schwellung die Folge von infiltrierenden Wirtszellen in das subkutane (schwarzer Pfeil) und das periartikuläre (weiße Pfeilspitzen) Weichgewebe war. Oben: Pfote, betroffen von SA. Unten: gesunde Pfote. B: *bone* (Knochen), C: *cartilage* (Knorpel). **(E,F)** Die Visualisierung von Gruppe A Streptokokken Antigen mittels Immunhistochemie indizierte die bakterielle Kolonisierung von Weichgewebe in den Pfoten. **(E)** Die Areale um die Tarsalgelenke waren mit GAS infiziert. Oben: repräsentative Abbildung der anti-GAS-Färbung. Unten: repräsentative Abbildung der Isotypkontrolle. **(F)** Kolonisierende Bakterien waren im Subkutan-Gewebe von Pfoten mit infiltrierenden, neutrophilen Granulozyten vergesellschaftet (schwarze Pfeilspitzen). Die Immunzellen wurden anhand ihrer Zellkern-Morphologie mit Hilfe der Hämatoxylin-Färbung differenziert. Die Abbildungen der histologischen Schnitte sind repräsentativ für Mäuse mit makroskopisch erkennbaren Schwellungen ( $n = 5$ ).

Zur Charakterisierung der histopathologischen Eigenheiten der SA wurden Dünnschnitte von geschwollenen Pfoten mittels Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Wie in **Abbildung 8D** deutlich zu erkennen ist, waren die makroskopisch auftretenden Entzündungszeichen das Resultat der massiven Infiltration von subkutanem und periartikulärem Weichgewebe durch Wirtszellen. Um zu überprüfen, ob die lokale Inflammation mit einer bakteriellen Kolonisierung der Gelenkregionen korrespondierte, wurde ein Protokoll zur immunhistochemischen *in situ*-Detektion von Gruppe A Kohlenhydraten angewandt. Folglich konnte gezeigt werden, dass GAS das Mikromilieu um die tarsalen Gelenke infizierte (**Abbildung 8F**). In Anbetracht des kurzen Beobachtungszeitraums und dem rapiden Fortschreiten der GAS-induzierten Erkrankung wurde vermutet, dass die lokale Infektion zur Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems führte. In diesem Zusammenhang wurde bei der weiteren histologischen Analyse festgestellt, dass es sich bei den infiltrierenden Wirtszellen um neutrophile Granulozyten handelte, welche im infizierten Gewebe mit GAS vergesellschaftet waren (**Abbildung 8F**). Diese Subpopulation der Leukozyten wurde in der Hämatoxylin-Färbung anhand ihrer segmentierten Zellkern-Morphologie identifiziert.

Als nächstes wurde mit Hilfe von mikro-computertomographischen ( $\mu$ CT) Morphometrie-Analysen an Femora und Pfoten untersucht, ob GAS Veränderungen der trabekulären beziehungsweise kortikalen Knochenstruktur induzierte. In **Abbildung A2** ist eine Auswahl an Parametern für die quantitative Beurteilung der Morphologie des Knochens dargestellt. Überraschenderweise wurde die Knochenstruktur weder in der femoralen Epiphyse noch im Tarsus durch die GAS-Infektion beeinflusst.

Zusammengenommen wurde hier ein neu etabliertes Modell für die GAS-induzierte Sepsis und SA dargelegt. Dieser Teil der Experimente zeigte, dass sich die SA durch eine vergleichsweise erhöhte Mortalität im Zuge eines aggressiv voranschreitenden Krankheitsverlaufs auszeichnete. Die massive Entzündung im Mikromilieu der Gelenke war das Ergebnis einer lokalen Infektion sowie der damit einhergehenden Infiltration durch neutrophile Granulozyten. Die Entzündungsreaktionen waren jedoch nicht stark genug ausgeprägt, um pathologische Veränderungen der Knochenstruktur hervorzurufen.

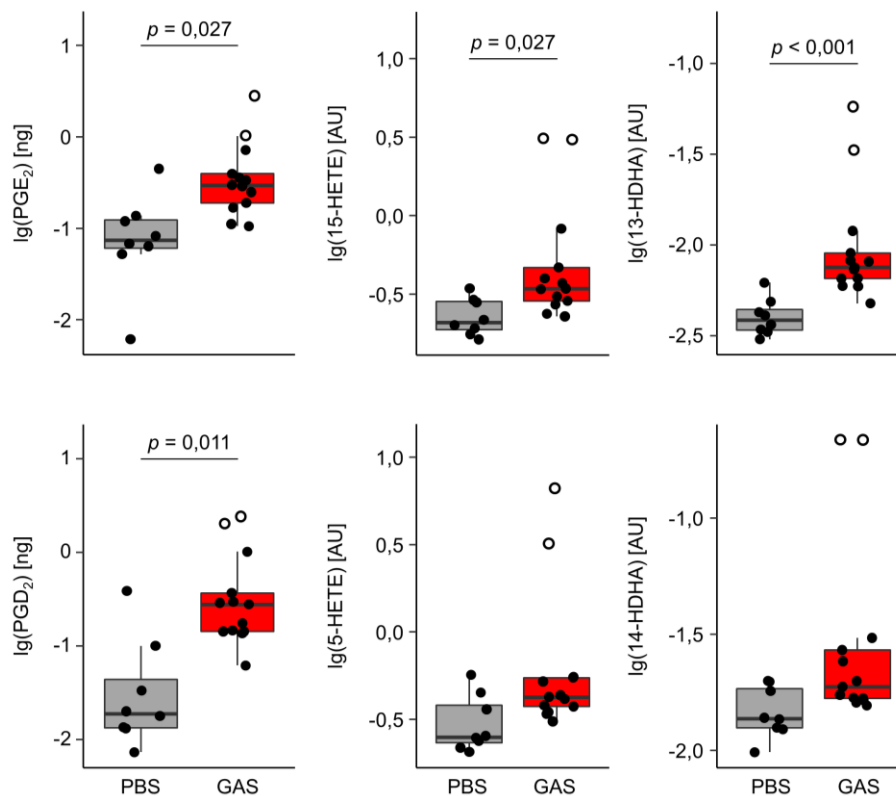
### **5.2 GAS verursachte die erhöhte Produktion von Eicosanoiden in den Pfoten**

---

Um zu überprüfen, ob Eicosanoide als wesentliche Vermittler der Immunaktivierung während einer Streptokokken-Infektion agieren, wurden Lipidextrakte aus Pfoten infizierter B6 mittels Tandem-Massenspektrometrie untersucht. In der Tat führte die GAS-Infektion zu einer er-

---

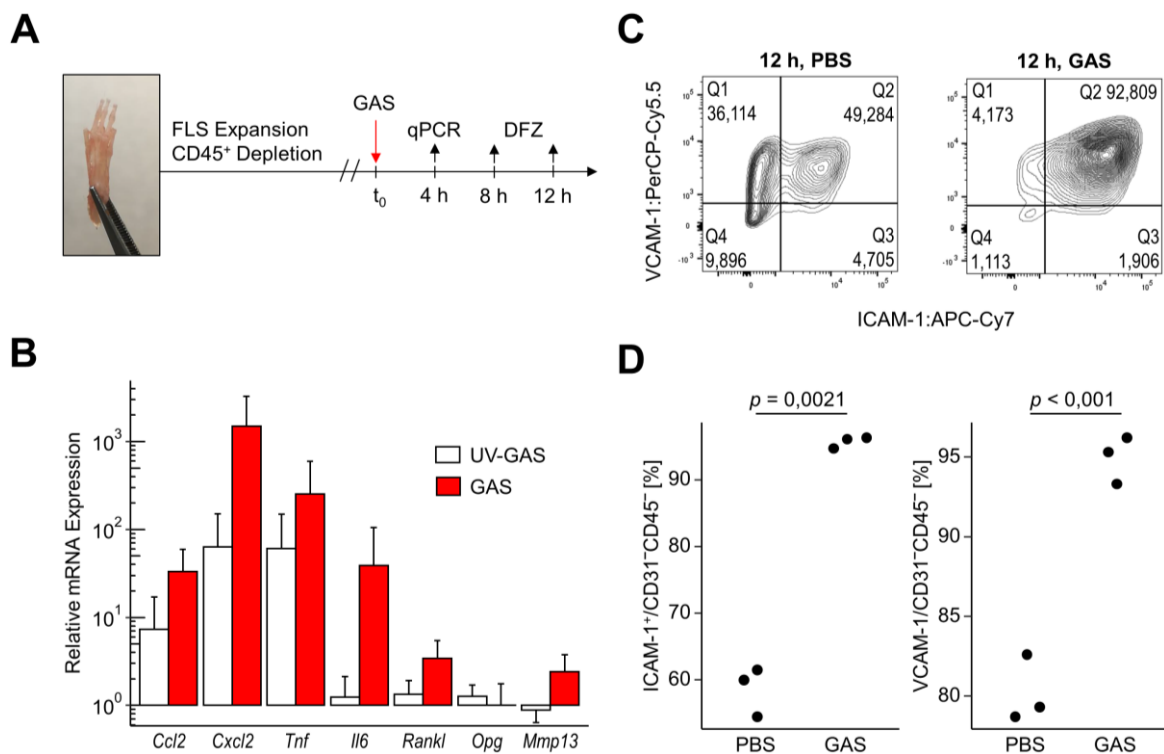
höhten Aktivität von Cyclooxygenasen im Gewebe und folglich zu einer ausgeprägten Überproduktion der pro-inflammatorischen Prostaglandine (PG) $E_2$  und  $D_2$  (**Abbildung 9**). Darüber hinaus induzierte GAS in ähnlicher Manier eine signifikant erhöhte, durch Lipoxygenasen katalysierte Umsetzung von Arachidonsäure zu 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE). Zudem wurde festgestellt, dass 5-HETE im Vergleich zur PBS-Kontrolle in tendenziell erhöhten Mengen vorlag, wobei dieser Unterschied jedoch statistisch nicht signifikant war. Abschließend wurden signifikant beziehungsweise tendenziell erhöhte Quantitäten von 13-Hydroxydocosahexaensäure (HDHA) oder 14-HDHA als Folge der GAS-Infektion ermittelt (**Abbildung 9**). Diese stabilen Stoffwechselprodukte wurden stellvertretend für die GAS-induzierte Überproduktion der instabilen DHA quantifiziert. Interessanterweise korrespondierten die Ausreißer der hier gezeigten Eicosanoid-Werte mit Proben, die aus Tieren mit Symptomen der septischen Arthritis generiert wurden. Zusammenfassend zeigen die Daten aus den Lipidomics-Analysen, dass eine GAS-Infektion zur Überproduktion von Eicosanoiden in den Pfoten, insbesondere bei Tieren mit SA, führte.



**Abbildung 9: GAS induzierte die Überproduktion von Eicosanoiden in den Pfoten von infizierten Mäusen.** (A) Die Pfoten von C57BL/6J Mäusen wurden homogenisiert und die Eicosanoide wurden mittels HPLC-MS/MS unter Verwendung von *dynamic multiple reaction monitoring* analysiert. Die Proben von infizierten Tieren (GAS, n = 13) zeigten signifikant erhöhte Mengen von Prostaglandin (PG) $E_2$ , PGD $_2$ , 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE) und 13-Hydroxydocosahexaensäure (13-HDHA) im Vergleich mit Proben aus nicht-infizierten Kontroll-Tieren (PBS, n = 8). Die weißen Punkte repräsentieren Pfoten, die Symptome einer septischen Arthritis aufwiesen. Ig: dekadischer Logarithmus, AU: arbiträre Einheiten.

### 5.3 Synoviale Fibroblasten induzierten nach GAS-Infektion die Überexpression von Mediatoren für die Rekrutierung und die Retention von Immunzellen

In Anbetracht des Vermögens von GAS periartikuläres Gewebe zu infizieren, wurde als Nächstes untersucht, inwieweit die Synovialmembran zur Induktion von SA und der damit einhergehenden Entzündungsreaktionen beiträgt. Dafür wurden zunächst synoviale Fibroblasten (*fibroblast-like synoviocytes*, FLS) – welche die dominante Zellpopulation in der Synovia darstellt – aus B6 Mäusen isoliert. Die *in vitro* GAS-Infektion erfolgte in einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 10 für 4, 8 oder 12 h (**Abbildung 10A**). Die Genexpression-Analyse von FLS, die für 4 h infiziert wurden, ergab eine 30- beziehungsweise 1.000-fache Erhöhung der Transkription der Gene *Ccl2* und *Cxcl2*, die für Chemokine codieren



**Abbildung 10: Synoviale Fibroblasten (FLS) induzierten nach GAS-Infektion die Überexpression von Chemokinen, pro-inflammatorischen Zytokinen und Integrin-Liganden. (A)** Experimentelles Design des *in vitro* Krankheitsmodells. Die FLS wurden aus den Maus-Pfoten durch den Verdau mit Kollagenase Typ IV isoliert und nach Expansion mittels Depletion von Leukozyten angereichert. GAS wurde mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 10 in die FLS-Kultur eingebracht. DFZ: durchflusszytometrische Einzelzell-Analyse. **(B)** Die relative mRNA Expression wurde mittels qPCR vier Stunden nach Beginn der GAS-Infektion ermittelt. Die Ct-Werte wurden über die  $2 \cdot -(\Delta\Delta Ct)^{-1}$  Methode auf nicht-infizierte FLS (PBS) und das Referenzgen *Gapdh* normiert. Die Balkendiagramme zeigen das arithmetische Mittel und die positive Standardabweichung. Im Graphen sind die Expressionsniveaus von infizierten Zellen (GAS, n = 4) und von FLS, die mit einer äquivalenten Anzahl UV-inaktivierter Bakterien stimuliert wurden (UV-GAS, n = 3), dargestellt. **(C)** Repräsentative Kontur-Graphen der durchflusszytometrischen Daten aus Kulturen nach 12 stündiger GAS-Infektion zeigen die Subpopulationen von  $CD31^- CD45^-$  FLS. Die Infektion trieb die Anreicherung von  $ICAM-1^+ VCAM-1^+$  FLS an. **(D)** Der relative Anteil von FLS, die Integrin-Liganden exprimierten, nahm in Folge der GAS-Infektion signifikant zu.

**(Abbildung 10B)**. Darüber hinaus war die Expression der Gene von den inflammatorischen Zytokinen *Il6* und *Tnf* – im Vergleich zu nicht-infizierten Kulturen – um das 40- beziehungsweise 200-fache erhöht. Die durch UV-inaktivierte Bakterien induzierte Überexpression von *Ccl2*, *Cxcl2* und *Tnf* war vergleichsweise geringer. Des Weiteren erwies sich der Einfluss von UV-inaktivierten GAS auf die Expression von *Il6* im Gegensatz zu vitalen Bakterien als vernachlässigbar gering. Die Infektion mit GAS bewirkte zudem einen 3-fachen Anstieg von *Rankl*, wobei das Expressionsniveau von *Opg*, dessen Proteinprodukt der Wirkung von RANKL entgegenwirkt, nicht verändert wurde. Im Übrigen induzierte GAS die Überexpression des Gens *Mmp13*, welches für eine Matrix-Metalloprotease codiert.

Im Anschluss wurde mittels durchflusszytometrischer Einzelzell-Analyse das Vermögen von FLS untersucht, auf eine GAS-Infektion mit der Regulierung der Expression von Integrin-Liganden zu reagieren. In diesem Zusammenhang wurde bei einer 12 h Infektion eine nahezu vollständige Verschiebung der CD31<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> FLS-Population zu ICAM-1<sup>+</sup> VCAM-1<sup>+</sup> Zellen beobachtet, so dass über 90 % aller analysierter FLS diese Membran-gebundenen Adhäsionsproteine im hohen Maße exprimierten (**Abbildung 10C & D**). Ferner bewirkte eine längerfristige Infektion von FLS, im Vergleich zur PBS-Kontrolle, eine zeitabhängige Überproduktion von CCL2, CXCL2, TNF und IL-6, wodurch die Ergebnisse der mRNA-Expression-Analyse auf Proteinebene bestätigt werden konnten (**Abbildung 11**). Auf Grund des geringen Stichprobenumfangs und der hohen Daten-Varianz erreichte die erhöhte Sekretion von CXCL2 nach 8 h beziehungsweise von Il-6 nach 24 h jedoch nicht die statistische Signifikanz.

Zusammenfassend weisen die Daten der hier dargelegten *in vivo* Experimente darauf hin, dass FLS bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der GAS-induzierten Entzündung involviert waren. Unter Berücksichtigung der durch die qPCR-Analyse aufgedeckte Überexpression von *Rankl* bei gleichzeitig unveränderter Expression von *Opg* legen die Ergebnisse nahe, dass FLS während einer GAS-Infektion Einfluss auf die Homöostase des Knochenstoffwechsels nehmen können.

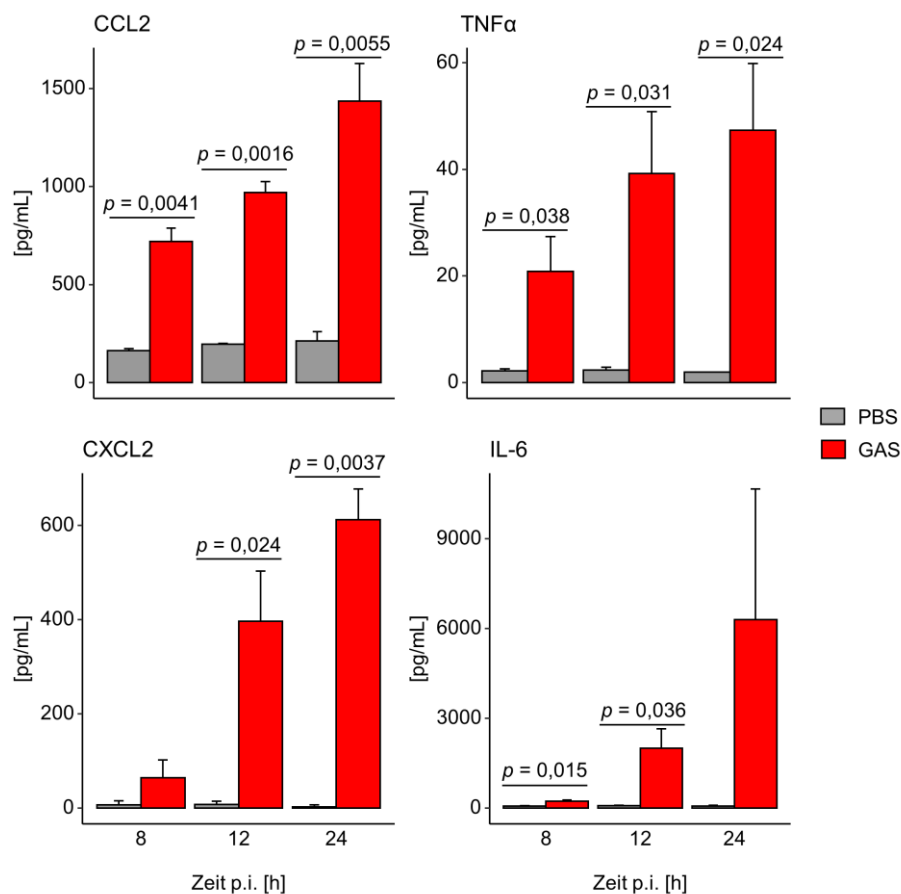
#### **5.4 Eine sekundäre Arthrose hatte keinen Einfluss auf die Inzidenz der septischen Arthritis**

---

Um zu untersuchen, ob eine degenerative Vorschädigung von Gelenken in Form einer Arthrose (*osteoarthritis*, OA) die Inzidenz der SA begünstigt beziehungsweise deren Verlauf verschlimmert, wurde bei 6 bis 8 Wochen alten B6 Mäusen eine operative Durchtrennung des

---

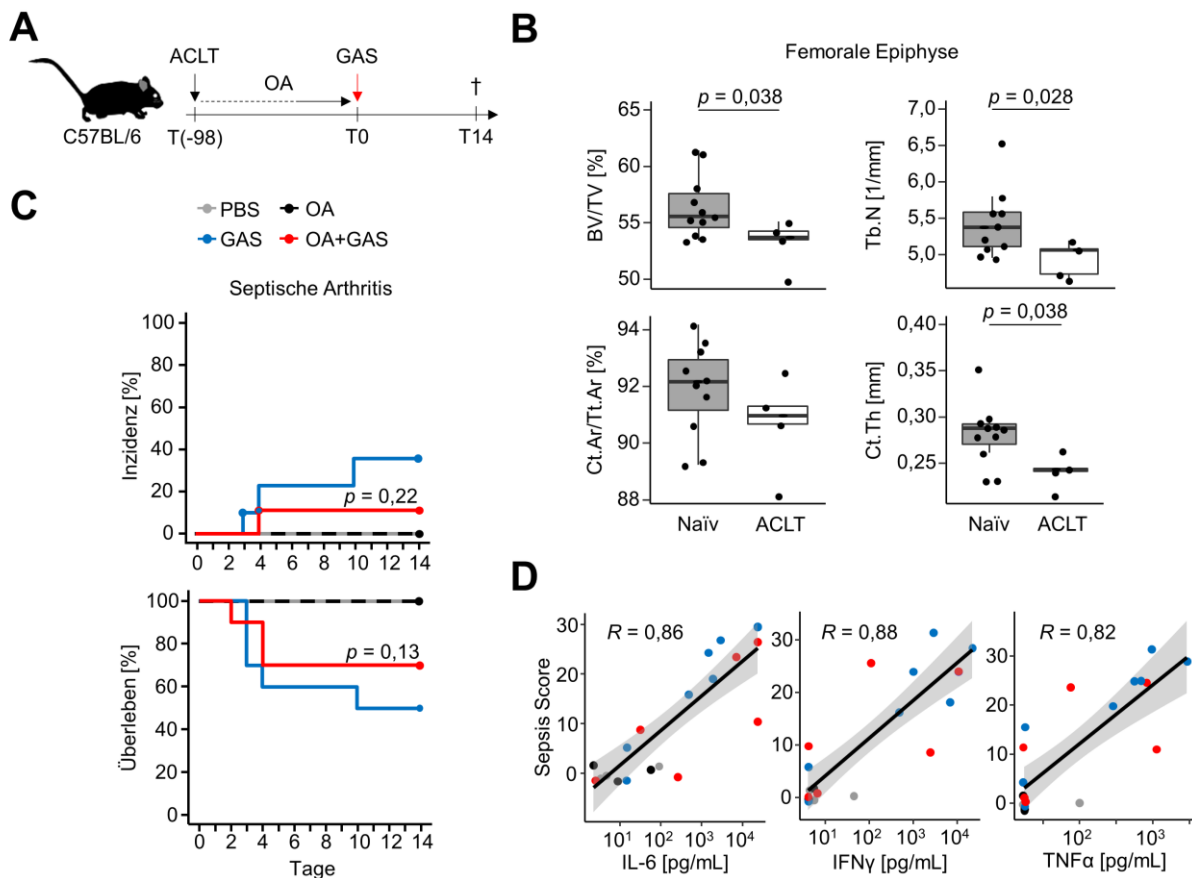
vorderen Kreuzbands (*anterior cruciate ligament transection*, ACLT) durchgeführt (**Abbildung 12A**). Da erwartet wurde, dass sich die degenerative Krankheit auf Grund einer verminderten mechanischen Stabilität des Knies und in Folge von motorischer Aktivität allmählich entwickelt, wurden die Tiere nach dem Eingriff zunächst für 14 Wochen beobachtet. Um zu bestätigen, dass die chirurgisch induzierte OA zum Zeitpunkt der Infektion tatsächlich etabliert war und folglich zu quantifizierbaren Veränderungen der Knochenmorphologie führte, wurde an der Epiphyse der Femora eine  $\mu$ CT-Analyse durchgeführt. In **Abbildung 12B** ist anhand einer Auswahl repräsentativer Knochenparameter dargestellt, dass die ACLT – im Vergleich zu unversehrten Gelenken – eine Reduktion des relativen Knochenvolumens (BV/TV) sowie der Anzahl an Trabekeln (Tb.N) in der Spongiosa induzierte. Des Weiteren wurde eine Verringerung der Dicke des kortikalen Knochens (Ct.Th) festgestellt. Zwar wurde außerdem ein tendenzieller Rückgang der relativen Kortikalfäche (Ct.Ar/Tt.Ar) beobachtet, jedoch erreichte dieser Unterschied nicht die statistische Signifikanz (**Abbildung 12B**).



**Abbildung 11: Die GAS-Infektion löste in FLS die zeitabhängige Überproduktion sowie Sekretion von Chemokinen und Zytokinen aus.** Die Ergebnisse aus der Analyse von Medium-Überständen GAS-infizierter FLS (MOI  $\approx$  10) sind in den Balkendiagrammen als arithmetische Mittel mit positiven Standardabweichungen visualisiert. Die quantitativen Messungen erfolgten mittels ELISA oder Bead-basierter, durchflusszytometrischer Multiplex-Bestimmung 8, 12 oder 24 h nach der Infektion. Graue Balken zeigen die Daten aus den uninfizierten Kontrollkulturen (PBS, n = 3) und rote Balken zeigen die Werte aus infizierten Kulturen (GAS, n = 3).



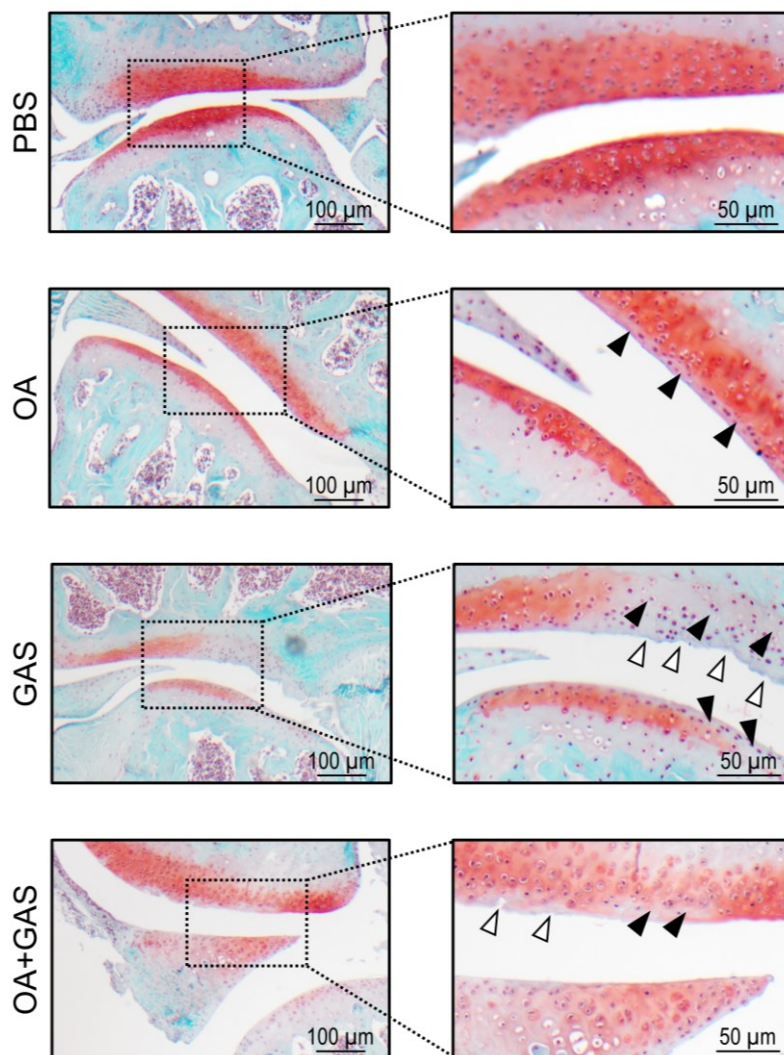
Nach der GAS-Infektion wurden die Mäuse für maximal 14 Tage beobachtet (**Abbildung 12A**). In diesem Zeitraum wurde die Inzidenz der SA anhand von Schwellungen an den Pfoten beziehungsweise mit Hilfe synovialen Bakterien analysiert. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass nur eines von zehn Tieren mit einer vorhergehenden OA im Verlauf des Beobachtungszeitraums an SA erkrankte (**Abbildung 12C**, oben). Die mortalitätsbereinigte Inzidenz von SA bei Tieren ohne Vorerkrankung war dagegen mit etwa 40 % (3/10) tendenziell höher, jedoch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Auch beim Vergleich der Überlebenswahrscheinlichkeiten wurde zwischen diesen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt, wobei die Mortalität in der Gruppe von Tieren ohne



**Abbildung 12: Eine chirurgisch induzierte Arthrose (OA) hatte keinen Einfluss auf die GAS-induzierte Sepsis und septische Arthritis.** (A) Experimentelles Schema. Bei 6 bis 8 Wochen alten männlichen C57BL/6J wurde eine chirurgische Durchtrennung des vorderen Kreuzbands vom rechten Knie durchgeführt (ACLT). Die Tiere wurden anschließend 14 Wochen sitzen gelassen. Demnach waren die Tiere zum Zeitpunkt der Infektion mit  $5 \cdot 10^5$  KBE GAS 20 bis 22 Wochen alt. (B) Die Etablierung der Arthrose wurde posthum durch Veränderungen der Knochenmorphologie verifiziert. Die Box-Plots zeigen, dass Knie-Gelenke mit durchtrenntem Kreuzband (ACLT, n = 5) im Vergleich zu unversehrten Knien (Naiv, n = 11) ein verringertes Knochenvolumen (BV/TV) und eine verringerte Anzahl an Trabekeln (Tb.N) in der Spongiosa des Femurs aufwiesen. Des Weiteren nahm in der Epiphyse in Folge der OA die Dicke des kortikalen Knochens ab (Ct.Th). Ct.Ar/Tt.Ar: relative Kortikalfläche. (C) Die degenerative Vorerkrankung bedingte nach Infektion keine Verschlimmerung des Krankheitsverlaufs. Kaplan-Meier-Schätzer der Inzidenz- (oben) und Überlebenswahrscheinlichkeiten von PBS-Kontrollen (n = 4), von Tieren mit OA (n = 5) und GAS-infizierten Mäusen ohne OA (GAS, n = 10) beziehungsweise mit OA (OA+GAS, n = 10). (D) Die Krankheitsaktivität der Sepsis korrelierte positiv mit Plasma-Konzentrationen von Interleukin (IL)-6, Interferon (IFN) $\gamma$  und Tumornekrosefaktor (TNF) $\alpha$ . R: Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient. Die grauen Flächen illustrieren das 95 % Konfidenzintervall der Regression.



Vorerkrankung (50 %) gegenüber Tieren mit OA (30 %) tendenziell höher war (**Abbildung 12C**, unten). Die quantitative Analyse von Interleukin (IL-)6, Interferon (IFN) $\gamma$  und Tumornekrosefaktor (TNF) $\alpha$  im Blut-Plasma ergab, in Übereinstimmung mit den klinischen Parametern, keine Unterschiede zwischen infizierten Tieren mit beziehungsweise ohne OA (**Abbildung 12D**). Interessanterweise korrelierten die Konzentrationen dieser inflammatorischen Zytokine stark mit dem Sepsis Score, was als Validierung des angewandten Scoring-Systems und somit als zusätzlicher Nachweis der Sepsis gewertet wurde.



**Abbildung 13: Die Arthrose und die GAS-Infektion induzierten die Erosion von Knorpel sowie den Abbau von extrazellulärer Matrix.** Die Proteoglykane wurden mit Hilfe von Safranin O angefärbt (rot). Fast Green (grün) und Hämatoxylin (blau) dienen als Gegenfärbungen. Die Knorpelstruktur von Knieen nicht-behandelter Tiere (PBS) war intakt. Die induzierte Arthrose (ACLT) Arthrose bedingte den Verlust von Proteoglykanen (schwarze Pfeilspitzen). Eine GAS-Infektion führte zusätzlich zur Erosion der Knorpelstruktur (weiße Pfeilspitzen), welche auch bei infizierten Tieren mit der degenerativen Vorerkrankung auftraten (ACLT+GAS).

Für die Beurteilung von Schäden am Knorpelgewebe von tibiofemorale Gelenken in Folge von OA oder der GAS-Infektion wurden Gewebe-Schnitte mittels Safranin O gefärbt. Kniegelenke aus gesunden Tieren zeichneten sich durch eine glatte Knorpeloberfläche mit gleichmäßiger Färbung der Proteoglykane aus (**Abbildung 13**, PBS). Veränderungen von intraartikulärem Gewebe als Konsequenz der chirurgisch induzierten OA manifestierten sich hauptsächlich durch den Verlust an Safranin O Färbung und folglich durch den Rückgang von extrazellulärer Matrix. In diesen Fällen blieb die Knorpeloberfläche jedoch weitestgehend intakt. In einem besonders gravierenden Fall von SA traten im infizierten Knie enorme Schäden in Form eines fast vollständigen Verlusts von Proteoglykanen auf, was mit ausgeprägten Erosionen an der Knorpeloberfläche einherging (**Abbildung 13**, GAS). Auf Grund der geringen Inzidenz von SA war dieser Fall jedoch nicht repräsentativ für die gesamte Gruppe von Tieren, die mit GAS infiziert wurden. Bei Kombination von OA mit der GAS-Infektion wurden mikroskopische Schäden am Gewebe wiederum in Form von Knorpelerosionen und anhand des Rückgangs von Proteoglykanen festgestellt. Unter Berücksichtigung der fast ausnahmslos unauffälligen Klinik der Mäuse in dieser Gruppe (**Abbildung 12C**), wurden in Bezug auf die Schädigung des Knorpels keine quantitativen Unterschiede zu nicht-infizierten beziehungsweise zu infizierten Mäusen ohne Vorerkrankung festgestellt.

Zusammenfassend zeigte dieser Teil der Versuche, dass eine milde OA keinen Einfluss auf die Schwere einer GAS-induzierten Sepsis hatte und dementsprechend das Auftreten einer SA in Mäusen nicht beeinflusste. Des Weiteren wurde demonstriert, dass eine akute Infektion der Gelenke während eines besonders schweren Fall der SA zum Verlust der extrazellulären Matrix führte und Erosionen der Knorpeloberfläche induzierte.

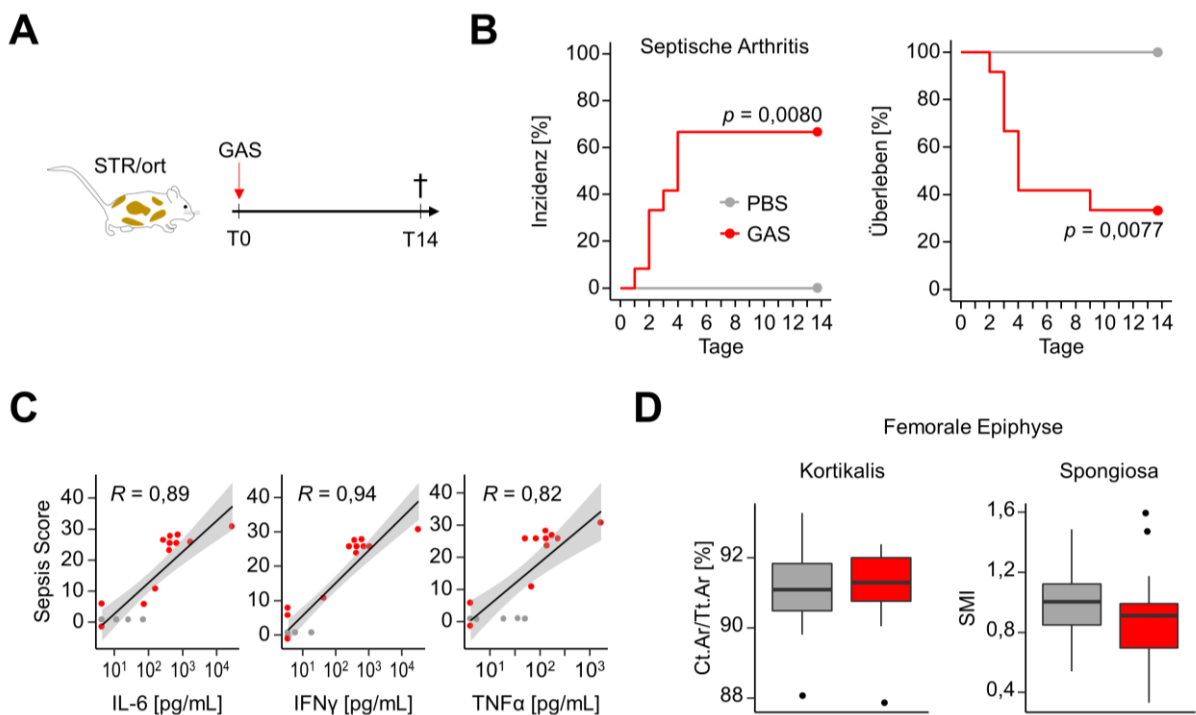
### **5.5 GAS induzierte bei Tieren mit einer primären Arthrose eine lebensbedrohliche SA ohne die Knochenstruktur zu beeinflussen**

---

Als Nächstes wurde untersucht, ob eine GAS-Infektion bei Mäusen mit einer primären Arthrose zu einer SA führt und Erosionen am Knochengewebe induziert. Dafür wurden 20 bis 22 Wochen alte männliche STR/ort mit  $1,5 \cdot 10^6$  KBE GAS infiziert (**Abbildung 14A**). GAS induzierte innerhalb des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen bei über 65 % (8/12) der Tiere eine SA (**Abbildung 14B**, links). Auch in diesem Modell wurde die SA anhand von Entzündungsreaktionen an den Pfoten und mit Hilfe von bakteriologischen Untersuchungen der tibiofemorale Synovialflüssigkeit identifiziert. Interessanterweise mussten alle Tiere mit Symptomen der SA auf Grund einer zu hohen klinischen Belastung innerhalb von ein bis vier Tagen nach der Infektion geopfert werden. Als Resultat war die Überlebensrate in der Grup-

---

pe mit GAS-infizierten Mäusen unter 35 % (4/12, **Abbildung 14B**, rechts). Bei den überlebenden Tieren wurde an Tag 14 eine kompetente Immunantwort in Form von GAS-spezifischen Antikörper im Plasma nachgewiesen (Median  $E_{450nm} = 0,234$  [IQR 0,154 - 0,328] bei GAS mit  $n = 4$  gegenüber 0,023 [0,008 - 0,054] bei PBS mit  $n = 7$ ;  $p = 0,0061$  Mann-Whitney  $U$  Test). Der Schweregrad der Sepsis korrelierte stark positiv mit den Plasma-Konzentrationen von IL-6, IFN $\gamma$  sowie TNF $\alpha$ , wodurch auch in diesem Maus-Modell ein lebensbedrohlicher Krankheitsverlauf mit einer für den Organismus schädlichen Überproduktion von inflammatorischen Zytokinen in Verbindung gebracht werden konnte (**Abbildung 14C**). Abschließend wurde mittels  $\mu$ CT untersucht, ob GAS in diesem Maus-Stamm Veränderungen der morphometrischen Parameter in der distalen Epiphyse des Femurs induzierte. Die Analyse ergab, dass trotz des nachweislich aggressiven Krankheitsverlaufs keine Veränderungen in der Struktur der Kortikalis beziehungsweise der Spongiosa in der Nähe zum Kniegelenk auftraten (**Abbildung 14D**).

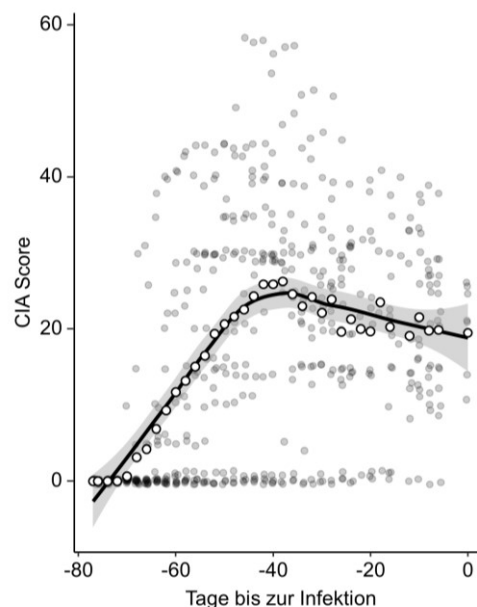


**Abbildung 14: GAS führte in Tieren mit genetisch bedingter Arthrose zu keinem Knochenverlust.** (A) Experimentelles Schema für die Infektion von 20 bis 22 Wochen alten männlichen STR/ort mit  $1,5 \cdot 10^6$  KBE GAS ( $n = 12$ ) und der korrespondierenden PBS-Kontrolle ( $n = 7$ ). (B) Kaplan-Meier-Schätzer der SA-Inzidenz (links) und Überlebenswahrscheinlichkeit (rechts) zeigen, dass GAS in diesem Mausstamm SA induzierte und zu einer hohen Mortalitätsrate führte. (C) Die Krankheitsaktivität der Sepsis korrelierte stark mit Entzündungsparametern im Maus-Plasma.  $R$ : Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient. Die grauen Flächen illustrieren das 95 % Konfidenzintervall der Regression. (D) Die repräsentativen Box-Plots zeigen, dass die GAS-Infektion ( $n = 22$ ) im Vergleich zur PBS-Kontrolle ( $n = 14$ ) zu keiner Veränderung in der kortikalen (links) und trabekulären Knochenmorphologie (rechts) des Femurs in der distalen Epiphyse führte. Ct.Ar/Tt.Ar: relative Kortikalfäche, SMI: structure model index.

Zusammenfassend wurde in diesem Teil der Experimente dargelegt, dass eine GAS-Infektion bei Tieren mit einer genetisch bedingten Arthrose zu einer hohen Inzidenz von SA führte, was mit einer hohen Mortalität einherging. Jedoch wurde im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren keine zusätzliche Schädigung der Knochenstruktur festgestellt.

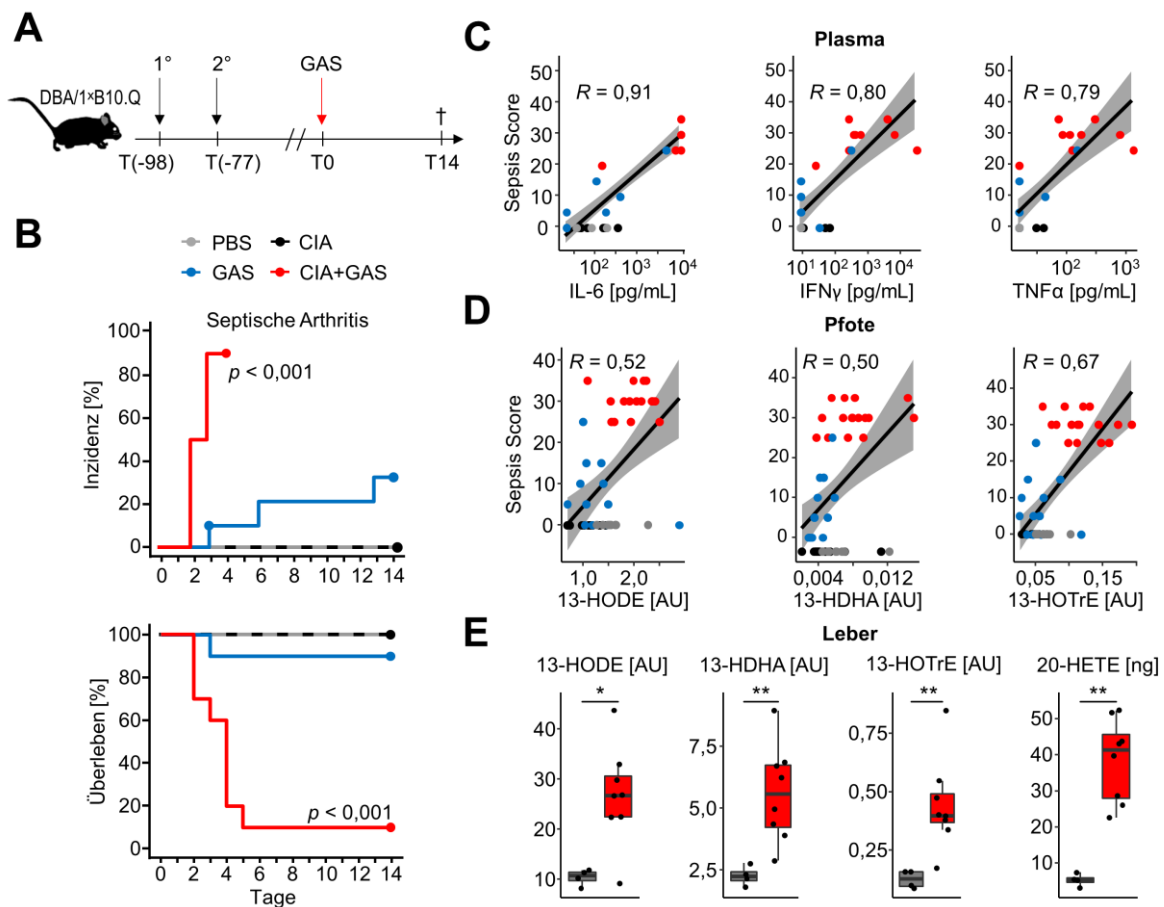
## 5.6 Eine chronisch entzündliche Vorerkrankung begünstigte das Auftreten der septischen Arthritis und verschlimmerte deren Verlauf

Um zu untersuchen, ob eine chronisch entzündliche Vorerkrankung der Gelenke den Verlauf einer GAS-induzierten septischen Arthritis beeinflusst, wurde das Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (*collagen-induced arthritis*, CIA) eingesetzt. Zum Auslösen der CIA wurden sechs bis acht Wochen alte männliche DBA/1 × B10.Q (F1) Mäuse durch subkutane Applikation von Rinder-Kollagen Typ II in Kombination mit komplettem Freund's Adjuvanz immunisiert. Drei Wochen später erfolgte die Sekundärimmunisierung mit bovinem Kollagen und inkomplettem Freund's Adjuvanz. In den folgenden 11 Wochen Beobachtungszeit bis zum Auslösen der GAS-Infektion wurde das Auftreten und die Schwere der CIA anhand von Schwellung sowie Rötungen an den Pfoten begutachtet. In **Abbildung 15** ist gezeigt, dass bei einigen Mäusen bereits eine Woche nach der Sekundärimmunisierung Symptome der



**Abbildung 15: Die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) ist eine monophasische Erkrankung.** Es wurden insgesamt 16 männliche DBA/1 × B10.Q in einem Alter von 6 bis 8 Wochen mit Rinder-Kollagen Typ II immunisiert und drei Wochen später wurde die Sekundärimmunisierung durchgeführt. In den darauffolgenden 77 Tagen vor der Infektion wurde die Aktivität der CIA anhand von Schwellungen an den Pfoten beurteilt. Im Streudiagramm sind die individuellen (graue Punkte) und die arithmetisch gemittelten CIA Scores (weiße Punkte) dargestellt. Der lokal gewichtete Regression-Streudiagramm-Glätter (schwarze Linie) mit 95 % Konfidenzintervall (graue Fläche) illustriert den Rückgang der Krankheitsaktivität der CIA.

CIA beobachtet werden konnten. Die entzündliche Erkrankung erreichte unter Berücksichtigung der arithmetisch gemittelten CIA-Scores 39 Tage nach der letzten Applikation von Kollagen ihren Höhepunkt. Ab diesem Zeitpunkt nahm die Krankheitsaktivität merklich ab, was durch den graduellen Rückgang von Rötungen und Schwellungen der betroffenen Pfoten gekennzeichnet war (**Abbildung 15**). Demnach konnte anhand der hier gezeigten Daten die monophasische Natur der CIA in F1 Mäusen bestätigt werden. Durch die Wahl des langen Beobachtungszeitraums vor der Infektion wurde gewährleistet, dass die Entzündungszeichen der CIA nicht die neu auftretenden Schwellungen nach GAS-induzierter SA verunklaren.



**Abbildung 16: Eine vorangehende CIA verschlimmerte die GAS-induzierte Sepsis und septische Arthritis.**

(A) Experimentelles Schema: 6 bis 8 Wochen alte männliche DBA/1 × B10.Q der F1 Generation wurden mit Rinder-Kollagen Typ II in komplettem Freund's Adjuvanz (1°) immunisiert und drei Wochen später erneut immunisiert (2°). Es entwickelte sich daraufhin die CIA, welche für 11 Wochen vor Infektion der Tiere mit  $2 \cdot 10^6$  KBE GAS beobachtet wurde. (B) Die Kaplan-Meier-Diagramme der Inzidenz der septischen Arthritis (oben) und der Überlebenswahrscheinlichkeit (unten) zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der SA und die Mortalitätsrate bei infizierten Tieren mit einer vorangehenden CIA (CIA+GAS, n = 10) - im Vergleich zu Tieren ohne Vorerkrankung (GAS, n = 10) - signifikant erhöht waren. (C,D) Korrelationsanalyse von Sepsis Scores mit den Plasma-Konzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen (C) und Mengen von Eicosanoiden in den Pfoten (D). CIA+GAS Mäuse, wiesen eine erhöhte Krankheitsaktivität der Sepsis auf, welche positiv mit Interleukin (IL-)6, Interferon (IFN) $\gamma$ , Tumornekrosefaktor (TNF) $\alpha$ , 13-Hydroxyoctadiensäure (13-HODE), 13-Hydroxydocosahexaensäure (13-HDHA) und 13-Hydroxyoctadecatrien-säure (13-HOTrE) korrelierte. R: Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient. Die grauen Flächen illustrieren das 95 % Konfidenzintervall der Regression. (E) Die Box-Plots stellen die erhöhten Mengen von Leber-Eicosanoiden in CIA+GAS Mäusen (rote Boxen, n = 8) im Vergleich zu den PBS-Kontrollen (graue Boxen, n = 4) dar. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; Mann-Whitney U Test.

## ERGEBNISSE

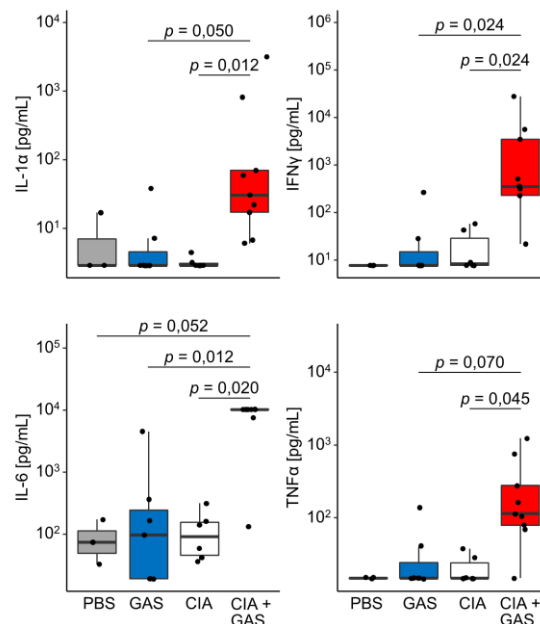
**Tabelle 7:** Bakterielle Belastung in Kniegelenken, Blut, Leber und Milz nach GAS-Infektion (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  Einstichproben-Wilcoxon-Rangsummen-Test).

	Median der bakteriellen Last (IQR) [KBE/mL $\cdot 10^5$ ]		
	GAS	CIA+GAS	$p$
Knie (links)	< 0,005 (0,005 - 0,005)	0,010 (0,005 - 0,52)	*0,036
Knie (rechts)	< 0,005 (0,005 - 0,005)	0,015 (0,005 - 0,18)	0,058
Blut	< 0,001 (0,001 - 0,001)	10 (0,51 - 10)	*0,012
Leber	< 0,002 (0,002 - 0,002)	532 (38 - 800)	**0,0039
Milz	< 0,001 (0,001 - 0,001)	194 (2 - 800)	**0,0039

Die insgesamt 16 CIA-Tiere wurden vor Beginn der Infektionsexperimente in zwei stratifizierte Zufallsstichproben eingeteilt. In Bezug auf die Schwere der Vorerkrankung gab es demzufolge keinen Unterschied zwischen Mäusen, die infiziert werden sollten (CIA+GAS Gruppe;  $n = 10$ ; Median CIA-Score = 1206 [IQR 888 - 1427]) und Mäusen, die nicht infiziert werden sollten (CIA Gruppe;  $n = 6$ ; 1324 [583 - 1896];  $p = 0,91$  Mann-Whitney  $U$  Test). Die nun 20 bis 22 Wochen alten Tiere wurden mit  $2 \cdot 10^6$  KBE GAS infiziert und anschließend für 14 Tage beobachtet (**Abbildung 16A**). Bemerkenswerterweise war die Inzidenz der SA bei Tieren mit CIA mit 90 % (9/10) signifikant höher als bei den infizierten Tieren ohne Vorerkrankung, von denen nur 30 % (3/10) Symptome der bakteriellen Arthritis aufwiesen (**Abbildung 16B**, oben). Die SA wurde anhand von Schwellungen nachgewiesen, die im Falle der CIA-Mäuse an den bereits entzündeten Körperregionen auftraten, jedoch nicht ausschließlich auf diese Bereiche begrenzt waren.

Des Weiteren wurde in Verbindung mit den bakteriologischen Analysen an Ausstrichen der tibiofemorale Synovialflüssigkeit festgestellt, dass die bakterielle Last im linken Kniegelenk von Tieren mit der Vorerkrankung signifikant höher war (**Tabelle 7**). Im Gegensatz dazu erreichte die Zunahme an isolierten Bakterien aus dem rechten Kniegelenk nicht die statistische Signifikanz. Die CIA begünstigte nicht nur das Auftreten der GAS-induzierten SA, sondern führte auch zu einer verschlimmerten Bakteriämie, die durch eine beträchtlich erhöhte bakterielle Belastung im Blut, in der Leber und in der Milz nachgewiesen wurde (**Tabelle 7**). In Folge der exazerbierten Infektion sank die Überlebenswahrscheinlichkeit in der CIA+GAS Gruppe im Vergleich zu den infizierten Mäusen ohne CIA von 90 % auf 10 % (**Abbildung 16B**, unten).

Die aggravierte Sepsis ging auch in diesem Tier-Modell mit erhöhten Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine IL-6, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  im Plasma einher, was anhand einer starken Korrelation der Zytokin-Werte mit der Krankheitsaktivität dokumentiert wurde (**Abbildung 16C**). Der Vergleich von nicht-infizierten Kontroll-Tieren ohne CIA mit nicht-infizierten CIA-Mäusen ergab, dass die Vorerkrankung selbst keine Erhöhung der Zytokin-Konzentrationen bewirkte (**Abbildung 17**). Vielmehr begünstigte die CIA eine übermäßige Reaktion vom Immunsystem auf die GAS- Infektion, was in dem nachweisbaren Zytokin-sturm resultierte (**Abbildung 16C**). Die exzessive Produktion von immunmodulatorischen Mediatoren wurde bei schwer erkrankten Tieren auch in Form von Eicosanoiden in den Pfoten nachgewiesen, die besonders bei infizierten CIA-Tieren in erhöhten Mengen vorlagen (**Abbildung 16D**). **Tabelle 8** listet die Ergebnisse aus den Korrelationsanalysen der Pfoten-Eicosanoide mit den Plasma-Konzentrationen von IL-6 auf. Die Daten zeigen einen starken Zusammenhang des Zytokins mit den Eicosanoiden 13-HOTrE sowie 13-HODE und eine signifikante Korrelation mit 15-HEPE, TXB<sub>2</sub>, 13-,14- und 17-HDHA. Diese Ergebnisse indizieren damit eine Wechselwirkung von verschiedenen Indikatoren unterschiedlich stark ausgeprägter Immunreaktionen während einer Sepsis. In Anbetracht der signifikant erhöhten Quantitäten von 13-HODE, 13-HDHA, 13-HOTrE und 20-HETE in der Leber von CIA+GAS-Mäusen gegenüber nicht-infizierten Kontrollen (**Abbildung 16E**) suggerieren die Ergebnisse aus den Lipidomics-Analysen, dass Eicosanoide in verschiedensten Gewebe-Typen während einer verschlimmerten Sepsis gebildet wurden.



**Abbildung 17: Die Infektion von CIA Mäusen mit GAS induzierte die exzessive Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen.** Eine alleinige CIA bedingte hingegen keine Erhöhung der Basal-Konzentrationen von Interleukin (IL-)1 $\alpha$ , IL-6, Interferon (IFN) $\gamma$  oder Tumornekrosefaktor (TNF) $\alpha$ . Die Zytokine wurden an den respektiven Endpunkten in Maus-Plasma mittels durchflusszytometrischem Multiplex-Ansatz quantifiziert.

## ERGEBNISSE

**Tabelle 8:** Korrelationsanalyse der Plasmakonzentrationen von IL-6 mit Pfoten-Eicosanoiden. *R*: Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient (\*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001; dick gedruckte Zahlen indizieren eine starke Korrelation).

Eicosanoid (Pfote)	Plasma-Konzentration von IL-6	
	<i>R</i>	<i>p</i>
13-HOTrE	<b>0,72</b>	***9,3 • 10 <sup>-8</sup>
13-HODE	<b>0,63</b>	***6,6 • 10 <sup>-6</sup>
15-HEPE	0,59	***4,5 • 10 <sup>-5</sup>
TXB <sub>2</sub>	0,57	***7,2 • 10 <sup>-5</sup>
13-HDHA	0,46	**0,0020
14-HDHA	0,49	**0,0010
17-HDHA	0,53	***0,00031

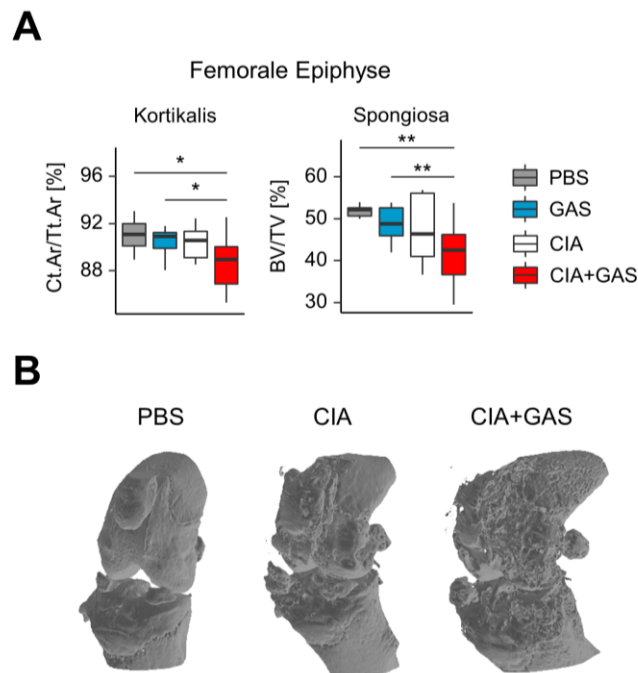
Zusammenfassend wurde im hier dargelegten Krankheitsmodell von CIA und GAS-Infektion gezeigt, dass die chronisch entzündliche Vorerkrankung zu einer deutlich erhöhten Inzidenz und Schwere der SA führte. Der exazerbierte Krankheitsverlauf der Sepsis war das Resultat der Kombination der verschiedenen Krankheitsentitäten und ging in Folge einer verschlimmerten Bakteriämie mit einer exzessiven Überproduktion von Zytokinen und Eicosanoiden einher, was ultimativ zu einem signifikanten Anstieg der Mortalitätsrate führte.

### 5.7 Die Schwere der septischen Arthritis bestimmte den Umfang von Knochendestruktionen in Mäusen mit einer chronisch entzündlichen Vorerkrankung

Für die Beurteilung von GAS-induzierten Erosionen am Knochengewebe von F1 Mäusen wurden  $\mu$ CT-Analysen an der Epiphyse sowie der Diaphyse vom Femur und an den Pfoten durchgeführt. In **Abbildung 18A** ist eine repräsentative Auswahl von Knochenparametern für die Kortikalis und für die Spongiosa der femoralen Epiphyse dargestellt. Es ist gezeigt, dass die CIA oder die GAS-Infektion im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren (PBS) zu einer tendenziellen Verringerung der relativen Kortikalfläche (Ct.Ar/Tt.Ar) sowie zur Abnahme des relativen trabekulären Knochenvolumens (BV/TV) führte. Erst bei der Kombination der Vorerkrankung mit der GAS-Infektion wurden signifikante Unterschiede dieser morphologischen Knochen-Parameter beim Vergleich mit der PBS- und der GAS-Gruppe festgestellt (**Abbildung 18A**). Jedoch wurde bei Gegenüberstellung dieser Variablen zwischen der CIA- und CIA+GAS-Gruppe kein statistisch nachweisbarer Knochenverlust ermittelt, obwohl die



Veränderungen der Knochenmorphologie bei infizierten CIA-Tieren tendenziell stärker ausgeprägt waren. Diese Tendenz ließ sich auch bei der Beurteilung weiterer, morphometrischer Parameter, die in **Tabelle 9** aufgelistet sind, erkennen. Im Falle der Spongiosa in der femoralen Epiphyse waren die schädlichen Veränderungen der Knochenstruktur in der CIA+GAS-Gruppe am deutlichsten. In diesem Zusammenhang wurde ein signifikanter Anstieg vom SMI – ein Maß für die strukturelle Veränderung der Trabekel – festgestellt, was gleichzeitig mit einer verringerten Anzahl der Trabekel (Tb.N) einherging. Darüber hinaus war die Abnahme der Dicke des kortikalen Knochens (Ct.Th) bei infizierten CIA-Mäusen am markantesten. Interessanterweise bewirkte die CIA, die GAS-Infektion sowie die Kombination der beiden Erkrankungen eine Abnahme des polaren Flächenträgheitsmoments (MMI) in der Kortikalis. Diese Variable kennzeichnet die Resistenz des Knochens gegenüber Torsionsbeanspruchung. Auch im Falle dieser Kenngröße der Knochenstabilität waren die schädlichen Veränderungen der femoralen Diaphyse in der CIA+GAS Gruppe am apparentesten (**Tabelle 9**). Bei Betrachtung der Knochenstruktur in der Peripherie zu den tarsalen Pfoten-Gelenken wurde festgestellt, dass die CIA sowohl bei nicht-infizierten als auch bei infizierten Tieren eine Abnahme der Knochenmineraldichte (BMD) induzierte.



**Abbildung 18: Die CIA-induzierte Entartung der Knochenmorphologie wurde bei Kombination der chronisch entzündlichen Gelenkerkrankung mit einer GAS-Infektion signifikant. (A)** Die Knochenmorphometrie der Femora wurde mit Hilfe von mikro-Computertomographie beurteilt. Die repräsentativen Box-Plots zeigen, dass die Parameter für die Knochenmorphologie der Kortikalis (links) beziehungsweise der Spongiosa (rechts) hauptsächlich in der CIA+GAS Gruppe verändert wurden. Ct.Ar/Tt.Ar: relative Kortikalfläche, BV/TV: relatives Knochenvolumen. **(B)** Die repräsentativen, drei-dimensionalen Rekonstruktionen der Bereiche um die Kniegelenke zeigen, dass Knochenerosionen, als Resultat veränderter Knochenmorphologie-Parameter, durch CIA beziehungsweise CIA+GAS induziert wurden.

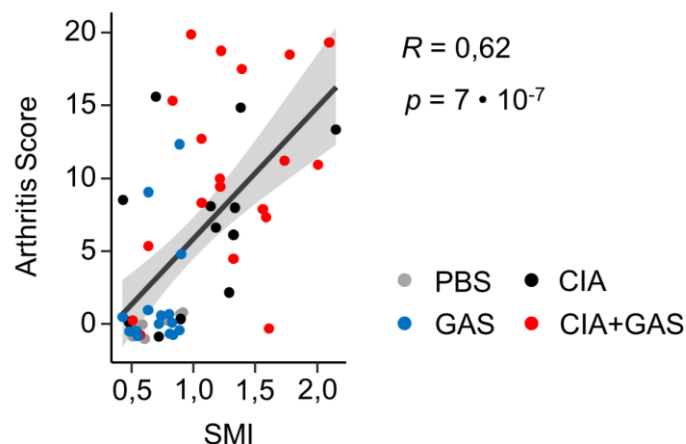
ERGEBNISSE

**Tabelle 9:** Auflistung einer Auswahl von Morphometrie-Parametern der Knochen. Die Pfeile kennzeichnen eine signifikante Abnahme beziehungsweise Zunahme der Variablen im Einzelvergleich. <sup>##</sup>p < 0,01 gegenüber GAS; <sup>\$</sup>p < 0,05; <sup>\$\$\$</sup>p < 0,001 gegenüber CIA; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 gegenüber CIA+GAS; Mann-Whitney U Test.

µCT-Parameter	PBS Median (IQR)	GAS Median (IQR)	CIA Median (IQR)	CIA+GAS Median (IQR)	p Kruskal- Wallis	
Femorale Epiphyse	BV/TV	*52,18 (50,65 - 52,60)	*48,86 (45,90 - 52,59)	46,37 (40,97 - 56,05)	42,51 (36,63 - 46,24) ↓	0,0030
	SMI	**0,5932 (0,5034 - 0,8066)	***0,7361 (0,5873 - 0,8266)	1,1564 (0,7106 - 1,3238)	1,2208 (1,0177 - 1,5954) ↑	0,00038
	Tb.N	**4,594 (4,434 - 4,887)	4,424 (4,070 - 4,754)	4,407 (3,866 - 5,097)	4,080 (3,616 - 4,212) ↓	0,0069
	BMD	0,7224 (0,7091 - 0,7387)	0,7040 (0,6936 - 0,7183)	0,6826 (0,6651 - 0,7320)	0,6976 (0,6819 - 0,7310)	0,32
	Ct.Ar/ Tt.Ar	*91,11 (90,09 - 92,00)	*90,91 (89,90 - 91,24)	90,10 (88,87 - 91,20)	88,37 (86,52 - 90,02) ↓	0,011
	MMI (polar)	5,725 (5,316 - 5,932)	5,004 (4,656 - 6,152)	4,423 (4,094 - 5,611)	5,354 (4,494 - 7,596)	0,26
	Ct.Th	0,2494 (0,2354 - 0,2681)	0,2549 (0,2131 - 0,2616)	0,2210 (0,1867 - 0,2587)	0,2051 (0,1655 - 0,2253)	0,035
	BMD	0,8403 (0,8209 - 0,8532)	0,8134 (0,8011 - 0,8237)	0,8047 (0,7809 - 0,8252)	0,8158 (0,7713 - 0,8362)	0,14
Femorale Diaphyse	Ct.Ar/ Tt.Ar	57,70 (56,77 - 58,76)	57,82 (56,89 - 58,45)	54,14 (51,26 - 60,47)	54,48 (53,54 - 58,87)	0,41
	MMI (polar)	###/\$\$\$/**0,7050 (0,6544 - 0,7313)	0,5877 (0,5671 - 0,6335) ↓	0,5691 (0,5641 - 0,5944) ↓	0,5496 (0,4494 - 0,5846) ↓	0,00011
	Ct.Th	0,2663 (0,2600 - 0,2677)	0,2608 (0,2504 - 0,2672)	0,2427 (0,2263 - 0,2728)	0,2386 (0,2261 - 0,2571)	0,35
	BMD	1,1204 (1,0463 - 1,1286)	1,097 (1,085 - 1,138)	1,0734 (1,0215 - 1,1177)	1,0807 (1,0430 - 1,1173)	0,25
Tarsus	Ct.Ar/ Tt.Ar	89,09 (87,84 - 89,43)	88,18 (87,50 - 89,47)	87,77 (86,54 - 88,34)	87,82 (86,62 - 88,82)	0,13
	MMI (polar)	1,739 (1,665 - 1,875)	\$/**1,593 (1,514 - 1,778)	2,670 (1,698 - 3,555) ↑	2,608 (1,793 - 3,291) ↑	0,0031
	Ct.Th	0,3368 (0,3174 - 0,3430)	0,3274 (0,3093 - 0,3423)	0,3055 (0,2834 - 0,3209)	0,3160 (0,2881 - 0,3467)	0,084
	BMD	\$/*0,8919 (0,8615 - 0,9099)	\$/*0,8820 (0,8563 - 0,9120)	0,8083 (0,8014 - 0,8438) ↓	0,8419 (0,8021 - 0,8868) ↓	0,0012

Die schädlichen Veränderungen am Knochen, die hier in Form von Parametern der  $\mu$ CT-Analyse repräsentiert wurden, resultierten in einer aberranten Morphologie des Gewebes. Die fulminanten und durch die CIA-induzierten Erosionen wurden nach Betrachtung der dreidimensionalen Rekonstruktionen der Röntgenprojektionen, besonders bei infizierten Tieren mit der chronisch entzündlichen Vorerkrankung erkenntlich (**Abbildung 18B**). Mit Hilfe der Korrelationsanalyse zwischen den in **Tabelle 9** aufgelisteten Variablen und den respektiven Krankheitsaktivitäten während einer autoimmunen beziehungsweise infektiösen Arthritis wurde festgestellt, dass das Ausmaß der Knochendestruktionen in signifikanter Abhängigkeit vom makroskopischen Arthritis Score war. Dieser Score bezifferte das Ausmaß von CIA-beziehungsweise SA-induzierten Entzündungen an den Gelenken. In **Abbildung 19** ist ein derartiger Zusammenhang in Form von der repräsentativen, starken Korrelation der Arthritis-Scores aller individueller Tiere mit dem SMI der Epiphyse des Femurs dargestellt. Es ist gezeigt, dass schwerwiegende Entzündungsreaktionen am tibiofemorales Gelenk mit einem osteoporotischen Phänotyp einhergingen und dass diese Korrelation hoch signifikant war. In **Tabelle 10** sind die Ergebnisse der Korrelationsanalysen zusammengefasst. Die Daten verdeutlichen, dass eine schwere Arthritis mit einer umfangreichen Zerstörung der Knochenstruktur assoziiert war.

Im Ganzen zeigten die hier dargelegten Erkenntnisse aus der morphometrischen Analyse, dass die chronisch entzündliche Vorerkrankung tendenzielle Veränderungen am Knochen hervorrief. Bei Kombination der CIA mit einer GAS-induzierten SA wurden die Erosionen am Knochen signifikant. Zudem wurde dargelegt, dass ein höheres Ausmaß von synovialer Inflammation bei F1 Mäusen stärker ausgeprägte Knochenerosionen bedingte.



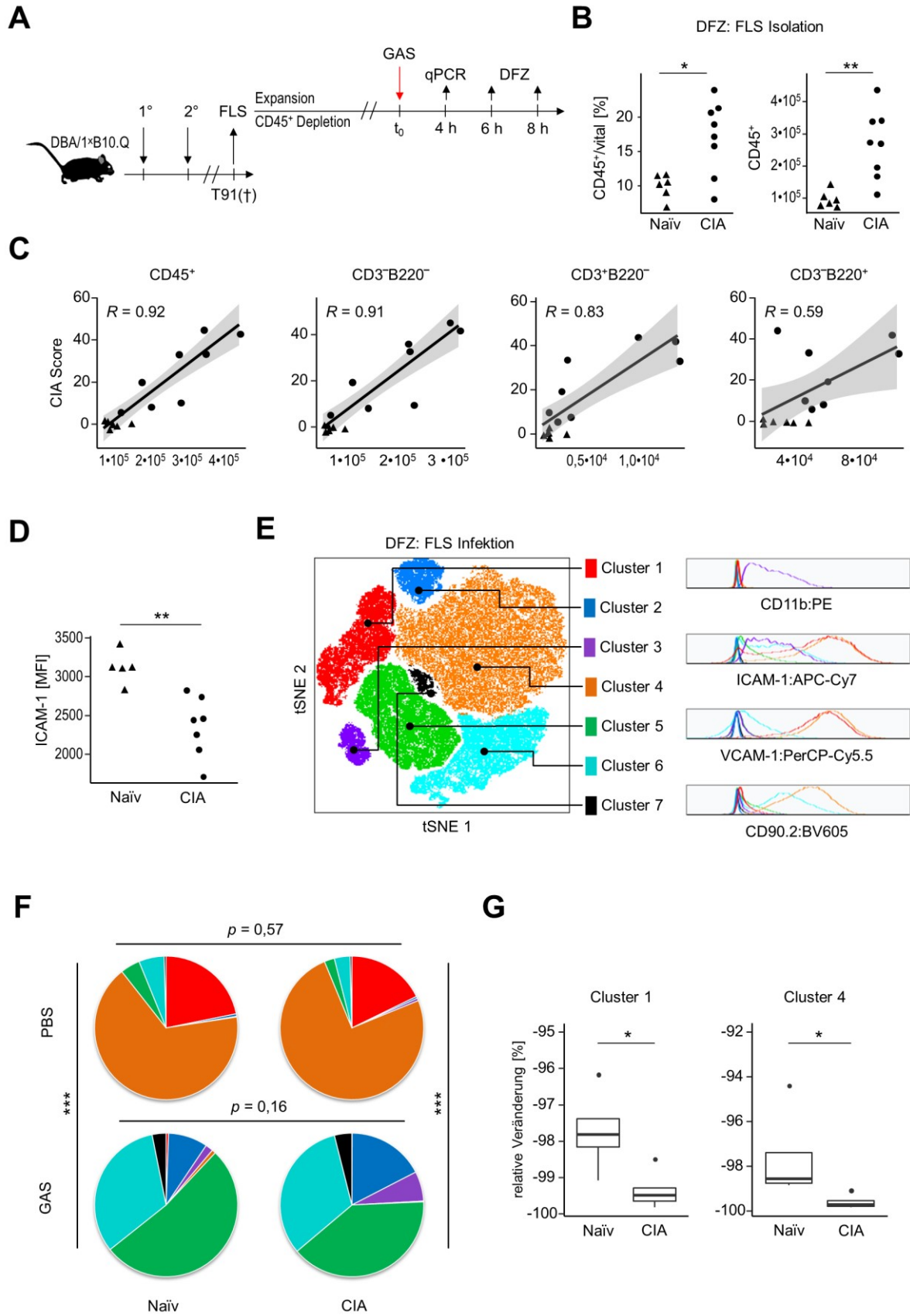
**Abbildung 19: Eine erhöhte Krankheitsaktivität der Arthritis in CIA und SA war mit einem osteoporotischen Phänotyp assoziiert.** Das Punktdiagramm stellt die starke Korrelation der Arthritis Scores mit dem *structure model index* (SMI) der Spongiosa in der Epiphyse des Femurs dar. *R*: Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient. Die grauen Flächen illustrieren das 95 % Konfidenzintervall der Regression.

**Tabelle 10:** Korrelationsanalyse der morphometrischen Knochen-Parameter mit den Arthritis Scores. *R*: Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001; dick gedruckte Zahlen indizieren eine starke Korrelation).

Lokalisierung	Parameter	Arthritis Score	
		<i>R</i>	<i>p</i>
Femorale Epiphyse	BV/TV	-0,47	***0,00033
	Tb.N	-0,34	*0,013
	BMD	-0,32	*0,017
	Ct.Ar/Tt.Ar	-0,37	**0,005
	MMI(polar)	0,15	0,29
	Ct.Th	-0,33	*0,016
	BMD	-0,40	**0,0026
Femorale Diaphyse	Ct.Ar/Tt.Ar	-0,45	***0,00071
	MMI(polar)	-0,21	0,14
	Ct.Th	<b>-0,60</b>	***2,0 • 10 <sup>-6</sup>
	BMD	-0,33	*0,014
Tarsus	Ct.Ar/Tt.Ar	-0,32	*0,017
	MMI(polar)	0,56	***5,8 • 10 <sup>-6</sup>
	Ct.Th	-0,26	*0,50
	BMD	-0,49	***0,00012

### 5.8 Die CIA war durch infiltrierende Leukozyten gekennzeichnet und begünstigte eine verstärkte Immunparalyse von FLS nach *in vitro* GAS-Infektion

Als Nächstes wurde erkundet, ob die zellulären Bestandteile der entzündeten Synovia bei den CIA Mäusen zu dem Phänomen einer verschlimmerten Sepsis und SA beitragen. Dafür wurden, in Anlehnung an die unter Absatz 5.6 beschriebenen Experimente, zunächst sechs bis acht Wochen alte F1 Mäuse zweimal im Abstand von drei Wochen mit Kollagen immunisiert (**Abbildung 20A**). Als Kontrolle wurden Tiere verwendet, die nicht immunisiert wurden (naïv). Die Mäuse wurden in einem Alter von 20 bis 22 Wochen geopfert und die synovialen Zellen wurden durch den Verdau von Hinter- sowie Vorderpfoten mittels Kollagenase Typ IV isoliert.



(Legende auf der nächsten Seite)

Die Immunphänotypisierung der Isolate mittels durchflusszytometrischer Einzelzell-Analyse ergab, dass die Synovia von Mäusen mit CIA sowohl relativ als auch absolut mehr CD45<sup>+</sup> Leukozyten enthielt (**Abbildung 20B**). Es wurde vermutet, dass der Umfang von der Zellinfiltration in die Synovia mit der Krankheitsaktivität der entzündlichen Erkrankung assoziiert war. Tatsächlich ergab die Korrelationsanalyse, dass die absolute Zahl von CD45<sup>+</sup> Zellen zum Zeitpunkt der Zell-Isolation in einem starken, positiven Zusammenhang mit der CIA-Aktivität stand (**Abbildung 20C**). Bei Betrachtung der Leukozyten-Subpopulationen wurde darüber hinaus festgestellt, dass die Anzahl von sowohl CD3<sup>-</sup> B220<sup>-</sup> myeloiden Zellen als auch CD3<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> T-Lymphozyten stark positiv mit dem CIA-Score korrelierten. Der Zusammenhang der Krankheitsaktivität der CIA mit der absoluten Zahl an ko-isolierten CD3<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> B-Lymphozyten war zwar schwächer, jedoch erreichte die Korrelation auch in diesem Fall die statistische Signifikanz ( $p < 0,001$ ; **Abbildung 20C**). Unter der Berücksichtigung der Erkenntnis, dass die Quantitäten der untersuchten Subpopulationen von Leukozyten in Mäusen ohne Vorerkrankung geringer waren, zeigen die Ergebnisse, dass sich die CIA-Synovia immunphänotypisch deutlich von einer gesunden Synovia unterschied.

**Abbildung 20 (auf der vorherigen Seite): Die Synovia von Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis war durch infiltrierende Immunzellen und durch eine verringerte Expression von Integrin-Liganden gekennzeichnet.** Eine *in vitro* Infektion von synovialen Fibroblasten mit GAS führte darüber hinaus zum Verlust von Subpopulationen, welche die Retention von Immunzellen vermitteln können. **(A)** Experimentelles Schema: 6 bis 8 Wochen alte, männliche DBA/1 × B10.Q Mäuse wurde mit Rinder-Kollagen Typ II Primär- (1°) und Sekundär-immunisiert (2°) woraufhin sich die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) entwickelte, die über 11 Wochen beobachtet wurde. Nach diesem Zeitraum wurden die Tiere geopfert und die synovialen Zellen wurden durch Verdau mit Kollagenase Typ IV aus den Pfoten der Tiere isoliert. Nach durchflusszytometrischer Analyse der Leukozyten aus dem heterogenen Zellgemisch erfolgte die Expansion der FLS mit anschließender Depletion der Leukozyten. Nachdem die Kulturen erneut expandiert wurden erfolgte die *in vitro* Infektion mit GAS mit einer MOI von 10 für 4, 6 oder 8 Stunden. Nach 4 h wurde die RNA isoliert und für die relative Quantifizierung der mRNA Expression mittels qPCR verwendet. Nach 6 und 8 h wurde die Einzelzellanalyse mittels Durchflusszytometrie (DFZ) durchgeführt. **(B)** Die Synovia von CIA Mäusen war erheblich mit Leukozyten infiltriert. Die Streudiagramme zeigen, dass in frisch isolierten, synovialen Zellen die relative sowie absolute Anzahl von CD45<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu Zellgemischen aus naiven Tieren signifikant erhöht war. (\* $p < 0,05$  Mann-Whitney *U* test) **(C)** Die Krankheitsaktivität der CIA war abhängig von der absoluten Anzahl infiltrierender, myeloider und lymphoider Zellen. Die Punktdiagramme zeigen die CIA Scores sowie die absoluten Quantitäten von Leukozyten (CD45<sup>+</sup>) und deren Subpopulationen in synovialen Isolaten aus naiven ( $n = 6$ ) Mäusen bzw. Tieren mit CIA ( $n = 8$ ). *R*: Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient. Die grauen Flächen illustrieren das 95 % Konfidenzintervall der Regression. **(D)** Die Expression vom Integrin-Liganden ICAM-1 war auf FLS aus CIA-Mäusen signifikant geringer. Die Synovia-Zellen wurden nach Isolation für eine Woche in *in vitro* expandiert und dann durchflusszytometrisch analysiert. Das Streudiagramm zeigt die Expression von ICAM-1 der CD31<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> Zellen anhand vom Median der Fluoreszenz-Intensität (MFI) **(E)** Das statistische Modell, ermittelt durch maschinelles Lernen sowie Data-Mining mit Hilfe des *t-distributed stochastic neighbor embedding* (tSNE) Algorithmus, indiziert die Heterogenität der Expressionsmuster von FLS. Das Modell wurde auf infizierte und nicht-infizierte Zellen aus naiven ( $n = 4$ ) beziehungsweise CIA-Mäusen ( $n = 5$ ) acht Stunden nach Beginn der Experimente angewendet. Links: die beaufsichtigte Abgrenzung der Cluster erfolgte anhand der durch tSNE geformten Daten-Inseln. Rechts: die Cluster sind distinkte Subpopulationen von FLS, die sich anhand der Expression von Oberflächen-Proteinen unterschieden. **(F,G)** Die *in vitro* Infektion von FLS mit GAS induzierte den Verlust der Cluster 1 (ICAM-1<sup>hi</sup> VCAM-1<sup>hi</sup>) und 4 (ICAM-1<sup>hi</sup> VCAM-1<sup>hi</sup> CD90.2<sup>hi</sup>), was in den aus CIA-Mäusen abgeleiteten Kulturen stärker ausgeprägt war. **(F)** Die Kreisdiagramme zeigen die Zusammensetzung von infizierten und nicht-infizierten FLS-Kulturen aus naiven Tieren beziehungsweise Mäusen mit CIA. Die Farbkodierung illustriert die anhand der tSNE-Cluster identifizierten FLS-Subpopulationen. (\*\* $p < 0,001$  exakter Fisher-Test) **(G)** Die Box-Plots zeigen die Veränderung des Anteils von Cluster 1 und 4 nach Infektion relativ zur PBS-Kontrolle. (\* $p < 0,01$  Mann-Whitney *U* Test)

Um zu untersuchen, ob die CIA auch Veränderungen in der Gen-Expression von FLS induzierte, wurden die synovialen Isolate zunächst für eine Woche in Kultur expandiert. Auf Grund des durch den Verdau bedingten Zellstressess konnten aus den ursprünglich 14 Isolaten nur 12 Kulturen etabliert werden, die anschließend analysiert wurden. In **Abbildung 20D** ist darstellt, dass FLS aus CIA-Mäusen im Vergleich zu den Zellen aus naïven Tieren signifikant weniger ICAM-1 exprimierten, was darauf hindeutet, dass in Folge der entzündlichen Vorerkrankung die Kompetenz von FLS, Leukozyten zu rekrutieren eingeschränkt war.

Damit vor Beginn der Infektionsexperimente gewährleistet werden konnte, dass sich die synovialen Zellen aus naïven beziehungsweise CIA-Mäusen in Bezug auf den Anteil von Leukozyten nicht unterschieden, wurden die CD45<sup>+</sup> Zellen aus den Kulturen depletiert (**Abbildung A3**). Nach einer abschließenden Expansion in Kultur wurden die angereicherten FLS mit einer MOI von 10 für vier, sechs oder acht Stunden mit GAS infiziert (**Abbildung 20A**). Überraschenderweise ergab die Analyse mittels qPCR vier Stunden nach Beginn des Experiments, dass die Infektion keinen Einfluss auf die relative mRNA Expression von *Ccl2*, *Cxcl2*, *Tnf*, *Il10*, *Tgfb1*, *Rankl* und *Mmp13* hatte (**Abbildung A4**). Lediglich die Expression von *Il6*, *Opg* und *Mmp1a* war in den FLS-Kulturen, die aus Tieren mit CIA generiert wurden, marginal jedoch statistisch signifikant runterreguliert. In diesem Zusammenhang wurde in Bezug auf die analysierten Gene keinen Unterschied zu der Expression von FLS aus naïven Tieren festgestellt.

Die durchflusszytometrische Einzelzell-Analyse wurde von infizierten und nicht-infizierten Kulturen nach sechs beziehungsweise acht Stunden durchgeführt. In **Abbildung 20E bis G** sind die Ergebnisse aus der Analyse der CD31<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> Zellen nach acht Stunden mittels maschinellem Lernen unter Verwendung des *t-distributed stochastic neighbor embedding* (tSNE) Algorithmus dargestellt. Mit Hilfe dieser Methode wurden sowohl infizierte als auch nicht-infizierte FLS anhand der von ihnen differenziell exprimierten Oberflächenantigene CD11b, ICAM-1, VCAM-1 und CD90.2 durch Anwendung von beaufsichtigtem Clustering in sieben distinkte Subpopulationen eingeteilt (**Abbildung 20E**). So wurde mit Hilfe der tSNE-Analyse festgestellt, dass sich die naïven FLS der PBS-Kontrollen in ihrer Zusammensetzung nicht von den FLS, die ursprünglich aus Mäusen mit CIA isoliert wurden, unterschieden (**Abbildung 20F**). Interessanterweise induzierte die achtstündige Infektion mit GAS, unabhängig von der Vorerkrankung der Donor-Tiere, einen signifikanten Verlust der Subpopulationen aus Cluster 1 und Cluster 4, die als ICAM-1<sup>hi</sup> VCAM-1<sup>hi</sup> beziehungsweise ICAM-1<sup>hi</sup> VCAM-1<sup>hi</sup> CD90.2<sup>hi</sup> Zellen identifiziert wurden. In Folge der Infektion wurde bezüglich der Komposition der FLS-Subpopulationen kein signifikanter Unterschied zwischen den Kulturen

---

aus gesunden und CIA-Mäusen festgestellt. Jedoch wurde eine tendenzielle Zunahme von Cluster 3, der durch die Expression von CD11b gekennzeichnet war, in den infizierten FLS aus CIA-Mäusen beobachtet (**Abbildung 20F**). Darüber hinaus war der GAS-induzierte Verlust von Cluster 1 und Cluster 4 in den Kulturen aus CIA-Mäusen signifikant stärker ausgeprägt, was eine differenzielle Reaktion der FLS auf die Infektion vermuten ließ. Unter Anwendung von klassischem hierarchischem Gating wurde entsprechend festgestellt, dass die Verminderung der Expression von sowohl ICAM-1 als auch VCAM-1 nur in den FLS aus CIA Mäusen die statistische Signifikanz erreichte (**Abbildung A5**).

Zusammengefasst zeigten die hier dargelegten Ergebnisse, dass die Synovia von Tieren mit CIA massiv mit Leukozyten infiltriert war. Der Umfang der Infiltration von periartikulärem Gewebe durch myeloide Zellen sowie T- und B-Lymphozyten war darüber hinaus abhängig von der Schwere der entzündlichen Vorerkrankung. Des Weiteren waren die FLS aus CIA-Mäusen durch eine verhältnismäßig geringere Expression des Integrin-Liganden ICAM-1 gekennzeichnet. Durch Anwendung von tSNE wurde außerdem explorativ beurteilt, inwieweit sich das Bouquet aus FLS-Subpopulationen in Folge der Infektion veränderte. Hierbei wurde festgestellt, dass GAS – besonders in FLS aus Tieren mit CIA – die Reduktion der Expression von ICAM-1, VCAM-1 und CD90.2 bewirkte und darüber hinaus die Expression von CD11b induzierte. Die hier gezeigten Daten deuten an, dass die entzündliche Vorerkrankung phänotypische Veränderungen in den synovialen Fibroblasten bewirkte, die zu einer vergleichsweise stärker ausgeprägten Immunparalyse im Verlauf der Infektion mit GAS führte.

### **5.9 Eine vorhergehende Infektion mit Influenza A Virus begünstigte das Auftreten der GAS-induzierten septischen Arthritis**

---

Um den Einfluss einer Infektion durch das Influenza A Virus (IAV) auf die Inzidenz und Schwere der GAS-induzierten SA zu untersuchen, wurden zwei Ko-Infektion-Modelle in B6 Mäusen etabliert (**Abbildung 21A**). Für das Modell einer viralen Superinfektion wurden 20 bis 22 Wochen alte männliche B6 Mäuse zunächst mit  $1 \cdot 10^5$  KBE GAS intravenös und zwei Tage später mit  $1 \cdot 10^5$  PBE IAV intranasal infiziert (GAS+IAV). Für das Modell einer bakteriellen Superinfektion wurde die Reihenfolge der Pathogen-Applikation invertiert, sodass die Tiere erst mit IAV und dann zwei Tage später mit GAS infiziert wurden (IAV+GAS). Unter Berücksichtigung von auftretenden Gelenk-Schwellungen bei Tieren mit einer monokausalen, bakteriellen Infektion (GAS) wurde eine Inzidenz der SA von 20 % festgestellt, die innerhalb von maximal vier Tagen auftrat (**Abbildung 21B**, links). Erwartungsgemäß setzten da-

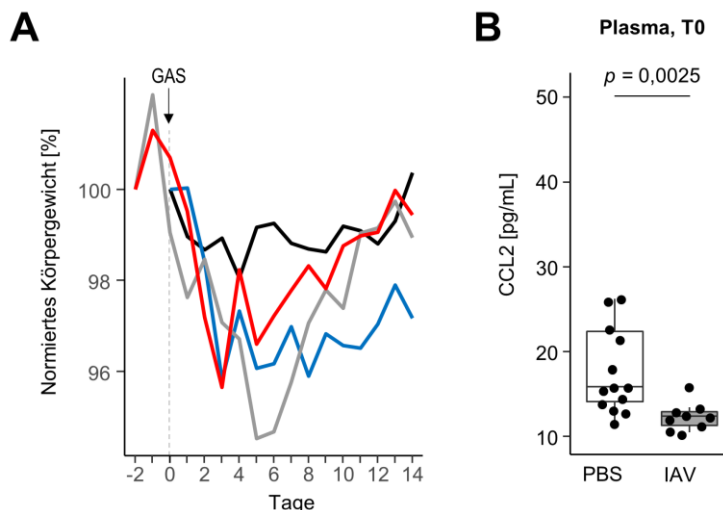
---





Verteilung mit denen der IAV- beziehungsweise GAS-Gruppe wurden signifikante Unterschiede festgestellt (**Abbildung 21B**, links). Die erhöhte Inzidenz in der IAV+GAS-Gruppe ging darüber hinaus mit einer Zunahme der Krankheitsaktivität der SA gegenüber der GAS-Gruppe einher (**Abbildung 21B**, rechts). Die verschlimmerte Erkrankung in der IAV+GAS-Gruppe spiegelte sich zudem in einer tendenziell verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit wieder, die jedoch nicht die statistische Signifikanz erreichte (**Abbildung 21C**, links). Dennoch war die Krankheitsaktivität der Sepsis beim Vergleich mit Tieren, die nur mit GAS infiziert wurden, signifikant erhöht (**Abbildung 21C**, rechts).

Mit Hilfe der Lipidomics-Analysen an Maus-Pfoten wurde eine positive Korrelation der Quantitäten der inflammatorischen Eicosanoide PGE<sub>2</sub> und PGD<sub>2</sub> mit dem Sepsis Score bestimmt (**Abbildung 21D**). Unter Berücksichtigung des in Folge der Ko-Infektion in der IAV+GAS-Gruppe verschlimmerten Krankheitsverlaufs wurde vermutet, dass die vorhergehende Virus-Infektion zu einer Schwächung der Tiere führte. Bei der vergleichenden Analyse der auf den Beginn der jeweiligen Experimente normierten Körpergewichte wurde eine Gewichtsreduktion bei Mäusen, die mit IAV infiziert wurden, registriert (**Abbildung 22A**). Zwar unterschied sich der Verlauf der Körpergewichte in dieser Gruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht signifikant von den Gewichtsverläufen der anderen Gruppen ( $p > 0,05$ ; zweifache ANOVA mit Messwiederholungen), jedoch zeigen die Daten, dass die virale Infektion die



**Abbildung 22: Eine Infektion mit IAV induzierte in Mäusen den Verlust von Körpergewicht und die Abnahme der Produktion von CCL2.** (A) Das Linienendiagramm stellt den Verlauf der Veränderung des Körpergewichts relativ zum Beginn der jeweiligen Beobachtungszeiträume dar. (B) Die IAV-Infektion beeinflusste die Sekretion von CCL2 und damit die Rekrutierung von Monozyten. Der Box-Plot zeigt die Plasmakonzentrationen zwei Tage nach Infektion der Tiere mit IAV im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren (PBS).

Gesundheit der Tiere für mindestens eine Woche wenigstens leicht beeinflusste. Bei Betrachtung der Zytokin-Konzentrationen im Mausplasma zwei Tage nach der Infektion mit IAV wurde beim Vergleich mit gesunden Kontroll-Mäusen eine signifikante Reduktion der Produktion des Monozyten-Chemokins CCL2 festgestellt (**Abbildung 22B**).

Zusammengefasst zeigen die hier dargelegten Daten, dass eine vorhergehende Infektion mit IAV die GAS-induzierte Sepsis verschlimmerte und das Auftreten der SA begünstigte. Das Virus schien darüber hinaus die Mäuse im Vorfeld der GAS-Applikation zu schwächen und die Rekrutierung von Monozyten zu beeinflussen. Demnach war die Immunreaktion in Folge der vorhergehenden IAV-Infektion beeinträchtigt, so dass die bakterielle Infektion nicht abgewehrt konnte, was ultimativ zu einer hohen Mortalitätsrate führte.

## VI. DISKUSSION

---

In dieser Studie wurde ein neuartiges Kleintier-Modell der Sepsis nach intravenöser Applikation von Gruppe A Streptokokkus etabliert. Die invasive Infektion induzierte eine akute septische Arthritis in hoher Inzidenz, deren gravierender Verlauf mit einer beträchtlich hohen Mortalität innerhalb weniger Tage assoziiert war. Die SA wurde mit Hilfe von zwei entscheidenden diagnostischen Kriterien identifiziert: (i) anhand der direkten Isolation von GAS aus den Kniegelenken und/oder (ii) mittels makroskopischer Erkennung von Schwellungen an den Pfoten-Gelenken bei koinzidenter Isolation von GAS aus einem anderen Wirtskompartiment, beispielsweise der Milz oder der Leber (Mathews et al., 2010; Newman, 1976). In der hier beschriebenen Studie konnte GAS des Weiteren im periartikulären Weichgewebe des Tarsus immunhistochemisch nachgewiesen werden. Anhand der histopathologischen Untersuchungen wurde außerdem demonstriert, dass die bakterielle Kolonisierung mit einer Infiltration von Immunzellen in das Mikromilieu der Gelenke assoziiert war und die dadurch induzierte Entzündung zu einer Schädigung des Weichgewebes führte. Hierbei wurden segmentkernige neutrophile Granulozyten im entzündeten Gewebe detektiert, die mit GAS vergesellschaftet waren.

### 6.1 Neutrophile sind an der Pathogenese der septischen Arthritis beteiligt

---

Neutrophile Granulozyten sind für die Beseitigung von infektiösen Erregern aus dem befallenen Wirtsgewebe indispensable. Jedoch tragen diese Immunzellen maßgeblich zur Pathophysiologie der SA bei, wenn es ihnen nicht gelingt die bakterielle Last zu beseitigen (Boff, Crijns, et al., 2018). Neutrophile stellen die erste Zell-Population, die während einer SA zum infizierten Gewebe dirigiert wird, dar (von Köckritz-Blickwede et al., 2008). Ihre Lebensdauer ist im Fließgleichgewicht zwar limitiert, kann jedoch durch das von aktivierten Makrophagen produzierte TNF $\alpha$  deutlich verlängert werden, wodurch gleichzeitig der Beginn einer Entzündung im betroffenen Gewebe induziert wird (McCracken & Allen, 2014; Takano et al., 2009).

Die Entfernung von Pathogenen durch Neutrophile wird durch die Phagozytose, die Absonderung anti-mikrobieller Peptide und mit Hilfe der Sekretion von reaktiven Sauerstoffspezies sowie neutrophilen extrazellulären Fallen (*neutrophil extracellular traps*, NETs) erreicht. Diese Mechanismen der angeborenen Immunabwehr führen jedoch während einer überschießenden Entzündungsreaktion zur umfangreichen Schädigung des infizierten Gewebes (Borregaard et al., 2007; Castanheira & Kubes, 2019; Paiva & Bozza, 2014). So wurde beispielsweise gezeigt, dass die im Verlauf der NETose freigesetzten Histone den Tod von um-

---

liegenden Endothelzellen induzieren und bei Infektionen des Blutes zu kritischen Leberschäden führen (Kolaczowska et al., 2015; Saffarzadeh et al., 2012).

In einer aktuellen Studie wurde der Einfluss von CXCR2 – ein auf Neutrophilen exprimierter Chemokin-Rezeptor (J. P. Jacobs et al., 2010) – auf die Pathologie der *S. aureus*-induzierten SA untersucht (Boff, Oliveira, et al., 2018). Diese Experimente an Mäusen haben demonstriert, dass die Inhibierung der Chemotaxis von Neutrophilen durch Anwendung eines CXCR2-Inhibitors mit einer erhöhten bakteriellen Last im Kniegelenk assoziiert war. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass durch die Einschränkung der Rekrutierung von Neutrophilen zum Infektionsherd die Bildung von inflammatorischen Zytokinen verringert wurde, wodurch das Ausmaß der artikulären Schäden reduziert wurde (Boff, Oliveira, et al., 2018). Diese Studie legte somit den Einfluss von Neutrophilen auf die Etablierung einer destruktiven Immunreaktion dar. Abgesehen von der Verwendung eines anderen Pathogens lösten die Wissenschaftler die SA im Gegensatz zu den hier gezeigten Experimenten durch intra-artikuläre Infektion aus. Demnach wurde eine Infektion vom synovialen Gewebe nach einer Bakteriämie umgangen. Daher wurde der Beitrag der synovialen Zellen zur Gelenkzerstörung mit diesen Experimenten nicht adressiert.

### **6.2 Synoviale Fibroblasten tragen zur Pathogenese der septischen Arthritis bei**

---

Die Synovia wird vornehmlich aus Fibroblasten (FLS) aufgebaut und ist ein wichtiger Angriffspunkt von Bakterien während einer SA. Der Beitrag von FLS bei der Induktion und der Aufrechterhaltung schädlicher Entzündungsreaktionen nach einer Infektion ist bislang unbekannt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass FLS nach *in vitro* GAS-Infektion die Überproduktion der Chemokine CCL2 und CXCL2 induzieren. Diese Proteine vermitteln die Rekrutierung von Monozyten beziehungsweise Neutrophilen zum infizierten Gewebe (Denadai-Souza et al., 2017; Deshmane et al., 2009). Des Weiteren bewirkte die GAS-Infektion eine inflammatorische Reaktion der FLS, welche anhand der Absonderung von TNF $\alpha$  und IL-6 nachgewiesen wurde.

Zahlreiche *in vivo* Studien haben die Relevanz von TNF $\alpha$  bei der Immunabwehr bakterieller Pathogene demonstriert (Rothe et al., 1993; Takashima et al., 1997; Tite et al., 1991). Dieses Zytokin ist darüber hinaus ein entscheidender Faktor bei der Entstehung der Pathologie während einer SA. In einem Modell der Infektion mit *S. aureus* wurde diesbezüglich festgestellt, dass TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Mäuse im Gegensatz zum Wildtyp resistent gegenüber der SA waren (Hultgren et al., 1998). Gleichzeitig wurde in den Knockout-Tieren eine uneingeschränkte

---

Verbreitung des Pathogens und damit eine erhöhte Mortalität beobachtet. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass eine Blockade der TNF $\alpha$ -Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 die Entzündung der Gelenke während einer SA abmilderten (Sultana & Bishayi, 2018).

TNF $\alpha$  ist des Weiteren in der Lage, die Expression von IL-6 zu induzieren (Ishimi et al., 1990). In dem hier präsentierten Modell veranlasste die Stimulation von FLS mit inaktivierten Bakterien zwar eine Überexpression von *Tnf*, jedoch waren lebende Bakterien für die Induktion von *Il6* nötig. Demnach suggerieren die hier gezeigten Ergebnisse, dass es lebende Bakterien erfordert, um eine umfangreiche Entzündung auszulösen. IL-6 hat pleiotrope Funktionen während der angeborenen Immunreaktion und reguliert in diesem Zusammenhang beispielsweise die medulläre Granulopoese, die Synthese von Granulozyten-aktivierenden Chemokinen und die Apoptose von Neutrophilen (Chou et al., 2012; Hunter & Jones, 2015; F. Liu et al., 1997). Das Zytokin kann im Konzert mit TNF $\alpha$  des Weiteren die Präsentation der Proteine Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) und Vaskulärzellen Adhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) induzieren (Q. Chen et al., 2004; Romano et al., 1997; Springer, 1990).

Die durchflusszytometrische Einzellzell-Analyse infizierter FLS ergab eine sieben- beziehungsweise zweifache Überexpression der Oberflächenproteine ICAM-1 und VCAM-1. ICAM-1 ist ein Ligand der Integrin-Komplexe CD11a/CD18 und CD11b/CD18 (Diamond et al., 1990). VCAM-1 vermittelt die Bindung an Integrin  $\alpha 4\beta 1$  (Garmy-Susini et al., 2005). Sowohl CD11b/CD18 als auch Integrin  $\alpha 4\beta 1$  werden auf myeloiden Zellen wie beispielsweise den Neutrophilen exprimiert (Hyun et al., 2019; Kadioglu et al., 2011), die nach Interaktion mit ICAM-1 oder VCAM-1 das infizierte Gewebe infiltrieren (Springer, 1994; Williams & Luscinskas, 2011). Diese beiden Adhäsionsproteine haben weitreichende Implikationen bei zahlreichen entzündlichen Erkrankungen, in dem sie die Aufrechterhaltung inflammatorischer Reaktionen unterstützen (Henninger et al., 1997; Norris et al., 1992; Poston et al., 1992). Zusammengenommen weisen infizierte FLS laut den hier gezeigten *in vitro* Daten immunologisch relevante Eigenschaften auf und induzieren Mediatoren einer kompetenten Entzündungsreaktion. In diesem Zusammenhang sind FLS in der Lage, Zellen des angeborenen Immunsystems zu rekrutieren und deren Infiltration in den Infektionsherd über die Expression von Integrin-Liganden zu gewährleisten. Demnach suggerieren die hier gezeigten Resultate, dass FLS unmittelbar zur Pathogenese der SA beitragen.

### 6.3 Synoviale Fibroblasten und infiltrierende Immunzellen orchestrieren die Pathogenese der septischen Arthritis

---

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal experimentell demonstriert werden, dass eine chronisch entzündliche Vorerkrankung der Gelenke das Auftreten einer GAS-induzierte SA begünstigt und deren Verlauf verschlimmert. In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde zwar umfangreich über die rheumatoide Arthritis (RA) als wichtiger Risikofaktor diskutiert (Doran et al., 2002; Gupta, 2003; Weston et al., 1999), jedoch konnte bislang nicht überprüft werden, ob eine immunsuppressive Therapie oder die Autoimmunität selbst für die SA prädisponiert. In der hier vorliegenden Arbeit wurde eindeutig demonstriert, dass immunkompetente Mäusen mit der autoimmunen Vorerkrankung signifikant anfälliger gegenüber einer unopponierten invasiven GAS-Infektion waren. Die Infektion war in diesen Tieren mit einer exzessiven Überproduktion von Zytokinen sowie Eicosanoiden verbunden, was ultimativ zu einer hohen Mortalitätsrate führte. Als Tier-Modell der RA wurde die Kollagen-induzierte (CIA) Arthritis verwendet. Die CIA teilt wichtige pathologische Charakteristika mit der humanen Erkrankung, wie etwa die Infiltration lymphoider sowie myeloider Zellen in das periartikuläre Gewebe und die synoviale Hyperplasie (Brand et al., 2007; Bustamante et al., 2017; Rooney et al., 1988). Im Folgenden wird argumentiert, inwieweit eben diese Eigenschaften der CIA maßgeblich an der Immunpathologie der hier beschriebenen exazerbierten SA beteiligt waren.

Die CIA-assoziierten Immunzell-Infiltrate in den entzündeten Gelenken präsentieren eine große Bandbreite an hoch exprimierten Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs), die bei Bindung von bakteriellen Bestandteilen von GAS rapide aktiviert werden können (Hafner et al., 2019; Hayashi et al., 2003; Navarini et al., 2009). Die Aktivierung von PRRs führt daraufhin zur Synthese und Absonderung von Entzündungsmediatoren und bedingt damit eine systemische Aktivierung sowie Rekrutierung von zusätzlichen Immunzellen, was zu der Entgleisung der GAS-induzierten Immunreaktion beitragen kann (Joosten et al., 2008, 2003). Die CIA ist des Weiteren durch eine kontinuierliche Proliferation und Akkumulation von FLS in den Gelenken charakterisiert (Matsuo et al., 2016; Nasu et al., 2000). Diese Zellen werden während einer SA ebenfalls aktiviert und tragen zur Rekrutierung und Emigration weiterer Leukozyten bei. Die hier gezeigten Daten suggerieren, dass im Falle einer vorhergehenden CIA die FLS im Pannus nach Kontakt mit GAS zum lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf beitragen. Demnach agieren die FLS im Konzert mit den infiltrierenden Immunzellen und vermitteln die schädlichen Entzündungsreaktionen, welche zu einer ungebremsten Zerstörung des artikulären Gewebes führen.

---

Die Ergebnisse aus den *in vitro* Infektionsversuchen an den aus F1 Tieren gewonnenen FLS waren jedoch ambivalent. Es wurde bestätigt, dass die frisch isolierte Synovia aus CIA-Mäusen massiv mit Lymphozyten und myeloiden Zellen infiltriert war. Jedoch induzierte die GAS-Infektion in FLS-Reinkulturen keine Überexpression von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Des Weiteren bewirkte GAS hierbei den Verlust der Expression von ICAM-1 und VCAM-1. Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind womöglich auf die langzeitige Kultivierung mit mehrfacher Anwendung der Leukozyten-Depletion zurückführbar. Der dadurch bedingte Zellstress war demnach scheinbar für den beobachteten Erschöpfungsphänotypen der FLS verantwortlich. Demnach suggerieren die gezeigten Daten, dass das Design dieser Teilexperimente ungeeignet war. Zukünftige Versuche mit anschließender Multiparameter-Analyse sollten demnach an frisch isolierten FLS aus infizierten beziehungsweise nicht-infizierten Mäusen mit oder ohne CIA durchgeführt werden.

### **6.4 Osteoklasten und biomechanische Abnutzung als mögliche Ursachen von Knochenerosionen bei einer septischen Arthritis**

---

Es wurde bereits mehrfach postuliert, dass die fulminanten Entzündungsreaktionen während einer SA die RANKL/RANK/OPG-Achse manipulieren, wodurch die Homöostase von Knochenaufbau und Resorption gestört wird (Kassem et al., 2016; Leite et al., 2015; Sakurai et al., 2003). RANKL ist ein Zytokin, das in der Lage ist die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläufern zu Knochen-resorbierenden Osteoklasten zu steuern (Okamoto & Takayanagi, 2019). Die Vorläuferzellen exprimieren RANK, welches der einzig bekannte Rezeptor für RANKL auf Zelloberflächen ist (Guerrini & Takayanagi, 2014; Nemeth et al., 2011). OPG ist ein Decoy-Rezeptor, welcher von stromalen Knochenzellen exprimiert wird und die Wirkung von RANKL auf die Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie antagonisiert (Solberg et al., 2014).

Bislang ist weitestgehend unbekannt, welcher Zelltyp der wichtigste Produzent von RANKL während einer SA ist und damit den Verfall von Knochengewebe vermittelt. In einer *in vivo* Studie wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass Osteoblasten die Expression von RANKL nach GAS-Infektion induzieren (Okahashi et al., 2003). Interessanterweise demonstrierte eine aktuelle Arbeit, dass eine Stimulation mit GAS-Antigenen in einer Ko-Kultur aus Osteoklasten-Vorläufern und Osteoblasten die Differenzierung zu Knochen-resorbierenden Zellen inhibierte (Volzke et al., 2020). Somit kann ausgegrenzt werden, dass GAS selbst den Verlust von Knochengewebe vermitteln kann, sondern die Wirtszellen in Folge der Entzündung als Reaktion auf die Infektion eine unverhältnismäßige Osteoklastogenese antreiben.

---



Des Weiteren erfordert der direkte Kontakt von GAS mit Knochenzellen eine Infektion vom Knochengewebe beispielsweise während einer aktiven Osteomyelitis, welche in dem Tiermodell der hier vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen wurde.

An dieser Stelle sollen FLS als maßgebliche Produzenten von RANKL während einer SA vorgeschlagen werden. Zum einen zeigten die histologischen Untersuchungen, dass FLS in direkten Kontakt mit GAS waren und zum anderen induzierte die *in vitro* Infektion von FLS mit GAS geringfügig die Überexpression von *Rankl*. Des Weiteren wurde in anderen Studien demonstriert, dass TNF $\alpha$  sowie IL-6 die Expression von RANKL auf FLS auslösen können (Choe et al., 2013; Gao et al., 2016; Hashizume et al., 2008). In den hier gezeigten Experimenten wurden sowohl TNF $\alpha$  als auch IL-6 in hohen Konzentrationen im Plasma von infizierten CIA-Mäusen identifiziert, was gleichzeitig mit einem signifikanten Verlust der Knochenmasse assoziiert war. Tiere, die nicht an der chronisch entzündlichen Erkrankung litten, wiesen weder derart hohe Zytokin-Konzentrationen auf, noch wurde bei ihnen eine Veränderung der Knochenmorphologie detektiert. Hiermit wird also argumentiert, dass eine überschießende Entzündungsreaktion zu der beschleunigten Erosion des Knochens führte. In diesem Zusammenhang wurden in einer vergangenen Studie an Mäusen, die das humane CD46 exprimieren, Knochenerosionen untersucht (Matsui et al., 2016). CD46 ist ein Rezeptor für das M-Protein, der die Invasion von Zellen durch GAS begünstigt und demzufolge die damit einhergehende Entzündungsreaktion verstärkt (Lövkvist et al., 2008; Matsui et al., 2009). Die transgenen Mäuse litten innerhalb von drei Tagen nach der GAS-Infektion an signifikanten Knochenläsionen (Matsui et al., 2016). Die Knochenmasse von infizierten Wildtyp-Mäusen änderte sich im Vergleich zu gesunden Tieren im gleichen Beobachtungszeitraum jedoch nicht.

Ein weiteres Argument für FLS als wichtige RANKL-Produzenten ist die Beobachtung, dass die Krankheitsaktivität der Arthritis mit dem Ausmaß der Knochendestruktion korrelierte. Der Arthritis Score beschreibt hierbei die Schwellung von Gelenken, welche im Falle der CIA unter anderem durch die synoviale Hyperplasie und somit durch chronisch aktivierte sowie übermäßig proliferierende FLS ausgelöst wird (F. Li et al., 2014; Mizoguchi et al., 2018; Turner & Filer, 2015). Jedoch haben etliche Studien gezeigt, dass während einer autoimmunen Arthritis infiltrierende T- und B-Lymphozyten RANKL exprimieren und demnach eine vermehrte Osteoklastogenese im entzündeten Gelenk unterstützen (Meednu et al., 2016; Takayanagi et al., 2000). Insbesondere in die Synovialmembran einwandernde T<sub>H</sub>17-Zellen, die essentiell für die Pathogenese der CIA sind, wurden als wichtige RANKL-Produzenten identifiziert (Deng et al., 2012; Sato et al., 2006). T<sub>H</sub>17-Zellen sind durch die Sekretion von

---

IL-17 wiederum in der Lage, die RANKL-Expression auf FLS zu stimulieren (Hashizume et al., 2008; Okamoto & Takayanagi, 2019). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Synthese von RANKL durch Zellen im entzündeten Gelenk *in situ* nicht nachgewiesen. Demnach sollten zukünftige Studien die Mechanismen der RANKL-vermittelten Knochenerosionen und den Beitrag von FLS beziehungsweise infiltrierenden Immunzellen zur *in vivo* Osteoklastogenese überprüfen.

*In vitro* Studien haben mehrfach demonstriert, dass die RANKL-induzierte Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ein mehrstufiger und somit längerfristiger Prozess mit einer Dauer von mindestens einer Woche ist (Kassem et al., 2016; Kim et al., 2018). Die in der hier vorliegenden Arbeit beobachteten GAS-induzierten Knochenerosionen traten bei infizierten CIA-Mäusen jedoch schon nach maximal vier Tagen auf. Zwar kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Osteoklastenvorläufer ein fortgeschrittenes Differenzierungsstadium aufweisen und damit eine vergleichsweise schnellere Osteoklastogenese *in vivo* ermöglichen, jedoch müssen auch andere Ursachen für den beobachteten Knochenverlust berücksichtigt werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die SA in einem besonders schweren Fall, den Verlust von extrazellulärer Matrix und eine starke Erosion der Knorpeloberfläche eines infizierten Kniegelenks bewirkte. In diesem Zusammenhang wurde in einer *in vitro* Studie gezeigt, dass GAS in der Lage ist, chondrogene Zellen zu infiltrieren (Sakurai et al., 2008). Die Infektion dieser Zellen resultierte daraufhin in der Überexpression von Metalloproteasen und dem damit verbundenen Abbau kollagener Matrixstrukturen. Des Weiteren wurde in anderen Studien gezeigt, dass eine starke Schädigung des Knorpels zur Freilegung des subchondralen Knochens führt (Kamekura et al., 2005). Dadurch kann es zu einer erhöhten mechanischen Belastung kommen, wodurch der Knochen in Folge normaler Bewegungsabläufe innerhalb kürzester Zeit geschädigt wird. Demnach wird hier postuliert, dass die SA-induzierte Dysplasie des Knochens auch durch RANKL-unabhängige Mechanismen entstehen kann. Demnach sollten kommende Experimente untersuchen, ob eine Infektions-bedingte Knorpelschädigung die Erosion des Knochens begünstigt.

### **6.5 Die SA induziert die Synthese anti-inflammatorischer Eicosanoide**

---

Eicosanoide sind Lipid-Mediatoren der Immunaktivierung und Resolution (Masoodi et al., 2010; Serhan, 2014), deren Produktion aus ubiquitären Vorläufermolekülen umgehend durch bakterielle Komponenten induziert werden kann (Von Moltke et al., 2012). Die Kombination der CIA mit nachfolgender GAS-Infektion führte in den hier dargelegten Experimenten zu

---

einer Überproduktion von anti-inflammatorischen Eicosanoiden wie beispielsweise 13-HOTrE in Pfoten und Leber. Erhöhte Mengen dieses Oxylipins wurden ebenfalls im Serum von Patienten gemessen, die an psoriatischer Arthritis leiden (Coras et al., 2019). 13-HOTrE ist für sein Vermögen bekannt, die durch IL-13 induzierte Expression zahlreicher Metalloproteasen in humanen Chondrozyten zu unterdrücken und damit die Schädigung von Knorpelgewebe einzudämmen (Schulze-Tanzil et al., 2002). Die aus der Katalyse durch die 15-Lipoxygenase produzierten Metabolite 13-HODE und 13-HOTrE sind in der Lage, die Ausbildung des NLRP3 Inflammasom-Komplex zu inhibieren (Kumar et al., 2016). Darüber hinaus wurde eine erhöhte Synthese von 13-HODE in Sepsis-Patienten gefunden (Hamaguchi et al., 2019).

Ein weiteres Lipid, das in dieser Arbeit in erhöhten Quantitäten detektiert wurde, ist 20-HOTE. Dieser Metabolit vermittelt während einer Sepsis die Protektion vor Herzschäden (J. Chen et al., 2018), indem er die Vasokonstriktion und Vasodilatation indirekt über die Produktion von Stickstoffmonoxid reguliert (Cuez et al., 2010; E. R. Jacobs et al., 2006). Des Weiteren inhibiert 20-HOTE die Bildung von Prostanoiden wie etwa PGE<sub>2</sub> (Tunctan et al., 2013). PGE<sub>2</sub> induziert die Produktion von RANKL auf ostealen Stromazellen und beeinflusst demnach die Homöostase des Knochengewebes (Lisowska et al., 2018; X. H. Liu et al., 2005). In Anbetracht der hier dargelegten Resultate ist die mehr als siebenfache Erhöhung der Synthese von 20-HOTE in der Leber das Resultat der kombinierten Krankheitsentitäten der CIA und SA.

Interessanterweise sind alle übermäßig sekretierten Eicosanoide, die in diesem Modell detektiert wurden, mit Mechanismen assoziiert, die einer Entzündungsreaktion entgegenwirken. In Anbetracht der schweren Krankheitsverläufe, konnten die Eicosanoide dem schwerwiegenden Zytokinsturm jedoch nicht ausreichend entgegenwirken, zumal die unkontrollierte Dissemination von GAS wohl zur Aufrechterhaltung der lebensbedrohlichen Inflammation beitrug.

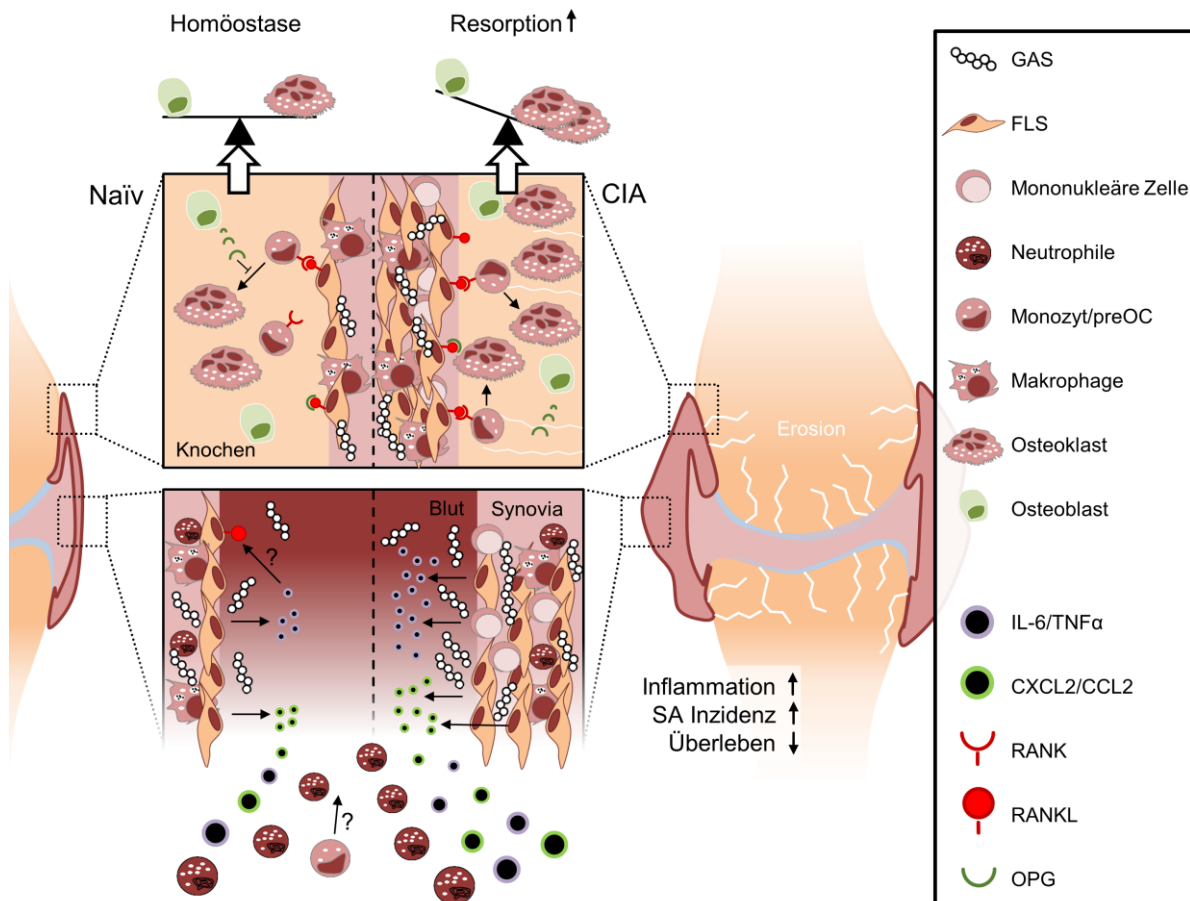
### 6.6 Die Arbeitshypothese als Grundlage für nachfolgende Studien

---

**Abbildung 23** illustriert einen theoretischen Ansatz, mit dessen Hilfe die hier dargelegten Resultate über das Zusammenspiel einer chronisch entzündlichen Gelenkerkrankung mit der GAS-induzierten SA zumindest in Teilen beleuchtet werden. Die Synovia von gesunden Individuen ist durch eine dünne Schicht aus FLS aufgebaut, die mit einigen wenigen Makrophagen assoziiert sind. Bei Infektion mit GAS können diese Zellen die Expression von Chemoki-

---

nen wie CXCL2 oder CCL2 und inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 oder TNF $\alpha$  induzieren. CXCL2 und CCL2 führen zur Aktivierung und Rekrutierung der Zellen des angeborenen Immunsystems, die zur Beseitigung der bakteriellen Last beitragen. IL-6 und TNF $\alpha$  unterstützen diese Immunreaktion, können jedoch auch die Expression von RANKL durch FLS induzieren. Zwar steuert RANKL die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen in knochenresorbierende Osteoklasten, jedoch kann dessen Wirkung nach Bindung an OPG blockiert werden.



**Abbildung 23: Die These als Modell: Die Kollagen-induzierte Arthritis begünstigt eine verschlimmerte Sepsis und septische Arthritis nach GAS-Infektion.** Die Synovialmembran naiver Gelenke besteht aus einer dünn-schichtigen Organisation von FLS und einiger Makrophagen. Im Falle der CIA kennzeichnen sich die FLS jedoch durch ein stark erhöhtes Vermögen zur Proliferation, was zur synovialen Hyperplasie führt. Darüber hinaus wird die chronische Entzündung durch in die Synovialmembran infiltrierende, mononukleäre Zellen sekundiert und aufrechterhalten. Im Vergleich zum gesunden Gelenk kann die entzündete Synovia nach Kontakt mit GAS die exzessive Sekretion von Zytokinen und Chemokinen begünstigen. Im Verlauf der SA könnten dann neu einwandernde, neutrophile Granulozyten und womöglich auch Monozyten zu der Entzündung und damit zur tödlichen Entgleisung des Immunsystems beitragen. Obwohl es bislang nicht geklärt ist, inwiefern eine CIA die Beeinträchtigung der Immunabwehr bedingt, konnte gezeigt werden, dass die entzündliche Vorerkrankung in Verbindung mit der Infektion einen Zytokin-Sturm begünstigt, der mit einer erhöhten Inzidenz der SA, sowie einer verringerten Überlebenschance einhergeht. Bestimmte mit Sepsis assoziierte Zytokine - insbesondere IL-6 - sind in der Lage, die Expression von RANKL auf FLS an der Grenzfläche zwischen Synovia und Knochen zu induzieren. RANKL löst schließlich die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen zu Osteoklasten aus. Die Osteoblasten, welche neue Knochenmatrix deponieren können, sind in der Lage, die Knochenresorption durch die Sekretion von OPG einzudämmen. OPG ist ein lösliches Surrogat von RANKL und verhindert bei Bindung an RANK die Osteoklastogenese. Das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau wird indes bei einer übermäßigen RANKL-Produktion gestört, was ultimativ in der Erosion der Knochenstruktur resultiert.

Somit bleibt die Homöostase zwischen Knochenabbau und Erosion erhalten, wodurch bei Tieren ohne Vorerkrankung die Integrität des Knochens trotz SA erhalten bleibt. Die Synovia von Tieren mit CIA hingegen ist durch eine Hyperplasie der FLS und durch eine Infiltration von mononukleären Zellen charakterisiert, die durch GAS im Verlauf einer SA aktiviert werden. Das Resultat ist eine exzessive Überproduktion der Chemokine sowie Zytokine und führt zu einer lebensbedrohlichen systemischen Entzündung. Diese Entzündung führt zu einer übermäßigen Produktion von RANKL. Durch die vermehrte Differenzierung von Osteoklasten werden die durch die Osteoblasten gesteuerten Mechanismen des Gewebeaufbaus überwältigt, was ultimativ zu einer Zerstörung der Knochensubstanz führt. Des Weiteren führt die entzündliche Vorerkrankung zur Schädigung des Knorpels, die durch die Infektion des Gelenks noch verstärkt wird. Die dadurch erhöhte biomechanische Belastung führt im Konzert mit den Osteoklasten zu einer schwerwiegenden Dysplasie des subchondralen Knochens.

### **6.7 Alter und Gelenkersatz als Risikofaktoren für die SA bei Patienten mit Arthrose**

---

In Anbetracht der Daten aus den Infektionsmodellen von Tieren mit primärer oder sekundärer Arthrose konnte kein Einfluss der degenerativen Vorerkrankung auf die septische Arthritis festgestellt werden. So induzierte GAS bei Tieren mit primärer OA keinen Knochenverlust. Bei Mäusen mit sekundärer OA war weder die Inzidenz der SA noch die Schwere der Sepsis und somit die Überlebenswahrscheinlichkeit signifikant verändert. Demnach suggerieren die Resultate aus den hier eingesetzten Modellen, dass eine Gelenkschädigung durch mechanische Überbelastung oder durch ein genetisch bedingtes Ungleichgewicht der Homöostase des artikulären Gewebes nicht für die SA prädisponiert. Dennoch wurde die humane OA in epidemiologischen Studien als Risikofaktor der SA vorgeschlagen (Dubost et al., 2004; Singh & Yu, 2018).

Da die primäre Arthrose eine multifaktorielle Ätiologie hat und durch Kombination aus unterschiedlichen pathologischen Instanzen bedingt ist (D. Chen et al., 2017), kann in diesem Zusammenhang nicht unterschieden werden, ob die Erosion der Gelenke selbst oder eine Begleiterscheinung der OA die Inzidenz der SA begünstigt. So tritt die OA vermehrt bei alten Menschen auf, sodass nahezu 60 % der über 70-jährigen an der progressiven Erkrankung leiden (Garstang & Stitik, 2006). Eben diese Bevölkerungsgruppe ist einem hohen Risiko ausgesetzt, an invasiven Infektionen und somit an der SA zu erkranken (McBride et al., 2020). Schwere Fälle von primärer oder sekundärer OA müssen mit einem Gelenkersatz behandelt werden. Es wurde wiederum in einer epidemiologischen Studien gezeigt, dass

---

vorhergehende Gelenkoperationen und das Vorhandensein von prosthetischen Gelenken ein noch größeres Risiko für eine SA darstellen als die RA (Kaandorp et al., 1995).

In diesem Zusammenhang wurde mehrfach demonstriert, dass Implantat-Materialien auf Grund ihrer physikalischen Eigenschaften und deren Interaktion mit dem biologischen Gewebe eine attraktive Kolonisierungsgrundlage für Bakterien darstellt und die Bildung von Biofilmen unterstützt (Arciola et al., 2018). Die Ausbildung von Biofilmen ist eine Strategie der Pathogene um der Beseitigung durch antimikrobielle Peptide und durch die zelluläre Immunabwehr des Wirts zu entgehen (Costerton, 1999; Zimmerli et al., 1984). Demnach werden chronische Infektionen und somit die Dissemination der Pathogene in das artikuläre Gewebe unterstützt, was in der Ausbildung einer SA resultiert. Zusammengenommen ist es auf Grund der verschiedenen Faktoren, die eine OA begleiten können, ausgenommen schwierig herzu-leiten, aus welchem Grund diese Form der chronischen Gelenkerkrankung mit einer verhältnismäßig höheren Inzidenz der SA assoziiert ist.

### **6.8 Influenza A Virus beeinflusst die Immunabwehr gegen eine Bakteriämie**

---

Anhand der hier dargelegten Daten wurde zum ersten Mal demonstriert, dass in der Lunge befindliches IAV die Immunreaktion gegen hämatogenes GAS beeinflusste. Obwohl die monokausale Infektion mit IAV nur einen marginalen Verlust des Körpergewichts und eine allgemein schwach ausgeprägte Klinik induzierte, führte sie im Kontext der Ko-Infektion zu einer signifikanten Verschlimmerung des Krankheitsverlaufs der bakteriellen Sepsis und begünstigte das Auftreten der SA. Die Aktivierung von PRRs wie TLR3 oder TLR7 durch virale RNA führt laut Literatur zu einer Überproduktion von Typ-I- und Typ-III-Interferonen (Durbin et al., 2013; Shahangian et al., 2009). In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass die Induktion anti-viraler Zytokine das Immunsystem auf die Abwehr von Viren einstellt, wodurch es gegenüber einer bakteriellen Infektion anfälliger wird (Siemens et al., 2017).

So wurde in einer Studie dargelegt, dass eine Infektion mit Pneumokokken nach IAV-Applikation die Expression von Typ-I-Interferonen verstärkte, was in der Suppression der Synthese von CCL2 und damit in der Einschränkung der Rekrutierung von Monozyten resultierte (Nakamura et al., 2011). In der hier gezeigten Arbeit wurde in Übereinstimmung mit dieser Studie eine verringerte Expression von CCL2 in Reaktion auf die IAV Infektion festgestellt, obwohl keine Veränderungen in den Konzentrationen von Typ-I-Interferonen detektiert werden konnte. CCL2 ist entscheidend für das Überleben während einer Sepsis, da es maßgeblich die Mechanismen der angeborenen Immunabwehr gegen Bakterien steuert (Gomes

---

et al., 2013; Winter et al., 2007). Da IAV jedoch mit dieser Achse der Immunreaktion interferiert, legen die Daten in Verbindung mit den Erkenntnissen aus der Literatur nahe, dass die virale Infektion das Immunsystem kompromittiert. In diesem Zusammenhang wurde in einer weiteren Studie gezeigt, dass eine Impfung von Mäusen mit attenuierten Viren die Tiere gegenüber tödlichen Verläufen nach einer IAV-GAS-Superinfektion schützten (Chaussee et al., 2011). Somit ist der Wirt bei unmittelbarer Abwehr des Virus besser auf die Gefahr einer invasiven bakteriellen Infektion eingestellt.

### 6.9 Limitationen

---

Trotz der neuartigen Erkenntnisse über die Ätiopathogenese der SA und dem Zusammenspiel dieser Erkrankung mit verschiedenen Risikofaktoren unterliegt diese Studie einigen Limitationen. In diesem Zusammenhang wurde ein Tier-Modell für ein strikt an den Menschen angepasstes Pathogen verwendet. So sind zahlreiche, für die Pathogenität von GAS entscheidende Virulenzfaktoren in Bezug auf ihre Aktivität gegenüber humanen Zellen und Proteinen auf den Menschen spezialisiert (Kasper et al., 2014; Reglinski & Sriskandan, 2014). Dennoch war das hier eingesetzte Modell in der Lage, die hämatogene Dissemination des Pathogens zu repräsentieren, die eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung einer SA darstellt. Dementsprechend wurde eine bakterielle Belastung in Leber und Milz detektiert. Darüber hinaus konnten vitale Bakterien auch aus den tibiofemorale Gelenken isoliert werden. Des Weiteren verursachte GAS in den Mäusen die Exazerbation einer bereits bestehenden Autoimmunität. Obwohl die CIA 11 Wochen nach Sekundärimmunisierung in Remission war, zeigten nicht-infizierte CIA-Mäuse in Femur sowie Tarsus eine eindeutige Knochen-Pathologie, die in GAS-infizierten Tieren mit CIA noch evidenter wurde. Demnach unterstützen diese Daten die aus epidemiologischen Studien an humanen Kohorten abgeleitete Hypothese, dass eine aktive Autoimmunität die SA begünstigt.

Eine geringfügige Limitation dieser Studie ist die Wahl einer verhältnismäßig kurzen Beobachtungsdauer von 14 Tagen nach der Infektion. Die Tiere, die von SA betroffen waren mussten sogar innerhalb wenige Tage nach Einsatz der ersten Symptome geopfert werden. Sowohl im Menschen als auch im Tiermodell wurde gezeigt, dass die SA in einen chronischen Zustand übergehen kann mitsamt Beteiligung von aktivierten T-Lymphozyten an der irreversiblen Gelenkdestruktion, die zu Invalidität in überlebenden Individuen führt (Corrado et al., 2016; García-De La Torre, 2003). Demnach war es in den hier beschriebenen Tiermodellen nicht möglich, jeglichen Einfluss einer adaptiven Immunreaktion auf die Aufrechterhaltung der Gelenkentzündung zu untersuchen.

---

## 6.10 Schlussfolgerungen

---

Anhand der Ergebnisse aus dieser Studie wurde gezeigt, dass eine vorhergehende Infektion mit IAV zur Verschlimmerung der SA führte. Die hier gezeigten Daten legen nahe, dass eine Grippeerkrankung zu den Risikofaktoren, die für eine SA prädisponieren, gezählt werden sollte. Deswegen legen die Resultate dieser Arbeit eine Empfehlung für die Gripeschutzimpfung zur Prävention der lebensbedrohlichen bakteriellen Arthritis, insbesondere bei Risikogruppen, nahe.

Die hier vorgelegte Arbeit hat gezeigt, dass eine bestehende Autoimmunität den Verlauf der Streptokokken-induzierten septischen Arthritis verschlimmert. Demnach suggerieren die Ergebnisse, dass Patienten mit rheumatoider Arthritis einem enorm hohen Risiko ausgesetzt sind, nach Infektion mit gram-positiven Erregern eine besonders gravierende Form der bakteriellen Arthritis zu entwickeln. Auf Grund der Natur des Zusammenspiels der beiden Krankheitsaktivitäten, die sich durch eine Überreaktion des Immunsystems gegen das Bakterium auszeichnet, sollten neue Interventionsstrategien erkundet werden, die darauf abzielen, die Immunreaktion einzudämmen.

In diesem Zusammenhang wurde in einer Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie an Kindern mit SA aus dem Jahre 2003 festgestellt, dass die Verwendung des anti-inflammatorischen Corticosteroids Dexamethason die klinische Symptomatik der SA ameliorierte (Odio et al., 2003). Eine aktuelle Meta-Analyse über die Verwendung von Corticosteroiden in der Pädiatrie bestätigte den nützlichen Effekt der Therapie zur Behandlung der bakteriellen Arthritis (Qin et al., 2018). Darüber hinaus sind RANKL-Inhibitoren wie Denosumab auf dem Markt erhältlich, dessen förderliche Wirkung bei Erkrankungen des Knochenstoffwechsels (e.g. Osteoporose) bereits erwiesen ist (Ackerman, 2008). Um diese Möglichkeiten zur Behandlung von SA auszuschöpfen, benötigt es zunächst klinische Studien, um die Sicherheit und Wirksamkeit der Therapien an Risikopatienten zu überprüfen.



**VII. LITERATURVERZEICHNIS**

---

- Abbasi, M., Mousavi, M. J., Jamalzahi, S., Alimohammadi, R., Bezvan, M. H., Mohammadi, H., & Aslani, S. (2019). Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. *Journal of Cellular Physiology*, 234(7), 10018–10031. <https://doi.org/10.1002/jcp.27860>
- Abram, S. G. F., Alvand, A., Judge, A., Beard, D. J., & Price, A. J. (2020). Mortality and adverse joint outcomes following septic arthritis of the native knee: a longitudinal cohort study of patients receiving arthroscopic washout. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(3), 341–349. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30419-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30419-0)
- Ackerman, K. E. (2008). Is denosumab a safe and effective treatment for postmenopausal osteoporosis? *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 4(7), 376–377. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0845>
- Åkesson, P., Sjöholm, A. G., & Björck, L. (1996). Protein SIC, a Novel Extracellular Protein of *Streptococcus pyogenes* Interfering with Complement Function. *Journal of Biological Chemistry*, 271(2), 1081–1088. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.1081>
- Ali, T., Kaitha, S., Mahmood, S., Ftesi, A., Stone, J., & Bronze, M. S. (2013). Clinical use of anti-TNF therapy and increased risk of infections. *Drug, Healthcare and Patient Safety*, 79. <https://doi.org/10.2147/DHPS.S28801>
- Ampofo, K., Herbener, A., Blaschke, A. J., Heyrend, C., Poritz, M., Korgenski, K., Rolfs, R., Jain, S., Carvalho, M. da G., Pimenta, F. C., Daly, J., Mason, E. O., Byington, C. L., & Pavia, A. T. (2010). Association of 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Infection and Increased Hospitalization With Parapneumonic Empyema in Children in Utah. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 29(10), 905–909. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181df2c70>
- Arciola, C. R., Campoccia, D., & Montanaro, L. (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), 397–409. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0019-y>
- Aziz, R. K., Kansal, R., Aronow, B. J., Taylor, W. L., Rowe, S. L., Kubal, M., Chhatwal, G. S., Walker, M. J., & Kotb, M. (2010). Microevolution of group a streptococci in vivo: Capturing regulatory networks engaged in sociomicrobiology, niche adaptation, and
-

- hypervirulence. *PLoS ONE*, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009798>
- Belkina, A. C., Ciccolella, C. O., Anno, R., Halpert, R., Spidlen, J., & Snyder-Cappione, J. E. (2019). Automated optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding improve visualization and analysis of large datasets. *Nature Communications*, 10(1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13055-y>
- Bellido, M., Lugo, L., Roman-Blas, J. A., Castañeda, S., Caeiro, J. R., Dapia, S., Calvo, E., Largo, R., & Herrero-Beaumont, G. (2010). Subchondral bone microstructural damage by increased remodelling aggravates experimental osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Arthritis Research & Therapy*, 12(4), R152. <https://doi.org/10.1186/ar3103>
- Berggard, K., Johnsson, E., Morfeldt, E., Persson, J., Stalhammar-Carlemalm, M., & Lindahl, G. (2001). Binding of human C4BP to the hypervariable region of M protein: a molecular mechanism of phagocytosis resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology*, 42(2), 539–551. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02664.x>
- Boff, D., Crijns, H., Teixeira, M., Amaral, F., & Proost, P. (2018). Neutrophils: Beneficial and Harmful Cells in Septic Arthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 468. <https://doi.org/10.3390/ijms19020468>
- Boff, D., Oliveira, V. L. S., Queiroz Junior, C. M., Silva, T. A., Allegretti, M., Verri, W. A., Proost, P., Teixeira, M. M., & Amaral, F. A. (2018). CXCR2 is critical for bacterial control and development of joint damage and pain in *Staphylococcus aureus* -induced septic arthritis in mouse. *European Journal of Immunology*, 48(3), 454–463. <https://doi.org/10.1002/eji.201747198>
- Boldizar, F., Mikecz, K., & Glant, T. T. (2010). Immunosenescence and its potential modulation: lessons from mouse models. *Expert Review of Clinical Immunology*, 6(3), 353–357. <https://doi.org/10.1586/eci.10.16>
- Borregaard, N., Sørensen, O. E., & Theilgaard-Mönch, K. (2007). Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunology*, 28(8), 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.06.002>
- Brand, D. D., Latham, K. A., & Rosloniec, E. F. (2007). Collagen-induced arthritis. *Nature Protocols*, 2(5), 1269–1275. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.173>
- Bremell, T., Lange, S., Yacoub, A., Rydén, C., & Tarkowski, A. (1991). Experimental
-

- Staphylococcus aureus arthritis in mice. *Infection and Immunity*, 59(8), 2615–2623. <https://doi.org/10.1128/IAI.59.8.2615-2623.1991>
- Brondello, J.-M., Djouad, F., & Jorgensen, C. (2019). Where to Stand with Stromal Cells and Chronic Synovitis in Rheumatoid Arthritis? *Cells*, 8(10), 1257. <https://doi.org/10.3390/cells8101257>
- Brundage, J. F., & Shanks, G. D. (2007). What Really Happened during the 1918 Influenza Pandemic? The Importance of Bacterial Secondary Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(11), 1717–1718. <https://doi.org/10.1086/522355>
- Buda, S., Streib, V., Preuß, U., Ralf, D., Biere, B., Schilling, J., Buchholz, U., an der Heiden, M., & Haas, W. (2019). *Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2018/2019*. <https://doi.org/10.25646/6232>
- Bustamante, M. F., Garcia-Carbonell, R., Whisenant, K. D., & Guma, M. (2017). Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 19(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1303-3>
- Campbell, I. K., Hamilton, J. A., & Wicks, I. P. (2000). Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*, 30(6), 1568–1575. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200006\)30:6<1568::AID-IMMU1568>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200006)30:6<1568::AID-IMMU1568>3.0.CO;2-R)
- Carapetis, J. R., Steer, A. C., Mulholland, E. K., & Weber, M. (2005). The global burden of group A streptococcal diseases. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(11), 685–694. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70267-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70267-X)
- Cardiff, R. D., Miller, C. H., & Munn, R. J. (2014). Manual Hematoxylin and Eosin Staining of Mouse Tissue Sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(6), pdb.prot073411-pdb.prot073411. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot073411>
- Castanheira, F. V. S., & Kubes, P. (2019). Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*, 133(20), 2178–2185. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-844530>
- Chaussee, M. S., Sandbulte, H. R., Schuneman, M. J., DePaula, F. P., Addengast, L. A., Schlenker, E. H., & Huber, V. C. (2011). Inactivated and live, attenuated influenza vaccines protect mice against influenza: Streptococcus pyogenes super-infections.
-

- Vaccine*, 29(21), 3773–3781. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.031>
- Chen, D., Shen, J., Zhao, W., Wang, T., Han, L., Hamilton, J. L., & Im, H. (2017). Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Research*, 5(September 2016), 16044. <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.44>
- Chen, J., Hamers, A. J. P., Finsterbusch, M., Massimo, G., Zafar, M., Corder, R., Colas, R. A., Dalli, J., Thiemermann, C., & Ahluwalia, A. (2018). Endogenously generated arachidonate-derived ligands for TRPV1 induce cardiac protection in sepsis. *The FASEB Journal*, 32(7), 3816–3831. <https://doi.org/10.1096/fj.201701303R>
- Chen, Q., Wang, W.-C., Bruce, R., Li, H., Schleider, D. M., Mulbury, M. J., Bain, M. D., Wallace, P. K., Baumann, H., & Evans, S. S. (2004). Central Role of IL-6 Receptor Signal-Transducing Chain gp130 in Activation of L-Selectin Adhesion by Fever-Range Thermal Stress. *Immunity*, 20(1), 59–70. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00358-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00358-3)
- Chien, Y.-W., Klugman, K. P., & Morens, D. M. (2009). Bacterial Pathogens and Death during the 1918 Influenza Pandemic. *New England Journal of Medicine*, 361(26), 2582–2583. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0908216>
- Choe, J.-Y., Park, K.-Y., Park, S.-H., Lee, S.-I., & Kim, S.-K. (2013). Regulatory effect of calcineurin inhibitor, tacrolimus, on IL-6/sIL-6R-mediated RANKL expression through JAK2-STAT3-SOCS3 signaling pathway in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Research & Therapy*, 15(1), R26. <https://doi.org/10.1186/ar4162>
- Chou, D. B., Sworder, B., Bouladoux, N., Roy, C. N., Uchida, A. M., Grigg, M., Robey, P. G., & Belkaid, Y. (2012). Stromal-derived IL-6 alters the balance of myeloerythroid progenitors during *Toxoplasma gondii* infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(1), 123–131. <https://doi.org/10.1189/jlb.1011527>
- Cibulka, M. T., White, D. M., Woehrle, J., Harris-Hayes, M., Enseki, K., Fagerson, T. L., Slover, J., & Godges, J. J. (2009). Hip Pain and Mobility Deficits — Hip Osteoarthritis: Clinical Practice Guidelines Linked to the International Classification of Functioning, Disability, and Health from the Orthopaedic Section of the American Physical Therapy Association. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, 39(4), A1–A25. <https://doi.org/10.2519/jospt.2009.0301>
-

- Cleary, P. P., Prahbu, U., Dale, J. B., Wexler, D. E., & Handley, J. (1992). Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase. *Infection and Immunity*, *60*(12), 5219–5223. <https://doi.org/10.1128/IAI.60.12.5219-5223.1992>
- Cole, J. N., Pence, M. A., von Köckritz-Blickwede, M., Hollands, A., Gallo, R. L., Walker, M. J., & Nizet, V. (2010). M Protein and Hyaluronic Acid Capsule Are Essential for In Vivo Selection of covRS Mutations Characteristic of Invasive Serotype M1T1 Group A Streptococcus. *MBio*, *1*(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00191-10>
- Coras, R., Kavanaugh, A., Boyd, T., Huynh, Q., Pedersen, B., Armando, A. M., Dahlberg-Wright, S., Marsal, S., Jain, M., Paravar, T., Quehenberger, O., & Guma, M. (2019). Pro- and anti-inflammatory eicosanoids in psoriatic arthritis. *Metabolomics*, *15*(4), 65. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1527-0>
- Corrado, A., Donato, P., Maccari, S., Cecchi, R., Spadafina, T., Arcidiacono, L., Tavarini, S., Sammiceli, C., Laera, D., Manetti, A. G. O., Ruggiero, P., Galletti, B., Nuti, S., De Gregorio, E., Bertholet, S., Seubert, A., Bagnoli, F., Bensi, G., & Chiarot, E. (2016). Staphylococcus aureus-dependent septic arthritis in murine knee joints: local immune response and beneficial effects of vaccination. *Scientific Reports*, *6*(June), 38043. <https://doi.org/10.1038/srep38043>
- Costerton, J. W. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, *284*(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Cue, D., Lam, H., & Cleary, P. P. (2001). Genetic dissection of the Streptococcus pyogenes M1 protein: regions involved in fibronectin binding and intracellular invasion. *Microbial Pathogenesis*, *31*(5), 231–242. <https://doi.org/10.1006/mpat.2001.0467>
- Cuez, T., Korkmaz, B., Buharalioglu, C. K., Sahan-Firat, S., Falck, J., Malik, K. U., & Tunctan, B. (2010). A Synthetic Analogue of 20-HETE, 5,14-HEDGE, Reverses Endotoxin-Induced Hypotension via Increased 20-HETE Levels Associated with Decreased iNOS Protein Expression and Vasodilator Prostanoid Production in Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *106*(5), 378–388. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00501.x>
- Cunningham, M. W. (2000). Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, *13*(3), 470–511. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.470-511.2000>
-

- Dale, J. B., Washburn, R. G., Marques, M. B., & Wessels, M. R. (1996). Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infection and Immunity*, *64*(5), 1495–1501. <https://doi.org/10.1128/IAI.64.5.1495-1501.1996>
- Denadai-Souza, A., Ribeiro, C. M., Rolland, C., Thouard, A., Deraison, C., Scavone, C., Gonzalez-Dunia, D., Vergnolle, N., & Avellar, M. C. W. (2017). Effect of tryptase inhibition on joint inflammation: A pharmacological and lentivirus-mediated gene transfer study. *Arthritis Research and Therapy*, *19*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1326-9>
- Deng, J., Liu, Y., Yang, M., Wang, S., Zhang, M., Wang, X., Ko, K.-H., Hua, Z., Sun, L., Cao, X., & Lu, L. (2012). Leptin exacerbates collagen-induced arthritis via enhancement of Th17 cell response. *Arthritis & Rheumatism*, *64*(11), 3564–3573. <https://doi.org/10.1002/art.34637>
- Denman, A. M. (1983). *Immunosuppressive Effects of Virus Infection* (pp. 47–59). [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)63850-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)63850-9)
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, *29*(6), 313–325. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- Diamond, M. S., Staunton, D. E., de Fougerolles, A. R., Stacker, S. A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M. L., & Springer, T. A. (1990). ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *Journal of Cell Biology*, *111*(6), 3129–3139. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.6.3129>
- Dinkla, K., Sastalla, I., Godehardt, A. W., Janze, N., Chhatwal, G. S., Rohde, M., & Medina, E. (2007). Upregulation of capsule enables *Streptococcus pyogenes* to evade immune recognition by antigen-specific antibodies directed to the G-related  $\alpha$ 2-macroglobulin-binding protein GRAB located on the bacterial surface. *Microbes and Infection*, *9*(8), 922–931. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.03.011>
- Dombek, P. E., Cue, D., Sedgewick, J., Lam, H., Ruschkowski, S., Finlay, B. B., & Cleary, P. P. (1999). High-frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 protein-mediated invasion and cytoskeletal rearrangements. *Molecular Microbiology*, *31*(3), 859–870. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01223.x>
-

- Domínguez-Cherit, G. (2009). Critically Ill Patients With 2009 Influenza A(H1N1) in Mexico. *JAMA*, *302*(17), 1880. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1536>
- Doran, M. F., Crowson, C. S., Pond, G. R., O'Fallon, W. M., & Gabriel, S. E. (2002). Frequency of infection in patients with rheumatoid arthritis compared with controls: A population-based study. *Arthritis & Rheumatism*, *46*(9), 2287–2293. <https://doi.org/10.1002/art.10524>
- Dubost, J. J., Soubrier, M., De Champs, C., Ristori, J. M., & Sauvezie, B. (2004). Streptococcal septic arthritis in adults. A study of 55 cases with a literature review. *Joint Bone Spine*, *71*(4), 303–311. [https://doi.org/10.1016/S1297-319X\(03\)00122-2](https://doi.org/10.1016/S1297-319X(03)00122-2)
- Durbin, R. K., Kotenko, S. V., & Durbin, J. E. (2013). Interferon induction and function at the mucosal surface. *Immunological Reviews*, *255*(1), 25–39. <https://doi.org/10.1111/imr.12101>
- Dziedzic, K. S. (2011). Osteoarthritis: best evidence for best therapies in hand osteoarthritis. *Nature Reviews. Rheumatology*, *7*(5), 258–260. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.44>
- Ebbers, M., Lübcke, P. M., Volzke, J., Kriebel, K., Hieke, C., Engelmann, R., Lang, H., Kreikemeyer, B., & Müller-Hilke, B. (2018). Interplay between *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* in murine alveolar bone loss, arthritis onset and progression. *Scientific Reports*, *8*(1), 15129. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33129-z>
- Elsissy, J. G., Liu, J. N., Wilton, P. J., Nwachuku, I., Gowd, A. K., & Amin, N. H. (2020). Bacterial Septic Arthritis of the Adult Native Knee Joint. *JBJS Reviews*, *8*(1), e0059. <https://doi.org/10.2106/JBJS.RVW.19.00059>
- Ermert, D., Weckel, A., Agarwal, V., Frick, I.-M., Björck, L., & Blom, A. M. (2013). Binding of Complement Inhibitor C4b-binding Protein to a Highly Virulent *Streptococcus pyogenes* M1 Strain Is Mediated by Protein H and Enhances Adhesion to and Invasion of Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(45), 32172–32183. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.502955>
- Estenssoro, E., Ríos, F. G., Apezteguía, C., Reina, R., Neira, J., Ceraso, D. H., Orlandi, C., Valentini, R., Tiribelli, N., Brizuela, M., Balasini, C., Mare, S., Domeniconi, G., Ilutovich,
-

- S., Gómez, A., Giuliani, J., Barrios, C., & Valdez, P. (2010). Pandemic 2009 Influenza A in Argentina. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(1), 41–48. <https://doi.org/10.1164/201001-0037OC>
- Evans, R. G., Collins, C., Miller, P., Ponsford, F. M., & Elson, C. J. (1994). Radiological scoring of osteoarthritis progression in STR/ORT mice. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2(2), 103–109. [https://doi.org/10.1016/S1063-4584\(05\)80060-3](https://doi.org/10.1016/S1063-4584(05)80060-3)
- Fang, H., & Beier, F. (2014). Mouse models of osteoarthritis: modelling risk factors and assessing outcomes. *Nature Reviews Rheumatology*, 10(7), 413–421. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.46>
- Fiebig, A., Loof, T. G., Babbar, A., Itzek, A., Koehorst, J. J., Schaap, P. J., & Nitsche-Schmitz, D. P. (2015). Comparative Genomics of *Streptococcus pyogenes* M1 isolates differing in virulence and propensity to cause systemic infection in mice. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(6), 532–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.06.002>
- Findlay, D. M., & Kuliwaba, J. S. (2016). Bone–cartilage crosstalk: a conversation for understanding osteoarthritis. *Bone Research*, 4(1), 16028. <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.28>
- Galloway, J. B., Hyrich, K. L., Mercer, L. K., Dixon, W. G., Ustianowski, A. P., Helbert, M., Watson, K. D., Lunt, M., & Symmons, D. P. M. (2011). Risk of septic arthritis in patients with rheumatoid arthritis and the effect of anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(10), 1810–1814. <https://doi.org/10.1136/ard.2011.152769>
- Gao, Q.-F., Zhang, X.-H., Yuan, F.-L., Zhao, M.-D., & Li, X. (2016). Recombinant human endostatin inhibits TNF- $\alpha$ -induced receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand expression in fibroblast-like synoviocytes in mice with adjuvant arthritis. *Cell Biology International*, 40(12), 1340–1348. <https://doi.org/10.1002/cbin.10689>
- García-Arias, M., Balsa, A., & Mola, E. M. (2011). Septic arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 25(3), 407–421. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2011.02.001>
- García-De La Torre, I. (2003). Advances in the management of septic arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 29(1), 61–75. <https://doi.org/10.1016/S0889->
-



857X(02)00080-7

- Garmy-Susini, B., Jin, H., Zhu, Y., Sung, R.-J., Hwang, R., & Varner, J. (2005). Integrin  $\alpha 4\beta 1$ –VCAM-1–mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessel maturation. *Journal of Clinical Investigation*, 115(6), 1542–1551. <https://doi.org/10.1172/JCI23445>
- Garstang, S. V., & Stitik, T. P. (2006). Osteoarthritis. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 85(Supplement), S2–S11. <https://doi.org/10.1097/01.phm.0000245568.69434.1a>
- Geirsson, A. J., Statkevicius, S., & Vikingsson, A. (2007). Septic arthritis in Iceland 1990–2002: increasing incidence due to iatrogenic infections. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(5), 638–643. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.077131>
- Gherardi, G., Vitali, L. A., & Creti, R. (2018). Prevalent emm Types among Invasive GAS in Europe and North America since Year 2000. *Frontiers in Public Health*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00059>
- Goldenberg, D. L. (1998). Septic arthritis. *The Lancet*, 351(9097), 197–202. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)09522-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)09522-6)
- Goldenberg, D. L., & Cohen, A. S. (1976). Acute infectious arthritis. *The American Journal of Medicine*, 60(3), 369–377. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(76\)90753-1](https://doi.org/10.1016/0002-9343(76)90753-1)
- Gomes, R. N., Teixeira-Cunha, M. G. A., Figueiredo, R. T., Almeida, P. E., Alves, S. C., Bozza, P. T., Bozza, F. A., Bozza, M. T., Zimmerman, G. A., & Castro-Faria-Neto, H. C. (2013). Bacterial Clearance in Septic Mice is Modulated by MCP-1/CCL2 and Nitric Oxide. *Shock*, 1. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31827802b5>
- Guerrini, M. M., & Takayanagi, H. (2014). The immune system, bone and RANKL. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 561, 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.06.003>
- Gupta, M. N. (2003). Prospective comparative study of patients with culture proven and high suspicion of adult onset septic arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62(4), 327–331. <https://doi.org/10.1136/ard.62.4.327>
- Gupta, M. N., Sturrock, R. D., & Field, M. (2001). A prospective 2-year study of 75 patients
-

- with adult-onset septic arthritis. *Rheumatology*, 40(1), 24–30. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/40.1.24>
- Hafner, A., Kolbe, U., Freund, I., Castiglia, V., Kovarik, P., Poth, T., Herster, F., Weigand, M. A., Weber, A. N. R., Dalpke, A. H., & Eigenbrod, T. (2019). Crucial Role of Nucleic Acid Sensing via Endosomal Toll-Like Receptors for the Defense of *Streptococcus pyogenes* in vitro and in vivo. *Frontiers in Immunology*, 10(FEB), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00198>
- Hamaguchi, M., Wu, H. N., Tanaka, M., Tsuda, N., Tantengco, O. A. G., Matsushima, T., Nakao, T., Ishibe, T., Sakata, I., & Yanagihara, I. (2019). A case series of the dynamics of lipid mediators in patients with sepsis. *Acute Medicine & Surgery*, 6(4), 413–418. <https://doi.org/10.1002/ams2.443>
- Hashizume, M., Hayakawa, N., & Mihara, M. (2008). IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF- and IL-17. *Rheumatology*, 47(11), 1635–1640. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken363>
- Hayashi, F., Means, T. K., & Luster, A. D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*, 102(7), 2660–2669. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1078>
- Henninger, D. D., Panés, J., Eppihimer, M., Russell, J., Gerritsen, M., Anderson, D. C., & Granger, D. N. (1997). Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 158(4), 1825–1832. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9029122>
- Hoe, N., Nakashima, K., Grigsby, D., Pan, X., Dou, S. J., Naidich, S., Garcia, M., Kahn, E., Bergmire-Sweat, D., & Musser, J. M. (1999). Rapid Molecular Genetic Subtyping of Serotype M1 Group A *Streptococcus* Strains. *Emerging Infectious Diseases*, 5(2), 254–263. <https://doi.org/10.3201/eid0502.990210>
- Hollinski, R., Osterberg, A., Polei, S., Lindner, T., Cantré, D., Mittlmeier, T., Vollmar, B., Bruhn, S., & Müller-Hilke, B. (2018). Young and healthy C57BL/6 J mice performing sprint interval training reveal gender- and site-specific changes to the cortical bone. *Scientific Reports*, 8(1), 1529. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19547-z>
- Holm, S. E. (1996). Invasive Group A Streptococcal Infections. *New England Journal of*
-

*Medicine*, 335(8), 590–591. <https://doi.org/10.1056/NEJM199608223350811>

Horstmann, R. D., Sievertsen, H. J., Leippe, M., & Fischetti, V. A. (1992). Role of fibrinogen in complement inhibition by streptococcal M protein. *Infection and Immunity*, 60(12), 5036–5041. <https://doi.org/10.1128/IAI.60.12.5036-5041.1992>

Hultgren, O., Eugster, H. P., Sedgwick, J. D., Körner, H., & Tarkowski, A. (1998). TNF/lymphotoxin-alpha double-mutant mice resist septic arthritis but display increased mortality in response to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(11), 5937–5942. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9834074>

Hunter, C. A., & Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*, 16(5), 448–457. <https://doi.org/10.1038/ni.3153>

Hutchinson, E. C., von Kirchbach, J. C., Gog, J. R., & Digard, P. (2010). Genome packaging in influenza A virus. *Journal of General Virology*, 91(2), 313–328. <https://doi.org/10.1099/vir.0.017608-0>

Hyun, Y.-M., Choe, Y. H., Park, S. A., & Kim, M. (2019). LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) distinctly regulate neutrophil extravasation through hotspots I and II. *Experimental & Molecular Medicine*, 51(4), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0227-1>

Ishimi, Y., Miyaura, C., Jin, C. H., Akatsu, T., Abe, E., Nakamura, Y., Yamaguchi, A., Yoshiki, S., Matsuda, T., & Hirano, T. (1990). IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 145(10), 3297–3303. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2121824>

Ispahani, P., Weston, V. C., Turner, D. P. J., & Donald, F. E. (1999). Septic Arthritis Due to *Streptococcus pneumoniae* in Nottingham, United Kingdom, 1985-1998. *Clinical Infectious Diseases*, 29(6), 1450–1454. <https://doi.org/10.1086/313526>

Iwasaki, A., & Pillai, P. S. (2014). Innate immunity to influenza virus infection. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 315–328. <https://doi.org/10.1038/nri3665>

Jacobs, E. R., Zhu, D., Gruenloh, S., Lopez, B., & Medhora, M. (2006). VEGF-induced relaxation of pulmonary arteries is mediated by endothelial cytochrome P -450 hydroxylase. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 291(3), L369–L377. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00265.2004>

---

- Jacobs, J. P., Ortiz-Lopez, A., Campbell, J. J., Gerard, C. J., Mathis, D., & Benoist, C. (2010). Deficiency of CXCR2, but not other chemokine receptors, attenuates a murine model of autoantibody-mediated arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/art.27470>
- Jadoun, J., Ozeri, V., Burstein, E., Skutelsky, E., Hanski, E., & Sela, S. (1998). Protein F1 Is Required for Efficient Entry of *Streptococcus pyogenes* into Epithelial Cells. *Journal of Infectious Diseases*, 178(1), 147–158. <https://doi.org/10.1086/515589>
- Jaeger, K., Selent, C., Jaehme, W., Mahr, S., Goebel, U., Ibrahim, S., Vollmar, B., & Mueller-Hilke, B. (2008). The genetics of osteoarthritis in STR/ort mice. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(5), 607–614. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.09.004>
- Johnsson, E., Berggård, K., Kotarsky, H., Hellwage, J., Zipfel, P. F., Sjöbring, U., & Lindahl, G. (1998). Role of the hypervariable region in streptococcal M proteins: binding of a human complement inhibitor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(9), 4894–4901. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794423>
- Joosten, L. A. . B., Abdollahi-Roodsaz, S., Heuvelmans-Jacobs, M., Helsen, M. M. A., van den Bersselaar, L. A. M., Oppers-Walgreen, B., Koenders, M. I., & van den Berg, W. B. (2008). T cell dependence of chronic destructive murine arthritis induced by repeated local activation of toll-like receptor–driven pathways: Crucial role of both interleukin-1 $\beta$  and interleukin-17. *Arthritis & Rheumatism*, 58(1), 98–108. <https://doi.org/10.1002/art.23152>
- Joosten, L. A. B., Koenders, M. I., Smeets, R. L., Heuvelmans-Jacobs, M., Helsen, M. M. A., Takeda, K., Akira, S., Lubberts, E., van de Loo, F. A. J., & van den Berg, W. B. (2003). Toll-Like Receptor 2 Pathway Drives Streptococcal Cell Wall-Induced Joint Inflammation: Critical Role of Myeloid Differentiation Factor 88. *The Journal of Immunology*, 171(11), 6145–6153. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.6145>
- Kaandorp, C. J. E., Dinant, H. J., van de Laar, M. A. F. J., Moens, H. J. B., Prins, A. P. A., & Dijkmans, B. A. C. (1997). Incidence and sources of native and prosthetic joint infection: a community based prospective survey. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 56(8), 470–475. <https://doi.org/10.1136/ard.56.8.470>
- Kaandorp, C. J. E., Schaardenburg, D. Van, Krijnen, P., Habbema, J. D. F., & Van De Laar, M. A. F. J. (1995). Risk factors for septic arthritis in patients with joint disease. *Arthritis &*
-

*Rheumatism*, 38(12), 1819–1825. <https://doi.org/10.1002/art.1780381215>

Kadioglu, A., De Filippo, K., Bangert, M., Fernandes, V. E., Richards, L., Jones, K., Andrew, P. W., & 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*, 186(10), 5907–5915. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001533>

Kamekura, S., Hoshi, K., Shimoaka, T., Chung, U., Chikuda, H., Yamada, T., Uchida, M., Ogata, N., Seichi, A., Nakamura, K., & Kawaguchi, H. (2005). Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(7), 632–641. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.03.004>

Kaplan, E. L. (1991). The resurgence of group A streptococcal infections and their sequelae. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 10(2), 55–57. <https://doi.org/10.1007/BF01964407>

Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv Für Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie*, 162(4), 480–483. <https://doi.org/10.1007/BF01863914>

Kasper, K. J., Zeppa, J. J., Wakabayashi, A. T., Xu, S. X., Mazzuca, D. M., Welch, I., Baroja, M. L., Kotb, M., Cairns, E., Cleary, P. P., Haeryfar, S. M. M., & McCormick, J. K. (2014). Bacterial Superantigens Promote Acute Nasopharyngeal Infection by *Streptococcus pyogenes* in a Human MHC Class II-Dependent Manner. *PLoS Pathogens*, 10(5), e1004155. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004155>

Kassem, A., Lindholm, C., & Lerner, U. H. (2016). Toll-Like receptor 2 stimulation of osteoblasts mediates staphylococcus aureus induced bone resorption and osteoclastogenesis through enhanced RANKL. *PLoS ONE*, 11(6), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156708>

Kim, D. S., Kwon, J.-E., Lee, S. H., Kim, E. K., Ryu, J.-G., Jung, K.-A., Choi, J.-W., Park, M.-J., Moon, Y.-M., Park, S.-H., Cho, M.-L., & Kwok, S.-K. (2018). Attenuation of Rheumatoid Inflammation by Sodium Butyrate Through Reciprocal Targeting of HDAC2 in Osteoclasts and HDAC8 in T Cells. *Frontiers in Immunology*, 9(July), 1525. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01525>

---

- Kolaczowska, E., Jenne, C. N., Surewaard, B. G. J., Thanabalasuriar, A., Lee, W.-Y., Sanz, M.-J., Mowen, K., Opdenakker, G., & Kubes, P. (2015). Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nature Communications*, 6(1), 6673. <https://doi.org/10.1038/ncomms7673>
- Kumar, N., Gupta, G., Anilkumar, K., Fatima, N., Karnati, R., Reddy, G. V., Giri, P. V., & Reddanna, P. (2016). 15-Lipoxygenase metabolites of  $\alpha$ -linolenic acid, [13-(S)-HPOTrE and 13-(S)-HOTrE], mediate anti-inflammatory effects by inactivating NLRP3 inflammasome. *Scientific Reports*, 6(1), 31649. <https://doi.org/10.1038/srep31649>
- Lancefield, R. C. (1933). A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci. *Journal of Experimental Medicine*, 57(4), 571–595. <https://doi.org/10.1084/jem.57.4.571>
- Leite, F. R. M. anzolli, de Aquino, S. G. arcia, Guimarães, M. R. odrigues, Cirelli, J. A. ugusto, Zamboni, D. S., Silva, J. S., & Junior, C. R. ossa. (2015). Relevance of the myeloid differentiation factor 88 (MyD88) on RANKL, OPG, and nod expressions induced by TLR and IL-1R signaling in bone marrow stromal cells. *Inflammation*, 38(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0001-4>
- Li, F., Li, X., Kou, L., Li, Y., Meng, F., & Ma, F. (2014). SUMO-Conjugating Enzyme UBC9 Promotes Proliferation and Migration of Fibroblast-like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis. *Inflammation*, 37(4), 1134–1141. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9837-x>
- Li, N., Ren, A., Wang, X., Fan, X., Zhao, Y., Gao, G. F., Cleary, P., & Wang, B. (2015). Influenza viral neuraminidase primes bacterial coinfection through TGF- $\beta$ -mediated expression of host cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(1), 238–243. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414422112>
- Li, Y., Yang, B., Bai, J., Xia, S., Mao, M., Li, X., Li, N., & Chen, L. (2019). The roles of synovial hyperplasia, angiogenesis and osteoclastogenesis in the protective effect of apigenin on collagen-induced arthritis. *International Immunopharmacology*, 73, 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.024>
- Lisowska, B., Kosson, D., & Domaracka, K. (2018). Lights and shadows of NSAIDs in bone healing: the role of prostaglandins in bone metabolism. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 12, 1753–1758. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S164562>
-

- Liu, F., Poursine-Laurent, J., Wu, H. Y., & Link, D. C. (1997). Interleukin-6 and the granulocyte colony-stimulating factor receptor are major independent regulators of granulopoiesis in vivo but are not required for lineage commitment or terminal differentiation. *Blood*, *90*(7), 2583–2590. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326224>
- Liu, X. H., Kirschenbaum, A., Yao, S., & Levine, A. C. (2005). Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E2 signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology*, *146*(4), 1991–1998. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1167>
- Louria, D. B., Blumenfeld, H. L., Ellis, J. T., Kilbourne, E. D., & Rogers, D. E. (1959). Studies on Influenza in the Pandemic of 1957-1958. II. Pulmonary Complications of Influenza. *Journal of Clinical Investigation*, *38*(1 Pt 1-2), 213–265. <https://doi.org/10.1172/JCI103791>
- Lövkvist, L., Sjölander, H., Wehelie, R., Aro, H., Norrby-Teglund, A., Plant, L., & Jonsson, A.-B. (2008). CD46 Contributes to the Severity of Group A Streptococcal Infection. *Infection and Immunity*, *76*(9), 3951–3958. <https://doi.org/10.1128/IAI.00109-08>
- Mahr, S., Menard, J., Krenn, V., & Müller, B. (2003). Sexual dimorphism in the osteoarthritis of STR/ort mice may be linked to articular cytokines. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *62*(12), 1234–1237. <https://doi.org/10.1136/ard.2002.005041>
- Masoodi, M., Eiden, M., Koulman, A., Spaner, D., & Volmer, D. A. (2010). Comprehensive Lipidomics Analysis of Bioactive Lipids in Complex Regulatory Networks. *Analytical Chemistry*, *82*(19), 8176–8185. <https://doi.org/10.1021/ac1015563>
- Mateen, S., Zafar, A., Moin, S., Khan, A. Q., & Zubair, S. (2016). Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinica Chimica Acta*, *455*, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.02.010>
- Mathews, C. J., Weston, V. C., Jones, A., Field, M., & Coakley, G. (2010). Bacterial septic arthritis in adults. *The Lancet*, *375*(9717), 846–855. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61595-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61595-6)
- Matsui, H., Nakatani, Y., Yoshida, H., Takizawa, A., Takeuchi, O., Øverby, A., Takahashi, T., Murayama, S. Y., & Matsuo, K. (2016). Flesh-eating *Streptococcus pyogenes* triggers
-

- the expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand. *Cellular Microbiology*, 18(10), 1390–1404. <https://doi.org/10.1111/cmi.12581>
- Matsui, H., Sekiya, Y., Nakamura, M., Murayama, S. Y., Yoshida, H., Takahashi, T., Imanishi, K., Tsuchimoto, K., Uchiyama, T., Sunakawa, K., & Ubukata, K. (2009). CD46 transgenic mouse model of necrotizing fasciitis caused by *Streptococcus pyogenes* infection. *Infection and Immunity*, 77(11), 4806–4814. <https://doi.org/10.1128/IAI.00577-09>
- Matsuo, Y., Mizoguchi, F., Saito, T., Kawahata, K., Ueha, S., Matsushima, K., Inagaki, Y., Miyasaka, N., & Kohsaka, H. (2016). Local fibroblast proliferation but not influx is responsible for synovial hyperplasia in a murine model of rheumatoid arthritis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 470(3), 504–509. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.121>
- McBride, S., Mowbray, J., Caughey, W., Wong, E., Luey, C., Siddiqui, A., Alexander, Z., Playle, V., Askelund, T., Hopkins, C., Quek, N., Ross, K., Orec, R., Mistry, D., Coomarasamy, C., & Holland, D. (2020). Epidemiology, Management, and Outcomes of Large and Small Native Joint Septic Arthritis in Adults. *Clinical Infectious Diseases*, 70(2), 271–279. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz265>
- McCracken, J. M., & Allen, L.-A. H. (2014). Regulation of Human Neutrophil Apoptosis and Lifespan in Health and Disease. *Journal of Cell Death*, 7, JCD.S11038. <https://doi.org/10.4137/JCD.S11038>
- McKenna, S., Malito, E., Rouse, S. L., Abate, F., Bensi, G., Chiarot, E., Micoli, F., Mancini, F., Gomes Moriel, D., Grandi, G., Mossakowska, D., Pearson, M., Xu, Y., Pease, J., Srisakandan, S., Margarit, I., Bottomley, M. J., & Matthews, S. (2020). Structure, dynamics and immunogenicity of a catalytically inactive CXC chemokine-degrading protease SpyCEP from *Streptococcus pyogenes*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 650–660. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.03.004>
- McLean-Tooke, A., Aldridge, C., Waugh, S., Spickett, G. P., & Kay, L. (2009). Methotrexate, rheumatoid arthritis and infection risk--what is the evidence? *Rheumatology*, 48(8), 867–871. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep101>
- Meednu, N., Zhang, H., Owen, T., Sun, W., Wang, V., Cistrone, C., Rangel-Moreno, J., Xing, L., & Anolik, J. H. (2016). Production of RANKL by Memory B Cells: A Link Between B
-



- Cells and Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 68(4), 805–816. <https://doi.org/10.1002/art.39489>
- Mignemi, M. E., Martus, J. E., Bracikowski, A. C., Lovejoy, S. a, Mencio, G. a, & Schoenecker, J. G. (2012). The spectrum of group A streptococcal joint pathology in the acute care setting. *Pediatric Emergency Care*, 28(11), 1185–1189. <https://doi.org/10.1097/PEC.0b013e318271a658>
- Mizoguchi, F., Slowikowski, K., Wei, K., Marshall, J. L., Rao, D. A., Chang, S. K., Nguyen, H. N., Noss, E. H., Turner, J. D., Earp, B. E., Blazar, P. E., Wright, J., Simmons, B. P., Donlin, L. T., Kalliolias, G. D., Goodman, S. M., Bykerk, V. P., Ivashkiv, L. B., Lederer, J. A., ... Brenner, M. B. (2018). Functionally distinct disease-associated fibroblast subsets in rheumatoid arthritis. *Nature Communications*, 9(1), 789. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02892-y>
- Monsalve, J., Kan, J. H., Schallert, E. K., Bisset, G. S., Zhang, W., & Rosenfeld, S. B. (2015). Septic Arthritis in Children: Frequency of Coexisting Unsuspected Osteomyelitis and Implications on Imaging Work-Up and Management. *American Journal of Roentgenology*, 204(6), 1289–1295. <https://doi.org/10.2214/AJR.14.12891>
- Morens, D. M., Taubenberger, J. K., & Fauci, A. S. (2008). Predominant Role of Bacterial Pneumonia as a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic Influenza Preparedness. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(7), 962–970. <https://doi.org/10.1086/591708>
- Morgan, D. S., Fisher, D., Merianos, A., & Currie, B. J. (1996). An 18 year clinical review of septic arthritis from tropical Australia. *Epidemiology and Infection*, 117, 423–428. <https://doi.org/10.1017/S0950268800059070>
- Myllykangas-Luosujärvi, R., Aho, K., Kautiainen, H., & Isomäki, H. (1995). Shortening of life span and causes of excess mortality in a population-based series of subjects with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 13(2), 149–153. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7656460>
- Nakamura, S., Davis, K. M., & Weiser, J. N. (2011). Synergistic stimulation of type I interferons during influenza virus coinfection promotes *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(9), 3657–3665. <https://doi.org/10.1172/JCI57762>
-

- Nasu, K., Kohsaka, H., Nonomura, Y., Terada, Y., Ito, H., Hirokawa, K., & Miyasaka, N. (2000). Adenoviral Transfer of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Genes Suppresses Collagen-Induced Arthritis in Mice. *The Journal of Immunology*, *165*(12), 7246–7252. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.12.7246>
- Navarini, A. A., Lang, K. S., Verschoor, A., Recher, M., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Odermatt, B., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (2009). Innate immune-induced depletion of bone marrow neutrophils aggravates systemic bacterial infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(17), 7107–7112. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901162106>
- Nemeth, K., Schoppet, M., Al-Fakhri, N., Helas, S., Jessberger, R., Hofbauer, L. C., & Goettsch, C. (2011). The Role of Osteoclast-Associated Receptor in Osteoimmunology. *The Journal of Immunology*, *186*(1), 13–18. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002483>
- Neumann, G., Noda, T., & Kawaoka, Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, *459*(7249), 931–939. <https://doi.org/10.1038/nature08157>
- Newman, J. H. (1976). Review of septic arthritis throughout the antibiotic era. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *35*(3), 198–205. <https://doi.org/10.1136/ard.35.3.198>
- Nobbs, A. H., Lamont, R. J., & Jenkinson, H. F. (2009). Streptococcus Adherence and Colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *73*(3), 407–450. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-09>
- Norrby-Teglund, A., Norgren, M., Holm, S. E., Andersson, U., & Andersson, J. (1994). Similar cytokine induction profiles of a novel streptococcal exotoxin, MF, and pyrogenic exotoxins A and B. *Infection and Immunity*, *62*(9), 3731–3738. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.9.3731-3738.1994>
- Norris, P. G., Barker, J. N. W. N., Allen, M. H., Leiferman, K. M., MacDonald, D. M., Haskard, D. O., & Hawk, J. L. M. (1992). Adhesion Molecule Expression in Polymorphic Light Eruption. *Journal of Investigative Dermatology*, *99*(4), 504–508. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12616175>
- Nuki, G. (1999). Osteoarthritis: a problem of joint failure. *Zeitschrift Für Rheumatologie*, *58*(3), 142–147. <https://doi.org/10.1007/s003930050164>
-

- O'Loughlin, R. E., Roberson, A., Cieslak, P. R., Lynfield, R., Gershman, K., Craig, A., Albanese, B. A., Farley, M. M., Barrett, N. L., Spina, N. L., Beall, B., Harrison, L. H., Reingold, A., & Beneden, C. V. (2007). The Epidemiology of Invasive Group A Streptococcal Infection and Potential Vaccine Implications: United States, 2000-2004. *Clinical Infectious Diseases*, *45*(7), 853–862. <https://doi.org/10.1086/521264>
- Odio, C. M., Ramirez, T., Arias, G., Abdelnour, A., Hidalgo, I., Herrera, M. L., Bolanos, W., Alpizar, J., & Alvarez, P. (2003). Double blind, randomized, placebo-controlled study of dexamethasone therapy for hematogenous septic arthritis in children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *22*(10), 883–889. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000091293.32187.7b>
- Oehmcke, S., Shannon, O., von Köckritz-Blickwede, M., Mörgelin, M., Linder, A., Olin, A. I., Björck, L., & Herwald, H. (2009). Treatment of invasive streptococcal infection with a peptide derived from human high-molecular weight kininogen. *Blood*, *114*(2), 444–451. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-182527>
- Oehmcke, S., Westman, J., Malmström, J., Mörgelin, M., Olin, A. I., Kreikemeyer, B., & Herwald, H. (2013). A Novel Role for Pro-Coagulant Microvesicles in the Early Host Defense against *Streptococcus pyogenes*. *PLoS Pathogens*, *9*(8), e1003529. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003529>
- Ofek, I., Simpson, W. A., & Beachey, E. H. (1982). Formation of Molecular Complexes Between a Structurally Defined M Protein and Acylated or Deacylated Lipoteichoic Acid of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Bacteriology*, *149*(2), 426–433. <https://doi.org/10.1128/JB.149.2.426-433.1982>
- Oh, B. R., Suh, D., Bae, D., Ha, N., Choi, Y. Il, Yoo, H. J., Park, J. K., Lee, E. Y., Lee, E. B., & Song, Y. W. (2017). Therapeutic effect of a novel histone deacetylase 6 inhibitor, CKD-L, on collagen-induced arthritis in vivo and regulatory T cells in rheumatoid arthritis in vitro. *Arthritis Research & Therapy*, *19*(1), 154. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1357-2>
- Okahashi, N., Sakurai, A., Nakagawa, I., Fujiwara, T., Kawabata, S., Amano, A., & Hamada, S. (2003). Infection by *Streptococcus pyogenes* induces the receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand expression in mouse osteoblastic cells. *Infection and Immunity*, *71*(2), 948–955. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.948>
-

- Okamoto, K., & Takayanagi, H. (2019). Osteoimmunology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031245>
- Pääkkönen, M. (2017). Septic arthritis in children: diagnosis and treatment. *Pediatric Health, Medicine and Therapeutics, Volume 8*, 65–68. <https://doi.org/10.2147/PHMT.S115429>
- Paiva, C. N., & Bozza, M. T. (2014). Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(6), 1000–1037. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5447>
- Perez-Casal, J., Okada, N., Caparon, M. G., & Scott, J. R. (1995). Role of the conserved C-repeat region of the M protein of *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology*, 15(5), 907–916. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02360.x>
- Poston, R. N., Haskard, D. O., Coucher, J. R., Gall, N. P., & Johnson-Tidey, R. R. (1992). Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *The American Journal of Pathology*, 140(3), 665–673. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372160>
- Proft, T., Louise Moffatt, S., Berkahn, C. J., & Fraser, J. D. (1999). Identification and Characterization of Novel Superantigens from *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Experimental Medicine*, 189(1), 89–102. <https://doi.org/10.1084/jem.189.1.89>
- Qin, Y., Li, Z., & Li, H. (2018). Corticosteroids as adjunctive therapy with antibiotics in the treatment of children with septic arthritis: a meta-analysis. *Drug Design, Development and Therapy, Volume 12*, 2277–2284. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S163560>
- Reglinski, M., & Sriskandan, S. (2014). The contribution of group A streptococcal virulence determinants to the pathogenesis of sepsis. *Virulence*, 5(1), 127–136. <https://doi.org/10.4161/viru.26400>
- Riedemann, N. C., Guo, R.-F., & Ward, P. A. (2003). A key role of C5a/C5aR activation for the development of sepsis. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(6), 966–970. <https://doi.org/10.1189/jlb.0403137>
- Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V., Sozzani, S., Bussolino, F., Poli, V., Ciliberto, G., & Mantovani, A. (1997). Role of IL-6 and Its Soluble Receptor in Induction of Chemokines and Leukocyte Recruitment. *Immunity*, 6(3), 315–325. <https://doi.org/10.1016/S1074->
-

7613(00)80334-9

- Rooney, M., Condell, D., Quinlan, W., Daly, L., Whelan, A., Feighery, C., & Bresnihan, B. (1988). Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 31(8), 956–963. <https://doi.org/10.1002/art.1780310803>
- Rothe, J., Lesslauer, W., Lötscher, H., Lang, Y., Koebel, P., Köntgen, F., Althage, A., Zinkernagel, R., Steinmetz, M., & Bluethmann, H. (1993). Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to IMF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*, 364(6440), 798–802. <https://doi.org/10.1038/364798a0>
- Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M. A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S. P., Lohmeyer, J., & Preissner, K. T. (2012). Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. *PLoS ONE*, 7(2), e32366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032366>
- Sakurai, A., Okahashi, N., Maruyama, F., Ooshima, T., Hamada, S., & Nakagawa, I. (2008). *Streptococcus pyogenes* degrades extracellular matrix in chondrocytes via MMP-13. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(3), 450–454. <https://doi.org/doi:10.1016/j.bbrc.2008.06.061>
- Sakurai, A., Okahashi, N., Nakagawa, I., Kawabata, S., Amano, A., Ooshima, T., & Hamada, S. (2003). *Streptococcus pyogenes* Infection Induces Septic Arthritis with Increased Production of the Receptor Activator of the NF- $\kappa$ B Ligand. *Infection and Immunity*, 71(10), 6019–6026. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.6019-6026.2003>
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. J., & Takayanagi, H. (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *Journal of Experimental Medicine*, 203(12), 2673–2682. <https://doi.org/10.1084/jem.20061775>
- Schultz, D., Methling, K., Rothe, M., & Lalk, M. (2019). Eicosanoid Profile of Influenza A Virus Infected Pigs. *Metabolites*, 9(7), 130. <https://doi.org/10.3390/metabo9070130>
- Schulze-Tanzil, G., De, S. P., Behnke, B., Klingelhofer, S., Scheid, A., & Shakibaei, M. (2002). Effects of the antirheumatic remedy hox alpha--a new stinging nettle leaf
-

- extract--on matrix metalloproteinases in human chondrocytes in vitro. *Histology and Histopathology*, 17(2), 477–485. <https://doi.org/10.14670/HH-17.477>
- Serhan, C. N. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, 510(7503), 92–101. <https://doi.org/10.1038/nature13479>
- Shahangian, A., Chow, E. K., Tian, X., Kang, J. R., Ghaffari, A., Liu, S. Y., Belperio, J. A., Cheng, G., & Deng, J. C. (2009). Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 119(7), 1910–1920. <https://doi.org/10.1172/JCI35412>
- Shen, P. C., Wu, C. L., Jou, I. M., Lee, C. H., Juan, H. Y., Lee, P. J., Chen, S. H., & Hsieh, J. L. (2011). T helper cells promote disease progression of osteoarthritis by inducing macrophage inflammatory protein-1?? *Osteoarthritis and Cartilage*, 19(6), 728–736. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.02.014>
- Shieh, W.-J., Blau, D. M., Denison, A. M., DeLeon-Carnes, M., Adem, P., Bhatnagar, J., Sumner, J., Liu, L., Patel, M., Batten, B., Greer, P., Jones, T., Smith, C., Bartlett, J., Montague, J., White, E., Rollin, D., Gao, R., Seales, C., ... Zaki, S. R. (2010). 2009 Pandemic Influenza A (H1N1). *The American Journal of Pathology*, 177(1), 166–175. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100115>
- Shirliff, M. E., & Mader, J. T. (2002). Acute septic arthritis. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 527–544. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.527-544.2002>
- Shrum, B., Anantha, R. V., Xu, S. X., Donnelly, M., Haeryfar, S., McCormick, J. K., & Mele, T. (2014). A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Research Notes*, 7(1), 233. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-233>
- Siemens, N., Oehmcke-Hecht, S., Mettenleiter, T. C., Kreikemeyer, B., Valentin-Weigand, P., & Hammerschmidt, S. (2017). Port d'Entrée for Respiratory Infections – Does the Influenza A Virus Pave the Way for Bacteria? *Frontiers in Microbiology*, 8(December), 2602. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02602>
- Singh, J. A., & Yu, S. (2018). Septic Arthritis in Emergency Departments in the <scp>US</scp> : A National Study of Health Care Utilization and Time Trends. *Arthritis Care & Research*, 70(2), 320–326. <https://doi.org/10.1002/acr.23270>
- Smolen, J. S., & Steiner, G. (2001). Rheumatoid arthritis is more than cytokines:
-

- Autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 44(10), 2218–2220. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200110\)44:10<2218::AID-ART382>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200110)44:10<2218::AID-ART382>3.0.CO;2-C)
- Solberg, L. B., Stang, E., Brorson, S. H., Andersson, G., & Reinholt, F. P. (2014). Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) co-localizes with receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1)-positive vesicles in rat osteoblasts and osteocytes. *Histochemistry and Cell Biology*, 143(2), 195–207. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1272-4>
- Spearman, C. (1908). The Method of 'Right and Wrong Cases' ('Constant Stimuli') Without Gauss's Formulae. *British Journal of Psychology*, 1904-1920, 2(3), 227–242. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1908.tb00176.x>
- Springer, T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346(6283), 425–434. <https://doi.org/10.1038/346425a0>
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*, 76(2), 301–314. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90337-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90337-9)
- Staines, K. A., Madi, K., Mirczuk, S. M., Parker, S., Burleigh, A., Poulet, B., Hopkinson, M., Bodey, A. J., Fowkes, R. C., Farquharson, C., Lee, P. D., & Pitsillides, A. A. (2016). Endochondral Growth Defect and Deployment of Transient Chondrocyte Behaviors Underlie Osteoarthritis Onset in a Natural Murine Model. *Arthritis and Rheumatology*, 68(4), 880–891. <https://doi.org/10.1002/art.39508>
- Staines, K. A., Poulet, B., Wentworth, D. N., & Pitsillides, A. A. (2017). The STR/ort mouse model of spontaneous osteoarthritis – an update. *Osteoarthritis and Cartilage*, 25(6), 802–808. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.12.014>
- Sultana, S., & Bishayi, B. (2018). Neutralization of TNFR-1 and TNFR-2 modulates *S. aureus* induced septic arthritis by regulating the levels of pro inflammatory and anti inflammatory cytokines during the progression of the disease. *Immunology Letters*, 196, 33–51. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.005>
- Sun, K., & Metzger, D. W. (2008). Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon- $\gamma$  during recovery from influenza infection. *Nature Medicine*, 14(5), 558–564. <https://doi.org/10.1038/nm1765>
-

- Takano, T., Azuma, N., Satoh, M., Toda, A., Hashida, Y., Satoh, R., & Hohdatsu, T. (2009). Neutrophil survival factors (TNF-alpha, GM-CSF, and G-CSF) produced by macrophages in cats infected with feline infectious peritonitis virus contribute to the pathogenesis of granulomatous lesions. *Archives of Virology*, *154*(5), 775–781. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0371-3>
- Takashima, K., Tateda, K., Matsumoto, T., Iizawa, Y., Nakao, M., & Yamaguchi, K. (1997). Role of tumor necrosis factor alpha in pathogenesis of pneumococcal pneumonia in mice. *Infection and Immunity*, *65*(1), 257–260. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.1.257-260.1997>
- Takayanagi, H., Ogasawara, K., Hida, S., Chiba, T., Murata, S., Sato, K., Takaoka, A., Yokochi, T., Oda, H., Tanaka, K., Nakamura, K., & Taniguchi, T. (2000). T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*, *408*(6812), 600–605. <https://doi.org/10.1038/35046102>
- Taylor, R. (1990). Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. *Journal of Diagnostic Medical Sonography*, *6*(1), 35–39. <https://doi.org/10.1177/875647939000600106>
- Terao, Y., Yamaguchi, M., Hamada, S., & Kawabata, S. (2006). Multifunctional Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase of *Streptococcus pyogenes* Is Essential for Evasion from Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(20), 14215–14223. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513408200>
- Timmer, A. M., Timmer, J. C., Pence, M. A., Hsu, L.-C., Ghochani, M., Frey, T. G., Karin, M., Salvesen, G. S., & Nizet, V. (2009). Streptolysin O Promotes Group A *Streptococcus* Immune Evasion by Accelerated Macrophage Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(2), 862–871. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804632200>
- Tite, J. P., Dougan, G., & Chatfield, S. N. (1991). The involvement of tumor necrosis factor in immunity to *Salmonella* infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *147*(9), 3161–3164. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1919009>
- Tjon-Kon-Fat, R., Meerhoff, T., Nikisins, S., Pires, J., Pereyaslov, D., Gross, D., Brown, C., Drishti, A., Hasibra, I., Kota, M., Simaku, A., Sarkisian, S., Torosyan, L., El Belazi, G., Hain, C., Lachner, P., Muchl, R., Popow-Kraupp, T., Redlberger-Fritz, M., ... Rakhimov, R. (2016). The potential risks and impact of the start of the 2015–2016 influenza season
-



- in the WHO European Region: a rapid risk assessment. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 10(4), 236–246. <https://doi.org/10.1111/irv.12381>
- Tunctan, B., Korkmaz, B., Sari, A. N., Kacan, M., Unsal, D., Serin, M. S., Buharalioglu, C. K., Sahan-Firat, S., Cuez, T., Schunck, W.-H., Manthati, V. L., Falck, J. R., & Malik, K. U. (2013). Contribution of iNOS/sGC/PKG pathway, COX-2, CYP4A1, and gp91phox to the protective effect of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, against vasodilation, hypotension, tachycardia, and inflammation in a rat model of septic shock. *Nitric Oxide*, 33, 18–41. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.05.001>
- Turner, J. D., & Filer, A. (2015). The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis pathogenesis. *Current Opinion in Rheumatology*, 27(2), 175–182. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000148>
- Volzke, J., Schultz, D., Kordt, M., Müller, M., Bergmann, W., Methling, K., Kreikemeyer, B., & Müller-Hilke, B. (2020). Inflammatory Joint Disease Is a Risk Factor for Streptococcal Sepsis and Septic Arthritis in Mice. *Frontiers in Immunology*, 11(October), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.579475>
- von Köckritz-Blickwede, M., Rohde, M., Oehmcke, S., Miller, L. S., Cheung, A. L., Herwald, H., Foster, S., & Medina, E. (2008). Immunological mechanisms underlying the genetic predisposition to severe Staphylococcus aureus infection in the mouse model. *The American Journal of Pathology*, 173(6), 1657–1668. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080337>
- Von Moltke, J., Trinidad, N. J., Moayeri, M., Kintzer, A. F., Wang, S. B., Van Rooijen, N., Brown, C. R., Krantz, B. A., Leppla, S. H., Gronert, K., & Vance, R. E. (2012). Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome in vivo. *Nature*, 490(7418), 107–111. <https://doi.org/10.1038/nature11351>
- Walker, M. J., Barnett, T. C., McArthur, J. D., Cole, J. N., Gillen, C. M., Henningham, A., Sriprakash, K. S., Sanderson-Smith, M. L., & Nizet, V. (2014). Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group A Streptococcus. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 264–301. <https://doi.org/10.1128/CMR.00101-13>
- Walton, M. (1978). A spontaneous ankle deformity in an inbred strain of mouse. *The Journal of Pathology*, 124(4), 189–194. <https://doi.org/10.1002/path.1711240403>
-

- Weston, V. C., Jones, A. C., Bradbury, N., Fawthrop, F., & Doherty, M. (1999). Clinical features and outcome of septic arthritis in a single UK Health District 1982-1991. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 58(4), 214–219. <https://doi.org/10.1136/ard.58.4.214>
- Williams, M. R., & Lusinskas, F. W. (2011). Leukocyte rolling and adhesion via ICAM-1 signals to endothelial permeability . Focus on “Leukocyte rolling and adhesion both contribute to regulation of microvascular permeability to albumin via ligation of ICAM-1.” *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 301(4), C777–C779. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00250.2011>
- Winter, C., Taut, K., Srivastava, M., Länger, F., Mack, M., Briles, D. E., Paton, J. C., Maus, R., Welte, T., Gunn, M. D., & Maus, U. A. (2007). Lung-Specific Overexpression of CC Chemokine Ligand (CCL) 2 Enhances the Host Defense to Streptococcus pneumoniae Infection in Mice: Role of the CCL2-CCR2 Axis. *The Journal of Immunology*, 178(9), 5828–5838. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.9.5828>
- Wooley, P. H., Dillon, A. M., & Luthra, H. S. (1983). Genetic control of type II collagen-induced arthritis in mice: Factors influencing disease susceptibility and evidence for multiple MHC-associated gene control. *Transplantation Proceedings*, 15(1), 180–185. <https://mayoclinic.pure.elsevier.com/en/publications/genetic-control-of-type-ii-collagen-induced-arthritis-in-mice-fac>
- World Health Organization. (2005). *The Current Evidence for the Burden of Group A Streptococcal Diseases Department of Child and Adolescent Health and Development World Health Organization*.
- Zimmerli, W., Lew, P. D., & Waldvogel, F. A. (1984). Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect. *Journal of Clinical Investigation*, 73(4), 1191–1200. <https://doi.org/10.1172/JCI111305>

**VIII. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

---

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

\_\_\_\_\_  
(Abgabedatum)

\_\_\_\_\_  
(Vollständige Unterschrift)

## IX. WISSENSCHAFTLICHER LEBENS LAUF

---

### Berufliche Erfahrung

- seit Mai 2017      Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universitätsmedizin Rostock, Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse, Arbeitsgruppe Klinische Immunologie
- Juni 2013 bis  
Dezember 2016      Wissenschaftliche Hilfskraft am Leibniz Institut für Plasmaforschung und Technologie in Greifswald, Zentrum für Innovationskompetenz Plasmatis
- August 2008 bis  
Juni 2011          Auszubildender zum Chemielaboranten bei der Eurofins Analytik GmbH in Hamburg
- Bestandene Abschlussprüfung der Industrie- und Handelskammer Hamburg

### Akademische Ausbildung

- seit Mai 2017      Promotion an der Universitätsmedizin Rostock im Bereich der experimentellen Immunologie
- August 2014 bis  
Februar 2017      Studium der Biochemie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald
- Bestandene Abschlussprüfung zum Master of Science
- August 2011 bis  
August 2014      Studium der Biochemie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald
- Bestandene Abschlussprüfung zum Bachelor of Science

## **X. FÖRDERUNG**

---

Diese Studie wurde durch die Landesexzellenzinitiative Mecklenburg-Vorpommern und den europäischen Sozialfonds (ESF) im Projekt „Kolnfekt“ gefördert (ESF/14-BM-A55-0011/16).

## **XI. DANKSAGUNG**

---

Hiermit bedanke ich mich vielmals bei Prof. Müller-Hilke für die beispiellose Betreuung und ausgesprochen hilfreiche Unterstützung während der Planung der Experimente sowie der Anfertigung der Niederschriften. Ihre Tür war immer offen und durch ihre ehrliche und beharrliche Natur konnte sie mich immer wieder in die Spur zurückbringen. Sie vermochte es außerdem mich jederzeit zu motivieren und bei Fehlschlägen wiederaufzubauen. In diesem Zusammenhang auch herzlichen Dank an Prof. Kreikemeyer, der mir als Zweitbetreuer beiseite stand.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter der Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse. Damit bedanke ich mich bei Dr. Engelmann, der mir zu Beginn meiner Arbeit in der AG Klinische Immunologie mit Rat und Tat beiseite stand. Außerdem möchte ich meinen Dank an Micheal Müller und Wendy Bergmann aussprechen, die immer ein offenes Ohr hatten und bei wissenschaftlichen Diskussionen zu etlichen Ideen, die in diese Arbeit transformiert wurden, beitrugen. Des Weiteren geht mein Dank an Marcel Kordt, meinen ehemaligen und ausgezeichneten Masterstudenten, durch dessen Hilfe ich den Herausforderungen von Lehre und Ausbildung auf den Grund gehen durfte. In diesem Zusammenhang auch vielen Dank an Sophia Müller und Erik Weipert, die mich praktisch ungemein unterstützten.

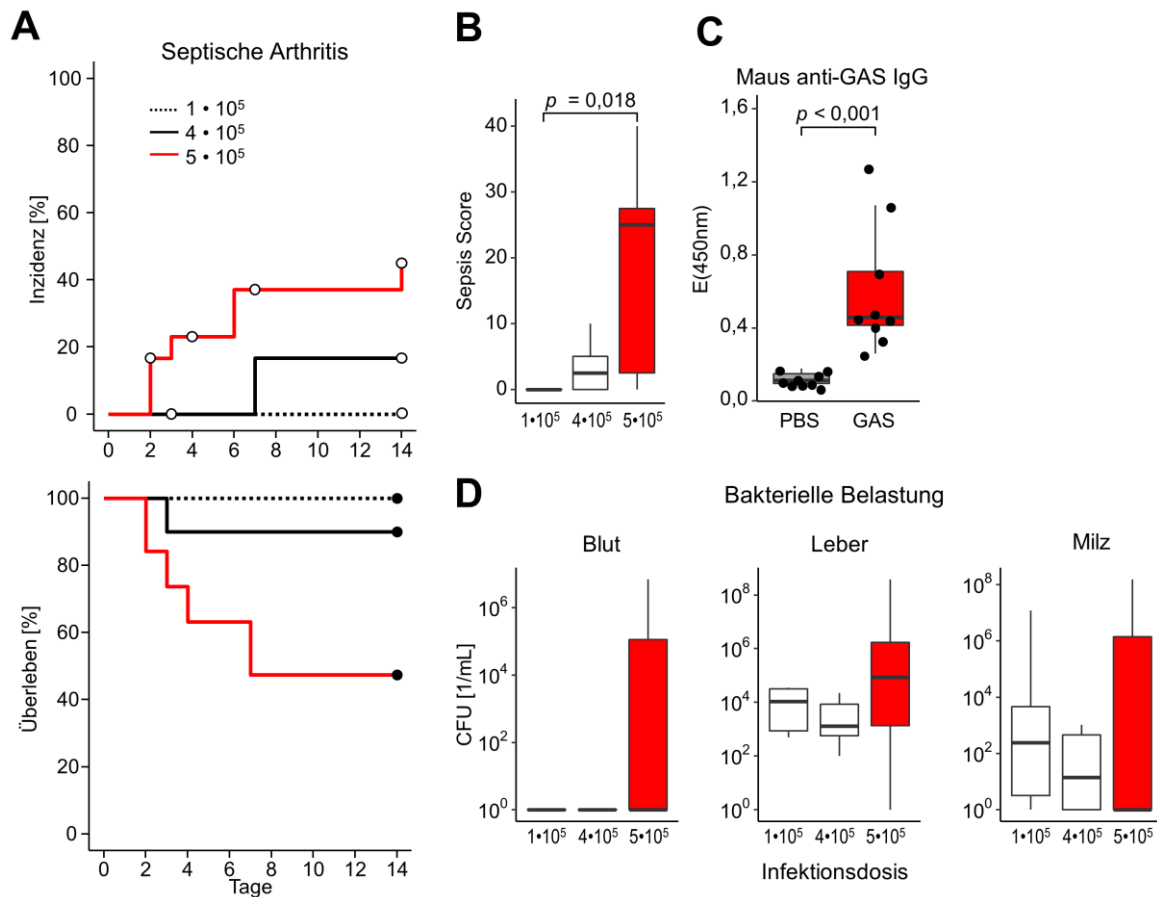
Außerdem möchte ich mich bei Daniel Schultz aus der Arbeitsgruppe von Prof. Lalk im Institut für Biochemie der Universität Greifswald bedanken. Im Zusammenhang unserer ausgezeichneten Kooperation trug er einen wichtigen Anteil zu dieser Arbeit bei. Vielen Dank vor allem an die Mitarbeiter der Core Facility für Versuchstierhaltung am Rudolf Zenker-Institut für experimentelle Chirurgie. Herzlichen Dank an Karin Gerber, Mareike Degner und Ilona Klamfuß für die Unterstützung bei der Tierzucht und bei der Bereitstellung der Versuchsmäuse. Des Weiteren geht mein Dank an Sonja Oehmcke-Hecht und Yvonne Humboldt für ihre Hilfe bei der Kultivierung von *S. pyogenes*.

Eintausend und ein Dank an meine wundervolle Lebensgefährtin Elisabeth Aleith. Sie schenkt mir mit jedem neuen Tag Kraft, Selbstbewusstsein, Freude und viel Zuckrigkeit. Vielen Dank an meine lieben Eltern Sylvia und Olaf Volzke. Ohne sie wäre ich heute nicht da wo ich bin. Sie waren mein Fels in der schwersten Brandung.

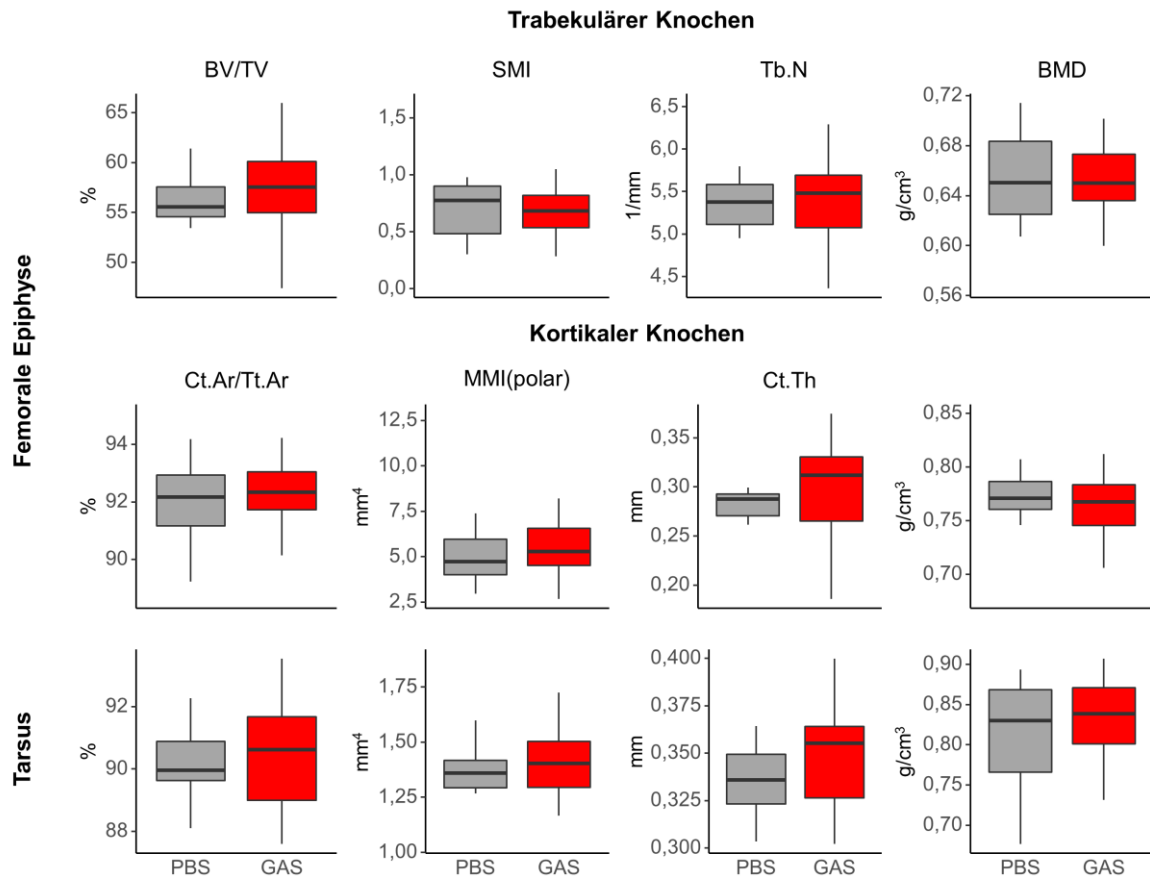
---

## XII. ANHANG

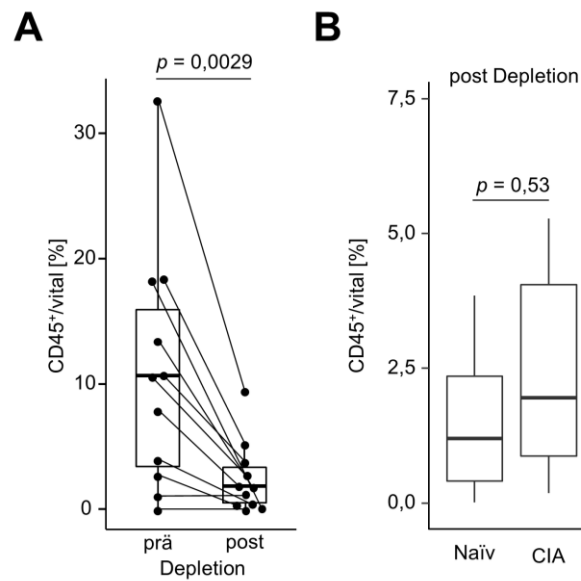
## ERGÄNZENDE ABBILDUNGEN



**Abbildung A1: Etablierung des Kleintier-Modells für Sepsis und septische Arthritis (SA).** (A) 20 bis 22 Woche alte, männliche C57Bl/6J wurden mit verschiedenen Dosen von Gruppe A Streptokokkus (GAS) infiziert und daraufhin für bis zu 14 Tage beobachtet. Die Kaplan-Meier-Schätzer der Inzidenz der SA und der Überlebensrate zeigen, dass  $5 \cdot 10^5$  koloniebildende Einheiten für das Auslösen von SA in einer hohen Anzahl von Tieren ausreichend waren. Die Mäuse wurden zum Ende des Beobachtungszeitraums beziehungsweise vorzeitig an humanen Endpunkten geopfert. (B) Die Box-Plots zeigen die Krankheitsaktivität der Sepsis nach Applikation verschiedener, bakterieller Dosen zum jeweiligen Endpunkt. (C) Die Box-Plots stellen die gemessenen Maus anti-GAS IgG Titer im Plasma von mit  $5 \cdot 10^5$  KBE GAS infizierten Tieren dar, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraums überlebt haben. (D) Sowohl Blut-Proben als auch Homogenisate von Lebern und Milzen wurden zu den respektiven Endpunkten auf Blut-Agar aufgebracht um die bakterielle Last für jede applizierte GAS-Dosis zu überprüfen.

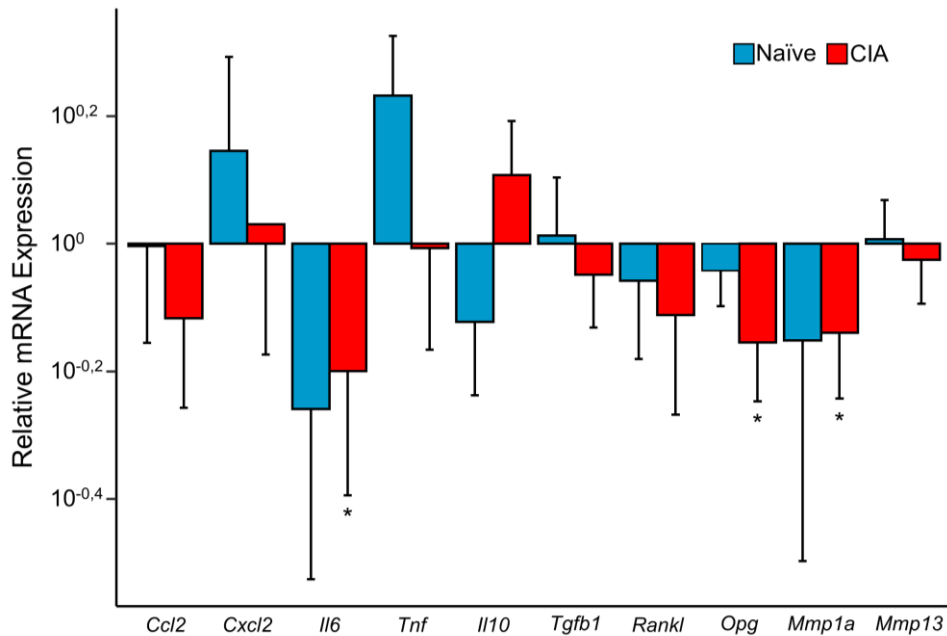


**Abbildung A2: Eine akute GAS-Infektion hatte keinen Einfluss auf die Knochenstruktur von C57BL/6J Mäusen.** Femora und Pfoten wurden mittels mikro-Computertomographie auf Veränderungen der Knochenmorphologie untersucht. Die Proben wurden an Tag 14 nach PBS-Applikation (n = 11) gewonnen. Die Proben von infizierten Mäusen (GAS) wurden, in Abhängigkeit von der Schwere der Sepsis, an den Endpunkten der Tage 3 (n = 6), 4 (n = 6) oder 14 (n = 19) nach der i.v. Applikation entnommen. Für den trabekulären Knochen sind das relative Knochenvolumen (BV/TV), der *structure model index* (SMI), die Anzahl der Trabekel (Tb.N) und die Knochenmineraldichte (BMD) dargestellt. Für den kortikalen Knochen sind die relative Kortikalfäche (Ct.Ar/Tt.Ar), das polare Flächenträgheitsmoment (MMI), die Kortikaldicke (Ct.Th) und die BMD gezeigt.

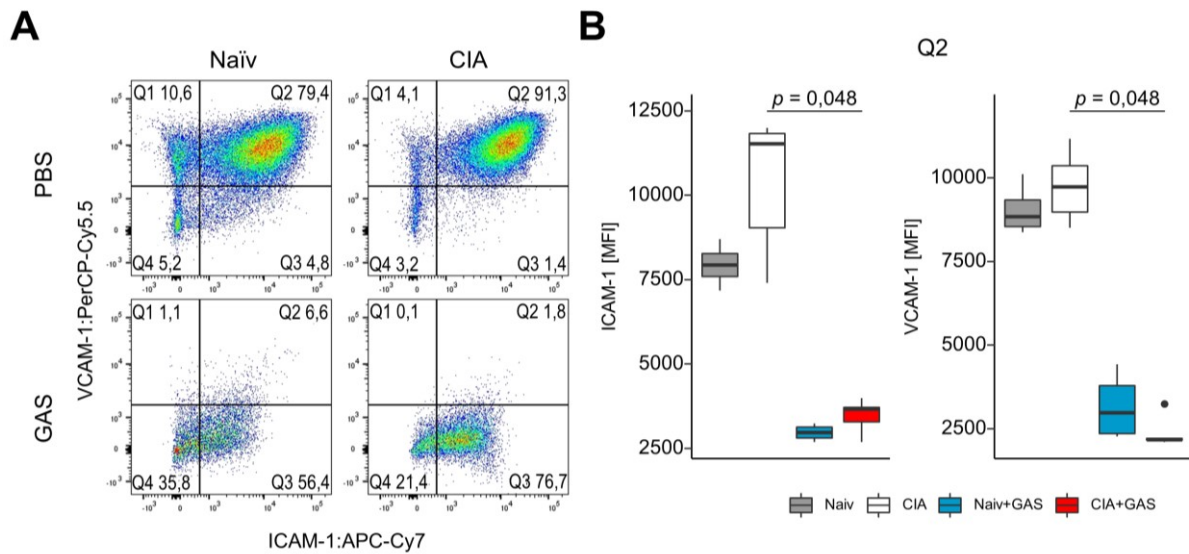


**Abbildung A3: Qualitätskontrolle der Depletion von Leukozyten aus FLS Kulturen. (A)** Der Box-Plot stellt den Anteil CD45<sup>+</sup> Zellen an allen lebenden Zellen der heterogenen FLS-Kultur, vor beziehungsweise nach Zellsortierung nach dem Größenausschluss-Prinzip, dar. Zudem ist die statistische Analyse mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für gepaarte Stichproben gezeigt. **(B)** Die FLS-Kulturen, welche aus naïven und Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis (CIA) abgeleitet wurden, unterschieden sich nach der Depletion - in Bezug auf den Anteil der CD45<sup>+</sup> an den vitalen Zellen - nicht voneinander.





**Abbildung A4: Die Expression von Zytokin-Genen wurde in FLS aus F1 Mäusen nach *in vitro* Infektion nicht beeinflusst.** Die FLS-Kulturen wurden für 4 h mit einer Multiplizität der Infektion von 10 mit GAS infiziert. Mittels qPCR wurde nach Normierung auf die PBS-Kontrollen und das Referenzgen *Gapdh* die relative mRNA Expression von Chemokinen (*Ccl2*, *Cxcl2*), Zytokinen (*Il6*, *Tnf*, *Il10*), RANK-Agonisten (*Rankl*[*Tnfsf11*], *Opg*[*Tnfrsf11b*]) und Matrixmetalloproteinasen (*Mmp1a*, *Mmp13*) analysiert. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte mitsamt positiven Standardabweichungen der infizierten FLS, die ursprünglich aus naïven (n = 3) oder Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis (CIA, n = 4) isoliert wurden. Die GAS-Infektion induziert in diesem Modell nur marginale Veränderungen der Expression der hier analysierten Gene ohne einen Unterschied zwischen FLS aus naïven und CIA Mäusen abzubilden. \*p < 0,05; Einstichproben-t-Test für den Vergleich mit der PBS-Kontrolle (n = 3 [Naïv], n = 4 [CIA]).



**Abbildung A5: GAS induzierte den Verlust der Expression von Integrin-Liganden durch FLS aus F1 Mäusen *in vitro*.** (A) Repräsentative Dichtediagramme illustrieren die deutliche Abnahme der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 von CD31<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> FLS nach 8 h Infektion mit GAS (MOI ≈ 10). (B) Nur bei FLS aus CIA Mäusen (n = 5) ist die Abnahme der Expression ICAM-1 und VCAM-1 signifikant, zeigt jedoch einen deutlichen Trend bei FLS aus naiven Tieren (n = 4). Die Box-Plots stellen die Expression anhand des Medians der Fluoreszenz-Intensitäten (MFI) des Detektionssignals für die Integrin-Liganden aus der ICAM-1<sup>+</sup> VCAM-1<sup>+</sup> FLS-Subpopulation dar.

**MATERIALTABELLEN**

GERÄTE UND VORRICHTUNGEN

<b>Hersteller</b>	<b>Hauptsitz</b>	<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Produktnummer/Modell</b>
Anthos Mikrosysteme	Krefeld, Deutschland	Plattenfotometer	HT III
Applied Biosystems	Foster City, CA, USA	Fast Real-Time PCR System	7900 HT
Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA	Durchflusszytometer	FACSAria IIIu FACSVerse
Binder	Tuttlingen, Deutschland	CO <sub>2</sub> -Brutschrank	CB 150
Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA	UV-Bestrahlungskammer	GS Gene Linker
Bruker	Antwerpen, Belgien	Mikro-Computertomograph	SkyScan 1076
Carl Zeiss	Oberkochen, Deutschland	Mikro-Fotoapparat	Axiocam ERc 5s
		Mikroskop	Axioplan 2
		Rotationsmikrotom	Hyrax M55
Thermo Scientific	Fisher Waltham, MA, USA	Gradienten-Thermoblock	Nanodrop ND1000
Zoonlab	Castrop-Rauxel, Deutschland	Kleinnager-Käfig	Typ 2L Typ 3

CHEMIKALIEN, PRÄPARATE UND LÖSUNGEN (TEIL 1)

Hersteller	Hauptsitz	Produktbezeichnung	Produktnummer/Modell
Abcam	Cambridge, UK	Anti-Streptococcus pyogenes Group A Carbohydrate antibody	ab9191
Applied Biosystems	Foster City, CA, USA	TaqMan <i>Il10</i>	Mm00439614_m1
		TaqMan <i>Mmp1a</i>	Mm00473485_m1
		TaqMan <i>Ccl2</i>	Mm00441242_m1
		TaqMan <i>Cxcl2</i>	Mm00436450_m1
		TaqMan <i>Gapdh</i>	Mm05724508_g1
		TaqMan <i>Il6</i>	Mm00446190_m1
		TaqMan <i>Mmp13</i>	Mm00439491_m1
		TaqMan <i>Opg (Tnfrsf11b)</i>	Mm01205928_m1
		TaqMan <i>(Tnfsf11)</i>	Mm00441906_m1
		TaqMan <i>Tgfb1</i>	Mm01178820_m1
TaqMan <i>Tnf</i>	Mm00443258_m1		
Bayer	Leverkusen, Deutschland	Xylazinhydrochlorid 2 % (w/v)	770-081
Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA	Adjuvant Incomplete Freund	263910
		BD Bacto™ Todd-Hewitt-Bouillon	BD 249220
		M. tuberculosis H37 Ra, desiccated	231141

## CHEMIKALIEN, PRÄPARATE UND LÖSUNGEN (TEIL 2)

Hersteller	Hauptsitz	Produktbezeichnung	Produktnummer/Modell
		APC anti-mouse CD31 Antibody (390)	102409
		APC anti-mouse/human CD45R/B220 Antibody (RA3-6B2)	103211
		APC/Fire™ 750 anti-mouse CD54 Antibody (YN1/1.7.4)	116125
		Brilliant Violet 605™ anti-mouse CD90.2 Antibody (30-H12)	105343
		DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate)	422801
		FITC anti-mouse CD45 Antibody (30-F11)	103107
BioLegend	San Diego, CA, USA	LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel	740446
		PE anti-mouse/human CD11b Antibody (M1/70)	101207
		PE/Cyanine5 anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) Antibody (RB-8C5)	108409
		PE/Cyanine7 anti-mouse CD3ε Antibody (145-2C11)	100319
		PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD106 Antibody (429)	105715
		TMB Substrate Kit	421101
Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA	Peroxide Blocking Reagent	BUF007B
		Rabbit F(ab') <sub>2</sub> anti-Mouse IgG-HRP (Human Adsorbed)	STAR13B

ANHANG

CHEMIKALIEN, PRÄPARATE UND LÖSUNGEN (TEIL 3)

Hersteller	Hauptsitz	Produktbezeichnung	Produktnummer/ Modell
		Albumin Fraktion V	8076.3
		Eosin G-Lösung 0,5 %	X883.1
		Natriumchlorid	601.1
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland	ROTI Histol (96 - 98 % Limonen)	6640.1
		Safranin O	T129.1
		Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	4855.2
		Tween 20	9127.1
Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA	SignalStain® DAB Substrate Kit	8059P
Chondrex	Redmond, WA, USA	Immunization Grade Bovine Type II Collagen	20021
Ethicon	Somerville, NJ, USA	Vicryl, 6-0, Nahtmaterial	V134H
		Normal Rb Serum Control	31884
Invitrogen	Carlsbad, CA, USA	Rabbit anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, 1 mg	R-21459
		DMEM, low glucose, pyruvate, no glutamine, no phenol red	11880-028
		Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	14190094
Life Technologies	Calsbad, CA, USA	Fetal Bovine Serum, qualified, Brazil	10270106
		MEM alpha, nucleosides	22571020
		Penicillin-Streptomycin (5000 U/mL)	15070-063
Meditate	Burgdorf, Deutschland	USEDECAL	40-3310-00
Merck	Darmstadt, Deutschland	Mayers Hämalaunlösung	109249
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland	autoMACS Running Buffer	130-091-221

CHEMIKALIEN, PRÄPARATE UND LÖSUNGEN (TEIL 4)

Hersteller	Hauptsitz	Produktbezeichnung	Produkt- No./Modell
PAN-Biotech	Aidenbach, Deutschland	HEPES Buffer 1M	P05-01100

## ANHANG

---

		Sodium pyruvate 100 mM	P04-43100
Pharmanovo	Hannover, Deutschland	Ketaminhydrochlorid 10 % (w/v)	27015.00.00
pluriSelect	Leipzig, Deutschland	CD45 S-pluriBead® anti-ms	29-04500-10
		S-pluriBead® Maxi Reagent Kit	70-50010-12
Qiagen	Hilden, Deutschland	RNeasy Plus Mini Kit	74134
Ratiopharm	Ulm, Deutschland	Tramadol, 100 mg/mL Tropfen	31467.00.00
Research and Diagnostic Systems	Minneapolis, MN, USA	Mouse CXCL2/MIP-2 DuoSet ELISA	DY452-05
Resorba	Nürnberg, Deutschland	Resolon, 4-0, Nahtmaterial	88061
Serva Electrophoresis	Heidelberg, Deutschland	Di-Natrium-EDTA	39760.01
Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA	Bovine Serum Albumin	A9418
StemCell Technologies	Vancouver, Kanada	Collagenase Type IV	7427
Thermo Scientific Fisher	Waltham, MA, USA	Fast Green FCF	BP123-10
Zentiva	Prag, Tschechien	Novaminsulfon 500 mg Lichtenst. Tropfen (Metamizol)	324275

---

SONSTIGES VERBRAUCHSMATERIAL

<b>Hersteller</b>	<b>Hauptsitz</b>	<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Produkt- No./Modell</b>
Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA	Columbia Agar mit 5 % Schafsblut	254071
Corning	Corning, NY, USA	Serologische Pipette, 25 mL	357525
Greiner Bio-One	Kremsmünster, Öster- reich	6 Well Multiwellplatte	657160
		EasyStrainer 70 µm	542070
Invitrogen	Carlsbad, CA, USA	Nunc MaxiSorp™ flat-bottom	44-2404-21
Paul Marienfeld	Lauda-Königshofen, Deutschland	Neubauer-Zählkammer	640010
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland	Cell Scraper 16 cm	83.1832
ssniff Spezialdiäten	Soest, Deutschland	ssniff R/M-H	V1535-000
Techno Plastic Products	Trasadingen, Schweiz	Serologische Pipette, 10 mL	94010
		Serologische Pipette, 5 mL	94005
		Zellkulturflasche T25	90026
		Zellkulturflasche T75	90076