

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktion: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich

Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms bei der Pneumokokkenmeningitis:
Untersuchungen in einem Mausmodell

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

vorgelegt von

Nadin Tremel

aus

Memmingen

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Uwe Ködel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Reinhard Zeidler
Priv. Doz. Dr. med. Tania Kümpfel

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einleitung.....	7
1.1 Die Grundlagen der bakteriellen Meningitis.....	7
1.2 Die Epidemiologie der bakteriellen Meningitis	7
1.3 Die klinischen Symptome und Komplikationen der bakteriellen Meningitis ...	9
1.4 Die Therapie und Prognose der bakteriellen Meningitis	11
1.5 Die Pathophysiologie der Entzündungsreaktion der Pneumokokkenmeningitis	13
1.5.1 Die Ausbreitung von <i>S. pneumoniae</i> im Liquor.....	13
1.5.2 Die immunologische Aktivierungskaskade im Liquorraum	16
1.6 Die Rolle der Caspase-1 bei der Pneumokokkenmeningitis.....	18
1.7 Das Inflammasom.....	20
2. Fragestellungen.....	23
3. Methoden	27
3.1 Das Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis.....	27
3.1.1 Der klinischer Score.....	27
3.1.2 Die Infektion	28
3.1.3 Die Präparation der Mäuse am Versuchsende	29
3.1.4 Die bakterielle Titerbestimmung.....	31
3.1.5 Die Zellzahlbestimmung im Liquor	32
3.2 Die Versuchsgruppen	32
3.3 Die Herstellung von Hirnschnitten	34
3.4 Die Auswertung zerebraler Blutungen.....	35
3.5 Die Bestimmung der Bluthirnschrankenpermeabilität.....	35
3.6 Die Erfassung der neuropathologischen Veränderungen	37
3.7 Die Messung der IL-1 β -Konzentration im Hirnhomogenat.....	38
3.8 Statistik.....	38
3.9 Tierversuchsgenehmigung	38
4. Ergebnisse	39
4.1 Die Folgen der ASC-Gendefizienz für den klinischen Zustand.....	39
4.2 Die Auswirkung der ASC-Gendefizienz auf die Entwicklung intrakranieller Komplikationen.....	41
4.3 Die Konsequenz der ASC-Gendefizienz für die Entzündungsreaktion	44

4.4	Die Bedeutung des NLRs NLRP3 und des Adaptermoleküls RIP2, zweier potentieller ASC-Interaktionspartner, bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis.....	47
4.5	Die Auswirkungen einer Inhibition von Zytokinen der IL-1-Familie auf die experimentelle Pneumokokkenmeningitis	50
4.6	Die Bedeutung von Cathepsin B bei der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms <i>in vivo</i>	53
4.7	Die Rolle des Pneumokokkentoxins Pneumolysin im NLRP3-Signalweg....	54
4.8	Die Rolle von Cathepsin B und Pneumolysin bei der IL-1 β -Produktion	57
4.9	Granulozyten: eine wichtige Quelle von IL-1 β bei der Pneumokokkenmeningitis.....	57
5.	Diskussion	61
5.1	Das NLRP3-Inflammasom besetzt eine zentrale Rolle in der Immunopathogenese der experimentellen Pneumokokkenmeningitis.....	61
5.2	Die Bedeutung von Zytokinen der IL-1-Familie, deren Aktivität vom NLRP3-Inflammasom reguliert wird, bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis.....	64
5.3	Die Beteiligung der Protease Cathepsin B bei der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms bei der Pneumokokkenmeningitis.....	69
5.4	Die Rolle von Pneumolysin bei der NLRP3-Inflammasomaktivierung	74
5.5	Die neutrophilen Granulozyten stellen eine wichtige Quelle für IL-1 β dar ...	77
5.6	Die neutrophilen Granulozyten sind die entscheidenden Effektorzellen der Pneumokokkenmeningitis.....	80
6.	Zusammenfassung	83
7.	Ausblick	89
8.	Literaturverzeichnis	91
9.	Anhang: Materialliste	105
10.	Danksagung	109

Abkürzungsverzeichnis

ASC	apoptosis-associated speck-like protein
AK	Antikörper
CSF	Liquor cerebrospinalis (cerebrospinal fluid)
DAMP	danger-associated molecular pattern
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ICP	intrakranieller Druck (intracranial pressure)
IL	Interleukin
IL-18BP	Interleukin-18-Bindungsprotein
KbE	Koloniebildende Einheit
LPS	Lipopolysaccharid
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NF- κ B	nukleärer Faktor κ B
NLR	NOD-like receptor
NLRP	NOD-like receptor protein
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, pH= 7,4

PGN	Peptidoglykan
D39 Δ PLY	Pneumolysin-defizienter Pneumokokkenstamm
PLY	Pneumolysin
PRR	pattern recognition receptor
RIP2	receptor-interacting protein 2
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
THP1	humane monozytäre Zelllinie (Makrophagen)
TLR	toll-like receptor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Grundlagen der bakteriellen Meningitis

Als Meningitis wird eine Entzündung der Pia mater, der Arachnoidea mater und benachbarter Strukturen, wie dem mit Liquor cerebrospinalis (CSF) gefüllten Subarachnoidalraum, bezeichnet (van de Beek et al. 2004; Barichello et al. 2012). Greift die Entzündung auf den Kortex über, spricht man von einer Meningoenzephalitis. Die weitaus gefährlichste Meningitisform stellt die bakterielle Meningitis dar. Ätiologisch kommen bei der bakteriellen Meningitis verschiedene Infektionswege in Frage:

- hämatogene Streuung: Generalisierung einer bakteriellen Infektion/Sepsis (z.B. bei Pneumokokkenpneumonie), infektiöse Endokarditis, Streuung aus chronischem Eiterherd
- fortgeleitet (per continuitatem): vom Mittelohr, Mastoid oder den Nasennebenhöhlen aus (Pneumokokken), Osteomyelitis des Schädelknochens (Staphylokokken)
- direkte Infektion: offene Schädel- und Schädelbasisfrakturen (SHT), offene Hirnverletzung, neurochirurgische Eingriffe, Shunt (Staphylokokken)

(Hacke und Poeck 2010; Krams 2010). Bei der bakteriellen Meningitis wird dabei zwischen ambulant, das heißt außerhalb einer medizinischen Einrichtung erworbenen, und nosokomialen, also sekundär während eines Krankenhausaufenthaltes erworbenen, Infektionen unterschieden.

1.2 Die Epidemiologie der bakteriellen Meningitis

Laut einer amerikanischen Studie aus dem Jahr 2011 sind Inzidenz und Sterblichkeitsrate der akuten ambulant erworbenen bakteriellen Meningitis in den

USA infolge von Impfung und besserer antimikrobieller und adjuvanter Therapie dramatisch gefallen: die Inzidenz ging von 3 bis 5 pro 100.000 im Jahr gegen Ende des 20. Jahrhunderts auf aktuell 1,3 bis 2 pro 100.000 im Jahr zurück (Thigpen et al. 2011; Bhimraj 2012). Allerdings fordert die Erkrankung immer noch einen hohen Tribut. In den USA versterben immer noch 10 bis 20 % aller Menschen, die an Meningitis erkranken (Swartz 2004). In weniger gut entwickelten Ländern sind die Zahlen wesentlich höher (Scarborough et al. 2007; Scarborough und Thwaites 2008; Bhimraj 2012). Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist die bakterielle Meningitis jährlich weltweit für geschätzt 170.000 Todesfälle verantwortlich (Stand Februar 2012). Das mögliche Erregerspektrum hängt von Infektionsort, Lebensalter und Immunstatus ab (Bhimraj 2012; Paulus 2012). Die häufigsten Erreger einer bakteriellen Mening(oenzephal)itis im Erwachsenenalter in den USA und Europa sind *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) (um 50%) und *Neisseria meningitidis* (um 30%) (Schuchat et al. 1997; van de Beek et al. 2004), gefolgt von Listerien (<5% der Fälle), Staphylokokken (je nach Literaturangabe 1-9% der Fälle), gramnegativen Enterobakterien inklusive *Pseudomonas aeruginosa* (<10% der Fälle) und *Haemophilus influenzae* (1-3%). Die häufigsten Keime der eitrigen Meningo(enzephal)itis im Kindesalter sind Pneumokokken und Meningokokken und in der Neugeborenenperiode gramnegative Erreger, *Streptococcus agalactiae* (Gruppe B-Streptokokken) und *Listeria monocytogenes*. Die Inzidenz der invasiven *Haemophilus influenzae* Typ B (Hib)-Erkrankungen ist nach Einführung der Hib-Konjugat-Impfstoffe vor über 15 Jahren deutlich zurückgegangen (Dawson et al. 1999; Kastenbauer und Pfister 2003; Pfister 2003; Paul und Lamont 2012). Sie wurden, zumindest in der westlichen Welt, nahezu eliminiert (Schuchat et al. 1997; van de Beek et al. 2004; Agrawal und Nadel 2011), so dass *S. pneumoniae* derzeit als der wichtigste Erreger der bakteriellen Meningitis des Kindes- und

Erwachsenenalters verbleibt (Kastenbauer und Pfister 2003; Pfister 2003; Dery und Hasbun 2007; Arda et al. 2008).

1.3 Die klinischen Symptome und Komplikationen der bakteriellen Meningitis

Das Erkrankungsbild der bakteriellen Meningitis stellt einen medizinischen Notfall dar. Dabei ist Zeit der Faktor, der die Prognose der Patienten am stärksten beeinflusst. Eine schnelle Diagnosefindung und ein früher Therapiebeginn in Form einer empirischen antibiotischen Behandlung sind essentiell (Klein et al. 2009). Jedoch kann die Erkrankung im Frühstadium schwer zu erkennen sein, da das klinische Krankheitsbild nicht immer den klassischen Symptomenkomplex aufweist, der mit einer bakteriellen Meningitis unmittelbar in Verbindung gebracht wird. Die Sensitivität der klassischen klinischen Trias bestehend aus Fieber, Nackensteifigkeit und Vigilanzstörung ist gering (44%), wobei sie bei der Pneumokokkenmeningitis noch in etwa doppelt so vielen Fällen wie bei der Meningokokkenmeningitis zu finden ist (58% versus 27%, $p < 0,001$). Dahingegen zeigen fast alle Patienten (95%) mindestens 2 der folgenden vier Symptome: Kopfschmerzen, Fieber, Nackensteifigkeit und Bewusstseinsminderung (definiert als ein Glasgow Coma Scale-Wert unter 14) (Kastenbauer und Pfister 2003; van de Beek et al. 2004). Andere mögliche Befunde sind klinische Symptome wie Fotophobie, Übelkeit, Erbrechen, epileptische Anfälle und fokale neurologische Defizite sowie positive neurologische Testbefunde wie das Kernig- (aktive Kniebeugung bei passiver Streckung des Kniegelenks bei 90° Beugung im Hüftgelenk) und Brudzinksi-Zeichen (reflektorische Kniebeugung bei passiver Kopfbewegung nach vorne) (Bhimraj 2012). Etwa 10% der Patienten mit bakterieller Meningitis haben eine Hirnnervenbeteiligung, der Häufigkeit nach des III., VI., VII. oder VIII. Hirnnervens. Hörstörungen, die meist Folge einer eitrigen Labyrinthitis sind, lassen sich bei etwa 10-20% der Patienten

nachweisen, bei Patienten mit Pneumokokkenmeningitis sogar bei bis zu 30% (Kastenbauer und Pfister 2003; Pfister 2003). Unter Ausschluss von Kontraindikationen wie einem erhöhten intrakraniellen Druck (durch eine kraniale Bildgebung) ist die Durchführung einer Lumbalpunktion bei jedem Patienten verpflichtend, bei dem eine bakterielle Meningitis vermutet wird. Die Liquoruntersuchung stellt den wichtigsten Faktor bei der Diagnosesicherung dar. Der Liquor von Patienten mit bakterieller Meningitis präsentiert sich typischerweise makroskopisch trüb, eventuell gelb verfärbt, und laborchemisch mit folgenden Befunden:

- Pleozytose von > 1000 Zellen/ μ l
- Proteingehalt erhöht > 100 mg/dl
- Glukosegehalt erniedrigt < 30 mg/dl (Liquor-Serumglukose-Ratio $< 0,4$)
- Laktaterhöhung $> 3,5$ mmol/l
- normalerweise hohe Neutrophilenzahl (80-95%), (granulozytäre Pleozytose)

(Straus et al. 2006; Hacke und Poeck 2010). Die Diagnose der bakteriellen Meningitis wird durch den Erregernachweis im Liquor gesichert. Neben der Kultur erlaubt die Gramfärbung des Liquors in den meisten Fällen eine schnelle Identifizierung des auslösenden Erregers (Sensitivität 60-90%, Spezifität 97%) (van de Beek et al. 2006), wenn die Patienten noch nicht antimikrobiell vorbehandelt sind. Im Rahmen einer bakteriellen Meningitis ist der intrakranielle Druck (ICP), für den Normwerte von 6 bis 14 mmHg gelten (Straus et al. 2006), als Zeichen eines Hirnödems oder Hydrozephalus bei Liquorabflussstörung häufig erhöht (> 25 mmHg). Zudem können zahlreiche andere Komplikationen unterschiedlichen Schweregrades während der Akutphase einer bakteriellen Meningitis auftreten, wie z.B. (van de Beek et al. 2004; van de Beek et al. 2006; Weisfelt et al. 2006): [i] Infarkte, verursacht

durch einen entzündungsbedingten Gefäßverschluss (Arteriitis, Sinusthrombose), Vasospasmus oder Blutung, unter Umständen gefolgt von fokalen neurologischen Defiziten wie Hemiparese oder Aphasie, [ii] epileptische Anfälle oder Bewusstseinsminderung, hervorgerufen durch Übergreifen der Entzündung auf den Kortex (Meningoenzephalitis), [iii] subdurales Empyem, [iv] Hörminderung/-verlust oder Beeinträchtigung anderer Hirnnerven. Die häufigsten extrakraniellen Komplikationen sind septischer Schock, disseminierte intravasale Koagulopathie (disseminated intravascular coagulation, DIC) oder Multiorganversagen. Über die Hälfte der erwachsenen Patienten mit einer bakteriellen Meningitis entwickelt Komplikationen im Krankheitsverlauf (Pfister et al. 1993; Kastenbauer und Pfister 2003). Der Anteil von neurologischen Residuen (insbesondere Hörstörungen, neuropsychologische Auffälligkeiten, Hemiparese, epileptische Anfälle, seltener Ataxie, Hirnnervenparesen und Sehstörungen wie z. B. homonyme Hemianopsie) liegt bei 20-50% (Grimwood et al. 2000; Kastenbauer und Pfister 2003; Pfister 2003; van de Beek et al. 2004).

1.4 Die Therapie und Prognose der bakteriellen Meningitis

Trotz antibiotischer Behandlung und großer Fortschritte in der Intensivmedizin handelt es sich bei der bakteriellen Meningitis immer noch um ein potentiell lebensbedrohliches Krankheitsbild mit einem hohen Prozentsatz an Fällen mit schlechtem klinischen Verlauf (Schuchat et al. 1997). Dies trifft vor allem für die Pneumokokkenmeningitis zu (34%), bedingt durch den hohen Anteil an oben beschriebenen Komplikationen (van de Beek et al. 2004). Ihre Mortalitätsrate schwankt je nach Literaturangabe zwischen 19-37% (Pfister et al. 1993; van de Beek et al. 2004; van de Beek et al. 2006; Weisfelt et al. 2006). Aufgrund dessen ist der alleinige klinische Verdacht für den Beginn einer Antibiotikatherapie ausreichend. Da

der Erreger anfangs unbekannt ist, sollten bei der Wahl der Antibiotika das Alter, Umgebungsfaktoren und Vorerkrankungen berücksichtigt und so der/die jeweils wahrscheinlichste/n Erreger behandelt werden (Schut et al. 2008). Nach einem Erregernachweis durch die Gramfärbung des Liquors und der Erstellung eines Antibiogramms erfolgt gegebenenfalls die Anpassung der Antibiotikatherapie für die optimale Behandlung, die mindestens 10 Tage dauern sollte (van de Beek et al. 2006). Dass der schnellstmögliche Beginn der Antibiotikatherapie großen Einfluss auf den Krankheitsverlauf besitzt, belegen zahlreiche retrospektive Studien, wie beispielsweise die Untersuchung von Proulx et al. (2005). Diese Studie zeigte, dass die Zahl der Todesfälle lediglich 5-6% betrug, wenn die Antibiotikagabe innerhalb der ersten 6 Stunden nach Aufnahme im Krankenhaus begonnen wurde. Allerdings erhöhte sich die Sterblichkeitsrate auf 45% bei einem Therapiebeginn zwischen der 6.- 8. Stunde und auf 75% zwischen der 8.-10. Stunde nach der klinischen Aufnahme (Bhimraj 2012). Als supportiver Behandlungsbaustein steht bei der Pneumokokkenmeningitis das Steroid Dexamethason zur Verfügung. Dieser Behandlungsansatz basiert auf der wissenschaftlichen und klinischen Erkenntnis, dass Glukokortikoide die gefährliche Entzündungsreaktion abmildern und dadurch den klinischen Verlauf einer Pneumokokkenmeningitis verbessern können (van de Beek 2009; Koedel et al. 2009b; Brouwer et al. 2010b; Kasanmoentalib et al. 2013). Die erste Gabe sollte vor oder simultan mit dem Beginn der antibiotischen Behandlung erfolgen. Im weiteren Verlauf wird Dexamethason für insgesamt 4 Tage alle 6 h verabreicht. Bei der Pneumokokkenmeningitis konnte so die Sterblichkeitsrate halbiert werden, was unter anderen auf eine Reduktion systemischer Komplikationen zurückgeführt wurde (de Gans und van de Beek 2002). Außerdem wurde bei Metaanalysen zur Glukokortikoidwirkung bei bakteriellen Meningitiden auch eine Abnahme neurologischer Folgeschäden und der

Hörminderung beobachtet (van de Beek et al. 2006; van de Beek et al. 2010; Brouwer et al. 2010a; Brouwer et al. 2010b).

Die weiteren Ausführungen beziehen sich auf die Pneumokokkenmeningitis als häufigste Form der bakteriellen Meningitis des Erwachsenen, die überdies eine (vergleichsweise) ungünstige Prognose aufweist.

1.5 Die Pathophysiologie der Entzündungsreaktion der Pneumokokkenmeningitis

Eine Pneumokokkenmeningitis entsteht, wenn es im Subarachnoidalraum zu einer Infektion mit den grampositiven Diplokokken *S. pneumoniae* kommt. Die Infektion kann beispielsweise vom Nasopharynx ausgehen und über die Blutbahn den Subarachnoidalraum erreichen; diese sogenannte hämatogene Genese dominiert bei Neugeborenen und Kindern. Alternativ kann sich die Infektion kontinuierlich von einem benachbarten Fokus (z.B. einer Mastoiditis) direkt in den Subarachnoidalraum ausbreiten. Diese Form stellt die häufigste Variante bei Erwachsenen dar (Koedel et al. 2010a).

1.5.1 Die Ausbreitung von *S. pneumoniae* im Liquor

Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist gegen die Einwanderung von pathogenen Keimen aus dem Blut in die Meningen durch eine effektive physiologische Barriere geschützt. Diese Barriere besteht aus zwei Komponenten, die Blut und das ZNS voneinander trennen: die Blut-Liquor-Schranke und die Blut-Hirn-Schranke. Die Blut-Liquor-Schranke wird durch das Kapillarendothel der Blutgefäße, die Basalmembran, und das Epithel der Plexus choroidei (baumartigen Gefäßkonvolute in den Hirnventrikeln) gebildet (Johansson et al. 2008; Palmer 2010). Sie ist nur für Wasser und gelöste Gase wie Sauerstoff vollständig durchlässig, für die meisten übrigen Moleküle aber undurchlässig. Diese können diese Barriere nur überwinden, wenn sie

von den Plexus-Epithelzellen aktiv aufgenommen und sezerniert werden.

Wesentliche Bestandteile der Blut-Hirn-Schranke sind mikrovaskuläre Endothelzellen (Risau et al. 1998; Rubin und Staddon 1999; Li et al. 2001), die mit *tight junctions* miteinander verbunden sind, eine geringe Pinozytoseaktivität aufweisen und über spezielle Transportsysteme verfügen, und so den Übertritt von Stoffen, Zellen und Keimen in das ZNS beschränken (Abbott et al. 2010; Daneman 2012). Für die meisten pathogenen Erreger, die sich Zugang zu den Meningen verschaffen, ist der exakte Mechanismus derzeit noch unbekannt. Dies gilt auch für *S. pneumoniae*, obwohl Hinweise darauf vorliegen, dass die Endothelzellen als Übertrittsstelle genutzt werden (Rodriguez et al. 1991; Ring et al. 1998; Zwijnenburg et al. 2001). In Tiermodellen der hämatogenen Pneumokokkenmeningitis wurden Bakterien in Gramfärbungen von Hirnschnitten ausschließlich im Bereich der Leptomeningen im Subarachnoidalraum beobachtet (Rodriguez et al. 1991). Dieser Befund deutet darauf hin, dass Pneumokokken über das zerebrale Endothel, nicht aber über das Plexusependym, in den Liquorraum eindringen. Der erste Schritt bei der Invasion in das ZNS ist die Adhäsion von Pneumokokken an die Oberfläche zerebraler Endothelzellen. Dabei binden Pneumokokken initial an exponierte Carbohydrate (Andersson et al. 1983; Idanpaan-Heikkila et al. 1997). Die weitere Interaktion zwischen Erreger und Endothel erfordert eine Aktivierung der Endothelzellen, in deren Folge diese Zellen verstärkt den Rezeptor des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) auf ihrer Oberfläche exprimieren. Der PAF-Rezeptor fungiert als Bindestelle für die Pneumokokken, woraufhin der Rezeptor-Pneumokokken-Komplex durch Clathrin-vermittelte Endozytose unverzüglich in die Zelle aufgenommen wird (Cundell et al. 1995; Ring et al. 1998). So gelangen die Pneumokokken, eingeschlossen in eine Vakuole, in die Endothelzelle. Innerhalb der Endothelzelle geht ein Teil der Pneumokokken in der Vakuole zugrunde, andere Pneumokokken wandern unter

Beteiligung des Adaptorproteins β -Arrestin durch die Zelle hindurch (Hammerschmidt 2009). Ist die Überwindung der Blut-Hirn-/Liquor-Schranke von den Pneumokokken erst einmal vollzogen, hat das körpereigene Immunsystem den eindringenden Keimen wenig entgegenzusetzen, da der Subarachnoidalraum Ähnlichkeiten mit sogenannten immunprivilegierten Organen wie dem Gehirn aufweist (Medawar 1948; Niederkorn 2006). Im Liquorraum befindet sich kein gut ausgebildetes Lymphsystem (Johnston et al. 2004). Lösliche Pathogenerkennungsrezeptoren, die notwendig für die Phagozytose der Bakterien sind, sind so gut wie nicht vorhanden (Dujardin et al. 1985; Stahel et al. 1997). Zudem stellt die Blut-Hirn-/Liquor-Schranke ein physiologisches Hindernis für deren Übertritt aus der Blutbahn in den Liquorraum dar (Pachter et al. 2003). Erschwerend kommt hinzu, dass im Liquor konstitutiv antientzündliche und immunsuppressive Faktoren vorhanden sind. Man kann den Liquorraum also als ein Körperkompartiment betrachten, in dem die Immunreaktivität unter normalen Bedingungen unterdrückt ist. Allerdings finden sich in Geweben, die an den Liquorraum angrenzen, wie z.B. in den Leptomeningen, im perivaskulären Raum, oder in den Plexus choroidei, funktionell aktive Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zellen, die sowohl auf ihrer Zelloberfläche als auch intrazellulär diverse Mustererkennungsrezeptoren exprimieren und dadurch befähigt sind, eingedrungene Pathogene zu detektieren und eine Immunreaktion auszulösen (Pashenkov und Link 2002; Guillemin und Brew 2004; Mukhopadhyay und Gordon 2004; McGreal et al. 2005). Zur Elimination der eingedrungenen Erreger reicht deren Phagozytoseleistung in der Regel nicht aus. Dies hat zur Folge, dass es zunächst zur ungestörten Vermehrung der Pneumokokken kommt (Small et al. 1986). In Folge der Aktivierung der ortständigen Immunzellen kommt es zur Einwanderung von Leukozyten in den Liquorraum. Diese Leukozyten sind aufgrund der lokal niedrigen Komplementfaktorenspiegel und der damit einhergehenden mangelhaften

Opsionierung ebenfalls nicht in der Lage, die Pneumokokken ausreichend zu phagozytieren (Simberkoff et al. 1980; Koedel et al. 2002a). Dadurch können die Erreger im Liquorraum sehr hohe Konzentrationen erreichen (Koedel et al. 2010a).

1.5.2 Die immunologische Aktivierungskaskade im Liquorraum

Wenn *S. pneumoniae* die stationäre Wachstumsphase erreichen oder vorher durch widrige Umwelteinflüsse geschädigt werden (beispielsweise durch Antibiotika), gehen sie in Autolyse (Koedel et al. 2002a; Kadioglu et al. 2008). Bei der Autolyse handelt es sich um eine Selbstverdauung der Zellwand durch Mureinhydrolasen, genannt Autolysine. Der Hauptvertreter unter den Autolysinen von *S. pneumoniae* ist die N-Acetyl-Muramyl-L-Alanin-Amidase (LytA) (Garcia et al. 1999; Lopez et al. 2000). Durch die Autolyse kommt es zur Freisetzung von Bakterienbestandteilen wie Peptidoglykanen (PGN), Lipoteichonsäure oder DNA, die als Auslöser einer massiven wirtseigenen Immunantwort fungieren. Die Entzündungsreaktion kann zu schweren Schäden im Gehirn führen und dadurch neurologische Defizite oder gar tödliche Verläufe verursachen. Diese Entzündungsreaktion wird durch die kombinierte, synergistisch wirkende Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR), vor allem TLR2 und TLR4, angestoßen (Koedel et al. 2010a). TLRs gehören zur Familie der Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), die unter anderem von Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten exprimiert werden. Sie dienen dem angeborenen Immunsystem dazu, ein breites Spektrum an Pathogenen wie Viren, Bakterien und Pilzen an bestimmten Merkmalen, sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) zu erkennen. Zu letzteren gehören die oben genannten Bakterienbestandteile wie PGN (Janeway 1992; Medzhitov und Janeway 1997; Medzhitov und Janeway 2002). Die Interaktion von PAMP und TLR2/4 führt in der Folge über den intrazellulären Signalumwandler

MyD88 (myeloid differentiation factor 88) zur Stimulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der für die Induktion von vielen Genen verantwortlich ist, die für inflammatorische Mediatoren kodieren (Koedel et al. 2010a). Es resultiert unter anderem die Produktion von Vorläuferformen von Zytokinen aus der Interleukin(IL)-1-Familie (IL-1 β und IL-18) (Mustafa et al. 1989; Fassbender et al. 1999), die aktiviert werden müssen. Dazu ist eine enzymatische Spaltung der Vorläuferzytokine von Nöten, die von einer intrazellulären inflammatorischen Protease, der Caspase-1, vollzogen wird. Die Sekretion der reifen Zytokine könnte über einen positiven Rückkopplungsmechanismus deren eigene Ausschüttung weiter ankurbeln, indem über die Bindung der Zytokine an IL-1-Rezeptoren MyD88-abhängigen Signalwege sekundär autokrin aktiviert werden (Koedel et al. 2010a). Die produzierten Zytokine initiieren eine massive Einwanderung von vornehmlich neutrophilen Granulozyten aus dem Blut in den Liquor und bedingen deren Aktivierung mit dem Ziel der Phagozytose der Bakterien. Die Neutrophilen wiederum setzen eine Reihe von Stoffen wie Oxidantien und proteolytische Enzyme frei, die, in Übermaßen produziert, auch schädigende Wirkung auf gesundes Gewebe haben können. Diese Stoffe können beispielsweise einen Verlust der Membranintegrität oder DNA-Strangbrüche verursachen (Klein et al. 2006a).

Einen weiteren Bakterienbestandteil von *S. pneumoniae* stellt Pneumolysin (PLY) dar, ein Poren-bildendes Zytolysin. Solche Toxine werden meist von Bakterien, die extrazellulär verbleiben und nicht selbst in Wirtszellen eindringen, in einer löslichen Form freigesetzt. Anschließend polymerisieren die sezernierten Toxine zu einem ringähnlichen Gefüge, das eine Pore in der Membran der Wirtszelle ausbildet (Aroian und van der Goot 2007; Freche et al. 2007). Auf diesem Weg könnte PLY direkt körpereigenes Gewebe schädigen und somit ein wichtiger pathogenetischer Faktor

bei der Pneumokokkenmeningitis sein (Hirst et al. 2003; El-Rachkidy et al. 2008; Hirst et al. 2008; Heuck et al. 2010). Alternativ wäre vorstellbar, dass PLY, das laut Berichten in der Fachliteratur auch proinflammatorisch wirken kann, zur Entzündungsverstärkung und damit indirekt zur Gewebeschädigung beiträgt (Braun et al. 1999a; Cockeran et al. 2001; Dessing et al. 2009; Witzernath et al. 2011). Zu Beginn dieser Dissertationsarbeit war jedoch unklar, über welchen Mechanismus und in welchem Ausmaß der Virulenzfaktor Pneumolysin Einfluss auf die Aktivierung der Entzündungsreaktion innerhalb der Pneumokokkenmeningitis nimmt.

1.6 Die Rolle der Caspase-1 bei der Pneumokokkenmeningitis

Zytokine spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis, indem sie das angeborene Immunsystem und somit die Immunantwort auf pathogene Keime und Gewebeschädigung regulieren. Als zentrale proinflammatorische Zytokine gelten die Vertreter der IL-1-Zytokin-Familie IL-1 β und IL-18 (Riesenfeld-Orn et al. 1989; Ramilo et al. 1990; Saukkonen et al. 1990; Quagliarello et al. 1991). Sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen fanden sich erhöhte IL-18- und IL-1 β -Spiegel im Hirngewebe beziehungsweise im Liquor (Mustafa et al. 1989; Fassbender et al. 1999; Zwijnenburg et al. 2003a; Zwijnenburg et al. 2003b). Dabei korrelierten die IL-1 β -Spiegel beim Menschen mit der Prognose; stark erhöhte IL-1 β -Werte gingen mit einem signifikant schlechteren klinischen Verlauf einher (Mustafa et al. 1989). Im Tiermodell induzierte schon allein die intrazisternale Gabe von IL-1 β eine Meningitis (Quagliarello et al. 1991). Außerdem zeigten IL-1 β -defiziente Mäuse, Kaninchen, die mit IL-1-Antikörpern behandelt worden waren, aber auch IL-18-defiziente Mäuse in Modellen der Pneumokokkenmeningitis eine geringere Immunreaktion (Saukkonen et al. 1990; Zwijnenburg et al. 2003a; Zwijnenburg et al. 2003b).

Wie im Abschnitt 1.6 bereits beschrieben, werden die Zytokine der IL-1-Familie als inaktive Vorläuferformen (z.B. pro-IL-1 β) produziert und dann durch proteolytische Spaltung in die biologisch aktive Form überführt und sezerniert. Diese Spaltung wird durch eine sich im Zytoplasma befindende Protease vollzogen, die Caspase-1 (Dinarello 1998; Ekert et al. 1999; Los et al. 1999; Zheng et al. 1999). Das „C“ in der Bezeichnung „Caspase-1“ beschreibt den Mechanismus der proteolytischen Spaltung als Cysteinprotease und „-aspase“ bezieht sich auf die Eigenschaft, hinter einer Asparaginsäure zu spalten (Alnemri et al. 1996). Die Caspase-1 ist der Untergruppe der „inflammatorischen“ Caspasen zugehörig, weil die Hauptsubstrate Vorläufer von Entzündungsmediatoren sind. Die zentrale Funktion der Caspase-1 in der Produktion von IL-1 β konnte durch zahlreiche Arbeiten aufgezeigt werden. Beispielsweise sind Caspase-1-Inhibitoren in der Lage, die Freisetzung der aktiven Form von IL-1 β zu verhindern (Miller et al. 1995; Hara et al. 1997). Zudem sind Caspase-1-defiziente Mäuse unfähig, aktives IL-1 β herzustellen (Kuida et al. 1995; Li et al. 1995). Zur Charakterisierung der Rolle von Caspase-1 in der Pathogenese der bakteriellen Meningitis führte unsere Arbeitsgruppe Versuche mit Hilfe von Caspase-1-defizienten Mäusen und dem Caspase-1-Inhibitor z-VAD-FMK durch. Dabei zeigte sich, dass die Depletion des Caspase-1-Gens und die pharmakologische Blockade von Caspase-1 den Meningitis-induzierten Anstieg von IL-1 β signifikant verringerten. Dies wurde von einer signifikant reduzierten meningealen Entzündungsreaktion begleitet. Überdies waren bei den defizienten Mäusen und den behandelten Ratten die Meningitis-assoziierten intrakraniellen Komplikationen signifikant geringer ausgeprägt als bei Wildtypmäusen und unbehandelten Ratten, was wiederum zu einem besseren klinischen Status führte. Diese Ergebnisse deuteten auf eine zentrale Rolle der Caspase-1 bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis hin (Koedel et al. 2002b).

1.7 Das Inflammasom

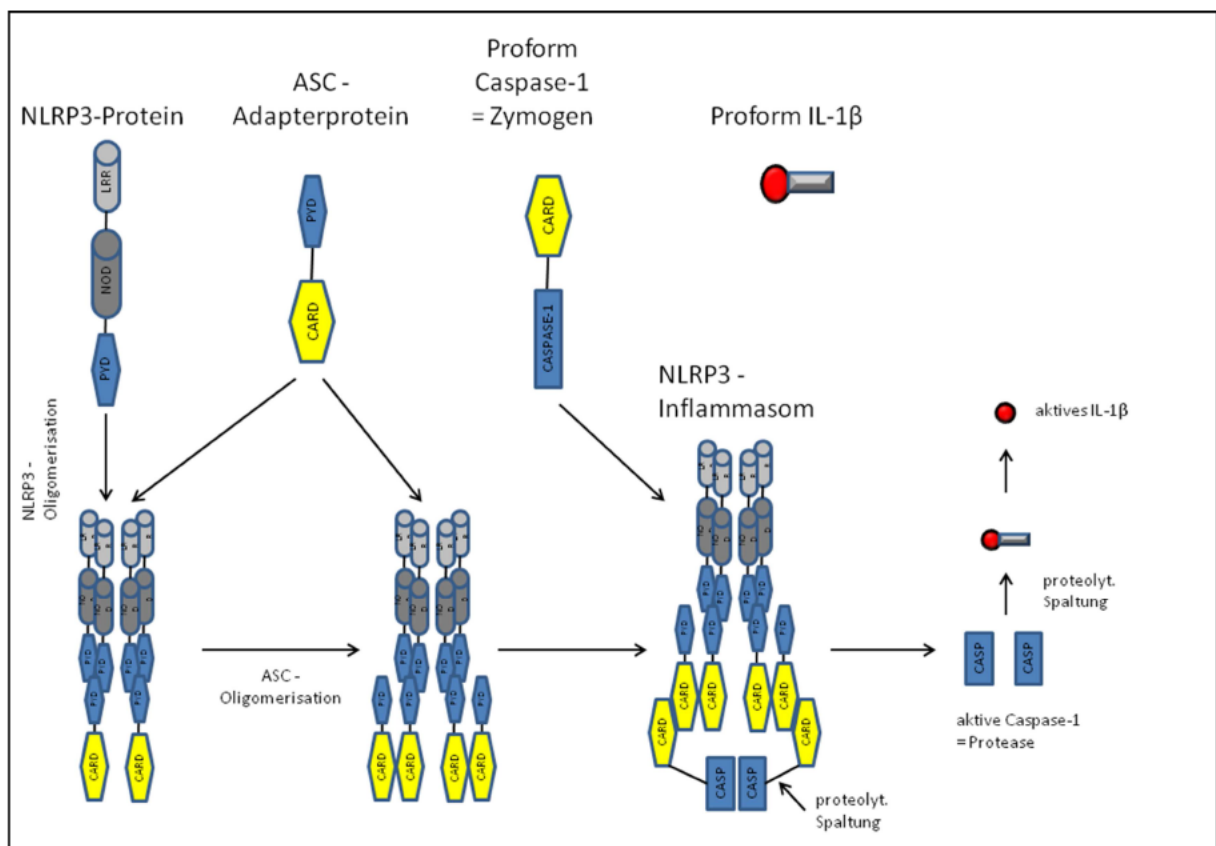
Alle Caspasen liegen als katalytisch inaktive Zymogene (Proform) im Zytoplasma vor und unterlaufen selbst wiederum eine proteolytische Aktivierung (Cohen 1997).

Dieser Schritt wird innerhalb eines großen Multiproteinkomplex, „Inflammasom“ genannt, vollzogen. Dieser Begriff setzt sich zusammen aus dem Wort „Inflammation“, um seine Funktion in der Aktivierung von inflammatorischen Caspasen und Entzündungsmediatoren widerzuspiegeln (Martinon et al. 2002), und dem Suffix -som von griech. „soma“, was so viel wie „Körper“ bedeutet und den Komplex mit seinem hohen Molekulargewicht ausdrückt (Martinon et al. 2009). Das Inflammasom beinhaltet NOD (nucleotide-binding oligomerization domain)-like Rezeptor (NLR)-Proteine und Adapterproteine, wie z.B. ASC (apoptosis-associated speck-like protein), die die NLR-Proteine mit der Proform der Caspase-1 verbinden (Franchi et al. 2009; Tschopp und Schroder 2010; Franchi et al. 2012; Yang et al. 2012). NLRs wiederum sind Multidomänproteine mit einer 3-teiligen Struktur; von diesen Proteinen existieren verschiedene Untergruppen wie NLRP, NOD und IPAF/NAIP (Schroder und Tschopp 2010). NLRs gehören wie die TLRs ebenfalls zur Familie der PRRs, die für die Erkennung von PAMPs nötig sind. Im Falle der NLRs handelt es sich aber im Gegensatz zu den membrangebundenen oder endosomalen TLRs um zytoplasmatische PRRs. Um zwischen pathogenen und physiologischen Keimen unterscheiden zu können, sind für die NLRs neben PAMPs wahrscheinlich auch sogenannte DAMPs (danger-associated molecular patterns), also Gefahrensignale, von Nöten, um die Immunantwort in Gang zu bringen (Matzinger 2002; Seong und Matzinger 2004). Diese DAMPs werden als Folge von Gewebeschäden und Zelllysis aus beschädigten Zellen freigesetzt (DNA, RNA, Harnsäure) und signalisieren so Pathogenität (Shi et al. 2003). NLRs sind demzufolge die lösliche Form der PRRs und stellen intrazelluläre Sensoren für

mikrobielle Bestandteile oder Gefahrensignale wie metabolischen Stress dar (Martinon et al. 2009). Werden solche Signale detektiert, durchlaufen die NLRs eine Selbstoligomerisation, in deren Folge das Adapterprotein ASC bindet, das daraufhin selbst oligomerisiert (Juliana et al. 2010). Alternativ wird auch die Möglichkeit der Interaktion mit der Kinase RIP2 (receptor-interacting protein 2) anstelle von ASC als Adaptermolekül diskutiert (Meylan und Tschopp 2005). In der Folge bildet sich der Multiproteinkomplex des Inflammasoms aus, das die pro-Caspase-1 bindet und aktiviert und konsekutiv IL-1 β in die aktive Form überführt. Ein Inflammasom, das schon näher untersucht wurde, ist das NLRP3-Inflammasom, benannt nach dem NLR-Protein NLRP3. Der Mechanismus zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms ist noch nicht völlig entschlüsselt. Man geht davon aus, dass die Aktivierung zwei biologische Prozesse erfordert: Zuerst wird in Folge einer Aktivierung von TLRs MyD88-abhängig die Transkription von NLRP3 durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B hochreguliert. Dann muss NLRP3 im 2. Schritt noch aktiviert werden (Aktivierungsschritt) (Bauernfeind et al. 2009) (siehe 1.6.2). Zur Aktivierung kommt es infolge eines extrazellulären ATP-Anstiegs z. B. im Rahmen einer Gewebeschädigung. Daraufhin erfolgt ein Kaliumausstrom über den P2X7-Rezeptor, der zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt (Petrilli et al. 2007). Als Zwischenschritte neben dem Kaliumausstrom werden verschiedene Vorgänge diskutiert. Zum einen existiert die Hypothese, dass durch diverse NLRP3-Aktivatoren die Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species (ROS)) getriggert wird (Hewinson et al. 2008). Zum anderen gibt es Hinweise darauf, dass ein lysosomales Enzym, die Protease Cathepsin B, zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt (Hornung et al. 2008). Das aktivierte NLRP3-Inflammasom generiert letztendlich das proinflammatorische Zytokin IL-1 β . Wie eingehend beschrieben, geht auch die Pneumokokkenmeningitis mit einer Hochregulation von

IL-1 β einher, bei der das NLRP3-Inflammasom eine entscheidende Rolle spielen könnte. Obwohl die Produktion von IL-1 β wichtig für die Infektionsabwehr ist, kann die Überproduktion auch schädlich sein, weil sie eine autodestruktive Hyperinflammation auslösen kann, und muss aus diesem Grund streng überwacht werden (Martinon und Tschopp 2007). Die Regulation der inflammatorischen Caspasen auf Inflammasomniveau ist ein wichtiger Kontrollpunkt bei der Steuerung der IL-1 β -Aktivität.

Abbildung 1: Schema des strukturellen Aufbaus des NLRP3-Inflammasoms



Zur Erläuterung siehe Text oben. LRR = leucine rich repeat, PYD = pyrin-domain, NOD = nucleotide oligomerization domain, CARD = caspase-recruitment domain.

2. Fragestellungen

In früheren Zellkulturuntersuchungen beobachteten wir eine robuste Aktivierung der Zysteinprotease Caspase-1 nach einer Infektion mit *S. pneumoniae*. Bei Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis und in Tiermodellen dieser Erkrankung fanden wir im Bereich des leukozytären Infiltrats sowie zerebraler Gefäße eine Hochregulation der Caspase-1-Expression (auf RNA- und Proteinebene). In Untersuchungen an Caspase-1-defizienten Mäusen stellten wir zudem fest, dass das Fehlen dieses Enzym eine nahezu komplette Inhibition der Immunreaktion und der sekundären intrakraniellen Komplikationen zur Folge hatte. Die definitiven Mechanismen der Caspase-1-Aktivierung bei der Pneumokokkenmeningitis waren jedoch nicht geklärt.

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit war die Charakterisierung der Mechanismen der Caspase-1-Aktivierung bei einer bakteriellen Infektion im Liquorraum. Als Modell diente die experimentelle Pneumokokkenmeningitis. Im Einzelnen sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

[i] Evaluation der funktionellen Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis.

Die Caspase-1-Aktivität wird innerhalb eines Multiproteinkomplexes, des sogenannten Inflammasoms, reguliert. Zentrale Komponenten dieses Multiproteinkomplexes sind zytosolische NOD-like-Rezeptoren (wie NLRP3) und das Adaptermolekül ASC, das für die Rekrutierung der pro-Caspase-1 in den Multiproteinkomplex sorgt. Eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms war nach Stimulation mit bakterieller RNA und den grampositiven Bakterien *Staphylococcus aureus* und *Listeria monocytogenes* beschrieben worden. In unserem Mausmodell sollten zur Evaluation der Rolle des NLRP3-Inflammasoms Mäuse eingesetzt

werden, denen entweder das „Rekrutierungsprotein“ ASC, das in allen Inflammasomtypen zu finden ist, oder aber das NLRP3-Inflammasomtypische „Sensorprotein“ NLRP3 fehlt. Bei diesen Versuchen sollten die Effekte der jeweiligen Gendefizienz auf die Infektabwehr, die Immunantwort, sowie die Entstehung intrakranieller Komplikationen und den klinischen Verlauf erfasst werden.

[ii] Analyse der Rolle der lysosomalen Protease Cathepsin B bei der Pneumokokken-induzierten Caspase-1-Aktivierung *in vivo*.

In früheren Untersuchungen war eine Beteiligung der lysosomalen Protease Cathepsin B bei der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms postuliert worden. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese beobachteten wir in Untersuchungen an humanen THP1-Makrophagen, dass die Aktivierung der Caspase-1 durch den Cathepsin B-Hemmstoff Ca-074-Me verhindert werden kann. In unserem Mausmodell sollte nun die Übertragbarkeit dieses *in vitro*-Befundes auf die *in vivo*-Situation überprüft werden. Hierzu wurden Mäuse entweder mit dem Inhibitor oder einem Placebo behandelt und die Auswirkungen der jeweiligen Behandlung auf die Infektabwehr, die Immunantwort, den klinischen Verlauf, sowie die zerebrale IL-1 β -Produktion untersucht.

[iii] Charakterisierung der Bedeutung des Pneumokokkentoxins Pneumolysin für die Aktivierung der Caspase-1 *in vivo*.

In zellkulturellen Studien war gezeigt worden, dass das Pneumokokkentoxin PLY die Freisetzung von IL-1 β aus Monozyten und Granulozyten induzieren kann. Bei eigenen Untersuchungen an THP1-Makrophagen stellten wir darüber hinaus fest, dass die Defizienz des bakteriellen Toxins mit einer verminderten Caspase-1-Aktivierung und IL-1 β -Freisetzung einhergeht. In unserem Mausmodell sollte die Bedeutung des bakteriellen Toxins bei der eitrigen Meningitis ermittelt werden.

Hierzu wurden Mäuse entweder mit einem Pneumolysin-exprimierenden Wildtypbakterium (D39 Stamm) oder einer Pneumolysin-defizienten isogenen Mutante dieses Wildtypstammes (D39 Δ Ply) infiziert und die jeweiligen Effekte auf die Immunreaktion (z.B. IL-1 β -Produktion) und den klinischen Verlauf gemessen.

[iv] Evaluation der Rolle neutrophiler Granulozyten bei der IL-1 β -Produktion bei der Pneumokokkenmeningitis.

Im Mausmodell hatte die Cathepsin B-Inhibition und die PLY-Defizienz nur zu einer Halbierung der IL-1 β -Produktion geführt, während bei den Untersuchungen an Makrophagen beide Strategien mit einer nahezu kompletten Blockade der IL-1 β -Produktion einhergingen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Pneumokokkenmeningitis durch eine neutrophile Entzündungsreaktion gekennzeichnet ist, neutrophile Granulozyten aber auch über Caspase-1-unabhängige Wege zur IL-1 β -Generierung verfügen. Zur Überprüfung dieser Hypothese behandelten wir in einer abschließenden Versuchsreihe eine Gruppe von Tieren mit einem monoklonalen Antikörper (AK) gegen neutrophile Granulozyten, um ihre Bedeutung als Quelle dieses Zytokins *in vivo* zu erfassen. Des Weiteren untersuchten wir den Einfluss der Neutropenie auf die Infektabwehr, die Immunreaktion und den Krankheitsverlauf.

3. Methoden

3.1 Das Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis

Das im folgenden Abschnitt beschriebene Mausmodell ist seit über 10 Jahren in unserer Arbeitsgruppe etabliert (Koedel et al. 2002c; Klein et al. 2006b; Klein et al. 2008).

3.1.1 Der klinischer Score

Zu Beginn der Experimente wurden die Versuchstiere (männliche C57BL/6-Mäuse) einer Eingangsuntersuchung unterzogen. Dabei wurde zunächst das Körpergewicht mit einer Präzisionswaage ermittelt. Anschließend wurde die Körpertemperatur digital über eine rektale Temperatursonde gemessen. In der Folge wurde zur Objektivierung der klinischen Verfassung der Tiere ein klinischer Score erhoben, der folgende Parameter/Testverfahren umfasste:

1) den sogenannte „Postural Reflex Test“ (modifiziert nach Bederson et al., 1986).

Bei diesem Test wurden die Mäuse am Schwanz angehoben und dabei deren Körperhaltung erfasst. Bei einer symmetrischen Streckung aller 4 Extremitäten wurde der Scorewert 0 (= normal) vergeben. Wurde beim Test eine Flexion des Rumpfes, ein Drehen um die eigene Achse (sogenanntes „Circling“) oder ein Fehlen jeglicher motorischen Aktivität beobachtet, wurde der entsprechenden Maus entweder 1, 2 oder aber 3 Scorepunkte zugewiesen.

2) den „Beam Balancing Test“ (abgeleitet von Feeney et al., 1982). Dabei wurde die Maus auf Holzstäbchen mit abnehmenden Durchmessern (13,5 mm, 9 mm, 4,5 mm) gesetzt und erfasst, ob sie über das entsprechende Holzstäbchen laufen oder länger als 15 Sekunden auf dem Holzstäbchen verbleiben kann. Konnte die Maus auf dem dünnsten Stäbchen laufen, wurde ihr der Scorewert 0 gegeben.

Konnte sie auf dem dünnsten Stäbchen länger als 15 Sekunden verweilen, erhielt die Maus 1 Scorepunkt usw.. Der maximale Scorewert von 6 wurde vergeben, wenn eine Maus kürzer als 15 Sekunden auf dem dicksten Stäbchen verweilte.

- 3) die Vigilanz: war das Tier wach, erhielt es den Scorewert 0 (= normal); war es lethargisch, wurde der Scorewert 1 verteilt.
- 4) den Fellzustand: bestand bei der Maus eine Piloerektion, bekam sie einen Scorewert von 1, wenn nicht (= normal), einen Scorewert von 0.
- 5) das Auftreten von Krampfanfällen: kam es bei der Maus zu Krampfanfällen wurde ihr ein Scorewert von 1 gegeben, wenn nicht, ein Scorewert von 0 (= normal).

Gesunde Mäuse wiesen einen Gesamtscorewert von 0 Punkten auf, während der maximale Scorewert von 12 Punkten terminal kranke Mäuse beschrieb.

Zusätzlich wurde zur Evaluation der motorischen Aktivität der sogenannte „Open Field Test“ (abgeleitet von Gould et al., 2008) durchgeführt. Dabei wurde die Maus in das zentrale Feld einer 42x42x20 cm großen Box gesetzt, deren Grundfläche in neun 14x14 cm große Felder unterteilt ist. Anschließend wurde die Zahl der Felder gezählt, die die Maus im Zeitraum von 2 Minuten durchquerte.

3.1.2 Die Infektion

Nach der klinischen Untersuchung erfolgte unter einer Isoflurannarkose die Induktion der Pneumokokkenmeningitis. Zur Isoflurannarkose wurde eine Narkosekammer verwendet, die an einem Isofluranverdampfer und ein Absaugsystem angeschlossen ist. Die Kammer wurde mit 4% Isofluran (verdampft in reinem Sauerstoff) vorgeflutet. In die geflutete Kammer wurde die Versuchsmaus eingebracht. Nach dem Abliegen der Maus wurde die Narkosetiefe mittels Lid-, Schwanz- und Zwischenzehenreflex geprüft. Dazu wurden entweder der Lidwinkel mit einem Wattestäbchen berührt oder

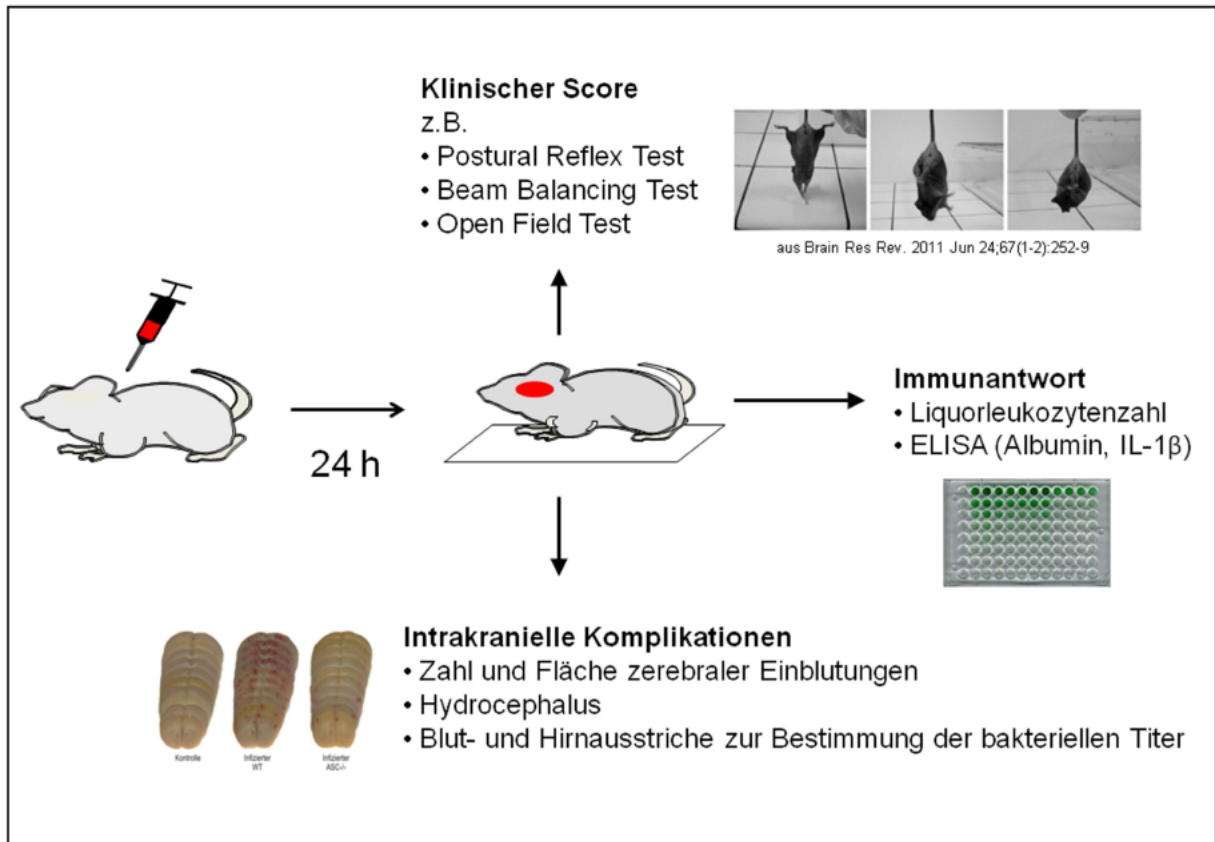
aber der Schwanz und Zwischenzehenraum mit einer Pinzette komprimiert. Nur Tiere, die auf den jeweiligen Reiz keine Reaktion zeigten (keine Lid-/Muskelzuckungen, Abwehrbewegungen oder Änderung der Atemfrequenz), wurden als ausreichend tief narkotisiert betrachtet. Bei ausreichender Narkosetiefe erfolgte die Induktion der Pneumokokkenmeningitis durch eine transkutane, intrazisternale Injektion von 10^5 Koloniebildende Einheiten (KbE) *S. pneumoniae* D39 in die Cisterna magna (in 15 μ l Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung; PBS). Kontrollmäuse erhielten lediglich 15 μ l PBS. Zur Injektion wurde der Kopf des Tieres mit einem eingeübten Handgriff der linken Hand umfasst und um 60° Grad inkliniert, um die Membrana antlanto-okzipitalis, die die Cisterna magna bedeckt, zu spannen. Danach erfolgte die intrazisternale Infektion, indem zunächst die Spritzenspitze mit der rechten Hand auf den mittleren Bereich des Os occipitale in der Medianlinie aufgesetzt wurde und daraufhin vorsichtig den Knochen in der Mittellinie entlang tastend schrittweise nach kaudal geführt wurde, bis der elastische Widerstand der Membran aufgefunden wurde. Anschließend wurde die Membran durchstoßen und die Bakteriensuspension injiziert. Nach der Infektion wurden die Tiere zum Aufwachen paarweise zurück in Plastik Käfige gelegt. Während der Aufwachphase wurden die Tiere über einen kurzen Zeitraum beobachtet, um auffällige Bewegungsmuster zu erkennen, die auf eine eventuelle Schädigung des Hirnstamms hindeuten können, wie beispielsweise ein Drehen um die eigene Achse. Zeigten die Mäuse keinerlei Auffälligkeiten, wurden sie im Käfig belassen. Dort wurden Ihnen Wasser und Futter ad libidum zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Die Präparation der Mäuse am Versuchsende

Am Versuchsende wurden die Mäuse mit Ketamin (100 mg/kg)/Xylazin (10 mg/kg) intraperitoneal narkotisiert. Fortan verblieben die Mäuse in Narkose. Bei

ausreichender Narkosetiefe wurden folgende Präparationsschritte durchgeführt: Die Mäuse wurden in einem stereotaktischen Rahmen eingespannt und dabei an beiden Schläfen und im Nasenwurzelbereich fixiert, um eine Positionsänderung des Kopfes während der Präparation zu vermeiden. Nach zusätzlicher lokaler Betäubung mit Lidocain wurde das Os interparietale des Schädels freigelegt und mit einem Mikrobohrer im 60°-Winkel median ein Loch im posterioren Areal der Knochenschuppe gebohrt. Über dieses Bohrloch wurde anschließend ein Katheter in die Cisterna magna eingeführt und Liquor gewonnen. Der entnommene Liquor diente zur mikroskopischen Zellzahlbestimmung der Leukozyten in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer (siehe 3.1.6). Bei ausreichendem Volumen ($> 5\mu\text{l}$) wurde der restliche Liquor zentrifugiert (bei 1900 rpm und Raumtemperatur für 10 min), der Überstand in ein Eppendorf-Probengefäß pipettiert und bei -30°C weggefroren. Über das angefertigte Bohrloch wurde außerdem der intrakranielle Druck mittels eines Druckwandlers gemessen, indem erneut ein Katheter eingeführt und mit Gewebekleber fixiert wurde. Nach Trocknung des Klebers wurde die entnommene Liquormenge durch PBS ausgeglichen und der Druck nach einem Verteilungszeitraum von 90 s gemessen. Danach wurden die Mäuse aus dem stereotaktischen Rahmen entnommen und auf dem Rücken auf einer Plastikunterlage gelagert. Im nächsten Schritt wurde der Brustkorb der Mäuse eröffnet und mit einer Insulinspritze Blut zur Bluttiterbestimmung aus dem rechten Ventrikel des Herzens entnommen. Daraufhin wurde nach Eröffnung des linken Ventrikels ein Plastikschauch in die Aorta vorgeschoben und mit Hilfe eines Fadens fixiert. Nach der transkardialen Perfusion des Gefäßsystems mit 15 ml gekühltem, mit 10 Einheiten Heparin/ml versetztem PBS wurde das Gehirn entnommen; das Groß- und Mittelhirn wurden sofort bei -80°C in einem Plastikschälchen tiefgefroren.

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Mausmodells der Pneumokokkenmeningitis und angewandte Untersuchungsmethoden



Zum Ablauf der Experimente siehe Text oben und für Erläuterungen der weiteren Untersuchungen siehe Text unten.

3.1.4 Die bakterielle Titerbestimmung

Das Kleinhirn wurde in 1ml sterilem PBS mit einer Hochleistungsdispersiermaschine (Ultra-Turrax®; einer Art Rührstab) homogenisiert. Das Kleinhirnhomogenat und das kardial gewonnene Blut wurden daraufhin unter sterilen Bedingungen in Serien verdünnt (Kleinhirn 1:10³ und 1: 10⁵, Blut 1:10 und 1:10³), auf Blutagarplatten ausgestrichen und anschließend für 24 h in einem Inkubator bei 37°C bebrütet. Im Anschluss erfolgten die Auszählung der gewachsenen Bakterienkolonien sowie die Berechnung der Titer unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsstufen.

3.1.5 Die Zellzahlbestimmung im Liquor

Um die Zellzahl im Liquor zu bestimmen, wurde ein Gemisch aus 2 μl Liquor und 18 μl Türk'sche Lösung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß hergestellt und für kurze Zeit inkubiert. Dadurch sollten die Leukozyten fixiert und eventuell vorhandene Erythrozyten lysiert werden. Anschließend wurden die Leukozyten in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer unter einem Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Liquorzellzahl wurde pro Mikroliter nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl (Zellen}/\mu\text{l)} = \text{ZZ} \times \text{KF} \times \text{VF}$$

wobei ZZ = Zellzahl, KF = Korrekturfaktor 1,25, VF = Verdünnungsfaktor 10

$$\rightarrow \text{ZZ (Zellen}/\mu\text{l)} = \text{ZZ} \times 12,5$$

3.2 Die Versuchsgruppen

In früheren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die genetische Depletion von Caspase-1 und die pharmakologische Blockade der Caspase-1 die Entzündungsreaktion bei der Pneumokokkenmeningitis entscheidend abschwächt. (Koedel et al. 2002b). Zur genaueren Charakterisierung der Mechanismen, die der Caspase-1-Aktivierung bei der Pneumokokkenmeningitis zugrunde liegen, führten wir im Rahmen dieser Doktorarbeit Untersuchungen zur Funktion des NLRP3-Inflammasoms und dessen Komponenten im Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis durch. Dazu wurden NLRP3-defiziente Mäuse (NLRP3^{-/-}, n=10), die uns von Herrn Prof. J. Tschopp (Abteilung für Biochemie der Universität Lausanne, Epalinges, Schweiz) überlassen wurden, und ASC-defiziente Mäuse (ASC^{-/-}, n=10), die uns Herr Prof. V.M. Dixit (Department for Physiological Chemistry, South San Francisco, California, USA) zur Verfügung stellte, mit dem Pneumokokkenstamm D 39 infiziert und mit infizierten Wildtypmäusen (WT, n=12),

die den gleichen genetischen Hintergrund wie die Knockoutstämme aufwiesen, verglichen (Stamm C57BL/6; Charles River Deutschland, Sulzfeld, Deutschland). Da beschrieben wurde, dass RIP-2 mit dem ASC-Protein um die Bindung an die Caspase-1 konkurrieren kann (Sarkar et al. 2006) und zudem eine Schlüsselposition im NOD1- und NOD2-Signalweg einnimmt (Barnich et al. 2005; Fairhead et al. 2008), untersuchten wir ferner Mäuse, die eine RIP2-Deletion aufwiesen (RIP^{-/-}). Diese erhielten wir ebenfalls von Prof. V.M. Dixit aus San Francisco, USA.

Um die Bedeutung NLRP3-Inflammasom-abhängiger Zytokine aus der IL-1-Familie in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis zu evaluieren, behandelten wir in weiteren Versuchsreihen WT-Mäuse mit dem rekombinanten IL-1-Rezeptor-Antagonisten Anakinra (n=6, 100 mg/kg Maus intraperitoneal, Amgen, München, Deutschland) oder mit einer Kombination aus Anakinra und rekombinantem Maus-IL-18-bindenden Protein (rIL-18BP; n=6, 5 mg/kg Maus intraperitoneal; Sino Biological, Beijing, China). Zum Vergleich wurde jeweils einer Gruppe aus 6 Wildtyptieren 0,5 ml beziehungsweise 1,0 ml PBS intraperitoneal appliziert.

Um Hinweise auf den Aktivierungsweg des NLRP3-Inflammasoms zu erhalten, führten wir des Weiteren Untersuchungen zur Rolle von Cathepsin B und Pneumolysin im Mausmodell durch.

Von zellkulturellen Untersuchungen an der humanen Makrophagenzelllinie THP-1 wussten wir, dass Pneumokokken Caspase-1 aktivieren und dass die Aktivierung in Abhängigkeit von Cathepsin B und Pneumolysin erfolgt. Diese Beobachtungen waren in Übereinstimmung mit Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, die zeigten, (i) dass Cathepsin B eine Rolle in der Aktivierungskaskade der Caspase-1 in Folge einer Zellstimulation mit Nigericin etc. (Hentze et al. 2003) spielen kann, und (ii) dass

Pneumolysin als Aktivator der Caspase-1 *in vitro* fungieren kann (McNeela et al. 2010).

Um zu überprüfen, ob diese *in vitro*-Befunde auch im *in vivo*-Modell Gültigkeit haben, wurden in dieser Versuchsreihe WT-Mäuse mit dem Cathepsin B-Inhibitor Ca-074-Me, der in 5%iges Dimethylsulfoxid (DMSO) enthaltenem PBS aufgelöst wurde (5 mg/kg Maus, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt die Trägersubstanz DMSO-PBS. Beide Substanzen wurden jeweils kurz vor und 6 h nach der Infektion intraperitoneal verabreicht (jeweils n=7). Um die Funktion von Pneumolysin im Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis zu erfassen, wurden WT-Mäuse zum einen mit dem Pneumolysin-defizienten Pneumokokkenstamm D39ΔPly (n=6), zum anderen mit dem Wildtypstamm D 39 (n=10) infiziert.

Es ist bekannt, dass neutrophile Granulozyten die vorherrschende Zellpopulation innerhalb der meningealen Infiltrate sind (Koedel et al. 2009a) und IL-1 β Caspase-1 abhängig und unabhängig produzieren können (Guma et al. 2009). Um Einblick in deren Bedeutung bei der Meningitis-induzierten IL-1 β -Produktion zu bekommen, wurden schließlich noch Granulozytendepletionsexperimente durchgeführt. Dabei wurden die Mäuse 24 Stunden vor der Infektion mit dem monoklonalen anti-GR1-Antikörper RB6-8C5 bzw. mit Isotyp-Kontrollantikörper behandelt (250 μ g/Maus; jeweils 6 Mäuse pro Gruppe). Der Erfolg der Depletionsstrategie wurde anhand von Differentialblutbildern überprüft (52 \pm 14 Granulozyten/ μ l Blut bei den anti-GR1-behandelten Mäusen versus 2196 \pm 501 Granulozyten/ μ l Blut bei den mit Kontrollantikörpern behandelten Mäusen).

3.3 Die Herstellung von Hirnschnitten

Die Gefrierschnitte wurden an einem Kryostat (CM-1950, Leica Instruments GmbH,

Nussloch, Deutschland) bei einer Objekttemperatur von -20°C angefertigt. Zunächst wurde das Hirn (dessen kaudaler Teil) mit Hilfe einer Pinzette und Einbettmedium auf einen Gewebeträger befestigt und dieser dann auf dem Schneidetisch montiert. Dabei wurden die Hirne mit der Hemisphärenseite nach unten positioniert, um beim Schneideprozess die Meningen in diesem krankheitsrelevanten Bereich möglichst wenig zu traumatisieren. Nach einem vorgefertigten Schneideprotokoll (siehe auch 3.4) wurden nun Gewebeschnitte, die den Hippocampus sowie Teile des inneren Liquorraums beinhalteten und eine Dicke von 10 µm aufwiesen, angefertigt und für geplante immunhistochemische Untersuchungen auf Objektträgern aufgebracht. Ferner wurden Gewebeschnitte von 30 µm Dicke einzeln in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesammelt und für spätere ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)-Untersuchungen verwendet. Diese dienten unter anderem zum Nachweis von Albumin und IL-1 β und erlaubten somit Rückschlüsse auf die Funktion der Bluthirnschranke bzw. das Ausmaß der Entzündungsreaktion.

3.4 Die Auswertung zerebraler Blutungen

Während des Schneidevorgangs wurde das Gehirn im Bereich der inneren Liquorräume, beginnend mit dem Erscheinen der Vorderhörner der Seitenventrikel, in einem Abstand von 300 µm insgesamt 10 mal mit einer Digitalkamera fotografiert. Anhand dieser Fotos konnten das Volumen der Liquorräume gemessen sowie die Fläche und Anzahl eventuell vorhandener intrazerebraler Einblutungen bestimmt werden. Die Auswertung der digitalisierten Bilder erfolgte mit dem Programm ImageTool (University of Texas Health Science Center at San Antonio, USA).

3.5 Die Bestimmung der Bluthirnschrankenpermeabilität

Unter physiologischen Bedingungen kann das Serumprotein Albumin mit seiner Molekülmasse von 66 kDa die Bluthirnschranke nicht überwinden (Eberhardt et al.

2008; Abbott et al. 2010). Eine Erhöhung des Albumingehalts im Hirngewebe deutet also auf eine Störung der Integrität der Bluthirnschranke hin. Um eine Aussage zur Integrität der Bluthirnschranke machen zu können, wurde daher von uns der Albumingehalt im Maushirnhomogenat mit Hilfe eines ELISAs gemessen. Dieser ELISA wurde vor einigen Jahren in unserer Arbeitsgruppe entwickelt und fand schon in einigen Forschungsprojekten Anwendung (Koedel et al. 2009a; Woehrl et al. 2011). Im ersten Schritt wurden Maxisorbplatten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit einem polyklonalen Mausalbumin-spezifischen Antikörper aus dem Kaninchen (Acris, Bad Nauheim, Deutschland) beschichtet. Dazu wurde der Antikörper mit einem Beschichtungspuffer (0,05 M Natriumcarbonat, pH 9,6) auf eine Konzentration von 0,5 µg/ml verdünnt, die Vertiefungen der Platten mit 100 µl dieser Lösung befüllt und für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten mit einer Waschlösung, bestehend aus 50 mM Tris, 0,14 M NaCl und 0,05 % Tween 20, pH 8,0, dreimal gewaschen, um überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper aus der Platte zu entfernen. Anschließend wurden die Vertiefungen für 30 Minuten mit Blockungspuffer aus 50 mM Tris, 0,14 M NaCl und 1% BSA (bovines Serumalbumin) inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Messproben aus den verschiedenen Mäusehirnen in die Plattenvertiefungen eingebracht. Für die Herstellung dieser Proben wurde jeweils ein 30 µm dicker Gefrierschnitt mit Lysepuffer (10 mM Hepes, pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ und einer Proteaseinhibitorenmischung aus Phenylmethylsulfonylfluorid, Aprotinin, Leuptyn und Pepstatin A) für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in einem Ultraschallbad homogeniert und bei 1900 rpm für 10 Minuten bei 5°C zentrifugiert. In den Überständen wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Nanoquant-Assay (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) die Gesamtproteinkonzentration bestimmt - entsprechend der Anleitung des Herstellers.

Darauf wurden diese Proben mit einem Proteingehalt von 0,5 µg in die jeweiligen Vertiefungen der ELISA-Platten überführt. Daran schloss sich eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur an. Nach dreimaligen Waschen mit Waschlösung wurde das Antikörper-gebundene Albumin mit Hilfe eines zweiten enzymkonjugierten Antikörpers, eines polyklonalen, peroxidasekonjugierten Anti-Mausalbumin-Antikörpers aus der Ziege (Bethyl, Montgomery, USA), detektiert. Dabei wurde dieser zweite Antikörper mit „Cross Down“- Puffer (pH 7,2, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) auf eine Konzentration von 0,1 µg/ml verdünnt, 100 µl dieser Lösung in die Vertiefungen eingebracht, und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem letzten Waschvorgang wurde farberzeugendes Enzymsubstratreagenz (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) für die Dauer von 15 Minuten in die Vertiefungen gegeben. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase setzte nun das Substrat in Form einer sichtbaren blauen Farbreaktion um. Diese kolorimetrische Reaktion wurde nach Ablauf der Inkubationszeit durch Zusatz von Schwefelsäure (0,5 N) abgestoppt und die Lichtabsorption der Proben bei 450 nm (Referenzfilter: 620 nm) mit einem elektronischen Plattenlesegerät (Berthold Tristar LB941) gemessen und so quantifiziert.

3.6 Die Erfassung der neuropathologischen Veränderungen

Um die neuropathologischen Veränderungen der einzelnen Versuchsgruppen besser miteinander vergleichen zu können, wurden das Ausmaß der Bluthirnschrankenschädigung, ermittelt durch den Albumingehalt im Hirngewebe, und die Anzahl der zerebralen Blutungen in einem neuropathologischen Score (genannt Neuroscore) zusammengefasst. Für den Grad der Bluthirnschrankenschädigung wurden die Punkte folgendermaßen zugeteilt: 0,1 und 2 Punkte wurden vergeben, wenn die Albuminkonzentration im Gehirn jeweils < 30, zwischen 31 und 90, sowie

oberhalb von > 90 ng/µg Hirnprotein lag. Das Ausmaß der zerebralen Blutungen wurde folgendermaßen gewertet: 0, 1 und 2 Punkte kennzeichneten jeweils 0-1, 2-12 und mehr als 12 zerebrale Einblutungen pro Versuchstier (Hirnprobe).

3.7 Die Messung der IL-1β-Konzentration im Hirnhomogenat

Die Konzentrationen von IL-1β im Mäusehirn wurden mit Hilfe eines kommerziellen ELISAs (R&D Systems), den Angaben des Herstellers folgend, ermittelt.

3.8 Statistik

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm SYSTAT in der Version 9.0 (SPSS, USA) verwendet. Der zentrale statistische Test war, wenn nicht anders vermerkt, der ungepaarte Student's *t*-Test, im Falle von Mehrgruppen-Vergleiche kombiniert mit einer Bonferroni-Holm-Prozedur. Diese statistische Vorgehensweise wurde entsprechend der Empfehlungen von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mansmann vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) München gewählt. Die erhobenen Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben, eventuelle Unterschiede wurden im Falle von * $p < 0,05$ als signifikant gewertet.

3.9 Tierversuchsgenehmigung

Diese Studie wurde in strikter Übereinstimmung mit den Empfehlungen des Guide for the Care and Use of Laboratory Animals des Institute of Laboratory Animal Resources (National Research Council, USA) und dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

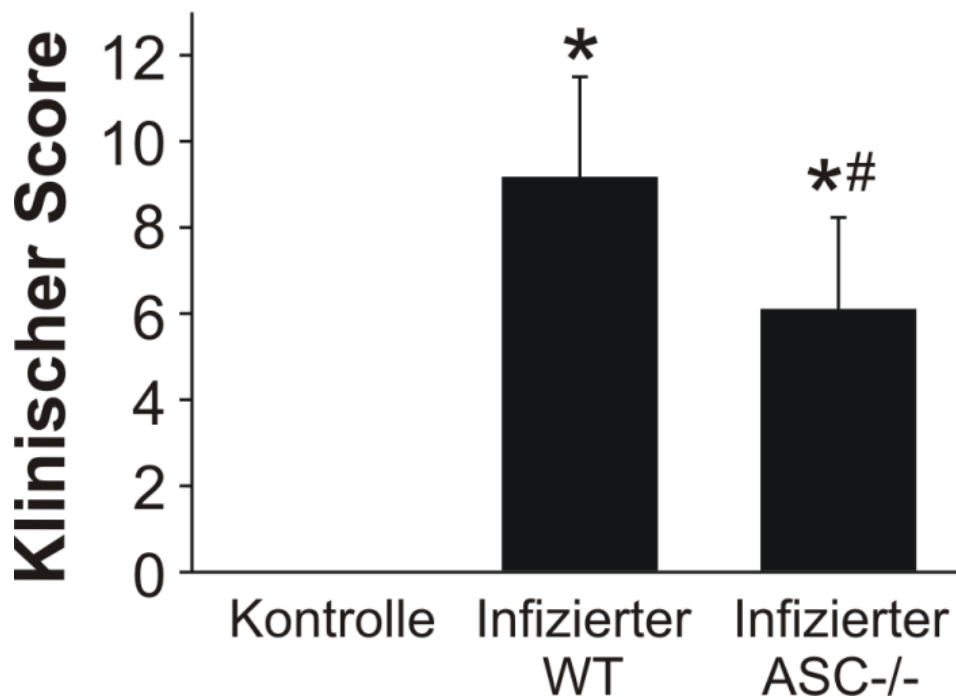
4. Ergebnisse

4.1 Die Folgen der ASC-Gendefizienz für den klinischen Zustand

In früheren Untersuchungen hatte unsere Arbeitsgruppe eine zentrale Rolle der Caspase-1 in der Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis festgestellt (Koedel et al. 2002b). Die Aktivität der Caspase-1 wird innerhalb eines Multiproteinkomplexes, des sogenannten Inflammasoms, reguliert. Zentrale Komponenten dieses Multiproteinkomplexes sind einerseits Mitglieder der Mustererkennungsrezeptor-Familie der zytosolischen NOD-like-Rezeptoren (wie NLRP3), andererseits das Adaptermolekül ASC, das für die Rekrutierung der pro-Caspase-1 in den Multiproteinkomplex sorgt. Um die Relevanz des NLRP3-Inflamasoms bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis zu überprüfen, infizierten wir in einer initialen Versuchsserie WT- und ASC-defiziente Mäuse mit einer hohen Dosis von *S. pneumoniae* (2×10^8 KbE/ml). Bei diesem Versuchsansatz starben über 70% der WT-Mäuse (8 von 11 Tieren) innerhalb von 24 h nach der Infektion, wohingegen die Todesrate der ASC-defizienten Mäuse lediglich 20% betrug (2 von 10 Tieren; $p = 0,019$). Im nächsten Versuchsansatz infizierten wir beide Mäusestämme mit einer geringeren Dosis von *S.pneumoniae* (2×10^7 KbE/ml). Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 24 Stunden nach der Infektion entwickelten alle WT-Mäuse ($n=12$) klinische Zeichen einer Infektion, was sich in einem erhöhten klinischen Score (**Abb. 3**), Gewichtsverlust und einer Hypothermie niederschlug. Die Letalität betrug lediglich 17% (nur 2 von 12 Tieren verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraums). Im Vergleich zu WT-Mäusen entwickelten ASC-/- Mäuse ($n=10$) ein milderes Krankheitsbild. Das spiegelte sich in signifikant niedrigeren klinischen Scorewerten und einem weniger stark ausgeprägten Gewichts- und Temperaturverlust wider (**Tab. 1**). Die Sterblichkeitsrate der infizierten ASC-/- Mäuse

lag bei 10% (1 von 10 Tieren).

Abbildung 3: Effekt der ASC-Defizienz auf den klinischen Verlauf der Pneumokokkenmeningitis in der Maus



Anmerkungen:

ASC-defiziente Tiere zeigten signifikant niedrigere klinische Scorewerte als Wildtyptieren, was als Zeichen eines mildereren Krankheitsverlaufs zu werten ist. WT=Wildtyp (n=12); ASC-/- = ASC-defiziente Mäuse (n=10). *p < 0,05, im Vergleich zu nicht-infizierten Wildtypkontrolltieren (n=8), #p < 0,05, im Vergleich zu infizierten Wildtyptieren. Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Tabelle 1: Auswirkungen der ASC-Defizienz auf den Meningitis-assoziierten Gewichts- und Temperaturverlust

Versuchsgruppe (n)	Gewichtsverlust		Temperatur
	[g]	[%]	[°C]
WT (12)	-3,78 ± 0,38	-14,07 ± 1,92	34,82 ± 0,7
ASC-/- (10)	-3,03 ± 0,44*	-11,6 ± 1,96*	35,78 ± 0,33*

WT = Wildtyp; ASC-/- = ASC-Defizienz. *p<0,05, im Vergleich zu infizierten Wildtyp-tieren. Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben

Zusammenfassend kann man sagen, dass die ASC-Defizienz mit einer höheren Überlebensrate und einem günstigeren klinischen (Akut-)Verlauf einherging. Da die Infektion mit 2×10^8 KbE/ml Pneumokokken mit einer sehr hohen Sterblichkeitsrate einherging, die Sterblichkeitsrate aber keine definierte Zielgröße in diesem Versuchsvorhaben war, wurde bei allen weiteren Versuchsreihen ausschließlich die geringere Infektionsdosis von 2×10^7 KbE/ml Bakterien verwendet.

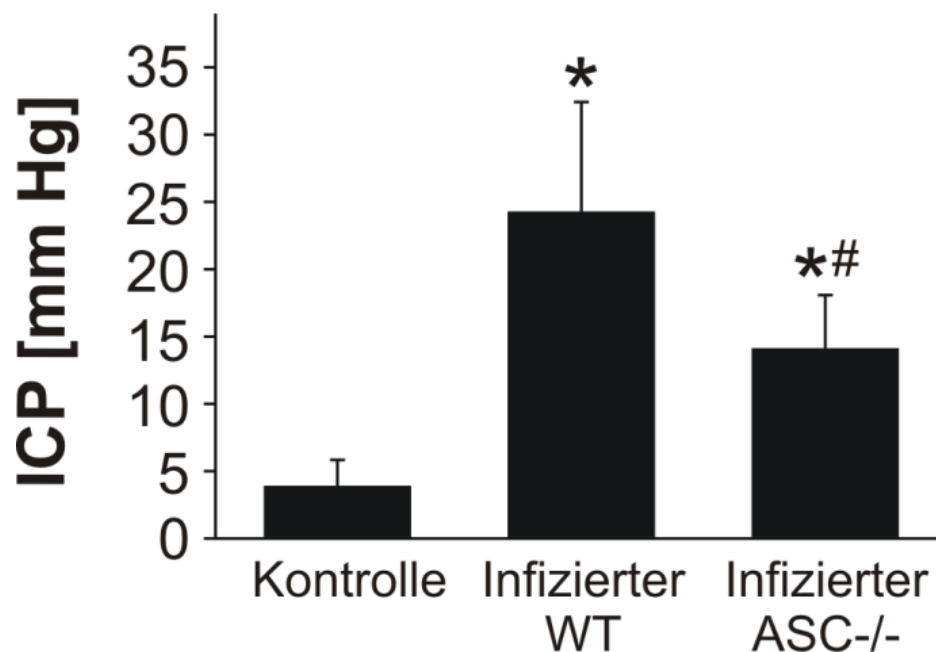
4.2 Die Auswirkung der ASC-Gendefizienz auf die Entwicklung intrakranieller Komplikationen

Da intrakranielle Komplikationen die Hauptursache für einen schlechten klinischen Verlauf einer Meningitis darstellen (van de Beek et al. 2004), untersuchten wir des Weiteren den Einfluss der ASC-Defizienz auf die Meningitis-assoziierte Hirnpathologie. Meningitis-typische pathologische Veränderungen sind: [i] ein vasogenes Hirnödem, das auf einer Beschädigung der Bluthirnschranke beruht und

zu einer Erhöhung des intrakraniellen Drucks führen kann, und [ii] eine Vaskulitis, die sich in zerebralen Blutungen äußern kann.

Die intrathekale Infektion mit *S. pneumoniae* führte zu einer signifikanten Erhöhung des intrakraniellen Drucks bei WT-Mäusen. Die ICP-Werte waren 24 h nach der Infektion mit Pneumokokken bei ASC-defizienten Mäusen signifikant niedriger als bei infizierten WT-Mäusen (**Abb. 4**).

Abbildung 4: Auswirkung der ASC-Defizienz auf den Meningitis-assoziierten Anstieg des intrakraniellen Drucks

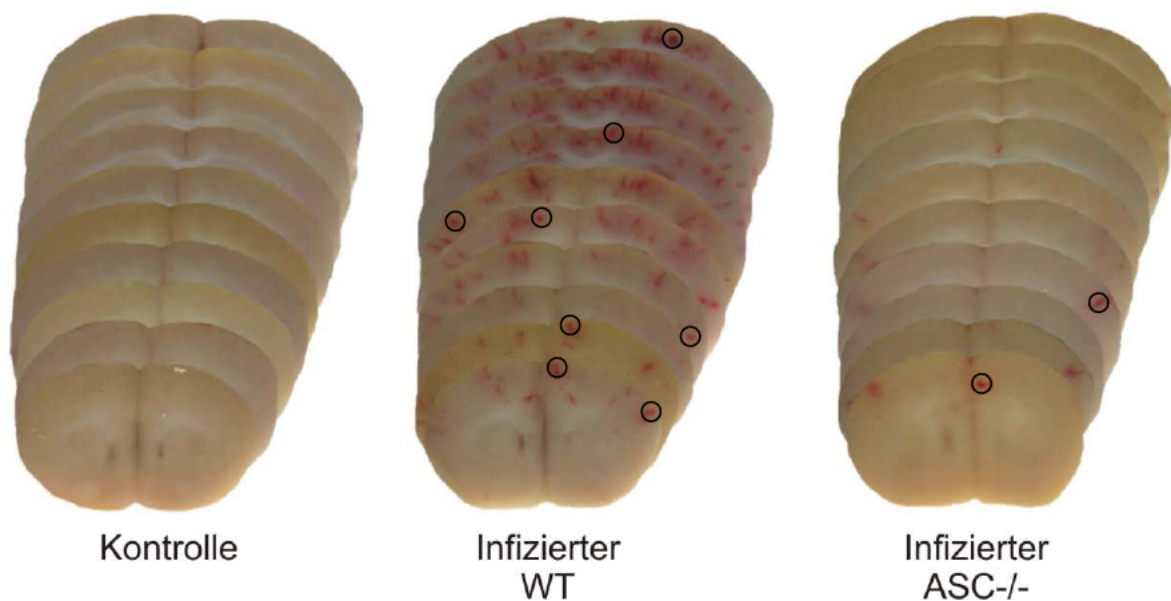


Anmerkungen:

Die Infektion mit Pneumokokken verursachte einen Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP). Die ICP-Werte der ASC-defizienten Tiere waren signifikant niedriger als die der Wildtypiere. WT=Wildtyp (n=12); ASC-/- = ASC-defiziente Mäuse (n=10). *p < 0,05, im Vergleich zu nicht-infizierten Wildtypkontrolltieren (n=8), #p < 0,05, im Vergleich zu infizierten Wildtypieren. Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

Ebenso waren die Bluthirnschrankenstörung und das Ausmaß intrazerebraler Blutungen bei infizierten ASC^{-/-} Mäusen geringer ausgeprägt als bei infizierten WT-Tieren. Dies spiegelte sich in einem signifikanten Unterschied im neuropathologischen Score (Beschreibung siehe Punkt 3.6) zwischen beiden Versuchsgruppen wider (**Abb. 5, 6**).

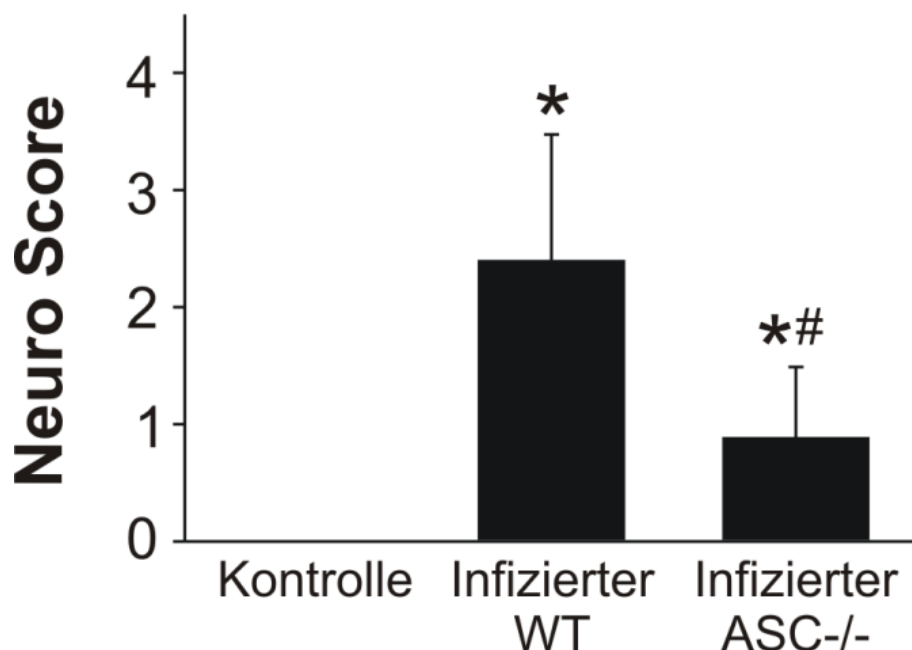
Abbildung 5: Effekt der ASC-Defizienz auf das Ausmaß intrazerebraler Einblutungen im Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis



Anmerkungen:

In den Hirnen infizierter ASC-defizienter Mäuse fanden sich weniger makroskopisch sichtbare Einblutungen als in denen von infizierten Wildtypmäusen. Die Abbildung zeigt repräsentative Beispiele der drei Versuchsgruppen: Kontrolle = nicht-infizierte Wildtypkontrolltiere (n=8); WT=Wildtyp (n=12); ASC^{-/-} = ASC-defiziente Mäuse (n=10). Die Kreise markieren einige der typischen intrazerebralen Einblutungen.

Abbildung 6: Auswirkung der ASC-Defizienz auf den neuropathologischen Score



Anmerkungen:

Die ASC-Defizienz ging mit einer signifikant milderen Hirnpathologie einher. WT=Wildtyp (n=12); ASC-/- = ASC-defiziente Mäuse (n=10). *p < 0,05, im Vergleich zu nicht-infizierten Wildtypkontrolltieren (n=8), #p < 0,05, im Vergleich zu infizierten Wildtyptieren. Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

Kurz zusammengefasst ging die genetische Depletion von ASC mit einer geringeren Hirnpathologie bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis einher.

4.3 Die Konsequenz der ASC-Gendefizienz für die Entzündungsreaktion

Die intrakraniellen Komplikationen der Meningitis werden vornehmlich durch eine pathologisch gesteigerte entzündliche Immunreaktion (Hyperinflammation)

hervorgerufen (Koedel et al. 2002a; Mook-Kanamori et al. 2011). Neutrophile

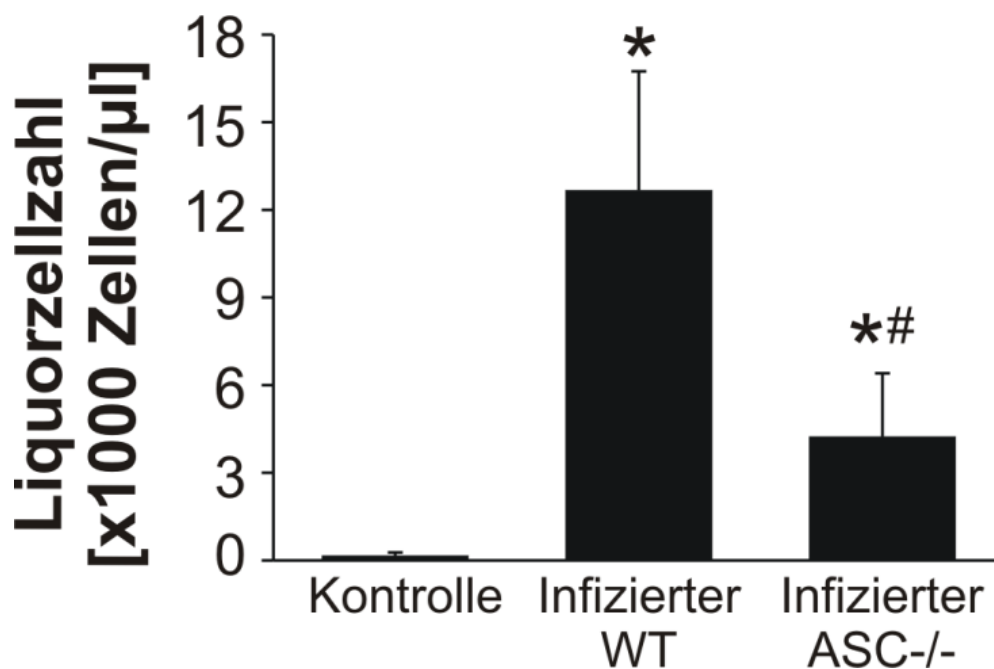
Granulozyten gelten dabei als Hauptverursacher der Meningitis-assoziierten

entzündlichen ZNS-Schädigung (Hoffmann et al. 2007; Koedel et al. 2009a; Woehrl

et al. 2011). Bei den ASC-defizienten Mäusen war die Reduktion der Hirnpathologie

mit einer verminderten Akkumulation von Leukozyten im Liquor vergesellschaftet (**Abb. 7**). Das Wachstum der Pneumokokken im Gehirn und im Blut war jedoch bei ASC-defizienten und Wildtypmäusen vergleichbar (**Abb. 8**).

Abbildung 7: Effekt der ASC-Defizienz auf die Liquorpleozytose

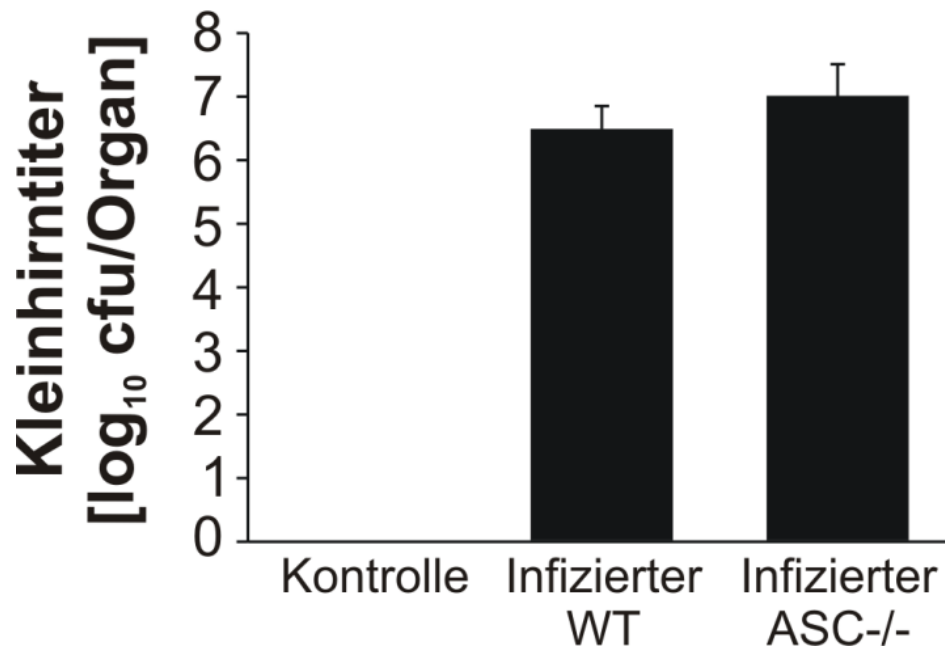


Anmerkungen:

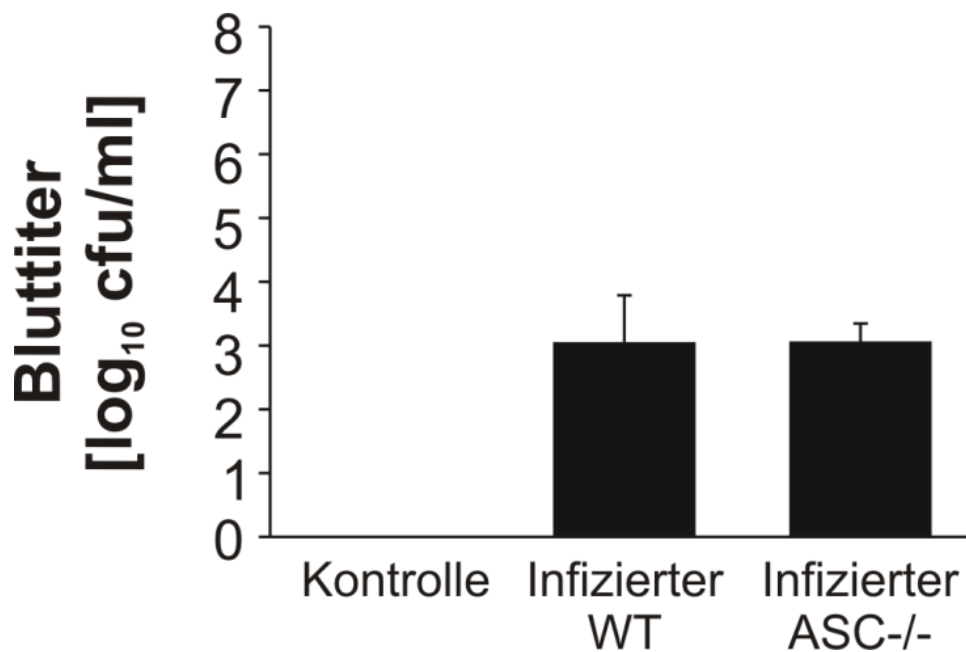
ASC-defiziente Mäuse wiesen signifikant geringere Leukozytenzahlen im Liquor auf als infizierte Wildtypmäuse. WT=Wildtyp (n=12); ASC-/- = ASC-defiziente Mäuse (n=10). *p < 0,05, im Vergleich zu nicht-infizierten Wildtypkontrolltieren (n=8), #p < 0,05, im Vergleich zu infizierten Wildtyptieren. Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Abbildung 8: Effekt der ASC-Defizienz auf das bakterielle Wachstum in Hirn (A) und Blut (B)

A



B



Anmerkungen:

Die ASC-Defizienz hatte keinerlei Auswirkung auf das Bakterienwachstum im Hirn (A) und Blut (B). Kontrolle = nicht-infizierte Wildtypiere (n=8); WT=Wildtyp (n=12); ASC-/- = ASC-defiziente Mäuse (n=10). Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Zusammengefasst hat das Adapterprotein ASC eine zentrale Rolle innerhalb der Entzündungsreaktion der Pneumokokkenmeningitis inne.

4.4 Die Bedeutung des NLRs NLRP3 und des Adaptermoleküls RIP2, zweier potentieller ASC-Interaktionspartner, bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

Zellkulturelle Untersuchungen hatten gezeigt, dass [i] die Caspase-1-Aktivierung durch bakterielle Muramyl-dipeptide (essentielle bakterielle Zellwandbestandteile) deren Interaktion mit den beiden NOD-like-Rezeptoren NOD2 und NLRP3 erfordert (Pan et al. 2007; Hoegen et al. 2011), [ii] NOD2-RIP2-abhängige Signalwege zur Zellaktivierung in Folge einer Pneumokokkenexposition beitragen (Liu et al. 2010), [iii] Pneumolysin NLRP3-abhängig eine Aktivierung der Caspase-1 induzieren kann (Hoegen et al. 2011) und [iv] NOD2-RIP2-abhängige Signale die Aktivität des NLRP3-Inflammasoms negativ regulieren können (Lupfer et al. 2013). Um Aufschluss über die Rolle dieser Signalwege bei der Inflammasomaktivierung zu bekommen, untersuchten wir Mäuse, denen entweder das NLRP3- oder das RIP2-Protein fehlte (jeweils n=10 pro Gruppe). Vergleichbar mit den ASC^{-/-}-Mäusen zeigten infizierte NLRP3^{-/-} Tiere einen signifikant milderen klinischen Verlauf. Dies ging mit einer signifikanten Abnahme der neuropathologischen Veränderungen einher. Die geringere Hirnpathologie war wiederum mit einer Reduktion der Pleozytose im Liquor vergesellschaftet (**Abb. 9**). Wie bei den ASC-defizienten Mäusen betrug die Letalität auch hier 10%. Im Gegensatz zur NLRP3-Defizienz hatte die genetische Depletion von RIP2 keinen Effekt auf den klinischen Verlauf, die Meningitis-assoziierte Hirnpathologie und die Leukozyteninfiltration in den Liquorraum. Die Sterberate lag im Bereich der Wildtypmäuse, nämlich bei 20%. Keine der beiden genetischen Defizienzen, weder die von RIP2 noch die von NLRP3, gingen mit Änderungen im Pneumokokkenwachstum einher (**Tab. 2**).

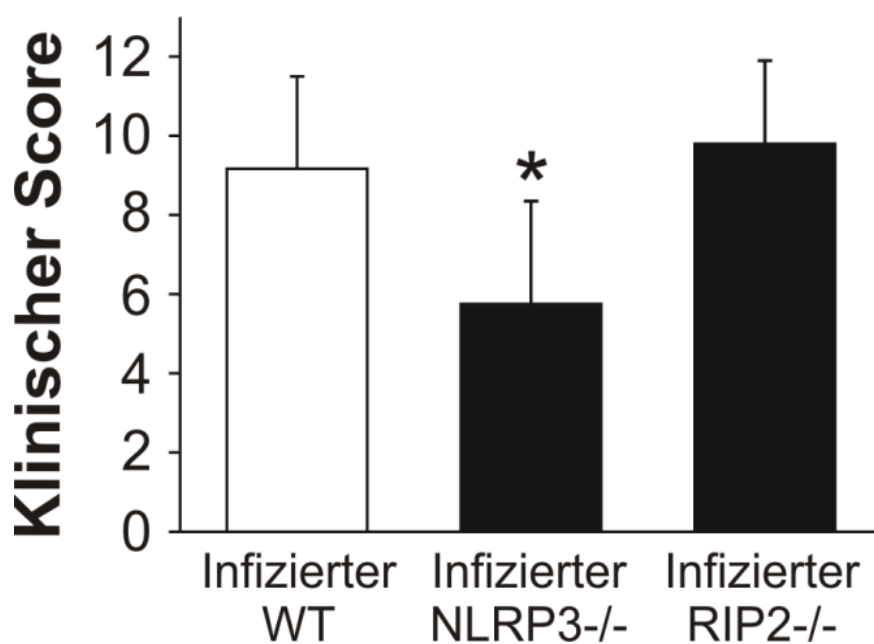
Tabelle 2: Pneumokokkenwachstum bei RIP2^{-/-} und NLRP3^{-/-}-Mäusen im Gehirn und Blut im Vergleich zu WT-Tieren

Versuchsgruppe (n)	Gehirn [log ₁₀ cfu/Organ]	Blut [log ₁₀ cfu/ml]
RIP2 ^{-/-} (10)	6,75 ± 0,64	2,72 ± 1,35
NLRP3 ^{-/-} (10)	6,67 ± 0,71	3,17 ± 1,24
WT (12)	6,49 ± 0,37	3,05 ± 0,74

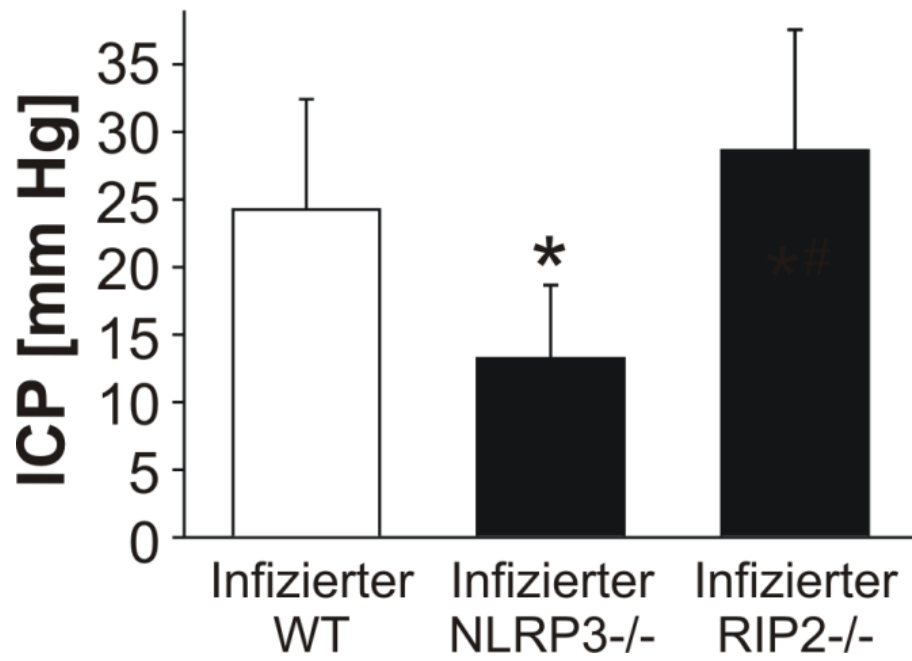
RIP2^{-/-} = RIP2-defiziente Mäuse; NLRP3^{-/-} = NLRP3-defiziente Mäuse; WT = Wildtyp (gleiche Gruppe wie oben). Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

Abbildung 9: Bedeutung von NLRP3 und RIP2 in der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

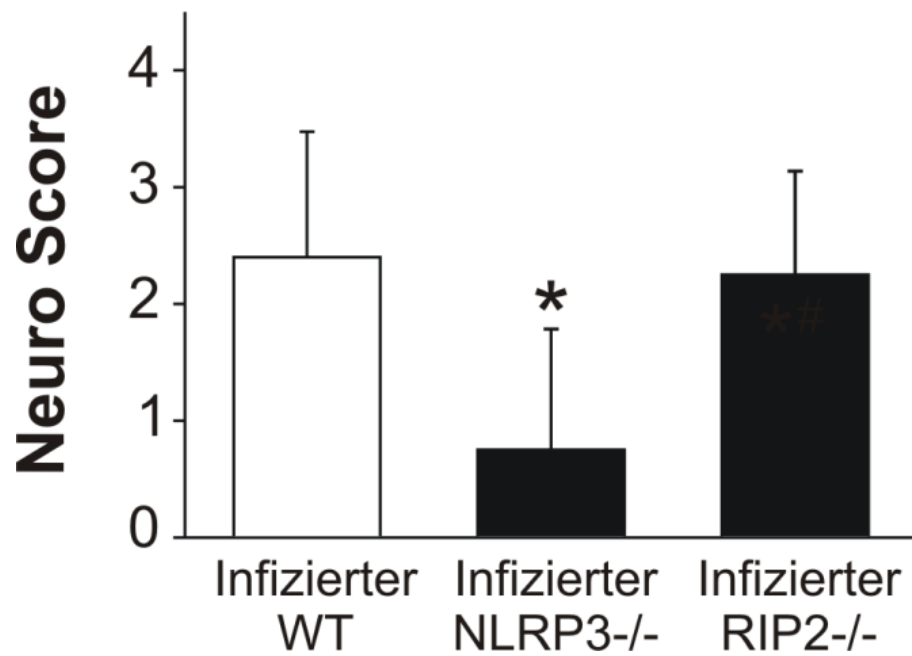
A



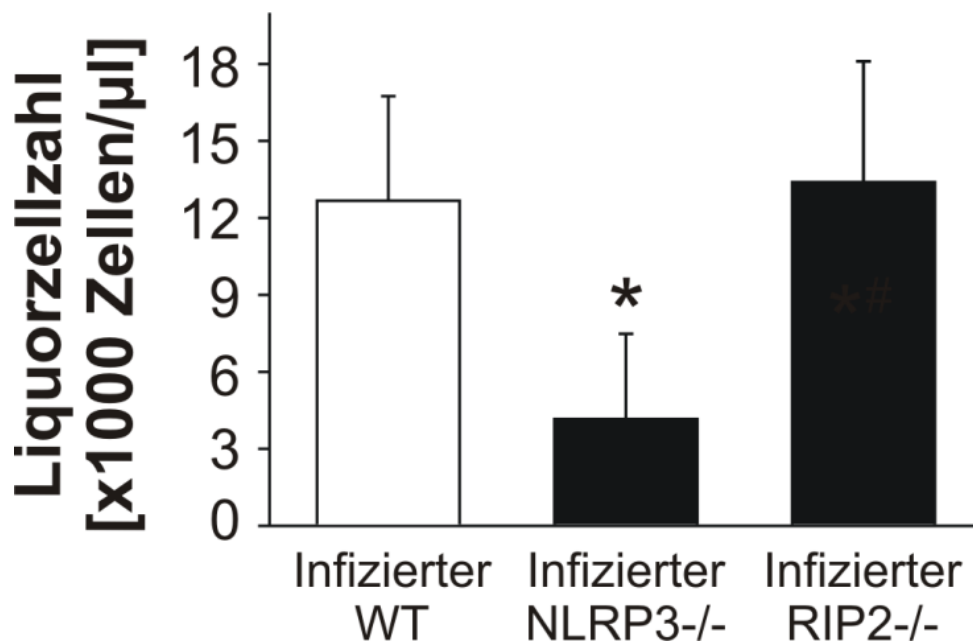
B



C



D



Anmerkungen:

(A) 24 h nach der Infektion wiesen NLRP3-, nicht aber RIP2-defiziente Mäuse einen signifikant besseren klinischen Status als die Wildtypiere auf. (B) Der mildere klinische Verlauf der NLRP3-defizienten Mäuse ging mit einem signifikant geringeren ICP-Anstieg einher. (C) Ebenso fanden sich bei den NLRP3-, nicht aber den RIP2-defizienten Mäusen signifikant geringere Neuroscorewerte. (D) Die Zahl der Entzündungszellen im Liquor wurde nur durch die NLRP3-Defizienz signifikant reduziert, im Vergleich mit Wildtypmäusen. ICP = intrakranieller Druck; WT=Wildtyp (n=12); NLRP3-/- = NLRP3-defiziente Mäuse (n=10); RIP2-/- = RIP2-defiziente Mäuse (n=10). *p <0,05, im Vergleich mit Wildtyptieren (n=12, gleiche Gruppe wie oben). Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

Kurz zusammenfassend lässt sich sagen, dass der NLRP3-Signalweg eine essentielle Bedeutung innerhalb der Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis besitzt.

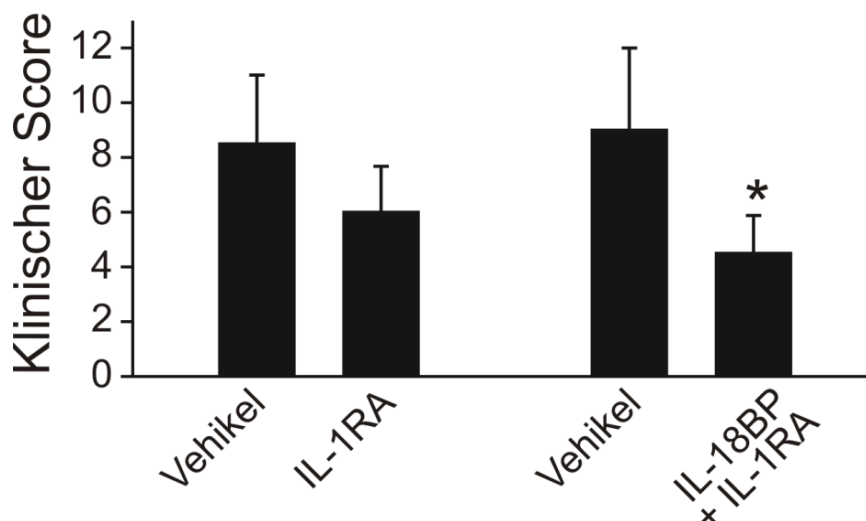
4.5 Die Auswirkungen einer Inhibition von Zytokinen der IL-1-Familie auf die experimentelle Pneumokokkenmeningitis

Aktive Caspase-1 wandelt biologisch inaktive Proformen von Zytokinen der IL-1-Familie, wie IL-1 β und IL-18, in aktive Moleküle um (Martinon et al. 2002; Martinon und Tschopp 2007; Lamkanfi und Dixit 2012). Um die Rolle dieser Zytokine für die Pneumokokkenmeningitis zu bestimmen, behandelten wir WT-Mäuse entweder mit dem IL-1R-Antagonisten Anakinra oder einer Kombination aus Anakinra und

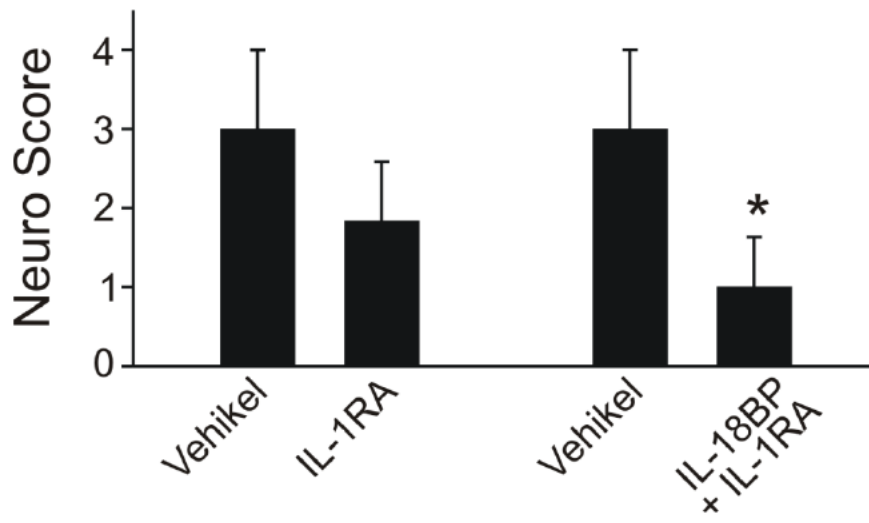
rekombinantem IL-18-Bindungsprotein, einem IL-18-Antagonisten. Die behandelten Tiere (jeweils n=6) wurden mit Kontrolltieren verglichen, denen das Vehikel PBS in einer Dosierung von 0,5 ml beziehungsweise 1 ml intraperitoneal injiziert worden war (jeweils n=6). Die IL-1R-Blockade bewirkte eine signifikante Reduktion des Meningitis-induzierten Anstiegs des ICPs und der Liquorleukozytenzahl. Es wurde jedoch keine signifikante Verbesserung des klinischen und des neuropathologischen Scores beobachtet (**Abb. 10**). Durch die zusätzliche Gabe von rIL-18BP konnte die Meningitis-assoziierte Liquorpleozytose weiter verringert werden (um 65%, im Vergleich zu 48% bei der Monotherapie mit Anakinra). Der stärker ausgeprägte antiinflammatorische Effekt wurde überdies als Ausdruck einer klinischen Verbesserung von signifikant geringeren klinischen und neuropathologischen Scorewerten begleitet. Keine der beiden Behandlungsstrategien beeinflusste das bakterielle Wachstum im Zentralnervensystem. Im Beobachtungszeitraum verstarb keine der behandelten Mäuse, während eine Maus in jeder Placebo(Vehikel)-Gruppe euthanasiert werden musste.

Abbildung 10: Effekte der IL-1 β - und IL-18-Inhibition bei der Pneumokokkenmeningitis

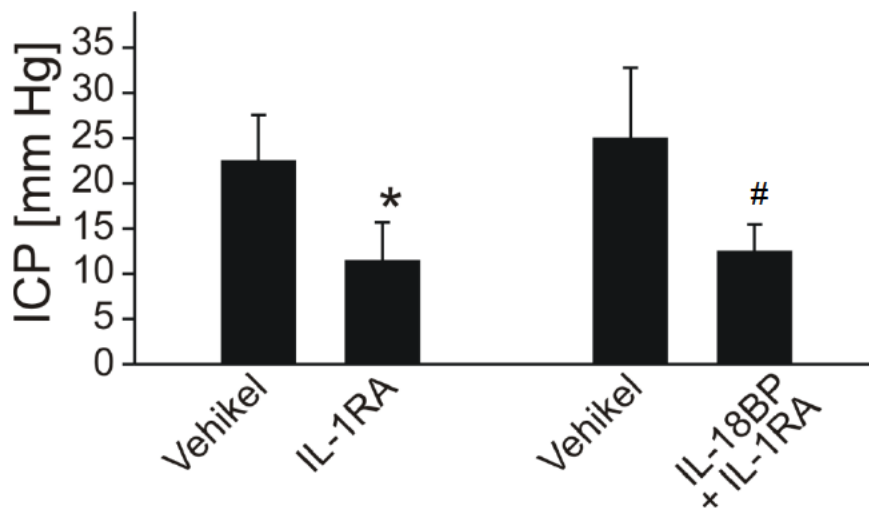
A



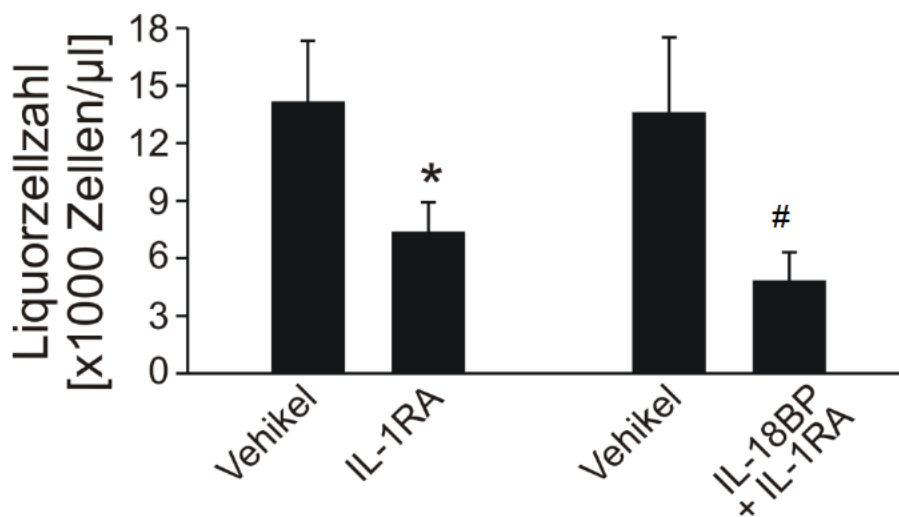
B



C



D



Anmerkungen:

(A) Im Gegensatz zur Kombinationstherapie führte die alleinige Behandlung mit Anakinra nur zu einer tendenziellen, nicht aber zu einer signifikanten Verbesserung des klinischen Status. (B) Die Neuroscorewerte waren nur bei Tieren, die kombiniert mit Anakinra und IL-18BP behandelt wurden, signifikant verringert. (C) Sowohl die Mono- als auch die Kombinationstherapie aus Anakinra und IL-18BP bewirkten einen signifikant verringerten ICP-Anstieg. (D) Mono- und Kombinationstherapie bewirkten eine signifikante Reduktion der Entzündungsreaktion. IL-1RA = Anakinra (n=6), *p<0,05 im Vergleich mit Vehikel = 0,5 ml PBS (phosphatgepufferte Salzlösung), (n=5); IL-18BP (IL-18 Bindungsprotein) + IL-1RA (Anakinra), (n=6), #p<0,05 im Vergleich mit Vehikel = 1 ml PBS, (n=5). Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass beide Entzündungsmediatoren, IL-1 β und IL-18, eine wichtige Rolle in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis einnehmen.

4.6 Die Bedeutung von Cathepsin B bei der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms *in vivo*

Durch Zellkulturversuche an ausdifferenzierten, humanen THP-1-Makrophagen gelang es unserer Arbeitsgruppe, erste Einblicke in den Aktivierungsmechanismus des NLRP3-Inflammasoms zu erlangen: bei der Aktivierung der Caspase-1 in Folge einer Exposition mit lebenden Pneumokokken kam der lysosomalen Protease Cathepsin B eine Schlüsselfunktion zu (Hoegen et al. 2011). Um die Bedeutung dieses Mechanismus in der *in vivo*-Situation zu überprüfen, führten wir im Mausmodell Behandlungsversuche mit dem Cathepsin B-Hemmstoff Ca-074-Me (n=7; intraperitoneal in einer Dosis von 5 mg/kg verabreicht) durch; Kontrolltiere (n=7) wurden mit einer DMSO-PBS-Lösung, dem Lösungsmittel von Ca-074-Me, behandelt. Die Behandlung mit Ca-074-Me resultierte in einer Milderung des klinischen Krankheitsbildes, einer Reduktion des ICPs, sowie der Liquorpleozytose, (**Abb. 11A-C**) ohne dabei die Hirn- und Blutbakterientiter sowie die Letalität (sowohl in der Behandlungs- als auch in der Placebogruppe = 0%) zu beeinflussen.

4.7 Die Rolle des Pneumokokkentoxins Pneumolysin im NLRP3-Signalweg

Unsere Zellkulturexperimente deuteten auch auf eine essentielle Beteiligung des bakteriellen Virulenzfaktors Pneumolysin bei der Caspase-1-Aktivierung in der Folge einer Pneumokokkeninfektion hin (Hoegen et al. 2011). Um Aufschluss über die Rolle von PLY im Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis zu erhalten, infizierten wir Mäuse entweder mit einem Pneumolysin-defizienten Pneumokokkenstamm (D39 Δ Ply; n=6) oder seinem isogenen Wildtypstamm (D39; n=9). Die Infektion mit der PLY-defizienten Mutante war mit einem mildereren Krankheitsverlauf vergesellschaftet, was sich in niedrigeren klinischen Score-Werten (**Abb. 11A**) sowie weniger stark ausgeprägten Gewichts- und Temperaturverlusten widerspiegelte (**Tab.3**). Zudem überlebten alle Mäuse, die mit der Mutante infiziert worden waren, das Beobachtungsintervall von 24 Stunden. Die Verbesserung des klinischen Zustands ging mit einer Reduktion der intrakraniellen Komplikationen einher; so wiesen die mit dem mutanten Bakterienstamm infizierten Mäuse niedrigere ICP-Werte als die mit dem Wildtypstamm infizierten Mäuse auf (**Abb. 11B**). Zudem war die Infektion mit dem Pneumolysin-defizienten Stamm mit einer Reduktion der Liquorpleozytose (um ca. 50%) (**Abb. 11C**) und der Bakterientiter im Blut (nicht aber im Gehirn) verbunden ($2,02 \pm 0,51$ versus $3,05 \pm 0,74$ log₁₀ KbE/ml bei mit dem Mutantenstamm bzw. Wildtypstamm infizierten Tieren; $p = 0,007$).

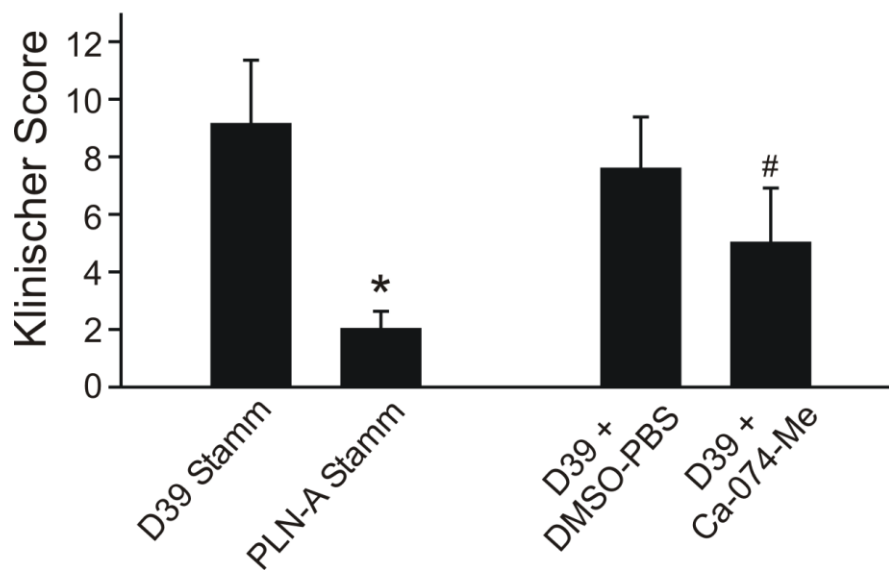
Tabelle 3: Auswirkungen einer Infektion mit einem Pneumolysin-defizienten Stamm auf selektive klinische Parameter

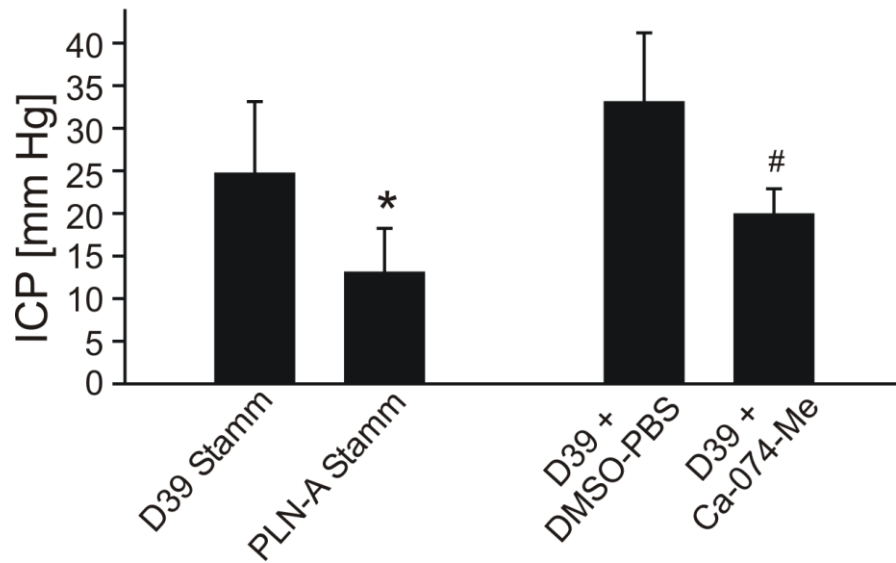
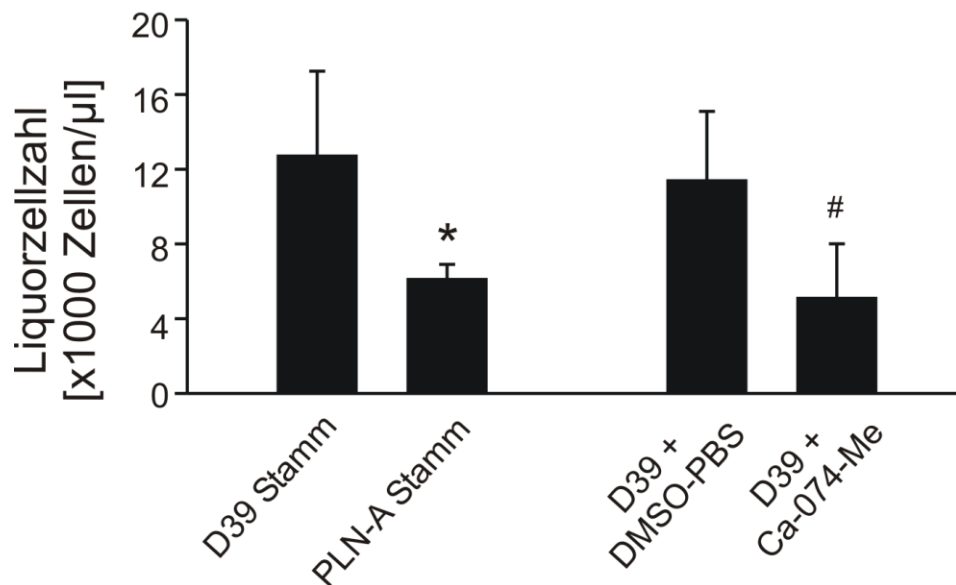
Versuchsgruppe (n)	Gewichtsverlust		Temperatur
	[g]	[%]	[°C]
WT-D39 (12)	-3,78 ± 0,38	-14,07 ± 1,92	34,82 ± 0,7
WT-D39ΔPly (6)	-2,8 ± 0,54*	-11,19 ± 2,34*	36,2 ± 0,33*

WT-D39 = mit dem Wildtypbakterienstamm D39 infizierte Wildtyptiere; WT-D39ΔPly = mit dem PLY-defizienten Bakterienstamm infizierte Wildtyptiere. *p<0,05, im Vergleich zu mit D39 infizierten Wildtyptieren. Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

Abbildung 11: Auswirkung der Pneumolysindefizienz und der Cathepsin B-Inhibition auf den klinischen Zustand (A), den intrakraniellen Druck (B) und die Liquorzellzahl (C) der Tiere mit Pneumokokkenmeningitis

A



B**C**Anmerkungen:

(A) Die Infektion mit einem Pneumolysin-defizienten Pneumokokkenstamm (D39 Δ Ply) war mit einem milderen klinischen Verlauf verbunden als die Infektion mit D39. Ebenso führte die Behandlung mit Ca-075-Me zu signifikant niedrigeren klinischen Scorewerten. (B) Sowohl der Einsatz von D39 Δ Ply als auch der von Ca-074-Me führte zu einem verminderten ICP-Anstieg im Laufe der Pneumokokkenmeningitis. (C) Die Infektion mit D39 Δ Ply resultierte in einer verringerten Infiltration des Liquors durch Leukozyten im Laufe der Pneumokokkenmeningitis. Dies traf ebenfalls auf die Behandlung mit Ca-074-Me zu. D39 Δ Ply = Pneumolysin-defizienter Pneumokokkenstamm (n=6), *p < 0,05, im Vergleich zu D 39 = Wildtypnpneumokokkenstamm (n=9). Ca-074-Me = Cathepsin B-Inhibitor, #p < 0,05, im Vergleich zu DMSO-PBS = Vehikel (Dimethylsulfoxid und phosphatgepufferte Salzlösung) (n=7). Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Kurz zusammengefasst nehmen bei der Pneumokokkenmeningitis sowohl Cathepsin B als auch PLY eine wichtige Rolle in der Induktion der Entzündungsreaktion ein, vermutlich indem sie zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und der Caspase-1 beitragen.

4.8 Die Rolle von Cathepsin B und Pneumolysin bei der IL-1 β -Produktion

Um einen Einblick in die Rolle von Pneumolysin und Cathepsin B bei der Pneumokokken-induzierten IL-1 β -Produktion *in vivo* zu bekommen, haben wir zusätzlich die IL-1 β -Konzentrationen im Hirnhomogenat mittels ELISA gemessen. Dabei beobachteten wir eine starke Induktion der IL-1 β -Expression in Hirnen, die von mit dem Wildtypstamm infizierten Mäusen entnommen worden waren (97 ± 34 pg/mg Protein versus nicht nachweisbar in Hirnen von Kontrollmäusen, denen anstelle der Bakterien PBS injiziert worden war). Die IL-1 β -Konzentrationen waren in Hirnhomogenaten von Mäusen, die mit dem Pneumolysin-defizienten Pneumokokkenstamm infiziert worden waren, signifikant reduziert (33 ± 42 pg/mg Gehirnprotein; $p = 0,017$). Dies traf auch für die Hirnhomogenate von Mäusen zu, die mit dem Wildtyppneumokokkenstamm infiziert und parallel mit dem Cathepsin B-Inhibitor Ca-074-Me behandelt worden waren (44 ± 16 pg/mg Gehirnprotein; $p = 0,012$). Abschließend kann man sagen, dass die positiven Veränderungen der Cathepsin B-Hemmung und der PLY-Defizienz - zumindest teilweise - auf eine signifikante Hemmung der IL-1 β -Produktion zurückzuführen sind.

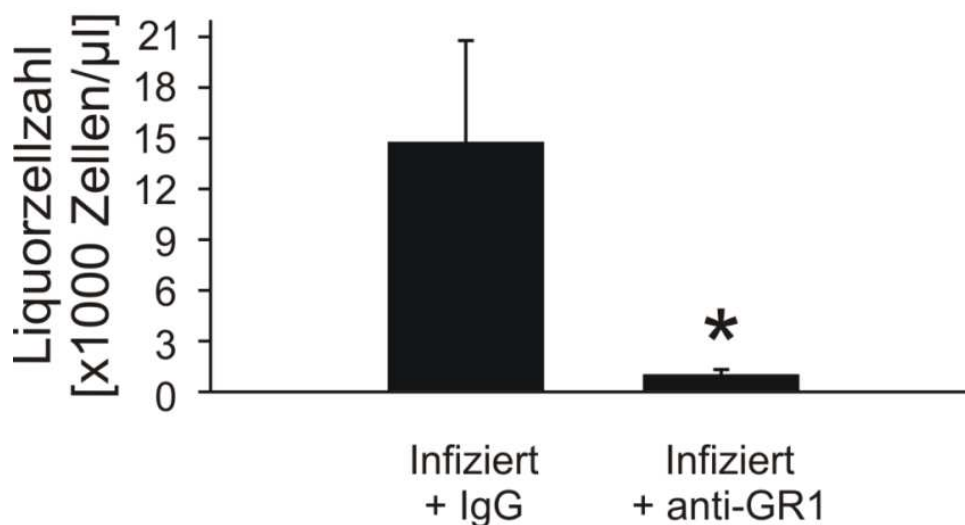
4.9 Granulozyten: eine wichtige Quelle von IL-1 β bei der Pneumokokkenmeningitis

Da die IL-1 β -Produktion durch die Pneumolysin-Defizienz oder die Cathepsin B-Hemmung *in vivo* weniger stark als *in vitro* (Makrophagenexperimente) beeinflusst wurde, untersuchten wir in einer abschließenden Versuchsreihe die Rolle

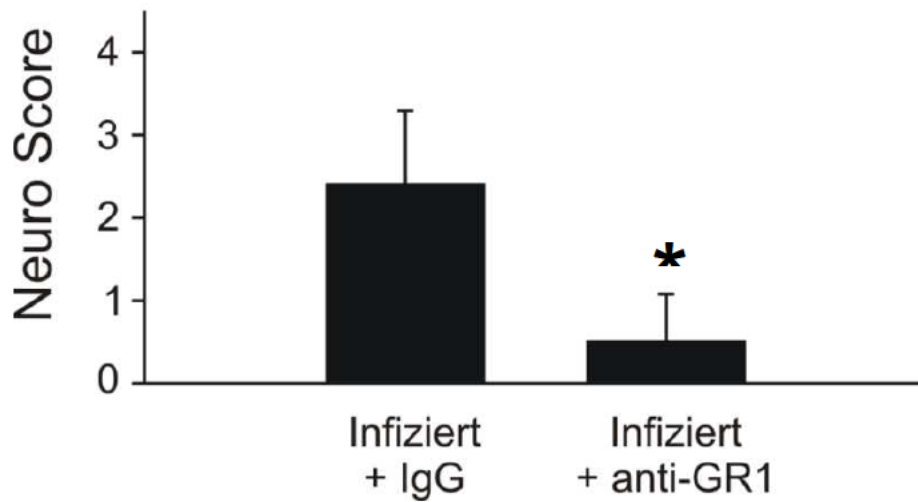
neutrophiler Granulozyten in der Meningitis-induzierten IL-1 β -Produktion. Neutrophile Granulozyten stellen die dominierende Zellpopulation im meningealen Infiltrat dar und können IL-1 β Caspase-1-abhängig und -unabhängig freisetzen (Greten et al. 2007; Guma et al. 2009; Koedel et al. 2009a). Wir induzierten mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (anti-GR-1) eine Depletion dieser Leukozytensubpopulation. Als Vergleichsgruppe dienten Wildtypmäuse, die mit einem Isotypantikörper (Ratten-IgG2b) behandelt wurden. Die Depletion der neutrophilen Granulozyten ging mit einer dramatischen Reduktion der Zellzahl im Liquor (**Abb. 12A**) und im Blut einher. Zudem führte die Elimination der Neutrophilen zu einer signifikant abgeschwächten Hirnpathologie (**Abb. 12B**), allerdings aber zu erhöhten bakteriellen Titer im Hirn (**Abb. 12C**) und Blut.

Abbildung 12: Effekte der Neutrophilendepletion auf Liquorzellzahl (A), Hirnpathologie (B) und Hirnbakterientiter (C) bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

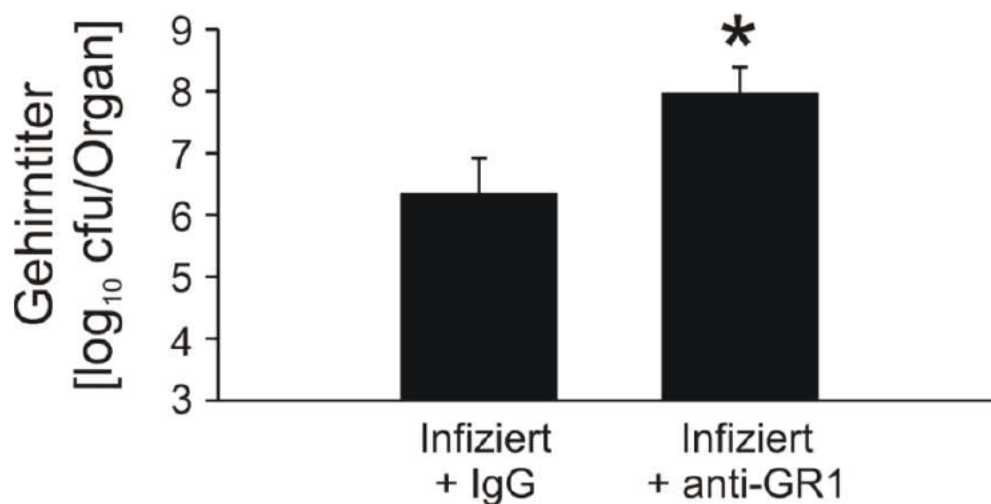
A



B



c



Anmerkungen:

(A) Die Vorbehandlung der Tiere mit anti-GR1-AK führte zu einer drastischen und signifikanten Reduktion der Neutrophilenanzahl im Liquor. (B) Außerdem bewirkte die Verwendung des Antikörpers eine signifikant reduzierte Hirnpathologie. (C) Die Neutropenie ging jedoch mit einem signifikant erhöhten Bakterientiter im Gehirn im Vergleich zu mit Isotypantikörper (IgG) vorbehandelten Tieren einher. anti-GR1 = monoklonaler AK (n=5), *<0,05, im Vergleich zu IgG = Isotypantikörper (n=5). Beide Gruppen wurden mit Wildtypbakterienstamm D 39 infiziert. Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

Zusätzlich resultierte die Depletion der Granulozyten in einer signifikanten Reduktion der IL-1 β -Konzentrationen im Hirn (41 ± 26 bzw. 91 ± 25 pg/mg Hirnprotein bei Anti-GR1- bzw. Isotypantikörper-behandelten Mäusen; $p = 0,034$). Kurz zusammengefasst sprechen diese Befunde dafür, dass Granulozyten eine wichtige IL-1 β -Quelle darstellen. Das von Granulozyten stammende IL-1 β kann sowohl Caspase-1 abhängig als auch -unabhängig freigesetzt worden sein. Diese Beobachtung könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass Behandlungsmaßnahmen, die die Caspase-1-Aktivierung verhindern, die IL-1 β -Produktion bei der Pneumokokkenmeningitis nur partiell inhibieren können.

5. Diskussion

5.1 Das NLRP3-Inflammasom besetzt eine zentrale Rolle in der Immunopathogenese der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

Unserer Arbeitsgruppe war es im Vorfeld gelungen, Caspase-1 als einen zentralen Mediator in der Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis zu identifizieren (Koedel et al. 2002b). Die Protease Caspase-1 ist hauptverantwortlich für die Aktivierung von Zytokinen der IL-1-Familie wie IL-1 β und IL-18 (Halle et al. 2008). IL-1 β und IL-18 liegen im Zytosol in inaktiven Vorläuferformen vor, die nach einer zellulären Aktivierung durch die aktive Caspase-1 in funktionsfähige Zytokine umgewandelt werden (Dinarello 2007; Martinon und Tschopp 2007; Denes et al. 2012). In den vergangenen 10 Jahren wurden Mechanismen der Caspase-1-Aktivierung aufgeklärt. So ist heute bekannt, dass die Aktivität der Caspase-1 innerhalb von zytosolischen Multiproteinkomplexen, genannt Inflammasome (Halle et al. 2008), kontrolliert wird. Im Zuge ihrer Aktivierung setzen sich diese Komplexe aus verschiedenen Komponenten zusammen, die in ihrer Gesamtheit das Inflammasom bilden. Zu diesen Komponenten zählen NLRP-Proteine, die als Mustererkennungsrezeptoren fungieren und für die Benennung des jeweiligen Inflammasoms verantwortlich sind, wie beispielsweise NLRP3. Weitere Bestandteile des Proteinkomplexes sind Adapterproteine wie ASC, die die Vorläuferform der Caspase-1, pro-Caspase-1, in den Komplex rekrutieren und mit den NLRP-Proteinen verbinden (Martinon et al. 2006; Halle et al. 2008). In einer zellkulturellen Untersuchung wurde ferner gezeigt, dass das Adaptermolekül RIP2 mit ASC um die Bindung an die Caspase-1 konkurrieren und als negativer Regulator einer Inflammasomaktivierung fungieren kann (Martinon et al. 2002; Srinivasula et al. 2002; Mariathasan et al. 2004; Lupfer et al. 2013).

Zu den am besten charakterisierten Inflammasomen gehört das NLRP3-Inflammasom (Menu und Vince 2011; Lamkanfi und Dixit 2012). Das NLRP3-Inflammasom kann durch eine Vielzahl von Bakterien (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*) (Mariathasan et al. 2006; Miller et al. 2007; Duncan et al. 2009; Harder et al. 2009), Viren (Influenza-Virus, Sendai-Virus, Adeno-Virus) (Kanneganti et al. 2006; Muruve et al. 2008; Allen et al. 2009) und Pilzen (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) (Gross et al. 2009; Said-Sadier et al. 2010) aktiviert werden. Zudem können auch diverse endogene Faktoren, die bei zellulärem und/oder metabolischem Stress gebildet bzw. freigesetzt werden (ATP, Harnsäure, Amyloid- β) (Mariathasan et al. 2006; Martinon et al. 2006; Halle et al. 2008), eine Aktivierung dieses Inflammasoms auslösen. Eine fehlgeleitete und/oder übermäßige Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms wurde mit zahlreichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Beispiele hierfür sind die Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrome (COPS), Gicht, Asbestose/Silikose, Diabetes mellitus Typ2, Kontakthypersensitivität und Morbus Alzheimer (Martinon et al. 2006; So et al. 2007; Watanabe et al. 2007; Cassel et al. 2008; Dostert et al. 2008; Halle et al. 2008; Neven et al. 2008; Masters et al. 2010; Wen et al. 2011).

Über die Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei (bakteriellen) Infektionen des ZNS, wie beispielsweise der Pneumokokkenmeningitis, war nichts bekannt.

In dieser Dissertationsarbeit sollte die Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis in einem etablierten Mausmodell charakterisiert werden. Zur Klärung der Fragestellung wurden Mäusestämme verwendet, die genetische Defizienzen ausgewählter Bausteine des NLRP3-Inflammasoms bzw. möglicher Interaktionspartner aufwiesen. Im Einzelnen wurden

ASC-, NLRP3- und RIP2-defiziente Mäusestämme untersucht. Die wesentlichen Beobachtungen unserer Untersuchungen waren, dass [i] die genetische Depletion von NLRP3 und ASC (nicht aber von RIP2) mit einer signifikant verringerten Immunreaktion verbunden war, was wiederum mit einer Abnahme Meningitis-assoziiierter neuropathologischer Veränderungen und folglich einem verbesserten klinischen Verlauf einherging. Diese Daten sprechen dafür, dass die von uns bereits früher beschriebene Aktivierung der Caspase-1 bei der Pneumokokkenmeningitis durch das NLRP3-Inflammasom erfolgt, während RIP2-abhängigen Signalwegen keine größere Rolle in der Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis zuzukommen scheint. Diese Ergebnisse decken sich mit denen einer Arbeit, in der der Einfluss von *Salmonella typhimurium* auf die Aktivierung von Caspase-1 in peritonealen Makrophagen sowie an ASC- und RIP2-knock-out-Mäusen *in vivo* untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass ASC essentiell für die Caspase-1-bedingte Bildung von IL-1 β (und IL18) innerhalb des Inflammasoms war, wohingegen der Verlust von RIP2 die Produktion von IL-1 β nicht beeinträchtigte (Mariathasan et al. 2004). Das traf auch für mit *Listeria monocytogenes* infizierte humane periphere Monozyten zu (Meixenberger et al. 2010). Im Gegensatz dazu hatten Pan et al. (2007) berichtet, dass zur Muramyldipeptid (bakterieller Zellwandbestandteil)-induzierten Produktion von aktivem IL-1 β *in vitro* (durch Makrophagen) sowohl NLRP3-ASC-abhängige als auch RIP2-abhängige Signalwege beitragen. Eine Beteiligung RIP2-abhängiger Signalwege bei der Aktivierung von immunkompetenten Zellen (z.B. Makrophagen, Mikrogliazellen) wurde auch nach einer Stimulation mit *S. pneumoniae* bzw. Pneumokokkenzellwandbestandteilen beschrieben (Opitz et al. 2004; Liu et al. 2010; Davis et al. 2011). Im Gegensatz dazu hatte die Arbeitsgruppe von P.J. Murray beobachtet, dass NOD2-RIP2-abhängige Signalwege an der Regulation der anti-inflammatorischen (nicht aber pro-inflammatorischen) Zytokinantwort auf eine

Pneumokokkeninfektion *in vitro* mitwirken (Moreira et al. 2008). Das bedeutet, dass sich die Datenlage zu NOD2-RIP2 bei Pneumokokkeninfektionen gegenwärtig inhomogen präsentiert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten Unterschiede im Versuchsaufbau, insbesondere im Infektionsort, sein. Für diese Interpretation spricht auch, dass die genetische NLRP3-Defizienz unterschiedliche Effekte in Mausmodellen der Pneumokokkenmeningitis und -pneumonie aufweist. Im Gegensatz zum Meningitismodell war die NLRP3-Defizienz im Pneumoniemodell mit einer Störung der Infektabwehr (folglich höheren bakteriellen Konzentrationen) und einem ungünstigen klinischen Verlauf vergesellschaftet (Fang et al. 2011; Witzentrath et al. 2011). Diese Diskrepanz zeigt, dass der Liquorraum und das Zentralnervensystem immunpathologisch eine Sonderstellung einnehmen, die durch eine besondere Vulnerabilität gegenüber entzündlichen Prozessen bei eingeschränkter Fähigkeit zur Infektabwehr gekennzeichnet ist (Niederhorn 2006; Koedel et al. 2010b).

Kurz zusammenfassend demonstrieren unsere Untersuchungen, dass die Pneumokokkeninfektion des Liquorraums zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt. Die Inflammasomaktivierung hat eine Verstärkung der entzündlichen Reaktion und der neuropathologischen Veränderung zur Folge.

5.2 Die Bedeutung von Zytokinen der IL-1-Familie, deren Aktivität vom NLRP3-Inflammasom reguliert wird, bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

Zytokine der IL-1-Familie gelten als Schlüsselmediatoren lokaler und systemischer Entzündungsreaktionen (Dinarello 2011). Die IL-1-Zytokin-Familie besteht aus mindestens 11 Mitgliedern (Dinarello 2010). Die am besten charakterisierten sind die namensgebenden proinflammatorischen Zytokine IL-1 α und IL-1 β und deren

natürlich vorkommender Antagonist, der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra) (Dinarello 2009). Alle drei Polypeptide binden an den gleichen Rezeptor, den Interleukin1-Rezeptor Typ I (IL-1RI). In Folge der Interaktion von IL-1 α oder IL-1 β mit diesem Rezeptor wird das akzessorische Protein IL-1RAcP rekrutiert. Durch den entstehenden heterodimeren Komplex wird eine Signalkaskade ausgelöst, die in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie von JNK (c-Jun N-terminale Kinase)- und MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Signalwegen mündet. Der Antagonist IL-1RA konkurriert mit IL-1 α oder IL-1 β um die Bindung an IL-1RI. Bindet IL-1RA an IL-1RI, bleibt die Rekrutierung von IL-1RAcP und jegliche Signaltransduktion aus (Pinteaux et al. 2002; Smeets et al. 2005; Huang et al. 2011). Die drei Polypeptide können auch mit einem weiteren Rezeptor interagieren, dem Interleukin1-Rezeptor Typ II (IL1-RII). Diesem Rezeptor fehlt die zytoplasmatische Signaltransduktionsdomäne. Er funktioniert daher als „Rezeptorattrappe“, d.h. die Bindung von IL-1 α oder IL-1 β an IL-1RII induziert keine Signaltransduktion (Gabay et al. 2010). Ein weiterer gut untersuchter Vertreter dieser Zytokinfamilie ist IL-18. Ebenso wie IL-1 β wird IL-18 in einer inaktiven Vorläuferform gebildet und muss zur Aktivierung enzymatisch durch Caspase-1 gespalten werden. Für IL-18 und IL-1 β gilt, dass sie nur in prozessierter („reifer“, gespaltener) und sezernierter Form biologisch aktiv sind (Hazuda et al. 1988; Rubartelli et al. 1990; Perregaux et al. 1992). Die biologische Aktivität von IL-18, zu der beispielsweise die Induktion einer Interferon γ - oder IL-8-Expression zählt, kann durch einen natürlich vorkommenden Inhibitor, dem IL-18-bindenden Protein, gehemmt werden (Kimura et al. 2008; Krumm et al. 2012). Frühere Studien bei Mensch und Tier wiesen auf eine zentrale Rolle von Zytokinen der IL-1-Familie bei der Pneumokokkenmeningitis hin. Sowohl im Mausmodell als auch bei Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis fanden sich erhöhte IL-18- und IL-1 β -Spiegel im Hirngewebe und Liquor (Mustafa et al.

1989; Fassbender et al. 1999; Zwijnenburg et al. 2003a; Zwijnenburg et al. 2003b). Dabei korrelierten die IL-1 β -Spiegel beim Menschen mit der Prognose; stark erhöhte IL-1 β -Werte gingen mit einem signifikant schlechteren klinischen Verlauf einher (Mustafa et al. 1989). Im Rattenmodell induzierte allein die intrazisternale Gabe von IL-1 β eine Meningitis (Quagliarello et al. 1991). Ferner zeigten Untersuchungen im Tiermodell der experimentellen Pneumokokkenmeningitis, dass durch eine genetische Defizienz von IL-1 β oder IL-18 sowie durch eine Neutralisation der IL-1 β -Aktivität durch spezifische Antikörper die Entzündungsreaktion im Subarachnoidalraum signifikant abgemildert wird (Saukkonen et al. 1990; Zwijnenburg et al. 2003b). Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis spielen könnten. Wir führten zunächst Untersuchungen zur Funktion von IL-1 β bei der Pneumokokkenmeningitis durch. Dabei setzten wir zur Inhibition der biologischen Aktivität den rekombinanten IL-1RA Anakinra ein. Anakinra hatte sich in verschiedenen Mausmodellen als effektiv herausgestellt, beispielsweise in Modellen der rheumatoiden Arthritis (Bresnihan 2001; Bresnihan 2002), des Myokardinfarkts (Abbate et al. 2008) und der Amyotrophen Lateralsklerose (Meissner et al. 2010). In unserem Modell bewirkte die IL-1 β -Inhibition eine signifikante Reduktion der Leukozytenzellzahl im Liquor, allerdings in einem geringeren Maße als bei ASC- und NLRP3-defizienten Mäusen beobachtet (48% versus 63 und 67%). Im Gegensatz zur ASC- und NLRP3-Defizienz hatte dieser Behandlungsansatz keinen signifikanten Effekt auf den klinischen Verlauf und die neuropathologischen Veränderungen; allerdings zeigte sich eine Tendenz in Richtung einer neuropathologischen und klinischen Verbesserung. Diese Befunde deuten daraufhin, dass der Phänotyp der ASC- und NLRP3-defizienten Mäuse nicht ausschließlich durch eine fehlende IL-1 β -IL-1R-Signaltransduktion zu

erklären ist. Eine mögliche Ursache für diese Unterschiede ist, dass die Gendefizienzen zusätzliche Signalwege, wie beispielsweise den IL-18-Signalweg, betreffen. Wie oben bereits erwähnt, lieferten früheren Studien eindeutige Hinweise auf eine Beteiligung dieses Zytokins in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis (Fassbender et al. 1999; Zwijnenburg et al. 2003a). Die Aktivität von IL-18 wird *in vivo* durch einen natürlich vorkommenden IL-18-Inhibitor, IL-18BP, moduliert (Krumm et al. 2012). In rekombinanter Form wurde dieses Protein bereits erfolgreich als IL-18-Antagonist in einem Mausmodell des experimentellen Schädelhirntraumas (Yatsiv et al. 2002) und in einem *in vitro*-Sepsismodell getestet (Stuyt et al. 2003). Wir setzten diesen Hemmstoff in Kombination mit Anakinra ein, um zu überprüfen, ob durch diese Behandlungsstrategie der bei NLRP3- bzw. ASC-defizienten Mäusen beobachteten Phänotyp erzielt werden kann. Durch die kombinierte Gabe konnte die Liquorpleozytose stärker als durch die Anakinra-Monotherapie abgeschwächt werden (um 65% versus 48%). Überdies führte die Kombinationsbehandlung im Unterschied zur Anakinra-Monotherapie auch zu einer signifikanten Abnahme der neuropathologischen Veränderungen und zu einer Verbesserung des klinischen Zustands. Damit war der Phänotyp der Mäuse, die mit Anakinra und rIL-18BP behandelt worden waren, vergleichbar mit dem der ASC- oder NLRP3-defizienten Mäuse. Zusammengenommen sprechen diese Daten dafür, dass die Effekte der ASC- und NLRP3-Defizienz bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis auf einer fehlenden Aktivierung von IL-1 β und IL-18 beruhen. Auch in anderen Infektionsmodellen, wie beispielsweise der durch *Citrobacter rodentium*-induzierten Colitis oder der Melioidose (Ceballos-Olvera et al. 2011; Liu et al. 2012), konnte der Phänotyp der ASC- oder NLRP3-Defizienz auf eine fehlende Aktivierung von IL-1 β und IL-18 zurückgeführt werden. Gegen die Allgemeingültigkeit dieser Aussage sprechen Untersuchungen in anderen

Krankheitsmodellen: so war beispielsweise in Mausmodellen der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis, der altersbedingten Makuladegeneration oder der Endotoxin-induzierten Leberschädigung der Krankheitsphänotyp der NLRP3-defizienten Mäuse mit dem IL-18-defizienter, nicht aber IL-1R- oder IL-1 β -defizienter Mäuse vergleichbar (Gris et al. 2010; Jha et al. 2010; Tsutsui et al. 2010; Doyle et al. 2012). In Mausmodellen der Gicht, der Atherosklerose oder einer durch Alkohol hervorgerufenen Neuroinflammation zeigten IL-1R- und IL-1 β -defiziente (nicht aber IL-18-defiziente) Mäuse einen ähnlichen Phänotyp wie NLRP3-defiziente Mäuse (Düwell et al. 2010; Amaral et al. 2012; Lippai et al. 2013). Einen möglichen Erklärungsansatz für diese diskrepanten Befunde lieferten die Studien von Hanamsagar et al. (2011) sowie Schmidt und Lenz (2012). So zeigten Hanamansagar et al., dass eine Stimulation von Mikrogliazellen mit *Staphylococcus aureus* eine Cathepsin B-, NLRP3- und ASC-abhängigen Produktion von reifem IL-1 β zur Folge hatte, keines dieser drei Moleküle aber an der gleichzeitigen IL-18-Freisetzung beteiligt war. Schmidt und Lenz wiederum beobachteten, dass die Freisetzung von IL-1 β durch dendritische Zellen nach einer Exposition mit *Listeria monocytogenes*-Proteinen in Abhängigkeit von reaktiven Sauerstoffspezies und Caspase-11 erfolgte, während IL-18 unabhängig von diesen Faktoren generiert wurde. Beide Zytokine können also - zumindest unter bestimmten (Versuchs)Bedingungen - auf unterschiedliche Art und Weise aktiviert werden. Zudem können beide Zytokine auch unabhängig voneinander gebildet werden: so wurde beispielsweise in einem Mausmodell der Colitis eine vermehrte Expression von IL-18, nicht aber IL-1 β beobachtet (Zaki et al. 2010), während nach einem Rückenmarkstrauma lediglich die Produktion von IL-1 β , nicht aber die von IL-18 erhöht war (de Rivero Vaccari et al. 2012). Diese Differenzen könnten Unterschiede

in der pathophysiologischen Bedeutung der Zytokine IL-1 β und IL-18 bei unterschiedlichen Krankheiten erklären.

5.3 Die Beteiligung der Protease Cathepsin B bei der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms bei der Pneumokokkenmeningitis

Ein weiterer thematischer Schwerpunkt dieser Dissertationsarbeit lag auf der Identifizierung von Mechanismen der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms bei der Pneumokokkenmeningitis. Die genaue Abfolge der molekularen Ereignisse, die zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führen, ist bisher nur teilweise geklärt (Latz 2010; Gross et al. 2011; Dowling und O'Neill 2012). Man geht davon aus, dass eine robuste Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms mindestens zwei distinkte extrazelluläre Signale erfordert: [i] ein bahrendes Signal (wie beispielsweise die Aktivierung von TLRs), das die Expression von NLRP3 induziert, und [ii] ein aktivierendes Signal, das die Bildung des Inflammasomkomplexes mit konsekutiver Caspase-1-Aktivierung triggert. Als mögliche Aktivierungsmechanismen wurden [i] der Ausstrom intrazellulärer Kaliumionen, [ii] die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und [iii] die Freisetzung lysosomaler Proteasen beschrieben (Gross et al. 2011).

Für die funktionelle Relevanz des Kaliumausstroms sprechen folgende Beobachtungen: zahlreiche mikrobielle Substanzen (wie beispielsweise Porenbildende Toxine), die eine NLRP3-Inflammasomaktivierung auslösen, können die Zellmembran von Wirtszellen schädigen und folglich einen Kaliumausstrom verursachen (Mariathasan et al. 2006; Petrilli et al. 2007; Piccini et al. 2008). Zudem kann eine Aktivierung endogener Kaliumkanäle zum Kaliumausstrom mit nachfolgender Inflammasomaktivierung führen. Beispielsweise verursachen hohe Konzentrationen von extrazellulärem ATP durch Bindung an P2X₇-Purinorezeptoren

eine Öffnung von Kaliumkanälen und eine Aktivierung der Caspase-1 (Perregaux und Gabel 1994; Kahlenberg und Dubyak 2004; Mariathasan et al. 2006; Piccini et al. 2008). Des Weiteren wurde in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien demonstriert, dass durch pharmakologische Strategien, die einer Reduktion der intrazellulären Kaliumkonzentrationen entgegenwirken, eine Inflammasomaktivierung nach Stimulation mit NLRP3-Aktivatoren verhindert werden kann, wie beispielsweise durch eine Erhöhung der extrazellulärer Kaliumkonzentration auf Werte über 70 mM (Petrilli et al. 2007) oder eine Gabe des Kaliumkanalblockers Glibenclamid (Lamkanfi et al. 2009).

Neben dem Kaliumausstrom wurden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als wichtige Signale in der NLRP3-Aktivierungskaskade postuliert (Tschopp und Schroder 2010). Diese Hypothese basiert auf folgenden Befunden: viele bekannte NLRP3-Aktivatoren induzieren die Produktion von ROS (Cruz et al. 2007; Cassel et al. 2008; Dostert et al. 2008). Zudem konnte in verschiedenen Zellkulturmodellen durch eine Behandlung mit Sauerstoffradikalfängern oder mit Hemmstoffen des Enzyms NADPH-Oxidase, das als wichtige ROS-Quelle gilt, die Aktivierung von Caspase-1 abgeschwächt werden (Dostert et al. 2008; Hewinson et al. 2008). Als zusätzliche oder alternative ROS-Quelle gelten die Mitochondrien (Zhou et al. 2011). Bisher ist jedoch ungeklärt, wie ROS das NLRP3-Inflammasom aktivieren. Es werden zwei Möglichkeiten diskutiert: [i] die hochreagiblen ROS könnten NLRP3 chemisch modifizieren und dadurch aktivieren; oder [ii] die ROS könnten mit anderen intrazellulären Proteinen (wie beispielsweise dem Thioredoxin interagierendem Protein, TXNIP) reagieren, die in der Folge an NLRP3 binden und zu dessen Aktivierung führen könnten (Zhou et al. 2011).

Ein weiterer Erklärungsansatz sieht die NLRP3-Aktivierung innerhalb oder am Ende

einer proteolytischen Kaskade. In diesem Modell verursachen NLRP3-Aktivatoren Schäden an Lysosomen, die zur Freisetzung lysosomaler Proteasen wie Cathepsin B in das Zytosol führen. Die Aktivität dieser Enzyme führt zur Spaltung und Aktivierung eines NLRP3-Liganden oder aber zur Zerstörung eines NLRP3-Inhibitors (Reiser et al. 2010; Gross et al. 2011). Für dieses Modell sprechen folgende Beobachtungen: [i] Die NLRP3-Inflammasomaktivierung durch Kristalle und Proteinaggregate wie Quarzkristalle und β -Amyloid-Proteine erfordert deren Phagozytose, die konsekutive Ruptur von Phagolysosomen und die Freisetzung lysosomaler Enzyme in das Zytoplasma (Halle et al. 2008; Hornung et al. 2008). [ii] Die IL-1 β -Sekretion nach einer Infektion mit dem intrazellulären Erreger *Listeria monocytogenes* geht mit einem Verlust der Integrität von Phagolysosomen einher, die durch das Porenbildende Bakterientoxin Listeriolysin O ausgelöst wird und zur Freisetzung von Cathepsin B in das Zytoplasma führt (Meixenberger et al. 2010). [iii] Die Freisetzung lysosomaler Proteasen wie Cathepsin B (und Cathepsin L) induzierte eine NLRP3-abhängige Caspase-1-Aktivierung und IL-1 β -Produktion in mit *Mycobacterium tuberculosis* stimulierten Mikrogliazellen (Lee et al. 2013). [iv] Die durch die Chemotherapeutika Gemcitabin und 5-Fluorouracil induzierte Sekretion von IL-1 β ging mit einer Permeabilisierung der lysosomalen Membran und einer konsekutiven Freisetzung der Protease Cathepsin B einher, die in der Folge an NLRP3 band und die Caspase-1-Aktivierung auslöste (Bruchard et al. 2013). [v] Auch die NLRP3-Aktivierung in Folge einer zellulären Exposition mit dem Kaliumionophor Nigericin war mit einem Übertritt von Cathepsin B aus den Lysosomen in das Zytosol vergesellschaftet. Beachtenswerterweise erfolgte die Freisetzung von Cathepsin B im letztgenannten Fall ohne erkennbare strukturelle Schädigung der Lysosomen (Hentze et al. 2003). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung stellten wir bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an humanen THP-1-Makrophagen fest,

dass die Stimulation der Zellen mit Pneumokokken nicht zur Ruptur von Lysosomen, aber zu einem Anstieg des lysosomalen pH-Werts und einem Austritt von Cathepsin B in das Zytosol (ohne Beschädigung der Lysosomenmembran) führte (Hoegen et al. 2011). Eine vergleichbare Beobachtung machte die Arbeitsgruppe von Rajamaki et al. (2010): Die Exposition von Makrophagen mit Cholesterolkristallen verursachte eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, die mit einer Destabilisierung der lysosomalen Membran, nicht aber mit einer vollständigen Ruptur der Lysosomen vergesellschaftet war und einen Austritt von Cathepsin B ins Zytosol bewirkte. In weiteren Experimenten konnten wir durch Einsatz verschiedener spezifischer pharmakologischer Hemmstoffe, wie des Cathepsin B-Hemmstoffs Ca-074-Me (Buttle et al. 1992; Newman et al. 2009) zeigen, dass eine Infektion mit *S. pneumoniae* bei Makrophagen eine ATP-abhängige Freisetzung der Protease Cathepsin B aus den Lysosomen verursacht, die ursächlich verantwortlich für die konsekutive Caspase-1-abhängige IL-1 β -Sekretion ist (Hoegen et al. 2011). Um die Rolle von Cathepsin B *in vivo* zu belegen, setzten wir im Rahmen dieser Dissertationsarbeit den Cathepsin B-Inhibitor CA-074-Me in unserem Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis ein. Die Hemmung dieser lysosomalen Protease führte zu einer signifikanten Verbesserung des klinischen Verlaufs, einer Abnahme der zentralvenösen Komplikationen sowie der meningealen Entzündungsreaktion. Überdies beobachteten wir einen starken Rückgang der IL-1 β -Konzentration im Hirnhomogenat der Mäuse, die mit dem Cathepsin B-Inhibitor behandelt worden waren. Diese Beobachtungen stimmen mit unseren zellkulturellen Befunden überein und sprechen für eine Beteiligung von Cathepsin B bei der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms bei der Pneumokokkenmeningitis. Kritisch anzumerken ist, dass der verwendete Cathepsin B Inhibitor Ca-074-Me zwar eine hohe Spezifität für dieses Enzym aufweist, aber auch die Aktivität anderer Proteasen, wie Cathepsin L,

beeinflussen kann (Montaser et al. 2002). So könnten die erzielten Effekte nicht ausschließlich auf der Hemmung von Cathepsin B beruhen. Zur Klärung dieser Frage wären Untersuchungen an entsprechenden Gen-defizienten Mäusen hilfreich. Überdies ist noch ungeklärt, ob Cathepsin B das NLRP3-Inflammasom direkt aktiviert oder diese Aktivierung auf einen indirekten Weg zustande kommt. Zum Beispiel könnte man sich vorstellen, dass Cathepsin B einen vermeintlichen endogenen NLRP3-Inhibitor im Zytosol abbaut oder aber ein zytoplasmatisches Molekül generiert, das dadurch zum NLRP3-Liganden wird (Hornung und Latz 2010). Diese Fragestellungen müssen in der Zukunft geklärt werden.

Da die Hemmung von Cathepsin B der Entstehung intrakranieller Komplikationen entgegenwirkt und den klinischen Verlauf günstig beeinflusst, könnte dieses Enzym ein aussichtsreicher Angriffspunkt für eine adjuvante Therapie der Pneumokokkenmeningitis sein. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen existieren Berichte über protektive Effekte einer Cathepsin B-Hemmung in Tiermodellen akuter und chronischer neurodegenerativer Erkrankungen, wie beispielsweise der zerebralen Ischämie und der Alzheimer'schen Erkrankung (Yamashima et al. 1998; Hook et al. 2005). Ferner wurden hohe Cathepsin B-Aktivitäten in Liquorproben von Patienten mit neuroinflammatorischen Erkrankungen, wie der Multipler Sklerose, beschrieben (Nagai et al. 2000). Der Aktivierung des Inflammasoms wird bei allen drei oben genannten Erkrankungen eine wichtige pathophysiologische Rolle zugeschrieben (Savage et al. 2012; Inoue und Shinohara 2013; Tan et al. 2013): Das Inflammasom scheint über eine Verstärkung der Immunreaktion entscheidend zur Gewebedestruktion (bzw. dessen Ausweitung) beizutragen. Somit erscheint es möglich, dass die Freisetzung und Aktivierung von Cathepsin B einen (weit) verbreiteten Mechanismus für die Auslösung und

Verstärkung Inflammasom-abhängiger Immunantworten im Zentralnervensystem darstellt.

5.4 Die Rolle von Pneumolysin bei der NLRP3-Inflammasomaktivierung

Die Virulenz von Pneumokokken hängt von Virulenzfaktoren wie der Polysaccharidkapsel oder dem Toxin PLY ab (Kadioglu et al. 2008; Mitchell und Mitchell 2010; Witzernath et al. 2011). PLY gehört zur Familie der Cholesterol-abhängigen Zytolysine; das sind bakteriellen Proteintoxine, die an Membrancholesterol binden, sich zu großen Aggregaten zusammenschließen und durch Porenbildung (mit einer Zerstörung der Membranintegrität) Zellyse und Zelltod verursachen (El-Rachkidy et al. 2008; Marriott et al. 2008; Heuck et al. 2010; Hotze und Tweten 2012). In sublytischen Konzentrationen kann PLY als hochwirksamer Immunregulator fungieren: PLY kann beispielsweise die Produktion von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen induzieren und den klassischen Komplementweg aktivieren (Paton et al. 1984; Mitchell et al. 1991; Houldsworth et al. 1994; Cockeran et al. 2002; Thornton und McDaniel 2005). In früheren Studien war gezeigt worden, dass Bakterien, die Poren-bildende Toxine ausbilden (beispielsweise *Listeria monocytogenes*), und deren Toxine per se das NLRP3-Inflammasom aktivieren können (Chu et al. 2009; Craven et al. 2009; Harder et al. 2009; Munoz-Planillo et al. 2009; Meixenberger et al. 2010). Um einen ersten Einblick in die Rolle von PLY in die Pneumokokken-induzierte Caspase-1-Aktivierung zu erhalten, hatte unsere Arbeitsgruppe Zellkulturexperimente an humanen THP-1-Makrophagen durchgeführt. Die Makrophagen wurden dabei entweder mit dem Wildtyppneumokokkenstamm D39 oder einer isogenen, PLY-defizienten Pneumokokkenmutante (D39 Δ PLY) stimuliert. Im Vergleich zum Wildtypstamm führte die Stimulation mit dem Pneumolysin-defizienten Stamm zu einer signifikant

reduzierten Cathepsin B- und Caspase-1-Aktivierung sowie einer verminderten IL-1 β -Freisetzung. Unsere Daten stehen in Einklang mit denen zweier bereits publizierter Studien: McNeela et al. (2010) berichteten, dass PLY die Freisetzung von IL-1 β aus dendritischen Zellen Cathepsin B- und NLRP3-abhängig vorantreiben kann. Witzernath und Kollegen (2011) zeigten, dass die Expression von PLY entscheidend für die NLRP3-Inflammasomaktivierung und IL-1 β -Sekretion in murinen Makrophagenkulturen nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* ist. Die Resultate dieser Arbeiten deuteten auf eine wichtige Rolle von PLY in der Immunregulation bei der Pneumokokkenmeningitis hin. Für diese Hypothese sprach auch die Beobachtung, dass hohe PLY-Konzentrationen im Liquor von Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis mit einer ungünstigen Prognose assoziiert waren (Wall et al. 2012). Zur Überprüfung der Hypothese verglichen wir die Phänotypen von Wildtypmäusen, die entweder mit einer isogenen, PLY-defizienten Pneumokokkenmutante oder Wildtyppneumokokken infiziert worden waren. In unserem Mausmodell war die Infektion mit PLY-defizienten Pneumokokken mit einem milderem Krankheitsverlauf als eine Infektion mit PLY-exprimierenden Pneumokokken vergesellschaftet. Der günstigere klinische Verlauf wurde von niedrigeren Bakterienzahlen im Blut begleitet, was suggeriert, dass der Effekt auf das klinische Erscheinungsbild - zumindest teilweise- auf eine weniger stark ausgeprägte Sepsis zurückzuführen ist; die Sepsis stellt eine typische systemische Komplikation der Pneumokokkenmeningitis dar (Koedel et al. 2004; van de Beek et al. 2006). Diese Beobachtung deckt sich mit vorangegangenen Studien an erwachsenen Nagetieren (Mäusen und Ratten): in diesen Tiermodellen war die Bakteriämie nach intrathekaler Infektion mit PLY-defizienten Pneumokokken geringer ausgeprägt als nach Gabe von Wildtyppneumokokken (Wellmer et al. 2002; Hirst et al. 2008). Zudem beobachteten wir eine signifikante Reduktion von intrakraniellen

Komplikationen und neuropathologischen Veränderungen bei Mäusen, die anstelle von Wildtyp pneumokokken mit PLY-defizienten Bakterien infiziert worden waren. Vergleichbare Ergebnisse wurden in früheren Untersuchungen an erwachsenen (Hirst et al. 2008) und neonatalen Ratten (Reiss et al. 2011) erhoben. Für diesen Effekt könnte die fehlende, direkte zytotoxische Wirkung von PLY auf Zellen des Zentralnervensystems verantwortlich sein. Ebenso vorstellbar ist, dass, in Analogie zur Wirkung des Cathepsin B-Inhibitors, die Reduktion der intrakraniellen Veränderungen auf einer geringer ausgeprägten Entzündungsreaktion beruht. Dieser Erklärungsansatz wird durch unsere Beobachtung gestützt, dass die Infektion mit PLY-defizienten Pneumokokken zu signifikant niedrigeren Liquorleukozytenzahlen und IL-1 β -Spiegeln im Hirn führte als die Infektion mit PLY-exprimierenden Pneumokokken. In Übereinstimmung mit unserem Befund berichteten Hirst et al. (2008) von einer signifikanten Reduktion der Neutrophilen- und Monozytenzahlen im Liquor von erwachsenen Ratten, die intrazisternal PLY-defiziente Bakterien erhalten hatten. Ebenso wurde in Mausmodellen der Pneumokokkenbakteriämie und -pneumonie von einer abgeschwächten Entzündungsreaktion nach Infektion mit PLY-defizienten Bakterienstämmen berichtet (Rubins et al. 1996; Jounblat et al. 2003). In anderen Untersuchungen in Tiermodellen der Pneumokokkenmeningitis (Friedland et al. 1995; Wellmer et al. 2002; Reiss et al. 2011) hatte die Pneumolysindefizienz jedoch keinerlei Auswirkungen auf die meningeale Inflammation. Die Gründe für diese voneinander abweichenden Ergebnisse sind unklar, könnten aber Unterschieden im Versuchsaufbau (wie z.B. verschiedene Tierarten, Untersuchungszeitpunkte) zuzuschreiben sein. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass PLY in unserem Modell der Pneumokokkenmeningitis ein wichtiger pathogenetischer Faktor zu sein scheint: ein wesentlicher Teil der biologischen Wirkung scheint dabei auf der Fähigkeit von PLY zu beruhen, die Aktivität des

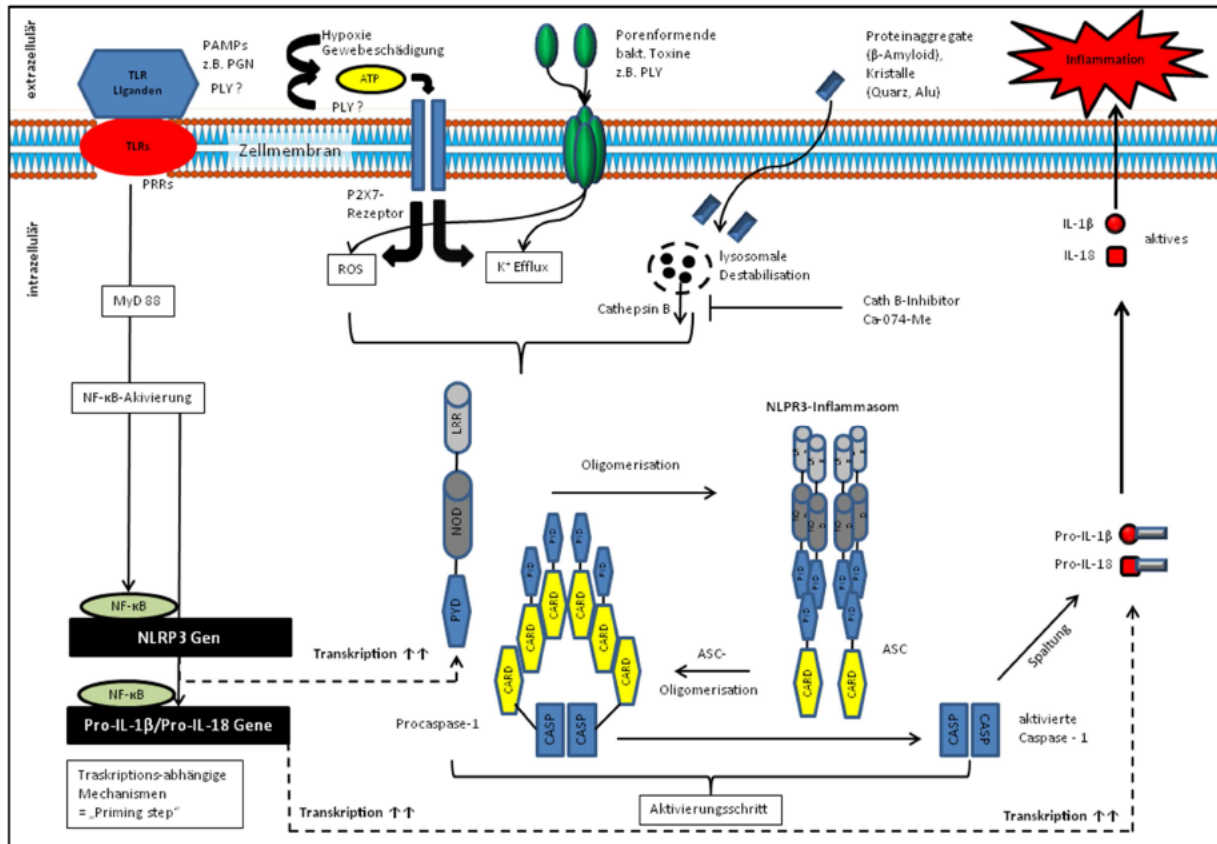
NLRP3-Inflammasom zu regulieren. Es sind jedoch noch weitere Studien notwendig, um folgende Fragen zu beantworten: [i] Welche PPRs sind an der Erkennung von PLY und der konsekutiven Auslösung der Immunantwort beteiligt? [ii] Welcher Mechanismus liegt der PLY-induzierten Freisetzung von Cathepsin B aus den Lysosomen zugrunde? Unsere Zellkulturexperimente lieferten Hinweise dafür, dass extrazelluläres ATP ein wichtiges Signalmolekül in diesem Prozess sein könnte (Hoegen et al. 2011). Unsere Beobachtung stimmt mit einer aktuellen Studie überein, die zeigte, dass die endogene Freisetzung von ATP aus Monozyten ein früher Schritt in der Inflammasom-Aktivierungskaskade diverser PAMPs einschließlich Muramyldipeptid ist (Piccini et al. 2008).

5.5 Die neutrophilen Granulozyten stellen eine wichtige Quelle für IL-1 β dar

Bei den Zellkulturversuchen ging sowohl die Pneumolysindefizienz als auch die Cathepsin B-Inhibition mit einer nahezu kompletten Blockade der IL-1 β -Produktion einher, während im Mausmodell „lediglich“ eine Abnahme der IL-1 β -Konzentrationen im Hirnhomogenat (zwischen 50% und 66%) beobachtet werden konnte. Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied könnte darin liegen, dass *in vivo* zusätzliche, NLRP3-Inflammasom-unabhängige Signalwege zur Produktion von IL-1 β beitragen. Diese Hypothese basierte auf Beobachtungen von Greten et al. (2007) und Guma et al. (2009), dass neutrophile Granulozyten IL-1 β (auch) über Caspase-1-unabhängige Wege prozessieren können und folglich bei einer neutrophilen Entzündungsreaktion eine Caspase-1-Blockade oder -Defizienz zu keiner vollständigen Blockade der IL-1 β -Produktion führen kann. Bei einer Pneumokokkenmeningitis stellen neutrophile Granulozyten die dominante Leukozytensubpopulation im Liquor dar: im unseren Mausmodell sind in Liquorproben, die 24 Stunden nach der Infektion gewonnen wurden, 80-90% der

Leukozyten dieser Leukozytensubpopulation zuzuordnen (Koedel et al. 2009a). Um den Beitrag neutrophiler Granulozyten zur IL-1 β -Freisetzung bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis zu erfassen, schalteten wir in einer Gruppe von Mäusen die neutrophilen Granulozyten mittels eines monoklonalen Antikörpers (anti-GR1) aus. Dieser Behandlungsansatz führte zu einer massiven Reduktion der Neutrophilenzahlen im Blut (um über 98%) und der Gesamtleukozytenzahlen im Liquor (um 94%; die Analyse erfolgte 24 Stunden nach der Infektion). Die Neutropenie ging mit einer signifikanten Reduktion der IL-1 β -Konzentrationen im Hirn infizierter Mäuse einher (um über 55%). Dieser Zelltyp scheint also eine wichtige Quelle von IL-1 β bei der Pneumokokkenmeningitis zu sein. Die beobachtete IL-1 β -Produktion in Hirnen von Mäusen, die mit Ca-074-Me behandelt oder mit Pneumolysin-defizienten Bakterien infiziert worden waren, könnte also auf einen Caspase-1-unabhängigen Generierungsweg in neutrophilen Granulozyten zurückzuführen sein. Zur weiteren Klärung dieser Hypothese sind in unserer Arbeitsgruppe Untersuchungen an murinen Granulozyten und Makrophagen geplant. In diesen Experimenten soll überprüft werden, welche Rolle der Caspase-1 bzw. dem NLRP3-Inflammasom bei der Pneumokokken-induzierten IL-1 β -Produktion in den jeweiligen Zelltypen zukommt. In einer weiteren Versuchsreihe soll der Frage nachgegangen werden, ob die IL-1 β -Produktion im Mausmodell komplett zum Erliegen kommt, wenn neutropene Mäuse zusätzlich mit Ca-074-Me behandelt werden oder mit Pneumolysin-defizienten Pneumokokken infiziert werden.

Abbildung 13: Übersicht zu den Mechanismen der IL-1 β -Produktion im Rahmen der experimentellen Pneumokokkenmeningitis



Anmerkung:

Das NLRP3-Inflammasom wird über einen Mechanismus aktiviert, der 2 Schritte beinhaltet. Zum Einen wird im sogenannten „priming step“ die Transkription von NLRP3 durch NF- κ B-induzierende Stimuli (PAMPs) hochreguliert. Zum Anderen ist ein „Aktivierungsschritt“ nötig. Dieser Schritt wird von verschiedenen Stimuli getriggert wie u.a. ATP, Nigericin oder MSU-Kristalle. Diese Stimuli führen zu ROS-Bildung, Kaliumausstrom und die Freisetzung von lysosomalem Cathepsin B in das Zytosol. Nachdem NLRP3 aktiviert wurde, oligomerisiert es zu einem Multiproteinkomplex, der das Adapterprotein ASC rekrutiert. Daraufhin oligomerisiert nun ASC und rekrutiert und aktiviert pro-Caspase-1. Daraus resultiert die Spaltung von pro-IL-1 β und pro-IL-18 und damit deren Aktivierung in die aktiven proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18.

TLR= toll-like receptor, PRR = pattern recognition receptor, PAMP = pathogen-associated molecular pattern, ROS = reactive oxygen species, LRR = leucine rich repeat, PYD = pyrin-domain, NOD = nucleotide oligomerization domain, CARD = caspase-recruitment domain. Modifiziert nach Juliana et al. (2010).

5.6 Die neutrophilen Granulozyten sind die entscheidenden Effektorzellen der Pneumokokkenmeningitis

Bei unseren Untersuchungen an neutropenen Mäusen stellten wir fest, dass die Elimination dieser Leukozytensubpopulation zu einer deutlichen Abnahme der neuropathologischen Veränderungen führte. Diese Beobachtung ist konform mit der Auffassung, dass der Meningitis-assoziierte Hirnschaden größtenteils auf eine massive, neutrophile Entzündungsreaktion zurückzuführen ist (Koedel et al. 2010a). Dieses Konzept geht auf folgende Beobachtung zurück: Im Kaninchenmodell der Pneumokokkenmeningitis konnte durch eine Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen das Adhäsionsmolekül CD18, die die Interaktion von neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen blockiert und dadurch der Einwanderung der Granulozyten in den Liquorraum entgegenwirkt (Saez-Llorens et al. 1991; Granert et al. 1994), der Meningitis-assoziierte Hirnschaden und die Sterblichkeitsrate signifikant reduziert werden (Tuomanen et al. 1989; Braun et al. 1999b). Diese Befunde wurden durch die Ergebnisse aktueller Studien an Mäusen erhärtet, bei denen die neutrophilen Granulozyten durch den Einsatz spezifischer Antikörper fast vollständig aus dem Organismus eliminiert worden waren. Die neutropenen Mäuse waren nahezu komplett vor der Entwicklung Meningitis-assoziiierter Hirnschäden geschützt: Im Vergleich zu normalen Tieren (ohne Neutrophilendepletion) zeigten die neutropenen Mäuse eine massive Reduktion der zerebralen Hämorrhagien, der Bluthirnschrankenstörung und des neuronalen Zelluntergangs im Hippocampus sowie eine erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit (Hoffmann et al. 2007; Koedel et al. 2009a; Woehrl et al. 2011). Ein vergleichbarer protektiver Effekt der Depletion von Neutrophilen wurde auch in einem Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie beobachtet (Marks et al. 2007). In diesem Modell war sie mit einem verlängerten Überleben der Versuchstiere und diskreteren histopathologischen Veränderungen in

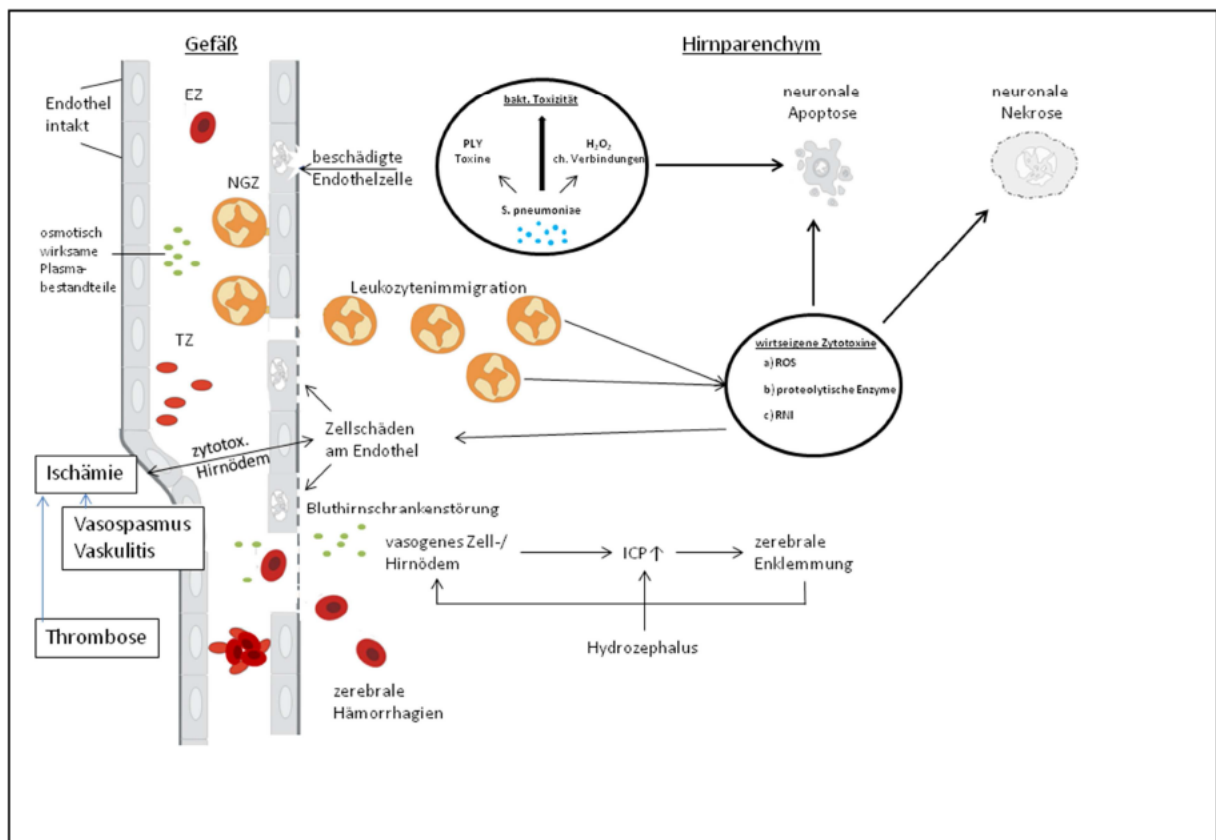
der Lunge vergesellschaftet. Dies deutet darauf hin, dass neutrophile Granulozyten im Rahmen von Pneumokokkeninfektionen unabhängig vom betroffenen Organ Gewebeschädigungen verursachen können (Koedel et al. 2009a). Beachtenswert ist jedoch, dass die Elimination der neutrophilen Granulozyten in allen Untersuchungen zur Erhöhung der bakteriellen Titer (z.B. im Gehirn und Blut) führte. Dieses Ergebnis erscheint plausibel, da die Elimination extrazellulärer Bakterien zu den zentralen Aufgaben neutrophiler Granulozyten gehört. Dieser Effekt erklärt auch, warum die pharmakologische Neutrophilendepletion keinesfalls als adjuvante Therapiestrategie bei der Pneumokokkenmeningitis in Frage kommt.

Neben den zytotoxischen Folgeerscheinungen der wirtseigenen Immunantwort („Kollateralschäden“), die vorrangig für Meningitis-assoziierte vaskuläre und kortikale Veränderungen verantwortlich sind, können auch direkte toxische Effekte der Pathogene zur Schadensentstehung beitragen. In Zellkulturexperimente wurde demonstriert, dass Pneumokokkenstämme, die weder PLY noch Wasserstoffperoxid produzieren können, weniger toxisch für Neurone, Mikroglia, Endothel- und Ependymzellen sind (Zysk et al. 2001; Braun et al. 2002; Hirst et al. 2003). Überdies wurde gezeigt, dass eine Stimulation mit diesen Toxinen einen apoptotischen Zelltod von Gehirnzellen induzieren kann (Braun et al. 2002). Weitere Unterstützung für die Rolle der bakteriellen Toxine lieferten Studien an Tiermodellen mit erwachsenen Kaninchen und Ratten. In diesen Untersuchungen ging eine Infektion mit Pneumokokkenstämmen, die kein PLY-, Autolysin- und/oder Wasserstoffperoxid bilden konnten, mit einem signifikant geringeren hippocampalen und cochleären Schaden einher als die Infektion mit den entsprechenden Wildtypstämmen (Braun et al. 2002; Hirst et al. 2003; Hirst et al. 2008). Zusammengenommen scheint der zerebrale Schaden bei der Pneumokokkenmeningitis sowohl durch die Immunantwort

des Wirts als auch durch direkte bakterielle Toxizität verursacht zu sein.

Dementsprechend sollte die ideale adjuvante Therapie der Pneumokokkenmeningitis beide Faktoren umfassen (Koedel et al. 2010b).

Abbildung 14: Übersicht zu den Mechanismen der Hirnschädigung im Rahmen der experimentellen Pneumokokkenmeningitis



Anmerkung:

Die Hirnschädigung im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis umfasst zwei kausale Komponenten. Auf der einen Seite verursachen neutrophile Granulozyten durch Freisetzung zytotoxischer Substanzen wie ROS neuropathologische Veränderungen in Form von neuronalen Nekrosen sowie endothelialen Zellschäden mit konsekutiven zerebralen Hämorrhagien, Bluthirnschrankenstörung, Hirnödemen und Ischämie aufgrund von Vasospasmen und Thrombosen. Auf der anderen Seite tragen toxische Effekte der Pneumokokken direkt zur Schadensentstehung bei. Durch bakterielle Toxine (PLY) oder chemische Verbindungen wie Wasserstoffperoxid kommt es zu neuronaler Apoptose und Endothelschäden. EZ = Erythrozyt, NGZ = neutrophiler Granulozyt, TZ = Thrombozyt, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, RNI = reaktive Stickstoffintermediate, ICP = intrakranieller Druck.

6. Zusammenfassung

Trotz effizienter antibiotischer Therapie, adjuvanter Dexamethasonbehandlung und intensivmedizinischer Betreuung ist die Pneumokokkenmeningitis weiterhin eine Erkrankung mit einer hohen Sterblichkeitsrate und häufigen neurologischen Folgeschäden. Die schlechte klinische Prognose ist im Wesentlichen auf Schädigungen des Gehirns zurückzuführen, die vorwiegend durch eine massive Entzündungsreaktion verursacht werden. Daher ist ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der Entzündungsreaktion bei der Pneumokokkenmeningitis ausschlaggebend dafür, neue Ansatzpunkte für die Entwicklung zusätzlicher Therapiemaßnahmen zu entdecken.

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde ein gut etabliertes Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis verwendet. Nach einer klinischen Eingangsuntersuchung wurden den Mäusen während einer Kurzzeitnarkose mit Isofluran Pneumokokken transkutan in die Cisterna magna injiziert. Die klinische Untersuchung umfasste folgende Parameter bzw. Tests: Körpergewicht und -temperatur, „Postural Reflex Test“ zur Bewertung der Körperhaltung, „Beam Balancing Test“ zur Beurteilung der motorischen Koordination, die Vigilanz, den Fellzustand, das Auftreten von Krampfanfällen und zur Evaluation der motorischen Aktivität den „Open Field Test“. Nach einem Beobachtungsintervall von 24 h wurden die Mäuse erneut klinisch untersucht. Anschließend wurden unter einer Ketamin/Xylazin-Narkose folgende Präparationsschritte durchgeführt: [i] Zunächst wurden die Tiere in einem stereotaktischen Rahmen fixiert, um Positionsänderungen im Laufe der Präparation zu verhindern. Daraufhin wurde das Os interparietale freigelegt und mit Hilfe eines Mikrobohrers im 60°-Winkel median ein Loch im posterioren Bereich dieser Knochenschuppe gebohrt. [ii] Über das

Bohrloch wurde ein Katheter eingeführt und Liquor gewonnen, der zur Bestimmung der Leukozytenzellzahl verwendet wurde. Konnte eine größere Menge Liquor gewonnen werden, wurde der überschüssige Anteil für weitere Untersuchungen gesammelt. Im Anschluss erfolgte über das angefertigte Bohrloch die Messung des intrakraniellen Drucks über einen Druckwandler. [iii] Zum Versuchsende wurden die Mäuse tief narkotisiert, der Brustkorb eröffnet und Blutproben zur Bluttiterbestimmung aus dem rechten Ventrikel entnommen. Danach wurden die Mäuse transkardial mit heparinierter Kochsalzlösung über einen fixierten Plastikschauch perfundiert. Im Anschluss wurden die Hirne entnommen und in einem Tiefkühlschrank weggefroren. Das Gewebematerial wurde im weiteren Projektverlauf für molekularbiologische und morphologische Analysen verwendet.

Der thematische Schwerpunkt dieser Dissertationsarbeit lag in der Charakterisierung der Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms in der Immunopathogenese der Pneumokokkenmeningitis. Dieses Thema leitete sich von früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ab, die eine herausragende Rolle der Cysteinprotease Caspase-1 in der Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis demonstriert hatten, ohne aber die Mechanismen der Aktivierung dieses Enzyms zu adressieren. Zu Beginn des Vorhabens war bekannt, dass die Aktivität der Caspase-1 innerhalb von Inflammasomen reguliert wird. Inflammasome stellen Multiproteinkomplexe dar, die als Plattform für die Aktivierung der proinflammatorischen Caspase-1 fungieren, indem sie die Protease binden und anschließend spalten. Deren aktive Form spaltet wiederum die Vorläuferzytokine pro-IL-1 β und pro-IL18 im Zytosol und generiert so reife und funktionsfähige Interleukine. Diese werden aus der Zelle freigesetzt, um nachgeschaltete inflammatorische Effekte zu vermitteln.

In einer ersten Versuchsreihe charakterisierten wir in unserem Modell der Pneumokokkenmeningitis den Phänotyp von Mäusen, denen das Adaptermolekül ASC fehlte. Diese Versuchsgruppe zeichnete sich sowohl durch eine geringere Letalität als auch durch ein milderer Krankheitsbild im Vergleich zu Wildtypieren aus. Außerdem waren intrakranielle Komplikationen wie intrazerebrale Einblutungen und der Anstieg des intrakraniellen Drucks geringer ausgeprägt. Die Reduktion der Hirnpathologie ging mit einer verminderten Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Liquor einher, was für eine Abschwächung der Entzündungsreaktion spricht. Diese Befunde spiegeln die zentrale Rolle von ASC in der Immunpathogenese der experimentellen Pneumokokkenmeningitis wider.

Frühere zellkulturelle Untersuchungen hatten gezeigt, dass [i] die Caspase-1-Aktivierung durch bakterielle Zellwandbestandteile deren Interaktion mit den beiden NOD-like-Rezeptoren NOD2 und NLRP3 erfordert, [ii] NOD2-RIP2-abhängige Signalwege zur Zellaktivierung in Folge einer Pneumokokkenexposition beitragen, und [iii] Pneumolysin NLRP3-abhängig eine Aktivierung der Caspase-1 induzieren kann. Um Aufschluss über die Rolle dieser Signalwege bei der Pneumokokkenmeningitis zu bekommen, untersuchten wir in der zweiten Versuchsreihe Mäuse, denen entweder das NLRP3- oder das RIP2-Protein fehlte. Die Ergebnisse der genetischen Depletion von NLRP3 waren vergleichbar mit denen der ASC-Depletion. Die NLRP3-Defizienz ging mit einer signifikant verringerten Immunreaktion einher, was von einer Abnahme der Meningitis-assoziierten neuropathologischen Veränderungen und einem verbesserten klinischen Verlauf begleitet wurde. Im Gegensatz dazu hatte die genetische Depletion von RIP2 keinen Effekt auf den klinischen Verlauf, die Meningitis-assoziierte Hirnpathologie und die Leukozyteninfiltration im Liquorraum. Somit scheint NLRP3, nicht aber RIP2 (und

RIP2-abhängige Signalwege) eine tragende Rolle in der Immunpathogenese der experimentellen Pneumokokkenmeningitis zuzukommen.

In einer dritten Versuchsreihe, in der Mäuse mit spezifischen Inhibitoren von Zytokinen der IL-1-Familie (Anakinra und rIL-18BP) behandelt wurden, konnten wir zeigen, dass die Zytokine IL-1 β und IL-18, wichtige Endprodukte der NLRP3-Inflammasom-Signalkaskade, entscheidend zur entzündlichen Reaktion und deren Begleitschäden beitragen. Die pharmakologische IL-1R-Blockade führte zu einer signifikanten Reduktion des Meningitis-induzierten ICP-Anstiegs und der Liquorzellzahl. Allerdings zeigte sich nur eine Tendenz, aber keine Signifikanz hinsichtlich der Verbesserung der klinischen und neuropathologischen Scorewerte. Durch die zusätzliche Inhibition von IL-18 konnte die Liquorpleozytose weiter verringert werden. Dieser stärker ausgeprägte antiinflammatorische Effekt war als Zeichen einer klinischen Verbesserung von signifikant geringeren klinischen und neuropathologischen Scorewerten begleitet. Der Phänotyp der kombinierten IL-1R- und IL-18-Blockade ähnelte denen der ASC- und NLRP3-Defizienz. Daraus schlossen wir, dass die protektiven Effekte der ASC- und NLRP3-Defizienz bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis auf die fehlende biologische Aktivität beider Zytokine zurückzuführen sind.

Bei zellkulturellen Untersuchungen hatte unsere Arbeitsgruppe beobachtet, dass die Pneumokokken-induzierte Caspase-1-Aktivierung entscheidend von der Aktivität der lysosomalen Protease Cathepsin B und der Wirkung des bakteriellen Zytotoxins Pneumolysin abhing. Um die Gültigkeit dieser Beobachtung bei der Pneumokokkenmeningitis zu überprüfen, führten wir Versuchsreihen durch, bei denen entweder Cathepsin B medikamentös inhibiert oder eine Versuchsgruppe mit einem PLY-defizienten Pneumokokkenstamm infiziert wurde. Durch die

pharmakologische Inhibition von Cathepsin B konnte eine Linderung des klinischen Krankheitsverlaufs, eine Abnahme der neuropathologischen Veränderungen, sowie eine Reduktion der Liquorpleozytose und der IL-1 β -Konzentrationen in unserem Meningitismausmodell erzielt werden. Einen vergleichbaren Phänotyp beobachteten wir, wenn wir Mäusen anstelle eines Wildtypstamms dessen isogene, PLY-defiziente Mutante intrazisternal injizierten. Beide Faktoren scheinen also eine wichtige Rolle in der Produktion von IL-1 β und dadurch in der Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis zu spielen. Im Mausmodell hatte die PLY-Defizienz und die Cathepsin B-Inhibition jeweils nur zu einer Abnahme der zerebralen IL-1 β -Konzentrationen um etwa 50% geführt, während bei den Untersuchungen an Makrophagen beide Strategien mit einer nahezu kompletten Blockade der IL-1 β -Freisetzung einhergingen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Pneumokokkenmeningitis durch eine neutrophile Entzündungsreaktion gekennzeichnet ist, neutrophile Granulozyten aber auch über Caspase-1-unabhängige Wege zur IL-1 β -Generierung verfügen. Zur Überprüfung dieser Hypothese behandelten wir in einer abschließenden Versuchsreihe eine Gruppe von Tieren mit einem monoklonalen Antikörper gegen neutrophile Granulozyten. Diese Behandlungsmaßnahme hatte eine stark verminderte IL-1 β -Produktion zur Folge. Daran machten wir fest, dass Granulozyten eine wichtige IL-1 β -Quelle darstellen und IL-1 β möglicherweise auch Caspase-1-unabhängig freisetzen.

Zusammenfassend zeigte unsere Studie, dass [i] das NLRP3-Inflammasom eine zentrale Position in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis einnimmt, [ii] die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 die NLRP3-Inflammasom-abhängigen Effekte vermitteln, und [iii] die lysosomale Protease Cathepsin B sowie das Pneumokokkentoxin PLY eine wichtige Funktion bei der Aktivierung des NLRP3-

Inflammasoms spielen. Gezielte therapeutische Eingriffe in diese Signalkaskade könnten ein vielversprechendes Ziel für eine adjuvante Therapie dieser Erkrankung darstellen, da die Blockade bzw. genetische Inaktivierung dieser Signalkaskade mit einer Reduktion der klinisch wichtigen intrakraniellen Komplikationen und einer Verbesserung des klinischen Verlaufs im Mausmodell einherging.

7. Ausblick

Bei unseren Untersuchungen im Rahmen des Dissertationsvorhabens stellten wir fest, dass die lysosomale Protease Cathepsin B eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms bei der Pneumokokkenmeningitis spielt. Nicht geklärt ist derzeit, auf welche Art und Weise Cathepsin B zur NLRP3-Inflammasomaktivierung beiträgt. Dazu wären verschiedene Mechanismen denkbar. Zum einen müsste beispielsweise untersucht werden, ob Cathepsin B einen vermeintlichen NLRP3-Inhibitor im Zytosol abbaut und es so zur Entthemmung des NLRP3-Inflammasoms kommt. Zum anderen wäre denkbar, dass Cathepsin B ein Substrat im Zytosol spaltet, das dann selbst als NLRP3-Ligand fungiert und so über dessen Bindung an NLRP3 zur Aktivierung des Inflammasoms führt (Hornung und Latz 2010).

Unsere Untersuchungen deuteten ferner daraufhin, dass PLY nicht nur die Generierung von biologisch aktivem IL-1 β , sondern auch dessen Expression induzieren kann. In der Fachliteratur finden sich widersprüchliche Ergebnisse zu den Mechanismen der Hochregulation der IL-1 β -Expression: einige Arbeiten implizierten TLR4, andere fanden keine Hinweise auf dessen Funktion, wieder andere zeigten eine Beteiligung von TLR2-abhängigen Signalwegen. Es sind folglich noch weitere Untersuchungen notwendig, um definitiv zu klären, wie der Wirt die Präsenz des zytolytischen Virulenzfaktors PLY erkennt. Hier gilt es beispielsweise, alle PRRs zu identifizieren, die an der Detektion von PLY-produzierenden versus PLY-defizienten Pneumokokkenstämmen sowie rekombinanten Pneumolysinen beteiligt sind (TLR4 vs. TLR2 vs. andere) (Malley et al. 2003; Witzentrath et al. 2011).

Unsere Ergebnisse lieferten zudem klare Hinweise dafür, dass die PLY-induzierte

Caspase-1-Aktivierung Cathepsin B abhängig erfolgt. Allerdings ist der genaue Mechanismus, über den PLY die Freisetzung von Cathepsin B aus den Lysosomen verursacht, noch nicht vollständig aufgedeckt. Möglich wäre sowohl eine direkte Schädigung der Lysosomen durch das Membranporen-bildende Toxin als auch ein indirekter Prozess, der z.B. die Pneumolysin-getriggerte Freisetzung von ATP in den Extrazellulärraum und die konsekutive Aktivierung von Purinorezeptoren beinhaltet.

Ferner beobachteten wir, dass die IL-1 β -Produktion in Hirnen von Mäusen, die mit Ca-074-Me behandelt oder mit Pneumolysin-defizienten Bakterien infiziert worden waren, weniger stark abnahm als in vergleichbaren Zellkulturexperimenten an Makrophagen. Da neutrophile Granulozyten der vorherrschende Zelltyp im entzündlichen Infiltrat bei der Pneumokokkenmeningitis sind, könnte dieser Unterschied auf einen Caspase-1-unabhängigen Generierungsweg in neutrophilen Granulozyten zurückzuführen sein. Zur weiteren Klärung dieser Hypothese sind in unserer Arbeitsgruppe Untersuchungen an murinen Granulozyten und Makrophagen geplant. In diesen Experimenten soll überprüft werden, welche Rolle der Caspase-1 bzw. dem NLRP3-Inflammasom bei der Pneumokokken-induzierten IL-1 β -Produktion in den jeweiligen Zelltypen zukommt. In einer weiteren Versuchsreihe soll der Frage nachgegangen werden, ob die IL-1 β -Produktion im Mausmodell komplett zu Erliegen kommt, wenn neutropene Mäuse zusätzlich mit Ca-074-Me behandelt werden oder aber mit Pneumolysin-defizienten Pneumokokken infiziert werden.

8. Literaturverzeichnis

- Abbate, A., F. N. Salloum, et al. (2008). "Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction." *Circulation* **117**(20): 2670-2683.
- Abbott, N. J., A. A. Patabendige, et al. (2010). "Structure and function of the blood-brain barrier." *Neurobiol Dis* **37**(1): 13-25.
- Agrawal, S. and S. Nadel (2011). "Acute bacterial meningitis in infants and children: epidemiology and management." *Paediatr Drugs* **13**(6): 385-400.
- Allen, I. C., M. A. Scull, et al. (2009). "The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA." *Immunity* **30**(4): 556-565.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, et al. (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." *Cell* **87**(2): 171.
- Amaral, F. A., V. V. Costa, et al. (2012). "NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout." *Arthritis Rheum* **64**(2): 474-484.
- Andersson, B., J. Dahmen, et al. (1983). "Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells." *J Exp Med* **158**(2): 559-570.
- Arda, B., O. R. Sipahi, et al. (2008). "Pooled analysis of 2,408 cases of acute adult purulent meningitis from Turkey." *Med Princ Pract* **17**(1): 76-79.
- Aroian, R. and F. G. van der Goot (2007). "Pore-forming toxins and cellular non-immune defenses (CNIDs)." *Curr Opin Microbiol* **10**(1): 57-61.
- Barichello, T., J. S. Generoso, et al. (2012). "Pathophysiology of acute meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* and adjunctive therapy approaches." *Arq Neuropsiquiatr* **70**(5): 366-372.
- Barnich, N., J. E. Aguirre, et al. (2005). "Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- κ B activation in muramyl dipeptide recognition." *J Cell Biol* **170**(1): 21-26.
- Bauernfeind, F. G., G. Horvath, et al. (2009). "Cutting edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression." *J Immunol* **183**(2): 787-791.
- Bederson, J. B., L. H. Pitts, et al. (1986). "Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination." *Stroke* **17**(3): 472-476.
- Bhimraj, A. (2012). "Acute community-acquired bacterial meningitis in adults: An evidence-based review." *Cleve Clin J Med* **79**(6): 393-400.
- Braun, J. S., R. Novak, et al. (1999a). "Pneumolysin, a protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*, induces nitric oxide production from macrophages." *Infect Immun* **67**(8): 3750-3756.
- Braun, J. S., R. Novak, et al. (1999b). "Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis." *Nat Med* **5**(3): 298-302.
- Braun, J. S., J. E. Sublett, et al. (2002). "Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis." *J Clin Invest* **109**(1): 19-27.
- Bresnihan, B. (2001). "The safety and efficacy of interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis." *Semin Arthritis Rheum* **30**(5 Suppl 2): 17-20.
- Bresnihan, B. (2002). "Effects of anakinra on clinical and radiological outcomes in rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* **61** Suppl 2: ii74-77.

- Brouwer, M. C., S. G. Heckenberg, et al. (2010a). "Nationwide implementation of adjunctive dexamethasone therapy for pneumococcal meningitis." Neurology **75**(17): 1533-1539.
- Brouwer, M. C., P. McIntyre, et al. (2010b). "Corticosteroids for acute bacterial meningitis." Cochrane Database Syst Rev(9): CD004405.
- Bruchard, M., G. Mignot, et al. (2013). "Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth." Nat Med **19**(1): 57-64.
- Buttle, D. J., M. Murata, et al. (1992). "CA074 methyl ester: a proinhibitor for intracellular cathepsin B." Arch Biochem Biophys **299**(2): 377-380.
- Cassel, S. L., S. C. Eisenbarth, et al. (2008). "The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(26): 9035-9040.
- Ceballos-Olvera, I., M. Sahoo, et al. (2011). "Inflammasome-dependent pyroptosis and IL-18 protect against *Burkholderia pseudomallei* lung infection while IL-1beta is deleterious." PLoS Pathog **7**(12): e1002452.
- Chu, J., L. M. Thomas, et al. (2009). "Cholesterol-dependent cytolysins induce rapid release of mature IL-1beta from murine macrophages in a NLRP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner." J Leukoc Biol **86**(5): 1227-1238.
- Cockeran, R., C. Durandt, et al. (2002). "Pneumolysin activates the synthesis and release of interleukin-8 by human neutrophils in vitro." J Infect Dis **186**(4): 562-565.
- Cockeran, R., A. J. Theron, et al. (2001). "Proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils." J Infect Dis **183**(4): 604-611.
- Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." Biochem J **326** (Pt 1): 1-16.
- Craven, R. R., X. Gao, et al. (2009). "Staphylococcus aureus alpha-hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells." PLoS One **4**(10): e7446.
- Cruz, C. M., A. Rinna, et al. (2007). "ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages." J Biol Chem **282**(5): 2871-2879.
- Cundell, D. R., N. P. Gerard, et al. (1995). "Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor." Nature **377**(6548): 435-438.
- Daneman, R. (2012). "The blood-brain barrier in health and disease." Ann Neurol **72**(5): 648-672.
- Davis, K. M., S. Nakamura, et al. (2011). "Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice." J Clin Invest **121**(9): 3666-3676.
- Dawson, K. G., J. C. Emerson, et al. (1999). "Fifteen years of experience with bacterial meningitis." Pediatr Infect Dis J **18**(9): 816-822.
- de Gans, J. and D. van de Beek (2002). "Dexamethasone in adults with bacterial meningitis." N Engl J Med **347**(20): 1549-1556.
- de Rivero Vaccari, J. P., D. Bastien, et al. (2012). "P2X4 receptors influence inflammasome activation after spinal cord injury." J Neurosci **32**(9): 3058-3066.
- Denes, A., G. Lopez-Castejon, et al. (2012). "Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg?" Cell Death Dis **3**: e338.

- Dery, M. A. and R. Hasbun (2007). "Changing epidemiology of bacterial meningitis." Curr Infect Dis Rep **9**(4): 301-307.
- Dessing, M. C., R. A. Hirst, et al. (2009). "Role of Toll-like receptors 2 and 4 in pulmonary inflammation and injury induced by pneumolysin in mice." PLoS One **4**(11): e7993.
- Dinarello, C. A. (1998). "Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme." Ann N Y Acad Sci **856**: 1-11.
- Dinarello, C. A. (2007). "A signal for the caspase-1 inflammasome free of TLR." Immunity **26**(4): 383-385.
- Dinarello, C. A. (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." Annu Rev Immunol **27**: 519-550.
- Dinarello, C. A. (2010). "IL-1: discoveries, controversies and future directions." Eur J Immunol **40**(3): 599-606.
- Dinarello, C. A. (2011). "Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases." Blood **117**(14): 3720-3732.
- Dostert, C., V. Petrilli, et al. (2008). "Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica." Science **320**(5876): 674-677.
- Dowling, J. K. and L. A. O'Neill (2012). "Biochemical regulation of the inflammasome." Crit Rev Biochem Mol Biol **47**(5): 424-443.
- Doyle, S. L., M. Campbell, et al. (2012). "NLRP3 has a protective role in age-related macular degeneration through the induction of IL-18 by drusen components." Nat Med **18**(5): 791-798.
- Duewell, P., H. Kono, et al. (2010). "NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals." Nature **464**(7293): 1357-1361.
- Dujardin, B. C., P. C. Driedijk, et al. (1985). "The determination of the complement components C1q, C4 and C3 in serum and cerebrospinal fluid by radioimmunoassay." J Immunol Methods **80**(2): 227-237.
- Duncan, J. A., X. Gao, et al. (2009). "Neisseria gonorrhoeae activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome." J Immunol **182**(10): 6460-6469.
- Eberhardt, J. L., B. R. Persson, et al. (2008). "Blood-brain barrier permeability and nerve cell damage in rat brain 14 and 28 days after exposure to microwaves from GSM mobile phones." Electromagn Biol Med **27**(3): 215-229.
- Ekert, P. G., J. Silke, et al. (1999). "Caspase inhibitors." Cell Death Differ **6**(11): 1081-1086.
- El-Rachkidy, R. G., N. W. Davies, et al. (2008). "Pneumolysin generates multiple conductance pores in the membrane of nucleated cells." Biochem Biophys Res Commun **368**(3): 786-792.
- Fairhead, T., D. Lian, et al. (2008). "RIP2 is required for NOD signaling but not for Th1 cell differentiation and cellular allograft rejection." Am J Transplant **8**(6): 1143-1150.
- Fang, R., K. Tsuchiya, et al. (2011). "Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to Streptococcus pneumoniae infection." J Immunol **187**(9): 4890-4899.
- Fassbender, K., O. Mielke, et al. (1999). "Interferon-gamma-inducing factor (IL-18) and interferon-gamma in inflammatory CNS diseases." Neurology **53**(5): 1104-1106.
- Feeney, D. M., A. Gonzalez, et al. (1982). "Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury." Science **217**(4562): 855-857.

- Franchi, L., T. Eigenbrod, et al. (2009). "The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis." Nat Immunol **10**(3): 241-247.
- Franchi, L., R. Munoz-Planillo, et al. (2012). "Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes." Nat Immunol **13**(4): 325-332.
- Freche, B., N. Reig, et al. (2007). "The role of the inflammasome in cellular responses to toxins and bacterial effectors." Semin Immunopathol **29**(3): 249-260.
- Friedland, I. R., M. M. Paris, et al. (1995). "The limited role of pneumolysin in the pathogenesis of pneumococcal meningitis." J Infect Dis **172**(3): 805-809.
- Gabay, C., C. Lamacchia, et al. (2010). "IL-1 pathways in inflammation and human diseases." Nat Rev Rheumatol **6**(4): 232-241.
- Garcia, P., M. Paz Gonzalez, et al. (1999). "The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains." Mol Microbiol **33**(1): 128-138.
- Gould, T. D., K. C. O'Donnell, et al. (2008). "Involvement of AMPA receptors in the antidepressant-like effects of lithium in the mouse tail suspension test and forced swim test." Neuropharmacology **54**(3): 577-587.
- Granert, C., J. Raud, et al. (1994). "Inhibition of leukocyte rolling with polysaccharide fucoidin prevents pleocytosis in experimental meningitis in the rabbit." J Clin Invest **93**(3): 929-936.
- Greten, F. R., M. C. Arkan, et al. (2007). "NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta." Cell **130**(5): 918-931.
- Grimwood, K., P. Anderson, et al. (2000). "Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects." Arch Dis Child **83**(2): 111-116.
- Gris, D., Z. Ye, et al. (2010). "NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses." J Immunol **185**(2): 974-981.
- Gross, O., H. Poeck, et al. (2009). "Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence." Nature **459**(7245): 433-436.
- Gross, O., C. J. Thomas, et al. (2011). "The inflammasome: an integrated view." Immunol Rev **243**(1): 136-151.
- Guillemin, G. J. and B. J. Brew (2004). "Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification." J Leukoc Biol **75**(3): 388-397.
- Guma, M., L. Ronacher, et al. (2009). "Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation." Arthritis Rheum **60**(12): 3642-3650.
- Hacke, W. and K. Poeck (2010). Neurologie mit ... 83 Tabellen. Heidelberg, Springer.
- Halle, A., V. Hornung, et al. (2008). "The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta." Nat Immunol **9**(8): 857-865.
- Hammerschmidt, S. u. U. K. (2009). Pathogenese und Pathophysiologie der akuten bakteriellen Meningitis. Akute bakterielle Meningitis. U. u. M. F. Vogel, Uni-Med Verlag. **2. Auflage**: 30-53.
- Hanamsagar, R., V. Torres, et al. (2011). "Inflammasome activation and IL-1beta/IL-18 processing are influenced by distinct pathways in microglia." J Neurochem **119**(4): 736-748.

- Hara, H., R. M. Friedlander, et al. (1997). "Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 2007-2012.
- Harder, J., L. Franchi, et al. (2009). "Activation of the Nlrp3 inflammasome by *Streptococcus pyogenes* requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor." J Immunol **183**(9): 5823-5829.
- Hazuda, D. J., J. C. Lee, et al. (1988). "The kinetics of interleukin 1 secretion from activated monocytes. Differences between interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta." J Biol Chem **263**(17): 8473-8479.
- Hentze, H., X. Y. Lin, et al. (2003). "Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin." Cell Death Differ **10**(9): 956-968.
- Heuck, A. P., P. C. Moe, et al. (2010). "The cholesterol-dependent cytolysin family of gram-positive bacterial toxins." Subcell Biochem **51**: 551-577.
- Hewinson, J., S. F. Moore, et al. (2008). "A key role for redox signaling in rapid P2X7 receptor-induced IL-1 beta processing in human monocytes." J Immunol **180**(12): 8410-8420.
- Hirst, R. A., B. Gosai, et al. (2003). "Streptococcus pneumoniae damages the ciliated ependyma of the brain during meningitis." Infect Immun **71**(10): 6095-6100.
- Hirst, R. A., B. Gosai, et al. (2008). "Streptococcus pneumoniae deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis." J Infect Dis **197**(5): 744-751.
- Hoegen, T., N. Tremel, et al. (2011). "The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release." J Immunol **187**(10): 5440-5451.
- Hoffmann, O., J. Priller, et al. (2007). "TRAIL limits excessive host immune responses in bacterial meningitis." J Clin Invest **117**(7): 2004-2013.
- Hook, V., T. Toneff, et al. (2005). "Inhibition of cathepsin B reduces beta-amyloid production in regulated secretory vesicles of neuronal chromaffin cells: evidence for cathepsin B as a candidate beta-secretase of Alzheimer's disease." Biol Chem **386**(9): 931-940.
- Hornung, V., F. Bauernfeind, et al. (2008). "Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization." Nat Immunol **9**(8): 847-856.
- Hornung, V. and E. Latz (2010). "Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation." Eur J Immunol **40**(3): 620-623.
- Hotze, E. M. and R. K. Tweten (2012). "Membrane assembly of the cholesterol-dependent cytolysin pore complex." Biochim Biophys Acta **1818**(4): 1028-1038.
- Houldsworth, S., P. W. Andrew, et al. (1994). "Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes." Infect Immun **62**(4): 1501-1503.
- Huang, Y., D. E. Smith, et al. (2011). "Neuron-specific effects of interleukin-1beta are mediated by a novel isoform of the IL-1 receptor accessory protein." J Neurosci **31**(49): 18048-18059.
- Idanpaan-Heikkila, I., P. M. Simon, et al. (1997). "Oligosaccharides interfere with the establishment and progression of experimental pneumococcal pneumonia." J Infect Dis **176**(3): 704-712.

- Inoue, M. and M. L. Shinohara (2013). "NLRP3 Inflammasome and MS/EAE." Autoimmune Dis **2013**: 859145.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." Immunol Today **13**(1): 11-16.
- Jha, S., S. Y. Srivastava, et al. (2010). "The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18." J Neurosci **30**(47): 15811-15820.
- Johansson, P. A., K. M. Dziegielewska, et al. (2008). "The blood-CSF barrier explained: when development is not immaturity." Bioessays **30**(3): 237-248.
- Johnston, M., A. Zakharov, et al. (2004). "Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species." Cerebrospinal Fluid Res **1**(1): 2.
- Jounblat, R., A. Kadioglu, et al. (2003). "Pneumococcal behavior and host responses during bronchopneumonia are affected differently by the cytolytic and complement-activating activities of pneumolysin." Infect Immun **71**(4): 1813-1819.
- Juliana, C., T. Fernandes-Alnemri, et al. (2010). "Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome." J Biol Chem **285**(13): 9792-9802.
- Kadioglu, A., J. N. Weiser, et al. (2008). "The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease." Nat Rev Microbiol **6**(4): 288-301.
- Kahlenberg, J. M. and G. R. Dubyak (2004). "Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release." Am J Physiol Cell Physiol **286**(5): C1100-1108.
- Kanneganti, T. D., M. Body-Malapel, et al. (2006). "Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA." J Biol Chem **281**(48): 36560-36568.
- Kasanmoentalib, E. S., M. C. Brouwer, et al. (2013). "Update on bacterial meningitis: epidemiology, trials and genetic association studies." Curr Opin Neurol **26**(3): 282-288.
- Kastenbauer, S. and H. W. Pfister (2003). "Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases." Brain **126**(Pt 5): 1015-1025.
- Kimura, T., Z. Kato, et al. (2008). "Expression, purification and structural analysis of human IL-18 binding protein: a potent therapeutic molecule for allergy." Allergol Int **57**(4): 367-376.
- Klein, M., U. Koedel, et al. (2006a). "Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy?" Prog Neurobiol **80**(6): 269-280.
- Klein, M., B. Obermaier, et al. (2008). "Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4." J Infect Dis **198**(7): 1028-1036.
- Klein, M., R. Paul, et al. (2006b). "Protein expression pattern in experimental pneumococcal meningitis." Microbes Infect **8**(4): 974-983.
- Klein, M., H. W. Pfister, et al. (2009). "Therapy of community-acquired acute bacterial meningitis: the clock is running." Expert Opin Pharmacother **10**(16): 2609-2623.
- Koedel, U., T. Frankenberg, et al. (2009a). "Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis." PLoS Pathog **5**(5): e1000461.

- Koedel, U., M. Klein, et al. (2009b). "Akute bakterielle Meningitis: Neues aus Forschung und Klinik." Akt Neurol **36**(EFirst): 381-396.
- Koedel, U., M. Klein, et al. (2010a). "New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis." Curr Opin Infect Dis **23**(3): 217-223.
- Koedel, U., M. Klein, et al. (2010b). "Modulation of brain injury as a target of adjunctive therapy in bacterial meningitis." Curr Infect Dis Rep **12**(4): 266-273.
- Koedel, U., T. Rupprecht, et al. (2004). "MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS." Brain **127**(Pt 6): 1437-1445.
- Koedel, U., W. M. Scheld, et al. (2002a). "Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis." Lancet Infect Dis **2**(12): 721-736.
- Koedel, U., F. Winkler, et al. (2002b). "Role of Caspase-1 in experimental pneumococcal meningitis: Evidence from pharmacologic Caspase inhibition and Caspase-1-deficient mice." Ann Neurol **51**(3): 319-329.
- Koedel, U., F. Winkler, et al. (2002c). "Meningitis-associated central nervous system complications are mediated by the activation of poly(ADP-ribose) polymerase." J Cereb Blood Flow Metab **22**(1): 39-49.
- Krams, M. (2010). Kurzlehrbuch Pathologie
126 Tabellen. Stuttgart [u.a.], Thieme.
- Krumm, B., X. Meng, et al. (2012). "A unique bivalent binding and inhibition mechanism by the yatapoxvirus interleukin 18 binding protein." PLoS Pathog **8**(8): e1002876.
- Kuida, K., J. A. Lippke, et al. (1995). "Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme." Science **267**(5206): 2000-2003.
- Lamkanfi, M. and V. M. Dixit (2012). "Inflammasomes and their roles in health and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **28**: 137-161.
- Lamkanfi, M., J. L. Mueller, et al. (2009). "Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome." J Cell Biol **187**(1): 61-70.
- Latz, E. (2010). "The inflammasomes: mechanisms of activation and function." Curr Opin Immunol **22**(1): 28-33.
- Lee, H. M., J. Kang, et al. (2013). "Microglial activation of the NLRP3 inflammasome by the priming signals derived from macrophages infected with mycobacteria." Glia **61**(3): 441-452.
- Li, J. Y., R. J. Boado, et al. (2001). "Blood-brain barrier genomics." J Cereb Blood Flow Metab **21**(1): 61-68.
- Li, P., H. Allen, et al. (1995). "Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock." Cell **80**(3): 401-411.
- Lippai, D., S. Bala, et al. (2013). "Alcohol-induced IL-1beta in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation." J Leukoc Biol.
- Liu, X., V. S. Chauhan, et al. (2010). "NOD2 mediates inflammatory responses of primary murine glia to *Streptococcus pneumoniae*." Glia **58**(7): 839-847.
- Liu, Z., M. H. Zaki, et al. (2012). "Role of inflammasomes in host defense against *Citrobacter rodentium* infection." J Biol Chem **287**(20): 16955-16964.
- Lopez, R., M. P. Gonzalez, et al. (2000). "Biological roles of two new murein hydrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling." Res Microbiol **151**(6): 437-443.

- Los, M., S. Wesselborg, et al. (1999). "The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice." Immunity **10**(6): 629-639.
- Lupfer, C., P. G. Thomas, et al. (2013). "Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection." Nat Immunol **14**(5): 480-488.
- Malley, R., P. Henneke, et al. (2003). "Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1966-1971.
- Mariathasan, S., K. Newton, et al. (2004). "Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf." Nature **430**(6996): 213-218.
- Mariathasan, S., D. S. Weiss, et al. (2006). "Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP." Nature **440**(7081): 228-232.
- Marks, M., T. Burns, et al. (2007). "Influence of neutropenia on the course of serotype 8 pneumococcal pneumonia in mice." Infect Immun **75**(4): 1586-1597.
- Marriott, H. M., T. J. Mitchell, et al. (2008). "Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction." Curr Mol Med **8**(6): 497-509.
- Martinon, F., K. Burns, et al. (2002). "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." Mol Cell **10**(2): 417-426.
- Martinon, F., A. Mayor, et al. (2009). "The inflammasomes: guardians of the body." Annu Rev Immunol **27**: 229-265.
- Martinon, F., V. Petrilli, et al. (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." Nature **440**(7081): 237-241.
- Martinon, F. and J. Tschopp (2007). "Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation." Cell Death Differ **14**(1): 10-22.
- Masters, S. L., A. Dunne, et al. (2010). "Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes." Nat Immunol **11**(10): 897-904.
- Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." Science **296**(5566): 301-305.
- McGreal, E. P., J. L. Miller, et al. (2005). "Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors." Curr Opin Immunol **17**(1): 18-24.
- McNeela, E. A., A. Burke, et al. (2010). "Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4." PLoS Pathog **6**(11): e1001191.
- Medawar, P. B. (1948). "Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye." Br J Exp Pathol **29**(1): 58-69.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." Curr Opin Immunol **9**(1): 4-9.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (2002). "Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system." Science **296**(5566): 298-300.
- Meissner, F., K. Molawi, et al. (2010). "Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1beta accelerates ALS pathogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(29): 13046-13050.
- Meixenberger, K., F. Pache, et al. (2010). "Listeria monocytogenes-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1beta, depending on listeriolysin O and NLRP3." J Immunol **184**(2): 922-930.

- Menu, P. and J. E. Vince (2011). "The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly." Clin Exp Immunol **166**(1): 1-15.
- Meylan, E. and J. Tschopp (2005). "The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress." Trends Biochem Sci **30**(3): 151-159.
- Miller, B. E., P. A. Krasney, et al. (1995). "Inhibition of mature IL-1 beta production in murine macrophages and a murine model of inflammation by WIN 67694, an inhibitor of IL-1 beta converting enzyme." J Immunol **154**(3): 1331-1338.
- Miller, L. S., E. M. Pietras, et al. (2007). "Inflammasome-mediated production of IL-1beta is required for neutrophil recruitment against Staphylococcus aureus in vivo." J Immunol **179**(10): 6933-6942.
- Mitchell, A. M. and T. J. Mitchell (2010). "Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation." Clin Microbiol Infect **16**(5): 411-418.
- Mitchell, T. J., P. W. Andrew, et al. (1991). "Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein." Mol Microbiol **5**(8): 1883-1888.
- Montaser, M., G. Lalmanach, et al. (2002). "CA-074, but not its methyl ester CA-074Me, is a selective inhibitor of cathepsin B within living cells." Biol Chem **383**(7-8): 1305-1308.
- Mook-Kanamori, B. B., M. Geldhoff, et al. (2011). "Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis." Clin Microbiol Rev **24**(3): 557-591.
- Moreira, L. O., K. C. El Kasmi, et al. (2008). "The TLR2-MyD88-NOD2-RIPK2 signalling axis regulates a balanced pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory cytokine response to Gram-positive cell walls." Cell Microbiol **10**(10): 2067-2077.
- Mukhopadhyay, S. and S. Gordon (2004). "The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity." Immunobiology **209**(1-2): 39-49.
- Munoz-Planillo, R., L. Franchi, et al. (2009). "A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in Staphylococcus aureus-induced activation of the Nlrp3 inflammasome." J Immunol **183**(6): 3942-3948.
- Muruve, D. A., V. Petrilli, et al. (2008). "The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response." Nature **452**(7183): 103-107.
- Mustafa, M. M., M. H. Lebel, et al. (1989). "Correlation of interleukin-1 beta and cachectin concentrations in cerebrospinal fluid and outcome from bacterial meningitis." J Pediatr **115**(2): 208-213.
- Nagai, A., Y. Murakawa, et al. (2000). "Cystatin C and cathepsin B in CSF from patients with inflammatory neurologic diseases." Neurology **55**(12): 1828-1832.
- Neven, B., A. M. Prieur, et al. (2008). "Cryopyrinopathies: update on pathogenesis and treatment." Nat Clin Pract Rheumatol **4**(9): 481-489.
- Newman, Z. L., S. H. Leppla, et al. (2009). "CA-074Me protection against anthrax lethal toxin." Infect Immun **77**(10): 4327-4336.
- Niederhorn, J. Y. (2006). "See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege." Nat Immunol **7**(4): 354-359.
- Opitz, B., A. Puschel, et al. (2004). "Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized Streptococcus pneumoniae." J Biol Chem **279**(35): 36426-36432.
- Pachter, J. S., H. E. de Vries, et al. (2003). "The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system." J Neuropathol Exp Neurol **62**(6): 593-604.

- Palmer, A. M. (2010). "The role of the blood-CNS barrier in CNS disorders and their treatment." Neurobiol Dis **37**(1): 3-12.
- Pan, Q., J. Mathison, et al. (2007). "MDP-induced interleukin-1beta processing requires Nod2 and CIAS1/NALP3." J Leukoc Biol **82**(1): 177-183.
- Pashenkov, M. and H. Link (2002). "Dendritic cells and immune responses in the central nervous system." Trends Immunol **23**(2): 69-70; author reply 70.
- Paton, J. C., B. Rowan-Kelly, et al. (1984). "Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin." Infect Immun **43**(3): 1085-1087.
- Paul, S. P. and L. S. Lamont (2012). "Clear and present danger: in childhood meningitis. The importance of Hib immunisation in infancy and high-risk groups." J Fam Health Care **22**(2): 16-19.
- Paulus, W. (2012). Neuropathologie.
- Perregaux, D., J. Barberia, et al. (1992). "IL-1 beta maturation: evidence that mature cytokine formation can be induced specifically by nigericin." J Immunol **149**(4): 1294-1303.
- Perregaux, D. and C. A. Gabel (1994). "Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity." J Biol Chem **269**(21): 15195-15203.
- Petrilli, V., S. Papin, et al. (2007). "Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration." Cell Death Differ **14**(9): 1583-1589.
- Pfister, E. u. H.-W. (2003, 2010/08/16). "AWMF-Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie: bakterielle (eitrige) Meningoenzephalitis." Retrieved 02/01, 2013, from <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/030-089.html>.
- Pfister, H. W., W. Feiden, et al. (1993). "Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. Results of a prospective clinical study." Arch Neurol **50**(6): 575-581.
- Piccini, A., S. Carta, et al. (2008). "ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(23): 8067-8072.
- Pintaux, E., L. C. Parker, et al. (2002). "Expression of interleukin-1 receptors and their role in interleukin-1 actions in murine microglial cells." J Neurochem **83**(4): 754-763.
- Proulx, N., D. Frechette, et al. (2005). "Delays in the administration of antibiotics are associated with mortality from adult acute bacterial meningitis." QJM **98**(4): 291-298.
- Quagliarello, V. J., B. Wispelwey, et al. (1991). "Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor." J Clin Invest **87**(4): 1360-1366.
- Rajamaki, K., J. Lappalainen, et al. (2010). "Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation." PLoS One **5**(7): e11765.
- Ramilo, O., X. Saez-Llorens, et al. (1990). "Tumor necrosis factor alpha/cachectin and interleukin 1 beta initiate meningeal inflammation." J Exp Med **172**(2): 497-507.
- Reiser, J., B. Adair, et al. (2010). "Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease." J Clin Invest **120**(10): 3421-3431.

- Reiss, A., J. S. Braun, et al. (2011). "Bacterial pore-forming cytolysins induce neuronal damage in a rat model of neonatal meningitis." J Infect Dis **203**(3): 393-400.
- Riesenfeld-Orn, I., S. Wolpe, et al. (1989). "Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components." Infect Immun **57**(7): 1890-1893.
- Ring, A., J. N. Weiser, et al. (1998). "Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway." J Clin Invest **102**(2): 347-360.
- Risau, W., S. Esser, et al. (1998). "Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells." Pathol Biol (Paris) **46**(3): 171-175.
- Rodriguez, A. F., S. L. Kaplan, et al. (1991). "Hematogenous pneumococcal meningitis in the infant rat: description of a model." J Infect Dis **164**(6): 1207-1209.
- Rubartelli, A., F. Cozzolino, et al. (1990). "A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence." EMBO J **9**(5): 1503-1510.
- Rubin, L. L. and J. M. Staddon (1999). "The cell biology of the blood-brain barrier." Annu Rev Neurosci **22**: 11-28.
- Rubins, J. B., D. Charboneau, et al. (1996). "Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia." Am J Respir Crit Care Med **153**(4 Pt 1): 1339-1346.
- Saez-Llorens, X., H. S. Jafari, et al. (1991). "Enhanced attenuation of meningeal inflammation and brain edema by concomitant administration of anti-CD18 monoclonal antibodies and dexamethasone in experimental Haemophilus meningitis." J Clin Invest **88**(6): 2003-2011.
- Said-Sadier, N., E. Padilla, et al. (2010). "Aspergillus fumigatus stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase." PLoS One **5**(4): e10008.
- Sarkar, A., M. Duncan, et al. (2006). "ASC directs NF-kappaB activation by regulating receptor interacting protein-2 (RIP2) caspase-1 interactions." J Immunol **176**(8): 4979-4986.
- Saukkonen, K., S. Sande, et al. (1990). "The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis." J Exp Med **171**(2): 439-448.
- Savage, C. D., G. Lopez-Castejon, et al. (2012). "NLRP3-Inflammasome Activating DAMPs Stimulate an Inflammatory Response in Glia in the Absence of Priming Which Contributes to Brain Inflammation after Injury." Front Immunol **3**: 288.
- Scarborough, M., S. B. Gordon, et al. (2007). "Corticosteroids for bacterial meningitis in adults in sub-Saharan Africa." N Engl J Med **357**(24): 2441-2450.
- Scarborough, M. and G. E. Thwaites (2008). "The diagnosis and management of acute bacterial meningitis in resource-poor settings." Lancet Neurol **7**(7): 637-648.
- Schmidt, R. L. and L. L. Lenz (2012). "Distinct licensing of IL-18 and IL-1beta secretion in response to NLRP3 inflammasome activation." PLoS One **7**(9): e45186.
- Schroder, K. and J. Tschopp (2010). "The inflammasomes." Cell **140**(6): 821-832.
- Schuchat, A., K. Robinson, et al. (1997). "Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team." N Engl J Med **337**(14): 970-976.
- Schut, E. S., J. de Gans, et al. (2008). "Community-acquired bacterial meningitis in adults." Pract Neurol **8**(1): 8-23.

- Seong, S. Y. and P. Matzinger (2004). "Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses." Nat Rev Immunol **4**(6): 469-478.
- Shi, Y., J. E. Evans, et al. (2003). "Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells." Nature **425**(6957): 516-521.
- Simberkoff, M. S., N. H. Moldover, et al. (1980). "Absence of detectable bactericidal and opsonic activities in normal and infected human cerebrospinal fluids. A regional host defense deficiency." J Lab Clin Med **95**(3): 362-372.
- Small, P. M., M. G. Tauber, et al. (1986). "Influence of body temperature on bacterial growth rates in experimental pneumococcal meningitis in rabbits." Infect Immun **52**(2): 484-487.
- Smeets, R. L., L. A. Joosten, et al. (2005). "Soluble interleukin-1 receptor accessory protein ameliorates collagen-induced arthritis by a different mode of action from that of interleukin-1 receptor antagonist." Arthritis Rheum **52**(7): 2202-2211.
- So, A., T. De Smedt, et al. (2007). "A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout." Arthritis Res Ther **9**(2): R28.
- Srinivasula, S. M., J. L. Poyet, et al. (2002). "The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1." J Biol Chem **277**(24): 21119-21122.
- Stahel, P. F., D. Nadal, et al. (1997). "Complement C3 and factor B cerebrospinal fluid concentrations in bacterial and aseptic meningitis." Lancet **349**(9069): 1886-1887.
- Straus, S. E., K. E. Thorpe, et al. (2006). "How do I perform a lumbar puncture and analyze the results to diagnose bacterial meningitis?" JAMA **296**(16): 2012-2022.
- Stuyt, R. J., S. H. Kim, et al. (2003). "Regulation of Staphylococcus epidermidis-induced IFN-gamma in whole human blood: the role of endogenous IL-18, IL-12, IL-1, and TNF." Cytokine **21**(2): 65-73.
- Swartz, M. N. (2004). "Bacterial meningitis--a view of the past 90 years." N Engl J Med **351**(18): 1826-1828.
- Tan, M. S., J. T. Yu, et al. (2013). "The NLRP3 Inflammasome in Alzheimer's Disease." Mol Neurobiol.
- Thigpen, M. C., C. G. Whitney, et al. (2011). "Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007." N Engl J Med **364**(21): 2016-2025.
- Thornton, J. and L. S. McDaniel (2005). "THP-1 monocytes up-regulate intercellular adhesion molecule 1 in response to pneumolysin from Streptococcus pneumoniae." Infect Immun **73**(10): 6493-6498.
- Tschopp, J. and K. Schroder (2010). "NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production?" Nat Rev Immunol **10**(3): 210-215.
- Tsutsui, H., M. Imamura, et al. (2010). "The TLR4/TRIF-Mediated Activation of NLRP3 Inflammasome Underlies Endotoxin-Induced Liver Injury in Mice." Gastroenterol Res Pract **2010**: 641865.
- Tuomanen, E. I., K. Saukkonen, et al. (1989). "Reduction of inflammation, tissue damage, and mortality in bacterial meningitis in rabbits treated with monoclonal antibodies against adhesion-promoting receptors of leukocytes." J Exp Med **170**(3): 959-969.
- van de Beek, D. (2009). "Corticosteroids for acute adult bacterial meningitis." Med Mal Infect **39**(7-8): 531-538.
- van de Beek, D., J. de Gans, et al. (2004). "Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis." N Engl J Med **351**(18): 1849-1859.

- van de Beek, D., J. de Gans, et al. (2006). "Community-acquired bacterial meningitis in adults." N Engl J Med **354**(1): 44-53.
- van de Beek, D., J. J. Farrar, et al. (2010). "Adjunctive dexamethasone in bacterial meningitis: a meta-analysis of individual patient data." Lancet Neurol **9**(3): 254-263.
- Wall, E. C., S. B. Gordon, et al. (2012). "Persistence of pneumolysin in the cerebrospinal fluid of patients with pneumococcal meningitis is associated with mortality." Clin Infect Dis **54**(5): 701-705.
- Watanabe, H., O. Gaide, et al. (2007). "Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity." J Invest Dermatol **127**(8): 1956-1963.
- Weisfelt, M., D. van de Beek, et al. (2006). "Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series." Lancet Neurol **5**(2): 123-129.
- Wellmer, A., G. Zysk, et al. (2002). "Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of *Streptococcus pneumoniae* in murine meningitis." Infect Immun **70**(11): 6504-6508.
- Wen, H., D. Gris, et al. (2011). "Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling." Nat Immunol **12**(5): 408-415.
- Witzenrath, M., F. Pache, et al. (2011). "The NLRP3 Inflammasome Is Differentially Activated by Pneumolysin Variants and Contributes to Host Defense in Pneumococcal Pneumonia." The Journal of Immunology **187**(1): 434-440.
- Woehrl, B., M. C. Brouwer, et al. (2011). "Complement component 5 contributes to poor disease outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis." J Clin Invest **121**(10): 3943-3953.
- Yamashima, T., Y. Kohda, et al. (1998). "Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'." Eur J Neurosci **10**(5): 1723-1733.
- Yang, C. S., D. M. Shin, et al. (2012). "The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases." Int Neurolog J **16**(1): 2-12.
- Yatsiv, I., M. C. Morganti-Kossmann, et al. (2002). "Elevated intracranial IL-18 in humans and mice after traumatic brain injury and evidence of neuroprotective effects of IL-18-binding protein after experimental closed head injury." J Cereb Blood Flow Metab **22**(8): 971-978.
- Zaki, M. H., K. L. Boyd, et al. (2010). "The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis." Immunity **32**(3): 379-391.
- Zheng, T. S., S. Hunot, et al. (1999). "Caspase knockouts: matters of life and death." Cell Death Differ **6**(11): 1043-1053.
- Zhou, R., A. S. Yazdi, et al. (2011). "A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation." Nature **469**(7329): 221-225.
- Zwijnenburg, P. J., T. van der Poll, et al. (2003a). "Interleukin-18 gene-deficient mice show enhanced defense and reduced inflammation during pneumococcal meningitis." J Neuroimmunol **138**(1-2): 31-37.
- Zwijnenburg, P. J., T. van der Poll, et al. (2003b). "IL-1 receptor type 1 gene-deficient mice demonstrate an impaired host defense against pneumococcal meningitis." J Immunol **170**(9): 4724-4730.

- Zwijnenburg, P. J., T. van der Poll, et al. (2001). "Experimental pneumococcal meningitis in mice: a model of intranasal infection." J Infect Dis **183**(7): 1143-1146.
- Zysk, G., B. K. Schneider-Wald, et al. (2001). "Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*." Infect Immun **69**(2): 845-852.

9. Anhang: Materialliste

Apparaturen und Geräte:

Material	Typ	Herkunft
Körpergewichtswaage	ABS/ABJ	KERN&SOHN, Balingen, Deutschland
Digitalthermometer	GTH 1160	GREISINGER electronic, Regenstauf, Deutschland
Stoppuhr		Junghans, Schramberg, Deutschland
Narkosemittel-Verdampfer	Vet.Med.Vapor	Dräger, Lübeck, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	HERAsafe®	Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA
Heizkissen	HK 20	Beurer, Ulm, Deutschland
Einspanner		Klinikwerkstatt
Lampe	150 HL	Flexilux®
Skalpell		Feather®
große Schere		Biochem luox
kleine Schere		Quadrolab, Meckenheim, Deutschland
Pinzette	INOX, Biologie No. 5	Dumont®
Bohrer	Micromot 50	Proxxon, Föhren, Deutschland
Druckwandler	SIRECUST 403 R	Siemens, München, Deutschland
Perfusor	Precidor	Infors AG Basel, Schweiz
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal	Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland
Mikroskop	TMS, ROBRA Micro	Nikon Deutschland, Düsseldorf
Zentrifuge	5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Material	Typ	Herkunft
feine Waage	ABJ	KERN&SOHN, Balingen, Deutschland
Zerstäuber	Ultra-Turrax®	Janke & Kunkel KG, Staufen, Deutschland
Vortexer	Mixer UZUSIO VTX-3000L	LMS, Tokio, Japan
Pipetten		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryostat-Mikrotom	CM 3050 S	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Antirollplatte	Glas, 70 mm	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Probenhalter	Aluminium, geriffelt, rund, 40 mm	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Digitalkamera	EasyShare DX 4330	Kodak Deutschland, Stuttgart

Verbrauchsmaterialien:

Material	Typ	Herkunft
Einmalhandschuhe	Manufix, powder-free, sensitive	Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalmundschutz	Surgical face mask, Standard, Barrier®	Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath-Untersfeldhaus, Deutschland
Reaktionsgefäße	PP-Tubes, 14 ml steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße	15 ml, 50 ml BlueMax Falcon	BD Biosciences, Deutschland, Heidelberg
Pipettenspitzen	20, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	1,5 ml Eppendorf-Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Material	Typ	Herkunft
Einmal-Mikropipetten	100 µl, Blaubrand®, intraEnd	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Gewebekleber	0,5 ml Histoacryl®	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Plastikschlauch	Portex Non Sterile Polythene Tubing 0,58 mm ID 0,96 mm OD	Sims Portex Ltd., Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn
sterile Einmalspritzen	5 ml, 20 ml, Discardit™ II	BD Medical Deutschland, Heidelberg
sterile Einmalinjektionsspritzen ohne Nadel	Omnifix®-F, Luer 1 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
sterile Feindosierspritzen mit Nadel	Omnican®-F, 1 ml, 30 G x ½	Braun, Melsungen, Deutschland
Kanülen	Microlance™ 3, 22 G 1¼	BD Medical Deutschland, Heidelberg
Tupfer	Maicell XT®, Zellstoff	MaiMed Medical, Neuenkirchen, Deutschland
Plastikschälchen	Plastic Tissue Dispomolds 24 x 24 x 5 mm	Diapath S.p.A., Martinengo, Italien
Agar-Platten	COL-S, Columbia	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg
96-Well-Platten	Nunc 96 MicroWell,	Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark
serlogische Pipetten	steril, 5 ml, 10 ml, Falcon®	BD Deutschland, Heidelberg
Rollenpflaster	Leukoplast® hospital	BSN medical GmbH
Verschlussfolie	Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, USA
Objekträger	SuperFrost®, geschliffen	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland
Einbettmedium	Jung tissue freezing medium	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland

Material	Typ	Herkunft
Mikrotomklingen	High-profile disposable microtome blades 818	Leica Biosystems, Nussloch, Germany

Reagenzien:

Material	Typ	Herkunft
Antikoagulans	Heparin-Natrium 25000 I.E., 5 ml Injektionslösung	ratiopharm, Ulm, Deutschland
Narkotikum	Ketaminhydrochlorid, 10 ml 50 mg/ml Injektionslösung	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland
Sedativum	Xylazinhydrochlorid, $\geq 99\%$, wasserlöslich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Desinfektionsmittel	Ethanol, 70% vergällt mit 1% MEK (Methylethylketon)	bezogen vom Klinikbedarf des Klinikums Großhadern, München
Inhalationsnarkotikum	Forene® (Isofluran), 250 ml Flüssigkeit zur Herstellung eines Dampfes zur Inhalation	Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Deutschland
Lokalanästhetikum	Xylocain 1% (Lidocainhydrochlorid), 50 ml Injektionsflaschen	AstraZeneca Deutschland GmbH, Wedel
Färbelösung	Türksche Lösung zur Leukozytenzählung (Wasser, Gentianaviolett)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
organisches Lösungsmittel als Trägersubstanz	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Alle weiteren Reagenzien und Substanzen wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen bei München, Deutschland) bezogen. Die Reagenzien, die für die Untersuchungen im Rahmen des Albumin-ELISAs benötigt wurden, finden sich direkt im Text der jeweiligen Kapitel des Material und Methoden-Teils.

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herzlichen Dank möchte ich meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. med. Uwe Ködel für die geduldige Einarbeitung in das Tiermodell, die kontinuierliche und durchwegs hilfreiche Betreuung und die konstruktive Kritik und Verbesserungsvorschläge bei der Erstellung dieser Dissertationsarbeit aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Hans-Walter Pfister für die Überlassung dieses spannenden und interessanten Themas der Dissertation und die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seinem Labor der Neuroinfektiologie.

Ein großes Dankeschön gilt ebenfalls Barbara Angele, die mich mit viel Geduld in die der restlichen Methoden eingeweiht hat und mir bei Fragen immer zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinen Mitdoktoranden Christina Wache, Christoph Höhne und Carmen Murr für die stets bereitwillige Hilfe und die gute Zeit.

Zuletzt geht mein persönlicher Dank an meine Familien, Freunde und insbesondere Benni für die fortwährende Unterstützung, Geduld und offenen Ohren während der Durchführung der Experimente und der Erstellung dieser Dissertationsarbeit.

Vielen lieben Dank!

Eidesstattliche Versicherung

Nadin Tremel

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms bei der Pneumokokkenmeningitis:
Untersuchungen in einem Mausmodell**

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

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

München, 27.06.2013

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand