

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Direktor: Prof. Dr. med. W. Brück)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Beeinflussung der Phagozytose von Pneumokokken durch Mikrogliazellen mit Anticholinergika

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Jörn Riegelmann
aus Langenhagen

Göttingen 2013

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

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

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 08.01.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
------------------------------------	----------

1 Einleitung	1
---------------------	----------

1.1 Infektionen mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
1.2 Cholin-bindende Proteine als wichtige Virulenzfaktoren von <i>S. pneumoniae</i>	2
1.3 Ipratropium und Dendrimere als potente Inhibitoren von CBPs	5
1.3.1 Ipratropium	5
1.3.2 Dendrimere	6
1.4 Mikrogliazellen: Residente Phagozyten des ZNS mesodermaler Herkunft.....	7
1.5 Gegenstand und Zielsetzung dieser Arbeit	7

2 Material und Methoden	9
--------------------------------	----------

2.1 Materialien.....	9
2.1.1 Geräte	9
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	10
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	11
2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen	13
2.1.4.1 Medium für die murine Mikroglia-Zellkultur.....	13
2.1.4.2 Medium für die murine Mikroglia-Zellkultur während der Phagozytose.....	13
2.1.4.3 WST-1-Medium	13
2.1.4.4 Trypticase-Soja-Bouillon (TSB)	13
2.1.4.5 Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	13
2.1.4.6 Phosphatpuffer	13
2.1.4.7 Poly-L-Lysin-Lösung (PLL)	14
2.1.4.8 DNase	14
2.1.5 Anticholinergika.....	14
2.1.5.1 Ipratropiumbromid	14

2.1.5.2 Dendrimere.....	14
2.1.6 Mäuse	15
2.1.7 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	15
2.1.8 Software	15
2.2 Herstellung der Pneumokokken-Inokula	16
2.3 Quantifizierung von Pneumokokken	16
2.3.1 Keimkonzentrationen in Inokula und Suspensionen	16
2.3.2 Absolute Anzahl intrazellulärer Pneumokokken nach Phagozytose	17
2.4 Wachstumskurven.....	17
2.5 Primäre murine Mikroglia-Zellkultur	18
2.5.1 Vorbereitung der Gewebekulturflaschen	18
2.5.2 Präparation von Mikrogliazellen	18
2.5.3 Kultivierung	20
2.5.4 Zellernte	20
2.5.5 Auszählung der Zellen	20
2.5.6 Ausplattierung	21
2.6 WST-1-Zellvitalitätstest	21
2.7 Phagozytoseversuche.....	22
2.7.1 Vorbereitung der Zellen.....	22
2.7.2 Verdünnung der Anticholinergika	22
2.7.3 Vorbereitung der Bakterien	22
2.7.4 Phagozytose	23
2.7.5 Berechnung der Phagozytoseleistung	24
2.7.5.1 Phagozytoseleistung unter Ipratropium-Einfluss	24
2.7.5.2 Phagozytoseleistung unter Dendrimer-Einfluss.....	25
2.7.6 Kriterien zum Ausschluss von Phagozytoseversuchen und Einzelwerten.....	26
2.8 Zytologie und Immunzytochemie	27
2.8.1 Methylenblau-Färbung	27
2.8.2 Iba1-Hämalaun-Färbung	27
2.9 Tierversuche	28
2.9.1 Mäuse	28
2.9.2 Infektion und Dendrimer-Applikation	29

2.9.2.1 Verdünnung der Dendrimere	29
2.9.2.2 Applikation der Dendrimere und Infektion	29
2.9.3 Beurteilung der Gesundheit der Tiere	29
2.9.4 Präparation der Milz	30
2.9.5 Umgang mit überlebenden Tieren.....	31
2.10 Statistik.....	31
3 Ergebnisse	32

3.1 Wachstumskinetik von <i>S. pneumoniae</i> R6 in Trypticase-Soja-Bouillon	32
3.1.1 Inokulum für Ipratropium-Experimente	32
3.1.2 Inokulum für Dendrimer-Experimente	33
3.2 Beeinflussung der Zellvitalität durch die Anticholinergika, Phosphatpuffer und TSB	35
3.3 Einfluss der Anticholinergika auf das Bakterienwachstum.....	36
3.3.1 Einfluss von Ipratropium auf das Pneumokokkenwachstum	36
3.3.2 Einfluss der Dendrimere auf das Pneumokokkenwachstum	37
3.3.2.1 Inkubation von 0 - 14 h.....	38
3.3.2.2 Inkubation von 12 - 14 h.....	39
3.3.2.3 Unterschiede der Keimkonzentrationen nach 14 und 2 h Co-Inkubation	40
3.4 Einfluss der Inkubation von Pneumokokken mit Anticholinergika während ihres Wachstums auf die Phagozytoseleistung muriner Mikrogliazellen.....	41
3.4.1 Phagozytoseleistung unter dem Einfluss von Ipratropium	41
3.4.2 Phagozytoseleistung unter dem Einfluss von Dendrimeren.....	42
3.4.2.1 Einfluss von g1-DMAE und g1-NH ₂	43
3.4.2.2 Einfluss von g2-DMAE und g2-NH ₂	45
3.4.2.3 Einfluss von g2-cho und g2-NH ₂	47
3.5 Einfluss der Anticholinergika auf die Bakterienmorphologie	51
3.6 Einfluss von g2-cho-Dendrimeren auf den Krankheitsverlauf nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> D39 <i>in vivo</i>	53
3.6.1 Überleben.....	53
3.6.2 Krankheitsverlauf: Gewicht	54

3.6.3 Krankheitsverlauf: Klinischer Score	55
3.6.4 Intralienale Keimkonzentration von <i>S. pneumoniae</i> nach Tod durch Infektion.....	56
4 Diskussion	58

4.1 Auswahl der Anticholinergika und Konzentrationen.....	59
4.1.1 Ipratropium	59
4.1.2 Dendrimere	61
4.2 Diskussion der Methode.....	63
4.2.1 Bakterien	63
4.2.2 Bestimmung der Keimkonzentration	64
4.2.3 Berechnung der relativen Phagozytoseleistung	66
4.3 Mittelbarer Einfluss der Anticholinergika auf die Phagozytoseleistung von Mikrogliazellen <i>in vitro</i>	67
4.3.1 Fehlender Einfluss von Ipratropium auf die Phagozytoseleistung.....	67
4.3.2 PAMAM-g1-DMAE hatte keinen Einfluss auf die Phagozytoseleistung	69
4.3.3 PPI-g2-DMAE führte zu verminderter Phagozytoseleistung	70
4.3.4 PPI-g2-cho führte zu gesteigerter Phagozytoseleistung	71
4.4 PPI-g2-cho zeigte keine Wirkung im Sepsismodell der Maus.....	74
5 Zusammenfassung	76
6 Literaturverzeichnis	78

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
∅	Durchmesser
Abb.	Abbildung
<i>Aqua bidest</i>	zweifach destilliertes Wasser
c	Zenti-
CBP	<i>choline binding protein</i> , Cholin-bindendes Protein
CFU	<i>colony forming unit</i> , koloniebildende Einheit (KbE)
cho	Cholin
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> , chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Da	Dalton (Einheit für die Masse von Molekülen)
DAB	Diaminobenzidin
dd	doppelt destilliert
DEAE	<i>N,N</i> -Diethylethanolamin, Freiname „Diethylaminoethanol“
DMAE	<i>N,N</i> -Dimethylethanolamin, Freiname „Dimethylaminoethanol“, auch „Norcholin“ genannt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNase	Desoxyribonuklease I
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffer Saline

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENI	European Neuroscience Institute Göttingen
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
g	Generation (eines Dendrimers); Gramm
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Iba	<i>ionized calcium binding adapter molecule</i> , ionisiertes kalziumbindendes Adaptormolekül
IC ₅₀	Konzentration, bei der eine halbmaximale Inhibition erreicht wird
IE	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
l	Liter
LTA	<i>lipoteichoic acid</i> , Lipoteichonsäure
M	Molarität
m	Meter; Milli-
min	Minute(n)
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl; Nano-
NaCl	Natriumchlorid
OPSI	<i>overwhelming post-splenectomy infection</i>
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P/S	Penicillin/Streptomycin

PAMAM	Polyamidoamin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLL	Poly-L-Lysin
PPI	Polypropylenimin
Psp	<i>pneumococcal surface protein</i> , Pneumokokken-Oberflächenprotein
R	Rest
RKI	Robert-Koch-Institut
rpm	Umdrehungen pro Minute
S.	Seite; <i>Streptococcus</i>
s.	siehe
STIKO	Ständige Impfkommision
TA	<i>teichoic acid</i> , Teichonsäure
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TSB	Trypticase-Soja-Bouillon
vs.	versus
WST-1	Tetrazoliumsalz
ZNS	Zentrales Nervensystem
μ	Mikro-

1 Einleitung

1.1 Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae ist ein Gram-positives Bakterium, das lebensbedrohliche Erkrankungen wie Pneumonie, Meningitis und Sepsis auslösen kann (Tuomanen et al. 1995; Cartwright 2002; Maestro und Sanz 2007; McIntyre et al. 2012). Es ist der am häufigsten nachgewiesene Erreger ambulant erworbener bakterieller Meningitiden, die bei 25 % der hospitalisierten Patienten zum Tod führen (Durand et al. 1993). Inzwischen konnten über 90 Serotypen identifiziert werden, die sich durch die Zusammensetzung der Polysaccharide ihrer Kapsel unterscheiden (Käyhty und Eskola 1996; McIntyre et al. 2012; Postma et al. 2012). Die Inzidenz der Erkrankungen ist abhängig von geografischer Lage und dem Alter der Patienten (Cartwright 2002). Auch die krankheitsursächlichen Serotypen zeigen eine geografisch ungleiche Verteilung (Hausdorff et al. 2000; McIntyre et al. 2012).

Während Kinder unter 2 Jahren und Erwachsene ab 60 Jahren eine Risikogruppe für ambulant erworbene Pneumokokkeninfektionen darstellen (Pedersen und Henrichsen 1983; Durand et al. 1993; Venetz et al. 1998; Cartwright 2002; Gjini et al. 2006; McIntyre et al. 2012), zeigt sich bei immunkompromittierten Patienten eine Häufung nosokomial erworbener Pneumokokkämien (Fernández Guerrero et al. 2003). Bei immunkompromittierten Patienten, die eine Pneumonie ambulant erworben hatten, wurde *S. pneumoniae* als häufigster Erreger gefunden (Camps Serra et al. 2008). Auch Aspleniker sind durch den Keim hoch gefährdet: Er ist ursächlich für ca. 90 % der OPSI-Syndrome (*overwhelming post-splenectomy infection*) (Waghorn 2001). Diese nach Splenektomie auftretende fulminante septische Infektion (Diamond 1969) endet in der Hälfte der Fälle letal (Waghorn 2001).

Ein großes Problem bei der effektiven Erregerbekämpfung ist die steigende Zahl antibiotikaresistenter, teilweise multiresistenter Pneumokokkenstämme, insbesondere in Ländern mit weniger zurückhaltender Indikationsstellung für eine Antibiose (Cartwright 2002; Liu et al. 2013).

Die Ständige Impfkommission (STIKO) des Robert-Koch-Institutes (RKI) empfiehlt für die oben genannten Risikogruppen (Kinder unter 2 Jahren, Erwachsene ab 60 Jahren sowie Patienten mit reduzierter Immunkompetenz) eine Impfung gegen

Pneumokokken. Bei Kindern kommt dabei ein 13-valenter Konjugat-Impfstoff zum Einsatz, Erwachsene werden mit einem nicht konjugierten 23-valenten Polysaccharid-Impfstoff geimpft. Von den in Deutschland vorkommenden krankheitsursächlichen Serotypen werden 82 % durch den 23-valenten und 63 % durch den 13-valenten Impfstoff abgedeckt (STIKO 2012a; STIKO 2012b). Da das 23-valente Vakzin nicht konjugierte Polysaccharide enthält, löst es eine T-Zell-unabhängige Immunantwort aus, bei der es nicht zur Bildung von B-Gedächtniszellen kommt, was eine häufige Auffrischung des Impfschutzes bei immunkompromittierten Patienten nötig macht (McIntyre et al. 2012; Postma et al. 2012). Für die Risikogruppe der über 60-Jährigen wird vom RKI nur eine einmalige Impfung empfohlen (STIKO 2012b). Inwieweit der immundefiziente Patient eine Immunität aufbaut, hängt von Art und Ausprägung seiner Immundefizienz ab (Pirofski und Casadevall 1998; Tian et al. 2007).

Die steigende Zahl antibiotikaresistenter Pneumokokkenstämme und die Beschränkung verfügbarer Impfstoffe auf wenige Serotypen machen – auch vor dem Hintergrund der demografischen Entwicklung in Deutschland und anderen Industrienationen, die dazu führt, dass immer mehr Menschen der Risikogruppe „Ü 60“ angehören werden – die Erforschung alternativer Ansätze in der Infektionsbekämpfung notwendig.

1.2 Cholin-bindende Proteine als wichtige Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*

Als Cholin-bindende Proteine (CBPs) wird eine Gruppe von Polypeptiden bezeichnet, die wichtige physiologische Prozesse von *S. pneumoniae* katalysiert und in allen Stämmen gefunden werden kann (Maestro et al. 2007; Hernández-Rocamora et al. 2009), wenngleich es durchaus Unterschiede in der Anzahl nachgewiesener CBPs bei den unterschiedlichen Serotypen gibt (Romero et al. 2007). Namensgebend ist ihre Eigenschaft, Cholin binden zu müssen, um katalytisch wirken zu können. Die CBPs binden dazu nicht-kovalent mit ihrer Cholin-bindenden Domäne (Rosenow et al. 1997; Gosink et al. 2000; Mitchell 2003; Maestro et al. 2007) an Cholin, das als Phosphorylcholin in den Teichonsäuren (TAs) und Lipoteichonsäuren (LTAs) der Zellwand von Pneumokokken vorkommt (s. Abbildung 1-1) (Bean und Tomasz 1977;

Briese und Hakenbeck 1985; García JL et al. 1998; Fernández-Tornero et al. 2001; Bergmann und Hammerschmidt 2006; Hammerschmidt 2006). Fehlt dieses Cholin, z. B. aufgrund einer herbeigeführten Mutation im Genom von *S. pneumoniae*, ist die Mutante avirulent (Gehre et al. 2009).

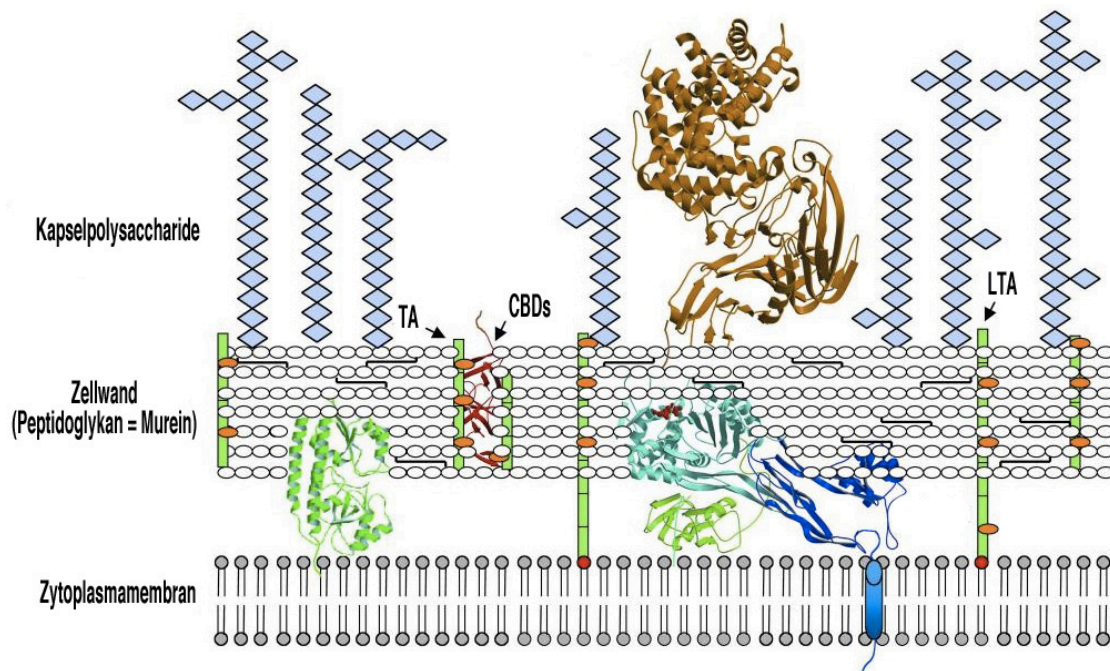


Abbildung 1-1 Schematische Darstellung der Zellwand von *S. pneumoniae*. Die Teichonsäuren (**TA**) und Lipoteichonsäuren (**LTA**) sind grün dargestellt, das Cholin ist orange eingefärbt. **CBDs:** Cholin-bindende Domänen von CBPs (modifiziert entnommen aus Di Guilmi und Dessen 2002, S. 730).

Das Anhaften der CBPs an der Pneumokokkenoberfläche ist essenziell für die Virulenz des Bakteriums. Zahlreiche CBPs konnten bis heute identifiziert und ihr Beitrag zur Virulenz der Pneumokokken bestimmt werden. In Tabelle 1-1 sind einige Beispiele für CBPs und ihr Einfluss auf die Virulenz des Pneumokokkus aufgelistet.

Name des CBP	Literatur	Eigenschaften/Einfluss auf die Virulenz
LytA (Autolysin)	Fernández-Tornero et al. 2001	Autolyse
	Sanchez-Puelles et al. 1986; García P et al. 1999; Gosink et al. 2000	Autolyse, Zellseparation
	López et al. 2000	Zellseparation
LytB	Bergmann und Hammerschmidt 2006	wird v. a. in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert
	García P et al. 1999; López et al. 2000	Zellseparation
	Gosink et al. 2000; Ramos-Sevillano et al. 2011	LytB-defiziente Mutante führt zu signifikant reduzierter Kolonisation im Nasopharynx
LytC	Gosink et al. 2000; Ramos-Sevillano et al. 2011	LytC-defiziente Mutante führt zu signifikant reduzierter Kolonisation im Nasopharynx
CbpA	Rosenow et al. 1997	CbpA-defiziente Mutante führt zu signifikant reduzierter Kolonisation im Nasopharynx, jedoch keine reduzierte Virulenz im Sepsismodell der Ratte
	Zhang et al. 2000	vermittelt Adhäsion und Invasion im menschlichen Nasopharynx
CbpD	Gosink et al. 2000	CbpD-defiziente Mutante führt zu signifikant reduzierter Kolonisation im Nasopharynx
CbpE	Gosink et al. 2000	CbpE-defiziente Mutante führt zu signifikant reduzierter Kolonisation im Nasopharynx
CbpG	Gosink et al. 2000	CbpG-defiziente Mutante führt zu signifikant reduzierter Kolonisation im Nasopharynx
	Gosink et al. 2000	CbpG-defiziente Mutante führt zu reduzierter Virulenz im Sepsismodell der Ratte
PspA	Tu et al. 1999	vermindert Komplementaktivierung durch <i>S. pneumoniae</i>

Tabelle 1-1 Beispiele einiger Cholin-bindender Proteine und ihr Beitrag zur Virulenz von *Streptococcus pneumoniae*. Cbp: Cholin-bindendes Protein (*choline-binding protein*). Psp: Pneumokken-Oberflächenprotein (*pneumococcal surface protein*).

Zwei der genannten CBPs konnten bisher mit der Zellseparation (= Ablösen der Pneumokokken voneinander) am Ende der Zellteilung in Verbindung gebracht werden: LytA und LytB. Während sich bei Defizienz von LytA nur relativ kurze Pneumokokkenketten von 6 - 10 Zellen bilden (Sanchez-Puelles et al. 1986; García P et al. 1999), kommt es bei eingeschränkter Funktion von LytB, das v. a. während der frühen exponentiellen Wachstumsphase exprimiert wird (Bergmann und Hammerschmidt 2006), zur Ausbildung von sehr langen Kokkenketten mit mehr als 100 Zellen (García P et al. 1999; López et al. 2000).

CBPs können durch einen Überschuss an freiem Cholin oder durch Cholinanaloga von der Oberfläche der Pneumokokken abgelöst werden, wobei es konsekutiv zur Inhibition der CBP-Aktivität kommt (García JL et al. 1998; Hernández-Rocamora et al.

2009). Da auf diese Weise jeder Pneumokokken-Serotyp in seiner Virulenz negativ beeinflusst werden kann, sind Forschungsansätze, die auf die Inhibition der CBPs abzielen, vielversprechend für die effektive Bekämpfung von Pneumokokkeninfektionen.

1.3 Ipratropium und Dendrimere als potente Inhibitoren von CBPs

Es ist *in vivo* nicht gefahrlos möglich, die Aktivität der CBPs durch Gabe von freiem Cholin suffizient einzuschränken, da die dazu benötigte Konzentration zu erheblichen Nebenwirkungen durch Interaktion mit den muskarinergen Rezeptoren führen würde (Maestro et al. 2007; Hernández-Rocamora et al. 2009). Stattdessen müssen Cholinanaloga eingesetzt werden, die in nebenwirkungsarmen Konzentrationen eine hohe Affinität zu den CBPs aufweisen, um diese von der Pneumokokkenoberfläche ablösen und deren katalytische Aktivität einschränken zu können.

1.3.1 Ipratropium

Ester bicyklischer Amine sind effektive Inhibitoren der CBPs (Maestro et al. 2007). Ein sehr potenter Vertreter dieser Gruppe ist Ipratropium (Strukturformel s. Abbildung 1-2). Es weist eine sehr hohe Affinität zu den CBPs auf, an die es reversibel bindet, und ist in der Lage, bereits in geringen Konzentrationen deren Aktivität zu inhibieren (Maestro et al. 2007). In der klinischen Praxis findet es als Ipratropiumbromid Anwendung bei der Behandlung von Bronchospasmen bei COPD und *Asthma bronchiale* (als Lösung zur Inhalation, z. B. Atrovent[®], Boehringer Ingelheim Pharma, Ingelheim, DE) und in der Behandlung von Sinusbradykardien (als Filmtablette, z. B. Itrop[®], Boehringer Ingelheim Pharma, Ingelheim, DE) (Rote Liste online 2013).

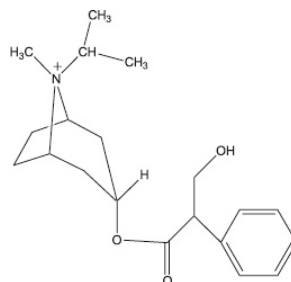


Abbildung 1-2 Strukturformel von Ipratropium (entnommen aus Maestro et al. 2007, S. 366).

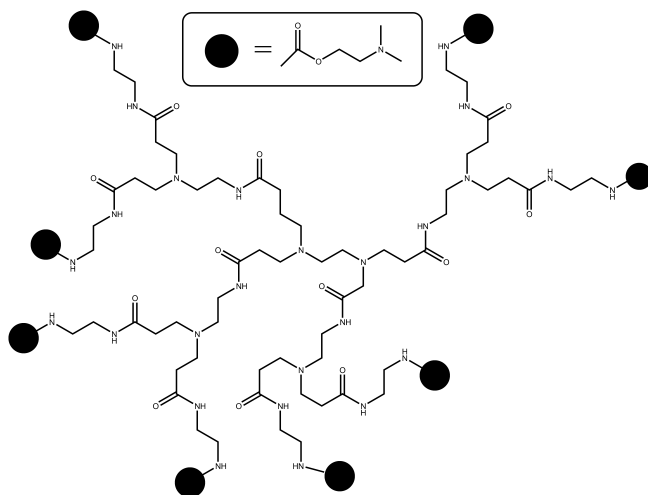
1.3.2 Dendrimere

Dendrimere (griechisch *dendron* – „Baum“) sind monodisperse Makromoleküle, die eine ausgehend von einem Kernmolekül gleichmäßig verzweigte, dreidimensionale Struktur aufweisen, die an die Verästelung eines Baumes erinnert. Ihre Synthese erfolgt schrittweise durch sich wiederholende identische Reaktionsschritte, bei denen die Verzweigung immer weiter zunimmt. Jede dieser Iterationen führt zu einem Dendrimer der nächsthöheren „Generation“ (Bosman et al. 1999).

Zu den bekanntesten Dendrimeren, die bis hin zu hohen Generationen synthetisiert werden konnten, zählen Polyamidoamin-Dendrimere (PAMAM-Dendrimere) und Polypropylenimin-Dendrimere (PPI-Dendrimere) (Bosman et al. 1999). Für letztere konnte bereits eine sehr hohe Affinität zu CBPs nachgewiesen werden, wenn sie mit Cholin funktionalisiert worden waren. Sie inhibierten die katalytische Aktivität der CBPs bereits in geringen Konzentrationen (Hernández-Rocamora et al. 2009).

In Abbildung 1-3 sind die Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Dendrimere dargestellt. Es sei darauf hingewiesen, dass sowohl die 1. Generation des PAMAM-Dendrimers als auch die 2. Generation des PPI-Dendrimers jeweils 8 funktionelle Gruppen aufweist.

(a) PAMAM-g1-DMAE



(b) PPI-g2-cho /-NH₂

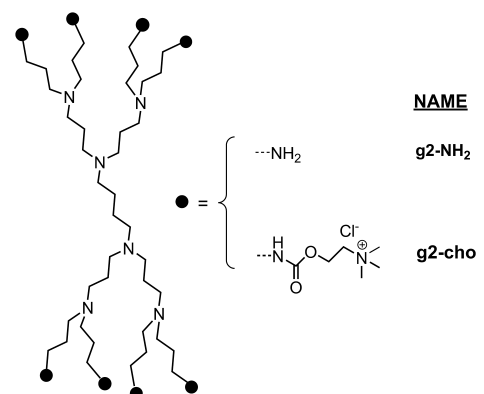


Abbildung 1-3 Beispiele für Strukturformeln von Dendrimeren, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden. **(a)** PAMAM-Dendrimer der 1. Generation, der mit *N,N*-Dimethylethanolamin (DMAE, auch „Norcholin“ genannt) funktionalisiert ist. Das nicht-funktionalisierte Pendant enthält anstelle der DMAE-Gruppe eine NH₂-Gruppe. **(b)** PPI-Dendrimer der 2. Generation (Kern: Butan-1,4-diamin), der nicht-funktionalisiert (g2-NH₂) bzw. mit Cholin (g2-cho) funktionalisiert ist. Außerdem kam eine mit DMAE funktionalisierte Variante dieses Dendrimers zum Einsatz (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Jesús M. Sanz, Institut für Molekular- und Zellbiologie, Universität Miguel Hernández, Elche, Spanien).

1.4 Mikrogliazellen: Residente Phagozyten des ZNS mesodermaler Herkunft

Mit Beginn der Blutzirkulation in der frühen fetalen Entwicklung verlassen primitive Makrophagen den Dottersack (Mesoderm) und kolonisieren das Neuroepithel (Neuroektoderm). Dort proliferieren sie und differenzieren zu Mikrogliazellen (Dalmau et al. 2003; Ginhoux et al. 2010; Ginhoux et al. 2013). Sie sind, im Gegensatz zu meningealen und perivaskulären Makrophagen, unmittelbar im Hirnparenchym lokalisiert, das sie ständig mit ihren Fortsätzen auf pathologische Veränderungen abtasten (Nimmerjahn et al. 2005; Hanisch und Kettenmann 2007) und reagieren empfindlich und schnell auf geringfügige Störungen der Homöostase des Zentralen Nervensystems (ZNS), z. B. auf die Invasion von Mikroorganismen (Kreutzberg 1996). Als residente Phagozyten und Teil der angeborenen Immunität stellen sie die erste Linie der Immunantwort im Hirnparenchym dar (Kreutzberg 1996; Rock et al. 2004; Engelhardt und Coisne 2011).

In ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen vermitteln sie zudem die erworbene Immunantwort (Thomas 1992; Hanisch und Kettenmann 2007). Entsprechende Oberflächenrezeptoren werden dazu vermehrt exprimiert, wenn die Mikrogliazellen aktiviert wurden (Rock et al. 2004).

Unter bestimmten inflammatorischen Bedingungen können Monozyten aus dem Blut ins ZNS einwandern und dort zu Mikrogliazellen differenzieren (Ginhoux et al. 2013). Bei Pneumokokken-Meningitis im Mausversuch geschah dies jedoch nicht während, sondern nach der Akutphase der Entzündung, als die neu rekrutierten Zellen an der Wiederherstellung der Gewebekomöostase mitwirkten (Djukic et al. 2006). Ob die sekundär eingewanderten Zellen in die bestehende Mikroglia population dauerhaft integriert werden oder nur der temporären Unterstützung dienen, ist noch nicht bekannt (Ginhoux et al. 2013).

1.5 Gegenstand und Zielsetzung dieser Arbeit

Vor dem Hintergrund zunehmender Antibiotikaresistenzen von *S. pneumoniae* und der Vielzahl pathogener Serotypen, die durch die verfügbaren Impfstoffe nicht vollständig abgedeckt werden, stellt die Steigerung der Phagozytoseleistung von

Mikrogliazellen einen vielversprechenden Ansatz zur Verhinderung Pneumokokken-induzierter Meningitiden dar.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Pneumokokken durch Inhibition von CBPs mit konsekutiver Kettenbildung von Mikrogliazellen besser phagozytiert werden als unbehandelte Pneumokokken.

Dazu wurde das bewährte Phagozytosemodell muriner Mikrogliazellen (z. B. Ribes et al. 2009) für wachsende Pneumokokkenkulturen etabliert und der mittelbare Einfluss von Anticholinergika mit nachgewiesener hoher Affinität zu CBPs auf die Phagozytoseleistung der Mikroglia erforscht.

Als potente Anticholinergika kamen bei den Versuchen das kommerziell erhältliche Ipratropiumbromid sowie PAMAM- und PPI-Dendrimere mit je 8 funktionellen Gruppen, die Cholin oder DMAE entsprechen, zum Einsatz.

Um den maximal möglichen Effekt auf die Bakterienmorphologie zu erzielen, sollten die Pneumokokken während ihres gesamten Wachstums mit den Anticholinergika co-inkubiert werden, was ihren möglichen Einsatz als Prophylaxe gegen Kolonisation und schwere Entzündung widerspiegelt. Im Vergleich dazu wurden Pneumokokkenkulturen nur während der letzten 2 Stunden ihrer exponentiellen Wachstumsphase mit den Anticholinergika co-inkubiert, um ihren Einsatz als Therapeutikum manifester Infektionen zu simulieren. Nach Wachstum unter Einfluss der Anticholinergika wurden die Pneumokokken auf murine Mikrogliazellen gegeben und deren Phagozytoseleistung bestimmt. Als Kontrolle dienten Mikrogliazellen, denen Pneumokokken zur Phagozytose angeboten wurden, die während des Wachstums in TSB mit einer geringen Menge Phosphatpuffer co-inkubiert wurden, wodurch die Aktivität der CBPs nicht eingeschränkt wird.

Anticholinergika, die *in vitro* zu einer Steigerung der Phagozytose führten, wurden später im Sepsismodell der Maus auf ihren Einfluss auf Überlebenszeit und Sterblichkeit untersucht. Dazu wurde C57BL/6N-Mäusen 15 Minuten vor Infektion mit *S. pneumoniae* D39, gegenüber dem diese Mäuse eine mittlere Empfindlichkeit zeigen (Gingles et al. 2001), das Anticholinergikum intraperitoneal injiziert. Da Mikrogliazellen und Makrophagen trotz ihrer unterschiedlichen Abstammung viele Eigenschaften gemeinsam haben (Rock et al. 2004), war das Sepsis-Modell für einen orientierenden ersten *In-vivo*-Ansatz zweckmäßiger als das Meningitis-Modell.

2 Material und Methoden

Die Länderangaben sind nach ISO 3166-1 kodiert.

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Absaugsystem VACUSAFE comfort	Integra Biosciences (Fernwald, DE)
Brutschrank Heraeus B12	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, DE)
CO ₂ -Inkubator HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, DE)
ELISA-Reader Rainbow Spectra	Tecan Deutschland (Crailsheim, DE)
Flockeneisbereiter AF 100	Scotsman Ice Systems (Pogliano Milanese, IT)
Kaltlichtlampe KL 1500 LCD	Schott (Mainz, DE)
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank HERAsafe HS	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, DE)
Mikroskop BX51	Olympus (Tokio, JP)
Mikroskop IMT-2	Olympus (Tokio, JP)
Mikroskop-Kamera DP71	Olympus (Tokio, JP)
Neubauer-Zählkammer	LO Laboroptik (Lancing, GB)
Pipettierhelfer accu-jet [®] pro	Brand (Wertheim, DE)
Präparierbesteck (Scheren, Pinzetten)	Hermle Labortechnik (Wehingen, DE)
Präzisionswaage Sartorius excellence E 12000 S	Sartorius (Göttingen, DE)
Reagenzglasschüttler Reax top	Heidolph Instruments (Schwabach, DE)
Reinstwassersystem Ultra Clear UV Plus	Siemens Water Technologies (Barsbüttel, DE)

Schüttler rotomix 92406 (Modell-Nr. M68902)	Barnstead / Thermolyne (Dubuque, IA, USA)
Sicherheits-Bunsenbrenner schütt flammy L	schuett-biotec (Göttingen, DE)
Tischautoklav DX-23	Systemec (Wettenberg, DE)
Universalschrank UNE 200	Memmert (Schwabach, DE)
Wärmeschrank Heraeus UT 6120	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, DE)
Wasserbad 1004 (21 l)	GFL Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, DE)
Zentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Zentrifuge Heraeus Multifuge 1S-R	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, DE)
Zoom-Stereomikroskop SZ61	Olympus (Tokio, JP)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

24-Loch-Gewebekulturplatten (mit F-Boden)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
96-Loch-Gewebekulturplatten (mit F-Boden)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Columbia-Blutagarplatten mit 5 % Schafblut	bioMérieux Deutschland (Nürtingen, DE)
Deckgläser quadratisch 18 x 18 mm, 0,13 mm dick	Gerhard Menzel (Braunschweig, DE)
Deckgläser rund, Ø 13 mm	Gerhard Menzel (Braunschweig, DE)
Einmalskalpelle	Dahlhausen (Köln, DE)
Gewebekulturflaschen 75 cm ² , Flaschenhals abgewinkelt	Corning (Corning, NY, USA)
Injektionsnadeln	Becton Dickinson (Heidelberg, DE)
Insulinspritzen BD Plastipak™ (1 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg, DE)

Kryoröhrchen und -boxen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Objektträger 3 x 1 Zoll, geputzt/gebrauchsfertig	Waldemar Knittel Glasbearbeitungsgesellschaft (Braunschweig, DE)
Parafilm [®] M	Brand (Wertheim, DE)
Pasteurpipetten aus Glas (145 mm)	Brand (Wertheim, DE)
Petrischalen 35 x 10 mm	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Pipettenspitzen (1000 μ l, 200 μ l, 10 μ l)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
ReagiergefäÙe (2 ml, 0,5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Röhrchen (50 ml, 15 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Schraubbecher 100 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Serologische Pipette (25 ml, 10 ml, 5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Spritzen BD Discardit [™] mit Luer-Ansatz (20 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg, DE)
Steril-Filter für Spritze, \varnothing 28 mm, 0,2 μ m PorengröÙe	Corning (Corning, NY, USA)

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Anti Iba1-Antikörper (Kaninchen) (# 019-19741)	Wako Chemicals (Neuss, DE)
Anti-Kaninchen Ig, biotinyliert (# RPN1004)	GE Healthcare (Solingen, DE)
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	B. Braun Melsungen (Melsungen, DE)
Avidin-Biotin-Komplex Kit, Peroxidase- konjugiert (# PK-4000)	Vector Laboratories (Peterborough, GB)
BBL [™] Trypticase [™] Soy Broth Pulver	Becton Dickinson (Heidelberg, DE)
DePeX Einbettmedium für Histologie	Serva Electrophoresis (Heidelberg, DE)
Desoxyribonuklease I (DNAse)	Worthington Biochemical (Lakewood, NJ, USA)

Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄)	Merck (Darmstadt, DE)
Diaminobenzidin (DAB)	Roche Diagnostics (Mannheim, DE)
DMEM, High Glucose, GlutaMAX™-I (4,5 g/l Glukose, ohne Pyruvat)	Gibco (Paisley, Schottland, GB)
DPBS	Gibco (Paisley, Schottland, GB)
Esel-Serum	Sigma-Aldrich Chemie (München, DE)
Fetales Kälberserum	Gibco (Paisley, Schottland, GB)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt, DE)
Gentamicin-Lösung (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie (München, DE)
Hanks' Salzlösung mit Phenolrot	Biochrom (Berlin, DE)
Ipratropiumbromidmonohydrat-Pulver	Sigma-Aldrich Chemie (München, DE)
Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %	B. Braun Melsungen (Melsungen, DE)
Löfflers Methylenblaulösung	Merck (Darmstadt, DE)
Magermilchpulver	Merck (Darmstadt, DE)
Mayers Hämalaunlösung für Mikroskopie	Merck (Darmstadt, DE)
Pen Strep (10.000 IE/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)	Gibco (Paisley, Schottland, GB)
Poly-L-Lysinhydrobromid (PLL)	Sigma-Aldrich Chemie (München, DE)
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Chemie (München, DE)
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie (München, DE)
Trypsin-Lösung (2,5 % in EDTA, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Biochrom (Berlin, DE)
Wasserstoffperoxid	Merck (Darmstadt, DE)
WST-1	Roche Diagnostics (Mannheim, DE)

2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

2.1.4.1 Medium für die murine Mikroglia-Zellkultur

Unter sterilen Bedingungen wurde DMEM mit 10 % Hitze-inaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S; 10.000 IE/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin) versetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.1.4.2 Medium für die murine Mikroglia-Zellkultur während der Phagozytose

Die Herstellung und Lagerung erfolgten wie unter 2.1.4.1 beschrieben, jedoch wurde kein P/S zugesetzt.

2.1.4.3 WST-1-Medium

Unter sterilen Bedingungen wurde das WST-1-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) 1:10 mit DMEM ohne FCS und ohne P/S verdünnt. Die Herstellung erfolgte jeweils direkt vor Gebrauch des Mediums.

2.1.4.4 Trypticase-Soja-Bouillon (TSB)

Auf dem Magnetrührer wurden 30 g BBL™ Trypticase™ Soy Broth-Pulver in 1 l destilliertem Wasser gelöst und anschließend bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.1.4.5 Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

Auf dem Magnetrührer wurden 9,55 g PBS-Pulver in 1 l H₂O dd gelöst. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.1.4.6 Phosphatpuffer

Zur Herstellung eines 20 mM Phosphatpuffers wurden 3,56 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na₂HPO₄ • 2 H₂O) in 1 l H₂O dd gelöst. Die Lösung wurde auf pH = 7 eingestellt, anschließend autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.1.4.7 Poly-L-Lysin-Lösung (PLL)

In 1 l H₂O dd wurden 100 mg Poly-L-Lysinhydrobromid gelöst und zu 200 ml in Glasflaschen abgefüllt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

2.1.4.8 DNase

Unter sterilen Bedingungen wurden 100 mg Desoxyribonuklease-I-Pulver in 20 ml Hanks' Salzlösung gelöst und zu 400 μ l aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.1.5 Anticholinergika

2.1.5.1 Ipratropiumbromid

Zur Herstellung einer 200 μ M Ipratropiumbromid-Lösung wurden unter sterilen Bedingungen 172,2 mg Ipratropiumbromidmonohydrat-Pulver in 2 ml Phosphatpuffer (20 mM, pH = 7) gelöst, steril filtriert und zu 100 μ l aliquotiert. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -20 °C.

2.1.5.2 Dendrimere

In dieser Arbeit kamen folgende, in Tabelle 2-1 aufgelistete Dendrimere zum Einsatz. Alle Dendrimere wiesen 8 funktionelle Gruppen auf (Strukturformeln s. Abbildung 1-3, S. 6).

Dendrimer-Typ	Molekulargewicht (MW) in Dalton (Da)
PAMAM-g1-DMAE	2.351
PAMAM-g1-NH ₂	1.430
PPI-g2-DMAE	1.693
PPI-g2-cho	2.098
PPI-g2-NH ₂	773

Tabelle 2-1 Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Dendrimere.

Die Dendrimer-Stammlösungen waren ein Geschenk von Prof. Dr. Jesús M. Sanz, Institut für Molekular- und Zellbiologie, Universität Miguel Hernández, Elche, Spanien.

Die Herstellung erfolgte dort wie zuvor beschrieben (Hernández-Rocamora et al. 2009). Die Stammlösungen wurden uns in Aliquots zu 2 μmol zur Verfügung gestellt. Unter sterilen Bedingungen erfolgte die Verdünnung mit 40 μl steril filtriertem Phosphatpuffer (20 mM, pH = 7) pro Aliquot auf 50 mM Lösungen, die zu 6 μl in Kryoröhrchen aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren wurden.

2.1.6 Mäuse

Die Zellen für die Mikroglia-Kultur wurden aus maximal 3 Tage alten C57BL/6N-Mäusen gewonnen, die vom European Neuroscience Institute (ENI) in Göttingen bezogen wurden.

Für die *In-vivo*-Versuche kamen 8 Wochen alte C57BL/6N-Mäuse weiblichen Geschlechts zum Einsatz, die von der Firma Charles River Laboratories International (Sulzfeld, DE) geliefert wurden.

2.1.7 *Streptococcus pneumoniae*

Die *In-vitro*-Versuche wurden mit dem unbekapselten *S. pneumoniae* R6 durchgeführt, der durch mehrere Mutationen (D39 \rightarrow R36 \rightarrow R36A \rightarrow R6) aus *S. pneumoniae* D39 hervorgegangen ist (Hoskins et al. 2001; Lanie et al. 2007). Für die intraperitoneale Infektion der Mäuse im Rahmen der *In-vivo*-Versuche kam der bekapselte Stamm D39 (Serotyp 2) zum Einsatz. Beide Stämme waren ein Geschenk von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald. Die Bakterien waren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und dienten als Stammlösung zur Herstellung frischer Inokula (s. 2.2), mit denen die Versuche durchgeführt wurden.

2.1.8 Software

cellSens Dimension 1.6	Olympus (Tokio, JP)
Easy-Fit 7.17	Tecan Deutschland (Crailsheim, DE)
Graph Pad Prism 5	GraphPad Software (La Jolla, CA, USA)
Microsoft Excel 2011 für Mac	Microsoft (Redmond, WA, USA)

2.2 Herstellung der Pneumokokken-Inokula

Zur Herstellung frischer Inokula wurden 50 μl Stamm-Inokulum (s. 2.1.7) in 5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung suspendiert. Je 1 ml der Suspension wurde auf eine Blutagarplatte aufgetragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h wurde der Bakterienrasen mit 5 ml NaCl aufgenommen, die Bakteriensuspension von Agarplatte zu Agarplatte überführt, gut durchmischt und schließlich in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Nach weiteren 24 h wurden 2 Kryoröhrchen bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und die Bakterienkonzentration des Inokulums durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf Blutagarplatten (s. 2.3.1) mit anschließender Mittelwertbildung der gezählten Kolonien bestimmt.

2.3 Quantifizierung von Pneumokokken

2.3.1 Keimkonzentrationen in Inokula und Suspensionen

Die Bestimmung der Konzentration von Pneumokokken erfolgte durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe. Dafür wurden in maximal 8 Reagiergefäße je 90 μl NaCl vorgelegt. Aus der Suspension, deren Pneumokokken-Konzentration es zu bestimmen galt, wurden 10 μl in das erste Reagiergefäß pipettiert (Verdünnung 1:10) und sorgfältig suspendiert. Aus dieser Suspension wurden wiederum 10 μl in das nächste Gefäß pipettiert. Diese Verdünnungsschritte wiederholten sich bis zum letzten Reagiergefäß. Aus jeder Verdünnungsstufe wurden 10 μl auf eine Blutagarplatte ausplattiert. Zusätzlich wurden 10 μl der unverdünnten Suspension auf die Agarplatte gegeben.

Nach Inkubation der Agarplatten für 24 h bei 37 °C wurden die Bakterienkolonien ausgezählt.

Zur Berechnung der Keimkonzentration (CFU/ml) wurde die Anzahl der gezählten Kolonien in einer Verdünnungsstufe mit dem Faktor 100 sowie mit der Zehnerpotenz der jeweiligen Verdünnungsstufe multipliziert und anschließend das arithmetische Mittel über alle Verdünnungsstufen gebildet. Verdünnungsstufen, in denen eine zu hohe Koloniedichte die Auszählung unmöglich machte, wurden nicht berücksichtigt. Um hohe Verdünnungsstufen nicht über Gebühr zu bewerten, wurden diese dann nicht mehr berücksichtigt, wenn sie mehr als 1/5 der Anzahl der in der

vorangegangenen Verdünnungsstufe gezählten Kolonien aufwiesen. (Dies hätte bedeutet, dass in der höheren Verdünnungsstufe die Keimkonzentration mehr als doppelt so hoch gewesen wäre wie in der vorherigen Verdünnungsstufe.)

2.3.2 Absolute Anzahl intrazellulärer Pneumokokken nach Phagozytose

Abweichend wurde bei der Ermittlung der absoluten Anzahl (CFU/Napf) intrazellulärer Pneumokokken nach Phagozytose und Zellyse mit 100 μ l *Aqua ad iniectabilia* verfahren: Je 50 μ l und 10 μ l wurden unverdünnt aus dem jeweiligen Napf der Gewebekulturplatte ausplattiert sowie 10 μ l wie oben beschrieben 1:10 verdünnt ausplattiert.

Die Anzahl der gezählten Kolonien aus 50 μ l Suspension wurde mit dem Faktor 2, die gezählten Kolonien aus 10 μ l Suspension mit dem Faktor 10 multipliziert. Die in der Verdünnungsstufe gezählten Kolonien wurden zusätzlich mit dem Faktor 10 multipliziert. Sofern einzelne Kolonien in den unverdünnten Stufen sichtbar waren, wurden diese immer zur Berechnung der Keimkonzentration herangezogen. Die Verdünnungsstufe wurde, wenn oben genannte Kriterien (s. 2.3.1) vorlagen, hier ebenfalls nicht berücksichtigt.

Lag die Anzahl der gezählten Kolonien aus 50 μ l unverdünnter Suspension unterhalb der Detektionsgrenze, d. h. wurden hier keine Kolonien festgestellt, wurde eine Koloniezahl von 1 CFU/Napf angenommen (1 Kolonie in dieser Stufe hätte 2 CFU/Napf bedeutet; bei 0 Kolonien sind es folglich weniger als 2 CFU/Napf).

2.4 Wachstumskurven

Zur Erfassung der Wachstumskinetik der Pneumokokken-Inokula, im Besonderen zur Bestimmung des Zeitpunktes der Phase exponentiellen Wachstums, wurde die Keimkonzentration von *S. pneumoniae* R6 während des Wachstums in TSB bei 37 °C zu bestimmten Zeitpunkten wie folgt ermittelt:

Unter sterilen Bedingungen wurden 9 ml (Ipratropium-Experimente) bzw. 2,7 ml TSB (Dendrimer-Experimente) und 500 μ l (Ipratropium-Experimente) bzw. 150 μ l (Dendrimer-Experimente) steril filtrierter Phosphatpuffer in ein Röhrchen vorgelegt. Parallel wurde das Inokulum, dessen Wachstumskinetik zu bestimmen war, in

mehreren Schritten mit TSB verdünnt. Aus der letzten Verdünnungsstufe wurden schließlich 500 μl (Ipratropium-Experimente) bzw. 150 μl (Dendrimer-Experimente) in das mit TSB und Phosphatpuffer vorbereitete Röhrchen gegeben. Die Endkonzentration der Bakterien im Röhrchen betrug 500 CFU/ml (Inokulum für Ipratropium-Versuche) bzw. 2.000 CFU/ml (Inokulum für Dendrimer-Versuche).

Die Röhrchen wurden bei 37 °C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die Suspension aus dem Inkubator entnommen, behutsam von Hand geschwenkt und die Keimkonzentration wie unter 2.3.1 beschrieben bestimmt.

2.5 Primäre murine Mikroglia-Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (Sterilbank) durchgeführt.

2.5.1 Vorbereitung der Gewebekulturflaschen

Unter sterilen Bedingungen wurden die 75 cm²-Gewebekulturflaschen mit abgewinkeltem Hals (1 Flasche für 2 Gehirne) mit 10 ml PLL pro Flasche für mindestens 30 Minuten beschickt. Danach wurden die Flaschen 3x mit jeweils 10 ml *Aqua bidest* gespült, gefolgt von einer Spülung mit 5 ml Medium (DMEM mit P/S). Schließlich wurden sie mit je 10 ml vorgewärmtem (37 °C) Medium (DMEM mit P/S) beschickt.

2.5.2 Präparation von Mikrogliazellen

Zur Gewinnung von Mikrogliazellen wurden neugeborene Mäuse (maximal 3 Tage alt) vom Typ C57BL/6N verwendet, die vom ENI Göttingen bezogen wurden. Als Arbeitsunterlage diente eine Styroporplatte, die mit Stofftüchern und Parafilm[®] bedeckt wurde, um eine desinfizierbare Oberfläche zu schaffen. Das Präparierbesteck war sterilisiert und wurde zwischen den Arbeitsschritten in 70%iger Ethanollösung aufbewahrt. Vor der Berührung mit einem Tier wurde es in PBS getaucht.

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Enthauptung mit einer Schere. Die Köpfe wurden auf den mit 70%iger Ethanollösung desinfizierten Parafilm[®] überführt (die

Desinfektion des Parafilms[®] erfolgte nach jeder Gehirnentnahme), wo sie mit einer Nadel fixiert wurden. Dort wurden Haut und Kalotte eröffnet, das Gehirn vorsichtig herausgelöst und je 2 Gehirne in eine mit Hanks' Salzlösung beschickte Petrischale auf Eis überführt.

Anschließend wurden unter dem Mikroskop die Meningen entfernt. Dazu wurden die auf Eis stehenden Petrischalen unter das Mikroskop gestellt und die Meningen mit feinen Pinzetten abpräpariert, bis sich die Gehirne als weißes Gewebe ohne rötliche, fädige Strukturen zeigten. Die fertig präparierten Gehirne wurden in ein Röhrchen mit Hanks' Salzlösung auf Eis überführt.

Die im Röhrchen gesammelten Gehirne wurden unter der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank 3x mit jeweils 10 ml Hanks' Salzlösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die überstehende Salzlösung vorsichtig abgesaugt und pro Gehirn 100 μ l Trypsin (unverdünnte Herstellerlösung) zugegeben. Das Röhrchen wurde verschraubt und auf dem Reagenzglasschüttler geschüttelt. Nach Inkubation im Wasserbad für 5 min bei 37 °C wurde es erneut auf dem Reagenzglasschüttler geschüttelt, gefolgt von weiteren 5 min Inkubation im Wasserbad. Hiernach wurde die Trypsinbehandlung durch Zugabe von 1 ml Medium pro Gehirn gestoppt. Mit einer serologischen Pipette wurde die Suspension vorsichtig resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 40 μ l DNase-Lösung pro Hirn und erneute Resuspension bis zur vollständigen Homogenität der Suspension.

Nach Zentrifugation für 10 min bei 800 rpm und 4 °C wurde der Überstand über dem Zellpellet abgesaugt und 5 ml Medium pro zu bestückender Zellkulturflasche hinzugegeben. Nach Resuspension wurden jeweils 5 ml der Suspension in eine der vorbereiteten Gewebekulturflaschen gegeben, die nach leichtem händischen Schwenken zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen in den Inkubator (37 °C, 5 % CO₂, angefeuchtete Luft) verbracht wurden.

Am nächsten Tag wurden die Zellen unter der Sterilbank je 3x mit 10 ml vorgewärmtem (37 °C) DPBS und 1x mit 5 ml vorgewärmtem Medium gewaschen. Danach wurden die Gewebekulturflaschen mit je 12 ml frischem Medium befüllt und wieder in den Inkubator gestellt. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel.

2.5.3 Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte in 75 cm²-Gewebekulturflaschen mit abgewinkeltem Hals in DMEM mit 10 % FCS und 1 % P/S (s. 2.1.4.1) im Inkubator mit angefeuchteter Luft bei 37 °C und 5 % CO₂. Ein Mediumwechsel erfolgte 2x pro Woche. Dabei wurde jede Flasche mit 12 ml frischem, vorgewärmten (37 °C) Medium befüllt.

2.5.4 Zellernte

Die erste Zellernte, der sog. 0. Abschlag, erfolgte frühestens 7 Tage nach der Präparation der Zellen. Ein konfluenter Astrozytenrasen war Voraussetzung für die erste Ernte und wurde unter dem Mikroskop beurteilt. War er vorhanden, wurden die Zellkulturflaschen 30 min auf den Schüttler gestellt, um die Mikrogliazellen vom Astrozytenrasen zu lösen. Danach wurde unter der Sterilbank das Medium mit den gelösten Mikrogliazellen abgenommen und in Röhrchen überführt. Die Gewebekulturflaschen wurden mit 12 ml frischem, vorgewärmten (37 °C) Medium beschickt und zurück in den Inkubator gestellt.

Die Röhrchen mit den geernteten Mikrogliazellen wurden für 10 min bei 900 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Pellet in einem Röhrchen wurde mit 1 - 2 ml Medium resuspendiert und zur Aufnahme eines weiteren Pellets in das nächste Röhrchen pipettiert. Auf diese Weise wurden alle Zellen in einem Röhrchen gesammelt.

Weitere Zellernten erfolgten im Wochenrhythmus. Es wurden maximal 4 Ernten durchgeführt (0. - 3. Abschlag), danach wurden die Flaschen verworfen.

2.5.5 Auszählung der Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl in der Suspension wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. 10 µl der Suspension mit den geernteten Zellen wurden mit der Pipette aufgenommen und mit 90 µl Trypanblau-Lösung (unverdünnte Herstellerlösung) vermischt (Verdünnung 1:10). Von dieser Mischung wurden jeweils 10 µl in die beiden Zählfelder mit je 4 Großquadraten der Neubauer-Zählkammer überführt. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen in den 8 Großquadraten (Großquadrat-Abmessungen: 1 mm² Fläche; 0,1 mm Tiefe; 0,1 mm³ = 0,1 µl Volumen) der

Zählkammer ausgezählt. Um die Zellzahl in einem Milliliter der Ausgangssuspension zu bestimmen, wurde die Anzahl der gezählten Zellen durch 8 dividiert und mit dem Faktor 1×10^5 multipliziert. (Division durch 8 ergibt die Anzahl der Zellen pro Großquadrat, Multiplikation mit 1×10^5 ergibt – unter Berücksichtigung der 1:10-Verdünnung – die Zahl der Zellen pro ml Ausgangssuspension.)

2.5.6 Ausplattierung

Zur experimentellen Verwendung wurden die Zellen in 96-Loch-Gewebekulturplatten ausgesät. Die Ausgangssuspension wurde dazu mit Medium entsprechend verdünnt und zu mindestens $100 \mu\text{l}$ in die Löcher der Gewebekulturplatte pipettiert. Die Zelldichte betrug 20.000 - 25.000 Zellen pro Loch.

2.6 WST-1-Zellvitalitätstest

Dieser Test beruht auf der Umsetzung von wasserlöslichem Tetrazoliumsalz (WST-1) zu Formazan durch das mitochondriale Enzym Succinatdehydrogenase. Der Umsatz erfolgt nur in Mitochondrien vitaler Zellen, sodass die umgesetzte Menge WST-1 direkt mit der Anzahl vitaler Zellen korreliert. Formazan wurde im ELISA-Reader photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt. Die Extinktion war dabei umso größer, je mehr vitale Zellen vorhanden waren bzw. je mehr WST-1 zu Formazan umgesetzt worden war. Der Test erfolgte an Zellen, die in einer 96-Loch-Gewebekulturplatte kultiviert worden waren (s. 2.5.6). Am Tag nach Zellernte und Ausplattierung in die Gewebekulturplatte erfolgte ein Mediumwechsel (s. 2.7.1). Am nächsten Tag wurde das Medium abpipettiert und die Zellen 1x mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen unter den gleichen Bedingungen, wie sie bei den Phagozytoseversuchen herrschten, für 30 min bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert: $50 \mu\text{l}$ TSB mit dem Anticholinergikum in der jeweiligen Konzentration und $150 \mu\text{l}$ DMEM (mit FCS, ohne P/S) wirkten während dieser Zeit auf die Zellen in einem Loch ein. Im Unterschied zu den Phagozytoseversuchen waren der TSB hierbei keine Pneumokokken zugesetzt. Als positive (= nicht toxische) Kontrolle wurde eine Gruppe Zellen mit DMEM (mit FCS, ohne P/S) inkubiert, als negative (= toxische) Kontrolle wurde eine Gruppe Zellen mit Triton™ X-100 (0,1%ige Lösung in DMEM

(mit FCS, ohne P/S)) inkubiert. Nach 30 min wurde der Überstand abgenommen und die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 μ l WST-1-Medium (s. 2.1.4.3) pro Loch auf die Zellen gegeben und diese für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Messung im ELISA-Reader.

Zur Ermittlung der Zellvitalität in Prozent wurde der Mittelwert der Extinktion der Löcher, in denen WST-Medium ohne Zellen vorlag, von den anderen gemessenen Extinktionswerten subtrahiert und der Mittelwert der Extinktion der Kontrollgruppe, die nur mit DMEM (mit FCS, ohne P/S) inkubiert worden war, als 100 % Zellvitalität angenommen.

2.7 Phagozytoseversuche

2.7.1 Vorbereitung der Zellen

Nach Ernte und Ausplattierung der Zellen wie oben beschrieben (s. 2.5.4 - 2.5.6) wurden diese über Nacht in den Inkubator gestellt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel: In jedes Loch wurden 250 μ l vorgewärmtes (37 °C) DMEM ohne P/S gegeben. Danach wurden die Gewebekulturplatten wieder in den Inkubator verbracht. Die Phagozytoseversuche erfolgten am Folgetag.

2.7.2 Verdünnung der Anticholinergika

Die aliquotierten Anticholinergika wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und unter sterilen Bedingungen mit steril filtriertem Phosphatpuffer auf die 20-fach höhere Konzentration verdünnt, die während des Bakterienwachstums vorliegen sollte.

2.7.3 Vorbereitung der Bakterien

Unter sterilen Bedingungen wurden 9 ml (für Ipratropium-Versuche) bzw. 2,7 ml TSB (für Dendrimer-Versuche) in Röhrchen vorgelegt.

Das Pneumokokken-Inokulum wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und in mehreren Schritten mit TSB verdünnt. Aus der letzten Verdünnungsstufe wurden schließlich 500 μ l (Ipratropium-Versuche) bzw. 150 μ l (Dendrimer-Versuche) in die vorbereiteten Röhrchen gegeben, sodass die Keimkonzentration in den Röhrchen 500 CFU/ml

(Inokulum für Ipratropium-Versuche) bzw. 2.000 CFU/ml (Inokulum für Dendrimer-Versuche) betrug.

Je nachdem, ob die Inkubation der Bakterien mit den Anticholinergika über die gesamte Wachstumsphase oder nur über die letzten 2 h der exponentiellen Wachstumsphase erfolgen sollte, wurden die Anticholinergika zu verschiedenen Zeitpunkten zugegeben:

Für eine Inkubation während des gesamten Bakterienwachstums wurden 500 μ l (Ipratropium-Versuche) bzw. 150 μ l (Dendrimer-Versuche) der zuvor verdünnten Anticholinergika zum Zeitpunkt 0 h in die mit TSB und Inokulum gefüllten Röhrrchen gegeben.

Für eine Inkubation nur während der letzten 2 h der exponentiellen Wachstumsphase wurden zum Zeitpunkt 0 h zunächst 500 μ l bzw. 150 μ l steril filtrierter Phosphatpuffer zugegeben. 2 h vor Ende des exponentiellen Wachstums (beim Inokulum für Ipratropium-Versuche nach 18 h, beim Inokulum für Dendrimer-Versuche nach 12 h) wurden aus diesen Röhrrchen 500 μ l bzw. 150 μ l abgenommen und 500 μ l bzw. 150 μ l der verdünnten Anticholinergika zugegeben.

Die Zugabe von 500 μ l bzw. 150 μ l der verdünnten Anticholinergika entspricht dabei der noch notwendigen 1:20-Verdünnung. Die Kontrollgruppe wurde mit 500 μ l bzw. 150 μ l steril filtriertem Phosphatpuffer inkubiert.

Die Röhrrchen wurden bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Vor Beginn des Wachstums (Zeitpunkt 0 h) und nach Ende des exponentiellen Wachstums (Zeitpunkt 20 h bzw. 14 h) wurde die Keimkonzentration in jedem Röhrrchen durch Ausplattieren auf Blutagarplatten bestimmt (s. 2.3.1).

2.7.4 Phagozytose

Die Phagozytoseversuche begannen, sobald die in TSB unter Anticholinergika-Einfluss gewachsenen Bakterien das Ende ihrer exponentiellen Wachstumsphase erreicht hatten (beim Inokulum für Ipratropium-Versuche nach 20 h, beim Inokulum für Dendrimer-Versuche nach 14 h).

Die Gewebekulturplatten wurden aus dem Inkubator entnommen und die Zellen unter der Sterilbank 2x mit PBS gewaschen. Danach wurden in jedes Loch 50 μ l der jeweiligen Bakteriensuspension sowie 150 μ l DMEM ohne P/S gegeben. Dies

entsprach einer Infektionsquote von ca. 220 CFU pro Mikrogliazelle in den Ipratropium-Versuchen und ca. 160 CFU pro Mikrogliazelle in den Dendrimer-Versuchen. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde der Überstand abgenommen und verworfen bzw. für zytologische Färbungen verwendet (s. 2.8). Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen, danach wurden in jedes Loch 250 µl Gentamicin-Lösung (100 µg/ml, gelöst in DMEM ohne P/S) gegeben und die Zellen für 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurde die Gentamicin-Lösung abgenommen und verworfen; zum Nachweis, dass alle extrazellulären Bakterien durch das Gentamicin abgetötet wurden, wurden aus 2 Löchern je 200 µl der Gentamicin-Lösung unverdünnt auf Agarplatten ausplattiert und im Brutschrank bei 37 °C für 24 h inkubiert.

Nach 2-maligem Waschen mit PBS erfolgte im nächsten Schritt die Lyse der Mikrogliazellen durch Zugabe von 100 µl *Aqua ad iniectabilia* pro Loch und kräftiges Durchmischen mit der Pipette.

Die Bestimmung der Anzahl der von den Mikrogliazellen bei der Phagozytose aufgenommenen Bakterien erfolgte wie unter 2.3.2 beschrieben.

2.7.5 Berechnung der Phagozytoseleistung

Alle Berechnungen zur relativen Phagozytoseleistung wurden mit dem Programm Microsoft® Excel durchgeführt.

Zur Bestimmung der relativen Phagozytoseleistung der Mikrogliazellen, die mit unter Einfluss der Anticholinergika gewachsenen Pneumokokken inkubiert worden waren, im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde wie folgt verfahren:

2.7.5.1 Phagozytoseleistung unter Ipratropium-Einfluss

Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wurde als 100 % definiert und ergab sich aus dem Quotienten vom Median der absolut in den Näpfen der Kontrollgruppe phagozytierten Bakterien (CFU/Napf) und der mittelwertigen Keimkonzentration (CFU/ml) von allen Röhrcchen, aus denen die gewachsenen Bakterien auf die Zellen gegeben worden waren (s. Formel 2-1).

$$\frac{\text{Median der phagozytierten Bakterien in der Kontrollgruppe (CFU/Napf)}}{\text{mittelwertige Bakterienkonz. von allen Gruppen (CFU/ml)}} := 100 \%$$

Formel 2-1 Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wird als 100 % definiert.

Die mittelwertige Bakterienkonzentration aller Gruppen ergab sich aus dem Mittelwert der dekadischen Logarithmen der einzelnen Keimkonzentrationen in den Röhrcchen, mit dem schließlich die Basis 10 potenziert wurde (s. Formel 2-2).

$$\text{Mittelwertige Bakterienkonz.} = 10^{\frac{\sum_{X=1}^n \log_{10} \text{Bakterienkonz. in der Gruppe } X \text{ (CFU/ml)}}{n}}$$

Formel 2-2 Formel zur Berechnung der mittelwertigen Bakterienkonzentration.

Die relative Phagozytoseleistung in einem Napf wurde dann wie folgt berechnet:

Die Anzahl der in einem Napf phagozytierten Bakterien (CFU/Napf) wurde durch die mittelwertige Bakterienkonzentration dividiert. Das Ergebnis wurde durch die als 100 % definierte Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe dividiert und mit dem Faktor 100 multipliziert. Es resultierte die relative Phagozytoseleistung in Prozent (s. Formel 2-3).

$$\begin{aligned} &\text{Rel. Phagozytoseleistung (\%)} \\ &= \frac{\text{Phagoz. Bakt. in einem Napf (CFU/Napf) / mittelw. Bakterienkonz. aller Gruppen (CFU/ml)}}{\text{Median der phagoz. Bakt. in der Kontrollgr. (CFU/Napf) / mittelw. Bakterienkonz. von allen Gruppen (CFU/ml)}} * 100 \end{aligned}$$

Formel 2-3 Formel zur Berechnung der relativen Phagozytoseleistung der Zellen in einem Loch in Ipratropium-Experimenten.

2.7.5.2 Phagozytoseleistung unter Dendrimer-Einfluss

Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wurde als 100 % definiert und ergab sich aus dem Quotienten vom Median der absolut in den Nöpfen der Kontrollgruppe phagozytierten Bakterien (CFU/Napf) und der Keimkonzentration (CFU/ml) in dem Röhrcchen, aus dem die gewachsenen Bakterien auf die Zellen der Kontrollgruppe gegeben worden waren (s. Formel 2-4).

$$\frac{\text{Median der phagozytierten Bakterien (CFU/Napf)}}{\text{Bakterienkonz. Kontrollgruppe (CFU/ml)}} := 100 \%$$

Formel 2-4 Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wird als 100 % definiert.

Die relative Phagozytoseleistung in einem Napf wurde dann wie folgt berechnet:

Die Anzahl der in einem Napf phagozytierten Bakterien (CFU/Napf) wurde durch die vor Zugabe zu den Zellen herrschende Bakterienkonzentration (CFU/ml) dividiert, die im jeweiligen Röhrchen vorlag, in dem die Bakterien unter dem Einfluss eines bestimmten Dendrimers gewachsen waren. Das Ergebnis wurde durch die als 100 % definierte Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe dividiert und mit dem Faktor 100 multipliziert. Es resultierte die relative Phagozytoseleistung in Prozent (s. Formel 2-5).

<p>Rel. Phagozytoseleistung (%)</p> $= \frac{\frac{\text{Phagoz. Bakt. in einem Napf nach Zugabe von unter Dendrimer X gewachsenen Bakt. (CFU/Napf)}}{\text{Bakterienkonz. im Röhrchen mit unter Dendrimer X gewachsenen Bakt. (CFU/ml)}}}{\frac{\text{Median der phagoz. Bakt. in der Kontrollgr. (CFU/Napf)}}{\text{Bakterienkonz. im Röhrchen der Kontrollgruppe (CFU/ml)}}} * 100$
--

Formel 2-5 Formel zur Berechnung der relativen Phagozytoseleistung der Zellen in einem Loch in Dendrimer-Experimenten.

Im Gegensatz zu den Ipratropium-Experimenten erfolgte die Berechnung der Phagozytoseleistung bei den Dendrimer-Experimenten bezogen auf die individuelle Bakterienkonzentration. Zwar beeinflussten die Dendrimere das Bakterienwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant, jedoch zeigten sich beim Vergleich der Dendrimergruppen untereinander Unterschiede, die nur knapp nicht signifikant waren (s. auch 3.3 und 4.2.3).

2.7.6 Kriterien zum Ausschluss von Phagozytoseversuchen und Einzelwerten

Bakterielle Kontamination des Mediums (DMEM) sowie Stimulation der Mikroglia (mikroskopisch typischer Phänotyp) ohne zugesetzten Stimulus führten zum Ausschluss des Versuchs.

Außerdem wurden Versuche ausgeschlossen, bei denen die Anzahl der Nöpfe, in denen die Zahl der phagozytierten Bakterien unterhalb der Nachweisgrenze lag, zu hoch war (festgelegte Grenze: ≥ 30 % der Nöpfe).

Wenn nach dem Ausplattieren der unverdünnten Stufen (50 μ l und/oder 10 μ l) aus einem Loch nach Zellyse diese auf den Agarplatten überwucherten und damit nicht zählbar waren, floss die Phagozytoseleistung dieser Zellen nicht in die Ergebnisse ein.

In einem Dendrimer-Experiment wurden alle Werte einer Gruppe ausgeschlossen, da die Bakterien im Röhrchen dieser Gruppe nicht gewachsen waren und folglich die phagozytierten Bakterien unterhalb der Detektionsgrenze lagen.

2.8 Zytologie und Immunzytochemie

2.8.1 Methylenblau-Färbung

Die Überstände aus den Löchern der Gewebekulturplatten, bestehend aus 50 μ l Bakteriensuspension und 150 μ l DMEM, wurden nach Ende der Phagozytose mit der Pipette abgenommen und auf Objektträger gegeben. Diese wurden im Brutschrank bei 37 °C getrocknet. Anschließend erfolgte die Hitzefixation, indem die Objektträger mit dem Bakterienausstrich nach oben 3x durch die obere Bunsenbrennerflamme gezogen wurden. Zur Färbung wurden die Bakterienausstriche für 5 min mit Löfflers Methylenblaulösung (unverdünnte Herstellerlösung) bedeckt und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Nach Trocknung bei Raumtemperatur wurden die gefärbten Ausstriche zur Mikroskopie mit DePeX eingedeckt.

Die zytologischen Bilder wurden unter einem Olympus BX51 Mikroskop mit der Kamera Olympus DP71 und dem Programm cellSens Dimension 1.6 (Olympus, Tokio, JP) aufgenommen.

2.8.2 Iba1-Hämalaun-Färbung

Zunächst wurden runde Deckgläser 2 - 3 h in 70 % Ethanol gewaschen, auf Filterpapier vereinzelt getrocknet und in einer Glaspetrischale für 3 h bei 180 °C sterilisiert.

Die sterilen Deckgläser wurden dann mit PLL für 1 h unter der Sterilbank inkubiert, 3x mit *Aqua bidest* gewaschen und mit einer sterilen Pinzette zum Trocknen vereinzelt.

Eine 24-Loch-Gewebekulturplatte wurde mit den beschichteten Deckgläsern bestückt und Mikrogliazellen mit einer Dichte von 150.000 Zellen pro Loch ausgesät. Nach einem Mediumwechsel am Folgetag folgte eine Phagozytose am dritten Tag, in deren Anschluss die Zellen nicht mit einer Gentamicin-Lösung, sondern für 30 min mit 4 % Formaldehyd in PBS inkubiert wurden. Nach 3-maligem Waschen mit PBS schloss sich folgende Färbung an:

Die Zellen wurden mit 0,1 % Triton™ X-100 in PBS für 30 min permeabilisiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit 3 % H₂O₂ in PBS für 10 min, gefolgt von 3-maliger PBS-Spülung. Danach wurden die Zellen für 30 min mit 5 % Esel-Serum und 0,5 % Magermilch in PBS inkubiert. Hiernach wurde der Primärantikörper (Anti-Iba1) 1:400 verdünnt für 90 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Nach 3-maligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen Ig), der 1:200 verdünnt in PBS für 60 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben wurde. Es folgte eine Spülung mit PBS (3x) und die Inkubation mit Avidin-Biotin-Komplex, der 30 min vor Gebrauch angesetzt worden war (98 µl PBS + 1 µl A + 1 µl B). Nach 3-maliger Spülung mit PBS erfolgte die Farbentwicklung durch Inkubation der Zellen mit Diaminobenzidin (DAB) für 3 Minuten. Im Anschluss erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun, das 1:2 verdünnt in PBS für 30 Sekunden auf die Zellen gegeben wurde. Nach Spülung mit *Aqua bidest* wurden die Deckgläser trocknen gelassen und abschließend mit DePeX auf Objektträgern fixiert.

Die zytologischen Bilder wurden wie unter 2.8.1 beschrieben aufgenommen.

2.9 Tierversuche

Der Einfluss auf den Krankheitsverlauf durch die Anticholinergika mit *in vitro* nachgewiesener Steigerung der Phagozytoseleistung wurde *in vivo* an Mäusen getestet, die durch intraperitoneale Injektion mit Pneumokokken infiziert worden waren.

Die Genehmigung für die Experimente wurde von der Tierschutzkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen und dem Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit erteilt.

2.9.1 Mäuse

Für die Tierversuche kamen weibliche Mäuse vom Typ C57BL/6N zum Einsatz, die von der Firma Charles River Laboratories International (Sulzfeld, DE) geliefert wurden. Die Unterbringung erfolgte in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen in Käfigen bei Raumtemperatur in einem

12-Stunden-Licht- und 12-Stunden-Dunkelzyklus. Es bestand jederzeit Zugang zu Wasser und Nahrung. Die Mäuse hatten mindestens 1 Woche Zeit, sich an ihre neue Umgebung zu gewöhnen, bevor sie im Alter von 8 Wochen infiziert wurden.

2.9.2 Infektion und Dendrimer-Applikation

2.9.2.1 Verdünnung der Dendrimere

Das Verteilungsvolumen einer Maus wurde vereinfachend mit 20 ml angenommen. Die Dendrimer-Konzentration im zentralen Kompartiment (Blut) der Maus sollte 10 μM betragen. Für 10 Mäuse wurden 44 μl der 50 mM Dendrimer-Stammlösung (g2-cho bzw. g2-NH₂) aufgetaut und mit 2,706 ml steril filtriertem Phosphatpuffer (20 mM, pH = 7) verdünnt. 250 μl dieser Lösung wurden den Mäusen 15 min vor der Infektion intraperitoneal injiziert.

2.9.2.2 Applikation der Dendrimere und Infektion

Je 10 Tiere wurden einer von 3 Gruppen zugewiesen: Den Tieren wurden 250 μl Dendrimer-Lösung (g2-cho bzw. g2-NH₂) oder steril filtrierter Phosphatpuffer 15 min vor Infektion intraperitoneal injiziert.

Die Infektion erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 250 μl 0,9%iger NaCl-Lösung mit 1×10^3 CFU (Versuch 1 und 2) bzw. 4×10^3 CFU (Versuch 3) *S. pneumoniae* D39 pro Maus.

In einem Vorversuch waren an 12 Tieren 3 verschiedene Keimkonzentrationen auf ihre Infektiosität getestet worden. Nach Infektion mit 1×10^3 CFU pro Maus waren 2 von 4 Tieren innerhalb von 3 Tagen gestorben.

2.9.3 Beurteilung der Gesundheit der Tiere

Der Gesundheitsstatus der Mäuse wurde durch Wiegen und Erhebung eines klinischen Scores nach Gerber et al. (2001) bestimmt. Die Stufen des Scores zeigt Tabelle 2-2.

Score	Klinisches Erscheinungsbild
Score 0	keine auffallende Verhaltensstörung
Score 1	moderate Lethargie (auffallend reduzierte Spontanaktivität)
Score 2	ausgeprägte Lethargie (kaum Spontanaktivität, aber das Tier läuft nach Stimulation durch den Untersucher)
Score 3	unfähig zu laufen
Score 4	tot

Tabelle 2-2 Klinischer Score zur Beurteilung der Gesundheit der Tiere nach Gerber et al. (2001).

Tiere, die sich nicht innerhalb von 30 Sekunden aus der Seitenlage selbstständig wieder aufrichten konnten oder einen Gewichtsverlust von $\geq 20\%$ zeigten, wurden durch Genickbruch getötet, um ihr Leiden nicht zu verlängern.

2.9.4 Präparation der Milz

Toten Mäusen wurde die Bauchhöhle mit einer Schere eröffnet und die Milz herauspräpariert. Nachdem die Milz mit einem Skalpell halbiert worden war, wurde eine Hälfte in einem Kryoröhrchen bei -20 °C eingefroren, die andere Hälfte wurde in ein Reagiergefäß mit $500\ \mu\text{l}$ isotoner Kochsalzlösung überführt und mit einem Stößel homogenisiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe pipettiert: $50\ \mu\text{l}$ des Homogenates wurden in ein Reagiergefäß pipettiert, in dem $450\ \mu\text{l}$ 0,9%ige NaCl-Lösung vorgelegt worden waren (Verdünnung 1:10). In gleicher Weise wurde bis zur 8. Verdünnungsstufe fortgefahren. Aus jeder Verdünnungsstufe wurden $10\ \mu\text{l}$ auf eine Blutagarplatte gegeben; aus der unverdünnten Stufe wurden zusätzlich $50\ \mu\text{l}$ auf die Agarplatte gegeben. Nach Inkubation der Blutagarplatten für 24 h bei 37 °C wurden die Bakterienkolonien ausgezählt. Die Berechnung der Keimkonzentration erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben. Die Reagiergefäße mit dem unverdünnten Homogenat wurden nach Pipettieren der Verdünnungsreihe bei -20 °C eingefroren.

Die Tierkadaver wurden vorschriftsgemäß entsorgt.

2.9.5 Umgang mit überlebenden Tieren

Tiere, die 2 Wochen nach Infektion noch lebten, wurden durch Genickbruch getötet. Im Anschluss wurde die Milz wie unter 2.9.4 beschrieben präpariert und Verdünnungsreihen ausplattiert.

2.10 Statistik

Die statistischen Auswertungen und grafischen Darstellungen wurden mithilfe der Software „Graph Pad Prism 5“ (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) erstellt.

Parametrische Daten werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt, nicht-parametrische Daten als Mediane mit 25./75.-Perzentilen. Zum Vergleich der Mittelwerte mehrerer Gruppen wurde eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) mit Korrektur nach Bonferroni verwendet. Für den Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen wurde der t-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Die Mediane mehrerer Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test mit Korrektur nach Dunns miteinander verglichen. Für den Vergleich zweier Gruppen aus nicht-parametrischen Daten wurde der U-Test nach Mann-Whitney verwendet. Der Vergleich von zwei Kaplan-Meier-Kurven erfolgte mittels Log-rank-Test.

Als statistisch signifikant different wurden Gruppen angenommen, die sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $\leq 0,05$ unterschieden. Bei den Experimenten wurden die Signifikanzniveaus entsprechend dargestellt ($p \leq 0,001$: ***; $p \leq 0,01$: **; $p \leq 0,05$: *).

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumskinetik von *S. pneumoniae* R6 in Trypticase-Soja-Bouillon

3.1.1 Inokulum für Ipratropium-Experimente

Es wurden 3 Röhrrchen mit jeweils 9,5 ml TSB und 500 μ l steril filtriertem Phosphatpuffer für 30 h bei 37 °C inkubiert. Die Pneumokokken waren auf eine initiale Keimkonzentration von 500 CFU/ml in den Röhrrchen verdünnt worden. Nach 0, 6, 12, 20, 24 und 30 Stunden wurde aus jedem Röhrrchen eine Verdünnungsreihe auf Blutagarplatten ausplattiert.

Abbildung 3-1 zeigt die Wachstumskurve des bei den Ipratropium-Versuchen verwendeten Inokulums von *S. pneumoniae* R6. Das Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurde nach 20 h erreicht. Zu diesem Zeitpunkt herrschte eine mediane Keimkonzentration von $5,7 \times 10^7$ CFU/ml (Streuung: $1,23 \times 10^7$ – $6,45 \times 10^7$ CFU/ml). Danach setzte die stationäre Phase ein.

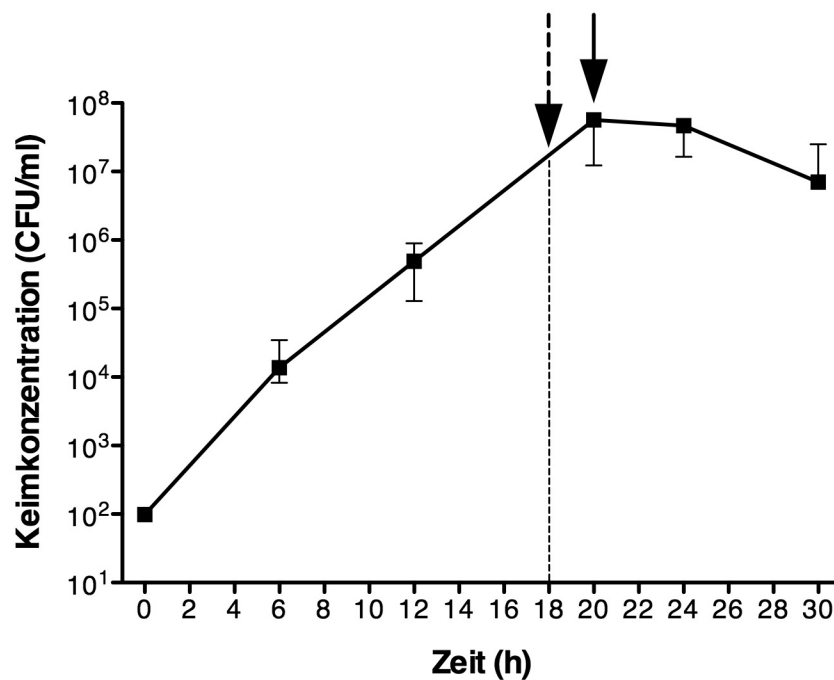


Abbildung 3-1 Wachstumskurve von *S. pneumoniae* R6 in 9,5 ml TSB und 500 µl Phosphatpuffer. Dargestellt sind die Medianwerte und die Streuung von 3 Einzelbeobachtungen. Der solide Pfeil bei 20 h markiert das Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Der gestrichelte Pfeil zeigt den Zeitpunkt 2 h vor Erreichen des Endes der exponentiellen Wachstumsphase an, in diesem Fall 18 h.

Aus dieser Wachstumskinetik ergab sich, dass zum Erreichen des maximal möglichen Effektes von Ipratropium auf das Pneumokokkenwachstum eine Co-Inkubation für 20 h vom Beginn des Bakterienwachstums an zu erfolgen hatte. Für eine Co-Inkubation während der letzten 2 h der exponentiellen Wachstumsphase musste das Ipratropium 18 h nach Beginn des Wachstums zu den Pneumokokken gegeben werden. Nach 20 h Wachstum wurden die Bakterien zur Phagozytose auf die Mikrogliazellen gegeben.

3.1.2 Inokulum für Dendrimer-Experimente

In 2 Versuchen wurden jeweils 3 Röhrchen mit je 2,7 ml TSB und 150 µl steril filtriertem Phosphatpuffer für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Pneumokokken waren auf eine initiale Keimkonzentration von 2.000 CFU/ml in den Röhrchen verdünnt worden. Nach 0, 17, 18, 19, 20 und 24 Stunden (in Abb. 3-2 grau dargestellt) bzw. nach 0, 12, 14, 16, 18, 20, 22 und 24 Stunden (in Abb. 3-2 schwarz dargestellt) wurde aus jedem Röhrchen eine Verdünnungsreihe auf Blutagarplatten ausplattiert.

Abbildung 3-2 zeigt die Wachstumskurve des bei den Dendrimer-Versuchen verwendeten Inokulums von *S. pneumoniae* R6. Nach 12 h herrschte eine mediane Keimkonzentration von $4,2 \times 10^6$ CFU/ml (Streuung: $2,2 \times 10^6$ - $6,0 \times 10^6$ CFU/ml). Das Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurde nach 14 h erreicht; zu diesem Zeitpunkt herrschte eine mediane Keimkonzentration von $4,3 \times 10^7$ CFU/ml (Streuung: $1,6 \times 10^7$ - $4,7 \times 10^7$ CFU/ml). Danach setzte die stationäre Phase ein.

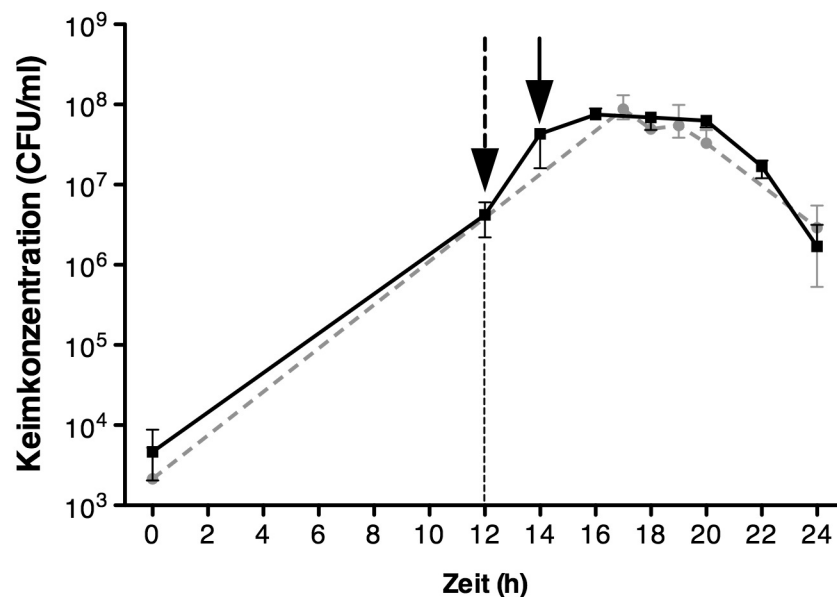


Abbildung 3-2 Wachstumskurve von *S. pneumoniae* R6 in 2,7 ml TSB und 150 μ l Phosphatpuffer. Dargestellt sind die Medianwerte und die Streuung von je 3 Einzelbeobachtungen. Die Bestimmung der Keimkonzentration erfolgte nach 0, 17, 18, 19, 20 und 24 Stunden (**graue Linie**) bzw. nach 0, 12, 14, 16, 18, 20, 22 und 24 Stunden (**schwarze Linie**). Der solide Pfeil bei 14 h markiert das Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Der gestrichelte Pfeil zeigt den Zeitpunkt 2 h vor Erreichen des Endes der exponentiellen Wachstumsphase an, hier 12 h.

Zum Erreichen des maximal möglichen Effektes der Dendrimere auf das Pneumokokkenwachstum hatte eine Co-Inkubation für 14 h vom Beginn des Bakterienwachstums an zu erfolgen. Für eine Co-Inkubation während der letzten 2 h der exponentiellen Wachstumsphase mussten die Dendrimere 12 h nach Beginn des Wachstums zu den Pneumokokken gegeben werden. Nach 14 h Wachstum wurden die Bakterien zur Phagozytose auf die Mikrogliazellen gegeben.

3.2 Beeinflussung der Zellvitalität durch die Anticholinergika, Phosphatpuffer und TSB

Mittels WST-Zellvitalitätstest wurde die Toxizität der Substanzen untersucht, denen die Mikrogliazellen während der 30-minütigen Phagozytose ausgesetzt waren. Dazu wurden die Zellen für 30 min mit den gleichen Substanzen inkubiert wie während der Phagozytose, wobei die Anticholinergika in der jeweils höchsten Konzentration untersucht wurden, die in den Phagozytoseversuchen eingesetzt wurde. Im Unterschied zu den Phagozytoseversuchen wurden keine Pneumokokken zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 3 h mit WST-Medium inkubiert und danach die Extinktion im ELISA-Reader gemessen. Die Zellvitalität der mit DMEM (mit FCS, ohne P/S) inkubierten Zellen wurde als 100 % angenommen.

Abbildung 3-3 zeigt die Zellvitalität in Prozent nach Inkubation der Zellen mit den Substanzen, wie sie in den Phagozytoseversuchen eingesetzt wurden. Die Mittelwerte der Gruppen, die denen in den Phagozytoseversuchen entsprechen, und der Mittelwert der mit DMEM inkubierten Kontrollgruppe unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p = 0,807$).

Die Werte der Gruppe, in der das WST-Medium in leere, d. h. nicht mit Zellen bestückte Löcher gegeben wurde, lagen nahe bei den Werten der Gruppe, in der die Zellen mit Triton™ X-100 (negative Kontrolle) behandelt wurden.

Wie diese Ergebnisse zeigen, wurde die Zellvitalität nicht durch die verwendeten Chemikalien (Phosphatpuffer, TSB, Ipratropium und Dendrimere) in den in dieser Arbeit untersuchten maximalen Konzentrationen beeinflusst.

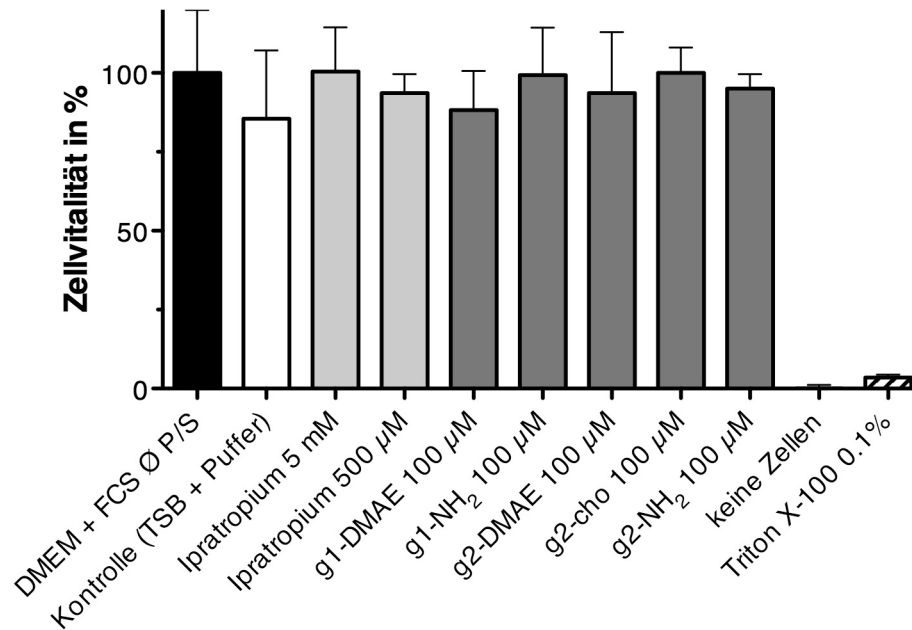


Abbildung 3-3 Zellvitalität von Mikrogliazellen nach Inkubation mit den in den Phagozytoseversuchen verwendeten Substanzen in maximaler Konzentration für 30 Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte + Standardabweichung von 4 Einzelbeobachtungen. Die Zellvitalität der mit DMEM inkubierten Kontrollgruppe wurde als 100 % angenommen.

3.3 Einfluss der Anticholinergika auf das Bakterienwachstum

Um den Einfluss der Anticholinergika in den verschiedenen Konzentrationen auf das Wachstum der Pneumokokken festzustellen, wurde aus den Röhrcchen, in denen die Bakterien gewachsen waren, vor Zugabe der Bakteriensuspension auf die Mikrogliazellen jeweils eine Verdünnungsreihe auf Blutagarplatten ausplattiert, um die Keimkonzentrationen zu bestimmen, denen die Mikrogliazellen der einzelnen Gruppen während der Phagozytose ausgesetzt waren.

3.3.1 Einfluss von Ipratropium auf das Pneumokokkenwachstum

Abbildung 3-4 zeigt die Keimkonzentrationen in den Röhrcchen, die zu Beginn des Wachstums mit einer Keimkonzentration von 500 CFU/ml beimpft worden waren, nach 20 h Bakterienwachstum unter Ipratropium-Einfluss, unmittelbar bevor aus diesen Röhrcchen jeweils 50 µl Bakteriensuspension zur Phagozytose auf die Mikrogliazellen gegeben wurden.

Die Mediane der logarithmierten Keimkonzentrationen der einzelnen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p = 0,468$). Das Bakterienwachstum wurde somit nicht durch die Anwesenheit von Ipratropium in den untersuchten Konzentrationen beeinflusst, weder bei der Inkubation mit Ipratropium über 20 h, noch bei der Inkubation über 2 h.

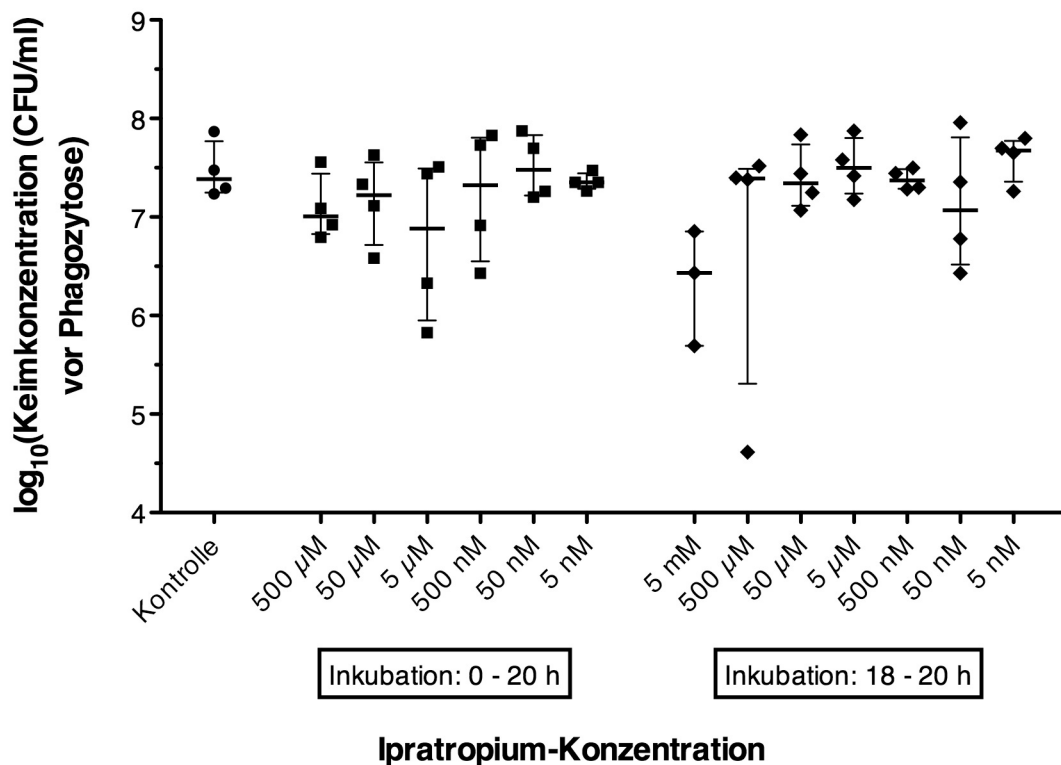


Abbildung 3-4 Einfluss von Ipratropium auf das Wachstum von *S. pneumoniae* R6. Das Ipratropium wurde entweder direkt zu Beginn des Wachstums in die Röhrrchen gegeben (Inkubation 0 - 20 h) oder nur für die letzten 2 h der exponentiellen Wachstumsphase (Inkubation 18 - 20 h). Die Keimkonzentrationen wurden logarithmiert und sind einzeln dargestellt. Neben den Einzelwerten sind jeweils die Mediane mit 25./75.-Perzentilen dargestellt.

3.3.2 Einfluss der Dendrimere auf das Pneumokokkenwachstum

Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6 zeigen die Keimkonzentrationen in den Röhrrchen, die zu Beginn des Wachstums mit einer Keimkonzentration von 2.000 CFU/ml beimpft worden waren, nach 14 h Bakterienwachstum unter Dendrimer-Einfluss, unmittelbar bevor aus diesen Röhrrchen jeweils 50 μ l Bakteriensuspension zur Phagozytose auf die Mikrogliazellen gegeben wurden.

Verglichen wurden die Mediane der logarithmierten Keimkonzentrationen in den Röhrcchen der funktionalisierten Dendrimere (g1-DMAE, g2-DMAE bzw. g2-cho), der zugehörigen nicht-funktionalisierten Dendrimere (g1-NH₂ bzw. g2-NH₂) und der Kontrollgruppe, die mit Phosphatpuffer inkubiert worden war – getrennt für eine Inkubation über 14 h (0 - 14 h, s. Abb. 3-5) und über 2 h (12 - 14 h, s. Abb. 3-6).

Außerdem wurden die Mediane der logarithmierten Keimkonzentrationen der jeweils höchsten Konzentration (100 µM) nach 14 h und 2 h Co-Inkubation miteinander verglichen, um herauszufinden, ob die Dauer der Co-Inkubation das Bakterienwachstum beeinflusst.

Gruppen mit nur einer Einzelbeobachtung wurden beim Vergleich nicht berücksichtigt.

3.3.2.1 Inkubation von 0 - 14 h

Beim Vergleich von g1-DMAE, g1-NH₂ und der Kontrollgruppe konnten keine signifikant verschiedenen Mediane gefunden werden ($p = 0,533$).

Ebenso ließ der Vergleich von g2-DMAE, g2-NH₂ und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede der Mediane erkennen ($p = 0,740$).

Beim Vergleich von g2-cho, g2-NH₂ und der Kontrollgruppe zeigte sich eine deutliche, wenn auch statistisch nicht signifikante Beeinflussung des Bakterienwachstums unter dem Einfluss der Dendrimere ($p = 0,052$; beim Vergleich nicht berücksichtigt: g2-cho 0,1 µM und g2-NH₂ 0,1 µM).

Obwohl die statistische Auswertung zeigte, dass die Dendrimere das Bakterienwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant beeinflusst hatten, entschieden wir uns dazu, die Phagozytoseleistung bei den Dendrimer-Experimenten bezogen auf die individuelle Bakterienkonzentration zu berechnen, da unter Einfluss von g2-cho die statistische Signifikanz nur knapp verfehlt wurde und wir einen möglichen wachstumshemmenden Effekt nicht unter Gebühr berücksichtigen wollten (s. auch 4.2.3).

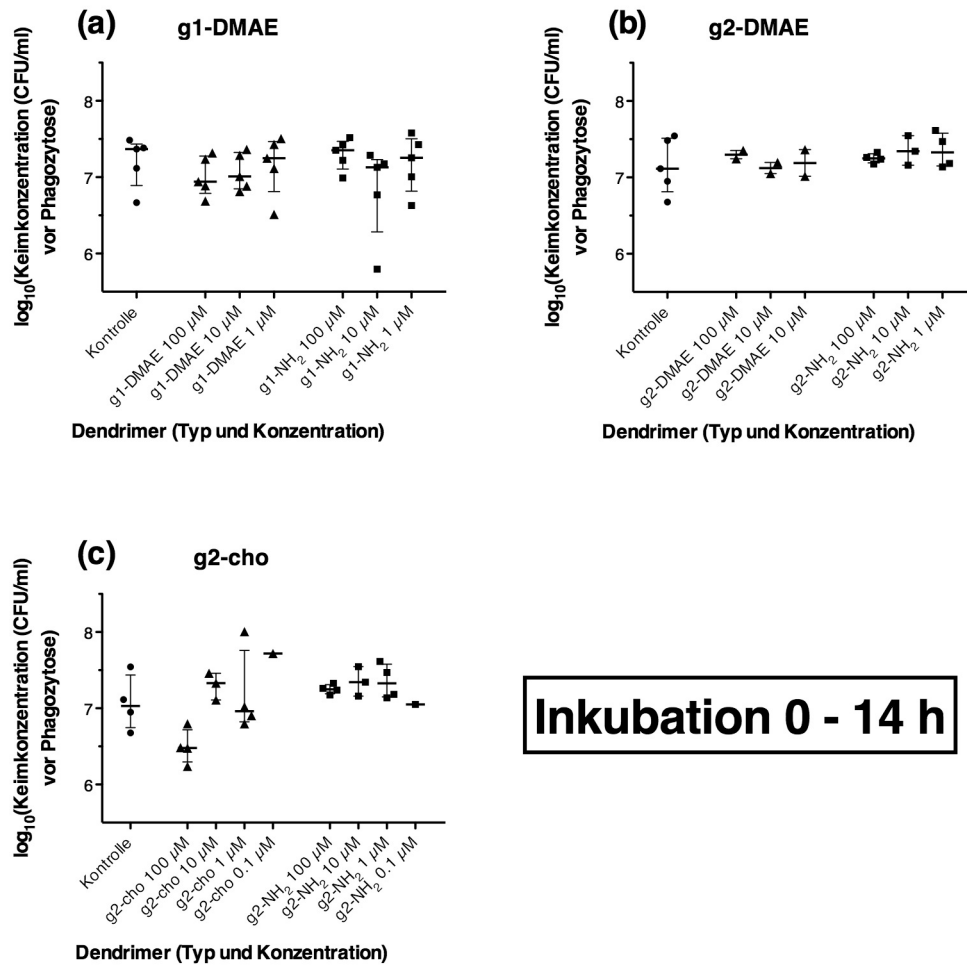


Abbildung 3-5 Beeinflussung des Bakterienwachstums durch Dendrimere bei einer Inkubation über 14 Stunden (0 - 14 h). Dargestellt sind die logarithmierten Keimkonzentrationen als Einzelwerte sowie die Mediane mit 25./75.-Perzentilen. **(a)** g1-DMAE und g1-NH₂. **(b)** g2-DMAE und g2-NH₂. **(c)** g2-cho und g2-NH₂.

3.3.2.2 Inkubation von 12 - 14 h

Beim Vergleich von g1-DMAE, g1-NH₂ und der Kontrollgruppe konnten keine signifikant verschiedenen Mediane gefunden werden ($p = 0,708$).

Der Vergleich von g2-DMAE, g2-NH₂ und der Kontrollgruppe ergab ebenfalls keine signifikanten Differenzen zwischen den Medianen ($p = 0,566$; beim Vergleich nicht berücksichtigt: g2-DMAE in allen Konzentrationen).

Auch der Vergleich von g2-cho, g2-NH₂ und der Kontrollgruppe wies keine signifikant differenten Mediane aus ($p = 0,155$; beim Vergleich nicht berücksichtigt: g2-cho 0,1 μM und g2-NH₂ 0,1 μM).

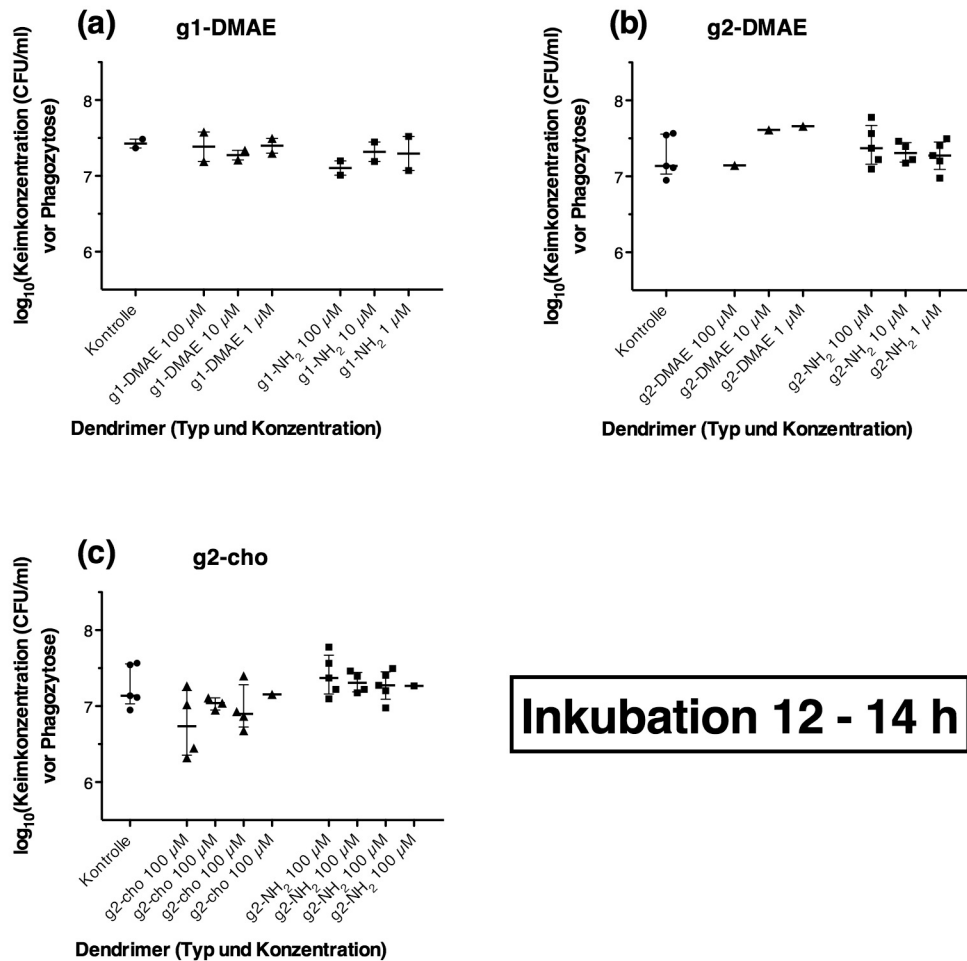


Abbildung 3-6 Beeinflussung des Bakterienwachstums durch Dendrimere bei einer Inkubation über 2 Stunden (12 - 14 h). Dargestellt sind die logarithmierten Keimkonzentrationen als Einzelwerte sowie die Mediane mit 25./75.-Perzentilen. **(a)** g1-DMAE und g1-NH₂. **(b)** g2-DMAE und g2-NH₂. **(c)** g2-cho und g2-NH₂.

3.3.2.3 Unterschiede der Keimkonzentrationen nach 14 und 2 h Co-Inkubation

Die in Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6 dargestellten Keimkonzentrationen nach 14 h und 2 h Co-Inkubation mit einem Dendrimer in einer Konzentration von 100 μM wurden mittels U-Test verglichen. Sie unterschieden sich nicht signifikant voneinander (g1-DMAE 100 $\mu\text{M}_{0-14\text{h}}$ vs. g1-DMAE 100 $\mu\text{M}_{12-14\text{h}}$, $p = 0,381$; g1-NH₂ 100 $\mu\text{M}_{0-14\text{h}}$ vs. g1-NH₂ 100 $\mu\text{M}_{12-14\text{h}}$, $p = 0,381$; g2-cho 100 $\mu\text{M}_{0-14\text{h}}$ vs. g2-cho 100 $\mu\text{M}_{12-14\text{h}}$, $p = 0,686$; g2-NH₂ 100 $\mu\text{M}_{0-14\text{h}}$ vs. g2-NH₂ 100 $\mu\text{M}_{12-14\text{h}}$, $p = 0,556$).

3.4 Einfluss der Inkubation von Pneumokokken mit Anticholinergika während ihres Wachstums auf die Phagozytoseleistung muriner Mikrogliazellen

Nachdem die Pneumokokken in TSB gewachsen waren und dabei über die gesamte Wachstumsphase oder nur über die letzten 2 h der exponentiellen Wachstumsphase mit den Anticholinergika inkubiert worden waren, wurden die Bakterien zur Phagozytose auf die Mikrogliazellen gegeben. Nach 30 min Phagozytose wurde das Medium mit verbliebenen Bakterien entfernt und an den Mikrogliazellen adhärierende, nicht phagozytierte (= extrazelluläre) Bakterien durch Inkubation der Zellen mit Gentamicin abgetötet. Danach wurden die Mikrogliazellen mit *Aqua ad iniectabilia* lysiert und die Anzahl phagozytierter (= intrazellulärer) Pneumokokken durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen auf Blutagarplatten bestimmt. Die Phagozytoseleistung der mit Phosphatpuffer inkubierten Kontrollgruppe wurde als 100 % definiert.

3.4.1 Phagozytoseleistung unter dem Einfluss von Ipratropium

Beim Vergleich der Phagozytoseleistungen der Gruppen, deren Pneumokokken unter dem Einfluss von Ipratropium in verschiedenen Konzentrationen gewachsen waren, mit der Kontrollgruppe, in der die Pneumokokken während des Wachstums in TSB mit einer geringen Menge Phosphatpuffer inkubiert worden waren, wurde aufgrund der Ergebnisse aus 3.3.1, die zeigten, dass Ipratropium in den von uns verwendeten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf das Bakterienwachstum hatte, eine in allen Gruppen identische Keimkonzentration nach 20 h Bakterienwachstum angenommen.

Abbildung 3-7 zeigt die Phagozytoseleistungen der Mikrogliazellen in Prozent im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zellen, denen Pneumokokken zur Phagozytose angeboten wurden, die während der gesamten Wachstumsphase (0 - 20 h) mit Ipratropium inkubiert worden waren, zeigten keine signifikant verschiedene Bakterienaufnahme verglichen mit der Kontrollgruppe (Kontrolle 100 % (62,79/141,30) vs. alle anderen Gruppen, $p > 0,05$).

Von den Zellen, denen Pneumokokken zugegeben wurden, die nur während der letzten 2 h der exponentiellen Wachstumsphase (18 - 20 h) mit Ipratropium inkubiert

worden waren, zeigten diejenigen eine signifikant niedrigere Phagozytoserate, denen Pneumokokken zugegeben wurden, die während ihres Wachstums mit 5 mM Ipratropium inkubiert worden waren (Kontrolle 100% (62,79/141,30) vs. 5 mM 11,11 % (10,28/31,25), $p \leq 0,05$). Bei allen anderen Konzentrationen unterschied sich die relative Phagozytoseleistung nicht signifikant von der der Kontrollgruppe (Kontrolle vs. alle anderen Gruppen, $p > 0,05$).

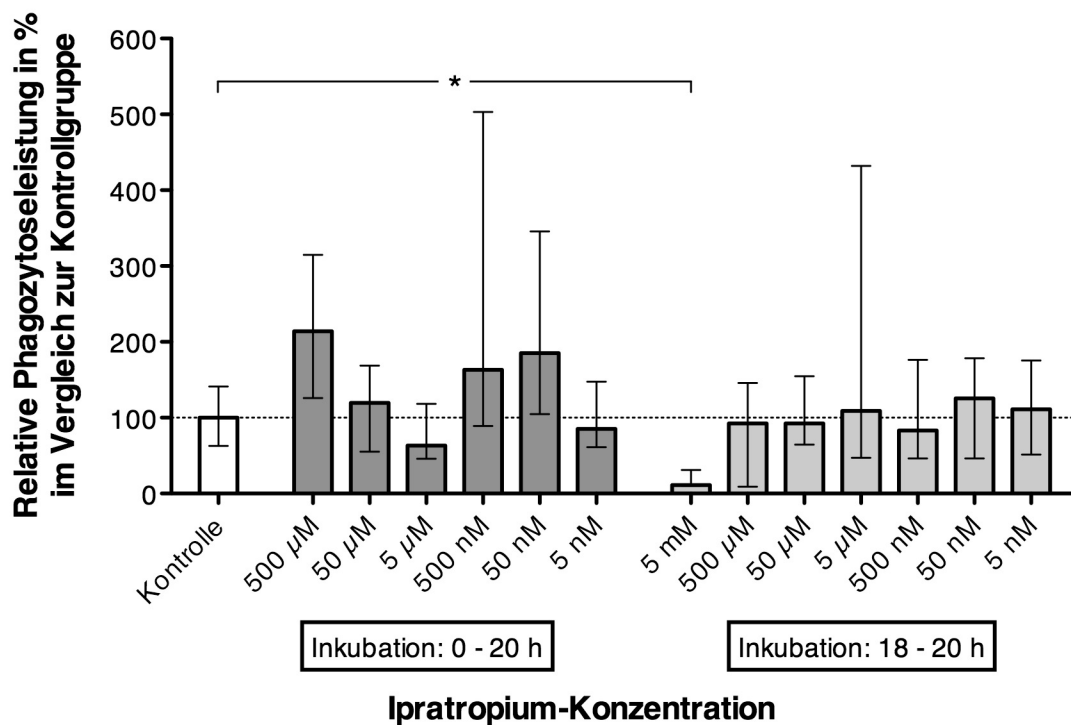


Abbildung 3-7 Relative Phagozytoseleistung in Prozent von Mikrogliazellen, denen Pneumokokken zur Phagozytose angeboten wurden, die mit Ipratropium in verschiedenen Konzentrationen während der gesamten Wachstumsphase (0 - 20 h) oder nur während der letzten 2 Stunden der exponentiellen Wachstumsphase (18 - 20 h) inkubiert worden waren. Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wurde als 100 % definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen von 16 Einzelbeobachtungen (bzw. 12 Einzelbeobachtungen in der Gruppe 5 mM).

3.4.2 Phagozytoseleistung unter dem Einfluss von Dendrimeren

Beim Vergleich der Phagozytoseleistungen der Gruppen, deren Pneumokokken unter dem Einfluss ausgewählter Dendrimere in verschiedenen Konzentrationen gewachsen waren, mit der Kontrollgruppe, in der die Pneumokokken während des Wachstums mit Phosphatpuffer inkubiert worden waren, wurden aufgrund der

Ergebnisse aus 3.3.2 die individuellen Keimkonzentrationen, denen die Zellen während der Phagozytose ausgesetzt waren, berücksichtigt.

Innerhalb der gleichen Dendrimer-Generation (g1 bzw. g2) wurden jeweils die mit DMAE oder Cholin funktionalisierten Dendrimere und die nicht funktionalisierten Dendrimere mit der Kontrollgruppe verglichen – getrennt für eine Co-Inkubation während der gesamten Wachstumsphase (0 - 14 h) oder nur während der letzten 2 h der exponentiellen Wachstumsphase (12 - 14 h) der Pneumokokken.

3.4.2.1 Einfluss von g1-DMAE und g1-NH₂

Zellen, denen Pneumokokken zur Phagozytose angeboten wurden, die während der gesamten Wachstumsphase (0 - 14 h) mit g1-DMAE inkubiert worden waren, zeigten keine signifikant verschiedene Bakterienaufnahme verglichen mit der Kontrollgruppe (Kontrolle vs. g1-DMAE in allen Konzentrationen, $p > 0,05$).

Pneumokokken, die während der gesamten Wachstumsphase (0 - 14 h) mit 100 μM g1-NH₂ inkubiert worden waren, wurden signifikant weniger phagozytiert als die mit Phosphatpuffer inkubierten Pneumokokken der Kontrollgruppe (Kontrolle 100 % (67,02/146,20) vs. g1-NH₂ 100 μM 48,61 % (32,84/86,20), $p \leq 0,05$). Die Bakterienaufnahme in den Gruppen „g1-NH₂ 10 μM “ und „g1-NH₂ 1 μM “ unterschied sich nicht signifikant von der der Kontrollgruppe (Kontrolle vs. g1-NH₂ 10 μM und 1 μM , $p > 0,05$).

Nach einer Inkubation der Pneumokokken während der letzten 2 h der exponentiellen Wachstumsphase (12 - 14 h) mit den Dendrimeren g1-DMAE und g1-NH₂ zeigten sich keine signifikant verschiedenen Phagozytoseleistungen verglichen mit der Kontrollgruppe (Kontrolle vs. g1-DMAE und g1-NH₂ in allen Konzentrationen, $p > 0,05$).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-8 zusammengefasst dargestellt.

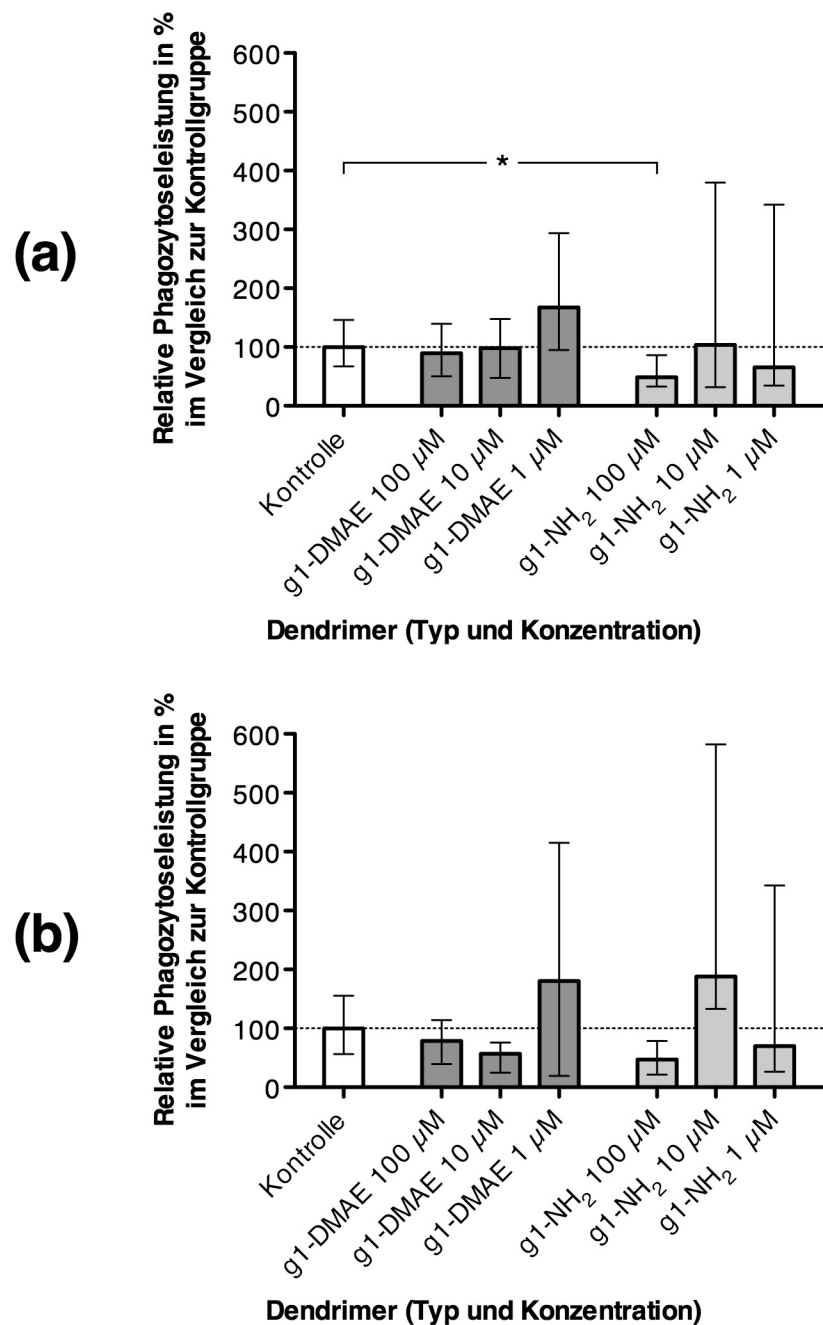


Abbildung 3-8 Relative Phagozytoseleistung in Prozent von Mikrogliazellen, denen Pneumokokken zur Phagozytose angeboten wurden, die mit Dendrimeren (g1-DMAE bzw. g1-NH₂) in verschiedenen Konzentrationen inkubiert worden waren. Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wurde als 100 % definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen. **(a)** Inkubation mit Dendrimeren während der gesamten Wachstumsphase (0 - 14 h). Kontrolle n = 32, g1-DMAE 100 µM n = 31, g1-DMAE 10 µM n = 32, g1-DMAE 1 µM n = 32, g1-NH₂ 100 µM n = 32, g1-NH₂ 10 µM n = 22, g1-NH₂ 1 µM n = 32. **(b)** Inkubation mit Dendrimeren nur während der letzten 2 Stunden der exponentiellen Wachstumsphase (12 - 14 h). Kontrolle n = 8, g1-DMAE 100 µM n = 8, g1-DMAE 10 µM n = 8, g1-DMAE 1 µM n = 8, g1-NH₂ 100 µM n = 8, g1-NH₂ 10 µM n = 7, g1-NH₂ 1 µM n = 8.

3.4.2.2 Einfluss von g2-DMAE und g2-NH₂

Pneumokokken, die während der gesamten Wachstumsphase (0 - 14 h) mit 100 μ M oder 1 μ M g2-DMAE inkubiert worden waren, wurden von den Mikrogliazellen signifikant weniger phagozytiert verglichen mit der Kontrollgruppe (Kontrolle 100 % (63,64/160,00) vs. g2-DMAE 100 μ M 8,06 % (6,03/31,17), $p \leq 0,01$; Kontrolle vs. g2-DMAE 1 μ M 18,81 % (12,47/43,34), $p \leq 0,05$). Zellen, denen Pneumokokken zugegeben wurden, die während der gesamten Wachstumsphase mit 10 μ M g2-DMAE inkubiert worden waren, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikant verschiedene Phagozytoseleistung (Kontrolle vs. g2-DMAE 10 μ M, $p > 0,05$). Ebenso unterschied sich die Phagozytoseleistung der Mikroglia, denen Pneumokokken zugegeben wurden, die von Beginn an unter dem Einfluss von g2-NH₂ gewachsen waren, nicht signifikant von der der Kontrollgruppe (Kontrolle vs. g2-NH₂ in allen Konzentrationen, $p > 0,05$).

Nach einer Inkubation der Pneumokokken während der letzten 2 h der exponentiellen Wachstumsphase (12 - 14 h) mit den Dendrimeren g2-DMAE und g2-NH₂ zeigten sich keine signifikant verschiedenen Phagozytoseleistungen verglichen mit der Kontrollgruppe (Kontrolle vs. g2-DMAE und g2-NH₂ in allen Konzentrationen, $p > 0,05$).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-9 zusammengefasst dargestellt.

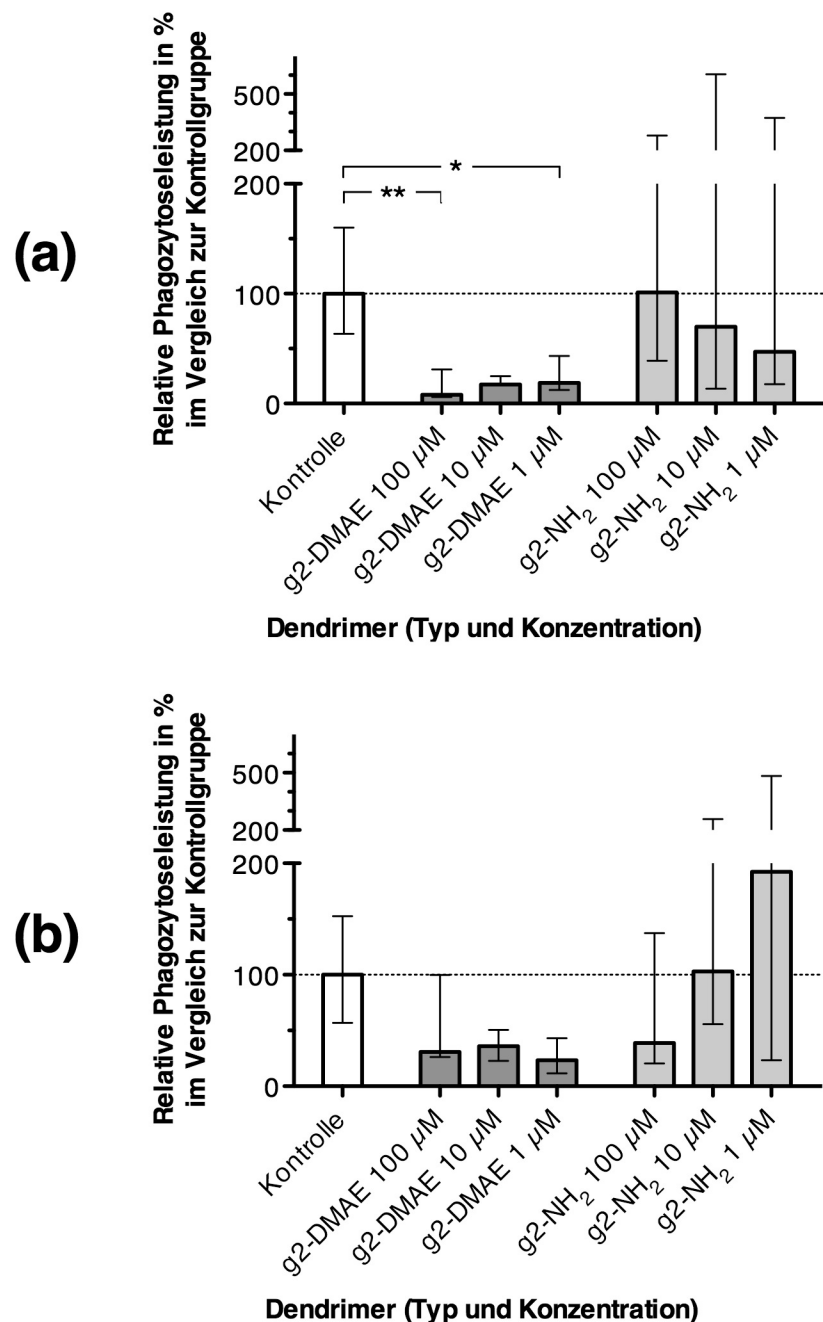


Abbildung 3-9 Relative Phagozytoseleistung in Prozent von Mikrogliazellen, denen Pneumokokken zur Phagozytose angeboten wurden, die mit Dendrimeren (g2-DMAE bzw. g2-NH₂) in verschiedenen Konzentrationen inkubiert worden waren. Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wurde als 100 % definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen. **(a)** Inkubation mit Dendrimeren während der gesamten Wachstumsphase (0 - 14 h). Kontrolle n = 8, g2-DMAE 100 μM n = 8, g2-DMAE 10 μM n = 8, g2-DMAE 1 μM n = 8; g2-NH₂ 100 μM n = 8, g2-NH₂ 10 μM n = 7, g2-NH₂ 1 μM n = 8. **(b)** Inkubation mit Dendrimeren nur während der letzten 2 Stunden der exponentiellen Wachstumsphase (12 - 14 h). Kontrolle n = 22, g2-DMAE 100 μM n = 6, g2-DMAE 10 μM n = 6, g2-DMAE 1 μM n = 6; g2-NH₂ 100 μM n = 21, g2-NH₂ 10 μM n = 17, g2-NH₂ 1 μM n = 20.

3.4.2.3 Einfluss von g2-cho und g2-NH₂

Für den mittelbaren Einfluss von g2-cho auf die Phagozytoseleistung der Mikrogliazellen konnte bei Inkubation der Pneumokokken mit g2-cho über die gesamte Wachstumsphase (0 - 14 h) eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung gezeigt werden (s. Abb. 3-10a). Die Phagozytoseleistung unter Einfluss von 100 μM g2-cho war signifikant höher als die der Kontrollgruppe (Kontrolle 100 % (40,00/160,00) vs. g2-cho 100 μM 1.476 % (839,30/4.648,00), $p \leq 0,001$). Auch wenn in der grafischen Darstellung klar eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennbar ist, waren die Phagozytoseleistungen unter Einfluss von 10, 1 und 0,1 μM g2-cho nicht signifikant verschieden von der der Kontrollgruppe (Kontrolle vs. g2-cho 10, 1 und 0,1 μM , $p > 0,05$). Die Phagozytoseleistungen unter Einfluss von g2-cho wiesen zudem sehr große Schwankungen auf.

Die Inkubation der Pneumokokken mit g2-NH₂ während der gesamten Wachstumsphase hatte keinen signifikanten Effekt auf die Phagozytoseleistung (Kontrolle vs. g2-NH₂ in allen Konzentrationen, $p > 0,05$).

Wurden die Pneumokokken nur während der letzten 2 h der exponentiellen Wachstumsphase (12 - 14 h) mit g2-cho inkubiert, waren die Phagozytoseleistungen unter Einfluss von 100 und 1 μM g2-cho signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Kontrolle 100 % (56,93/152,50) vs. g2-cho 100 μM 491,10 % (399,30/1.021,00), $p \leq 0,001$; Kontrolle vs. g2-cho 1 μM 242,70 % (161,80/516,10), $p \leq 0,05$). Die mediane Phagozytoseleistung unter Einfluss von 10 μM g2-cho war geringer als unter Einfluss von 1 μM g2-cho, sodass sich die Dosis-Wirkungs-Beziehung, wie sie bei Co-Inkubation über die gesamte Wachstumsphase gefunden wurde, hier nicht wiederfinden ließ. Die Phagozytoseleistung unter Einfluss von 10 und 0,1 μM g2-cho unterschied sich zudem nicht signifikant von der der Kontrollgruppe (Kontrolle vs. g2-cho 10 und 0,1 μM , $p > 0,05$).

Die Inkubation der Pneumokokken mit g2-NH₂ während der letzten 2 h der Wachstumsphase hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Phagozytoseleistung (Kontrolle vs. g2-NH₂ in allen Konzentrationen, $p > 0,05$).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-10 zusammengefasst dargestellt.

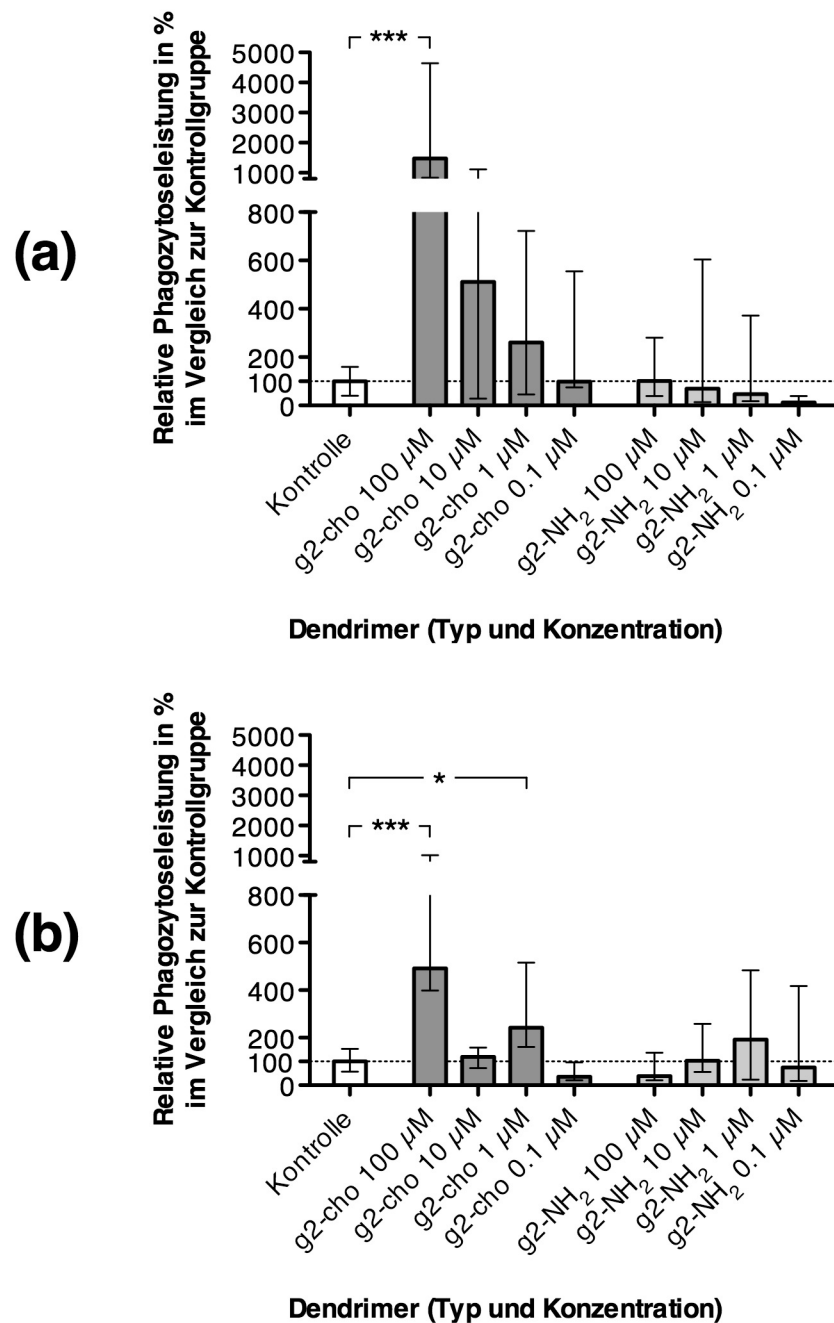


Abbildung 3-10 Relative Phagozytoseleistung in Prozent von Mikrogliazellen, denen Pneumokokken zur Phagozytose angeboten wurden, die mit Dendrimeren (g2-cho bzw. g2-NH₂) in verschiedenen Konzentrationen inkubiert worden waren. Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wurde als 100 % definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen. **(a)** Inkubation mit Dendrimeren während der gesamten Wachstumsphase (0 - 14 h). Kontrolle n = 15, g2-cho 100 μM n = 14, g2-cho 10 μM n = 10, g2-cho 1 μM n = 14, g2-cho 0.1 μM n = 3, g2-NH₂ 100 μM n = 14, g2-NH₂ 10 μM n = 10, g2-NH₂ 1 μM n = 14, g2-NH₂ 0.1 μM n = 4. **(b)** Inkubation mit Dendrimeren nur während der letzten 2 Stunden der exponentiellen Wachstumsphase (12 - 14 h). Kontrolle n = 22, g2-cho 100 μM n = 17, g2-cho 10 μM n = 13, g2-cho 1 μM n = 15, g2-cho 0.1 μM n = 6, g2-NH₂ 100 μM n = 21, g2-NH₂ 10 μM n = 17, g2-NH₂ 1 μM n = 20, g2-NH₂ 0.1 μM n = 7.

Die intrazellulären Bakterien nach Phagozytose illustriert Abbildung 3-11: Waren die Pneumokokken unter Einfluss von Phosphatpuffer (= Kontrolle) gewachsen, befanden sich nach Phagozytose in den Mikrogliazellen keine Kokkenketten (s. Abb. 3-11a). Im Gegensatz dazu waren in den Mikrogliazellen, denen Pneumokokken zur Phagozytose angeboten worden waren, die unter Einfluss von $100 \mu\text{M}$ g2-cho zu Ketten gewachsen waren, kurze Kokkenketten zu beobachten (s. Abb. 3-11b).

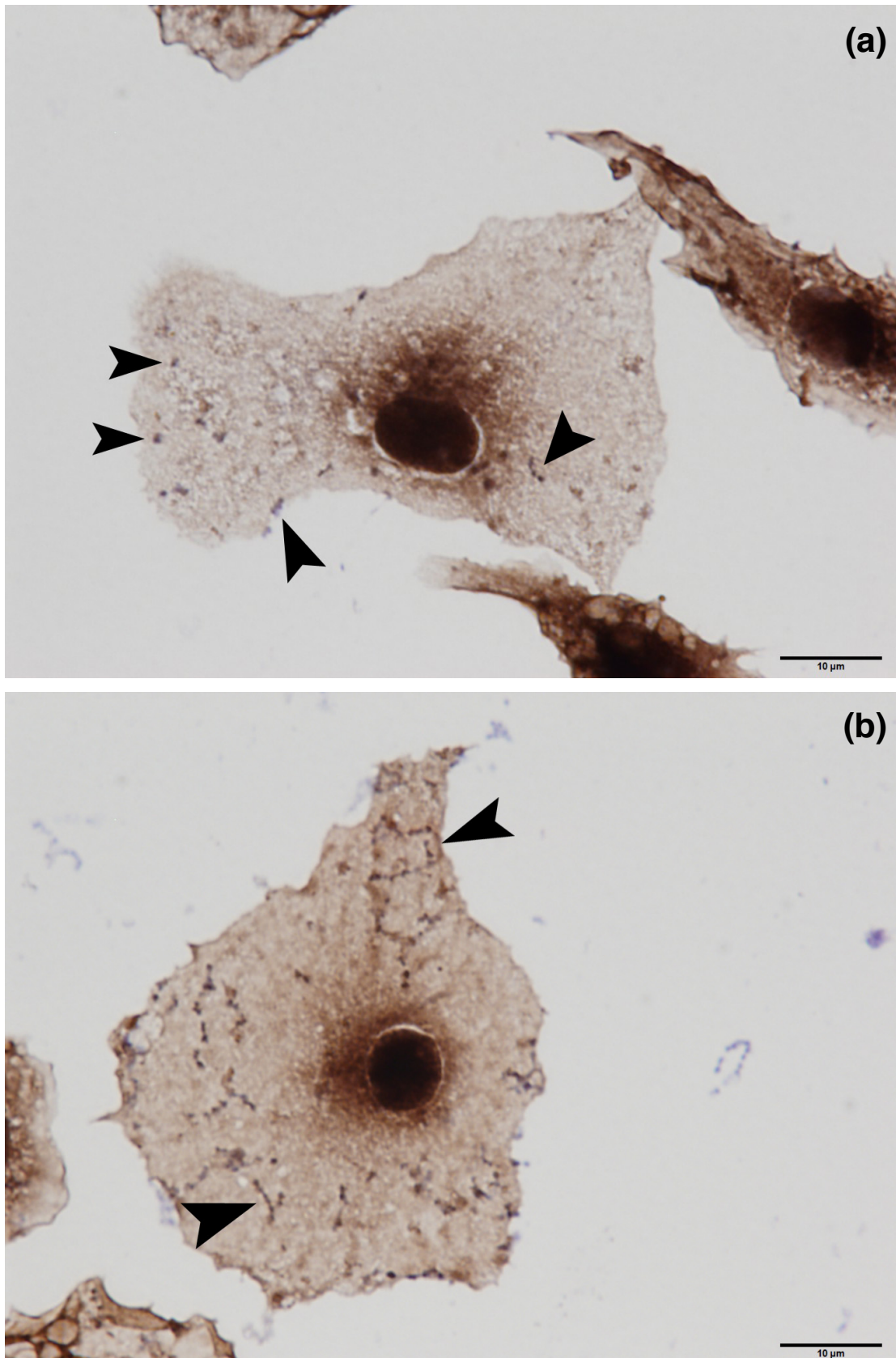


Abbildung 3-11 Iba1-Hämalaun-Färbung von Mikrogliazellen, die Pneumokokken phagozytiert haben. Die Pneumokokken sind blau gefärbt. **(a)** Die intrazellulären Pneumokokken sind unter Einfluss von Phosphatpuffer (= Kontrolle) gewachsen und liegen intrazellulär nicht als Ketten vor (s. Pfeile). **(b)** Die Pneumokokken sind unter Einfluss von 100 μM g2-cho gewachsen. Man erkennt deutlich, dass die Pneumokokken auch intrazellulär als Ketten vorliegen (s. Pfeile). Messbalken: 10 μm .

3.5 Einfluss der Anticholinergika auf die Bakterienmorphologie

Nach der Phagozytose wurden die Überstände aus den Löchern der Gewebekulturplatte der zytologischen Färbung zugeführt.

Abbildung 3-12 zeigt exemplarisch die zytologischen Färbungen der Überstände nach Phagozytose aus den Gruppen „Kontrolle“ (Inkubation mit Phosphatpuffer) (a), „Ipratropium 500 μM 0 - 20 h Inkubation“ (b), „g2-cho 100 μM 0 - 14 h Inkubation“ (c und d), „g2-NH₂ 100 μM 0 - 14 h Inkubation“ (e) und „g2-DMAE 100 μM 14 h Inkubation“ (f).

Unter dem Einfluss von g2-cho in einer Konzentration von 100 μM bei einer Co-Inkubation über 14 h kam es dabei zur Ausbildung deutlich längerer Kokken-Ketten im Vergleich zur mit Phosphatpuffer inkubierten Kontrollgruppe und zur mit dem nicht-funktionalisierten Dendrimer (g2-NH₂ 100 μM) inkubierten Gruppe. Es konnte außerdem beobachtet werden, dass die Anzahl langer Kokken-Ketten und deren Länge mit der Konzentration und der Inkubationsdauer von g2-cho korreliert: Je höher die Konzentration von g2-cho und je länger die Co-Inkubation dauerte, desto mehr lange Kokken-Ketten waren zu finden und desto länger waren die Ketten. Unter dem Einfluss von 500 μM Ipratropium (0 - 20 h), 100 μM g2-NH₂ (0 - 14 h) und 100 μM g2-DMAE (0 - 14 h) bildeten sich Kokken-Ketten, die verglichen mit denen aus der Kontrollgruppe teilweise länger waren, jedoch nicht die Länge der Ketten aus der Gruppe „g2-cho 100 μM “ erreichten.

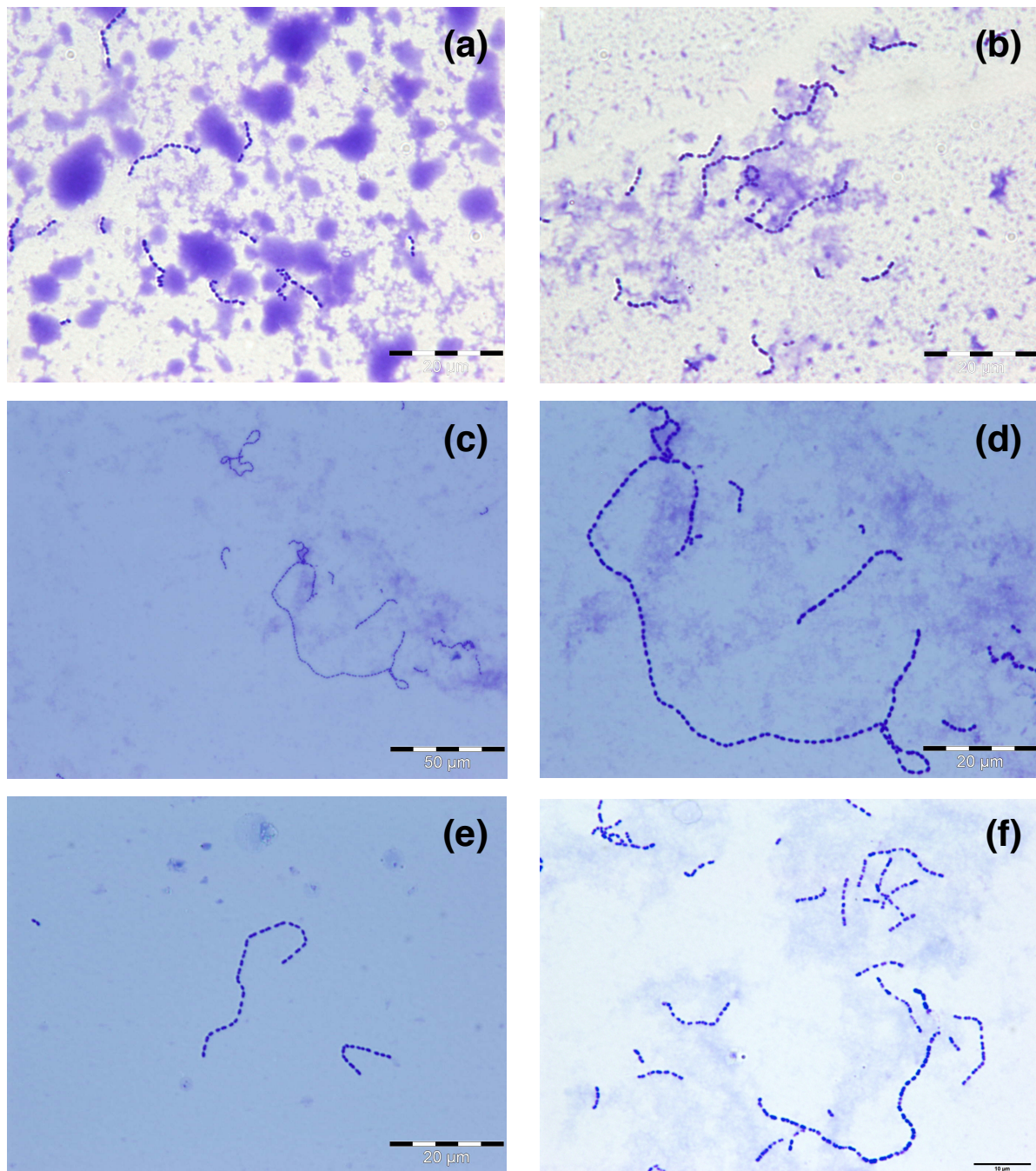


Abbildung 3-12 Zytologische Färbungen der Überstände mit Methyleneblau nach der Phagozytose. Länge der Messbalken: 10 μm in f; 20 μm in a, b, d und e; 50 μm in c. **(a)** Kontrollgruppe, die über 20 h mit Phosphatpuffer inkubiert wurde. **(b)** Pneumokokken nach Inkubation mit 500 μM Ipratropium über 20 h. **(c)** Pneumokokken nach Inkubation mit 100 μM g2-cho über 14 h. **(d)** Ausschnittsvergrößerung aus (c). **(e)** Pneumokokken nach Inkubation mit 100 μM g2-NH₂ über 14 h. **(f)** Pneumokokken nach Inkubation mit 100 μM g2-DMAE über 14 h.

3.6 Einfluss von g2-cho-Dendrimeren auf den Krankheitsverlauf nach Infektion mit *S. pneumoniae* D39 *in vivo*

Um herauszufinden, ob die Dendrimere, für die *in vitro* eine Steigerung der Phagozytoseleistung von Mikrogliazellen gefunden wurde, den Krankheitsverlauf nach Infektion mit *S. pneumoniae* durch intraperitoneale Injektion günstig beeinflussen, wurde 8 Wochen alten C57BL/6N-Mäusen vor ihrer Infektion mit *S. pneumoniae* D39 entweder Phosphatpuffer (n = 3 x 10), g2-cho (n = 3 x 10) oder g2-NH₂ (n = 2 x 10) intraperitoneal 15 min vor Infektion injiziert. Die Dendrimere sollten dabei unter Annahme eines Verteilungsvolumens von 1 l/kg und einer geringen Eliminationskonstante eine Konzentration von 10 µM im zentralen Kompartiment (Blut) der Maus erreichen. Die Tiere wurden nach Infektion regelmäßig gewogen und der klinische Score bestimmt. Nach dem Tod wurde die Milz homogenisiert und zur Bestimmung der Keimkonzentration auf Blutagarplatten ausplattiert.

3.6.1 Überleben

Abbildung 3-13 zeigt die Kaplan-Meier-Kurve aus 3 Experimenten. In der mit Phosphatpuffer behandelten Kontrollgruppe überlebten 16 von 30 Tieren (53,33 %), in der mit g2-cho behandelten Gruppe überlebten 17 von 30 Tieren (56,33 %) und in der mit g2-NH₂ behandelten Gruppe überlebten 9 von 20 Tieren (45,00 %). Die Behandlung mit g2-cho führte dabei zu keinem signifikanten Unterschied in der Überlebenszeit und Sterblichkeit im Vergleich zur mit Puffer behandelten Kontrollgruppe (Phosphatpuffer vs. g2-cho, p = 0,751; Log-rank-Test).

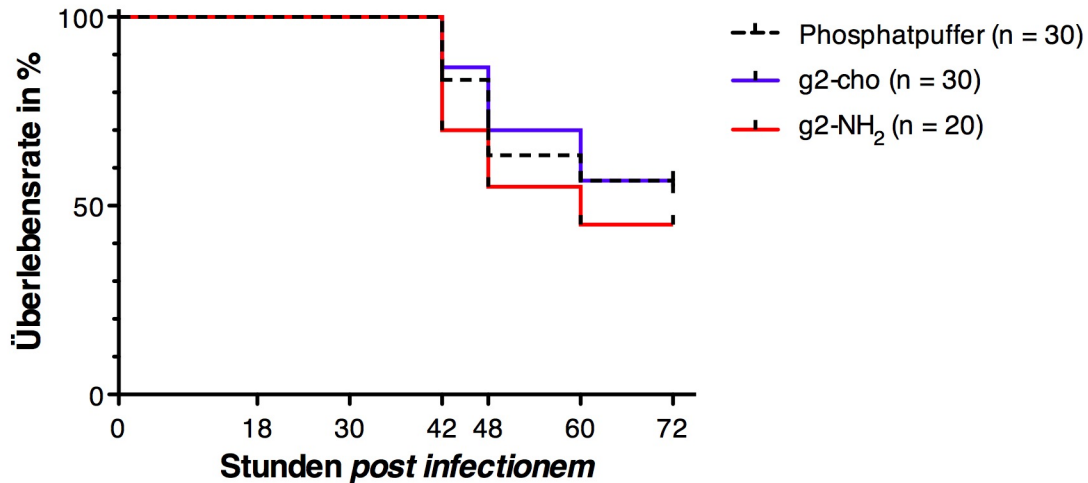


Abbildung 3-13 Kaplan-Meier-Kurve aus 3 Experimenten. Die Behandlung mit g2-cho führte zu keinem signifikanten Unterschied in der Überlebenszeit und der Sterblichkeit im Vergleich zur mit Puffer behandelten Kontrollgruppe.

3.6.2 Krankheitsverlauf: Gewicht

Die Tiere wurden vor der Infektion sowie 18 h *post infectionem* und dann alle 12 bzw. 6 h gewogen. Abbildung 3-14 zeigt den Gewichtsverlauf nach Infektion.

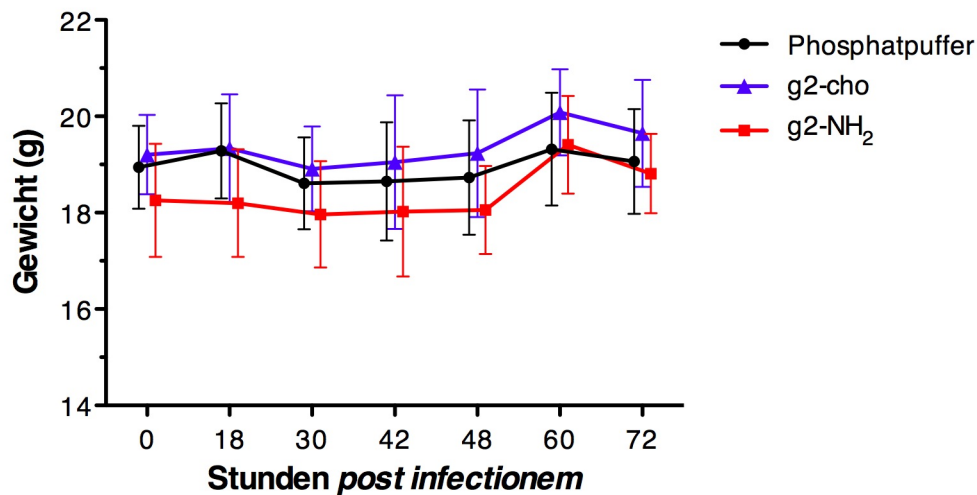


Abbildung 3-14 Gewichtsverlauf nach Infektion mit *S. pneumoniae* D39. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Tote und getötete Tiere wurden nicht mehr berücksichtigt. Zur besseren Übersicht sind die Datenpunkte leicht gegeneinander versetzt dargestellt. Aus 3 Experimenten sind die Beobachtungszeitpunkte wie folgt zusammengefasst worden: 18 h (12,5 - 22,5 h), 30 h (26 - 30 h), 42 h (42,5 - 45,5 h), 48 h (47 - 49 h), 60 h (47 - 60 h) und 72 h (68 - 70,5 h).

Die Gewichtsabnahme während des Krankheitsverlaufs, dargestellt in Abbildung 3-15, zeigte keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen ($p = 0,596$).

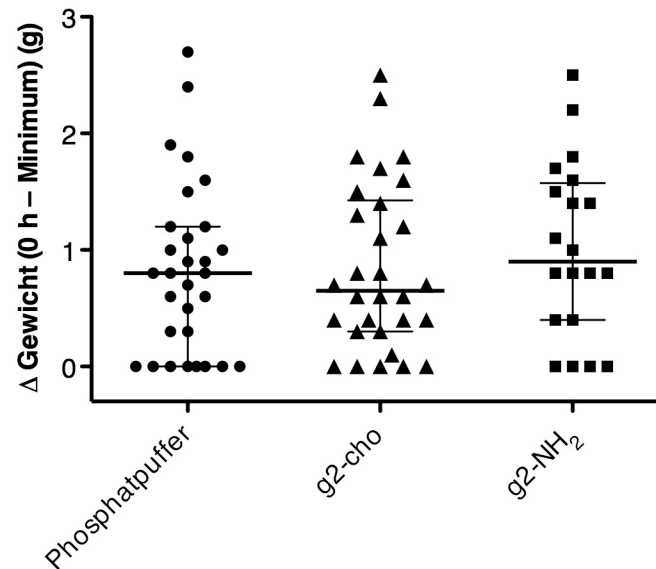


Abbildung 3-15 Gewichtsverlust nach Infektion. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen sowie die Einzelwerte der Gewichtsabnahme vom Gewicht vor der Infektion und dem Minimalgewicht während des Krankheitsverlaufs vor dem Tod.

3.6.3 Krankheitsverlauf: Klinischer Score

Der klinische Score (s. 2.9.3) wurde zu den gleichen Zeitpunkten *post infectionem* beurteilt, zu denen die Mäuse auch gewogen wurden. Er ist in Abbildung 3-16 im zeitlichen Verlauf dargestellt. Zu keinem Zeitpunkt waren die Mediane des klinischen Scores der Gruppen signifikant different.

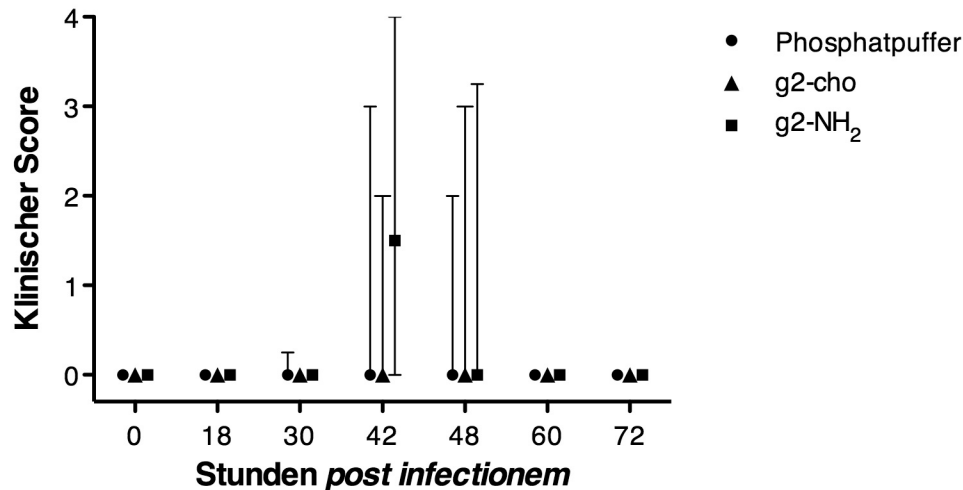


Abbildung 3-16 Klinischer Score im zeitlichen Verlauf. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen. Nachdem ein Tier den Score 4 (= tot) erreicht hatte, wurde es im weiteren Verlauf nicht mehr berücksichtigt. Zu keinem Zeitpunkt waren die Mediane des klinischen Scores der Gruppen signifikant different. Zur besseren Übersicht sind die Datenpunkte leicht gegeneinander versetzt dargestellt.

3.6.4 Intralienale Keimkonzentration von *S. pneumoniae* nach Tod durch Infektion

Die Milz der durch Infektion gestorbenen Tiere wurde hälftig homogenisiert. Das Homogenat wurde in einer Verdünnungsreihe auf Blutagarplatten ausplattiert. Abbildung 3-17 zeigt die ermittelten Keimkonzentrationen. Die Konzentrationen von *S. pneumoniae* D39 in den Milzhomogenaten zeigten keine signifikanten Differenzen ($p = 0,486$).

In den Milzhomogenaten der Tiere, die nicht durch die Infektion gestorben waren und nach 2 Wochen getötet wurden, lag die Konzentration von *S. pneumoniae* D39 unterhalb der Nachweisgrenze von 20 CFU/ml.

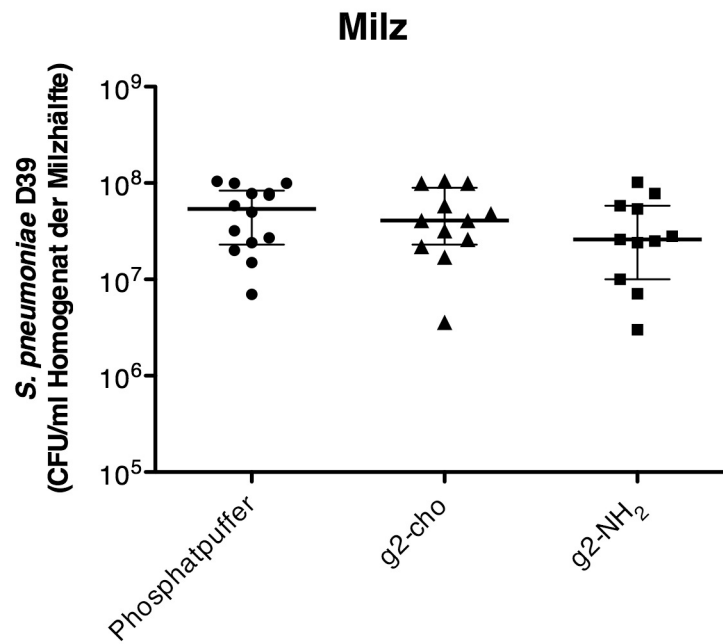


Abbildung 3-17 Konzentration von *S. pneumoniae* D39 im Homogenat einer Milzhälfte von durch Infektion gestorbenen Tieren. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25.75.-Perzentilen sowie die Einzelwerte der ermittelten Keimkonzentrationen. Es ließen sich keine signifikanten Differenzen zwischen den Keimkonzentrationen feststellen ($p = 0,486$; Kruskal-Wallis-Test).

4 Diskussion

Steigende Antibiotikaresistenzen und die Limitation verfügbarer Vakzine auf einige Serotypen von *S. pneumoniae* erfordern neue Ansätze in der antimikrobiellen Therapie (Cartwright 2002; STIKO 2012a; STIKO 2012b; Liu et al. 2013).

Cholin-bindende Proteine (CBPs), die gemeinsames Merkmal aller Pneumokokkenstämme sind (Maestro et al. 2007; Hernández-Rocamora et al. 2009), sind für die Virulenz von *S. pneumoniae* essenziell und vermitteln unter anderem Zellseparation nach Ende der Zellteilung, Adhäsion an Wirtsgewebe und Autolyse mit konsekutiver Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren (Sanchez-Puelles et al. 1986; Rosenow et al. 1997; García P et al. 1999; Gosink et al. 2000; López et al. 2000; Zhang et al. 2000; Fernández-Tornero et al. 2001; Bergmann und Hammerschmidt 2006). Da Anticholinergika unspezifisch alle CBPs, also mehrere Virulenzfaktoren gleichzeitig inhibieren, ist mit einer Ausbildung von Resistenzen ihnen gegenüber nicht zu rechnen (Fernández-Tornero et al. 2001). CBPs könnten daher einen vielversprechenden Angriffspunkt bei der Entwicklung neuer antimikrobieller Wirkstoffe darstellen.

Die Aktivität von CBPs kann durch einen Überschuss an Cholin inhibiert werden, woraufhin es unter anderem zur Bildung langer Kokkenketten kommt. Die dazu notwendige Konzentration ist jedoch für einen therapeutischen Einsatz zu hoch (Maestro et al. 2007; Hernández-Rocamora et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es durch Co-Inkubation von Pneumokokken während ihres Wachstums mit potenten Anticholinergika, die in therapeutisch vertretbaren Dosen eingesetzt werden können, zu einer gesteigerten Phagozytoserate kommt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde dazu zunächst die Wachstumskinetik der verwendeten Inokula in TSB bestimmt. In den sich anschließenden Phagozytoseversuchen, für die ein bestehendes Phagozytoseprotokoll für in Kultur gewachsene Bakterien etabliert wurde, wurden die Pneumokokken während ihres gesamten Wachstums – im Sinne einer prophylaktischen Gabe der Anticholinergika – oder nur während der letzten 2 Stunden der exponentiellen Wachstumsphase – im Sinne einer Behandlung manifester Infektionen – mit den Anticholinergika inkubiert. Um einen möglichen toxischen Effekt der bei den Phagozytoseversuchen eingesetzten Substanzen auf die Mikrogliazellen auszuschließen, wurde nach

Co-Inkubation von Mikrogliazellen mit den unterschiedlichen Anticholinergika ein WST-Zellvitalitätstest durchgeführt, dem die Phagozytoseversuche mit Mikrogliazellen von C57BL/6N-Mäusen folgten. Schließlich wurden die sich in den Phagozytoseversuchen als phagozytosesteigernd erwiesenen Anticholinergika im Sepsismodell der Maus getestet. Nach Infektion wurden die Mäuse zur Bewertung des Krankheitsverlaufs regelmäßig gewogen und der klinische Score bestimmt. Die Todeszeitpunkte wurden festgehalten und die Keimkonzentration im Blut der durch die Infektion gestorbenen Tiere durch Ausplattieren von Milzhomogenaten bestimmt. Die Beweggründe für die Auswahl der Anticholinergika und ihrer Konzentration, die angewandten Methoden sowie die aus den Versuchen gewonnenen Erkenntnisse sollen nachfolgend diskutiert werden.

4.1 Auswahl der Anticholinergika und Konzentrationen

Um die CBPs wirkungsvoll mit Cholin zu inhibieren, sind hohe Konzentrationen im millimolaren Bereich nötig, die einen therapeutischen Einsatz wegen zu hoher Nebenwirkungen verbieten (Maestro et al. 2007; Hernández-Rocamora et al. 2009).

4.1.1 Ipratropium

Diesem Umstand Rechnung tragend untersuchten Maestro und Mitarbeiter Cholinanaloga auf ihre Affinität zu und ihren inhibitorischen Effekt auf CBPs (Maestro et al. 2007). Dabei stellte sich Ipratropium als hoch affin heraus. Während sich bei Sättigung mit Cholin 2 Bindungsstellen verschiedener Affinität darstellten (hochaffin und wenig affin), die erst bei 10 mM Cholin gesättigt waren, zeigten alle Bindungsstellen gegenüber Ipratropium eine hohe Affinität und waren im Fall des von ihnen untersuchten freien LytA bereits bei 2 mM Ipratropium gesättigt.

Bei Zugabe sehr geringer Mengen Cholin zu LytA und LytC kommt es zunächst zu einer Steigerung der Aktivität dieser beiden CBPs (Briese und Hakenbeck 1985; Maestro et al. 2007). Erst die Zugabe größerer Mengen Cholin führt zu einer Inhibition. In sehr geringen Konzentrationen steigerte auch Ipratropium zunächst die Aktivität von LytA, jedoch war die Konzentration, ab der Ipratropium zu einer Inhibition von LytA führte, im Vergleich zur dazu benötigten Cholin-Konzentration

geringer. Bei LytC konnten Maestro et al. keine gesteigerte Aktivität durch geringe Konzentrationen von Ipratropium beobachten. LytB, das neben LytA für die Zellseparation am Ende der Zellteilung verantwortlich ist und dessen Defizienz oder Inhibition zur Bildung sehr langer Kokkenketten führt (García P et al. 1999), unterliegt keiner Aktivierung nach Zugabe geringer Mengen Cholin (Hernández-Rocamora et al. 2009). Eine vollständige Inhibition der CBP-Aktivität erreichten Maestro et al. bei den untersuchten CBPs mit Ipratropium-Konzentrationen von 5 mM (LytA) bzw. 10 mM (LytB).

Bei der Untersuchung des Ipratropium-Einflusses auf wachsende Pneumokokkenkulturen beschreiben Maestro et al. eine totale Limitation bzw. eine starke Reduktion des Wachstums in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe von 20 mM Ipratropium. Im Vergleich dazu kam es nach Zugabe von 50 mM Cholin nicht zu einer negativen Beeinflussung des Bakterienwachstums, jedoch zur Bildung langer Kokkenketten. Diese stellten sich unter Ipratropium-Einfluss nicht dar, stattdessen wurden morphologisch unförmige Kokken (Ausbeulungen, verschiedene Größen) in kurzen Ketten (6 - 10 Zellen, „mediumlange“ Ketten) beobachtet. Maestro et al. schließen daraus, dass durch eine eventuell andere Konformationsänderung der CBPs nach Bindung von Ipratropium die CBPs nicht bloß inhibiert werden, sondern toxische Eigenschaften entfalten oder dass Ipratropium seine toxischen Eigenschaften auf andere, noch unbekannte Art und Weise entwickelt.

Da jedoch bei den Versuchen von Maestro et al. das Bakterienwachstum durch die gewählte Ipratropium-Konzentration verhindert wurde, wäre es ebenso möglich, dass die CBPs zwar inhibiert wurden, sich diese Inhibition aber nicht in der Bildung von langen Kokkenketten zeigen konnte, da eine Zellseparation erst nach Zellteilung stattfinden kann, die durch die hohe Ipratropium-Konzentration offensichtlich verhindert wurde. Eine totale Inhibition von CBPs konnten Maestro et al. bereits für Ipratropium-Konzentrationen von 5 bzw. 10 mM zeigen, weshalb wir es für sinnvoll erachteten, geringere Ipratropium-Konzentrationen, die nicht zur Inhibition des Wachstums, sondern nur zur Inhibition der CBPs führen sollten, auf ihren Einfluss auf die Phagozytose zu untersuchen. Dabei orientierten wir uns an den Ergebnissen von Ensing et al. zur Pharmakokinetik von Ipratropium. Nach intravenöser Gabe von 2 mg Ipratropiumbromid konnte eine maximale Plasmakonzentration von ca. 100 μ M gemessen werden, die nach 1 h auf ca. 5 nM abgefallen war. Nach oraler Gabe von

20 mg betrug die Plasmakonzentration maximal ca. 5 nM. Nach Inhalation von 2 mg Ipratropium konnte nur innerhalb der ersten Stunde Ipratropium im Plasma nachgewiesen werden. Trotzdem war die Bioverfügbarkeit nach Inhalation am größten. Zudem zeigte sich die Bioverfügbarkeit nach Gabe verschiedener oraler Dosen konstant für den jeweiligen Probanden, sodass die Absorption nicht durch intestinale, gesättigte Transporter limitiert ist und höhere Dosen zu einer höheren Plasmakonzentration führen würden (Ensing et al. 1989). Vor diesem Hintergrund erschienen uns Konzentrationen des Ipratropiums im Wirtsorganismus von 5 nM bis maximal 5 mM für vertretbar und erforschenswert.

4.1.2 Dendrimere

Die schwache Bindung zwischen Cholin und einer einzelnen Cholin-Bindungsstelle eines CBP (Medrano et al. 1996; Maestro et al. 2007) zeigt die Notwendigkeit zum Eingehen mehrerer dieser schwachen Bindungen auf, ein Phänomen, das als „Multivalenz“ bezeichnet wird (Mammen et al. 1998) und im Fall der CBPs zu einer ausreichend starken Anhaftung an die Pneumokokkenoberfläche führt.

Dem Vorbild der multivalenten Präsentation des Cholins durch TAs und LTAs in der Bakterienzellwand folgend, funktionalisierten Hernández-Rocamora et al. PPI-Dendrimere verschiedener Generationen mit Cholin und untersuchten deren Affinität zu CBPs (Hernández-Rocamora et al. 2009). Eine Aktivierung von LytA und LytC, wie sie für geringe Konzentrationen von Cholin beschrieben wurde (Briese und Hakenbeck 1985), blieb nach Inkubation mit Dendrimeren aus. Die Affinität zu den CBPs stieg von Cholin über g1-cho zu g2-cho sehr stark an, wohingegen sie gegenüber nachfolgenden Generationen (g3 und höher) eher einen linearen Anstieg zeigte. Die für die Zellseparation von *S. pneumoniae* verantwortlichen CBPs LytA und LytB konnten durch Zugabe von 0,2 bzw. 5,4 μM g2-cho halbmaximal inhibiert werden (IC_{50}). Die dazu benötigten Konzentrationen an Cholin fielen deutlich höher aus (9,1 bzw. 6,3 mM). Bei Inkubation von wachsenden Pneumokokken mit 100 μM g2-cho wuchsen die Bakterien zu langen Ketten und die Autolyse wurde inhibiert. Um den gleichen Effekt mit Cholin zu erzielen, mussten hingegen 50 mM eingesetzt werden. Nicht-funktionalisierte Dendrimere ($\text{R} = -\text{NH}_2$) hatten keinen Effekt auf Autolyse oder Morphologie. Bei Inkubation von LytA mit Dendrimer-Konzentrationen

über $100 \mu\text{M}$ bildeten sich sichtbare Aggregate, die wohl durch cholinabhängige Wechselwirkungen quervernetzte Dendrimere und CBPs widerspiegeln.

Gegenüber Dendrimern höherer Generationen weisen die der niederen Generationen eine höhere Reinheit auf. Da sowohl PPI- als auch PAMAM-Dendrimere divergent, d. h. ausgehend von einem Kernmolekül, durch sich wiederholende Reaktionen synthetisiert werden (Bosman et al. 1999; Malik et al. 2000), käme es schon bei einer Selektivität einer Reaktion von 99,5 % bei der Synthese eines PPI-Dendrimers der 5. Generation (64 Endgruppen, 248 Reaktionen zur Synthese) nur zu $0,995^{248} \approx 29 \%$ defektfreien Dendrimern (Bosman et al. 1999). PPI-Dendrimere der 2. Generation sind demgegenüber von größerer Reinheit, sodass sie weniger nutzlose oder gar schädliche funktionelle Gruppen enthalten sollten. Die Potenz von PPI-Dendrimern jenseits der 2. Generation steigt zudem nur noch geringfügig, sodass wir uns für eine Co-Inkubation der Pneumokokken mit PPI-g2-cho entschieden haben. Dabei erwarteten wir gemäß der dosisabhängigen Inhibition der CBPs, die von Hernández-Rocamora et al. gezeigt wurde, eine entsprechend verlaufende Steigerung der Phagozytoseleistung. Die maximale Konzentration legten wir auf $100 \mu\text{M}$ fest, da wegen der beschriebenen sichtbaren Aggregate beim Einsatz höherer Konzentrationen bei einem eventuell später folgenden *In-vivo*-Einsatz Mikroembolien zu befürchten wären.

Genau wie PPI-Dendrimere der 2. Generation weisen PAMAM-Dendrimere der 1. Generation 8 funktionelle Gruppen auf. Im Gegensatz zu den PPI-Dendrimern zeigen sie jedoch *in vitro* keine hämolytischen Nebenwirkungen, was auf die im Gegensatz zu den PPI-Dendrimern zusätzlichen Amid-Gruppen im Inneren des PAMAM-Dendrimers zurückzuführen sein könnte (Malik et al. 2000). Hämolytische Nebenwirkungen zeigen sich für PAMAM-Dendrimere erst in höheren Generationen und treten von Generation zu Generation stärker in Erscheinung. Für PPI-Dendrimere ist dieser Effekt unabhängig von der Generation beobachtet worden (Malik et al. 2000). Der hämolytische Effekt konnte für kationische PPI- und PAMAM-Dendrimere ($R = -\text{NH}_2$) (Shao et al. 2011) ab einer Konzentration von 1 mg/ml und für anionische Dendrimere (ungeladener Rest) ab 2 mg/ml beobachtet werden ($1 \text{ mg/ml PPI-g2-NH}_2$ [MW = 773 Da] entspricht ca. $1.300 \mu\text{M}$, bei PPI-g2-cho [MW = 2.098 Da] sind es ca. $480 \mu\text{M}$). Auch in nicht hämolytischen Konzentrationen ($10 \mu\text{g/ml}$, entspricht ca. $13 \mu\text{M PPI-g2-NH}_2$) stellte die Arbeitsgruppe nach 1 h

Inkubation noch morphologische Veränderungen der Erythrozyten durch kationische PAMAM- und PPI-Dendrimere fest. Anionische PAMAM-Dendrimere auch hoher Generationen hingegen verursachten bis zu Konzentrationen von 2 mg/ml keine nachweisbaren morphologischen Veränderungen an Erythrozyten. Shao et al. untersuchten die Toxizität von PPI- und PAMAM-Dendrimeren mit jeweils 32 Endgruppen (3. bzw. 4. Generation) gegenüber verschiedenen Zelllinien und konnten zeigen, dass PPI-Dendrimere auf eukaryote Zellen ca. 50x zytotoxischer wirken als PAMAM-Dendrimere (Shao et al. 2011). PAMAM-Dendrimere versprechen also weniger hämolytische Nebenwirkungen und sind weniger zytotoxisch, was sie als Träger potenter CBP-Inhibitoren attraktiv macht und uns dazu veranlasste, sie in dieser Arbeit als mögliche Alternative zu PPI-Dendrimeren zu untersuchen.

In Anbetracht der Beobachtungen, dass positive Oberflächenladungen ($R = -NH_2$) zur Toxizität beitragen (Malik et al. 2000; Yang et al. 2011), schien es ebenso wünschenswert, die positive Ladung des Cholins, mit dem die PPI-g2-Dendrimere funktionalisiert waren, zu entfernen. Durch Entfernung einer Methylgruppe vom Cholin wird daraus das ungeladene *N,N*-Dimethylethanolamin (DMAE), das ebenfalls in der Lage ist, an CBPs zu binden (Sanz et al. 1988). Daher untersuchten wir ebenfalls PPI-g2-DMAE und PAMAM-g1-DMAE auf eine potentiell mittelbar phagozytosesteigernde Wirkung.

4.2 Diskussion der Methode

4.2.1 Bakterien

Der bei den *In-vitro*-Experimenten verwendete Pneumokokkenstamm R6 bietet gegenüber dem Stamm D39, aus dem er durch mehrere Mutationen hervorgegangen ist (Hoskins et al. 2001; Lanie et al. 2007), den Vorteil, dass er avirulent ist. Die Kapsel, die virulente Stämme vor Phagozytose schützt, weist R6 im Gegensatz zum Stamm D39 nicht auf, was zu einer gesteigerten Phagozytose führt (Tuomanen et al. 1995; Pirofski und Casadevall 1998; Martner et al. 2009; Postma et al. 2012), bei der R6 ca. 10x mehr von murinen Mikrogliazellen phagozytiert wird als D39 (Ribes et al. 2010). Hieraus ergibt sich ein weiterer Vorteil, da so die Zahl von Näpfen, in denen

die Anzahl phagozytierter Bakterien unterhalb der Nachweisgrenze liegt, reduziert werden kann.

Die CBPs, deren Wirkung durch die Anticholinergika inhibiert werden sollte, sind gemeinsames Merkmal aller Pneumokokkenstämme (Maestro et al. 2007; Hernández-Rocamora et al. 2009), wobei die verschiedenen Serotypen verschieden viele CBPs exprimieren (Romero et al. 2007). Im Genom von R6 konnten Gene für 10 CBPs identifiziert werden (Hoskins et al. 2001), ebenso wie bei D39. Dabei sind unter anderem die für LytA, LytB und LytC codierenden Gene im Genom beider Stämme identisch (Lanie et al. 2007).

Die Verwendung von R6 für die *In-vitro*-Versuche ergab sich aus den oben genannten praktischen Vorteilen. Wegen der überwiegenden genetischen Gleichheit der CBPs in beiden Stämmen sollte die Wirkung der Anticholinergika und eine damit eventuell verbundene gesteigerte Phagozytose für beide Stämme identisch sein und sich *in vivo* bei Verwendung von D39 bestätigen. Zusätzlich käme es außerdem zu einer generellen Verminderung der Virulenz der Bakterien durch die Inhibition auch anderer CBPs (s. Tabelle 1-1, S. 4).

4.2.2 Bestimmung der Keimkonzentration

Jedes Verfahren zur Bestimmung von Keimkonzentrationen weist verfahrensspezifische Schwächen und Fehlerquellen auf. Dem in dieser Arbeit verwendeten Verfahren liegt die Annahme zugrunde, dass jedes lebende Bakterium auf einem geeigneten Nährboden wachsen, sich teilen und eine Kolonie bilden kann. Da zwei oder mehr Zellen auf einem Haufen eine gemeinsame Kolonie bilden (Madigan und Martinko 2006), ist es nötig, die Probe vor dem Ausplattieren zu verdünnen bzw. wie in dieser Arbeit eine Verdünnungsreihe auszuplattieren, damit die einzelnen Bakterienzellen jeweils eigenständige Kolonien bilden und diese auch weit genug auseinander liegen, damit sie nicht während des Wachstums zu einer Kolonie fusionieren. Trotzdem wird niemals sichergestellt werden können, dass nicht doch einige Bakterien eng beisammen liegen und eine gemeinsame Kolonie bilden. Um dieser Ungenauigkeit Rechnung zu tragen, wird daher bei der Auswertung der ausplattierten Probe nicht von der „Anzahl lebender Zellen“, sondern von „koloniebildenden Einheiten“ (colony forming unit = CFU) gesprochen. Neben dieser

naturgegebenen Ungenauigkeit sind Pipettierungenauigkeiten, Pipettieren aus einer durch mangelhafte Durchmischung inhomogenen Suspension, sowie insuffizientes Vermischen mit dem Verdünnungsmedium beim Anlegen der Verdünnungsreihe weitere Fehlerquellen (Madigan und Martinko 2006), die durch sorgfältiges Arbeiten allenfalls minimiert, jedoch nicht gänzlich vermieden werden können.

Unklarheit herrscht bezüglich der Frage, inwieweit sich die durch Anticholinergika induzierte Kettenbildung der Pneumokokken auf die Bildung von Kolonien auswirkt. Denkbar wäre, dass sich bei gleicher Zellzahl beim Ausplattieren von kurzen Ketten (ohne Einfluss von Anticholinergika gewachsen) mehr Kolonien bilden als beim Ausplattieren von langen Kokkenketten. Diese Bedenken erheben auch Maestro und Mitarbeiter, die nach Inkubation von Pneumokokken mit Cholin weniger Kolonien zählten als nach Inkubation ohne Cholin, obwohl die Messung der Extinktion (Turbidimetrie) eine gleiche Zellanzahl suggerierte (Maestro et al. 2007).

Die Bestimmung der Keimkonzentration mittels Turbidimetrie beruht auf dem Prinzip, dass die Lichtintensität beim Durchlaufen eines zellhaltigen Mediums dadurch vermindert wird, dass das Licht abgelenkt wird, wenn es auf eine Zelle trifft. Im Gegensatz zum Ausplattieren werden dabei auch tote Bakterien erfasst. Zudem darf die Zelldichte nicht zu hoch sein, damit Licht, das von einem Bakterium aus dem Strahlengang abgelenkt wurde, nicht von einem anderen erneut abgelenkt wird und somit den Detektor doch erreicht (Fuchs 2006). Dazu können ebenfalls Verdünnungen erforderlich sein, die entsprechende Fehler (siehe oben) mit sich bringen. Zudem ist dieses Verfahren auf einzelne Bakterienzellen ausgelegt. Wegen ihrer Geometrie ist es hingegen sehr wahrscheinlich, dass Kokkenketten, wenn sie nicht in der Ebene des Strahlengangs liegen, mehr Licht ablenken und dass in einem kokkenkettenhaltigen Medium Mehrfachablenkungen häufig sind. Die Anwendung der Turbidimetrie für kokkenkettenhaltige Medien dürfte damit ebenfalls nicht fehlerfrei sein.

Die Auszählung der einzelnen Kokken in einer Zählkammer wäre ein Verfahren, das zumindest die durch die Kettenbildung entstehenden Fehler verhindern könnte. Es ist jedoch sehr aufwendig und weist eine geringe Sensitivität auf, da immer nur eine kleine Probe der Suspension in die Zählkammer gegeben wird, was bei der Bestimmung der Anzahl phagozytierter Bakterien, die schon beim Ausplattieren zum Teil im Bereich der Nachweisgrenze oder darunter lag, wohl dazu führen würde, dass

sich in der in der Zählkammer befindlichen Probe keine Bakterien finden ließen. Dieses Verfahren war somit für unsere Belange ungeeignet.

Eine Kombination von Auszählung der Bakterien in der Zählkammer vor Zugabe zu den Mikrogliazellen und Ausplattieren der phagozytierten Bakterien nach Phagozytose wäre nicht sinnvoll, da wir nachweisen konnten, dass sich nach Phagozytose intrazellulär ebenfalls Kokkenketten befinden (s. Abbildung 3-11, S. 50).

4.2.3 Berechnung der relativen Phagozytoseleistung

Die aus dem WST-Zellvitalitätstest (s. 3.2) gewonnene Erkenntnis, dass die bei den Phagozytoseversuchen eingesetzten Substanzen (TSB, Phosphatpuffer, Anticholinergika) während der 30-minütigen Inkubation nicht toxisch auf die Mikroglia wirkten, bedeutete, dass zur Berechnung der relativen Phagozytoseleistung keine mathematische Korrektur für unterschiedliche Anzahlen zur Phagozytose fähiger Zellen in den einzelnen Gruppen erfolgen musste.

Neben der Anzahl zur Phagozytose fähiger Zellen ist die Zahl der Bakterien, die den Mikroglia zur Phagozytose angeboten werden, relevant für die Bestimmung der Phagozytoseleistung. Bei einer Inhibition des Bakterienwachstums durch die Anticholinergika, wie sie von Maestro und Mitarbeitern für Ipratropium in höheren Konzentrationen festgestellt wurde (Maestro et al. 2007), sind die absolut gezählten Kolonien nach der Lyse der Zellen nicht direkt miteinander vergleichbar, da Mikroglia, denen weniger Bakterien zur Phagozytose angeboten werden, auch weniger Gelegenheit haben zu phagozytieren. Aus diesem Grund verglichen wir die Keimkonzentrationen in den Röhrchen der einzelnen Gruppen miteinander, bevor die Bakterien auf die Mikroglia gegeben wurden. Dabei zeigte sich, dass Ipratropium in den in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Bakterien nahm (s. 3.3.1), sodass die Phagozytoseleistung in Bezug auf die mittelwertige Keimkonzentration von allen Gruppen berechnet wurde. Auch unter Einfluss der Dendrimere kam es zu keiner signifikanten Beeinflussung des Bakterienwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch zeigten sich zwischen den Dendrimergruppen g2-cho und g2-NH₂ deutliche Unterschiede (s. 3.3.2.1), die nur knapp nicht signifikant waren ($p = 0,052$). Obwohl die logarithmierten Keimkonzentrationen mittels ANOVA miteinander hätten verglichen

werden dürfen, entschieden wir uns für einen Vergleich mittels Kruskal-Wallis-Test, da mit einigen Dendrimeren nur zwei Phagozytoseversuche durchgeführt worden waren und somit für den Vergleich nur 2 Werte zur Verfügung standen. Um den wachstumshemmenden Effekt von g2-cho aber nicht unter Gebühr zu berücksichtigen und in Anbetracht des im Vergleich zur ANOVA strengeren Tests nach Kruskal-Wallis, der knapp die Signifikanz verfehlte, entschieden wir uns dazu, die Phagozytoseleistung in den Dendrimer-Experimenten auf die jeweils individuelle Bakterienkonzentration zu beziehen.

4.3 Mittelbarer Einfluss der Anticholinergika auf die Phagozytoseleistung von Mikrogliazellen *in vitro*

4.3.1 Fehlender Einfluss von Ipratropium auf die Phagozytoseleistung

Ipratropium ist als Ester eines bicyklischenamins ein potenter Inhibitor von CBPs (Maestro et al. 2007). In der von Maestro et al. untersuchten Konzentration von 20 mM kam es jedoch statt zu einer Kettenbildung zur Inhibition des Pneumokokkenwachstums und zu morphologischen Veränderungen der Kokken. In dieser Arbeit versuchten wir die Konzentration von Ipratropium so weit zu reduzieren, dass das Bakterienwachstum nicht inhibiert wird, jedoch gleichzeitig die Ipratropiumkonzentration noch ausreichend sein sollte, die CBPs zu inhibieren und als sichtbares Zeichen dafür die Bildung von Kokkenketten zu induzieren.

Zwar zeigte sich durch die von uns verwendeten Konzentrationen keine signifikante Beeinflussung des Bakterienwachstums, jedoch wurden die während des Wachstums mit Ipratropium inkubierten Pneumokokken von den Mikroglia nicht besser phagozytiert als die mit Phosphatpuffer inkubierten Kontrollen. Pneumokokken, die während der letzten 2 h ihrer exponentiellen Wachstumsphase mit 5 mM Ipratropium inkubiert worden waren, wurden sogar signifikant weniger phagozytiert. Die wahrscheinlichste Ursache dafür ist, dass trotz der nicht signifikanten Beeinträchtigung des Pneumokokkenwachstums durch Inkubation mit 5 mM Ipratropium für 2 h die absolute Anzahl zugeführter Bakterien zu gering war, um den Mikrogliazellen eine ausreichende Phagozytose zu ermöglichen. Hierfür spricht ebenfalls die hohe Anzahl von Nöpfen (6 von 12; Einzelwerte nicht

dargestellt), in denen die intrazellulären Pneumokokken unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

Obgleich im lichtmikroskopischen Präparat sehr wohl einige längere Kokkenketten zu beobachten waren, blieb ihre Länge hinter der durch g2-cho-Dendrimere induzierten Kettenlänge deutlich zurück. Möglich wäre, dass durch die gesteigerte Aktivität von LytA bei niedrigen Konzentrationen von Ipratropium (Maestro et al. 2007) (s. auch 4.1.1) die Kettenbildung trotz Inhibition von LytB, das durch geringe Anticholinergika-Konzentrationen nicht inhibiert wird (Hernández-Rocamora et al. 2009), verhindert wurde, indem die Aktivität von LytA allein ausreichte, den Pneumokokken Zellseparation zu ermöglichen. In diesem Fall würden andere zur Virulenz beitragende CBPs, die bei geringen Ipratropium-Konzentrationen keiner Aktivierung unterliegen, ebenfalls inhibiert werden, und Ipratropium könnte als Inhibitor von CBPs z. B. der Kolonisation des Nasopharynx durch Pneumokokken entgegenwirken. Ob es tatsächlich zur Inhibition anderer CBPs unter Einfluss der hier eingesetzten niedrigen Ipratropium-Konzentrationen gekommen ist, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden, da unser einziges sicheres Indiz für eine effektive CBP-Inhibition, nämlich die Ausbildung sichtbarer Kokkenketten, ausblieb.

Ebenso wäre es möglich, dass die von uns verwendeten niedrigen Konzentrationen nicht ausreichend waren, um CBPs effektiv zu inhibieren und eine damit erhoffte Reduktion der Virulenz zu erzielen.

Die Beobachtungen von Maestro et al. (2007), dass Ipratropium das Pneumokokkenwachstum inhibiert, konnten von uns schon durch Co-Inkubation der Pneumokokken mit 5 mM Ipratropium während der letzten 2 h der exponentiellen Wachstumsphase, was zur merklichen Dämpfung des Wachstums führte, bestätigt werden. Damit könnte Ipratropium unter Umständen zur Prophylaxe von Pneumokokken-Pneumonien genutzt werden: Zwar konnten Ensing et al. bei ihren Probanden nach inhalativer Gabe von 2 mg Ipratropium nur eine Plasmakonzentration von ca. 5 nM feststellen (Ensing et al. 1989), die Ipratropium-Konzentration an der Oberfläche der Alveolen könnte aber ausreichend hoch sein, um das Wachstum der Pneumokokken dort zu inhibieren. Entsprechende Versuche sollten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, ebenso wie die Erforschung des dieser Wachstumsinhibition zugrunde liegenden Mechanismus.

4.3.2 PAMAM-g1-DMAE hatte keinen Einfluss auf die Phagozytoseleistung

Auch wenn das Auftreten von hämolytischen Nebenwirkungen durch PPI-Dendrimere in den von uns verwendeten Konzentrationen wohl nicht zu befürchten ist, so könnten sie dennoch zu morphologischen Veränderungen von Erythrozyten führen (s. 4.1.2). Daher hielten wir es für sinnvoll, PAMAM-Dendrimere der 1. Generation zu untersuchen, die ebenfalls 8 funktionelle Gruppen aufweisen, aber in der ersten Generation nicht hämolytisch wirken (Malik et al. 2000) und generell weniger toxisch sind als PPI-Dendrimere (Shao et al. 2011). Statt mit Cholin wurden diese Dendrimere mit DMAE funktionalisiert, dessen Stickstoffatom eine Methylgruppe weniger aufweist und somit seine ständige positive Ladung verliert.

Weder die Co-Inkubation mit g1-DMAE während der gesamten exponentiellen Wachstumsphase noch während ihrer letzten 2 h konnte zu einer gesteigerten Phagozytose führen. Nach Co-Inkubation mit 100 μM g1-NH₂ während der gesamten exponentiellen Wachstumsphase wurden die Pneumokokken sogar signifikant weniger phagozytiert als die der Kontrollgruppe.

Das Ausbleiben der bei CBP-Inhibition zu erwartenden Kettenbildung ist ein Indiz dafür, dass eine Inhibition der CBPs durch g1-DMAE nicht ausreichend stattgefunden hat.

Dass die permanente positive Ladung des Stickstoffatoms im Cholin nicht Voraussetzung für die Bindung an CBPs ist, zeigen die Untersuchungen von Sanz et al. (1988), die freiem DMAE eine hohe Affinität zu CBPs attestieren. Da jedoch die Cholin-bindende Domäne der CBPs die Gestalt einer hydrophoben Tasche auf der Enzymoberfläche aufweist (Fernández-Tornero 2001; Maestro et al. 2007), muss das Stickstoffatom von einer hydrophoben Oberfläche umgeben sein, die durch die verbliebenen zwei Methylgruppen des DMAE wohl nicht mehr ausreichend gegeben ist, sodass daran die Inhibition der CBPs gescheitert sein könnte. Auch muss berücksichtigt werden, dass DMAE hier als Teil eines Makromoleküls, nämlich des Dendrimers, vorliegt und es durch sterische Hinderung (Schwarz und Schmidbaur 2012) zu einem größeren Abstand der Methylgruppen des DMAE zueinander gekommen sein könnte, wodurch nur eine von ihnen Zugang zur Cholin-Bindungsstelle gehabt haben könnte. Eventuell wäre es durch Hinzufügen jeweils einer weiteren Methylgruppe, also bei Funktionalisierung des Dendrimers mit Diethylaminoethanol (DEAE) statt mit DMAE, möglich, durch die resultierende

Steigerung der Hydrophobie eine suffiziente Bindung zu erreichen und so die CBPs zu inhibieren. Entsprechende Untersuchungen bieten sich für die zukünftige Forschung an.

Die reduzierte Phagozytoseleistung von unter $100 \mu\text{M}$ g1-DMAE gewachsenen Pneumokokken erscheint nicht plausibel. Bei Inkubation mit nicht-funktionalisierten Dendrimeren ($R = -\text{NH}_2$) konnte bisher weder eine Inhibition von CBPs beobachtet werden (Hernández-Rocamora 2009), noch ist von einem toxischen Effekt des Dendrimers auf die Mikroglia auszugehen, wie unsere Ergebnisse des WST-Zellvitalitätstest zeigen. Daher sollte dieser Dendrimer eigentlich keinen Effekt haben. Obwohl die Irrtumswahrscheinlichkeit hier unter 5 % liegt, sollte der Versuch wiederholt werden, um die hier gefundenen Ergebnisse zu überprüfen. Sollte sich die reduzierte Phagozytoseleistung bestätigen, ist die Ursache zu erforschen.

4.3.3 PPI-g2-DMAE führte zu verminderter Phagozytoseleistung

Nachdem Hernández-Rocamora et al. (2009) mit PPI-Dendrimeren der 2. Generation, die mit Cholin funktionalisiert waren, die Inhibition von CBPs gelang, entschieden wir uns dazu, das bewährte Gerüst des PPI-g2-Dendrimers funktionalisiert mit DMAE, was durch Reduktion der Oberflächenladung eine Verminderung der Toxizität erhoffen lässt (Malik et al. 2000; Yang et al. 2011), auf eine mögliche Inhibition der CBPs mit konsekutiver Kettenbildung der Pneumokokken und möglicherweise erhöhter Phagozytose zu untersuchen.

Entgegen unseren Erwartungen stellte sich nach Inkubation der Pneumokokken während ihrer gesamten exponentiellen Wachstumsphase unter dem Einfluss von PPI-g2-DMAE ein dosisabhängiger, phagozytosehemmender Effekt dar. Eine Co-Inkubation während der letzten 2 h der exponentiellen Wachstumsphase beeinflusste die Phagozytose hingegen genauso wenig wie die Inkubation mit dem nicht-funktionalisierten Dendrimer ($R = -\text{NH}_2$).

Wie bereits unter 4.3.2 ausgeführt, wäre ein ausbleibender Effekt nachvollziehbar. Für einen phagozytosehemmenden Effekt finden sich in der Literatur jedoch keine möglichen Erklärungen. Da durch PPI-g2-cho keine Aktivierung von CBPs beobachtet wurde (Hernández-Rocamora et al. 2009), sollte unter Einfluss von DMAE dieser Effekt ebenfalls ausbleiben. Im Falle einer Aktivierung von LytA und

LytB wäre außerdem damit zu rechnen, dass sich statt mediumlanger Ketten kürzere Ketten bilden. Dem widersprechen auch unsere Beobachtungen, da sich im Überstand nach Phagozytose ebenfalls mediumlange und sogar längere Ketten finden ließen (s. Abbildung 3-12f, S. 52). Die Aktivierung der CBPs durch PPI-g2-DMAE scheint damit unwahrscheinlich. Die Ursache für die verminderte Phagozytose kann damit an dieser Stelle nicht geklärt werden.

4.3.4 PPI-g2-cho führte zu gesteigerter Phagozytoseleistung

Einzig durch Co-Inkubation der Pneumokokken während ihres Wachstums mit PPI-g2-cho konnten wir in den Phagozytoseversuchen eine Steigerung der mikroglialen Bakterienaufnahme erreichen. Dabei konnten wir die Beobachtungen von Hernández-Rocamora et al. bestätigen, dass es unter Einfluss dieses Dendrimers zur Ausbildung sehr langer Kokkenketten kommt, die Folge der Inhibition von LytA und LytB (Hernández-Rocamora et al. 2009) und sichtbares Indiz für die potente Inhibition der CBPs ist. Die Stärke dieses Effekts war dosisabhängig und trat umso stärker in Erscheinung, je länger die Pneumokokken mit dem Dendrimer während ihrer exponentiellen Wachstumsphase inkubiert worden waren. Entsprechend verhielt es sich mit dem Einfluss auf die Phagozytoseleistung der Mikrogliazellen: Je höher die Dosis und je länger die Co-Inkubation, desto mehr Bakterien wurden von den Zellen phagozytiert. Die Steigerung der relativen Phagozytoseleistung zeigte dabei innerhalb der Gruppen teilweise erhebliche Schwankungen, sodass nach Co-Inkubation während der gesamten exponentiellen Wachstumsphase nur 100 μ M des Dendrimers und bei der Co-Inkubation während der letzten 2 h des exponentiellen Wachstums nur 100 μ M und 1 μ M zu einer signifikant erhöhten Bakterienaufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe führten. Sollte die von uns festgestellte Verminderung des Wachstums unter Einfluss von g2-cho, aufgrund derer wir uns zur Berechnung der Phagozytoseleistung relativ zur individuell den Mikroglia angebotenen Bakterienkonzentration entschieden haben, nur der Tatsache geschuldet sein, dass die gleiche Anzahl an Bakterienzellen beim Vorliegen in langen Ketten weniger Kolonien bildet (s. 4.2.2 und 4.2.3), so wäre die von uns ermittelte relative Phagozytoseleistung etwas überbewertet. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass nach Ausplattieren der Bakterien nach Phagozytose die

absolute Anzahl der Kolonien in den Gruppen von g2-cho immer deutlich größer war als in den anderen Gruppen (Daten nicht dargestellt). Hinzu kommt unsere Beobachtung, dass Mikroglia, denen Kokkenketten zur Phagozytose angeboten wurden, intrazellulär ebenfalls kleine Ketten zeigten, von denen zu erwarten ist, dass sie ebenfalls weniger Kolonien bildeten als wenn sie als Diplokokken vorgelegt hätten. Daher darf geschlossen werden, dass es sich in jedem Fall um eine echte Steigerung der Phagozytose im Sinne einer Steigerung der Anzahl phagozytierter Bakterienzellen handelte.

Welchen Anteil die veränderte Morphologie der Pneumokokken daran hatte bzw. ob sie überhaupt einen Einfluss auf die Phagozytoseleistung von Mikroglia hatte, ist fraglich. Bereits vor 60 Jahren wurde der Einfluss der Pneumokokkenmorphologie auf die Phagozytose mikroskopisch untersucht, mit dem Ergebnis, dass nach Zugabe gleicher Bakterienzellzahlen humane polymorphkernige Granulozyten durchschnittlich die gleiche Menge Pneumokokken phagozytierten – unabhängig davon, ob sie als Ketten oder Diplokokken vorlagen (Austrian 1953).

Auch wenn ein Einfluss der Morphologie nicht gänzlich ausgeschlossen werden konnte, so ist es wahrscheinlich, dass andere Faktoren, die aus der unspezifischen Inhibition der CBPs resultieren, hauptsächlich für die gesteigerte Phagozytose waren.

Unter anderem wurden von Swiatlo und Mitarbeitern Veränderungen der Oberflächeneigenschaften der Pneumokokken nach Entfernung der CBPs beobachtet: Unbekapselte Pneumokokkenstämme wurden hydrophiler und oberflächlich negativer geladen, während sich im bekapselten Stamm D39 keine derartigen Veränderungen zeigten (Swiatlo et al. 2002). Die erhöhte Hydrophobie sollte eher die Phagozytose erleichtern (Absolom 1988; Calvinho et al. 1996; Swiatlo et al. 2002), die negativere Oberflächenladung erschwert hingegen die Phagozytose (van Oss 1978; Swialto et al. 2002), da Phagozyten ebenfalls oberflächlich negativ geladen sind. Der von Swiatlo et al. durchgeführte Adhärenzversuch zeigt jedoch, dass sich letztendlich eine verminderte Adhärenz der CBP-freien unbekapselten Pneumokokken an Monozyten ergibt, während die Adhärenz von D39 unbeeinflusst bleibt. Die veränderten Oberflächeneigenschaften müssten demnach eigentlich zu einer verminderten Phagozytoseleistung führen, sodass andere Ursachen unseren Beobachtungen zugrunde liegen müssen.

Da die CBPs eine höhere Affinität zu g2-cho als zum Cholin der TAs und LTAs der Pneumokokkenzellwand haben, liegen letztere wahrscheinlich während der Co-Inkubation mit g2-cho sehr viel exponierter an der Bakterienoberfläche vor. TAs und LTAs sind Liganden des TLR-2 (Kochan et al. 2012), durch dessen Stimulation eine Steigerung der Phagozytose erreicht wird (Ebert et al. 2005; Ribes et al. 2009; Ribes et al. 2010; Kochan et al. 2012). Dabei wurde jedoch meist eine längere Co-Inkubation (24 h) gewählt. Ob die 30-minütige Co-Inkubation (= Dauer der Phagozytose) zu einer Aktivierung der Mikrogliazellen ausgereicht hat, ist fraglich. Jedoch konnte nach 30-minütiger Co-Inkubation mit TLR-2-Agonisten zumindest eine vermehrte Expression des Rezeptors beobachtet werden (Cervantes et al. 2011). Zudem darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Pneumokokken in Ketten vorlagen, was zu einer lokal hohen Konzentration von TAs und LTAs führte, die eine Mikroglia-Aktivierung via TLR-2 begünstigt haben könnte.

Als unspezifischer CBP-Inhibitor hat g2-cho neben LytA und LytB auch LytC inhibiert. Die Inhibition der beiden letztgenannten CBPs konnte bereits mit einer gesteigerten Phagozytose durch Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten in Verbindung gebracht werden. Dabei wurden eine LytB- und eine LytC-defiziente Mutante signifikant besser phagozytiert als der Wildtyp von *S. pneumoniae* D39. Die Doppelmutante wurde sogar noch erheblich besser phagozytiert. Aus diesen Beobachtungen leiteten die Autoren ab, dass diese beiden CBPs einen wichtigen Beitrag zur Virulenz leisten, indem sie die Pneumokokken vor der Erkennung durch Phagozyten schützen (Ramos-Sevillano et al. 2011). In diesem Fall würde es evtl. ausreichen, die Pneumokokken vor Zugabe auf die Mikroglia für einige Zeit mit g2-cho zu präinkubieren. Die dadurch erreichbare Phagozytosesteigerung sollte in weiteren Versuchen mit der durch unsere Co-Inkubation erreichten Steigerung verglichen werden.

Welchen Anteil die möglichen Mechanismen an der hier festgestellten Steigerung der Phagozytose im Einzelnen hatten und ob evtl. weitere Ursachen in Betracht gezogen werden müssen, bleibt zu klären.

4.4 PPI-g2-cho zeigte keine Wirkung im Sepsismodell der Maus

Nachdem sich g2-cho *in vitro* als phagozytosesteigernd herausgestellt hatte, beschlossen wir, seine mögliche Einflussnahme auf den Krankheitsverlauf im Sepsismodell der Maus zu testen. 15 min vor der intraperitonealen Infektion mit *S. pneumoniae* D39 wurden den Mäusen ebenfalls intraperitoneal die Dendrimere injiziert, in einer Menge, dass bei Annahme eines Verteilungsvolumens von 1 l/kg unter Vernachlässigung der Elimination eine Konzentration von 10 μ M im zentralen Kompartiment (Blut) der Maus vorlag. Wir erwarteten zudem, dass am Injektionsort aufgrund der vorherigen Dendrimer-Injektion die Dendrimer-Konzentration höher war. Es stellte sich daraufhin kein Unterschied in der Überlebenszeit und der Sterblichkeit verglichen mit den mit Phosphatpuffer behandelten Kontrolltieren ein. Auch führte die Dendrimer-Behandlung nicht zu einer signifikant differenten krankheitsbedingten Gewichtsabnahme oder zu Unterschieden beim klinischen Score. Die Keimkonzentration im Blut der durch Infektion verstorbenen Tiere, gemessen durch Ausplattierung von Milzhomogenaten, zeigte ebenfalls keine signifikanten Differenzen. Die erhoffte Verbesserung der Immunantwort war somit nicht festzustellen.

Obwohl Dendrimere erst in jüngster Zeit in den Fokus der medizinischen Forschung gerückt sind, existieren bereits erste Untersuchungen zu ihrer Pharmakokinetik. Diese lassen Zweifel daran aufkommen, ob g2-cho durch die einmalige Applikation, wie in unserem Versuchsmodell durchgeführt, seine Wirkung entfalten konnte. Zwar werden positiv geladene Dendrimere im Vergleich zu ungeladenen besser retiniert (Nigavekar et al. 2004), sodass die positive Ladung am Cholin in dieser Hinsicht vielleicht sogar hilfreich war, jedoch werden Dendrimere sehr schnell eliminiert und ausgeschieden (Kobayashi et al. 2003; Nigavekar et al. 2004; Dai et al. 2010). Die von Nigavekar et al. untersuchten PAMAM-Dendrimere waren nach 24 h größtenteils ausgeschieden. PPI-Dendrimere werden noch rascher eliminiert und waren nach intravenöser Injektion bereits nach 15 min zu 60 % eliminiert (Kobayashi et al. 2003). Trotz der hohen Clearance aus dem Körper konnten auch nach 12 Wochen noch Dendrimere in den Organen nachgewiesen werden (Nigavekar et al. 2004). Bei Injektion größerer Mengen und nach Entwicklung sehr potenter Dendrimere könnte so eine Verbesserung der Erregerbekämpfung erreicht werden. Ebenfalls denkbar wäre, zur Behandlung akuter Pneumokokkeninfektionen die Dendrimere per Infusion

zu verabreichen. Auf diese Weise wäre eine gleichbleibend hohe Dendrimer-Konzentration im Blut zu erreichen, die die CBPs inhibieren könnte und idealerweise dazu führen würde, dass die CBPs mit den Dendrimeren ausgeschieden werden. Die retinierten Mengen der Dendrimere müssten sich bei entsprechenden Untersuchungen zudem als unschädlich erweisen, um einen Einsatz in der klinischen Praxis zu ermöglichen.

Da nach intravenöser Injektion kaum Dendrimere ins Hirnparenchym gelangen (Nigavekar et al. 2004), sollten zur speziellen Behandlung der Pneumokokken-Meningitis zudem weitere *In-vivo*-Versuche folgen, bei denen die Dendrimere subarachnoidal oder intraventriculär appliziert werden. Dabei könnten sehr geringe Konzentrationen des Dendrimers bereits ausreichend sein, den von uns gezeigten Effekt der gesteigerten Phagozytoseleistung zu bestätigen, da das intrakranielle Verteilungsvolumen klein ist und aktuelle Untersuchungen zeigen konnten, dass sich Dendrimere nach derartiger Applikation sehr gut im Hirnparenchym verteilen (Albertazzi et al. 2013). Allerdings konnten dabei nur Dendrimere mit positiver Oberflächenladung ($R = -NH_2$) das Ependym des Liquorraumes überwinden. Dendrimere, die mit lipophilen Gruppen funktionalisiert waren, konnten nicht ins Parenchym übertreten. Beide Dendrimere der 4. Generation wirkten jedoch *in vitro* toxisch auf Neurone. Die Toxizität und Pharmakokinetik werden vom verwendeten Dendrimer-Typ, der Generation, der Oberflächenladung und den angefügten funktionellen Gruppen entscheidend beeinflusst (Malik et al. 2000; Kobayashi et al. 2003; Nigavekar et al. 2004; Kobayashi und Brechbiel 2005; Dai et al. 2010; Shao et al. 2011; Yang et al. 2011; Albertazzi et al. 2013), daher kann zur Toxizität und Pharmakokinetik von Dendrimeren keine allgemeine Aussage getroffen werden. Für jeden einzelnen Dendrimer, der sich in Zukunft in der medizinischen Diagnostik oder Therapie als vielversprechend herauskristallisiert, müssen daher entsprechende Vorversuche zur Ermittlung dieser Parameter durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Streptococcus pneumoniae ist der häufigste Erreger bakterieller Meningitiden. Eine Pneumokokken-Meningitis führt trotz Ausschöpfung aller heute verfügbaren Behandlungsmöglichkeiten in 25 % der Fälle zum Tod. Steigende Antibiotikaresistenzen und die Limitation verfügbarer Vakzine auf einige Serotypen von *S. pneumoniae* erfordern neue Ansätze in der antimikrobiellen Therapie. Cholinbindende Proteine (CBPs) sind gemeinsames Merkmal aller Pneumokokkenstämme und für die Virulenz dieses Bakteriums essenziell. Durch Zugabe potenter Anticholinergika können die CBPs von der Bakterienoberfläche abgelöst und damit inhibiert werden.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch Inhibition von CBPs während des Wachstums der Pneumokokken deren Phagozytose durch Mikrogliazellen *in vitro* gesteigert werden kann. Während ihres Wachstums wurden die Bakterien dazu mit potenten Anticholinergika inkubiert und am Ende ihrer exponentiellen Wachstumsphase auf murine Mikrogliazellen gegeben.

Nicht alle eingesetzten Anticholinergika konnten die Inhibition der CBPs – angezeigt durch die Bildung langer Kokkenketten – bewirken, obwohl für sie alle eine hohe Affinität zu den CBPs in früheren Arbeiten nachgewiesen worden war.

Ipratropium, das in höheren Konzentrationen das Pneumokokkenwachstum inhibiert, induzierte in den von uns eingesetzten niedrigen Konzentrationen weder die Bildung von Ketten noch führte es zu einer erhöhten Phagozytoseleistung.

Mit DMAE funktionalisiert zeigten PAMAM-Dendrimere der 1. Generation ebenfalls keine Inhibition der CBPs: Es bildeten sich weder Kokkenketten noch zeigte sich eine erhöhte Bakterienaufnahme der Mikroglia. Im Gegensatz dazu stellte sich unter Einfluss von PPI-g2-DMAE neben ausbleibender Kettenbildung ein dosisabhängiger phagozytosehemmender Effekt dar.

Einzig durch Co-Inkubation mit dem mit Cholin funktionalisierten PPI-Dendrimer der 2. Generation gelang die Inhibition der CBPs mit resultierender Bildung langer Ketten. Die Phagozytoseleistung zeigte eine dosisabhängige Steigerung sowohl für eine Co-Inkubation während der gesamten exponentiellen Wachstumsphase als auch nach Co-Inkubation während ihrer letzten 2 Stunden.

Dennoch konnte im Sepsismodell der Maus durch intraperitoneale Injektion dieses Dendrimers 15 min vor Infektion mit *S. pneumoniae* kein protektiver Effekt erzielt

werden: Zwischen den mit Dendrimeren behandelten Tieren und denen der Kontrollgruppe zeigten sich keine Unterschiede in Überlebenszeit und Sterblichkeit, dem krankheitsbedingten Gewichtsverlust, dem klinischen Score und der durch Ausplattieren von Milzhomogenaten ermittelten Keimkonzentration im Blut infektionsbedingt verstorbener Tiere.

Die von uns eingesetzten Konzentrationen von Ipratropium scheinen für eine Inhibition der CBPs nicht ausgereicht zu haben. Der bislang nicht genau geklärte wachstumshemmende Effekt, der sich in unseren Versuchen bereits ab 5 mM bemerkbar machte, könnte jedoch durch Inhalation von Ipratropium gezielt zur Prophylaxe von Pneumokokken-Pneumonien genutzt werden.

Bei an Dendrimere gekoppelten, eigentlich potenten Liganden der CBPs konnte beobachtet werden, dass sie als Teil des Dendrimers ihre Affinität gegenüber den CBPs nicht nur deutlich verändern, sondern auch unerwartete Effekte (Verminderung der Phagozytose) hervorrufen können. Wegen der raschen Elimination scheint die einmalige Gabe eines potenten Dendrimers zur Inhibition der CBPs *in vivo* nicht auszureichen und erklärt das Versagen im Sepsismodell. Neuere Untersuchungen zur Distribution im Hirnparenchym nach intraventrikulärer oder subarachnoidaler Injektion lassen hoffen, dass durch Gabe subtoxischer Dosen die von uns beobachtete Phagozytosesteigerung *in vivo* reproduzierbar ist.

Durch Inhibition der CBPs ist es möglich, die Virulenz aller Serotypen des Pneumokokkus stark zu reduzieren. Potente Inhibitoren könnten sowohl als Therapeutikum als auch zur Infektionsprophylaxe eingesetzt werden, ohne dass es dabei zur Ausbildung von Resistenzen kommt, da zeitgleich mehrere Virulenzfaktoren inhibiert werden. Es ist daher von großem medizinischen Interesse, Inhibitoren der CBPs zu entwickeln, die in subtoxischen Dosen eine hohe Affinität zu den CBPs aufweisen und diese inhibieren.

6 Literaturverzeichnis

- Absolom DR (1988): The role of bacterial hydrophobicity in infection: bacterial adhesion and phagocytic ingestion. *Can J Microbiol* 34, 287-298
- Albertazzi L, Gherardini L, Brondi M, Sulis Sato S, Bifone A, Pizzorusso T, Ratto GM, Bardi G (2013): *In vivo* distribution and toxicity of PAMAM dendrimers in the central nervous system depend on their surface chemistry. *Mol Pharm* 10, 249-260
- Austrian R (1953): Morphologic variation in pneumococcus. I. An analysis of the bases for morphologic variation in pneumococcus and description of a hitherto undefined morphologic variant. *J Exp Med* 98, 21-34
- Bean B, Tomasz A (1977): Choline metabolism in pneumococci. *J Bacteriol* 130, 571-574
- Bergmann S, Hammerschmidt S (2006): Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* 152, 295-303
- Bosman AW, Janssen HM, Meijer EW (1999): About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications. *Chem Rev* 99, 1665-1688
- Briese T, Hakenbeck R (1985): Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. *Eur J Biochem* 146, 417-427
- Calvinho LF, Almeida RA, Oliver SP (1996): Influence of *Streptococcus dysgalactiae* surface hydrophobicity on adherence to mammary epithelial cells and phagocytosis by mammary macrophages. *Zentralbl Veterinarmed B* 43, 257-266
- Camps Serra M, Cervera C, Pumarola T, Moreno A, Perelló R, Torres A, Jiménez de Anta MT, Marcos MA (2008): Virological diagnosis in community-acquired pneumonia in immunocompromised patients. *Eur Respir J* 31, 618-624
- Cartwright K (2002): Pneumococcal disease in western Europe: burden of disease, antibiotic resistance and management. *Eur J Pediatr* 161, 188-195
- Cervantes JL, Dunham-Ems SM, La Vake CJ, Petzke MM, Sahay B, Sellati TJ, Radolf JD, Salazar JC (2011): Phagosomal signaling by *Borrelia burgdorferi* in human monocytes involves Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR8 cooperativity and TLR8-mediated induction of IFN-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3683-3688
- Dai H, Navath RS, Balakrishnan B, Guru BR, Mishra MK, Romero R, Kannan RM, Kannan S (2010): Intrinsic targeting of inflammatory cells in the brain by polyamidoamine dendrimers upon subarachnoid administration. *Nanomedicine (Lond)* 5, 1317-1329
- Dalmau I, Vela JM, González B, Finsen B, Castellano B (2003): Dynamics of microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 458, 144-157
- Diamond LK (1969): Splenectomy in childhood and the hazard of overwhelming infection. *Pediatrics* 43, 886-889

- Di Guilmi AM, Dessen A (2002): New approaches towards the identification of antibiotic and vaccine targets in *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO Rep* 3, 728-734
- Djukic M, Mildner A, Schmidt H, Czesnik D, Brück W, Priller J, Nau R, Prinz M (2006). Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain* 129, 2394-2403
- Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS, Swartz MN (1993): Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med* 328, 21-28
- 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
- Engelhardt B, Coisne C (2011): Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS* 8, 4
- Ensing K, De Zeeuw RA, Nossent GD, Koëter GH, Cornelissen PJ (1989): Pharmacokinetics of ipratropium bromide after single dose inhalation and oral and intravenous administration. *Eur J Clin Pharmacol* 36, 189-194
- Fernández Guerrero ML, Ramos JM, Marrero J, Cuenca M, Fernández Roblas R, De Górgolas M (2003): Bacteremic pneumococcal infections in immunocompromised patients without AIDS: the impact of beta-lactam resistance on mortality. *Int J Infect Dis* 7, 46-52
- Fernández-Tornero C, López R, García E, Giménez-Gallego G, Romero A (2001): A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat Struct Biol* 8, 1020-1024
- Fuchs G: Allgemeine Mikrobiologie. 8. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006
- García JL, Sánchez-Beato AR, Medrano FJ, López R (1998): Versatility of choline-binding domain. *Microb Drug Resist* 4, 25-36
- García P, González MP, García E, López R, García JL (1999): LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol* 31, 1275-1281
- Gehre F, Spisek R, Kharat AS, Matthews P, Kukreja A, Anthony RM, Dhodapkar MV, Vollmer W, Tomasz A (2009): Role of teichoic acid choline moieties in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 77, 2824-2831
- Gerber J, Raivich G, Wellmer A, Noeske C, Kunst T, Werner A, Brück W, Nau R (2001): A mouse model of *Streptococcus pneumoniae* meningitis mimicking several features of human disease. *Acta Neuropathol* 101, 499-508
- Gingles NA, Alexander JE, Kadioglu A, Andrew PW, Kerr A, Mitchell TJ, Hopes E, Denny P, Brown S, Jones HB et al. (2001): Role of genetic resistance in invasive pneumococcal infection: identification and study of susceptibility and resistance in inbred mouse strains. *Infect Immun* 69, 426-434
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER et al. (2010): Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841-845

- Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T (2013): Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* 7, 45
- Gjini AB, Stuart JM, Lawlor DA, Cartwright KA, Christensen H, Ramsay M, Heyderman RS (2006): Changing epidemiology of bacterial meningitis among adults in England and Wales 1991-2002. *Epidemiol Infect* 134, 567-569
- Gosink KK, Mann ER, Guglielmo C, Tuomanen EI, Masure HR (2000): Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68, 5690-5695
- Hammerschmidt S (2006): Adherence molecules of pathogenic pneumococci. *Curr Opin Microbiol* 9, 12-20
- Hanisch UK, Kettenmann H (2007): Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10, 1387-1394
- Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR (2000): Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 30, 100-121
- Hernández-Rocamora VM, Maestro B, de Waal B, Morales M, García P, Meijer EW, Merckx M, Sanz JM (2009): Multivalent Choline Dendrimers as Potent Inhibitors of Pneumococcal Cell-Wall Hydrolysis. *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 948-951
- Hoskins J, Alborn WE Jr, Arnold J, Blaszczyk LC, Burgett S, DeHoff BS, Estrem ST, Fritz L, Fu DJ, Fuller W et al. (2001): Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* 183, 5709-5717
- Käyhty H, Eskola J (1996): New vaccines for the prevention of pneumococcal infections. *Emerg Infect Dis* 2, 289-298
- Kobayashi H, Brechbiel MW (2005): Nano-sized MRI contrast agents with dendrimer cores. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 2271-2286
- Kobayashi H, Kawamoto S, Jo SK, Bryant HL, Brechbiel MW, Star RA (2003): Macromolecular MRI contrast agents with small dendrimers: pharmacokinetic differences between sizes and cores. *Bioconjug Chem* 14, 388-394
- Kochan T, Singla A, Tosi J, Kumar A (2012): Toll-like receptor 2 ligand pretreatment attenuates retinal microglial inflammatory response but enhances phagocytic activity toward *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 80, 2076-2088
- Kreutzberg GW (1996): Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19, 312-318
- Lanie JA, Ng WL, Kazmierczak KM, Andrzejewski TM, Davidsen TM, Wayne KJ, Tettelin H, Glass JI, Winkler ME (2007): Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol* 189, 38-51
- Liu C, Xiong X, Xu W, Sun J, Wang L, Li J (2013): Serotypes and patterns of antibiotic resistance in strains causing invasive pneumococcal disease in children less than 5 years of age. *PloS One* 8, e54254

- López R, González MP, García E, García JL, García P (2000): Biological roles of two new murein hydrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling. *Res Microbiol* 151, 437-443
- Madigan MT, Martinko JM: *Biology of Microorganisms*. 11. Auflage; Pearson Prentice Hall, New Jersey (USA) 2006
- Maestro B, Sanz JM (2007): Novel approaches to fight *Streptococcus pneumoniae*. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2, 188-196
- Maestro B, González A, García P, Sanz JM (2007): Inhibition of pneumococcal choline-binding proteins and cell growth by esters of bicyclic amines. *FEBS J* 274, 364-376
- Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R, Lorenz K, Frey H, Weener JW, Meijer EW, Paulus W, Duncan R (2000): Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility *in vitro*, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers *in vivo*. *J Control Release* 65, 133-148
- Martner A, Skovbjerg S, Paton JC, Wold AE (2009): *Streptococcus pneumoniae* autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines. *Infect Immun* 77, 3826-3837
- McIntyre PB, O'Brien KL, Greenwood B, Van de Beek D (2012): Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide. *Lancet* 380, 1703-1711
- Mitchell TJ (2003): The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol* 1, 219-230
- Nigavekar SS, Sung LY, Llanes M, El-Jawahri A, Lawrence TS, Becker CW, Balogh L, Khan MK (2004): 3H dendrimer nanoparticle organ/tumor distribution. *Pharm Res* 21, 476-483
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005): Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science* 308, 1314-1318
- Pedersen FK, Henrichsen J (1983): Pneumococcal meningitis and bacteraemia in Danish children 1969-1978. Serotypes, incidence and outcome. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B* 91, 129-134
- Pirofski LA, Casadevall A (1998): Use of licensed vaccines for active immunization of the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev* 11, 1-26
- Postma DF, Van Werkhoven CH, Huijts SM, Bolkenbaas M, Oosterheert JJ, Bonten MJM (2012): New trends in the prevention and management of community-acquired pneumonia. *Neth J Med* 70, 337-348
- Ramos-Sevillano E, Moscoso M, García P, García E, Yuste J (2011): Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. *PloS One* 6, e23626
- 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
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK (2004): Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17, 942-964
- Romero P, López R, García E (2007): Key role of amino acid residues in the dimerization and catalytic activation of the autolysin LytA, an important virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 282, 17729-17737
- Rosenow C, Ryan P, Weiser JN, Johnson S, Fontan P, Ortqvist A, Masure HR (1997): Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 25, 819-829
- Rote Liste Service GmbH (Hrsg.): Rote Liste 2013 online. www.rote-liste.de, aufgerufen am 16.04.2013. Frankfurt/Main 2013
- Sanchez-Puelles JM, Ronda C, Garcia JL, Garcia P, Lopez R, Garcia E (1986): Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur J Biochem* 158, 289-293
- Sanz JM, Lopez R, Garcia JL (1988): Structural requirements of choline derivatives for "conversion" of pneumococcal amidase. A new single-step procedure for purification of this autolysin. *FEBS Lett* 232, 308-312
- Schwarz WHE, Schmidbaur H (2012): Observations and descriptions versus explanations--an example: does nature, does theory know about steric hindrance? *Chemistry* 18, 4470-4479
- Shao N, Su Y, Hu J, Zhang J, Zhang H, Cheng Y (2011): Comparison of generation 3 polyamidoamine dendrimer and generation 4 polypropylenimine dendrimer on drug loading, complex structure, release behavior, and cytotoxicity. *Int J Nanomedicine* 6, 3361-3372
- Ständige Impfkommision (STIKOa): Stellungnahme zur Impfung Erwachsener gegen Pneumokokken; in: *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 7; hrsg. v. Robert-Koch-Institut, Berlin 2012, 55
- Ständige Impfkommision (STIKOb): Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert-Koch-Institut/Stand: Juli 2012; in: *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 30; hrsg. v. Robert-Koch-Institut, Berlin 2012, 283-310
- Swiatlo E, Champlin FR, Holman SC, Wilson WW, Watt JM (2002): Contribution of choline-binding proteins to cell surface properties of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 70, 412-415
- Thomas WE (1992): Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Brain Res Rev* 17, 61-74
- Tian H, Groner A, Boes M, Pirofski L (2007): Pneumococcal capsular polysaccharide vaccine-mediated protection against serotype 3 *Streptococcus pneumoniae* in immunodeficient mice. *Infect Immun* 75, 1643-1650
- Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ (1999): Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 67, 4720-4724

- Tuomanen EI, Austrian R, Masure HR (1995): Pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med* 332, 1280-1284
- van Oss CJ (1978): Phagocytosis as a surface phenomenon. *Annu Rev Microbiol* 32, 19-39
- Venez I, Schopfer K, Mühlemann K (1998): Paediatric, invasive pneumococcal disease in Switzerland, 1985-1994. Swiss Pneumococcal Study Group. *Int J Epidemiol* 27, 1101-1104
- Waghorn DJ (2001): Overwhelming infection in asplenic patients: current best practice preventive measures are not being followed. *J Clin Pathol* 54, 214-218
- Yang K, Weng L, Cheng Y, Zhang H, Zhang J, Wu Q, Xu T (2011): Host-guest chemistry of dendrimer-drug complexes. 6. Fully acetylated dendrimers as biocompatible drug vehicles using dexamethasone 21-phosphate as a model drug. *J Phys Chem B* 115, 2185-2195
- Zhang JR, Mostov KE, Lamm ME, Nanno M, Shimida S, Ohwaki M, Tuomanen E (2000): The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* 102, 827-837

Publikation im Zusammenhang mit dieser Dissertation

Ribes S *, **Riegelmann J** *, Redlich S, Maestro B, de Waal B, Meijer EW, Sanz JM, Nau R (2013): Multivalent choline dendrimers increase phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* R6 by microglial cells. *Chemotherapy* 59, 138-142

* gleichberechtigte Erstautorenschaft

Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Roland Nau, für die Überlassung des Themas und die stets freundliche Unterstützung in familiärer Atmosphäre. Für seine gute Betreuung und seinen fachkundigen Rat bin ich ihm sehr dankbar, ebenso für die Korrektur dieser Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. Sandra Ribes danke ich für ihre gute Betreuung und den stets konstruktiven Gedankenaustausch.

Meiner Mitdotorandin, Dipl.-Biol. Sandra Redlich, danke ich für die gründliche Einführung in die Laborarbeit, für die gute Zusammenarbeit und für ihre Unterstützung bei den *In-vivo*-Experimenten.

Ebenso danke ich allen andern Mitdotoranden für die kollegiale Zusammenarbeit.

Frau Stephanie Bunkowski – die unersetzbare gute Seele unserer Arbeitsgruppe – was hätte ich ohne sie gemacht. Ich danke ihr für ihre zuverlässige Zuarbeit und dauerhafte Hilfsbereitschaft.

Herrn Peter Lange aus der Abteilung Neurologie danke ich für seine Unterstützung bei den ELISA-Messungen.

Prof. Dr. Jesús M. Sanz vom Institut für Molekular- und Zellbiologie der Universität Miguel Hernández (Elche, Spanien) gilt mein Dank für die Bereitstellung der Dendrimere und wertvolle Gedankenanstöße.

Für die Überlassung der Pneumokokkenstämme danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.

Frau Kellner aus dem Zentrum Mikrobiologie danke ich für das Herstellen der TSB.

Besonders danken möchte ich meiner Familie für ihre Unterstützung, vor allem meiner Mutter für ihre professionelle Fahndung nach Fehlerteufeln in dieser Arbeit.