

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

**Die Rolle verschiedener Virulenzfaktoren
von *Streptococcus pneumoniae* bei der Meningitis:
Untersuchung am Mausmodell**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Tammo Helmut Kunst

aus

Oldenburg

Göttingen 2014

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

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

II. Berichterstatter/in: PD Dr. rer. nat. F. Lühder

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. C. Lüder

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2015

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1	EINIGE HISTORISCHE ANMERKUNGEN ZU <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	1
1.2	AUFBAU VON <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	2
1.3	VIRULENZFAKTOREN VON <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	5
1.3.1	<i>Zytosolische Virulenzfaktoren</i>	6
1.3.2	<i>Oberflächenproteine</i>	9
1.3.2.1	Neuraminidase	10
1.3.2.2	Hyaluronidase	11
1.3.2.3	Autolysin	13
1.3.2.4	Cholin-bindendes Protein A (CbpA)	15
1.3.2.5	Pneumococcal surface Protein A (PspA)	16
1.3.2.6	Pneumococcal adherence and virulence factor A (PavA)	17
1.4	PROBLEMSTELLUNG	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	ART DER STUDIE	19
2.2	TIERE	19
2.3	BAKTERIEN	19
2.4	MENINGITISMODELL	20
2.4.1	<i>Klinischer Score</i>	22
2.4.2	<i>Seiltest</i>	22
2.4.3	<i>Gewichtsverlust</i>	24
2.4.4	<i>Histologie</i>	25
2.4.4.1	Haematoxylin-Eosin (HE)-/Chloracetatesterasefärbung	25
2.4.4.2	Entzündungsscore	28
2.4.4.3	Neuronaler Schaden	29
2.5	STATISTIK	29
3	ERGEBNISSE	30
3.1	<i>IN VITRO</i> -WACHSTUM DER PNEUMOLYSIN-DEFIZIENTEN D39-MUTANTE	30
3.2	KLINISCHER VERLAUF DER MENINGITIS IM MAUSMODELL	30
3.2.1	<i>Gewichtsverlust</i>	30
3.2.2	<i>Klinischer Score</i>	32
3.2.3	<i>Seiltest</i>	35

3.3	BAKTERIENTITER 36 STUNDEN NACH INFEKTION	37
3.4	LEUKOZYTENINFILTRATION	39
3.5	NEURONENSCHADEN	50
3.6	ÜBERLEBENSZEIT VON MIT PNEUMOLYSIN-DEFIZIENTEN PNEUMOKOKKEN INFIZIERTEN MÄUSEN	51
4	DISKUSSION	53
5	ZUSAMMENFASSUNG	61
6	ANHANG	62
6.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	62
6.2	VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN	63
7	LITERATURVERZEICHNIS	65

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Einige historische Anmerkungen zu *Streptococcus pneumoniae*

Im Jahre 1881 wurde *Streptococcus pneumoniae* unabhängig voneinander von Louis Pasteur in Frankreich und George M. Sternberg in den USA in menschlichem Speichel beschrieben (Pasteur 1881; Pasteur et al. 1881; Sternberg 1881). Beide konnten durch Injektion des Speichels in Kaninchen diese Erreger vermehren und im Blut der Tiere isolieren. Auch beschrieben beide Forscher Paare von kokkoiden Bakterien. Die Rolle dieses Erregers als Verursacher der Pneumonie wurde von Friedländer (1883), Talamon (1883) und Fraenkel (1884) erkannt. Fraenkel nannte ihn darum *Pneumococcus* (1886). Dass derselbe Erreger eine Meningitis verursachen kann, wurde von Netter (1887) und Weichselbaum (1887) gezeigt. 1920 wurde der *Pneumococcus* in *Diplococcus pneumoniae* umbenannt (Winslow et al. 1920). Erst 1974 erhielt er den jetzigen Namen *Streptococcus pneumoniae* (Deibel und Seeley 1974). Zu Beginn des 20. Jahrhunderts waren alle Therapieversuche, unter anderem wiederholte Liquorpunktionen, bei Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis erfolglos, die Prognose galt als infaust. Frühe Versuche der Behandlung mit chemotherapeutischen Substanzen und später Sulfonamiden führten zwar zu einer gewissen Verbesserung der Prognose, waren aber – auch wegen Resistenzentwicklungen – ohne durchschlagenden Erfolg (Morgenroth und Levy 1911; Moore und Chesney 1917; Evans und Gaisford 1938; Whitby 1938; Tillett et al. 1943). Daneben gab es Versuche, die Infektion mit Antiseren zu behandeln (Felton 1924), ebenfalls ohne nachhaltiges Ergebnis. In den 40er Jahren konnte Penicillin erstmals in genügender Menge produziert werden, um dann mit durchschlagendem Erfolg gegen Pneumokokken angewendet zu werden (Abraham et al. 1941; Keefer et al. 1943).

In den vergangenen 40 Jahren wurden hochwirksame Antibiotikatherapien, die auch gegen penicillinresistente Pneumokokken wirksam sind, eingeführt, und auch intensiv-

medizinische Maßnahmen und die Frühdiagnostik wurden entscheidend ausgebaut; trotz der verbesserten Therapieansätze ist die Prognose bei einer Pneumokokken-Meningitis aber weiterhin ernst: Die Letalität beträgt bei Erwachsenen bis in die jüngste Zeit immer noch 20-30 %, und bei über 30 % der Überlebenden finden sich Hörschäden, kognitive Beeinträchtigungen, Epilepsien und Paresen (Bohr et al. 1984; Swartz 1984; Quagliarello und Scheld 1992; Durand et al. 1993; Pfister et al. 1993; Davis und McIntyre 1995; van de Beek et al. 2004; Schmidt et al. 2006; Arda et al. 2008)

Die morphologischen Ursachen für diese Langzeit-Defizite liegen in Neuronenschäden im neokortikalen und hippokampalen Bereich (Zysk et al. 1996; Nau et al. 1999; Wellmer et al. 2000; Meli et al. 2002; Focke et al. 2012). Nau et al. (2004) zeigten zudem, dass ein Teil der neurologischen Spätfolgen auf axonalen Schädigungen beruht.

1.2 Aufbau von *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae ist nach Einführung von Impfungen gegen *Haemophilus influenzae* zum häufigsten Erreger von bakteriellen Meningitiden geworden. Durch die Lagerung der Pneumokokken zu Diplokokken, die Zusammensetzung des C-Polysaccharids und ihre Empfindlichkeit gegen Optochin unterscheiden sie sich von anderen α -hämolisierenden Streptokokken (Whiley und Beighton 1998). Neben einer Meningitis verursachen sie beim Menschen vor allem Lobär- und Bronchopneumonien, Septitiden sowie Infektionen im Hals-Nasen-Ohrenbereich (Otitis media, Mastoiditis und Sinusitis) (z. B. (ACIP 2000; Hirst et al. 2004; Toltzis und Jacobs 2005; CDC 2008; Meyer et al. 2008).

Der Durchmesser der rundlichen Pneumokokken (Abbildung 1) beträgt ca. 1,5 μm , variiert jedoch in Abhängigkeit von den jeweiligen Wachstumsbedingungen. Die Zellwand selbst ist etwa 150 nm dick und weist in ihrer äußeren Schicht Peptidoglykane (Murein) und Teichon- und Lipoteichonsäuren auf, eine typische Zusammensetzung grampositiver Bakterien (Tomasz 1981; Wartha et al. 2007). Die Zellwandbestandteile

sind in der Lage, an Oberflächenepithelien anzuhaften und damit eine Infektion zu ermöglichen, andererseits provozieren sie eine Immunantwort vom Körper.

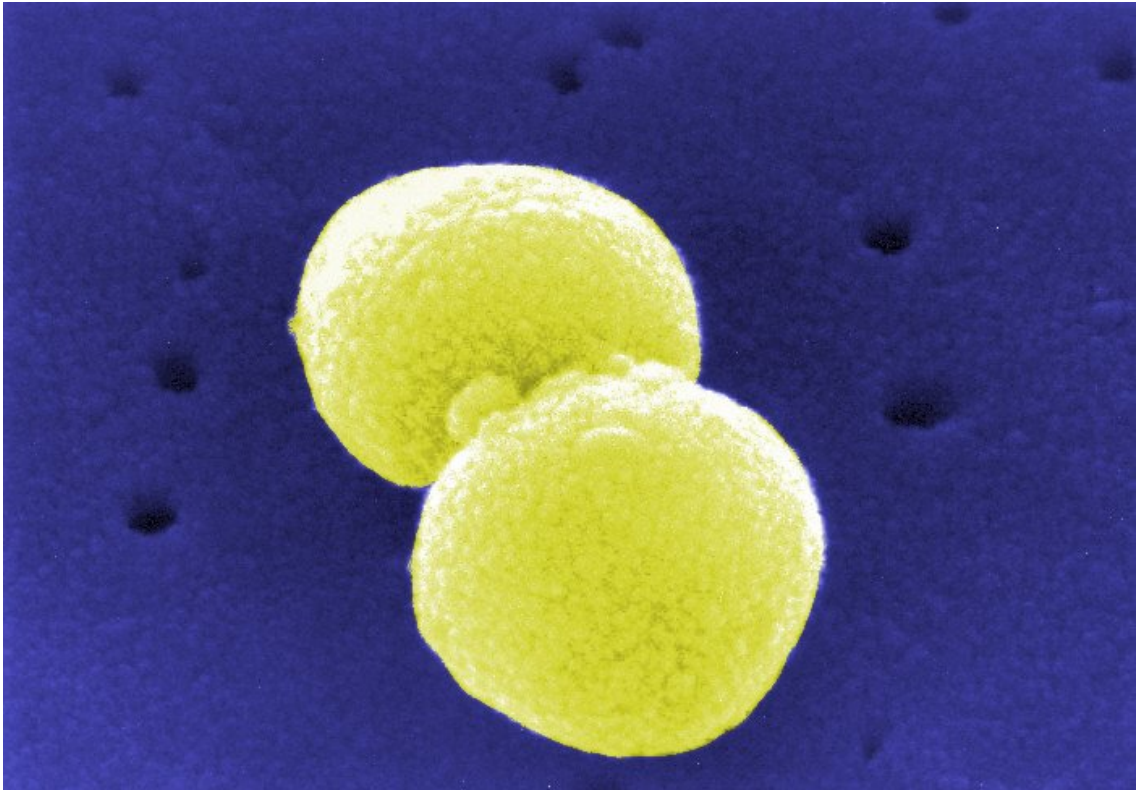


Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Streptococcus pneumoniae*¹

Der Pneumokokkus besitzt eine dicke, komplex gebaute Polysaccharid-Kapsel. Die Kapsel stellt generell einen wichtigen Virulenzfaktor dar (Iannelli et al. 1999), doch der genaue Mechanismus, wie die Kapsel die Infektion unterstützt, ist noch nicht vollständig bekannt. Die Kapsel an sich wirkt nicht inflammatorisch (Tuomanen et al. 1987). Wahrscheinlich fördert sie die Ausbreitung des Erregers im Organismus, indem sie die Phagozytose durch Granulozyten und Monozyten über Opsonierung mit spezifischen

¹ Copyrightfreie Abbildung (Quelle: Dr. Richard Facklam - CDC-Public Health Image Library [<http://phil.cdc.gov/phil/>])

Antikörpern, die sich kaum gegen die unterhalb der Kapsel gelegenen antigenen Strukturen bilden können, behindert (Lee et al. 1991).

Die Zellwandbestandteile der Pneumokokken verursachen eine Entzündungsreaktion, die zur Pneumokokkeninfektion beiträgt (Nau und Eiffert 2002). Sie haben eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung der Entzündungskaskade (als potenter Stimulator des alternativen Komplementsystems) in der Lunge und im Subarachnoidalraum (Tuomanen et al. 1985; 1987), bei der Stimulation der Zytokinproduktion (Heumann et al. 1994), bei der Zunahme der Permeabilität des Epithels (Tuomanen et al. 1985; 1987) und der Produktion des ‚*platelet activating factor*‘ (PAF) (Cabellos et al. 1992). Desweiteren tragen die Zellwandbestandteile – z. B. LTA (Lipoteichonsäure) wahrscheinlich auch durch direkte Schädigung von Neuronen (Kim et al. 1995; Nau und Brück 2002; Neher und Brown 2007) zur Entstehung von Folgeschäden der Meningitis mit bei.

Das Vorkommen von Teichonsäuren in der Pneumokokkenzellwand verstärkt die Entzündungsreaktion (Mitchell et al. 1997).

Um in den Subarachnoidalraum zu gelangen, müssen die Bakterien zuerst das Mukosaepithel des Nasopharynx besiedeln. Die Kolonisation wird durch bakterielle IgA-Proteasen erleichtert (Quagliariello und Scheld 1992; Tzanakaki und Mastrantonio 2007). Die Anheftung an das Mucosaepithel erfolgt über adhäsive Pili. Nach Erreichen des intravaskulären Raumes verhindert die Polysaccharid-Kapsel des Erregers die Phagozytose sowie die Aktivierung des Komplementsystems. Die Dauer der Bakteriämie und die Konzentration der Bakterien im Blut spielen für die Wahrscheinlichkeit eines Eindringens in den Liquorraum eine entscheidende Rolle.

Zum Schluss muss der Erreger die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Dazu heften sich die Pneumokokken mittels adhäsiver Mechanismen an die zerebralen Endothelzellen und verursachen ein Auseinanderweichen der Zellen. Somit wird eine Penetration der Blut-Hirn-Schranke möglich (Quagliariello und Scheld 1992; Tzanakaki und Mastrantonio 2007). In diesem Zusammenhang spielt auch der PAF eine Rolle: Ring et al. (1998) demonstrierten eine Interaktion zwischen Pneumokokken und PAF-Rezeptor als aktiven Transportmechanismus. Teilweise gelangen die Bakterien auch möglicherweise über einen aktiven Transport in den *Filiae olfactoriae* in das Gehirn (van Ginkel et al. 2003).

Da das Gehirn bei der körpereigenen Abwehr eine gesonderte Rolle spielt und aufgrund der Blut-Hirn-Schranke ein besonderer Schutz des Hirngewebes vor exogenen Noxen besteht, verfügt es nur über eine verminderte Immunität. So besitzt es kein effektives Komplementsystem. Auch wurde ein verzögertes Einwandern von Immunzellen aus dem Blut (wie Makrophagen und Granulozyten), die die Phagozytose und Abtötung von Erregern bewirken, beobachtet (Quagliarello und Scheld 1992). Die residenten Immunzellen (Mikroglia und Monozyten/Makrophagen) initiieren wahrscheinlich diese Einwanderung, spielen jedoch bei der Phagozytose von Bakterien selbst nur eine geringe Rolle. Andererseits kommt es im Rahmen der subarachnoidalen Entzündung im Verlauf auch zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (Sharief et al. 1992).

1.3 Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae*

Lange glaubte man, dass die Polysaccharid-Kapsel des *Streptococcus pneumoniae* allein für die Virulenz verantwortlich wäre, weil Stämme mit einer solchen Kapsel, verglichen mit unkapselten Stämmen, erheblich virulenter waren. Neuere Untersuchungen brachten aber die Erkenntnis, dass auch Pneumokokkenproteine wichtig für die Infektion durch den Erreger sind. Diese Proteine wirken entweder durch entzündungsfördernde Maßnahmen oder direkten Angriff auf die Wirtsmembran. Zu diesen Proteinen gehören Pneumolysin, Neuraminidase, Autolysin, Hyaluronidase, Pneumococcal Surface Protein A und Cholin-bindendes Protein A.

Grundsätzlich unterscheidet man zunächst den zytosolischen Virulenzfaktor Pneumolysin von den Glycom- bzw. Proteom-basierte Faktoren; diese lassen sich auch als extrazelluläre Faktoren zusammenfassen. Unter den Oberflächenproteinen wiederum lassen sich die an Peptidoglykane gebundenen von den an Cholinreste und den an Lipide gebundenen Proteinen unterscheiden (Jedrzejak 2004; García-Suárez et al. 2006) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae*

Zytosolische Virulenzfaktoren	Pneumolysin (Ply)
Glykom-basierte VF	Kapsel Teichonsäuren Lipoteichonsäuren
Oberflächenproteine (Proteom-basierte VF)	Neuraminidase A und B (NanA und NanB) Autolysin (LytA) Hyaluronidase (Hyl) Pneumococcal Surface Protein A (PspA) Cholin-bindendes Protein A (CbpA) Pneumococcal adherence and virulence factor A (PavA)

In der Forschungspraxis richtet sich das Interesse im Hinblick auf eine mögliche Entwicklung von Vakzinen und optimierten Pharmaka in erster Linie auf das Pneumolysin und die Oberflächenproteine (García-Suárez et al. 2006), die im Folgenden näher erläutert werden.

1.3.1 Zytosolische Virulenzfaktoren

Pneumolysin (Ply) spielt für viele Pneumokokkenerkrankungen eine Rolle und wird bei allen klinisch isolierten Pneumokokkenstämmen gefunden (Paton 1996; Winter et al. 1997; Hirst et al. 2004; García-Suárez et al. 2006).

Pneumolysin gehört zu den Cholesterol-abhängigen Zytolysinen (CDC = *cholesterol-dependent cytolysins*). Aufgrund einer bestimmten Aminosäuresequenz im Undecapeptid, einer homologen Kette aus 11 Aminosäuren, können die CDC durch die Thiolgrup-

pen der Aminosäure Cystein-Disulfidbrücken bilden. Dies führt zu einer Aktivierung der Toxine. Diese Toxine wurden früher als Thiol-aktivierende Zytolysine (TACs) bezeichnet. Da man bei Pneumolysin jedoch kein Cystein in der Undecapeptidkette gefunden hatte, wurde die Nomenklatur in CDC geändert (Alouf 2000; Shepard et al. 2000; Palmer 2001).

Cholesterol-abhängige Toxine zählen zu der Stoffklasse membranschädigender Toxine. Sie werden von einer Vielzahl von grampositiven Bakterien gebildet (früher TAC - (Berry et al. 1995; Paton 1996; Rossjohn et al. 1998).

Das besondere an Pneumolysin ist, dass es zytosolisch vorkommt und erst durch Autolyse des Bakteriums freigesetzt wird. Derzeit werden aber auch noch einige Autolyse-unabhängige Ausschüttungen diskutiert, wie z. B. das Vorkommen von extrazytoplasmatisch lokalisiertem Pneumolysin (Rossjohn et al. 1998; Balachandran et al. 2001; Hirst et al. 2004). Die Virulenz dieses Pneumolysins ergibt sich zum einen aus der zytolytischen Fähigkeit, aber auch aus der Komplementaktivierung (Rossjohn et al. 1998).

Das Pneumolysin verfügt über unterschiedliche Wirkmechanismen. Zum einen hat es eine zytotoxische und zum anderen eine komplementaktivierende Wirkung.

Bei der zytotoxischen Wirkung bindet das Pneumolysin über einen Cholesterolrezeptor an die Wirtszellmembran. Das führt zu einer transmembranösen Porenbildung, was wiederum zur Lyse der Zelle führt (Berry et al. 1995; Tweten 1995; Andrew et al. 1997; Rossjohn et al. 1998; Berry et al. 1999; Gilbert et al. 1999; Tilley et al. 2005). Die Aktivität von Pneumolysin ist *in vitro* durch Zugabe von Cholesterol hemmbar (Andrew et al. 1997; Gilbert et al. 1999; Hirst et al. 2004), und das stöchiometrische Verhältnis des Pneumolysin-Cholesterol-Komplexes beträgt nach einer Untersuchung von Nollmann et al. (2004) 1 : 1.

Die komplementaktivierende Wirkung entfaltet das Toxin durch seine Bindung an die Fc-Region des menschlichen Immunglobulin G (IgG) (Mitchell et al. 1991; Paton et al. 1993; Alexander et al. 1998; Berry et al. 1999; Hirst et al. 2004; Tilley et al. 2005). So aktiviert Pneumolysin den klassischen Komplementweg (Paton et al. 1984; Berry et al. 1999). Die vermehrte Aktivierung des Komplementsystems bewirkt einen erhöhten Verbrauch an Komplementfaktoren im Serum. Da Komplement essentiell für die Opso-

nierungsfähigkeit von Granulozyten ist (Paton et al. 1984; Alcantara et al. 1999; Casal und Tarrago 2003), wird die Phagozytosefähigkeit vermindert.

Einen anderen Effekt hat Pneumolysin in nicht zytotoxischer Konzentration; so werden die Chemotaxis und die bakterizide Wirkung der neurophilen Granulozyten verhindert (Paton und Ferrante 1983).

Die Ziliarbewegung ist ein wichtiger Bestandteil der nicht spezifischen Immunabwehr im Respirationstrakt (Boulnois et al. 1991). Pneumolysin ist dafür bekannt, dass es die Ziliarbewegung der Epithelzellen im menschlichen Respirationstrakt hemmt und durch Schädigung des Gefäßendothels eine erhöhte vaskuläre Permeabilität hervorruft (Feldman et al. 1990). Pneumolysin ist somit in der Lage, diese Gewebsbarrieren zu zerstören und eine Kolonisation in diesem Bereich zu bewirken sowie eine weitere Verbreitung des Bakteriums zu erleichtern (Rubins und Janoff 1998). Der Effekt von Pneumolysin bei der Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und Penetration ins zerebrale System sowie die Entwicklung des Hirnödems konnten experimentell nachgewiesen werden (Zysk et al. 2001; Nau und Eiffert 2002). Nach Beurg et al. (2005) schädigt das Pneumolysin spezifisch die cochleären Haarzellen und dürfte damit maßgeblich für die Hörstörungen als häufiges Residuum der Pneumokokkenmeningitis verantwortlich sein.

Pharmakologisch können diese Prozesse derzeit klinisch noch nicht beeinflusst werden. So beobachteten Nau und Eiffert (2002), dass Antibiotika zwar antiinfektiös – im idealfall – hoch wirksam sind, aber nur einen geringen antiinflammatorischen Effekt ausüben. Das hängt damit zusammen, dass es nach der antibiotisch bedingten Zelllyse von Pneumokokken zu einer massiven Ausschüttung von intrazellulären Toxinen (u. a. Pneumolysin) kommt. *In vitro* gelingt mit subinhibitorischen Konzentrationen von Antibiotika, die die Proteinsynthese hemmen (Clindamycin, Erythromycin, Rifampicin), eine Unterdrückung der Pneumolysin-Synthese; die praktische Relevanz dieser Beobachtung schätzen Spreer et al. (2007) allerdings vor allem wegen des Risikos einer Resistenzentwicklung eher skeptisch ein.

Pneumolysin ist neben H_2O_2 der Haupttrigger der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose. Diese Apoptose ist nur zum Teil Kaspasen-abhängig. Hauptsächlich geht es auf einen raschen intrazellulären Anstieg von Kalzium und reaktiven Sauerstoffradikalen sowie eine frühe Mitochondrienschädigung zurück, die über den TLR4 vermittelt

wird (Srivastava et al. 2005). Die geschädigten Mitochondrien produzieren AIF (Apoptose-induzierender-Faktor), was zur Apoptose führt (Braun et al. 2002).

Pneumolysin verursacht einen raschen Anstieg von intrazellulärem Kalzium durch seine transmembranöse Porenbildung, was wiederum zu einer raschen Zerstörung von Mitochondrien und somit zu der damit einhergehenden Freisetzung von AIF führt. Therapieansätze hinsichtlich einer Stabilisierung der Membran sowie einer Neutralisierung des einströmenden Kalziums sind in Erprobung (Braun et al. 2001; 2002; Stringaris et al. 2002).

Das 53 kDa große Protein besteht aus 471 Aminosäuren (Walker et al. 1987; Paton et al. 1993; Rossjohn et al. 1998; Jedrzejewski 2001). Die Strukturanalyse von Pneumolysin zeigt, dass ein Bereich in der Nähe des c-Terminus des Toxins, ein besonderer Cystinrest (Aminosäure 427 bis 437), vornehmlich für die Zytotoxizität bedeutsam ist. Eine Substitution von einigen Aminosäuren in diesem Bereich reduziert die Zytotoxizität von Pneumolysin um bis zu 99,9 % (Saunders et al. 1989; Tweten 1995; Berry et al. 1999).

1.3.2 Oberflächenproteine

Der *Streptococcus pneumoniae* besitzt eine Reihe von Proteinen, die mit der Zelloberfläche verbunden sind und als Virulenzfaktoren bezeichnet werden. Sie sind mit der Zellwand entweder durch LPXTG (grampositive attachment motif) oder eine nicht kovalente Cholinbindung verbunden. Zu den grampositiven Anheftungs-Motiven zählen die Neuraminidase und Hyaluronidase. *Pneumococcal Surface Protein A*, Autolysin und Cholin-bindendes Protein A gehören zu den Cholin-bindenden Proteinen (Jedrzejewski 2004).

1.3.2.1 Neuraminidase

Das Enzym Neuraminidase spaltet die N-Acetylneuraminsäuren (Sialinsäuren) von Oberflächenglykanen wie von Muzin, Glykolipiden und Glykoproteinen der Wirtszelle (Kelly und Greiff 1970; Winter et al. 1997). Diese Veränderung der Zellstruktur führt wahrscheinlich zu einer vergrößerten Wirtszelloberfläche, wobei jetzt mehr Rezeptoren für eine Interaktion mit den Pneumokokken zur Verfügung stehen (Berry et al. 1996; Tong et al. 2000). Somit könnte die Neuraminidase zu einer schnelleren und effektiveren Adhärenz des Erregers an der Wirtszelle führen (Williamson et al. 2008).

Auch diskutiert man, ob die Neuraminidase die Viskosität des Mukus reduziert und damit die Kolonisation des umliegenden Gewebes durch Pneumokokken erleichtert (Krivan et al. 1988; Scanlon et al. 1989). Diskutiert wird zudem eine Freisetzung von Einfachzuckern aus Glykokonjugaten der Wirtszelloberfläche als schnell und einfach verfügbare Energiequelle der Pneumokokken (Burnaugh et al. 2008): die genaue Rolle der Neuraminidase bei der Pneumokokken-Meningitis ist allerdings derzeit noch unklar.

Bei allen klinisch isolierten *Streptococcus pneumoniae*-Stämmen fand man Neuraminidase an der Zelloberfläche exprimiert (Kelly und Greiff 1970; O'Toole et al. 1971; Berry et al. 1996).

Der Erreger verfügt mindestens über zwei, wahrscheinlich jedoch drei Enzyme mit Neuraminidaseaktivität (NanA/NanB/NanC) (Camara et al. 1994; Berry et al. 1996), wobei die Bedeutung der Neuraminidasen noch nicht geklärt ist. Die Neuraminidasen unterscheiden sich hinsichtlich ihres strukturellen Aufbaus und ihrer pH-Aktivität.

Die NanA hat eine Molekularmasse von ca. 110-140 kDa (Camara et al. 1994) und das pH-Optimum von NanA liegt bei ~ 5 (Jedrzejewski 2001). Die NanB hat eine ungefähre Molekülmasse von 75 kDa (Berry et al. 1996) und ein pH-Optimum von ~ 7 (Berry et al. 1996). NanB verfügt über eine ungefähr 100-mal schwächere Aktivität als NanA (Lock et al. 1988; Berry et al. 1996). Durch die Kenntnis der Gensequenz der Neuraminidasen konnte eine NanA-defiziente Mutante hergestellt werden (Camara et al. 1994), die in einem Versuch mit ihrem Wildtyp verglichen wurde. Die NanA-defiziente Mutante wies eine verminderte Virulenz auf (Mitchell 2000), was die Virulenz der NanA belegt.

In den Tiermodellen zeigten sich speziesabhängige Unterschiede bei der Beimpfung mit gereinigter Neuraminidase. Intrazerebral inokulierte Mäuse litten an neurologischen Schäden und in einigen Fällen kam es zum Exitus (Kelly und Greiff 1970); im Gegensatz dazu fanden sich im Hunderversuch bei ähnlicher Inokulation keinerlei Symptome (O'Toole und Stahl 1975).

Auch zeigte eine erhöhte Konzentration von N-Acetylneuraminsäuren in der zerebrospinalen Flüssigkeit eine Häufung von Bakteriämie und Koma bei Patienten mit einer bakteriellen Meningitis (O'Toole et al. 1971).

Die Neuraminidase ist an sich nicht entzündungsfördernd, und auch eine Assoziation mit einem Hörverlust konnte im Tiermodell nicht nachgewiesen werden (Winter et al. 1997). Sie ermöglicht aber den Streptokokken eine längere Überlebensdauer und eine bessere Replikationsmöglichkeit in der Lunge (Mitchell 2000).

1.3.2.2 *Hyaluronidase*

Die Hyaluronidase wird von fast allen grampositiven Bakterien produziert und bei 99 % aller klinisch isolierten Streptokokken gefunden (Paton et al. 1993; Berry et al. 1994). Sie ist ein wichtiges Oberflächenprotein und dient der Spaltung von Hyaluron. Beim Hyaluron handelt es sich um ein Makropolysaccharid. Es besteht aus Wiederholungen von d-Glukuronsäure(1- β -3) N-acetyl-D-Glucosamid(1- β -4)-Ketten (Qiu et al. 1996). Dieses Polysaccharid dient nicht nur der Vernetzung von Zellen, sondern besitzt auch zahlreiche andere Funktionen, z. B. bei der Unterstützung der Körperabwehr (Jedrzejak 2001). Es ist sehr verbreitet in der extrazellulären Matrix und für eine Reihe biologischer Funktionen mit verantwortlich, wie z. B. Zellmigration und -differenzierung, Zell-Zell-Vernetzung, Embryonalentwicklung sowie Wachstum und Metastasierung von Tumorzellen (Miyake et al. 1990).

Da das Hyaluron sich über einen CD44-Rezeptor an andere Zellen bindet, liegt der Schluss nahe, dass Hyaluron für die Immunantwort wichtig ist, da auch Immunzellen diesen Rezeptor exprimieren (wie z. B. Neurophile, Makrophagen und T- bzw. B-Zellen) (Haynes et al. 1989; Miyake et al. 1990).

In welcher Weise die Hyaluronidase die Infektion von *Streptococcus pneumoniae* begünstigt, ist noch nicht geklärt.

Man weiß aber, dass die Hyaluronidase (Hyl) die Infektion insoweit fördert, dass sie das extrazelluläre Gewebe (Matrix) zerstört (Pritchard et al. 1994). Das geschieht durch die Trennung der 1,4-glykosidischen Verbindung von Hyaluron. Als Endprodukte von Hyaluron bleiben ungesättigte Polysaccharide mit einer Doppelsaccharideinheit übrig (Pritchard et al. 1994).

Die mit der Zerstörung einhergehende zunehmende Durchlässigkeit des Gewebes erleichtert den Pneumokokken die Translokation (z. B. vom Lungengewebe ins Blut).

Das konnte auch in einem Pneumonie-Modell von Mitchell (2000) beobachtet werden. Durch Insertions-Duplikation wurde eine Hyl-defiziente Mutante hergestellt, die die verminderte Virulenz des Mutanten belegte. Bei Beimpfung mit Hyl-defizienten Mutanten und Wildtyp während einer Pneumonie erreichten beide Erreger zwar zur gleichen Zeit die Blutbahn, aber in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Konzentration an Hyl-defizienten Mutanten betrug 10^3 /ml, wohingegen die Konzentration des Wildtyps im Blut bei 10^8 /ml lag. Bei direkter Gabe in die Blutbahn wurden keine Unterschiede hinsichtlich der Überlebensrate der Mäuse festgestellt. Das belegt, dass Hyaluronidase bei der Penetration durch das Gewebe zur Blutbahn wichtig ist (Mitchell 2000).

Dies wird unter anderem auch für ein Meningitismodell nach intranasaler Infektion zu Hilfe genommen. Durch die gleichzeitige intranasale Gabe von Hyaluronidase kann die natürliche Ausbreitung der Pneumokokken ins ZNS nachgeahmt werden, was mit der alleinigen intranasalen Infektion mit Pneumokokken selten gelingt (Zwijnenburg et al. 2001). Die Zunahme der Gewebsdurchlässigkeit spielt eine wichtige Rolle auch bei Wundinfektionen, Pneumonie und anderen Septitiden (Jedrzejewski 2001).

In Streptokokkenkulturen wurde das Enzym sowohl als Oberflächenprotein, aber auch als Enzym im Medium gefunden. Das legt den Schluss nahe, dass zumindest ein Teil der Hyaluronidase ins umliegende Wirtsgewebe abgegeben wird, um die Ausbreitung einer Infektion zu beschleunigen (Berry et al. 1994).

1.3.2.3 Autolysin

Autolysin zählt zu den Mureinhydrolasen, die bei allen Mikroorganismen vorkommen. Mureinhydrolasen dienen der Zelle für viele physiologische Funktionen, wie z. B. zum Wachstum oder zur Querteilung, indem sie Lücken im Mureinsakkulus entstehen lassen, in das sich wiederum neues Murein einlagern kann (Tomasz 1981).

Dieses Enzym kann auch die Lyse der Bakterienzelle hervorrufen, was unweigerlich zum Zelltod führt (Rogers et al. 1980; Mitchell et al. 1997; Tai 2006).

Die LytA-Amidase, eine N-acetylmuramoyl-L-alanin Amidase, ist die wichtigste Murein-Hydrolase des *Streptococcus pneumoniae* (Mosser und Tomasz 1970; Romero et al. 2007). Dieses Enzym kommt in der Zellwand des Erregers vor. Hierbei handelt es sich um ein 36 kDa großes Enzym, das zwei Funktionsregionen besitzt. Die eine Domäne wird als C-terminales Teil bezeichnet, wo die Bindung zu Teichon- bzw. Lipoteichonsäuren der Pneumokokken-Zelloberfläche stattfindet (dient der Verankerung). Dem N-terminalen Bereich wird die lytische Aktivität bezüglich der Pneumokokkenpeptidstrukturen zugesprochen (lytische Funktion) (Romero et al. 2007).

Man nimmt an, dass die Verbindung mit der Lipoteichonsäure *in vivo* einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der potentiellen Lyseaktivität von Autolysin hat. In dieser Verbindung befindet sich dieses Enzym in einem inaktiven Zustand (vielleicht durch einen mangelnden Zugang zu Substraten). Wird unter bestimmten Voraussetzungen, wie zum Beispiel durch Biosynthesestop (z. B. bei Nährstoffentzug) oder bei einer Penizillintherapie, diese Verbindung unterbrochen, wird das Enzym aktiv und trennt die kovalenten Bindungen der cholinhaltigen Zellbestandteile. Dies führt zur Autolyse der Bakterienzelle (Paton et al. 1993).

Andere Autoren gehen davon aus, dass das Enzym in zwei Formen vorkommt. Zum einen in einer zytoplasmatischen inaktiven Form und zum anderen in einer membranasoziierten aktiven Form (Briese und Hakenbeck 1985; Romero et al. 2007). Im Versuch zeigte sich, dass das inaktive Enzym gehäuft in Zellen, die auf Ethanolaminen wachsen, vorkommt. Hingegen wurde eine Akkumulation des aktiven Enzyms in Kulturen, die auf cholinhaltigen Medien wachsen, beobachtet (Briese und Hakenbeck 1985). Nach Isolierung und Reinigung und durch Gabe von Cholin wurde das inaktive Enzym in eine aktive Form überführt (Höltje und Tomasz 1975b; Romero et al. 2007). Somit stellt

Cholin einen Co-Faktor bei der Umwandlung dar (Giudicelli und Tomasz 1984), und man nimmt an, dass LytA durch Cholin einen Konformationswechsel erfährt und daraus seine Enzymaktivität erhält (Höltje und Tomasz 1975a, b; Sánchez-Puelles et al. 1987; Romero et al. 2007).

Autolysin fördert auf zwei Wegen die Pneumokokkenerkrankung. Zum einen entfaltet es seine lytische Wirkung durch Bindung an das Cholin der Teichonsäure der Pneumokokkenzellwand (Jedrzejak 2001), wo es proinflammatorisch wirksame Zellbestandteile, wie z. B. Peptidoglykane und Teichonsäuren, freisetzt (Tuomanen et al. 1985; Berry et al. 1989; Mitchell et al. 1997; Balachandran et al. 2001; Romero et al. 2007)..

Zum anderen wirkt es auch indirekt über die Freisetzung von zytoplasmatischen Proteinen. Sie werden durch die Lyse der Bakterienzelle aus dem Zytoplasma ins Gewebe abgegeben. Zu diesen Proteinen zählt zum Beispiel das Pneumolysin, das oben schon erwähnt wurde (Johnson 1977; Mitchell et al. 1997; Sicard et al. 2000).

Im Mausmodell mit einem Autolysin-defizienten Mutanten konnte der Virulenzsteigernde Effekt von Autolysin eindeutig belegt werden (Berry et al. 1989; 1992). Die Autolysin-defizienten Erreger, die in Mäuselungen bei einem Pneumoniemodell injiziert wurden, lösten keine Entzündungsreaktion in der Lunge aus und waren nicht im Blut nachweisbar (Canvin et al. 1995). Es wurde beobachtet, dass Autolysin auch bei anderen Pneumokokkenerkrankungen entscheidend mitwirkt, so z. B. bei der Autolysinvermittelten Freisetzung von Zellwandbestandteilen bei der Mittelohrinfection im Chinchilla-Modell bei Otitis media (Sato et al. 1996).

Die Immunisierung mit Autolysin bei Mäusen bewirkt einen entscheidenden Schutz gegen Pneumokokken (Lock et al. 1988). Durch die Beimpfung der Mäuse mit Pneumolysin oder mit beiden Enzymen konnte aber keine entscheidende Zunahme des protektiven Effekts, sondern eher ein annähernd gleicher Schutz festgestellt werden (Lock et al. 1988). Auch war in einem Mausmodell die Überlebensrate von Mäusen, die mit Autolysin immunisiert und dann mit einem Pneumolysin-defizienten Mutanten infiziert wurden, nicht erhöht (Lock et al. 1988).

1.3.2.4 Cholin-bindendes Protein A (CbpA)

Pneumokokken verfügen über Oberflächenproteine, die es dem Bakterium erlauben, an die Zelle anzudocken. Hierzu gehören neben der LytA und dem PspA auch das Cholin-bindende Protein A (CbpA). Pneumokokken besitzen mehrere Cholin-bindende Proteine, wobei CbpA das am besten untersuchte ist und bei allen untersuchten Pneumokokken vorkommt (Rosenow et al. 1997). Das Enzym besteht aus 663 Aminosäuren, und sein Molekulargewicht liegt bei 75 kDa (Wren 1991).

Ebenso wie die anderen Oberflächenproteine verfügt das CbpA über zwei Funktionsbereiche: zum einen über den C-terminalen Teil, der zur Verankerung dient (wie oben beim autolytischen Enzym beschrieben), und zum anderen über einen funktionellen N-terminalen Bereich.

Die Aufgabe von CbpA bei der Adhärenz an die Wirtszelle und die Rolle bei der Verbreitung der Infektion konnte durch Studien belegt werden. CbpA-defiziente Mutanten wurden mit ihren Wildtypen verglichen. Den Mutanten fehlte die Fähigkeit, sich an die Zytokin-aktivierten Wirtszellen zu binden. Das CbpA scheint eine Art „Bindeglied“ zwischen dem Cholin der Lipoteichonsäure/Teichonsäure der Pneumokokken und der Wirtszelle zu sein und bewirkt eine prolongierte nasopharyngeale Kolonisation (Orihuela et al. 2004). Somit scheint CbpA das erste bekannte Adhäsionsprotein der Pneumokokken zu sein (Rosenow et al. 1997). Es ist daher auch wahrscheinlich, dass CbpA unter anderem auch für einen Wechsel von der Kolonisation zur Invasion der Pneumokokkenerkrankung verantwortlich ist (Jedrzejewski 2001).

Es wird auch darüber diskutiert, ob CbpA und andere Cholin-bindende Proteine die Cholinzellwandreste blockieren und somit eine Interaktion des Erregers mit der Wirtszelle verhindern. Zytokinaktivierte Wirtszellen exprimieren an ihrer Zelloberfläche PAF-Rezeptoren, die die Fähigkeit haben, das Cholin der Pneumokokkenzellwand zu binden und durch diese Bindung die Immunantwort aktivieren. Somit könnten die CBPs diese Verbindung verhindern (Cundell et al. 1995).

Beide Möglichkeiten, sowohl die Pneumokokken-Adhäsion als auch die Pneumokokken-Cholin-Blockierung, sind wahrscheinlich (Jedrzejewski 2001).

1.3.2.5 *Pneumococcal surface Protein A (PspA)*

PspA ist Bestandteil der Zellwand von Pneumokokken und zählt ebenfalls zu den Oberflächenproteinen (McDaniel et al. 1984). Auch dieses Protein wurde bei allen klinisch isolierten Pneumokokkenstämmen gefunden (Crain et al. 1990). Die Molekülmasse von PspA variiert zwischen 67 bis 99 kDa (Jedrzejewski 2001).

Das PspA zählt zu den Cholin-bindenden Proteinen. Es besteht aus einem C-terminalen Bereich, der mit dem Erreger verbunden ist, und einem N-terminalen Bereich, der als funktioneller Bereich dient und an Laktoferrin bindet (Hammerschmidt et al. 1999; Hakansson et al. 2001).

PspA bindet sich über die C-terminale Region an das Cholin der Lipoteichon- bzw. Teichonsäuren der Pneumokokken (nicht-kovalente Bindung). Der C-terminale Bereich wird auch Cholin-bindende Region genannt.

Die Cholin-bindenden Regionen wurden auch noch auf Oberflächen anderer Bakterien gefunden, wie z. B. *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium difficile*, *Streptococcus mutants* und *Streptococcus downei*.

Inaktivierung des PspA-Gens führt zu einer verminderten Virulenz gegenüber dem jeweiligen Wildtyp-Stamm (Briles et al. 1988). Die Funktion von PspA besteht darin, dass es die Pneumokokken vor dem Komplementsystem des Wirts schützt (Cundell et al. 1995; Ren et al. 2004) und die Phagozytose reduziert (Briles et al. 1997).

Genau gesagt, handelt es sich bei PspA um einen Inhibitor der Faktor-B-getriggerten Komplementaktivierung (Tu et al. 1999), und es reduziert bzw. verhindert die Anlagerung von Komplement C3b, woraus sich eine Verringerung der Aktivierung des alternativen Komplementweges ergibt. Dadurch wird die komplementvermittelte Phagozytose reduziert (Briles et al. 1997; Li et al. 2007).

Die Strukturanalyse des PspA zeigte eine hohe elektrostatische Spannung, die die Kapsel der Pneumokokken stabilisiert und durch ihre elektronegative Eigenschaft eine Komplementaktivierung verhindert (Jedrzejewski 2001).

1.3.2.6 *Pneumococcal adherence and virulence factor A (PavA)*

Pneumokokken können sich an Glykosidrezeptoren von Epithelzellen und an Fibronectin anheften und somit zu Mittelohrinfektionen bis hin zu Meningitis oder Pneumokokken-Pneumonien führen. Ein Virulenzfaktor, der eine wichtige Rolle diesbezüglich zu spielen scheint, ist das PavA (Pneumococcal adherence and virulence factor A).

Es handelt sich um ein 551 Aminosäuren großes Polypeptid, welches zu den Oberflächenproteinen gezählt wird. PavA wirkt als Bindeglied zwischen dem Erreger und dem Fibronectin. PavA ist in der Lage, sich an Fibronectin sowohl in seiner flüssigen als auch in seiner nicht mobilen Phase zu binden. Anhand einer Studie von Holmes et al. konnte dies bewiesen werden. Hierbei wurden zwei Pneumokokkenstämme (Wildtypen vs. *PavA*^{-/-}-Mutant) miteinander verglichen, wobei der Wildtyp eine 10-fach höhere Bindung zu Fibronectin aufwies (Holmes et al. 2001). Diese Beobachtung machten auch van der Flier et al. (1995).

Man geht davon aus, dass Fibronectin-bindende Proteine eine wichtige Rolle bei der Erreger-Wirts-Beziehung spielen, wobei sie die Aufnahme von Bakterien oder bakteriellen Produkten stimulieren (Holmes et al. 2001).

Es gibt eine Reihe von Fibronectin-bindenden Proteinen, welche aber von PavA abgegrenzt werden müssen. PavA weist in seiner primären Sequenz nicht das charakteristische N-terminale Polypeptid auf (Izard und Kendall 1994). Darüber hinaus fehlt die typische C-terminale Domäne, die der Verankerung an den gram-positiven Bakterienzellen dient (Navarre und Schneewind 1994), auch fehlt eine Cholin-bindende Sequenz bei diesem Polypeptid. Darüber hinaus zeigt PavA unterschiedliche Sequenzen im Fibronectin-bindenden Bereich. Deshalb ist es in der Lage, an immobilisiertem Fibronectin zu binden, auch bei einem hohen Überschuss an Fibronectin in flüssiger Phase. Man nimmt an, dass anhand dieser unterschiedlichen Sequenzen das Polypeptid die Konformation des an der Oberfläche gebundenen Fibronectin erkennt.

PavA ist in der Lage, die Komplementaktivität zu vermindern, indem es die Bindung zwischen Komplement C3b zu den Zellen hemmt (Hammerschmidt et al. 1999; Tu et al. 1999; Pracht et al. 2005). Die Fibronectin-bindende Wirkung von PavA ist durch Heparin hemmbar (van der Flier et al. 1995), inwieweit sich therapeutische Ansätze daraus ergeben, ist bisher nicht weiter untersucht worden.

1.4 Problemstellung

Die klinische Relevanz der unterschiedlichen putativen bzw. nachgewiesenen Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* für die Therapie der bakteriellen Meningitis sowie für die Entwicklung proteinbasierter Impfstoffe ist noch unzureichend geklärt. Um weitere Aufschlüsse über die pathogenetische Bedeutung der unterschiedlichen Virulenzfaktoren zu gewinnen, wurde in der vorliegenden Untersuchung an einem Mausmodell mit intrazerebraler Infektion (Wellmer et al. 2000; Gerber et al. 2001) die Virulenz eines Wildtyps von *Streptococcus pneumoniae* (D39) mit anderweitig isogenischen Derivaten mit Defektmutationen der Gene zur Kodierung von Neuraminidase A und B, Hyaluronidase und Pneumolysin verglichen. Als Zielparameter kamen neben der Vigilanz und der motorischen Funktion auch das Körpergewicht sowie das morphologische Bild der Entzündung zur Anwendung.

2 Material und Methoden

2.1 Art der Studie

In der vorliegenden Arbeit wurde am Tiermodell versucht, die Funktion und Auswirkungen der Virulenzfaktoren von Pneumokokken zu bestimmen. Die Tierversuche wurden durch die Bezirksregierung Braunschweig (AZ 604.42502/01-20.97) genehmigt.

2.2 Tiere

In dem Tiermodell wurden fünf bis acht Monate alte männliche Mäuse des Stammes C57Bl6 verwendet. Die Tiere wurden in Kollektiven von maximal 10 Mäusen gehalten. Sie erhielten „Haltungsfutter für Mäuse“ (Altromin, Lage) und Wasser ad libitum. Die Versuchstierzahl in den verschiedenen Versuchsgruppen betrug 11.

2.3 Bakterien

Die verwendeten Bakterien wurden durch Dr. med. Gregor Zysk, Abteilung Mikrobiologie, Universität Düsseldorf, generiert und für diese Versuche freundlicherweise bereitgestellt. Als Wildtyp-Stamm für die Infektionsversuche diente ein allgemein bekannter Laborstamm von *Streptococcus pneumoniae*: D39, der auch Grundlage der ge-

nerierten Stämme war. Bei diesem Stamm handelt es sich um einen *Streptococcus pneumoniae* Typ 2. Für den jeweiligen Virulenzfaktor inaktive Mutanten des *Streptococcus pneumoniae*-Stamms D39 wurden durch Insertions-Duplikations-Mutagenese hergestellt. Dabei wurden interne Genfragmente, die aus chromosomaler DNA amplifiziert wurden, mit dem Insertionsvektor pJDC9 mittels Standard-DNA-Technik ligiert (Chen und Morrison 1988). Die Insertion erfolgte an der Position 547 des 1416 bp langen Ply-Gen; an der Position 605 des 3108 bp langen NanA-Gen, an Position 735 des 2094 bp langen NanB-Gen und an Position 534 des 2850 bp langen Hyl-Gen.

Die entstandenen Erythromycin-resistenten Mutanten wurden auf 1 µg/ml Erythromycin enthaltendem Luria-Bertani- (LB-) Agar, welcher 5 % Schafblut enthielt, selektiert. Der funktionelle Verlust von Pneumolysin wurde durch einen Hämolyse-Assay überprüft. Die Stabilität der Mutanten wurde durch PCR-Analyse und DNA-Sequenzierung in nach Infektion aus der Milz isolierten Pneumokokken überprüft. Das Wachstumsverhalten der Pneumolysin-defizienten Pneumokokken wurde in Todd-Hewitt-Bouillon mit Hefeextrakt überprüft.

Die Inokula wurden folgendermaßen hergestellt: Der entsprechende Stamm oder die Mutanten wurden in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation gewonnen, danach mit einer phosphatgepufferten 0,9 %-Kochsalzlösung gewaschen, resuspendiert, aliquotiert und bei -70 °C aufbewahrt. Die Bakterientiter im Inokulum wurden mittels Verdünnungsreihen auf Blutagarplatten bestimmt und vor Infektion auf die gewünschte Menge durch entsprechende Verdünnung (10^4 Bakterien/25 µl) gebracht. Die Konzentration im Inokulum wurde erneut mittels Verdünnungsreihe nach der Verdünnung nach Inokulation kontrolliert.

2.4 Meningitismodell

Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg) anästhesiert. Danach wurden 25 µl einer 0,9 % NaCl-Lösung mit 10^4 CFU (*colony-forming units* = koloniebildende Einheiten) des entsprechenden Stammes

(Wildtyp oder Mutante) in den rechten Frontallappen mit einer 27 G-Einwegnadel injiziert. Mittels Applikationshilfe wurde garantiert, dass die Einstichtiefe 2-3 mm betrug. Dadurch wurde erreicht, dass der Hauptteil des Inokulum über den Schrägschliff der Nadelöffnung in den Subarachnoidalraum und nur ein Teil in die oberflächliche Hirnregion gelangte.

Alle Tiere erwachten ohne offensichtliche Defizite oder Krankheitszeichen aus der Narkose.

Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde 12, 24, 32 und 36 Stunden nach der Infektion durch einen klinischen Score, Gewicht und Seiltest erfasst. 36 Stunden nach der Infektion wurden die Tiere getötet (Dekapitation) und das Blut entnommen. Gehirn, Leber und Milz wurden entfernt.

Das Zerebellum und die ventrale Hälfte der Milz wurden in einer 0,9 %igen Kochsalzlösung (1/20 w/w) homogenisiert. Bakterien-Titer im Blut und in homogenisierter Milz und Zerebellum wurden mittels Verdünnungsreihen auf Schafblut-Agarplatten bestimmt.

Der Rest des Gehirns und die Leber wurden in 4 %igem Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet.

Um den Neuronenschaden zu quantifizieren, wurde sowohl eine Gruppe von Mäusen mit dem *Streptococcus pneumoniae* D39-Wildtyp als auch eine Gruppe mit Pneumolysin-defizienten *S. pneumoniae* (jeweils n=10) infiziert. Nach 36 Stunden wurden die Mäuse mit Xylazine und Ketamin anästhesiert, mittels zervikaler Dislokation getötet und danach die Gefäße mit einer phosphatgepufferten Salzlösung sowie anschließend mit ca. 50 ml 4 % Paraformaldehyd perfundiert. Das Gehirn wurde daraufhin entnommen, weitere 2 Tage in 4 % Paraformaldehyd eingelegt und dann in Paraffin eingebettet.

In speziellen Experimenten wurde die Überlebensdauer von mit D39-Wildtyp- und Pneumolysin-defizienten Pneumokokken infizierten Mäusen bestimmt. Dafür wurden in gleicher Weise 12 Mäuse pro Gruppe infiziert und die Zeit bis zum Tode bzw. bis zur Tötung bei einem klinischen Score von 3 (präfinaler Zustand) bestimmt.

2.4.1 Klinischer Score

Der klinische Score wurde wie folgt ermittelt:

Tabelle 2: Klinischer Score

0 Punkte	gesund (keine offensichtlichen Verhaltensveränderungen)
1 Punkt	leicht lethargisch
2 Punkte	mittelmäßig lethargisch (offensichtliche Verminderung spontaner Aktivität)
3 Punkte	schwer lethargisch, gehunfähig (seltene spontane Aktivität, aber Bewegung nach externer Stimulation)
4 Punkte	Tod

Tiere mit einem Score von 3 wurden aus ethischen Gründen getötet.

2.4.2 Seiltest

Ein 60 cm langes Seil wurde in einer Höhe von 60 cm über dem Boden befestigt. Man setzte die Maus in die Mitte des Seiles. Eine gepolsterte Kiste wurde unter das Seil gestellt, damit herunterfallende Mäuse sich nicht verletzen konnten (Abbildung 2).



Abbildung 2: Versuchsaufbau für den Seiltest

Die Zeit zum Erreichen eines Endes wurde gemessen. Sowohl das Erreichen eines Endes als auch die benötigte Zeit wurden in einem Score zusammengefasst. Mäuse, die in weniger als 7 Sekunden das Ende erreichten, erhielten einen Score von 1. Alle folgenden 6 Sekunden wurden mit einem zusätzlichen Punkt bewertet. Mäuse, die länger als 60 Sekunden am Seil hingen, ohne ein Ende zu erreichen, erhielten 11 Punkte. Mäuse, die vom Seil fielen, bevor 60 Sekunden erreicht waren, erhielten zu den 11 Punkten pro 6 Sekunden, die zu 60 Sekunden fehlten, einen extra Punkt. Die höchste Punktzahl (20 Punkte) erhielten Mäuse, die innerhalb der ersten 6 Sekunden vom Seil fielen (Wellmer et al. 2000) [Tabelle 3].

Tabelle 3: Punktwertung beim Seiltest

Zeit (Sekunden)	Ende erreicht	Ende nicht erreicht
0-6	1	20
7-12	2	19
13-18	3	18
19-24	4	17
25-30	5	16
31-36	6	15
37-42	7	14
43-48	8	13
49-54	9	12
55-60	10	11
>60		11

2.4.3 Gewichtsverlust

Die Gewichtsbestimmung erfolgte mit einer herkömmlichen Waage auf 0,5 g genau.

2.4.4 Histologie

Es wurden 1 µm dünne Schnitte von der Leber und koronare Schnitte des Gehirns angefertigt, mit Haematoxylin/Eosin bzw. Chloracetatesterase angefärbt und mittels Lichtmikroskop untersucht. Die Gehirnregionen wurden semi-quantitativ nach Entzündungen und Neuronenschaden ausgewertet.

2.4.4.1 *Haematoxylin-Eosin (HE)-/Chloracetatesterasefärbung*

HE-Färbung:

Bei der HE-Färbung wird zunächst das Objekt in Xylol (3 x 3 min.) und dann in einer absteigenden Alkoholreihe für je 2 min. entparaffiniert. Die Färbung erfolgt dann in folgenden Schritten:

1. 3-8 min. Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer
2. Differenzieren in HCl-Alkohol (1750 ml Iso-alk/750ml Aqua dest./25ml HCl 25%)
3. 10 min. Bläuen in fließendem Leitungswasser
4. Färben in Eosin 5-15 min. (0,1% in Aqua dest.). Es soll mäßig überfärbt werden.
5. Auswaschen in Wasser, 1-5 min.
6. Aufsteigende Alkoholreihe (in die niedrigen Alkohole nur kurz eintauchen, da Eosin mit H₂O ausgewaschen wird)
7. Xylol (3x3 min.)
8. Eindecken mit DePex

Verwendete Lösungen:

- Hämalan nach Mayer: gebrauchsfertig nach Filtrieren (Merck, Bestellnr. 1.09249.0500 [500 ml])
- Eosin: 1% Stammlösung (Eosin G, Merck, Bestellnr. 1.15935.0025 [25g])
0,1% Gebrauchslösung: 10 ml Stammlsg., 90ml Aqua dest.
1 Tropfen konz. Essigsäure
oder
Stammlösung aus 2 g Eosin, 40 ml Aqua dest., 160 ml 95% Alk.
Gebrauchslösung: 1 Teil Stammlsg. + 3 Teile 80 % Alk., auf 200ml Lsg.
0,5 ml Eisessig

Die Färbung zeigt Zellkerne, Kalk, sauren Schleim und grampositive Bakterien blau, alles Übrige in verschiedenen Tonabstufungen rot.

Die Dauer der Färbezeit mit Eosin hängt von der Konzentration der Farbstofflösung ab, aber auch von der Fixierung der Präparate. Die Färbung wird durch einen Zusatz von 1 Tropfen Essigsäure auf 100 ml Eosinlösung verbessert.

Die **Chloracetatesterasefärbung** erfolgte in folgenden Schritten:

1. Entparaffinierung:

3x Xylol (insg. 30 min.)

3x 100% Ethanol

1x 90% jeweils 3-5 min.

70%

50%

1x E-Wasser (entmineralisiert; 3 min.)

1x PBS

2. Färbung:

A)

- i. 50mg Pararosanilin (Merck Nr. 7601) 3 ml HCl (1M) lösen und abkühlen lassen
- ii. ca. 2ml (etwas mehr) ausgekühlte 1M NaNitrit (0,09g NaNitrit + 10ml A. dest.) unter ständigem Schütteln langsam tropfenweise zu i. geben, bis ein Farbumschlag von braun zu gelb erfolgt. 5 min. bei RT reagieren lassen.

B)

- i. 0,9 mg Naphthol-AS-D-Chloracetat (Sigma N 0758) + 500 µl Dimethylformamid lösen
- ii. Zu A) dazugeben.
- iii. Zugabe von 250 µl Pararosanilin-Lösung (A) - wird rot
- iv. Mit PBS auf 50 ml auffüllen
- v. Den entstandenen flockigen Niederschlag abfiltrieren

C)

- i. 30-40 min. Inkubationszeit bei RT
- ii. 10 min. mit Leitungswasser spülen, eventuell mit Häkalaun gegenfärben
- iii. Häkalaun: 3 x kurz eintauchen und dann mit Leitungswasser spülen (ca. 4 min.)
- iv. Mit Aquamont eindeckeln

2.4.4.2 Entzündungsscore

Die Schwere der meningealen Entzündung wurde durch die Anzahl der Granulozyten in Hirnarealen unter einem Mikroskop mit high-power field (x 40 Objektiv) eingeschätzt. Dabei wurden drei meningeale Abschnitte (oberflächliche Neocortexbereiche), beide Hippocampusfissuren, der frontale Interhemisphärenspalt und der dritte Ventrikel untersucht (Abbildung 3).

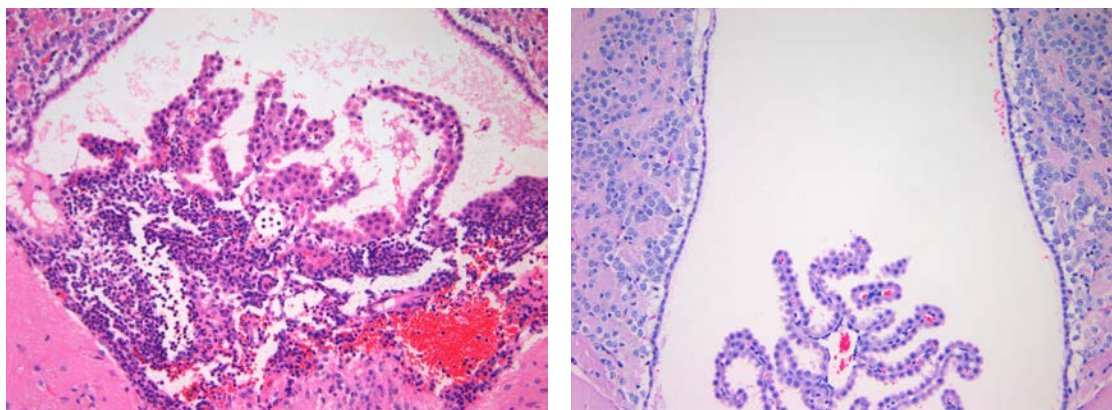


Abbildung 3: Lichtmikroskopisches Bild, HE-Färbung. Links stellen sich im Bereich der Meningen >50 Granulozyten dar, rechts keine Granulozyten sichtbar

Der Score wurde folgendermaßen ermittelt:

Tabelle 4: Bewertung der granulozytären Infiltration

Keine Granulozyten	0 Punkte
Granulozyten	1 Punkt
11-50 Granulozyten	2 Punkte
> 50 Granulozyten	3 Punkte

Der Score der einzelnen Areale wurde addiert. Somit war ein maximaler Score von 21 Punkten möglich (Gerber et al. 2001).

2.4.4.3 Neuronaler Schaden

Der Neuronenschaden wurde anhand von HE-Schnitten semiquantitativ ausgewertet. Dabei wurden vier Areale des Gehirns (Neocortex, Striatum, Hippocampus, Gyrus dentatus) auf die Dichte von nekrotischen oder apoptotischen Neuronen untersucht, wobei aufgrund visueller Einschätzung ein Score nach folgenden Kriterien ermittelt wurde:

- <10 % aller Neuronen geschädigt = 1 Punkt
- 10-30 % der Neuronen = 2 Punkte
- >30 % der Neuronen = 3 Punkte.

Der Score der individuellen Bereiche wurde pro Tier zu einem Gesamtscore addiert, als Maximum ergaben sich hier 12 Punkte.

2.5 Statistik

Die erhobenen Ergebnisse wurden, sofern es sich um parametrische normalverteilte Daten (z. B. Bakterientiter nach logarithmischer Transformation) handelte, als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Gruppenunterschiede wurden statistisch mittels t-Test (bei 2 Gruppen) oder ANOVA (bei mehr als 2 Gruppen) ermittelt. Zur Korrektur für wiederholtes Testen wurde der Dunnett Test verwendet. Bei nicht-parametrischen Daten (verschiedene Scores) wurden die Ergebnisse deskriptiv mit Median und 25er sowie 75er Perzentile angegeben. Der Gruppenvergleich erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test (2 Gruppen) oder Kruskal-Wallis-Test (mehr als 2 Gruppen). Als post hoc-Analyse wurde der Dunn's-Test verwendet. P-Werte von $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Die Überlebenszeiten in mit *ply*^{-/-}-Mutanten und D39-Wildtyp-Stamm infizierten Mäusen wurden mittels Kaplan-Meier-Kurven dargestellt, die Überlebenszeiten wurden mit dem log rank-Test statistisch verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro*-Wachstum der Pneumolysin-defizienten D39-Mutante

Das *in vitro*-Wachstum der Pneumolysin-defizienten Mutante war gleich dem des D39-Wildtyp-Stammes.

3.2 Klinischer Verlauf der Meningitis im Mausmodell

3.2.1 Gewichtsverlust

Im Verlauf des Mausmodells verloren alle Mäuse infektionsbedingt an Gewicht. Obwohl der Gewichtsverlust bei Mäusen, die mit Pneumolysin-defizienten Stämmen (*ply*^{-/-}) infiziert wurden, etwas geringer ausfiel, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden; der Gewichtsverlust bei den mit den anderen modifizierten Stämmen infizierten Mäusen war eher höher als beim D39-Wildtyp (Abbildung 4, Tabelle 5).

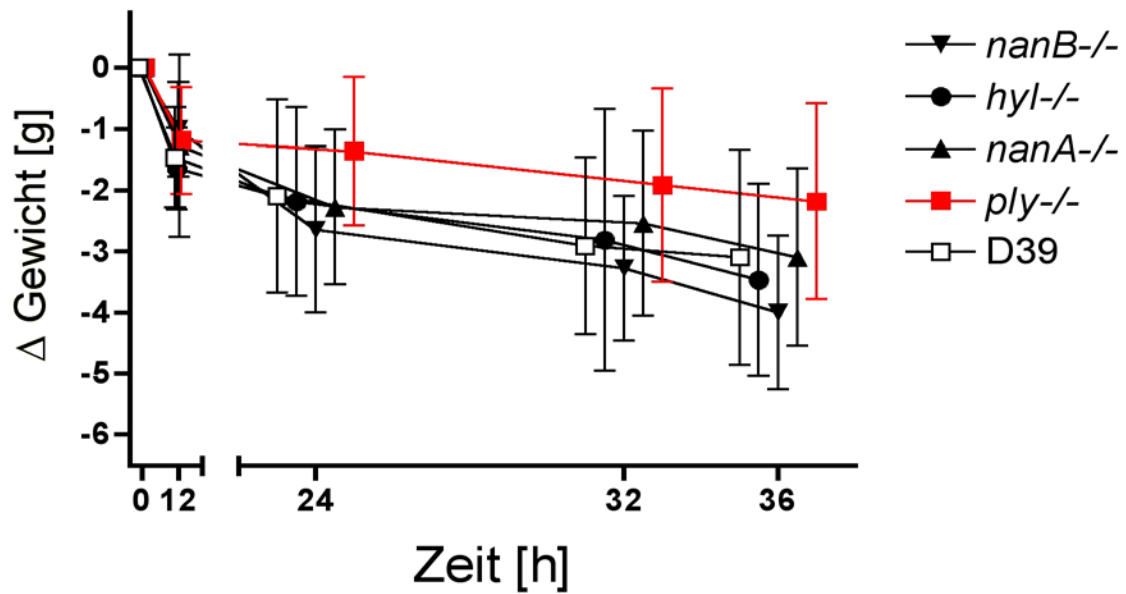


Abbildung 4: Graphische Darstellung des Gewichtsverlustes (Mittelwert \pm Standardabweichung) im Mausmodell im Vergleich mit allen infizierten Mäusen.

Zur Legende (vgl. Wellmer et al. 2002):

ply=Pneumolysin, *nanA*=Neuraminidase A, *nanB*=Neuraminidase B, *hyl*=Hyaluronidase

Tabelle 5: Gewichtsverlust im Mausmodell bei allen infizierten Mäusen. Zur Legende siehe Abbildung 4

		<i>S. pneumoniae</i> -Stamm					
		D39	<i>ply</i> ^{-/-}	<i>nanA</i> ^{-/-}	<i>nanB</i> ^{-/-}	<i>hyl</i> ^{-/-}	p
Gew.-verlust [g]	12 h	-1,46 \pm 0,82	-1,18 \pm 0,87	-1,27 \pm 1,49	-1,00 \pm 0,77	-1,64 \pm 0,67	0,59
	24 h	-2,09 \pm 1,58	-1,36 \pm 1,21	-2,27 \pm 1,27	-2,64 \pm 1,36	-2,18 \pm 1,54	0,32
	32 h	-2,91 \pm 1,45	-1,91 \pm 1,58	-2,54 \pm 1,51	-3,27 \pm 1,19	-2,81 \pm 2,14	0,36
	36 h	-3,09 \pm 1,76	-2,18 \pm 1,60	-3,09 \pm 1,45	-4,00 \pm 1,26	-3,46 \pm 1,57	0,10

3.2.2 Klinischer Score

Im klinischen Score zeigte sich bei 3 Mäusen, die mit D39-Wildtyp-Stämmen infiziert waren, 24 Stunden nach der Infektion eine zunehmende Lethargie (3 Tiere betroffen mit Score zwischen 0,5-1). Im Verlauf erhöhte sich die Zahl nach 32 Stunden auf 7 und nach 36 Stunden auf 8 von 11 Tieren (3 Tiere waren gehunfähig).

Im Gegensatz dazu war die Gruppe der mit *ply*^{-/-}-Mutanten D39 behandelten Mäuse sowohl nach 24 als auch nach 32 h nach Infektion klinisch unbeeinträchtigt. Lediglich eins der Tiere war nach 36 h leicht lethargisch.

Die anderen Gruppen verzeichneten ebenfalls eine zunehmende Lethargie bei andauernder Infektionsexposition. Tiere, die mit *nanA*^{-/-}-Mutanten infiziert wurden, waren bereits nach 32 h leicht lethargisch (4 Tiere betroffen). Nach 36 h waren 10 Tiere leicht bis schwer lethargisch oder gehunfähig (2 davon mussten aus ethischen Gründen getötet werden).

In der *nanB*^{-/-}-Gruppe waren 7 Tiere nach 32 h und 6 Tiere nach 36 h betroffen (da ein Tier aus ethischen Gründen getötet wurde).

Bei Tieren, die mit *hyl*^{-/-}-Mutanten infiziert wurden, waren nach 32 h 5 Tiere leicht lethargisch, nach 36 h 7 Tiere leicht bis mäßig lethargisch.

Im klinischen Score fanden sich lediglich signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe, die mit *ply*^{-/-}-Pneumokokken infiziert wurde, und der mit dem D39-Wildtyp-Stamm infizierten Gruppe. Dabei waren die mit *ply*^{-/-}-Pneumokokken infizierten Mäuse zum Zeitpunkt 32 h und 36 h jeweils statistisch signifikant weniger krank als die mit dem D39-Wildtyp-Stamm infizierten Mäuse.

Tabelle 6: Klinischer Score (dargestellt sind jeweils Median [25er/75er Perzentil]; * bedeutet statistisch signifikanten Unterschied zum Wildtyp). Zur Legende siehe Abbildung 4 (Seite 31)

		<i>S. pneumoniae</i> Stamm					
		D39	<i>ply</i> ^{-/-}	<i>nanA</i> ^{-/-}	<i>nanB</i> ^{-/-}	<i>hyl</i> ^{-/-}	p
klinischer Score	24 h	0 [0/0,375]	0 [0/0]	0 [0/0]	0 [0/0]	0 [0/0]	n.s.
	32 h	0.5 [0/2]	0 [0/0]*	0 [0/0,875]	0.5 [0/1]	0,5 [0/1]	0,02
	36 h	1 [0,25/2,75]	0 [0/0]#	1 [0/1]	1 [0,125/1]	0,75 [0,5/2]	0,005

Abbildung 5 zeigt die graphische Darstellung des klinischen Scores aller Mutantenstämme im Vergleich mit D39-Wildtyp und im direkten Vergleich zwischen Wildtyp und mit *ply*^{-/-}-Stämmen infizierten Mäusen.

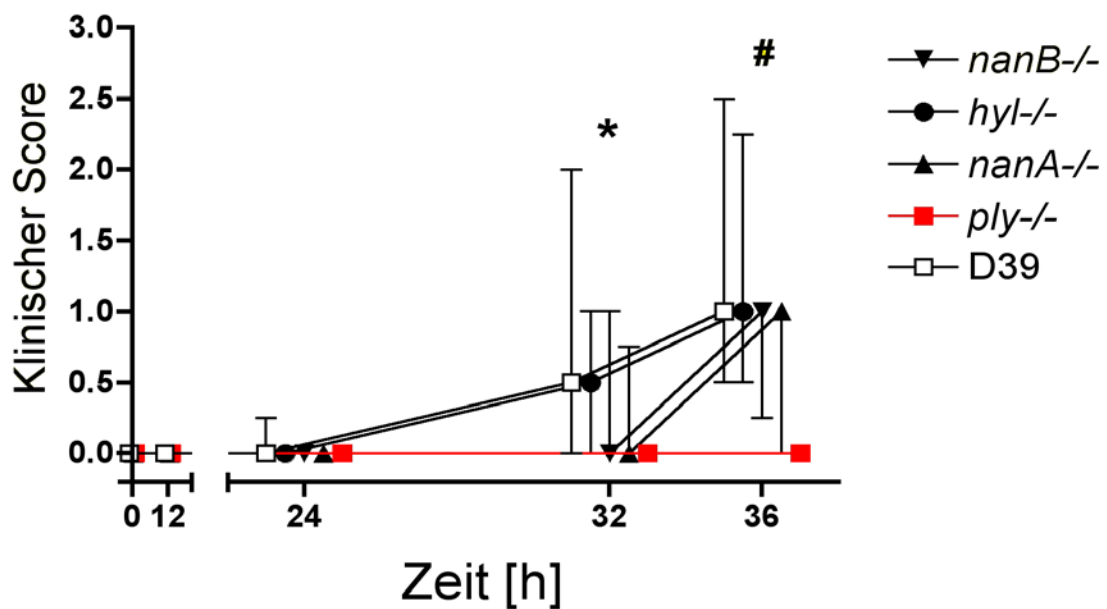


Abbildung 5: Graphische Darstellung des klinischen Scores (Mittelwert \pm Standardabweichung) im Mausmodell im Vergleich mit allen infizierten Mäusen (* = $p < 0,05$; # = $p < 0,01$)

Im Folgenden werden die Mutantenstämme nach 32 Stunden und 36 Stunden untereinander verglichen.

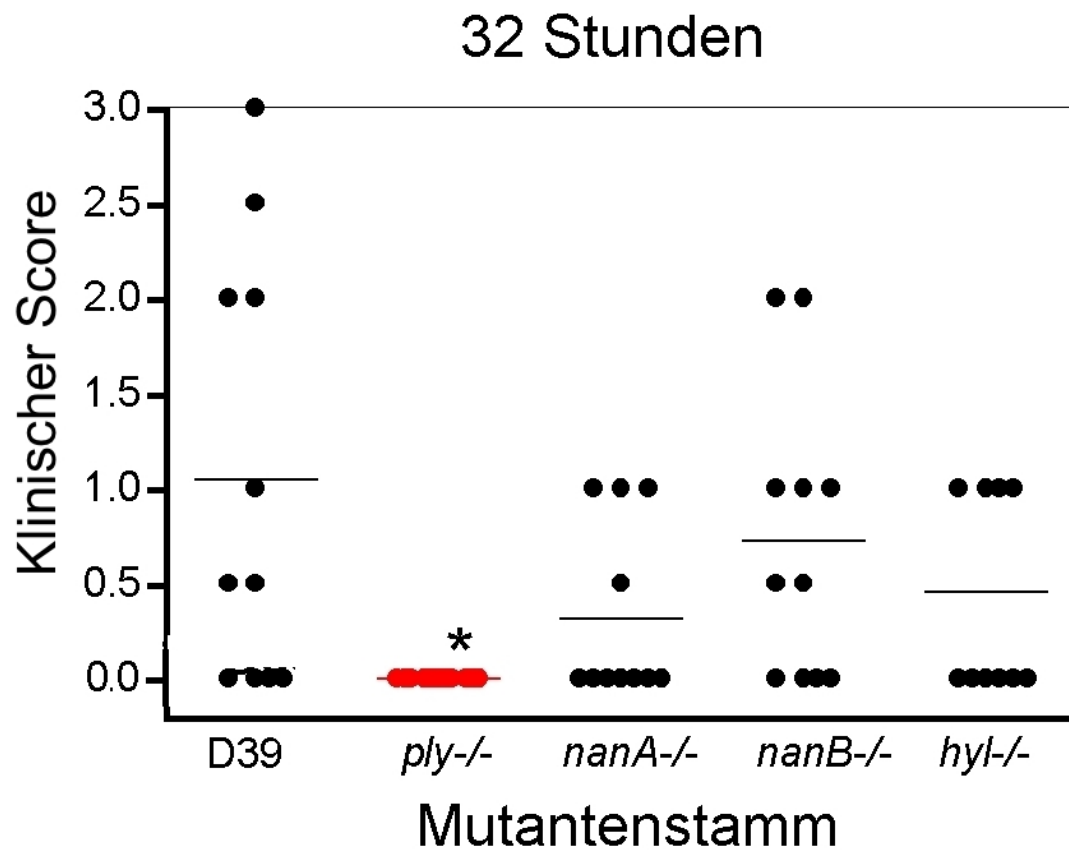


Abbildung 6: Graphische Darstellung des klinischen Scores nach 32 Stunden (Einzelwerte und Median) im Mausmodell im Vergleich mit allen infizierten Mäusen (* = $p < 0,05$). Zur Legende siehe Abbildung 4 (Seite 31)

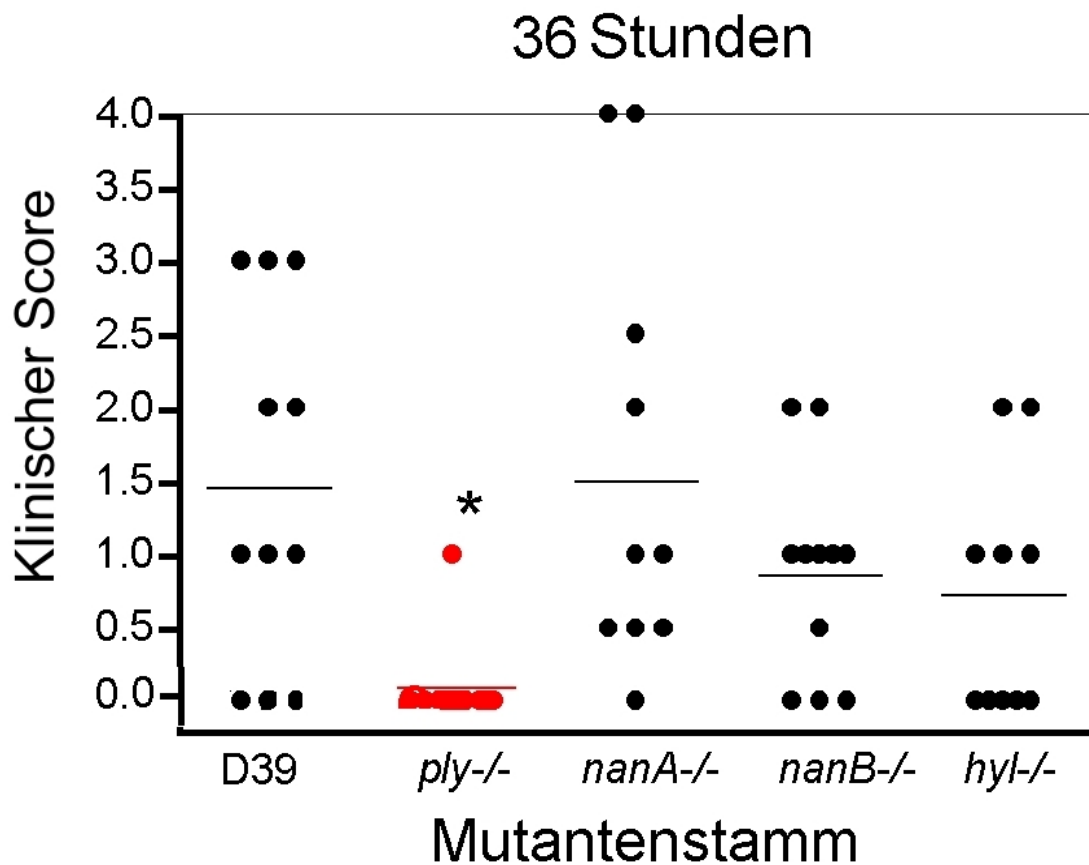


Abbildung 7: Graphische Darstellung des klinischen Scores nach 36 Stunden (Einzelwerte und Median) im Mausmodell im Vergleich mit allen infizierten Mäusen (* = $p < 0,05$). Zur Legende siehe Abbildung 4 (Seite 31)

3.2.3 Seilttest

Entsprechend dem klinischen Score waren auch die Ergebnisse des Seiltestes der Mäuse, die mit *ply*^{-/-}-Mutanten infiziert wurden, besser als die der mit D39-Wildtyp infizierten Mäuse ($p=0,05$ im Dunne-Test). Die Infektion mit allen anderen Mutanten beeinflusste die Ergebnisse des Seiltestes nicht (Tabelle 7).

Tabelle 7: Punktzahl im Seilttest (Median [25er/75er Perzentil]). Zur Legende siehe Abbildung 4 (Seite 31)

		<i>S. pneumoniae</i> Stamm					
		D39	<i>ply</i> -/-	<i>nanA</i> -/-	<i>nanB</i> -/-	<i>hyl</i> -/-	p
Seilttest	24 h	4 [2/6,25]	2 [1,25/5,5]	3 [2/9,5]	3 [2,25/11,25]	4 [2,25/6,5]	0,66
	32 h	10 [3,25/19,75]	3 [2/5,75]	8 [4,25/17]	11 [2,25/16,75]	11 [4/19]	0,32
	36 h	18 [2,25/19,75]	2 [2/8,5]	19 [4/20]	11 [6/19]	13,5 [10/17]	0,05

Die graphische Darstellung der im Seilttest erreichten Punktzahl zeigt Abbildung 8:

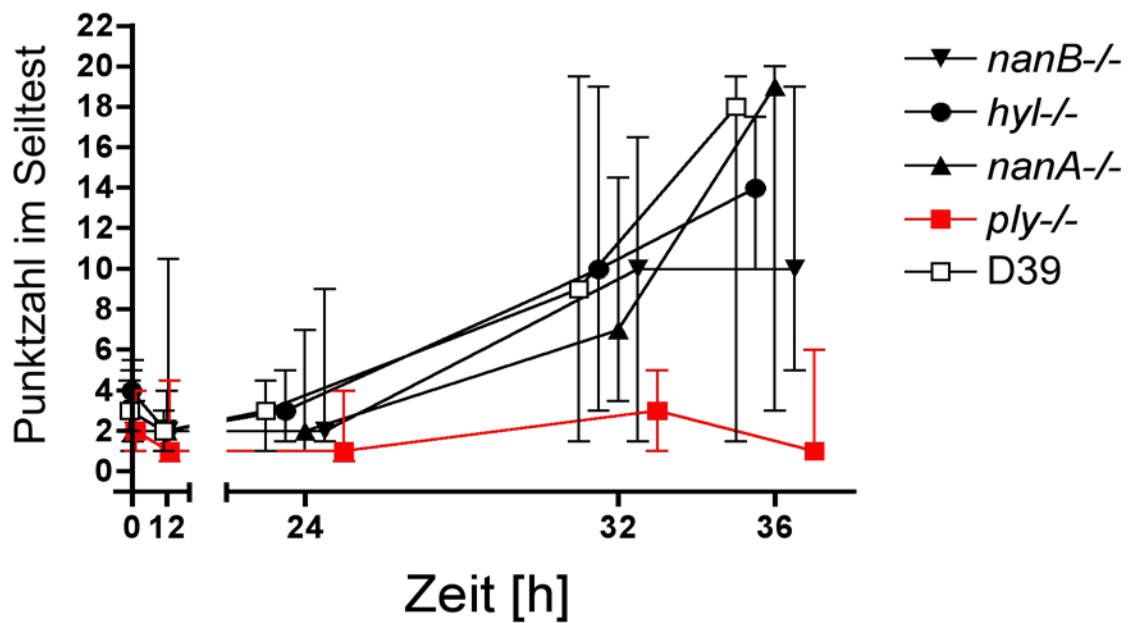


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Punktzahl im Seilttest (Mittelwert \pm Standardabweichung) im Mausmodell im Vergleich mit allen infizierten Mäusen. Zur Legende siehe Abbildung 4 (Seite 31)

3.3 Bakterientiter 36 Stunden nach Infektion

Die Bakterientiter im Blut nach logarithmischer Transformation waren lediglich in der mit *ply*^{-/-}-Mutanten infizierten Gruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe wies nach 36 h einen fast 100-fach höheren Blut-Titerwert auf als die *ply*^{-/-}-Gruppe. Der Bakterien-Titer im Cerebellum und in der Milz war in der *ply*^{-/-}-Mutanten Gruppe ebenfalls im Mittel um eine Zehnerpotenz, jedoch aufgrund der hohen interindividuellen Streuung nicht statistisch signifikant, niedriger. Der direkte Vergleich zwischen den cerebellären Titern beider Gruppen (D39 vs. *ply*^{-/-}) war im t-Test signifikant.

Tabelle 8: Bakterientiter nach logarithmischer Transformation nach 36 Stunden. Zur Legende siehe Abbildung 4 (Seite 31); Vergleich mit allen infizierten Mäusen (* = $p < 0,05$)

		<i>S. pneumoniae</i> Stamm					
		D39	<i>ply</i> ^{-/-}	<i>nanA</i> ^{-/-}	<i>nanB</i> ^{-/-}	<i>hyl</i> ^{-/-}	p
Bakterientiter [log CFU/ml]	Blut	7,23 ± 1,67	5,25 ± 1,39*	6,50 ± 1,82	6,47 ± 1,60	7,72 ± 2,11	0,02
	Cerebellum	7,21 ± 0,70	6,36 ± 0,81	6,99 ± 1,04	6,89 ± 0,92	7,57 ± 1,00	0,04
	Milz	6,71 ± 1,85	5,65 ± 1,12	6,88 ± 1,56	6,40 ± 1,59	7,34 ± 1,90	0,18

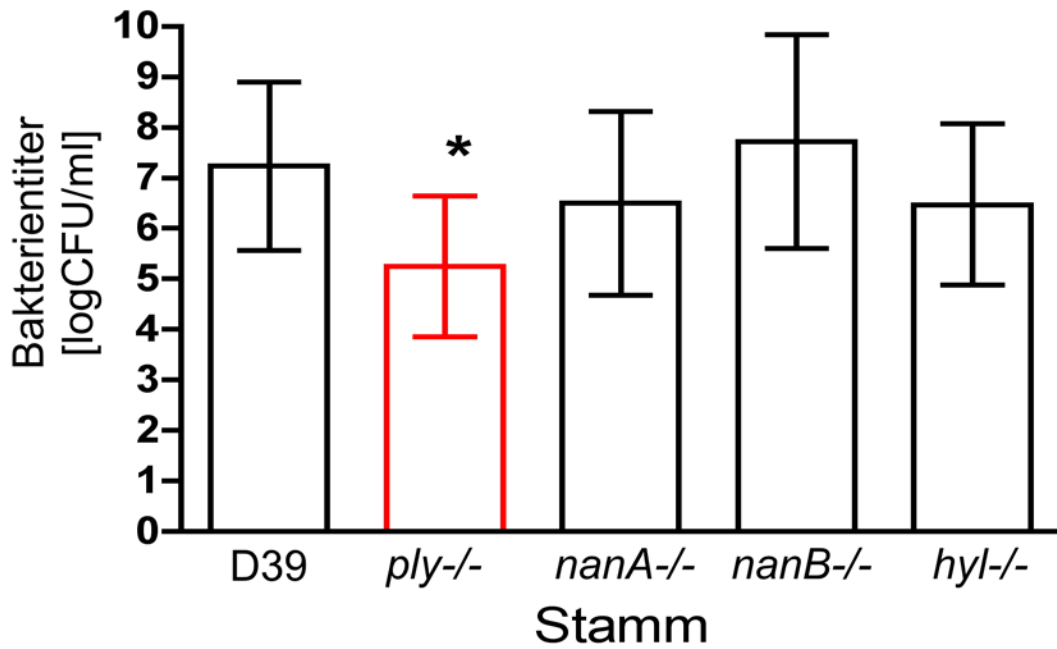


Abbildung 9: Bakterientiter nach 36 Stunden im Blut. Zur Legende siehe Abbildung 4 (Seite 31); Vergleich mit allen infizierten Mäusen (* = $p < 0,05$)

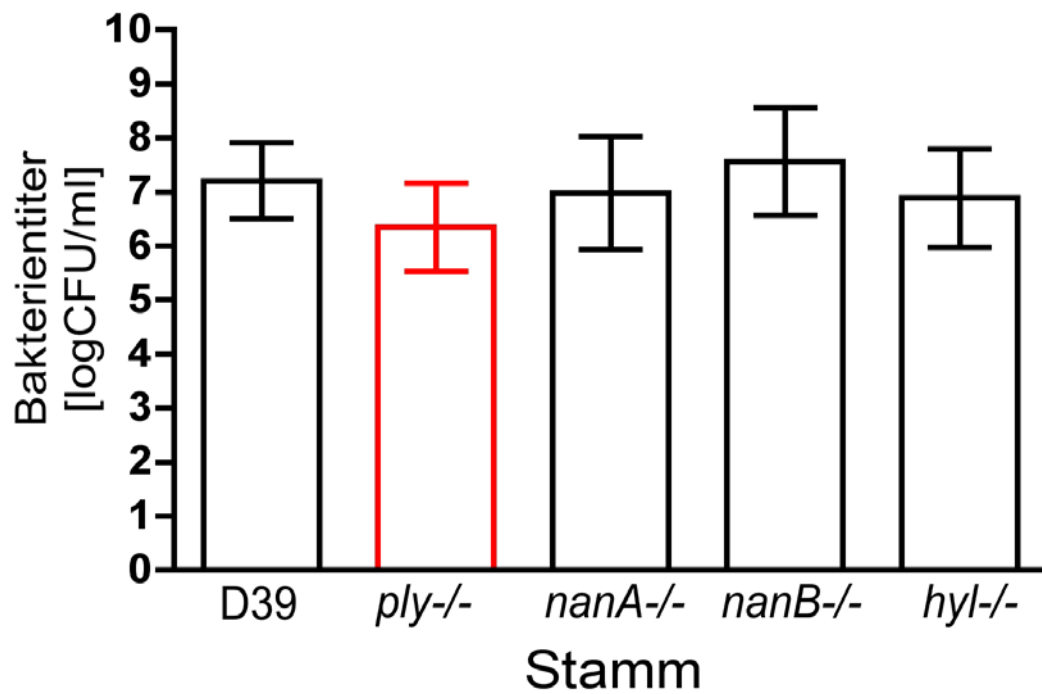


Abbildung 10: Bakterientiter nach 36 Stunden im Cerebellum. Zur Legende siehe Abbildung 4 (Seite 31)

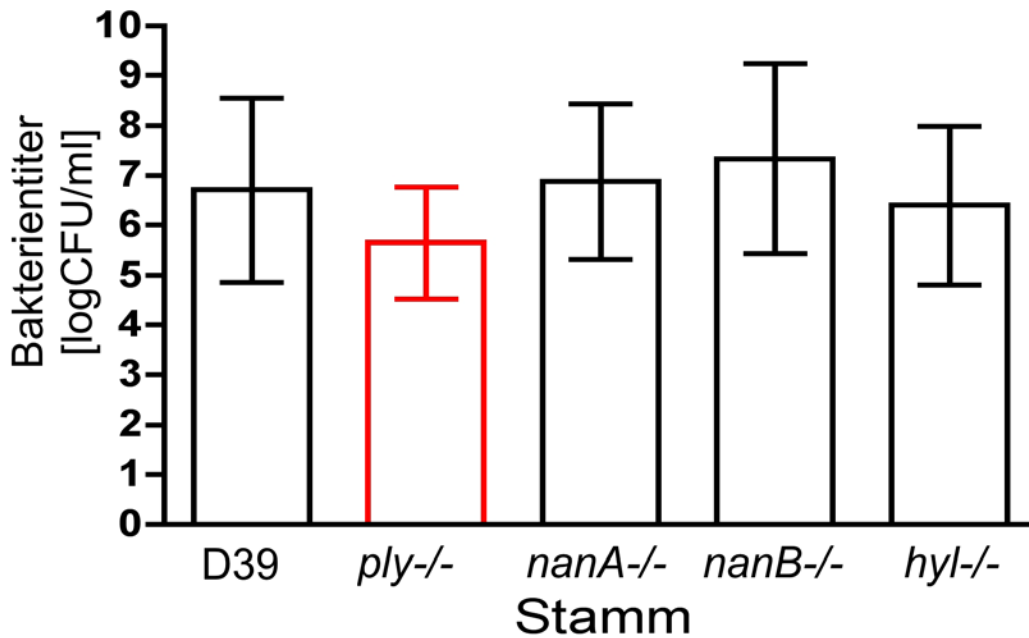


Abbildung 11: Bakterientiter nach 36 Stunden in der Milz. Zur Legende siehe Abbildung 4 (Seite 31)

3.4 Leukozyteninfiltration

Die Mäuse entwickelten alle eine Meningitis mit deutlicher subarachnoidaler Leukozyteninfiltration. Die vorwiegend granulozytären Infiltrate fanden sich vor allem im Subarachnoidalraum, aber auch in den Ventrikeln. Die leukozytäre Infiltration im Subarachnoidalraum war in der mit *ply*-defizienten Mutanten infizierten Gruppe ebenfalls tendenziell geringer (s. folgende Abbildungen), obwohl die Differenzen im Leukozyteninfiltrations-Score nicht statistisch signifikant waren. Die übrigen Infektionsgruppen unterschieden sich nicht von der mit D39-Wildtyp-Pneumokokken infizierten Gruppe.

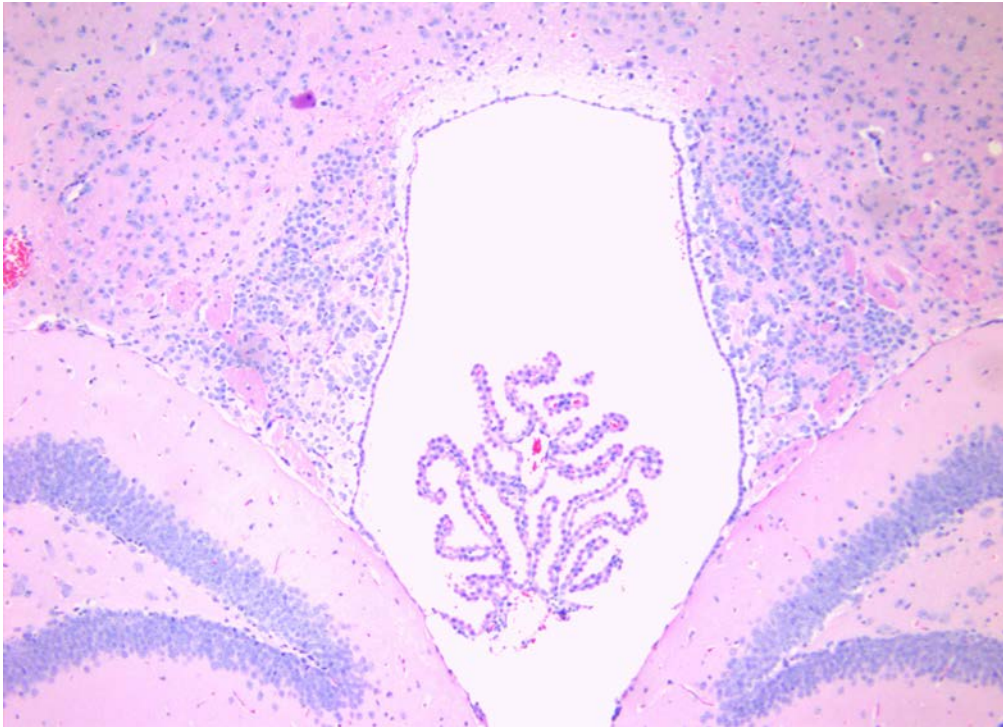


Abbildung 12: Granulozytäre Infiltrate des III. Ventrikels (10x Vergrößerung) bei *ply*^{-/-} Mutanten-Infektion

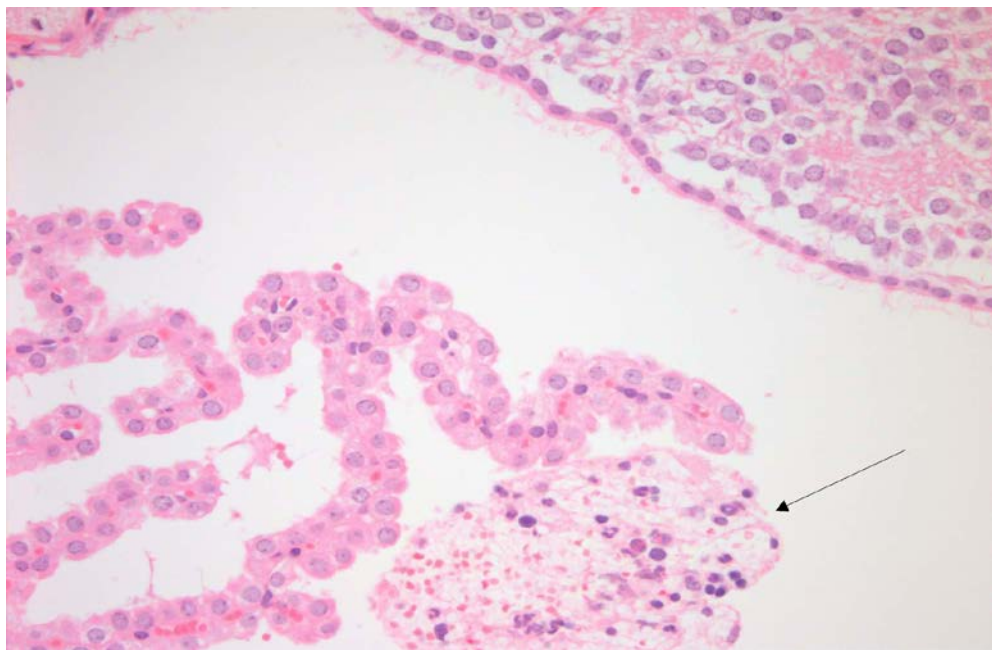


Abbildung 13: Spärliche granulozytäre Infiltrate des III. Ventrikels (40x Vergrößerung) bei *ply*^{-/-} Mutanten-Infektion

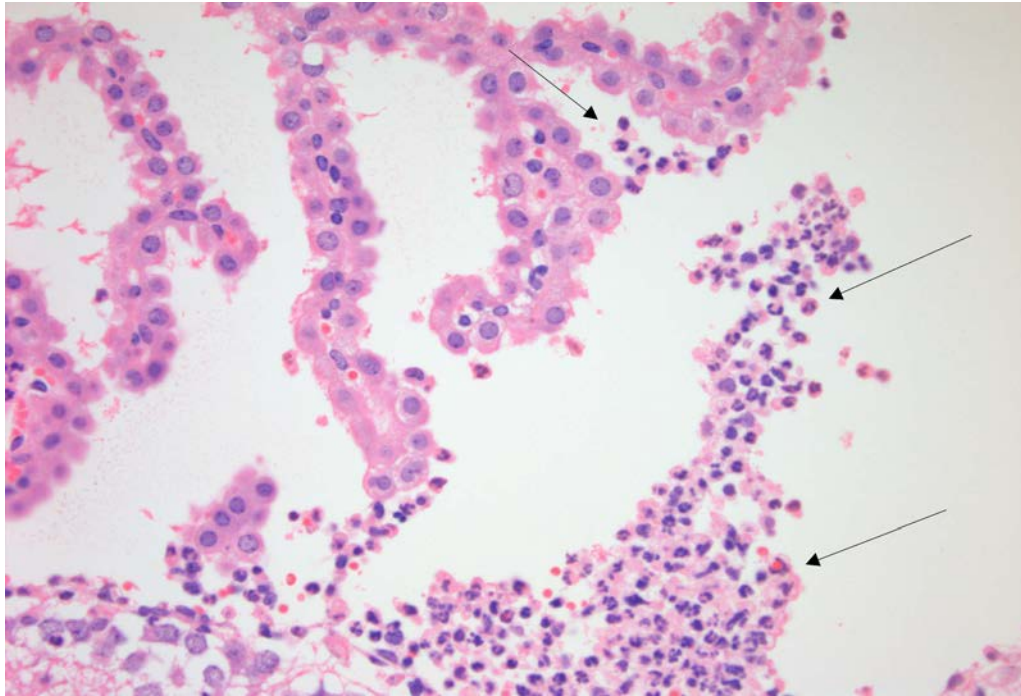


Abbildung 14: Reichlich granulozytäre Infiltrate des III. Ventrikels (40x Vergrößerung) bei D39-Wildtyp-Infektion

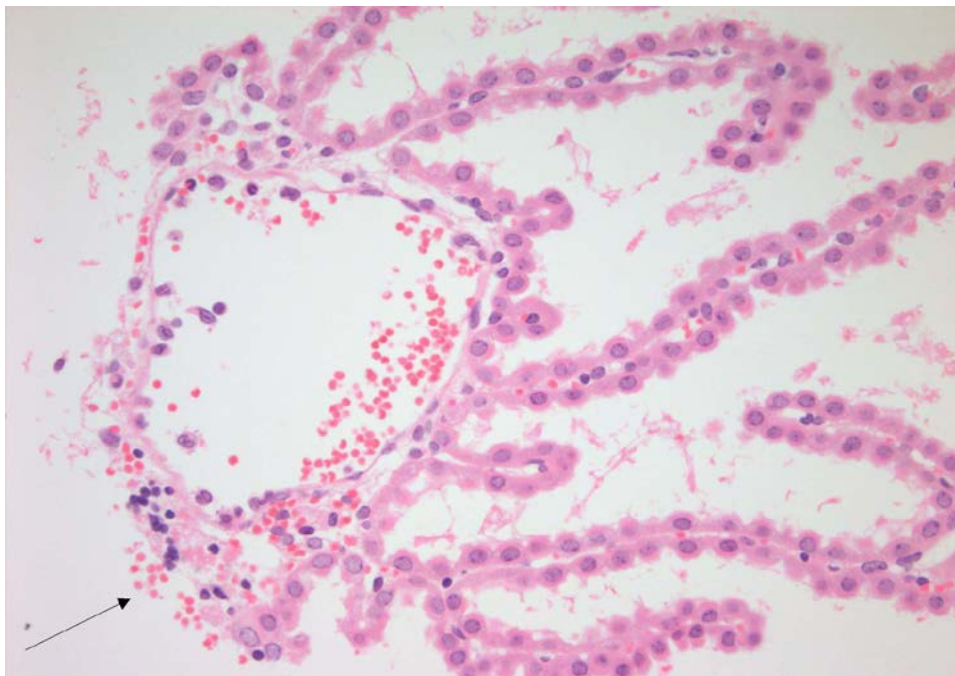


Abbildung 15: Plexus choroideus mit wenigen granulozytären Infiltraten des III. Ventrikels (40x Vergrößerung) bei *hyl*^{-/-}-Mutanten-Infektion



Abbildung 16: Plexus choroideus und einige granulozytäre Infiltrate des III. Ventrikels (40x Vergrößerung) bei *nanA*^{-/-}-Mutanten-Infektion

Der Entzündungsscore unterschied sich nicht signifikant, war aber nach Infektion mit *ply*^{-/-}-Mutanten deutlich niedriger als in den anderen Gruppen (Tabelle 9, Abbildung 17).

Tabelle 9: Entzündungsscore (Median [25er/75er Perzentil]). Zur Legende siehe Abbildung 4 (Seite 31)

	<i>S. pneumoniae</i> Stamm					
	D39	<i>ply</i> ^{-/-}	<i>nanA</i> ^{-/-}	<i>nanB</i> ^{-/-}	<i>hyl</i> ^{-/-}	p
Entzündungsscore	12 [6/17]	6 [4/11]	11 [8/17,5]	12 [8,8/15,5]	9 [3,5/15,5]	0,16

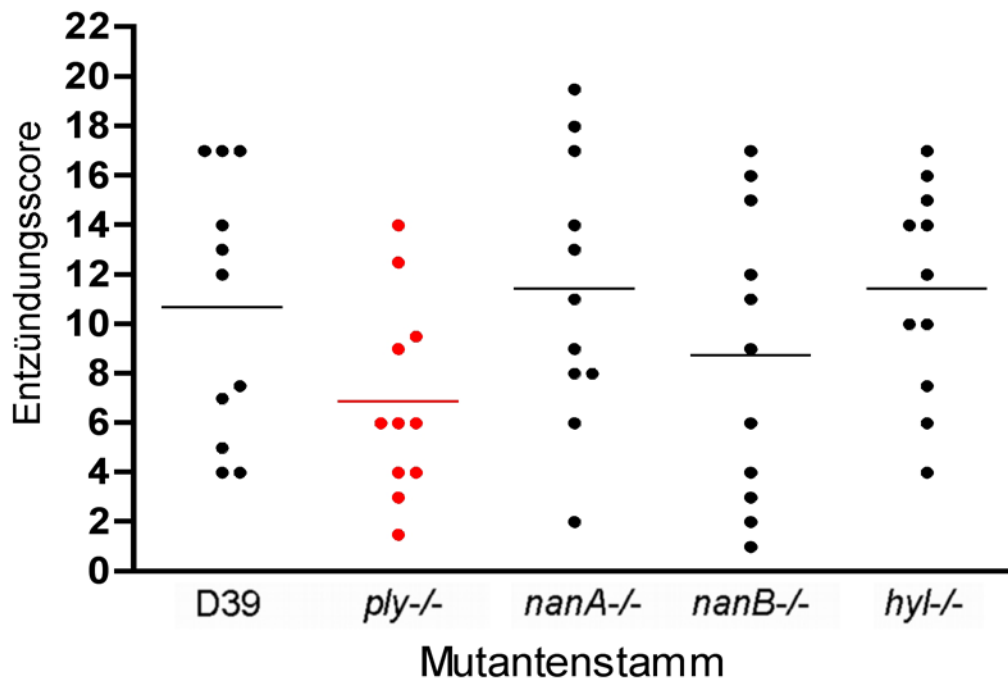


Abbildung 17: Graphische Darstellung des Entzündungsscores nach 36 Stunden (Einzelwerte und Median) im Mausmodell im Vergleich mit allen infizierten Mäusen. Zur Legende siehe Abbildung 4 (Seite 31)

Die beschriebenen Unterschiede bestätigen sich histologisch für den Interhemisphärenspalt (Abbildung 18 bis Abbildung 22) sowie die Neocortexoberfläche (Abbildung 23 und Abbildung 24).

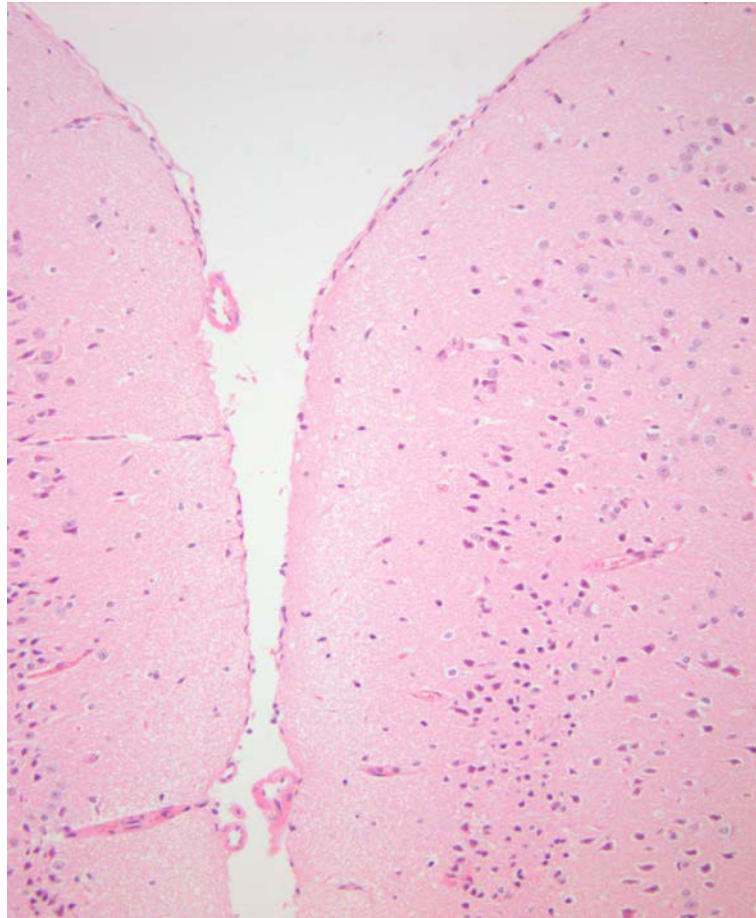


Abbildung 18: Granulozytäre Infiltrate des interhemisphären Spaltes (20x Vergrößerung) bei *ply*^{-/-}-Mutanten-Infektion

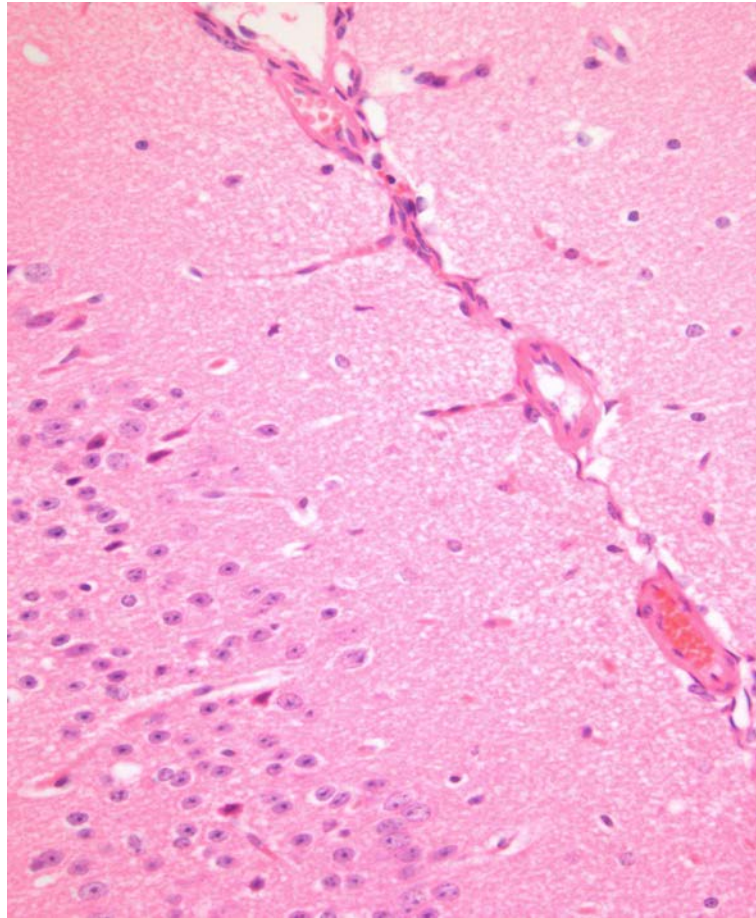


Abbildung 19: Wenig granulozytäre Infiltrate des interhemisphären Spaltes (40x Vergrößerung) bei *p/y*^{-/-}-Mutanten-Infektion

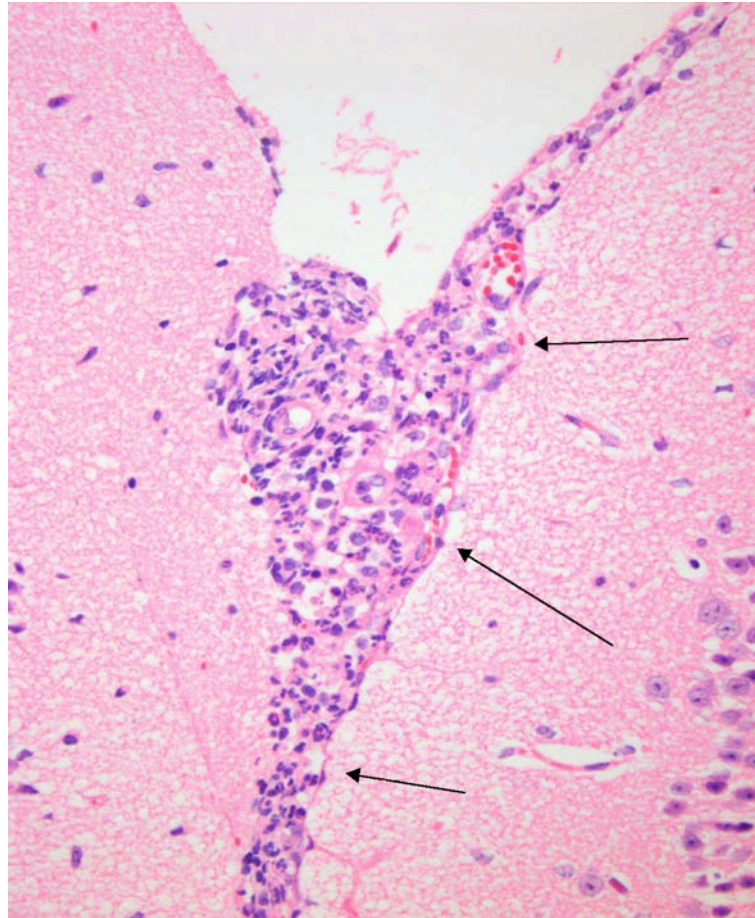


Abbildung 20: Reichlich granulozytäre Infiltrate des Interhemisphärenspaltes (40x Vergrößerung) bei D39-Wildtyp-Infektion

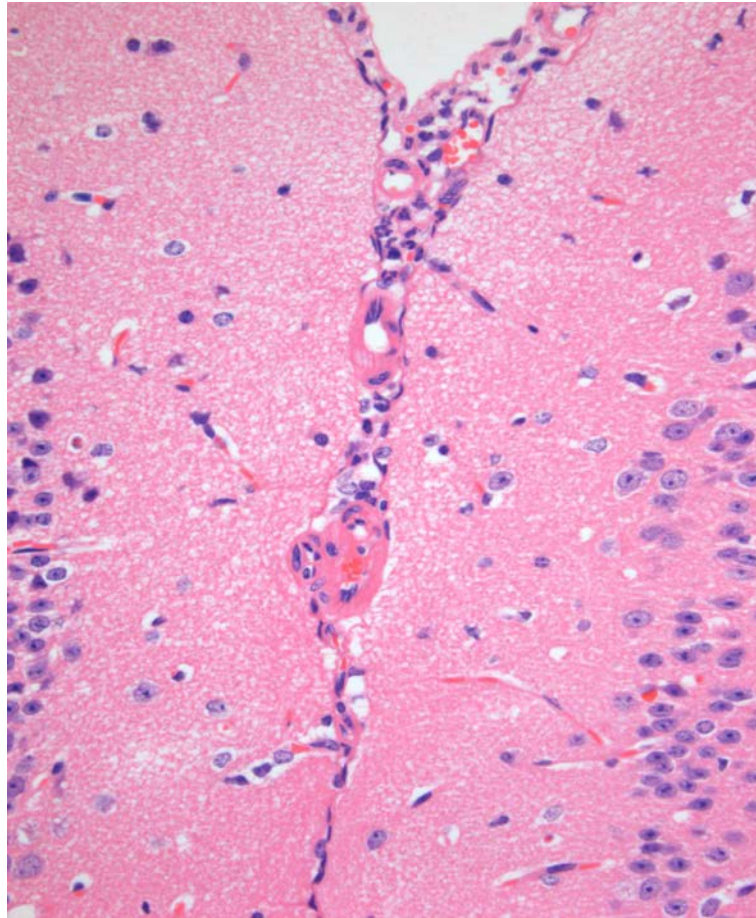


Abbildung 21: Mäßig granulozytäre Infiltrate des Interhemisphärenspaltes (40 x Vergrößerung) bei *hyl*^{-/-}-Mutanten-Infektion

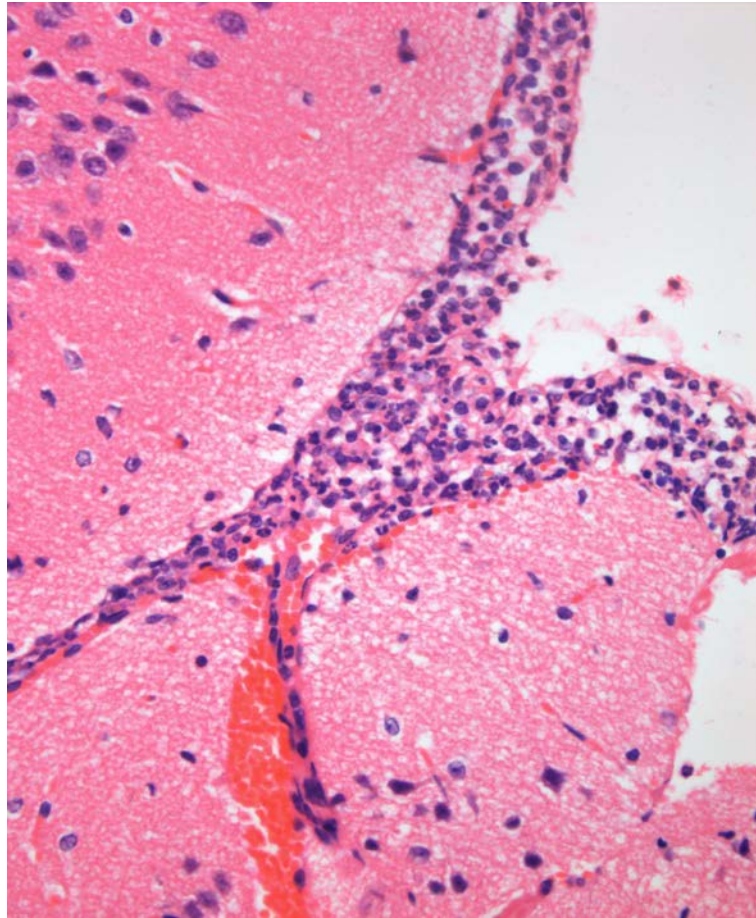


Abbildung 22: Reichlich granulozytäre Infiltrate des Interhemisphärenspaltes (40x Vergrößerung) bei *nanB*⁻-Mutanten-Infektion

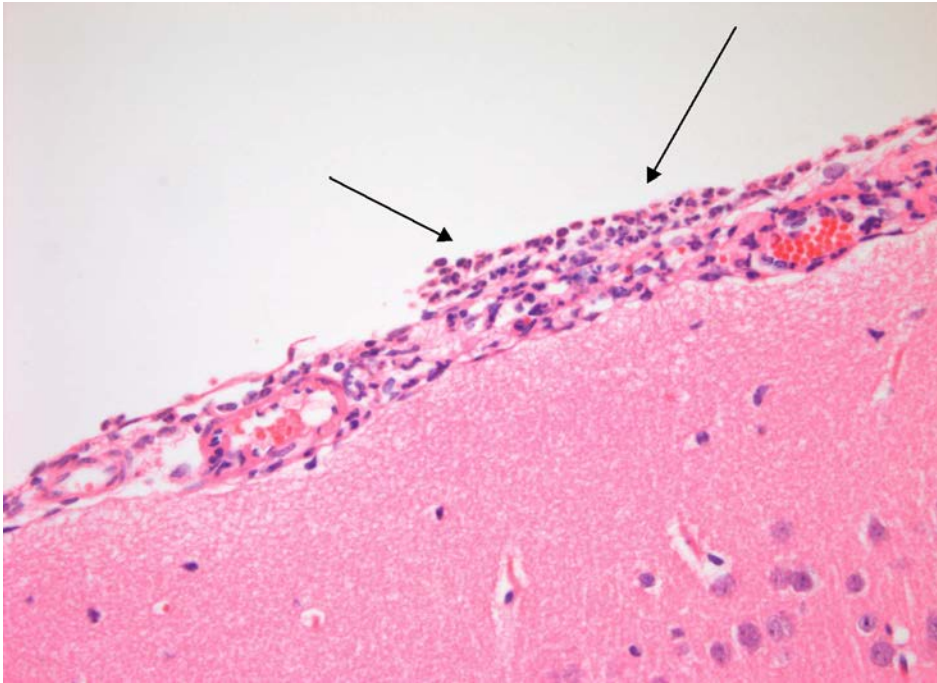


Abbildung 23: Reichlich granulozytäre Infiltrate im Bereich der Neocortexoberfläche (40x Vergrößerung) bei D39-Wildtyp-Infektion

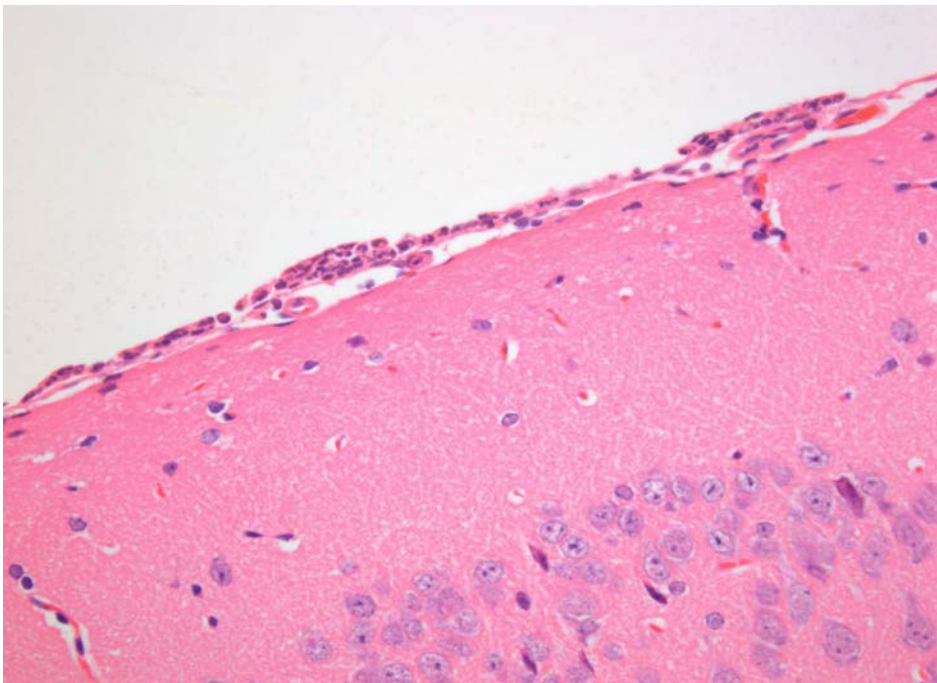


Abbildung 24: Wenig granulozytäre Infiltrate im Bereich der Neocortexoberfläche (40x Vergrößerung) bei *ply*^{-/-}-Mutanten-Infektion

3.5 Neuronenschaden

In den Hirnschnitten zeigte sich, dass der Neuronenschaden vorwiegend im Bereich der Hippocampusformation und im Neocortex vorlag. Morphologisch entsprach der Neuronenschaden vor allem einer Nekrose (Abbildung 25). Der Neuronenschadenscore trat unabhängig vom Vorhandensein oder Fehlen von Pneumolysin auf (Tabelle 10).

Tabelle 10: Neuronenschaden in Abhängigkeit von der Region, Vergleich D39 und *ply*^{-/-} (Median [25er/75er Perzentil]). Zur Legende siehe Abbildung 4 (Seite 31)

		<i>S. pneumoniae</i> Stamm		
		D39	<i>ply</i> ^{-/-}	p
Hirnregion	Hippocampus	2 [1/2]	1,5 [1/1,5]	0,74
	Neocortex	2 [1/2]	1,5 [1/2]	0,35
	Basalganglien	1 [0/1]	1 [0,5/1]	0,74

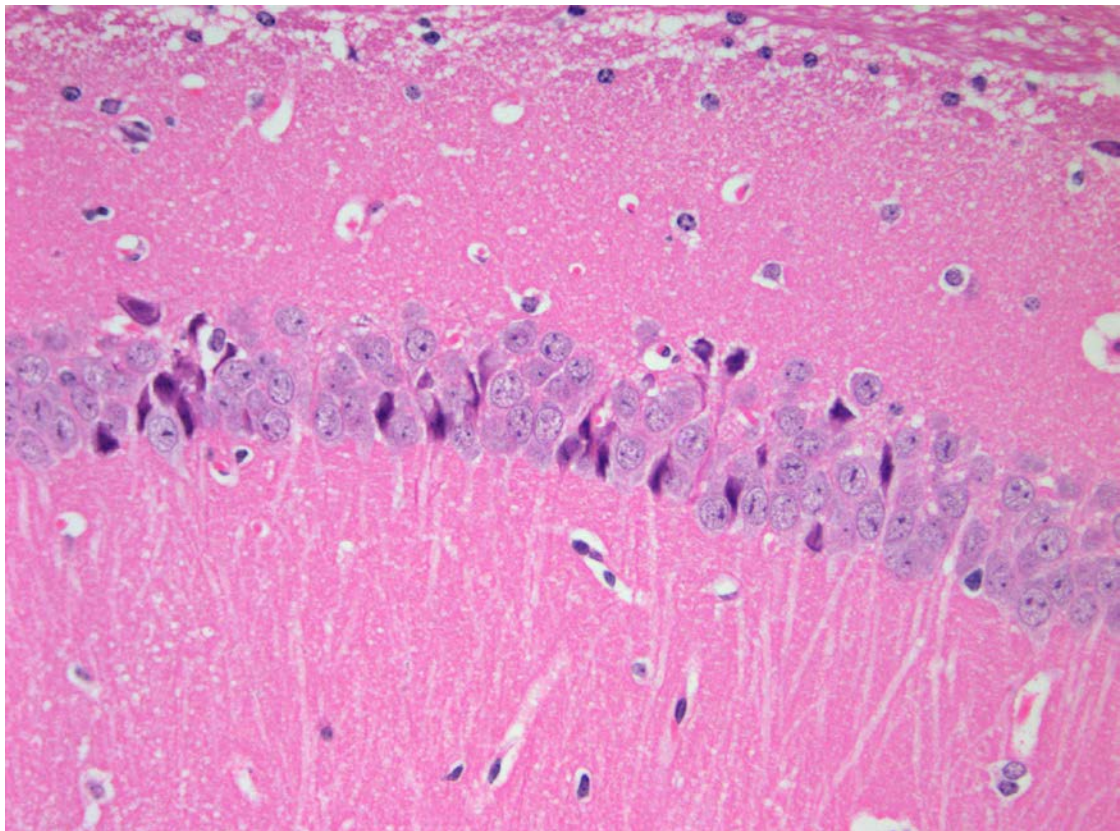


Abbildung 25: Neuronenschaden im Bereich des Hippocampus (40x Vergrößerung) bei D39-Wildtyp-Infektion

3.6 Überlebenszeit von mit Pneumolysin-defizienten Pneumokokken infizierten Mäusen

Die mit *ply*^{-/-}-Pneumokokken infizierten Mäuse zeigten eine deutlich längere Überlebenszeit als die mit D39-Wildtyp infizierten Mäuse. Unterschiede manifestierten sich deutlich ab ca. 2 Tagen nach Infektion; die 5-Tages-Überlebenszeit lag nach Wildtypinfektion lediglich bei 10 % vs. 50 % nach Infektion mit *ply*^{-/-}-Mutanten, und auch nach 10 Tagen war der Unterschied mit 20 % vs. 0 % Überlebenden deutlich (log rank-Test: $p < 0,001$; Abbildung 26).

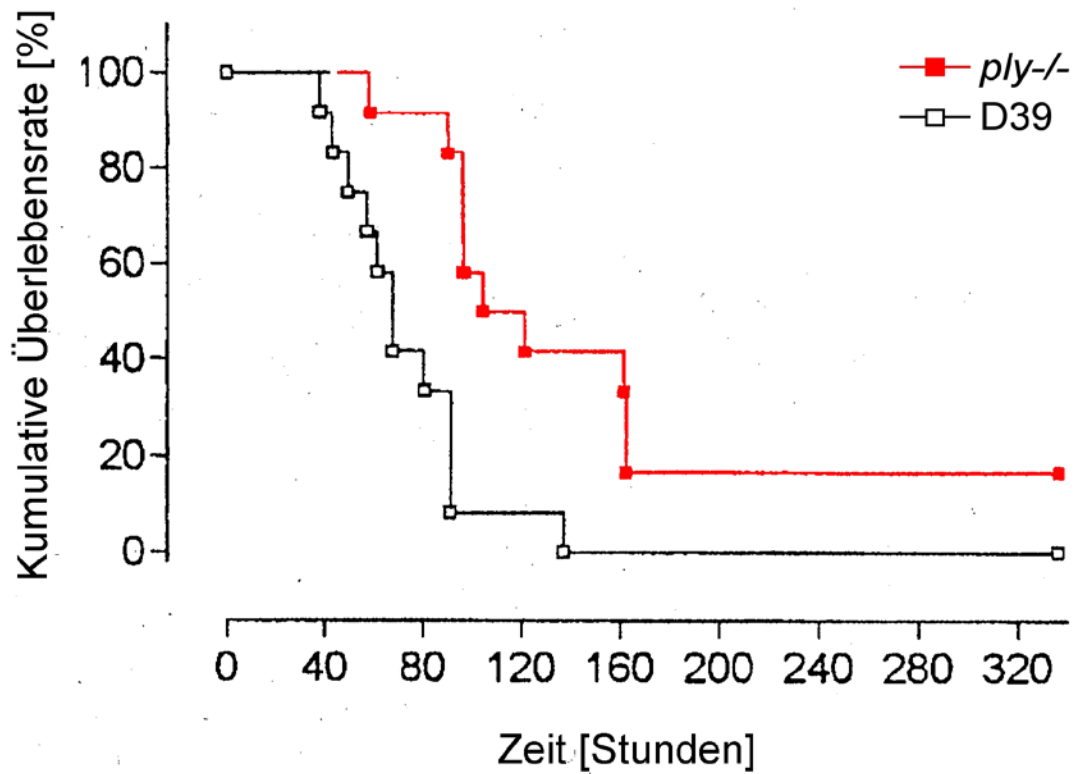


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Tiere im Vergleich zwischen D39- und *ply-/-*-Stämmen. Zur Legende siehe Abbildung 4 (Seite 31)

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass Pneumolysin als Virulenzfaktor für die Schwere und den Verlauf einer experimentellen Pneumokokken-Meningitis und –Sepsis von erheblicher Bedeutung ist, während die übrigen untersuchten Virulenzfaktoren im verwendeten Modell keine wesentliche Rolle spielten. In unserem Mausmodell zeigte sich, dass *ply*^{-/-}-Pneumokokken bei gleich hohem Inokulum und bei annähernd gleich hohen Bakterientitern im Zerebellum signifikant geringere Bakterientiter im Blut aufwiesen. Dies ging einher mit einer geringeren klinischen Krankheitsausprägung nach 36 Stunden.

Trotz erwähnter vergleichbarer Bakterientiter im Zerebellum war die Entzündungsreaktion, gemessen mit dem histologisch bestimmten meningealen Inflammationsscore, ebenfalls etwas, jedoch nicht statistisch signifikant, geringer als bei Mäusen, die mit den Wildtyp-(D39)-Pneumokokken infiziert wurden. Die übrigen Knockout-Varianten der Pneumokokken führten zu einer mit durch den Wildtyp verursachten Meningitis vergleichbaren Krankheitsausprägung, mit nicht signifikant unterschiedlichen klinischen und histologischen Veränderungen.

Diese Erkenntnis bestätigt zunächst, dass Pneumolysin einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* für invasive Infektionen ist. Gleichzeitig zeigt sich, dass die anderen untersuchten Virulenzfaktoren, d. h. die Oberflächenproteine, ungeachtet ihrer ausführlich untersuchten Eigenschaften im Rahmen der Pathogenese von *S. pneumoniae*-Infektionen (siehe Kapitel 1.3.2, Seite 9ff) als Kandidaten für eine Vakzinentwicklung speziell für die Pneumokokkenmeningitis eher wenig Erfolg versprechen. Die Möglichkeit der Verbesserung der mukosalen Immunität durch Impfstoffe, die auf den Oberflächenproteinen beruhen (Di Guilmi und Dessen 2002; Cao et al. 2007; Ogunniyi et al. 2007a; Giefing et al. 2008; Morsczeck et al. 2008), kann aber naturgemäß trotzdem auch einen maßgeblichen protektiven Einfluss bezüglich der Entwicklung einer Meningitis, die nur eine Manifestation der invasiven *S. pneumoniae*-Infektion ist, ausüben.

Diese steht aber klinisch-epidemiologisch weit im Vordergrund, verursacht sie doch weltweit und insbesondere in den Entwicklungsländern – vor allem bei Kleinkindern – zahlreiche Todesfälle und bleibende Behinderungen (Di Guilmi und Dessen 2002; van de Beek et al. 2004; Galiza und Heath 2007; Maestro und Sanz 2007; Arda et al. 2008). Zudem drängt das Auftreten von multipel resistenten Stämmen von Pneumokokken, die den Therapieerfolg bei einmal eingetretener manifester Meningitis limitieren, zur Entwicklung effektiver Impfstoffe (Tai 2006; Maestro und Sanz 2007).

Die derzeit verfügbaren Impfstoffe basieren auf dem Polysaccharidanteil der Zellwand und sind daher gegenüber der großen genetischen Diversität der Pneumokokkenstämme anfällig, so dass ihre Wirksamkeit begrenzt und nicht zuverlässig vorhersagbar ist (Kirkham et al. 2006b; Maestro und Sanz 2007).

Daher kommt dem Pneumolysin als Zielsubstanz für die Entwicklung von Impfstoffen nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung eine besondere Bedeutung zu, was in anderen Tiermodellen bestätigt wird (z. B. (Berry et al. 1989; Orihuela et al. 2004; Ogunniyi et al. 2007a; Dessing et al. 2008).

Die *ply*^{-/-}-Stämme wurden durch verschiedene Verfahren hergestellt. Berry et al. (1989) generierten durch Insertions-Duplikation einen Pneumokokkenstamm, der die Fähigkeit verloren hatte, Pneumolysin zu produzieren. Es zeigte sich, dass nach intranasaler Applikation die Mäuse, die mit diesen *ply*^{-/-}-Stämmen infiziert wurden, eine höhere Überlebensrate hatten; die LD50-Dosis (=50 % *lethal dose*) bei intraperitonealer Infektion war zudem deutlich höher, und die Entfernung der Pneumolysin-defizienten Erreger aus dem Blut in einem dritten Studienteil ging rascher vonstatten.

Durch Insertions-Duplikation wurden sowohl *ply*^{-/-} als auch für andere mögliche Virulenzfaktoren defiziente Pneumokokkenstämme hergestellt, unter anderem für Autolysin (LytA) und das Oberflächenprotein A (PspA). Berry und Paton fanden heraus, dass bei intraperitonealer Applikation nicht nur *ply*^{-/-}, sondern auch *lytA*^{-/-} und *pspA*^{-/-} Pneumokokkenstämme eine geringere Virulenz hatten. Anders verhielten sich CbpA-, NanA- oder Hyl-defiziente Stämme. Hier wurde keine Virulenzabschwächung beobachtet (Berry und Paton 2000).

Orihuela et al. (2004) stellten ebenfalls durch Insertions-Duplikations-Mutagenese Stämme her, die bezüglich CbpA, Ply, SpxB, LytA, NanA oder PspA defizient waren

und fanden am Mausmodell deutliche Unterschiede der Bedeutung dieser Faktoren in Abhängigkeit von der Inokulation:

- NanA, SpxB und weniger ausgeprägt CbpA führten zu einer Verlängerung der nasopharyngealen Kolonisierung.
- CbpA und NanA förderten die Ausbreitung in die tiefen Atemwege.
- Nach Etablierung einer pulmonalen Infektion förderten Ply, SpxB und LytA die bakterielle Replikation in der Lunge und die Invasion in die Blutbahn.
- In der Blutbahn waren lediglich Ply und LytA erforderlich, um die Replikation in hohen Titern zu ermöglichen, und ausschließlich CbpA war zur Invasion in den Liquor erforderlich.

Ergänzend zu diesen Befunden ergaben unsere Versuche, dass nach Invasion der zerebrospinalen Flüssigkeit Pneumolysin als einziger der Virulenzfaktoren die Schwere der resultierenden Infektion der Meningen bestimmt; zusammengenommen kommt dem Pneumolysin damit vom Stadium der Pneumonie an eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese zu.

Ogunniyi et al. (2007b) erzeugten auf dieselbe Weise Ply-, PspA- und PspC-defiziente D39-Mutanten und fanden, dass die nasopharyngeale Besiedlung durch PspA stärker gefördert wurde als durch die beiden anderen Faktoren; die Entstehung von Pneumonie und Sepsis wurde einzig durch PspA begünstigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden solche Stämme erstmals in einem Meningitismodell an der Maus (vorgestellt von (Gerber et al. 2001) angewendet; eine ähnliche aktuelle Studie von Hirst et al. (2008) bestätigt unsere Befunde in Bezug auf das Pneumolysin weitgehend: In dieser Untersuchung wurde bei Ratten durch einen zisternalen Katheter eine Meningitis durch unterschiedliche Pneumokokkenstämme induziert. Während nach Zufuhr des D39-Wildtyps alle Versuchstiere innerhalb von 26 Stunden eine Meningitis entwickelten, verursachten isogenetische *ply*^{-/-} bzw. *lytA*^{-/-}-Mutanten keine oder nur eine milde Infektion.

Einschränkend muss berücksichtigt werden, dass in der vorliegenden Arbeit nicht alle potentiellen Virulenzfaktoren untersucht wurden; etwa dem hier nicht berücksichtigten

PavA attestierten Pracht et al. (2005) in einem methodisch der vorliegenden Arbeit weitgehend entsprechenden Meningitismodell neben einem Einfluss auf die Adhärenz und Invasion auch einen fördernden Effekt der meningealen Inflammation.

Die Virulenz von Pneumolysin wird zum einen durch die zytolytische Fähigkeit erklärt, so dass Pneumolysin zu den membranschädigenden Toxinen gezählt wird (Rossjohn et al. 1998). Zum anderen besitzt es, wie bereits oben erwähnt, eine komplementaktivierende Wirkung. In unserem Modell haben wir den Mechanismus, über welchen sich die Virulenz von Pneumolysin erklärt, nicht untersucht. Allerdings gehen wir davon aus, dass es sich um entsprechende Mechanismen handelt, wie sie in der Literatur beschrieben wurden. Im Einzelnen sind dies folgende:

- Porenbildung und Zytolyse durch Bindung an den Cholesterolrezeptor (Berry et al. 1995; Tweten 1995; Andrew et al. 1997; Rossjohn et al. 1998; Berry et al. 1999; Gilbert et al. 1999; Tilley et al. 2005);
- Aktivierung von Komplement nach Bindung an die Fc-Region des menschlichen Immunglobulin G (IgG) und daraus resultierende Hemmung der Opsonisierungskompetenz der Granulozyten (Mitchell et al. 1991; Paton et al. 1993; Alexander et al. 1998; Berry et al. 1999; Hirst et al. 2004; Tilley et al. 2005);
- Verhinderung der Chemotaxis und der bakteriziden Wirkung der neutrophilen Granulozyten in nicht zytotoxischer Konzentration (Paton und Ferrante 1983).

Berry et al. (1995) stellten in ihrem Mausmodell fest, dass die verminderte Virulenz bei Pneumokokkenstämmen eher mit zytotoxischen als mit der komplementaktivierenden Fähigkeit zu tun hat. Hierzu stellten sie Pneumolysin-Mutanten her, die gezielt eine der oben erwähnten Fähigkeiten verloren hatten. Durch Punktmutation entstanden *ply*-defiziente Mutanten, deren Pneumolysin gezielt entweder keine lytische Aktivität aufwies oder aber das Komplementsystem nicht aktivieren konnte (Berry et al. 1999). Es zeigte sich, dass die Mäuse, die mit Pneumokokken beimpft wurden und ein nicht zytotoxisches Pneumolysin exprimierten, eine höhere Überlebensrate hatten.

In einem weiteren Versuch wurden solche Mutanten mit *ply*^{-/-}-Mutanten, die kein Pneumolysin produzierten, verglichen. Es zeigte sich, dass die Virulenz der durch Punktmutation generierten, ein defektes Pneumolysin produzierenden Mutanten immer

noch höher war als die der *ply*^{-/-}-Mutanten (Berry et al. 1999). Dies legt nahe, dass es noch eine andere Aktivität des Toxins gibt, welche zur Virulenz beisteuert (Berry et al. 1999; Mitchell 2000). Alcantara et al. (1999; 2001) stellten dagegen fest, dass die komplementaktivierende Wirkung auch eine entscheidende Rolle bei der Virulenz spielt, indem durch die vermehrte und ungezielte Aktivierung der Komplementkaskade eine geringere Konzentration an bindungsfähigem Komplement im Serum zur Verfügung steht.

Somit trägt die Reduktion an Komplementfaktoren (wie bereits oben beschrieben) zur verminderten Oponierung und Schwächung der allgemeinen Körperabwehr bei.

Stringaris et al. (2002) beschrieben in ihren Versuchen, dass Pneumolysin ebenfalls für die Aktivierung der p38 MAPK-Signalkaskade und die Apoptose in Zielzellen verantwortlich ist.

Kombinationen einzelner Virulenzfaktoren zeigten, dass nur teilweise mit einer zusätzlichen Verminderung der Virulenz zu rechnen ist. Eine Reduktion der Virulenz wurde durch die Doppelmutationen von *ply*^{-/-} und *pspA*^{-/-}, *ply*^{-/-} und *hyl*^{-/-} sowie *ply*^{-/-} und *cbpA*^{-/-} erreicht. Neuraminidase- und Autolysindefizienz führten in Kombination mit Pneumolysindefizienz zu keiner weiteren Virulenzabschwächung.

Zusätzlich verfügt Pneumolysin anscheinend über die Fähigkeit, die unspezifische Immunabwehr durch Bindung an die Fc-Region von IgG in frühen Infektionsphasen zu umgehen (Berry et al. 1999) und die Immunabwehr durch Zerstörung von neutrophilen Granulozyten zu schwächen und somit die Infektion zu beschleunigen (Zysk et al. 2000).

Im aktuellen Experiment konnten sich *ply*^{-/-}-Pneumokokken, die intrazerebral appliziert wurden, systemisch vermindert verbreiten, was für eine verstärkte Clearance aus der Blutbahn sprechen und Folge der verminderten Toxizität (Zysk et al. 2001) und damit einer Verzögerung der Ausbreitung sein kann.

Ähnliches konnten Musher et al. (2001) auf andere Weise zeigen. In ihrem Mausmodell wurden Mäuse nach intraperitonealer Infektion mit Streptokokken Typ 1 oder 4 zusätzlich mit Anti-Ply-IgG beimpft. Bei den behandelten Tieren fanden sich sowohl eine höhere Überlebensrate als auch negative Blutkulturen. Da Pneumolysin die Epithelzel-

len der Lungenalveolen zerstört und die Phagozytosefähigkeit der polymorphkernigen Leukozyten vermindert, können in der frühen Infektionsphase somit durch IgG-Antipneumolysin-Antikörper die Pneumolysineffekte verhindert werden (Musher et al. 2001).

Pneumolysin wirkt entzündungsfördernd, indem es die Aktivität von Neutrophilen stimuliert (Cockeran et al. 2001). In unserem Mausmodell stellten wir eine geringe Abnahme des meningealen Inflammationsscores nach Infektion mit der *ply*-defizienten Mutante fest, die möglicherweise bei einer höheren Versuchstierzahl statistische Signifikanz erreicht hätte.

Weder die Hyaluronidase noch die Neuraminidase hatten in unserem Mausmodell einen Effekt auf den klinischen Verlauf oder auf die Bakterientiterzahl im Blut (Verbreitung im Blut oder Keimwachstum bei Infektion) unserer Versuchstiere. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Berry und Paton (2000) in ihren Experimenten. Weiterhin scheint die Neuraminidase A in Untersuchungen mit entsprechenden defizienten Pneumokokken an Meerschweinchen keine Rolle beim Hörverlust bzw. den Innenohrschäden zu spielen (Winter et al. 1997). Die Beobachtung, dass Neuraminidase A-defiziente Stämme keinen Effekt auf eine Minderung des Hörverlustes haben, erklären Berry und Paton (2000) damit, dass ein Fehlen von NanA durch die Aktivität von NanB und NanC kompensiert wird. Bei NanB-Defizienz verhielt es sich ebenso.

Für die Ausbreitung von Pneumokokken vom Lungengewebe in die Blutbahn kommt der Hyaluronidase eine entscheidende Bedeutung zu (Kostyukova et al. 1995; Zwijnenburg et al. 2001). Die intrazerebrale Beimpfung ist daher eine eher ungeeignete Methode, um die Rolle dieses Enzyms hinsichtlich seiner Pathogenität zu bestimmen (Koedel und Pfister 1999). Da – wie bei anderen Studien vorher (Berry und Paton 2000) – eine intrazerebrale Beimpfung in unserem Mausmodell angewendet wurde, fand sich nicht unerwartet kein Effekt der Hyaluronidasedefizienz auf die Virulenz.

Pneumolysin als membranschädigendes Zytotoxin bewirkt die Zytolyse der Wirtszelle. Ein derartiger Effekt mag auch eine Rolle bei der Zerstörung der mikrovaskulären Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke spielen. Daneben kommt es durch die Aktivierung der Tyrosinkinase und von Caspasen zur Schädigung der Neuronen (Zysk et al. 2001).

Aus diesem Grund erwarteten wir einen geringeren Neuronenschaden im Mausmodell bei den *ply*^{-/-}-Pneumokokkenstämmen im Vergleich zu den Wildtypen. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied im Neuronenschaden zwischen den *ply*^{-/-} und Wildtyp-Stämmen. Dies könnte mit der geringen Selektivität des verwendeten Scores oder tatsächlich nicht vorhandenen Unterschieden zusammenhängen.

Möglicherweise ist der verwendete semiquantitative histologische Score zu ungenau, um geringe Unterschiede nachzuweisen. Auch könnten einige der Tiere nicht krank genug gewesen sein, damit ein ausreichender Neuronenschaden auftritt. Der mediane klinische Score der Kontrolltiere nach 36 Stunden zeigte einen Score von 1 (leicht lethargisch). Darüber hinausgehend mag auch das Modell nur zum Teil die Mechanismen beim Menschen in Bezug auf den Neuronenschaden reflektieren. Wir beobachteten so zum Beispiel vor allem einen nekrotischen Neuronenschaden, während im Obduktionsgut beim Menschen der apoptotische Zelltod eine nicht unerhebliche Rolle spielte (Nau et al. 1999). Die Infektion verläuft in unserem Modell perakut, so dass vermutlich die Zeit zur Entwicklung entsprechender pathologischer Veränderungen zu kurz war. Alternativ mag die antibiotische Behandlung beim Menschen eine Rolle spielen. Durch Antibiotikagabe kommt es zum einen zu einem längeren Verlauf und andererseits zur zusätzlichen Freisetzung bakterieller Bestandteile, insbesondere zytosolischer Proteine wie des Pneumolysins (Spreer et al. 2003).

Zusammenfassend konnten wir mit unseren Untersuchungen zeigen, dass Pneumolysin einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* ist. Sowohl der klinische Score als auch Wachstum und systemische Ausbreitung der Bakterien im Blut werden als Folge einer Infektion mit defizienten Pneumokokken beeinflusst. Defizienz einzelner Neuraminidasen oder der Hyaluronidase zeigten in unserem Modell keine Auswirkungen in Bezug auf die gemessenen klinischen und paraklinischen Parameter. Weitere Studien sind notwendig, um den Effekt von Pneumolysin auf meningeale Entzündung sowie Neuronenschaden zu beurteilen. Andere Modelle, die mit intranasaler Infektion arbeiten, sind zudem notwendig, um den Effekt von Hyaluronidase auf die Entwicklung der experimentellen Meningitis zu beurteilen.

Insgesamt erweist sich aber das Pneumolysin in der vorliegenden Untersuchung in Übereinstimmung mit der umfangreichen Literatur (z. B. Cockeran et al. (2005)) als vielversprechende Target-Substanz für die Impfstoffentwicklung; eine nicht-toxische,

für die Impfung im Prinzip geeignete Variante entwickelten z. B. Kirkham et al. (2006a) durch Deletion einer einzelnen Aminosäure, die die Porenbildung verhindert. Interessant ist ferner die von Roche et al. (2007) demonstrierte Möglichkeit, mit entsprechend veränderten und damit virulenzgeschwächten Bakterienstämmen eine Lebendimpfung durchzuführen; auch in dieser Untersuchung an Mäusen erwies sich ein Ply- und PspA-Doppel-Knockout-Stamm als effektiv und sicher.

Nach Infektion der Mutter mit dem Wildtyp von *S. pneumoniae* zeigen Säuglinge mit hohen Anti-Ply-Antikörpertitern eine reduzierte Pneumokokkenbesiedlung (Holmlund et al. 2006); auch die erfolgreiche Passivimmunisierung mit einem Pneumolysin-Antiserum gegen eine Pneumokokken-Keratitis (Green et al. 2008) unterstreicht die Bedeutung dieses Faktors und das Potential einer passiven oder aktiven Pneumolysin-Impfung. Die protektive Wirksamkeit natürlicher (Baxendale et al. 2008) und synthetischer Antikörper gegen Pneumolysin (García-Suárez et al. 2004) zur Verhütung einer Pneumokokkeninfektion wurde gezeigt; dies ist aber auf die Meningitis so nicht übertragbar. Die Erprobung aktiver Pneumolysin-Vakzine hat bislang noch keine verwertbaren Erfolge gezeigt (Ferreira et al. 2006).

Nach der vorliegenden Untersuchung und dem überwiegenden Teil der Literatur ist Pneumolysin speziell für die Verhütung der Meningitis die am ehesten erfolgversprechende Zielsubstanz für die Entwicklung eines Impfstoffs; nach der Literatur (Berry und Paton 2000; Orihuela et al. 2004; Hirst et al. 2008) sollte zudem wahrscheinlich auch das – in der vorliegenden Untersuchung nicht geprüfte – Autolysin berücksichtigt werden.

5 Zusammenfassung

Die anhaltend hohe Letalität der Pneumokokkenmeningitis und die Entstehung multipel resistenter Stämme sowie die begrenzte Wirksamkeit der verfügbaren Polysaccharid- und Konjugat-Impfstoffe sind der Hintergrund intensiver Bemühungen um die Entwicklung effizienter und sicherer Vakzine gegen *S. pneumoniae*. Entsprechende Untersuchungen sind in der Regel auf die Virulenzfaktoren der Pneumokokken fokussiert.

In der vorliegenden Untersuchung wurde in einem Meningitismodell mit intrazerebraler Infektion die Virulenz des D39-Wildtyps von *S. pneumoniae* mit anderweitig isogenetischen Varianten verglichen, bei denen die Gene für die Bildung von Pneumolysin, Neuraminidase A und B bzw. Hyaluronidase durch Insertions-Duplikation ausgeschaltet worden waren. Die Untersuchung erfolgte an je 11 Mäusen pro Gruppe, denen jeweils 10^4 CFU des entsprechenden Stammes in den rechten Frontallappen verabreicht wurden. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde 12, 24, 32 und 36 Stunden nach der Infektion durch einen klinischen Score, Gewicht und Seilttest erfasst. 36 Stunden nach der Infektion wurden die Tiere getötet (Dekapitation) und das Gehirn für die histologische Untersuchung aufbereitet.

Das Körpergewicht nahm in allen Gruppen ab; die Unterschiede waren nicht signifikant, aber der Gewichtsverlust in der *ply*^{-/-}-Gruppe lag deutlich niedriger als in den anderen Gruppen. Der klinische Score war in dieser Gruppe 32 und 36 Stunden nach Infektion statistisch signifikant niedriger, d. h. die Tiere waren gesünder als nach Infektion mit dem Wildtyp, und ein entsprechendes Ergebnis zeigte der Seilttest. Die anderen Knockout-Varianten unterschieden sich weder untereinander noch vom Wildtyp in relevanter Weise. Diese klinischen Ergebnisse ließen sich sowohl in Bezug auf die Überlebenszeit als auch auf den Bakterientiter nach 36 Stunden und den histologischen Befund reproduzieren.

Zusammenfassend ist das Pneumolysin als vielversprechender Kandidat für eine Zielsubstanz für die Entwicklung von Impfstoffen gegen die Pneumokokkenmeningitis anzusehen; zusätzlich ist dies nach der aktuellen Literatur wahrscheinlich auch für das hier nicht untersuchte Autolysin der Fall, Neuraminidase A und B bzw. Hyaluronidase dagegen scheinen eher ungeeignet zu sein.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

CbpA	Cholin-bindendes Protein A
CDC	<i>cholesterol-dependent cytolysins</i>
Hyl	Hyaluronidase
<i>hyl</i> ^{-/-}	Hyaluronidase-defizient
IgG	Immunglobulin G
LPXTG	<i>grampositive attachment motif</i>
LytA	Autolysin
<i>lytA</i> ^{-/-}	Autolysin-defizient
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
n.s.	nicht signifikant
NanA	Neuraminidase A
<i>nanA</i> ^{-/-}	Neuraminidase A-defizient
NanB	Neuraminidase B
<i>nanB</i> ^{-/-}	Neuraminidase B-defizient
NanC	Neuraminidase C
<i>nanC</i> ^{-/-}	Neuraminidase C-defizient
PAF	<i>platelet activating factor</i>
PavA	<i>pneumococcal adherence and virulence factor A</i>
Ply	Pneumolysin
<i>ply</i> ^{-/-}	Pneumolysin-defizient
PspA	<i>pneumococcal surface protein A</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>SpxB</i>	<i>Streptococcus pneumoniae expression of pyruvate oxidase</i>
TAC	Thiol-aktivierende Zytolysine

6.2 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

TABELLE 1: VIRULENZFAKTOREN VON <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	6
TABELLE 2: KLINISCHER SCORE	22
TABELLE 3: PUNKTWERTUNG BEIM SEILTEST	24
TABELLE 4: BEWERTUNG DER GRANULOZYTÄREN INFILTRATION.....	28
TABELLE 5: GEWICHTSVERLUST IM MAUSMODELL BEI ALLEN INFIZIERTEN MÄUSEN	31
TABELLE 6: KLINISCHER SCORE	33
TABELLE 7: PUNKTZAHL IM SEILTEST.....	36
TABELLE 8: BAKTERIENTITER NACH LOGARITHMISCHER TRANSFORMATION NACH 36 STUNDEN	37
TABELLE 9: ENTZÜNDUNGSSCORE	42
TABELLE 10: NEURONENSCHADEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER REGION, VERGLEICH D39 UND <i>PLY</i> -/-.....	50
ABBILDUNG 1: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VON <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	3
ABBILDUNG 2: VERSUCHSAUFBAU FÜR DEN SEILTEST	23
ABBILDUNG 3: LICHTMIKROSKOPISCHES BILD, HE-FÄRBUNG.....	28
ABBILDUNG 4: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES GEWICHTSVERLUSTES.....	31
ABBILDUNG 5: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES KLINISCHEN SCORES	33
ABBILDUNG 7: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES KLINISCHEN SCORES NACH 32 STUNDEN	34
ABBILDUNG 8: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES KLINISCHEN SCORES NACH 36 STUNDEN	35
ABBILDUNG 9: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER PUNKTZAHL IM SEILTEST	36
ABBILDUNG 10: BAKTERIENTITER NACH 36 STUNDEN IM BLUT	38
ABBILDUNG 11: BAKTERIENTITER NACH 36 STUNDEN IM CEREBELLUM.....	38
ABBILDUNG 12: BAKTERIENTITER NACH 36 STUNDEN IN DER MILZ	39
ABBILDUNG 13: GRANULOZYTÄRE INFILTRATE DES III. VENTRIKELS (10X VERGRÖßERUNG) BEI <i>PLY</i> -/ MUTANTEN-INFESTION.....	40
ABBILDUNG 14: SPÄRLICHE GRANULOZYTÄRE INFILTRATE DES III. VENTRIKELS (40X VERGRÖßERUNG) BEI <i>PLY</i> -/MUTANTEN-INFESTION	40
ABBILDUNG 15: REICHLICH GRANULOZYTÄRE INFILTRATE DES III. VENTRIKELS (40X VERGRÖßERUNG) BEI D39-WILDTYP-INFESTION	41

ABBILDUNG 16: PLEXUS CHOROIDEUS MIT WENIGEN GRANULOZYTÄREN INFILTRATEN DES III. VENTRIKELS (40X VERGRÖßERUNG) BEI <i>HYL</i> ^{-/-} -MUTANTEN-INFEKTION.....	41
ABBILDUNG 17: PLEXUS CHOROIDEUS UND EINIGE GRANULOZYTÄRE INFILTRATE DES III. VENTRIKELS (40X VERGRÖßERUNG) BEI <i>NANA</i> ^{-/-} -MUTANTEN-INFEKTION	42
ABBILDUNG 18: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES ENTZÜNDUNGSSCORES NACH 36 STUNDEN (EINZELWERTE UND MEDIAN) IM MAUSMODELL IM VERGLEICH MIT ALLEN INFIZIERTEN MÄUSEN	43
ABBILDUNG 19: GRANULOZYTÄRE INFILTRATE DES INTERHEMISPÄREN SPALTES (20X VERGRÖßERUNG) BEI <i>PLY</i> ^{-/-} -MUTANTEN-INFEKTION	44
ABBILDUNG 19: WENIG GRANULOZYTÄRE INFILTRATE DES INTERHEMISPÄREN SPALTES (40X VERGRÖßERUNG) BEI <i>PLY</i> ^{-/-} -MUTANTEN-INFEKTION	45
ABBILDUNG 20: REICHLICH GRANULOZYTÄRE INFILTRATE DES INTERHEMISPÄRENSPALTES (40X VERGRÖßERUNG) BEI D39-WILDTYP-INFEKTION	46
ABBILDUNG 21: MÄßIG GRANULOZYTÄRE INFILTRATE DES INTERHEMISPÄRENSPALTES (40 X VERGRÖßERUNG) BEI <i>HYL</i> ^{-/-} -MUTANTEN-INFEKTION	47
ABBILDUNG 23: REICHLICH GRANULOZYTÄRE INFILTRATE DES INTERHEMISPÄRENSPALTES (40X VERGRÖßERUNG) BEI <i>NANB</i> ^{-/-} -MUTANTEN-INFEKTION	48
ABBILDUNG 24: REICHLICH GRANULOZYTÄRE INFILTRATE IM BEREICH DER NEOCORTEXOBERFLÄCHE (40X VERGRÖßERUNG) BEI D39-WILDTYP-INFEKTION	49
ABBILDUNG 25: WENIG GRANULOZYTÄRE INFILTRATE IM BEREICH DER NEOCORTEXOBERFLÄCHE (40X VERGRÖßERUNG) BEI <i>PLY</i> ^{-/-} -MUTANTEN-INFEKTION	49
ABBILDUNG 25: NEURONENSCHADEN IM BEREICH DES HIPPOCAMPUS (40X VERGRÖßERUNG) BEI D39-WILDTYP-INFEKTION	51
ABBILDUNG 26: KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSKURVEN DER TIERE IM VERGLEICH ZWISCHEN D39- UND <i>PLY</i> ^{-/-} -STÄMMEN	52

7 Literaturverzeichnis

- Abraham EP, Chain E, Fletcher CM, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Florey HW (1941): Further observations on penicillin. *Lancet* 2, 177-189
- ACIP (2000): Preventing pneumococcal disease among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 49, 1-35
- Alcantara RB, Preheim LC, Gentry MJ (1999): Role of Pneumolysin's complement-activating activity during pneumococcal bacteremia in cirrhotic rats. *Infect Immun* 67, 2862-2866
- Alcantara RB, Preheim LC, Gentry-Nielsen MJ (2001): Pneumolysin-induced complement depletion during experimental pneumococcal bacteremia. *Infect Immun* 69, 3569-3575
- Alexander JE, Berry AM, Paton JC, Rubins JB, Andrew PW, Mitchell TJ (1998): Amino acid changes affecting the activity of pneumolysin alter the behaviour of pneumococci in pneumonia. *Microb Pathog* 24, 167-174
- Alouf JE (2000): Cholesterol-binding cytolytic protein toxins. *Int J Med Microbiol* 290, 351-356
- Andrew PW, Mitchell TJ, Morgan PJ (1997): Relationship of structure to function in pneumolysin. *Microb Drug Resist* 3, 11-17
- Arda B, Sipahi OR, Atalay S, Ulusoy S (2008): Pooled analysis of 2,408 cases of acute adult purulent meningitis from Turkey. *Med Princ Pract* 17, 76-79
- Balachandran P, Hollingshead SK, Paton JC, Briles DE (2001): The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *J Bacteriol* 183, 3108-3116
- Baxendale HE, Johnson M, Stephens RC, Yuste J, Klein N, Brown JS, Goldblatt D (2008): Natural human antibodies to pneumococcus have distinctive molecular characteristics and protect against pneumococcal disease. *Clin Exp Immunol* 151, 51-60
- Berry AM, Paton JC (2000): Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun* 68, 133-140

- Berry AM, Lock RA, Hansman D, Paton JC (1989): Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 57, 2324-2330
- Berry AM, Paton JC, Hansman D (1992): Effect of insertional inactivation of the genes encoding pneumolysin and autolysin on the virulence of *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Microb Pathog* 12, 87-93
- Berry AM, Lock RA, Thomas SM, Rajan DP, Hansman D, Paton JC (1994): Cloning and nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *Infect Immun* 62, 1101-1108
- Berry AM, Alexander JE, Mitchell TJ, Andrew PW, Hansman D, Paton JC (1995): Effect of defined point mutations in the pneumolysin gene on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 63, 1969-1974
- Berry AM, Lock RA, Paton JC (1996): Cloning and characterization of nanB, a second *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase gene, and purification of the NanB enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178, 4854-4860
- Berry AM, Ogunniyi AD, Miller DC, Paton JC (1999): Comparative virulence of *Streptococcus pneumoniae* strains with insertion-duplication, point, and deletion mutations in the pneumolysin gene. *Infect Immun* 67, 981-985
- Beurg M, Hafidi A, Skinner L, Cowan G, Hondarrague Y, Mitchell TJ, Dulon D (2005): The mechanism of pneumolysin-induced cochlear hair cell death in the rat. *J Physiol* 568, 211-227
- Bohr V, Paulson OB, Rasmussen N (1984): Pneumococcal meningitis. Late neurologic sequelae and features of prognostic impact. *Arch Neurol* 41, 1045-1049
- Boulnois GJ, Paton JC, Mitchell TJ, Andrew PW (1991): Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 5, 2611-2616
- Braun JS, Novak R, Murray PJ, Eischen CM, Susin SA, Kroemer G, Halle A, Weber JR, Tuomanen EI, Cleveland JL (2001): Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus. *J Infect Dis* 184, 1300-1309
- Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR (2002): Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* 109, 19-27
- Briese T, Hakenbeck R (1985): Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. *Eur J Biochem* 146, 417-427

- Briles DE, Yother J, McDaniel LS (1988): Role of pneumococcal surface protein A in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Infect Dis* 10 Suppl 2, S372-374
- Briles DE, Hollingshead SK, Swiatlo E, Brooks-Walter A, Szalai A, Virolainen A, McDaniel LS, Benton KA, White P, Prellner K, Hermansson A, Aerts PC, Van Dijk H, Crain MJ (1997): PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb Drug Resist* 3, 401-408
- Burnaugh AM, Frantz LJ, King SJ (2008): Growth of *Streptococcus pneumoniae* on human glycoconjugates is dependent upon the sequential activity of bacterial exoglycosidases. *J Bacteriol* 190, 221-230
- Cabellos C, MacIntyre DE, Forrest M, Burroughs M, Prasad S, Tuomanen E (1992): Differing roles for platelet-activating factor during inflammation of the lung and subarachnoid space. The special case of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Invest* 90, 612-618
- Camara M, Boulnois GJ, Andrew PW, Mitchell TJ (1994): A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect Immun* 62, 3688-3695
- Canvin JR, Marvin AP, Sivakumaran M, Paton JC, Boulnois GJ, Andrew PW, Mitchell TJ (1995): The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J Infect Dis* 172, 119-123
- Cao J, Chen D, Xu W, Chen T, Xu S, Luo J, Zhao Q, Liu B, Wang D, Zhang X, Shan Y, Yin Y (2007): Enhanced protection against pneumococcal infection elicited by immunization with the combination of PspA, PspC, and ClpP. *Vaccine* 25, 4996-5005
- Casal J, Tarrago D (2003): Immunity to *Streptococcus pneumoniae*: Factors affecting production and efficacy. *Curr Opin Infect Dis* 16, 219-224
- CDC (2008): Invasive pneumococcal disease in children 5 years after conjugate vaccine introduction--eight states, 1998-2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 57, 144-148
- Chen JD, Morrison DA (1988): Construction and properties of a new insertion vector, pJDC9, that is protected by transcriptional terminators and useful for cloning of DNA from *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* 64, 155-164
- Cockeran R, Anderson R, Feldman C (2005): Pneumolysin as a vaccine and drug target in the prevention and treatment of invasive pneumococcal disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53, 189-198

- Cockeran R, Theron AJ, Steel HC, Matlola NM, Mitchell TJ, Feldman C, Anderson R (2001): Proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils. *J Infect Dis* 183, 604-611
- Crain MJ, Waltman WD, 2nd, Turner JS, Yother J, Talkington DF, McDaniel LS, Gray BM, Briles DE (1990): Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 58, 3293-3299
- Cundell DR, Pearce BJ, Sandros J, Naughton AM, Masure HR (1995): Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells. *Infect Immun* 63, 2493-2498
- Davis CW, McIntyre PB (1995): Invasive pneumococcal infection in children, 1981-92: a hospital-based study. *J Paediatr Child Health* 31, 317-322
- Deibel RH, Seeley HW: *Streptococcaceae fam nov*; in: *Bergey's manual of determinative bacteriology*; hrsg. v. BUCHANAN RE, GIBBONS NE; Williams & Wilkins; Baltimore 1974, 490-517
- Dessing MC, Florquin S, Paton JC, van der Poll T (2008): Toll-like receptor 2 contributes to antibacterial defence against pneumolysin-deficient pneumococci. *Cell Microbiol* 10, 237-246
- Di Guilmi AM, Dessen A (2002): New approaches towards the identification of antibiotic and vaccine targets in *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO Rep* 3, 728-734
- Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS, Jr., Swartz MN (1993): Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med* 328, 21-28
- Evans GM, Gaisford WF (1938): Treatment of pneumonia with 2-(p-aminobenzene-sulphonamido)pyridine. *Lancet* 2, 14-19
- Feldman C, Mitchell TJ, Andrew PW, Boulnois GJ, Read RC, Todd HC, Cole PJ, Wilson R (1990): The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Microb Pathog* 9, 275-284
- Felton LD (1924): A study of the isolation and concentration of the specific antibodies of antipneumococcus sera. *Boston Med Surg J* 190, 819-825
- Ferreira DM, Areas AP, Darrieux M, Leite LC, Miyaji EN (2006): DNA vaccines based on genetically detoxified derivatives of pneumolysin fail to protect mice against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46, 291-297

- Focke NK, Kallenberg K, Mohr A, Djukic M, Nau R, Schmidt H (2012): Distributed, Limbic Gray Matter Atrophy in Patients after Bacterial Meningitis. *AJNR Am J Neuroradiol*,
- Fraenkel A (1884): Über die genuine Penumonie, in: Verhandlungen des III. Congresses für Innere Medizin, 3. Congress. 3, 17-31
- Fraenkel A (1886): Weitere Beiträge zur Lehre von den Mikroccoccn der genuinen fibrinösen Pneumonie. *Z Klin Med* 11, 437-458
- Friedländer C (1883): Die Mikrokokken der Pneumonie. *Fortschr Med* 1, 715-733
- Galiza EP, Heath PT (2007): Pneumococcal conjugate vaccines. A review. *Minerva Med* 98, 131-143
- García-Suárez MM, Cima-Cabal MD, Flórez N, García P, Cernuda-Cernuda R, Astudillo A, Vázquez F, de los Toyos JR, Méndez FJ (2004): Protection against pneumococcal pneumonia in mice by monoclonal antibodies to pneumolysin. *Infect Immun* 72, 4534-4540
- García-Suárez MM, Vázquez F, Méndez FJ (2006): Streptococcus pneumoniae virulence factors and their clinical impact: An update. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24, 512-517
- 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
- Giefing C, Meinke AL, Hanner M, Henics T, Bui MD, Gelbmann D, Lundberg U, Senn BM, Schunn M, Habel A, Henriques-Normark B, Ortqvist A, Kalin M, von Gabain A, Nagy E (2008): Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J Exp Med* 205, 117-131
- Gilbert RJ, Jimenez JL, Chen S, Tickle IJ, Rossjohn J, Parker M, Andrew PW, Saibil HR (1999): Two structural transitions in membrane pore formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of Streptococcus pneumoniae. *Cell* 97, 647-655
- Giudicelli S, Tomasz A (1984): Attachment of pneumococcal autolysin to wall teichoic acids, an essential step in enzymatic wall degradation. *J Bacteriol* 158, 1188-1190

- Green SN, Sanders M, Moore QC, 3rd, Norcross EW, Monds KS, Caballero AR, McDaniel LS, Robinson SA, Onwubiko C, O'Callaghan RJ, Marquart ME (2008): Protection from *Streptococcus pneumoniae* keratitis by passive immunization with pneumolysin antiserum. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 290-294
- Hakansson A, Roche H, Mirza S, McDaniel LS, Brooks-Walter A, Briles DE (2001): Characterization of binding of human lactoferrin to pneumococcal surface protein A. *Infect Immun* 69, 3372-3381
- Hammerschmidt S, Bethe G, Remane PH, Chhatwal GS (1999): Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 67, 1683-1687
- Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM (1989): CD44--a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 10, 423-428
- Heumann D, Barras C, Severin A, Glauser MP, Tomasz A (1994): Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun* 62, 2715-2721
- Hirst RA, Gosai B, Rutman A, Guerin CJ, Nicotera P, Andrew PW, O'Callaghan C (2008): *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. *J Infect Dis* 197, 744-751
- Hirst RA, Kadioglu A, O'Callaghan C, Andrew PW (2004): The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol* 138, 195-201
- Holmes AR, McNab R, Millsap KW, Rohde M, Hammerschmidt S, Mawdsley JL, Jenkinson HF (2001): The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol* 41, 1395-1408
- Holmlund E, Quiambao B, Ollgren J, Nohynek H, Käyhty H (2006): Development of natural antibodies to pneumococcal surface protein A, pneumococcal surface adhesin A and pneumolysin in Filipino pregnant women and their infants in relation to pneumococcal carriage. *Vaccine* 24, 57-65
- Höltje JV, Tomasz A (1975a): Biological effects of lipoteichoic acids. *J Bacteriol* 124, 1023-1027
- Höltje JV, Tomasz A (1975b): Specific recognition of choline residues in the cell wall teichoic acid by the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase of *Pneumococcus*. *J Biol Chem* 250, 6072-6076

- Iannelli F, Pearce BJ, Pozzi G (1999): The type 2 capsule locus of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 181, 2652-2654
- Izard JW, Kendall DA (1994): Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol Microbiol* 13, 765-773
- Jedrzejewski MJ (2001): Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 187-207 ; first page, table of contents
- Jedrzejewski MJ (2004): Extracellular virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci* 9, 891-914
- Johnson MK (1977): Cellular location of pneumolysin. *FEMS Microbiol Lett* 2, 243-245
- Keefer CS, Blake FG, Marshall EK, Jr., Lockwood JS, Wood WB, Jr. (1943): Penicillin in the treatment of infections: a report of 500 cases. *JAMA* 122, 1217-1224
- Kelly R, Greiff D (1970): Toxicity of pneumococcal neuraminidase. *Infect Immun* 2, 115-117
- Kim YS, Kennedy S, Tauber MG (1995): Toxicity of *Streptococcus pneumoniae* in neurons, astrocytes, and microglia in vitro. *J Infect Dis* 171, 1363-1368
- Kirkham LA, Jefferies JM, Kerr AR, Jing Y, Clarke SC, Smith A, Mitchell TJ (2006a): Identification of invasive serotype 1 pneumococcal isolates that express nonhemolytic pneumolysin. *J Clin Microbiol* 44, 151-159
- Kirkham LA, Kerr AR, Douce GR, Paterson GK, Dilts DA, Liu DF, Mitchell TJ (2006b): Construction and immunological characterization of a novel nontoxic protective pneumolysin mutant for use in future pneumococcal vaccines. *Infect Immun* 74, 586-593
- Koedel U, Pfister HW (1999): Models of experimental bacterial meningitis. Role and limitations. *Infect Dis Clin North Am* 13, 549-577, vi
- Kostyukova NN, Volkova MO, Ivanova VV, Kvetnaya AS (1995): A study of pathogenic factors of *Streptococcus pneumoniae* strains causing meningitis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 10, 133-137
- Krivan HC, Roberts DD, Ginsburg V (1988): Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6157-6161
- Lee CJ, Banks SD, Li JP (1991): Virulence, immunity, and vaccine related to *Streptococcus pneumoniae*. *Crit Rev Microbiol* 18, 89-114

- Li J, Glover DT, Szalai AJ, Hollingshead SK, Briles DE (2007): PspA and PspC minimize immune adherence and transfer of pneumococci from erythrocytes to macrophages through their effects on complement activation. *Infect Immun* 75, 5877-5885
- Lock RA, Paton JC, Hansman D (1988): Comparative efficacy of pneumococcal neuraminidase and pneumolysin as immunogens protective against *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* 5, 461-467
- Maestro B, Sanz JM (2007): Novel approaches to fight *Streptococcus pneumoniae*. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2, 188-196
- McDaniel LS, Scott G, Kearney JF, Briles DE (1984): Monoclonal antibodies against protease-sensitive pneumococcal antigens can protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp Med* 160, 386-397
- Meli DN, Christen S, Leib SL, Täuber MG (2002): Current concepts in the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Opin Infect Dis* 15, 253-257
- Meyer A, Ladefoged K, Poulsen P, Koch A (2008): Population-based survey of invasive bacterial diseases, Greenland, 1995-2004. *Emerg Infect Dis* 14, 76-79
- Mitchell TJ (2000): Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* 151, 413-419
- Mitchell TJ, Andrew PW, Saunders FK, Smith AN, Boulnois GJ (1991): Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein. *Mol Microbiol* 5, 1883-1888
- Mitchell TJ, Alexander JE, Morgan PJ, Andrew PW (1997): Molecular analysis of virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 26, 62S-71S
- Miyake K, Underhill CB, Lesley J, Kincade PW (1990): Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J Exp Med* 172, 69-75
- Moore HF, Chesney AM (1917): A study of ethylhydrocuprein (optochin) in the treatment of acute lobar pneumonia. *Arch Intern Med* 19, 611-682
- Morgenroth J, Levy R (1911): Chemotherapie der Pneumokokkeninfektion. *Berl Klin Wochenschr* 48, 1560-1561

- Morsczeck C, Prokhorova T, Sigh J, Pfeiffer M, Bille-Nielsen M, Petersen J, Boysen A, Kofoed T, Frimodt-Møller N, Nyborg-Nielsen P, Schrotz-King P (2008): Streptococcus pneumoniae: proteomics of surface proteins for vaccine development. *Clin Microbiol Infect* 14, 74-81
- Mosser JL, Tomasz A (1970): Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J Biol Chem* 245, 287-298
- Musher DM, Phan HM, Baughn RE (2001): Protection against bacteremic pneumococcal infection by antibody to pneumolysin. *J Infect Dis* 183, 827-830
- Nau R, Brück W (2002): Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci* 25, 38-45
- Nau R, Eiffert H (2002): Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. *Clin Microbiol Rev* 15, 95-110
- Nau R, Gerber J, Bunkowski S, Brück W (2004): Axonal injury, a neglected cause of CNS damage in bacterial meningitis. *Neurology* 62, 509-511
- Nau R, Soto A, Brück W (1999): Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 265-274
- Navarre WW, Schneewind O (1994): Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 14, 115-121
- Neher JJ, Brown GC (2007): Neurodegeneration in models of Gram-positive bacterial infections of the central nervous system. *Biochem Soc Trans* 35, 1166-1167
- Netter A (1887): De la méningite due au pneumocoque (avec ou sans pneumonie). *Archives Générales de Médecine* 19, 257-277, 434-455
- Nollmann M, Gilbert R, Mitchell T, Sferrazza M, Byron O (2004): The role of cholesterol in the activity of pneumolysin, a bacterial protein toxin. *Biophys J* 86, 3141-3151
- O'Toole RD, Stahl WL (1975): Experimental pneumococcal meningitis. Effects of neuraminidase and other pneumococcal constituents on cerebrospinal fluid in the intact dog. *J Neurol Sci* 26, 167-178
- O'Toole RD, Goode L, Howe C (1971): Neuraminidase activity in bacterial meningitis. *J Clin Invest* 50, 979-985

- Ogunniyi AD, Grabowicz M, Briles DE, Cook J, Paton JC (2007a): Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 75, 350-357
- Ogunniyi AD, LeMessurier KS, Graham RM, Watt JM, Briles DE, Stroehner UH, Paton JC (2007b): Contributions of pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), and PspC to pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae* D39 in a mouse model. *Infect Immun* 75, 1843-1851
- Orihuela CJ, Gao G, Francis KP, Yu J, Tuomanen EI (2004): Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J Infect Dis* 190, 1661-1669
- Palmer M (2001): The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* 39, 1681-1689
- Pasteur L (1881): Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bull Acad Med (Paris)* 10, 94-103
- Pasteur L, Chamberland C, Roux E (1881): Sur une maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Compt Rend Acad Sci* 92, 159-165
- Paton JC (1996): The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Trends Microbiol* 4, 103-106
- Paton JC, Ferrante A (1983): Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect Immun* 41, 1212-1216
- Paton JC, Rowan-Kelly B, Ferrante A (1984): Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect Immun* 43, 1085-1087
- Paton JC, Andrew PW, Boulnois GJ, Mitchell TJ (1993): Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu Rev Microbiol* 47, 89-115
- Pfister HW, Feiden W, Einhäupl KM (1993): Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. Results of a prospective clinical study. *Arch Neurol* 50, 575-581
- Pracht D, Elm C, Gerber J, Bergmann S, Rohde M, Seiler M, Kim KS, Jenkinson HF, Nau R, Hammerschmidt S (2005): PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infect Immun* 73, 2680-2689
- Pritchard DG, Lin B, Willingham TR, Baker JR (1994): Characterization of the group B streptococcal hyaluronate lyase. *Arch Biochem Biophys* 315, 431-437

- Qiu G, Toyoda H, Toida T, Koshiishi I, Imanari T (1996): Compositional analysis of hyaluronan, chondroitin sulfate and dermatan sulfate: HPLC of disaccharides produced from the glycosaminoglycans by solvolysis. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 44, 1017-1020
- Quagliarello V, Scheld WM (1992): Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med* 327, 864-872
- Ren B, McCrory MA, Pass C, Bullard DC, Ballantyne CM, Xu Y, Briles DE, Szalai AJ (2004): The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. *J Immunol* 173, 7506-7512
- Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI (1998): Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* 102, 347-360
- Roche AM, King SJ, Weiser JN (2007): Live attenuated *Streptococcus pneumoniae* strains induce serotype-independent mucosal and systemic protection in mice. *Infect Immun* 75, 2469-2475
- Rogers HJ, Perkins HR, Ward JB: Formation of cell wall polymers; in: *Microbial cell wall and membranes*; hrsg. v. Nombela C; Chapman & Hall; London 1980, 437-460
- Romero P, López R, Garcia 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
- Rossjohn J, Gilbert RJ, Crane D, Morgan PJ, Mitchell TJ, Rowe AJ, Andrew PW, Paton JC, Tweten RK, Parker MW (1998): The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* 284, 449-461
- Rubins JB, Janoff EN (1998): Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. *J Lab Clin Med* 131, 21-27
- Sánchez-Puelles JM, García JL, López R, García E (1987): 3'-end modifications of the *Streptococcus pneumoniae* lytA gene: role of the carboxy terminus of the pneumococcal autolysin in the process of enzymatic activation (conversion). *Gene* 61, 13-19

- Sato K, Quartey MK, Liebler CL, Le CT, Giebink GS (1996): Roles of autolysin and pneumolysin in middle ear inflammation caused by a type 3 *Streptococcus pneumoniae* strain in the chinchilla otitis media model. *Infect Immun* 64, 1140-1145
- Saunders FK, Mitchell TJ, Walker JA, Andrew PW, Boulnois GJ (1989): Pneumolysin, the thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*, does not require a thiol group for in vitro activity. *Infect Immun* 57, 2547-2552
- Scanlon KL, Diven WF, Glew RH (1989): Purification and properties of *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase. *Enzyme* 41, 143-150
- Schmidt H, Heimann B, Djukic M, Mazurek C, Fels C, Wallesch CW, Nau R (2006): Neuropsychological sequelae of bacterial and viral meningitis. *Brain* 129, 333-345
- Sharief MK, Ciardi M, Thompson EJ (1992): Blood-brain barrier damage in patients with bacterial meningitis: association with tumor necrosis factor-alpha but not interleukin-1 beta. *J Infect Dis* 166, 350-358
- Shepard LA, Shatursky O, Johnson AE, Tweten RK (2000): The mechanism of pore assembly for a cholesterol-dependent cytolysin: formation of a large prepore complex precedes the insertion of the transmembrane beta-hairpins. *Biochemistry* 39, 10284-10293
- Sicard M, Gasc AM, Giammarinaro P, Lefrancois J, Pasta F, Samrakandi M (2000): Molecular biology of *Streptococcus pneumoniae*: an everlasting challenge. *Res Microbiol* 151, 407-411
- Spreer A, Kerstan H, Böttcher T, Gerber J, Siemer A, Zysk G, Mitchell TJ, Eiffert H, Nau R (2003): Reduced release of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2649-2654
- Spreer A, Lis A, Gerber J, Reinert RR, Eiffert H, Nau R (2004): Differences in clinical manifestation of *Streptococcus pneumoniae* infection are not correlated with in vitro production and release of the virulence factors pneumolysin and lipoteichoic and teichoic acids. *J Clin Microbiol* 42, 3342-3345
- Spreer A, von Ruden C, Mitchell TJ, Eiffert H, Nau R (2007): Influence of subinhibitory concentrations of protein-synthesis-inhibiting antibiotics on production and release of the pneumococcal virulence factor pneumolysin in vitro. *Chemotherapy* 53, 327-331

- Srivastava A, Henneke P, Visintin A, Morse SC, Martin V, Watkins C, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT, Malley R (2005): The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. *Infect Immun* 73, 6479-6487
- Sternberg GM: A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. John Murphy & Co., Baltimore 1881
- Stringaris AK, Geisenhainer J, Bergmann F, Balshüsemann C, Lee U, Zysk G, Mitchell TJ, Keller BU, Kuhnt U, Gerber J, Spreer A, Bähr M, Michel U, Nau R (2002): Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiol Dis* 11, 355-368
- Swartz MN (1984): Bacterial meningitis: more involved than just the meninges. *N Engl J Med* 311, 912-914
- Tai SS (2006): Streptococcus pneumoniae protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. *Crit Rev Microbiol* 32, 139-153
- Talamon C (1883): Coccus de la pneumonie. *Bull Soc Anat Paris* 58, 475-481
- Tillett WS, Cambier MJ, Harris WH (1943): Sulfonamide-fast pneumococci: a clinical report of two cases of pneumonia together with experimental studies on the effectiveness of penicillin and tyrothricin against sulfonamide-resistant strains *J Clin Invest* 22, 249-255
- Tilley SJ, Orlova EV, Gilbert RJ, Andrew PW, Saibil HR (2005): Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* 121, 247-256
- Toltzis P, Jacobs MR (2005): The epidemiology of childhood pneumococcal disease in the United States in the era of conjugate vaccine use. *Infect Dis Clin North Am* 19, 629-645
- Tomasz A (1981): Surface components of Streptococcus pneumoniae. *Rev Infect Dis* 3, 190-211
- Tong HH, Blue LE, James MA, Chen YP, DeMaria TF (2000): Evaluation of phase variation of nontypeable Haemophilus influenzae lipooligosaccharide during nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect Immun* 68, 4593-4597
- 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 E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A (1985): The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis* 151, 859-868
- Tuomanen E, Rich R, Zak O (1987): Induction of pulmonary inflammation by components of the pneumococcal cell surface. *Am Rev Respir Dis* 135, 869-874
- Tweten RK: Pore-forming toxins of the gram positive bacteria; in: Virulence mechanisms of bacterial pathogens; hrsg. v. Roth JA, Bolin CA, Brogden KA, Minion C, Wannemuehler MJ; American Society for Microbiology (ASM); Washington DC 1995, 207-230
- Tzanakaki G, Mastrantonio P (2007): Aetiology of bacterial meningitis and resistance to antibiotics of causative pathogens in Europe and in the Mediterranean region. *Int J Antimicrob Agents* 29, 621-629
- van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M (2004): Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 351, 1849-1859
- van der Flier M, Chhun N, Wizemann TM, Min J, McCarthy JB, Tuomanen EI (1995): Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to immobilized fibronectin. *Infect Immun* 63, 4317-4322
- van Ginkel FW, McGhee JR, Watt JM, Campos-Torres A, Parish LA, Briles DE (2003): Pneumococcal carriage results in ganglioside-mediated olfactory tissue infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14363-14367
- Walker JA, Allen RL, Falmagne P, Johnson MK, Boulnois GJ (1987): Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 55, 1184-1189
- Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, Henriques-Normark B (2007): Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol* 9, 1162-1171
- Weichselbaum A (1887): Über die Ätiologie der akuten Meningitis cerebro-spinalis. *Fortschr Med* 5, 573-583
- Wellmer A, Noeske C, Gerber J, Munzel U, Nau R (2000): Spatial memory and learning deficits after experimental pneumococcal meningitis in mice. *Neurosci Lett* 296, 137-140

- Wellmer A, Zysk G, Gerber J, Kunst T, Von Mering M, Bunkowski S, Eiffert H, Nau R (2002): Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of *Streptococcus pneumoniae* in murine meningitis. *Infect Immun* 70, 6504-6508
- Whiley RA, Beighton D (1998): Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 13, 195-216
- Whitby LEH (1938): Chemotherapy of pneumococcal and other infections with 2-(p-aminobenzenesulphonamido) pyridine. *Lancet* 1, 14-19
- Williamson YM, Gowrisankar R, Longo DL, Facklam R, Gipson IK, Ades EP, Carlone GM, Sampson JS (2008): Adherence of nontypeable *Streptococcus pneumoniae* to human conjunctival epithelial cells. *Microb Pathog* 44, 175-185
- Winslow CE, Broadhurst J, Buchanan RE, Krumwiede C, Rogers LA, Smith GH (1920): The Families and Genera of the Bacteria: Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. *J Bacteriol* 5, 191-229
- Winter AJ, Comis SD, Osborne MP, Tarlow MJ, Stephen J, Andrew PW, Hill J, Mitchell TJ (1997): A role for pneumolysin but not neuraminidase in the hearing loss and cochlear damage induced by experimental pneumococcal meningitis in guinea pigs. *Infect Immun* 65, 4411-4418
- Wren BW (1991): A family of clostridial and streptococcal ligand-binding proteins with conserved C-terminal repeat sequences. *Mol Microbiol* 5, 797-803
- Zwijnenburg PJ, van der Poll T, Florquin S, van Deventer SJ, Roord JJ, van Furth AM (2001): Experimental pneumococcal meningitis in mice: a model of intranasal infection. *J Infect Dis* 183, 1143-1146
- Zysk G, Brück W, Gerber J, Brück Y, Prange HW, Nau R (1996): Anti-inflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 722-728
- Zysk G, Bejo L, Schneider-Wald BK, Nau R, Heinz H (2000): Induction of necrosis and apoptosis of neutrophil granulocytes by *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Exp Immunol* 122, 61-66
- Zysk G, Schneider-Wald BK, Hwang JH, Bejo L, Kim KS, Mitchell TJ, Hakenbeck R, Heinz HP (2001): Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69, 845-852

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Roland Nau, Chefarzt der Abteilung für Geriatrie im Evangelischen Krankenhaus Göttingen Weende, für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Erstellung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Andreas Wellmer, Chefarzt der Abteilung für Neurologie am Krankenhaus Ludmillerstift Meppen, für die umfassende persönliche Betreuung, Anleitung und die konstruktive Kritik während der experimentellen Aufgabenstellungen sowie bei der Fragestellung der Promotionsarbeit.

Herrn Gregor Zysk danke ich herzlich für die Generierung und Bereitstellung der genetisch modifizierten Stämme von *S. pneumoniae*.

Des Weiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern des Neurochemischen Labors, insbesondere Stefanie Bunkowski (MTA Neuropathologie Göttingen), und allen, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Am 04.08.1974 wurde ich, Tammo Helmut Kunst, in Oldenburg geboren. Am 09.07.2005 heiratete ich die Zahnärztin Valeska Kunst, geb. Sander. Unser Sohn Moritz Leonard Kunst wurde am 16.08.2007 geboren.

Eingeschult wurde ich 1981. Die Schule schloss ich 1995 mit dem Abitur ab. 1991-1992 nahm ich an einem Schüleraustausch als Rotary-Austauschschüler an der Lecanto Highschool in Florida, USA, teil.

Meinen Zivildienst absolvierte ich im Evangelischen Krankenhaus in Oldenburg. Im Wintersemester 1996/97 begann ich ein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Im März 2002 erhielt ich das II. Staatsexamen. Von April 2002 bis März 2003 absolvierte ich ein Praktisches Jahr im Klinikum Links der Weser in Bremen. Im April 2003 erhielt ich das III. Staatsexamen. Von Mai 2003 bis Oktober 2005 war ich als Arzt im Praktikum in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe unter der Leitung von Prof. Dr. med. H. T. Öney im Klinikum Links der Weser, Bremen, tätig.

Von November 2005 bis April 2009 absolvierte ich meine Facharztausbildung in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe unter der Leitung von Prof. Dr. med. H. T. Öney im Klinikum Links der Weser, Bremen. Seit April 2010 bin ich in eigener gynäkologischer Praxis in Achim niedergelassen.

Unsere Tochter Hanna Carlotta Kunst wurde am 08.04.2011 geboren.