

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universitätsklinik Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. Matthias Frosch

eingereicht über das
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Oskar-Rüger Kaaden

Arbeit angefertigt unter der wissenschaftlichen Betreuung von
Frau Dr. Alexandra Unkmeir
vorgelegt über Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Anton Mayr

**Untersuchungen über die Interaktion von Meningokokken mit Zellen der
Blut-Hirn-Schranke**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

von
Ruth Jägerhuber
aus Memmingen

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.- Prof. Dr. R. Stolla

Referent: Univ.- Prof. Dr. A. Mayr

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. S. Reese

Tag der Promotion: 18.07.2003

1 Einleitung und Problemstellung	3
2 Schrifttum	4
2.1 Meningokokken	4
2.1.1 Klassifizierung der Neisseriaceae	4
2.1.2 Eigenschaften	4
2.1.3 Vorkommen und Bedeutung	8
2.2 Die Blut - Hirn - Schranke	11
2.3 Infektionswege	12
2.4 Zytokine	13
2.5 Bedeutung der Zytokine bei bakterieller Meningitis	14
2.6 Immunreaktionen des Gehirns (spezifische/paraspezifische)	16
3 Eigene Untersuchungen	18
3.1 Material	18
3.1.1 Geräte	18
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	18
3.1.3 Chemikalien und Reaktionskits	19
3.1.4 Nährmedien	21
3.1.5 Enzyme	22
3.1.6 Zusätze	22
3.1.7 Antikörper	23
3.1.8 Zellen	23
3.1.9 Bakterienstämme	24
3.2 Methoden	26
3.2.1. Zellkultur der HBMEC	26
3.2.1.1 Auftauen von Zellen	26
3.2.1.2 Splitten der Zellen	26
3.2.1.3 Aussäen von Zellen für den Infektionsversuch	27
3.2.2 Bakterienanzucht	27
3.2.3 Infektionsversuch in Zellkulturen	28
3.2.4 Gewinnung von Zellen und Überständen	29
3.2.5 Zytokin ELISA	30
3.2.6 Isolierung der mRNA	34

3.2.7 Umschrieb der mRNA in cDNA	35
3.2.8 Polymerase -Chain – Reaction (PCR)	36
3.2.9 Gelelektrophorese der PCR Amplifikate	39
3.2.10 Westernblot	40
4 Ergebnisse	43
4.1 Infektionsversuche in Zellkulturen	43
4.1.1 Adhärenz und Invasion von Meningokokken an/in HBMEC	43
4.1.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen	46
4.2 Einfluß einer Meningokokken – Infektion auf die Transkription einzelner Endothelzellgene	47
4.3 Freisetzung von Zytokinen durch HBMEC	50
4.4 Adhärenz und Invasion nach Prästimulierung mit IL-6, IL-8 und TNF- α	54
4.5 Zytokinfreisetzung der HBMEC unter Cytochalasin D - Einfluß	55
4.6 Untersuchungen des $\alpha_5\beta_1$ Integrin Rezeptors	58
4.6.1 Nachweis von $\alpha_5\beta_1$ (FN) Rezeptoren auf HBMEC	58
4.6.2 Zytokinfreisetzung der HBMEC nach Blockierung des $\alpha_5\beta_1$ (FN) Rezeptors	59
4.7 Untersuchungen mit Außenmembranproteinen	61
4.7.1 Zytokinfreisetzung durch HBMEC nach Zugabe von Außenmembranprotein (OMP)	61
4.7.2 Infektionsversuch mit LPS Mutante	63
4.7.3 Zytokinfreisetzung im Transwell – Versuch	64
5 Diskussion	66
6 Zusammenfassung	74
Summary	76
7 Literatur	78
8 Anhang	86
8.1 Abkürzungsverzeichnis	86
8.2 Tabellenverzeichnis	88
8.3 Abbildungsverzeichnis	89

1 Einleitung und Problemstellung

Meningokokken werden den Neisseriaceae zugeordnet. Es sind gramnegative Diplokokken, die den menschlichen Nasen-Rachen-Raum besiedeln und unter bestimmten noch nicht völlig geklärten Umständen nach hämatogener Streuung eine Sepsis oder Meningitis hervorrufen können.

Ein zentraler Schritt in der Pathogenese der durch *Neisseria meningitidis* verursachten bakteriellen Meningitis besteht in der Interaktion der Bakterien mit Zellen der Blut-Hirn-Schranke. Nach Überwindung der Schranke kommt es im Zentralen Nervensystem (ZNS) durch die Mobilisation von Abwehrmechanismen zur Auslösung einer Entzündungskaskade mit weitreichenden Folgen.

Die Schwere der Erkrankung scheint direkt mit der Produktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren zu korrelieren [73,74,22,54]. Interessanterweise werden die Zytokine lokal produziert, mit einer hohen Liquorkonzentration bei Meningitis und hoher Serumkonzentration im Fall einer Septikämie [73,74,9]. Die Meningitis betreffend wurden als mögliche Quellen dieser Zytokine bereits Zellen des Hirnparenchyms, meningeale Entzündungszellen und Dendritische Zellen ausgemacht [40,44]. Es wird vermutet, dass Endothelzellen, Mikrogliazellen und Astrozyten ebenfalls nicht unerheblich an der Zytokinproduktion beteiligt sind.

Da Gehirnendothelzellen die ersten Zellen sind, mit denen die Meningokokken auf ihrem Weg ins ZNS in Kontakt treten, ist es naheliegend, dass diese Zellen auch als erste mit der Anlockung von Abwehrzellen beginnen.

Zweck der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe eines etablierten Zellkulturmodells sowie molekularbiologischen Verfahren eine mögliche Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Zytokine durch Gehirnendothelzellen nach Infektion mit Meningokokken zu untersuchen.

2 Schrifttum

2.1 Meningokokken

2.1.1. Klassifizierung der Neisseriaceae

Die Familie der Neisseriaceae besteht aus den 5 Gattungen *Neisseria*, *Branhamella*, *Moraxella*, *Kingella* und *Acinetobacter*. Mitglieder der Gattung *Neisseria* besiedeln die Schleimhäute warmblütiger Tiere. Zwei dieser Spezies sind humanpathogene Bakterien: *Neisseria meningitidis* (Meningococcus) und *Neisseria gonorrhoeae* (Gonococcus). Die übrigen Spezies *N. flavescens*, *N. mucosa*, *N. subflava*, *N. sicca* und *N. lactamica* sind i.d.R. nicht pathogen und als regionale Opportunisten oder Problemkeime Bestandteil der Schleimhautflora der oberen Atemwege [10].

2.1.2 Eigenschaften

Bei *Neisseria meningitidis* handelt es sich um aerobe gramnegative Diplokokken mit einem Durchmesser von 0,6-1µm. Sie bilden etwa 1mm große grau-opake, runde, glatte Kolonien von weicher bis schleimiger Konsistenz. Im mikroskopischen Präparat sind sie meist kugelig, können in Haufen zusammenliegen, bilden aber keine Ketten. Durch Teilung in zwei zueinander senkrechten Ebenen bilden sich häufiger Tetraden.

Das Wachstumsoptimum der Neisserien liegt bei 36°C und 3-10% CO₂ in feuchter Atmosphäre. Sie sind empfindlich gegen Penicillin.

Neisserien besitzen keine Flagellen, aber Pili, sowie eine undulierende 7,5-8,5nm dicke äußere Membran. Ihre Zellwand enthält Peptidoglykan.

Die Zellwand bildet in der schnellen Wachstumsphase durch Knospung der Außenmembran Blebs, welche LPS und Aussenmembranbestandteile enthalten.

Neisserien besitzen Oxidase und Katalase, mit Ausnahme von *N. elongata* und lassen sich anhand folgender Faktoren voneinander unterscheiden: Nachweis der Säurebildung aus einigen Zuckern, Hämolysevermögen, Reduktion von Nitrit und Nitrat, Polysaccharidbildung aus Saccharose und Pigmentbildung.

Tabelle 1: Biochemische Unterscheidung der Neisseria-Arten des Menschen [13]

<i>Neisseria</i>	Oxi- dase	Kata- lase	Glu	Mal	Fru	Sac	Lac	Poly- sac- charid	NO ₂	NO ₃	Pig- ment	Hämolyse
			Säurebildung						Reduktion			
<i>gonorrhoea</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>meningitidis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	d	-	-	-
<i>lactamica</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	G	-	+	-
<i>polysaccharea</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	G	-	+	-
<i>mucosa</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	G	G	d	-
<i>sicca</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	G	-	d	-
<i>perflava</i>	+	d	+	+	+	+	-	+	G	-	+	+
<i>flava</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	G	-	+	-
<i>subflava</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	G	-	+	-
<i>flavescens</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	G	-	+	-
<i>cinerea</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	G	-	+	-
<i>elongata</i>	+	d	d	-	-	-	-	-	G	-	+	-

N. meningitidis besitzt 13 Serogruppen [60], deren Einteilung auf der Basis der Kapselpolysaccharide beruht [31,5,6]. Das Kapselpolysaccharid ist entweder ein Homo- oder Heteropolymer aus sich wiederholenden Einheiten von Mono-, Di- oder Trisacchariden. Die meisten Kapselpolysaccharide (außer Kapselpolysaccharid A) sind aus Sialinsäurederivaten zusammengesetzt.

Kapsellose, nicht gruppierbare Stämme sind bei Keimträgern häufig, kommen aber als pathogene Erreger praktisch nicht vor.[13]

Tabelle 2: Zusammensetzung der Kapselpolysaccharide von *N. meningitidis* [10]

Serogruppe	Zusammensetzung
A	teilweise O-acetyliertes Homopolymer aus 2-Acetamid-2-Deoxy-D-Mannose-6-Phosphat
B	N-Acetyl Neuraminsäure (2→8- α -linked)
C	O-Acetylierte N-Acetylneuraminsäure (2→9- α -linked)
X	2-Acetoamid-2-Deoxy-D-Glucose-4-Phosphat
Y	teilweise O-acetylierte wechselnde Sequenz aus D-glucose und N-Acetylneuraminsäure
Z	nicht bestimmt
Z'(29E)	equimolarer Gehalt an 3-Deoxy-D-Manno-Octulosonsäure und 2-Acetamid-2-Deoxy-Galactosamin
W-135	wechselnde Sequenz aus D-Galactose und N-Acetylneuraminsäure

Mit Ausnahme der Serogruppe B, welche beim Mensch wenig immunogen ist [25], sind die Polysaccharidkapseln der Meningokokken gute Immunogene und dienen der Impfstoffherstellung. Meningokokken sind in der Lage, ihr für die Kapselexpression verantwortliches genetisches Material auszutauschen und so möglicherweise von Serogruppe B zu C oder umgekehrt zu wechseln (capsule switching)[60].

Tabelle 3: Funktion und Klassifizierung der Außenmembrananteile von *Neisseria meningitidis* [60]

Komponente	Funktion	Klassifizierung
Kapsel	schützt vor wirtvermittelter komplement-abhängiger Bakteriolyse und Phago-zytose	13 Serogruppen (A, B, C, E-29, H, I, K, L, M, W-135, X, Y, Z)
Außenmembranproteine		
Porine	bilden Poren, durch die kleine hydrophile Substanzen passagieren, Kationen-oder Anionen-selektiv	
PorA		Klasse 1 Außenmembranprotein (Serosubtyp)
PorB		Klasse 2 oder 3 Außenmembranprotein (Serotyp)
Opacity-associated Proteins		
Opa	fördert Adhärenz an Wirtszellen und Leukozyten	
Opc	fördert Adhärenz an Wirtszellen	Klasse 5 Außenmembranprotein
Reduction modifiable Protein	unbekannt	Klasse 4 Außenmembranprotein
Lipooligosaccharide	besitzen starke endotoxische Aktivität	13 Immunotypen
Pili	fördern initiale Adhärenz an Epithel- und Endothelzellen sowie an Erythrozyten	Klasse I und II

Meningokokken der Serogruppen B und C wurden nach der Anwesenheit von Außenmembranproteinen in Serotypen unterteilt (16 Protein-, 10 LPS-Typen)[13], wobei der Serotyp 2 für die meisten Krankheitsfälle verantwortlich ist. Die Typ 2 Antigene von Serogruppe B und C sind chemisch und serologisch identisch und Antikörper gegen diese Antigene wirken in der Anwesenheit von Komplement bakterizid.

Die Lipooligosaccharide der Meningokokken sind 5-10 mal toxischer als die von *E. coli* oder *Salmonella typhimurium*. Menschen entwickeln Antikörper gegen Meningokokken-LPS im Verlauf systemischer Erkrankungen. Die Rolle dieser Antikörper für die Immunität gegen Meningokokken muss jedoch noch geklärt werden [10].

2.1.3 Vorkommen und Bedeutung

Der menschliche Nasopharynx gilt als natürliches Reservoir von *N. meningitidis*. Die Übertragung erfolgt durch Tröpfcheninfektion. Je nach Altersstufe und epidemiologischer Situation ist hierzulande mit 5-30% Keimträgern zu rechnen. In geschlossenen Gemeinschaften wurden auch schon Quoten von 80-90% ermittelt, ohne dass Erkrankungsfälle aufgetreten wären [13].

Neben *N. meningitidis* besiedeln auch die apathogenen *N. lactamica* die Schleimhaut des menschlichen Nasopharynx, wobei im Hinblick auf die Altersverteilung ein umgekehrtes Verhältnis zwischen *N. meningitidis* und *N. lactamica* besteht. Träger von Meningokokken sind im allgemeinen über 21 Jahre alt, wogegen die meisten Krankheitsfälle bei Kindern unter 5 Jahren (Serogruppe B) bzw. im Alter zwischen 4 und 14 Jahren (Serogruppe C) auftreten [10]. *N. lactamica* ist hauptsächlich bei jüngeren Kindern anzutreffen [7,14,29,41,61]. Da zwischen *N. meningitidis* und *N. lactamica* kreuz-reaktive Antigene beobachtet wurden [38,41,70,77], besteht die Vermutung, dass die Besiedelung des Nasopharynx mit *N. lactamica* den Wirt vor der Besiedelung mit pathogenen *N. meningitidis* Stämmen über Keimkonkurrenz ev. auch über immunologische Aktivitäten schützt [16,29]. Bei Untersuchungen in 7 Grundschulen und Kindergärten in München, Augsburg und Ingolstadt wurden 26 *N. lactamica* Stämme mit 17 verschiedenen Genotypen ermittelt [1].

Welche Faktoren dafür verantwortlich sind, dass diese Bakterien in die Blutbahn übertreten und zu einer Meningokokkenerkrankung führen, ist noch ungeklärt. Die Gründe dafür sind jedoch eher auf der Seite des Wirts, als auf der bakteriellen Seite zu suchen [30]. Personen mit Immundefekten, oder noch nicht voll entwickeltem Immunsystem (Kinder) sind besonders empfänglich [60].

Meningokokkenerkrankungen treten in folgenden Formen auf:

- Bakteriämie ohne Schock
- Bakteriämie mit Schock
- Meningitis
- Meningitis mit septischem Schock

Meningokokkenerkrankungen können sowohl sporadisch, als auch epidemisch vorkommen; in Europa bevorzugt im Spätwinter und Frühling mit einer Erkrankungsrate von 5 - 50 / 100 000 Einwohner [10]. Im afrikanischen „Meningitis-Gürtel“ zwischen Äthiopien und dem Senegal kommt es alle 8-10 Jahre zu bedrohlichen Ausbrüchen, meist gegen Ende der Trockenzeit, mit 500 – 1000 Fällen / 100 000 Einwohner [60].

Die Serogruppen A, B und C sind weltweit für die meisten Erkrankungen verantwortlich, wobei in Europa und Amerika B und C, in Afrika und Asien A und C vorherrschen.

Tabelle 4. Geographische Verteilung der Serogruppen von *N. meningitidis*

Serogruppe	Asien	Europa	Israel	Menigitis- Gürtel	Schweden	USA	Zentral-und Südamerika
A	X			X			
B		68%				X	X
C	X	X		X		X	
Y			X		X	zunehmend	

Für diese Arbeit wurde ein Serogruppe B Stamm aus dem ST-32-Komplex (vormals ET-5), eine hypervirulente, klonale Linie, verwendet. Stämme dieses Komplexes verursachten in den späten 70ern Ausbrüche in Nordwesteuropa und Zentral- und Südamerika [24] und Anfang der 90er in Oregon und Washington [19].

2.2 Die Blut - Hirn - Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke wurde erstmals 1885 von Paul Ehrlich mittels peripherer intravenöser Farbstoffinjektion (Trypan Blau) beobachtet. Bei allen Organen, mit Ausnahme des Gehirns trat eine Färbung ein. Damit stellt sie eine strukturelle Barriere zwischen dem vaskulären System des Körpers und dem Gehirn dar. Der Begriff der Blut-Hirn-Schranke wird sowohl als Oberbegriff für alle Epithelbarrieren zwischen Blut und Nervengewebe (Blut-ZNS-Schranke, Blut-Liquor-Schranke, Blut-Retina-Schranke, Blut-Nerven-Schranke), als auch zur Bezeichnung der Grenze zwischen Kapillargefäßen und zerebraler extrazellulärer Flüssigkeit verwendet.

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zwischen Kapillarendothel und zentralnervösem Extrazellulärraum wird aus den Endothelzellen der Kapillaren, den Perizyten und den Endfüßen der Gliazellen (Astrozyten) gebildet. Dabei sind die wichtigsten Mitspieler im Arrangement der BHS die Endothelzellen, die die Gefäßwände auskleiden und mit dem Blutstrom in unmittelbarem Kontakt stehen. Diese Endothelzellen sind an ihren äußeren Schichten in den sogenannten tight junctions miteinander verschmolzen und weisen einen sehr viel höheren elektrischen Widerstand ($2000\Omega/\text{cm}^2$) auf [12], als die fenestrierten Kapillarendothelien der Körperperipherie ($5-10\Omega/\text{cm}^2$). Diesen lückenlosen Verband können weder Blutzellen, noch lösliche Bestandteile des Blutes über 20 kDa frei passieren. Perizyten (kontraktile Zellen) treten im Gehirn im Gegensatz zu anderen Organen besonders zahlreich auf. Sie umklammern die Endothelzellen mit ihren Fortsätzen und sind gemeinsam mit diesen in eine aus feinsten Fasern bestehenden Basalmembran eingebettet. Astrozyten umfassen mit ihren Endfüßchen die Endothelzellen und Perizyten einschliesslich der Basalmembran.

Die Blut-Liquor-Schranke in den Plexus choroidei (PC) besteht aus einer einschichtigen Epithellage, auf der außen eine gefäßführende Bindegewebsschicht aus einschichtigem kubischen Epithel zu liegen kommt. Prinzipiell ähneln sich Aufbau und Funktion von PC und BHS, wobei die Kapillaren des Choroidplexus etwas durchlässiger sind, als die der BHS [53].

2.3 Infektionswege

Das weitgehende Fehlen einer ständigen Infektabwehr d.h. das Vorhandensein von nur wenigen Abwehrzellen und Antikörpern macht das Gehirn besonders anfällig für bakterielle Angriffe. Nach Überwindung der BHS treffen Bakterien ideale Wachstumsbedingungen an und können sich praktisch ungehindert vermehren. Da nur eine begrenzte Anzahl von Pathogenen in der Lage ist, die BHS zu überwinden, haben sie vermutlich sehr spezifische Eigenschaften entwickelt, um in eine direkte Interaktion mit der luminalen Seite des cerebralen Endothels treten zu können. Für die meisten Erreger der bakteriellen Meningitis ist der genaue Eintrittsort in das zentrale Nervensystem (ZNS) unbekannt und es werden verschiedene Mechanismen für die Infiltration diskutiert:

- Bindung an Membranproteine
- Übertritt in Makrophagen
- Überspülen der BHS bei massiver Bakteriämie [37]

Es ist anzunehmen, daß die Invasion dabei auf transzellulärem Weg erfolgt und die Integrität des Monolayers nicht zerstört wird, denn der transendotheliale elektrische Widerstand (TEER) und die H^3 -Inulin Permeabilität bleiben unverändert [69,53].

Für *N. meningitidis* wurden bereits einige Faktoren für die meningeale Invasion identifiziert. Dabei handelt es sich um die Interaktion von Wirtszellrezeptoren (z.B. $\alpha_5\beta_1$ Integrin-Rezeptor) mit bakteriellen Oberflächenbestandteilen z.B. Außenmembranproteine Opa und Opc; Porine, Lipooligosaccharide, Typ IV Pili [71,57].

Die Adhäsion von *N. meningitidis* erfolgt in zwei Schritten:

1. „initial adhesion“: Bakterien lagern sich Pilus-vermittelt an die Oberfläche der Zielzellen und bilden dort kleine Kolonien
2. „intimate adhesion“: angelagerte Bakterien treten in engen Kontakt zur Oberfläche der Zielzellen

Am Übergang der „initial adhesion“ in die „intimate adhesion“ ist wahrscheinlich das Regulatorprotein CrgA beteiligt, indem es die bakteriellen Oberflächenstrukturen (Pili und Kapsel), die eine enge Adhäsion verhindern, herunterreguliert [18].

2.4 Zytokine

Zytokine sind Proteine (vorrangig Glycoproteine) von relativ niedriger Molekularmasse (ca. 8-25 kDa) und bestehen häufig nur aus einer Kette. Sie kontrollieren als aktivierende, regulierende oder inhibierende Botenstoffe alle wichtigen biologischen Vorgänge, wie Zellwachstum, Zellaktivierung, Gewebsreparation, Entzündung, Fibrose und Morphogenese. Eine wesentliche Funktion der Zytokine ist die Steuerung des Immunsystems in Form einer Beteiligung an der unspezifischen, d.h. paraspezifischen Immunantwort. Einige Zytokine haben auf spezifische Zelltypen außerdem chemotaktische Wirkung. Obwohl man die Zytokine „einer Familie“ zuordnet, so beschreibt dies eher eine funktionelle, als eine strukturelle Gemeinsamkeit, da diese Proteine nicht alle chemisch verwandt sind. Dennoch gibt es Zytokinpaare, die etwa 30% gleiche Sequenzen aufweisen, z.B. IL-1 α und IL-1 β ; TNF- α und TNF- β ; EGF und TGF- β . Es gibt auch stark homologe Subfamilien. IFN- γ mit ca. 20 Mitgliedern ist ein Beispiel für eine große Subfamilie [59].

Die Zytokine werden in 5 Gruppen unterteilt:

- Interferone \Rightarrow Inhibition der Virusreplikation in infizierten Zellen
- Interleukine \Rightarrow Informationsaustausch mit weißen Blutzellen, Bioregulation
- Hämatoplastische Wachstumsfaktoren \Rightarrow Stimulation der Produktion von Zellen des Blutsystems
- Wachstumsfaktoren
- Chemokine \Rightarrow Beteiligung an Leukozytenmigration

2.5 Bedeutung der Zytokine bei bakterieller Meningitis

Bei einer Mortalität von bis zu 10% führt die bakterielle Meningitis in bis zu 30% der Überlebenden zu schweren neurologischen Folgeschäden [32,34].

Wegen der begrenzten Regenerationsfähigkeit des Nervengewebes bleiben die Hirnschäden (neurologischen Ausfallserscheinungen) ein Leben lang bestehen.

Ist eine kritische Konzentration von Bakterien erreicht, reagiert der Körper mit einer massiven Mobilisation von Abwehrmechanismen. Die Ausschüttung von Zyto - und Chemokinen und der Einstrom von Abwehrzellen aus dem Blut lösen eine Entzündungskaskade aus, die auch nach Antibiotika vermittelter Abtötung der verursachenden Pathogene weiterläuft. Diese über das eigentliche Ziel der Bakterienelimination hinauschießende Entzündungsreaktion richtet erheblichen Schaden am Nervengewebe an.

TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 werden in der Anfangsphase der durch Meningokokken verursachten lokalen Entzündungsantwort von Gehirnzellen wie z.B. Astrozyten und Mikroglia produziert. Da bei bakterieller Meningitis der TNF- α - Gehalt im Liquor signifikant höher als im Blut ist [74], muß er lokal produziert werden [49].

TNF- α wirkt als Signal zur Auslösung der Entzündungskaskade, in deren Ablauf Granulozyten vom Blutstrom in den Liquorraum einströmen. Zusätzlich zur proinflammatorischen Wirkung ist TNF- α an weiteren, für die bakterielle Meningitis charakteristischen Krankheitsprozessen beteiligt: dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, Veränderung der Hirndurchblutung und eine Verschiebung zu anaerobem Metabolismus.

Granulozyten, Neuronen, Gliazellen, glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen produzieren nach Stimulation mit TNF- α und bakteriellen Produkten Matrixmetalloproteinasen (MMP). MMP lösen die subendotheliale Basalmembran, welche die BHS um zerebrale Gefäße bildet, auf. Damit sind MMP Schlüsselmoleküle für die Entstehung des Hirnödems und der Granulozytenextravasation während der bakteriellen Meningitis. Bei keiner anderen ZNS - Erkrankung sind die bisher gemessenen MMP-Konzentrationen derart hoch, wie bei der bakteriellen Meningitis.

Entzündungszellen im Liquor produzieren Sauerstoffradikale. Da das Gehirn mit etwa 20% des Herzminutenvolumens durchblutet wird und somit eine hohe Sauerstoffspannung besitzt, ist es oxidativem Schaden besonders ausgesetzt. Gehirnzellen weisen einen hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf, welche leicht oxidierbar sind und das Gehirn verfügt über wenig endogene Antioxidantien. Werden Zellmembranen, -organellen, Enzyme und Erbsubstanz oxidiert, können sie ihre Funktion nicht mehr erfüllen und die Zelle stirbt.

Weiterhin führt die so entstandene Ischämie zur Freisetzung von Glutamat aus zugrundegehenden Neuronen, welches zu weiterem Neuronenschaden beiträgt.

Die Liquorspiegel von TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 korrelieren hauptsächlich mit der Granulozytenzahl, dem Gesamteiweiß und dem L-Laktat. Da die Spiegel dieser Zytokine im Serum viel niedriger liegen, als im Liquor, kann ein Transport aus dem Blut in den Liquor ausgeschlossen werden. Es ist naheliegender, dass ein niedriger Umsatz des Liquor pools der Zytokine und des TNF- α die hohen Spiegel im Liquor hervorruft [45].

2.6 Immunreaktionen des Gehirns (spezifische/paraspezifische)

Da das Gehirn keine ständige Immunabwehr besitzt, ist es bei Infektionen auf die Einwanderung von Abwehrzellen angewiesen.

Eine intakte Blut-Hirn-Schranke kann von Lymphozyten kaum überwunden werden [75]. Im Verlauf entzündlicher Prozesse wird die Impermeabilität der Schranke jedoch geschwächt. Unter dem Einfluß verschiedener Faktoren, u.a. Entzündungszellen und deren Zytokine lösen sich die tight junctions und es bilden sich tunnelähnliche Strukturen, sogenannte Endothelvenolen, durch welche Lymphozyten wandern können und Poren, ähnlich den Fenestrae peripherer Kapillaren.

Spezifische T-Zell-Linien sind in der Lage, mit Hilfe proteolytischer Enzyme (MHC II positive) Endothelzellen zu lysieren und auf diesem Weg ins Gehirn einzudringen.

ZNS-spezifische Zellen wandern früher ins Parenchym ein und verbleiben vorwiegend perivaskulär. Unspezifisch aktivierte T-Zellen wandern erst später ein, dringen dafür aber weiter ins Gehirn vor [62].

In jedem Fall können nur aktivierte Lymphozyten einwandern, nicht native [75]. Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt durch Bakterien, Viren und proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder Interferon- γ [56].

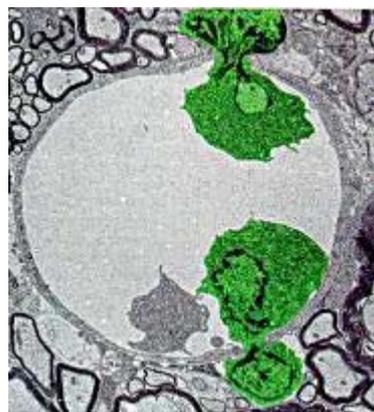


Abb.1: Aktivierte T-Lymphozyten durchbrechen die Wand von Hirngefäßen [75]

An den Gehirndothelien kommt es zu zwei weitreichenden Veränderungen.

Zum Ersten werden spezifische Oberflächenmoleküle exprimiert.

Auf der Oberfläche der Endothelien befinden sich verschiedene Adhäsionsmoleküle, die den Lymphozyten bei der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke behilflich sind [64].

- Selektine: wichtig für das schnelle Anhaften und Ablösen von der Gefäßwand (Lymphozyten - Rolling) [62]
- Endothelimmunglobuline: Bindungsstellen für aktivierte Lymphozyten welche Integrine z.B. Integrin- β 1 exprimieren. VLA-4 (very late antigen-4) bindet an VCAM-1 (vaskuläres Adhäsionsmolekül aus der Immunglobulingruppe), für das sog. Lymphozyten-Homing
- Adressine: Liganden für Lymphozyten-Homing Rezeptoren
- Cadherine: verantwortlich für Gewebsdifferenzierung [62]

Die Expression dieser Adhäsionsmoleküle und die Lymphozyteninfiltration steigen während einer Entzündung an [62], z.B. durch den Einfluß von TNF- α [26].

Zum Zweiten kommt es zur Erhöhung der Endothelpermeabilität.

Über Messung des Transendothelialen elektrischen Widerstands (TEER) ist eine Aussage über die Ionenpermeabilität von Zellmonolayern cerebraler Kapillarendothelien möglich. Auch auf diesen TEER hat TNF- α einen erheblichen Einfluß. Eine TNF- α Konzentration von 10-100 U/ml führt zu einer TEER-Absenkung von 30%, die noch reversibel ist. Steigt die TNF- α Konzentration jedoch auf 1000 U/ml, beträgt die TEER-Absenkung 50% und ist irreversibel [26].

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Neben den für ein mikrobiologisches Labor üblichen Geräten sind für die Untersuchungen noch folgende Geräte bzw. Apparate eingesetzt worden:

- ELISA-Reader Titerec Multiscan MCC/340 (Labsystems)
- Gel-Kamera Herolab UVT-28 MP/ ICU-1 (Herolab, Wiesloch)
- Multistepper (Eppendorf, Hamburg)
- Neubauerkammer (Brand)
- PCR Gerät T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen)
- Photometer (Hitachi, Schäfer & Partner, Schwäbisch Gmünd)
- Rad/Rotator (Renner GmbH, Darmstadt)
- RNA/DNA Calculator Gene Quant pro (Biochrom, Berlin)
- Spannungsgeräte Standard Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)
- Video Graphic Printer UP-890CE (Sony)
- Vortexer Reax 2000 (Heidolph Elektro KG)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Für Zellkultur und Infektionsversuche wurden neben den üblichen Materialien vorwiegend folgende Gefäße verwendet:

- 15ml- u. 50ml Greiner Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)
- 0,5ml, 1,5ml u. 2ml Eppendorf-Gefäße (Eppendorf, Hamburg)
- Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden)
- Transwell- Platten (Costar, Corning, USA)

3.1.3 Chemikalien und Reaktionskits

Für mRNA Isolation, PCR und ELISA kamen folgende Reaktionskits und Chemikalien zum Einsatz:

- Fast Track[®] 2.0 mRNA Isolation Kit (Invitrogen, Paisley, England)
- cDNA Cycle[™] Kit 25 Reactions (Invitrogen, Paisley, England)
- Human ELISA Kit
 - TNF- α
 - Interleukin -1 β
 - Interleukin - 6
 - Interleukin - 8
 - TGF- β
 - MCP-1 (ImmunoKontakt, Bioggio, Schweiz)
- Antibody pairs to Human
 - TNF- α
 - Interleukin-1 β
 - Interleukin-6
 - Interleukin-8
 - (ImmunoKontakt, Bioggio, Schweiz)
- Primer für TNF- α , IL-1 β , IL-1 α IL-6, IL-8, IL-12, TGF- β Rantes, GM-CSF, MCP-1 (Sigma, Taufkirchen)
- MgCl₂ (Roche, Mannheim)
- Taq Polymerase (Roche, Mannheim)
- 10x PCR Puffer (Roche, Mannheim)
- dNTP (Roth, Karlsruhe)
- Agarose NEEO Rotigagarose[®] für Elektrophorese (Roth, Karlsruhe)
- TAE 242g Tris (Roth, Karlsruhe)
 - 57,1ml Essigsäure 100% (Merck, Darmstadt)
 - 100ml 0,5M EDTA pH8 (Applichem GmbH, Darmstadt)
 - ad 1l aqua dest (Ampuwa, Fresenius, Bad Homburg)
- GEBS-Probenmarker 20% Glycerin
 - 50mM EDTA
 - 0,05% Bromphenolblau
 - 0,5% N-Lauroylsarkosine (Sigma Chemical St. Louis, USA)

-
- Smart ladder (Eurogentec)
 - Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt)
 - Sodiumdodecylsulfat (SDS)
 - Lower Tris 90,85g Tris in 400ml aqua dest, mit HCl ad pH 8,8
10ml SDS 20%
ad 500ml aqua dest
 - Upper Tris 30,0g Tris in 400ml aqua dest, mit HCl ad pH 6,8
10ml SDS 20%
ad 500ml aqua dest
 - Polyacrylamid 30% (Roth, Karlsruhe)
 - Temed p.a. 99% -C₆H₁₆N₂ - (Roth, Karlsruhe)
 - Ammoniumpersulfat 10% (APS) (Applichem GmbH, Darmstadt)
 - Gibco Leiter - Prestained Protein Ladder 2x250µl - (Invitrogen, Paisley, England)
 - Biorad-Marker (Biorad, München)
 - Zuschnittpapier 100 Stück 70x100mm (Schleicher&Schuell, Dassel)
 - Nitrozellulose Protran BA 85 Cellulosenitrat 25 Stück 0,45µm,70x100mm (Schleicher&Schuell, Dassel)
 - PonceauS-Rot (Sigma, Taufkirchen)
 - Waschpuffer: PBS Dulbecco instamed 9,55g/l (Biochrom, Berlin)
0,1% Tween-20 (Merck, Darmstadt)
 - Blockpuffer: Waschpuffer mit 1% Magermilchpulver (Applichem GmbH, Darmstadt)
 - Substrat: 18ml 0,1M TrisHCl pH 9,6
2ml NBT -Nitroblau Tetrazoliumchlorid (Applichem GmbH, Darmstadt)
200µl BCIP -5Brom-4Chlor-3Indolphosphat-p-Toluidinsalz (Applichem GmbH, Darmstadt)
40µl MgCl₂ (Merck, Darmstadt)
BSA – Bovines Serum Albumin (Applichem GmbH, Darmstadt)
 - Methanol (Merck, Darmstadt)

- Blotpuffer 10xStock 30g Tris
144g Glycin in 1l aqua dest.
- Laufpuffer 700ml aqua dest.
200ml Methanol
100ml 10xStock

3.1.4 Nährmedien

- GC-Agar : 1,5% Proteose-Pepton
0,1% Stärke
0,45% K-Phosphat
15-Bacto-Agar, pH 7,2
- PPM : 1,5% Proteose-Pepton
0,5% NaCl
0,05% Stärke
0,4% KH_2PO_4
0,1% K_2HPO_4 , pH 7,8
- PPM⁺ Medium : 50ml PPM
250 μ l 2M MgCl_2
250 μ l 8,4% NaHCO
500 μ l Polyvitex (bio Merieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)

- HBMEC–Medium : RPMI 1640 (Biochrom, Berlin)
 - 10% Nu-Serum Culture Supplement (Bacton Dickinson, Bedford, MA)
 - 10% FCS - Fetal bovine Serum (Biochrom, Berlin)
 - 1% MEM-Vitamines (Biochrom, Berlin)
 - 1% L-Glutamin 200mM (Biochrom, Berlin)
 - 1% Na-Pyruvat 100mM (Biochrom, Berlin)
 - 100µl Heparin (5 U/ml⁻¹) 5000 U/ml seromed (Biochrom, Berlin)
 - 100µl ECGS (30µg/ml⁻¹) Endothelial cell growth supplement (Cell systems, Clonetics, St. Katherinen)

3.1.5 Enzyme

- Trypsin EDTA (Gibco, Karlsruhe)

3.1.6 Zusätze

- Antibiotika: Penicillin/Streptomycin 10 000 U/10 000µg/ml
Gentamicin 10mg/ml 1ml in 50ml RPMI = 0,2mg/ml
(Biochrom, Berlin)
- Saponin rein (SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg) 1% in RPMI
- Gelatine – Gelatin research grade (SERVA Feinbiochemica GmbH, Heidelberg)
- Humanes Serum (Eigenherstellung)
- Zytoskeletthinhibitoren - Cytochalasin D - (SERVA, Heidelberg)
- Interleukine : Interleukin-6 recombinantes humanes (rhu) IL-6
Interleukin-8 recombinantes humanes (rhu) IL-8
(Promocell GmbH, Heidelberg)

3.1.7 Antikörper

- Goat-anti-Fibronectin Receptor (Integrin $\alpha_5\beta_1$) polyklonaler Antikörper (Chemicon, Temecula, USA)
- Anti goat AK alkalische Phosphatase AP (Dianova GmbH, Hamburg)

3.1.8 Zellen

Human Brain Microvascular Endothelial Cells (HBMEC):

Humane Gehirnkapillare wurden durch eine Modifizierung der durch Bowman [8] beschriebenen Methode isoliert. Kleine Fragmente von cerebralem Cortex wurden nach chirurgischen Eingriffen bei Kindern mit Anfallsleiden im Childrens Hospital Los Angeles auf Eis gelegt [68]. Sichtbare größere Blutgefäße, sofern vorhanden, wurden vorsichtig entfernt.

Die Cortexfragmente wurden in kleine Stücke geschnitten und in Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 2% fetalem bovinem Serum (DMEM-S) homogenisiert. Das Homogenat wurde in 15% Dextran in DMEM-S 10min bei 10 000g zentrifugiert. Die so gewonnenen Mikrogefäße wurden daraufhin in einer Lösung aus 1mg/ml Collagenase/Dispase in DMEM-S 1h bei 37°C verdaut. Die Mikrogefäßkapillare wurden durch Absorption auf eine Glasperlsäule und Herunterwaschen isoliert.

Diese HBMEC waren positiv für :

- Faktor VIII-Rag
- Carboanhydrase IV
- Ulex Europeus Agglutinin I
- nahmen fluoreszenzmarkierte acetylierte Low Density Lipoproteine (LDL) auf und
- exprimierten Gamma Glutamyl Transpeptidase (GGT).

Sie zeigten eine selektive Expression von Zelladhäsionsmolekülen, die sich von der makrovaskulärer Endothelzellen unterscheidet. Das könnte Auswirkungen auf den Leukozytentransport in das ZNS haben [68].

Die gewonnenen Zellen wurden schließlich mit SV 40 T-large Antigen immortalisiert.

3.1.9 Bakterienstämme

Bei dem *Neisseria meningitidis* Serogruppe B Stamm MC58 handelt es sich um ein klinisches Isolat des ST-32 (vormals ET-5) Komplexes. Dieser Stamm wurde 1983 im United Kingdom isoliert (R. Borrow, persönliche Mitteilung).

Meningokokken werden serologisch in folgender Reihenfolge klassifiziert:

Serogruppe : Serotyp : Serosubtyp

Das von uns verwendete Isolat wurde folgendermaßen charakterisiert:

Serogruppe B : 15 : P1.7,16

Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden Bakterien eingesetzt, die zum einen ihre Kapselexpression nicht durch Phasenvariation abstellen können (MC58*) und zum anderen nicht mehr in der Lage sind, eine Kapsel zu exprimieren (MC58 *siaD*).

MC58*

Das *siaD* Gen eines spontan Streptomycin resistenten Isolats des Meningokokkenstammes MC58 wurde zunächst durch die Insertion einer Doppelresistenzkassette (*rpsL/ermC*) deletiert. Anschließend wurde ein im 5' Ende derart modifiziertes *siaD* Gen eingesetzt, daß eine Kapselphasenvariation durch ein „slipped strand mispairing“ Ereignis nicht mehr stattfinden konnte. Der (dC)⁷ Abschnitt im *siaD* Gen wurde durch die Sequenz CCGCCTC ersetzt, ohne die Aminosäuresequenz der Polysialyltransferase zu verändern. Das führte zu einer konstanten Expression der Polysaccharidkapsel [33,50].

MC58 *siaD*

Die Synthese des Kapselpolysaccharids wird von Enzymen bewirkt, deren Gene innerhalb der Region A des Kapselgenclusters (*cps*) lokalisiert sind. Bei Meningokokken mit Sialinsäure-haltigen Kapseln (Serogruppe B, C, W135 und Y) kodieren die Gene *siaA*, *siaB* und *siaC* für Enzyme der Sialinsäuresynthese. Diese Gene sind bei den genannten Serogruppen hoch konserviert. Die Sialinsäure wird durch das *siaD* Genprodukt, die Polysialyltransferase, zu Polymeren verknüpft, sie kann aber auch für die endogene

Sialysierung des LPS verwendet werden. Die Polysialyltransferase ist Serogruppen-spezifisch. Daraus folgt, daß das Ausschalten der *siaD* Gene zu einem Verlust der Kapselexpression führt, ohne die endogene Sialysierung zu beeinflussen. Aus diesem Grund wurden unbekapselte, isogene Mutanten durch eine Insertion von Antibiotikaresistenzgenen hergestellt [50].

H44/76

Dieser B Meningokokkenstamm gehört ebenfalls zum ST-32 Komplex (B:15:P1.7,16) und wurde 1978 in Norwegen isoliert [35,72]. Er exprimiert Pili, Opa und Opc in gleicher Menge, wie MC58* [40].

H44/76 *lpx*

Die LPS freie Mutante des H44/76 Stammes wurde uns freundlicherweise von Prof. van der Ley vom National Institut of Public Health an the Environment, Bilthoven, Holland zur Verfügung gestellt. Bei dieser Mutante wurden durch Insertion zwei Gene, die in die Lipid A Acyloxyacylation involviert sind, inaktiviert.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur der HBMEC

HBMEC wurden in RPMI 1640 Medium unter Zugabe von fetalem bovines Serum (FCS) (10%), Nu-Serum Culture Supplement (10%), Vitaminen (1%), Na-Pyruvat (1mM), L-Glutamin (2mM), Heparin (5 U/ml⁻¹) und Endothelial cell growth supplement (ECGS) (30µg/ml⁻¹) in mit 2%iger Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen kultiviert.

3.2.1.1 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in 5ml HBMEC-Medium überführt und 10min bei 1350upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in HBMEC-Medium mit PenG/Strep (1%) resuspendiert und auf zwei 25cm² gelatinebeschichtete Zellkulturflaschen verteilt. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ in feuchter Atmosphäre 2 - 3 Tage bebrütet bis der Zellrasen konfluent war.

3.2.1.2 Splitten der Zellen

Konfluente Zellkulturen wurden nach Abnahme des Mediums mit etwa 1ml Trypsin EDTA vom Flaschenboden gelöst und in 5ml HBMEC-Medium abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurden die Zellen in HBMEC-Medium resuspendiert, im Verhältnis 1 : 3 auf neue gelatinebeschichtete Zellkulturflaschen verteilt und wie oben beschrieben, bebrütet.

Für die Versuche wurden Zellen bis zur 22./23. Passage verwendet. Ältere Passagen verändern ihre Oberflächenmarker und exprimieren diese nicht mehr vollständig.

3.2.1.3 Aussäen von Zellen für den Infektionsversuch

Für die Infektionsversuche, die nicht in den Zellkulturflaschen stattfanden, wurden die Zellen auf die gelatinebeschichteten Vertiefungen einer 24 well-Platte ausgesät. Nach Ablösen, Zentrifugieren und Resuspendieren der Zellen in 5ml HBMEC-Medium wurde mit Hilfe der Neubauer-Kammer die Zellzahl der Suspension bestimmt, die Zellen wurden in einer Konzentration von 10^5 Zellen/ml/Vertiefung ausgesät und 2 - 3 Tage unter täglicher mikroskopischer Kontrolle inkubiert.

3.2.2 Bakterienanzucht

Bakterien der Stämme MC58* und MC58 *siaD* wurden aus der Gefrierkultur (-80°C) auf GC-Agar fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die 2. und 3. Fraktion jedes Isolates wurde in je 15 – 20ml supplementiertes PPM (PPM⁺) überführt und 1 - 2 h im Schüttelinkubator bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,8 – 1 bebrütet.

Die Berechnung der Bakterienanzahl erfolgte mittels optischer Dichte (OD) :

einer OD von 1 entsprechen ca. 1×10^9 Bakterien/ml,

Die eingesetzte Bakterienanzahl bei den Versuchen:

Infektionsversuch zur Bestimmung der Adhärenz und Invasion:

1×10^6 Bakterien/Vertiefung (~10 Bakterien/Zelle)

Infektionsversuch zur Zytokinbestimmung:

1×10^7 bzw. 1×10^8 Bakterien/Vertiefung (100 – 1000 Bakterien/Zelle),

1×10^9 Bakterien/75cm² Zellkulturflasche; je nach Experiment

Für die Infektionsversuche mit $> 10^6$ Bakterien/well wurden die Bakterien aus dem PPM⁺ Medium abzentrifugiert und in der benötigten Menge RPMI 1640 + 10% HS resuspendiert.

3.2.3 Infektionsversuch in Zellkulturen

Prinzip :

Die Unterschiede im Adhärenz- und Invasionsverhalten der beiden Meningokokkenstämme MC58* und MC58 *siaD* an bzw in HBMEC wurden in Form einer Zeitkinetik untersucht.

Reagenzien :

GC-Agar Platten

24 well Platten

PPM⁺ Medium

RPMI 1640+HS(10%)

Saponinlösung (0,5g in 50ml RPMI 1640)

Gentamicinlösung (1ml in 50ml RPMI 1640)

PBS

HBMEC

Bakterienstämme MC58* und MC58 *siaD*

Vorgehensweise :

Die unter 3.2.1.3 vorbereiteten konfluenten Zellrasen zweier 24 well - Platten wurden 3 mal mit RPMI 1640 gewaschen, um Reste des HBMEC Mediums vollständig zu entfernen. Die in Flüssigkultur angezüchteten Bakterien wurden in RPMI und 10% HS, in einer Konzentration von 10^6 Bakterien/ml/Vertiefung, auf die Zellen aufgebracht und bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet.

Nach 2h, 4h, 6h und 8h Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und die nicht adhärennten Bakterien mit RPMI von den Zellen gewaschen. Die Vertiefungen für die Adhärenzbestimmung wurden mit je 1ml 1%iger Saponinlösung 15min inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Die Invasionswells wurden für 1,5h mit je 1ml Gentamicinlösung inkubiert, um alle adhärennten Bakterien zu eliminieren, danach gewaschen und ebenfalls mit 1%iger Saponinlösung 15min inkubiert.

Aus der Saponinlösung und den darin enthaltenen lysierten Zellen wurden Verdünnungsreihen in PBS hergestellt, diese auf GC-Agar ausplattiert und über nacht bei 37°C bebrütet.

Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Koloniebildenden Einheiten (KBE) der Bakterien ausgezählt und nach Adhärenz und Invasion ausgewertet.

Variation:

Um eine mögliche Überexpression von Rezeptoren zu erreichen, wurden HBMEC 24 – 48h vor der Infektion mit je 150ng/ml IL-6, IL-8 bzw. 10-100ng/ml TNF- α vorbehandelt. Danach wurde der Infektionsversuch wie beschrieben durchgeführt.

3.2.4 Gewinnung von Zellen und Überständen

Prinzip:

Für vergleichende Untersuchungen der Zytokinfreisetzung und der mRNA Expression wurden HBMEC und ihre Überstände nach verschiedenen Zeiten der Inkubation mit den Stämmen MC58* und MC58 *siaD* benötigt.

Reagenzien:

75cm² Zellkulturflaschen

RPMI 1640+10% HS

Trypsin EDTA

PBS

HBMEC

Bakterienstämme

Vorgehensweise:

Die konfluenten HBMEC wurden mit den Bakterien in einer Konzentration von 10⁹ Bakterien/Flasche, resuspendiert in RPMI 1640 und 10% HS, in den Zellkulturflaschen infiziert und bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Nach 0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h und 8h wurden die Überstände abgenommen, abzentrifugiert, um sie von der Bakterienlast zu befreien und in geeigneten Aliquots von 0,5ml bei –20°C tiefgekühlt.

Die Zellen wurden nach dreimaligem Waschen mit RPMI 1640 mit Hilfe von Trypsin EDTA von den Flaschen gelöst, 2 mal in PBS resuspendiert und abzentrifugiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C gelagert.

Variationen:

- OMP: anstelle der vollständigen Bakterien wurden nur die Außenmembranproteine eingesetzt, um ihren Anteil an der Auslösung der Zytokinfreisetzung zu ermitteln. Die OMP- Fraktion aus MC58 *siaD* wurde im Institut für Hygiene und Mikrobiologie von Frau Heppel hergestellt.
- $\alpha_5\beta_1$ Integrin-Antikörper: 15-20min vor der Infektion wurden die Zellen mit 10 μ g/ml $\alpha_5\beta_1$ Integrin-AK vorbehandelt, um die Hauptbindungsstellen der Bakterien an die Zellen zu blockieren.
- Cytochalasin D: 30min – 1h vor der Infektion wurden die Zellen mit dem Zytoskeletthinhibitor Cytochalasin D in einer Konzentration von 1 μ g/ml vorbehandelt und waren somit nicht mehr in der Lage, Bakterien zu internalisieren.
- Transwell-Versuch: In die Vertiefungen mit den fertigen HBMEC-Monolayern wurden Transwells mit einer Membranporengröße von 0,1 μ m eingesetzt. Die Zugabe der Bakterien erfolgte nur in die Transwells. Da die Bakterien aufgrund ihrer Größe (0,6-1 μ m) die Poren nicht passieren konnten, kam es zu keinem direkten Kontakt mit den Zellen. Nur Außenmembranvesikel (Blebs) konnten die Poren durchwandern und die Zellen erreichen.

3.2.5 Zytokin ELISA

Sofern nicht vom Hersteller fertig beschichtete ELISA Platten verwendet wurden, wurden die Vertiefungen von 96 well-Flachboden-Platten mit den entsprechenden Beschichtungs-Antikörpern in PBS bei 4°C über Nacht inkubiert, am nächsten Tag zweimal mit Waschpuffer (PBS+0,05% Tween-20) gewaschen, 2h mit Blocking Puffer (PBS+5% BSA) inkubiert, noch zweimal gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur vollständig getrocknet.

Der Interleukinstandard wurde im Verdünnungspuffer gelöst und die Verdünnungsreihe entsprechend der Anweisung des Herstellers angesetzt.

selbstbeschichtet:

IL-1 β	TNF- α	IL-6	IL-8
500pg/ml	800pg/ml	100pg/ml	1000pg/ml
250 “	400 “	50 “	500 “
125 “	200 “	25 “	250 “
63 “	100 “	12,5 “	125 “
32 “	50 “	6,3 “	63 “
16 “	25 “	3,2 “	32 “
		1,6 “	16 “

fertigbeschichtet:

IL-1- β	TNF- α	IL-6	IL-8	TGF- β	MCP-1
400pg/ml	1000pg/ml	100pg/ml	1000pg/ml	600pg/ml	1000pg/ml
160 “	250 “	50 “	500 “	300 “	250 “
64 “	62,5 “	25 “	250 “	150 “	62,2 “
25,6 “	15,6 “	12,5 “	125 “	75 “	15,5 “
10,3 “		6,3 “	63 “	38 “	
		3,2 “	32 “	19 “	
		1,6 “	16 “		

Die hergestellte Standardreihe und die Proben der Zellüberstände wurden in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert, mit den zugehörigen Reagentien versehen und nach Erfolgen der Farbreaktion mit dem ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 450nm/490nm/620nm auf ihren Zytokingehalt untersucht.

IL-1 β ELISA	IL-6 ELISA	IL-8 ELISA
Standard/Proben (verdünnt)	Standard/Proben (verdünnt)	Standard/Proben (verdünnt)
⇓	⇓	⇓
Biotinylierter Antikörper	Biotin Konjugat	
⇓ <i>3h inkubieren</i>	⇓ <i>2h inkubieren</i>	⇓
3 x waschen	3 x waschen	
⇓	⇓	⇓
Streptavidin HRP	Streptavidin HRP	HRP Konjugat
⇓ <i>20min inkubieren</i>	⇓ <i>1h inkubieren</i>	⇓ <i>2h inkubieren</i>
3 x waschen	4 x waschen	3 x waschen
⇓	⇓	⇓
TMB	TMB	TMB
⇓ <i>15-20min inkubieren</i>	⇓ <i>15-20min inkubieren</i>	⇓ <i>15-20min inkubieren</i>
1M H ₂ SO ₄ Stopplösung	4N H ₂ SO ₄ Stopplösung	4N H ₂ SO ₄ Stopplösung

TNF- α ELISA	TGF- β ELISA	MCP-1 ELISA
Standard/Proben	Standard/Proben	Standard/Proben
↓ (verdünnt)	↓ <i>3h inkubieren</i>	↓
Biotinylierter Antikörper	3 x waschen	Rabbit Anti Human-AK
↓ <i>3h inkubieren</i>	↓	↓ <i>3h inkubieren</i>
4 x waschen	Monoklonaler TGF- β AK	5 x waschen
↓	↓ <i>2h inkubieren</i>	↓
Streptavidin HRP	3 x waschen	alk. Phosphatase-AK
↓ <i>20min inkubieren</i>	↓	Goat Anti Rabbit
4 x waschen	Biotin Konjugat	↓ <i>45min inkubieren</i>
↓	↓ <i>45min inkubieren</i>	5 x waschen
TMB	3 x waschen	↓
↓ <i>15-20min inkubieren</i>	↓	Farbreagenz
1M H ₂ SO ₄ Stopplösung	Streptavidin HRP	↓ <i>15-20min inkubieren</i>
	↓ <i>45min inkubieren</i>	Stopplösung
	3 x waschen	
	↓	
	TMB	
	↓ <i>15-20min inkubieren</i>	
	0,5M H ₂ SO ₄ Stopplösung	

3.2.6 Isolierung der mRNA

Das Grundprinzip der RNA-Isolation besteht im Lysieren der Zellen, der Inaktivierung von RNAsen und der anschließenden Isolation der Gesamt-RNA (rRNA, tRNA, mRNA) durch Lösung (in Natriumacetat, Phenol und Chloroform) und Fällung (mit Isopropanol). Da der Anteil der mRNA an der Gesamt-RNA nur 2% beträgt, sind schwach exprimierte Transkripte aus diesem Isolat oft nicht nachweisbar. Durch ein spezielles Verfahren, bei dem RNAs mit einem Poly-A⁺-Schwanz selektiert werden, läßt sich der mRNA-Anteil auf 50% steigern. Dabei kommt es zu einer Bindung von Poly-A⁺-RNA an Oligo-dT-Nucleotide von etwa 20 Basen Länge, welche an eine Matrix (Zellulose) gebunden sind. Nach mehreren Waschgängen wird die mRNA eluiert und mit Ethanol gefällt.

Vorgehensweise:

Die bei – 80°C gelagerten Zellen aus den Infektionsversuchen wurden in Lyse-Puffer resuspendiert und 15min bei 45°C im Wasserbad inkubiert, um sie zu lysieren und die RNA freizusetzen. Nach Zugabe von 950µl 5M NaCl Stocklösung wurde das Lysat geschwenkt und 3-4 mal durch eine sterile Spritze mit Nadel gezogen, um etwaige verbliebene DNA aufzulösen. Oligo (dT) Zellulose wurde zugegeben, 30min im Lysat geschwenkt, um die Bindung des polyA Schwanzes der mRNA an die Zellulose zu ermöglichen, abzentrifugiert und nach Entfernen des Überstandes in Bindungs-Puffer resuspendiert. Mit Hilfe von Low Salt Wasch-Puffer wurden durch Resuspension und Zentrifugation SDS und kontaminierende RNA, wie z.B. rRNA entfernt und die Zellulose auf Spin Columns überführt. Nach Abzentrifugieren des restlichen Waschpuffers wurde die mRNA mit Lösungs-Puffer aus der Zellulose gelöst, mit 2M Na-Acetat und 100% Ethanol präzipitiert und auf Trockeneis bis zum Festwerden gekühlt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 4°C und Entfernen des Überstands wurde die mRNA in Lösungs-Puffer resuspendiert und bei – 80°C tiefgekühlt.

3.2.7 Umschrieb der mRNA in cDNA

Da als Ausgangsmaterial für die Polymerase-Chain-Reaction DNA benötigt wird, muß die gewonnene mRNA in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Mit Hilfe von Reverser Transkriptase des Aviären Myoblastose Virus (AMV-RT) kann die Transkription in umgekehrter Richtung stattfinden und aus der mRNA wird Erst-Strang (First-Strand) cDNA.

Versuchsansatz:

Die Konzentration der mRNA wurde mit Hilfe der optischen Dichte (OD) bestimmt. In einem Spektralphotometer (RNA/DNA Calculator) wurde bei einer Wellenlänge von 230, 260 und 280nm, und einer Verdünnung von 1:100 in einer Quarzküvette die Absorption der mRNA Proben gegen Aqua dest. gemessen. Dabei entspricht eine OD von 0,1 einer Konzentration von 100ng/µl. (OD von 1= 1µg/µl)

Von jeder RNA Probe wurden 200ng eingesetzt, mit H₂O auf je 11,5µl aufgefüllt und mit 1µl Oligo Primer 10 min auf 65°C erhitzt, um Sekundärstrukturen zu zerstören. Beim langsamen Abkühlen auf Raumtemperatur kann der Primer hybridisieren.

Nach Zugabe von:

- 1µl RNase Inhibitor
- 4µl 5x RT Puffer
- 1µl 100mM dNTP
- 1µl 80mM Natrium Pyrophosphat
- 0,5µl AMV Reverse Transkriptase

wurden die Proben 1h bei 42°C für die Reverse Transkription inkubiert, danach 2min auf 95°C erhitzt, um RNA-cDNA Hybriden zu denaturieren, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Mit 1µl 0,5M EDTA und 20µl Phenolchloroform wurde die cDNA durch Vortexen und Zentrifugieren extrahiert, in ein neues Tube überführt, mit 88µl Ethanol und 22µl Ammoniumacetat präzipitiert und auf Trockeneis gestellt, bis die Lösung vollständig fest geworden war. Nach 15min Zentrifugieren mit 13000 U bei 4°C wurde der Überstand verworfen, das cDNA Pellet in 20µl H₂O resuspendiert und bei – 20°C gelagert.

3.2.8 Polymerase -Chain – Reaction (PCR)

Durch wiederholte Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung mit verschiedenen Temperatur- und Zeitoptima wurden mit Hilfe von Primern, Oligonukleotiden und Polymerase cDNA Einzelstränge zu Doppelsträngen ergänzt, voneinander getrennt und wieder ergänzt, um ein exponentielles Wachstum des gewünschten cDNA-Abschnitts zu erreichen.

Reagenzien:

10x Puffer

MgCl₂

dNTP

Taq Polymerase

Aqua dest

Primer 1 und Primer 2 für TNF- α -, IL1- β -, IL-6-, IL-8-, IL-1 α -, IL-12-, TGF- β -, MCP-1, Rantes-, GM-CSF- und β -Aktin-Gene

Die Primer wurden nach den Ergebnissen der Zytokin ELISAs ausgewählt und in einer Menge von je 10ng eingesetzt.

Folgende Primersequenzen wurden eingesetzt:

Produktgröße (bp)

β -Aktin

Sense 5'- TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA -3' 661bp

Antisense 5'- CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG -3'

TNF- α

Sense 5'- CCT TGG TCT GGT AGG AGA CG -3' 325bp

Antisense 5'- CAG AGG GAA GAG TTC CCC AG -3'

IL-6		
Sense	5'- ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC -3'	628bp
Antisense	5'- GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G -3'	
IL-8		
Sense	5'- TTT GCC AAG GAG TGC TAA AG -3'	199bp
Antisense	5'- CTC CAC AAC CCT CTG CAC CC -3'	
IL-1 β		
Sense	5'- AAT TTT TGG GAT CTA CAC TCT CCA GCT GTA -3'	331bp
Antisense	5'- CTT CAT CTT TGA AGA AGA ACC TAT CTT CTT -3'	
IL-1 α		
Sense	5'- GTC TCT GAA TCA GAA ATC CTT CTA TC -3'	421bp
Antisense	5'- CAT GTC AAA TTT CAC TGC TTC ATC C -3'	
IL-12		
Sense	5'- AGG TCA AGG CTA TGG TGA GC -3'	189bp
Antisense	5'- TGC CTT CCA GAC ACT TAC GG -3'	
GM-CSF		
Sense	5'- TGG CTG CAG AGC CTG CTG CTC -3'	432bp
Antisense	5'- TCA CTC CTG GAC TGG CTC CC -3'	
MCP-1		
Sense	5'- ATG AAA GTC TCT GCC GCC -3'	303bp
Antisense	5'- TCA AGT CTT CGG AGT TTG G -3'	
RANTES		
Sense	5'- ATG AAG GTC TCC GCG GCA -3'	280bp
Antisense	5'- CTA GCT CAT CTC CAA AGA G -3'	

TGF- β

Sense 5'- GCC CTG GAC ACC AAC TAT TGC -3' 335bp

Antisense 5'- GCT GCA CTT GCA GGA GCG CAC -3'

Versuchsansatz:

Je 2ml von jeder Probe, Positiv- und Negativkontrolle (H₂O) wurden mit einem Mastermix aus:

- 0,25 μ l Primer 1
- 0,25 μ l Primer 2
- 3,0 μ l MgCl₂
- 5,0 μ l 10x Puffer
- 2,5 μ l dNTP
- 36,9 μ l H₂O
- 0,1 μ l Taq Polymerase eingesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 50 μ l.

PCR-Programm:

	Schritte	Temperatur	Zeit	
	1	94°C	5min	
Denaturierung	2	94°C	1min	30 Zyklen
Annealing	3	X	1min	
Elongation	4	72°C	45sec	
	5	72°C	7min	
	6	15°C	Pause	

Die Berechnung der Annealing Temperatur erfolgte nach Anzahl und Zusammensetzung der Basen der Primer mit der Formel:

$4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 5$	IL-8, TNF- α , pos. Kontrolle	53°C
	IL-1 β , IL-6, β Aktin	58°C
	IL-1 α , IL-12, GM-CSF, TGF- β	57°C
	MCP-1, Rantes	51°C

3.2.9 Gelelektrophorese der PCR Amplifikate

Die in der PCR gewonnenen DNA-Abschnitte, welche die entsprechenden Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren kodieren, wurden entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Die entstandenen Banden wurden mit Hilfe von Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, unter UV-Licht sichtbar gemacht und die Größe der Amplifikate mittels eines Größenmarkers bestimmt.

Versuchsansatz:

Für ein 1,5%iges Gel wurden 2,25g Agarose in 150ml TAE-Puffer bis zum vollständigen Lösen der Agarose in der Mikrowelle erhitzt und blasenfrei in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach der Polymerisation des Gels wurden je 8 μ l PCR-Probe mit 2 μ l GEBS-Marker gemischt und neben der smart ladder in die Taschen des Gels aufgetragen. Die Auftrennung der Banden erfolgte unter einer Spannung von 140 Volt und einer Stromstärke von 200mA in einem Zeitraum von 60-90 Minuten. In einem anschließenden 20 minütigen Ethidiumbromidbad (0,035%) wurden die Banden mit Hilfe eines UV-Transluminators sichtbar gemacht und mit einer Sofortbildkamera und in elektronischer Form dokumentiert.

3.2.10 Westernblot

Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine biochemische Untersuchungsmethode zum Nachweis der Reinheit von Proteinen und zum Nachweis von Proteinmustern. In diesem Fall diente sie zum Nachweis von Rezeptoren.

Die Proteine werden denaturiert, indem sie mit dem anionischen Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat), das an die Proteine bindet, inkubiert werden. Dadurch werden die Proteine negativ geladen und wandern in einem elektrischen Feld zur Anode, wobei die Wanderungstrecke nur noch von der Proteingröße und der Porengröße des Polyacrylamids bestimmt wird. Acrylamid eignet sich optimal für die Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld nach ihrer Größe. Das Acrylamid bildet zusammen mit dem Bisacrylamid ein quervernetztes Netzwerk, wobei die Porengröße durch die Konzentration von Acrylamid und Bisacrylamid reguliert werden kann. Für große Proteine verwendet man niedrigprozentige Gele und für kleine Proteine hochprozentige. Um eine optimale Auftrennung der Proteine zu gewinnen, verwendet man zweischichtige Gele. Die untere Schicht wird als Trenngel, die obere als Sammelgel bezeichnet. Das Sammelgel hat eine geringere Konzentration von Acrylamid und einen anderen pH-Wert, was das „Ansammeln“ von Proteinen in scharfen Banden erlaubt, bevor sie in das Trenngel einlaufen

Vorgehensweise:

Zur Analyse der $\alpha_5\beta_1$ (FN) Rezeptoren auf HBMEC wurde ein 12,5% -iges Gel verwendet. Trenn- und Sammelgel wurden nacheinander gemischt und zwischen die Glasplatten der Laufkammer gegossen. Die Laufkammer wurde mit SDS – Laufpuffer gefüllt, die vorbereiteten Proben (5min auf 100°C danach auf Eis), der Marker und die Leiter wurden in die Geltaschen pipettiert und die Gelelektrophorese gestartet. Für die Durchwanderung wurde eine Stromstärke von 10mA für das Sammelgel und 20mA für das Trenngel gewählt. Nach Auslaufen der Farbfront wurden die Gele in einer Schale mit Laufpuffer von den Platten gelöst.

Western Blotting

Im Western-Blot Verfahren werden Antikörper eingesetzt, um aus einem Proteingemisch die Anwesenheit von bestimmten Proteinen nachzuweisen. Dabei wird zusätzlich noch Information über die Größe der Proteine erhalten.

Nach der Auftrennung des Proteingemisches in der SDS-PAGE und dessen Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden als erstes freie Bindungsstellen auf der Membran mit einem neutralen Protein (BSA, Milchproteine) abgeblockt, um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulose zu verhindern. Danach wurde die zu analysierende Proteinbande mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert. Um das zu ermöglichen, wurde dieser Antikörper oder ein zweiter Antikörper, der gegen den ersten gerichtet ist, mit einem Enzym kovalent gekoppelt. Nach Zugabe von Enzymsubstrat wurde dieses sichtbar.

Vorgehensweise:

Das Blot-Sandwich wurde wie dargestellt in einer mit Blotpuffer gefüllten Schale aufgebaut. Alle Bestandteile wurden gut in Blotpuffer eingeweicht.

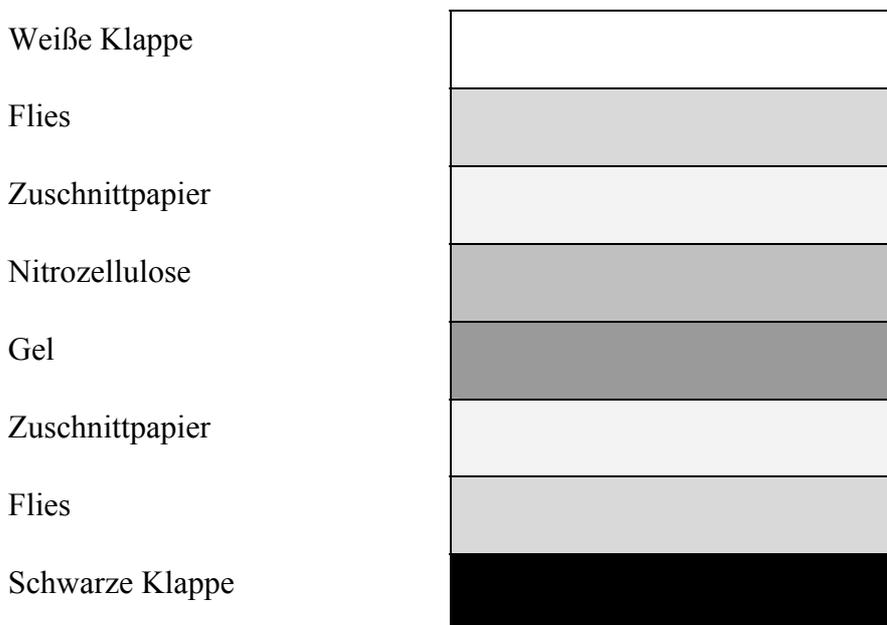


Abb.2: Aufbau des Blot-Sandwiches

Das Sandwich wurde mit einem Kühlelement in die Blotkammer eingesetzt (Kathode zu Kathode, Anode zu Anode), die Blotkammer mit Laufpuffer gefüllt und das Gel 1h bei 300mA geblottet. Proteine, die mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, wurden nun aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran mittels des elektrischen Feldes transferiert; dabei blieb das Proteinmuster des Gels auf der Nitrozellulosemembran erhalten.

Die Nitrozellulose wurde vorsichtig vom Gel getrennt und die Proteine in 30-60min mit Ponceau S reversibel gefärbt. Die Position des Markers wurde eingezeichnet. Nach dem Entfärben mit Wasser wurde die Nitrozellulose 1h in Blockpuffer eingelegt, um unspezifische Bindungen zu blocken.

Der erste Antikörper - goat anti $\alpha_5\beta_1$ (FN) Rezeptor Antikörper - wurde 1:200 in Blockpuffer verdünnt und die Nitrozellulose darin über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Nitrozellulose 3x10min in Waschpuffer gewaschen und mit dem zweiten Antikörper - anti goat Antikörper alkalische Phosphatase - in einer Verdünnung von 1:2500 in Waschpuffer, 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang (3x10min in Waschpuffer) wurde die Nitrozellulose zuerst mit 0,1M TrisCl bedeckt, bis das Substrat hergestellt war und danach so lange im Substrat geschwenkt, bis die Banden gut sichtbar waren. Nach Abspülen mit Wasser wurde die Nitrozellulose unter leichtem Druck getrocknet.

4 Ergebnisse

4.1 Infektionsversuche in Zellkulturen

4.1.1 Adhärenz und Invasion von Meningokokken an/in HBMEC

Zur Bestimmung von Adhärenz und Invasion der ausgewählten Meningokokkenstämme MC58* und MC58 *siaD* bei Gehirndothelzellen (HBMEC) des Menschen wurden Infektionsversuche durchgeführt. HBMEC wurden wie unter 3.2.3 beschrieben, mit Bakterien in RPMI 1640 Medium bzw. in RPMI 1640 mit 10% humanem Serum (HS) inkubiert, da in vorausgegangenen Untersuchungen mit anderen Meningokokkenstämmen ein invasionsfördernder Effekt des HS, der auf dem Serumfaktor Fibronectin beruht, beobachtet worden war. Nach 2, 4, 6 und 8 Stunden wurde das Adhärenz- und Invasionsverhalten untersucht, um Ausgangswerte für die spätere Analyse der mRNA-Expression und Zytokinfreisetzung zu erhalten. Dabei wurden erhebliche Unterschiede zwischen beiden Stämmen bei Adhärenz und Invasion, sowie ihrem Verhalten in den verschiedenen Medien erkennbar.

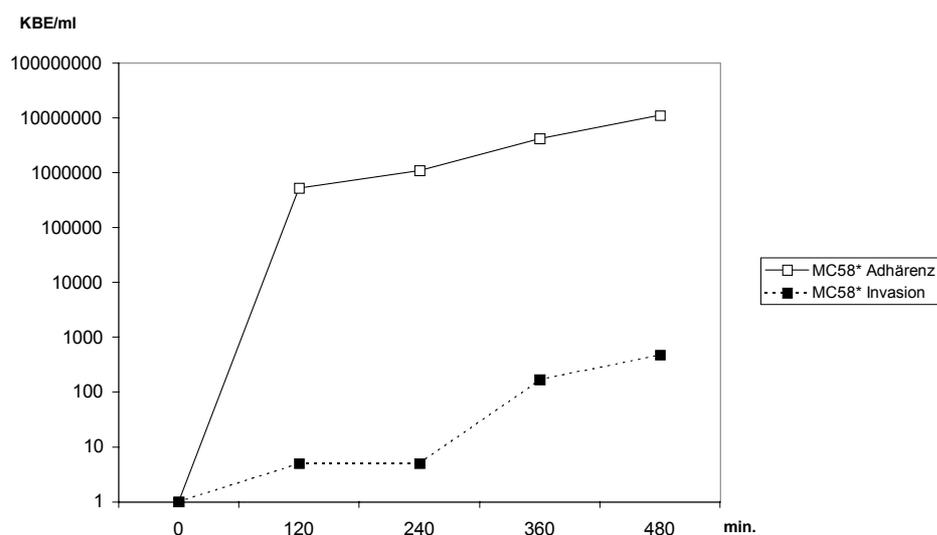


Abb.3: Gemittelte Adhärenz- und Invasionswerte von MC58* an HBMEC in RPMI 1640 Medium aus 3 unabhängigen Versuchen

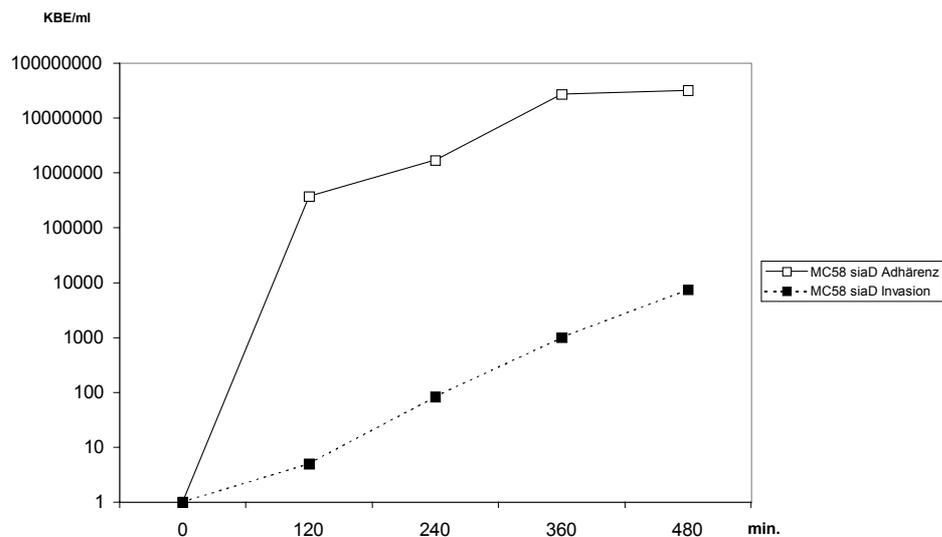


Abb.4: Gemittelte Adhärenz- und Invasionswerte von MC58 *siaD* an HBMEC in RPMI 1640 Medium aus 3 unabhängigen Versuche

In reinem RPMI 1640 Medium erreichten die Adhärenzwerte beider Stämme bereits nach einer Inkubationszeit von 2h ihr Maximum, wogegen die Höchstwerte der Invasion in die Zellen erst nach 6 – 8h gemessen wurden. Dabei erfolgt die Invasion des MC58 *siaD* in einem gleichmäßigen Anstieg; bei MC58* ist der deutlichste Invasionsanstieg zwischen 6h und 8h zu beobachten. Während sich die Adhärenzwerte beider Stämme in etwa gleichen Größenordnungen bewegen, erweist sich der unkapselte Stamm (MC58 *siaD*) als wesentlich invasiver. Seine Invasionswerte übersteigen die des bekapselten Stammes um durchschnittlich das zehnfache.

Auch in RPMI mit 10% humanem Serum näherte sich die Adhärenz beider Stämme nach zweistündiger Inkubation ihrer Sättigung. Während sich die Adhärenzwerte der Bakterien im gleichen Bereich wie die der Infektionsversuche in reinem RPMI 1640 Medium befanden (10^7 KBE/ml), bestand bei den Invasionswerten hier ein deutlicher Unterschied. Der Zusatz von 10% HS steigerte die Invasion der Bakterien in die Zellen um den Faktor 100. In vorangegangenen Arbeiten war der Serumfaktor Fibronectin als invasionsfördernder Bestandteil im HS ermittelt worden. Über die Bindung an den $\alpha_5\beta_1$ Integrin Rezeptor auf den HBMEC fördert er die Internalisierung der Bakterien in die Zellen. Auch in diesem Medium zeigte sich der unkapselte Stamm wieder 10fach invasiver als der bekapselte.

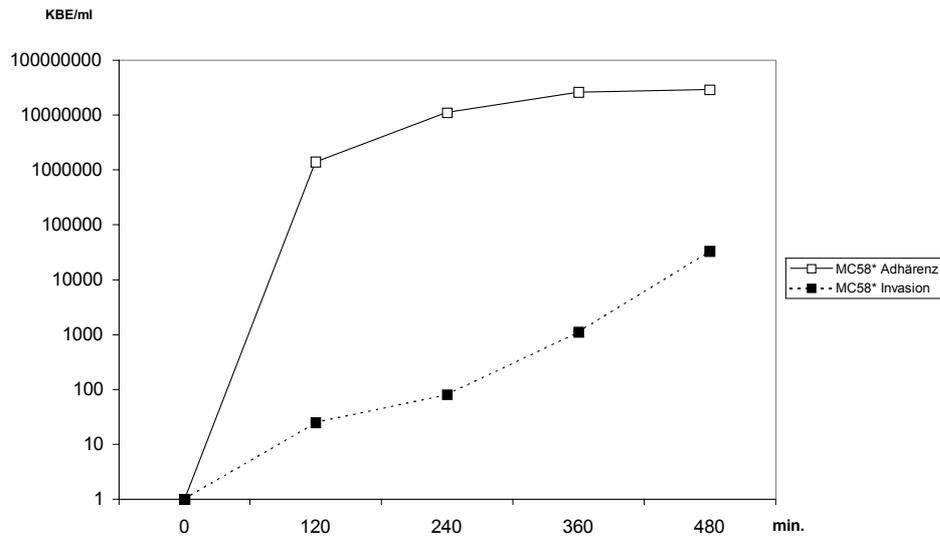


Abb.5: Gemittelte Adhärenz- und Invasionswerte von MC58* an HBMEC in RPMI 1640 Medium mit 10% humanem Serum aus 3 unabhängigen Versuchen

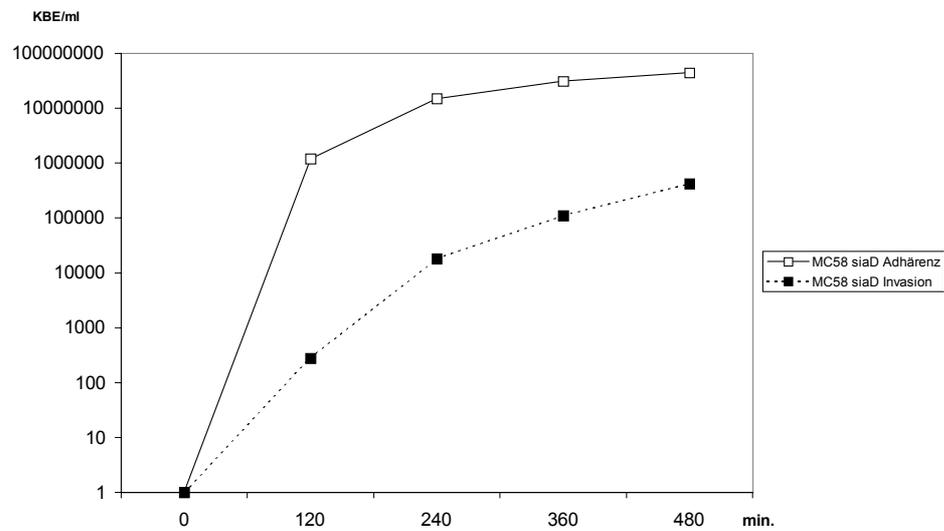
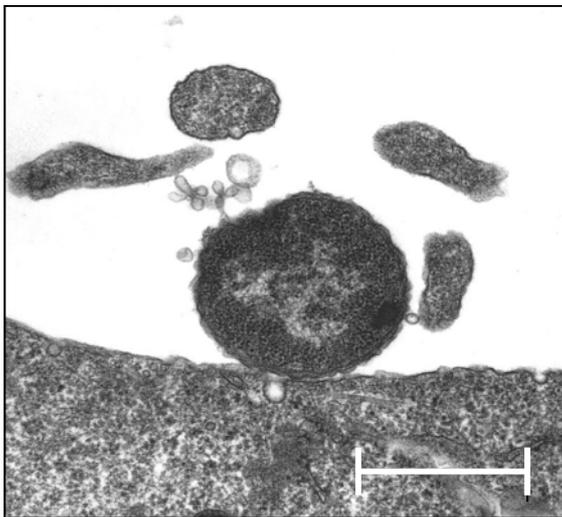


Abb.6: Gemittelte Adhärenz- und Invasionswerte von MC58 *siaD* an HBMEC in RPMI 1640 Medium mit 10% humanem Serum aus 3 unabhängigen Versuchen

4.1.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Parallel zu den Infektionskinetiken wurden zur Bestätigung von Adhärenz und Invasion in Zusammenarbeit mit Frau Heppel und Professor G. Krohne (zentrale Abteilung für Elektronenmikroskopie, Biozentrum, Würzburg) elektronenmikroskopische Bilder von Meningokokken des MC58* Stamms bei der Adhärenz an und Invasion in HBMEC angefertigt.



Die Länge des Balkens entspricht 1 μm

Abb.7: Adhärenter *N. meningitidis* Serogruppe B Stamm MC58* an HBMEC

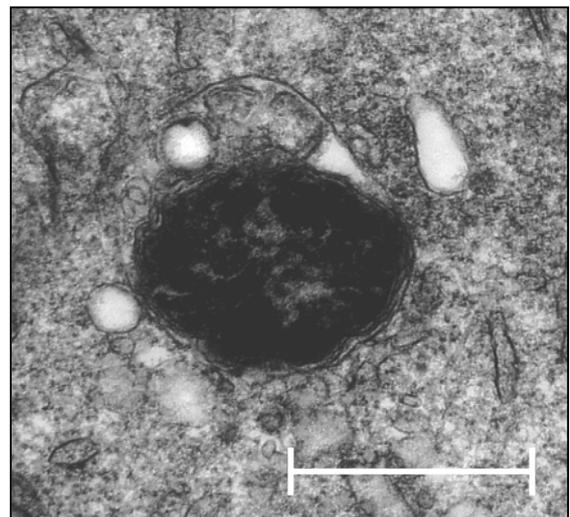


Abb.8: Invasiver *N. meningitidis* Serogruppe B Stamm MC58* an HBMEC

Die Abb. 7 zeigt einen Meningokokkus aus dem MC58* Stamm bei der Adhärenz an eine humane Gehirnendothelzelle. Deutlich sichtbar sind Lamellipoden, Zellausstülpungen, die das Bakterium umschließen, sowie Vesikel, die sogenannten Blebs, die das Bakterium aus der Außenmembran abschnürt.

In der Abb. 8 ist ein Meningokokkus dargestellt, der sich nach der Internalisierung durch eine humane Gehirnendothelzelle intrazellulär in einer Vakuole befindet.

4.2 Einfluß einer Meningokokken – Infektion auf die Transkription einzelner Endothelzellgene

Um der Frage nachzugehen, ob eine *N. meningitidis* Infektion die Transkription einzelner Gene von Endothelzellen beeinflusst, wurde mittels RT – PCR die Transkription verschiedener Gene, die für Zytokine und Chemokine kodieren, untersucht. In allen Versuchen wurden Gehirnendothelzellen mit dem bekapselten bzw. unbekapselten *N. meningitidis* Stamm infiziert, aus dem Zell – Lysat die mRNA isoliert und die eukaryotische mRNA mit reverser Transkriptase und Oligo-dT Primern in cDNA umgeschrieben. Unter Verwendung spezifischer Primer, die von den Zielgenen abgeleitet wurden, konnten mittels PCR diejenigen Genabschnitte, welche für TNF- α , TGF- β , IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1, GM-CSF, Rantes und β -Aktin codieren, amplifiziert werden. β -Aktin, das zu allen untersuchten Zeitwerten konstant exprimiert wird, diente dabei als Kontrolle.

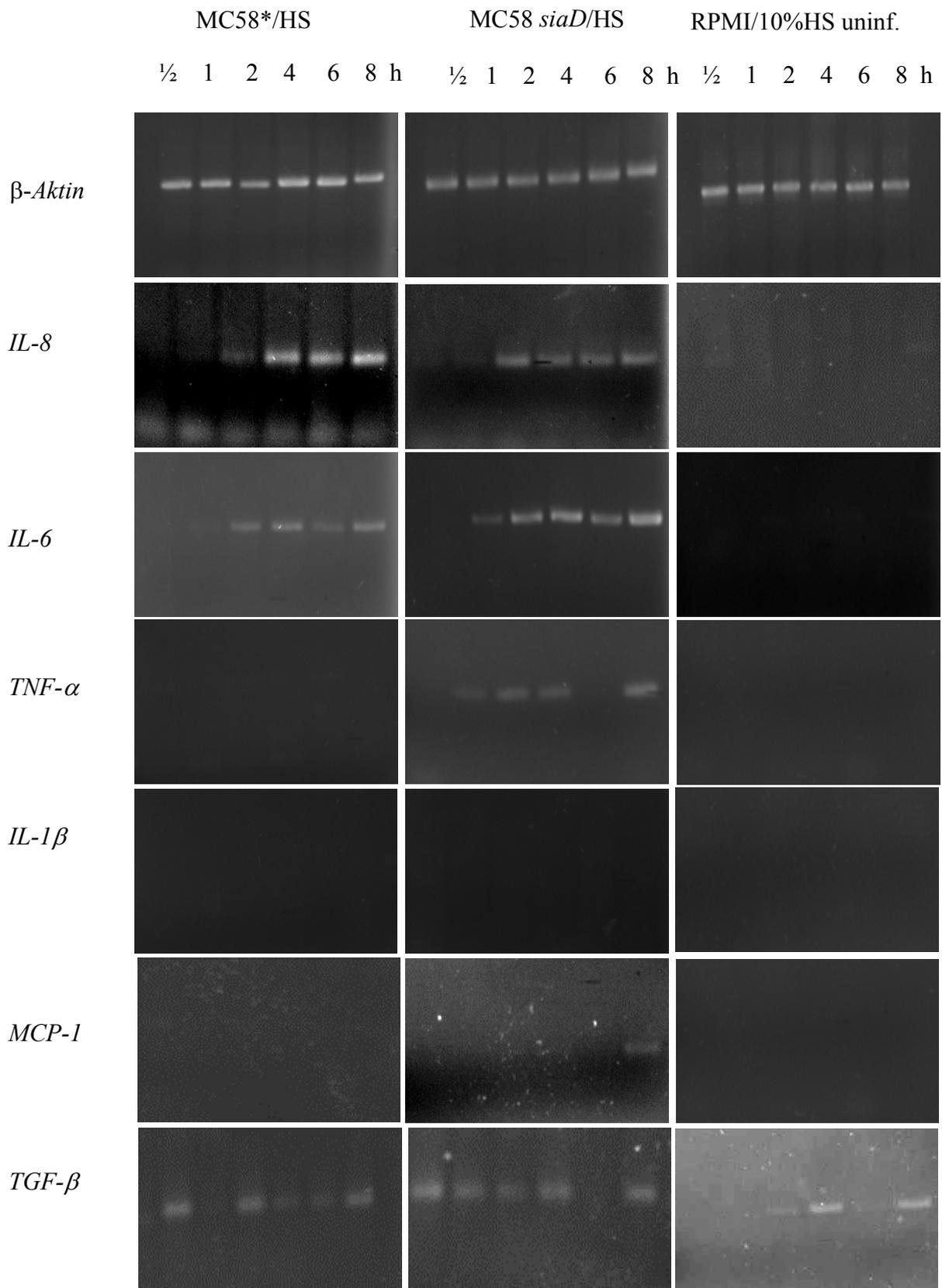


Abb.9: Kinetik einer induzierten Zytokinexpression in mit *N. meningitidis* infizierten HBMEC

Die Induktion der Transkription war für die Gene von IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β und MCP-1 nachweisbar. Beide Stämme MC58* und MC58 *siaD* führten zu einer Expression der für IL-6 und IL-8 kodierenden Gene. Dagegen wurde das für TNF- α kodierende Gen nur von den Zellen exprimiert, welche mit dem unbekapselten Stamm infiziert worden waren. Bei den uninfizierten Zellen wurde außer bei β -Aktin erwartungsgemäß keine Genexpression festgestellt.

Bei IL-6 war nach der Infektion mit dem unbekapselten Stamm MC58 *siaD* die erste Expression nach einer Stunde erkennbar und steigerte sich bis zur stärksten Expression nach 8h. Bei den Zellen, die mit dem bekapselten Stamm infiziert wurden, konnte die Expression erst nach 2 Stunden festgestellt werden und war insgesamt etwas schwächer ausgeprägt, als bei MC58 *siaD*. Die Expression des IL-8 Gens der infizierten Zellen war bei beiden Bakterienstämmen 2h nach der Infektion erfolgt, wobei sie bei den mit MC58 *siaD* infizierten Zellen etwas deutlicher sichtbar war. Im Verlauf der weiter untersuchten Zeitwerte blieb die Expression bei beiden Stämmen relativ konstant.

Das TNF- α Gen wurde 1h nach der Infektion mit MC58 *siaD* bereits schwach exprimiert. Auch hier war eine Steigerung der Expression bis zum 8h Wert feststellbar. Die Infektion mit MC58* führte bei TNF- α zu keiner nachweisbaren Genexpression.

Das TGF- β Gen wurde ähnlich wie β -Aktin konstant exprimiert, jedoch etwas schwächer. Ebenso konnte bei MCP-1 eine schwache Expression festgestellt werden.

4.3 Freisetzung von Zytokinen durch HBMEC

Um herauszufinden, ob die nachgewiesene Induktion der Zytokin mRNA Expression bei mit *N. meningitidis* infizierten HBMEC auch zu einer vermehrten Freisetzung dieser Zytokine führt, wurden die unter 3.2.4 beschriebenen Zellüberstände der Infektionsversuche mit ELISA, wie unter 3.2.5 angegeben, auf ihren Gehalt an TNF- α , TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-8 und MCP-1 untersucht. Dabei wurden zeitabhängig gesteigerte Zytokinfreisetzungen ermittelt, die mit den Ergebnissen der Transkriptionsanalyse korrelieren.

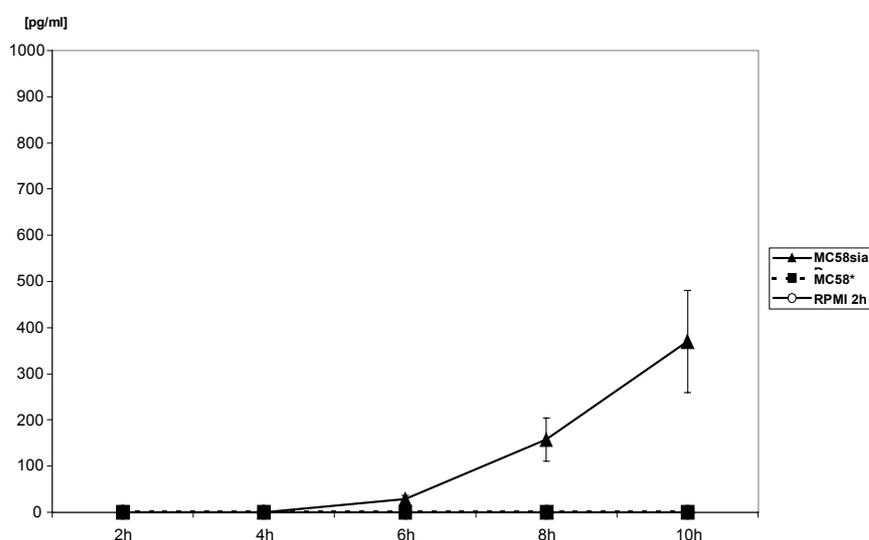


Abb.10: Freisetzung von TNF- α durch HBMEC nach Infektion mit MC58* und MC58 *siaD* bzw. ohne Infektion

TNF- α konnte nur im Überstand der mit MC58 *siaD* infizierten Zellen in einer höheren Konzentration als im Überstand nicht infizierter Zellen nachgewiesen werden. Dabei erreichte die Freisetzung nach sechsstündiger Infektionszeit eine Konzentration von 28 pg/ml und steigert sich über 157 pg/ml nach 8 h bis auf 369 pg/ml zum letzten gemessenen Zeitwert nach 10 Stunden.

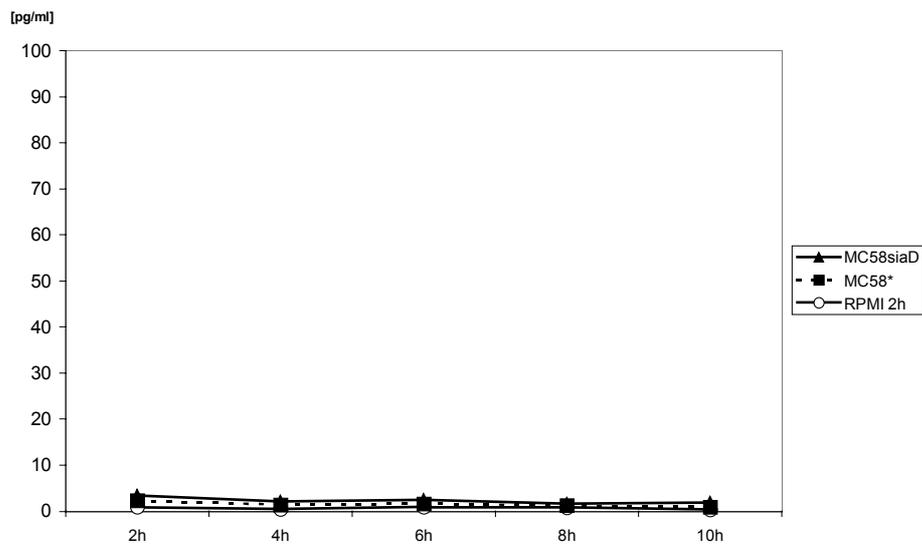


Abb.11: Freisetzung von IL-1 β durch HBMEC nach Infektion mit MC58* und MC58 *siaD* bzw. ohne Infektion

Eine Freisetzung von IL-1 β wurde nach Infektion mit beiden Stämmen zu keinem untersuchten Zeitpunkt in erhöhter Konzentration gemessen. Die Freisetzung von IL-1 β blieb immer im Bereich der auch von nicht infizierten Zellen produzierten Menge.

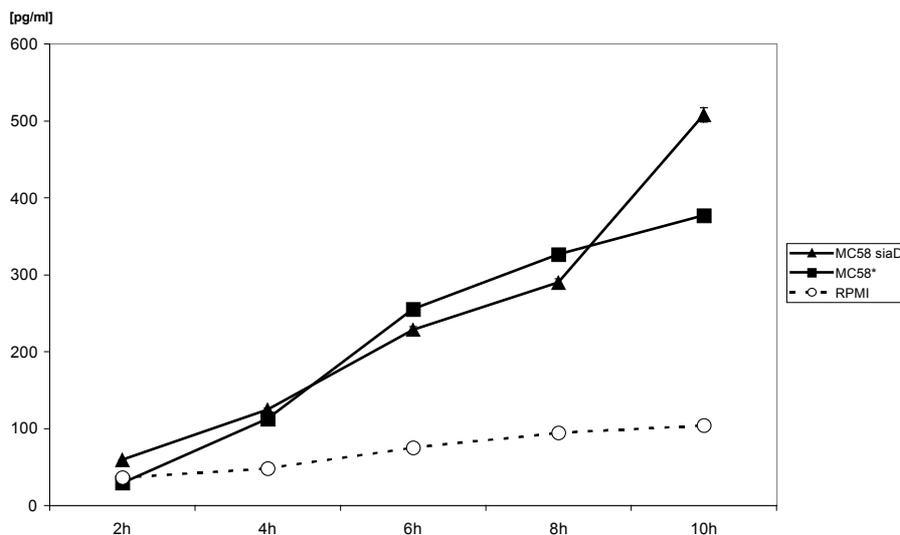


Abb.12: Freisetzung von IL-6 durch HBMEC nach Infektion mit MC58* und MC58 *siaD* bzw. ohne Infektion

IL-6 wurde von Zellen sowohl nach MC58*- als auch nach MC58 *siaD* - Infektion freigesetzt. Dabei erreichten die Überstände der mit dem unbekapselten Stamm infizierten Zellen jedoch höhere Endkonzentrationen als die Überstände aus der MC58*- Infektion.

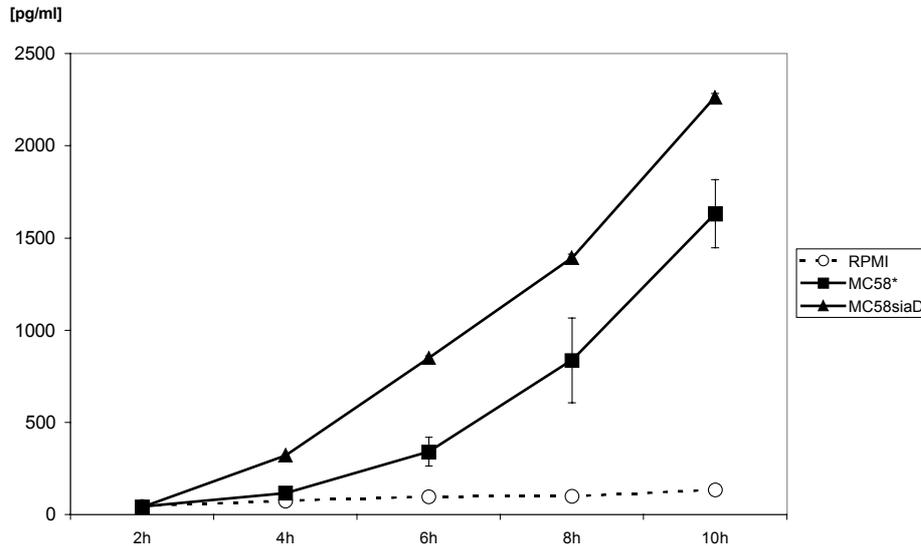


Abb.13: Freisetzung von IL-8 durch HBMEC nach Infektion mit MC58* und MC58 *siaD* bzw. ohne Infektion

Auch IL-8 konnte nach Infektion mit beiden Stämmen in den Zellüberständen nachgewiesen werden, wobei wiederum der unbekapselte Stamm eine höhere IL-8 Freisetzung bewirkte, als der bekapselte. Von allen untersuchte Zytokinen wurde IL-8 in der größten Menge freigesetzt.

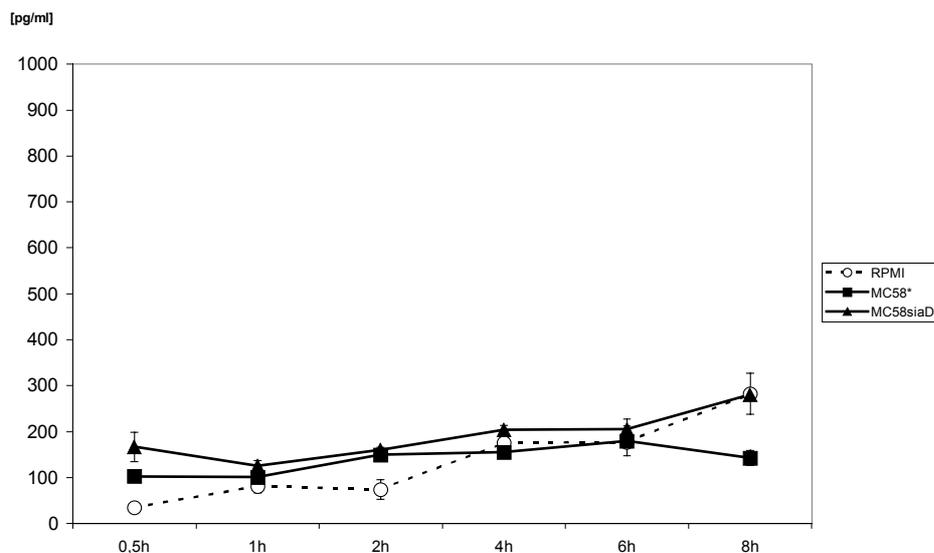


Abb.14: Freisetzung von MCP-1 durch HBMEC nach Infektion mit MC58* und MC58 *siaD* bzw. ohne Infektion

Bei der Freisetzung von MCP-1 konnten weder zwischen den mit den verschiedenen Stämmen infizierten Zellen, noch im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen Unterschiede festgestellt werden. Die Freisetzung von MCP-1 erhöhte sich im Verlauf der Inkubationszeit kaum und die Überstände infizierter Zellen erreichten keine höheren Konzentrationen, als die der uninfizierten Zellen.

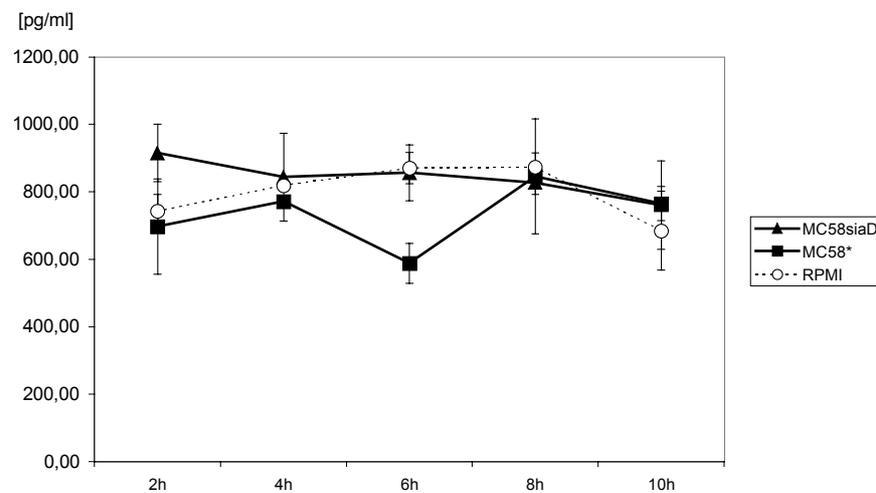


Abb.15: Freisetzung von TGF- β durch HBMEC nach Infektion mit MC58* und MC58 *siaD* bzw. ohne Infektion

Das inhibitorische Zytokin TGF- β wurde zu allen untersuchten Zeitwerten in nahezu gleicher Menge freigesetzt, wobei in den Überständen der uninfizierten Zellen keine höheren Konzentrationen nachweisbar waren, als in denen der infizierten Zellen.

4.4 Adhärenz und Invasion nach Prästimulierung mit IL-6, IL-8 und TNF- α

Gehirndothelzellen, die 24 – 48h lang mit 150ng/ml IL-6 bzw. IL-8 oder 100ng/ml TNF- α vorbehandelt worden waren, wurden mit Bakterien beider Stämme infiziert, um den Einfluß dieser Interleukine auf die Adhärenz und Invasion zu untersuchen. Die Überlegung war, ob möglicherweise ein autokriner Mechanismus zwischen Bakterien und Zellen in der Weise existiert, daß die Zellen durch die hohen Zytokinkonzentrationen zu einer Überexpression von Rezeptoren stimuliert werden. Auf diese Weise würden bei einer Infektion Meningokokken, welche die Zytokinproduktion der HBMEC anregen, weiteren Meningokokken das Überwinden der Blut - Hirn - Schranke erleichtern.

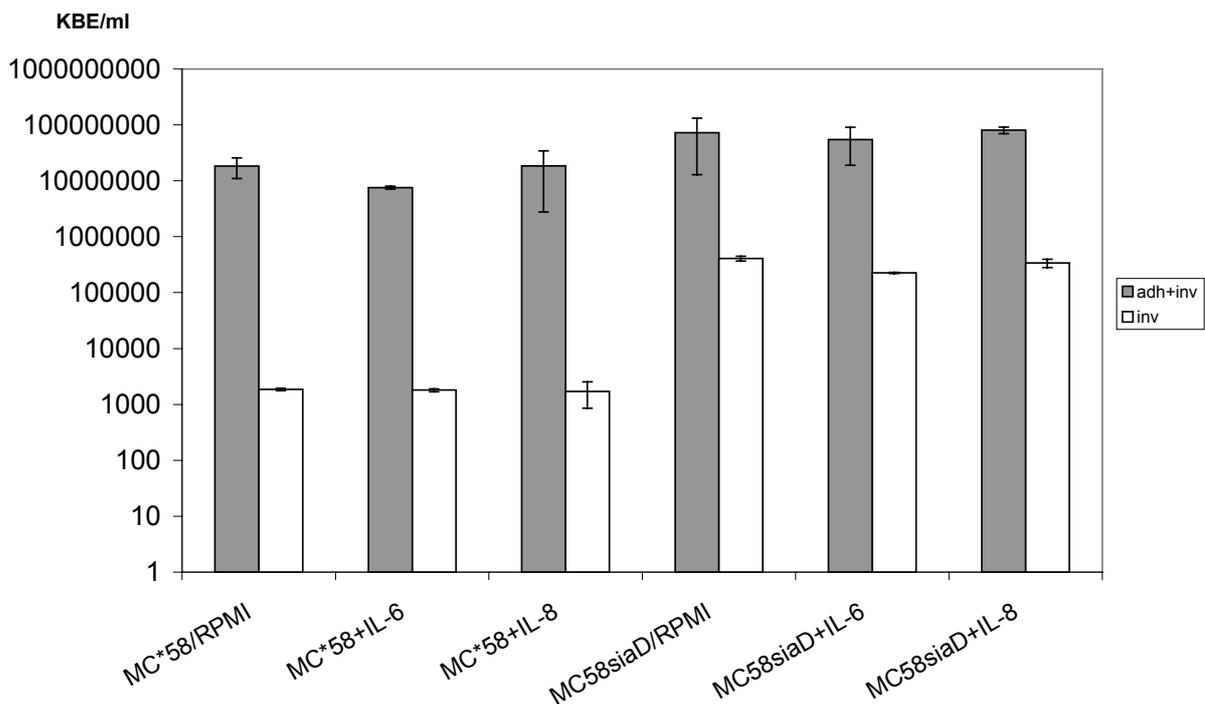


Abb.16: Adhärenz und Invasion von MC58* und MC58 *siaD* bei HBMEC nach Vorbehandlung mit IL-6 bzw. IL-8

Nach siebenstündiger Infektionszeit konnte bei beiden Stämmen weder bei IL-8 - noch bei IL-6 - vorbehandelten Zellen im Vergleich zu unvorbehandelten Zellen eine Veränderung im Adhärenz - oder Invasionsverhalten festgestellt werden.

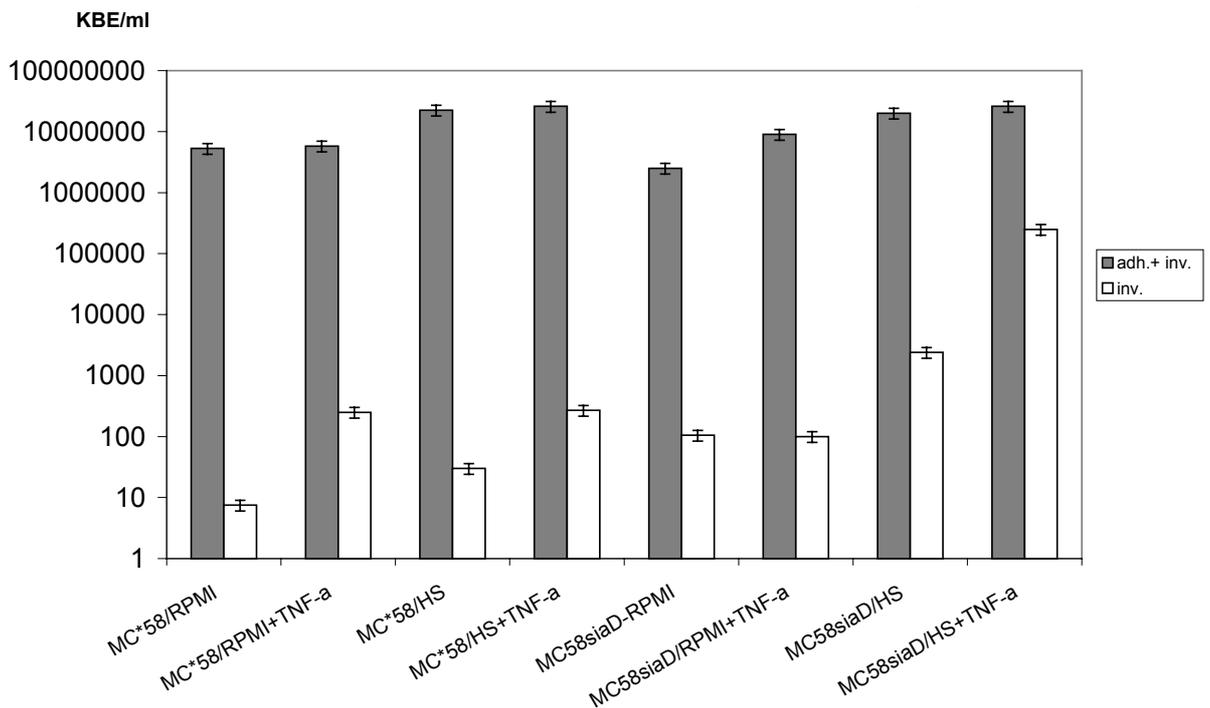


Abb.17: Adhärenz und Invasion von MC58* und MC58 *siaD* bei HBMEC nach Vorbehandlung mit TNF- α

Die Inkubation der Zellen mit TNF- α führte zu deutlichen Veränderungen bei der Invasion der Bakterien in die Zellen. Während die Adhärenz unverändert blieb, erhöhte sich die Invasion bei beiden Stämmen nach siebenstündiger Infektionszeit um das 10fache.

4.5 Zytokinfreisetzung der HBMEC unter Cytochalasin D - Einfluß

Cytochalasin D, ein Hemmstoff der Mikrofilamentaggregation, verhindert die Ausbildung der Aktinfilamente der Zellen. Eine intakte Zytoskelettfunktion ist Voraussetzung für die Endozytose eukaryonter Zellen, bei der Bakterien in membranumhüllten Vakuolen in Epi- oder Endothelzellen aufgenommen werden. In vorangegangenen Arbeiten wurde festgestellt, daß HBMEC nach einer Behandlung mit dem Zytoskelettinhibitor nicht mehr in der Lage sind, Meningokokken zu internalisieren. Die Adhärenz der Bakterien an die

Zellen wird dadurch jedoch nicht beeinträchtigt. Um festzustellen, ob die Adhärenz der Bakterien an die Zellen ein ausreichendes Signal für die Induktion der Zytokinfreisetzung darstellt, wurden mit Cytochalasin D vorbehandelte HBMEC mit Bakterien beider Stämme infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 2, 4, 6 u. 8h wurde die Freisetzung von TNF- α , IL-6 und IL-8 im Vergleich zu uninfizierten und unvorbehandelten Zellen mittels ELISA gemessen.

Nach der Cytochalasin D Behandlung kam es zu einem signifikanten Rückgang in der TNF- α Freisetzung bei den mit MC58 *siaD* infizierten HBMEC. Die TNF- α Konzentration in den Überständen blieb zu allen untersuchten Zeitpunkten im gleichen Bereich wie bei uninfizierten Zellen. Gleichzeitig wurde deutlich, daß die Cytochalasinbehandlung bei den uninfizierten Zellen die Freisetzung von TNF- α nicht beeinflußt. Da der bekapselte Stamm in den vorausgegangenen Untersuchungen zu keiner TNF- α Freisetzung führte, wurde er hier nicht weiter untersucht.

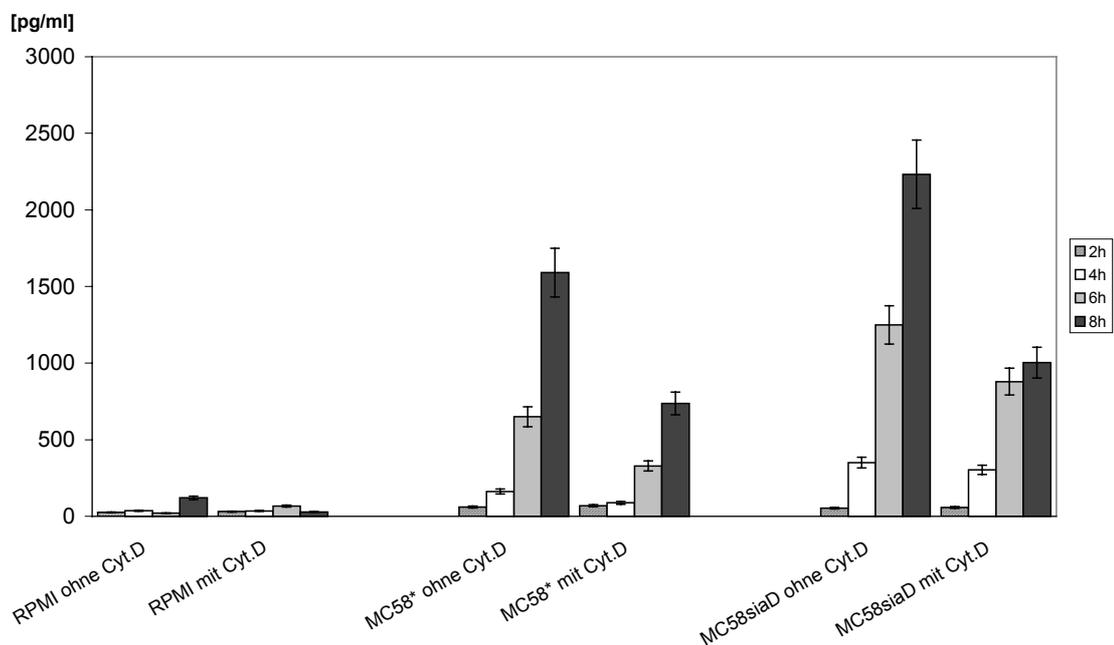


Abb.18: IL-8 Freisetzung aus mit MC58* und MC58 *siaD* infizierten bzw. uninfizierten HBMEC nach Vorbehandlung mit Cytochalasin D im Vergleich zu unvorbehandelten Zellen

Auch bei IL-8 führte die Verhinderung der Internalisierung zu einem erheblichen Rückgang in der Freisetzung, die mit zunehmender Inkubationszeit immer deutlicher sichtbar wurde. Zum letzten gemessenen Zeitpunkt nach 8h wurde von den mit Cytochalasin D behandelten Zellen nur noch halb so viel IL-8 freigesetzt, wie von den unvorbehandelten Zellen. Die Reduktion der Freisetzung zeigte sich bei den mit dem unbekapselten Stamm infizierten Zellen noch deutlicher, als bei den mit dem bekapselten Stamm infizierten HBMEC.

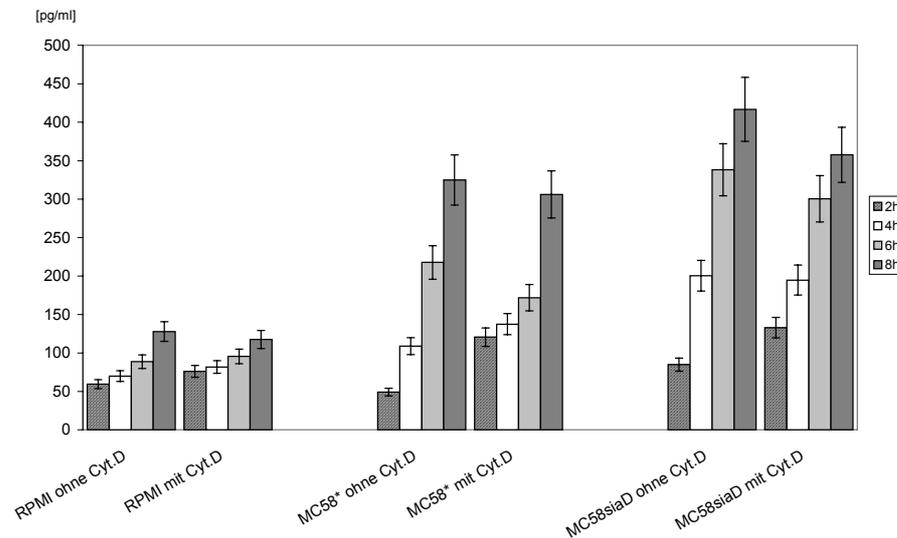


Abb.19: IL-6 Freisetzung aus mit MC58* und MC58 *siaD* infizierten bw. uninfizierten Zellen nach Vorbehandlung mit Cytochalasin D im Vergleich zu unvorbehandelten Zellen

In der Freisetzung von IL-6 konnte nach Cytochalasin D Vorbehandlung so gut wie kein Rückgang beobachtet werden. Schon durch die alleinige Adhärenz der beiden Stämme erreicht IL-6 in den Überständen nahezu die gleichen Konzentrationen wie in den Überständen nicht vorbehandelter Zellen.

4.6 Untersuchungen des $\alpha_5\beta_1$ Integrin Rezeptors

4.6.1 Nachweis von $\alpha_5\beta_1$ (FN) Rezeptoren auf HBMEC

Bei dem $\alpha_5\beta_1$ (FN) Rezeptor handelt es sich um einen Transmembranrezeptor aus der Familie der Integrine. Durch die Verbindung mit intrazellulären Bestandteilen wie Aktinfilamenten beeinflussen sie die Organisation des Zytoskeletts der Zelle. Von den bisher bekannten 24 verschiedenen Integrinen spielt der $\alpha_5\beta_1$ Integrin Rezeptor bei der Adhärenz von Meningokokken an Gehirnendothelzellen die wichtigste Rolle [71]. Den Hauptbindungspartner bildet dabei die β_1 Untereinheit. Da diese Rezeptor für alle vorgenommenen Untersuchungen von großer Bedeutung ist, wurde die verwendete HBMEC Zelllinie mittels Westernblot unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen $\alpha_5\beta_1$ Integrine auf das Vorhandensein des $\alpha_5\beta_1$ Integrin Rezeptors untersucht.

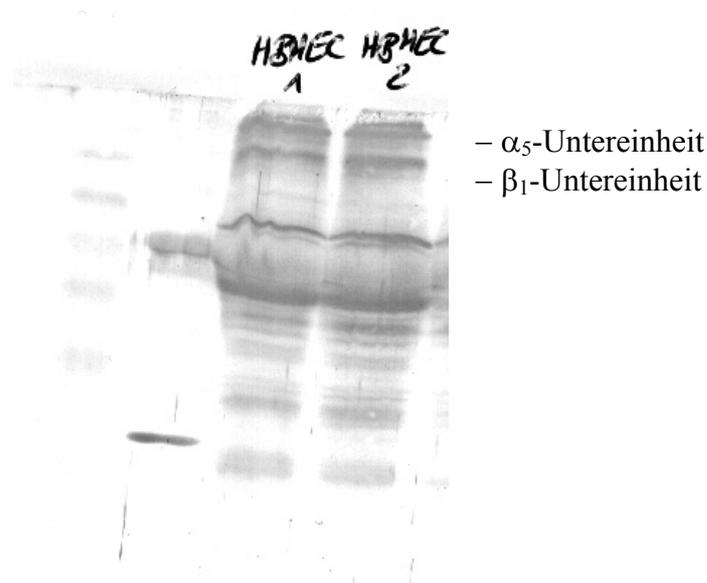


Abb.20: Westernblot der HBMEC – Lysate zum Nachweis des $\alpha_5\beta_1$ (FN) Rezeptors

4.6.2 Zytokinfreisetzung der HBMEC nach Blockierung des $\alpha_5\beta_1$ (FN) Rezeptors

Parallel zu den vorangegangenen Zytokinmessungen wurden die Überstände von Zellen untersucht, deren $\alpha_5\beta_1$ Integrin Rezeptoren für die Meningokokken beider Stämme nicht mehr als Bindungsstelle zur Verfügung standen. 15 – 20min vor der Infektion mit MC58* und MC58 *siaD* wurden die HBMEC mit 10 mg/ml $\alpha_5\beta_1$ Integrin Antikörper inkubiert und ihre Zytokinausschüttung nach 4 und 8h im Vergleich zu den Überständen nicht blockierter Zellen gemessen. Für diesen Versuch wurden die Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 ausgewählt.

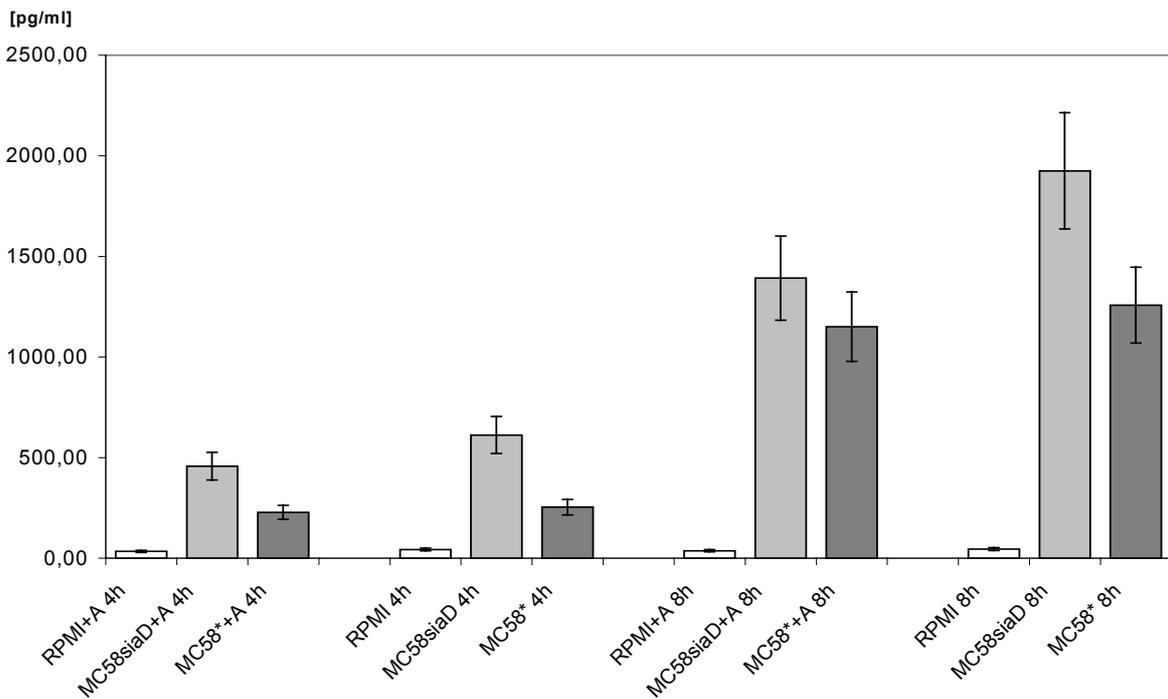


Abb.21: IL-8 Freisetzung mit und ohne $\alpha_5\beta_1$ Integrin blocking Antikörper

Die Freisetzung von IL-8 ist nach der Blockade der Hauptbindungsstelle vor allem bei den mit dem unbekapselten Stamm infizierten Zellen deutlich reduziert.

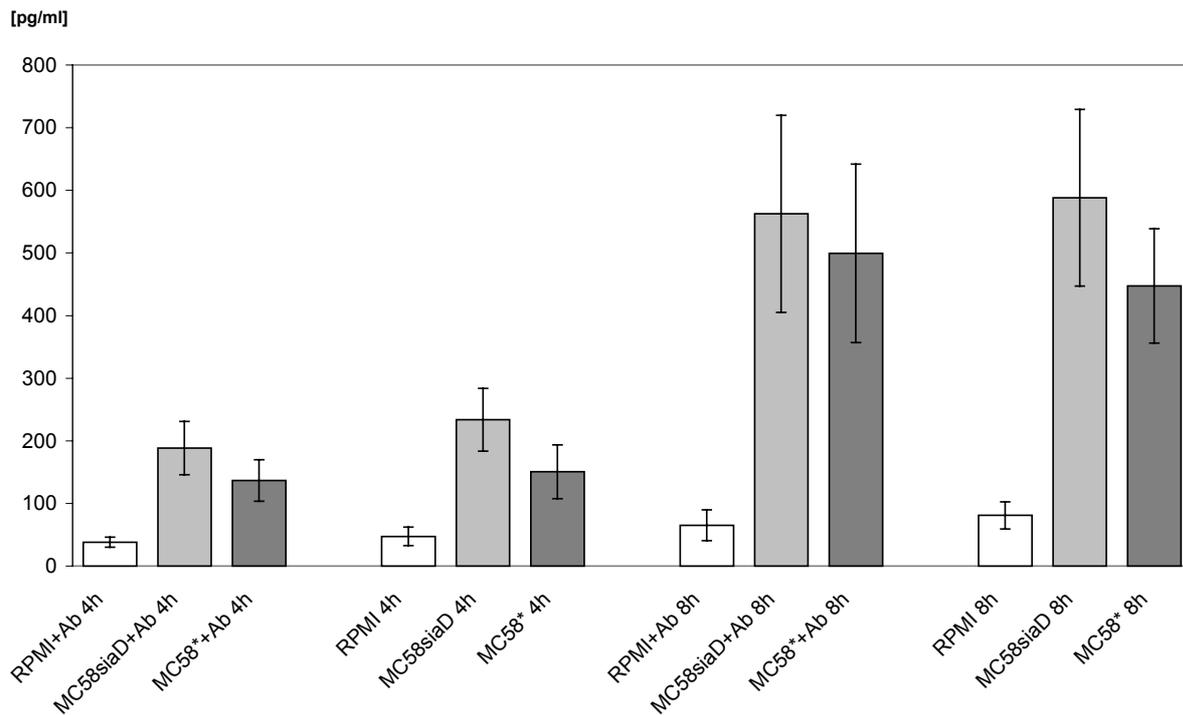


Abb.22: IL-6 Freisetzung mit und ohne $\alpha_5\beta_1$ Integrin blocking Antikörper

IL-6 blieb von der veränderten Bindungssituation zwischen Bakterien und Zellen fast unbeeinflusst. 4h nach Infektion waren die IL-6 Konzentrationen in den Überständen der blockierten Zellen noch leicht erniedrigt. Nach einer Inkubationszeit von 8h war in der IL-6 Ausschüttung jedoch kein Unterschied mehr zwischen Zellen mit blockierten oder freien $\alpha_5\beta_1$ Integrin Rezeptoren erkennbar. Ebensovienig wurde die Freisetzung von TNF- α durch die Blockade dieses Rezeptors beeinflusst. Nach Infektion mit dem unbekapselten Stamm setzten die vorbehandelten HBMEC genauso viel TNF- α frei, wie die nicht vorbehandelten. Bei IL-1 β wurde keine Veränderung des Freisetzungsprofils festgestellt. Alle gemessenen Werte befanden sich im gleichen niedrigen Bereich, wie die in Abbildung 11 gezeigten Grundwerte.

4.7 Untersuchungen mit Außenmembranproteinen

4.7.1 Zytokinfreisetzung durch HBMEC nach Zugabe von Außenmembranprotein (OMP)

Nachdem die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen vermuten ließen, daß zumindest im Fall einiger Zytokine ein direkter rezeptorvermittelter Kontakt zwischen Zelle und Bakterium für die Auslösung der Zytokinproduktion nicht nötig ist, konzentrierten sich die nächsten Untersuchungen auf bakterielle Bestandteile, die für die HBMEC als Signal für die Zytokinproduktion wirken könnten. Im Vergleich zu intakten Bakterien des MC58 *siaD* Stamms wurde eine OMP – Fraktion aus dem gleichen Stamm in einer Konzentration von 10, 100 und 500µg/ml eingesetzt.

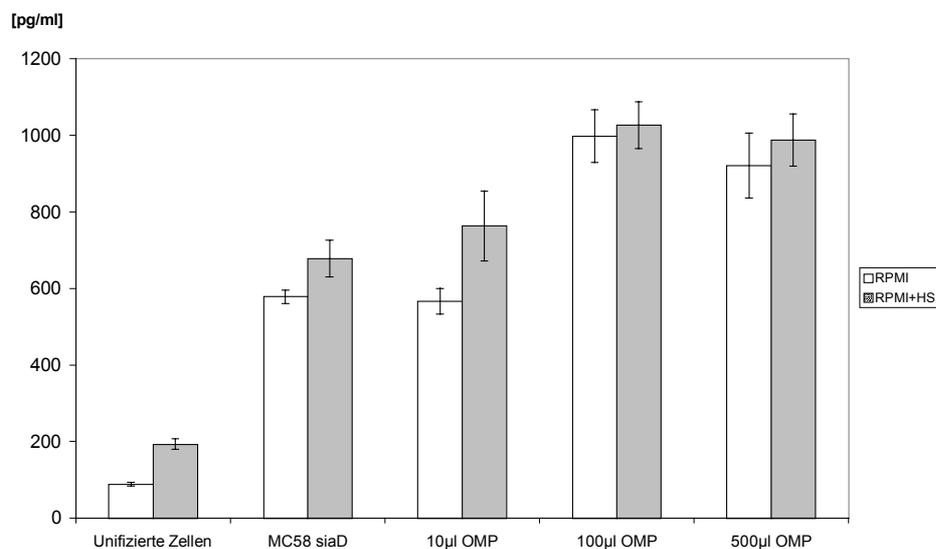


Abb.23: IL- 6 Freisetzung durch HBMEC nach Zugabe von 10, 100 und 500µg OMP/ml

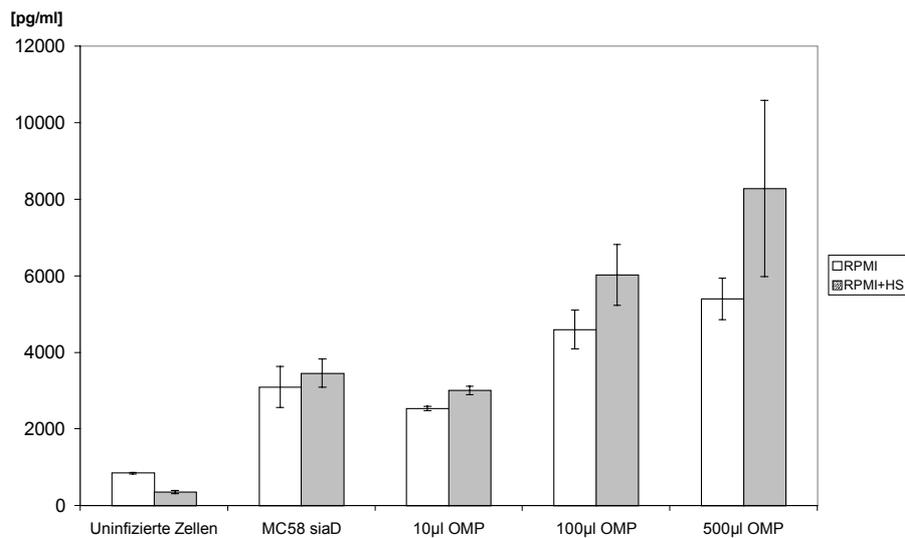


Abb.24: IL- 8 Freisetzung durch HBMEC nach Zugabe von 10, 100 und 500µg OMP/ml

Nach einer Inkubationszeit von 8h erreichte die Freisetzung von IL- 6, IL- 8 und TNF- α bei einer OMP Konzentration von 10µg/ml annähernd die gleiche Höhe wie bei einer Infektionsdosis von 10^6 Bakterien/ml. Diese Übereinstimmung bestand sowohl in reinem RPMI 1640 Medium, als auch unter Zusatz von 10% humanem Serum.

Die Erhöhung der OMP Konzentration auf 100µg/ml steigerte die Zytokinproduktion. IL- 8 wurde danach in doppelter Menge freigesetzt, bei IL- 6 und TNF- α kam es zu einer Steigerung von durchschnittlich einem Drittel. Dabei war die Steigerung bei IL- 6 in RPMI 1640 Medium, bei TNF- α unter Serumzusatz deutlicher erkennbar.

Durch eine weitere Erhöhung der OMP Konzentration auf 500µg/ml konnte die IL- 6 Produktion nicht weiter gesteigert werden. Die Freisetzung von IL- 8 erhöhte sich nochmals leicht, wogegen sich die TNF- α Freisetzung in reinem RPMI 1640 deutlich und unter Zusatz von humanem Serum um das 8fache steigern ließ.

4.7.2 Infektionsversuch mit LPS Mutante

Die bakteriellen Lipopolysaccharide (LPS) gelten bei einer Infektion als wichtige Faktoren für die Induktion der Zytokinproduktion. Durch die Infektion von HBMEC mit dem Meningokokkenstamm H44/76 und seiner Mutante H44/76 lpx, die kein LPS mehr bildet, sollte der LPS Anteil an der Zytokinfreisetzung ermittelt werden. Dieser Stamm wurde ausgewählt, da für ihn bereits diese LPS freie Mutante existiert.

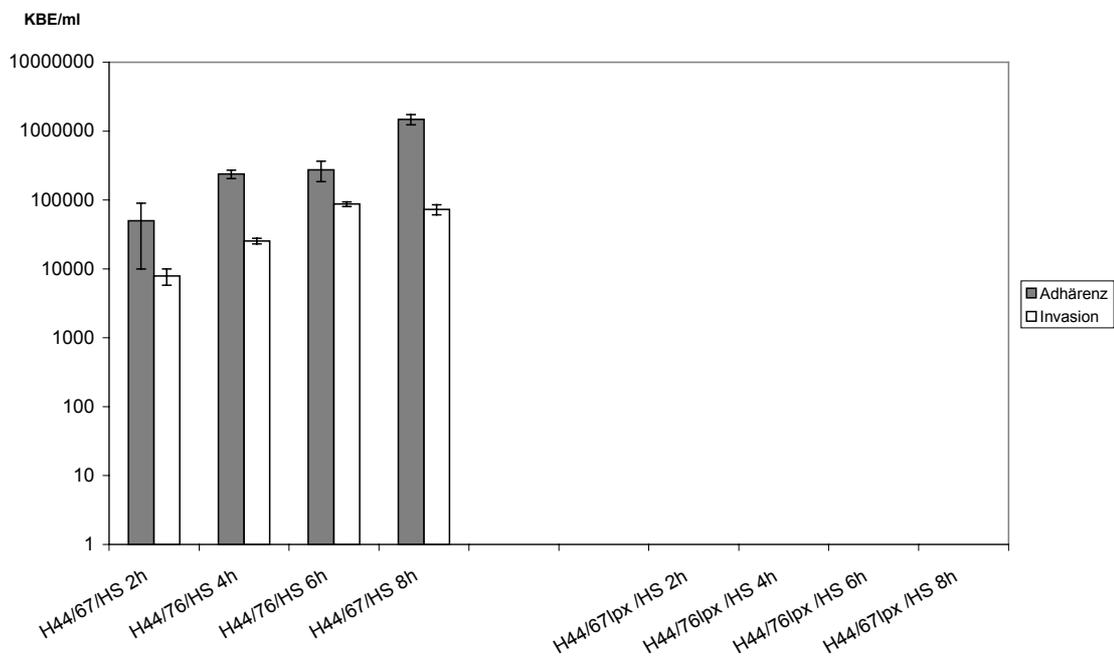


Abb.25: Infektionskinetik des Meningokokkenstammes H44/76 im Vergleich zu seiner LPS Mutante H44/76 lpx

Die LPS Mutante war weder zur Adhärenz noch zur Invasion in HBMEC in der Lage. Somit konnten auch keine weiteren Untersuchungen zur Zytokinfreisetzung unternommen werden.

4.7.3 Zytokinfreisetzung im Transwell – Versuch

Meningokokken sind in der Lage, aus ihrer Außenmembran kleine Partikel, die sogenannten Blebs zu vesikulieren. Nach den erfolgreichen Versuchen mit Außenmembranproteinen sollte festgestellt werden, ob die in Form von Vesikeln freigesetzte Menge an Außenmembranprotein für die Zelle ein ausreichendes Signal für die Zytokinproduktion darstellt. Zu diesem Zweck wurden Transwells für den Infektionsversuch mit MC58* und MC58 *siaD* eingesetzt.

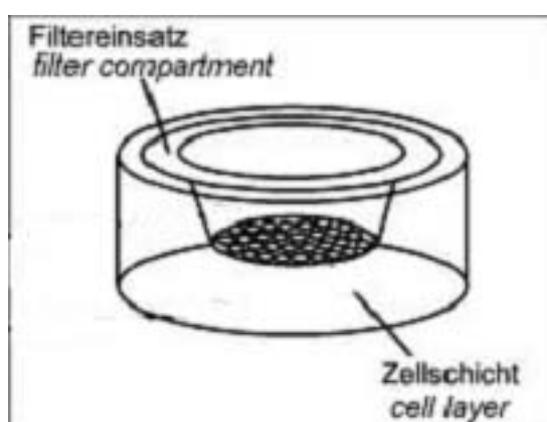


Abb.26: Darstellung des Infektionsversuchs im Transwell

Durch die Membranporengröße von $0,1\mu\text{m}$ wurde der direkte Kontakt zwischen Bakterien und Zellen unterbunden. Kleinere Partikel (Blebs) konnten die Poren jedoch ungehindert passieren. Die Funktionalität der Membran wurde durch eine bakterielle Untersuchung des außerhalb des Transwells befindlichen Mediums nach achtstündiger Infektionszeit überprüft. Der Zellüberstand wurde wieder auf den Gehalt an IL- 6, IL- 8 und TNF- α im Vergleich zu nicht Transwell Überständen untersucht.

In dieser Versuchsanordnung konnte auch nach achtstündiger Infektionszeit keine gesteigerte Freisetzung von IL- 6, IL- 8 oder TNF- α durch die in den Transwell befindlichen HBMEC gemessen werden. Die Konzentrationen an diesen Zytokinen in den Überständen befanden sich durchgehend im Bereich der Zytokinkonzentrationen in Überständen nicht infizierter Zellen.

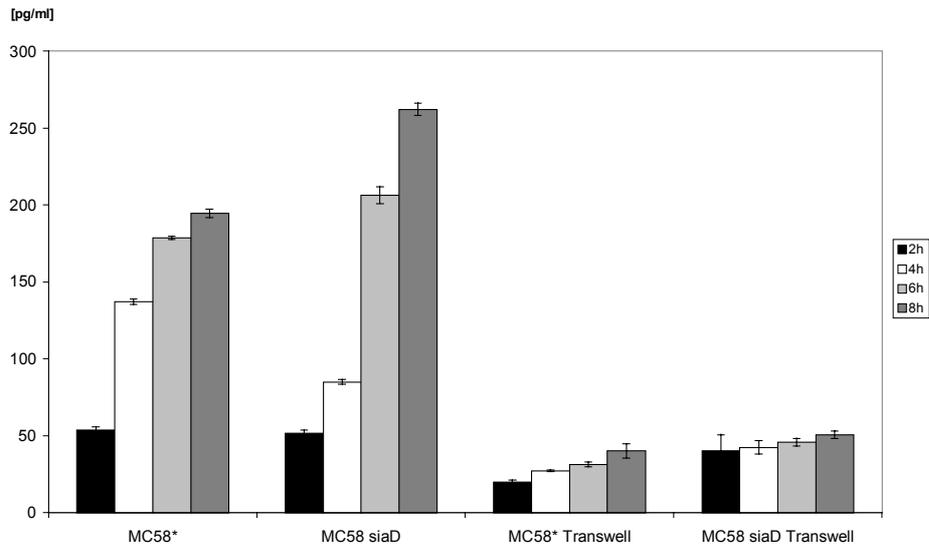


Abb.27: IL- 6 Freisetzung durch HBMEC nach Infektion mit MC58* und MC58 *siaD* im Transwell im Vergleich zur IL- 6 Freisetzung bisher durchgeführter Infektionsversuche

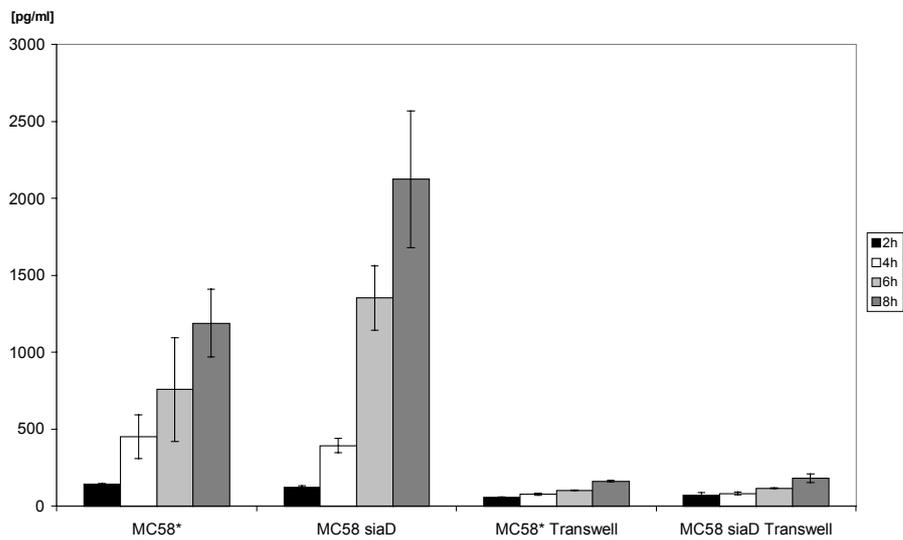


Abb.28: IL- 8 Freisetzung durch HBMEC nach Infektion mit MC58* und MC58 *siaD* im Transwell im Vergleich zur IL- 8 Freisetzung bisher durchgeführter Infektionsversuche

5 Diskussion

Bei einer *N. meningitidis* Infektion gelangen Meningokokken nach Überwindung der Nasen-Rachen-Schleimhaut in den Blutstrom. Im Verlauf der weiteren Pathogenese bestehen Unterschiede zwischen den Stämmen verschiedener hyperinvasiver klonaler Linien. Während Stämme des ST - 11 (vormals ET – 37) Komplexes vorwiegend schwere Septikämien verursachen, besitzen Stämme des ST – 32 (vormals ET – 5) Komplexes eine hohe Affinität zu Zellen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und können nach Überwindung dieser Barriere eine schwere eitrige Meningitis hervorrufen. Zur Überwindung der BHS haben diese Meningokokken spezielle Pathomechanismen entwickelt. Diese bestehen z.B. in der Fähigkeit bestimmter Stämme, das Außenmembranprotein Opc exprimieren zu können. Mit diesem Protein binden die Meningokokken über den Serumfaktor Fibronectin an den $\alpha_5\beta_1$ Integrin Rezeptor der Gehirndothelzellen [71] und werden daraufhin von der Zelle internalisiert.

Ein Kennzeichen einer Meningokokkeninfektion ist u.a. der massive Anstieg von proinflammatorischen Zyto- und Chemokinen in Blut und Liquor [73,9], der eine Mobilisierung von Abwehrzellen bewirkt und den Eintritt großer Leukozytenmengen in den Subarachnoidalraum zur Bekämpfung der bakteriellen Invasion ermöglicht. Dabei überwiegen in der Anfangsphase Neutrophile, im weiteren Verlauf der Krankheit dann Monozyten [44]. Neben dieser positiven Wirkung der Zytokine kommt es allerdings durch die von ihnen ausgelöste Entzündungsreaktion zu schweren Schäden am Nervengewebe. Die Klärung der Interaktion von Meningokokken, Endothelzellen der BHS und Zytokinen ist daher von erheblichem Interesse.

Bei Zellen des Hirnparenchyms, meningealen Entzündungszellen und Dendritischen Zellen wurde die Zyto- und Chemokinproduktion bereits nachgewiesen [44,40]. Für die mikrovaskulären cerebralen Endothelzellen, die mit ihren tight junctions die erste Schicht der BHS bilden und bei einer bakteriellen Infektion des Gehirns die ersten Zellen sind, mit denen die Bakterien in Kontakt treten, steht dieser Nachweis noch aus.

Mit einem etablierten Zellkulturmodell wurden Genexpression und Zytokinfreisetzung durch humane Gehirndothelzellen nach Infektion mit einem Isolat der hyperinvasiven klonalen Linie ST – 32 der Serogruppe B untersucht. Bei den Stämmen MC58* und der unbekapselten

isogenen Mutante MC58 *siaD* handelt es sich um Meningokokken, deren Tropismus zu den Zellen der BHS nachgewiesen wurde. Beide Stämme exprimieren das Außenmembranprotein Opc.

Für diese Arbeit wurden die für eine inflammatorische Antwort typischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 ausgewählt, welche bei Patienten mit Meningitis im Serum, jedoch hauptsächlich im Liquor nachgewiesen wurden [74,49,54,39,22]. Weitere Untersuchungen umfaßten die Zytokine IL-1 α , TGF- β , MCP-1, Rantes und GM-CSF.

TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 fördern die lokale Entzündung am Ort mikrobieller Infektionen und vermitteln die Adhärenz von Leukozyten an Endothelien und ihre Transmigration durch die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen [11,47]. TNF- α und IL-1 β stimulieren zahlreich Zelltypen u.a. Endothelzellen zur Produktion von IL-6 und IL-8 [20,4,63]. IL-8 ist ein Zytokin mit starkem chemoattraktivem und aktivierendem Effekt auf Neutrophile [3,21].

MCP-1, Rantes und GM-CSF aktivieren Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und T-Memory Zellen wohingegen das inhibitorische Zytokin TGF- β alle Immun- und Hämatopoese-funktionen hemmt. Rantes und GM-CSF wurde bei diesen Untersuchungen nicht exprimiert. In Untersuchungen mit Meningealzellen wurde eine Freisetzung dieser beiden Zytokine erst 24h nach der Infektion mit *N. meningitidis* festgestellt [15].

Bei IL-1 α und IL-1 β konnte nach Infektion mit beiden Bakterienstämmen keine vermehrte Produktion bzw. Genexpression nachgewiesen werden. Die Konzentration an IL-1 β blieb im zellfreien Überstand im Vergleich zum Kontrollüberstand nichtinfizierter Zellen immer auf gleicher Höhe. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen, die bei Untersuchungen der Interaktion von Shiga Toxinen (aus *E. coli*) mit HBMEC erzielt wurden [58]. Dendritische Zellen dagegen setzen nach einer *N. meningitidis* Infektion mit den Stämmen MC58* und MC58 *siaD* große Mengen an IL-1 β frei [40]. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Ausschüttung von Zytokinen aus Dendritischen Zellen insgesamt höher ist. HBMEC nutzen dieses Zytokin möglicherweise nicht als Leukozytenmigrationsfaktor.

TNF- α wurde bei den Infektionsversuchen mit HBMEC nur von den Zellen freigesetzt, die mit dem unbekapselten Meningokokkenstamm infiziert worden waren. Nach einer Infektion mit dem bekapselten Stamm war mit den gewählten Versuchsbedingungen keine TNF- α Produktion nachweisbar. Mit einer Modifizierung des Versuchsverfahrens im Bezug auf eine größere Zellzahl, der Verwendung von anderen Kulturbedingungen, dem Einsatz größerer Bakterienmengen oder der Verlängerung der Inkubationszeit, sind diese Ergebnisse noch weiter zu untersuchen. TNF- α spielt nach bisherigen Erkenntnissen im Verlauf einer Meningokokkenerkrankung eine zentrale Rolle. So korreliert der TNF- α Spiegel im CSF direkt mit der Schwere des Schadens an der Blut-Hirn-Schranke [39].

MCP-1 wurde von infizierten und nichtinfizierten Zellen gleichermaßen exprimiert und freigesetzt, jedoch nur in äußerst geringem Umfang. Auch dieses Zytokin ist unter geänderten Versuchsbedingungen noch weiter zu untersuchen, da seine Expression möglicherweise erst nach längeren Inkubationszeiten beginnt.

Die Freisetzung und Genexpression von TGF- β bestand fast gleichmäßig über alle untersuchten Zeitwerte. Bei Untersuchungen mit murinen BMEC wurde die Expression von TGF- β durch TNF- α und LPS hochreguliert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß TGF- β eine wichtige Rolle bei entzündlichen ZNS Erkrankungen spielt [48]. In Versuchen mit murinen mikrovaskulären Gehirndothelzellen konnte die Migration von Leukozyten durch die Blut-Hirn-Schranke *in vivo* und *in vitro* durch TGF- β inhibiert werden [23]. Unstimulierte, oder mit IL-1 β und Interferon- γ aktivierte BMEC exprimierten dagegen keine TGF- β mRNA [48]. Somit wäre in der vorliegenden Studie im Bezug auf die Freisetzung von TGF- β ein anderes Ergebnis zu erwarten gewesen, da es als inhibitorisches Zytokin eigentlich von nichtinfizierten Zellen stärker, als von infizierten freigesetzt werden müsste. Im infizierten Zustand ist eine Hemmung der Immunreaktionen schließlich nicht mehr erwünscht. Wenn man aber berücksichtigt, daß TGF- β nicht nur die Proliferation von Immunzellen verhindert, sondern auch nach Hirnschädigungen durch die Stimulation der Produktion von Nerve Growth Factor (NGF) die Regeneration von Nerven unterstützt und die Ausdehnung der Astrozytenproliferation sowie die Narbenbildung kontrolliert [48], sind die erzielten Ergebnisse doch schlüssig. TGF- β hätte somit weniger eine rein inhibitorische als vielmehr eine regulatorische Funktion zu erfüllen, indem es ein

Überschießen der Immunreaktion bei einer ZNS Infektion verhindert und so zur Schadensbegrenzung und nachfolgender Reparatur beiträgt.

IL-6 wurde von HBMEC nach Infektion mit beiden Stämmen im Vergleich zu uninfizierten Zellen deutlich vermehrt freigesetzt. Bei Untersuchungen mit Mäusen wurde festgestellt, dass die IL-6 Produktion durch TNF- α und IL-1 induziert wird und zwar erheblich schneller, als durch LPS. Ein hoher IL-6 Spiegel korreliert dabei in Verbindung mit TNF- α und IL-1 mit einer erhöhten Mortalität. IL-6 ist vermutlich ein wichtiger Effektor in der Manifestation von TNF- α - und IL-1-Wirkungen *in vivo*. Ebenso ist TNF- α an der LPS-bedingten Induktion von IL-6 beteiligt, denn eine gleichzeitige Verabreichung von rekombinantem murinen TNF- α mit LPS führte zu einer Reduktion des IL-6 Spiegels. Umgekehrt unterdrückt IL-6 die durch bakterielle Endotoxine induzierte IL-1 – und TNF- α Synthese [63].

Ebenso war bei IL-8 eine signifikant erhöhte Freisetzung feststellbar. Auch die IL-8 Produktion wird durch IL-1, TNF- α und LPS induziert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Endothelzellen cerebralen Ursprungs in der Lage sind, als Reaktion auf den Kontakt mit Meningokokken Zytokine zu bilden. Dabei konnte nach der Infektion mit beiden Meningokokkenstämmen ein typisches Zytokinfreisetzungsprofil nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der Induktion der Zytokinproduktion stellten sich zwei Fragen.

- Welche bakteriellen Bestandteile lösen die Zytokinproduktion aus?
- Zu welchem Adhäsions- bzw. Invasionszeitpunkt beginnt die Zytokinausschüttung?

Die LPS-Komponente (Endotoxin) der bakteriellen Außenmembran gilt als Hauptauslöser für die Zytokinproduktion [36]. Alternative Therapien gegen die durch Meningokokken-LPS verursachten proinflammatorischen Effekte z.B. anti-Endotoxin monoklonale Antikörper [76], rekombinantes bakterizides / permeabilitätssteigerndes Protein BPI [28,46], oder LPS bindendes Protein und Limulus anti-LPS Faktor [17] sind jedoch nur teilweise erfolgreich, da vermutlich auch andere Faktoren als LPS Signale für die proinflammatorische Stimulation geben [65]. *Sprong* hat bei Untersuchungen mit humanen peripheren Blutmonozyten festgestellt, daß eine Infektion mit intakten Meningokokken

eine stärkere Zytokinausschüttung bewirkt, als die entsprechende Menge reiner LPS. So sind nicht-LPS-Komponenten von Meningokokken in der Lage, Zytokinproduktion und Mortalität bei Mäusen zu verursachen. Ein Beispiel für eine nicht-LPS-Komponente ist die von Meningokokken produzierte IgA-Protease. Bei peripheren Blutmonozyten wurde bereits ihre Wirkung auf die Induktion proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen [47].

Versuche, mit einer LPS-freien Meningokokkenmutante, mit welcher weltweit gearbeitet wird und die von der Arbeitsgruppe von *van der Ley* zur Verfügung gestellt wurde [66], den LPS- und nicht LPS- Anteil an der Zytokinausschüttung zu ermitteln, konnten nicht weiter verfolgt werden, da diese Mutante nicht mehr zur Adhärenz an bzw. Invasion in die HBMEC fähig war. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit einer Lipooligosaccharidmutante eines Serogruppe C Stamms von *N. meningitidis* und Epithelzellen erzielt [2]. Das deutet darauf hin, daß dem bakteriellen LPS ein wesentlicher Anteil am Adhärenzvorgang an Zellen zukommt. Die Zugabe von reinem Außenmembranprotein zu den Zellen führte dagegen zu einer deutlichen Zytokinantwort bei IL-6, IL-8 und TNF- α .

Meningokokken sind in der Lage, aus ihrer Außenmembran kleine Vesikel, sogenannte Blebs, abzuschneiden und freizusetzen. Diese Vesikel führen bei Neutrophilen zur Produktion von TNF- α , IL-1 und IL-8 [43]. Es wäre denkbar, daß auch für HBMEC bereits der Kontakt mit diesen Blebs ein ausreichendes Signal für die Zytokinproduktion darstellt. Die Ergebnisse der Transwell-Versuche mit Porengrößen, die einen Kontakt der Bakterien zu den Zellen verhindern, Blebs aber passieren lassen, deuten jedoch nicht in diese Richtung. Die Zellüberstände der Transwells wiesen keinen höheren Zytokingehalt als die uninfizierter Zellen auf. Warum die Zugabe von reinem Außenmembranprotein eine Zytokinantwort bewirkt, im Transwell-Versuch jedoch die Außenmembranvesikel die HBMEC nicht zur Zytokinausschüttung veranlassen, ist unklar. Möglicherweise ist die Distanz zwischen Membran und Zellmonolayer zu groß und die Vesikel erreichen die Zellen nicht, oder nicht in ausreichender Menge. In weiteren Versuchen z.B. mit Hilfe elektronenmikroskopischer Analysen müsste geklärt werden, in welchem Umfang es zu einem Kontakt zwischen Blebs zu Zellen kommt.

Bei allen Zytokinen, die nach Meningokokkeninfektion verstärkt freigesetzt wurden, zeigte sich, daß Genexpression und Zytokinproduktion nach einer Infektion mit der kapsellosen Mutante MC58 *siaD* deutlich früher einsetzten und stärker ausfielen, als bei den bekapselten Meningokokken. Im Fall von TNF- α kam es sogar nur durch die unbekapselten Bakterien zu einer Freisetzung bzw. Genexpression. Aus Infektionskinetiken mit diesen beiden Stämmen ist bekannt, daß die unbekapselte Variante schneller adhärirt und invadiert, als die bekapselte. Somit ist davon auszugehen, daß das Signal zur Zytokinproduktion spätestens mit der Invasion der Bakterien in die Zellen erfolgt. Um diesen Vorgang etwas genauer zu untersuchen, wurde die Zytokinfreisetzung von Zellen ermittelt, denen durch die Vorbehandlung mit Cytochalasin D das Ausbilden ihrer Aktinfilamente unmöglich gemacht wurde und die daher nicht mehr in der Lage waren, Meningokokken zu internalisieren. Die Freisetzung von IL-8 ging daraufhin um über die Hälfte zurück, wohingegen IL-6 in nahezu unverändertem Umfang freigesetzt wurde. In weiterführenden Untersuchungen wurde mittels Antikörper der $\alpha_5\beta_1$ Integrin-Rezeptor, die Hauptbindungsstelle für Meningokokken an HBMEC [71] blockiert, was ebenfalls einen Rückgang in der IL-8 Freisetzung zur Folge hatte und die IL-6 Produktion wiederum unverändert blieb. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß für die Produktion von IL-6 offensichtlich weder eine Internalisation der Bakterien, noch eine Bindung an den $\alpha_5\beta_1$ Integrin Rezeptor nötig ist, im Gegensatz zu IL-8. Entweder sind andere Bindungsstellen dafür ausreichend, oder aber ein direkter Kontakt zwischen Bakterien und Zellen ist nicht nötig. Die Identifizierung der intrazellulären Vorgänge während dieser Bakterien-Zell-Interaktion wird das Ziel weiterer Forschungen sein.

Die Differenz in der IL – 8 Freisetzung zwischen Adhärenz und Invasion der Meningokokken dient möglicherweise dem Schutz der HBMEC. Solange sich die Bakterien noch außerhalb der Zellen im Stadium der Adhärenz befinden, ist die Anheftung von Neutrophilen zur Bekämpfung dieser Bedrohung eindeutig notwendig. IL – 8 fördert aber bei Neutrophilen die Sekretion von Superoxidanionen und lysosomalen Enzymen, welche die Durchlässigkeit von Blutgefäßen erhöhen [67]. Dieser, für die HBMEC schädigende Effekt, ist zum Zeitpunkt der Adhärenz durch die Verdünnung dieser Substanzen im Blutstrom noch von geringerem Ausmaß. Mit der Invasion der Bakterien in die HBMEC und nachfolgender Einwanderung von Neutrophilen könnte er aber überhand nehmen.

Es gibt Untersuchungsergebnisse, die eine mögliche Wirkung von IL-8 endothelialen Ursprungs in der Abschwächung von Entzündungsvorgängen an der Gefäßoberfläche erkennen lassen, indem die Anheftung von Neutrophilen an zytokinaktivierte Endothelzellschichten verhindert wird. Auf diese Weise wären die betreffenden Zellen gegen Schädigung durch Neutrophile geschützt [27].

In Untersuchungen mit HBMEC wurde bereits festgestellt, daß die Endothelzellen unter Zytokineinfluß (IL-1 β , TNF- α) verstärkt (Shiga-) toxinbindende Rezeptoren exprimieren. [58] und damit die zytotoxische Dosis (CD₅₀) erheblich (10³-10⁴) herabsetzen. *Nassif* hat bei Untersuchungen mit Babyratten festgestellt, daß Meningokokken die TNF- α Produktion nutzen um ihr volles pathogenes Potential einsetzen zu können [52]. TNF- α induziert bei Meningokokkenerkrankungen die Hochregulation des Adhäsionsmoleküls CEACAM-1 (carcinoembryonic antigenrelated adhesion molecule) bei Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells - HUVEC). Diese induzierte CEACAM-Expression führt zu einer gesteigerten Opa abhängigen Bindung und Invasion der Bakterien in die Endothelzellen [51]. Ob Gehirnendothelzellen dementsprechend einen Oberflächenrezeptor wie z.B. den $\alpha_5\beta_1$ Integrin Rezeptor unter Zytokinstimulation hochregulieren und so die Adhärenz von Meningokokken an die Gefäßwände und ihren Austritt aus dem Blut in die Zellen unterstützen, wäre für HBMEC durchaus vorstellbar und ist Gegenstand derzeitiger Forschungen.

Um herauszufinden, ob die gemessenen Zytokine für Meningokokken eine Verbesserung der Adhärenz und Invasion bewirken, wurden HBMEC mit IL-6 bzw. IL-8, den Zytokinen, die sie nach einer Meningokokkeninfektion am deutlichsten exprimieren, und TNF- α präinkubiert. Weder unter dem Einfluß von IL-6 noch von IL-8 konnte eine Steigerung der bakteriellen Adhärenz oder Invasion beobachtet werden. Eine Vorbehandlung der Zellen mit TNF- α erhöhte die Invasion bei gleichbleibender Adhärenz jedoch signifikant. Bei dem unbekapselten Stamm MC58 *siaD* bewirkt TNF- α in Anwesenheit von humanem Serum eine Steigerung der Invasion um den Faktor 1000. Unklar ist noch, auf welchem Weg es zu dieser verbesserten Invasion kommt. Möglicherweise kommt es zu einer vermehrten Expression des $\alpha_5\beta_1$ Integrin-Rezeptors oder anderer Rezeptoren durch die Einwirkung von TNF- α .

Nachdem Waage bereits nachgewiesen hat, daß Subarachnoidalraum und systemischer Kreislauf funktionell getrennte Bereiche sind, was die Produktion von Zytokinen betrifft, [74] wäre eine mögliche Erklärung für die Entstehung hoher Zytokinkonzentrationen, die bei einer Meningitis nur im Liquor, nicht im Serum nachzuweisen sind, folgende:

Meningokokken, die bekapselt im Blut zirkulieren, adhäreren an Gehirnendothelzellen. Nach der Invasion beginnen die Zellen mit der Produktion von Zytokinen (IL-6, IL-8 und TNF- α), die sie ins Blut und in den Liquor abgeben. Dadurch wird durch TNF- α weiteren Meningokokken die Invasion in Gehirnendothelzellen erleichtert. Außerdem werden Abwehrzellen angelockt (Dendriten), welche in den Subarachnoidalraum eindringen, dort Zytokine in hohen Konzentrationen produzieren und so zu einer fatalen Entzündung der Meningen führen.

Für eine gezielte Vorbeugung dieser schweren Entzündungsantwort während einer Meningokokkenerkrankung ist eine genaue Charakterisierung des Zusammenspiels von Zellen, die die Zytokine produzieren und den Bakterien absolut notwendig. Methoden zur Abschwächung der Schwere der Symptome einer Meningokokkenmeningitis schließen die Herunterregulation der Zytokinproduktion durch entzündungshemmende Medikamente ein [39,54]. Durch eine passive Immunisierung mit polyklonalem Antiserum gegen TNF- α konnten Babyratten vor der mit Meningokokkämie verbundenen Mortalität geschützt werden, trotz der Tatsache, daß die bakterielle Wachstumskinetik *in vivo* unverändert blieb [52]. So bestünde eine sehr erfolgversprechende Therapie in Maßnahmen, welche die Produktion proinflammatorischer Zytokine in einem Bereich halten, in dem nur ihre positiven immunstimulierenden Effekte zum Tragen kommen.

6 Zusammenfassung

Neisseria meningitidis, ein Gram negatives pathogenes Bakterium ist eine der Ursachen für schwere Septikämie und Meningokokkenmeningitis. Nach Besiedelung des menschlichen Nasopharynx und Übertritt in die Blutbahn besteht ein zentraler Schritt in der Pathogenese der durch *N. meningitidis* verursachten bakteriellen Meningitis in der Interaktion der Bakterien mit Zellen der Blut-Hirn-Schranke.

Die Schwere der Erkrankung scheint direkt mit der Produktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren zu korrelieren. Daher wurde in der vorliegenden Studie mit Hilfe eines Zellkulturmodells die Freisetzung von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Monocyten-attrahierendem Protein-1 (MCP-1) und transformierendem Wachstumsfaktor beta (TGF- β) durch Gehirndothelzellen nach Infektion mit Meningokokken analysiert.

Mit ELISA und RT-PCR wurde die Freisetzung von Zytokinen und die Transkription der Zytokin-codierenden Gene von humanen Gehirndothelzellen (HBMEC) nach Infektion mit dem Meningokokkenstamm MC58* und seiner unbekapselten isogenen Mutante MC58 *siaD* der Serogruppe B nachgewiesen. In Übereinstimmung mit der Zytokinfreisetzung wurde dabei ein typisches Genexpressionsmuster festgestellt. Beide Bakterienstämme beeinflussten die Transkription der Gene, die für IL-6 und IL-8 kodieren, wobei die Transkription bei den Zellen, die mit dem unbekapselten Stamm infiziert wurden, früher nachzuweisen war. Die Transkription des TNF- α Gens wurde nur nach der Infektion mit der unbekapselten Mutante nachgewiesen. Für IL-1 β und MCP-1 wurde keine verstärkte Transkription festgestellt, wogegen das Gen, welches für TGF- β codiert, von infizierten wie uninfizierten Zellen gleichermaßen exprimiert wurde.

Neben den intakten Bakterien führte auch die Stimulation mit Außenmembranproteinen zu einer Induktion der Zytokinfreisetzung.

Die Verhinderung der Internalisierung der Bakterien in die Zellen bzw. die Blockade des $\alpha_5\beta_1$ Integrin Rezeptors reduzierte die Freisetzung von IL-8 und TNF- α , nicht jedoch die Freisetzung von IL-6.

Während durch die IL-6 oder IL-8 Prästimulation der HBMEC keine Veränderung des Invasionsverhaltens der Meningokokken beobachtet werden konnte, führte eine Prästimulation mit TNF- α zu einer deutlich gesteigerten Invasion der Bakterien in die Zellen.

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß der Entzündungsprozeß im Gehirn eine komplexe Interaktion zwischen Bakterium und Wirtszelle erfordert. Dabei spielen die Gehirnendothelzellen offensichtlich eine wichtige Rolle in der interzellulären Kommunikation der beteiligten Zellen, indem sie Zytokine als Immunmodulatoren freisetzen, die ihrerseits zu veränderter Expression von Adhäsionsmolekülen führen könnten.

Summary

Analysis of the interaction of meningococci with cells of the blood-brain-barrier

The Gram-negative bacterium *Neisseria meningitidis* is a major cause of bacterial meningitis and septicemia worldwide. After colonization of the nasopharyngeal mucosa and entry into the bloodstream, the interaction of the bacteria with cells of the blood-brain barrier plays a pivotal role in the pathogenesis of meningitis.

Several studies have shown, that the severe manifestations of systemic meningococcal disease directly correlate with the production of proinflammatory cytokines chemokines and growth factors. Therefore the release of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and transforming growth factor (TGF)- β by human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) was analysed after infection with meningococci using a well established cell culture model (Unkmeir et al., 2002).

By ELISA and RT-PCR analysis release of cytokines and transcription of cytokine encoding genes in HBMEC was demonstrated after infection with the meningococcal isolate MC58* and his capsule deficient mutant MC58 *siaD* of serogroup B.

A typical gene expression pattern was detected corresponding to the release of cytokines in the supernatant detected by ELISA. Both meningococcal isolates lead to an increase of transcription of IL-6 and IL-8 genes. However, in HBMEC infected with the capsule deficient mutant MC58 *siaD* transcription started earlier. The transcription of the TNF- α gene was only detected after infection with the MC58 *siaD* strain. No enhanced transcription was detected for IL-1 β and MCP-1, either infecting with encapsulated or unencapsulated meningococci. Interestingly, TGF- β was expressed by infected and noninfected cells in equal amounts.

Furthermore, stimulation with outer membrane proteins also induced cytokine release by HBMEC.

Inhibition of bacterial internalization by blocking the $\alpha_5\beta_1$ integrin receptor on HBMEC reduced the release of IL-8 and TNF- α but not IL-6.

While prestimulation of HBMEC with IL-6 and IL-8 did not influence bacterial uptake by the host cell, TNF- α prestimulation clearly increased the invasion rate of meningococci into the cerebral endothelial cell.

These results show, that the inflammatory process at the blood-brain barrier requires a complex interaction of the bacterium with its host cell. Evidently, brain endothelial cells could play an important role in the intercellular communication of different participant cells by release of proinflammatory cytokines and chemokines, and might further act as immunomodulators, which could also influence cell adhesion molecules.

7 Literatur

1. Alber, D., Oberkötter M., Suerbaum, S., Claus, H., Frosch, M., and Vogel, U., Genetic Diversity of *Neisseria lactamica* Strains from Epidemiologically Defined Carriers; *J. Clin. Microbiol.* 2000; **39**: 1710-1715.
2. Albiger, B., Johansson, L., and Jonsson A.-B., Lipooligosaccharide-Deficient *Neisseria meningitidis* Shows Altered Pilus-Associated Characteristics; *Infection and Immunity* 2003; **71**: 155-162.
3. Baggiolini, M., Walz, A., and Kunkel, S.L., Neutrophil-activating peptide-1/IL-8 a novel cytokine that activates neutrophils; *J. Clin. Invest.* 1989; **84**: 1045-1049.
4. Bazzoni, F., Cassatella, M.A. Rossi, F., Dewald, B., and Baggiolini, M., Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/IL-8; *J Exp Med* 1991; **173**: 771-774.
5. Bhattacharjee, A.K. and Jennings, H.J., Characterization of 3-deoxy-D-Mannooctulosonic acid as a component of the capsular polysaccharide antigen from *Neisseria meningitidis* serogroup 29-e; *Biochem Biophys Res Commun* 1974 , **61** : 489-493.
6. Bhattacharjee, A.K., Jennings, H.J., Kenny, C.P., Martin, A., and Smith I.C., Structural Determination of the polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups Y, W-135, and BO1; *Can J Biochem* 1976; **54**: 1-8.
7. Blakebrough, I.S., Greenwood, B.M., Whittle, H.C., Bradley, A.K., and Gilles, H.M., The epidemiology of infections due to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in a northern Nigerian community; *J. Infect. Dis.* 1982; **146**: 626-637.
8. Bowman, P.D., Ennis, S.R., Rarey, K.E., Betz, A.L., and Goldstein, G.W., Brain microvascular endothelial cells in tissue culture : a model for study of blood-brain permeability ; *Ann Neurol* 1983; **14**: 396-402.
9. Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P., Espevik, T., and Waage, A., Molecular mechanisms in the compartmentalized inflammatory response presenting as meningococcal meningitis or septic shock ; *Microb. Pathog.* 1992 ; **13** : 423-431.
10. Braude, Abraham I., M.D., Ph.D., Medical Microbiology and Infectious Diseases, International Textbook of Medicine 1981 Saunders Verlag.

11. Brouckaert, P., Libert, C., Everaedt, B., Takahashi, N., Cauwels, A., and Fiers, W., Tumor necrosis factor, its receptors and the connection with interleukin-1 and interleukin-6; *Immunobiology* 1993 ; **187**: 317-329.
12. Butt, A., Jones, H.C., and Abbot, N.J., Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study; *J. Physiol.* 1990; **429**: 47-62.
13. Burkhardt, F., Mikrobiologische Diagnostik; Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1992.
14. Cartwright, K.A., Stuart, J.M., Jones, D.M., and Noah N.D., The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*; *Epidemiol. Infect.* 1987; **99**: 591-601.
15. Christodoulides, M., Makepeace B.L., Partridge, K.A., Kaur, D., Fowler, M.I., Weller, R.O., and Heckels, J.E., Interaction of *Neisseria meningitidis* with Human Meningeal Cells Induces the Secretion of a Distinct Group of Chemotactic, Proinflammatory, and Growth-Factor Cytokines; *Infection and Immunity* 2002; **70**: 4035-4044.
16. Coen, P.G., Cartwright, K., and Stuart J., Mathematical modelling of infection and disease due to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*; *Int. J. Epidemiol.* 2000; **29**: 180-188.
17. Dankesreiter, S., Hoess, A., Schneider-Mergener, J., Wagner, H., and Miethke, T., Synthetic endotoxin-binding peptides block endotoxin-triggered TNF-alpha-production by macrophages in vitro and in vivo and prevent endotoxin-mediated toxic shock; *J Immunol* 2000 ; **164** : 4804-4811.
18. Deghmane A.-E., Giorgini, D., Laribbe, M., Alonso, J.-M., and Taha, M.-K.; Downregulation of pili and capsule of *Neisseria meningitidis* upon contact with epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein; *Molecular Microbiology* 2002 **43**: 1555-1564.
19. Diermayer, M., Hedberg, K., Hoesly, F.C., et al., Epidemic disease in Oregon: the evolving epidemiology of the ET-5 strain. *JAMA* 1999; **281**: 1493-1497.
20. Dinarello, C.A., The proinflammatory cytokines IL-1 and TNF- α and treatment of the septic shock syndrome, *J Inf Dis* 1991; **163**: 1177-1184.

21. van Damme, J., Interleukin-8 and related molecules In: Thomson AW., ed. The cytokine handbook, London: Academic Press 1991: 201-214.
22. van Deuren, M., van der Ven-Jongekrijg, J., Bartelink, A.K., van Dalen, R., Sauerwein, R.W., and van der Meer, J.W., Correlation between proinflammatory cytokines and antiinflammatory mediators and the severity of disease in meningococcal infections; *J Inf Dis* 1995; **172**: 433-439.
23. Fabry, Z., Topham, D.J., Fee, D., Herlein, J., Carlino, J.A., Hart, M.N., and Sriram, S., TGF – beta 2 decreases migration of lymphocytes *in vitro* and homing of cells into the central nervous system *in vivo*; *J. Immunol.* 1995; **155**: 325.
24. Fischer, M. and Perkins, B.A., *Neisseria meningitidis* serogroup B: emergence of the ET-5 complex; *Semin Pediatr Infect Dis* 1997; **8**: 50-56.
25. Frasch, C.E., Vaccines for prevention of meningococcal disease; *Clin. Microbiol. Rev.* 1989; **2**: 134-138.
26. Galla, H.-J., Migration von immunkompetenten Zellen über die BHS *in vitro*; Sonderforschungsbereich 293 Uni Münster 1997-1998.
27. Gimbrone, M.A., Obin, M.S., Brock, A.F., Luis, E.A., Haas, P.E., Hebert, C.A., Yip, Y.K., Leung, D.W., Lowe, D.G., Kohr, W.J., Darbonne, W.C., Bechtol, K.B., and Baker, J.B., Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions; *Science* 1989; **246**: 1601-1603.
28. Giroir, B.P., Quint, P.A., Barton, P., Kirsch, E.A., Kitchen, L., Goldstein, B., Nelson, B.J., Wedel, N.J., Carroll, S.F., and Scannon, P.J., Preliminary evaluation of recombinant amino-terminal fragment of human bactericidal/permeability-increasing protein in children with severe meningococcal sepsis; *Lancet* 1997; **350**: 1439-1443.
29. Gold, R., Goldschneider I., Lepow, M.L., Draper, T.F., and Randolph, M., Carriage Of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children; *J. Inf. Dis.* 1978; **137**: 112-121.
30. Goldschneider, I., Gotschlich, E.C, and Artenstein, M.S.; Human Immunity to the meningococcus, I. The role of humoral antibodies, II. Development of natural immunity; *J Exp Med* 1969; **129**: 1307-1348.

31. Gotschlich E.C., Liu, T.Y., and Artenstein M.S., Human immunity to the meningococcus, Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides; *J Exp Med* 1969 ; **129** : 1349-1365.
32. Grimwald et al., Adverse outcomes of bacterial meningitis in school-age survivor; *Pediatrics* 1995; **95**: 646-656.
33. Hammerschmidt, S., Muller, A., Sillmann, H., Muhlenhoff, M., Borrow, R., Fox, A., van Putten, J., Zollinger, W.D., Gerardy-Schahn, R., and Frosch, M., Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease; *Mol. Microbiol.* 1996; **20**: 1211-1220.
34. Harvey, D. et al.; Bacterial meningitis in the newborn: a prospective study of mortality and Morbidity; *Semin Perinatol* 1999; **23**: 218-225.
35. Holten, E., Serotypes of *Neisseria meningitidis* isolated from patients in Norway during the first six months of 1978; *J.Clin. Microbiol.* 1979; **9**: 186-188.
36. Hurley, J.C., Endotoxaemia: methods of detection and clinical correlates; *Clin Microbiol Rev* 1995; **8**: 268-292.
37. Joachimski Felix, Blut-Hirn-Schranke, 1998, unveröffentlicht.
38. Kim, J.J., Mandrell, R.E., and Griffiss J.M., *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis* share lipooligosaccharide epitopes but lack common capsular and class 1, 2 and 3 protein epitopes; *Infect. Immun.* 1989; **57**: 602-608.
39. Kornelisse, R.F., de Groot, R., and Neijens, H.J., Bacterial meningitis: mechanisms of disease and therapy; *Eur J Pediatr* 1995; **541**: 85-96.
40. Kolb-Mäurer, A., Unkmeir, A., Kämmerer, U., Hübner, C., Leimbach, T., Stade, A., Kämpgen, E., Frosch, M., and Dietrich, G., Interaction of *Neisseria meningitidis* with Human Dendritic cells; *Infection and Immunity* 2001; **69**: 6912-6922
41. Kremastinou, J., Tzanakaki, G., Pagalis, A., Theodoudou, M., Weir, D.M., and Blackwell, C.C, Detection of IgG and IgM to meningococcal outer membrane proteins in relation to carriage of *Neisseria meningitidis* or *Neisseria lactamica*; *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1999; **24**: 73-78.

-
42. Kremastinou, J., Tzanakaki, G., Velonakis, E., Voyiatzi, A., Nickolaou, A., Elton, R.A., Weir, D., and Blackwell, C., Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* among ethnic Greek school children from Russian immigrant families in Athens; *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1999; **23**: 13-20.
 43. Lapinet, J.A., Scapini, P., Calzetti, F., Perez, O., and Cassatella, M.A., Gene Expression and production of TNF- α , IL-1 β , IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β and gamma Interferon inducible Protein 18 by Human Neutrophils stimulated with Group B Meningococcal outer Membrane Vesicles; *Infection and Immunity*, .2000; **68**: 6917-6923.
 44. Leib, S.L. and Täuber, M.G., Pathogenesis of bacterial meningitis; *Infect Dis Clin North Am* 1999; **13**: 527-548.
 45. Leib, S.L. and Täuber, M.G., Suche nach Strategien zur Verhinderung des Hirnschadens als Folge von bakterieller Meningitis; *Schweiz. Med. Wochenschau* 2000; **130**: Nr. 24.
 46. Levin, M., Quint, P.A., Goldstein, B., Barton, P., Bradley, J.S., Shemie, S.D., Yeh, T., Kim, S.S., Cafaro, D.P., Scannon, P.J., and Giroir, B.P., Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI21) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis: a randomised trial. RBPI21 Meningococcal Sepsis Study Group. *Lancet* 2000 ; **356** : 961-967.
 47. Lorenzen, D.R., Düx, F., Wölk, U., Tsirpouchtsidis, A., Haas, G., and Meyer, T.F., Immunoglobulin A1 Protease, an Exoenzyme of Pathogenic Neisseriae, is a Potent Inducer of Proinflammatory cytokines; *J Exp Med*; 1999; **190** : 1049-1058.
 48. Macvilay, S. and Fabry Z., TGF- β Cytokine Production by Murine Brain Microvessel Endothelial Cells; *Neural Notes* 1997; **111**: 21-23.
 49. Moller, B., Mogensen, S.C., Wendelboe, P., Brentzen, K., and Petersen, C.M., Bioactive and inactive forms of TNF- α in spinal fluid from Patients with meningitis; *J Inf Dis*; 1991; **163**: 886-889.
 50. Mühlhardt, Cornel, Der Experimentator; Molekularbiologie / Genomics, 3. Auflage 2002; Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg.

51. Muenzner, P., Dehio, C., Fujiwara, T., Achtman, M., Meyer, T.F., and Gray-Owen S.D., Carcinoembryonic antigen family receptor specificity of *Neisseria meningitidis* Opa variants influences adherence to and invasion of proinflammatory cytokine-activated endothelial cells; *Infect Immun* 2000 ; **68** : 3601-3607.
52. Nassif, X. Mathison J.C., Wolfson, E., Koziol, J.A., Ulevitch, R.J., and So, M., Tumor necrosis factor alpha antibody protects against lethal meningococcaemia, *Mol Microbiol*, 1992 ; **6**: 591-597 .
53. Nassif, X., Bourdoulous, S., Eugene, E., and Couraud, P.O., How do extracellular pathogens cross the blood-brain-barrier? *Trends in Microbiology* 2002; **10** .
54. Ohga, S., Aoki, T., Okada, K., Akeda, H., Fujioka, K., Oshima, A., Mori, T., Minamishima, I., and Ueda, K, Cerebrospinalfluid concentrations of IL-1 β , TNF- α and IFN- γ in bacterial meningitis; *Arch Dis Child* 1994; **70**: 123-125.
55. Ohga, S., Okada, K., Ueda K., Takada, H., Ohta, M., Aoki, T., Kinukawa, N., Miyazaki, S., and Hara, T., Cerebrospinal fluid cytokine levels and dexamethasone therapy in bacterial meningitis; *J Infect* 1999 ; **39** : 55-60.
56. Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Haley, A.S., and Johnson, K.P., Exacerbations of multiple sclerosis in patients with gamma interferon; *Lancet* 1987; **1**: 893-895.
57. Pron, B., Taha, M.K., Rambaud, C., Fournet, J.C., Pattey, N., Monnet, J.P., et al, Interaction of *Neisseria meningitidis* with the Components of the Blood-Brain-Barrier correlates with an increased expression of PilC *JID* 1997; **176**: 1285-1292.
58. Ramegowda, B., Samuel, J.E., and Tesh, V.L., Interaction of Shiga Toxins with HBMEC: Cytokines as sensitizing agents; *J Inf Dis* 1999; **180**:1205-1213.
59. Roitt, I.M., Brostoff, J.M., and David K., Kurzes Lehrbuch der Immunologie; 3. Auflage; Thieme Verlag.
60. Rosenstein, NE., M.D, Perkins, B.A., M.D., Stephens, D.S., M.D., Popovic, T., PH.D., M.D., and Hughes, J.M., M.D., Meningococcal Disease, *N Engl J Med*, 2001 ; **344**: 1378-1388.
61. Saez Nieto, J.A., Dominguez, J.R., Monton, J.L., Cristobal, P., Fenoll, A., Vazquez, J., Casal, J., and Taracena, B., Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in a school population during an epidemic period in Spain; *J. Hyg.* 1985; **94**: 279-288 .

-
62. Selmaj, K., Pathophysiology of the blood-brain-barrier; *Springer Semin Immunopathol* 1996; **18**: 57-73.
 63. Shalaby, M.R., Waage, A., Aarden, L., and Espevik, T., Endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 induce interleukin-6 production *in vivo*; *Clin Immunol Immunopathol* 1989 ; **53** : 488-498.
 64. Springer, T.A., Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration; *Annu Rev Physiol*, 1995; **57**: 827-872.
 65. Sprong, T., Stikkelbroeck, N., van der Ley, P., Steeghs, L., van Alphen, L., Klein, N., Netea, M.G., van der Meer, J.W.M., and van Deuren, M., Contributions of *Neisseria meningitidis* LPS and non LPS to proinflammatory cytokine response, *Journal of Leukocyte Biology*; 2001; **70**: 283-288.
 66. Steeghs, L., de Cock, H., Evers, E., Zomer, B., Tommassen, J., and van der Ley, P., Outer membrane composition of a lipopolysaccharide-deficient *Neisseria meningitidis* mutant; *The EMBO Journal* 2001; **20**: 6937-6945.
 67. Sticherling, M., Bornscheuer, E., Schröder, J.-M., and Christophers, E., Localization of neutrophil-activating peptide-1/ interleukin-8 immunoreactivity in normal and psoriatic skin; *J. Invest. Dermatol.* 1991; **96**: 26-30.
 68. Stins, M.F., Gilles, F., and Kim, K.S., Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells; *J Neuroimmunol* 1997; **76**: 81-90.
 69. Stins, M.F., Badger, J., and Kim, K.S., Bacterial Invasion and transcytosis in transfected HBMEC; *Microbial Pathogenesis* 2001; **30**: 19-28.
 70. Troncoso, G., Sanchez, S., Moreda, M., Criado, M.T., and Ferreiros, C.M., Antigenic cross-reactivity between outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species; *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2000; **27**: 103-109.
 71. Unkmeir, A., Latsch, K., Dietrich, G., Wintermeyer, E., Schinke, B., and Schwender, S., Fibronectin mediates Opc- dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in HBMEC; *Molecular Microbiology* 2002; **46**: 933-946.
 72. Virji, M., Kayhty, H., Ferguson, D.J.P., Heckels, J.E., and Moxon E.R., The role of pili in the interactions of pathogenic *Neisseria* with cultured human endothelial cells; *Mol. Microbiol.* 1991; **5**: 1831-1841.

-
73. Waage, A., Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P., and Espevik, T., The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock, association between interleukine-6, interleukine-1 and fatal outcome, *J Exp Med* 1989 Jan 1; **169** : 333-338.
 74. Waage, A., Halstensen, A., Shalaby, R., Brandzaeg, P., Kierulf, P., and Espevik, T., Local production of TNF- α , IL-1 and IL-6 in meningococcal meningitis; Relation to the inflammatory response; *J Exp Med* 1989; **170**:1859-1867.
 75. Weckerle H., Linington, C., Lassmann, H., and Meyermann, R., Cellular immune reactivity within the CNS; *Trends Neurosci* 1986; **9**: 271-277.
 76. Ziegler, E.J., Fisher, C.J. Jr., Sprung, C.L., Straube, R.C., Sadoff, J.C., Foulke, G.E., Wortel, C.H., Fink, M.P., Dellinger, R.P., and Teng, N.N., Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double blind, placebo controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group; *N Engl J Med* 1991; **324**: 429-436.
 77. Zorgani, A.A., James, V.S., Stewart, J., Blackwell, C.C., Elton, R.A., and Weir, D.M., Serum bactericidal activity in a secondary school population following an outbreak of meningococcal disease: effects of carriage and secretor status; *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996; **14**: 73-81.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AFC	Antikörper formierende Zellen
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
d	wechselnder Ausfall
DIC	Disseminierte Intravasale Koagulation
DMEM	Dulbecco's modified Eagles Medium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen Diamino Tetraacetic Acid Dinatriumsalz
EGF	Epidermall growth factor
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ermC	Erythromycin C
ET	Elektrophoresetyp
EZF	Extrazelluläre Flüssigkeit
FCS	Fetales Kälberserum
FN	Fibronektin
G	Gasbildung
GC-Agar	Gonokokken-Agar
GEBS	Glycerin EDTA Bromphenolblau N-Lauroylsarkosine
GGTP	Gammaglutamyltranspeptidase
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen koloniestimulierender Faktor
HBMEC	Human Brain Microvascular Endothelial Cells
HS	Humanes Serum
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDA	kilo Dalton
LDL	Low Density Lipoprotein
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
MC	Meningococcus

MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NGF	Nerve Growth Factor
OD	Optische Dichte
OMP	Outer Membrane Protein
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PC	Plexus Choroidei
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PenG	Penicillin G
PNG	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PPM	Proteose Pepton Medium
RANTES	Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted protein
rhu	recombinanes humanes
rpsL	Streptomycin
rRNA	ribosomale RNA
ST	Sequenztyp
Strep	Streptomycin
TEER	Trans-Endothelial Electric Resistance
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
VCAM	Vasculäres Adhäsionsmolekül
ZNS	Zentrales Nerven System

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab.1:	Biochemische Unterscheidung der humanen Neisseria Arten [13]	5
Tab.2:	Zusammensetzung der Kapselpolysaccharide von <i>Neisseria meningitidis</i> [10]	6
Tab.3:	Funktion und Klassifizierung der Außenmembranproteine von <i>Neisseria meningitidis</i> [60]	7
Tab.4:	Geographische Verteilung der Serogruppen von <i>Neisseria meningitidis</i>	10

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Aktiviert T-Lymphozyten durchbrechen die Wand von Hirngefäßen [Weckerle et al.1986]	16
Abb.2	Aufbau des Western-Blot Sandwiches	40
Abb.3	Darstellung der Adhärenz- und Invasionswerte von MC58* an HBMEC in RPMI	42
Abb.4	Darstellung der Adhärenz- und Invasionswerte von MC58 <i>siaD</i> an HBMEC in RPMI	43
Abb.5	Darstellung der Adhärenz- und Invasionswerte von MC58* an HBMEC in RPMI mit 10%HS	44
Abb.6	Darstellung der Adhärenz- und Invasionswerte von MC58 <i>siaD</i> an HBMEC in RPMI mit 10%HS	44
Abb.7	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines adhärennten MC58* an HBMEC	45
Abb.8	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines invasiven MC58* an HBMEC	45
Abb.9	Kinetik einer induzierten Zytokinexpression in mit <i>Neisseria meningitidis</i> infizierten HBMEC	47
Abb.10	Freisetzung von TNF- α durch HBMEC nach Infektion mit MC58*, MC58 <i>siaD</i> und ohne Infektion	49
Abb.11	Freisetzung von IL-1 β durch HBMEC nach Infektion mit MC58*, MC58 <i>siaD</i> und ohne Infektion	50
Abb.12	Freisetzung von IL-6 durch HBMEC nach Infektion mit MC58*, MC58 <i>siaD</i> und ohne Infektion	50
Abb.13	Freisetzung von IL-8 durch HBMEC nach Infektion mit MC58*, MC58 <i>siaD</i> und ohne Infektion	51
Abb.14	Freisetzung von MCP-1 durch HBMEC nach Infektion mit MC58*, MC58 <i>siaD</i> und ohne Infektion	51
Abb.15	Freisetzung von TGF- β durch HBMEC nach Infektion mit MC58*, MC58 <i>siaD</i> und ohne Infektion	52
Abb.16	Darstellung der Adhärenz und Invasion von MC58* und MC58 <i>siaD</i> bei HBMEC nach Vorbehandlung mit IL-6 bzw. IL-8	53
Abb.17	Darstellung der Adhärenz und Invasion von MC58* und MC58 <i>siaD</i> bei HBMEC nach Vorbehandlung mit TNF-a	54
Abb.18	Darstellung der IL-8 Freisetzung aus mit MC58* und MC58 <i>siaD</i> infizierten bzw. Uninfizierten HBMEC nach Vorbehandlung mit Cytochalasin D im Vergleich zu unvorbehandelten Zellen	55

Abb.19	Darstellung der IL-6 Freisetzung aus mit MC58* und MC58 <i>siaD</i> infizierten bzw. Uninfizierten HBMEC nach Vorbehandlung mit Cytochalasin D im Vergleich zu unvorbehandelten Zellen	56
Abb.20	Westernblot der HBMEC-Lysate zum Nachweis des $\alpha_5\beta_1$ (FN) Rezeptors	57
Abb.21	Darstellung der IL-8 Freisetzung mit und ohne $\alpha_5\beta_1$ Integrin blocking Antikörper	58
Abb.22	Darstellung der IL-6 Freisetzung mit und ohne $\alpha_5\beta_1$ Integrin blocking Antikörper	59
Abb.23	Darstellung der IL-6 Freisetzung durch HBMEC nach Zugabe von 10, 100 und 500 μ g OMP/ml	60
Abb.24	Darstellung der IL-8 Freisetzung durch HBMEC nach Zugabe von 10, 100 und 500 μ g OMP/ml	61
Abb.25	Darstellung der Infektionskinetik des Meningokokkenstammes H44/76 im Vergleich zu seiner LPS defizienten Mutante H44/76 <i>lpx</i>	62
Abb.26	Darstellung des Infektionsversuchs im Transwell	63
Abb.27	Darstellung der IL-6 Freisetzung durch HBMEC nach Transwell-Infektion mit MC58* und MC58 <i>siaD</i> im Vergleich zur IL-6 Freisetzung herkömmlicher Infektionsversuche	64
Abb.28	Darstellung der IL-8 Freisetzung durch HBMEC nach Transwell-Infektion mit MC58* und MC58 <i>siaD</i> im Vergleich zur IL-8 Freisetzung herkömmlicher Infektionsversuche	64