

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Prof. Dr. med. W. Brück)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Beeinflussung des Verlaufs von Pneumokokken-Meningitis in Mäusen
durch Stimulation mit einem Cytosin-Guanin-haltigen Oligonukleotid**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Laura Zacke, geb. König

aus Jena

Göttingen 2019

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

Referent/in: Prof. Dr. med. R. Nau

Ko-Referent/in: PD Dr. Fred Lühder

Drittreferent/in: Prof. Dr. Holger Reichardt

Datum der mündlichen Prüfung: 04.02.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel

„Beeinflussung des Verlaufs von Pneumokokken-Meningitis in Mäusen durch
Stimulation mit einem Cytosin-Guanin-haltigen Oligonukleotid“

eigenhändig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen
und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 21.04.2020

.....

(Laura Zacke)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
1.2 Mikroglia.....	3
1.3 Toll-like-Rezeptoren (TLR)	4
1.4 CpG	7
1.5 Aufgabenstellung.....	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Versuchstiere	10
2.2 CpG	10
2.3 Antikörper	11
2.4 Bakterienstamm und Infektion	11
2.5 Abbruchkriterien	13
2.6 Probengewinnung und Verarbeitung.....	13
2.7 Histologische Untersuchung.....	16
2.8 ELISA.....	19
2.9 Statistische Analyse.....	20
2.10 Versuchsaufbau	21
2.10.1 Überlebensexperiment mit immunsupprimierten Mäusen.....	21
2.10.2 Überlebensexperiment mit immunkompetenten Mäusen	22
2.10.3 Überlebensexperiment mit immunkompetenten TLR9 ^{-/-} -Mäusen.....	22
2.10.4 Ermittlung der Bakteriendichte sowie Auswirkung des CpGs auf inflammatorische	23
Prozesse in immunsupprimierten C57BL/6-Mäusen.....	23
2.10.5 Ermittlung der Bakteriendichte sowie Auswirkung des CpGs auf inflammatorische	
Prozesse in immunkompetenten C57BL/6-Mäusen	24
3. Ergebnisse	25
3.1 Ermittlung der protektiven Wirkung des CpGs bei einer Pneumokokkenmeningitis bei	
immunsupprimierten Mäusen.....	25
3.1.1 Vergleich zweier CpG-Dosen hinsichtlich ihrer Toleranz und Auswirkung.....	25
3.1.2 Untersuchung des protektiven Effekts einer Einzeldosis von 100 µg CpG bei	
immunsupprimierten Mäusen.....	27
3.2 Ermittlung der protektiven Wirkung des CpGs bei immunkompetenten Mäusen	29
3.3 Nachweis der Notwendigkeit der TLR9-Signalkaskade für den protektiven Effekt CpGs.....	31

3.4 Ermittlung der Bakteriendichte sowie Quantifizierung der inflammatorischen Prozesse bei immunsupprimierten C57BL/6-Mäusen.....	33
3.4.1 Bakterienkonzentrationen 24 Stunden nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> in Kleinhirn, Milz und Blut	33
3.4.2 Histologische Untersuchung der Großhirne	35
3.4.3 Konzentration an Chemokinen und Zytokinen in Kleinhirn und Milz 24 Stunden nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i>	36
3.4.4 IL-12/IL-23p40- Gehalt im Serum	38
3.4.5 Zusammenhang zwischen Bakterienbelastung und Zytokin-/Chemokinkonzentrationen....	39
3.4.6 Ermittlung der IL-12/IL-23p40- und MIP-1 α -Konzentration 24 Stunden nach der CpG-Gabe in Kleinhirn und Milz bei immunsupprimierten Mäusen vor Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> 40	
3.5 Abhängigkeit der Bakterienbelastung und der Entzündungsprozesse von der Zeit bei immunsupprimierten C57BL/6-Mäusen.....	42
3.5.1 Bakterienkonzentrationen 36 Stunden nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> in Kleinhirn, Milz und Blut	42
3.5.2 Histologische Untersuchung der Großhirne	44
3.5.3 Konzentration an Chemokinen und Zytokinen in Milz, Kleinhirn und Serum 36 Stunden nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i>	45
3.5.4 Zusammenhang zwischen Bakterienbelastung und Zytokin-/Chemokinkonzentrationen....	46
3.6 Ermittlung der Bakteriendichte sowie Quantifizierung der inflammatorischen Prozesse bei immunkompetenten C57BL/6-Mäusen	48
3.6.1 Bakterienkonzentration 24 Stunden nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> in Kleinhirn, Milz und Blut	48
3.6.2 Histologische Untersuchung der Großhirne	49
3.6.3 Konzentration an Chemokinen und Zytokinen in Serum, Kleinhirn und Milz 24 Stunden nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> bei immunkompetenten Mäusen.....	51
3.6.4 IL-12/IL-23p40- Gehalt im Serum von immunkompetenten Mäusen.....	53
3.6.5 Zusammenhang zwischen Bakterienbelastung und Zytokin-/Chemokinkonzentrationen....	54
3.7 Abhängigkeit der Bakterienbelastung und der Entzündungsprozesse von der Zeit bei immunkompetenten C57BL/6- Mäusen	55
3.7.1 Bakterienkonzentration 36 Stunden nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> in Kleinhirn, Milz und Blut	55
3.7.2 Histologische Untersuchung der Großhirne	56
3.7.3 Konzentration an Chemokinen und Zytokinen in Serum, Kleinhirn und Milz 36 Stunden nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i>	58
3.7.4 Zusammenhang zwischen Bakterienbelastung und Zytokin-/Chemokinkonzentrationen....	60
3.8 Langzeitwirkung von CpG auf IL-12/IL-23p40 und MIP-1 α	61
3.9 Auswirkung der CpG-Applikation auf die Milz.....	64

4. Diskussion	66
4.1 Die Prophylaxe mit 100 µg CpG hat einen protektiven Effekt bei immunsupprimierten und bei immunkompetenten Mäusen, jedoch nicht bei TLR9 ^{-/-} -Mäusen	66
4.2 CpG beeinflusst das Wachstum und die Ausbreitung von <i>S. pneumoniae</i>	68
4.3 Der protektive Effekt CpGs ist IL-12/IL-23p40- und MIP-1 α -abhängig	69
4.4 Auswirkungen CpGs auf die Milz	72
5. Zusammenfassung	74
6. Literaturverzeichnis	76

Abkürzungen

AK	Antikörper
AMP	antimikrobielle Proteine
AP-1	Transkriptionsfaktor AP-1
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CAE	Chlorazetatesterase
CDC	<i>Cholesterol-Dependent-Cytolysin</i>
CFU	<i>colony forming unit</i> = koloniebildende Einheit
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DC	dendritic cells = dendritische Zellen
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent assay</i> = Enzymimmunoassay
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
Iba1	<i>ionized calcium-binding adaptor molecule 1</i>
IFN- $\alpha/\beta/\gamma$	Interferon Alpha / Beta/ Gamma
Ig-M	Immunglobulin M
IL-6/ IL-12	Interleukin 6 / Interleukin 12
IRAK	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
Lyt A	N-acetyl-muramyl-L-Aanin-Amidase
LRRs	<i>leucine rich repeats</i>
MIP-1 α / β	<i>macrophage inflammatory protein 1 alpha / beta</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>

NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
RO	<i>reactive oxygen</i> = reaktiver Sauerstoff
SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TIR-Domäne	Toll/IL1-Rezeptor-ähnliche Domäne
TH1-Zellen	T-Helfer Zellen Typ 1
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRAF 6	<i>TNF-receptor-associated Factor 6</i>
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung

1. Einleitung

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Laut WHO (2012a) erkrankten im Jahr 2000 weltweit bis zu 14,5 Mio. Kinder unter 5 Jahren an einer Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken), von denen 826.000 die Erkrankung nicht überlebten (O'Brien et al. 2009). 2008 ging die WHO von noch immer 541.000 Toten unter 5 Jahren aus (WHO 2012b). Aufgrund teilweise mangelnder Daten schätzt die WHO die jährliche Erkrankungsrate deutlich höher ein. Vor allem in Entwicklungsländern, in denen keine flächendeckende Gesundheitsversorgung, Impfstoffe oder Antibiotika zur Verfügung stehen, sind insbesondere Menschen mit einem insuffizienten oder geschwächten Immunsystem betroffen.

Studien zufolge sind bei bis zu 90% der Kleinkinder, insbesondere bei den unter 2-Jährigen, bereits Pneumokokken im oberen Respirationstrakt nachweisbar. Diese Kleinkinder sind sogenannte Carrier (Keimträger), auch wenn sie selbst nicht unbedingt erkranken (Sá-Leão et al. 2000, Adetifa et al. 2012, Harboe et al. 2012). Die meisten Erkrankungen sind non-invasiv und manifestieren sich in Form einer Otitis media, Sinusitis oder Bronchitis. Bei sehr virulenten Erregern oder geschwächter Immunabwehr, z. B. durch eine vorausgehende Viruserkrankung, Organtransplantation oder Chemotherapie, kann es zu einer akuten Lungenentzündung, Bakteriämie oder Meningitis kommen (Carratalà et al. 1998, Gudiol et al. 2014). Vorwiegend betroffen sind Kleinkinder und Ältere sowie Personen mit chronischen Erkrankungen und geschwächtem Immunsystem (McEllistrem et al. 2002, Morrill et al. 2014, Siemieniuk et al. 2011).

Zurzeit sind über 90 Serotypen der grampositiven Pneumokokken bekannt. Sie unterscheiden sich anhand ihrer Polysaccharidkapsel und damit auch in ihrer Virulenz und ihrem Vorkommen (Sjöström et al. 2006, Weinberger et al. 2010). Die Polysaccharidkapsel ermöglicht den Pneumokokken eine hohe Virulenz, da diese die Bakterien vor der Immunabwehr des Wirtes schützt, indem sie die Phagozytose verhindert (Brown et al. 1982) und antimikrobielle Proteine (AMP) inaktiviert (Peschel 2002, Wartha et al. 2007). Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor ist das Exotoxin Pneumolysin. Pneumolysin wird durch Lyt A (N-acetyl-muramyl-L-Alanin-Amidase) unterstützte Autolyse der Pneumokokken freigesetzt und hat die Fähigkeit, das angeborene Immunsystem zu stimulieren (Mitchell et al. 1991, Braun et al. 1999, Cockeran

et al. 2001). Hier wirkt Pneumolysin als Agonist an TLR4 (Toll-like-Rezeptor 4) (Malley et al. 2003, Ebert et al. 2005). Pneumolysin gehört zu der Gruppe der Cholesterol-Dependent-Cytolysins (CDC) (Alouf 2000, Palmer 2001) und ist in der Lage, durch Porenbildung alle Zellmembranen zu zerstören, welche Cholesterol enthalten und somit den Zelltod zu injizieren (Rossjohn et al. 1998). Zysk et al. bewiesen 2001 in einem zerebrovaskulären Endothelzellkulturmodell, dass Pneumolysin entscheidend für das Eindringen von Pneumokokken durch eine Endothelschicht ist. Bei hohen Bakterienkonzentrationen können die Pneumokokken die Blut-Hirn-Schranke und die Blut-Liquor-Schranke überwinden. Genaue Mechanismen sind jedoch noch nicht bekannt (Iovino et al. 2013). Die Abgabe von inflammatorischen und zelltoxischen Substanzen durch spontane Autolyse oder Sekretion führt zu unterschiedlichen Reaktionen im Gehirn (Tuomanen et al. 1985). Zum einen kommt es zu direkter Schädigung der Neuronen und mikrovaskulären Endothelzellen durch Pneumolysin oder H₂O₂ (Zysk et al. 2001, Braun et al. 2002, Stringaris et al. 2002, Braun et al. 2007). Auf der anderen Seite werden Mikrogliazellen mittels Toll-like-Rezeptoren (TLR) aktiviert und über den Nuclear Factor κ B (NF- κ B) zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine angeregt. In der Zerebrospinalflüssigkeit von Meningitispatienten konnten neben Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha (MIP-1 α), MIP-1 β und Interleukin-8 (IL-8) weitere Chemokine ausfindig gemacht werden, welche im unmittelbaren Zusammenhang mit der Rekrutierung von Leukozyten stehen (Spanaus et al. 1997). Die Leukozyten geben wiederum Zytokine und Chemokine sowie reaktiven Sauerstoff (Reactive Oxygen = RO) und Proteasen ab und können ebenfalls zellschädigend wirken (Leib et al. 1996, Azeh et al. 1998, Lahrtz et al. 1998). Die Folgen sind Vaskulitis, Vasospasmus, Obstruktion der zerebralen Gefäße sowie Beeinträchtigung der zerebrovaskulären Autoregulierung (Tureen et al. 1990). Infolgedessen kann es zu einer Hyperämie oder Ischämie mit lokaler Nekrose kommen, welche zu neuronalen Schäden führen kann. Klinisch bedeutet das, dass der Betroffene bei einer akuten Meningitis ins Koma verfallen oder sterben kann (Kastenbauer und Pfister 2003, Stockmann et al. 2013). Weisfelt et al. stellten dabei fest, dass Patienten über 60 Jahre zumeist an kardiorespiratorischen Komplikationen versterben, wohingegen jüngere Patienten eher neurologischen Komplikationen erliegen (Weisfelt et al. 2006 a und b). Bei fast einem Drittel der Erkrankten treten Folgeschäden wie Entwicklungsverzögerungen, epileptische Anfälle, Lernschwierigkeiten und Beschädigung der Cochlea mit einhergehender Schwerhörigkeit auf (Grimwood et al. 2000, Merkelbach et al. 2000, Østergaard et al. 2005).

1.2 Mikroglia

Mikrogliazellen wurden 1932 zum ersten Mal von Pio del Rio-Hortega als solche benannt (Del Rio-Hortega 1932). Bereits damals lieferte er eine klare Definition von Mikroglia, welche bis heute Bestand hat. So entdeckte er, dass Mikrogliazellen im Gegensatz zu Neuronen und Astrozyten mesodermalen Ursprungs sind und während der frühen Entwicklungsphase in das Hirn immigrieren. Mikrogliazellen findet man gleichmäßig in allen Bereichen des Zentralnervensystems (ZNS), wo sie jeweils ein eigenes Territorium für sich beanspruchen. Schon damals waren die unterschiedlichen Morphologien der Mikrogliazellen bekannt, unter anderen eine amöboide Form im Entwicklungsstadium des Gehirns sowie nach einem pathologischen Ereignis oder eine stark verzweigte Form im gesunden, ausgebildeten Gehirn. Zudem erkannte del Rio-Hortega bereits, dass Mikrogliazellen in der Lage sind, abzuwandern, zu proliferieren sowie zu phagozytieren.

Heute wissen wir zusätzlich, dass Mikrogliazellen - zusammen mit den in den Meningen und im Plexus choroideus sowie in den perivaskulären Räumen ansässigen Makrophagen - die erste Abwehrmöglichkeit gegenüber in das ZNS eingedrungenen Bakterien bilden und bis zu 12 % der Zellen des Gehirns ausmachen (Lawson et al. 1990). In ihrer „ruhenden“ Form mit starken Verzweigungen betreiben die Mikrogliazellen pausenlos aktives Gewebescanning (Kreutzberg 1996, Nimmerjahn et al. 2005). Sobald es zu einem Antigenkontakt kommt oder eine Veränderung der Homöostase eintritt, verändern sich die Zellen schrittweise in einen „aktiven“ Zustand mit einer amöboiden Morphologie (Nakamura et al. 1999, Stence et al. 2001, Cho et al. 2006). Sie sind dann in der Lage, eine gezielte Immunabwehr oder Reparaturmaßnahmen einzuleiten (Kreutzberg 1996, Olson und Miller 2004, Davalos et al. 2005) sowie Zelldebris und Pathogene zu phagozytieren. Durch Antigenpräsentation tragen sie zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems bei (Gehrmann et al. 1993, Cash und Rott 1994). Zudem können Mikrogliazellen proliferieren und Zyto- sowie Chemokine ausschütten, um weitere Immunzellen zu rekrutieren (Giulian und Baker 1985, Lee et al. 1993). Werden Pathogene wie Bakterien phagozytiert, kommt es zu einer Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (Häusler et al. 2002, Butovsky et al. 2005, Ribes et al. 2010). Bei der Phagozytose von Zelldebris nach Apoptose hingegen kommt es zur Herabregulierung der Entzündungsreaktion (Magnus et al. 2001, Chan et al. 2006, Liu et al. 2006).

Mehrere Faktoren nehmen Einfluss auf den Aktivitätszustand der Mikroglia. Zum einen führt das Auftreten von normalerweise nicht vorhandenen Strukturen (z. B. Bakterienfragmente, Blutgerinnungsfaktoren, Serumkomponenten, Antikörper-Antigen-Komplexe) oder eine

deutliche Anreicherung bestimmter Moleküle (z. B. ATP, Zytokine, Wachstumsfaktoren) zur Aktivierung der Mikroglia (Hide et al. 2000, Nakamura 2002, Lee et al. 2006). Zum anderen können durch Reduktion herab modulierender Chemokine (z. B.: Fraktalkin) oder durch das Abbrechen direkten Neuronenkontaktes (z.B. CD200-Rezeptor) die Mikroglia ebenfalls in einen aktivierten Zustand wechseln (Hoek et al. 2000, Cardona et al. 2006, Nash et al. 2015). Durch eine zu starke Aktivierung der Mikroglia kann sich die neuroprotektive Wirkung in eine neurotoxische umkehren. Durch übermäßige Ausschüttung von reaktivem Sauerstoff, Stickstoffmonoxid (NO) sowie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) können Neuronen, Oligodendrozyten sowie die Extrazellulärmatrix zerstört werden (Colton und Gilbert 1987, Kim und Täuber 1996, Bogdan et al. 1997, Lee et al. 2001, Pickering et al. 2005, Hanisch und Kettenmann 2007).

1.3 Toll-like-Rezeptoren (TLR)

Wird unser Körper von Pneumokokken oder anderen Pathogenen bedroht, so stehen ihm zwei Immunsysteme, welche eng miteinander verknüpft sind, zur Bekämpfung zur Verfügung: Zum einen die angeborene Immunabwehr und zum anderen die adaptive Immunabwehr. Unter die angeborene Immunabwehr fallen jegliche Form an natürlichen Barrieren, das Komplementsystem und ständig patrouillierende Zellen (z. B.: Makrophagen, natürliche Killerzellen - NK), welche in der Lage sind, Pathogene zu erkennen, zu phagozytieren und unter anderem der spezifischen Immunabwehr zu präsentieren. Makrophagen, B-Zellen, dendritische Zellen (DC) sowie auch Mikrogliazellen exprimieren Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs) wie TLRs auf ihrer Zelloberfläche sowie im Inneren, welche der Zelle ermöglichen, potentielle Liganden zu erkennen. PRRs sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems, deren Expression durch Zellaktivierung gesteuert ist (Matsuguchi et al. 2000). TLRs sind integrale Glycoproteine in der äußeren Zellmembran (TLR1, 2, 4, 5, 6) bzw. der Membranen intrazellulärer Zellkompartimente wie des endoplasmatischen Retikulums, der Endosomen oder Lysosomen (TLR3, 7, 8, 9) (Akira et al. 2006). Bis jetzt sind 12 funktionale TLRs bei Säugetieren (Mensch 10 TLRs) entdeckt, welche alle in der Lage sind unterschiedliche Pathogen-Associated-Molecular-Patterns (PAMPs) zu erkennen und verschiedene Immunreaktionen auszulösen.

Bei einer Infektion mit Pneumokokken kommt es zu einem Zusammenspiel dreier unterschiedlicher TLRs: TLR2, TLR4 und TLR9 (Echchannaoui et al. 2002, Koedel et al. 2003, Albiger et al. 2007, Dessing et al. 2008, Klein et al. 2008). So registriert TLR2 Lipopeptide

sowie Lipoteichsäuren (Schwandner et al. 1999, Takeuchi et al. 1999, Yoshimura et al. 1999, Schröder et al. 2003). TLR4 hingegen erkennt freigesetztes Pneumolysin (Malley et al. 2003, Ebert et al. 2005, Srivastava et al. 2005). Intrazellulär erkennen endosomale TLR9 die bakterielle DNS (Desoxyribonukleinsäure) anhand unmethylierter CpG-Dinucleotide (Hemmi et al. 2000, Dalpke et al. 2002, Blasius und Beutler 2010).

Kommt es zu einem PAMP-Kontakt, rekrutieren die TLRs Adapterproteine wie Myeloid-Differentiation-Factor 88 (MyD88) an ihrer zytoplasmatischen Toll/IL1-Rezeptor ähnlichen Domäne (TIR-Domäne) (Medzhitov et al. 1998, Bowie und O'Neill 2000, Takeuchi et al. 2000) und aktivieren Signalkaskaden, in deren Folge proinflammatorische Zytokine und Chemokine ausgeschüttet werden und die antigenspezifische Immunabwehr gefördert wird (Takaoka et al. 2005). Im Falle von TLR9 gelangt die bakterielle DNS durch Phagozytose in die Zelle und wird in den Endosomen in Bruchstücke zerlegt. CpG lagert sich an leucinhaltige Bereiche (LRRs - Leucine Rich Repeats) des TLR9 an und führt damit wahrscheinlich zu einer Strukturveränderung, die auch eine Veränderung der zytoplasmatischen TIR-Domäne bewirkt (Latz et al. 2007). Dies ist das Signal für das Adaptermolekül MyD88, sich mit seiner TIR-Domäne anzulagern (Schnare et al. 2000). Über die Aktivierung der IL-1R-assoziierten-Kinase 4 (IRAK 4) wird der TNFR-Asociated Factor 6 (TRAF 6) aktiviert, was zu mehreren Komplexbildungen führt, in deren Folge die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, Interferon Regulatory Factor 7 (IRF7) und der Transkriptionsfaktor AP-1 gebildet werden und die Gentranskription für proinflammatorische Zytokine sowie Interferon α/β (IFN- α/β) eingeleitet wird (Suzuki et al. 2002, Kawagoe et al. 2008, Blasius und Beutler 2010).

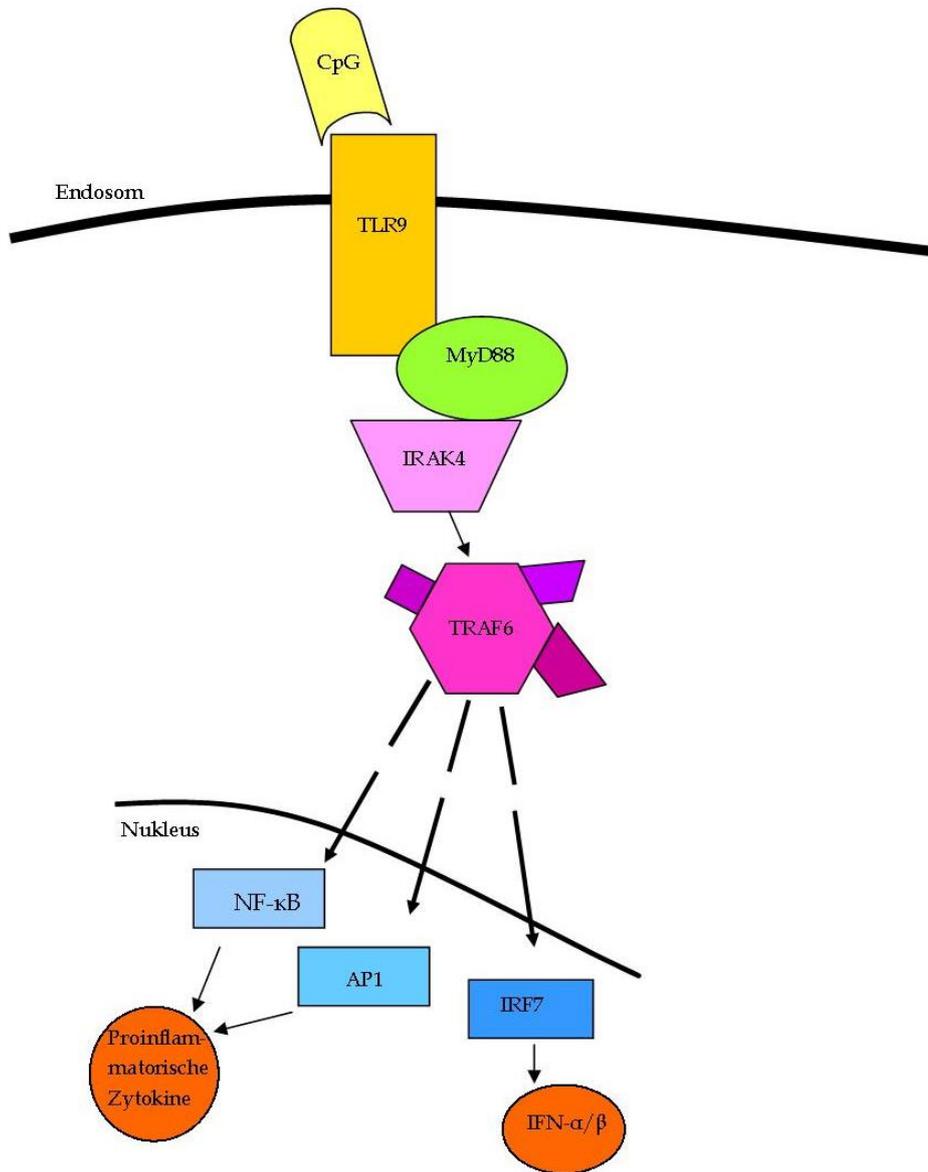


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der intrazellulären TLR9-Aktivierungskaskade, in deren Folge proinflammatorische Zytokine sowie IFN- α/β ausgeschüttet werden.

1.4 CpG

In der bakteriellen DNS kommen in einer recht hohen Frequenz (1:16) Abschnitte von unmethyliertem Cytosin - Phosphat - Guanin (CpG) vor. Im Genom der Wirbeltiere hingegen findet man CpG wesentlich seltener und auch vorwiegend in methylierter Form (Cardon et al. 1994). Krieg et al. bewiesen bereits 1995, dass dies der ausschlaggebende Unterschied ist, weshalb das Immunsystem der Vertebraten in der Lage ist, bakterielle DNS zu erkennen und unter anderem B-Lymphozyten zu aktivieren. Krieg und seine Kollegen erkannten auch, dass im optimalen Fall das CpG-Dinucleotid von zwei 5'-Purinen und zwei 3'-Pyrimidinen umgeben ist. Des Weiteren entdeckten sie, dass CpG-Oligonucleotide, welche ein Nuklease-resistentes Phosphor-Thioat-modifiziertes Rückgrat besitzen, eine drei- bis sechsfach gesteigerte Wirkung hervorrufen. Kurz darauf entdeckten Klinman et al., dass unmethyliertes CpG nicht nur in der Lage ist bei B-Lymphozyten eine erhöhte Produktion an IL-6, IFN- γ und IL-12 hervorzurufen, sondern auch bei NK-Zellen sowie CD4⁺ T-Lymphozyten (Klinman et al. 1996). Bald danach konnte nachgewiesen werden, dass die IFN- γ -Produktion abhängig von der Ausschüttung von IL-12 und TNF- α durch Makrophagen, welche durch CpG stimuliert wurden, ist (Halpern et al. 1996, Chace et al. 1997). Chu et al. konnten 1997 nachweisen, dass eine durch CpG hervorgerufene Ausschüttung an IL-12 und IFN- γ die Differenzierung der CD-4⁺ T-Helferzellen zu TH1-Zellen (T-Helfer Zellen Typ 1) begünstigt. Im Gegenzug zur TH2-Reaktion, welche vor allem die humorale Immunabwehr umfasst, beinhaltet die TH1-Reaktion die Aktivierung der zellulären Abwehr sowie zusätzlich die Produktion von Immunglobulin (Ig)G (He et al. 2004, Bernard und Phipps 2007) und ist ein wichtiger Bestandteil der ersten Phase der Immunabwehr. 1999 entdeckten Elkins und seine Kollegen, dass die Gabe von CpG bei Mäusen eine protektive Wirkung durch die Stimulierung TH1-assoziiierter Zytokine gegenüber intrazellulären Erregern in einem Sepsismodel bewirkte. 2001 bestätigten Gramzinski et al., dass IL-12 und IFN- γ die Ursachen für den protektiven Effekt des CpGs sind. Unter anderem konnte ein protektiver Effekt mit einer erhöhten Überlebensrate gegenüber einer intrazellulären Infektion mit *Plasmodium yoelii*, *Burkholderia pseudomallei* sowie bei einer Meningoenzephalitis, verursacht durch *Escherichia coli*, erzielt werden (Gramzinski et al. 2001, Wongratanacheewin et al. 2004, Ribes et al. 2014). Je nach Erreger ergab sich ein optimaler protektiver Effekt, wenn das CpG einmalig ein bis drei Tage vor der Infektion verabreicht wurde. Die Wirkung hielt zwischen 7 - 14 Tagen an. Klinman et al. zeigten 1999, dass man durch regelmäßige Gabe von CpG den Schutz unbegrenzt aufrechterhalten kann. In dieser Zeit stieg die Anzahl an Milzzellen, welche IL-6 und IFN- γ produzierten zunächst an –

sank aber innerhalb eines Monats wieder auf ihren Ausgangswert ab. Es konnten keine dauerhaften pathologischen Veränderungen der Organe bei Mäusen festgestellt werden, welche täglich CpG erhielten. Neben NK-Zellen und Makrophagen können auch Mikrogliazellen von CpG stimuliert werden und reagieren mit einer erhöhten Ausschüttung, unter anderem von IL-1 β , TNF α , MIP-1 α , MIP-1 β sowie etwas zeitverzögert auch von IL-6 und IL-12 (Schluesener et al. 2001, Takeshita et al. 2001, Dalpke et al. 2002). IL-12 wiederum stimuliert unter anderem T-Zellen sowie NK-Zellen dazu, INF- γ auszuschütten, welches seinerseits eine positive Rückkopplung zu den IL-12-produzierenden Zellen hat, ihre Leistung zu steigern und mehr pro-inflammatorische Zytokine wie IL-12 zu produzieren (Flesch et al. 1995). Durch die Stimulierung des TLR-Systems, unter anderem auch durch CpG, werden nicht nur mehr Chemo- und Zytokine ausgeschüttet, sondern auch die Phagozytoserate und die intrazelluläre Tötung von Bakterien erhöht (Ribes et al. 2009, Ribes et al. 2010). Aufgrund seiner stimulierenden Wirkung auf das Immunsystem wird der Einsatz von CpG in unterschiedlichen Bereichen untersucht. Es gibt bereits vielversprechende Versuche mit CpG als Zusatzstoff für Impfstoffe. 2015 waren Fukuyama et al. in der Lage, einen kombinierten nasalen Impfstoff gegen *S. pneumoniae* erfolgreich an alten Mäusen zu entwickeln, welcher in Zukunft vielleicht auch die Effektivität des Pneumokokken-Polysaccharid-Impfstoffes (23 Serotypen) bei über 65-Jährigen steigert (Schenkein et al. 2008). Bereits erfolgreich in klinischen Studien war CpG als Zusatzstoff für den konjugierten 7-valenten Impfstoff gegen Pneumokokken bei HIV-Patienten (Offersen et al. 2012). Ebenfalls vielversprechend sind Ergebnisse der Krebsforschung. Es konnten bereits positive Ergebnisse im Versuch mit B-Zellen einer lymphatischen Leukämie erzielt werden (Jahrsdörfer et al. 2005, Liang et al. 2010). In klinischen Studien erzielte die Gabe von CpG einen deutlichen Rückgang von Melanomen und Basalzellkarzinomen (Pashenkov et al. 2006, Hofmann et al. 2008).

1.5 Aufgabenstellung

Inhalt dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob CpG eine protektive Wirkung gegenüber einer Pneumokokkenmeningitis bei immunsupprimierten wie auch bei immunkompetenten Mäusen hervorruft, wenn dieses zuvor intraperitoneal injiziert wurde.

Um dies zu ermitteln, wurde bei Mäusen über einen Zeitraum von 7 Tagen eine Neutropenie mit Hilfe eines Antikörpers induziert. 36 Stunden nach der ersten Antikörpergabe wurde der Prophylaxegruppe CpG bzw. der Kontroll-Gruppe eine Pufferlösung einmalig injiziert. 72 Stunden später wurden alle immunsupprimierten Mäuse intrakraniell mit *Streptococcus pneumoniae* infiziert. Ebenso wurde den immunkompetenten Mäusen drei Tage vor der Infektion CpG bzw. eine Pufferlösung intraperitoneal injiziert. Eine Überlebenskurve über 14 Tage wurde bei den immunsupprimierten wie auch bei den immunkompetenten Mäusen nach der Infektion erstellt und der Krankheitsverlauf protokolliert, um eventuell auftretende Abweichungen zu registrieren.

Um den Stellenwert der TLR9-Kaskade zu demonstrieren, wurde mit TLR9^{-/-}-Mäusen ebenfalls ein Überlebensexperiment durchgeführt. Auch in dieser Versuchsreihe wurde den Mäusen 72 Stunden vor der intrakraniellen Infektion CpG bzw. eine Pufferlösung intraperitoneal injiziert. Eine Überlebenskurve wurde erstellt und der Krankheitsverlauf beobachtet.

Es stellte sich zudem die Frage, ob und wie lange die Gabe von CpG die Konzentrationen von IL-12/IL-23p40, MIP-1 α und IFN- γ in Kleinhirn, Milz und Serum beeinflusst. Außerdem sollte untersucht werden, ob CpG einen Einfluss auf die Bakterienkonzentration und auf den Entzündungsverlauf hat. Zu diesem Zweck wurden immunkompetente und immunsupprimierte Mäuse 72 h vor Infektion ebenfalls mit CpG oder einer Pufferlösung injiziert und 24 bzw. 36 Stunden nach der Infektion getötet und untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuchsreihen wurden insgesamt 177 C57BL/6-Mäuse (176 ♂, 1 ♀) im Alter von 8 bis 14 Wochen und einem durchschnittlichen Ausgangsgewicht von $24,32 \pm 2,97$ g verwendet. Bezogen wurden diese Tiere von Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld. Aus der eigenen Tierzucht der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen wurden 13 TLR9^{-/-}-Mäuse (2 ♀, 11 ♂) mit einem durchschnittlichen Gewicht von $29,94 \pm 4,25$ g und im Alter von 11-22 Wochen bezogen. Die TLR9^{-/-}-Mäuse besaßen denselben genetischen Hintergrund wie die C57BL/6-Mäuse. Aufgrund der erschwerten Beschaffung wurde eine größere Streuung im Alter sowie unterschiedliches Geschlecht hingenommen.

Alle Mäuse wurden in konventionellen Käfigen in kleinen Gruppen (max. acht Tiere) bei konstanten Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnissen sowie Nahrung und Wasser *ad libitum* gehalten. Die Versuche wurden vom *Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* (LAVES), Oldenburg, genehmigt.

2.2 CpG

In den Experimenten wurde ein synthetisches CpG-Oligonukleotid mit einer Phosphothioat-Modifikation verwendet. Erworben wurde das in Pulverform unter dem Namen Thioat 1668 gelieferte CpG bei TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin. Das Thioat enthielt folgende Basenabfolge an Nukleotiden: 5'-TCCATGACGTTCCCTGATGCT-3'. Das pulverförmige CpG wurde mit destilliertem Wasser aufgelöst, um eine Konzentration von 3 mg/ml zu erhalten, portioniert und anschließend bei -80 °C aufbewahrt. Im ersten Experiment wurden zwei Dosierungen getestet: 100 µg und 200 µg CpG. Die Mäuse in der Gruppe mit 200 µg CpG bekamen 67 µl der zuvor angelegten Konzentration verdünnt in 133 µl NaCl (0,9 %ige Kochsalzlösung). Der anderen Gruppe sowie allen Tieren der sich anschließenden Experimente wurden 100 µg CpG verabreicht. Dies entspricht 33,5 µl der Stammlösung und wurde zusammen mit 166,5 µl 0,9 %igem NaCl (finales Volumen: 200 µl pro Maus) 72 Stunden vor der Infektion mit Pneumokokken intraperitoneal injiziert. Den Kontroll-Gruppen hingegen

wurde stattdessen 33,5 µl destilliertes Wasser in 166,5 µl 0,9 % igem NaCl (finales Volumen: 200 µl) gelöst verabreicht. Im Experiment mit 200 µg CpG bekamen die Kontroll-Mäuse das doppelte Volumen der Kontroll-Lösung verabreicht. Nachfolgend wird die Kontroll-Lösung als Puffer bzw. Pufferlösung bezeichnet.

2.3 Antikörper

Zur Ausschaltung der neutrophilen Granulozyten (CD11b⁺ Ly-6G⁺-Ly-6C^{int}) wurde der monoklonale Antikörper anti-Ly-6G, Klon 1A8 (BioXcell, West Lebanon, NH, USA) verwendet (Ribes et al. 2013). Der Antikörper 1A8 bindet nur an Ly-6G^{high}-Neutrophile. Im Gegensatz zu anderen Antikörpern bindet er nicht an Isoformen von Ly-6G oder Ly-6C, welche auf anderen Leukozyten exprimiert werden (Fleming et al. 1993). Um eine ausreichende Neutropenie zu gewährleisten, wurden den Tieren der entsprechenden Versuche bereits 4 Tage vor der Infektion (Tag - 4) 50 µl Antikörper mit einer Konzentration von 1 mg/ml in 200 µl 0,9%igem NaCl intraperitoneal verabreicht (finales Volumen: 250 µl pro Maus). Dies wurde täglich zur selben Zeit am Morgen bis einschließlich zwei Tage nach der Infektion (Tag +2) wiederholt (insgesamt sieben Injektionen).

2.4 Bakterienstamm und Infektion

Es wurde der *Streptococcus pneumoniae* (SPN) Stamm D39 (bekapselt, Serotyp 2) verwendet. Die Ausgangskonzentration der in - 80 °C aufbewahrten Pneumokokken betrug 6×10^9 Kolonie-bildende Einheiten [Colony-Forming Units (CFU)]/ml und wurde in steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung vor der intrazerebralen Infektion auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

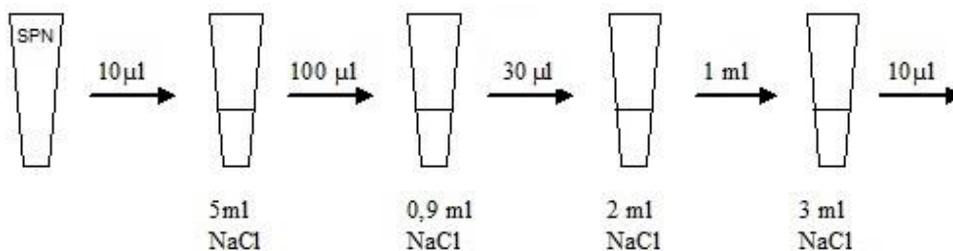


Abbildung 2: Verdünnungsschema *S. pneumoniae*

Die Bakterienkonzentration des Inokulums wurde mittels einer Verdünnungsreihe in 1:10-Verdünnungsstufen mit anschließender Auftragung auf Blutagarplatten und Bebrütung in einem Brutschrank (Modell 200, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach) bei 37 °C für 24 Stunden überprüft. Das Inokulum wurde vor Beginn und nach Abschluss der Infektion getestet.

Die Mäuse wurden mit einer Mischung aus 10 mg/kg Xylazin (2 %, Riemser Arzneimittel AG, Greifswald) und 100 mg/kg Ketamin (10 %, Medistar Arzneimittel-Vertrieb GmbH, Holzwickede) intraperitoneal anästhesiert. Unter Narkose wurde ihnen intrakraniell in den oberflächlichen rechten frontalen Neokortex 10 µl Pneumokokken D39-Inokulum injiziert (Gerber et al. 2001). Immunkompetente Mäuse wurden mit $2,5 - 7 \times 10^2$ CFU/Maus infiziert, immunsupprimierte Mäuse hingegen mit $0,5 - 1,5 \times 10^2$ CFU/Maus. Die Erregerdosis wurde so gewählt, dass die Kontroll-Gruppe in der Überlebenskurve eine ca. 50 %ige Sterberate aufwies. Die Infektion aller Mäuse musste zügig durchgeführt werden, da bereits nach Abschluss der Infektion im Inokulum eine geringere Bakterienkonzentration nachgewiesen werden konnte als zu Beginn.

S. pneumoniae D39 ist ein sehr empfindlicher Stamm. Temperaturschwankungen sowie hohe Zentrifugalkräfte mussten vermieden werden, um ein Absterben der Bakterien und somit einen Virulenzverlust des Inokulums zu verhindern.

2.5 Abbruchkriterien

Zur Überwachung des Gesundheitszustandes wurden die Mäuse täglich am Morgen gewogen (Sartorius Excellence Waage, Sartorius GmbH, Göttingen) und ihr klinischer Score (Gerber et al. 2001) erhoben. Nach der Infektion wurde dies mindestens zweimal am Tag wiederholt. Der klinische Score sowie das Gewicht bestimmten die Abbruchkriterien, um das Leid der Tiere so gering wie möglich zu halten. Verlor ein Tier 20 % von seinem Ausgangsgewicht oder erreichte den klinischen Score von 3, wurde die Maus aus dem Versuch genommen und getötet. Alle überlebenden Tiere einer Experimentreihe wurden am Endzeitpunkt, 2 Wochen nach Infektion, getötet.

Bedeutung des klinischen Scores:

Klinischer Score	Merkmale
0	Gesund – keine Verhaltensauffälligkeiten
1	Leicht erkrankt – leicht reduzierte Spontanaktivität, verklebte Augen
2	Erkrankt – geringe Spontanaktivität, Lethargie
3	Schwer erkrankt – kaum bis keine Spontanaktivität, nicht gehfähig
4	Tod

2.6 Probengewinnung und Verarbeitung

Sobald ein Tier aus der Experimentreihe genommen wurde, wurde - sofern möglich - entweder unter Narkose oder nach Eintritt des Todes, Blut aus dem Herzen gewonnen und je 10 µl in 1:10 Verdünnungen bis 1:10⁷ aufgetragen (siehe Abbildung 3). Nach 24 Stunden bei 37 °C in einem Inkubator wurden die Kolonien auf dem Agar ausgezählt (Abbildung 4) und die CFU berechnet, um Rückschlüsse über die bakterielle Belastung des Blutes zu ziehen. Die ermittelten CFU geben lediglich einen ungefähren Wert an, da nur einzelne Kolonien gezählt werden. Jedoch lässt dies keinen Rückschluss zu, ob ein einzelnes Bakterium oder mehrere Bakterien den Ausgang für die gebildete Kolonie stellen. Somit lagen die ermittelten CFU-Werte sehr wahrscheinlich unter der wirklichen Bakterienzahl. Das verbliebene Blut wurde nach Gerinnung bei 4 °C und 3000 U/min für 15 Minuten zentrifugiert, um das Serum zu gewinnen.

Dieses wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt, um zu einem späteren Zeitpunkt mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, siehe 2.8) die Zytokin- und Chemokinkonzentration zu bestimmen. Die Maus wurde direkt nach der Blutentnahme durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden Milz und Hirn entnommen und die Länge der Milz mittels eines Lineals gemessen. Kleinhirn und Milz wurden in verschließbare Reagiergefäße mit $500\text{ }\mu\text{l}$ NaCl gegeben, manuell homogenisiert und $10\text{ }\mu\text{l}$ direkt und in 1:10 Verdünnungen bis $1:10^7$ analog zum Blut auf Blutagar auspipettiert (Abbildung 3), um nach Auszählung die Bakterienkonzentration der Homogenate zu erhalten. Die Reste der Homogenate wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Das Großhirn wurde für spätere mikroskopische Untersuchungen in Formalin und 2 - 4 Tage später in 4 %ige phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) gegeben. Die überlebenden Mäuse, welche erst zwei Wochen nach der Infektion getötet wurden, wurden wie die anderen Mäuse prozessiert. Da die Mäuse die Infektion überwunden hatten und somit kaum oder keine Bakterien in den Tieren erwartet wurden, wurde $50\text{ }\mu\text{l}$ Blut direkt und $10\text{ }\mu\text{l}$ in 1:10 Verdünnung auf Agar pipettiert. Von Milz- und Kleinhirnhomogenaten wurden $200\text{ }\mu\text{l}$ direkt sowie je $10\text{ }\mu\text{l}$ in 1:10-Verdünnung aufgetragen und am nächsten Tag ausgezählt.

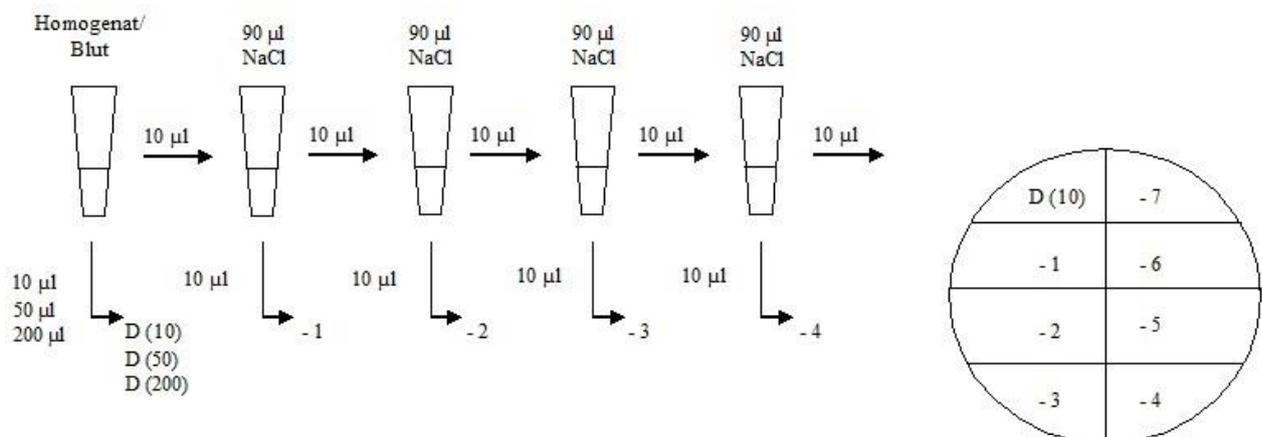


Abbildung 3: Verdünnungsschema der Homogenate und Blut sowie schematische Darstellung einer Agarplatte mit D(10). D(10) = unverdünntes Blut und Homogenat verstorbener Maus, D(50) = unverdünntes Blut überlebender Maus, D(200) = unverdünntes Homogenat überlebender Maus



Abbildung 4: *S. pneumoniae* auf Agar nach 24 Stunden Inkubation

Einigen Tieren wurde vor der Infektion unter Anästhesie retrobulbär Blut entnommen. Durch die Punktion des retrobulbären Venenplexus können mittels einer Kapillare (max. 0,8 mm Durchmesser) geringe Blutmengen (ca. 0,17 ml) gewonnen werden. Die gewonnenen Blutmengen sollten 1 % des Körpergewichtes nicht überschreiten, um das Tier nicht zu sehr zu belasten. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und die Seren zu einem späteren Zeitpunkt auf ihre Zytokin- und Chemokinkonzentrationen untersucht.

2.7 Histologische Untersuchung

Die entnommenen Großhirne wurden nach Formaldehyd- und PBS-Behandlung in Paraffin eingebettet und in 2 µm dünne Scheiben geschnitten. Anschließend wurden die Proben wieder entparaffiniert. Dazu wurden die Schnitte dreimal je 10 Minuten in Xylol getränkt. Daraufhin wurden die Schnitte eine Minute lang mit einem Xylol-Isopropanol-Gemisch (1:1) getränkt, um dann zweimal je 5 Minuten in 100 %iges Isopropanol getaucht zu werden. In drei Schritten wurde der Isopropanolgehalt gesenkt (90 %ig, 70 %ig, 50 %ig). In jedem Schritt wurden die Schnitte jeweils für 3 Minuten getränkt und abschließend mit Aqua dest. abgespült.

Die so vorbereiteten Schnitte wurden dann mit Chloracetat-Esterase (CAE-Kit, 91-C von Sigma-Aldrich Co. LLC.) gefärbt, um die Granulozyten sichtbar zu machen, da diese den Grad der Entzündung widerspiegeln. Hierfür wurden die Schnitte für ca. 30 - 60 Minuten in Aqua bidest. bei ca. 37 °C vorinkubiert. 40 ml Aqua bidest. (37 °C) wurde mit 1 ml Natrium-Nitrit-Lösung und 1 ml Fast-Red-Violett-LB- Base-Lösung gemischt. Hierzu wurden erst 5 ml Trizmal-Puffer (Trizmal™ 6.3 Concentrate, Sigma-Aldrich Co. LLC.) zugegeben und dann 1 ml einer Naphtol-AS-D-Chloracetat-Lösung. Nach Rotfärbung der Lösung wurden die Schnitte bei 37 °C ca. 60 - 80 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua dest. abgespült und dann zusätzlich mit Hämalaun (Merck KGaA, Darmstadt) als Gegenfärbung eingefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Zur Konservierung wurden die Schnitte mit Aqua Tex (Merck KGaA, Darmstadt) eingedeckelt. Zu beachten ist, dass CAE auch einige Monozyten und Makrophagen anfärben kann und somit keine spezifische Nachweismethode für neutrophile Granulozyten ist. Die beiden Großhirnhemisphären wurden getrennt voneinander ausgezählt. In jeder Hälfte wurden die oberflächlichen Hirnhautregionen in drei Abschnitte eingeteilt und aus jedem dieser Abschnitte ein Bereich bei einer 40-fachen Vergrößerung zufällig ausgewählt. Anschließend wurden die CAE-positiven Leukozyten in den einzelnen Abschnitten sowie in der Fissura hippocampi ausgezählt und mit einem Punktesystem (Score) bewertet. Der Score spiegelte den Grad der meningealen Entzündung wider. Keine CAE-positiven Leukozyten ergab Score 0, < 10 Leukozyten ergab Score 1, 10 - 50 Leukozyten ergab Score 2 und > 50 Leukozyten Score 3 (Abbildung 5). Anschließend wurde der Durchschnitt der Scores aller ausgewerteten Regionen gebildet.

Des Weiteren wurden Schnitte derselben Tiere mit ionisiertem Kalziumbindenden-Adapter-Molekül-1 (Iba1; ionized calcium-binding adaptor molecule 1) gefärbt, um die Mikrogliazellen darzustellen (Abbildung 6). Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte fünf Mal drei Minuten mittels Mikrowellenbehandlung in 10 nM Citratpuffer (pH 6,0) vorbehandelt, um die durch das Formaldehyd maskierten Epitope wieder herzustellen. Da die Farbstoffentwicklung auf Chromogenumsetzung durch Enzyme beruht, mussten vor der eigentlichen Färbung die bereits vorhandenen Enzyme in den Schnitten inaktiviert werden, um keine falschen positiven Resultate zu bekommen. Aus diesem Grund wurden die Schnitte mit PBS abgespült und die endogene Peroxidase mittels 3 %igem H₂O₂ in PBS (10 Minuten) inaktiviert. Nach erneutem Abspülen mit PBS wurden die Schnitte zusätzlich 30 Minuten in ein Gemisch aus Esel-Serum (5 % Donkey Serum, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und in PBS angerührter Magermilch (0,5 % Magermilchpulver, Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland) gegeben. Die eigentliche Färbung basiert auf der (Strept)Avidin-Biotin-Complex-Methode. Über Nacht wurden die Schnitte mit Anti-Iba1 (1:400, Anti-Iba1, Rabbit #019-19741, Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland) bei 4 °C inkubiert. Anti-Iba1 ist ein polyklonaler Primärantikörper, welcher sich an die Iba1-Proteine in Makrophagen und Mikrogliazellen anlagert. Überschüssiges Anti-Iba1 wurde abgespült und der biotinylierte Sekundärantikörper Anti-Rabbit IgG (1:200, #RPN 1004, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) für 60 Minuten bei Raumtemperatur hinzugegeben. Der Sekundärantikörper lagerte sich an den Primärantikörper an. Wieder wurden überschüssige Antikörper abgespült. Nun wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 45 - 60 Minuten hinzugegeben, welcher mit dem Sekundärantikörper reagierte. Überschüsse wurden wieder abgespült. Zur Farbentwicklung wurde das Chromogen Diaminobenzidin (DAB Substrate, #11718096001, Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet, welches mit der Peroxidase reagiert und die Iba1-positiven Bereiche braun färbt. Als Gegenfärbung wurde Mayers Hämalaun (#109249, Merck Chemicals GmbH) verwendet, welches Zellkerne blau darstellt.

Die Hirnschnitte wurden in sechs gleichmäßige kortikale Abschnitte eingeteilt. Bei einer 20-fachen Vergrößerung wurden die Anzahl der Mikrogliazellen in einem zufällig ausgewählten Bereich in den sechs kortikalen Hirnarealen sowie beidseitig im Hippocampus ermittelt. Es ergaben sich somit acht Auszählbereiche. Anschließend wurde die Summe der ermittelten Zellen gebildet und durch die Anzahl der bewertbaren Regionen geteilt.

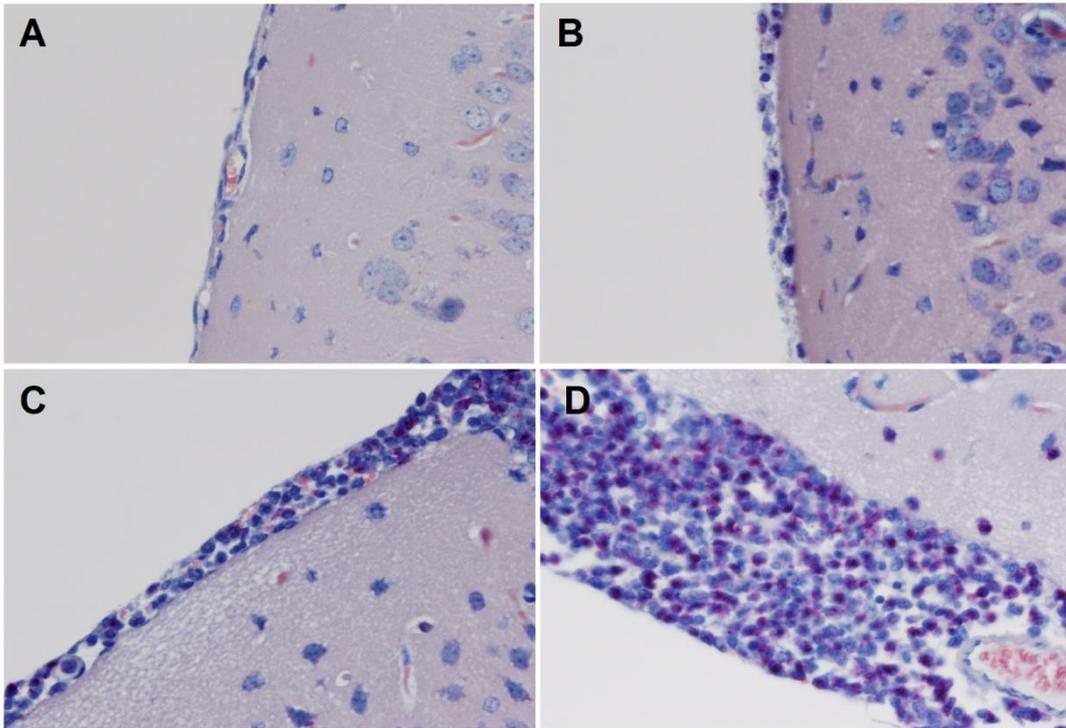


Abbildung 5: histologische Hirnschnitte in CAE-Färbung. A) Entzündungsscore 0, B) Score 1, C) Score 2, D) Score 3

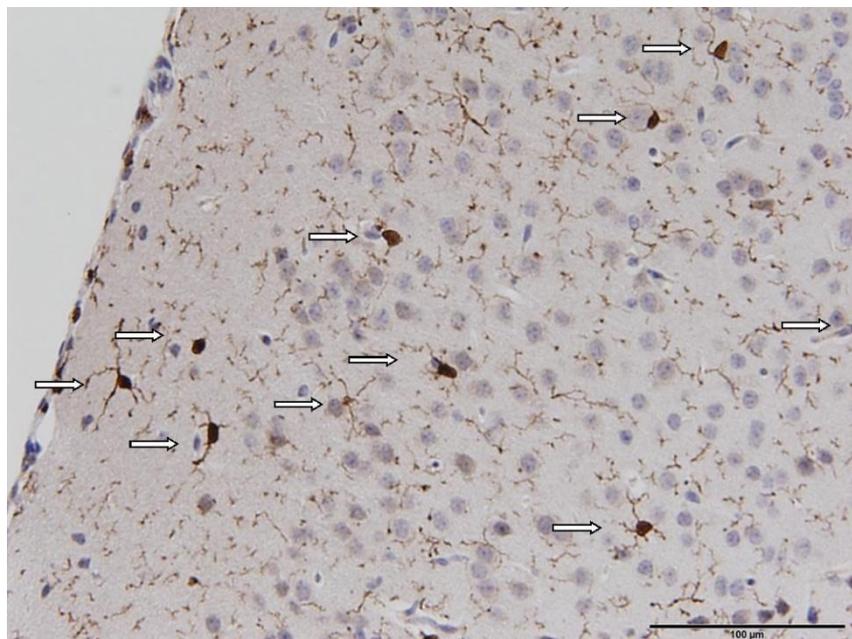


Abbildung 6: Iba1-Färbung, Iba1⁺ -Zellen erscheinen braun, Mikrogliazellen werden sichtbar (Pfeil)

Alle Schnitte wurden mit dem Mikroskop Olympus BX51 über eine Olympus DP71-Kamera im Betrachtungsprogramm CellSens Dimension 1.7.1 (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland) ausgewertet.

2.8 ELISA

Mittels eines antikörperbasierten Immunassays (ELISA) können Peptide und Proteine wie Zytokine quantifiziert werden. Hierbei werden spezifische Antikörper (AK) zu dem nachzuweisenden Protein mit einem Enzym versetzt, welches nach der Bindung mit dem Antigen katalytisch reagiert und durch einen Farbumschlag, Chemolumineszenz oder Fluoreszenz messbar wird. Die Konzentrationen an IL-12/ IL-23p40, MIP-1 α und IFN- γ in Kleinhirn, Milz und Serum wurden mittels Sandwich-ELISA ermittelt.

Bei der hier verwendeten Sandwich-Technik wurden auf einer Mikrotiterplatte 50 μ l/Well mit PBS verdünnte analytspezifische Antikörper (capture antibody) (5 ml PBS+ 27,5 μ l AK) aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die überschüssigen Antikörper wurden mittels Waschpuffer (0,5 g Tween/1 l PBS) ausgewaschen und mittels Blockpuffer (300 μ l/Well Reagent Diluent 1) geblockt. Das vorbereitete Analyt (Homogenatüberschuss bzw. Serum verdünnt mit Reagent Diluent 1, 50 μ l/Well) wurde am nächsten Tag hinzugegeben und verband sich mit dem Antikörper. Nach erneutem Blocken wurde überschüssiges Analyt ausgewaschen und die Mikrotiterplatten 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um dann erneut gewaschen zu werden. Im nächsten Schritt wurden 50 μ l/Well eines zweiten analytspezifischen Antikörpers (detection antibody) (5 ml Reagent Diluent1 + 27,5 μ l AK) hinzugegeben, welcher sich ebenfalls mit dem Analyt verband und an ein Reporterenzym gebunden war. Es entstand somit ein Antikörper-Analyt-Antikörper-Komplex. Nach erneuter zweistündiger Inkubation wurden überschüssige Detektions-Antikörper ausgewaschen. Bei dem hier verwendeten Kit wurde 50 μ l/Well Horseradish Peroxidase (HRP)-Diluent (40 ml Waschpuffer + 40 mg Bovine Serum Albumin (BSA) + 1 μ l Streptavidin HRP) hinzugegeben und nach einer kurzen Inkubationszeit Überschüsse wieder ausgewaschen. Das HRP-Diluent verband sich mit dem Detektions-Antikörper und führte bei Zugabe von 100 μ l/Well Tetramethylbenzidinsubstratlösung zu einem blauen Farbumschlag, welcher abhängig von der vorhandenen Menge an Analyt war. Nach Beendigung der Reaktion mittels 50 μ l Stopplösung (Schwefelsäure) veränderte sich die Farbe zu gelb und konnte bei 450 nm photometrisch innerhalb der nächsten 30 Minuten gemessen werden. Parallel dazu wurde eine mitgelieferte Standardreihe zum Vergleich erstellt. In dem hier beschriebenen Vorgehen wurden Duo Set ELISA Development Systems Kits (R& D Systems, Wiesbaden, Deutschland) verwendet.

2.9 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung und Darstellung wurde das Programm Prism 5 von GraphPad Software Inc, San Diego, USA, eingesetzt. Zur Analyse der Überlebenskurven wurde der Log-Rank-Test verwendet. Die Gewichtsentwicklung, Bakteriendichte, Entzündungsgrad, Milzlängen und -gewichte sowie die Zytokin- und Chemokinkonzentration zwischen den Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Die Werte wurden alle als Median und Interquartilsabstand (25 % - 75 %) angegeben. Bakterienkonzentrationen, die unterhalb der Detektionsgrenze von 1×10^2 , bzw. 1×10^3 lagen, wurden mit < 99 bzw. < 999 gleichgesetzt, um vergleichbare Berechnungen zu erhalten. Mögliche Zusammenhänge zwischen der Bakteriendichte und den Zytokin- und Chemokinkonzentrationen wurden mittels Spearman-Rank-Test untersucht.

Es wurde von einer Normalverteilung der Dichte der Mikrogliazellen ausgegangen, weshalb die Anzahl der Iba1⁺-Zellen pro Fläche mittels t-Test verglichen wurde. Der klinische Score wurde an dem letzten Zeitpunkt verglichen, an dem in beiden Gruppen noch allen Tieren ein Score zugeordnet werden konnte. Verstorbene bzw. getötete Mäuse wurden zum Todeszeitpunkt mit den klinischen Score 4 bzw. 3 bewertet und danach aus der Auswertung genommen. Die Scores wurden ebenfalls mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen. Bakterienkonzentrationen und Chemokine bzw. Zytokine wurden mittels Spearman-Rang-Korrelation überprüft um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen den beiden bestand.

Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet und alle Werte auf 2 Dezimalstellen hinter dem Komma gerundet.

2.10 Versuchsaufbau

2.10.1 Überlebensexperiment mit immunsupprimierten Mäusen

Um zu ermitteln, ob das CpG bei immunsupprimierten Mäusen die Mikroglia zu erhöhter Immunantwort stimuliert und somit eine protektive Wirkung ausübt, wurden 48 C57BL/6-Mäuse wie in 2.3 beschrieben mit dem Anti-Ly-6G (1A8)-Antikörper behandelt. 72 Stunden vor der Infektion (Tag -3, 8 Stunden nach der 2. Antikörpergabe) wurde randomisiert jeweils 18 Mäusen 100 µg CpG (33,5µl) in 166,5 µl NaCl, bzw. 200 µl Pufferlösung intraperitoneal injiziert (siehe 2.2). Um den Effekt einer höheren CpG-Dosis zu ermitteln, wurde 12 Mäusen die doppelte Menge an CpG (200 µg CpG in, n = 6 CpG-Mäuse) bzw. Pufferlösung (n = 6 Kontroll-Mäuse) intraperitoneal verabreicht.

Am Tag 0 wurden alle Mäuse 8 Stunden nach der Antikörpergabe intrakraniell mit *S. pneumoniae* infiziert. 2 - 3-mal täglich wurde der klinische Score sowie das Gewicht festgestellt. Mäuse, welche aus dem Experiment aufgrund der Abbruchkriterien genommen wurden oder verstarben, wurden wie oben beschrieben prozessiert. Es wurde eine Kaplan-Meier-Kurve mit den Todeszeitpunkten erstellt, um eine Überlebenskurve zu erhalten. Bei Tieren, die aufgrund der Abbruchkriterien getötet werden mussten, galt der Zeitpunkt der Tötung als Todeszeitpunkt. Nach 14 Tagen wurden alle überlebenden Mäuse getötet und Milz, Kleinhirn und Blut auf ihre Bakterienbelastung sowie ihren Zytokingehalt untersucht (Abbildung 7).

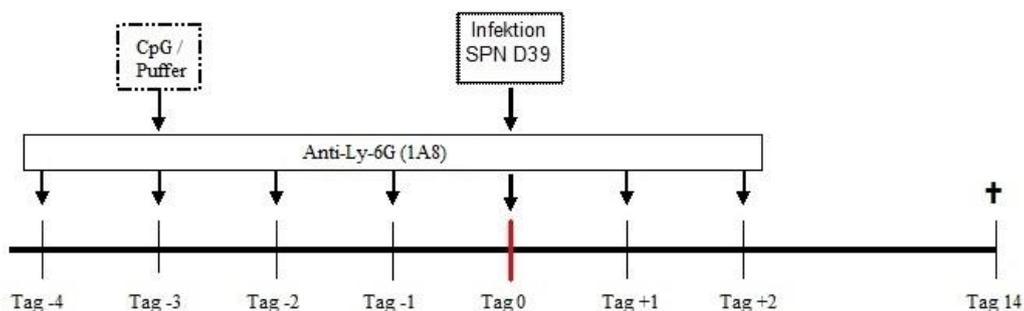


Abbildung 7: Versuchsaufbau Überlebensexperiment immunsupprimierter C57BL/6-Mäuse.

2.10.2 Überlebensexperiment mit immunkompetenten Mäusen

Um zu evaluieren, ob CpG auch eine protektive Wirkung bei immunkompetenten Mäusen hat, wurde 19 zufällig ausgewählten C57BL/6-Mäusen 72 Stunden vor der Infektion mit *S. pneumoniae* D39 100 µg CpG injiziert. 18 Mäusen wurde entsprechend als Kontroll-Gruppe Pufferlösung injiziert (Abbildung 8). Nach der Infektion wurden die Mäuse 2 - 3-mal am Tag gewogen und der klinische Score erhoben. Verstorbene Mäuse oder solche, die den Abbruchkriterien entsprachen, wurden wie oben beschrieben prozessiert. Eine Überlebenskurve nach Kaplan-Meier mit den Todeszeitpunkten wurde erstellt. Nach 14 Tagen wurden die überlebenden Mäuse getötet und Milz, Kleinhirn und Blut auf ihre Bakterienbelastung sowie Zytokinkonzentrationen untersucht.

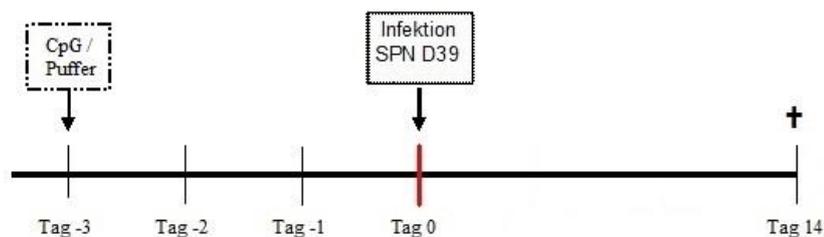


Abbildung 8: Versuchsaufbau Überlebensexperiment immunkompetenter C57BL/6-Mäuse und TLR9^{-/-}-Mäuse

2.10.3 Überlebensexperiment mit immunkompetenten TLR9^{-/-}-Mäusen

TLR 9^{-/-} - Mäuse sollten nicht durch CpG stimuliert werden, wenn CpG nur durch TLR9 erkannt wird. Um dies zu überprüfen, wurden 13 TLR 9^{-/-}-Mäuse im Alter von 11 - 22 Wochen getestet, von denen 2 weibliche Mäuse waren. Der Testgruppe (1♀, 6♂) wurde 3 Tage vor der Infektion 100 µg CpG injiziert, der Kontroll-Gruppe (1♀, 5♂) Pufferlösung. Die Mäuse wurden nach der Infektion 2 - 3-mal täglich gewogen und der klinische Score erhoben. Verstorbene oder getötete Mäuse wurden analog zu den anderen Experimenten behandelt (Abbildung 8).

2.10.4 Ermittlung der Bakteriendichte sowie Auswirkung des CpGs auf inflammatorische

Prozesse in immunsupprimierten C57BL/6-Mäusen

Um die unmittelbare Wirkung des CpGs auf das Wachstum und die Ausbreitung der Bakterien beim geschwächten Immunsystem zu ermitteln, wurden 21 C57BL/6-Mäuse im Alter von 8 - 9 Wochen beginnend 4 Tage vor Infektion mit Anti-Ly-6G Antikörper behandelt. 11 Mäusen wurde 100 µg CpG 72 Stunden vor der Infektion intraperitoneal verabreicht. Den übrigen 10 Mäusen wurde entsprechende Pufferlösung injiziert. Den Mäusen wurde vor der Infektion retrobulbär Blut entnommen, um die IL-12/IL-23p40-Serumkonzentration vor und nach der Infektion zu bestimmen. 24 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* D39 (230 CFU/ Maus) wurden alle Mäuse getötet und Proben entnommen. Da eine Tendenz zu erkennen war, wurde anschließend das Experiment mit 22 C57BL/6-Mäusen wiederholt und erst 36 Stunden nach der Infektion mit 460 CFU *S. pneumoniae* D39 pro Maus beendet (Abbildung 9).

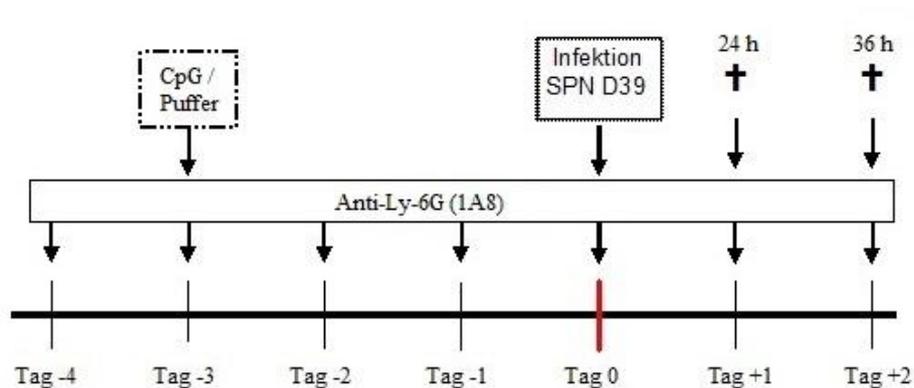


Abbildung 9: Versuchsaufbau Kurzzeitexperiment mit immunsupprimierten Mäusen. Bei allen C57BL/6-Mäusen wurde eine Neutropenie mit Anti-Ly-6G(A8)-Antikörper induziert. 21 C57BL/6-Mäuse wurden 24 Stunden nach der Infektion mit *S. pneumoniae* getötet. 22 C57BL/6-Mäuse wurden hingegen 36 Stunden nach der Infektion getötet.

2.10.5 Ermittlung der Bakteriendichte sowie Auswirkung des CpGs auf inflammatorische Prozesse in immunkompetenten C57BL/6-Mäusen

Um die direkte Auswirkung des CpGs auf immunkompetente C57BL/6-Mäuse zu ermitteln, wurden 24 Mäuse randomisiert in CpG-Gruppe und Kontroll-Gruppe mit je n = 12 eingeteilt. Drei Tage vor der Infektion mit *S. pneumoniae* D39 (1550 CFU/ Maus) wurde die CpG-Gruppe analog zu vorhergehenden Experimenten mit 100 µg CpG intraperitoneal injiziert. Die Kontroll-Gruppe erhielt entsprechend 200 µl Pufferlösung. Den Mäusen wurde vor Infektion retrobulbär Blut entnommen, um die IL-12/IL-23p40-Serumkonzentration vor und nach der Infektion zu bestimmen. Bereits 24 Stunden nach Infektion wurden alle Mäuse getötet und wie beschrieben die Proben gewonnen und verarbeitet. In einer weiteren Versuchsreihe wurden 20 Mäuse analog behandelt, jedoch erst nach 36 Stunden getötet (Abbildung 10).

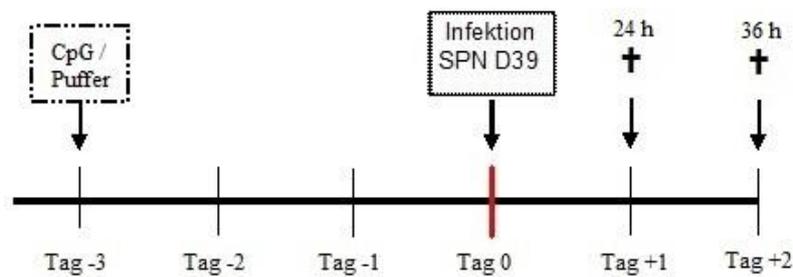


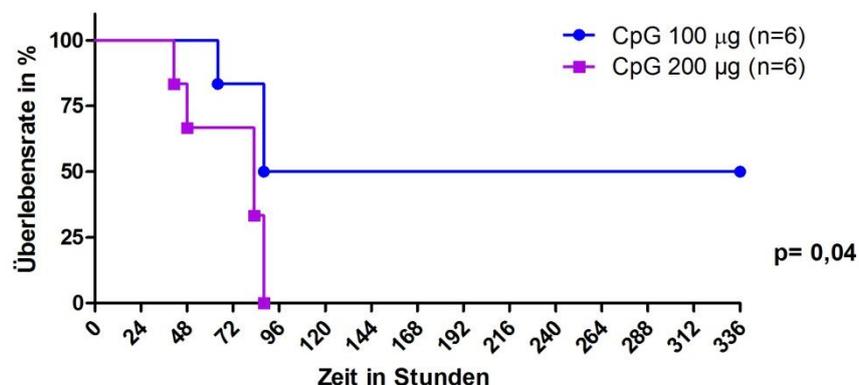
Abbildung 10: Versuchsaufbau Kurzzeitexperiment mit immunkompetenten Mäusen. 24 C57BL/6-Mäuse wurden 24 Stunden nach der Infektion mit *S. pneumoniae* getötet. 20 C57BL/6-Mäuse wurden hingegen 36 Stunden nach der Infektion getötet.

3. Ergebnisse

3.1 Ermittlung der protektiven Wirkung des CpGs bei einer Pneumokokkenmeningitis bei immunsupprimierten Mäusen

3.1.1 Vergleich zweier CpG-Dosen hinsichtlich ihrer Toleranz und Auswirkung

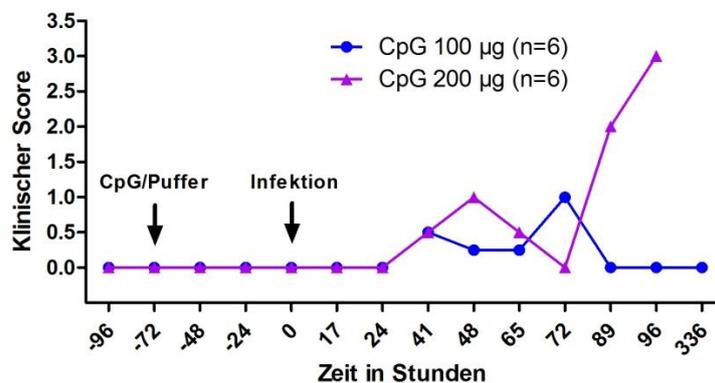
Um den Effekt einer höheren CpG-Dosis im Vergleich zur 100 µg-Dosis zu ermitteln, wurde 6 Tieren die doppelte Menge an CpG injiziert. Sie erhielten somit 200 µg (67 µl CpG) anstatt 100 µg (33,5 µl). Bei allen Mäusen wurden 4 Tage vor der Infektion mit 100 CFU *S. pneumoniae* die neutrophilen Granulozyten mittels Anti-Ly-6G (1A8)-Antikörper eliminiert. Nach bereits 88 Stunden erreichten die CpG-Tiere, denen 200 µg (67 µl) CpG pro Maus injiziert wurde, eine Sterblichkeitsrate von 100 %. Im Vergleich dazu erlangte die Gruppe mit 100 µg eine Sterblichkeitsrate von 50 %. Es ergab sich eine statistische Signifikanz mit $p = 0,04$ nach dem Log-Rank-Test in der Überlebenszeit (Graph 1). Die Mediane Überlebenszeit der mit 100 µg CpG behandelten Mäuse betrug 212 Stunden. Im Gegensatz dazu überlebten die mit 200 µg CpG injizierten Mäuse im Median nur 83 Stunden.



Graph 1: Überlebenskurve ab Infektionszeitpunkt ($t = 0$ h) immunsupprimierter CpG-Mäuse nach Injektion von 33,5 µl (100 µg) im Vergleich zu 67 µl (200 µg) CpG. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Log-Rank-Tests durchgeführt.

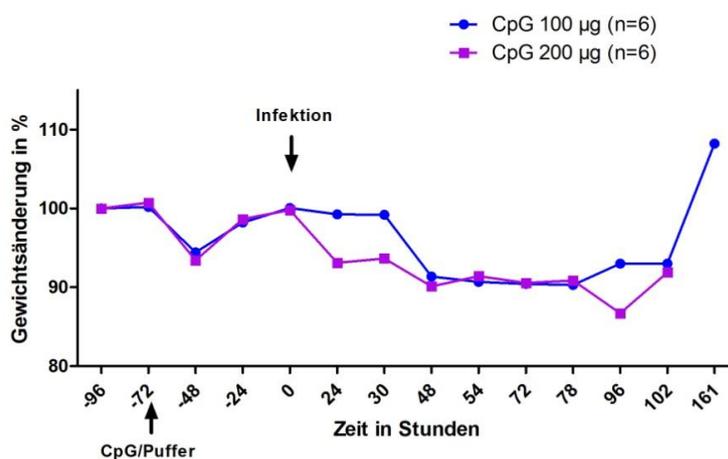
Die ersten klinischen Symptome traten in der CpG-Gruppe, welche 200 µg CpG injiziert bekam, im Median 41 Stunden nach der Infektion auf. In der anderen Gruppe traten die ersten Symptome deutlich später auf. Im Median erkrankten die Mäuse nach 188,5 Stunden ($p = 0,069$, Log-Rank-Test). Beim Vergleich des klinischen Scores zum Zeitpunkt 41 Stunden nach Infektion ergab sich zwischen der Gruppe, welche 100 µg CpG injiziert bekam, und der CpG-

Gruppe mit 200 µg CpG kein Unterschied ($p = 0,67$; Mann-Whitney-U-Test) (Graph 2). Die CpG-Injektion hatte keine Auswirkung auf den klinischen Score vor der Infektion.



Graph 2: Entwicklung des klinischen Scores von immunsupprimierten Mäusen, welchen 200 µg CpG injiziert wurden, im Vergleich zu Mäusen, denen 100 µg CpG verabreicht wurde. Bei beiden Gruppen handelte es sich um immunsupprimierte C57BL/6-Mäuse nach Infektion mit 100 CFU/Maus. Verstorbene Mäuse wurden im Kurvenverlauf nicht berücksichtigt. In der Gruppe mit 200 µg CpG gab es keine überlebenden Tiere. Ein Punkt entspricht jeweils dem Gruppenmedian.

48 Stunden vor der Infektion war bei allen CpG-Mäusen ein kurzzeitiger Gewichtsabfall zu erkennen, der im Zusammenhang mit der CpG-Injektion, welche 24 Stunde zuvor verabreicht wurde, stand (Graph 3). 24 Stunden nach CpG-Injektion konnte im Median ein Gewichtsabfall von 6,58 (5,44 - 7,14) % zum Ausgangsgewicht bei den CpG-Mäusen, die mit 200 µg behandelt wurden, festgestellt werden. Im Vergleich dazu verloren die CpG-Mäuse, die mit 100 µg behandelt wurden, im Median 5,55 (3,7 - 6,15) % ihres Ausgangsgewichtes ($p = 0,24$; Mann-Whitney-U-Test).

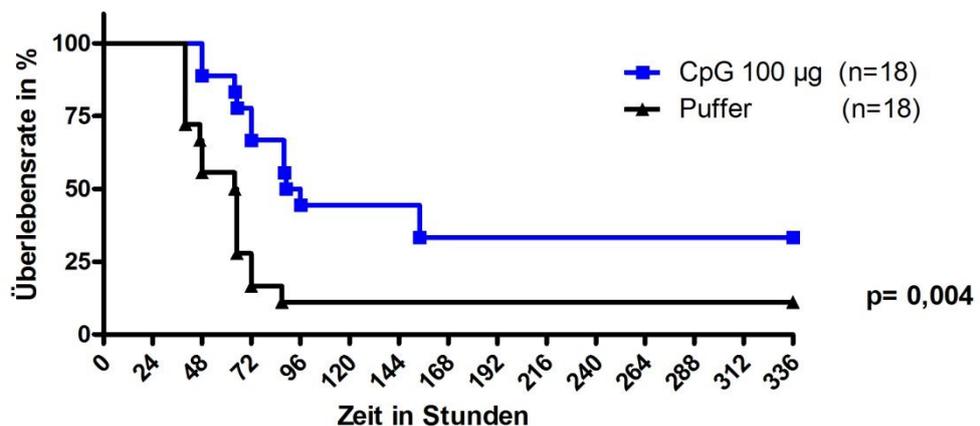


Graph 3: Gewichtsveränderung bei immunsupprimierten C57BL/6-Mäusen während des Experimentverlaufs, ausgehend von 100 % als Anfangsgewicht bei 96 Stunden vor der Infektion (100 CFU SPN D39 /Maus). Verglichen wurden CpG 200 µg ($n = 6$) und CpG 100 µg ($n = 6$). Die Punkte stehen jeweils für den Medianwert je Gruppe und Zeitpunkt. 72 Stunden vor der Infektion wurde den Mäusen CpG injiziert.

Aufgrund der deutlich schlechteren Überlebensrate der Mäuse mit 200 µg CpG wurde in weiteren Experimenten den Mäusen nur 100 µg CpG verabreicht.

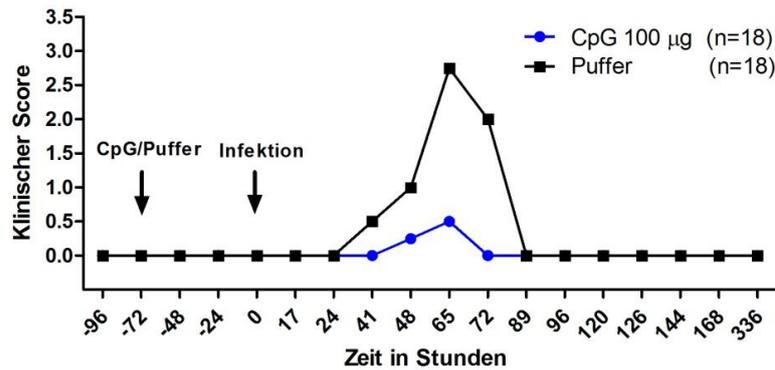
3.1.2 Untersuchung des protektiven Effekts einer Einzeldosis von 100 µg CpG bei immunsupprimierten Mäusen.

Die insgesamt 18 immunsupprimierten Mäuse, welche lediglich 100 µg CpG injiziert bekamen, zeigten mittels Log-Rank-Test eine statistisch signifikant längere Überlebenszeit im Vergleich zu der infizierten Kontroll-Gruppe ($p = 0,004$; $n = 18$) (Graph 4). Bei den verstorbenen CpG-Mäusen lag der Todeszeitpunkt im Median bei 92,5 Stunden nach Infektion. Im Vergleich dazu erlagen die Kontroll-Mäuse der Erkrankung im Schnitt nach 64,5 Stunden. 33,3 % (6/18) der CpG-Mäuse und 11,1 % (2/18) der Kontroll-Mäuse überlebten.



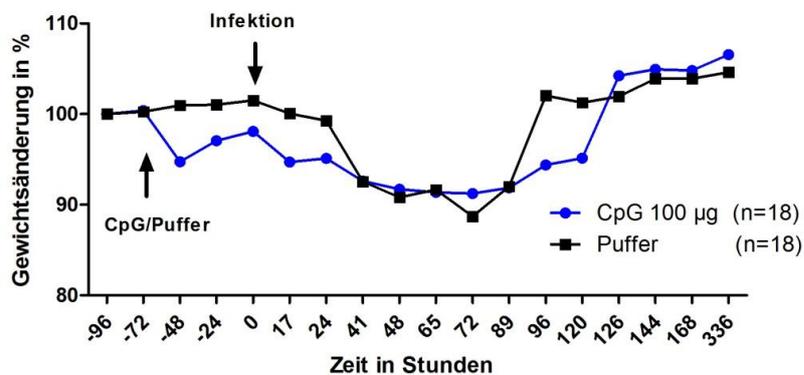
Graph 4: Überlebenskurve immunsupprimierter CpG-Mäuse (100 µl) ($n = 18$) gegenüber einer Kontroll-Gruppe ($n = 18$) nach intrazerebraler Injektion mit *S. pneumoniae*. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Log-Rank-Tests durchgeführt.

Die ersten Symptome zeigten sich im Median bei den mit CpG behandelten Mäusen 56,5 Stunden nach der Infektion. In der Kontroll-Gruppe konnte bereits nach 41 Stunden im Median erste Symptome erkannt werden ($p = 0,051$; Log-Rank-Test). Bei der Betrachtung des klinischen Scores fiel zum Zeitpunkt 41 Stunden nach der Infektion ein tendenzieller Unterschied mit $p = 0,061$ (Mann-Whitney-U-Test) zwischen den beiden Gruppen auf (Graph 5). Die Injektion von CpG alleine hatte keinen Einfluss auf den klinischen Score, wie das Intervall von - 72 Stunden bis + 17 Stunden zeigte.



Graph 5: Entwicklung des klinischen Scores während des Experiments bei mit CpG behandelten infizierten Mäusen (100 µg) und infizierten Kontroll-Mäusen, je n = 18 immunsupprimierte Tiere. Verstorbene Mäuse wurden im Graphen nicht berücksichtigt.

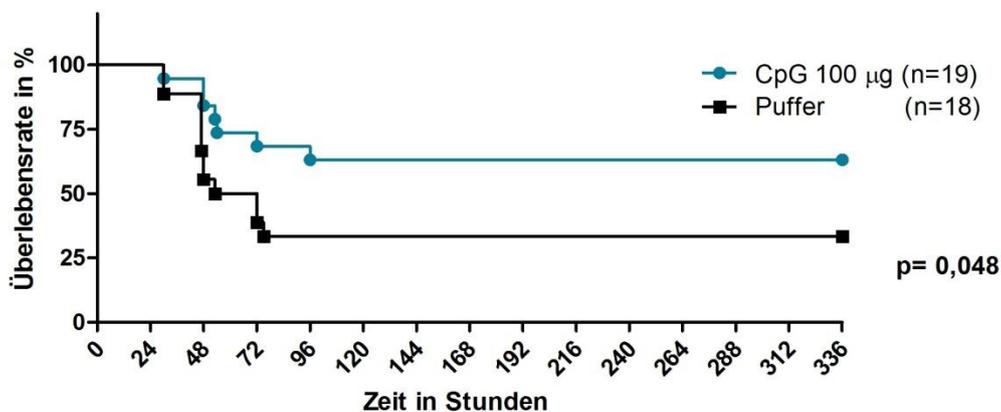
24 Stunden nach CpG-Injektion konnte bei den CpG-Mäusen kurzzeitig eine deutliche Gewichtsreduktion festgestellt werden gegenüber den Kontroll-Mäusen. Die CpG-Mäuse verloren im Median 5,56 (4,56 - 6,27) % ihres Ausgangsgewichtes, während die Kontroll-Mäuse 1,8 (1,1 - 3,4) % zunahmen ($p < 0,0001$; Mann-Whitney-U-Test).



Graph 6: Gewichtsveränderung bei immunsupprimierten C57BL/6-Mäuse während des Experimentverlaufs, ausgehend von 100 % als Anfangsgewicht bei 96 Stunden vor der Infektion (100 CFU SPN D39 /Maus). Die Punkte stehen jeweils für den Medianwert je Gruppe und Zeitpunkt. 72 Stunden vor der Infektion wurde den Mäusen CpG- oder Pufferlösung injiziert.

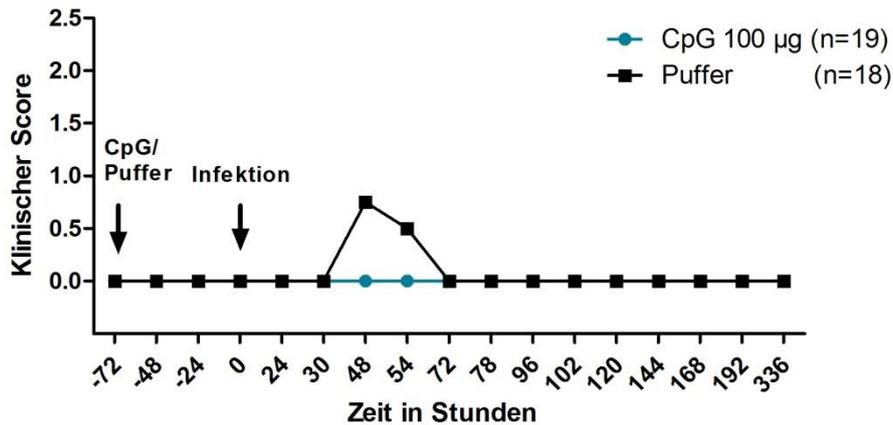
3.2 Ermittlung der protektiven Wirkung des CpGs bei immunkompetenten Mäusen

37 Mäuse wurden randomisiert in 2 Gruppen eingeteilt. 19 Mäuse bekamen 100 µg CpG und 18 Mäuse 100 µg Pufferlösung injiziert. Den Mäusen wurden 72 Stunden später 240 - 305 CFU Pneumokokken pro Maus intrakraniell injiziert. Es konnte eine statistisch signifikante Differenz zwischen den Überlebenszeiten beider Gruppen festgestellt werden mittels Log-Rank-Test ($p = 0,048$) (Graph 7). Im Median überlebten die Kontroll-Mäuse 62,5 Stunden. Da mehr als die Hälfte der CpG-Mäuse überlebte, lag der mediane Todeszeitpunkt dieser Gruppe bei > 14 Tagen. 63,2 % (12/19) der CpG-Mäuse und nur 33,3 % (6/18) der Kontroll-Mäuse überlebten.



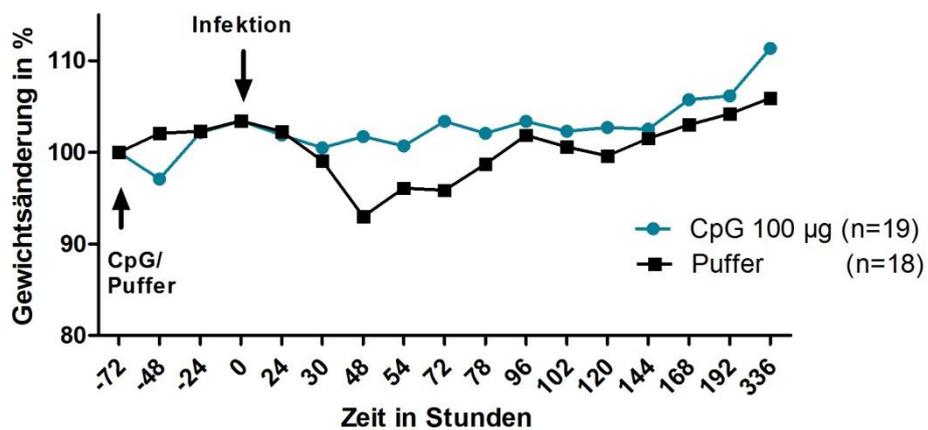
Graph 7: Überlebenskurve immunkompetenter C57BL/6-Mäuse, Behandlung mit 100 µg CpG/Maus, CpG-behandelte (n = 19) vs. Kontroll-Tiere (n = 18). Zum Zeitpunkt 336 Stunden befanden sich in der CpG-Gruppe n = 12 und in der Kontroll-Gruppe n = 6. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Log-Rank-Tests durchgeführt.

Im Median entwickelten die Kontroll-Mäuse nach 48 Stunden signifikant eher Symptome als die mit CpG behandelten Mäuse ($p = 0,039$; Log-Rank-Test). Bereits 2 Tage nach Infektion waren die Kontroll-Mäuse stärker erkrankt (im Median 0,75 (0,0 - 3,25)) als die Mäuse, welche mit 100 µg CpG (im Median 0,0) behandelt wurden. 48 Stunden nach der Infektion ergab sich zwischen den beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied mit $p = 0,0065$ (Mann-Whitney-U-Test) (Graph 8).



Graph 8: Entwicklung des klinischen Scores nach Infektion mit *S. pneumoniae*. Vergleich von immunkompetenten CpG-Mäusen mit immunkompetenten Kontroll-Mäusen. Die Punkte stehen für den Medianwert je Gruppe und Zeitpunkt.

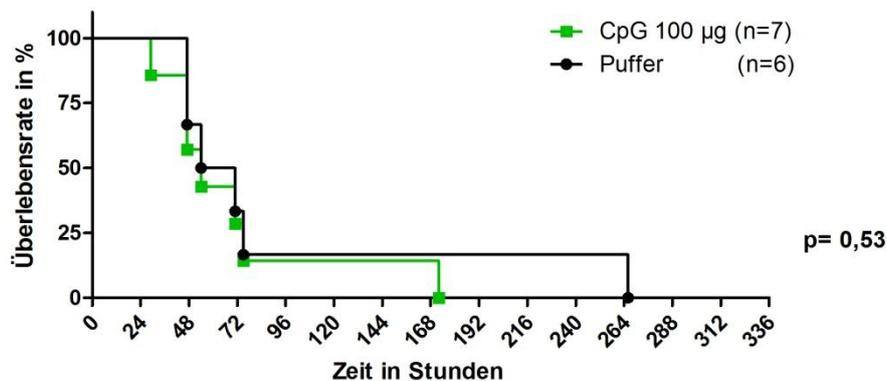
Kurz nach der Injektion mit CpG (-72 Stunden) kam es auch hier zu einem kurzzeitigen Gewichtsabfall von 2,91 (1,87 - 4,04) % bei -48 Stunden in der CpG-Gruppe (Graph 9). Im Gegensatz stieg das Gewicht der Kontroll-Mäuse um 2,1 (0,7 – 4,1) % an ($p < 0,0001$; Mann-Whitney-U-Test). Zum Zeitpunkt der Infektion (0 Stunden) mit *S. pneumoniae* war das Gewicht der CpG-Mäuse wieder gestiegen, um dann infektionsbedingt wieder zu fallen.



Graph 9: Gewichtsveränderung im Laufe des Experiments bei immunkompetenten Mäusen (n = 19 in der CpG-Gruppe und n = 18 Mäusen in der Kontroll-Gruppe). Das Ausgangsgewicht wurde als 100 % gesetzt. Jeder Punkt entspricht dem Median der Gruppe zum gemessenen Zeitpunkt. Verstorbene Tiere wurden im Graph nicht berücksichtigt.

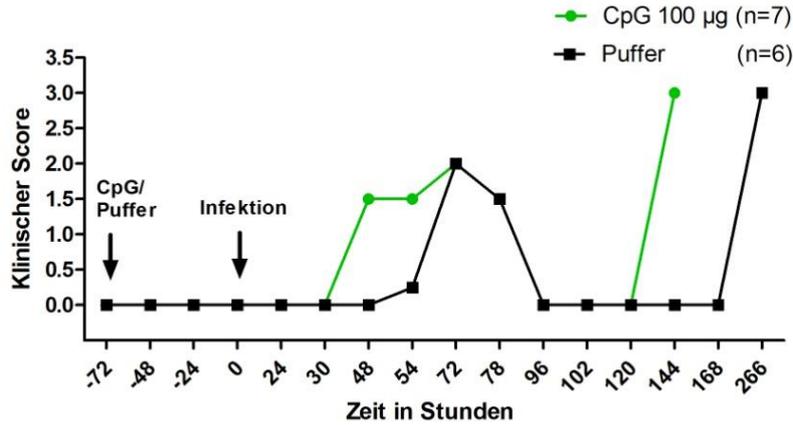
3.3 Nachweis der Notwendigkeit der TLR9-Signalkaskade für den protektiven Effekt CpGs

13 TLR9^{-/-} nicht Leukozyten-depletierte Mäuse wurden randomisiert in 2 Gruppen aufgeteilt, wobei 7 Mäusen 24 Stunden vor Infektion intraperitoneal CpG injiziert wurde und den verbliebenen 6 Mäusen Pufferlösung. Die Mäuse wurden mit 305 CFU/ml *S. pneumoniae* pro Maus infiziert und anschließend eine Überlebenskurve erstellt (Graph 10). Es konnte in der Überlebenszeit kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden. Nach dem Log-Rank-Test ergab sich ein $p = 0,53$. Die Letalität lag in beiden Gruppen bei 100 %.



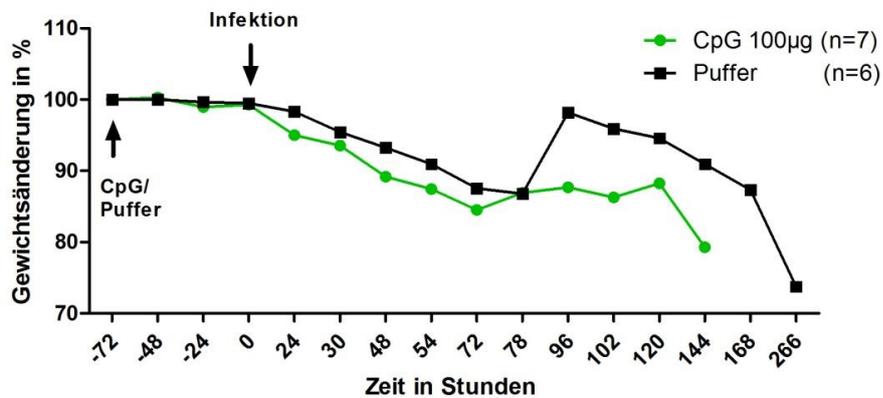
Graph 10: Überlebenskurve ab dem Infektionszeitpunkt ($t = 0$) nicht Leukozyten-depletierter TLR9^{-/-}-Mäuse, welche mit 100 µg CpG bzw. Pufferlösung 72 Stunden zuvor behandelt wurden. Am Infektionstag wurden sie mit 305 CFU/Maus *S. pneumoniae* intrakraniell infiziert. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Log-Rank-Tests durchgeführt.

Auch bei der Betrachtung des klinischen Scores fiel kein Unterschied auf. Zum Zeitpunkt von 30 Stunden nach der Infektion war der klinische Score nicht different ($p = 0,68$; Mann-Whitney-U-Test) (Graph 11). Die ersten Symptome in der CpG-Gruppe konnten nach 48 Stunden festgestellt werden. Im Gegensatz dazu traten die ersten Symptome der Kontroll-Gruppe im Median 6 Stunden später auf ($p = 0,31$; Log-Rank-Test).



Graph 11: Entwicklung des klinischen Scores bei TLR9^{-/-}-Mäusen. Die Punkte entsprechen dem Medianwert der Gruppen je Zeitpunkt.

Es war auch keine Gewichtsveränderung 24 Stunden nach der Injektion mit CpG zu erkennen (Graph 12). Erst nach der Infektion (t = 0 Stunden) kam es zu einem Gewichtsabfall.



Graph 12: Gewichtsentwicklung TLR9^{-/-}-Mäuse. Zum Zeitpunkt t = 0 Stunden fand die Infektion mit 305 CFU/Maus *S. pneumoniae* statt (schwarzer Pfeil). Jeder Punkt steht für den Medianwert je Gruppe und Zeitpunkt.

3.4 Ermittlung der Bakteriendichte sowie Quantifizierung der inflammatorischen Prozesse bei immunsupprimierten C57BL/6-Mäusen

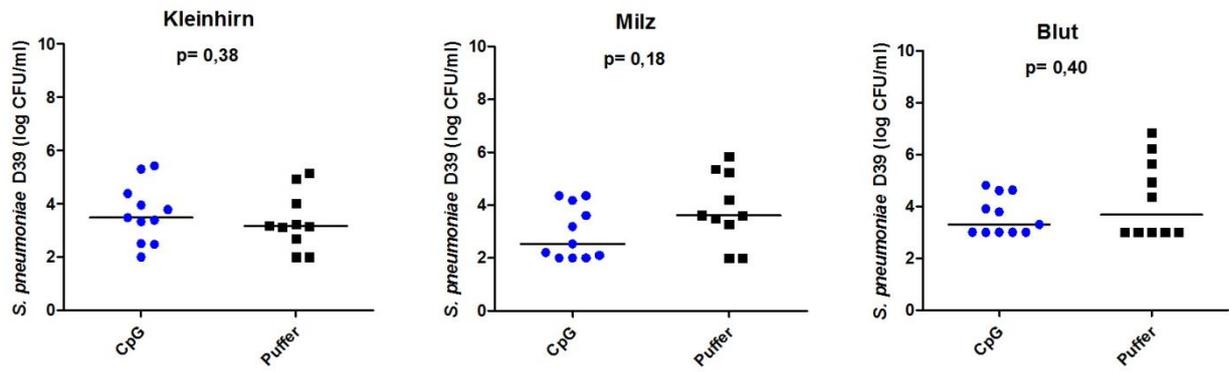
3.4.1 Bakterienkonzentrationen 24 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* in Kleinhirn, Milz und Blut

21 C57BL/6 Neutrophilen-depletierte Mäuse wurden randomisiert einer CpG-Gruppe (n = 11) und einer Kontroll-Gruppe (n = 10) zugeteilt. Am Infektionstag wurde allen Mäusen 230 CFU/ml *S. pneumoniae* D39 intrakraniell injiziert. Allen Mäusen wurde zusätzlich 5 Stunden vor der Infektion retrobulbär Blut entnommen. Nach 24 Stunden wurden alle Tiere getötet und Blutproben sowie Homogenate von Kleinhirn und Milz gewonnen und auf ihre Bakterienkonzentration untersucht (Graph 13). Die Werte wurden als Median (Interquartilsabstand 25 % - 75 %) \log_{10} CFU/ml angegeben.

Bei der Ermittlung der Bakterienkonzentration ergab sich eine mediane Bakterienanzahl im Kleinhirn in der CpG-Gruppe von 3,48 (2,51 - 4,38) \log_{10} CFU/ml gegenüber der Kontroll-Gruppe mit 3,16 (2,52 - 4,23) \log_{10} CFU/ml ($p = 0,38$; Mann-Whitney-U-Test). Bei einer Maus in der CpG-Gruppe und bei zwei Mäusen in der Kontroll-Gruppe lag die Bakteriendichte unterhalb der Detektionsgrenze von 1×10^2 CFU/ml.

Ebenso ergab sich keine statistisch signifikante Differenz bei den Milz- und Blutproben zwischen den Gruppen. In der Kontroll-Gruppe war die mediane Anzahl der Bakterien in der Milz mit 3,61 (2,96 - 5,26) \log_{10} CFU/ml geringfügig höher als in der CpG-Gruppe mit 2,53 (1,99 - 4,18) \log_{10} CFU/ml ($p = 0,18$; Mann-Whitney-U-Test). Bei drei Milzhomogenaten der Kontroll-Gruppe und zweien der CpG-Gruppe lag die Bakterienkonzentration unterhalb der Detektionsgrenze von 1×10^2 CFU/ml.

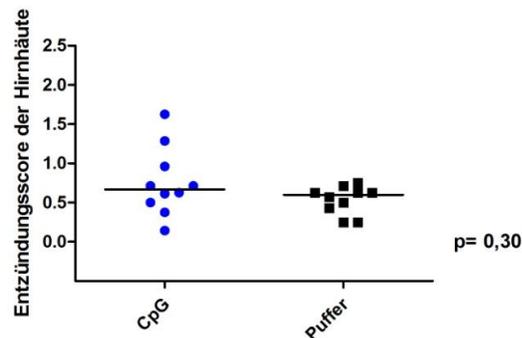
Die Blutproben der CpG-Gruppe enthielten 3,3 (3,0 - 4,61) \log_{10} CFU/ml und die Kontroll-Gruppe 3,68 (3,0 - 5,8) \log_{10} CFU/ml ($p = 0,4$; Im Mann-Whitney-U-Test). In der Kontroll-Gruppe lagen vier Proben unterhalb der Detektionsgrenze von 1×10^3 CFU/ml. Eine Probe lag genau auf der Detektionsgrenze. In der CpG-Gruppe lagen fünf Proben unterhalb der Detektionsgrenze.



Graph 13: 24 Stunden-Kurzzeitexperiment mit immunsupprimierten C57BL/6-Mäusen. Im Vergleich sind die Bakterienkonzentrationen der CpG-Gruppe (n = 11) zur Kontroll-Gruppe (n = 10) in Kleinhirn- und Milzhomogenaten sowie im Blut dargestellt. Der Median ist durch einen horizontalen Balken gekennzeichnet. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

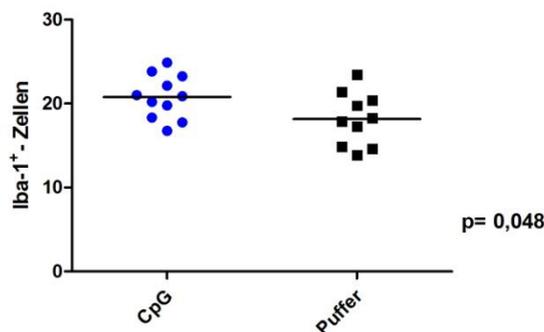
3.4.2 Histologische Untersuchung der Großhirne

Die Hirnhäute der Großhirne wurden auf ihren Entzündungsgrad untersucht (Graph 14). Im Vergleich beider Gruppen ergab sich kein Unterschied ($p = 0,30$; Mann-Whitney-U-Test). Der Entzündungsscore lag bei beiden Gruppen zwischen 0 - 1. Im Median betrug der Score in der CpG-Gruppe 0,67 (0,47 - 1,04) und in der Kontroll-Gruppe 0,6 (0,38 - 0,65).



Graph 14: Entzündungsscore der Hirnhäute immunsupprimierter Mäuse 24 Stunden nach Infektion. CpG-Gruppe $n = 11$, Kontroll-Gruppe $n = 10$ Mäuse; der Median ist durch einen horizontalen Balken verdeutlicht. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

Nach Auszählung der sechs kortikalen sowie beider Hippocampus-Ausschnitte konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mikroglia-dichten in den Großhirnen beider Gruppen festgestellt werden (Graph 15). Für die CpG-Gruppe ergab sich im Mittel 20,8 ($\pm 2,58$) Zellen je Zählabschnitt und in der Kontroll-Gruppe 18,2 ($\pm 3,13$) Zellen ($p = 0,048$; t-Test).



Graph 15: Anzahl an Iba1-positiver Zellen je Zählbereiche in Großhirnschnitten immunsupprimierter Mäuse 24 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae*. CpG-Gruppe $n = 11$, Kontroll-Gruppe $n = 10$ Mäuse; der Mittelwert ist durch einen horizontalen Balken gekennzeichnet. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des t-Tests durchgeführt.

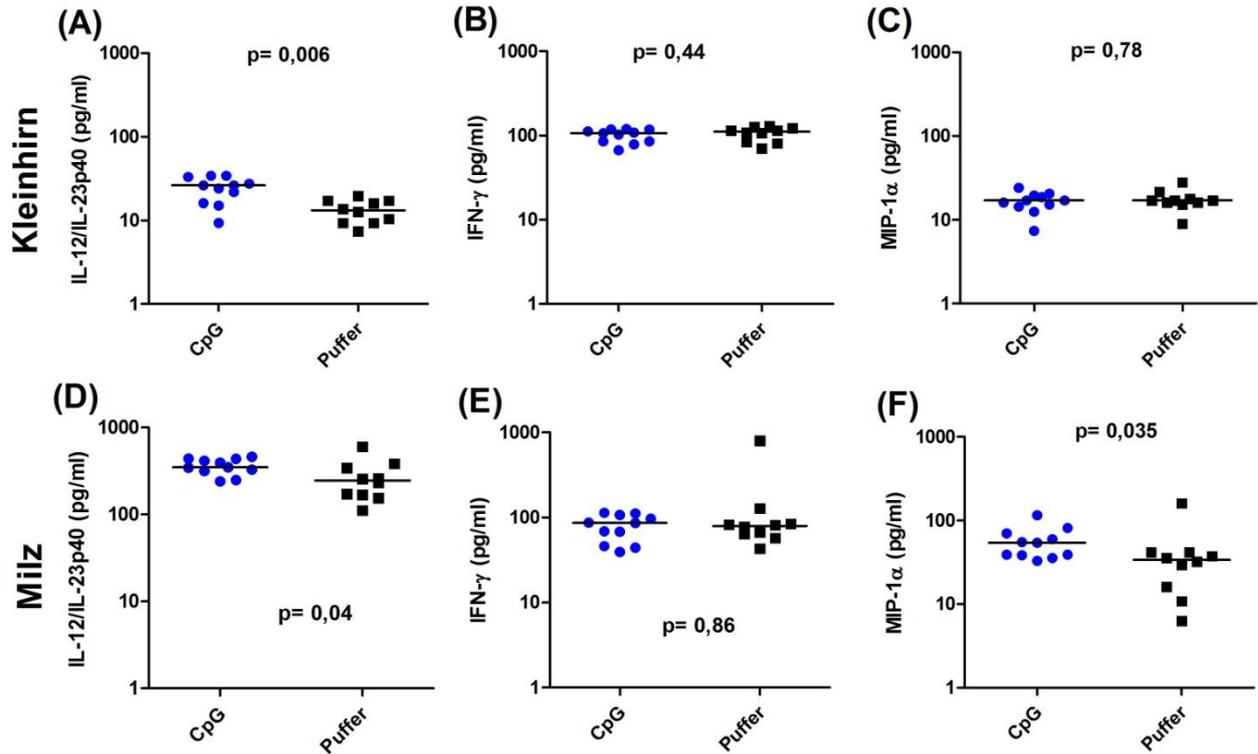
3.4.3 Konzentration an Chemokinen und Zytokinen in Kleinhirn und Milz 24 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae*

Bei der Quantifizierung der Zytokine mittels ELISA fiel eine starke Erhöhung der IL-12/IL-23p40-Werte in der CpG-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe in den Kleinhirn- und Milzhomogenaten auf (Graph 16). Im Mann-Whitney-U-Test waren die Differenzen statistisch signifikant. Für das Kleinhirn ergab sich mit 26,30 (16,1 - 33,10) pg/ml in der CpG-Gruppe zu 13,25 (9,3 - 17,20) pg/ml in der Kontroll-Gruppe ein signifikanter Unterschied von $p = 0,006$ (Graph 16, A). In der Milz lagen die IL-12/IL-23p40-Konzentrationen mit 349,4 (316,4 - 437,5) pg/ml in der CpG-Gruppe höher als in der Kontroll-Gruppe mit 245,8 (166,0 - 353,5) pg/ml ($p = 0,04$) (Graph 16, D).

Beim Vergleich der IFN- γ -Konzentrationen ergab sich weder im Kleinhirn noch in der Milz eine statistisch signifikante Differenz zwischen der CpG-Gruppe und der Kontroll-Gruppe. Im Kleinhirn betragen die IFN- γ -Konzentrationen 106,3 (85,3 - 117,7) pg/ml in der CpG-Gruppe zu 111,5 (82,68 - 123,7) pg/ml in der Kontroll-Gruppe ($p = 0,44$) (Graph 16, B). In der Milz konnten Werte in der CpG-Gruppe von 86,2 (46,2 - 107,2) pg/ml sowie 79,6 (62,63 - 95,28) pg/ml in der Kontroll-Gruppe ermittelt werden ($p = 0,86$) (Graph 16, E).

Zusätzlich wurden Milz und Kleinhirn auf ihren MIP-1 α -Gehalt untersucht. Beim Kleinhirn konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der CpG-Gruppe mit 17,0 (14,3 - 19,6) pg/ml und der Kontroll-Gruppe mit 17,0 (15,88 - 18,7) pg/ml festgestellt werden ($p = 0,78$) (Graph 16, C).

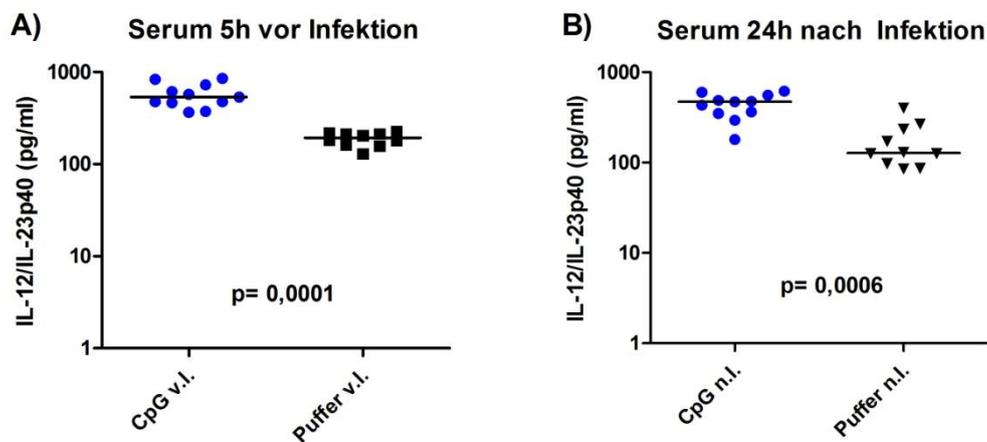
In der Milz hingegen konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden. Für die CpG-Gruppe ergab sich eine mediane MIP-1 α -Konzentration von 54,2 (38,3 - 70,2) pg/ml und für die Kontroll-Gruppe 33,8 (14,78 - 41,8) pg/ml ($p = 0,035$) (Graph 16, F).



Graph 16: Zytokin- und Chemokinquantifizierung 24 Stunden nach Infektion mit *S.pneumoniae* in Kleinhirn- und Milzhomogenaten von immunsupprimierte C57BL/6-Mäuse, CpG n = 11 Tiere, Puffer n = 10 Tiere. IL-12/IL-23p40-Konzentrationen in Kleinhirn (A) und Milz (D). IFN- γ -Konzentrationen in Kleinhirn (B) und Milz (E). MIP-1 α -Konzentrationen in Kleinhirn (C) und Milz (F). Der Median ist durch einen horizontalen Balken gekennzeichnet. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

3.4.4 IL-12/IL-23p40- Gehalt im Serum

Die 5 Stunden vor der Infektion gewonnenen Serumproben wurden mit dem Serum 24 Stunden nach der Infektion bezüglich ihrer IL-12/IL-23p40-Konzentrationen verglichen (Graph 17). Vor wie auch nach der Infektion fiel auf, dass der IL-12/IL-23p40- Gehalt bei den CpG-Mäusen deutlich erhöht war. Die Differenz der CpG-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe war bei beiden statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test). So ergaben die Messungen vor der Infektion 536,4 (465,0 - 727,2) pg/ml in der CpG-Gruppe und 193,5 (159,6 - 215,1) pg/ml in der Kontroll-Gruppe ($p = 0,0001$). Nach der Infektion veränderten sich die IL-12/IL-23p40-Konzentrationen nur geringfügig mit 470,5 (349,4 - 557,2) pg/ml in der CpG-Gruppe zu 127,5 (94,78 - 242,2) pg/ml in der Kontroll-Gruppe ($p = 0,0006$). Die Konzentration an IL-12/IL-23p40 in der Kontroll-Gruppe 5 Stunden vor der Infektion konnte als Ausgangskonzentration vor CpG-Gabe betrachtet werden und spiegelte den normalen Gehalt im Serum wider.



Graph 17: IL-12/IL-23p40- Konzentrationen im Serum 5 Stunden vor Infektion (A) mit SPN D39 sowie 24 Stunden nach Infektion (B). Der Median ist durch einen horizontalen Balken verdeutlicht. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

3.4.5 Zusammenhang zwischen Bakterienbelastung und Zytokin-/Chemokinkonzentrationen

24 Stunden nach der Infektion konnten die IL-12/IL-23p40-Konzentrationen bei den Kontroll-Mäusen weder in der Milz, dem Kleinhirn noch im Serum mit den Bakterienkonzentrationen in Verbindung gebracht werden (Tabelle 1). Ebenfalls ergab sich keine Korrelation zwischen den IFN- γ -Konzentrationen und der Bakteriendichte in der Milz und im Kleinhirn. Lediglich die MIP-1 α -Konzentration in den Milzen konnte mit der Bakterienbelastung in Verbindung gebracht werden ($p = 0,04$) (Tabelle 1).

Die erhöhten IL-12/IL-23p40- und IFN- γ -Konzentrationen in den Milzen der mit CpG-behandelten Mäuse korrelierten negativ mit der Bakterienkonzentration in der Milz ($p = 0,03$). Dies bedeutete, dass die erhöhten Zytokinwerte ursächlich für die niedrigere Bakterienkonzentration waren. Im Kleinhirn und Serum konnte kein Zusammenhang zwischen den Zytokin- und Chemokinkonzentrationen und den Bakterienbelastungen ermittelt werden (Tabelle 4).

Mit dem Spearman-Rank-Test ergaben sich für die:

Kontroll-Mäuse

	<u>Spearman's Rangkorrelationskoeffizient r_s, (p-Wert)</u>		
	IL-12/IL-23p40	MIP-1α	IFN-γ
Milz	0,48 (p = 0,17)	0,66 (p = 0,04)	0,26 (p = 0,47)
Kleinhirn	0,54 (p = 0,11)	0,23 (p = 0,51)	0,48 (p = 0,17)
Serum nach Infektion	0,43 (p = 0,22)	Nicht gemessen	Nicht gemessen

Tabelle 1: Spearman's Rangkorrelationskoeffizient zwischen der Bakterienbelastung und Zytokin- bzw. Chemokin-konzentrationen in Milz, Kleinhirn und Serum 24 Stunden nach Infektion immunsupprimierter Kontroll-Mäuse (n = 10 Tiere)

mit CpG-behandelte Mäuse

	<u>Spearman's Rangkorrelationskoeffizient r_s, (p-Wert)</u>		
	IL-12/IL-23p40	MIP-1α	IFN-γ
Milz	- 0,67 (p = 0,03)	- 0,35 (p = 0,29)	- 0,65 (p = 0,03)
Kleinhirn	0,27 (p = 0,42)	0,18 (p = 0,49)	0,05 (p = 0,88)
Serum nach Infektion	- 0,59 (p = 0,061)	Nicht gemessen	Nicht gemessen

Tabelle 2: Spearman's Rangkorrelationskoeffizient zwischen Bakterienbelastung und Zytokin- bzw. Chemokin-konzentrationen in Milz, Kleinhirn und Serum 24 Stunden nach Infektion CpG-behandelter immunsupprimierter Mäuse (n = 11 Tiere)

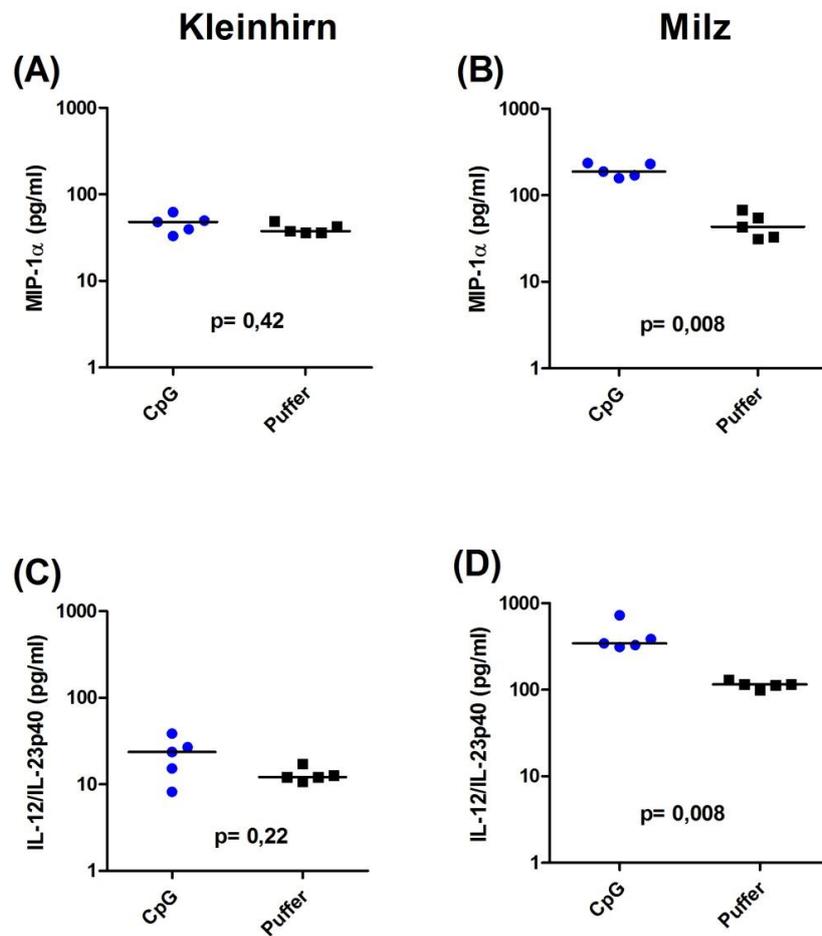
3.4.6 Ermittlung der IL-12/IL-23p40- und MIP-1 α -Konzentration 24 Stunden nach der CpG-Gabe in Kleinhirn und Milz bei immunsupprimierten Mäusen vor Infektion mit *S. pneumoniae*

Um zusätzlich unterscheiden zu können, ob eine Veränderung der Zytokinkonzentrationen auf die Entzündungsreaktion oder auf die CpG-Gabe zurückzuführen war, wurden fünf immunsupprimierte Mäuse 24 Stunden nach CpG- bzw. Puffer-Gabe (Tag -2) getötet, und deren Milz- und Kleinhirnhomogenate auf ihren IL-12/IL-23p40- und MIP-1 α -Gehalt untersucht (Graph 18).

Im Kleinhirn waren kaum Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen. So ergaben sich in der CpG-Gruppe im Median 48,1 (36,2 - 55,95) pg/ml MIP-1 α und in der Kontroll-Gruppe 37,8 (36,2 - 45,7) pg/ml ($p = 0,42$; Mann-Whitney-U-Test). Bei der Quantifizierung der IL-12/IL-23p40-Konzentrationen ergaben sich für die CpG-Gruppe 23,7 (11,75 - 32,7) pg/ml und für die Kontroll-Gruppe 12,1 (11,45 - 14,95) pg/ml ($p = 0,22$; Mann-Whitney-U-Test).

In der Milz hingegen konnte eine deutliche Auswirkung des CpGs auf die IL-12/IL-23p40- und MIP-1 α -Konzentration festgestellt werden. In der CpG-Gruppe betrug die MIP-1 α -Konzentration im Median 187,6 (163,6 - 232,4) pg/ml und in der Kontroll-Gruppe 43,3 (32,2 - 61,55) pg/ml ($p = 0,008$; Mann-Whitney-U-Test). Mit 343,2 (320,0 - 556,2) pg/ml war die Konzentration an IL-12/IL-23p40 in der CpG-Gruppe deutlich erhöht gegenüber der Kontroll-Gruppe mit 115,2 (106,5 - 123,2) pg/ml ($p = 0,008$; Mann-Whitney-U-Test).

Die Konzentrationen der Zytokine in den Kontroll-Gruppen konnte als Ausgangskonzentration vor CpG-Injektion betrachtet werden und spiegelten den normalen Zytokin-Gehalt bei immunsupprimierten Mäusen wider.



Graph 18: Konzentration an MIP-1 α (A und B) und IL-12/IL-23p40 (pg/ml) (C und D) in immunsupprimierten Mäusen 24 Stunden nach CpG- bzw. Puffer-Injektion. Der Median ist durch einen horizontalen Balken verdeutlicht. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

3.5 Abhängigkeit der Bakterienbelastung und der Entzündungsprozesse von der Zeit bei immunsupprimierten C57BL/6-Mäusen

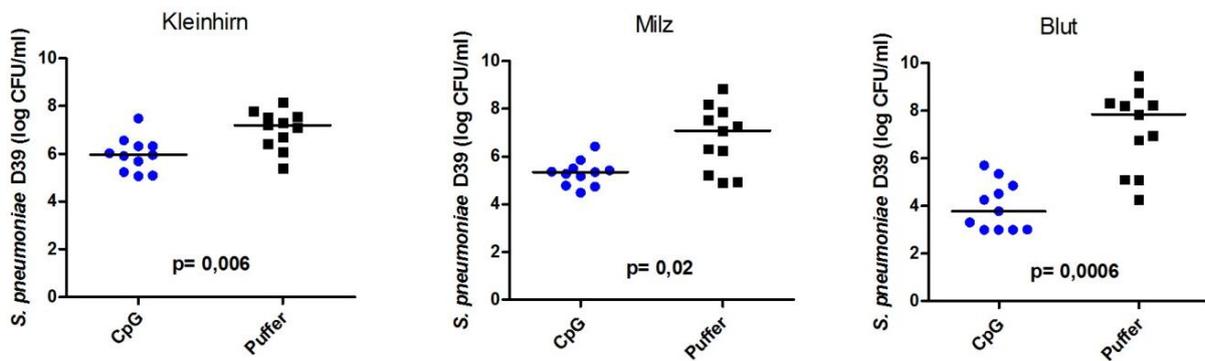
3.5.1 Bakterienkonzentrationen 36 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* in Kleinhirn, Milz und Blut

Bei der Analyse der Bakterienkonzentrationen im Blut sowie in den Milz- und Kleinhirnhomogenaten von immunsupprimierten Mäusen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der CpG-Gruppe und der Kontroll-Gruppe 24 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* festgestellt werden. Jedoch ergaben sich einige signifikante Unterschiede zwischen den Zytokin- und Chemokinkonzentrationen. Der Zeitraum des Kurzzeitexperimentes wurde deshalb auf 36 Stunden erweitert und erneut Blut, Milz und Kleinhirn auf ihre Bakterienbelastung sowie ihre Zytokin- und Chemokinkonzentrationen untersucht.

22 immunsupprimierte C57BL/6-Mäuse wurden in eine CpG- und eine Kontroll-Gruppe mit je 11 Tieren aufgeteilt. Allen Mäusen wurde am Infektionstag 460 CFU/ml *S. pneumoniae* D39 intrakraniell injiziert. 36 Stunden nach der Infektion wurden alle Mäuse getötet und Blut, Serum sowie Kleinhirn- und Milzhomogenate gewonnen.

Es gab statistisch signifikante Differenzen im Mann-Whitney-U-Test beim Vergleich der Bakterienkonzentrationen zwischen den CpG-Mäusen (n = 11) und den Kontroll-Mäusen (n = 11). Bei allen Proben war die Bakterienbelastung im Median deutlich höher als im Versuch, welcher 24 Stunden nach Infektion beendet wurde. Die Messwerte werden als Medianwert (Interquartilsabstand 25 % - 75 %-Wert) angegeben.

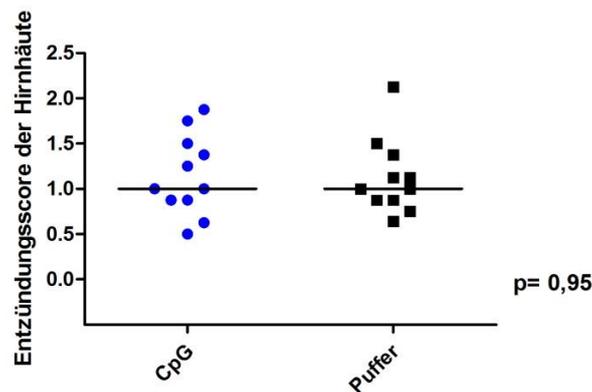
In den Homogenaten der Kleinhirne war die durchschnittliche Bakteriendichte in den CpG-Mäusen mit 5,95 (5,23 - 6,32) log₁₀ CFU/ml signifikant geringer als in den Kontroll-Mäusen mit 7,20 (6,42 - 7,54) log₁₀ CFU/ml (p = 0,006). Ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich in den Milzhomogenaten mit einer Bakteriendichte von 5,34 (4,78 - 5,51) log₁₀ CFU/ml in der CpG-Gruppe und 7,08 (5,23 - 7,88) log₁₀ CFU/ml in der Kontroll-Gruppe (p = 0,02) (Graph 19). Besonders deutlich wurde der Unterschied bei den Blutproben mit medianen 3,78 (3,0 - 4,85) log₁₀ CFU/ml in der CpG-Gruppe im Vergleich zu 7,85 (5,11 - 8,32) log₁₀ CFU/ml in der Kontroll-Gruppe (p = 0,0006). Bei drei Mäusen in der CpG-Gruppe lag die Bakteriendichte unterhalb der Nachweisgrenze von 1 x 10³ CFU/ml und eine Maus hatte eine ermittelte Bakterienkonzentration von 1 x 10³ CFU/ml.



Graph 19: Bakterienkonzentration 36 Stunden nach Infektion in Kleinhirn- und Milzhomogenaten sowie im Blut von immunsupprimierten C57BL/6-Mäusen. In jeder Gruppe befanden sich n = 11 Mäuse. Der Medianwert ist durch einen horizontalen Balken hervorgehoben. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

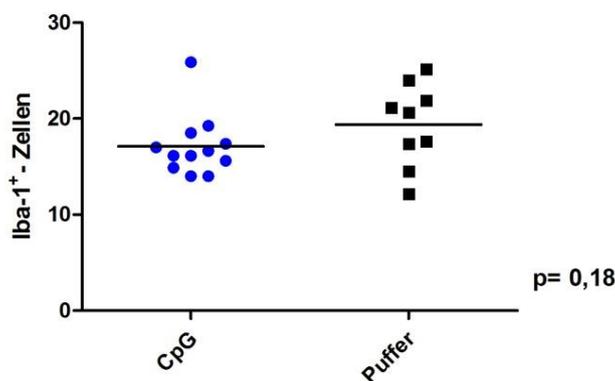
3.5.2 Histologische Untersuchung der Großhirne

Die Leukozyteninfiltration der Meningen (mit dem im Methodenteil beschriebenen semi-quantitativen Score gemessen) war bei beiden Gruppen annähernd gleich ($p = 0,95$). Bei beiden Gruppen hielt sich der Grad der Entzündung in einem Bereich von Score 1 auf.



Graph 20: Entzündungsscore der Hirnhäute immunsupprimierter Mäuse 36 Stunden nach Infektion. Ermittlung durch Auszählung neutrophiler Leukozyten in der CAE-Färbung. CpG n = 11, Puffer n = 11 Mäuse. Der Median ist durch einen horizontalen Balken gekennzeichnet. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

Bei der Auszählung der Iba1-positiven Zellen (Mikroglia) ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Die Anzahl an Mikroglia in der Kontroll-Gruppe betrug 19,38 ($\pm 4,31$) Zellen / Zählabschnitt gegenüber der CpG-Gruppe mit 17,11 ($\pm 3,19$) Zellen / Zählabschnitt ($p = 0,18$; Mann-Whitney-U-Test).



Graph 21: Anzahl an Iba1-positiven Zellen (Mikroglia) je Zählbereich in Großhirnschnitten von immunsupprimierten C57BL/6-Mäusen 36 Stunden nach Infektion. CpG n = 11 Tiere, Puffer n = 11 Tiere. Der Mittelwert ist durch einen horizontalen Balken gekennzeichnet. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des t-Tests durchgeführt.

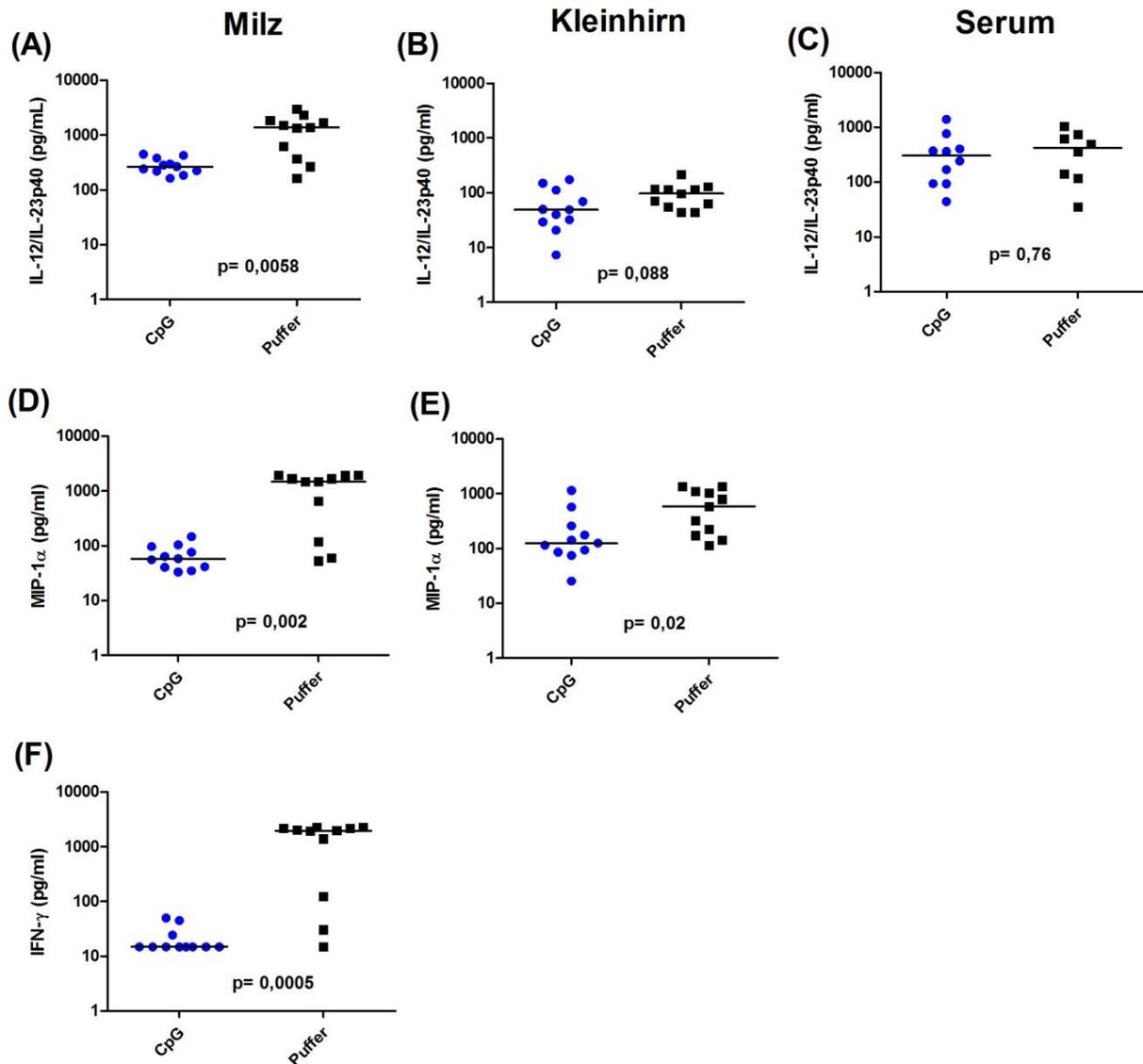
3.5.3 Konzentration an Chemokinen und Zytokinen in Milz, Kleinhirn und Serum 36 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae*

Die Homogenate sowie das Serum infizierter und nach 36 Stunden getöteter Tiere wurden ebenfalls auf ihren Zytokin- und Chemokingehalt untersucht. Waren nach 24 Stunden die Konzentrationen in beiden Gruppen annähernd gleich bzw. in der CpG-Gruppe deutlich erhöht, ergab sich nun ein deutlicher Anstieg in der Kontroll-Gruppe (Graph 22).

In der Milz erreichten die IL-12/IL-23p40-Konzentrationen Werte von 672,7 (201,0 - 932,5) pg/ml in der Kontroll-Gruppe im Vergleich zu 119,5 (90,5 - 184,5) pg/ml in der CpG-Gruppe (Graph 22, A). Der Unterschied zwischen beiden Konzentrationen war statistisch signifikant mit $p = 0,005$ (Mann-Whitney-U-Test). Bei der Quantifizierung der IL-12/IL-23p40-Konzentration im Kleinhirn ergab sich lediglich eine leicht erhöhte Konzentration in der Kontroll-Gruppe mit 96,8 (55,3 - 118,7) pg/ml gegenüber der CpG-Gruppe mit 49,0 (29,4 - 111,7) pg/ml ($p = 0,088$; Mann-Whitney-U-Test) (Graph 22, B). Das Serum wurde ebenfalls auf seine IL-12/IL-23p40-Konzentration untersucht. In der Kontroll-Gruppe konnte auch hier nur eine leicht höhere Konzentration mit 423,1 (124,1 - 710,0) pg/ml gegenüber der CpG-Gruppe mit 302,3 (93,28 - 491,8) pg/ml festgestellt werden ($p = 0,76$; Mann-Whitney-U-Test) (Graph 22, C).

Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich im Vergleich der MIP-1 α -Konzentrationen in Milz und Kleinhirn zwischen den CpG- und Kontroll-Mäusen (Graph 22, D und E). In den Milzhomogenaten konnten im Median 1482,0 (119,8 - 1926,0) pg/ml in der Kontroll-Gruppe und 58,4 (40,6 - 96,5) pg/ml in der CpG-Gruppe ermittelt werden ($p = 0,002$; Mann-Whitney-U-Test). Für die Kleinhirnhomogenate ergab sich 582,6 (172,9 - 1113,0) pg/ml in der Kontroll-Gruppe zu 125,4 (86,3 - 258,0) pg/ml in der CpG-Gruppe ($p = 0,02$; Mann-Whitney-U-Test).

Die Milzhomogenate wurden zusätzlich auf ihre IFN- γ -Konzentration untersucht (Graph 22, F). In der CpG-Gruppe befanden sich nur 2 Proben oberhalb der Detektionsgrenze. Die IFN- γ -Konzentrationen lagen in der Kontroll-Gruppe mit 1969,0 (123,2 - 2189) pg/ml im Vergleich zur CpG-Gruppe mit < 15 ($< 15 - 24,4$) pg/ml signifikant höher ($p = 0,0005$; Mann-Whitney-U-Test).



Graph 22: Konzentrationen an IL-12/IL-23p40 (A, B, C), MIP-1 α (D, E) und IFN- γ (pg/ml) (F) in Milz- und Kleinhirnhomogenaten sowie in Serum 36 Stunden nach Infektion immunsupprimierter C57BL/6-Mäuse. Je Gruppe n = 11 Tiere. Der Median ist durch einen horizontalen Balken gekennzeichnet. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

3.5.4 Zusammenhang zwischen Bakterienbelastung und Zytokin-/Chemokinkonzentrationen

Um zu ermitteln, ob die in den immunsupprimierten Mäusen nach 36 Stunden gemessenen hohen Konzentrationen an IL-12/IL-23p40, MIP-1 α und IFN- γ im direkten Zusammenhang mit der höheren Bakterienbelastung standen, wurden die Bakterienkonzentrationen mit den Zytokin- und Chemokinkonzentrationen mit Hilfe des Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten in Beziehung gesetzt.

Die in den Milzen der Kontroll-Mäuse gemessenen höheren IL-12/IL-23p40-, MIP-1 α - sowie IFN- γ -Konzentrationen korrelierten mit der erhöhten Bakterienkonzentration ($p = 0,002$; $p = 0,002$; $p = 0,006$). Ebenfalls bestand ein Zusammenhang zwischen der IL-12/IL-23p40- sowie der MIP-1 α -Konzentration und der Bakterienbelastung im Kleinhirn ($p = 0,002$; $p < 0,0001$). Beim Serum der Kontroll-Mäuse konnte auch eine Korrelation zwischen der Bakterienkonzentration im Blut und der IL-12/IL-23p40-Konzentration nachgewiesen werden ($p = 0,005$) (Tabelle 3).

Bei den CpG-Mäusen sind die erhöhten IL-12/IL-23p40-Konzentrationen in Milz und Kleinhirn unabhängig von den Bakterienkonzentrationen ($p = 0,97$; $p = 0,052$). Es ergab sich eine signifikante negative Korrelation zwischen der IL-12/IL-23p40-Konzentration im Serum und der Bakterienbelastung im Blut ($p = 0,009$). Dies bedeutete, dass eine Zunahme der IL-12/IL-23p40-Konzentration mit einer Reduktion der Bakterienbelastung einherging (Tabelle 4).

Mit dem Spearman-Rank-Test ergaben sich für die:

Kontroll-Mäuse

	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient r_s ,		
	IL-12/IL-23p40	MIP-1 α	IFN- γ
Milz	0,83 ($p = 0,002$)	0,85 ($p = 0,002$)	0,79 ($p = 0,006$)
Kleinhirn	0,83 ($p = 0,002$)	0,95 ($p < 0,0001$)	Nicht gemessen
Serum	0,91 ($p = 0,005$)	Nicht gemessen	Nicht gemessen

Tabelle 3: Spearman's Rangkorrelationskoeffizient zwischen der Bakterienbelastung und Zytokin- bzw. Chemokin-konzentrationen in Milz, Kleinhirn und Serum 36 Stunden nach Infektion immunsupprimierter Kontroll-Mäuse ($n = 11$ Tiere).

mit CpG-behandelte Mäuse

	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient r_s ,		
	IL-12/IL-23p40	MIP-1 α	IFN- γ
Milz	- 0,018 ($p = 0,97$)	0,073 ($p = 0,84$)	0,79 ($p = 0,0055$)
Kleinhirn	0,61 ($p = 0,052$)	0,68 ($p = 0,025$)	Nicht gemessen
Serum	- 0,79 ($p = 0,009$)	Nicht gemessen	Nicht gemessen

Tabelle 4: Spearman's Rangkorrelationskoeffizient zwischen der Bakterienbelastung und Zytokin- bzw. Chemokin-konzentrationen in Milz, Kleinhirn und Serum 36 Stunden nach Infektion CpG-behandelter immunsupprimierter Mäuse ($n = 11$ Tiere).

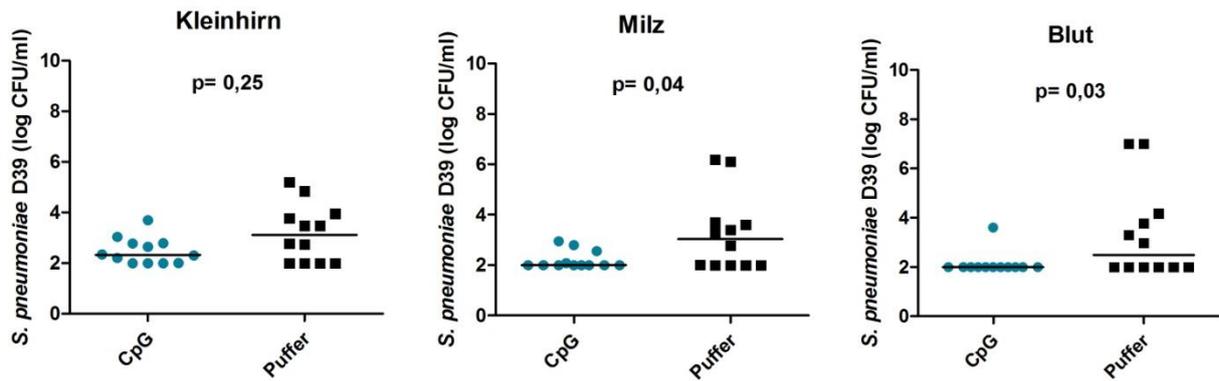
3.6 Ermittlung der Bakteriendichte sowie Quantifizierung der inflammatorischen Prozesse bei immunkompetenten C57BL/6-Mäusen

3.6.1 Bakterienkonzentration 24 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* in Kleinhirn, Milz und Blut

24 immunkompetente C57BL/6-Mäuse wurden zufällig in zwei Gruppen (je n = 12 Tiere) aufgeteilt. Der einen Gruppe wurde 24 Stunden vor der Infektion wie beschrieben CpG intraperitoneal injiziert. 24 Stunden nach Infektion mit 1550 CFU *S. pneumoniae* D39 pro Maus wurden die Mäuse getötet und Blut sowie Milz- und Kleinhirnhomogenate gewonnen und auf ihre Bakterienbelastung untersucht. Zur Veranschaulichung wurden die Konzentrationen in Medianwerten (Interquartilsabstand 25 % - 75 %-Wert) angegeben (Graph 23).

Für die Kleinhirn- und Milzhomogenate lag die Detektionsgrenze bei 100 CFU/ml *S. pneumoniae*. Bei den Kleinhirnproben betrug die Bakteriendichte in der CpG-Gruppe 2,32 (1,99 - 2,78) log₁₀ CFU/ml und in der Kontroll-Gruppe 3,12 (1,99 - 3,91) log₁₀ CFU/ml, wobei in der Kontroll-Gruppe vier Tiere unter der Detektionsgrenze lagen und in der CpG-Gruppe drei Tiere (p = 0,25; Mann-Whitney-U-Test) (Graph 23). Die Bakterienkonzentration einer CpG-Maus lag genau auf der Detektionsgrenze. Bei den Milzhomogenaten wurde in der CpG-Gruppe eine mediane Bakteriendichte von 1,99 (1,99 - 2,44) log₁₀ CFU/ml und in der Kontroll-Gruppe von 3,04 (1,99 - 3,68) log₁₀ CFU/ml ermittelt (p = 0,04; Mann-Whitney-U-Test). Die Bakterienkonzentrationen von acht Tieren aus der CpG-Gruppe und vier Tieren aus der Kontroll-Gruppe lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Bei einer Kontroll-Maus lag die ermittelte Bakterienkonzentration genau auf der Detektionsgrenze.

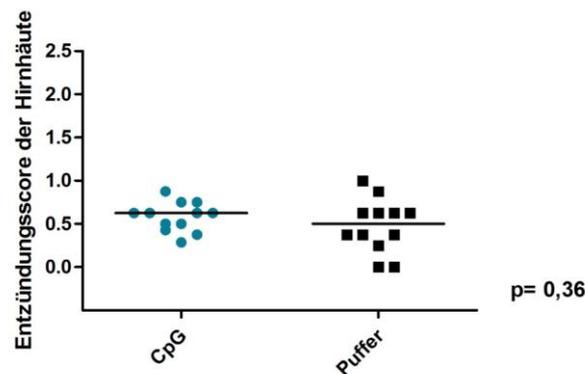
Die mediane Bakterienbelastung in den Blutproben der Kontroll-Gruppe lag bei 2,49 (1,99 - 4,08) log₁₀ CFU/ml. Es lagen sechs Proben über der Detektionsgrenze. Mit 3,60 log₁₀ CFU/ml *S. pneumoniae* lag nur eine einzige Probe der CpG-Gruppe über der Detektionsgrenze von 1 x 10² CFU/ml (p = 0,03, Mann-Whitney-U-Test) (Graph 23).



Graph 23: Bakterienkonzentration im Blut sowie in den Kleinhirn- und Milzhomogenaten 24 Stunden nach Infektion von immunkompetenten C57BL/6-Mäusen, je Gruppe n = 12. Der Median ist durch einen horizontalen Balken angezeigt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

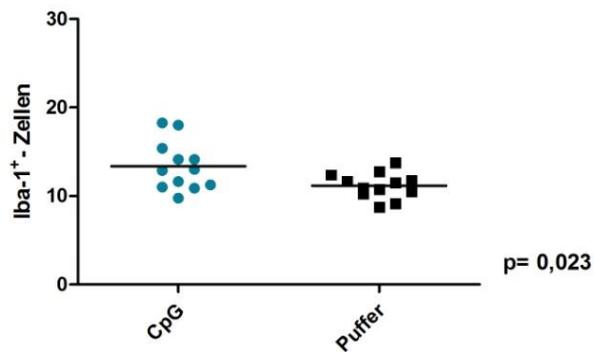
3.6.2 Histologische Untersuchung der Großhirne

Bei der Ermittlung des Entzündungsgrads mittels CAE-Färbung ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Graph 24). Der Entzündungsscore befand sich bei beiden Gruppen zwischen 0 und 1 (CpG 0,63; Puffer 0,5) ($p = 0,35$; Mann-Whitney-U-Test).



Graph 24: Entzündungsscore der Hirnhäute immunkompetenter C57BL/6-Mäuse 24 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae*. Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

Bei der Auszählung der Mikrogliazellen in den sechs kortikalen sowie in beiden Hippocampusbereichen, mittels Mikroskop nach Iba1-Färbung, lag die Zelldichte in der CpG-Gruppe im Mittel mit 13,35 (\pm 2,75) Zellen höher als in der Kontroll-Gruppe mit 11,17 (\pm 1,44) Zellen je Zählbereich ($p = 0,023$; t-Test) (Graph 25).



Graph 25: Anzahl Iba1-positiven Zellen (Mikroglia) je Zählbereich in Großhirnschnitten von immunkompetenten C57BL/6-Mäusen 24 Stunden nach Infektion. Je Gruppe $n = 12$ Tiere. Der Mittelwert ist durch einen horizontalen Balken gekennzeichnet. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des t-Tests durchgeführt.

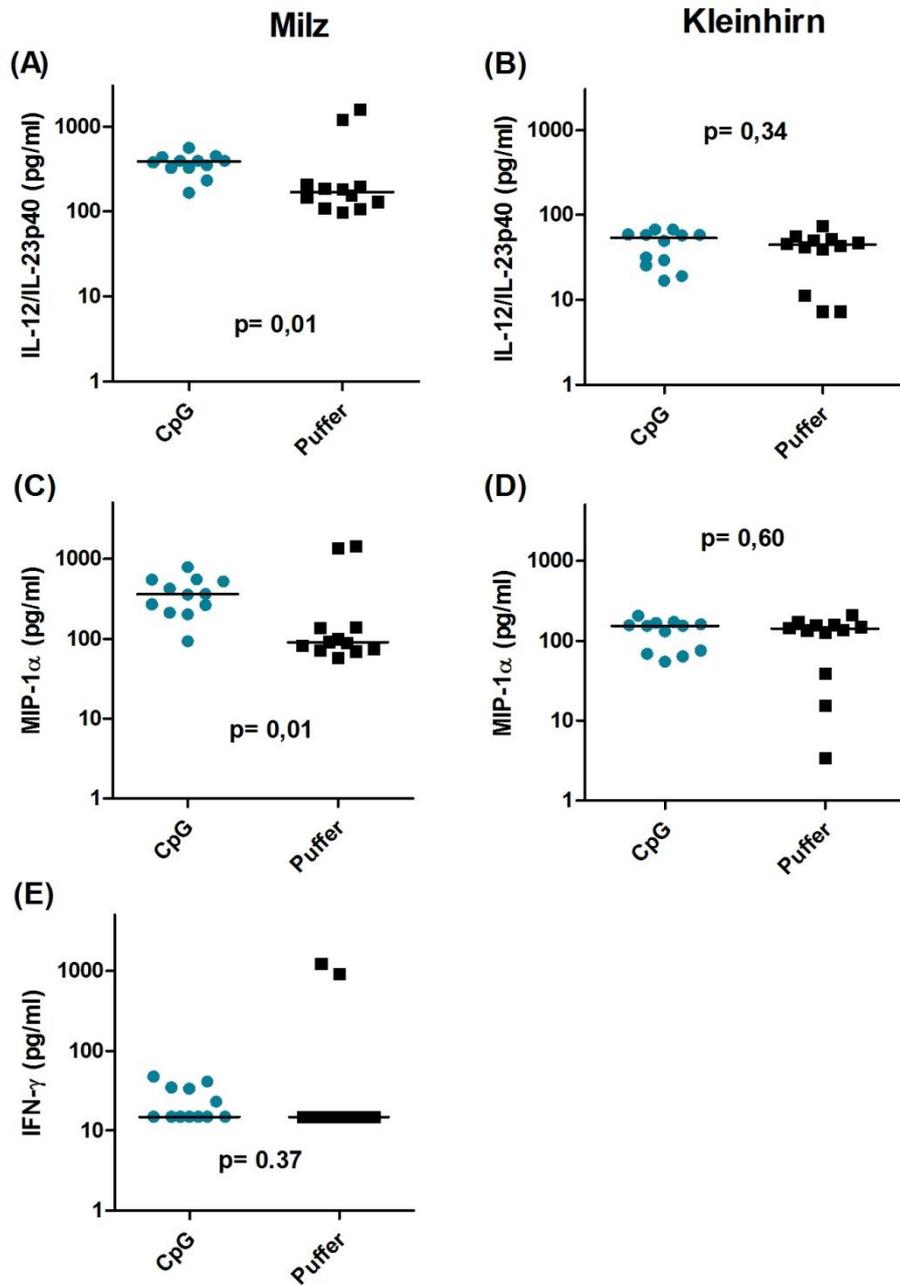
3.6.3 Konzentration an Chemokinen und Zytokinen in Serum, Kleinhirn und Milz 24 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* bei immunkompetenten Mäusen

Die Kleinhirn- und Milzhomogenate wurden auf ihre IL-12/IL-23p40-Konzentrationen untersucht (Graph 26). Im Folgenden sind die Medianwerte sowie die Interquartilsabstände (25 % - 75 %-Wert) angegeben.

In den Milzhomogenaten wurden für die CpG-Gruppe 387,5 (328,9 - 428,1) pg/ml im Vergleich zu 169,7 (114,6 - 205,5) pg/ml in der Kontroll-Gruppe ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt ($p = 0,01$; Mann-Whitney-U-Test) (Graph 26, A). Beim Vergleich der Kleinhirnproben konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden. Mit 53,7 (26,48 - 59,0) pg/ml waren die Werte der CpG-Gruppe annähernd gleich wie die der Kontroll-Gruppe mit 44,7 (18,45 - 51,73) pg/ml ($p = 0,34$; Mann-Whitney-U-Test) (Graph 26, B).

Kleinhirn- und Milzhomogenate wurden zusätzlich auf ihre MIP-1 α -Konzentrationen untersucht. Im Vergleich der Milzhomogenate ergab sich wieder ein statistisch signifikanter Unterschied in den Konzentrationen ($p = 0,01$; Mann-Whitney-U-Test). In der CpG-Gruppe waren die Werte im Median mit 359,3 (225,1 - 542,4) pg/ml deutlich erhöht gegenüber den 90,5 (72,33 - 138,9) pg/ml der Kontroll-Gruppe (Graph 26, C). Bezüglich ihrer MIP-1 α -Konzentrationen ergab sich im Vergleich der Kleinhirnhomogenate nur ein geringfügiger Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Graph 26, D). Mit 152,9 (70,23 - 165,8) pg/ml lag die CpG-Gruppe im Median etwas höher als die Kontroll-Gruppe mit 140,8 (61,15 - 157,6) pg/ml ($p = 0,60$; Mann-Whitney-U-Test).

Aufgrund der signifikanten Konzentrationsunterschiede von IL-12/IL-23p40 und MIP-1 α in den Milzhomogenaten wurden diese zusätzlich auf ihre IFN- γ -Konzentration untersucht (Graph 26, E). Es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied mit $p = 0,37$ ermittelt werden (Mann-Whitney-U-Test). In beiden Gruppen befanden sich fast alle Werte unterhalb der Quantifizierungsgrenze von 15 pg/ml. Die CpG-Gruppe hob sich mit einem Median von < 15 ($< 15 - 34,38$) pg/ml und fünf messbaren Werten kaum von der Kontroll-Gruppe ab. Der Median sowie beide Interquartilsabstände betragen in der Kontroll-Gruppe < 15 pg/ml. Lediglich zwei Werte lagen oberhalb der Quantifizierungsgrenze.



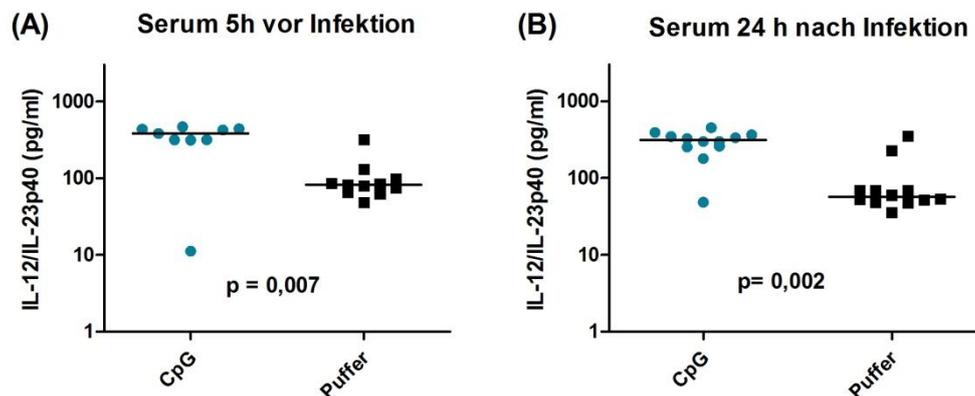
Graph 26: Immunkompetente C57BL/6-Mäuse 24 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* (je Gruppe n = 12 Tiere). IL-12/IL-23p40-Konzentrationen in Milz- (A) und Kleinhirnhomogenaten (B), MIP-1 α -Konzentrationen in Milz- (C) und Kleinhirnhomogenaten (D), IFN- γ -Konzentrationen in Milzhomogenaten (E). Der Median ist durch einen horizontalen Balken hervorgehoben. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

3.6.4 IL-12/IL-23p40- Gehalt im Serum von immunkompetenten Mäusen

5 Stunden vor der Infektion mit *S.pneumoniae* wurde den Mäusen retrobulbär Blut entnommen. Die Serumproben wurden mit denen 24 Stunden nach Infektion verglichen.

Durch die CpG-Gabe stieg bereits vor Infektion der IL-12/IL-23p40-Gehalt signifikant gegenüber der Kontroll-Gruppe an. Mit 381,9 (315,1 - 437,1) pg/ml lag die Konzentration in der CpG-Gruppe deutlich höher als in der Kontroll-Gruppe mit 82,1 (65,8 - 98,4) pg/ml ($p = 0,007$; Mann-Whitney-U-Test) (Graph 27, A). Die Konzentration von IL-12/IL-23p40 in der Kontroll-Gruppe spiegelte den normalen Gehalt im Serum bei immunkompetenten Mäusen wider.

Auch 24 Stunden nach der Infektion lag die Konzentration an IL-12/IL-23p40 in der CpG-Gruppe signifikant höher als in der Kontroll-Gruppe. In der CpG-Gruppe wurde ein Medianwert von 313,1 (255,6 - 360,1) pg/ml und in der Kontroll-Gruppe von 56,65 (49,23 - 69,1) pg/ml ermittelt ($p = 0,002$; Mann-Whitney-U-Test) (Graph 27, B).



Graph 27: IL12/IL23p40-Konzentration 5 Stunden vor der Infektion (A) mit *S. pneumoniae* sowie 24 Stunden nach der Infektion (B). Der Median ist durch einen horizontalen Balken verdeutlicht. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test durchgeführt

3.6.5 Zusammenhang zwischen Bakterienbelastung und Zytokin-/Chemokinkonzentrationen

Auch bei den immunkompetenten Mäusen wurden 24 Stunden nach Infektion die Bakterienkonzentrationen ins Verhältnis zu den ermittelten Zytokin- und Chemokinkonzentrationen mittels Spearman's-Rank-Test gesetzt (Tabelle 3).

In der CpG-Gruppe konnten keine Zusammenhänge zwischen den Bakterienkonzentrationen und den Zytokin- und Chemokinwerten ermittelt werden (Tabelle 6). Im Gegensatz dazu, konnte in der Kontroll-Gruppe ein bakterienbedingter Anstieg an IFN- γ in der Milz ($p = 0,03$), an MIP-1 α im Kleinhirn ($p = 0,02$) sowie ein Anstieg der IL-12/IL-23p40-Konzentration im Serum festgestellt werde ($p = 0,02$) (Tabelle 5).

Mit dem Spearman-Rank-Test ergaben sich für die:

Kontroll-Mäuse

	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient r_s , (p-Wert)					
	IL-12/IL-23p40		MIP-1 α		IFN- γ	
Milz	0,4	($p = 0,20$)	0,44	($p = 0,15$)	0,65	($p = 0,03$)
Kleinhirn	0,55	($p = 0,067$)	0,68	($p = 0,02$)	Nicht gemessen	
Serum	0,69	($p = 0,02$)	Nicht gemessen			

Tabelle 5: Spearman's Rangkorrelationskoeffizient zwischen der Bakterienbelastung und Zytokin- bzw. Chemokin-konzentration in Milz, Kleinhirn und Serum 24 Stunden nach Infektion immunkompetenter Kontroll-Mäuse ($n = 12$ Tiere).

Mit CpG-behandelte Mäuse

	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient r_s , (p-Wert)					
	IL-12/IL-23p40		MIP-1 α		IFN- γ	
Milz	- 0,27	($p = 0,40$)	- 0,38	($p = 0,22$)	0,00	($p = 1,01$)
Kleinhirn	0,00	($p = 1,01$)	0,18	($p = 0,59$)	Nicht gemessen	
Serum	- 0,39	($p = 0,21$)	Nicht gemessen			

Tabelle 6: Spearman's Rangkorrelationskoeffizient zwischen der Bakterienbelastung und Zytokin- bzw. Chemokin-konzentration in Milz, Kleinhirn und Serum 24 Stunden nach Infektion CpG-behandelter immunkompetenter Mäuse ($n = 12$ Tiere).

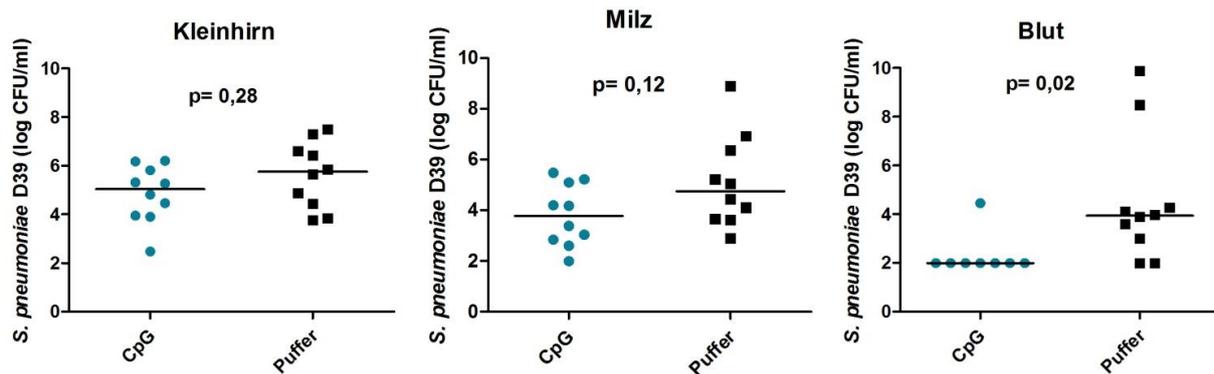
3.7 Abhängigkeit der Bakterienbelastung und der Entzündungsprozesse von der Zeit bei immunkompetenten C57BL/6- Mäusen

3.7.1 Bakterienkonzentration 36 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* in Kleinhirn, Milz und Blut

Da bei dem 36-Stunden-Experiment mit immunsupprimierten Mäusen deutliche Veränderungen in den Bakterienkonzentrationen gegenüber dem 24-Stunden-Experiment erkennbar waren, wurde auch ein 36-Stunden-Experiment mit 20 immunkompetenten Mäusen durchgeführt (Graph 28). Blut, Kleinhirn sowie die Milz wurden gewonnen und auf ihre Bakterienbelastungen sowie ihren Zytokin- und Chemokingehalt untersucht. Nach 24 Stunden konnte lediglich im Blut ein signifikanter Unterschied in der Bakterienbelastung festgestellt werden. Auch nach 36 Stunden konnten in den Milz- und Kleinhirnhomogenaten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Bakterienkonzentrationen festgestellt werden, jedoch waren die Konzentrationen deutlich höher als nach 24 Stunden.

Im Kleinhirn ergab sich im Median eine Bakteriendichte von 5,04 (3,94 - 5,90) \log_{10} CFU/ml in der CpG-Gruppe und 5,75 (4,29 - 6,78) \log_{10} CFU/ml in der Kontroll-Gruppe ($p = 0,28$; Mann-Whitney-U-Test). Ein ebenfalls geringer Unterschied stellte sich im Vergleich der Milzhomogenate dar mit 3,78 (2,78 - 5,13) \log_{10} CFU/ml in der CpG-Gruppe und 4,75 (3,65 - 6,50) \log_{10} CFU/ml in der Kontroll-Gruppe ($p = 0,12$; Mann-Whitney-U-Test).

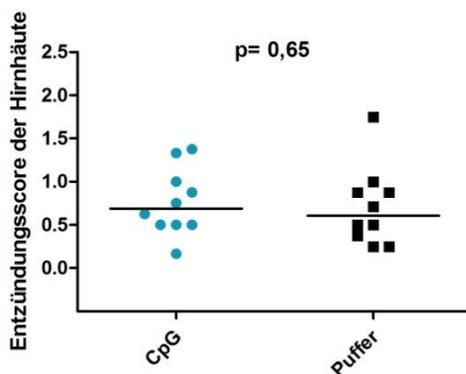
Ein deutlich signifikanter Unterschied ergab sich bei den Blutproben. In der CpG-Gruppe lag lediglich eine Probe mit 4,46 \log_{10} CFU/ml oberhalb der Detektionsgrenze von 1×10^2 CFU/ml. Im Vergleich dazu lag die Bakterienbelastung in der Kontroll-Gruppe im Median bei 3,94 (2,75 - 5,33) \log_{10} CFU/ml ($p = 0,02$; Mann-Whitney-U-Test). Lagen nach 24 Stunden lediglich sechs von zwölf Proben oberhalb der Detektionsgrenze (Graph 23, Seite 49), so konnte nach 36 Stunden in acht von zehn Blutproben bei den Kontroll-Mäusen Bakterienkonzentrationen oberhalb der Detektionsgrenze festgestellt werden (Graph 28).



Graph 28: Bakterienkonzentrationen in den Kleinhirn- und Milzhomogenaten sowie im Blut 36 Stunden nach Infektion von immunkompetenten C57BL/6-Mäusen, je Gruppe n = 10 Tiere. Der Median ist durch einen horizontalen Balken angezeigt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

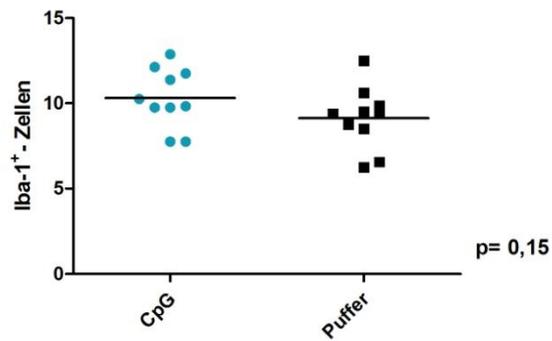
3.7.2 Histologische Untersuchung der Großhirne

Ebenfalls statistisch nicht signifikant war der Vergleich der Entzündungsscores (Graph 29). Es ergab sich ein p-Wert von 0,65 (Mann-Whitney-U-Test) mit einem medianen Entzündungsscore in der CpG-Gruppe von 0,68 (0,5- 1,08) und 0,61 (0,34 – 0,91) in der Kontroll-Gruppe.



Graph 29: Entzündungsscore der Hirnhäute immunkompetenter Mäuse 36 Stunden nach der Infektion (je Gruppe n = 10 Tiere). Der Median ist durch einen horizontalen Balken gekennzeichnet. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

Nach 36 Stunden konnte auch kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Mikrogliazellen festgestellt werden (Graph 30). Mit im Mittel 10,32 ($\pm 1,73$) Zellen in der CpG-Gruppe zu 9,13 ($\pm 1,82$) Zellen in der Kontroll-Gruppe ergab sich $p = 0,15$ (t-Test).



Graph 30: Anzahl der Iba 1-positiven Zellen in Großhirnschnitten immunkompetenter C57BL/6-Mäuse 36 Stunden nach der Infektion (je Gruppe n = 10 Tiere). Der Mittelwert ist durch einen horizontalen Balken gekennzeichnet. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des t-Tests durchgeführt.

3.7.3 Konzentration an Chemokinen und Zytokinen in Serum, Kleinhirn und Milz 36 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae*

Auch nach 36 Stunden wurden bei den Milz- und Kleinhirnhomogenaten sowie den Seren die Zytokine quantifiziert (Graph 31).

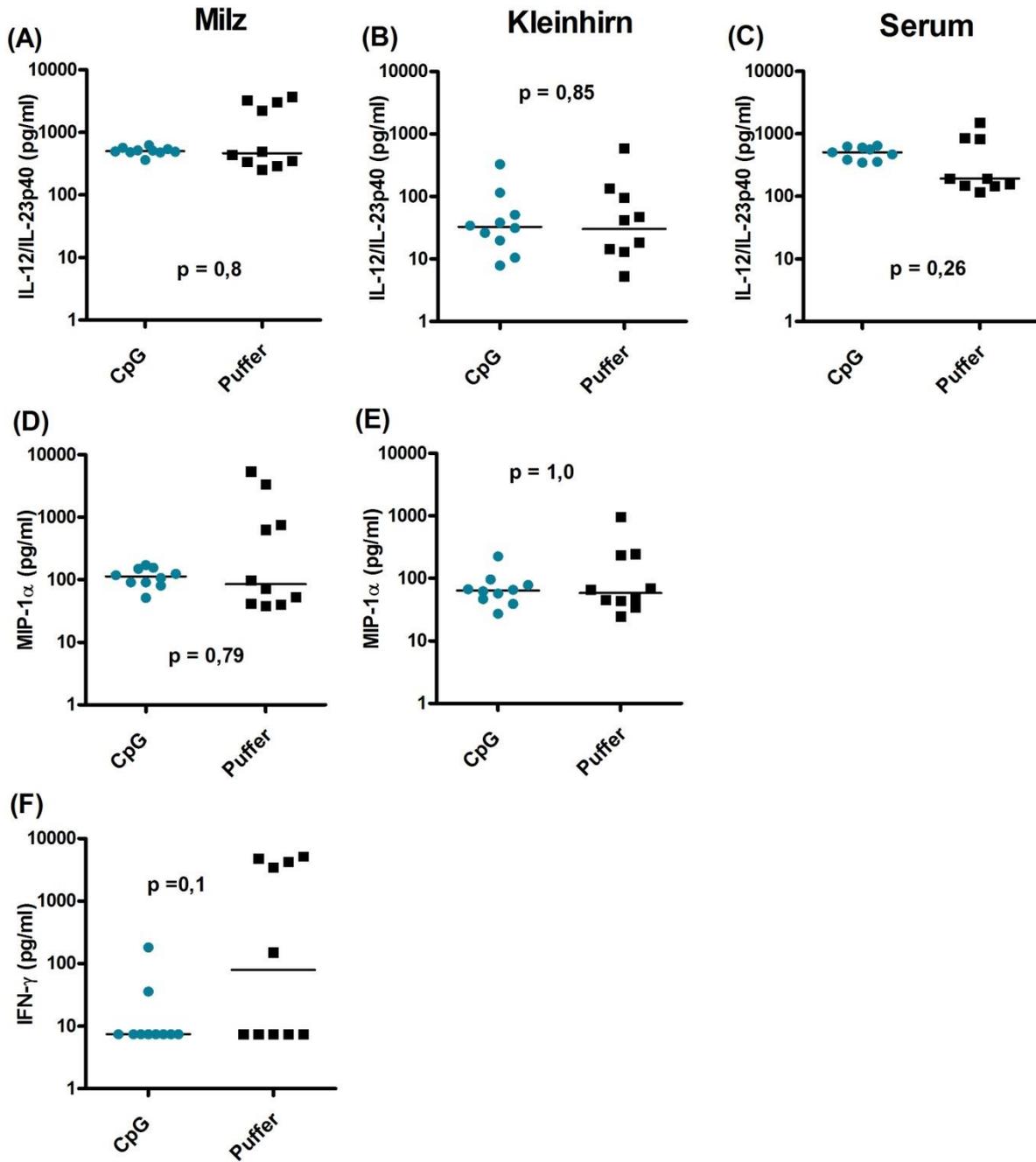
Im Vergleich der IL-12/IL-23p40-Konzentrationen konnten weder in den Kleinhirn- noch in den Milzhomogenaten signifikante Unterschiede ermittelt werden. Ein nur geringer Unterschied in der IL-12/IL-23p40-Konzentration wurde zwischen den Milzhomogenaten (Graph 31, A) festgestellt. Mit 503,3 (484,2 - 548,3) pg/ml lag der Gehalt in der CpG-Gruppe leicht über der Kontroll-Gruppe mit 467,4 (329,7 - 3126) pg/ml ($p = 0,8$; Mann-Whitney-U-Test). In den Kleinhirnhomogenaten (Graph 31, B) ergab sich mit 32,8 (17,4 - 67,25) pg/ml in der CpG-Gruppe und 30,2 (11,15 - 105,3) pg/ml in der Kontroll-Gruppe ein p -Wert von 0,85 (Mann-Whitney-U-Test). Konnte nach 24 Stunden noch ein gravierender Unterschied zwischen den IL-12/IL-23p40-Konzentrationen im Serum festgestellt werden, so war nach 36 Stunden der Unterschied nicht mehr statistisch signifikant ($p = 0,26$; Mann-Whitney-U-Test; Graph 31, C). In der CpG-Gruppe wurde im Median eine Konzentration von 507,8 (371,8 - 615,8) pg/ml erreicht und in der Kontroll-Gruppe 192,8 (147,6 - 840,6) pg/ml.

Ebenfalls keine statistisch signifikante Differenz ergab die Betrachtung der MIP-1 α -Konzentration in den Kleinhirn- und Milzhomogenaten. In den Milzhomogenaten wurden in der CpG-Gruppe 113,0 (88,48 - 151,9) pg/ml und in der Kontroll-Gruppe 85,1 (41,3 - 1412) pg/ml MIP-1 α gemessen ($p = 0,79$; Mann-Whitney-U-Test) (Graph 31, D).

Mit 64,0 (44,68 - 82,43) pg/ml lagen die Werte der CpG-Gruppe im Kleinhirn annähernd bei denen der Kontroll-Gruppe mit 57,98 (41,6 - 238,69 pg/ml) ($p = 1,0$; Mann-Whitney-U-Test) (Graph 31, E).

Bei der Untersuchung der Milzhomogenate auf ihren IFN- γ -Gehalt konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Im Median ergab sich für die CpG-Gruppe eine Konzentration von $< 7,5$ ($< 7,5 - 14,5$) pg/ml und für die Kontroll-Gruppe 79,15 ($< 7,5 - 4383$) pg/ml IFN- γ ($p = 0,1$; Mann-Whitney-U-Test) (Graph 31, F).

Zu beachten war, dass in der CpG-Gruppe lediglich zwei Werte über der Detektionsgrenze von 7,5 pg/ml lagen und in der Kontroll-Gruppe fünf Werte.



Graph 31: Immunkompetente C57BL/6-Mäuse 36 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* (je Gruppe n = 10 Tiere). IL-12/IL-23p40-Konzentrationen in Milz- (A) und Kleinhirnhomogenaten (B) sowie im Serum (C). MIP-1 α -Konzentrationen in Milz- (D) und Kleinhirnhomogenaten (E), IFN- γ -Konzentrationen in Milzhomogenaten (F). Der Median ist durch einen horizontalen Balken hervorgehoben. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

3.7.4 Zusammenhang zwischen Bakterienbelastung und Zytokin-/Chemokinkonzentrationen

36 Stunden nach der Infektion konnte mittels Spearman's-Rank-Test ein Zusammenhang in beiden Gruppen zwischen der Erhöhung der IL-12/IL-23p40- sowie MIP-1 α -Werte im Kleinhirn und der Bakterienbelastung festgestellt werden ($p < 0,02$). Ebenso ergab sich eine positive Korrelation in beiden Gruppen zwischen der Bakterienbelastung und der IFN- γ -Konzentration in der Milz ($p = 0,03$) (Tabelle 7 + 8).

Mit dem Spearman-Rank-Test ergaben sich:

Für Kontroll-Mäuse

	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient r_s , (p-Wert)		
	IL-12/IL-23p40	MIP-1 α	IFN- γ
Milz	0,59 (p = 0,081)	0,54 (p = 0,11)	0,7 (p = 0,03)
Kleinhirn	0,82 (p = 0,006)	0,84 (p = 0,004)	Nicht gemessen
Serum	0,43 (p = 0,25)	Nicht gemessen	

Tabelle 7: Spearman's Rangkorrelationskoeffizient zwischen der Bakterienbelastung und Zytokin- bzw. Chemokin-konzentrationen in Milz, Kleinhirn und Serum 36 Stunden nach Infektion immunkompetenter Kontroll-Mäuse (n = 10 Tiere).

Für mit CpG-behandelte Mäuse

	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient r_s , (p-Wert)		
	IL-12/IL-23p40	MIP-1 α	IFN- γ
Milz	0,58 (p = 0,088)	0,25 (p = 0,49)	0,7 (p = 0,03)
Kleinhirn	0,71 (p = 0,027)	0,72 (p = 0,02)	Nicht gemessen
Serum	- 0,64 (p = 0,067)	Nicht gemessen	

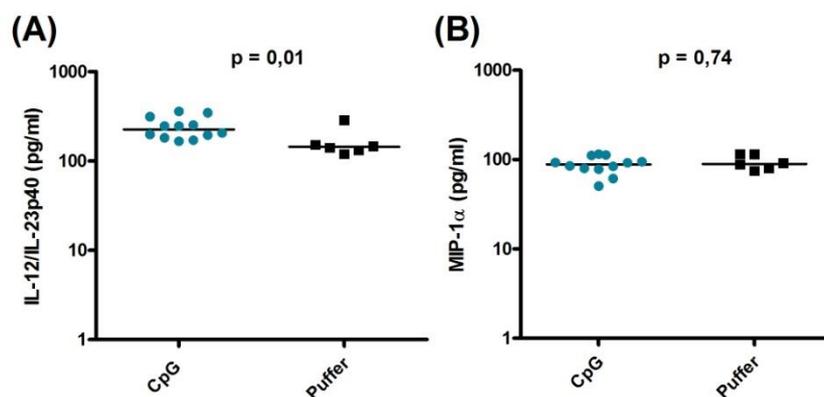
Tabelle 8: Spearman's Rangkorrelationskoeffizient zwischen der Bakterienbelastung und Zytokin- bzw. Chemokin-konzentrationen in Milz, Kleinhirn und Serum 36 Stunden nach Infektion CpG-behandelter immunkompetenter Mäuse (n = 10 Tiere).

3.8 Langzeitwirkung von CpG auf IL-12/IL-23p40 und MIP-1 α

Es stellte sich die Frage, ob CpG auch langfristig eine Wirkung auf die IL-12/IL-23p40- und MIP-1 α -Konzentration hat. Aus diesem Grund wurden auch die Milz- und Serumproben der überlebenden Mäuse der Überlebensexperimente hinsichtlich ihrer Zytokine untersucht. Im Überlebensexperiment mit immunkompetenten C57BL/6-Mäusen überlebten zwölf Tiere aus der CpG-Gruppe und sechs Tiere aus der Kontroll-Gruppe. In allen Tieren lag die Bakterienkonzentration unterhalb der Detektionsgrenze von 20 CFU/ml. Im Folgendem, werden jeweils der Median angegeben sowie die dazugehörigen Interquartilsabstände (25 % - 75 %-Wert) (Graph 32).

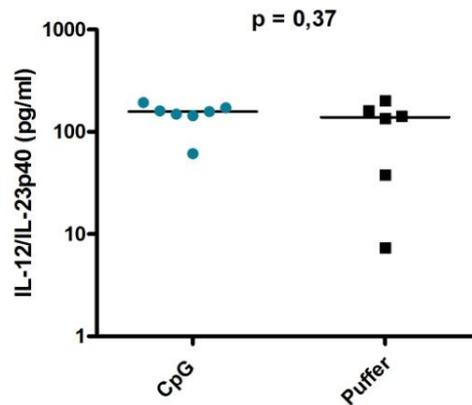
Bei der Quantifizierung der IL-12/IL-23p40-Konzentration konnte in den Milzhomogenaten ein signifikanter Unterschied ($p = 0,01$; Mann-Whitney-U-Test) zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Graph 32, A). 14 Tage nach der Infektion mit *S. pneumoniae* waren die IL-12/IL-23p40-Werte in der CpG-Gruppe noch immer deutlich erhöht mit 226,8 (185,4 - 299,5) pg/ml im Vergleich zu 144,6 (128,8 - 187,0) pg/ml in der Kontroll-Gruppe.

Zwischen den MIP-1 α -Konzentrationen wurde kein Unterschied ($p = 0,74$; Mann-Whitney-U-Test) gemessen. In der CpG-Gruppe ergaben sich 88,7 (78,5 - 107,3) pg/ml und in der Kontroll-Gruppe 89,85 (78,52 - 114,9) pg/ml (Graph 32, B).



Graph 32: (A) IL-12/IL-23p40- und (B) MIP-1 α -Konzentrationen in Milzhomogenaten von überlebenden immunkompetenten Mäusen 14 Tage nach Infektion mit *S. pneumoniae* (CpG-Gruppe: $n = 12$ Mäusen, Kontroll-Gruppe: $n=6$ Mäuse). Der Median ist durch einen horizontalen Balken dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

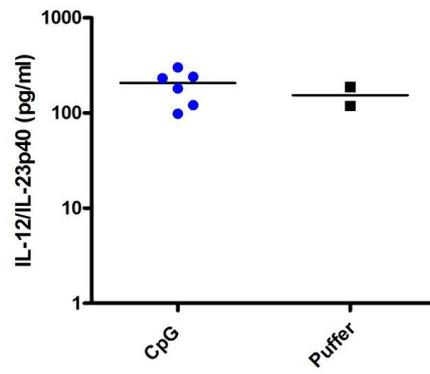
Im Serum konnte ebenfalls bezüglich der IL-12/IL-23p40-Konzentration kein Unterschied ermittelt werden (Graph 33). Es ergab sich ein p-Wert von 0,37 (Mann-Whitney-U-Test) mit 157,6 (143,7 - 171,6) pg/ml in der CpG-Gruppe im Vergleich zu 139,0 (30,28 - 171,6) pg/ml in der Kontroll-Gruppe.



Graph 33: IL-12/IL-23p40-Konzentrationen (pg/ml) im Serum von immunkompetenten Mäusen 14 Tage nach der Infektion mit *S. pneumoniae* (CpG-Gruppe: n = 12 Mäusen; Kontroll-Gruppe: n = 6 Mäuse). Der Median ist durch einen horizontalen Balken dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

Im Langzeitexperiment mit immunsupprimierten C57BL/6-Mäusen gab es acht CpG-Mäuse und nur zwei Kontroll-Mäuse, die bis zur Beendigung des Experiments, nach 14 Tagen, überlebten. In nur einer Kontroll-Maus konnte mit 4×10^2 CFU /ml geringe Mengen *S. pneumoniae* im Kleinhirn nachgewiesen werden. Alle anderen Proben lagen unterhalb der Detektionsgrenze von 20 CFU/ml.

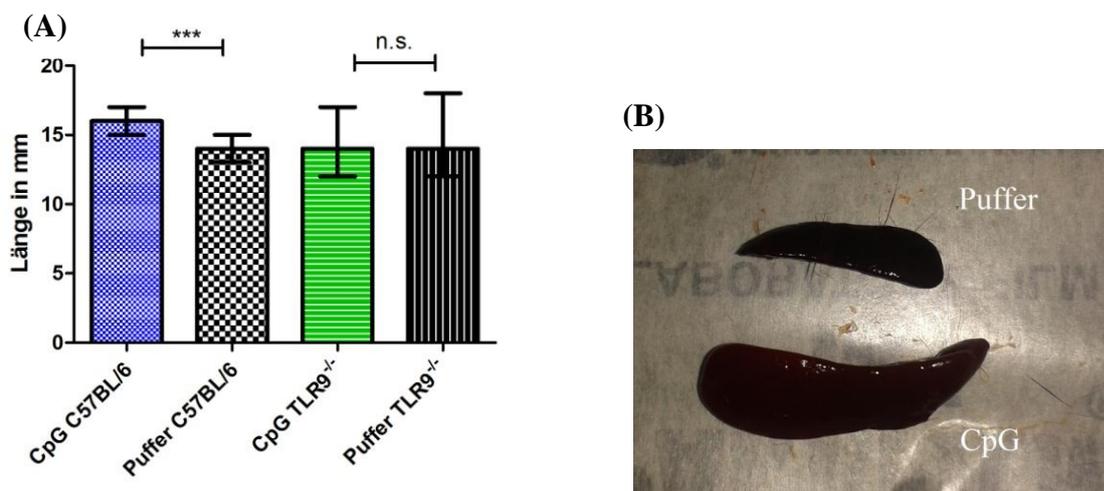
In der CpG-Gruppe ergab sich für die Milzhomogenate eine mediane IL-12/IL-23p40-Konzentration von 206,7 (115,1 - 255,8) pg/ml im Vergleich zur Kontroll-Gruppe mit 153,8 (119,4 - 188,2) pg/ml. Aufgrund der nicht ausreichenden Datenmenge kann keine statistische Auswertung durchgeführt werden. Bei der Betrachtung des Graphen 34 fällt eine leichte Erhöhung des Medians der IL-12/IL-23p40-Konzentration in der CpG-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe auf.



Graph 34: IL-12/IL-23p40-Konzentrationen (pg/ml) in Milzhomogenaten immunsupprimierter Mäuse 14 Tage nach Infektion. CpG-Gruppe n = 6 Mäuse, Kontroll-Gruppe n=2 Mäuse. Der Median ist durch einen horizontalen Balken gekennzeichnet. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

3.9 Auswirkung der CpG-Applikation auf die Milz

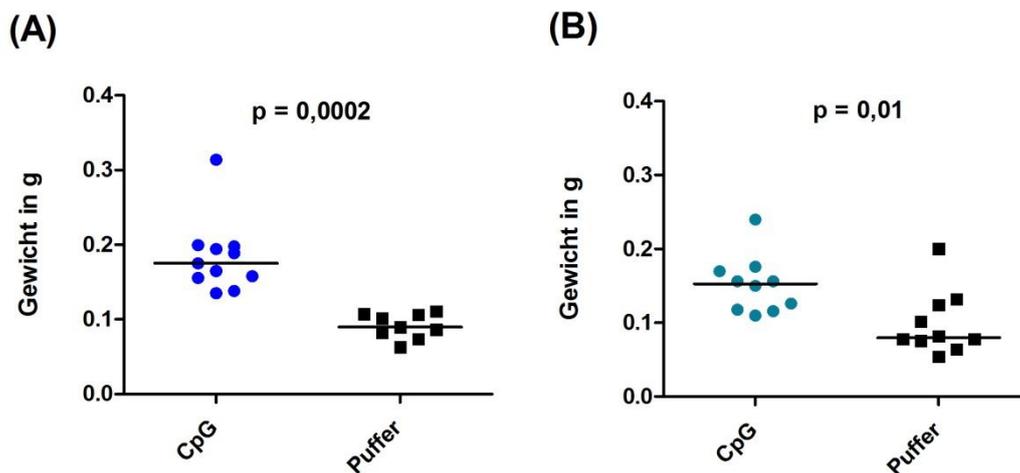
Die Längen der Milzen von 82 mit CpG stimulierten C57BL/6-Mäusen, 80 Kontroll-C57BL/6-Mäusen, 7 mit CpG stimulierten TLR9^{-/-}-Mäusen und 6 Kontroll-TLR9^{-/-}-Mäusen wurden mittels eines Lineals gemessen. Man erkennt einen deutlichen Unterschied zwischen den mit CpG stimulierten und den unstimulierten C57BL/6-Mäusen (Abbildung 11). Die Milzlänge der mit CpG behandelten Mäuse betrug im Median 16 (15-17) mm. Im Vergleich dazu wurde in der Kontroll-Gruppe eine mediane Milzlänge von 14 (13-15) mm ermittelt ($p < 0,0001$; Mann-Whitney-U-Test) (Graph 35). Im Vergleich der mit CpG stimulierten und der unstimulierten TLR9^{-/-}-Mäuse gab es keinen signifikanten Unterschied. Mit 14 (13 - 15) mm durchschnittlicher Länge in der CpG-Gruppe zu 13 (12 - 15) mm in der Kontroll-Gruppe ergab sich $p = 0,57$ (Mann-Whitney-U-Test).



Graph 35: (A) Vergleich der Milzlänge von C57BL/6-Mäusen mit CpG-Behandlung (n = 66 Tiere) und der Kontroll-Gruppe (n = 73 Tiere) sowie TLR9^{-/-}-Mäusen mit (n = 7 Tiere) und ohne CpG-Behandlung (n = 6 Tiere). *** $p < 0,0001$; n.s. = nicht signifikant. Der Interquartilsabstand ist durch einen Balken dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

Abbildung 11: (B) Die obere Milz stammt von einer C57BL/6-Maus aus einer Kontroll-Gruppe (14 x 4 mm), die untere Milz von einer C57BL/6-Maus aus einer mit CPG stimulierten Gruppe (19 x 6 mm). Beide Mäuse entstammen der gleichen Versuchsreihe und wurden 36 Stunden nach Infektion getötet.

Zusätzlich wurde von 21 mit CpG stimulierten C57BL/6-Mäusen sowie 19 Kontroll-C57BL/6-Mäusen die Milz vor dem Homogenisieren gewogen (Graph 36). Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte zwischen der CpG- und der Kontroll-Gruppe sowohl bei den immunsupprimierten wie auch den immunkompetenten Mäusen festgestellt werden. Bei den immunsupprimierten Mäusen wurde mit einem medianen Gewicht in der CpG-Gruppe von 0,18 (0,16 - 0,2) g und in der Kontroll-Gruppe von 0,09 (0,08 - 0,11) g ein p-Wert von 0,0002 (Mann-Whitney-U-Test) ermittelt (Graph 36, A). Im Vergleich der immunkompetenten Mäuse ergab sich für die CpG-stimulierten Mäuse im Median ein Gewicht von 0,15 (0,12 - 0,17) g zu 0,08 (0,07 - 0,13) g in der Kontroll-Gruppe ($p = 0,01$; Mann-Whitney-U-Test) (Graph 36, B). Die Stimulierung mit CpG führt somit zu einer annähernden Verdoppelung des Milzgewichts.



Graph 36: (A) Milzgewicht von immunsupprimierten CpG-Mäusen ($n = 11$ Tiere) im Vergleich zu immunsupprimierten Kontroll-Mäusen ($n = 9$ Tiere). (B) Milzgewicht von immunkompetenten CpG-Mäusen ($n = 10$ Tiere) im Vergleich zu immunkompetenten Kontroll-Mäusen ($n = 10$ Tiere). Der Median ist durch einen horizontalen Balken markiert. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

4. Diskussion

4.1 Die Prophylaxe mit 100 µg CpG hat einen protektiven Effekt bei immunsupprimierten und bei immunkompetenten Mäusen, jedoch nicht bei TLR9^{-/-}-Mäusen

Trotz medizinischen Fortschritts ist *Streptococcus pneumoniae* der häufigste Erreger bei einer bakteriellen Meningitis mit oft schweren Folgeschäden oder tödlichem Ausgang (Kastenbauer und Pfister 2003, van de Beek et al. 2002, Buchholz et al. 2016). Insbesondere sind Patienten mit einem geschwächten Immunsystem betroffen.

Die Mikroglia spielt in der zerebralen Immunabwehr eine entscheidende Rolle. Sie ist in der Lage, Pathogene zu phagozytieren und anschließend die Antigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, um die adaptive Immunantwort zu aktivieren. In vorhergehenden *in vitro* - Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Gabe von CpG die Mikroglia stimuliert werden kann vermehrt Pneumokokken zu phagozytieren (Ribes et al. 2010). Es galt nun, herauszufinden, ob dies auch *in vivo* der Fall ist.

Da insbesondere Patienten mit einem geschwächten Immunsystem betroffen sind, wurden bei einem Teil der Mäuse die neutrophilen Granulozyten depletiert. Die neutrophilen Granulozyten spielen offensichtlich eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung einer intrazerebralen *S. pneumoniae*-Infektion. Trotz einer höheren Dosis ($2,5-7 \times 10^2$ CFU/Maus) an *S. pneumoniae* überlebten bei den immunkompetenten Kontroll-Mäusen mit 33,3 % deutlich mehr Mäuse als bei den immunsupprimierten Kontroll-Mäusen (11,1 %), obwohl diese nur $0,5 - 1 \times 10^2$ CFU/Maus injiziert bekamen. Folglich sind die Mikrogliazellen nur ein Teil der zerebralen Immunantwort und benötigen für ihre ungestörte Funktion die Kommunikation mit zirkulierenden Granulozyten. Jedoch führte die Stimulierung der Mikroglia durch 100 µg CpG zu einer deutlichen Verlängerung der Überlebenszeit (Median 92,5 Stunden) bei immunsupprimierten Mäusen. 33,3 % der mit CpG behandelten Mäuse überlebten. Dagegen blieben lediglich 11,1% der immunsupprimierten Kontroll-Mäuse am Leben und hatten eine mediane Überlebenszeit von 64,5 Stunden ($p = 0,004$; Log-Rank-Test). Die immunsupprimierten Kontroll-Mäuse zeigten zudem deutlich eher Symptome nach der Infektion ($p = 0,051$; Log-Rank-Test).

Eine höhere Dosis an CpG hingegen führte zu einer deutlich höheren Sterberate. Bereits nach 88 Stunden erreichten infizierte Mäuse, welche zuvor mit 200 µg CpG behandelt wurden, eine Sterberate von 100 % (mediane Überlebenszeit 83 Stunden). Durch die doppelte Dosis an CpG traten zudem die ersten Krankheitssymptome bereits nach 41 Stunden auf. Im Gegensatz dazu konnten in der Gruppe, welche 100µg CpG injiziert bekamen, im Median erst nach 188,5 Stunden Symptome festgestellt werden. Zum Zeitpunkt 41 Stunden nach der Infektion konnte kein signifikanter Unterschied im Gesundheitszustand zwischen den beiden CpG-Gruppen ermittelt werden. Sieben Stunden später mussten jedoch bereits zwei Mäuse aus der Gruppe denen 200 µg CpG injiziert wurde aufgrund ihres klinischen Scores von 3 aus dem Versuch genommen werden. Die Belastung mit einer doppelt so hohen CpG-Gabe, zusätzlich zur Pneumokokkeninfektion, scheint für den immunsupprimierten Maus-Organismus zu hoch zu sein. Möglicherweise wurde durch eine zu starke Aktivierung der Mikroglia die protektive Eigenschaft in eine neurotoxische umgekehrt (Colton und Gilbert 1987, Hanisch und Kettenmann 2007).

Bei den immunkompetenten Mäusen konnte die Überlebenszeit durch die Gabe von CpG ebenfalls deutlich gesteigert werden. 14 Tage nach der Infektion mit *S. pneumoniae* waren noch 63,2% der mit CpG behandelten Mäuse am Leben. Ohne CpG überlebten lediglich 33,3 % der Mäuse ($p = 0,048$; Log-Rank-Test). Durch die Gabe von CpG traten bei den Mäusen deutlich später Symptome auf ($p = 0,039$; Log-Rank-Test). 48 Stunden nach der Infektion waren die Kontroll-Mäuse bereits deutlich stärker erkrankt als die mit CpG behandelten Tiere ($p = 0,0065$; Mann-Whitney-U-Test).

Bei den immunsupprimierten wie auch den immunkompetenten CpG-Mäusen konnte 24 Stunden nach Injektion mit CpG ein kurzzeitiger Gewichtsabfall festgestellt werden. Die mit CpG behandelten immunkompetenten Mäuse nahmen im Median 2,91 % ihres Ausgangsgewichtes ab, wohingegen die Kontroll-Mäuse ihr Gewicht um 2,1 % steigerten ($p < 0,0001$, Mann-Whitney-U-Test). Bei den immunsupprimierten Mäusen, welche mit 100 µg CpG behandelt wurden, konnte ein Gewichtsabfall von 5,56 % festgestellt werden. Die Kontroll-Mäuse hingegen nahmen 1,8 % ihres Ausgangsgewichtes zu ($p < 0,0001$; Mann-Whitney-U-Test). Es konnte kein wesentlich höherer Gewichtsverlust bei den mit 200 µg CpG behandelten Mäusen (6,58 %) gegenüber den Mäusen mit 100 µg CpG festgestellt werden ($p = 0,24$; Mann-Whitney-U-Test). Dies bestätigte unserer Vermutung, dass die Kombination aus deutlich höherer CpG-Dosis zusätzlich zur Infektion ursächlich für die hohe Letalität war und nicht die CpG-Dosis alleine. Eine Erklärung für den Gewichtsverlust kann die erhöhte Produktion an

IL-1 und TNF- α durch CpG-Stimulation sein. Diese führen zu typischem Krankheitsverhalten wie Appetitlosigkeit und somit Gewichtsverlust (Bluthé et al. 1994, Bluthé et al. 2000, McCusker und Kelley 2013). Kozak et al. stellten 2005 fest, dass kurz nach der Injektion mit CpG erhöhte Körpertemperaturen gemessen werden konnten. Bis auf den Gewichtsverlust konnten keine weiteren Symptome, welche sich in dem klinischen Score widerspiegeln, festgestellt werden.

Die Stimulierung der Mikroglia durch CpG erfolgt über den Toll-like Rezeptor 9 (Hemni et al. 2000). Dies konnte im Experiment bestätigt werden. Die Injektion mit 100 μ g CpG hatte keinerlei Einfluss auf die Überlebenszeit und den Krankheitsverlauf bei TLR9-defizienten Mäusen. In der Kontroll-Gruppe wie auch in der mit CpG behandelten Gruppe lag die Sterberate bei 100 % ($p = 0,53$; Log-Rank-Test). Es konnte kein Unterschied im Krankheitsverlauf festgestellt werden. Ebenfalls konnte kein Gewichtsabfall als Folge der CpG-Injektion beobachtet werden, was darauf schließen ließ, dass auch dieser TLR9-abhängig ist.

4.2 CpG beeinflusst das Wachstum und die Ausbreitung von *S. pneumoniae*

Allen Mäusen wurde intrakraniell *S. pneumoniae* injiziert, so dass das lokale Immunsystem im Gehirn weitestgehend alleine die Infektion bekämpfen musste, zumal es mehrere Stunden dauert, bis zirkulierende Leukozyten zur Unterstützung in das ZNS gelangen (Ernst et al. 1983). Entscheidend für die Eindämmung der Infektion sind neben den Mikrogliazellen die im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten. Bereits kurz nach einer Infektion steigt das Level an CD11b⁺ Ly-6G⁺ -Ly-6C^{int} - Granulozyten im Hirn stark an (Mildner et al. 2008). Aus diesem Grund waren die Bakterientiter in den immunsupprimierten Mäusen im Blut und in der Milz deutlich höher als bei den immunkompetenten Mäusen, obwohl sie eine deutlich geringere Dosis an *S. pneumoniae* injiziert bekamen. Durch die Gabe von CpG wird in den immunsupprimierten Mäusen das Eindringen der Bakterien in den Blutkreislauf behindert. Bereits 36 Stunden nach der Infektion waren signifikant mehr Bakterien in den Blutproben der Kontroll-Mäuse zu finden als in den mit CpG behandelten Mäusen ($p = 0,0006$; Mann-Whitney-U-Test). Gleichzeitig war ein deutlicher Unterschied in den Bakterientitern der Kleinhirnproben zu erkennen. In den Proben der CpG-behandelten Mäuse waren signifikant weniger Bakterien nachweisbar als in den Kontroll-Mäusen ($p = 0,006$; Mann-Whitney-U-Test). Ebenso war die Anzahl der Bakterien in der Milz deutlich geringer in der CpG-Gruppe ($p = 0,02$; Mann-

Whitney-U-Test). Nach 14 Tagen konnten bei den überlebenden Mäusen, welche mit CpG behandelt wurden, keine Bakterientiter mehr gemessen werden. Lediglich in einer nicht mit CpG-behandelten Kontroll-Maus konnten geringe Mengen an *Streptococcus pneumoniae* im Kleinhirn nachgewiesen werden.

In vitro wurde bereits gezeigt, dass mit CpG stimulierte Mikroglia vermehrt *S. pneumoniae* phagozytiert. Wir konnten nun beweisen, dass auch *in vivo* eine signifikante Reduktion der Bakterienvermehrung, ausgehend von der Mikroglia und den zirkulierenden Granulozyten, stattfand.

CpG ist nicht nur in der Lage, die Mikroglia zu stimulieren, sondern auch die neutrophilen Granulozyten zu vermehrter Phagozytose sowie Bildung reaktiven Sauerstoffs anzuregen (Weighardt et al. 2000). Des Weiteren stimuliert CpG periphere Lymphozyten, Makrophagen sowie NK-Zellen, Chemo- und Zytokine auszuschütten (Krieg et al. 1995, Klinman et al. 1996). Bei den immunkompetenten Mäusen, welche mit CpG behandelt wurden, lagen 24 Stunden und 36 Stunden nach der Infektion nur in wenigen Blutproben die Bakterientiter oberhalb der Detektionsgrenzen. Im Vergleich zu der CpG-Gruppe lagen die Bakterientiter in der immunkompetenten Kontroll-Gruppe signifikant höher ($p < 0,03$; Mann-Whitney-U-Test). Lediglich 24 Stunden nach der Infektion konnten in den Milzen der Kontroll-Mäuse signifikant höhere Konzentrationen gemessen werden ($p = 0,04$; Mann-Whitney-U-Test). Jedoch lagen auch hier acht Mäuse aus der CpG-Gruppe und vier Mäuse aus der Kontroll-Gruppe unterhalb der Detektionsgrenze. In den Gehirnproben konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Es ist möglich, dass zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion stärkere Unterschiede in den Bakterientitern der Organe auftreten. Es ist zu vermuten, dass ein vollständig erhaltenes Immunsystem, welches zusätzlich durch CpG stimuliert wurde, deutlich effektiver eine Infektion mit *S. pneumoniae* überwinden kann als ein unstimuliertes Immunsystem.

4.3 Der protektive Effekt CpGs ist IL-12/IL-23p40- und MIP-1 α -abhängig

Dringen Bakterien in den Organismus ein, so wird die Immunabwehr aktiviert. Die DNS der Bakterien enthalten unmethyliertes CpG. Dieses sowie auch synthetisch hergestelltes CpG aktivieren das angeborene Immunsystem mittels des TLR9-Rezeptors. Neben erhöhter Phagozytoserate werden auch vermehrt TH1-assoziierte Zytokine wie IL-12, IFN- γ und

MIP-1 α ausgeschüttet (Klinman et al. 1996). MIP-1 α , welches wiederum weitere Granulozyten und Makrophagen rekrutiert, wird vermehrt bei einer bakteriellen Meningitis von Granulozyten und Makrophagen produziert (Diab et al. 1999).

Bedingt durch die CpG-Gabe stieg bei den immunsupprimierten Mäusen der IL-12/IL-23p40-Gehalt im Serum deutlich gegenüber den Kontroll-Gruppen an ($p = 0,0001$; Mann-Whitney-U-Test). 24 Stunden nach der Infektion waren die IL-12/IL-23p40-Konzentrationen im Serum - unabhängig von der Bakterienbelastung - noch immer signifikant höher ($p = 0,0006$). Bei der Betrachtung der Milzhomogenate fiel bei den CpG-Mäusen ebenfalls eine stark erhöhte IL-12/IL-23p40-Konzentration vor und kurz nach der Infektion auf (Weighardt et al. 2000). Genauso bewirkte das CpG eine Erhöhung der MIP-1 α -Konzentrationen in den Milzen. Kurz nach der Infektion war auch hier die Konzentration stark erhöht gegenüber der Kontroll-Gruppe. Es ergab sich ein ursächlicher Zusammenhang zwischen den hohen IL-12/IL-23p40-Konzentrationen und den niedrigen Bakterientiter in den Milzhomogenaten ($r_s < -0,67$; $p = 0,03$; Spearman-Rank-Test). Im Kleinhirn waren lediglich die IL-12/IL-23p40-Konzentrationen kurz nach der Infektion in der CpG-Gruppe erhöht.

36 Stunden nach der Infektion verändert sich das Verhältnis der Zytokinkonzentrationen. Waren nach 24 Stunden die Konzentrationen in den CpG-Gruppen signifikant höher bzw. annähernd gleich, so stiegen nun die Zytokinkonzentrationen in den Kontroll-Gruppen signifikant an. Nun waren die MIP-1 α -Konzentrationen in den Milz- und Kleinhirnhomogenaten der Kontroll-Gruppen signifikant höher als in den dazugehörigen CpG-Gruppen. Ebenso war der IL-12/IL-23p40- sowie der IFN- γ -Gehalt der Kontroll-Gruppe in der Milz deutlich höher. Die signifikant höheren Zytokinkonzentrationen waren auf die ebenfalls höheren Bakterientiter in der Kontroll-Gruppe zurückzuführen und waren ein Zeichen von bakterieller Sepsis (Skrupky et al. 2011). Im Serum unterschieden sich die beiden Gruppen hinsichtlich ihres IL-12/IL-23p40-Gehaltes kaum. Jedoch sind die hohen Werte in der CpG-Gruppe Ursache für die deutlich niedrigeren Bakterienkonzentrationen ($r_s = -0,79$; $p = 0,009$; Spearman-Rank-Test). In der Kontroll-Gruppe hingegen sind die IL-12/IL-23p40-Werte aufgrund der starken Bakterienbelastung erhöht ($r_s = 0,91$; $p = 0,005$). Wird CpG systemisch verabreicht, so hat es nicht nur eine stimulierende Wirkung, sondern auch einen herabregulierenden Einfluss auf die T-Lymphozyten in der Milz (Mellor et al. 2005, Wingender et al. 2006).

Auch bei den immunkompetenten Mäusen konnte ein starker Anstieg der IL-12/IL-23p40-Konzentration im Serum kurz nach CpG-Gabe beobachtet werden. Diese blieb auch 24 Stunden nach der Infektion in der CpG-Gruppe deutlich erhöht gegenüber der Kontroll-Gruppe. Die hohe IL-12/IL-23p40-Konzentration war unabhängig von der Bakterienbelastung im Blut, im Gegensatz zur Kontroll-Gruppe, welche deutlich höhere Bakterientiter aufwies als die CpG-Gruppe. 36 Stunden nach der Infektion war der Unterschied in den IL-12/IL-23p40-Konzentrationen zwischen der mit CpG behandelten Gruppe und der Kontroll-Gruppe nicht mehr signifikant. Jedoch lagen die Werte der CpG-Gruppe im Median über denen der Kontroll-Gruppe und waren ursächlich für die signifikant geringere Bakterienbelastung.

In den Milzproben konnte 24 Stunden nach der Infektion ebenso CpG-bedingt ein Anstieg der MIP-1 α - und IL12/IL-23p40-Konzentrationen gegenüber der Kontroll-Gruppe festgestellt werden. Infektionsbedingt glichen sich 36 Stunden nach der Infektion die Konzentrationen an MIP-1 α und IL-12/IL-23p40 in beiden Gruppen an. Im Kleinhirn konnten 24 Stunden nach der Infektion keine Unterschiede in den Zytokinkonzentrationen ermittelt werden. Auch nach 36 Stunden gab es keine Unterschiede. Möglicherweise könnten zu einem späteren Zeitpunkt Unterschiede auftreten, da im Überlebensexperiment zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Infektion signifikante Unterschiede im klinischem Score auftraten.

Bei einem gesunden Immunsystem sind die Einflüsse des CpG auf das Gehirn am Anfang der Infektion kaum merklich, wohingegen systemisch die Auswirkungen des CpGs messbar sind. Auch bei den immunsupprimierten Mäusen waren im Kleinhirn 24 Stunden nach CpG-Gabe - noch vor der Infektion - keine signifikanten Unterschiede in den IL-12/IL-23p40- und MIP-1 α -Konzentrationen im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe messbar. Mit einer molekularen Größe von 6,383 kDa ist CpG nicht in der Lage, in ausreichender Konzentration durch die Blut-Hirn-Schranke zu gelangen (Crooke 1991, Nau et al. 2010), um dort direkt die Mikrogliazellen zu stimulieren. Eine Stimulierung der Mikroglia erfolgt folglich indirekt, weshalb kurz nach der CpG-Gabe kaum Veränderungen im Kleinhirn messbar sind. Der Austausch zwischen den Mikrogliazellen sowie den im Blut zirkulierenden Zellen erfolgt über unterschiedliche Wege: 1) einige Zytokine sowie pro-inflammatorische Pathogene können durch die Blut-Hirn-Schranke dringen, 2) durch Aktivierung der Endothelzellen sowie der perivaskulären Makrophagen, 3) oder durch Signalübermittlung des Vagusnervs (Perry et al. 2003).

Eine Prophylaxe mit CpG hat langfristigen Einfluss auf den Organismus. Noch zwei Wochen nach der Infektion konnte bei den überlebenden, mit CpG behandelten Mäusen erhöhte IL-12/IL-23p40-Konzentrationen in der Milz festgestellt werden. Nach ca. zwei Wochen beginnt

die Wirkung jedoch nachzulassen, um dann den Ausgangszustand wieder einzunehmen (Klinman et al.1999, Wongratanacheewin et al.2004).

IL-12p40 ist eines der wichtigsten Zytokine bei der Bekämpfung einer *S. pneumoniae*-Infektion. In Assoziation mit einer p35-Kette bildet es IL-23 (Oppmann et al. 2000). Im Gegensatz zu IL-23 lenkt IL-12 die Immunreaktion in Richtung TH1 Typ (Oppmann et al. 2000, Aggarwal et al. 2003, Lupardus und Garcia 2008). Insbesondere zu Beginn der Infektion ist IL-12 ein Schlüsselzytokin bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (Yamamoto et al. 2004). IL-12 führt zu IFN- γ -Produktion in NK-Zellen, was wiederum zu vermehrter Ausschüttung von TNF- α aus Makrophagen führt, in deren Folge vermehrt neutrophile Granulozyten rekrutiert werden (Sun et al. 2007). Dies erklärte die deutlich besseren Überlebenszeiten bei den immunkompetenten Mäusen, welche nach CpG-Gabe vermehrt IL-12/IL-23p40 im Serum und in der Milz aufwiesen. Unter anderem wurde durch die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten eine Sepsis verhindert. Bei den immunsupprimierten Mäusen fehlen jedoch die neutrophilen Granulozyten, weshalb die Stimulierung der Mikroglia die wichtigste Abwehr gegen die Bakterien darstellte. 24 Stunden nach der Infektion konnte bei den immunkompetenten sowie auch den immunsupprimierten Mäusen, welche mit CpG behandelt wurden, eine Zunahme der Mikroglia dichte im Kortex beobachtet werden. Durch die Vorstimulierung wurden deutlich mehr Mikrogliazellen rekrutiert und zur Proliferation angeregt. Bei den TLR9^{-/-}-Mäusen konnte dies nicht beobachtet werden. Ein Unterschied in der Leukozytenzahl konnte weder bei den immunkompetenten, noch bei den immunsupprimierten TLR9^{-/-}-Mäusen festgestellt werden.

4.4 Auswirkungen CpGs auf die Milz

CpG aktiviert dendritische Zellen sowie Makrophagen, vermehrt Chemokine und Zytokine zu produzieren, welche die Hämatopoese beeinflussen. Insbesondere wird die extramedulläre Hämatopoese beeinflusst. In der Milz führt dies dazu, dass große Mengen an Granulozyten-Makrophagen-Progenitor-Zellen, insbesondere CD11b⁺Gr-1⁺-Zellen, produziert werden (Sparwasser et al. 1999, Morecki et al. 2008). Mikroskopisch kann eine Zunahme der weißen und roten Pulpa festgestellt werden sowie ein Verwischen der Lymphfollikel (Ranocchia et al. 2012). Makroskopisch wird dies durch eine starke Vergrößerung der Milz deutlich. Auch in unseren Versuchen konnte eine starke Größen- und Gewichtszunahme der Milzen durch eine einmalige CpG-Gabe festgestellt werden. Durch die CpG-Gabe verdoppelte sich das Gewicht

der Milzen bei den immunsupprimierten wie auch den immunkompetenten Mäusen gegenüber den Kontroll-Mäusen. Die Veränderungen der Hämatopoese in der Milz sind TLR9-abhängig. Aus diesem Grund konnte kein Unterschied zwischen den Milzen der TLR9^{-/-}-Mäuse festgestellt werden. Die Veränderungen sind nicht von Dauer. Innerhalb eines Monats nach der letzten CpG-Gabe kehren die Chemokin- und Zytokinkonzentrationen sowie die Zellpopulation zu ihren Ausgangswerten zurück (Klinman et al. 1999).

5. Zusammenfassung

Seit Einführung des Impfstoffes gegen Pneumokokken (Deutschland 2006 und 2009) nimmt die Anzahl der tödlich endenden, durch *S. pneumoniae* verursachten Infektionen ab. Trotz Antibiotikatherapie und Impfstoffen sind wir jedoch noch weit davon entfernt, Sterblichkeit und Spätfolgen bei *S. pneumoniae*-Infektionen zu verhindern. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir, ob eine einmalige intraperitoneale Injektion mit einem Cytosin-Guanin-haltigen Oligonukleotid die Immunabwehr des Wirtsorganismus stimuliert und damit den Verlauf einer Pneumokokken-Meningitis beeinflussen kann.

Da insbesondere Menschen mit einem geschwächten Immunsystem gefährdet sind, wurden bei einem Teil der Mäuse die neutrophilen Granulozyten depletiert. Die immunsupprimierten Mäuse zeigten eine deutlich höhere Anfälligkeit für eine intrakranielle Infektion trotz geringerer injizierter Bakteriosen gegenüber immunkompetenten Mäusen. Durch die vorherige Gabe von 100 µg CpG verlängerten sich bei den immunsupprimierten Mäusen die Überlebenszeiten sowie der Zeitabstand bis zum Ausbruch der ersten Symptome ($p = 0,004$ und $p = 0,055$; Log-Rank-Test). Zudem überlebten mehr Mäuse im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Da keine neutrophilen Granulozyten an der Bekämpfung der Infektion beteiligt waren, konnten wir den Rückschluss ziehen, dass eine Stimulierung der Mikroglia für die Kontrolle des anfänglichen Infektionsverlaufs verantwortlich war. Bereits kurz nach der Infektion konnte bei den mit CpG behandelten Mäusen eine Zunahme der Mikroglia im Kortex beobachtet werden. Gleichsam wurden 36 Stunden nach der Infektion signifikant weniger Bakterien in Milz, Kleinhirn und Blut nachgewiesen ($p = 0,022$, $p = 0,006$, $p = 0,0006$; Mann-Whitney-U-Test). Durch die CpG-Gabe konnte kurz danach eine signifikante Erhöhung der IL-12/IL-23p40- und MIP-1 α -Konzentrationen im Serum und der Milz festgestellt werden. Wir gehen davon aus, dass CpG nicht nur in der Lage ist, das Immunsystem dazu zu stimulieren, die Bakterienmenge zu kontrollieren, sondern auch die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen zu beeinflussen.

Eine Erhöhung der CpG-Dosis hatte einen gegenteiligen Effekt. Die Belastung des Organismus mit einer doppelt so hohen Dosis zusätzlich zu einer *S. pneumoniae*-Infektion war mit einer erhöhten Letalität verbunden. Wahrscheinlich führte eine zu starke Stimulierung der Mikroglia zu einer Umkehr der protektiven Eigenschaft in eine neuro-/immunotoxische.

Interessanterweise konnte nicht nur ein protektiver Effekt des CpGs bei immunsupprimierten Mäusen festgestellt werden, sondern auch bei immunkompetenten Mäusen. Auch hier konnte

ein späterer Ausbruch erster Symptome sowie eine verlängerte Überlebenszeit festgestellt werden ($p = 0,039$ und $p = 0,048$; Log-Rank-Test). CpG-bedingt konnten auch hier erhöhte Konzentrationen an IL-12/IL-23p40 und MIP-1 α in Serum und Milz sowie eine Steigerung der Mikroglia-dichte festgestellt werden.

Alle immunsupprimierten und immunkompetenten Mäuse, welche CpG injiziert bekamen, verloren kurzzeitig an Körpergewicht. Zusätzlich konnte bei diesen Mäusen eine Verdoppelung der Milzgröße aufgrund einer veränderten extramedulären Hämatopoese festgestellt werden.

Die protektive Eigenschaft CpGs, der Gewichtsverlust sowie die Veränderung der extramedulären Hämatopoese waren TLR9-abhängig. In einem durchgeführten Überlebens-experiment konnten keine Veränderungen nach CpG-Gabe bei TLR9^{-/-}-Mäusen beobachtet werden.

Wir konnten beweisen, dass eine Gabe von 100 μ g CpG sowohl bei immunsupprimierten als auch bei immunkompetenten Mäusen die Resistenz gegenüber einer Pneumokokkenmeningitis steigert.

6. Literaturverzeichnis

- Adetifa IM, Antonio M, Okoromah CA, Ebruke C, Inem V, Nsekpong D, Bojang A, Adegbola RA (2012): Pre-vaccination nasopharyngeal pneumococcal carriage in a Nigerian population: epidemiology and population biology. *PLoS One* 7, e30548
- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL (2003): Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278, 1910-1914
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801
- Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, Wartha F, Beiter K, Katsuragi H, Akira S, Normark S, Henriques-Normark B (2007): Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol* 9, 633-644
- Alouf JE (2000): Cholesterol-binding cytolytic protein toxins. *Int J Med Microbiol* 290, 351-356
- Azeh I, Mäder M, Smirnov A, Beuche W, Nau R, Weber F (1998): Experimental pneumococcal meningitis in rabbits: the increase of matrix metalloproteinase-9 in cerebrospinal fluid correlates with leukocyte invasion. *Neurosci Lett* 256, 127-130
- Bernard MP, Phipps RP (2007): CpG oligodeoxynucleotides induce cyclooxygenase-2 in human B lymphocytes: implications for adjuvant activity and antibody production. *Clin Immunol* 125, 138-148
- Blasius AL, Beutler B (2010): Intracellular Toll-like receptors. *Immunity* 32, 305-315
- Bluthé RM, Pawlowski M, Suarez S, Parnet P, Pittman Q, Kelley KW, Dantzer R (1994): Synergy between tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in the induction of sickness behavior in mice. *Psychoneuroendocrinology* 19, 197-207
- Bluthé RM, Layé S, Michaud B, Combe C, Dantzer R, Parnet P (2000): Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice. *Eur J Neurosci* 12, 4447-4456
- Bogdan I, Leib SL, Bergeron M, Chow L, Täuber MG (1997): Tumor necrosis factor-alpha contributes to apoptosis in hippocampal neurons during experimental group B streptococcal meningitis. *J Infect Dis* 176, 693-697
- Bowie A, O'Neill LA (2000): The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 67, 508-514.

- Braun JS, Novak R, Gao G, Murray PJ, Shenep JL (1999): Pneumolysin, a protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*, induces nitric oxide production from macrophages. *Infect Immun* 67, 3750-3756
- Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR (2002): Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* 109, 19-27
- Braun JS, Hoffmann O, Schickhaus M, Freyer D, Dagand E, Bermpohl D, Mitchell TJ, Bechmann I, Weber JR (2007): Pneumolysin causes neuronal cell death through mitochondrial damage. *Infect Immun* 75, 4245-4254
- Brown EJ, Joiner KA, Cole RM, Berger M (1982): Localization of complement component 3 on *Streptococcus pneumoniae*: anti-capsular antibody causes complement deposition on the pneumococcal capsule. *Infect Immun* 39, 403-409
- Buchholz G, Koedel U, Pfister HW, Kastenbauer S, Klein M (2016): Dramatic reduction of mortality in pneumococcal meningitis. *Crit Care* 20, 312
- Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, Schwartz M (2005): Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Mol Cell Neurosci* 29, 381-393
- Cardon LR, Burge C, Clayton DA, Karlin S (1994): Pervasive CpG suppression in animal mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3799-3803
- Cardona AE, Piro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, et al. (2006): Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* 9, 917-924
- Carratalà J, Rosón B, Fernández-Sevilla A, Alcaide F, Gudiol F (1998): Bacteremic pneumonia in neutropenic patients with cancer: causes, empirical antibiotic therapy, and outcome. *Arch Intern Med* 158, 868-872
- Cash E, Rott O (1994): Microglial cells qualify as the stimulators of unprimed CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in the central nervous system. *Clin Exp Immunol* 98, 313-318
- 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
- Chan A, Hummel V, Weilbach FX, Kieseier BC, Gold R (2006): Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells downregulates microglial chemoattractive function and migration of encephalitogenic T cells. *J Neurosci Res* 84, 1217-1224
- Cho BP, Song DY, Sugama S, Shin DH, Shimizu Y, Kim SS, Kim YS, Joh TH (2006): Pathological dynamics of activated microglia following medial forebrain bundle transection. *Glia* 53, 92-102

- Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV (1997): CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 186, 1623-1631
- Cockeran R, Theron AJ, Steel HC, Matlola NM, Mitchell TJ, Feldman C, Anderson R (2001): Proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils. *J Infect Dis* 183, 604-611
- Colton CA, Gilbert DL (1987): Production of superoxide anions by CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* 223, 284-288
- Crooke RM (1991): In vitro toxicology and pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. *Anticancer Drug Des* 6, 609-646
- Dalpke AH, Schäfer MK, Frey M, Zimmermann S, Tebbe J, Weihe E, Heeg K (2002): Immunostimulatory CpG-DNA activates murine microglia. *J Immunol* 168, 4854-4863
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005): ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8, 752-758
- Del Rio-Hortega P: Microglia. In: Penfield W (Hrsg.): *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. Hoeber, New York 1932, 482-534
- Dessing MC, Florquin S, Paton JC, van der Poll T (2008): Toll-like receptor 2 contributes to antibacterial defence against pneumolysin-deficient pneumococci. *Cell Microbiol* 10, 237- 246
- Diab A, Abdalla H, Li HL, Shi FD, Zhu J, Höjberg B, Lindquist L, Wretling B, Bakhiet M, Link H (1999): Neutralization of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and MIP-1alpha attenuates neutrophil recruitment in the central nervous system during experimental bacterial meningitis. *Infect Immun* 67, 2590-2601
- Ebert S, Gerber J, Bader S, Mühlhauser F, Brechtel K, Mitchell TJ, Nau R (2005): Dose-dependent activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination. *J Neuroimmunol* 159, 87-96.
- Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R (2002): Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis* 186, 798-806
- 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
- Ernst JD, Decazes JM, Sande MA (1983): Experimental pneumococcal meningitis: role of leukocytes in pathogenesis. *Infect Immun* 41, 275-279

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

Flesch IE, Hess JH, Huang S, Aguet M, Rothe J, Bluethmann H, Kaufmann SH (1995): Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 181, 1615-1621

Fukuyama Y, Ikeda Y, Ohori J, Sugita G, Aso K, Fujihashi K, Briles DE, McGhee JR, Fujihashi K (2015): A molecular mucosal adjuvant to enhance immunity against pneumococcal infection in the elderly. *Immune Netw* 15, 9-15

Gehrmann J, Banati RB, Kreutzberg GW (1993): Microglia in the immune surveillance of the brain: human microglia constitutively express HLA-DR molecules. *J Neuroimmunol* 48, 189-198

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

Giulian D, Baker TJ (1985): Peptides released by ameboid microglia regulate astroglial proliferation. *J Cell Biol* 101, 2411-2415

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

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

Gudiol C, Garcia-Vidal C, Arnan M, Sánchez-Ortega I, Patiño B, Duarte R, Carratalà J (2014): Etiology, clinical features and outcomes of pre-engraftment and post-engraftment bloodstream infection in hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant* 49, 824-830

Hanisch UK, Kettenmann H (2007): Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10, 1387-1394

Halpern MD, Kurlander RJ, Pisetsky DS (1996): Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell Immunol* 167, 72-78.

Harboe ZB, Slotved HC, Konradsen HB, Kalsoft MS (2012): A Pneumococcal Carriage Study in Danish Pre-school Children before the Introduction of Pneumococcal Conjugate Vaccination. *Open Microbiol J* 6, 40-44

Häusler KG, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, Hanisch UK (2002): Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur J Neurosci* 16, 2113-2122

He B, Qiao X, Cerutti A (2004): CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J Immunol* 173, 4479-4491

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, et al. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745

Hide I, Tanaka M, Inoue A, Nakajima K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y (2000): Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. *J Neurochem* 75, 965-972

Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Brown MH, Barclay AN, et al. (2000): Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290, 1768-1771

Hofmann MA, Kors C, Audring H, Walden P, Sterry W, Trefzer U (2008): Phase 1 evaluation of intralesionally injected TLR9-agonist PF-3512676 in patients with basal cell carcinoma or metastatic melanoma. *J Immunother* 31, 520-527

Iovino F, Orihuela CJ, Moorlag HE, Molema G, Bijlsma JJ (2013): Interactions between blood-borne *Streptococcus pneumoniae* and the blood-brain barrier preceding meningitis. *PLoS One* 8, e68408

Jahrsdörfer B, Wooldridge JE, Blackwell SE, Taylor CM, Griffith TS, Link BK, Weiner GJ (2005): Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *J Leukoc Biol* 77, 378-387

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

Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y, Saitoh T, Kawai T, Takeuchi O, Akira S (2008): Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol* 9, 684-691

Kim YS, Täuber MG (1996): Neurotoxicity of glia activated by gram-positive bacterial products depends on nitric oxide production. *Infect Immun* 64, 3148-3153

Klein M, Obermaier B, Angele B, Pfister HW, Wagner H, Koedel U, Kirschning CJ (2008): Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR)2 and TLR4. *J Infect Dis* 198, 1028-1036

- 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
- Klinman DM, Conover J, Coban C (1999): Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection. *Infect Immun* 67, 5658-5663
- Koedel U, Angele B, Rupprecht T, Wagner H, Roggenkamp A, Pfister HW, Kirschning CJ (2003): Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol* 170, 438-444
- Kozak W, Wrotek S, Kozak A (2005): Pyrogenicity of CpG-DNA in mice: role of interleukin-6, cyclooxygenases, and nuclear factor-kappaB. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, 871- 880
- Kreutzberg GW (1996): Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19, 312-318
- 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
- Lahrtz F, Piali L, Spanaus KS, Seebach J, Fontana A (1998): Chemokines and chemotaxis of leukocytes in infectious meningitis. *J Neuroimmunol* 85, 33-43
- Latz E, Verma A, Visintin A, Gong M, Sirois CM, Klein DC, Monks BG, McKnight CJ, Lamphier MS, Duprex WP, et al. (2007): Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 8, 772-779
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990): Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39, 151-170
- Lee DY, Park KW, Jin BK (2006): Thrombin induces neurodegeneration and microglial activation in the cortex in vivo and in vitro: proteolytic and non-proteolytic actions. *Biochem Biophys Res Commun* 346, 727-738
- Lee P, Lee J, Kim S, Lee MS, Yagita H, Kim SY, Kim H, Suk K (2001): NO as an autocrine mediator in the apoptosis of activated microglial cells: correlation between activation and apoptosis of microglial cells. *Brain Res* 892, 380-385
- Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW (1993): Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* 150, 2659-2667
- Leib SL, Kim YS, Chow LL, Sheldon RA, Täuber MG (1996): Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. *J Clin Invest* 98, 2632-2639

- Liang X, Moseman EA, Farrar MA, Bachanova V, Weisdorf DJ, Blazar BR, Chen W (2010): Toll-like receptor 9 signaling by CpG-B oligodeoxynucleotides induces an apoptotic pathway in human chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 115, 5041-5052
- Liu Y, Hao W, Letiembre M, Walter S, Kulanga M, Neumann H, Fassbender K (2006): Suppression of microglial Inflammatory activity by myelin phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species. *J Neurosci* 26, 12904-12913
- Lupardus PJ, Garcia KC (2008): The structure of interleukin-23 reveals the molecular basis of p40 subunit sharing with interleukin-12. *J Mol Biol* 382, 931-941.
- Magnus T, Chan A, Grauer O, Toyka KV, Gold R (2001): Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to down-regulation of microglial immune activation. *J Immunol* 167, 5004-5010
- Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT (2003): Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1966-1971
- Matsuguchi T, Takagi K, Musikachoen T, Yoshikai Y (2000): Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, toll-like receptors 2 and 4, are differently regulated in mouse T lymphocytes. *Blood* 95, 1378-1385
- McCusker RH, Kelley KW (2013): Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. *J Exp Biol* 216, 84-98
- McEllistrem MC, Mendelsohn AB, Pass MA, Elliott JA, Whitney CG, Kolano JA, Harrison LH (2002): Recurrent invasive pneumococcal disease in individuals with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 185, 1364-1368
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA Jr (1998): MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2, 253-258
- Mellor AL, Baban B, Chandler PR, Manlapat A, Kahler DJ, Munn DH (2005): Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. *J Immunol* 175, 5601-5605
- Merkelbach S, Sittinger H, Schweizer I, Müller M (2000): Cognitive outcome after bacterial meningitis. *Acta Neurol Scand* 102, 118-123
- 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-6ChighCCR2+ monocytes are required for the control of bacterial infection in the central nervous system. *J Immunol* 181, 2713-2722

- Mitchell TJ, Andrew PW, Saunders FK, Smith AN, Boulnois GJ (1991): Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute α -phase protein. *Mol Microbiol* 5, 1883-1888
- Morrill HJ, Caffrey AR, Noh E, LaPlante KL (2014): Epidemiology of pneumococcal disease in a national cohort of older adults. *Infect Dis Ther* 3, 19-33
- Morecki S, Gelfand Y, Yacovlev E, Eizik O, Shabat Y, Slavin S (2008): CpG-induced myeloid CD11b+Gr-1+ cells efficiently suppress T cell-mediated immunoreactivity and graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 14, 973-984
- Nakamura Y (2002): Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull* 25, 945-953
- Nakamura Y, Si QS, Kataoka K (1999): Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci Res* 35, 95-100
- Nash KR, Moran P, Finneran DJ, Hudson C, Robinson J, Morgan D, Bickford PC (2015): Fractalkine over expression suppresses α -synuclein-mediated neurodegeneration. *Mol Ther* 23, 17-23
- 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
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005): Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-1318
- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland K, Levine OS, Cherian T, Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team (2009): Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 374, 893-902
- Offersen R, Melchjorsen J, Paludan SR, Østergaard L, Tolstrup M, Søgaaard OS (2012): TLR9-adjuvanted pneumococcal conjugate vaccine induces antibody-independent memory responses in HIV-infected adults. *Hum Vaccin Immunother* 8, 1042-1047
- Olson JK, Miller SD (2004): Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173, 3916-3924
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, et. Al (2000): Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715-725
- Østergaard C, Konradsen HB, Samuelsson S (2005): Clinical presentation and prognostic factors of *Streptococcus pneumoniae* meningitis according to the focus of infection. *BMC Infect Dis* 5, 93

- Palmer M (2001): The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* 39, 1681-1689
- Pashenkov M, Goëss G, Wagner C, Hörmann M, Jandl T, Moser A, Britten CM, Smolle J, Koller S, Mauch C, et al. (2006): Phase II trial of a toll-like receptor 9-activating oligonucleotide in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 24, 5716-5724
- Peschel A (2002): How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol* 10, 179-186
- Perry VH, Newman TA, Cunningham C (2003): The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 4, 103-112
- Pickering M, Cumiskey D, O'Connor JJ (2005): Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp Physiol* 90, 663-670
- Ranocchia RP, Gorlino CV, Crespo MI, Harman MF, Liscovsky MV, Morón G, Maletto BA, Pistorresi-Palencia MC (2012): Arginase-dependent suppression by CpG-ODN plus IFA-induced splenic myeloid CD11b(+)Gr1(+) cells. *Immunol Cell Biol* 90, 710-721
- Ribes S, Ebert S, Czesnik D, Regen T, Zeug A, Bukowski S, Mildner A, Eiffert H, Hanisch UK, Hammerschmidt S, et al. (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
- Ribes S, Ebert S, Regen T, Agarwal A, Tauber SC, Czesnik D, Spreer A, Bunkowski S, Eiffert H, Hanisch UK, et al. (2010): Toll-like receptor stimulation enhances phagocytosis and intracellular killing of nonencapsulated and encapsulated *Streptococcus pneumoniae* by murine microglia. *Infect Immun* 78, 865-871
- Ribes S, Regen T, Meister T, Tauber SC, Schütze S, Mildner A, Mack M, Hanisch UK, Nau R (2013): Resistance of the brain to *Escherichia coli* K1 infection depends on MyD88 signaling and the contribution of neutrophils and monocytes. *Infect Immun* 81, 1810-1819
- Ribes S, Meister T, Ott M, Redlich S, Janova H, Hanisch UK, Nessler S, Nau R (2014): Intraperitoneal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotides protects neutropenic mice against intracerebral *Escherichia coli* K1 infection. *J Neuroinflammation* 11, 14
- Rosjohn J, Gilbert RJ, Crane D, Morgan PJ, Mitchell TJ, Rowe AJ, Andrew PW, Paton JC, Tweten RK, Parker MW (1998): The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* 284, 449-461
- Sá-Leão R, Tomasz A, Sanches IS, Nunes S, Alves CR, Avô AB, Saldanha J, Kristinsson KG, de Lencastre H (2000): Genetic diversity and clonal patterns among antibiotic-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children: day care centers as autonomous epidemiological units. *J Clin Microbiol* 38, 4137-4144

Schenkein JG, Park S, Nahm MH (2008): Pneumococcal vaccination in older adults induces antibodies with low opsonic capacity and reduced antibody potency. *Vaccine* 26, 5521–5526

Schluesener HJ, Seid K, Deininger M, Schwab J (2001): Transient in vivo activation of rat brain macrophages/microglial cells and astrocytes by immunostimulatory multiple CpG oligonucleotides. *J Neuroimmunol* 113, 89 - 94

Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R (2000): Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* 10, 1139-1142

Schröder NW, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zähringer U, Göbel UB, Weber JR, Schumann RR (2003): Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like-receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 278, 15587-15594

Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ (1999): Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274, 17406-17409

Siemieniuk RA, Gregson DB, Gill MJ (2011): The persisting burden of invasive pneumococcal disease in HIV patients: an observational cohort study. *BMC Infect Dis* 11, 314

Sjöström K, Spindler C, Ortqvist A, Kalin M, Sandgren A, Köhlmann-Berenzon S, Henriques-Normark B (2006): Clonal and capsular types decide whether pneumococci will act as a primary or opportunistic pathogen. *Clin Infect Dis* 42, 451-459

Skrupky LP, Kerby PW, Hotchkiss RS (2011): Advances in the management of sepsis and in the understanding of key immunologic defects of the disorder. *Anesthesiology* 115, 1349–1362.

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

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

Srivastava A, Henneke P, Visintin A, Morse SC, Martin V, Watkins C, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT, Malley R (2005): The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. *Infect Immun* 73, 6479-6487

Stence N, Waite M, Dailey ME (2001): Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33, 256-266

- Stockmann C, Ampofo K, Byington CL, Filloux F, Hersh AL, Blaschke AJ, Cowan P, Korgenski K, Mason EO, Pavia AT (2013): Pneumococcal meningitis in children: epidemiology, serotypes, and outcomes from 1997-2010 in Utah. *Pediatrics* 132, 421-428
- Stringaris AK, Geisenhainer J, Bergmann F, Balshüsemann C, Lee U, Zysk G, Mitchell TJ, Keller BU, Kuhnt U, Gerber J, et al. (2002): Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiol Dis* 11, 355-368
- Sun K, Salmon SL, Lotz SA, Metzger DW (2007): Interleukin-12 promotes gamma interferon-dependent neutrophil recruitment in the lung and improves protection against respiratory *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* 75, 1196-1202
- Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, et al. (2002): Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416, 750-756
- Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, Kano S, Honda K, Ohba Y, Mak TW, Taniguchi T (2005): Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434, 243-249
- Takehita S, Takehita F, Haddad DE, Janabi N, Klinman DM (2001): Activation of microglia and astrocytes by CpG oligodeoxynucleotides. *Neuroreport* 12, 3029-3032
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999): Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443-451
- Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S (2000): Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* 12, 113-117
- Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A (1985): The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis* 151, 859-868
- Tureen JH, Dworkin RJ, Kennedy SL, Sachdeva M, Sande MA (1990): Loss of cerebrovascular autoregulation in experimental meningitis in rabbits. *J Clin Invest* 85, 577-581
- van de Beek D, Schmand B, de Gans J, Weisfelt M, Vaessen H, Dankert J, Vermeulen M (2002): Cognitive impairment in adults with good recovery after bacterial meningitis. *J Infect Dis* 186, 1047-1052
- Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, Henriques-Normark B (2007): Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol* 9, 1162-1171

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

Weinberger DM, Harboe ZB, Sanders EA, Ndiritu M, Klugman KP, Rückinger S, Dagan R, Adegbola R, Cutts F, Johnson HL, O'Brien KL, Scott JA, Lipsitch M (2010): Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 51, 692-699

Weisfelt M, van de Beek D, Spanjaard L, Reitsma JB, de Gans J (2006 a): Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series. *Lancet Neurol* 5, 123-129

Weisfelt M, van de Beek D, Spanjaard L, Reitsma JB, de Gans J (2006 b): Community-acquired bacterial meningitis in older people. *J Am Geriatr Soc* 54, 1500-1507

WHO: Measuring impact of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccination. Immunization, Vaccines and Biologicals WHO/ IVB/ 12.08 Genf 2012a

WHO (2012b): Estimated Hib and pneumococcal deaths for children under 5 years of age, 2008. (http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/Pneumo_hib/en); Zugriff am 28.07.2017

Wingender G, Garbi N, Schumak B, Jüngerkes F, Endl E, von Bubnoff D, Steitz J, Striegler J, Moldenhauer G, Tüting T, et.al (2006): Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO. *Eur J Immunol* 36,12-20.

Wongratanacheewin S, Kespichayawattana W, Intachote P, Pichyangkul S, Sermswan RW, Krieg AM, Sirisinha S (2004): Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide confers protection in a murine model of infection with *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun* 72, 4494-4502

Yamamoto N, Kawakami K, Kinjo Y, Miyagi K, Kinjo T, Uezu K, Nakasone C, Nakamatsu M, Saito A (2004): Essential role for the p40 subunit of interleukin-12 in neutrophil-mediated early host defense against pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*: involvement of interferon-gamma. *Microbes Infect* 6, 1241-1249

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

Zysk G, Schneider-Wald BK, Hwang JH, Bejo L, Kim KS, Mitchell TJ, Hakenbeck R, Heinz HP (2001): Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69, 845-852

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. Roland Nau für die Überlassung des Themas sowie eine herzliche und umfassende Betreuung und viele hilfreiche Ratschläge.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Sandra Ribes für eine freundschaftliche Zusammenarbeit und ihre enorme Unterstützung bei allen Experimenten sowie anschließenden Auswertungen.

Zudem bedanke ich mich bei Stefanie Bunkowski für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft sowie für die von ihr angefertigten Präparate und Analysen.