

Aus der Abteilung Neuropathologie
(Prof. Dr. med. W. Brück)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Beeinflussung des Verlaufs von ZNS-Infektionen in
immundefizienten Mäusen durch Immunstimulanzen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Tanja Meister

aus

Kassel

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Nau

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Flügel

III. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. P. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: 27. November 2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Toll-like Rezeptoren	1
1.2 CpG-Motive	3
1.3 ZNS-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten.....	5
1.4 Aufgabenstellung.....	7
2. Material und Methoden	8
2.1 Mäuse.....	8
2.2 CpG-ODN.....	8
2.3 Bakterienstamm und Induktion der <i>Escherichia-coli</i> -Meningitis	9
2.4 Beschreibung der Tiermodelle.....	10
2.5 Ermittlung des Krankheitszustandes.....	14
2.6 Tötung der Mäuse und Präparation.....	15
2.7 Durchflusszytometrie (FACS [Fluorescence activated cell sorting]) zur qualitativen Bestimmung der Granulozytopenie	16
2.8 Statistische Analyse	16
3. Ergebnisse	17
3.1 Verschiedene Immunsuppressionen im Vergleich:	17
3.1.1 MyD88-defiziente Mäuse	17
3.1.2 TRIF-defiziente Mäuse	24
3.1.3 Granulozyten-depletierte Mäuse.....	26
3.2 Signifikanter protektiver Effekt von CpG-ODN auf immunsupprimierte Mäuse bei <i>Escherichia-coli</i> -K1-Meningitis	32
3.3 Geringer, statistisch nicht signifikanter protektiver Effekt von CpG-ODN auf immunkompetente Mäuse bei <i>Escherichia-coli</i> -K1-Meningitis	37
3.4 Kein nachgewiesener protektiver Effekt von CpG-ODN auf TLR9-defiziente Mäuse .	40
3.5 Gewichtsabnahme nach CpG-ODN-Injektion.....	43

4. Diskussion	46
4.1 Der Beitrag von MyD88- und TRIF- Signalvermittlung zur Resistenz des Gehirns von Mäusen gegen <i>Escherichia-coli</i> -K1-Meningitis.....	46
4.2 Die Rolle der neutrophilen Granulozyten beim Schutz gegen <i>Escherichia-coli</i> -K1-Meningitis im Gehirn von Mäusen	47
4.3 Die Prophylaxe mit 100 µg CpG-ODN steigerte die Resistenz des Gehirns gegen <i>Escherichia-coli</i> -K1-Meningitis in neutropenischen Mäusen.....	48
5. Zusammenfassung	52
6. Literaturverzeichnis.....	54

Abkürzungen

CD:	Cluster of Differentiation („Unterscheidungsgruppen“)
CFU:	colony-forming unit (Koloniebildende Einheit)
CpG-DNA:	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-reiche Desoxyribonucleinsäure
CpG-ODN:	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-reiche Oligonukleotide
CXCL1:	CXC(Chemokin)-Ligand 1
Da:	Dalton
DC:	Dendritische Zellen
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
dsRNA:	doppelsträngige Ribonucleinsäure
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS:	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FCS:	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
HSP:	Heat-Schock-Protein
IKK:	I κ B(Inhibitor of κ B)-Kinase
IFN- γ :	Interferon gamma
IL:	Interleukin
IRF-3:	Interferon-Regulator-Faktor 3
LPS:	Lipopolysaccharid
MHC:	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MyD88:	Myeloid-Differenzierungs-Factor 88
NaN ₃ :	Natriumazid

NF- κ B:	Nuklear-Faktor kappa B
NK-Zelle:	Natürliche Killerzellen
Pam ₃ CSK ₄ :	Synthetisches triacyliertes Lipoprotein
PAMP:	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS:	Phosphat buffered Saline (salzhaltiger Phosphatpuffer)
RNA:	Ribonukleinsäure
ROS:	reaktive Sauerstoffspezies
TLR:	Toll-like Rezeptor
TNF- α :	Tumornekrosefaktor alpha
TRAF:	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes Faktor
TRIF:	TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- β (Toll/Interleukin-1Rezeptor (TIR)-Domäne-enhaltende Adaptor Protein die Interferon- β induzieren)

1. Einleitung

1.1 Toll-like Rezeptoren

Das angeborene Immunsystem in Säugetieren exprimiert Toll-like Rezeptoren (TLR), um das Eindringen von Mikroorganismen zu bemerken. Zu diesem Zweck erkennen die TLRs, die sich beispielsweise auf Dendritischen Zellen befinden, sogenannte PAMPs (engl. Pathogen-associated molecular patterns), die schließlich eine Signalkaskade in Gang setzen (Visintin et al. 2001).

In Säugetieren sind bereits 12 TLRs bekannt, und TLR1 bis TLR9 sind sowohl in Mäusen als auch im Menschen zu finden (Akira et al. 2006). Diese TLRs erkennen jeweils spezifische Muster von vor allem pathogenen Mikroorganismen und regulieren anschließend das angeborene und erworbene Immunsystem. Die Expression der TLRs wird durch viele Faktoren bestimmt, wie beispielsweise die Stärke der mikrobiellen Invasion und deren Komponenten sowie durch körpereigene Zytokine. TLRs werden nicht nur auf Abwehrzellen exprimiert, sondern finden sich auch auf anderen Zelltypen, so zum Beispiel in der Mukosa des respiratorischen Trakts und des Intestinaltrakts sowie im Nierenepithel.

Die verschiedenen Rezeptoren erkennen unter anderem folgende Komponenten (Takeda et al. 2003):

TLR1: Triacylpolypeptide (aus Bakterien)

TLR2: Lipoproteine (aus verschiedenen Krankheitserregern)

TLR3: doppelsträngige RNA (aus Viren)

TLR4: Lipopolysaccharide (aus Gram-negativen Bakterien), sowie endogene Proteine wie HSP (allgemein durch Stress vermehrt produziert wie Hitze, UV-Strahlung, viraler oder bakterieller Befall)

TLR5: Flagellin (aus Bakterien)

TLR6: Diacyllipopeptide (aus Mycoplasmen)

TLR7: Imidazochinolin (synthetisches Produkt)

TLR8: CL075 (Thiazolochinolonderivat, synthetisches Produkt)

TLR9: CpG-DNA (aus Bakterien).

Die Aktivierung induziert eine Entzündungsreaktion, fördert die Entwicklung der Antigen-spezifischen Abwehr und dient zur Diskriminierung zwischen körpereigenen und körperfremden. Die Signalübertragung ist in der Abbildung 1 für Toll-like Rezeptor 4 und TLR9 schematisch dargestellt.

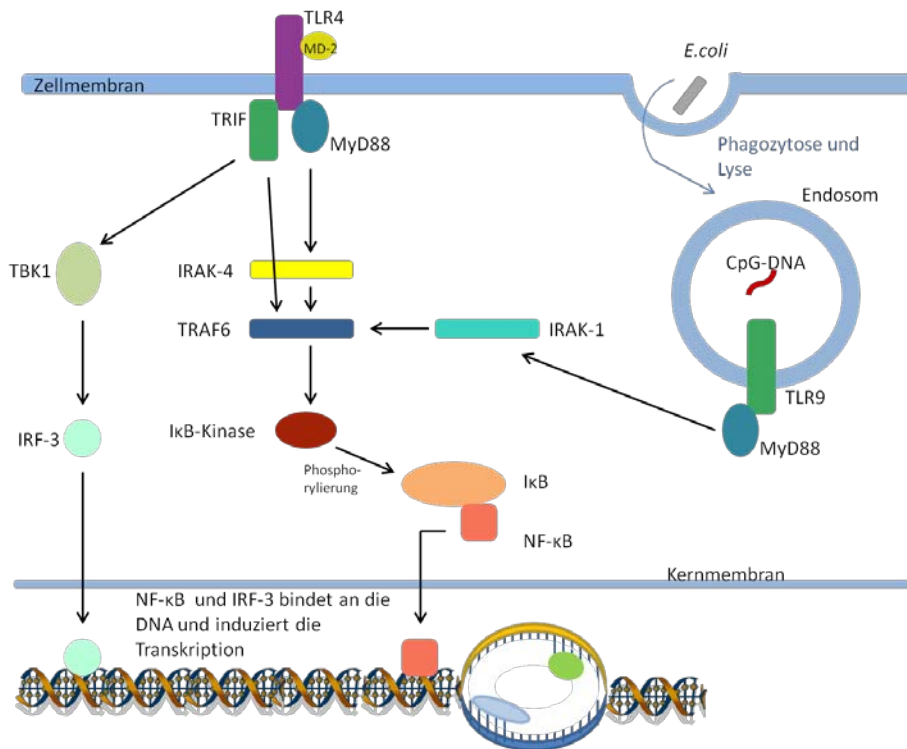


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Signalkaskade der Toll-like Rezeptoren 4 und 9. Die Kaskade resultiert in der Freisetzung von NF-κB und IRF-3, die in den Zellkern wandern und dort an die DNA binden und schließlich die Transkription verschiedener Zytokine induzieren.

CpG-DNA bindet direkt an den TLR9. Das Signal wird über MyD88 (myeloid differentiation factor 88) vermittelt und resultiert TRAF6- und IKK-abhängig in einer Freisetzung von NF-κB (nuclear factor kappa B), wodurch es zur Produktion einer Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen wie beispielsweise TNF-α, IL-6 und CXCL1 kommt (Hacker et al. 2000; Hemmi et al. 2000). MyD88 ist ein intrazellulärer Signalvermittler in der TLR- und IL-1-Rezeptor-Familie, der beispielsweise am TLR2, 4, 5, 7 und 9 vorkommt (Koedel et al. 2004).

Der TLR4 kann auch MyD88-unabhängig stimuliert werden, wie beispielsweise über TRIF (Toll/IL-1R (TIR)-domain-containing adaptor protein inducing interferon-β). Es konnte gezeigt werden, dass MyD88-defiziente Mäuse in Makrophagen keine Zytokine nach Peptidoglycan-, Lipoprotein-, CpG-DNA-, dsRNA- oder Imidazochinolin-Behandlung produzieren und keine Aktivierung von NF-κB aufweisen, was auf eine untergeordnete Rolle des TRIF-Weges in der Aktivierung der meisten TLRs inklusive TLR9 schließen lässt (Takeda et al. 2003).

Durch die Stimulation von Mikroglia durch TLR-Agonisten wie beispielsweise CpG-DNA, LPS oder Pam₃CSK₄ wird ein Anstieg von Zytokinen und Chemokinen im Gewebe induziert. Zusätzlich wird die Phagozytose von *Escherichia coli* durch Mikrogliazellen gesteigert und es ist ein Anstieg des intrazellulären Abtötens zu registrieren (Ribes et al. 2009).

1.2 CpG-Motive

Unter CpG-Motiven versteht man nichtmethylierte Cytosin-Guanin-dinukleotidreiche DNA, die viel häufiger im bakteriellen Genom vorkommt als in der DNA von Wirbeltieren. Diese CpG-Oligodinukleotide (CpG-ODN) binden an den TLR9, aktivieren diesen, was schließlich in einer Produktion von Zytokinen und Chemokinen wie beispielsweise IL-6, IL-12 und TNF- α resultiert und somit zur Aktivierung des Immunsystems führt (Hemmi et al. 2000; Ribes et al. 2010).

Diese Motive induzieren ebenfalls eine Proliferation muriner B-Zellen und T-Zellen, eine Sekretion von Immunglobulinen und aktivieren NK-Zellen (Klinman et al. 1996). Wenn man aus der DNA den CpG-Anteil entfernt, oder die bakterielle DNA mittels Methylase methyliert, wird der stimulatorische Effekt aufgehoben. Es existiert ein synthetisch hergestelltes Korrelat, Phosphothioat-CpG, welches wirksamer ist als unmodifizierte Oligonukleotide (Krieg et al. 1995).

Die bakterielle DNA stimuliert zusätzlich die IFN- γ -Produktion in NK-Zellen durch zusätzliche IL-12-Produktion von Makrophagen (Chace et al. 1997) und ist in der Lage, die extramedulläre Hämatopoese zu triggern, was zu einer Vergrößerung der Milz führen kann (Sparwasser et al. 1999).

Zusätzlich können CpG-Motive eine schützende Funktion vor Allergien aufweisen, da sie die Entwicklung der Th1-Zellen stärker stimulieren als die Th2-Immunantwort, und es dadurch eher zu einer Th1-Immunantwort führt (Klinman 2004). Zusätzlich hat eine CpG-ODN-Therapie die Potenz, Krebs, wie beispielsweise subkutanen Blasenkrebs, zu kurieren, was durch eine Th1-vermittelte Antwort vermittelt wird (Ninalga et al. 2005).

Unmethylierte CpG-Motive gelangen während einer intrazerebralen Infektion mit Bakterien durch deren Wachstum in den Subarachnoidalraum (Spreer et al. 2009).

Immunabwehrmechanismen, die verhindern sollen, dass Bakterien in das ZNS gelangen, sind die Blut-Liquor- und die Blut-Hirn-Schranke, die meningealen und vaskulären Makrophagen sowie die parenchymale Mikroglia. Wenn die ersten beiden Mauern versagen, kann die aktivierte Mikroglia zu einer frühen Immunantwort führen (Hanisch und Kettenmann 2007).

Die Aufgabe der Mikrogliazellen, die gewebespezifische Makrophagen im ZNS darstellen, ist es, das umliegende Gewebe zu überwachen und jedes pathologische Ereignis zu registrieren, das die Homöostase stört (Nimmerjahn et al. 2005). Des Weiteren ist reaktive Mikroglia in das Abräumen von toxischem Zellschrott und in das Fördern der Gewebereparatur eingebunden (Hanisch und Kettenmann 2007; Djukic et al. 2006).

Aktivierte Mikrogliazellen, die unter anderem TLR9 exprimieren und während einer Entzündungsreaktion im ZNS TLR-Gen-Transkripte verstärkt herstellen, produzieren nach Bindung der CpG-Motive NO und TNF- α , die bei einer überschießenden Reaktion der Mikrogliazellen für einen neurotoxischen Effekt auf Neurone bei bakterieller und autoimmuner Gewebeschädigung verantwortlich sind (Iliev et al. 2004).

Durch die TNF- α -Produktion ist die Entstehung eines Toxic-Shock-Syndroms möglich (Sparwasser et al. 1997). Des Weiteren stimulieren CpG-Motive Antigen-präsentierende Zellen zur Produktion verschiedener kostimulatorischer Moleküle und Zytokine, wie zum Beispiel IL-12, welches wiederum Th1-Zellen aktiviert (Lipford et al. 1997).

Neben der Th1-Antwort wird ebenfalls eine T-Zell-Antwort der zytotoxischen T-Zellen gegen Proteinantigene induziert. Zusätzlich wird die Reifung von unreifen Dendritischen Zellen (DC) und Aktivierung von reifen DC zur Zytokinproduktion angeregt und eine Hochregulierung von MHC-II, CD40, CD86 induziert (Sparwasser et al. 1998).

Mikroglia reagiert schnell auf minimale pathologische Veränderungen im ZNS und spielt eine Schlüsselrolle in der Abwehr von Infektionskrankheiten, Entzündung, Trauma, Ischämie, Tumor und Degeneration. Sie fungiert als Alarmsystem im Immunsystem durch Überwachung und Kontrolle des umgebenden Gewebes. Aktivierte Mikroglia zerstört Mikroorganismen, entfernt schädliche Ablagerungen, fördert Gewebereparatur durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren und stellt so die Homöostase wieder her (Kreutzberg 1996).

Durch CpG-Motive wird die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten stark erhöht und die Anzahl von phagozytotischen Rezeptoren hochreguliert. Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten ist ebenfalls ein wichtiger Faktor in der protektiven Wirkung von CpG-ODNs (Weighardt et al. 2000).

1.3 ZNS-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten

Patienten, die unter Immundefekten leiden, erkranken häufiger an ZNS-Infektionen als immunkompetente Patienten. Das Erregerspektrum ist dabei abhängig von der Art der Immunsuppression, der zugrunde liegenden Krankheit und dem Umfeld (Pruitt 2010). Da immunsupprimierte Patienten auf Grund einer verminderten entzündlichen Reaktion zu Beginn geringere Symptome bei ZNS-Infektionen zeigen und die Befunde häufig initial ebenfalls nur diskret sind, muss nicht selten auf aggressive Diagnostik zurückgegriffen werden, um die Infektion festzustellen (Armstrong 1984). In neutropenischen Patienten sind häufig Fieber und mentale Veränderungen die einzigen klinischen Anzeichen einer ZNS-Infektion (Lukes et al. 1984).

Der häufigste Neutrophilendefekt ist die durch zytotoxische Chemotherapie verursachte Neutropenie. Ebenfalls bedeutsam ist die Veränderung der Neutrophilen-Funktion durch eine adrenocorticosteroidale Therapie.

Das typische Erregerspektrum der Meningitis bei Neutropenie erstreckt sich dabei auf folgende Mikroorganismen:

Pseudomonas aeruginosa

Enterobacteriaceae

Bacillus spp.

Listeria monocytogenes

Streptococcus pneumoniae

Staphylococcus aureus

Candida spp.

Dabei sind *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* die am häufigsten vorkommenden Erreger (Armstrong 1984), *Escherichia coli* ist sogar der am häufigsten isolierte Erreger in klinischen Proben (Russo und Johnson 2003).

Durch die verringerte Erregerelimination der Patienten ist schließlich auch eine längere Behandlungsdauer von Nöten (Nau et al. 1990).

Wenn schließlich noch Komplikationen hinzukommen, ist das Outcome trotz effektiver antibiotischer Therapie bei Kindern und Erwachsenen mit größerem neurologischen Schäden assoziiert (Grimwood et al. 2000). Die psychomotorische Leistung, das Erinnerungsvermögen sowie die Konzentration sind nach einer Meningitis auch bei nicht immunsupprimierten Patienten signifikant herabgesetzt (Merkelbach et al. 2000).

Die Schädigungen des Hirngewebes werden durch ROS, Zytokine und exzitatorische Aminosäuren verursacht, die durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, Caspasen und Proteasen gebildet werden. Zusätzlich ist die bakterielle Meningitis mit hoher Letalität assoziiert, die *Escherichia-coli*-Meningitis speziell bei älteren und immungeschwächten Patienten (Nau und Brück 2002; Russo und Johnson 2003). Des Weiteren verursacht *Escherichia coli* eine Meningitis bei Neugeborenen, die mit einer hohen Letalität einhergeht (Kim 2012). Die Mechanismen des Immunsystems im Subarachnoidalraum sind nicht ausreichend, um eine größere Zahl einmal dort eingedrungener bekapselter Bakterien zu eliminieren (Nau und Brück 2002).

Zusätzlich kommt hinzu, dass einige *Escherichia-coli*-Stämme Beta-Laktamase produzieren können, wodurch viele Antibiotika, wie beispielsweise Breitspektrum-Cephalosporine der 3. Generation nicht mehr wirken (Dubois et al. 2009; Boyer-Mariotte et al. 2008).

1.4 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, welchen Stellenwert die MyD88- bzw. TRIF-Signalkaskade sowie die Granulozyten bei der Resistenz gegen eine intrazerebrale Infektion mit *Escherichia coli* K1 haben. Dazu wurden MyD88-defiziente sowie TRIF-defiziente Mäuse verwendet, mit *Escherichia coli* K1 infiziert und mit Wildtypmäusen desselben genetischen Hintergrunds (C57Bl/6J) verglichen. Für die Untersuchung des Beitrags der zirkulierenden Granulozyten zur Infektionsresistenz des Gehirns wurden Wildtypmäuse mit dem Anti-Ly-6G-Antikörper (Klon 1A8) behandelt und mit Wildtypmäusen, die den Isotypantikörper IgG2a injiziert bekamen, nach einer intrazerebralen Infektion verglichen. Der Anti-Ly-6G-Antikörper zerstört spezifisch Ly-6G-positive Zellen. Ly-6G ist ein Oberflächenantigen, welches vor allem auf Granulozyten vorkommt (Daley et al. 2008). Ein anderer häufig genutzter Antikörper, RB6-8C5, senkt sowohl Ly-6G- als auch Ly-6C-positive Zellen, das heißt sowohl neutrophile Granulozyten als auch Monozyten (Fleming et al. 1993). In dieser Arbeit entschieden wir uns aber gegen die Verwendung des RB6-8C5-Antikörpers, um ausschließlich die neutrophilen Granulozyten abzusenken. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob eine prophylaktische systemische Behandlung mit CpG-ODN einen protektiven Effekt auf eine durch *Escherichia coli* K1 verursachte Meningitis bei immunsupprimierten Mäusen aufweist.

Die Steigerung der Phagozytose sowie der intrazellulären Abtötung von Bakterien, wie beispielsweise *Escherichia coli* und *Streptococcus pneumoniae*, durch Mikrogliazellen nach der Behandlung mit CpG-ODN wurde bereits in vitro gezeigt (Ribes et al. 2009; Ribes et al. 2010). Für die hier bearbeitete Fragestellung wurden Mäusen spezifisch über 7 Tage die Granulozyten mittels des oben genannten Antikörpers depletiert und 72 Stunden vor der CpG-ODN-/Puffer-Behandlung wurden die Mäuse intrazerebral mit *Escherichia coli* K1 infiziert. Es sollte untersucht werden, ob mit Aktivierung des TLR9 nicht nur in vitro, sondern auch in vivo ein protektiver Effekt zu erzielen ist. Hierzu wurde dieselbe Prozedur auch mit TLR9-defizienten Mäusen durchgeführt.

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob eine prophylaktische Behandlung mit CpG-ODN auch auf immunkompetente Mäuse gegen eine durch *Escherichia coli* K1 verursachte Meningitis protektiv wirkt.

2. Material und Methoden

2.1 Mäuse

165 männliche C57Bl/6N-Mäuse im Alter zwischen 8 - 11 Wochen und einem Gewicht von $22,2 \pm 1,3$ g sowie 70 männliche und weibliche C57Bl/6J-Mäuse mit einem Alter von 8 – 13 Wochen und einem Gewicht von $24,2 \pm 2,7$ g wurden von der Firma Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld erworben. Des Weiteren wurden von Prof. Uwe-Karsten Hanisch, Abteilung Neuropathologie der Universität Göttingen, 19 TRIF-defiziente Mäuse (trif^{ps2}) im Alter von 8 - 10 Wochen männlichen und weiblichen Geschlechts mit einem Gewicht von $19,6 \pm 3,0$ g und 37 MyD88-defiziente Mäuse ($\text{myd88}^{-/-}$) im Alter von 8 - 13 Wochen männlichen und weiblichen Geschlechts mit einem Gewicht von $21,8 \pm 3,8$ g jeweils mit dem selben genetischen Hintergrund wie die C57Bl/6J-Mäuse zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden 35 TLR9^{-/-}-Mäuse im Alter von 11 Wochen bis 7 Monate männlichen und weiblichen Geschlechts mit einem Gewicht von $25,0 \pm 3,6$ g aus der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen bezogen. Alle Versuchstiere wurden in der ZTE unter konstanten Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnissen mit 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und erhielten freiem Zugang zu Futter und Wasser.

Die Tierversuche wurden mit Genehmigung des Niedersächsischen Landesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit in Braunschweig und unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.2 CpG-ODN

Die Substanz besteht aus Phosphothioat-modifizierten Oligodinukleotiden und wurde synthetisiert und verkauft durch TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin und unter dem Handelsnamen Thioat 1668 vertrieben. Die Basensequenz der CpG-Oligodinukleotide ist 5'-TCCATGACGTTCCTGATGCT-3'.

Die Trockensubstanz wurde in destilliertem Wasser aufgelöst, um eine Konzentration von 3 mg/ml zu erzeugen, aliquotiert und die Stammlösung wurde bei -80° C aufbewahrt.

Vor der Injektion wurde die CpG-ODN-Lösung durch Zugabe von PBS auf 0,5 mg/ml verdünnt und anschließend jeder Maus 200 μ l (was einer Gesamtmasse von 100 μ g CpG-ODN entspricht) intraperitoneal verabreicht.

Den Mäusen der Puffergruppe wurden 34 µl destilliertes Wasser in 166 µl PBS gelöst injiziert.

Die Substanz wurde einmalig 72 Stunden vor der intrazerebralen Infektion mit *Escherichia coli* K1 verabreicht (Elkins et al. 1999).

2.3 Bakterienstamm und Induktion der *Escherichia-coli*-Meningitis

Die Meningitis wurde mittels eines bekapselten, pathogenen *Escherichia-coli*-K1-Stamms induziert, der von einem Kind mit Meningitis isoliert wurde (Geschenk von Dr. G. Zysk, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

Der Bakterienstamm wurde auf Blutagarplatten aufgebracht und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kolonien in steriler NaCl-Lösung resuspendiert. Das Inokulum wurde aliquotiert und mit einer Konzentration von 10^{11} CFU/ml bei -80° C aufbewahrt.

Vor der intrazerebralen Infektion wurde die Dichte der Bakterien in steriler 0,9 %iger Kochsalzlösung auf die jeweilige gewünschte Konzentration verdünnt. Die Überprüfung der Bakterienkonzentration des Inokulums wurde durch eine Verdünnungsreihe in 1:10-Verdünnungsstufen in 0,9% NaCl bis $1:10^6$, anschließende Auftragung auf Blutagarplatten und Bebrüten bei 37° C für 24 Stunden, erbracht.

Die Mäuse wurden narkotisiert durch intraperitoneale Gabe eines Gemischs aus 100 mg/kg Ketamin (Medistar Arzneimittel-Vertrieb GmbH, Holzwickede) und 10 mg/kg Xylazin (Riemser Arzneimittel AG, Greifswald). Unter Anästhesie wurde ihnen zwischen $5-10 \times 10^3$ CFU/Maus für immunsupprimierte Mäuse und 10^5 CFU/Maus *Escherichia coli* K1 für immunkompetente Mäuse suspendiert in 0,9 %iger Kochsalzlösung mittels einer 27-G-Nadel intrazerebral injiziert. Die Einstichstelle befand sich hinter dem ersten Drittel auf der Linie zwischen Auge und Ohr über dem rechten Frontallappen. Die Nadel wurde 2 mm tief eingeführt, um die Bakterien in den Subarachnoidalraum bzw. oberflächlichen Neocortex zu injizieren (Gerber et al. 2001; Wellmer et al. 2004). Es wurde ein Volumen von 12,5 µl der Bakteriensuspension injiziert.

Die Erregerdosis war so gewählt, dass ca. 60 % der Versuchstiere in der Kontrollgruppe erkrankten und an der Infektion verstarben.

2.4 Beschreibung der Tiermodelle

- I. Um zu zeigen, welchen Stellenwert die MyD88-Signalkaskade in der Resistenz gegen eine intrazerebrale Infektion mit *Escherichia coli* K1 hat, wurden 8 MyD88-defiziente Mäuse in der MyD88^{-/-}-Gruppe und 10 C57Bl/6J-Mäuse in der Wildtyp-Gruppe mit 8×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1 wie in 2.3 beschrieben infiziert (Abbildung 2). Des Weiteren wurden 11 MyD88-defiziente Mäuse in der MyD88^{-/-}-Gruppe und 9 C57Bl/6J-Mäuse in der Wildtypgruppe mit $2,1 \times 10^2$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1 wie oben beschrieben infiziert. Alle Mäuse wurden nach der Infektion für 14 Tage beobachtet, mehrfach täglich gewogen und mittels eines klinischen Scores untersucht. Es wurde anschließend eine Überlebenskurve erstellt.

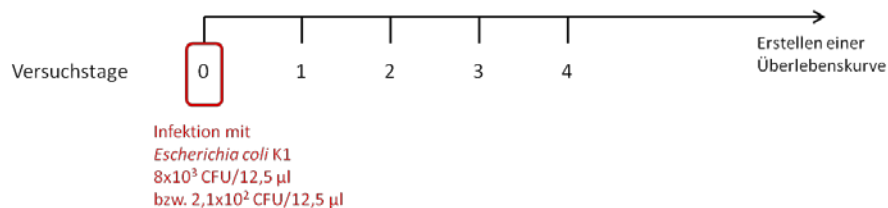


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Tiermodells mit MyD88-defizienten Mäusen zur Überprüfung des Stellenwerts der Myd88-Signalkaskade an einer *Escherichia-coli*-K1-Meningitis.

- II. Um die Bakteriendichte in den MyD88-defizienten Mäusen mit der Bakteriendichte der Wildtypmäuse vergleichen zu können, wurden 18 MyD88-defiziente sowie 14 C57Bl/6J-Mäuse mit $1,4 \times 10^4$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1 infiziert und 30 Stunden nach der Infektion getötet. Es wurde die Bakteriendichte im Kleinhirn, in der Milz und im Blut bestimmt und miteinander verglichen.
- III. Um zu zeigen, welchen Stellenwert die TRIF-Signalkaskade in der Resistenz gegen eine intrazerebrale Infektion mit *Escherichia coli* K1 hat, wurden 17 TRIF-defiziente sowie 15 C57Bl/6J-Mäuse mit 5×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1 infiziert. Die Mäuse wurden nach der Infektion für 14 Tage beobachtet, mehrfach täglich gewogen und mittels eines klinischen Scores untersucht. Es wurde anschließend eine Überlebenskurve erstellt.

- IV. Um zu untersuchen, welchen Stellenwert die im Blut zirkulierenden Granulozyten in der Resistenz gegen eine intrazerebrale Infektion mit *Escherichia coli* K1 haben, wurden 27 C57Bl/6N-Mäuse mit dem Anti-Ly-6G-Antikörper (Klon 1A8, Bio Xcell, West Lebanon, NH, USA) zur Induktion einer systemischen Neutropenie behandelt (Daley et al. 2008; Wojtasiak et al. 2010), während eine zweite Gruppe bestehend aus 26 C57Bl/6N-Mäusen mit dem Isotyp IgG2a (BioXcell, West Lebanon, NH, USA) behandelt wurde, einem gematchten monoklonalen Kontrollantikörper von der Ratte gegen das Antigen Trinitrophenol. Zur Infektion wurden 12 Stunden nach der ersten Antikörpergabe 5×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1 wie in 2.3 beschrieben injiziert (Abbildung 3). Die Mäuse wurden nach der Infektion für 14 Tage beobachtet, mehrfach täglich gewogen und mittels eines klinischen Scores untersucht. Es wurde anschließend eine Überlebenskurve erstellt.

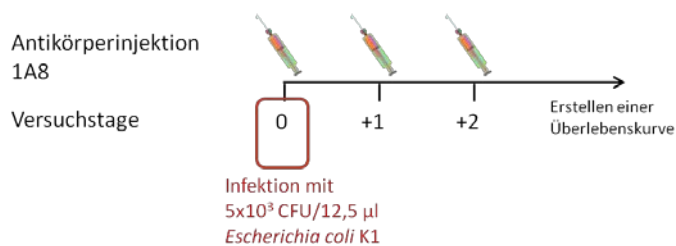


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Tiermodells zur Überprüfung des Stellenwerts von neutrophilen Granulozyten bei der *Escherichia-coli*-K1-Meningitis.

- V. Um die Bakteriendichte in den immunsupprimierten Mäusen mit der Bakteriendichte der Kontrollmäuse zu vergleichen, wurden 12 C57Bl/6N-Mäuse mit dem Anti-Ly-6G-Antikörper (Klon 1A8) behandelt, während eine zweite Gruppe bestehend aus 12 C57Bl/6N-Mäusen den Antikörper-Isotyp IgG2a injiziert bekam. Zur Infektion wurden 12 Stunden nach der ersten Antikörpergabe 5×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1 wie oben beschrieben injiziert und 40 Stunden nach der Infektion wurden die Mäuse getötet. Es wurde die Bakteriendichte im Kleinhirn und in der Milz bestimmt und miteinander verglichen.

VI. Zur Bearbeitung der Frage, ob CpG-ODN bei immunsupprimierten Tieren protektiv gegen eine *Escherichia-coli*-K1-Meningitis wirkt, wurden die C57Bl/6N-Mäuse in die CpG-Gruppe (n = 36) und Puffergruppe (n = 33) eingeteilt. Vier Tage vor der Infektion wurde begonnen, den Mäusen aller zwei Gruppen täglich für sieben Tage 50 µg des Anti-Ly-6G-Antikörpers (Klon 1A8) intraperitoneal zu injizieren, um eine Neutropenie zu induzieren. Drei Tage vor der Infektion, ungefähr 12 Stunden nach der Antikörpergabe, bekamen die Mäuse der CpG-Gruppe eine einmalige intraperitoneale Gabe von 100 µg CpG-ODN (34 µl der Stammlösung) gelöst in 166 µl PBS und den Mäusen der Puffergruppe wurden 34 µl destilliertes Wasser gelöst in 166 µl PBS injiziert. Es wurde jeweils ein Gesamtvolumen von 200 µl injiziert. Die Dosis von 100 µg CpG-ODN wurde der Publikation Barrier et al. (2006) entnommen und die einfache Gabe 3 Tage vor Infektion wurde nach dem von Elkins et al. (1999) publizierten Schema durchgeführt. Die Infektion wurde wie oben beschrieben mit 6×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1 im Abstand von 12 Stunden zur Antikörpergabe durchgeführt (Abbildung 4). Die Mäuse wurden nach der Infektion für 14 Tage beobachtet, mehrfach täglich gewogen und mittels eines klinischen Scores untersucht. Es wurde anschließend eine Überlebenskurve erstellt.

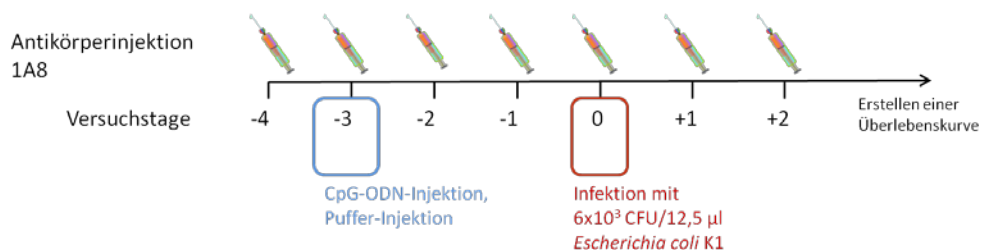


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Tiermodells zur Ermittlung des protektiven Effekts von CpG-ODN gegen *Escherichia-coli*-K1-Meningitis bei immunsupprimierten Mäusen.

VII. Um 42 Stunden nach Infektion die Bakteriendichte in der CpG-Gruppe und der Puffergruppe der immunsupprimierten Tiere vergleichen zu können, wurden 19 C57Bl/6N-Mäuse in zwei Gruppen aufgeteilt; 10 Mäuse bekamen CpG-ODN und 9 Mäuse bekamen Pufferlösung, und es wurden in beiden Gruppen wie in VI. beschrieben mittels des Anti-Ly-6G-Antikörpers (Klon 1A8) über 7 Tage hinweg die Granulozyten depletiert. 42 Stunden nach der Infektion mit $7,5 \times 10^3$ CFU/Maus

Escherichia coli K1 wurden die Mäuse getötet, und es wurde die Bakteriendichte im Kleinhirn, in der Milz und im Blut bestimmt und miteinander verglichen.

- VIII. Um einen protektiven Effekt bei immunkompetenten Mäusen zu prüfen, wurden 20 C57Bl/6N-Mäuse, denen nicht der Anti-Ly-6G-Antikörper injiziert wurde, mit 100 µg CpG-ODN behandelt, und 20 Kontrollmäuse erhielten die Pufferlösung (Abbildung 5). Als Inokulum wurde bei diesen Mäusen 72 Stunden nach der CpG- bzw. Puffergabe $1,8 \times 10^5$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1 als intrazerebrale Injektion gewählt, um ebenfalls eine Sterblichkeit der Tiere in der Puffergruppe von ca. 60 % zu erhalten. Die Infektion wurde wie in 2.3 beschrieben durchgeführt. Die Mäuse wurden nach der Infektion für 14 Tage beobachtet, mehrfach täglich gewogen und mittels eines klinischen Scores untersucht. Es wurde anschließend eine Überlebenskurve erstellt.

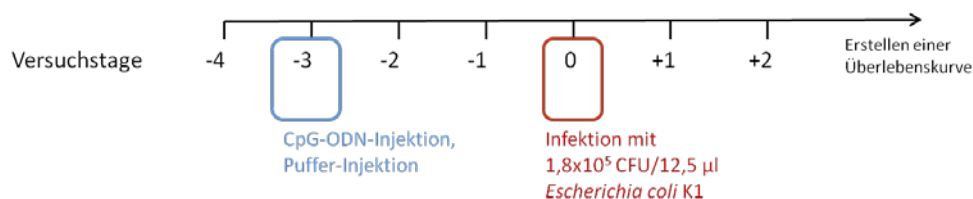


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Tiermodells zur Ermittlung des protektiven Effekts von CpG-ODN gegen *Escherichia-coli*-K1-Meningitis bei immunkompetenten Mäusen.

- IX. Um zu prüfen, ob der protektive Effekt der CpG-ODN hauptsächlich über eine TLR9-Aktivierung läuft, wurden 35 TLR-defiziente Mäuse 7 Tage hintereinander mit dem Anti-Ly-6G-Antikörper (Klon 1A8) wie in VI. beschrieben behandelt. Die Mäuse wurden randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt. 17 TLR9-defiziente Mäuse wurden 72 Stunden vor der Infektion mit 100 µg CpG-ODN behandelt und 18 TLR9-defiziente Mäuse mit Pufferlösung. Zur Infektion wurde $1,5 \times 10^4$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1 wie in 2.3 beschrieben injiziert. Die Mäuse wurden nach der Infektion für 14 Tage beobachtet, mehrfach täglich gewogen und mittels eines klinischen Scores untersucht. Es wurde anschließend eine Überlebenskurve erstellt.

2.5 Ermittlung des Krankheitszustandes

Der Gesundheitszustand der Tiere wurde die ersten vier Tage nach Infektion dreimal täglich mittels Wiegen (Sartorius excellence Waage, Sartorius GmbH, Göttingen) und mit Hilfe eines klinischen Scores (Gerber et al. 2001) ermittelt. Hierzu wurden die Tiere auf den Käfig gesetzt und ihre Spontanbewegung beobachtet. Falls diese nicht vorhanden war, wurde durch leichtes Anstoßen ein Stimulus gegeben und die Reaktion abgewartet. Werte wurden nach folgenden Kriterien vergeben:

0: keine Verhaltensabnormalität

1: leicht lethargisch (gesenkte spontane Aktivität)

2: lethargisch (seltene Spontanbewegung, Bewegung nach Stimulation)

3: schwer lethargisch (keine Fortbewegung mehr möglich)

4: tot.

2.6 Tötung der Mäuse und Präparation

Mäuse, die nach Infektion mehr als 20 % ihres Gewichts verloren oder einen klinischen Score von 3 erreichten, wurden aus ethischen Gesichtspunkten getötet, und der Zeitpunkt der Tötung wurde in der Kaplan-Meier-Kurve als Todeszeitpunkt angenommen. Die Mäuse wurden wie unten beschrieben präpariert. Mäuse, die die akute Phase der Infektion überlebten, wurden 14 Tage nach Infektion getötet und präpariert.

Die Mäuse wurden mit einem Gemisch aus 100 mg/kg Ketamin (Medistar Arzneimittel-Vertrieb GmbH, Holzwickede) und 10 mg/kg Xylazin (Riemser Arzneimittel AG, Greifswald) anästhesiert. Mittels einer 27-G-Nadel wurde das Herz punktiert und Blut entnommen. Anschließend wurden die Mäuse mittels Genickbruch getötet. Das gewonnene Blut wurde direkt und in 1:10-Verdünnungen bis 1:10⁶ auf eine Blutagarplatte aufgebracht. Den Mäusen wurde Milz und Gehirn entnommen. Die halbe Milz und das halbe Kleinhirn wurden in jeweils 500 µl 0,9 %iger Kochsalzlösung gegeben und mechanisch homogenisiert. Von dem Homogenat wurden jeweils 10 µl direkt und in 1:10-Verdünnungen bis 1:10⁷ auf Blutagarplatten aufgebracht. Bei den Mäusen, die 14 Tage überlebten, wurden direkt 200 µl des Homogenats auf die Agarplatte aufgebracht, um die Detektionsgrenze von 2x10² auf 10 CFU/ml zu senken. Alle Blutagarplatten wurden für 24 Stunden bei 37° C in einem Brutschrank (Modell 200, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach) bebrütet. Zur Auswertung wurde die Keimzahl abgelesen und die Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) pro ml ausgerechnet. Reste des Homogenats wurden bei -20° C eingefroren. Die jeweils andere Hälfte der Milz und des Cerebellum wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C aufbewahrt.

2.7 Durchflusszytometrie (FACS [Fluorescence activated cell sorting]) zur qualitativen Bestimmung der Granulozytopenie

3-4 Tropfen Blut wurden aus der Schwanzvene der Mäuse entnommen und in 1-2 ml auf 4° C gekühlten FACS-Puffer (2 % iger FCS, 1 mM EDTA und 0,2 % NaN₃ in PBS gelöst) suspendiert. Es wurden Anti-Ly-6G-, Anti-Ly-6C-, Anti-B220- (BD Pharmingen, Heidelberg) und Anti-CD11b-Antikörper (eBioscience, San Diego, USA) hinzugegeben, die bereits mit Fluoreszenz-Markern versehen waren. Die Erythrozyten wurden mittels Lysepuffer (BD Pharmingen, Heidelberg) zerstört. Die Leukozyten wurden durch Zentrifugieren und Verwerfen des Überstand isoliert und anschließend mit dem FACS-Cytometer (BD FACSCanto II Flow Cytometer, BD Bioscience, San Jose CA USA) analysiert. (Mildner et al. 2008)

Prinzip der FACS-Analyse (Durchflusszytometrie):

Die einzelnen Zellen fließen an einem Lichtstrahl vorbei, welcher wiederum je nach Körnung der Zelle gebrochen wird (Side scatter channel) und somit die Oberflächenbeschaffenheit der Zelle angibt, während ein zweiter Lichtstrahl je nach Größe der Zelle gestreut wird und durch Messung der Lichtintensität in einem bestimmten Winkel die Größe der Zelle angibt (forward scatter channel).

Zusätzlich können vor der Messung die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenantigene besetzt werden und so die Dichte der markierten Antigene auf der Zelle ermittelt werden.

Die Anzeige der Messergebnisse wird in einem zweidimensionalen Koordinatensystem dargestellt.

2.8 Statistische Analyse

Die Graph Pad Prism-Software Version 5 (San Diego, USA) wurde zur Analyse und graphischen Darstellung genutzt.

Die Überlebenskurven wurden mit dem Log-Rank-Test analysiert.

Die Gewichtsentwicklung, die Bakteriendichte und der klinische Score wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

Ein $P < 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

Der Vergleich der Gewichtsentwicklung ergab für den Zeitpunkt 46 Stunden nach Infektion mit $P = 0,8377$ (Mann-Whitney-U-Test) keinen statistisch signifikanten Unterschied der MyD88-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen (Abbildung 7). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 8 Mäuse in der MyD88^{-/-}-Gruppe und 14 Mäuse in der Wildtypgruppe.

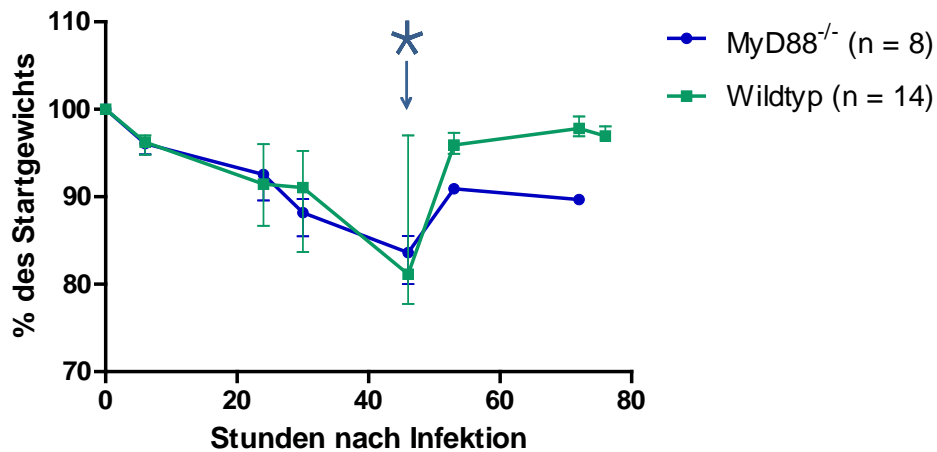


Abbildung 7: Gewichtsentwicklung der MyD88-defizienten Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen nach intrazerebraler Infektion der Mäuse mit $8,25 \times 10^3$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median mit den dazugehörigen Interquartilsabständen der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Verstorbene Mäuse wurden nach ihrem Tod bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Der Stern markiert den Zeitpunkt 46 Stunden nach Infektion mit $P = 0,8377$ (Mann-Whitney-U-Test). Zum Zeitpunkt 54 Stunden nach Infektion befanden sich eine Maus in der MyD88^{-/-}-Gruppe und 7 Mäuse in der Wildtypgruppe.

Der Vergleich des Klinischen Scores zu dem Zeitpunkt 46 Stunden nach Infektion ergab mit $P = 0,0042$ (Mann-Whitney-U-Test) einen statistisch signifikanten Unterschied der MyD88-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen (Abbildung 8). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 8 Mäuse in der MyD88^{-/-}-Gruppe und 14 Mäuse in der Wildtypgruppe.

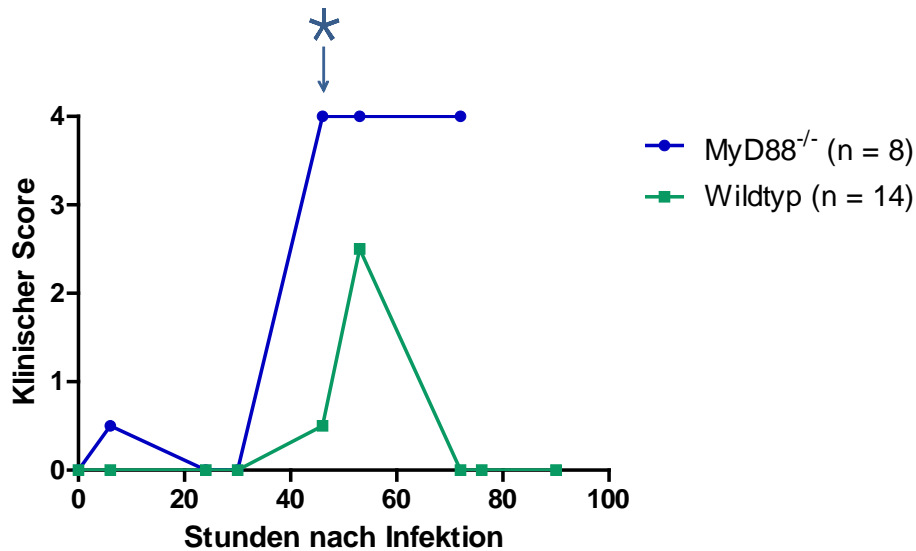


Abbildung 8: Entwicklung des klinischen Scores der MyD88-defizienten Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen nach intrazerebraler Infektion der Mäuse mit $8,25 \times 10^3$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Verstorbene Mäuse erhielten nach dem Todeszeitpunkt einmalig einen Score von 4 und wurden bei der weiteren Auswertung nicht mehr berücksichtigt. Der Stern markiert den Zeitpunkt 46 Stunden nach Infektion mit $P = 0,0042$ (Mann-Whitney-U-Test). Zum Zeitpunkt 54 Stunden nach Infektion befanden sich 3 Mäuse in der MyD88^{-/-}-Gruppe und 14 Mäuse in der Wildtypgruppe.

Sogar bei Verwendung eines sehr niedrigen Inokulums, bei dem alle Wildtypmäuse ($n = 9$) überlebten, starben nach Infektion mit $2,1 \times 10^2$ CFU/Maus über 90 % der MyD88-defizienten Mäuse (10/11) während des Beobachtungszeitraums (Abbildung 9). Hier ergab sich ebenfalls eine signifikante Differenz mit $P < 0,0001$ (Log-Rank-Test).

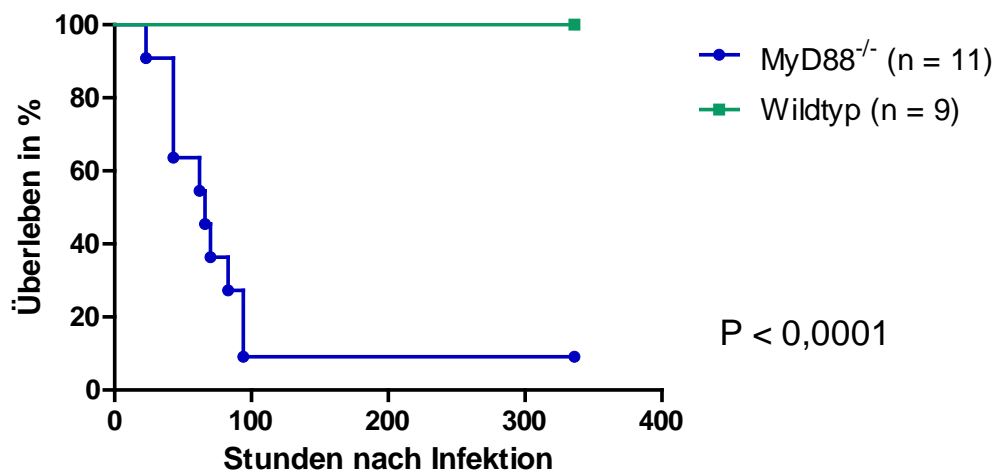


Abbildung 9: Überlebenskurve von MyD88-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen nach intrazerebraler Infektion der Mäuse mit $2,1 \times 10^2$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Log-Rank-Tests durchgeführt.

Der Vergleich der Gewichtsentwicklung ist in Abbildung 10 dargestellt. Für den Zeitpunkt 40 Stunden nach Infektion war mit $P = 0,9674$ (Mann-Whitney-U-Test) kein statistisch signifikanter Unterschied der MyD88-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 10 Mäuse in der MyD88^{-/-}-Gruppe und 9 Mäuse in der Wildtypgruppe.

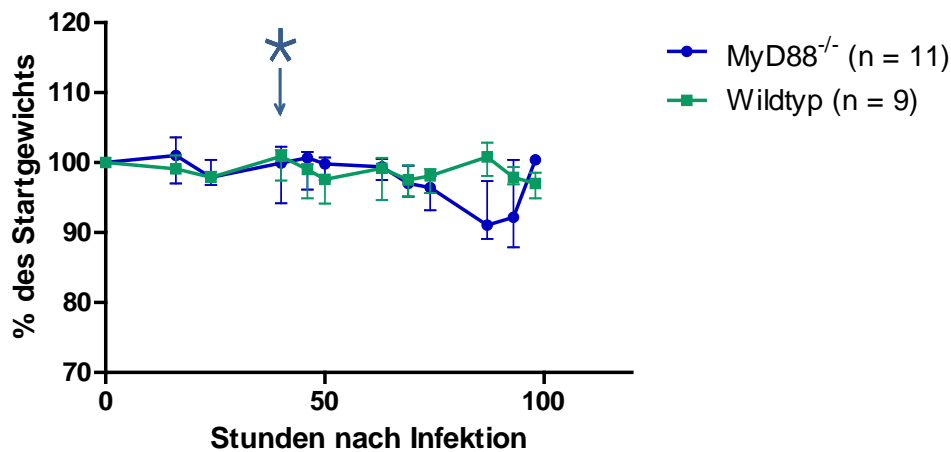


Abbildung 10: Gewichtsentwicklung der MyD88-defizienten Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen nach intrazerebraler Infektion der Mäuse mit $2,1 \times 10^2$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median mit den dazugehörigen Interquartilsabständen der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Verstorbene Mäuse wurden nach ihrem Tod bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Der Stern markiert den Zeitpunkt 40 Stunden nach Infektion mit $P = 0,9674$ (Mann-Whitney-U-Test). Zum Zeitpunkt 69 Stunden nach Infektion befanden sich 5 Mäuse in der MyD88^{-/-}-Gruppe und 9 Mäuse in der Wildtypgruppe.

Der Vergleich des Klinischen Scores zu dem Zeitpunkt 40 Stunden nach Infektion ergab mit $P = 0,4737$ (Exakter Test nach Fisher [da der Mann-Whitney-U-Test nicht möglich war, da in einer Gruppe alle Werte 0 waren]) keinen statistisch signifikanten Unterschied der MyD88-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen (Abbildung 11). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 10 Mäuse in der MyD88^{-/-}-Gruppe und 9 Mäuse in der Wildtypgruppe.

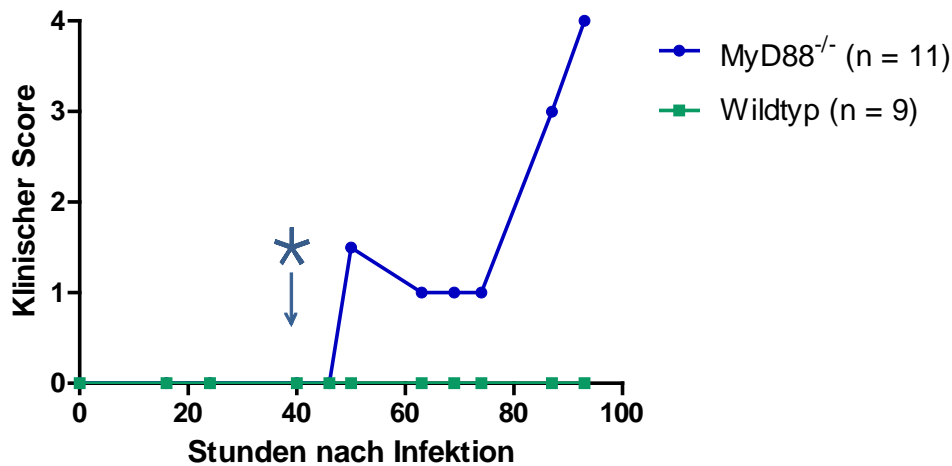


Abbildung 11: Entwicklung des klinischen Scores MyD88-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen nach intrazerebraler Infektion der Mäuse mit $2,1 \times 10^2$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Verstorbene Mäuse erhielten nach dem Todeszeitpunkt einmalig einen Score von 4 und wurden bei der weiteren Auswertung nicht mehr berücksichtigt. Der Stern markiert den Zeitpunkt 40 Stunden nach Infektion mit $P = 0,4737$ (Exakter Test nach Fisher). Zum Zeitpunkt 69 Stunden nach Infektion befanden sich 5 Mäuse in der MyD88^{-/-}-Gruppe und 9 Mäuse in der Wildtypgruppe.

Um die Unterschiede in der Bakteriendichte der beiden Gruppen darzustellen, töteten wir die Mäuse 30 Stunden nach der Infektion. Da sich in den vorangegangenen Versuchen zeigte, dass die ersten MyD88-defizienten Mäuse bereits nach 48 Stunden tot waren, wählten wir diesen Zeitpunkt, um Proben aller Mäuse gewinnen zu können.

Beim Vergleich der Bakteriendichte zwischen der MyD88^{-/-}-Gruppe (n = 16) und der Wildtypgruppe (n = 14) waren im Kleinhirn, in der Milz und im Blut der MyD88-defizienten Mäuse die Bakterienkonzentrationen signifikant höher als in der Wildtypgruppe ($P < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test) (Abbildung 12-14).

Die Bakteriendichte ist als Median (Interquartilsabstand 25 % – 75 %) angegeben.

Im Homogenat des Kleinhirns betrug die Bakteriendichte in der Gruppe der MyD88-defizienten Mäuse 7,90 (7,06 - 8,39) \log_{10} CFU/ml, während die Bakteriendichte in der Wildtypgruppe 3,87 (3,51 - 4,52) \log_{10} CFU/ml betrug ($P = 0,0002$, Mann-Whitney-U-Test).

Die Nachweisgrenze lag für das Kleinhirnhomogenat bei 2×10^2 CFU/ml. In der MyD88^{-/-}-Gruppe lag keine und in der Wildtypgruppe lagen 2 Proben unter der Nachweisgrenze.

In der Milz betrug die Bakteriendichte in der Gruppe der MyD88-defizienten Mäuse 6,82 (6,10 - 7,04) \log_{10} CFU/ml, während die Bakteriendichte in der Wildtypgruppe 3,31 (2,47 - 4,22) \log_{10} CFU/ml betrug ($P = 0,0003$, Mann-Whitney-U-Test) Die Nachweisgrenze lag für

das Milzhomogenat bei 40 CFU/ml. In der MyD88^{-/-}-Gruppe lag keine und in der Wildtypgruppe lag 1 Probe unter der Nachweisgrenze.

Im Blut betrug die Bakteriendichte in der Gruppe der MyD88-defizienten Mäuse 6,48 (6,02 - 7,15) log₁₀CFU/ml, während die Bakteriendichte in der Wildtypgruppe < 3,00 (< 3,00 - < 3,00) log₁₀CFU/ml betrug. Dies stellte mit P < 0,0001 nach dem Exakten Test nach Fisher ebenfalls einen signifikanten Unterschied dar. Die Nachweisgrenze lag für das Blut bei 10³ CFU/ml. In der MyD88^{-/-}-Gruppe lag keine der Proben und in der Wildtypgruppe lagen alle Proben unter der Nachweisgrenze.

Damit ist gezeigt, dass die MyD88-Signalkaskade einen hohen Stellenwert in der Abwehr einer intrazerebralen Infektion mit *Escherichia coli* K1 aufweist.

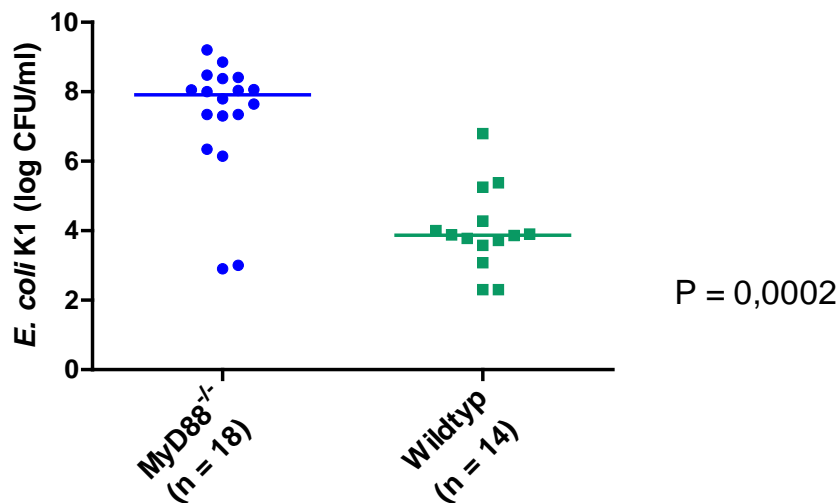


Abbildung 12: Bakteriendichte 30 Stunden nach Infektion mit $1,4 \times 10^4$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1 im Kleinhirn von MyD88-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen. Jeder Punkt steht für einen Messwert, das heißt des Gewebehomogenats einer Maus. Die Linien markieren den Median. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Die Nachweisgrenze lag für das Kleinhirnhomogenat bei 2×10^2 CFU/ml. In der MyD88^{-/-}-Gruppe lag keine Probe und in der Wildtypgruppe lagen 2 Proben unter der Nachweisgrenze.

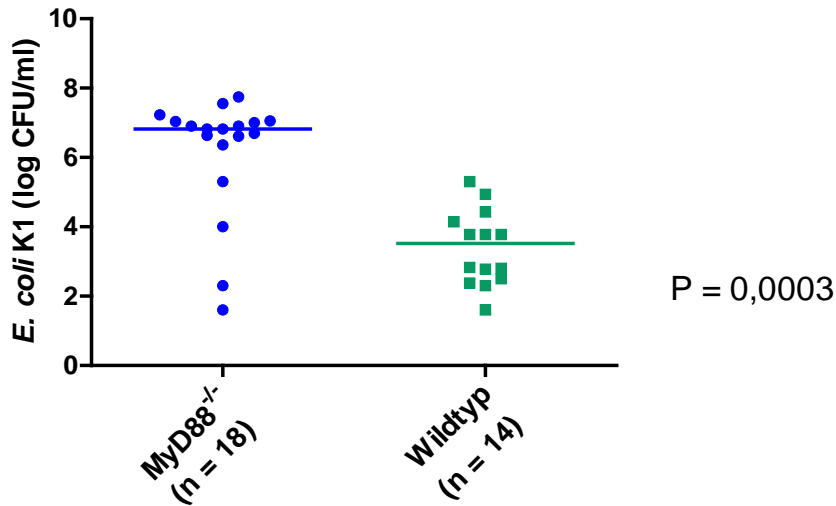


Abbildung 13: Bakteriendichte 30 Stunden nach Infektion mit $1,4 \times 10^4$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1 in der Milz von MyD88-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen. Jeder Punkt steht für einen Messwert. Die Linien markieren den Median. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Die Nachweisgrenze lag für das Milzhomogenat bei 40 CFU/ml. In der MyD88^{-/-}-Gruppe lag keine und in der Wildtypgruppe 1 Probe unter der Nachweisgrenze.

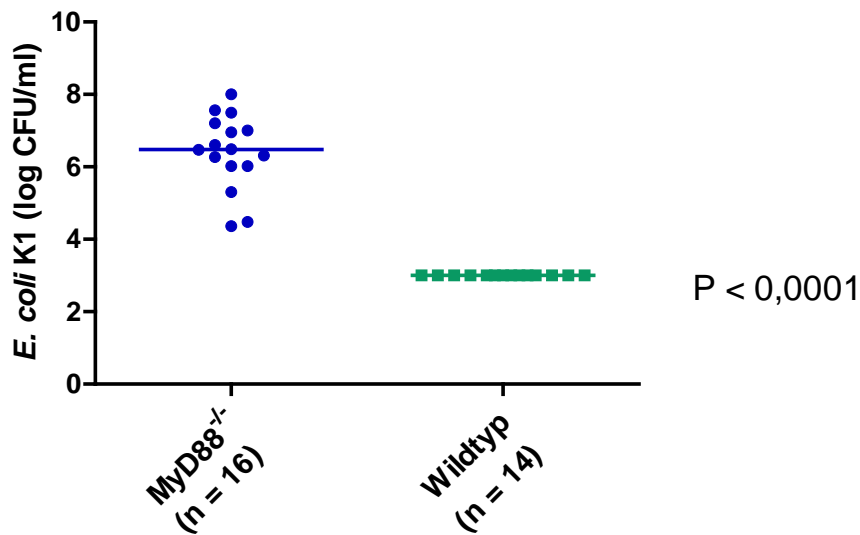


Abbildung 14: Bakteriendichte 30 Stunden nach Infektion mit $1,4 \times 10^4$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1 im Blut von MyD88-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen. Jeder Punkt steht für einen Messwert. Die Linien markieren den Median. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Exakten Tests nach Fisher durchgeführt. Die Nachweisgrenze lag bei 10^3 CFU/ml. In der MyD88^{-/-}-Gruppe lagen alle Proben oberhalb der Nachweisgrenze. In der Gruppe der Wildtypmäuse lag keine Probe oberhalb der Nachweisgrenze.

3.1.2 TRIF-defiziente Mäuse

TRIF-Knockout-Mäuse wiesen in Bezug auf eine *Escherichia-coli*-K1-Meningitis keine Immunsuppression auf. Die TRIF-defizienten Mäuse wurden im Vergleich zu randomisierten Wildtypmäusen mit 5×10^3 CFU *Escherichia coli* K1 pro Maus infiziert, und es wurde eine Überlebenskurve erstellt (Abbildung 15). 58,8 % (10/17) der TRIF-defizienten Mäuse überlebten die Infektion, und in der Wildtypgruppe überlebten 53,3 % (8/15) der Mäuse während der Beobachtungsperiode bis 14 Tage nach der Infektion. Nach dem Log-Rank-Test ergab sich hieraus keine statistisch signifikante Differenz mit $P = 0,722$.

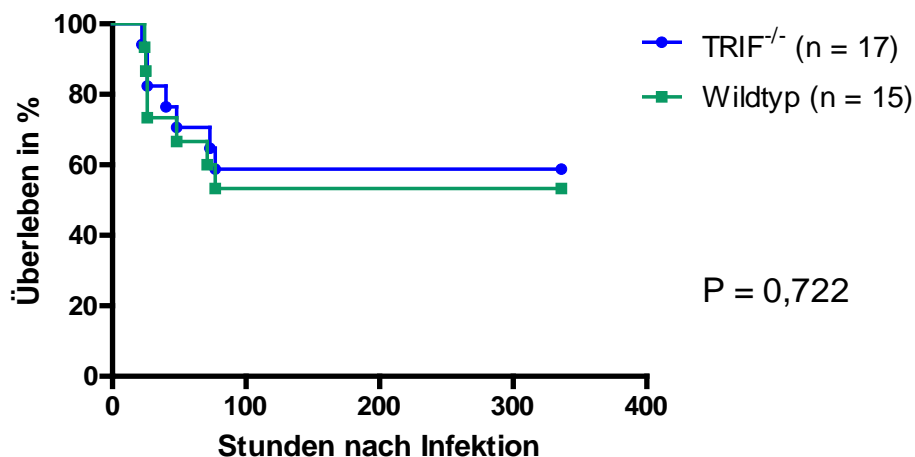


Abbildung 15: Überlebenskurve von TRIF-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen nach intrazerebraler Infektion der Mäuse mit 5×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Log-Rank-Tests durchgeführt.

Der Vergleich der Gewichtsentwicklung ergab für den Zeitpunkt 36 Stunden nach Infektion mit $P = 0,0666$ nach dem Mann-Whitney-U-Test keinen statistisch signifikanten Unterschied der TRIF-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen (Abbildung 16). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 14 Mäuse in der TRIF^{-/-}-Gruppe und 11 Mäuse in der Wildtypgruppe.

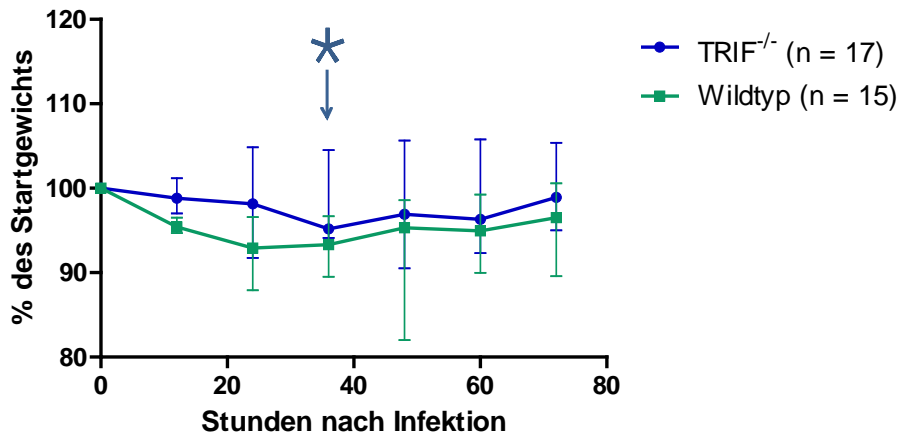


Abbildung 16: Gewichtsentwicklung der TRIF-defizienten Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen nach intrazerebraler Infektion der Mäuse mit 5×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median mit den dazugehörigen Interquartilsabständen der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Verstorbene Mäuse wurden nach ihrem Tod bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Der Stern markiert den Zeitpunkt 36 Stunden nach Infektion mit $P = 0,0666$ (Mann-Whitney-U-Test). Zum Zeitpunkt 60 Stunden nach Infektion befanden sich 12 Mäuse in der TRIF^{-/-}-Gruppe und 10 Mäuse in der Wildtypgruppe.

Der Vergleich des Klinischen Scores zu dem Zeitpunkt 36 Stunden nach Infektion ergab mit $P = 0,3264$ nach dem Mann-Whitney-U-Test keinen statistisch signifikanten Unterschied der TRIF-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen (Abbildung 17). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 16 Mäuse in der TRIF^{-/-}-Gruppe und 15 Mäuse in der Wildtypgruppe.

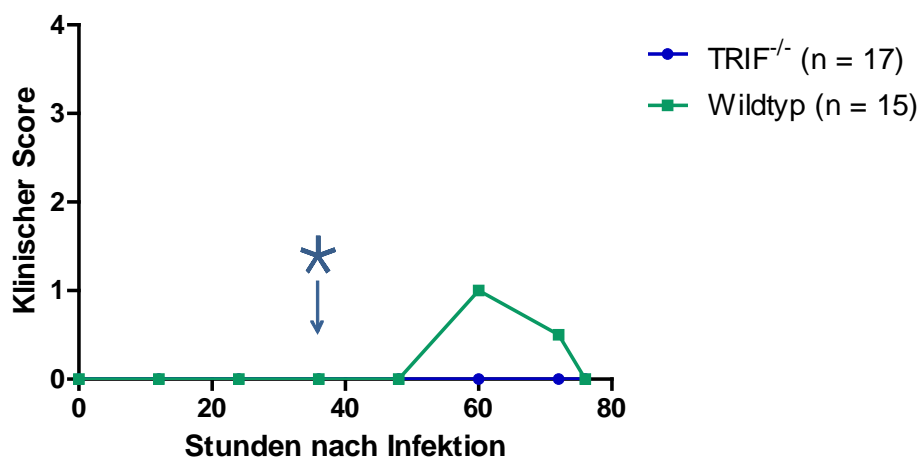


Abbildung 17: Entwicklung des klinischen Scores der TRIF-defizienten Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen nach intrazerebraler Infektion der Mäuse mit 5×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Verstorbene Mäuse erhielten nach dem Todeszeitpunkt einmalig einen Score von 4 und wurden bei der weiteren Auswertung nicht mehr berücksichtigt. Der Stern markiert den Zeitpunkt 36 Stunden nach Infektion mit $P = 0,3264$ (Mann-Whitney-U-Test). Zum Zeitpunkt 60 Stunden nach Infektion befanden sich 13 Mäuse in der TRIF^{-/-}-Gruppe und 11 Mäuse in der Wildtypgruppe.

3.1.3 Granulozyten-depletierte Mäuse

In einem weiteren Experiment wurden die Mäuse mit dem Anti-Ly-6G-Antikörper zur Depletion der neutrophilen Granulozyten und eine zweite Gruppe mit dem Isotyp Anti-IgG2a-Antikörper behandelt. Anschließend wurden die Mäuse mit 5×10^3 CFU *Escherichia coli* K1 pro Maus infiziert. Hierbei zeigte sich mit einer Überlebensrate von 40,7 % (11/27) in der Anti-Ly-6G-Gruppe im Vergleich zur Anti-IgG2a-Gruppe mit einer Überlebensrate von 65,4 % (17/26), dass die mit dem Anti-Ly-6G-Antikörper (Klon 1A8) behandelten Mäuse eine signifikant höhere Sterblichkeit aufwiesen ($P = 0,049$) als die Tiere aus der Anti-IgG2a-Gruppe (Abbildung 18).

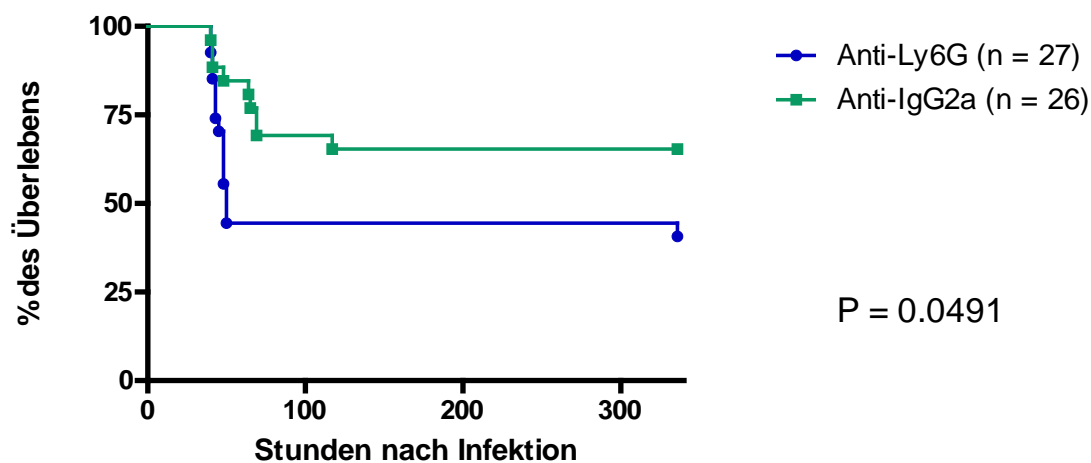


Abbildung 18: Überlebenskurve der sieben Tage lang mit 50 µg Anti-Ly-6G (Klon 1A8) behandelten Mäuse im Vergleich zu Mäusen, die mit Anti-IgG2a behandelt wurden, nach intrazerebraler Infektion der Mäuse mit 5×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Log-Rank-Tests durchgeführt.

Der Vergleich der Gewichtsentwicklung ergab für den Zeitpunkt 36 Stunden nach Infektion mit $P = 0,1534$ (Mann-Whitney-U-Test) keinen statistisch signifikanten Unterschied der mit Anti-Ly-6G behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit dem Isotyp Anti-IgG2a behandelten Mäuse (Abbildung 19). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 26 Mäuse in der Anti-Ly-6G-Gruppe und 26 Mäuse in der Anti-IgG2a-Gruppe.

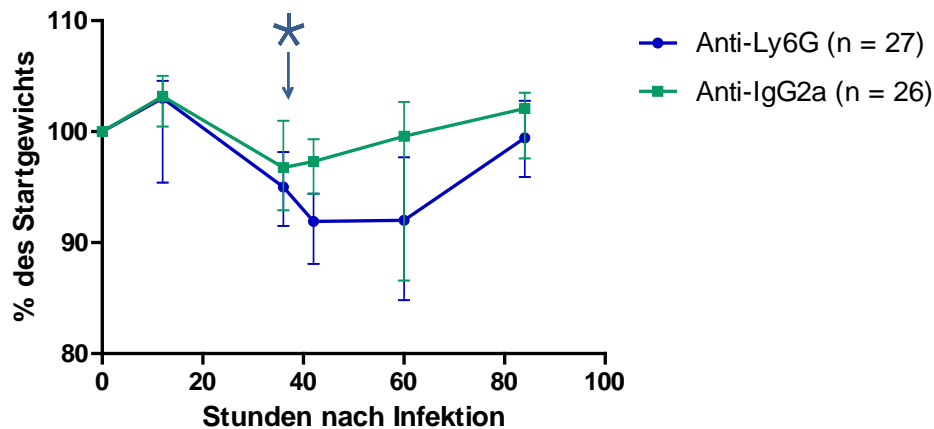


Abbildung 19: Gewichtsentwicklung der mit Anti-Ly-6G behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit dem Isotyp Anti-IgG2a-Antikörper behandelten Mäusen nach intrazerebraler Infektion der Mäuse mit 5×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median mit den dazugehörigen Interquartilsabständen der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Verstorbene Mäuse wurden nach ihrem Tod bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Der Stern markiert den Zeitpunkt 36 Stunden nach Infektion mit $P = 0,1534$ (Mann-Whitney-U-Test). Zum Zeitpunkt 60 Stunden nach Infektion befanden sich 21 Mäuse in der Anti-Ly-6G-Gruppe und 25 Mäuse in der Anti-IgG2a-Gruppe.

Der Vergleich des klinischen Scores zu dem Zeitpunkt 36 Stunden nach Infektion ergab mit $P = 0,0038$ nach dem Mann-Whitney-U-Test einen statistisch signifikanten Unterschied der mit Anti-Ly-6G behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit dem Isotyp Anti-IgG2a-Antikörper behandelten Mäusen (Abbildung 20). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 27 Mäuse in der Anti-Ly-6G-Gruppe und 26 Mäuse in der Anti-IgG2a-Gruppe.

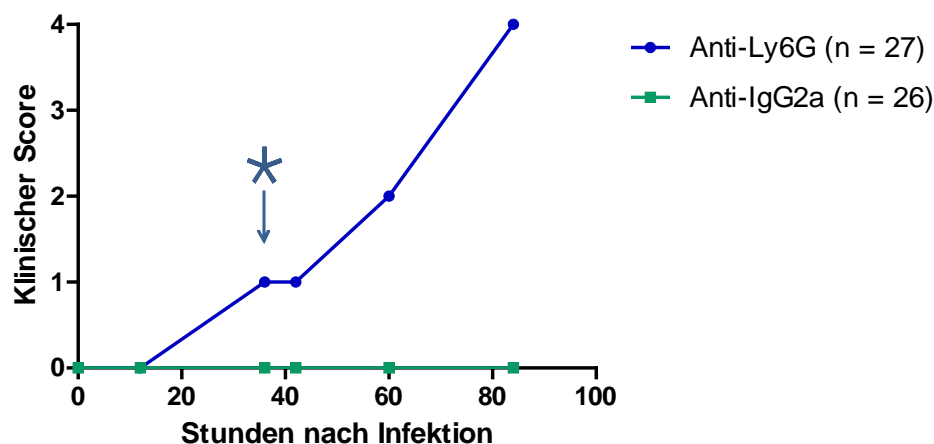


Abbildung 20: Entwicklung des klinischen Scores der mit Anti-Ly-6G behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit dem Anti-IgG2a behandelten Mäusen nach intrazerebraler Infektion der Mäuse mit 5×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Verstorbene Mäuse erhielten nach dem Todeszeitpunkt einmalig einen Score von 4 und wurden bei der weiteren Auswertung nicht mehr berücksichtigt. Der Stern markiert den Zeitpunkt 36 Stunden nach Infektion mit $P = 0,0038$ (Mann-Whitney-U-Test). Zum Zeitpunkt 60 Stunden nach Infektion befanden sich 27 Mäuse in der Anti-Ly-6G-Gruppe und 26 Mäuse in der Anti-IgG2a-Gruppe.

Um die Unterschiede in der Bakteriendichte der beiden mit unterschiedlichen Antikörpern behandelten Gruppen darzustellen, töteten wir die Mäuse 30 Stunden nach der Infektion. Da sich in den vorangegangenen Versuchen gezeigt hatte, dass die ersten neutropenen Mäuse bereits 40 Stunden nach Infektion getötet werden mussten, wählten wir diesen Zeitpunkt, um Proben aller Mäuse gewinnen zu können.

Der Vergleich der Bakteriendichte 30 Stunden nach der Infektion zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 21 und 22). Die mit Anti-Ly-6G behandelten Mäuse wiesen höhere Bakterientiter auf, ihre Fähigkeit zur Abtötung der Bakterien war also herabgesetzt.

Die Bakteriendichte ist als Median (Interquartilsabstand 25 % – 75 %) angegeben.

Die mit Anti-Ly-6G behandelten Mäuse wiesen mit 5,70 (4,89 - 6,75) \log_{10} CFU/ml im Kleinhirn höhere Bakterientiter auf, während in den mit Anti-IgG2a behandelten Mäusen Titer von 2,30 (2,30 - 3,60) \log_{10} CFU/ml gefunden wurden ($P = 0,004$, Mann-Whitney-U-Test). Die Nachweisgrenze lag für das Kleinhirnhomogenat bei 2×10^2 CFU/ml. 8 Proben der mit Anti-IgG2a behandelten Mäuse und keine Probe der mit Anti-Ly-6G behandelten Mäuse lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

In der Milz wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen der mit dem Anti-Ly-6G-Antikörper behandelten Gruppe und der IgG2a-Gruppe gefunden von 3,77 (3,21 - 5,59) \log_{10} CFU/ml in der Anti-Ly-6G-Gruppe und 1,59 (1,59 - 1,60) \log_{10} CFU/ml in der IgG2a-Gruppe ($P = 0,002$, Mann-Whitney-U-Test). Die Nachweisgrenze lag für das Milzhomogenat bei 40 CFU/ml. 9 Proben der mit Anti-IgG2a behandelten Mäuse und keine Probe der mit Anti-Ly-6G behandelten Mäuse lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

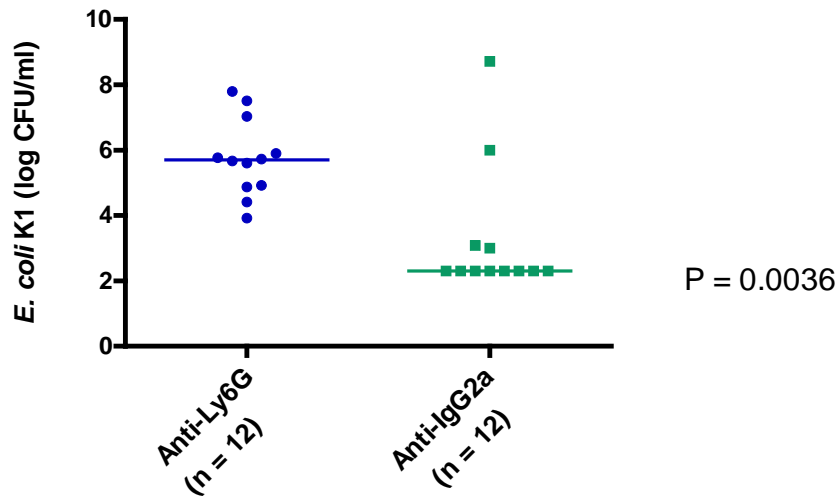


Abbildung 21: Bakteriendichte 30 Stunden nach Infektion mit 5×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1 im Kleinhirn von Anti-Ly-6G-behandelten Mäusen im Vergleich zu Mäusen, die mit Anti-IgG2a behandelt wurden. Jeder Punkt steht für einen Messwert. Die Linien markieren den Median. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

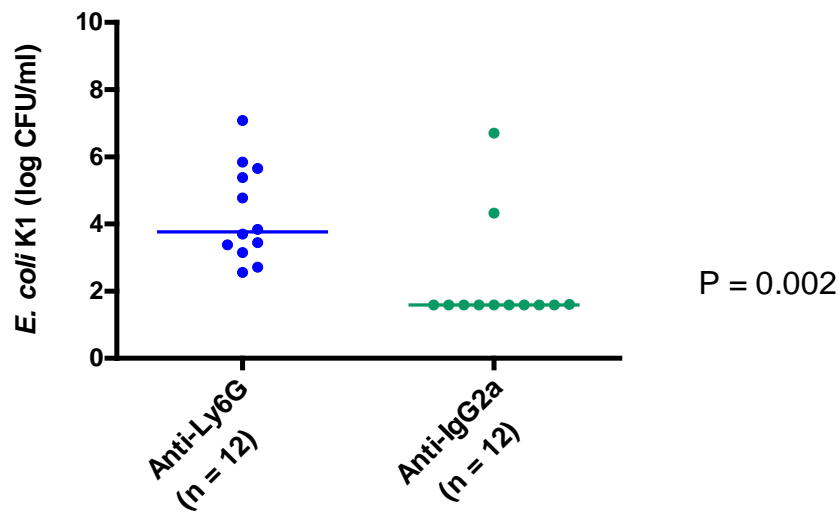


Abbildung 22: Bakteriendichte 30 Stunden nach Infektion mit 5×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1 in der Milz von Anti-Ly-6G-behandelten Mäusen im Vergleich zu Mäusen, die mit Anti-IgG2a behandelt wurden. Jeder Punkt steht für einen Messwert. Die Linien markieren den Median. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

Analyse der Immunsuppression:

Um zu kontrollieren, dass der Anti-Ly-6G-Antikörper (Klon 1A8) nur die neutrophilen Granulozyten depletiert, der Isotyp Anti-IgG2a des Antikörpers aber keine nennenswerte Depletion verursacht, wurden FACS-Analysen des Blutes der unterschiedlich behandelten Mäuse durchgeführt.

Das Blut wurde als Stichprobe einigen Mäusen während der Experimente zur Ermittlung des Stellenwertes der Granulozyten und während der Experimente zur Wirksamkeit von CpG-ODN jeweils zu dem Zeitpunkt 0 kurz vor der Infektion, dann zu den Zeitpunkten 24 h und 48h nach Infektion sowie nach der Tötung nach den oben beschriebenen Kriterien entnommen.

Der erste Graph (Abbildung 23 A) zeigt alle Blutzellen, die detektiert wurden und aus denen schließlich das Grundrauschen subtrahiert wurde. So ergibt sich der zweite Graph (Abbildung 23 B), der die eingegrenzten Zellen nach der Dichte der Antigene Ly-6G und Ly-6C auf der Zelloberfläche darstellt. Die neutrophilen Granulozyten befinden sich am oberen rechten Rand im dem umrahmten Bereich ($CD11b^+Ly-6G^+Ly-6C^{int}$). Zum Vergleich ist in Abbildung 24 die FACS-Analyse einer immunkompetenten Maus dargestellt, bei der der Anteil der $CD11b^+Ly-6G^+Ly-6C^{int}$ -Zellen deutlich höher ist.

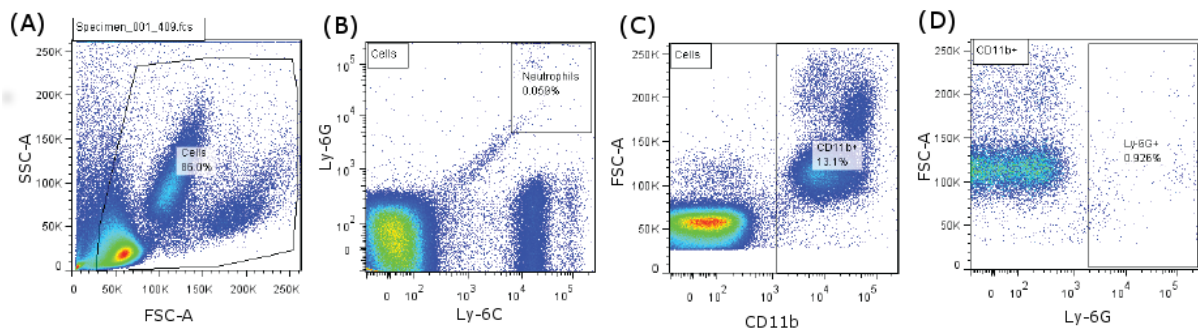


Abbildung 23: FACS-Analyse einer mit dem Anti-Ly-6G-Antikörper (Klon 1A8) behandelten Maus. SSC: Der Side scatter Channel misst, wie stark das Licht im 90° Winkel abgelenkt wird, und gibt damit Informationen über die Granularität einer Zelle an. FSC: Der Forward scatter Channel misst die Streuung des Lasers im 20°-Winkel und gibt Auskunft über die Größe einer Zelle. (A) Zeigt alle detektierten Blutzellen. (B) Hier ist die eingeraumte Zellpopulation aus (A) nach Oberflächenantigenen aufgezeigt. Im umrahmten Bereich befinden sich die neutrophilen Granulozyten (0,059%) $CD11b^+Ly-6G^+Ly-6C^{int}$. (C) Dieser Graph dient zur Identifikation aller $CD11b^+$ -markierten Zellen. (D) Hier sind die $CD11b^+$ -markierten Zellen gezeigt und nach der Menge ihres Oberflächenantigens Ly-6G aufgetragen. Die relative Häufigkeit der Ly-6G⁺-Zellen an den $CD11b^+$ -Zellen lag bei 0,926% (Vergleiche Abbildung 24: nicht depletierte Maus, relative Häufigkeit der Ly-6G⁺-Zellen an den $CD11b^+$ -Zellen beträgt 41,2%). Monozyten hingegen befinden sich links im Graphen, da sie $CD11b^+Ly-6G^-Ly-6C^{high}$ sind.

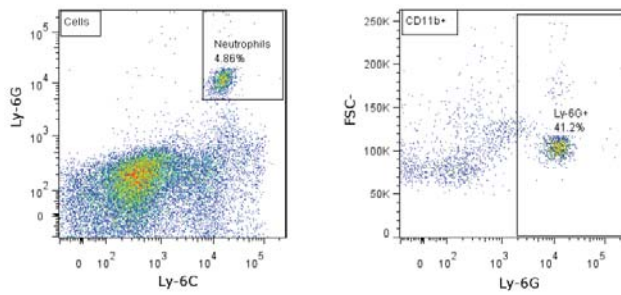


Abbildung 24: FACS-Analyse einer nicht immunsupprimierten Maus. Die neutrophilen Granulozyten befinden sich im ersten Graphen im rechten oberen Kasten (Vergleiche Abbildung 23 (B)). Der Anteil der Ly-6G⁺-Zellen an den CD11b⁺-Zellen beträgt 41,2% (Vergleich Abbildung 23 (D)).

In Abbildung 25 ist exemplarisch die FACS-Analyse jeweils einer Probe pro Gruppe aus den Experimenten zur Ermittlung des Stellenwertes der Granulozyten bei der Resistenz gegen eine intrazerebrale *Escherichia coli*-K1-Infektion aufgezeigt. An dem Ergebnis ist zu sehen, dass der Anti-Ly-6G-Antikörper (Klon 1A8) nur den Anteil der neutrophilen Granulozyten herabsetzte, während der Isotyp Anti-IgG2a-Antikörper die neutrophilen Granulozyten nicht depletierte.

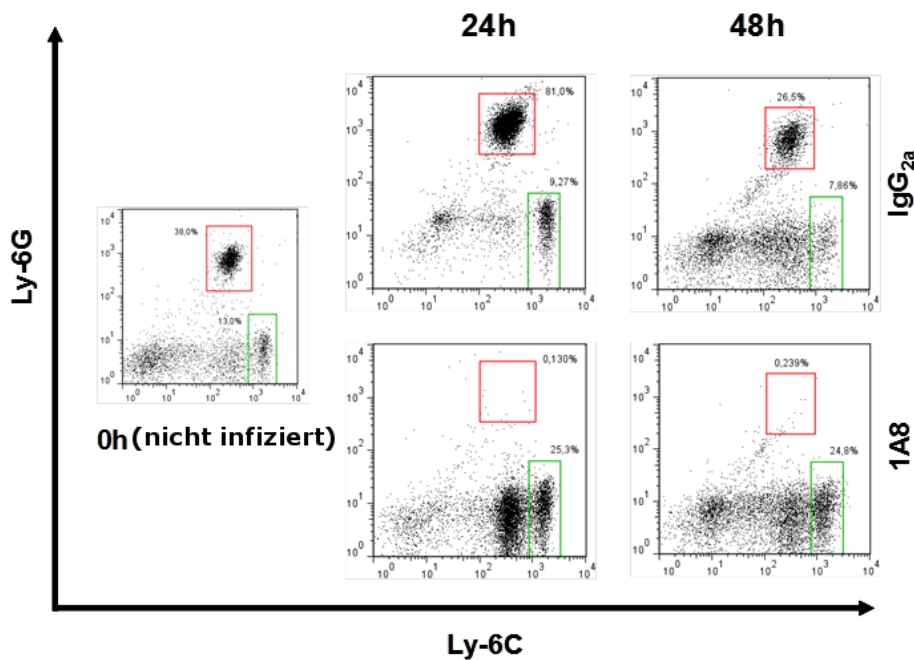


Abbildung 25: FACS-Analyse des Blutes der mit Anti-Ly-6G-Antikörpern (Klon 1A8) bzw. IgG2a behandelten Mäuse nach 0, 24 und 48 Stunden nach der intrazerebralen Infektion mit *Escherichia coli* K1. Es wurde die gleiche Anzahl an B220⁺-Zellen (Leukozyten) detektiert. In dem rot umrahmten Bereich befinden sich die neutrophilen Granulozyten. Ihr Anteil war bei den mit Klon 1A8 behandelten Mäusen, mit Werten unter 1%, deutlich gesenkt im Vergleich zu den Mäusen, die mit den Isotyp IgG2a behandelt wurden (26 - 81 %). In dem grün umrahmten Bereich befinden sich die inflammatorischen Monozyten. Ihr Anteil war bei den von uns verwendeten Antikörpern im Vergleich zum Ausgangswert nicht gesenkt (7,9 - 25 %).

3.2 Signifikanter protektiver Effekt von CpG-ODN auf immunsupprimierte Mäuse bei *Escherichia-coli*-K1-Meningitis

In vier an verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten Experimenten wurde ermittelt, dass ein statistisch signifikanter Unterschied in der Sterblichkeit der beiden mit Anti-Ly-6G-Antikörper behandelten Gruppen, der CpG-Gruppe, behandelt mit 100 µg CpG-ODN (n = 35), und der Puffergruppe, behandelt mit Pufferlösung (n = 33), bei intrakranieller Infektion mit 6×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1 (P = 0,0003, Log-Rank-Test) bestand (Abbildung 26). In der mit CpG-ODN behandelten Gruppe wurde im beobachteten Zeitraum bis 14 Tage nach Infektion ein Überleben von 77 % (27/35) ermittelt, während in der Puffergruppe ein Überleben von 33 % (11/33) beobachtet wurde.

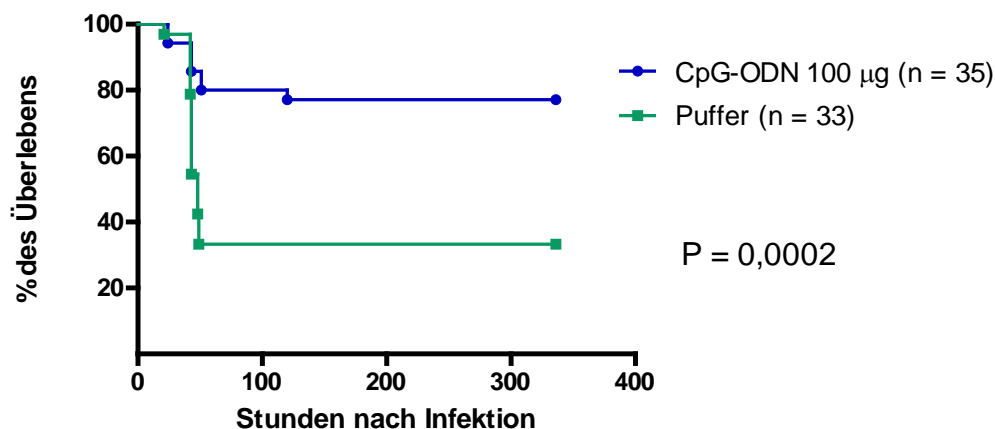


Abbildung 26: Überlebenskurve der immunsupprimierten und mit 100 µg CpG-ODN behandelten Mäuse im Vergleich zu den immunsupprimierten und mit Puffer behandelten Mäusen nach intrazerebraler Infektion mit 6×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Log-Rank-Tests durchgeführt.

Der Vergleich der Gewichtsentwicklung ergab für den Zeitpunkt 42 Stunden nach Infektion mit $P = 0,0032$ (Mann-Whitney-U-Test) einen statistisch signifikanten Unterschied zugunsten der immunsupprimierten und mit $100 \mu\text{g}$ CpG-ODN behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit Puffer behandelten immunsupprimierten Mäusen (Abbildung 27). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 33 Mäuse in der CpG-Gruppe und 32 Mäuse in der Puffergruppe.

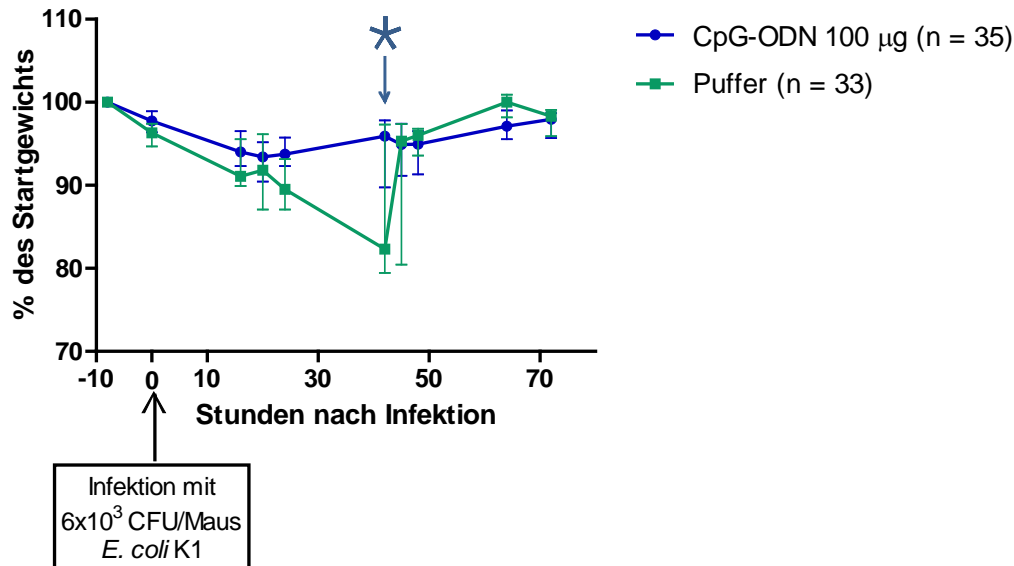


Abbildung 27: Gewichtsentwicklung der immunsupprimierten und mit $100 \mu\text{g}$ CpG-ODN behandelten Mäuse im Vergleich zu den immunsupprimierten und mit Puffer behandelten Mäusen nach intrazerebraler Infektion mit 6×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median mit den dazugehörigen Interquartilsabständen der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Verstorbene Mäuse wurden nach ihrem Tod bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Der Stern markiert den Zeitpunkt 42 Stunden nach Infektion, an dem die Mäuse der Puffer-Gruppe mehr Gewicht verloren, als die mit CpG-ODN behandelten Mäuse ($P = 0,0032$, Mann-Whitney-U-Test). Zum Zeitpunkt 64 Stunden nach Infektion befanden sich 28 Mäuse in der CpG-Gruppe und 11 Mäuse in der Puffergruppe.

Der Vergleich des klinischen Scores zum Zeitpunkt 42 Stunden nach Infektion ergab einen statistisch signifikanten Unterschied der immunsupprimierten und mit 100 µg CpG-ODN behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit Puffer behandelten immunsupprimierten Mäusen ($P = 0,0018$, Mann-Whitney-U-Test) (Abbildung 28). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 35 Mäuse in der CpG-Gruppe und 32 Mäuse in der Puffergruppe.

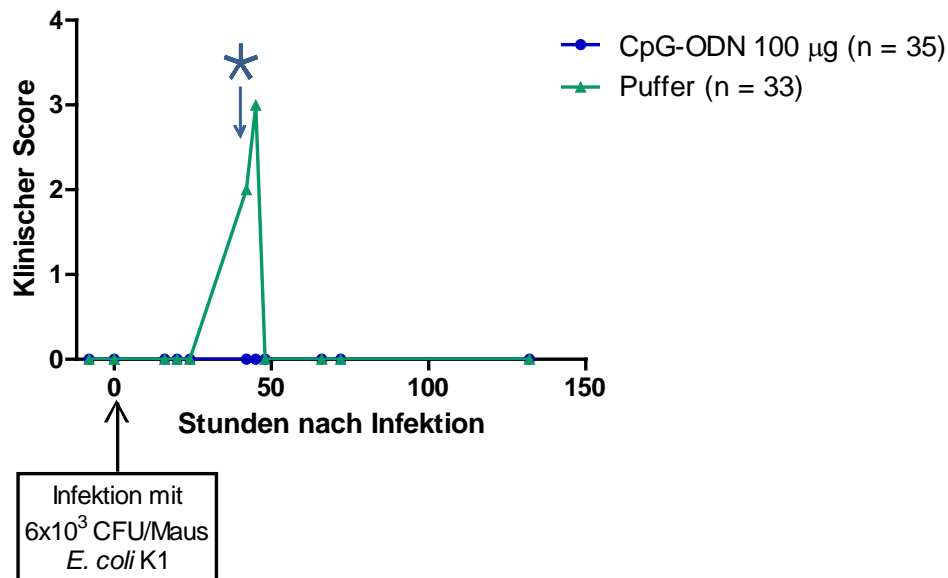


Abbildung 28: Entwicklung des Klinischen Scores immunsupprimierter und mit 100 µg CpG-ODN behandelte Mäuse im Vergleich zu den immunsupprimierten und mit Puffer behandelten Mäusen nach intrazerebraler Infektion mit 6×10^3 CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Verstorbene Mäuse erhielten nach dem Todeszeitpunkt einmalig einen Score von 4 und wurden bei der weiteren Auswertung nicht mehr berücksichtigt. Der Stern markiert den Zeitpunkt 42 Stunden nach Infektion mit $P = 0,0018$ (Mann-Whitney-U-Test). Zum Zeitpunkt 66 Stunden nach Infektion befanden sich 28 Mäuse in der CpG-Gruppe und 13 Mäuse in der Puffergruppe.

In einem weiteren Experiment wurde aufgezeigt, dass 42 Stunden nach der Infektion die Bakteriendichte im Kleinhirn und in der Milz bei den immunsupprimierten Mäusen, die 72 Stunden vor der Infektion mit $7,5 \times 10^3$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1 mit 100 µg CpG-ODN ($n = 10$) behandelt wurden, signifikant niedriger war, als in der Gruppe der mit Puffer ($n = 9$) behandelten immunsupprimierten Mäuse.

Die Bakteriendichte ist als Median (Interquartilsabstand 25 % – 75 %) angegeben.

In der CpG-Gruppe lag die Bakteriendichte im Kleinhirn bei 2,54 (2,30 – 3,66) \log_{10} CFU/ml während sie in der Puffergruppe bei 5,09 (3,47 – 6,84) \log_{10} CFU/ml lag ($P = 0,0098$, Mann-Whitney-U-Test) (Abbildung 29). Die Nachweisgrenze für das Kleinhirnhomogenat lag bei

2×10^2 CFU/ml. 5 Proben der CpG-Gruppe und keine Probe der Puffergruppe lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

In der CpG-Gruppe lag die Bakteriendichte in der Milz bei $2,75$ ($1,59 - 4,90$) \log_{10} CFU/ml während sie in der Puffergruppe bei $4,65$ ($4,30 - 5,92$) \log_{10} CFU/ml lag mit $P = 0,0402$ (Abbildung 30). Die Nachweisgrenze für das Milzhomogenat lag bei 40 CFU/ml. 4 Proben der CpG-Gruppe und keine Probe der Puffergruppe lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Im Blut der Mäuse konnte kein Unterschied zwischen der CpG- und der Puffergruppe nachgewiesen werden, da der Großteil der Messwerte unter der Nachweisgrenze von 10^3 CFU/ml lag.

In der CpG-Gruppe betrug die Bakteriendichte < 3 ($< 3 - 4,29$) \log_{10} CFU/ml und in der Puffergruppe betrug sie < 3 ($< 3 - 4,31$) \log_{10} CFU/ml ($P = 0,93$, Mann-Whitney-U-Test) (Abbildung 31). Die Nachweisgrenze lag bei 10^3 CFU/ml. 5 Blutproben der CpG-Gruppe und 6 Proben der Puffergruppe lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

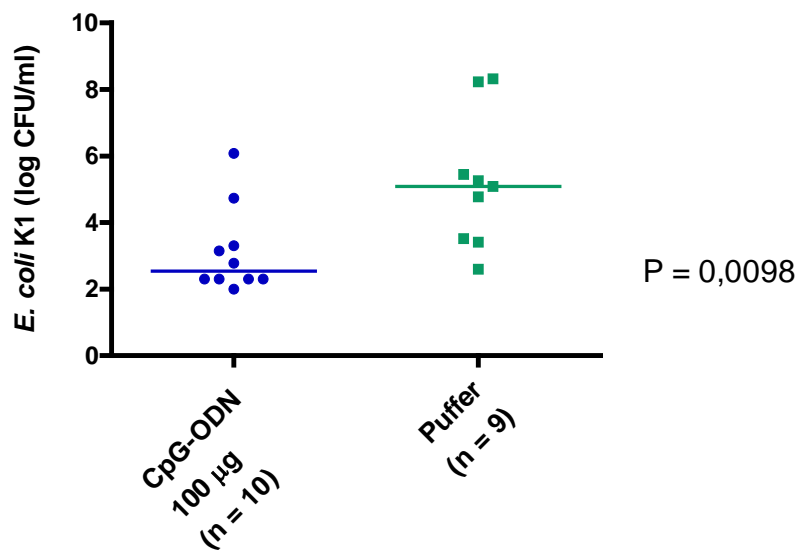


Abbildung 29: Bakteriendichte 42 Stunden nach Infektion mit $7,5 \times 10^3$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1 im Kleinhirn von immunsupprimierten und mit 100 µg CpG-ODN behandelten Mäusen im Vergleich zu immunsupprimierten und mit Puffer behandelten Mäusen. Jeder Punkt steht für einen Messwert. Die Linien markieren den Median. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Die Nachweisgrenze für das Kleinhirnhomogenat lag bei 2×10^2 CFU/ml. 5 Proben der CpG-Gruppe und keine Probe der Puffergruppe lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

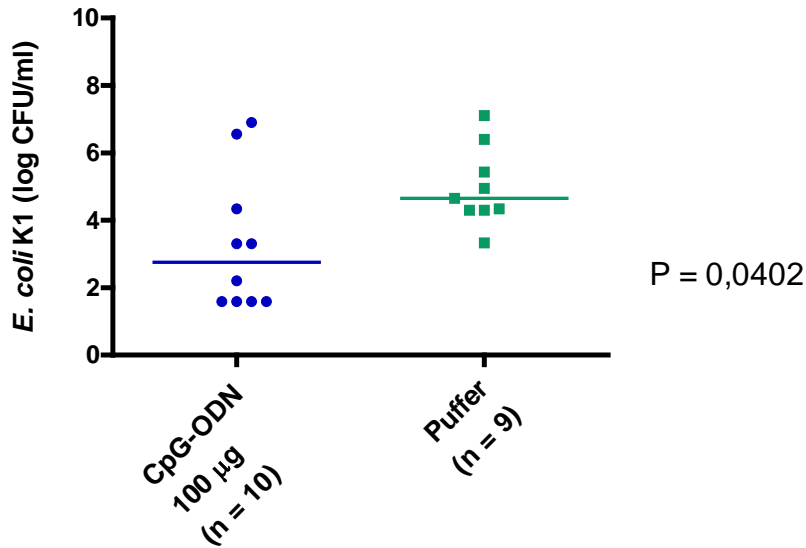


Abbildung 30: Bakteriendichte 42 Stunden nach Infektion mit $7,5 \times 10^3$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1 in der Milz von immunsupprimierten und mit 100 µg CpG-ODN behandelten Mäusen im Vergleich zu immunsupprimierten und mit Puffer behandelten Mäusen. Jeder Punkt steht für einen Messwert. Die Linien markieren den Median. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Die Nachweisgrenze für das Milzhomogenat lag bei 40 CFU/ml. 4 Proben der CpG-Gruppe und keine Probe der Puffergruppe lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

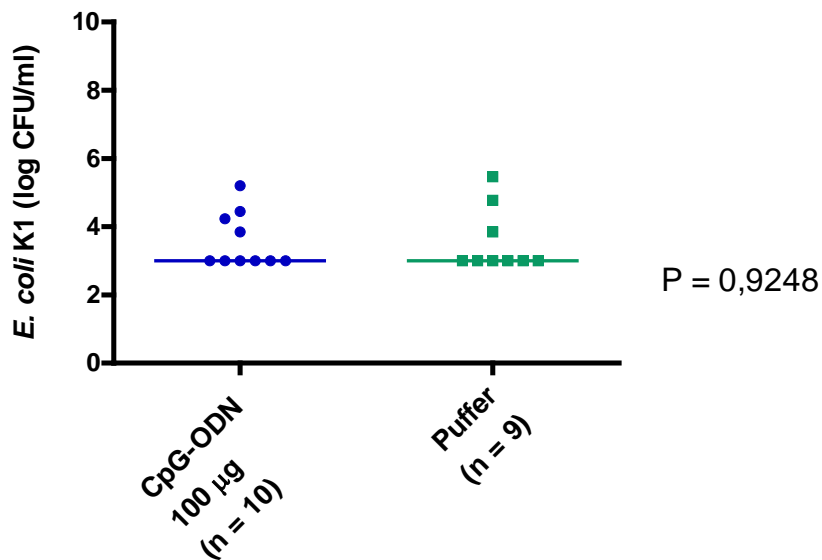


Abbildung 31: Bakteriendichte 42 Stunden nach Infektion mit $7,5 \times 10^3$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1 im Blut von immunsupprimierten und mit 100 µg CpG-ODN behandelten Mäusen im Vergleich zu immunsupprimierten und mit Puffer behandelten Mäusen. Jeder Punkt steht für einen Messwert. Die Linien markieren den Median. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Die Nachweisgrenze lag bei 10^3 CFU/ml. 5 Blutproben der CpG-Gruppe und 6 Proben der Puffergruppe lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

3.3 Geringer, statistisch nicht signifikanter protektiver Effekt von CpG-ODN auf immunkompetente Mäuse bei *Escherichia-coli*-K1-Meningitis

In der CpG-Gruppe (n = 20), behandelt mit 100 µg CpG-ODN, überlebten in dem Beobachtungszeitraum bis 14 Tage nach Infektion 60 % der Tiere (12/20). In der Puffergruppe (n = 20), in der die Mäuse mit Pufferlösung behandelt wurden, überlebten 45 % (9/20) die intrazerebraler Infektion mit $1,8 \times 10^5$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1 (Abbildung 32). In zwei an verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten Experimenten konnte mit dem Log-Rank-Test mit $P = 0,2$ kein statistisch signifikanter Unterschied in der Sterblichkeit der beiden Gruppen nachgewiesen werden.

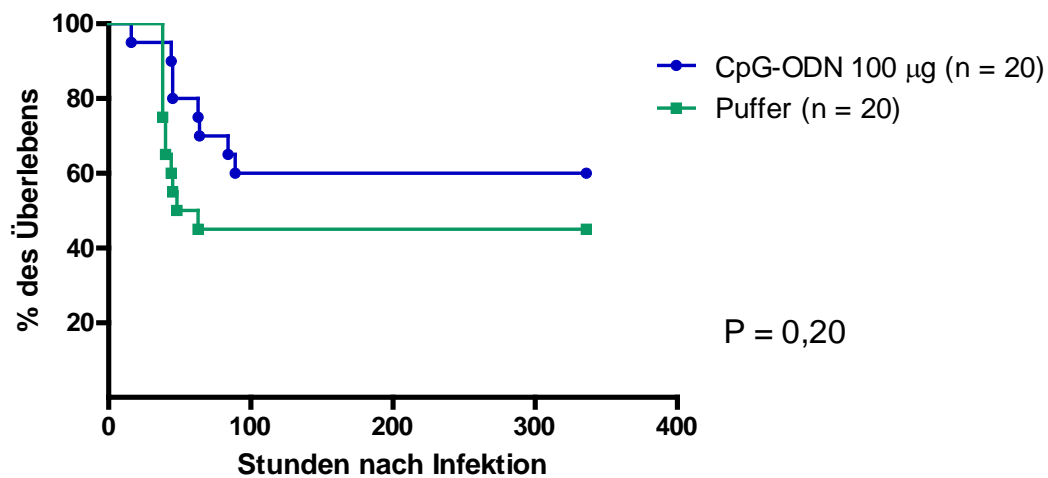


Abbildung 32: Überlebenskurve der immunkompetenten und mit 100 µg CpG-ODN behandelten Mäuse im Vergleich zu den immunkompetenten und mit Puffer behandelten Mäusen nach intrazerebraler Infektion mit $1,8 \times 10^5$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Log-Rank-Tests durchgeführt.

Der Vergleich der Gewichtsentwicklung ergab für den Zeitpunkt 42 Stunden nach Infektion mit $P = 0,9862$ (Mann-Whitney-U-Test) keinen statistisch signifikanten Unterschied der immunkompetenten und mit $100 \mu\text{g}$ CpG-ODN behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit Puffer behandelten immunkompetenten Mäusen (Abbildung 33). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 19 Mäuse in der CpG-Gruppe und 15 Mäuse in der Puffergruppe.

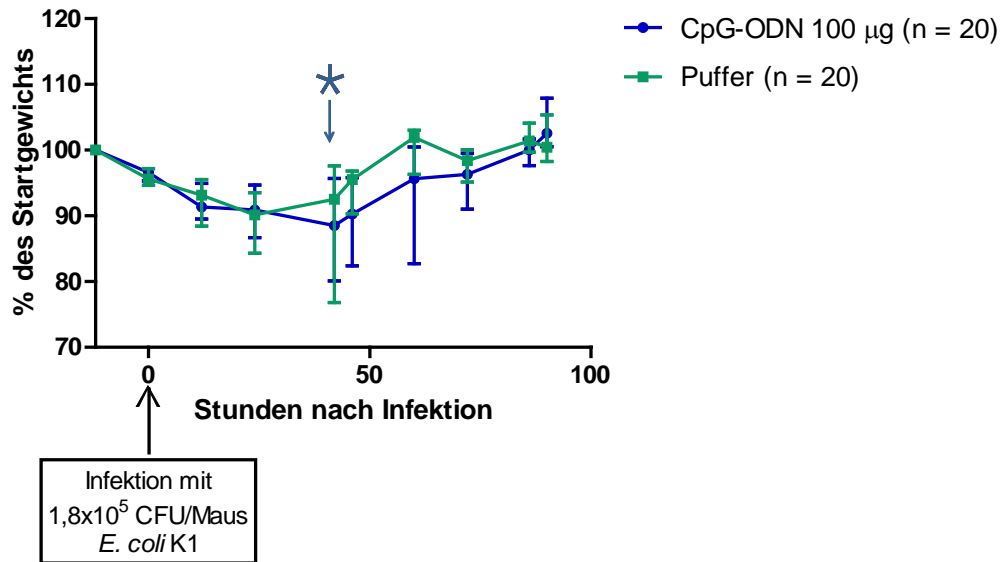


Abbildung 33: Gewichtsentwicklung der mit $100 \mu\text{g}$ CpG-ODN behandelten immunkompetenten Mäuse im Vergleich zu den mit Puffer behandelten immunkompetenten Mäusen nach intrazerebraler Infektion mit $1,8 \times 10^5$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median mit den dazugehörigen Interquartilsabständen der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Verstorbene Mäuse wurden nach ihrem Tod bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Der Stern markiert den Zeitpunkt 42 Stunden nach Infektion mit $P = 0,9862$ (Mann-Whitney-U-Test). Zum Zeitpunkt 60 Stunden nach Infektion befanden sich 16 Mäuse in der CpG-Gruppe und 10 Mäuse in der Puffergruppe.

Der Vergleich des klinischen Scores zu dem Zeitpunkt 42 Stunden nach Infektion ergab mit $P = 0,0344$ (Mann-Whitney-U-Test) einen statistisch signifikanten Unterschied zugunsten der immunkompetenten und mit $100 \mu\text{g}$ CpG-ODN behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit Puffer behandelten immunkompetenten Mäusen (Abbildung 34). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 19 Mäuse in der CpG-Gruppe und 20 Mäuse in der Puffergruppe.

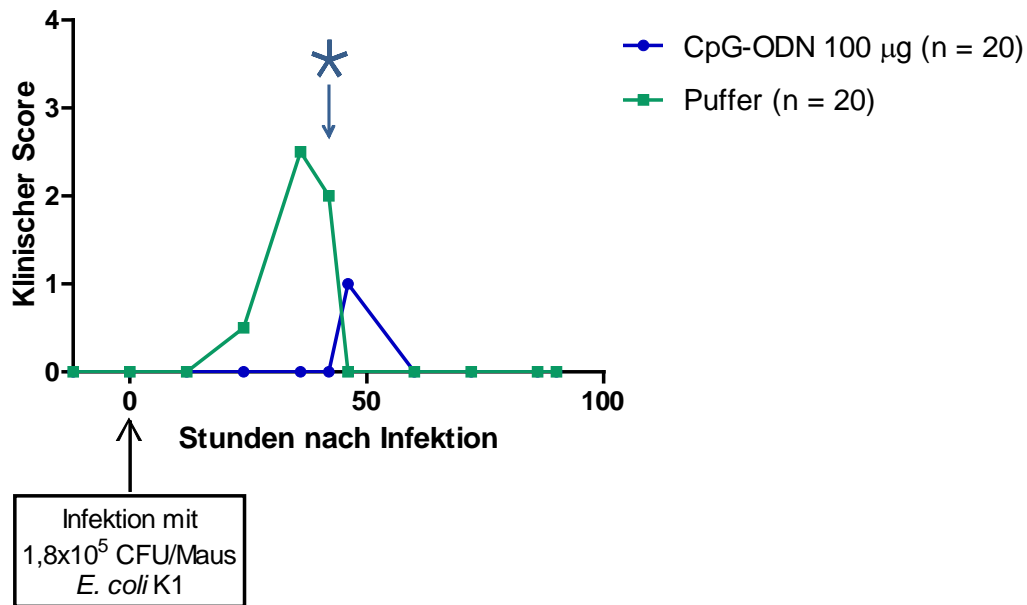


Abbildung 34: Entwicklung des Klinischen Scores immunkompetenter und mit $100 \mu\text{g}$ CpG-ODN behandelten Mäuse im Vergleich zu den immunkompetenten und mit Puffer behandelten Mäusen nach intrazerebraler Infektion mit $1,8 \times 10^5$ CFU/Maus *E. coli* K1. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Verstorbene Mäuse erhielten nach dem Todeszeitpunkt einmalig einen Score von 4 und wurden bei der weiteren Auswertung nicht mehr berücksichtigt. Der Stern markiert den Zeitpunkt 42 Stunden nach Infektion mit $P = 0,0344$ (Mann-Whitney-U-Test). Zum Zeitpunkt 60 Stunden nach Infektion befanden sich 16 Mäuse in der CpG-Gruppe und 11 Mäuse in der Puffergruppe.

3.4 Kein nachgewiesener protektiver Effekt von CpG-ODN auf TLR9-defiziente Mäuse

In zwei Experimenten wurde gezeigt, dass 100 µg CpG-ODN auf TLR9-defiziente Mäuse, die sieben Tage mit dem Anti-Ly-6G-Antikörper behandelt wurden, keinen protektiven Effekt im Vergleich zur Pufferbehandlung hatte. Zur Infektion wurden $1,5 \times 10^4$ CFU *Escherichia coli* K1 pro Maus intrazerebral injiziert.

In der CpG-Gruppe (n = 17) ergab sich in dem Beobachtungszeitraum bis 14 Tage nach Infektion ein Überleben von 11,8% (2/17), während in der Puffergruppe (n = 18) ein Überleben von 50% (9/18) ermittelt wurde (Abbildung 35).

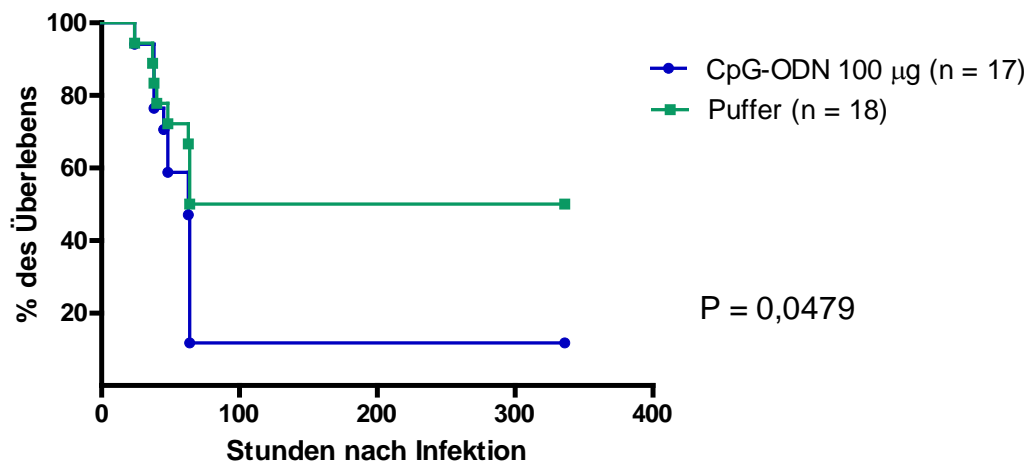


Abbildung 35: Überlebenskurve der mit Anti-Ly-6G-Antikörper und 100 µg CpG-ODN behandelten TLR9-defizienten Mäuse im Vergleich zu den mit Anti-Ly-6G-Antikörper und Puffer behandelten TLR9-defizienten Mäusen nach intrazerebraler Infektion mit $1,5 \times 10^4$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Log-Rank-Tests durchgeführt.

Der Vergleich der Gewichtsentwicklung ergab für den Zeitpunkt 36 Stunden nach Infektion mit $P = 0,0475$ nach dem Mann-Whitney-U-Test einen statistisch signifikanten Unterschied der mit $100 \mu\text{g}$ CpG-ODN behandelten TLR9-defizienten immunsupprimierten Mäuse im Vergleich zu den mit Puffer behandelten TLR9-defizienten immunsupprimierten Mäusen (Abbildung 36). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 16 Mäuse in der CpG-Gruppe und 17 Mäuse in der Puffergruppe.

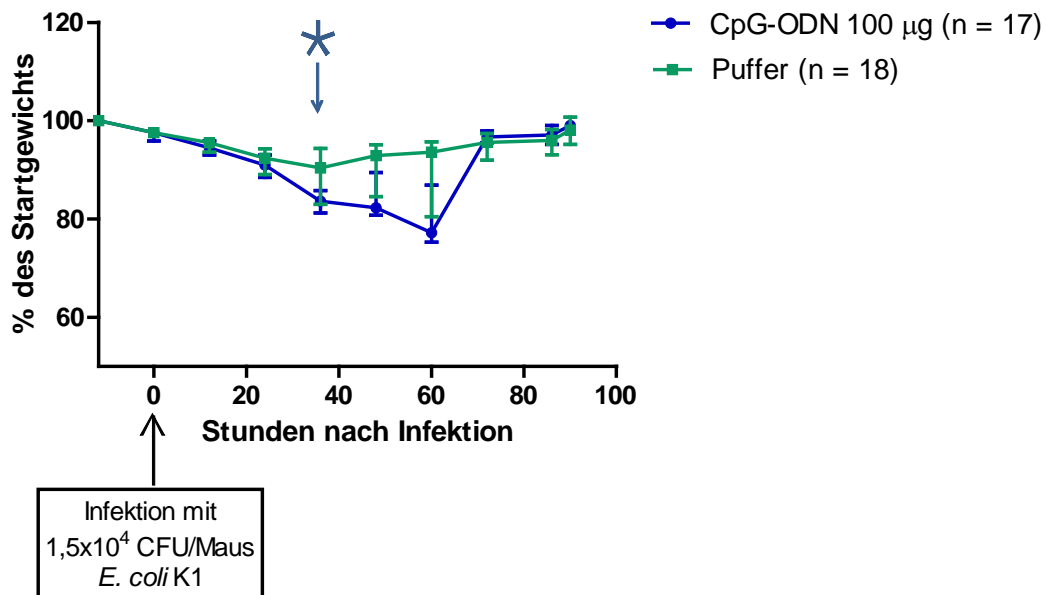


Abbildung 36: Gewichtsentwicklung der mit $100 \mu\text{g}$ CpG-ODN behandelten TLR9-defizienten Mäuse im Vergleich zu den mit Puffer behandelten TLR9-defizienten Mäusen nach intrazerebraler Infektion mit $1,5 \times 10^4$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median mit den dazugehörigen Interquartilsabständen der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Verstorbene Mäuse wurden nach ihrem Tod bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Der Stern markiert den Zeitpunkt 36 Stunden nach Infektion mit $P = 0,0475$ (Mann-Whitney-U-Test). Zum Zeitpunkt 60 Stunden nach Infektion befanden sich 10 Mäuse in der CpG-Gruppe und 12 Mäuse in der Puffergruppe.

Der Vergleich des klinischen Scores zu dem Zeitpunkt 36 Stunden nach Infektion ergab mit $P = 0,2265$ (Mann-Whitney-U-Test) keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den immunsupprimierten und mit $100 \mu\text{g}$ CpG-ODN behandelten Mäusen im Vergleich zu den mit Puffer behandelten immunsupprimierten Mäusen (Abbildung 37). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 16 Mäuse in der CpG-Gruppe und 18 Mäuse in der Puffergruppe.

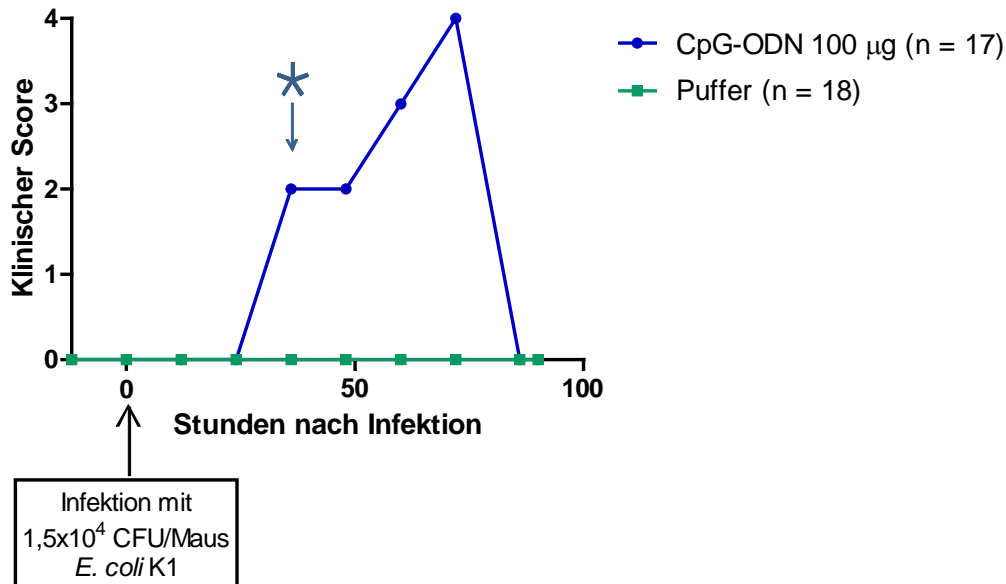


Abbildung 37: Entwicklung des klinischen Scores der mit $100 \mu\text{g}$ CpG-ODN behandelten immunsupprimierten TLR9-defizienten Mäuse im Vergleich zu den immunsupprimierten und mit Puffer behandelten TLR9-defizienten Mäusen nach intrazerebraler Infektion mit $1,5 \times 10^4$ CFU/Maus *Escherichia coli* K1. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Verstorbene Mäuse erhielten nach dem Todeszeitpunkt einmalig einen Score von 4 und wurden bei der weiteren Auswertung nicht mehr berücksichtigt. Der Stern markiert den Zeitpunkt 36 Stunden nach Infektion mit $P = 0,2265$ (Mann-Whitney-U-Test). Zum Zeitpunkt 60 Stunden nach Infektion befanden sich 12 Mäuse in der CpG-Gruppe und 14 Mäuse in der Puffergruppe.

3.5 Gewichtsabnahme nach CpG-ODN-Injektion

Während der Experimente konnte man beobachten, dass die immunsupprimierten Mäuse (7 Tage mit Anti-Ly-6G-Antikörper behandelt), die mit 100 µg CpG-ODN behandelt wurden, 12 Stunden nach der CpG-Injektion einen Gewichtsverlust aufwiesen, der in der Puffergruppe nicht nachzuweisen war, der aber 36 Stunden nach Injektion wieder rückläufig war.

Da CpG-ODN neben ihrem protektiven Effekt auch Makrophagen zur Produktion von schädlich hohen Konzentrationen an TNF- α veranlassen können, könnte dies die Gewichtsabnahme erklären (Sparwasser et al. 1997).

Wie in Abbildung 38 gezeigt ist, wiesen die immunsupprimierten und mit CpG-ODN behandelten Mäuse an Tag -2 nach der CpG-ODN-Injektion 94,1 % (92,9 - 95,2 %) ihres Körpergewichtes auf, während die immunsupprimierten Mäuse der Puffergruppe 101,3 % (100,0 - 102,2 %) ihres Startgewichts aufwiesen. Die Daten sind als Median (Interquartilsabstand 25 % - 75 %) angegeben.

Der Vergleich der beiden Gruppen zum Zeitpunkt Tag -2 ergibt nach Auswertung mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests einen statistisch signifikanten Unterschied der beiden Gruppen von $P < 0,0001$.

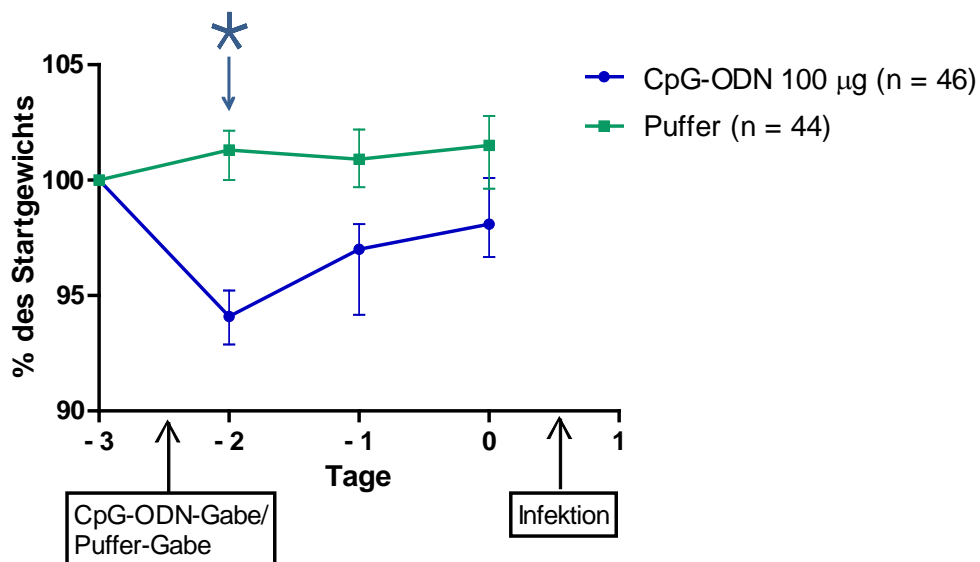


Abbildung 38: Gewichtsentwicklung der immunsupprimierten und mit CpG-ODN behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit Puffer behandelten immunsupprimierten Mäusen nach intraperitonealer Gabe von 100 µg CpG-ODN bzw. Puffer. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median mit dem dazugehörigen Interquartilsabstand der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Der Stern markiert den Tag -2 mit $P < 0,0001$ (Mann-Whitney-U-Test).

Wie in Abbildung 39 gezeigt ist, wiesen die immunkompetenten und mit CpG-ODN behandelten Mäuse an Tag -2 nach der CpG-ODN-Injektion 95,7 % (94,3 - 96,7 %) ihres Körpergewichtes auf, während die immunkompetenten Mäuse der Puffergruppe 98,7 % (97,0 - 101,3%) ihres Startgewichtes aufwiesen. Die Daten sind als Median (Interquartilsabstand 25 % - 75 %) angegeben.

Der Vergleich der beiden Gruppen zum Zeitpunkt Tag -2 ergab nach Auswertung mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests einen statistisch signifikanten Unterschied der beiden Gruppen von $P < 0,0001$.

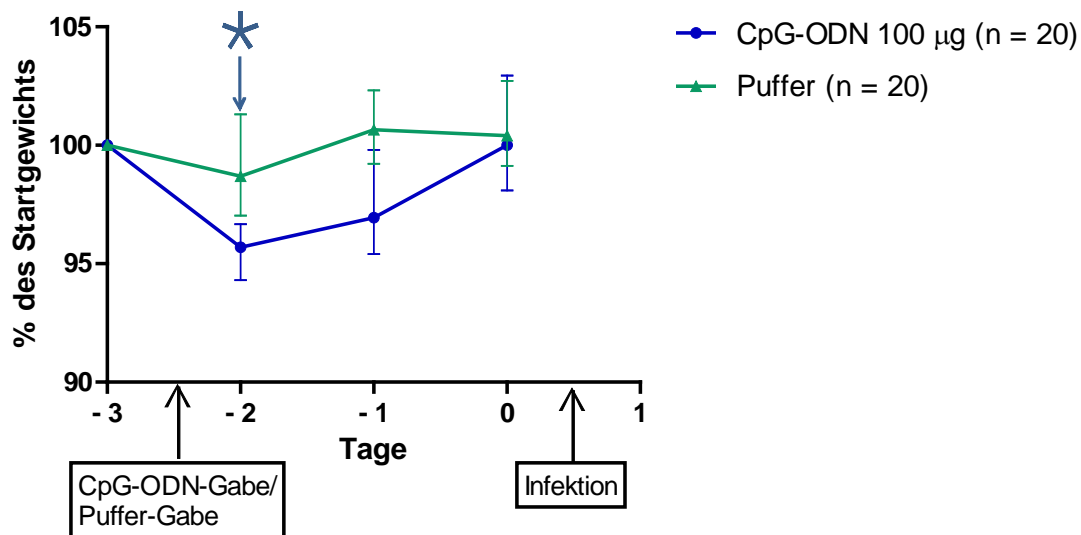


Abbildung 39: Gewichtsentwicklung der immunkompetenten und mit CpG-ODN behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit Puffer behandelten immunkompetenten Mäusen nach intraperitonealer Gabe von 100 µg CpG-ODN bzw. Puffer. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median mit dem dazugehörigen Interquartilsabstand der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Der Stern markiert den Tag -2 mit $P < 0,0001$ (Mann-Whitney-U-Test).

Wie in Abbildung 40 gezeigt ist, wiesen die immunsupprimierten und mit CpG-ODN behandelten TLR9-defizienten Mäuse an Tag -2 nach der CpG-ODN-Injektion 99,1 % (97,1 - 99,4 %) ihres Körpergewichtes auf, während die immunsupprimierten TLR9-defizienten Mäuse der Puffergruppe 99,5 % (97,5 - 100,1 %) ihres Startgewichts aufwiesen. Die Daten sind als Median (Interquartilsabstand 25 % - 75 %) angegeben.

Der Vergleich der beiden Gruppen zum Zeitpunkt Tag -2 ergab nach Auswertung mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests mit $P = 0,3665$ keinen statistisch signifikanten Unterschied der beiden Gruppen.

Dies lässt darauf schließen, dass der TLR9 in die Vermittlung des Gewichtsverlustes eingebunden war.

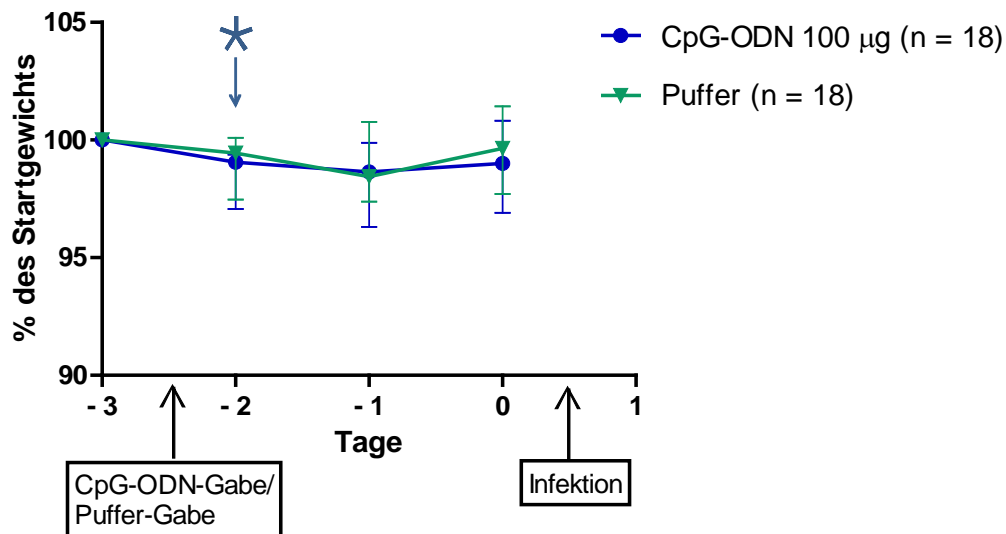


Abbildung 40: Gewichtsentwicklung der immunsupprimierten und mit CpG-ODN behandelten TLR9-defizienten Mäuse im Vergleich zu den mit Puffer behandelten immunsupprimierten TLR9-defizienten Mäusen nach intraperitonealer Gabe von 100 µg CpG-ODN bzw. Puffer. Die dargestellten Punkte stehen jeweils für den Median mit dem dazugehörigen Interquartilsabstand der Gruppe zu dem angegebenen Zeitpunkt. Der Stern markiert den Tag -2 mit $P = 0,3665$ (Mann-Whitney-U-Test).

4. Diskussion

4.1 Der Beitrag von MyD88- und TRIF- Signalvermittlung zur Resistenz des Gehirns von Mäusen gegen *Escherichia-coli*-K1-Meningitis

Das Gehirn wird durch verschiedene Mechanismen vor dem Eindringen pathogener Erreger geschützt, die einer Festung ähneln. Der äußere Wall wird von der Blut-Hirn-Schranke beziehungsweise von der Blut-Liquor-Schranke gebildet, die das unkontrollierte Eindringen von löslichen Molekülen, pathogenen Keimen und körpereigenen Zellen verhindern sollen. Der vom Liquor umflossene Raum dient als Wassergraben. Der innere Wall wird von den Ausläufern der Astrozyten und von der parenchymalen Basalmembran gebildet. Im Inneren der Festung befindet sich die Mikroglia, die das umliegende Gewebe überwacht (Engelhardt und Coisne 2011). Die Mikroglia ist nach dem Eindringen von Pathogenen in der Lage, diese zu phagozytieren. Durch die Stimulation der TLRs lässt sich sowohl die Phagozytose als auch das intrazelluläre Abtöten steigern (Ribes et al. 2009).

Um die Rolle der intrazellulären Signalvermittler MyD88 und TRIF, die die beiden wichtigsten Wege in der Signalvermittlung des TLR4 darstellen, in Bezug auf eine *Escherichia-coli*-K1-Meningitis aufzudecken, wurden jeweils die einzelnen Wege mit Hilfe von MyD88-defizienten bzw. TRIF-defizienten Mäusen untersucht. Die Mikroglia ist mit Hilfe der TLRs in der Lage, PAMPs zu erkennen und dadurch eine Immunantwort anzustoßen (Visintin et al. 2001). Es ist bereits bekannt, dass der MyD88-Signalweg eine wichtige Rolle in der Immunaktivierung und damit auch in der Abwehr des ZNS gegen das Gram-positive Bakterium *Streptococcus pneumoniae* hat (Koedel et al. 2004) und ebenfalls das Überleben einer *Escherichia-coli*-Sepsis beeinflusst (van't Veer et al. 2011). Dies lässt vermuten, dass eine intakte MyD88-Signalübertragung der TLRs notwendig ist für den Schutz des Gehirnparenchyms gegen eindringende Mikroorganismen.

In dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass MyD88 ein wichtiger Baustein in der Abwehr gegen eine intrazerebrale Infektion sowie in der Erkennung und in der Elimination des Gram-negativen Bakteriums *Escherichia coli* K1 ist und dass ohne diesen Baustein die Kontrolle über die Erreger stark beeinträchtigt ist. Die Bakterientiter waren in der MyD88^{-/-}-Gruppe im Vergleich zu den Wildtypmäusen stark erhöht. Diese korrelierten mit einer erhöhten Sterblichkeit in den MyD88-defizienten Mäusen. Selbst bei Erregerdosen, bei denen alle Wildtypmäuse überlebten, starben in der MyD88^{-/-}-Gruppe 90%.

Im Gegensatz dazu ist TRIF für ein besseres Überleben einer *Escherichia-coli*-K1-Meningitis nicht erforderlich. Es konnte gezeigt werden, dass die TRIF-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen keine statistisch signifikanten Einschränkungen im Überleben aufwiesen. Es trat auch kein Unterschied im Verlauf des Klinischen Scores auf, was auf einen nur geringen Stellenwert des TRIF-Weges bei einer intrazerebralen *Escherichia-coli*-Meningitis hinweist.

Vergleichbar mit diesen Ergebnissen haben TRIF-defiziente Mäuse einen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zu MyD88-defizienten Mäusen in einem *Escherichia-coli*-Sepsis-Modell (van't Veer et al. 2011).

4.2 Die Rolle der neutrophilen Granulozyten beim Schutz gegen *Escherichia-coli*-K1-Meningitis im Gehirn von Mäusen

Mikrogliazellen und andere ZNS-Makrophagen kommunizieren mit zirkulierenden Blutzellen über vielfältige Mechanismen (Perry et al. 2007). Neutrophile Granulozyten werden in hoher Zahl im Knochenmark produziert und zirkulieren für einige Stunden im Blut. Während einer Infektion werden sie von den Endothelzellen angezogen. Diese Neutrophilen-Endothel-Interaktionen umfassen die rollende Adhäsion, gefolgt von der festen Bindung und anschließender Diapedese (Borregaard 2010). Zusätzlich wirken einige proinflammatorische Mediatoren aktivierend auf die Endothelzellen, wodurch die Blut-Hirn-Schranke durchlässiger wird (Kielian et al. 2001).

Wahrscheinlich erhöht eine defekte Neutrophilen-Rekrutierung die Anfälligkeit des Körpers gegen eine bakterielle Infektion. Mäuse mit fehlender Expression der CD11b⁺Ly-6G⁺CCR2⁻-Granulozyten weisen erhöhte Bakterientiter im Gehirn, sowie einen schwereren klinischen Verlauf und eine erhöhte Letalität nach einer *Streptococcus-pneumoniae*-Meningitis auf (Mildner et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Senkung der neutrophilen Granulozyten der Anti-Ly-6G-Antikörper verwendet. Mit diesem Antikörper wird eine spezifische Depletierung der neutrophilen Granulozyten vorgenommen und keine gemeinsame Depletierung der neutrophilen Granulozyten und Monozyten erzeugt, wie es bei dem Antikörper Anti-Gr-1 der Fall ist (Daley et al. 2008). Durch die Depletion der neutrophilen CD11b⁺Ly-6G⁺Ly-6C⁺-Granulozyten durch den monoklonalen Anti-Ly-6G-Antikörper wird eine systemische Neutropenie erzeugt. Es wurde aufgezeigt, dass die Behandlung mit Anti-Ly-6G zu erhöhten bakteriellen Titern im Kleinhirn und in der Milz führt und schließlich erhöhte Letalität bei der

experimentellen *Escherichia-coli*-K1-Meningitis im Vergleich zur IgG2a-Gruppe verursacht. Zusätzlich zeigten die Mäuse, die mit dem Anti-Ly-6G-Antikörper behandelt wurden, schwerere klinische Symptome, als in der Gruppe der Mäuse, die mit dem Isotyp behandelt wurden.

Damit ist gezeigt, dass die im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten eine wesentliche Rolle in der Erkennung und in der Elimination von *Escherichia-coli*-K1-Meningitis spielen. Der starke nachteilige Effekt der Neutropenie auf die Resistenz des Gehirns gegen die intrazerebrale Infektionen mit *Escherichia coli* K1 war unerwartet, da die Mikroglia als die erste Abwehr bei der intrazerebralen Injektion unberührt sein sollte. Die wahrscheinlichste Schlussfolgerung ist, dass die protektiven Funktionen der Mikrogliazellen und anderer ZNS-ständiger Makrophagen in der frühen Phase der Infektion abhängig sind von der Kommunikation mit zirkulierenden Granulozyten und von der Aktivität dieser Granulozyten.

4.3 Die Prophylaxe mit 100 µg CpG-ODN steigerte die Resistenz des Gehirns gegen *Escherichia-coli*-K1-Meningitis in neutropenischen Mäusen

Die *Escherichia-coli*-Meningitis ist eine Erkrankung, die vor allem bei immunsupprimierten Patienten nach einer zytotoxischen Chemotherapie auftritt (Armstrong 1984). Es kommt hinzu, dass die therapeutischen Möglichkeiten auf Grund von Resistenzentwicklung abnehmen (Dubois et al. 2009), wie beispielsweise bei der Bildung von ESBL (Erweitertes-Spektrum an Beta-Laktamase). Diese Beta-Laktamase ist in der Lage, eine Mehrzahl der Penicilline und Cephalosporine zu hydrolysieren, wodurch diese ihre Wirkung verlieren (Mariani-Kurkdjian et al. 2012). Des Weiteren kommt es nach einer Meningitis häufig zu Einschränkungen der psychomotorischen Leistungen (Merkelbach et al. 2000; Nau und Brück 2002).

Aus diesen Gründen wäre es sinnvoll, bei immunsupprimierten Patienten bereits vor einer Infektion das Immunsystem so zu aktivieren, dass es nicht zur klinischen Ausprägung einer Meningitis kommt, wenn Bakterien ins ZNS eindringen.

Wie sich bereits *in vitro* zeigte, führt die Aktivierung von TLR9 durch Zugabe von CpG-ODN zu Mikroglia-Zellkulturen zur Produktion verschiedener Zytokine, die das Immunsystem bereits vor der Anwesenheit von Pathogenen in Alarmbereitschaft versetzen (Ribes et al. 2009).

In Nagetiermodellen wurde aufgezeigt, dass eine Behandlung mit CpG-ODN einen protektiven Effekt bei einer Infektion mit *Francisella tularensis*, *Listeria monocytogenes*

(Elkins et al. 1999) sowie *Cryptosporidium parvum* (Barrier et al. 2006) oder mit *Plasmodium yodii* (Gramzinski et al. 2001) als auch bei akuter mikrobieller Sepsis aufweist (Weighardt et al. 2000). CpG-ODN scheinen einen Schutz gegen eine Vielzahl von extrazerebralen Infektionen zu vermitteln.

Diese Möglichkeit sollte sich bei gefährdeten Personen, z.B. Personen mit Neutropenie, nutzen lassen, um sie vor einem schweren Krankheitsverlauf mit begleitenden nosokomialen Infektionen zu schützen und somit das Behandlungsergebnis zu verbessern.

Es wurde erstmalig aufgezeigt, dass systemische Immunstimulation nicht nur gegen systemische Infektionen schützen kann, sondern auch in der Lage ist, die lokale Infektionsresistenz des Gehirns zu steigern. Wenn Bakterien in das Gehirn eindringen oder direkt dort injiziert werden, bestimmt die Funktion der in der Nähe befindlichen Mikrogliazellen darüber, ob die Infektion schnell eingedämmt werden kann, oder ob die Infektion sich ausbreitet und eventuell sogar zum Tod des Wirts führt (Nau und Brück 2002). Das Ziel der Arbeit war es, die lokale Immunabwehr so zu stärken, dass die intrazerebral verabreichten Bakterien erfolgreich bekämpft werden konnten.

Mit Hilfe der Tierversuche, konnte ein klarer Effekt von 100 µg CpG-ODN aufgezeigt werden. Die Letalität der depletierten Mäuse nach Induktion einer *Escherichia-coli*-K1-Meningitis wurde im Vergleich zur mit Puffer behandelten Kontrollgruppe von über 60 % auf 25 % verringert ($P = 0,0003$). Die mit CpG-ODN behandelten Mäuse zeigten 42 Stunden nach der Infektion signifikant niedrigere Bakterientiter im Kleinhirn und in der Milz (Kleinhirn $P = 0,01$; Milz $P = 0,04$).

Von 10 Tieren, die mit CpG-ODN behandelt wurden, zeigten 5 Tiere Bakterientiter unter der Nachweisgrenze im Kleinhirn bzw. 4 von 10 Tieren Titer unter der Nachweisgrenze in der Milz. Keine der Mäuse der Kontrollgruppe zeigte im Kleinhirn oder in der Milz Bakterientiter unter der Nachweisgrenze. Im Blut wurde kein Unterschied der beiden Gruppen nachgewiesen. In den immunkompetenten Mäusen konnte im Gegensatz dazu nur eine Reduktion der Bakteriendichte um 15 % erreicht werden, was keinen statistisch signifikanten Unterschied darstellt.

Der zugrunde liegende Mechanismus der Prophylaxe ist die Bindung des CpG-ODN an den TLR9, wodurch es zur Ausschüttung von Zytokinen kommt, die das Immunsystem aktivieren (Krieg et al. 1995, Ribes et al. 2010). Viele systemisch verabreichten TLR-Agonisten, unter anderem auch CpG-ODN, sind auf Grund ihrer Molekulargröße von über 6000 Da nicht in der Lage, in ausreichender Konzentration in das Gehirn einzudringen, um dort direkt die Mikrogliazellen zu stimulieren (Nau et al. 2010). Trotzdem zeigte sich nach intraperitonealer

Injektion von CpG-ODN eine gesteigerte lokale Infektionsabwehr des Gehirns gegen eindringende Bakterien. Die TLR9-defizienten Mäuse wiesen nach der CpG-ODN-Injektion keine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit auf als die Mäuse der Kontrollgruppe. Diese Daten zeigen, dass der protektive Effekt tatsächlich über den TLR9 vermittelt wird und nicht durch einen anderen unspezifischen immunstimulatorischen Effekt hervorgerufen wurde. Wie bereits erwähnt, ist die Steigerung der Resistenz gegen Infektionen des Gehirns nach der systemischen Gabe von CpG-ODN wahrscheinlich nicht die Konsequenz der direkten Aktivierung der Mikroglia. Die Lipidschicht der Bluthirnschranke bildet ein großes Hindernis für das Eindringen hydrophiler Substanzen aus dem Blut in das Gehirn, die eine ungefähre Größe von 6000 Da aufweisen. Trotz der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Liquor-Schranke sind Mikrogliazellen und ortsständige Makrophagen des ZNS in der Lage, mit zirkulierenden Blutzellen über verschiedene Mechanismen zu kommunizieren (Perry et al. 2007). Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass das Fehlen von neutrophilen Granulozyten die Resistenz des Gehirns gegen eine *Escherichia-coli*-Meningitis stark senkte. Wie oben ausgeführt wurde, war dies ebenfalls auf die fehlende Kommunikation der Mikrogliazellen mit im Blut zirkulierenden, neutrophilen Granulozyten zurückzuführen. Die Aktivierung der Mikroglia vor einer Infektion scheint also mit Hilfe einer Kommunikation der Mikrogliazellen mit Blutzellen statt zu finden.

Es muss erwähnt werden, dass die Behandlung mit CpG-ODN bei immunsupprimierten und immunkompetenten Mäusen auch Nebenwirkungen aufwies, die sich vor allem darin zeigten, dass die Mäuse einen Tag nach der CpG-ODN-Injektion, im Vergleich zur mit Puffer behandelten Kontrollgruppe, signifikant an Gewicht verloren. Da dieser Gewichtsverlust bei den TLR9-defizienten Mäusen nicht nachgewiesen wurde, muss dieser Effekt ebenfalls mit der Aktivierung des TLR9 zusammenhängen. CpG-induzierte Symptome konnten auch in klinischen Studien beobachtet werden (Kozak et al. 2006). Wir beobachteten bei den Mäusen trotz des initialen Gewichtsverlusts durch die CpG-ODN-Gabe aber eine hohe Steigerung des Überlebens.

Bei den TLR9-defizienten Mäusen konnte, nach der CpG-ODN-Injektion kein initialer Gewichtsverlust beobachtet werden. Allerdings wiesen diese Mäuse nach der Infektion eine nicht zu erklärende Verschlechterung des Überlebens auf, im Vergleich zu den mit Puffer behandelten Mäusen. Sie waren weder in der Lage, bei bestehender Neutropenie das Immunsystem in Alarmbereitschaft zu versetzen, noch eine höhere bakterielle Abtötung zu erzielen. Sie wurden durch die CpG-ODN-Injektion sogar geschädigt. Hierbei handelt es sich

wahrscheinlich um eine Nebenwirkung der CpG-ODNs, die bei Vorhandensein des TLR9 durch den protektiven Effekt der Substanz überlagert wird.

Bei den immunkompetenten Mäusen brachte die Behandlung mit CpG-ODN und die damit verbundene Versetzung des Immunsystems in Alarmbereitschaft keine signifikante Steigerung der Abwehr gegen die intrakranielle Injektion von *Escherichia coli* K1. Es konnte nur ein milder protektiver Effekt ermittelt werden. Anscheinend ist die Immunantwort bei voller Immunkompetenz nur begrenzt steigerbar. In den immunkompetenten Mäusen war auch ohne Stimulation der TLR9 eine relativ hohe Resistenz gegen die *E.coli*-Meningitis vorhanden, was dadurch zu erkennen war, dass zur Infektion der immunsupprimierten Mäuse 5×10^3 CFU/Maus injiziert wurden, um eine Sterblichkeit von ca. 60 % in der Puffergruppe zu erzielen, während in den immunkompetenten Mäusen ein Inoculum von 2×10^5 CFU/Maus nötig war.

Es wurde gezeigt, dass eine intraperitoneale Injektion von CpG-ODN nicht ausschließlich die peritonealen und im Blut zirkulierenden Phagozyten aktivieren, sondern dass auch die Phagozyten aktiviert werden, die sich im ZNS befinden.

CpG-ODN bietet also eine therapeutische Möglichkeit, speziell bei Patienten, die beispielsweise durch eine Chemotherapie immungeschwächt sind, protektiv gegen bakterielle ZNS-Infektionen vorzugehen. Man könnte diesen Patienten damit eine lange und schwere Krankheitsdauer ersparen und schließlich das Risiko von Komplikationen und bleibenden Schädigungen minimieren. Es muss bedacht werden, dass man mit dem protektiven Effekt auch eine schädigende Wirkung auslösen kann (Iliev et al. 2004).

5. Zusammenfassung

Escherichia coli ist eine der Hauptursachen von Meningitis und Meningoencephalitis in älteren und immunsupprimierten Patienten sowie von der durch Gram-negative Bakterien verursachten Meningitis bei Säuglingen. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir den Beitrag der neutrophilen Granulozyten und der TLR-Signalkaskade zur Resistenz adulter Mäuse gegen eine intrazerebrale *Escherichia-coli*-K1-Infektion, anhand von Mäusen, deren neutrophile Granulozyten durch den Anti-Ly-6G-Antikörper depletiert wurden sowie mit Hilfe von MyD88-defizienten und TRIF-defizienten Mäusen. Ein Mangel an MyD88-Adapter-Proteinen reduzierte dramatisch das Überleben der Tiere, während das Fehlen von TRIF-Adapter-Proteinen keine Einschränkung im Überleben nach sich zog im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Die Depletion der neutrophilen CD11b⁺Ly-6G⁺Ly-6C^{int}-Granulozyten durch intraperitoneale Injektion des Anti-Ly-6G-Antikörpers führte zu höheren bakteriellen Titern im Kleinhirn und in der Milz und schließlich zu einer erhöhten Letalität im Vergleich zu den mit dem Isotyp behandelten Mäusen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass der den Toll-like-Rezeptoren nachgeschaltete MyD88-Signalweg und die neutrophilen Granulozyten wichtige Elemente in der Immunabwehr während der Frühphase einer *Escherichia-coli*-Meningitis sind.

Wie bereits in verschiedenen Experimenten gezeigt wurde, können CpG-ODNs Tiere vor verschiedenen Infektionen schützen (Elkins et al. 1999; Barrier et al. 2006). Vor diesem Hintergrund prüften wir, ob eine prophylaktische Behandlung mit CpG-ODN ebenfalls vor einer experimentell erzeugten Infektion des Zentralen Nervensystems schützt.

Dazu wurden Mäuse, denen mit Hilfe des Anti-Ly-6G-Antikörpers eine Neutropenie induziert wurde, sowie immunkompetente Mäuse und TLR9-defiziente Mäuse jeweils intrakraniell mit *Escherichia coli* K1 infiziert. Drei Tage vor der Infektion bekamen die Mäuse der CpG-Gruppen eine einmalige intraperitoneale Injektion von 100 µg CpG-ODN.

Hierbei zeigte sich, dass die Behandlung mit CpG-ODN die Letalität nach einer intrazerebralen Infektion von 66 % auf 23 % bei den neutropenischen Mäusen senkte ($P = 0,0002$, Log-Rank-Test). Zusätzlich wiesen die mit CpG-ODN behandelten Mäuse 42 Stunden nach Infektion geringere bakterielle Titer im Kleinhirn und in der Milz auf, als es in den mit Puffer behandelten Tieren der Fall war ($P = 0,01$ und $P = 0,04$, Mann-Whitney-U-Test). In den immunkompetenten Mäusen war die Letalität der mit CpG-ODN behandelten Mäuse leicht niedriger im Vergleich zur Puffergruppe, es konnte jedoch kein statistisch

signifikanter Unterschied gefunden werden. TLR9-defiziente Mäuse erhielten keinen schützenden Effekt durch die prophylaktische Behandlung mit CpG-ODN. Dies zeigt, dass die prophylaktische Behandlung mit CpG-ODN nicht nur während einer systemischen Infektion einen Vorteil bringt, sondern ebenfalls die Resistenz von neutropenischen Mäusen gegen eine ZNS-Infektion mit *Escherichia coli* erhöht. Somit könnte CpG-ODN in Zukunft ein Mittel bieten, um neutropenische Patienten prophylaktisch vor einer *Escherichia-coli*-K1-Meningitis zu schützen und ihnen somit schwere Verlaufsformen und Komplikationen der Krankheit zu ersparen.

6. Literaturverzeichnis

- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015
- Armstrong D (1984): Central nervous system infections in the immunocompromised host. *Infection*, 12, S58-S64. DOI: 10.1007/BF01641746
- Barrier M, Lacroix-Lamandé S, Mancassola R, Auray G, Bernardet N, Chauussé AM, Uematsu S, Akira S, Laurent F (2006): Oral and intraperitoneal administration of phosphorothioate oligodeoxynucleotides leads to control of *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal mice. *J Infect Dis*, 193, 1400-1407. DOI: 10.1086/503748
- Borregaard N (2010): Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33, 657-670. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.11.011
- Boyer-Mariotte S, Duboc P, Bonacorsi S, Lemeland JF, Bingen E, Pinquier D (2008): CTX-M-15-producing *Escherichia coli* in fatal neonatal meningitis: failure of empirical chemotherapy. *J Antimicrob Chemother*, 62, 1472-1474. DOI: 10.1093/jac/dkn362
- Chace JH, Hooker NA, Mildenstein KL, Krieg AM, Cowdery JS (1997): Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin Immunol Immunopathol* 84, 185-193. DOI: 10.1006/clin.1997.4380
- Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE (2008): Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol*, 83, 64-70. DOI: 10.1189/jlb.0407247
- Djukic M, Mildner A, Schmidt H, Czesnik D, Brück W, Priller J, Nau R, Prinz M (2006): Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain*, 129, 2394-2403. DOI: 10.1093/brain/awl206
- Dubois D, Prasadarao NV, Mittal R, Bret L, Roujou-Gris M, Bonnet R (2009): CTX-M beta-lactamase production and virulence of *Escherichia coli* K1. *Emerg Infect Dis*, 15, 1988-1990. DOI: 10.3201/eid1512.090928
- Elkins KL, Rhinehart-Jones TR, Stibitz S, Conover JS, Klinman DM (1999): Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol*, 162, 2291-2298.
- Engelhardt B, Coisne C (2011): Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS*, 8, 4. DOI: 10.1186/2045-8118-8-4
- Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR (1993): Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol*, 151, 2399-2408.
- Gerber J, Raivich G, Wellmer A, Noeske C, Kunst T, Werner A, Bruck W, Nau R (2001): A mouse model of *Streptococcus pneumoniae* meningitis mimicking several features of human disease. *Acta Neuropathol*, 101, 499-508.

- Gramzinski RA, Doolan DL, Sedegah M, Davis HL, Krieg AM, Hoffman SL (2001): Interleukin-12- and gamma Interferon-dependent protection against Malaria conferred by CpG oligodeoxynucleotide in mice. *Infect Immun*, 69, 1643-1649. DOI: 10.1128/IAI.69.3.1643-1649.2001
- Grimwood K, Anderson P, Anderson V, Tan L, Nolan T (2000): Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. *Arch Dis Child*, 83, 111-116. DOI: 10.1136/adc.83.2.111
- Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H (2000): Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med*, 192, 595-600. DOI: 10.1084/jem.192.4.595
- Hanisch UK, Kettenmann H (2007): Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, 10, 1387-1394. DOI: 10.1038/nn1997
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sako S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Tajeda K, Akira S (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408, 740-745.
- Iliev AI, Stringaris AK, Nau R, Neumann H (2004): Neuronal injury mediated via stimulation of microglial toll-like receptor-9 (TLR9). *FASEB J*, 18, 412-414. DOI: 10.1096/fj.03-0670fje
- Kielian T, Barry B, Hickey WF (2001): CXC chemokine receptor-2 ligands are required for neutrophil-mediated host defense in experimental brain abscesses. *J Immunol*, 166, 4634-4643.
- Kim KS (2012): Current concepts on the pathogenesis of *Escherichia coli* meningitis: implications for therapy and prevention. *Curr Opin Infect Dis*, 25, 273-278. DOI: 10.1097/QCO.0b013e3283521eb0
- Klinman DM (2004): Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol*, 4, 249-258. DOI: 10.1038/nri1329
- Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM (1996): CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2879-2883. DOI: 10.1073/pnas.93.7.2879
- Koedel U, Rupprecht T, Angele B, Heesemann J, Wagner H, Pfister HW, Kirschning CJ (2004): MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS. *Brain*, 127, 1437-1445. DOI: 10.1093/brain/awh171
- Kozak W, Wrotek S, Kozak A (2006): Pyrogenicity of CpG-DNA in mice: role of interleukin-6, cyclooxygenases, and nuclear factor-kappaB. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290, R871-R880. DOI: 10.1152/ajpregu.00408.2005
- Kreutzberg GW (1996): Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19, 312-318. DOI: 10.1016/0166-2236(96)10049-7
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM (1995): CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374, 546-549. DOI: 10.1038/374546a0

- Lipford GB, Sparwasser T, Bauer M, Zimmermann S, Koch ES, Heeg K, Wagner H (1997): Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur J Immunol*, 27, 3420-3426. DOI: 10.1002/eji.1830271242
- Lukes SA, Posner JB, Nielsen S, Armstrong D (1984): Bacterial infections of the CNS in neutropenic patients. *Neurology*, 34, 269-275. DOI: 10.1212/WNL.34.3.269
- Mariani-Kurkdjian P, Doit C, Bingen E (2012): Extended-spectrum beta-lactamase producing-enterobacteriaceae. *Arch Pediatr*, 19, S93-S96. DOI: 10.1016/S0929-693X(12)71280-0
- Merkelbach S, Sittinger H, Schweizer I, Müller M (2000): Cognitive outcome after bacterial meningitis. *Acta Neurol Scand*, 102, 118-123. DOI: 10.1034/j.1600-0404.2000.102002118.x
- Mildner A, Djukic M, Garbe D, Wellmer A, Kuziel WA, Mack M, Nau R, Prinz M (2008): Ly-6G+ CCR2- myeloid cells rather than Ly-6C(high) CCR2+ monocytes are required for the control of bacterial infection in the central nervous system. *J Immunol*, 181, 2713-2722.
- Nau R, Brück W (2002): Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci*, 25, 38-45. DOI: 10.1016/S0166-2236(00)02024-5
- Nau R, Schuchardt V, Prange HW (1990): Zur Listeriose des Zentralnervensystems: Fortschritte der Neurologie. *Psychiatrie*, 58, 408-422.
- Nau R, Sörgel F, Eiffert H (2010): Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev*, 23, 858-883. DOI: 10.1128/CMR.00007-10
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005): Resting microglia cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308, 1314-1318. DOI: 10.1126/science.1110647
- Ninalga C, Loskog A, Klevenfeldt M, Essand M, Totterman TH (2005): CpG oligonucleotide therapy cures subcutaneous and orthotopic tumors and evokes protective immunity in murine bladder cancer. *J Immunother*, 28, 20-27. DOI: 10.1097/00002371-200501000-00003
- Perry VH, Cunningham C, Holmes C (2007): Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol*, 7, 161-167. DOI: 10.1038/nri2015
- Pruitt AA (2010): Central nervous system infections in cancer patients. *Semin Neurol*, 30, 296-310. DOI: 10.1055/s-0030-1255216
- Ribes S, Ebert S, Czesnik D, Regen T, Zeug A, Bunkowski S, Mildner A, Eiffert H, Hanisch UK, Hammerschmidt S, Nau R (2009): Toll-like receptor prestimulation increases phagocytosis of *Escherichia coli* DH5alpha and *Escherichia coli* K1 strains by murine microglial cells. *Infect Immun*, 77, 557-564. DOI: 10.1128/IAI.00903-08
- Ribes S, Ebert S, Regen T, Agarwal A, Tauber SC, Czesnik D, Spreer A, Bunkowski S, Eiffert H, Hanisch UK, Hammerschmidt S, Nau R (2010): Toll-like receptor stimulation enhances phagocytosis and intracellular killing of nonencapsulated and encapsulated *Streptococcus pneumoniae* by murine microglia. *Infect Immun*, 78, 865-871. DOI: 10.1128/IAI.01110-09

Russo TA, Johnson JR (2003): Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect*, 5, 449-456. DOI: 10.1016/S1286-4579(03)00049-2

Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Borschert K, Hacker H, Heeg K, Wagner H (1997): Bacterial DNA causes septic shock. *Nature*, 386, 336-337. DOI: 10.1038/386336a0

Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H (1998): Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol*, 28, 2045-2054. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199806)28:06<2045::AID-IMMU2045>3.0.CO;2-8

Sparwasser T, Hultner L, Koch ES, Luz A, Lipford GB, Wagner H (1999): Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis. *J Immunol*, 162, 2368-2374.

Spreer A, Lugert R, Stoltefaut V, Hoecht A, Eiffert H, Nau R (2009): Short-term rifampicin pretreatment reduces inflammation and neuronal cell death in a rabbit model of bacterial meningitis. *Crit Care Med*, 37, 2253-2258. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181a036c0

Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003): Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 21, 335-376.

van't Veer C, van den Pangaart PS, Kruijswijk D, Florquin S, de Vos AF, van der Poll T (2011): Delineation of the role of Toll-like receptor signaling during peritonitis by a gradually growing pathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 286, 36603-36618. DOI: 10.1074/jbc.M110.189126

Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM (2001): Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol*, 166, 249-255.

Weighardt H, Feterowski C, Veit M, Rump M, Wagner H, Holzmann B (2000): Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J Immunol*, 165, 4537-4543.

Wellmer A, von Mering M, Spreer A, Diem R, Eiffert H, Noeske C, Bunkowski S, Gold R, Nau R (2004): Experimental pneumococcal meningitis: impaired clearance of bacteria from the blood due to increased apoptosis in the spleen in Bcl-2-deficient mice. *Infect Immun*, 72, 3113-3119. DOI: 10.1128/IAI.72.6.3113-3119.2004

Wojtasiak M, Pickett DL, Tate MD, Londrigan SL, Bedoui S, Brooks AG, Reading PC (2010): Depletion of Gr-1+, but not Ly6G+, immune cells exacerbates virus replication and disease in an intranasal model of herpes simplex virus type 1 infection. *J Gen Virol*, 91, 2158-2166. DOI: 10.1099/vir.0.021915-0

Lebenslauf

Am 21.09.1982 wurde ich in Kassel geboren. Von 1989 bis 1993 besuchte ich die Grundschule Hoof und anschließend von 1993 bis zum Sommer 1999 die Erich Kästner-Schule in Baunatal. Ab 1999 besuchte ich die Jacob-Grimm-Schule in Kassel und machte dort 2002 mein Abitur.

2003 bis 2004 absolvierte ich ein Freiwilliges Soziales Jahr beim DRK im Roten Kreuz Krankenhaus Kassel.

2005 bis 2008 machte ich eine Ausbildung zur Chemielaborantin im Landesbetrieb Hessisches Landeslabor in Kassel.

Im Sommersemester 2008 begann ich mein Medizinstudium an der Georg-August-Universität in Göttingen.

Im März 2010 bestand ich den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.