

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktorin: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich

**Rolle von S100A8/A9 in der Immunpathogenese der  
Pneumokokkenmeningitis**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Christina Wache  
aus Lutherstadt Wittenberg

2015

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Uwe Ködel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Haas  
PD Dr. med. Bianca Schaub  
Prof. Dr. med. Andreas Holzinger  
Prof. Dr. med. Hans-Walter Pfister

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR,  
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2015

*Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie der bakteriellen Meningitis	1
1.2 Klinische Komplikationen der Pneumokokkenmeningitis	2
1.3 Kurzer Überblick zur Pathogenese und Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis	3
1.3.1 Invasion des Liquorraums	3
1.3.2 Aktivierung des Immunsystems	3
1.3.3 Körpereigene und Erreger-abhängige Gewebeschädigung	4
1.3.4 <i>Circulus vitiosus</i> pathophysiologischer Veränderungen	6
1.4 Rolle endogener Alarmsignale	7
1.5 Mögliche Rolle von S100A8/A9 in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis	8
1.6 Nomenklatur der S100-Proteine	8
1.7 Stammbaum der S100-Proteine	8
1.8 Funktionen von S100-Proteinen	10
1.8.1 Intrazelluläre Funktionen	11
1.8.2 Extrazelluläre Funktionen	13
1.9 Freisetzung von S100-Proteinen	15
1.10 Beteiligung von S100-Proteinen bei Erkrankungen außerhalb des ZNS	16
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>19</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1 Genehmigung der Regierung von Oberbayern	21
3.2 Tiermodell der Pneumokokkenmeningitis	21
3.2.1 Versuchsgruppen	23
3.2.2 Versuchsablauf	28
3.2.2.1 Klinische Beurteilung der Mäuse	28
3.2.2.1.1 Beam Balancing Test	28
3.2.2.1.2 Postural Reflex Test	29

3.2.2.1.3 Beurteilung von Fellstatus und Vigilanz	29
3.2.2.1.4 Ermittlung der Körpertemperatur	29
3.2.2.1.5 Open Field Test	29
3.2.2.1.6 Erfassung möglicher Belastungszeichen	29
3.2.2.2 Liquor- und Blutzellzahlbestimmung	30
3.2.2.3 Herstellung von Liquor- und Blutproben	30
3.2.2.4 Bestimmung der bakteriellen Titer in Blut und Hirn	30
3.2.3 Analyse der Integrität der Blut-Hirn-Schranke	31
3.2.4 Bestimmung des Ventrikelvolumens und Quantifizierung der zerebralen Einblutungen	32
3.2.5 Nachweis von apoptotischem Zelltod	33
3.2.6 Immunhistochemischer Nachweis von S100A8/A9	33
3.2.7 Reinigung von S100A8, S100A9 und S100A8/A9	34
3.2.8 Messung der CXCL-2- und S100A8/A9-Konzentrationen	34
3.3 Zellkulturversuche	34
3.3.1 ER-Hoxb8-Granulozyten	35
3.3.1.1 Kultivierung der Vorläuferzellen	35
3.3.1.2. Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen	36
3.3.2 Murine Knochenmarks-Granulozyten	36
3.3.3. Murine Knochenmarks-Makrophagen	37
3.3.4 Stimulation mit verschiedenen <i>Streptococcus pneumoniae</i> -Stämmen	38
3.3.5 Photometrische Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH)	39
3.3.6 Testverfahren zur Bestimmung der Hämolyse	39
3.3.7 Western Blot-Analyse von S100A8 und S100A9	40
3.4 Humane Liquorproben	41
3.5 Statistische Analyse	41
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>42</b>
4.1 Untersuchungen zur Expression von S100A8/A9 bei der Pneumokokkenmeningitis	42
4.1.1 S100A8/A9-Freisetzung in den Liquor während der Pneumokokkenmeningitis	42

4.1.2 Zelluläre Quellen von S100A8/A9 bei der Pneumokokkenmeningitis	44
4.2 S100A8/A9 wird Pneumolysin (PLY)-abhängig aus nekrotischen neutrophilen Granulozyten freigesetzt	45
4.3 S100A8/A9 verstärkt die Entzündungsreaktion unter antibiotischer Therapie	50
4.4 Extrazelluläres S100A8/A9 ist ein entscheidender Faktor für die Wirkung bei der Pneumokokkenmeningitis	56
4.5 Wirkmechanismus von extrazellulärem S100A8/A9 bei der Pneumokokkenmeningitis	58
4.6 S100A8/A9 könnte ein Angriffsziel für eine adjuvante Behandlungsmaßnahme bei der Pneumokokkenmeningitis sein	63
<b>5. Diskussion</b>	<b>65</b>
5.1 Charakterisierung der Freisetzung von S100A8/A9 im Krankheitsverlauf der Pneumokokkenmeningitis	66
5.2 Bedeutung von S100A9 bei der Pneumokokkenmeningitis	69
5.3 Wirkmechanismen von S100A8/A9 bei der Pneumokokkenmeningitis	71
5.4 Einordnung von S100A8/A9 in das derzeit gültige Konzept zur Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis	74
5.5 S100A9: Mögliches Ziel für eine adjuvante Behandlung der Pneumokokkenmeningitis	76
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>7. Ausblick</b>	<b>81</b>
<b>8. Quellenverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b>	<b>86</b>
<b>10. Danksagung</b>	<b>104</b>
<b>11. Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>106</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Epidemiologie der bakteriellen Meningitis**

Im Jahre 1806 beschrieb der Schweizer Arzt Gaspard Vieusseux erstmals das Krankheitsbild der bakteriellen Meningitis (Tyler, 2010). Bis zur Einführung der Antibiotika in den 30er und 40er Jahren des 20. Jahrhunderts verliefen die meisten Fälle tödlich (Toomey und Roach, 1939). Obwohl Antibiotika wie Sulfonamide und Penicillin die bakterielle Meningitis heilbar gemacht haben und die intensivmedizinische Betreuung sich stetig verbessert, bleiben sowohl Letalität als auch die Häufigkeit von Folgeschäden dieser Erkrankung unannehmbar hoch (Koedel et al., 2002). Erregerspektrum und Inzidenz der akuten bakteriellen Meningitis hängen vom Alter des Patienten ab. Menschen unter 5 Jahren und über 60 Jahren sind am häufigsten von Neuerkrankungen betroffen (Schuchat et al., 1997). Die häufigsten Erreger außerhalb der Neonatalperiode sind *Streptococcus pneumoniae* mit einer Letalität von 20-30% und *Neisseria meningitidis* mit 10% (de Gans und van de Beek, 2002; Auburtin et al., 2006). In den letzten 20 Jahren ließen sich wesentliche Veränderungen in der Epidemiologie der bakteriellen Meningitis erkennen. Die Inzidenz der durch *Haemophilus influenzae* Typ B verursachten Meningitiden sank in den USA und Westeuropa durch die Einführung eines konjugierten Impfstoffs für Kinder Anfang der 90er Jahre drastisch (Schuchat et al., 1997; Dawson et al., 1999; Thigpen et al., 2011). In diesen Ländern ist die bakterielle Meningitis nunmehr hauptsächlich eine Erkrankung des Erwachsenenalters (Koedel et al., 2002). Durch die Zulassung eines heptavalenten Pneumokokken-Konjugat-Impfstoffs (PCV 7) kam es in Ländern mit hoher Durchimpfungsrate auch zur Abnahme der durch Pneumokokken verursachten Meningitiden (Progress in introduction of pneumococcal conjugate vaccine-worldwide, 2008; Hsu et al., 2009; Ruckinger et al., 2009). Ein weiterer Trend ist die Zunahme Antibiotika-resistenter Stämme. In Süd- und Osteuropa liegen die Raten Penicillin-resistenter Pneumokokken zwischen 25% und 50%, während der Anteil in Nord- und Mitteleuropa unter 5% beträgt (Cohen, 1997; Hoban et al., 2001; van de Sande-Bruinsma et al., 2008). Diese Divergenz lässt sich im Wesentlichen durch den unterschiedlichen Einsatz von Breitspektrumantibiotika erklären (Goossens et al., 2005).

## **1.2 Klinische Komplikationen der Pneumokokkenmeningitis**

Neurologische und neuropsychologische Langzeitfolgen betreffen bis zu 50% der Überlebenden (Schmidt et al., 2006; Ramakrishnan et al., 2009; Jit, 2010). Einen ungünstigen Verlauf nimmt die Erkrankung vor allem durch intrakranielle Komplikationen wie Hirnödem, zerebraler Gefäßbeteiligung, erhöhter intrakranieller Druck und Hydrozephalus (Koedel et al., 2010). In einer Studie zum Spektrum der Komplikationen einer Pneumokokkenmeningitis untersuchten Kastenbauer und Pfister 87 Patienten (Kastenbauer und Pfister, 2003). Intrakranielle Komplikationen traten in 74,7% der Fälle auf. Bei 27,6% der Patienten kam es zu Krämpfen. Zerebrovaskuläre Komplikationen zeigten sich in 21,8% der Fälle arteriell und in 10,3% venös. Zu einem diffusen Hirnödem kam es in 28,7%, zu einem Hydrozephalus in 16,1% und zu spontanen intrakraniellen Blutungen in 9,2% der Fälle. 19,5% der Patienten erlitten einen Hörschaden. In 4,6% der Fälle traten Hirnnervenlähmungen auf. Seltener Komplikationen waren Myelitis und Cerebritis. Die Mortalitätsrate betrug 24,1%. Nur 48,3% der Patienten konnten bei guter Gesundheit nach Hause entlassen werden (Kastenbauer und Pfister, 2003). Ferner entwickelten 37,9% der Patienten systemische Komplikationen. Dazu gehören septischer Schock, disseminierte intravasale Gerinnung, Nierenversagen und ARDS (*acute respiratory distress syndrome*). Zu ähnlichen Resultaten kommt eine Studie von van de Beek et al. (2004), die von Oktober 1998 bis April 2002 696 niederländische Patienten mit ambulant erworbener akuter bakterieller Meningitis, die durch Liquorkulturen nachgewiesen wurde, prospektiv evaluierte. Bei Aufnahme zeigten sich 14% der Patienten komatös und 33% hatten fokalneurologische Defizite. Die Sterblichkeitsrate betrug insgesamt 21% und war bei Patienten mit Pneumokokkenmeningitis (30%) höher als bei Patienten, die an einer Meningokokkenmeningitis litten (7%). In 34% der Fälle kam es zu einem ungünstigen Verlauf der Erkrankung mit Folgekomplikationen wie Hörverlust (14%), Aphasie (2%), Hirnnervenlähmungen (5%) oder Hemiparesen (4%). Risikofaktoren dafür waren unter anderem ein höheres Alter des Patienten, Otitis oder Sinusitis, ein niedriger Scorewert auf der *Glasgow Coma Scale* bei Aufnahme, Tachykardie, positive Blutkulturen und Thrombozytopenie (van de Beek et al., 2004).

## **1.3 Kurzer Überblick zur Pathogenese und Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis**

### **1.3.1 Invasion des Liquorraums**

Die bakterielle Infektion des Liquorraums ist Auslöser einer purulenten Meningitis. Es gibt für die Erreger unterschiedliche Wege, um in den Liquorraum zu gelangen: auf dem Blutweg (hämatogene Meningitis), von einem in der Nähe gelegenen Infektionsherd (Durchwanderungsmeningitis) oder durch direkte Infiltration bei offenem Schädel-Hirn-Trauma (Koedel, 2009). Der Liquorraum weist in immunologischer Hinsicht einige besondere Merkmale auf (Niederkorn, 2006). Durch die geringe Anzahl immunkompetenter Zellen ist er besonders anfällig für eindringende Erreger. Polymorphkernige Leukozyten, Immunglobuline und Komplementfaktoren sind so gut wie abwesend (Scheld, 1984). Die Blut-Hirn-Schranke isoliert den Liquorraum vom zirkulierenden Blut und erschwert den Übertritt von Blutbestandteilen (Pachter et al., 2003). Außerdem besitzt die zerebrospinale Flüssigkeit eine große Anzahl anti-inflammatorischer und immunsuppressiver Substanzen, die die Immunantwort aktiv unterdrücken können (Niederkorn, 2006). So können sich die Erreger zunächst ungehindert vermehren.

### **1.3.2 Aktivierung des Immunsystems**

Erreichen die Bakterien eine gewisse Dichte, werden sie schließlich durch Nährstoffmangel zur Autolyse gezwungen (Lewis, 2000). Dabei werden Bakterienbausteine (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) frei, deren Präsenz durch Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, *pattern recognition receptors*), die sich auf und in Immunzellen befinden, detektiert werden. Zu diesen Mustern gehören bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipoteichonsäure, Peptidoglykan, oder der zytolytische Virulenzfaktor Pneumolysin (PLY). An der Erkennung dieser Bestandteile sind sowohl *toll-like-* (TLR2 und TLR4) als auch *NOD-like*-Rezeptoren (*nucleotide-binding oligomerization domain receptors*) beteiligt (Echchannaoui et al., 2002; Koedel et al., 2003; Klein et al., 2008). Das Zusammenspiel zwischen PRRs und PAMPs führt über das Adaptermolekül MyD88 (Koedel et al., 2004) zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Aktivatorprotein AP-1 (Tsuchiya et al., 2007) und Nuklearfaktor NF-κB (Koedel et al., 2000). Diese regulieren die Expression pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1), Chemokine (CXCL-1, CXCL-2, CXCL-8) und Christina Wache, 2015

Adhäsionsmoleküle (Koedel et al., 2002; Nau und Bruck, 2002; Weber und Tuomanen, 2007). Durch das Zusammenwirken dieser Immunmediatoren wandern Leukozyten in den Liquorraum ein. Zudem wird die intrazerebrale Expression von Komplementfaktoren für die Opsonophagozytose über einen MyD88-abhängigen Signalweg hochreguliert (Koedel et al., 2004; Rupprecht et al., 2007). Die Bekämpfung der Erreger im Liquorraum funktioniert jedoch nur eingeschränkt, die Pathogene können nur teilweise eliminiert werden (Ernst et al., 1983). Dadurch können die Bakterien im Liquorraum sehr hohe Konzentrationen erreichen, was letztendlich die ausgeprägte Entzündungsreaktion bei der Pneumokokkenmeningitis bedingt.

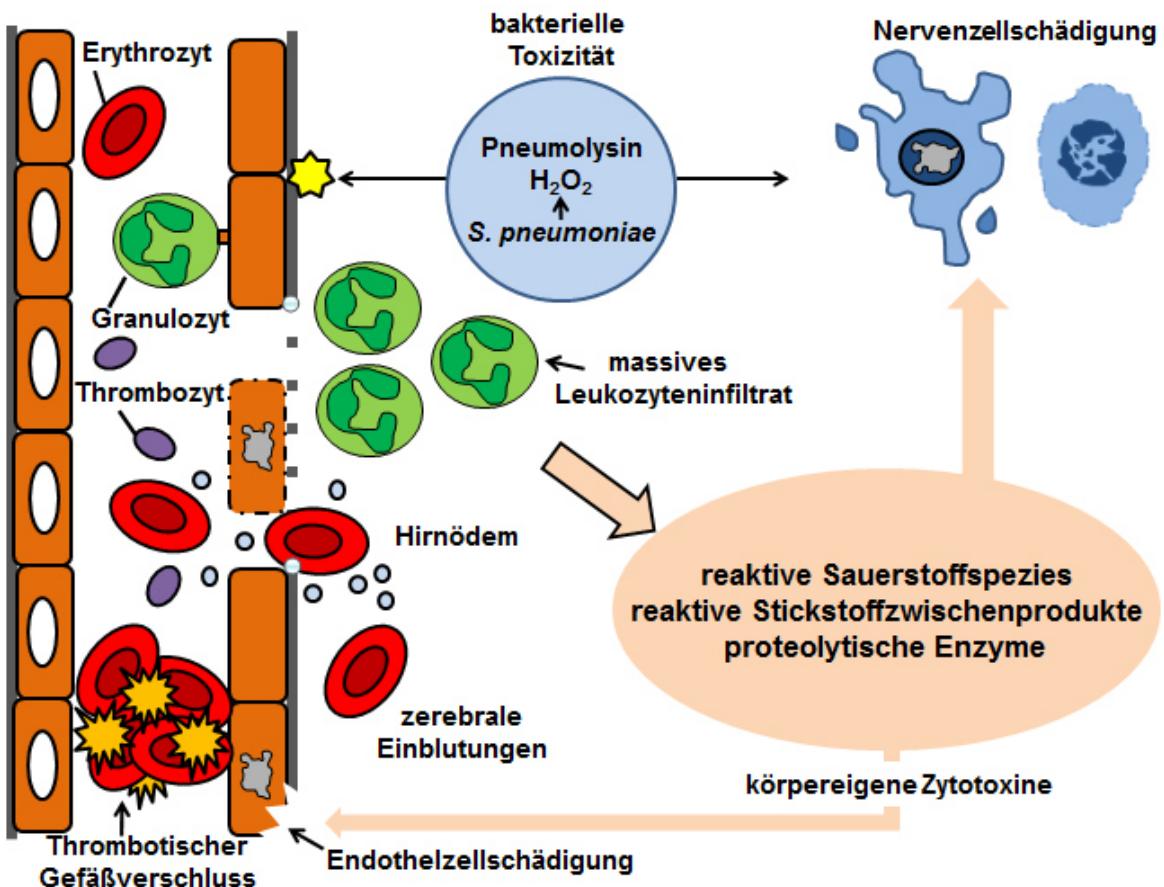
### **1.3.3 Körpereigene und Erreger-abhängige Gewebeschädigung**

Die für die Pneumokokkenmeningitis typischen Pathologien werden vor allem von der massiven, von Neutrophilen beherrschten Immunantwort hervorgerufen (Koedel et al., 2010; Mook-Kanamori et al., 2011).

Die Immunantwort aktiverter Neutrophiler besteht unter anderem darin, starke Oxidantien wie Peroxynitrit freizusetzen. Deren zytotoxische Effekte haben verheerende Folgen auf zerebrales Gewebe (Klein et al., 2006). Eine weitere Waffe dieser neutrophilen Granulozyten sind Granula, die proteolytische Enzyme freisetzen, wie z.B. Matrixmetalloproteininasen (Koedel et al., 2010). Laut Studien mit pharmakologischen Hemmstoffen scheinen diese Proteininasen zum neuronalen Schaden und dem Aufbrechen der Blut-Hirn-Schranke beizutragen (Leib et al., 2000). Ein weiterer Faktor, der entscheidend zum Ausmaß des neuronalen Schadens beiträgt, ist die Toxizität des Erregers. Der zytotoxische Virulenzfaktor Pneumolysin scheint hier eine wichtige Rolle zu spielen und wird in fast allen klinischen Isolaten von *Streptococcus pneumoniae* gefunden. Infiziert man Mäuse mit PLY-defizienten Pneumokokken-Stämmen, kommt es zu signifikant geringeren neuronalen Schäden (Braun et al., 2002; Hirst et al., 2008). Zudem war die Persistenz hoher PLY-Spiegel im Liquor von Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis mit einer ungünstigen Prognose der Erkrankung vergesellschaftet (Wall et al., 2012). Wichtigste Voraussetzung für die Freisetzung von Pneumolysin ist wahrscheinlich die Fähigkeit des Bakteriums zur Autolyse (Hirst et al., 2004). Zu Beginn der Entzündung, in der Pneumolysin noch in geringer Konzentration vorliegt, scheint seine wesentliche Rolle

die Induktion von Apoptose (Braun et al., 2002), die Aktivierung des Komplements (Mitchell et al., 1991) und die Initiierung pro-inflammatorischer Antworten in Immunzellen (Cockeran et al., 2001) zu sein. In hohen Konzentrationen hat Pneumolysin eine lytische Wirkung auf alle Zellen (Abb. 1), deren Membran Cholesterin enthält (Boulnois et al., 1991).

**Abb. 1: Mechanismen Meningitis-assozierter Gewebeschädigung**



**Legende:** Die histopathologischen Merkmale der Pneumokokkenmeningitis umfassen Hirnödem, kortikale Einblutungen, fokale Nekroseherde in kortikalen und subkortikalen Strukturen und neuronale Apoptose im Hippocampus. Studien im Tiermodell haben gezeigt, dass die vaskulären und kortikalen Schädigungen vor allem durch die massive von Neutrophilen ausgehende Entzündungsreaktion entstehen. Diese führt zur Freisetzung zahlreicher körpereigener Zytotoxine, wie Oxidantien und proteolytische Enzyme. Zusätzlich zu entzündungsbedingten Schäden tragen auch zytotoxische Bestandteile von *S. pneumoniae*, wie Pneumolysin oder Wasserstoffperoxid, zur Gewebsverletzung bei (Koedel et al., 2010).

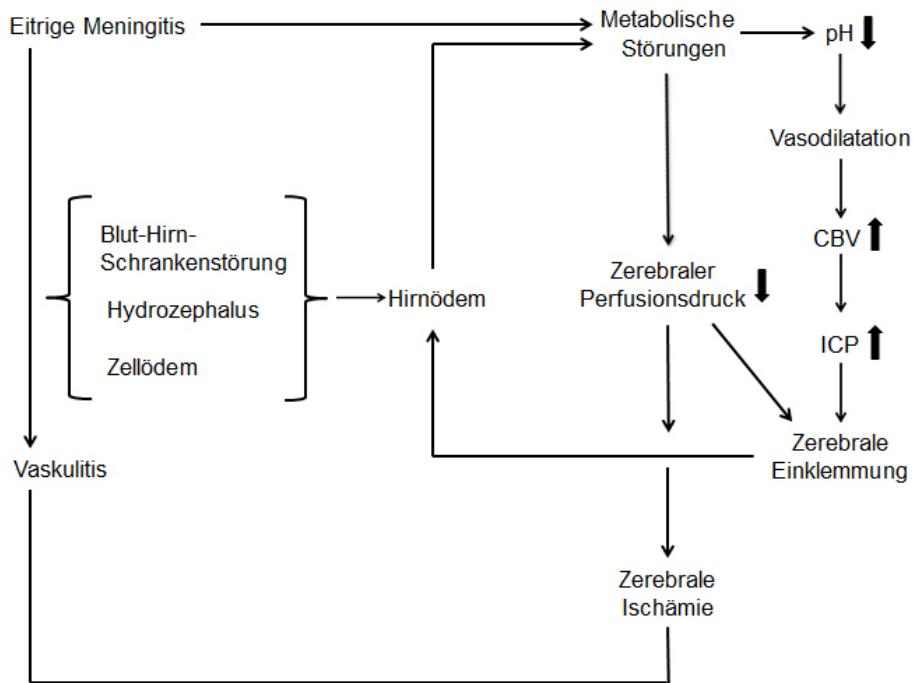
Es gibt Hinweise darauf, dass Pneumokokken, die diesen Virulenzfaktor besitzen, zudem leichter die Blut-Hirn-Schranke überwinden und so Zutritt zum Liquorraum erhalten. Pneumolysin-defiziente Stämme waren *in vitro* nicht in der Lage,

Endothelzell-Barrieren zu durchdringen (Zysk et al., 2001). Auch im Mausmodell zeigten Pneumolysin-negative Mutanten einen abgeschwächten Verlauf der Meningitis (Wellmer et al., 2002; Hirst et al., 2008; Hoegen et al., 2011; Reiss et al., 2011). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl körpereigene als auch bakterielle Toxine zu den typischen neuropathologischen Veränderungen der Pneumokokkenmeningitis wie Hirnödem, Hydrozephalus und zerebrale Gefäßkomplikationen beitragen.

#### **1.3.4 Circulus vitiosus pathophysiologischer Veränderungen**

Durch die in der Entzündung freiwerdenden Proteasen und Oxidantien entstehen endotheliale Zellschäden. Diese führen zu einem Zusammenbruch der zerebrovaskulären Autoregulation, der Reaktivität der zerebralen Gefäße auf CO<sub>2</sub> und der Integrität der Blut-Hirn-Schranke (Abb. 2). Durch den Verlust der Autoregulation kann die Hirnperfusion bei Blutdruckschwankungen nicht mehr konstant gehalten werden. Es kann also beim Anstieg des Blutdrucks zu einem Anstieg der Hirndurchblutung und folglich des intrakraniellen Drucks, bei einem Abfall des Blutdrucks zu Minderperfusionen kommen (Paulson et al., 1974). Durch frei werdende Säuren, wie Lactat oder Pyruvat, steigen die Protonenkonzentrationen an, was wiederum eine Vasodilatation und damit eine Zunahme des zerebralen Blutflusses auslösen kann (Jones et al., 1989). Durch die Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke können Plasmabestandteile in zerebrales Gewebe eindringen und dort ein vasogenes Ödem auslösen (Kempski, 2001). Durch zytotoxische Substanzen von Erreger und Wirt kommt es zum Verlust der Zell-Homöostase und einer Zunahme intrazellulärer Flüssigkeit. Daraus resultieren zytotoxische Ödeme (Braun et al., 2001). Schließlich können auch interstitielle Ödeme entstehen, die auf einer Zunahme des Liquorvolumens beruhen. Durch die entzündeten Arachnoidalzotten kann der Liquor nur noch eingeschränkt oder gar nicht mehr resorbiert werden (Scheld et al., 1980). All diese Mechanismen führen zur Zunahme des intrakraniellen Druckes und halten die pathophysiologischen Veränderungen in einer Art „Teufelskreis“ aufrecht. Durch den erhöhten Druck kann es zu zerebralen Einklemmungen oder aber auch zur Minderperfusion des Gehirns bis hin zum Schlaganfall kommen (Koedel et al., 2002).

**Abbildung 2: Circulus vitiosus der Meningitis**



**Legende:** Mechanismen der Entstehung zerebraler Sekundärschäden bei der bakteriellen Meningitis. CBV: cerebrales Blutvolumen; ICP: intrakranieller Druck (auf der Grundlage von Pfister, 1989)

#### 1.4 Rolle endogener Alarmsignale

In den letzten Jahren wurde in neurowissenschaftlichen Studien zunehmend deutlich, dass Entzündungsreaktionen an zerebralen Schädigungen im Rahmen nicht-infektiöser Erkrankungen beteiligt sind. Als Auslöser dieser nicht-infektiösen Entzündungsreaktionen werden sogenannte endogene Alarmsignale, im englischen Sprachgebrauch auch als *damage associated molecular patterns* (DAMPs) bezeichnet, angesehen (Bianchi, 2007; Chan et al., 2012). Endogene Alarmsignale werden aus geschädigtem Gewebe freigesetzt und besitzen pro-inflammatorische Aktivität. Überdies können diese Moleküle auch von Makrophagen und Granulozyten aktiv „sezerniert“ werden. Dies geschieht beispielsweise nach Kontakt mit Entzündungstimulatoren wie Lipopolysaccharide oder Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Interferon- $\gamma$ ) (Voganatsi et al., 2001; Ryckman et al., 2003; Dumitriu et al., 2005). Zur Gruppe der DAMPs gehören verschiedene Moleküle, wie z.B. Hitzeschockproteine, Harnsäurekristalle, HMGB-1 (*high mobility group protein B1*) oder auch S100A8 und S100A9 (Basu et al., 2000; Ishii et al., 2001; Ni et al., 2002; Shi et al., 2003; Foell et al., 2007).

## **1.5 Mögliche Rolle von S100A8/A9 in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis**

In den letzten Jahren häufen sich die Hinweise, dass Proteine aus der S100-Familie, zu denen S100A8 (*Myeloid-related* Protein 8 (MRP 8), auch bekannt als Calgranulin A) und S100A9 (MRP 14, Calgranulin B) gehören, als endogene Alarmsignale wirken können (Chan et al., 2012). S100A8 und S100A9 sind kleine, Kalzium-bindende Proteine, die konstitutiv und in großen Mengen in Neutrophilen und in geringeren Mengen in Monozyten exprimiert werden (Edgeworth et al., 1991).

## **1.6 Nomenklatur der S100-Proteine**

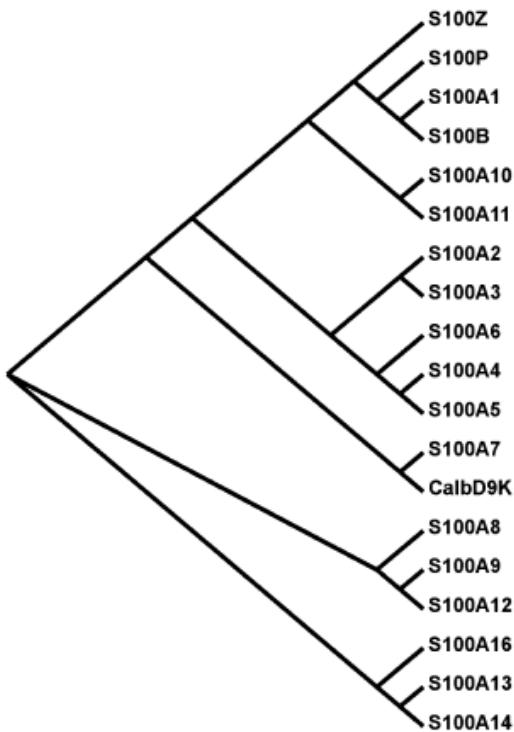
S100-Proteine bilden die größte Subgruppe in der Superfamilie der EF-Hand Proteine. Sie besitzen zwei kalziumbindende EF-Hand-Motive. EF-Hand Proteine binden Kalzium über ein Helix-Loop-Helix-Motiv. Der Name „EF-Hand“ wurde erstmals 1973 formuliert, um das kalziumbindende Motiv von Parvalbumin graphisch zu beschreiben (Kretsinger und Nockolds, 1973; Lewit-Bentley und Rety, 2000). Diese Struktur erinnert an eine greifende Hand, woraus der Name dieser Proteine entstand. Durch die Bindung an Kalzium ändert sich die Konformation des Proteins und damit auch seine Funktion. Namensgeber für S100 ist die 100%ige Löslichkeit in Ammoniumsulfatlösung (100% soluble = S100) (Foell et al., 2004). Erste Mitglieder dieser großen Familie wurden vor mehr als 40 Jahren in Rinderhirnen entdeckt.

## **1.7 Stammbaum der S100-Proteine**

Bis heute sind mehr als 20 Vertreter dieser Proteine beschrieben worden. S100-Proteine sind kleine, saure Proteine mit einer Größe von 10-14 kDa. Viele von ihnen zeigen ein Zell- und Gewebe-spezifisches Expressionsmuster, was auf eine hohe Spezifität hindeutet. Außerdem formen sie Homo-, Hetero- und sogar Oligomere, was zu ihrer funktionellen Diversität beiträgt (Marenholz et al., 2004). Bisher konnten S100-Proteine nur in Wirbeltieren gefunden werden, daher scheint es im Vergleich zu anderen Vertretern wie Troponin C oder Calmodulin eine phylogenetisch junge Gruppe der EF-Hand Proteine zu sein. Trotz ihrer phylogenetisch kurzen Geschichte ist die Diversität der S100-Familie als größte Subgruppe unter den EF-Hand Proteinen schnell gewachsen. Eine Ähnlichkeit von 22% bis 57% in ihren Sequenzen

deutet darauf hin, dass sie sich während ihrer Evolution hoch spezialisieren konnten (Marenholz et al., 2004). Phylogenetische Stammbäume von S100-Proteinen aus Mensch, Maus und Ratte lassen erkennen, dass es vier große Untergruppen in Säugetieren gibt (Abb. 3). Jede dieser Gruppen könnte sich durch multiple Genduplikationen aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein entwickelt haben. Die erste Untergruppe besteht aus S100B, S100A1, S100P und S100Z. S100A2, S100A3, S100A4, S100A5 und S100A6 bilden die zweite Gruppe. Die berechneten phylogenetischen Abstände zwischen den Mitgliedern dieser Gruppe sind am geringsten. Das deutet darauf hin, dass sie evolutionär gesehen am jüngsten sind. Die dritte Gruppe beinhaltet S100A8, S100A9 und S100A12. Diese Proteine befinden sich hauptsächlich im Intrazellulärraum. Unter bestimmten pathologischen Bedingungen, wie z.B. im Verlauf einer Arthritis, kommen sie allerdings auch in hohen Konzentrationen im Extrazellulärraum vor (Frosch et al., 2000; Foell et al., 2004). Dort scheinen sie als chemotaktische Moleküle und Mediatoren proinflammatorischer Signale zu fungieren. Die vierte Untergruppe ist aufgrund ihrer phylogenetischen Distanz facettenreicher als die anderen drei. Sie umfasst die Proteine S100A13, S100A14 und S100A16. Einige S100-Proteine können noch keiner Untergruppe zugeordnet werden. Hierzu gehört beispielsweise S100A7 oder auch Calbindin 3 (Marenholz et al., 2004).

**Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum humaner S100-Proteine**



**Legende (entnommen aus Marenholz et al., 2004):** Es werden keine relativen Abstände zwischen den einzelnen Proteinen gezeigt. Der Stammbaum teilt sich in vier große Äste auf, die sich wiederum in verwandte S100-Proteine aufteilen.

### **1.8 Funktionen von S100-Proteinen**

S100-Proteine nehmen viele verschiedene Funktionen wahr. Sie sind beispielsweise am Zellwachstum, der Zelldifferenzierung, Zellzyklus-Regulation, Transkription und Sekretion beteiligt. Die vielfältigen biologischen Aktivitäten erreichen sie dadurch, dass sie über verschiedene Ionen-bindende Domänen verfügen, in unterschiedlichen Zellkompartimenten und im Extrazellulärtraum vorkommen und miteinander interagieren können. Hervorzuheben sind besonders drei Proteine, die eng mit der angeborenen Immunabwehr verbunden sind: S100A8 (Calgranulin A, MRP 8), S100A9 (Calgranulin B, MRP 14) und S100A12 (Calgranulin C, extrazelluläres RAGE bindendes Protein, EN-RAGE). S100A8 und S100A9 existieren als Homodimere und können Heterodimere wie S100A8/A9 (Calprotectin genannt) formen, die die biologisch relevanten Formen dieser Proteine - zumindest beim Menschen - darzustellen scheinen (Ehrchen et al., 2009). Als intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Moleküle spielen sie eine Rolle bei der Zellmigration und dem Stoffwechsel des Zytoskeletts. Sobald sie in den Extrazellulärtraum freigesetzt werden (bei Zellschäden

oder Aktivierung von Phagozyten), werden sie zu Alarmsignalen, die Immunzellen und das vaskuläre Endothel aktivieren können (Foell et al., 2007). Die Expression dieser drei Vertreter der S100-Proteine kann im entzündeten Gewebe signifikant hochreguliert werden (Odink et al., 1987; Zwadlo et al., 1988; Foell et al., 2004; Foell et al., 2004; Foell und Roth, 2004). Ferner wurde eine enge Korrelation zwischen der Serum-Konzentration von S100A8/A9 und dem Ausmaß von Entzündungsreaktionen bei der HIV-Infektion, mykobakteriellen Infektionskrankheiten, chronisch entzündlichen Prozessen und Malignomen beobachtet (Lugering et al., 1995; Strasser et al., 1997; Pechkovsky et al., 2000; Kleinegger et al., 2001; Foell et al., 2004).

### **1.8.1 Intrazelluläre Funktionen**

Intrazelluläres S100A8/A9 scheint unter anderem die [i] Reifung und Funktion von Knochenmarkszellen und die [ii] Organisation des Zytoskeletts zu beeinflussen, sowie [iii] wachstumshemmende Wirkung auf Mikroorganismen zu haben (Nacken et al., 2003). Im Folgenden werden die drei Aspekte genauer beleuchtet.

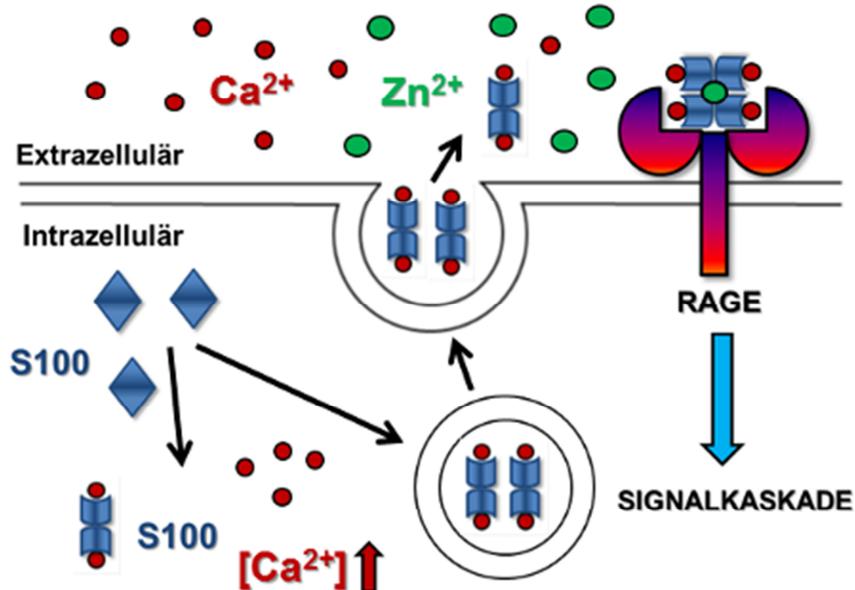
S100-Proteine sind in der Lage, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase aufrechtzuerhalten (Abb. 4) und die Aktivität verschiedener Enzyme zu regulieren. S100A8/A9 moduliert beispielsweise die Aktivität der Kaseinkinasen 1 und 2, zweier Enzyme, die Topoisomerase 1 und RNA-Polymerase 2 phosphorylieren und somit die Genexpression regulieren. Dies spricht für eine mögliche Rolle von S100A8/A9 bei der Regulierung von Reifung und Funktion von Knochenmarkszellen. Die Expression von S100A8 und S100A9 in Monozyten tritt in frühen Stadien der Differenzierung auf (Lagasse und Clerc, 1988), jedoch nicht in gewebsständigen Makrophagen (Zwadlo et al., 1988). Zwadlo et al. (1988) konnten zeigen, dass Monozyten *in vitro* in den ersten drei Tagen ihrer Ausdifferenzierung in zunehmendem Maß S100A8/A9 freisetzen. Ab dem vierten Tag nimmt die Freisetzung kontinuierlich ab. S100A8/A9 scheint also nur in bestimmten, frühen Differenzierungsstadien von Monozyten und Makrophagen freigesetzt zu werden (Donato, 2001).

Außerdem wirken S100-Proteine an der Organisation des Zytoskeletts mit (Donato, 2001). Sie modulieren  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig die Interaktionen der Hauptkomponenten des Zytoskeletts (Mikrotubuli, Intermediärfilamente und Mikrofilamente) mit Membranen. S100A8, S100A9 und S100A12 translozieren in die Plasmamembran und in

Intermediärfilamente aus Vimentin in Monozyten und Granulozyten (Lemarchand et al., 1992; Roth et al., 1993) und in Intermediärfilamente aus Keratin in Epithelzellen (Goebeler et al., 1995), sobald die zytosolische Calciumkonzentration steigt. Die Phosphorylierung von S100A9 und S100A12 führt sowohl zur vermehrten Translokation der Proteine als auch zur erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsaffinität dieser Proteine. Die Verlagerung von S100A8 in Membranen und ins Zytoskelett erfordert die vorherige Komplexbildung mit S100A9 (Roth et al., 1993; van den Bos et al., 1996). Die Translokation dieser S100-Proteine könnte in Zusammenhang stehen mit der Rolle von Plasmamembranen und dem Zytoskelett bei der Migration, Chemotaxis, Degranulation und Phagozytose. All diese Vorgänge sind charakteristisch für aktivierte Granulozyten und Monozyten. Die Aktivierung der Proteinkinase C in Monozyten resultiert ebenso in einer Translokation von S100A8/A9 in Mikrotubuli (Rammes et al., 1997; Donato, 2001).

Zusammengefasst gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass S100-Proteine  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Proteine sind, die eine Rolle bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Regulierung von Proteinphosphorylierung, Enzymaktivitäten, Organisation des Zytoskeletts, Zellproliferation und -differenzierung spielen (Donato, 2001) (Abb. 5).

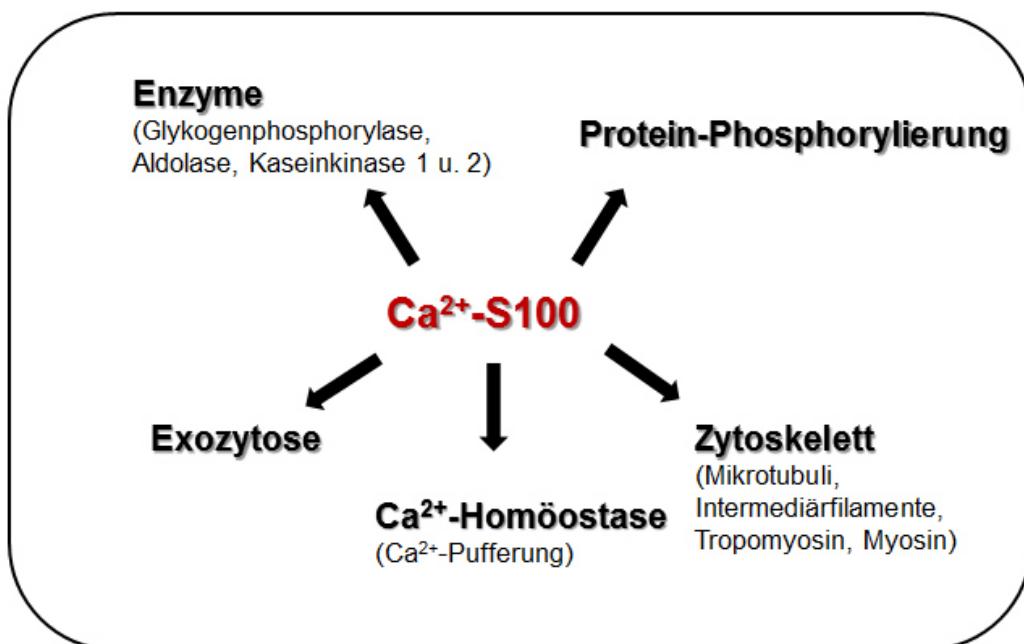
**Abbildung 4:  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Funktion von S100-Proteinen**



**Legende:** S100-Proteine können als Sensoren für intrazelluläre Calcium-Spiegel innerhalb der Zelle agieren und durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindung an ein Zielprotein dessen biologische Aktivität steuern. Außerdem werden einige S100-Proteine durch ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal freigesetzt. Extrazellulär können S100-Proteine bei Vorhandensein hoher Konzentrationen an  $\text{Ca}^{2+}$  und

$Zn^{2+}$ -Polymere formen und beispielsweise an den Rezeptor für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte RAGE binden (modifiziert nach Marenholz et al., 2004).

**Abbildung 5: Intrazelluläre Wirkung von S100-Proteinen**



**Legende:** Schematische Darstellung der intrazellulären Aufgaben von S100-Proteinen (modifiziert nach Donato, 2001).

### 1.8.2 Extrazelluläre Funktionen

Proteine wie S100A8 und S100A9 können in den Extrazellulärraum freigesetzt werden (Marenholz et al., 2004). Extrazelluläres S100A8/A9 kann an diverse Zelloberflächenproteine wie Heparinsulfat-Proteoglykan oder carboxylierte Glykane auf Endothelzellen binden (Srikrishna et al., 2001; Robinson et al., 2002). Als weitere Bindungspartner gelten der Mustererkennungsrezeptor (PRR) *toll-like* Rezeptor (TLR) 4 und der Rezeptor für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (RAGE) auf Immunzellen (Hofmann et al., 1999; Vogl et al., 2007; Boyd et al., 2008; Bjork et al., 2009). Das Zusammenspiel von S100A8/A9 mit PRRs wie TLR4 kann zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuklearfaktor NF- $\kappa$ B führen, was die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine auslöst (Vogl et al., 2007; Riva et al., 2012). *In vitro* wird auch eine chemotaktische Wirkung von S100A8/A9 auf Neutrophile (Devery et al., 1994; Ryckman et al., 2003) und die Stimulation der Neutrophilen-Adhäsion und -Migration beschrieben (Newton und Hogg, 1998; Vogl et al., 2004). Außerdem

ist S100A8/A9 wohl dazu in der Lage, die Degranulation neutrophiler Granulozyten zu induzieren (Simard et al., 2010), zur Aktivierung der NADPH-Oxidase beizutragen (Kerkhoff et al., 2005) und die antimikrobielle Wirkung von neutrophilen Granuloyzten durch Verbesserung der Phagozytosefähigkeit zu erhöhen (Simard et al., 2011). S100-Proteine können auch Zink- und Kupferionen binden. Es konnte gezeigt werden, dass die *Candida*-statischen Effekte von S100A8/A9-Proteinen auf ihren Zink-bindenden Eigenschaften beruhen (Steinbakk et al., 1990; Clohessy und Golden, 1995; Sohnle et al., 2000). *In vitro* zeigt S100A8/A9 wachstumshemmende Wirkung auf eine große Anzahl an Mikroorganismen. Da das Heterodimer Zink mit hoher Affinität bindet, fällt die freie Konzentration dieses Metalls und steht Mikroorganismen somit nicht mehr zur Verfügung, was die wachstumshemmende Wirkung erklärt (Sohnle et al., 2000).

Darüber hinaus zeigten *in vitro* Studien aber auch, dass S100A9 die pro-inflammatorische Aktivität von Makrophagen nach Phagozytose apoptotischer Neutrophiler unterdrücken (De Lorenzo et al., 2010) und den oxidativen Stoffwechsel neutrophiler Granuloyzten hemmen kann (Srourssi et al., 2010).

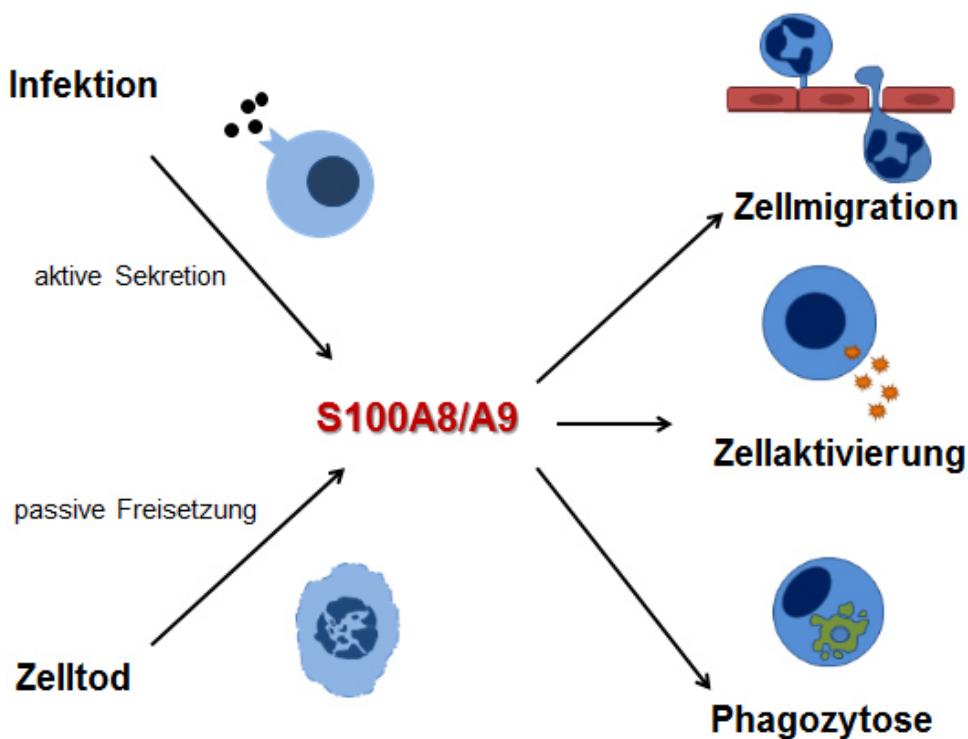
Folglich scheint S100A8, S100A9 und S100A8/A9 offensichtlich pro- und anti-entzündliche Eigenschaften zu besitzen. Die Art der Wirkung scheint von der Konzentration, der Struktur und der Lokalisation des Proteins sowie von den beteiligten Zellarten abzuhängen. Auf Letzteres weist eine kürzlich durchgeführte Studie (Averill et al., 2011) hin, die unterschiedliche Effekte von S100A8/A9 auf verschiedene Knochenmarkszellen demonstrierte. So zeigte S100A8/A9 pro-inflammatorische Effekte auf Neutrophile, hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf Makrophagen und wirkte sogar anti-inflammatoryisch auf dendritische Zellen (Averill et al., 2011). Abgesehen von seinen immunmodulatorischen Eigenschaften kann extrazelluläres S100A8/A9 zum Verlust endothelialer Zell-Zell-Kontakte führen. Des Weiteren kann es eine verstärkte endotheliale Permeabilität und einen durch Nekrose oder Apoptose ausgelöstem endothelialen Zelltod bedingen (Viemann et al., 2005; Viemann et al., 2007). Zur Apoptose kommt es auch in verschiedenen anderen Zellen unterschiedlicher Herkunft als Reaktion auf hohe Konzentrationen von freigesetztem S100A8/A9 (Ghavami et al., 2010).

## **1.9 Freisetzung von S100-Proteinen**

S100A8/A9 scheint sowohl passiv als auch aktiv in den Extrazellulärraum zu gelangen (Abb. 6). Die passive Freisetzung erfolgt aus nekrotischen Zellen. Auch aus für Neutrophile beschriebene extrazellulären Netzen (NETs) kann S100A8/A9 freigesetzt werden (Urban et al., 2009).

Bei der aktiven Freisetzung wird S100A8/A9 von aktivierten Monozyten und Granulozyten als Reaktion auf einen Kontakt mit mikrobiellen Komponenten und proinflammatorischen Zytokinen freigesetzt (Rammes et al., 1997). Diese Freisetzung wird durch den Kontakt von Phagozyten mit entzündetem Endothel gefördert (Frosch et al., 2000). Im Detail ist dieser Freisetzungsmechanismus von S100A8/A9 noch nicht geklärt. Bekannt ist, dass die Freisetzung des S100A8/A9-Protein-Komplexes aus aktivierten Monozyten nach Aktivierung der Proteinkinase C über einen Sekretionsweg erfolgt, der ein intaktes mikrotubuläres Netzwerk erfordert (Rammes et al., 1997). Dieser Sekretionsweg scheint sich jedoch von der nicht-klassischen Sekretion zu unterscheiden. Durch elektronenmikroskopische Analysen fand man heraus, dass im Zytosol weder S100A8/A9-haltige Endosomen noch entsprechende Vesikel gefunden werden können (Edgeworth et al., 1991). Die Freisetzung von S100A8/A9 scheint also Vesikel-unabhängig zu erfolgen. Darüber hinaus scheint die Freisetzung von S100A8/A9 keine Zelloberflächenexpression dieser Proteine zu benötigen. Daher wäre es möglich, dass Oberflächenexpression und Sekretion des S100A8/A9-Heterodimers zwei verschiedene, voneinander unabhängige Signalwege darstellen (Nacken et al., 2003). In der folgenden Abbildung (Abb. 6) sind beide Freisetzungsmechanismen und die wesentlichen Funktionen von extrazellulärem S100A8/A9 zusammengefasst dargestellt.

**Abbildung 6: Freisetzungsmechanismen und Funktionen von extrazellulärem S100A8/A9**



**Legende:** S100A8/A9 kann sowohl passiv aus nekrotischen Zellen als auch aktiv sezerniert werden. Extrazelluläres S100A8/A9 trägt unter anderem zur Zellmigration, Aktivierung von Immunzellen mit konsekutiver Freisetzung von Zytokinen sowie zur Phagozytose bei.

### 1.10 Beteiligung von S100-Proteinen bei Erkrankungen außerhalb des ZNS

S100A8/A9-Proteine spielen bei einer Reihe von Erkrankungen eine wichtige Rolle. Hierzu gehört beispielsweise die Reaktive Arthritis, bei der aktivierte Phagozyten die entzündlich veränderte Synovia infiltrieren und S100A8/A9 freisetzen (Odink et al., 1987; Zwadlo et al., 1988). In der Synovialflüssigkeit des entzündeten Gelenkes findet sich S100A8/A9 in sehr hohen Konzentrationen; aber auch im Serum dieser Patienten sind erhöhte S100A8/A9-Spiegel nachzuweisen (Berntzen et al., 1991; Frosch et al., 2000; Kane et al., 2003). In mehreren klinischen Studien bei Patienten mit rheumatoider Arthritis oder Psoriasis-Arthritis konnte eine außerordentlich gute Korrelation zwischen der S100A8/A9-Serumkonzentration und dem Ausmaß der arthritischen Veränderungen gezeigt werden. Diese soll sogar der Aussagekraft des C-reaktiven Proteins und der Erythrozyten-Sedimentationsrate überlegen sein (Brun et al., 1994; Kane et al., 2003; Foell et al., 2007). Auch bei der juvenilen idiopathischen Arthritis (JIA) lassen sich in Serum und Synovialflüssigkeit erhöhte

Werte an S100A8/A9 messen, die in Langzeitstudien bei Kindern gut mit der Krankheitsaktivität korrelierten (Berntzen et al., 1991; Frosch et al., 2000; Foell et al., 2004). Bei Kindern mit systemischem Beginn der JIA waren die Serumkonzentration von Phagozyten-spezifischen S100-Proteinen 20-fach höher als bei Patienten, die an einer Sepsis oder anderen entzündlichen Erkrankungen litten (Frosch et al., 2003; Wulffraat et al., 2003; Foell et al., 2004). Darüber hinaus wurde eine vermehrte Expression dieser Proteine in Makrophagen von Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen wie Dermatomyositis oder Polymyositis beobachtet. Im Verlauf entzündlicher Myopathien scheint S100A8/A9 zur Destruktion von Myozyten beizutragen, indem es die Proliferation und Differenzierung von Myoblasten hemmt und durch die Aktivierung von Caspase-3 deren Apoptose induziert (Seeliger et al., 2003).

In Fäzes von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gemessene Konzentrationen an S100A8/A9 sind in Kombination mit dem S100A8/A9-Serumspiegel hilfreich in der Verlaufsbeobachtung von chronischen Erkrankungen wie *Colitis ulcerosa* oder *Morbus Crohn*, da erhöhte Messwerte auf lokale Entzündungsherde hinweisen, die in klinischen Untersuchungen nicht detektiert werden konnten (Limburg et al., 2000; Thjodleifsson et al., 2003). Es wird vermutet, dass diese Proteine sogar als prospektive Biomarker für das Outcome dieser Patienten dienen könnten (Foell et al., 2003; Kane et al., 2003; Foell et al., 2004). Auch bei anderen chronischen Erkrankungen wie Mukoviszidose oder der Kawasaki-Vaskulitis kann eine erhöhte Konzentration von S100A8/A9 im Serum schon geringste Entzündungsaktivitäten anzeigen, die bisher von anderen klinischen Tests nicht detektiert werden können (Frosch et al., 2000; Foell et al., 2003). Weitere Erkrankungen, bei denen S100-Proteine eine Rolle zu spielen scheinen, sind Atherosklerose oder Diabetes mellitus Typ 1 und 2. S100A8 und S100A9 können sowohl in Mäusen als auch in Menschen in atherosklerotischen Plaques gefunden werden (Eue et al., 2000; McCormick et al., 2005; Ionita et al., 2009). Im Blut von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 wird die Expression inflammatorischer Gene (S100A8 und S100A9) hochreguliert (Jin et al., 2013). Auch im Muskelgewebe von Mäusen mit gestörter Glukosetoleranz bzw. Diabetes mellitus Typ 2 konnte eine erhöhte Expression von S100A9 gemessen werden (Ortega et al., 2013).

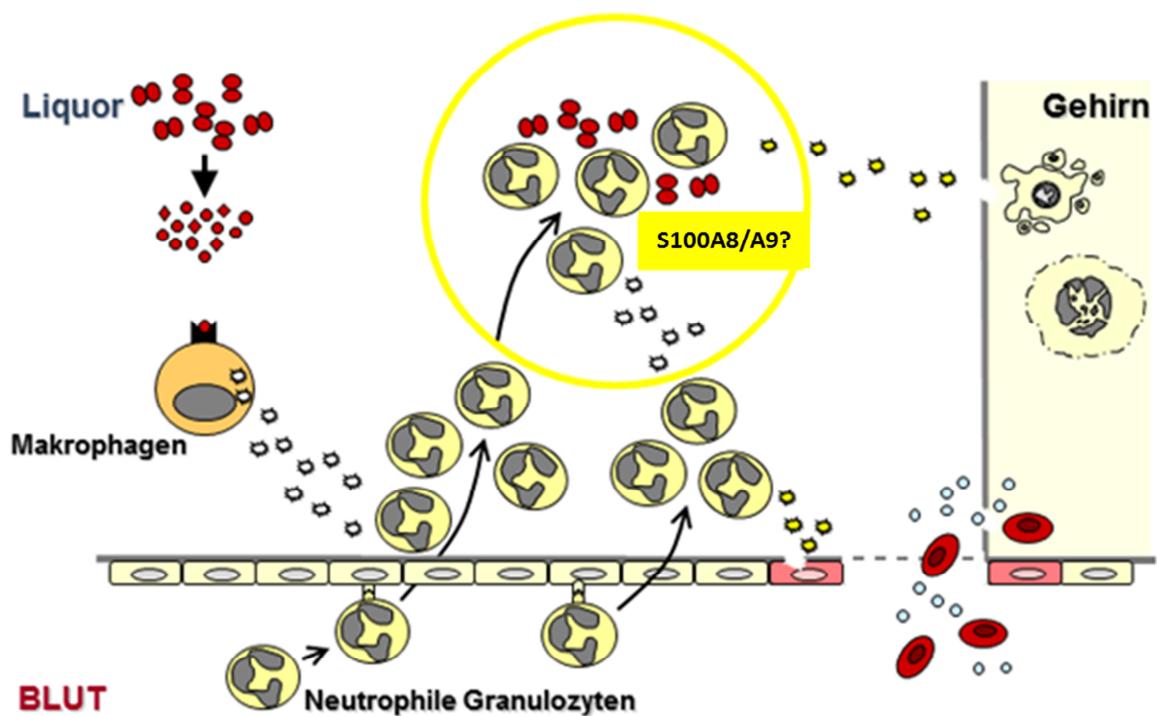
S100A8/A9 scheint überdies durch vermehrtes Rekrutieren und Aktivieren von Neutrophilen und Monozyten in den Arterienwänden die Atherogenese zu

beschleunigen (Schiopu und Cotoi, 2013). Weitere Hinweise für die Beteiligung von S100A8/A9 bei entzündlichen Erkrankungen konnten anhand von *in vivo* Experimenten an S100A9-defizienten Mäusen gewonnen werden. In der Maus führt die gezielte Deletion des S100A9-Gens sowohl zu einem Verlust von S100A9 als auch S100A8. Ursächlich hierfür dürfte ein schnellerer Abbau von S100A8 in Abwesenheit seines Bindungspartners S100A9 sein (Hobbs et al., 2003; Manitz et al., 2003). In einem Mausmodell der abdominellen Sepsis ging die S100A9-Defizienz mit einem verminderten bakteriellen Wachstum und einer geringer ausgeprägten systemischen Entzündungsreaktion einher. Dies war mit einer signifikant reduzierten Sterblichkeit im Vergleich zu Wildtyp (WT) - Mäusen assoziiert (Vogl et al., 2007; van Zoelen et al., 2009). Ferner zeigten S100A9-defiziente Mäuse eine abgeschwächte Infiltration neutrophiler Granulozyten im Modell der akuten Pankreatitis, in verschiedenen Modellen von vaskulären Läsionen und während der Wundheilung (Vogl et al., 2004; Schnekenburger et al., 2008; Croce et al., 2009). Des Weiteren verhinderte die Vorbehandlung von Mäusen mit anti-S100A8- und anti-S100A9-Antikörpern in einem Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Alveolen (nicht jedoch ins Lungengewebe), ohne dabei die Chemokin-Konzentrationen zu mindern (Raquil et al., 2008). Im Gegensatz dazu hatte die S100A9-Defizienz keinen Einfluss auf die Rekrutierung von Granulozyten ins Ohr nach Injektion von IL-8 (Manitz et al., 2003), ins Peritoneum nach Thioglycolat-Applikation (Manitz et al., 2003) sowie in die Lunge bei einer experimentellen Klebsiellenpneumonie (Achouiti et al., 2012). Ebenso waren neutralisierende Antikörper gegen S100A8 und S100A9 nahezu unwirksam bei der Verhinderung einer durch LPS induzierten Lungenentzündung in der Maus (Bozinovski et al., 2005). Die Behandlung mit S100A8/A9 unterdrückte sogar eine akute Leberentzündung nach LPS-Injektion durch die Hemmung der Aktivität proinflammatorischer Zytokine (Ikemoto et al., 2007). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass S100A8/A9 sehr vielfältig zu agieren scheint. Je nach Tiermodell und Erkrankung zeigt es sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften.

## 2. Zielsetzung

Die massive, oft protrahierte Immunreaktion gilt heute als zentraler kausaler Faktor für die Schädigung neuronalen Gewebes bei der Pneumokokkenmeningitis. Immunologische Untersuchungen der letzten Jahre haben demonstriert, dass bei Gewebeschäden verschiedene endogene Alarmsignale, wie beispielsweise S100A8/A9, freigesetzt werden, die eine akute Entzündungsreaktion auslösen bzw. verstärken können. Die Freisetzung endogener Alarmsignale in Folge Meningitis-assozierter Gewebeschäden könnte zur Perpetuierung und Verstärkung der meningealen Entzündungsreaktion (und folglich auch der Gewebeschädigung) beitragen (Abb. 7).

**Abbildung 7: Mögliche Rolle von S100A8/A9 in der Pneumokokkenmeningitis**



**Legende:** Die Infektion des Liquorraums mit *Streptococcus pneumoniae* führt zur Produktion von Lockstoffen, die die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in den Liquorraum initiieren. Aktivierte Neutrophile schädigen körpereigene Zellen und agieren als Schlüsselzellen bei der Pneumokokkenmeningitis. Da S100A8/A9 die am häufigsten vorkommenden Proteine im Zytoplasma Neutrophiler sind, vermuteten wir eine wichtige Regulierungsfunktion von S100A8/A9 in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis.

Der thematische Schwerpunkt dieser Dissertationsarbeit lag auf der Charakterisierung der Funktion des endogenen Alarmsignals S100A8/A9 in der Immunregulation und Neuropathologie der Pneumokokkenmeningitis. Die Untersuchungen wurden in einem etablierten Mausmodell der Meningitis durchgeführt, in dem die beim Menschen beobachteten entzündlichen und neuropathologischen Veränderungen nachvollzogen werden können. Im Einzelnen wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- [i] Charakterisierung der Freisetzung von S100A8/A9 im Krankheitsverlauf der Pneumokokkenmeningitis
- [ii] Analyse der funktionellen Bedeutung von S100A8/A9 bei der Regulation der Entzündungsreaktion und der Entstehung Meningitis-assozierter intrakranieller Komplikationen
- [iii] Identifizierung von Mechanismen, die der biologischen Funktion von S100A8/A9 bei der Pneumokokkenmeningitis zugrunde liegen, sowie
- [iv] Überprüfung, ob S100A8/A9 einen möglichen Angriffspunkt für eine adjuvante Behandlung dieser Erkrankung darstellt.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Genehmigung der Regierung von Oberbayern**

Diese Arbeit wurde in strenger Übereinstimmung mit den Richtlinien des Leitfadens für die Pflege und Nutzung von Labortieren (Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA) und dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Das Tierversuchsvorhaben wurde von der Tierschutzkommission der Regierung von Oberbayern genehmigt (Genehmigungsnummer: 55.2-1-54-2531-31-09).

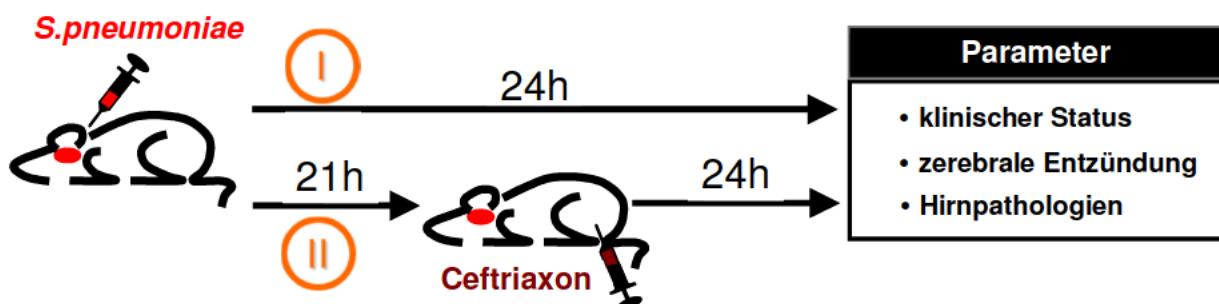
#### **3.2 Tiermodell der Pneumokokkenmeningitis**

In dieser Arbeit wurde ein gut etabliertes Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis verwendet (Klein et al., 2006; Koedel et al., 2009). Ausgewachsene männliche C57BL6/n Mäuse wurden gewogen und ihre Körpertemperatur wurde gemessen. Daraufhin wurden sie klinisch untersucht und ein Score erhoben, auf den unter Punkt 3.2.2.1 genauer eingegangen wird. Nach der klinischen Evaluation wurden die Mäuse unter eine Sterilbank verbracht und die Meningitis mittels intrazisternaler Injektion von  $20 \mu\text{l}$   $10^7$  Kolonienbildender Einheiten (KBE)/ml *S. pneumoniae* Typ 2 induziert (D39 Stamm, dankenswerterweise von Herrn Prof. Sven Hammerschmidt, Abteilung Genetik der Mikroorganismen, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, zur Verfügung gestellt) (Abb. 8). Dafür erhielten die Tiere eine Kurzzeitnarkose mit Isofluran (Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Deutschland). Den Kontrollen wurden  $20 \mu\text{l}$  phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) intrazisternal injiziert. Zeigten die Mäuse nach dem Abklingen der Narkose eine klinische Hirnstammsymptomatik (Schwäche einer/ mehrerer Extremitäten, Drehen um die eigene Achse), wurden sie umgehend euthanasiert. Tiere, die nach der Injektion keinerlei Auffälligkeiten zeigten, wurden in ihren Käfigen belassen und mit ausreichend Futter und Wasser versorgt. Heizdecken, auf denen die Käfige platziert wurden, dienten der Konstanthaltung der Körpertemperatur. Alle Tiere, die länger als 24 Stunden nach Infektion beobachtet wurden, erhielten eine antibiotische Therapie mit Ceftriaxon (MIP Pharma, Polen), die 24 Stunden nach Infektion begann. Am Ende jedes Experiments wurden die Tiere erneut gewogen, der klinische Score erhoben und ihre Körpertemperatur gemessen. Daraufhin wurden die Tiere mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht)/Xylazin

(10 mg/kg Körpergewicht; Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) intraperitoneal narkotisiert. In regelmäßigen Abständen wurde die Narkosetiefe durch Setzen von Schmerzreizen kontrolliert und bei Bedarf wurde Ketamin/Xylazin nachinjiziert. Der Kopf der narkotisierten Maus wurde nun in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Im Anschluss wurde die Schädelkalotte frei präpariert. Am Übergang vom *Os interparietale* zum *Os occipitale* wurde in Verlängerung der *Sutura sagittalis* mittels einer Handbohrmaschine ein kleines Bohrloch angelegt.

Durch dieses wurde ein Katheter bestehend aus einer Stahlkanüle und einem 1 cm langem Polyethylenschlauch (mit einem Innendurchmesser von 0,58 mm und einem Außendurchmesser von 0,98 mm) in die *Zisterna magna* eingeführt. Es wurden Liquorproben zur Bestimmung der Leukozytenzahl und der Konzentration von S100A8/A9 gewonnen und anschließend der intrakranielle Druck (ICP) gemessen. Dazu wurde erneut ein Katheter eingebracht, mit Histoacryl (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) fixiert und die entnommene Menge Liquor mit PBS ersetzt. Eineinhalb Minuten nach der PBS-Gabe wurde der intrakranielle Druck mittels Druckwandler ermittelt. Nach Applikation einer Überdosis an Narkosemitteln wurde der Thorax der Maus eröffnet, das Herz freipräpariert und 1 ml Blut aus dem rechten Ventrikel entnommen. Anschließend wurde ein Plastikschauch transkardial in die *Aorta ascendens* gelegt und die Leber aufgeschnitten, um das Gehirn mit 15 ml eiskaltem PBS, das 10 U/ml Heparin (ratiopharm, Ulm, Deutschland) enthielt, transkardial zu perfundieren. Im Anschluss wurden die Hirne entnommen, das Kleinhirn für die Bestimmung der bakteriellen Titer verwendet (siehe unter 3.2.2.7) und das Großhirn umgehend tiefgefroren (- 80°C).

**Abbildung 8: Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis**



**Legende:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Mausmodells der Pneumokokkenmeningitis und anschließende Untersuchungen.

### **3.2.1 Versuchsgruppen**

Um das Freisetzungsmuster von S100A8/A9 in der murinen Pneumokokkenmeningitis zu untersuchen, entnahmen wir zur Analyse Liquor- und Serumproben von C57BL6/n Mäusen (WT-Mäuse, Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) vor, sechs, 18, 24 und 48 Stunden nach der Pneumokokken-Infektion (D39 Stamm; n = 4 in jeder Gruppe) (Tabelle 1.1). Um eine mögliche Quelle von S100A8/A9 zu identifizieren, erfolgte in einer weiteren Versuchsreihe eine Neutrophilen-Depletion durch intraperitoneale Gabe von 250 µg anti-GR1-Antikörpern (RB6-8C5 Klon, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) (Koedel et al., 2009) (Tabelle 1.2). Vierundzwanzig Stunden später wurden die Mäuse mit *S. pneumoniae* infiziert und mit infizierten WT-Mäusen verglichen, die anstelle des anti-GR1-Antikörpers einen Isotyp-Kontrollantikörper (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) in gleicher Dosierung erhalten hatten (n = 5 in jeder Gruppe). In der Folge führten wir immunhistochemische Untersuchungen an Hirnschnitten von infizierten C57BL6/n-Mäusen (jeweils n = 4) und S100A9-defizienten Tieren (jeweils n = 2) durch, deren Hirne jeweils 24 und 48 Stunden nach Infektion für Formalinfixierung und Paraffineinbettung entnommen wurden (Tabelle 1.3). Zusätzlich wurden WT-Mäuse anstelle mit dem D39-Wildtyp-Stamm mit einem isogenen Pneumolysin-defizienten D39ΔPLY Stamm infiziert, (n = 5 in jeder Gruppe), um Aufschluss über die Rolle des bakteriellen Zytotoxins Pneumolysin bei der Freisetzung von S100A8/A9 zu erhalten (Tabelle 1.4).

Um die Rolle von S100A8/A9 in der Entwicklung der Meningitis aufzuklären, wurden S100A9-defiziente Mäuse, die 10-fach auf den genetischen C57BL6/n-Hintergrund rückgekreuzt worden waren, mit *S. pneumoniae* infiziert und nach 24 Stunden evaluiert (Tabelle 1.5). Als positive Kontrollgruppe dienten infizierte C57BL6/n-WT-Mäuse (n = 9 in jeder Gruppe). Als Negativ-Kontrollen wurden C57BL6/n-WT-Mäuse verwendet, denen anstelle von *S. pneumoniae* PBS in die *Zisterna magna* injiziert wurde (n = 4). Um Einsichten in die Funktion von S100A8/A9 im weiteren Krankheitsverlauf einer Pneumokokkenmeningitis zu bekommen, wurden S100A9-defiziente Tiere 24 Stunden nach der Infektion intraperitoneal mit 100 mg/kg Körpergewicht Ceftriaxon behandelt und vierundzwanzig Stunden später (d.h. 48 Stunden nach der Infektion) untersucht (Tabelle 1.6). Die Antibiotikabehandlung sollte die Mäuse vor einer fulminanten Infektion mit tödlichem Ausgang vor Ablauf der 48 Stunden schützen. Infizierte, Ceftriaxon-behandelte WT Mäuse dienten als

Vergleichsgruppe ( $n = 10$  in jeder Gruppe), wohingegen PBS-injizierte Mäuse als Negativkontrolle fungierten ( $n = 4$ ). In einer weiteren Versuchsserie sollte geklärt werden, ob extrazelluläres S100A8/A9 für die beobachteten Effekte der S100A9-Gendefizienz im fortgeschrittenen Krankheitsstadium einer Meningitis verantwortlich zu machen ist. Dazu wurde S100A9-defizienten Mäusen zunächst 25 µl von 400 µg/ml gereinigtem S100A8 oder S100A9 (von unserem Kooperationspartner Herrn PD Dr. Thomas Vogl vom Institut für Immunologie der Westfälische Wilhelms-Universität in Münster hergestellt) oder die identische Menge des jeweiligen hitzeinaktivierten Proteins in die *Zisterna magna* injiziert (Tabelle 1.7). Eine Stunde später wurden die Mäuse infiziert, weitere 24 Stunden später mit Ceftriaxon behandelt und schließlich 48 Stunden nach der Infektion untersucht ( $n = 6$  in jeder Gruppe). In einer weiteren Versuchsreihe wurde überprüft, ob S100A8, S100A9 oder S100A8/A9 *per se* eine Liquorpleozytose induzieren können. Hierfür wurde gereinigtes S100A8 (in ausgewählten Versuchen auch gereinigtes S100A9 und S100A8/A9; 20 µl von 50 µg Protein/ml) in die *Zisterna magna* von Wildtyp-, RAGE<sup>-/-</sup> und TLR2-TLR4-doppelt-defizienten Mäusen injiziert (Tabelle 1.8). Sechs Stunden später wurden die Leukozytenzahl und CXCL-2-Konzentrationen im Liquor bestimmt ( $n = 4$  in jeder Gruppe). Als Kontrollgruppe dienten Mäuse, die PBS oder hitzeinaktivierte rekombinante Proteine erhielten ( $n = 4$  in jeder Gruppe). In einer abschließenden Versuchsserie untersuchten wir die therapeutische Wirkung des Quinolin-3-Carboxamids Paquinimod, das uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Tomas Leanderson (Immunologische Arbeitsgruppe, Universität Lund, Schweden) zur Verfügung gestellt worden war. Paquinimod gilt als S100A9-Antagonist (Bjork et al., 2009). In dieser Versuchsreihe wurden WT-Mäuse mit 100 mg/kg Körpergewicht Ceftriaxon in Kombination mit 10 mg/kg Paquinimod (ABR-215757;  $n = 9$ ) oder dem entsprechendem Vehikel (PBS mit 25% Dimethylsulfoxid (DMSO;  $n = 9$ ) behandelt (Tabelle 1.9).

**Tabelle 1: Versuchsgruppen**

**1.1 Freisetzungsmuster im Zeitverlauf**

Tiere	Infektion	Wirkstoff/Zeitpunkt	Untersuchungszeitpunkt	Anzahl
C57BL6/n	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	-	vor, 6, 18, 48 h nach Infektion	n = 4 pro Gruppe

**1.2 Quelle von S100A8/A9 (Neutrophilen-Depletion)**

Tiere	Infektion	Wirkstoff/Zeitpunkt	Untersuchungszeitpunkt	Anzahl
C57BL6/n	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	250 µg anti-GR1-AK i.p./ 24h vor Infektion	24 h nach Infektion	n = 5
C57BL6/n	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	250 µg Isotyp-Kontroll-AK i.p./ 24h vor Infektion	24 h nach Infektion	n = 5

**1.3 Immunhistochemischer Nachweis von S100A8/A9**

Tiere	Infektion	Wirkstoff/Zeitpunkt	Untersuchungszeitpunkt	Anzahl
S100A9 <sup>-/-</sup> *	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	-	24 h nach Infektion	n = 4
S100A9 <sup>-/-</sup> *	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	Ceftriaxon i.p./24h nach Infektion	48 h nach Infektion	n = 2
C57BL6/n	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	-	24 h nach Infektion	n = 4
C57BL6/n	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	Ceftriaxon i.p./24h nach Infektion	48 h nach Infektion	n = 2

#### 1.4 Rolle von Pneumolysin

Tiere	Infektion	Wirkstoff/Zeitpunkt	Untersuchungszeitpunkt	Anzahl
C57BL6/n	<i>S.pneumoniae</i> ΔPLY i.c.	-	24 h nach Infektion	n = 5
C57BL6/n	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	-	24 h nach Infektion	n = 5

#### 1.5 Rolle von S100A8/A9 in der Entwicklung der Meningitis

Tiere	Infektion	Wirkstoff/Zeitpunkt	Untersuchungszeitpunkt	Anzahl
S100A9-/-*	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	-	24 h nach Infektion	n = 9
C57BL6/n, positive Kontrollgruppe	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	-	24 h nach Infektion	n = 9
C57BL6/n, negative Kontrollgruppe	PBS i.c.	-	24 h nach Infektion	n = 4

#### 1.6 Funktion von S100A8/A9 im weiteren Krankheitsverlauf (48 h-Versuche)

Tiere	Infektion	Wirkstoff/Zeitpunkt	Untersuchungszeitpunkt	Anzahl
S100A9-/-*	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	Ceftriaxon i.p./24h nach Infektion	48 h nach Infektion	n = 10
C57BL6/n	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	Ceftriaxon i.p./24h nach Infektion	48 h nach Infektion	n = 10
C57BL6/n, negative Kontrollgruppe	PBS i.c.	-	48 h nach Infektion	n = 4

## 1.7 Funktion von extrazellulärem S100A8/A9

Tiere	Infektion	Wirkstoff/Zeitpunkt		Untersuchungszeitpunkt	Anzahl
S100A9 <sup>-/-</sup> *	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	10 µg S100A8 i.c./1h vor Infektion	Ceftriaxon i.p./ 24h nach Infektion	48 h nach Infektion	n = 6
S100A9 <sup>-/-</sup> *	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	10 µg S100A9 i.c./ 1h vor Infektion	Ceftriaxon i.p./ 24h nach Infektion	48 h nach Infektion	n = 6
S100A9 <sup>-/-</sup> *	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	10 µg HI-S100A8 i.c./ 1h vor Infektion	Ceftriaxon i.p./ 24h nach Infektion	48 h nach Infektion	n = 6
S100A9 <sup>-/-</sup> *	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	10 µg HI-S100A9 i.c./ 1h vor Infektion	Ceftriaxon i.p./ 24h nach Infektion	48 h nach Infektion	n = 6

## 1.8 Rolle von S100A8/A9 bei der Liquorpleozytose

Tiere	Infektion	Wirkstoff/Zeitpunkt	Untersuchungszeitpunkt	Anzahl
C57BL6/n	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	1 µg S100A8 i.c.	6 h nach Wirkstoffgabe	n = 4
RAGE <sup>-/-*</sup>	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	1 µg S100A8 i.c.	6 h nach Wirkstoffgabe	n = 4
TLR2 <sup>-/-</sup> TLR4 <sup>-/-*</sup>	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	1 µg S100A8 i.c.	6 h nach Wirkstoffgabe	n = 4
C57BL6/n	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	HI-Proteine/PBS	6 h nach Wirkstoffgabe	n = 4 pro Gruppe

## 1.9 Wirkung des S100A9-Antagonisten Paquinimod

Tiere	Infektion	Wirkstoff/Zeitpunkt	Untersuchungszeitpunkt	Anzahl
C57BL6/n	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	Ceftriaxon + 10mg/kg Paquinimod i.p./24h nach Infektion	48h nach Infektion	n = 9
C57BL6/n	<i>S.pneumoniae</i> i.c.	Ceftriaxon + Vehikel i.p./24h nach Infektion	48h nach Infektion	n = 9

**Legende:** \* Der genetische Hintergrund dieser Mäuse ist ebenfalls C57BL6/n.

### 3.2.2 Versuchsablauf

#### 3.2.2.1 Klinische Beurteilung der Mäuse

Der klinische Score setzte sich aus folgenden Parametern zusammen: [i] „Beam Balancing“-Test, [ii] „Postural Reflex“-Test, [iii] Beurteilung der Vigilanz und [iv] des Fellstatus. Überdies wurde in regelmäßigen Abständen die Körpertemperatur und das Körpergewicht gemessen, ein „Open Field Test“ durchgeführt, und die Mäuse auf das Vorhandensein von Belastungszeichen untersucht (letzteres umfasste die Beurteilung des Fellstatus, des Augenstatus, der Körperstellung, der Atembewegungen, der Vigilanz und der Gewichtsabnahme sowie des Auftretens epileptischer Anfälle). Gesunde Tiere wiesen einen Scorewert von null Punkten auf; elf Punkte erhielten Tiere mit einer terminalen Krankheitssymptomatik, die umgehend euthanasiert werden mussten.

##### 3.2.2.1.1 Beam Balancing Test

Bei diesem Test (abgeleitet von Feeney et al., 1982) wurde die Maus auf drei Holzstäbe unterschiedlichen Durchmessers (13,5 mm, 9 mm, 4,5 mm) gesetzt. Konnte sie auf dem Stab mit kleinstem Durchmesser laufen, erhielt sie einen Scorewert von 0 Punkten. Hielt sie sich mindestens 15 s darauf, wurde der Scorewert 1 vergeben. Der höchste Scorewert von 6 Punkten wurde einer Maus zugewiesen,

wenn sie sich weniger als 15 s auf dem Stab mit dem größten Durchmesser halten konnte.

### **3.2.2.1.2 Postural Reflex Test**

Bei diesem Test (abgeleitet von Bedersen et al., 1986) wurde die Maus am Schwanz leicht angehoben und die Körperhaltung der Maus begutachtet. Extendierte die Maus alle vier Extremitäten symmetrisch, erhielt sie 0 Scorepunkte. Bog die Maus den Rumpf in eine Richtung ab, drehte sie sich um die eigene Körperachse, oder zeigte sie keinerlei Körperbewegung, dann wurden ihr 1, 2 oder 3 Scorepunkte zugeteilt.

### **3.2.2.1.3 Beurteilung von Fellstatus und Vigilanz**

Der Fellstatus wurde anhand der Kategorien „normal“ (Scorewert 0) bzw. „struppig“, „glanzlos“ oder „verschmutzt“ (Scorewert 1) beurteilt. Die Vigilanz der infizierten Tiere wurde in die Grade „wach“ (0 Pkt.), „lethargisch“ oder „somnolent“ (1 Pkt.) und „komatös“ (keine Reaktion bei Auslösen des Schwanzreflexes, 6 Pkt.) eingeteilt.

### **3.2.2.1.4 Ermittlung der Körpertemperatur**

Die Körpertemperatur der Maus wurde mit einer digitalen rektalen Temperatursonde (GTH1160 Digitalthermometer, Greisinger electronic GmbH, Regenstauf; Sondendurchmesser 1,5 mm), die mit Vaseline bestrichen wurde, gemessen.

### **3.2.2.1.5 Open Field Test**

Um die motorische Aktivität der Maus zu beurteilen, wurde sie zentral in eine Box mit den Maßen 42 x 42 x 20 cm gesetzt (abgeleitet von Gould TD et al., 2009). Die Grundfläche ist in neun 14 x 14 cm große Felder unterteilt. Zwei Minuten lang wurde die Anzahl der Felder gezählt, die die Maus durchquerte.

### **3.2.2.1.6 Erfassung möglicher Belastungszeichen**

Die Erfassung möglicher Belastungszeichen erfolgte anhand eines Beurteilungsbogens, der folgende Parameter beinhaltete:

- Fellstatus: normal = 0 Scorepunkte (Pkt.); struppig, ungepflegt, schmutzig = 1 Pkt.
- Augenstatus: normal = 0 Pkt.; verklebt = 1 Pkt.; eingesunken = 3 Pkt.
- Körperstellung: normal = 0 Pkt.; gekrümmmt = 1 Pkt.; Seitenlage = 3 Pkt.
- Atembewegungen: normal = 0 Pkt.; leicht verstärkt = 1 Pkt.; deutlich verstärkt und verlangsamt = 3 Pkt.

- Motorische Anfälle: keine = 0 Pkt.; kurzzeitige Anfälle = 1 Pkt.; Status *epilepticus* (Anfallsdauer > 5 min) = 6 Pkt.
- Vigilanz: normal = 0 Pkt.; somnolent = 1 Pkt.; komatos (keine Reaktion auf Schwanz- und Zwischenzehenreflex) = 6 Pkt.
- Gewichtsabnahme: < 10% des Körpergewichts (KG) = 0 Pkt.; 10 – 15% des KG = 1 Pkt.; 15,1-20% des KG = 3 Pkt.; > 20% des KG = 6 Pkt.

In Abhängigkeit von den erhobenen Scorewerten wurde die klinische Überwachung entweder intensiviert oder das Experiment abgebrochen (bei 6 Scorepunkten des Beurteilungsbogens).

### **3.2.2.2 Liquor- und Blutzellzahlbestimmung**

Leukozytenzahlen im Liquor und im Blut wurden mit Hilfe von Fuchs-Rosenthal- und Neubauerzählkammern (Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland) bestimmt. Dazu wurden 2 µl Liquor mit 18 µl Türk'scher Lösung bzw. 20 µl Blut mit 180 µl Türk'scher Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Mit dieser Suspension wurde die jeweilige Zählkammer gefüllt und die Zellen wurden unter einem Lichtmikroskop (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) bei 40facher Vergrößerung ausgezählt. Die Zellzahl pro Mikroliter im Liquor berechnet sich wie folgt: Zellzahl [n/µl] = Z x Verdünnungsfaktor (10) / Kammertiefe (0,2) (Z: ausgezählte Zellzahl in der Kammer). Die Zellzahl pro Mikroliter im Blut berechnet sich wie folgt: Zellzahl [n/µl] = Z x Verdünnungsfaktor (10) / Kammertiefe (0,1) (Z: ausgezählte Zellzahl in der Kammer).

### **3.2.2.3 Herstellung von Liquor- und Blutproben**

Entnommene Liquor- und Blutproben wurden 10 min bei 2000 Umdrehungen/min mit einer Zentrifuge (5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, danach die Überstände abpipettiert und anschließend bei -20°C eingefroren.

### **3.2.2.4 Bestimmung der bakteriellen Titer in Blut und Hirn**

Das Kleinhirn wurde separiert, in 1 ml PBS verbracht und 1-2 min mit Hilfe eines Ultra-Turrax® (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Darauf

wurden 100 µl Kleinhirnhomogenat 10<sup>3</sup>- und 10<sup>5</sup>-fach verdünnt auf Blutagarplatten (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) ausgestrichen. Ebenso wurden 10 µl Blut in der Verdünnung 1:10 und 1:1000 auf Agarplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C unter 5%iger Kohlendioxidbegasung wurden die sichtbaren bakteriellen Kolonien ausgezählt und die Titer unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen pro Kleinhirn bzw. ml Blut errechnet.

### **3.2.3 Analyse der Integrität der Blut-Hirn-Schranke**

Zur Bestimmung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke wurde in Mäusehirnhomogenat mit Hilfe eines ELISAs (*enzyme linked immunosorbent assay*) die Albuminkonzentration ermittelt (Koedel et al., 2004). Das Serumalbumin ist ein geeigneter Indikatorstoff, da es bei intakter Blut-Hirn-Schranke nicht in das Gehirn gelangen kann. Für die Bestimmung der Albuminkonzentration wurden zunächst MaxiSorb-Platten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit einem polyklonalen Antikörper aus der Ziege (Mouse Albumin ELISA Quantitation Set, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA) beschichtet, der sich spezifisch gegen Mausalbumin richtet. Dazu wurde eine Antikörperlösung in Beschichtungspuffer (0,05 M Natriumcarbonat, pH 9,6) im Verhältnis 1:100 verdünnt und pro Vertiefung 100 µl dieser Lösung aufgetragen. Anschließend wurde die Platte 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde sie dreimal mit Waschpuffer (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 8,0) gewaschen und für 30 min mit 200 µl Blockierungspuffer (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% bovines Serumalbumin [BSA], pH 8,0) inkubiert. Anschließend erfolgte wiederum ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Die Hirnschnitte wurden 10 min in sogenanntem Lysepuffer (10 mM HEPES, pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> und einer Proteaseinhibitorenmischung aus Phenylmethylsulfonylfluorid, Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A) auf Eis inkubiert, dann im Ultraschallbad homogenisiert und darauf bei 14000 Umdrehungen/min 15 min lang bei 4°C zentrifugiert. Die Hirnlysate wurden anschließend nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit Hilfe einer Roti®-Nanoquant-Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) auf eine einheitliche Proteinmenge von 0,5 µg/100µl eingestellt. Dann wurden jeweils 100µl Hirnhomogenat in jede Vertiefung der Platte gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte fünfmaliges Waschen mit dem

Waschpuffer. Anschließend wurde das gebundene Albumin mittels eines polyklonalen Peroxidase-konjugierten Antikörpers gegen Mausalbumin aus der Ziege (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA) detektiert. Dafür wurde die Antikörperlösung in Probenkonjugatpuffer (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1 % BSA, 0,05% Tween 20, pH 8,0) im Verhältnis 1:10000 verdünnt und 100 µl dieser Lösung in jede Vertiefung der Platte gegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte erneut fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen, je 100µl Enzymsubstratreagenz (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) in jede Vertiefung pipettiert und die Platte nochmals für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die kolorimetrische Reaktion wurde durch Zusatz von 100 µl 0,18 M Schwefelsäure gestoppt und in der Folge die Absorption bei 450 nm bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Mit unterschiedlichen Albuminkonzentrationen wurde eine Eichkurve erstellt. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinmenge in den Proben ließ sich die Konzentration von Albumin/µg Protein anhand der Eichkurve errechnen.

### **3.2.4 Bestimmung des Ventrikellvolumens und Quantifizierung der zerebralen Einblutungen**

Das tiefgefrorene Mäusehirn wurde mit Hilfe eines Kryomikrotoms (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) bei - 20°C nach einem definierten Protokoll geschnitten. In diesem Schnittverfahren entstanden Hirnschnitte unterschiedlicher Dicke für ELISA-Untersuchungen zur Bestimmung des Albumingehalts, der CXCL-2-Konzentrationen (30 µm-Schnitte) und für histologische Untersuchungen (10 µm-Schnitte). Für die Bestimmung des Ventrikellvolumens und die Quantifizierung der Einblutungen wurden beginnend bei den anterioren Anteilen der Seitenventrikel in Abständen von jeweils 300 µm insgesamt neun Schnittflächen fotografiert und digitalisiert. Die Größe des Gehirns und der Ventrikel wurde mit Hilfe der Bildauswertungssoftware Image Tool for Windows 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, USA) bestimmt und deren Volumina entsprechend  $V = \Sigma$  Hirn- bzw. Ventrikelfläche x 0,3 mm berechnet. Außerdem wurde die Anzahl der Blutungen gezählt und die Gesamtfläche der Blutungen ermittelt.

### **3.2.5 Nachweis von apoptotischem Zelltod**

Apoptotische Zellen wurden mit Hilfe eines kommerziellen histochemischen *in situ* Testverfahrens in Hirnschnitten infizierter Mäuse nachgewiesen, dem sogenannten Klenow-FragEL™ DNA *fragmentation detection kit* (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland). Das Klenow-Fragment ist ein aus *Escherichia coli* extrahiertes Proteinfragment der DNA-Polymerase 1, das nach enzymatischer Spaltung mit Subtilisin entsteht und modifizierte Nukleotide in DNA einbauen kann (Klenow und Henningsen, 1970). Dabei binden Klenow-Fragmente zunächst an exponierte Enden fragmentierter DNA und katalysieren die Bindung Biotin-markierter Deoxynukleotide an diese DNA-Endstücke. Die biotinylierten Nukleotide werden anschließend mit einem an Meerrettichperoxidase gekoppelten Streptavidin-Konjugat detektiert. Die Reaktion der markierten Probe mit Diaminobenzidin erzeugt ein unlösliches braunes Substrat in Zellen, die eine fragmentierte DNA aufweisen. Die gefärbten Hirnschnitte wurden mit Hilfe einer Digitalkamera, die an einen PC angeschlossen war, bei 35-facher Vergrößerung fotografiert. Im Anschluss wurden die Anzahl der FragEL™-positiven Zellen im ventrikulären Infiltrat und Hippocampus mit Hilfe der oben genannten Bildverarbeitungssoftware ermittelt und als Anzahl FragEL™-positiver Zellen pro 100 infiltrierter Leukozyten beziehungsweise pro Hirnschnitt dargestellt.

### **3.2.6 Immunhistochemischer Nachweis von S100A8/A9**

Fünf µm dicke koronare paraffinierte Hirnschnitte, die die Seitenventrikel und hippocampales Gewebe enthielten, wurden mit Maus-Antiserum aus dem Kaninchen entweder spezifisch für S100A8 oder S100A9 gefärbt (Roth et al., 1993). Dafür wurden die Paraffinschnitte zweimal 10 min in Rotihistol entparaffiniert. Anschließend wurde das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe (je 2 min 100%, 96%, 80%, 70% Ethanol) rehydriert. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Objektträger in Citratpuffer (0,1 M Zitronensäure und 0,1 M Natriumcitrat) für 20 min inkubiert. Nach der Hemmung endogener Peroxidase-Aktivität mit 0,3% methanolischem Wasserstoffperoxid und Blockade unspezifischer Bindungen mit 50%igem Ziegenserum wurden die Hirnschnitte mit S100A8- oder S100A9-Antiserum (in einer 1:200 Verdünnung) über Nacht bei 4°C inkubiert. Mit primärem Antikörper markierte Zellen wurden anschließend mit biotinyliertem anti-Kaninchen IgG aus der Ziege markiert (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA; Verdünnung von 1:200;

Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur). Zur optischen, farbigen Darstellung der S100A8- oder S100A9-positiven Zellen wurden die Hirnschnitte in der Folge mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin und 3,3-Diaminobenzidin inkubiert (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Nach Gegenfärbung mit Mayers Hämatoxylinlösung wurden die Gewebeschnitte mit Hilfe eines Olympus BX51 Mikroskops inspiziert und mit einer gekühlten Moticam 500 Digitalkamera (Moticam, Deutschland), die mit einem PC verbunden war, Fotografien angefertigt.

### **3.2.7 Reinigung von S100A8, S100A9 und S100A8/A9**

Gereinigtes S100A8, S100A9 und S100A8/A9 wurde uns freundlicherweise von unserem Kooperationspartner Herr PD Dr. Thomas Vogl (Institut für Immunologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster) zur Verfügung gestellt (Vogl et al., 2007).

### **3.2.8 Messung der CXCL-2- und S100A8/A9-Konzentrationen**

Die CXCL-2-Konzentrationen in Hirnhomogenat wurden mit einem kommerziell erhältlichen ELISA (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) den Anweisungen des Herstellers folgend bestimmt. Die Konzentrationen von S100A8/A9 wurden in Liquor- und Serumproben sowie in Zellkulturüberständen von ER-Hoxb8-Granulozyten und murinen Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) mit Hilfe eines Sandwich-ELISA am Institut unseres Kooperationspartner Herrn PD Dr. Vogl gemessen (Vogl et al., 2007).

## **3.3 Zellkulturversuche**

Alle Versuche mit Zellkulturen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden zwischen den einzelnen Bearbeitungsschritten in einem Brutschrank bei 37°C und 5%iger Kohlendioxidbegasung kultiviert. Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauerzählkammer verwendet. Tote Zellen ließen sich mit Färbung durch Trypan-Blau (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) identifizieren. Bei den Zellkulturuntersuchungen wurden ER-Hoxb8-Granulozyten sowie murine Knochenmarks-Granulozyten (BMN = *bone marrow-derived neutrophils*) und -Makrophagen (BMDM = *bone marrow-derived macrophages*) verwendet.

### **3.3.1 ER-Hoxb8-Granulozyten**

#### **3.3.1.1 Kultivierung der Vorläuferzellen**

Die HoxB-Granulozyten wurden uns von Herrn Dr. Hans Häcker vom Institut für Infektionskrankheiten am St. Jude Children's Research Hospital in Memphis, USA zur Verfügung gestellt. Bei diesen Zellen handelt es sich um konditional mit ER-Hoxb8 (*estrogen-regulated* Hoxb8) immortalisierte Progenitorzellen, die vorab aus dem Knochenmark von C57BL6/n-Mäusen gewonnen worden waren (Wang, G. G., et al., 2006; Koedel, U., et al., 2009). Durch die Expression von ER-Hoxb8 wird die Ausdifferenzierung der Knochenmarksvorläuferzellen (Blatt, C., et al., 1988; Knoepfler, P. S., et al., 2001) verhindert. Um die Aktivität von ER-Hoxb8 exogen beeinflussen zu können, wurde das N-terminale Ende des Transkriptionsfaktor mit der Östrogen-bindenden Domäne des Östrogenrezeptors gekoppelt und somit eine Östrogenabhängigkeit der ER-Hoxb8-Aktivität erzielt (genaue Beschreibung siehe Wang et al., 2006). In anderen Worten: durch die Zugabe von 1 µM Östrogen zum Zellkulturmedium können die ER-Hoxb8-Zellen an der Ausdifferenzierung gehindert werden und bleiben folglich vermehrungsfähig. Die ER-Hoxb8-Vorläuferzellen wurden in 6-Well-Platten in Optimem-Medium kultiviert (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), das 10% FCS, 30 µM β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland), 100 IU/ml Penicillin G und 100 IU/ml Streptomycinsulfat (Biochrom, Berlin, Deutschland), 4% Überstand aus Stammzellfaktor-produzierenden CHO-Zellen (*chinese hamster ovarian cells*) und 1 µM Östrogen (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) enthielt. Alle 48 Stunden wurden die Zellen gesplittet. Dafür wurden die Zellsuspensionen aus zwei Wells in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt, 10 min bei 900 Umdrehungen/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet anschließend in 2 ml Medium resuspendiert. Danach wurden 250 µl dieser Zellsuspension in ein neues Well gegeben und mit 2,75 ml frischem Medium gemischt. Vierundzwanzig Stunden nach dem Zellsplitting wurde der Inhalt eines neuen Wells im Verhältnis 1:1 auf zwei Wells aufgeteilt und zu jedem dieser Wells 1,5 ml frisches Medium hinzugegeben.

### **3.3.1.2. Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen**

Zur Ausdifferenzierung der ER-Hoxb8-Zellen mussten die Zellen in östradiolfreies Medium überführt werden. Dazu wurden die Vorläuferzellen zunächst abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml PBS mit 10% FCS resuspendiert. Dieser Arbeitsschritt wurde einmal wiederholt und die Zellen daraufhin in 3 ml Ausdifferenzierungsmedium (= Östrogen-freies Kulturmedium) resuspendiert und die Zelldichte mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ermittelt. Dazu wurden 20 µl der Zellsuspension mit 80 µl Trypan-Blau-Lösung gemischt; Trypan-Blau kann von toten Zellen nicht aus dem Zytosol ausgeschleust werden, d.h. es reichert sich in toten Zellen an und verfärbt diese blau bis dunkelblau. Unter einem Lichtmikroskop wurden die Zellen bei 40-facher Vergrößerung in einem Großquadrat der Zählkammer gezählt. Die Zellzahl pro Mikroliter berechnet sich wie folgt: Zellzahl [n/µl] = Z x Verdünnungsfaktor (5) x Kammerfaktor (1,25) x 4 (Z = ausgezählte Zellzahl in Kammer; Faktor 4, da nur 4 statt 16 Quadrate ausgezählt wurden). In Anschluss wurde durch Zugabe von Ausdifferenzierungsmedium die Zellkonzentration im Medium auf  $1 \times 10^5$  (lebende, nicht blau gefärbte) Zellen/ml eingestellt und von dieser Suspension jeweils 3 ml in die Wells einer 6 Well-Platte pipettiert. Nach 4-tägiger Kultivierung im Ausdifferenzierungsmedium wurden die ER-Hoxb8-Neutrophilen in ein Ausdifferenzierungsmedium ohne Antibiotika transferiert.

### **3.3.2 Murine Knochenmarks-Granulozyten**

Zur Herstellung muriner Knochenmarks-Granulozyten wurden die *Femores* von C57BL6/n-Mäusen entnommen, an beiden Enden eröffnet und jeweils mit 5 ml PBS gespült. Die so gewonnene Knochenmarkssuspension wurde titriert und größere verbliebene Gewebefragmente durch Filtrierung über ein 70 µm-Sieb abgetrennt. Das Filtrat wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet zur Lyse von Erythrozyten mit hypotoner NaCl-Lösung (0,2%) inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension über einen Gradienten aus Percoll (52%/64%/72%; verdünnt mit 1,5 M NaCl und *Aqua dest.*; Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) geschichtet. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 1000 g konnten die Neutrophilen aus der Grenzschicht zwischen 64%iger und 72%iger Percolllösung gewonnen werden. Anschließend wurden diese Zellen mit PBS gewaschen und in

einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Optimem-Medium mit 0,5% Nutridoma-SP Medium suspendiert.

Zur Überprüfung der Reinheit der Zellpräparation wurden zwei Methoden eingesetzt: der durchflußzytometrische Nachweis GR1-positiver Zellen (deren Anteil war regelhaft größer als 97%) und die morphologische Beurteilung der Zellpräparation. Hierzu erfolgte die Fixation und Färbung der Zellen mit Hilfe eines Färbekits (Hemacolor, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland). Mit Hemacolor® wird ein Färbeergebnis erzielt, das der Pappenheim Färbung entspricht. Dazu wurde der Objektträger mit dem Zellausstrich erst luftgetrocknet und anschließend 10 s in Fixierlösung (Methanol) und je 20 s in Färbelösung 1 (Eosinlösung) und 2 (Thiazinlösung) gehalten. Die Färbung wurde im Anschluss mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet. Daraufhin erfolgte eine morphologische Beurteilung von 100 Zellen unter dem Lichtmikroskop (Anteil von Granulozyten > 95%).

### **3.3.3. Murine Knochenmarks-Makrophagen**

Zur Gewinnung von Makrophagen (BMDM, aus WT-Mäusen) wurden murine Knochenmarkszellen aus dem *Femur* von WT-Mäusen entnommen. Die Knochen wurden mit eisgekühlter PBS gespült und die Zellsuspension durch ein 70 µm-Sieb filtriert. Die aufgefangenen Zellen wurden in Makrophagen-Medium (DMEM, 50 ng/ml rM-CSF, 10% FCS, 10 mM HEPES, 10 mM L-Glutamin und 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin) resuspendiert und bei 5%iger Kohlendioxidbegasung und 37°C kultiviert. Vier Tage später erfolgte ein Mediumwechsel. Nach weiteren drei Tagen wurde das Medium abgenommen und durch 5 ml Accutase-Lösung (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) ersetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde die Zellsuspension in ein 50ml Falconröhrchen transferiert und zentrifugiert. Daraufhin wurde das Zellpellet in 2 ml antibiotikafreiem Makrophagenmedium resuspendiert und die Zellzahl wie unter Punkt 3.3.1.2 beschrieben bestimmt. Anschließend wurde eine definierte Zahl von Makrophagen (200 000 Zellen pro Well) in Makrophagen-Medium ohne Penicillin/Streptomycin in die einzelnen Vertiefungen einer 96-Well-Zellkulturplatte gegeben.

### **3.3.4 Stimulation mit verschiedenen *Streptococcus pneumoniae*-Stämmen**

Vierundzwanzig Stunden nach Einbringen der Zellen in Antibiotika-freies Medium wurden die ER-Hoxb8-Granulozyten in ein Falcon-Röhrchen transferiert, zentrifugiert, nach Entfernen des Überstands in 2 ml Stimulationsmedium (Optimem-Medium plus 30 mM Mercaptoethanol, 4% SCF und 1% Mausserum) resuspendiert und anschließend gezählt. Im Anschluss wurde durch Verdünnen mit dem Stimulationsmedium eine Suspension aus 2 Millionen Zellen pro ml Medium hergestellt und jeweils 150 µl dieser Suspension in die einzelnen Vertiefungen einer 96-Well-Platte eingebracht. Für die Stimulation wurden folgenden Bakterienstämmen verwendet: [i] ein *S. pneumoniae* D39-Wildtyp-Stamm, [ii] ein isogener Pneumolysin-defizienten D39ΔPLY-Stamm, sowie [iii] ein Pneumolysin-produzierender und [iv] ein Pneumolysin-defizienter Serotyp 6a- und 6b-Stamm, die uns dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. Sven Hammerschmidt (Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald) zur Verfügung gestellt worden waren. Zwei, vier und acht Stunden nach der Stimulation wurden Überstände gewonnen, zentrifugiert und für die Bestimmung von S100A8/A9 mittels ELISA bzw. S100A8 und S100A9 mittels Western Blot bei -20°C eingefroren. Außerdem fand zu den jeweiligen Zeitpunkten eine Aktivitätsbestimmung der Lactatdehydrogenase, wie unter Punkt 3.3.3 beschrieben, statt.

Die selektiven Hemmstoffen des klassischen ER-Golgi-Sekretionswegs und nicht-klassischer Sekretionswege Brefeldin A und Demecolcin (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) sowie deren Vehikel wurden den ausdifferenzierten ER-Hoxb8-Granulozyten in einer Konzentration von jeweils 5 µg/ml vor Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae* Typ 2 (D39-Stamm, 6 Stunden lang) hinzugegeben. Kontrollzellen (CON) wurden entweder mit Medium oder *Streptococcus pneumoniae* Typ 2 inkubiert.

Die BMDMs wurden 24 Stunden nach Umsetzen in antibiotikafreies Makrophagen-Medium mit folgenden Substanzen stimuliert bzw. behandelt: [i] S100A8, S100A9 und S100A8/A9, [ii] S100A8, S100A9, S100A8/A9 in Gegenwart eines anti-Maus TLR4-Antikörpers (1A6-Klon) oder dessen Isotyp-Kontrollantikörpers (beide Antikörper wurden uns freundlicherweise von NovImmune, Genf, Schweiz, zur Verfügung gestellt), [iii] Pneumokokken (D39-Stamm), die vor Zugabe zu den BMDMs 2 oder 20 Stunden lang mit Penicillin/Streptomycin behandelt (und dadurch lysiert) worden waren, und [iv] Pneumokokken, die zuvor 20 Stunden lang mit

Penicillin/Streptomycin inkubiert worden waren, in Kombination mit S100A8, S100A9 oder S100A8/A9. Außerdem wurden die BMDMs mit aufsteigenden Konzentrationen von unbehandelten *Streptococcus pneumoniae* inkubiert. Zwei, vier und acht Stunden nach der Stimulation wurden Überstände gewonnen, zentrifugiert und für die Bestimmung von CXCL-2 mittels ELISA und S100A9 mittels Western Blot bei -20°C eingefroren. Zusätzlich fand zu den jeweiligen Zeitpunkten eine Aktivitätsbestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH), wie unter Punkt 3.3.5 beschrieben, statt.

Die BMNs wurden entweder mit aufsteigenden Konzentrationen von *Streptococcus pneumoniae* D39, der isogenen Pneumolysin-Mutante D39 $\Delta$ PLY oder mit Medium für die Dauer von 4 Stunden inkubiert. Am Versuchsende wurden im Zellkulturüberstand die Freisetzung von S100A9 mittels Western Blot und die Aktivität der Lactatdehydrogenase, wie unter Punkt 3.3.5 beschrieben, bestimmt.

### **3.3.5 Photometrische Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH)**

Die LDH ist ein ubiquitäres zytoplasmatisches Enzym, das bei einer Schädigung der Zellmembran (z.B. im Rahmen eines nekrotischen Zelluntergangs) in den Extrazellulärtraum freigesetzt wird. Die LDH-Konzentration im Zellkulturüberstand korreliert dabei mit dem Ausmaß des Zelluntergangs. Die LDH katalysiert die Oxidation von Lactat zu Pyruvat und reduziert gleichzeitig NAD<sup>+</sup> zu NADH/H<sup>+</sup>. Im verwendeten kolorimetrischen LDH-Nachweisverfahren reagiert NADH mit einer spezifischen Substanz unter Bildung eines Farbstoffes, der ein Absorptionsmaximum bei 450 nm aufweist (Biovision Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit, Biovision Inc., Milpitas, California, USA). Die LDH-Konzentration wurde jeweils in zentrifugierten Zellkulturüberständen (S), in zentrifugierten Kontroll-Zellüberständen nach Lyse mit Triton X-100 (Positivkontrolle; PC) und in zellfreiem Kontrollmedium (Negativkontrolle; NC) gemessen. Die Zytotoxizität wurde im Anschluss als prozentualer Anteil der maximalen LDH-Freisetzung (nach physikalischer Zellyse) entsprechend folgender Formel berechnet: (S-NC/PC-NC) x 100.

### **3.3.6 Testverfahren zur Bestimmung der Hämolyse**

Die Produktion von Pneumolysin wurde, wie von Benton *et al.* (1997) beschrieben, mit Hilfe eines Hämolyse-Assays geprüft. Dabei wurden je 100 µl eines Dithiothreitol-Christina Wache, 2015

Puffers (10 mM Dithiotreitol, 0,1% bovines Serumalbumin in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung, pH 7,4) in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) gegeben. Den Wells in der ersten Reihe der Platte wurden keine Bakterien hinzugegeben. Einige Bakterienkolonien, die über Nacht auf Blutagar-Platten gewachsen waren, wurden mit einer sterilen Impföse abgenommen und in 5 ml Medium aus Todd-Hewith Broth mit 0,5% Hefeextrakt (THY) eingebracht und zentrifugiert. Das daraus entstandene Pneumokokken-Pellet wurde mit 400 µl Lysepuffer (0,01% Natriumdodecylsulfat, 0,1% Natriumdeoxycholat, 0,015 M Natriumcitrat) lysiert und bei 37°C für 30 min inkubiert.

In die Reihen 2, 3 und 4 wurden je 50 µl des lysierten Pneumokokken-Pellets (hierfür wurden die Stämme D39, D39 $\Delta$ PLY, Serotyp 6b<sub>trans</sub> und Serotyp 6b<sub>opaque</sub> verwendet) hinzugefügt und seriell im Verhältnis 1:1, 1:2 und 1:4 verdünnt. Anschließend wurden in jede Vertiefung fünfzig Mikroliter von 2%igem Schafsstammblut pipettiert. Die Platte wurde für 10 min bei 37°C inkubiert und danach für weitere 10 min mit 1000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Wells auf Lyse des Schafsstammbluts hin (Lysezeichen: aufgelöstes Erythrozyten-Pellet, Rotfärbung und Trübung der Pufferlösung) untersucht.

### **3.3.7 Western Blot-Analyse von S100A8 und S100A9**

Zehn µl Zellkulturüberstand oder 3 µl Liquor (der mit 7 µl PBS versetzt wurde) wurden 1:2 bzw. 1:6 in Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 0,05% Bromphenolblau, 20% Glycerol und 5% β-Mercaptoethanol) verdünnt und für 10 min in einer Mikrowelle auf 60°C erhitzt. Daraufhin wurden für die Elektrophorese jeweils 20 µl in die Taschen eines 4-12%igen NuPage Tris-Bis Gels (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) gegeben und bei U = 200 V und I = 110 mA 35 min lang in einem Laufpuffer (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland; unter Zusatz von 950 ml *Aqua dest.*) aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) mit Hilfe eines Transferpuffers (50 ml Puffer, 100 ml Methanol und 850 ml *Aqua dest.*, U = 30 V, I = 170 mA, t = 60 min.) wurden die Proteine durch Trocknen bei 37°C im Trockenschrank auf der Membran fixiert. Anschließend wurden sie bei 4°C für 18 Stunden mit Kaninchen-Antiserum, das entweder gegen S100A8 oder S100A9 gerichtet war (Verdünnung 1:1000 mit PBS-Tween und 0,5% Milchpulver), inkubiert.

Dann wurden die Membranen 15 min in PBS-Tween gewaschen und mit einem Peroxidase-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Verdünnung 1:2000; Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) eine Stunde lang inkubiert. Daraufhin folgte wiederum ein 15-minütiger Waschschritt. Primär gebundene Antikörper wurden mit dem FemtoMax Chemilumineszenz-Substrat-Kit detektiert (Rockland Inc., Gilbertsville, USA). Anschließend wurden die Blots mit einem Doc-It® LS Bildanalyse-System (UVP Inc., Upland, California, USA) visualisiert und digitalisiert.

### **3.4 Humane Liquorproben**

Um die Freisetzung von S100A8/A9 während der Erkrankung beim Menschen zu bestätigen, analysierten wir Liquorproben von 20 erwachsenen Patienten mit Kultur-positiver Pneumokokkenmeningitis sowie von zehn Alters- und Geschlechts-abgestimmten Patienten mit nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen (drei mit Migräne, zwei mit Kopfschmerzen anderer Ätiologie und fünf mit idiopathischer Fazialisparese). Die Proben wurden mit Hilfe von ELISA und/oder Western Blot untersucht. Bei allen Patienten wurde die Lumbalpunktion aus diagnostischen Gründen nach Aufklärung und Einverständniserklärung durchgeführt. Die Nutzung der Proben wurde von den Ethikkommissionen der Universitäten München und Kopenhagen (Proben von Patienten mit Pneumokokkenmeningitis unseres Kooperationspartners Herrn Prof. Dr. Christian Ostergaard; Institut für Klinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Kopenhagen Hirvore, Dänemark) genehmigt.

### **3.5 Statistische Analyse**

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden die erhobenen Daten mittels einseitiger Varianzanalyse (ANOVA, *one way analysis of variance*) und dem Bonferroni Post Hoc-Test verglichen. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant betrachtet. In den Abbildungen sind die Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung (SDV) dargestellt.

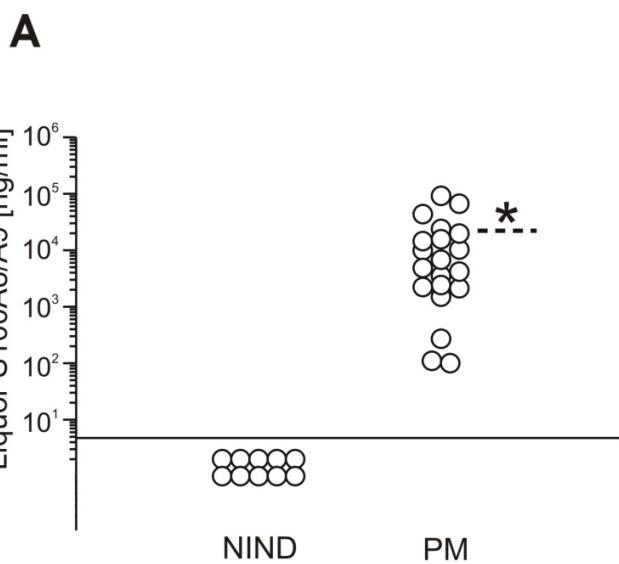
## **4. Ergebnisse**

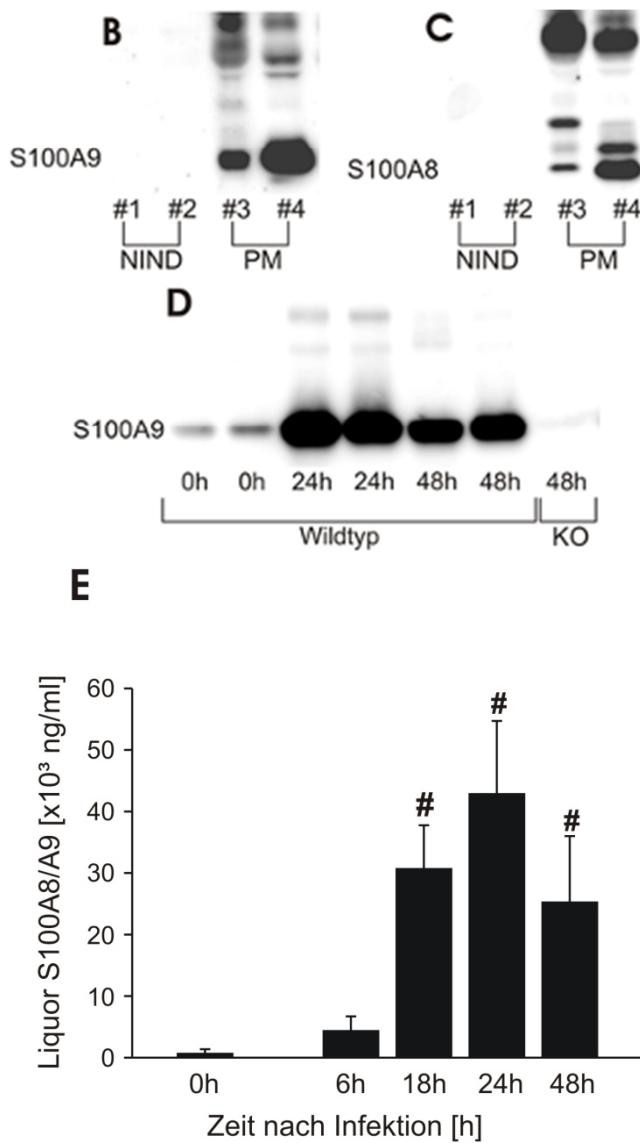
### **4.1 Untersuchungen zur Expression von S100A8/A9 bei der Pneumokokkenmeningitis**

#### **4.1.1 S100A8/A9-Freisetzung in den Liquor während der Pneumokokkenmeningitis**

Bis jetzt ist sehr wenig über die Freisetzung von S100A8/A9 bei ZNS-Erkrankungen bekannt. Lediglich in Liquorproben von Patienten, die an einer Alzheimer-Erkrankung litten, war bisher eine signifikante (wenn auch nur geringgradige) Erhöhung der S100A8/A9-Konzentrationen im Vergleich zu Kontrollen beschrieben worden (Kummer et al., 2012). In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von ELISA-Untersuchungen eine massive Freisetzung von S100A8/A9 in den Liquor von Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis festgestellt (Abb. 9 A). Bei zusätzlichen Western Blot-Analysen mit Antikörpern, die entweder gegen S100A8 oder S100A9 gerichtet waren, zeigten sich in diesen Liquorproben deutliche Banden bei 8 kDa und 14 kDa, die die monomere Form dieser Proteine kennzeichnen (Abb. 9 B, C).

**Abbildung 9: Expression und Freisetzung von S100A8/A9 bei der Pneumokokkenmeningitis**





**Legende:** **A – C.** S100A8/A9-Konzentrationen in Liquorproben von Patienten mit Pneumokokkenmeningitis (PM) oder nicht-entzündlichen neurologischen Krankheiten (NIND). **A.** Befunde der ELISA-Messung. **B, C.** Abbildung repräsentativer Western Blot-Befunde. **D, E.** S100A8/A9-Konzentrationen in murinen Liquorproben. Wildtyp = C57BL6/n-Mäuse. KO = S100A9-defizienten-Mäuse. **D.** Abbildung repräsentativer Western Blot-Ergebnisse. **E.** Darstellung der ELISA-Resultate. \*  $p < 0,05$ , verglichen mit Patienten mit NIND mittels ungepaartem Student's-t-Test. #  $p < 0,05$ , verglichen mit Liquorproben, die vor oder 6 Stunden nach Infektion gewonnen wurden, mittels einfacher Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni Post Hoc-Test.

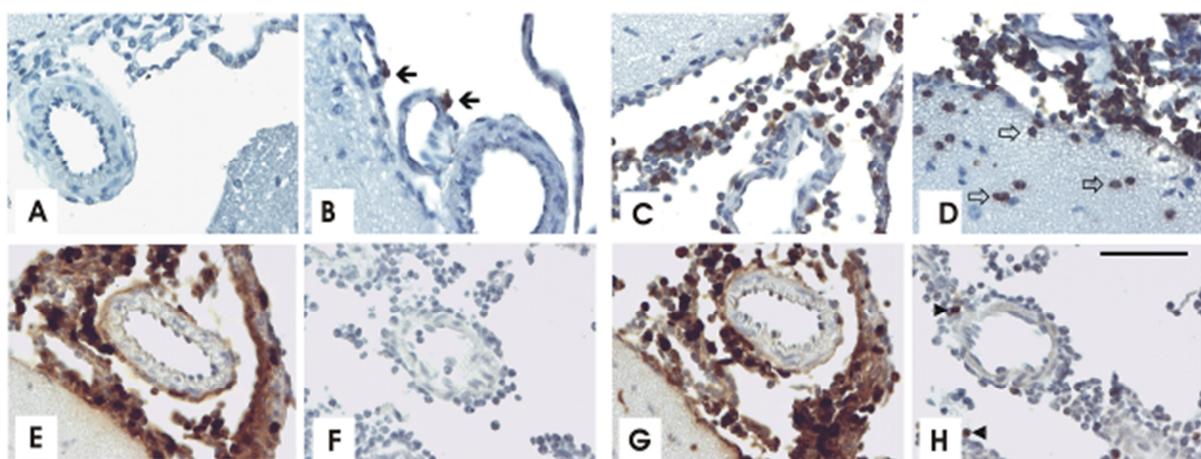
Außerdem waren Banden mit molekularen Massen zwischen 16 und 42 kDa sichtbar, die möglicherweise dimere oder trimere Homo- und/oder Heteromere von S100A8 und S100A9 repräsentieren. Ähnlich wie beim Menschen war S100A8/A9 sowohl bei Western Blot- als auch bei ELISA-Untersuchungen in Liquorproben von Mäusen mit einer Pneumokokkenmeningitis nachweisbar (Abb. 9 D, E).

Bemerkenswerterweise waren die Konzentrationen von S100A8/A9 in den Liquorproben zu den Beobachtungszeitpunkten 18, 24 und 48 Stunden *post infectionem* signifikant höher als zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Infektion. Dieser Befund könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Proteine eher im fortgeschrittenen als im frühen Krankheitsstadien von pathophysiologischer Bedeutung sind.

#### **4.1.2 Zelluläre Quellen von S100A8/A9 bei der Pneumokokkenmeningitis**

Um einen Einblick in die zellulären Quellen von S100A8 und S100A9 bei der Pneumokokkenmeningitis zu bekommen, führten wir in der Folge immunhistochemische Untersuchungen und Granulozyten-Depletionsversuche durch. In den Abbildungen **10 A - H** sind die wesentlichen Befunde der immunhistochemischen Analysen dargestellt (Abb. **10 A - H**): S100A9 ließ sich im gesunden Kontroll-Hirngewebe nicht anfärben. In infizierten Mäusehirnen wurden S100A9-positive Zellen vornehmlich im entzündlichen Infiltrat im Subarachnoidalraum gefunden. In fortgeschrittenen Entzündungsstadien waren S100A9-positive Zellen überdies in oberflächlichen kortikalen Schichten des Gehirns detektierbar. Vermutlich handelt es sich bei den angefärbten Zellen um infiltrierte Granulozyten (Abb. **10 A - D**). Immunfärbungen mit S100A8-Antikörpern zeigten ähnliche Resultate wie Färbungen mit S100A9-Antikörpern (Abb. **10 E, G**).

**Abbildung 10: Immunhistochemische Färbungen muriner Hirnschnitte**



**Legende:** Immunhistochemische Färbungen muriner Hirnschnitte mit S100A9-Antikörpern: nicht infizierte Kontrollmaus [A], WT-Maus 6 Stunden nach Infektion [B], 24 Stunden nach Infektion [C] und 48 Stunden nach Infektion [D, E], sowie S100A9-defiziente Maus 48 Stunden nach Infektion [F]. Schwarze und schwarz-umrandete Pfeile deuten auf S100A9-

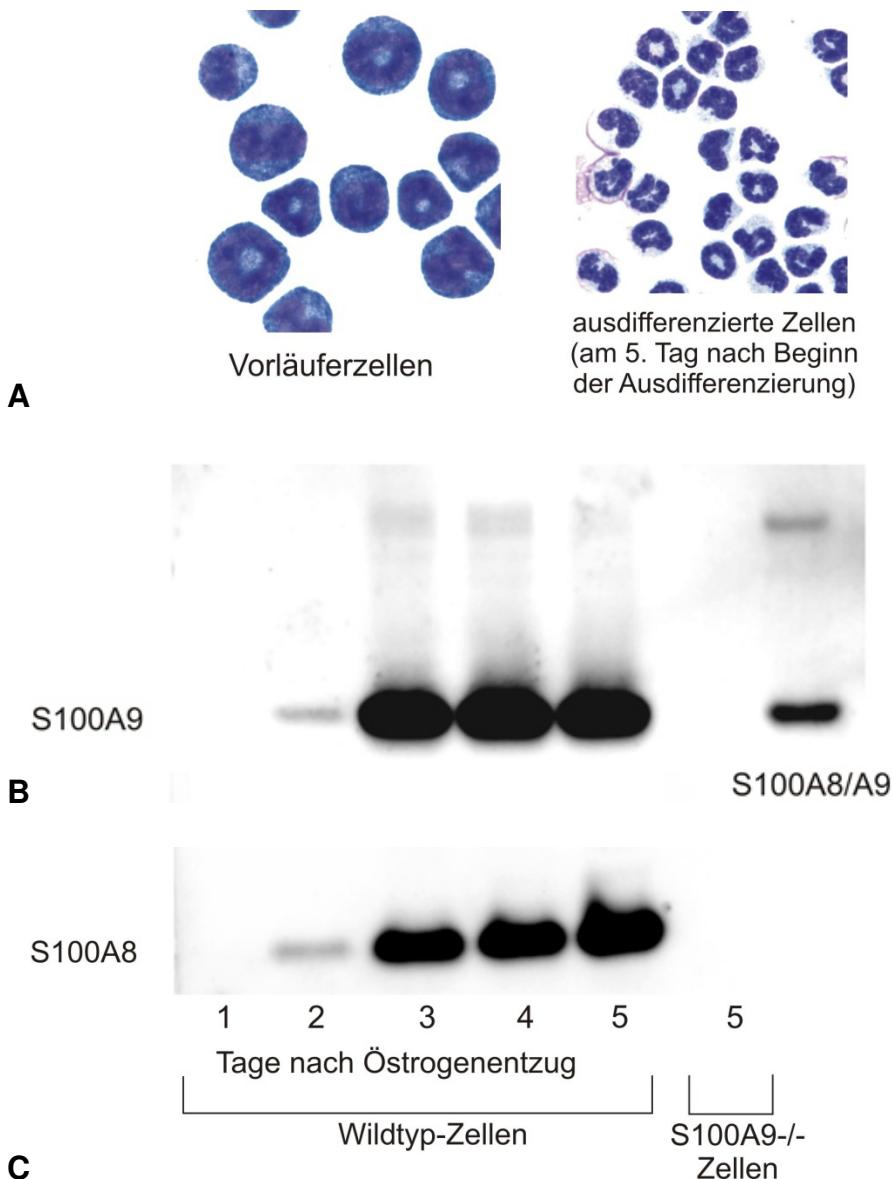
positive Leukozyten im Subarachnoidalraum und im superfiziellem zerebralen Kortex. Immunhistochemische Färbungen von Hirnschnitten mit S100A8-Antikörpern: WT-Maus [G] und S100A9-defiziente Maus [H] 48 Stunden nach Induktion der Meningitis. Die Pfeilköpfe deuten auf S100A8-positive Zellen. Der Maßstabsbalken zeigt 100 µm.

Um Granulozyten als wichtige Quelle von S100A8/A9 zu verifizieren, depletierten wir in einer weiteren Versuchsreihe durch eine Vorbehandlung mit anti-GR1-Antikörpern Mäuse von Granulozyten. Anschließend bestimmten wir die S100A8/A9-Konzentration in Liquorproben, die wir 24 Stunden nach der Krankheitsinduktion gewonnen hatten. Die Granulozyten-Depletion resultierte in einer deutlichen Reduktion der Granulozytenzahl in Blut ( $165 \pm 182$  Zellen/µl, im Vergleich zu  $2797 \pm 540$  Zellen/µl im Blut von Isotyp-Kontrollmäusen) und Liquor ( $1,149 \pm 469$  Zellen/µl, im Vergleich zu  $11,872 \pm 2,603$  Zellen/µl im Liquor von Isotyp-Kontrollmäusen; Reduktion von über 90%). Die Eliminierung von Granulozyten wurde von einer signifikanten Reduktion der S100A8/A9-Konzentration im Liquor begleitet ( $9,1 \pm 5,1$  µg/ml im Vergleich zu  $51,0 \pm 10,4$  µg/ml in Isotyp-Kontrollmäusen). Diese Beobachtung unterstützte somit unsere histologischen Untersuchungsergebnisse.

#### **4.2 S100A8/A9 wird Pneumolysin (PLY)-abhängig aus nekrotischen neutrophilen Granulozyten freigesetzt**

Zur weiteren Charakterisierung des Freisetzungsmechanismus von S100A8/A9 führten wir zellkulturelle Untersuchungen durch. Dabei verwendeten wir in erster Linie sogenannte ER-Hoxb8-Granuloyzten. Bei diesen Zellen handelt es sich um murine Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von C57BL6/n-Mäusen, die mit einem retroviralen Vektor transfiziert wurden, der neben der Östrogen-bindenden Domäne des Östrogenrezeptors den Transkriptionsfaktor ER-Hoxb8 enthält. Dadurch exprimieren diese Zellen in Gegenwart von extrazellulärem Östrogen ER-Hoxb8, das die Proliferation, nicht aber die Ausreifung von hämatopoetischen Vorläuferzellen induziert (Wang et al., 2006). Wird den Zellen das Östrogen entzogen, differenzieren sie innerhalb weniger Tage zu Neutrophilen aus. In Voruntersuchungen konnten wir zeigen, dass diese Zellen während der Ausdifferenzierung zu Granulozyten zunehmend S100A8 und S100A9 exprimieren (Abb. 11).

**Abbildung 11: Ausdifferenzierung von ER-Hoxb8-Granuloyzten aus ER-Hoxb8-Progenitorzellen**

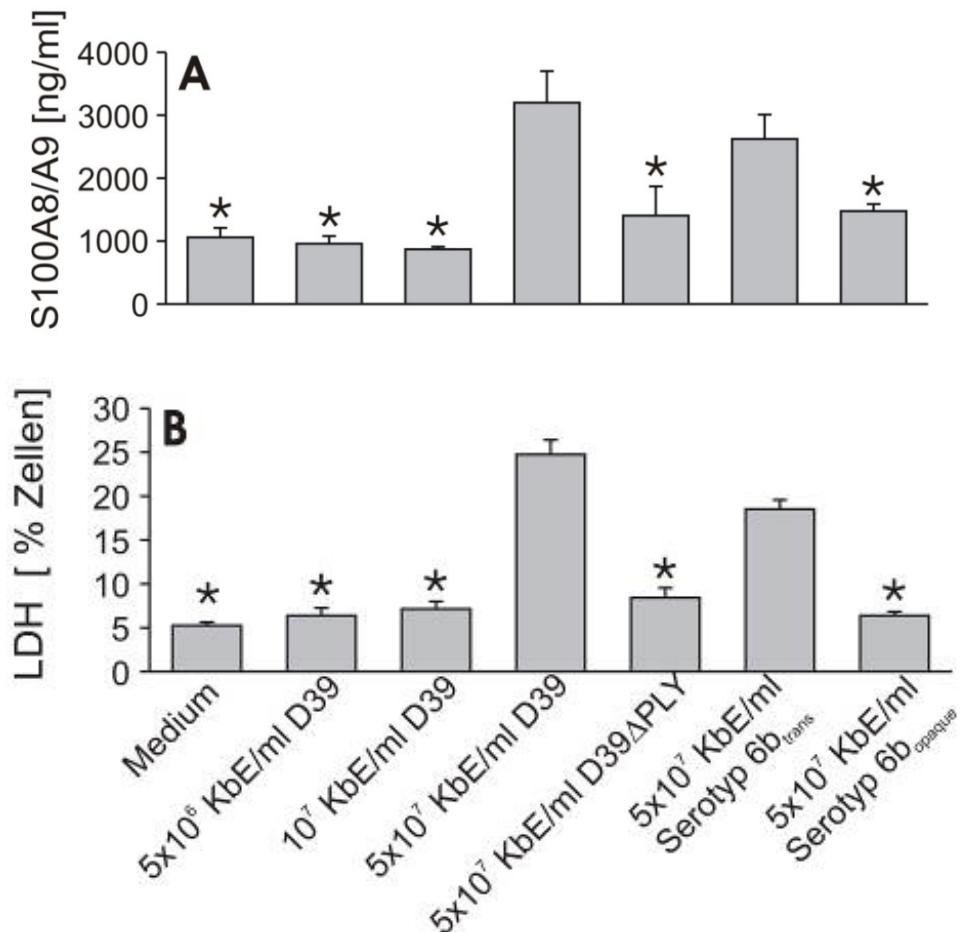


**Legende:** [A] Die Ausdifferenzierung der Progenitorzellen (links) wurde durch Östrogenentzug induziert. Nach 5-tägiger Kultivierung mit oder ohne Östrogen wurden die Zellen mit Giemsa-Färbung angefärbt, um ihre Kernmorphologie sichtbar zu machen. Man beachte die typische Segmentierung der murinen neutrophilen Granulozyten (rechts). [B, C] Die intrazelluläre S100A8- und S100A9-Expression wurde mit Hilfe von Western Blot-Untersuchungen von Zellysaten während des Ausdifferenzierungsprozesses gemessen. Als Negativkontrollen dienten Lysate von S100A9-defizienten ER-Hoxb8-Zellen. Gereinigtes S100A8/S100A9 (2 ng/Spur) diente als Positivkontrolle.

Die Stimulation mit  $5 \times 10^7$  KBE/ml Pneumokokken (aber nicht mit  $5 \times 10^6$  KBE/ml oder  $5 \times 10^5$  KBE/ml) führte zu einer signifikanten Freisetzung von S100A8/A9 in den Zellkulturüberstand (Abb. 12 A). Die Freisetzung von S100A8/A9 ging mit einem

vermehrten Zelluntergang einher, was aus dem Anstieg der LDH-Konzentration in den Zellkulturüberständen geschlossen werden kann (Abb. 12 B).

**Abbildung 12: S100A8/A9-Freisetzung aus Neutrophilen wird durch Pneumolysin-induzierten Zelltod gefördert**



**Legende:** Ausdifferenzierte murine ER-Hoxb8-Neutrophile wurden Pneumolysin (PLY)-produzierenden (D39- und 6b $_{trans}$ -Stamm) oder PLY-defizienten *Streptococcus pneumoniae*-Stämmen (isogene D39-Mutante D39 $\Delta$ PLY- und 6b $_{opaque}$ -Stamm) ausgesetzt. S100A8/A9-Konzentrationen wurden mittels ELISA 4 Stunden nach Stimulation mit Pneumokokken in den Zellkulturüberständen gemessen. Das Ausmaß des Zelltods wurde durch Bestimmung der extrazellulären Laktatdehydrogenase-Menge (LDH) ermittelt. Die Pneumokokken induzierten, abhängig von ihrer Konzentration, die Freisetzung von S100A8/A9 aus ER-Hoxb8-Neutrophilen [A]. Die Freisetzung von S100A8/A9 korrelierte mit einer erhöhten Freisetzung von LDH in den Zellüberständen [B]. Die Daten von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Dreifachexperimenten sind als Mittelwerte  $\pm$  SDV angegeben. \* p < 0,05, im Vergleich mit stimulierten Zellen des D39-Stammes (ANOVA und Bonferroni Post Hoc-Test).

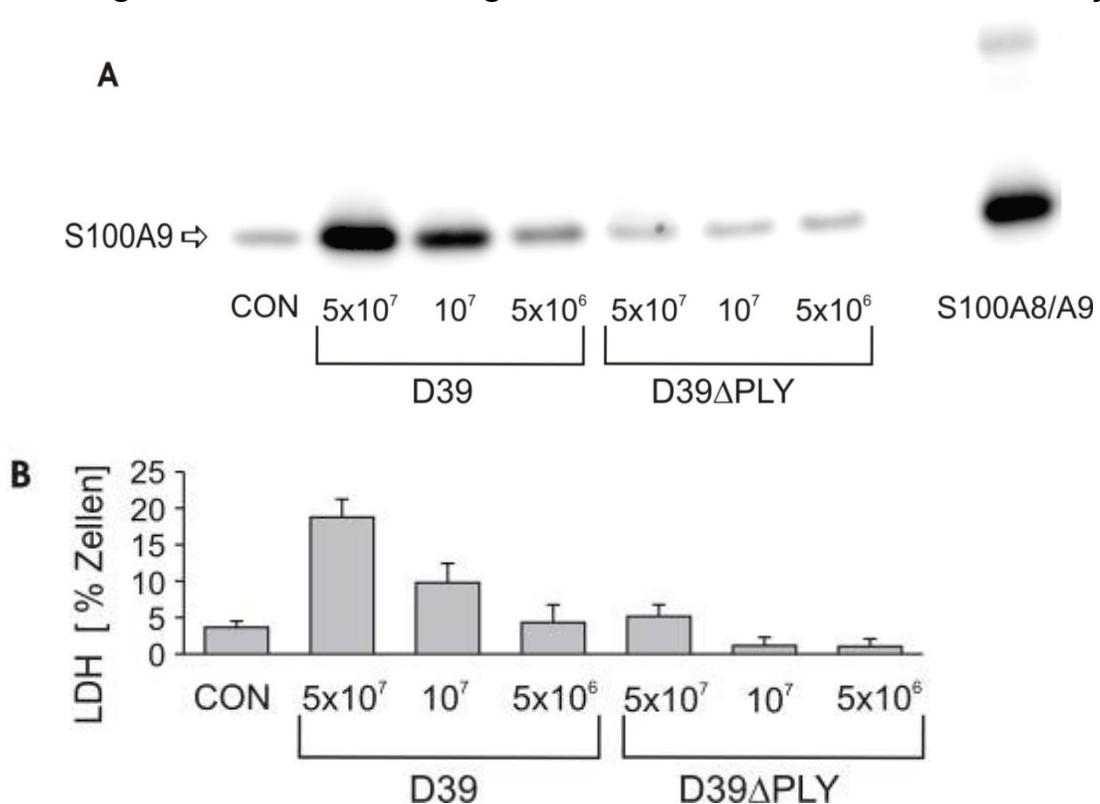
*Streptococcus pneumoniae* besitzt eine Reihe von Virulenzfaktoren, die das Überwinden von Schleimhautbarrieren, das Überleben in der Blutbahn und das

Eindringen ins Gewebe begünstigen. Der bekannteste und vermutlich bedeutendste dieser Faktoren ist das porenbildende Toxin Pneumolysin. Da Pneumolysin nachgewiesener Weise zur Pneumokokken-induzierten Nekrose humaner Granulozyten beitragen kann (Bruck et al., 1995), setzten wir murine ER-Hoxb8-Neutrophile sowohl einer isogenen Pneumolysin-defizienten D39 $\Delta$ PLY-Mutante als auch einem PLY-bildenden und -defizientem Serotyp 6b-Stamm aus. Beide PLY-defizienten Stämme zeigten im Vergleich zu den entsprechenden WT-Stämmen eine signifikant reduzierte Fähigkeit, S100A8/A9-Freisetzung zu induzieren. Die Reduktion der Freisetzung von S100A8/A9 ging mit einer eingeschränkten Toxizität der PLY-defizienten Stämme einher. Das spricht für ein PLY-abhängiges, passives Austreten von S100A8/A9 aus sterbenden Zellen als hauptsächlicher Freisetzungsmechanismus von S100A8/A9.

Die Ergebnisse, die die Versuche mit ER-Hoxb8-Zellen lieferten, konnten bei primären BMNs nachvollzogen werden (Abb. 13). Im Gegensatz dazu setzten BMDMs *in vitro* nach Stimulation mit  $5 \times 10^7$  KBE/ml Pneumokokken kein S100A8/A9 in den Zellkulturüberstand frei (Abb. 14).

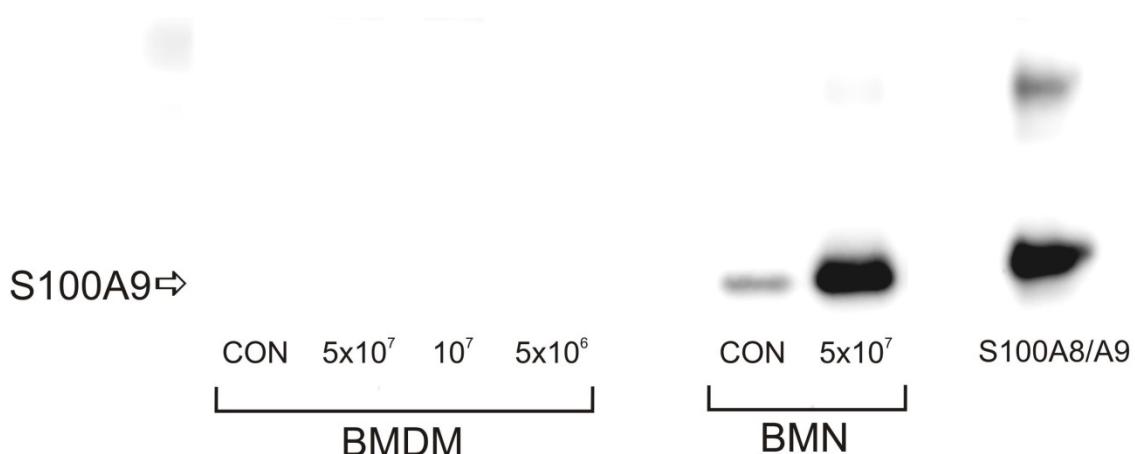
Für eine passive Freisetzung von S100A8/A9 sprechen ferner Befunde von Versuchsreihen mit selektiven Hemmstoffen des klassischen ER-Golgi-Sekretionswegs und nicht-klassischer Sekretionswege, wie Brefeldin A und Demecolcin. Weder durch die Zugabe von Brefeldin A noch durch Demecolcin konnte die Pneumokokken-induzierte S100A8/A9-Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten abgeschwächt werden (Abb. 15).

**Abbildung 13: S100A9-Freisetzung aus murinen Knochenmarks-Granulozyten**



**Legende:** S100A9- und LDH-Freisetzung wurde in Zellkulturüberständen von BMNs mit Hilfe von Western Blot- [A] und LDH-Aktivitäts-Untersuchungen [B] bestimmt. Dabei wurden die BMNs aufsteigenden Konzentrationen von *Streptococcus pneumoniae* Typ 2 (D39-Stamm, über 6 Stunden) oder der isogenen PLY-defizienten Mutante D39 $\Delta$ PLY ausgesetzt. Bei den Western Blot-Analysen diente gereinigtes S100A8/A9 als Positivkontrolle.

**Abbildung 14: S100A9-Freisetzung aus murinen Makrophagen und Granulozyten**



**Legende:** S100A9-Freisetzung wurde in Zellkulturüberständen von BMDMs mit Hilfe von Western Blot-Analysen bestimmt. Dabei wurden die BMDMs steigenden Konzentrationen von *Streptococcus pneumoniae* Typ 2 (D39-Stamm, über 6 Stunden) ausgesetzt. Gereinigtes S100A8/A9 und Überstände von BMNs dienten als Positivkontrollen.

**Abbildung 15: S100A9-Freisetzung aus murinen ER-Hoxb8-Neutrophilen**



**Legende:** Die Freisetzung von S100A9 wurde in Zellkulturüberständen von ER-Hoxb8-Neutrophilen mit Hilfe von Western Blot-Analysen bestimmt. ER-Hoxb8-Neutrophile wurden *Streptococcus pneumoniae* Typ 2 (D39-Stamm, 6 Stunden lang) ausgesetzt und mit Vehikel, Demecolcin (DC) oder Brefeldin A (BFA) behandelt. Kontrollzellen (CON) wurden nur mit Medium inkubiert. Als Positivkontrolle diente gereinigtes S100A8/A9.

Zur Evaluation der Bedeutung dieses Freisetzungsmechanismus bei der Pneumokokkenmeningitis (*in vivo*) infizierten wir Mäuse entweder mit dem PLY-bildenden D39-Stamm oder der isogenen PLY-defizienten D39 $\Delta$ PLY-Mutante. Daraufhin bestimmten wir die S100A8/A9-Konzentration in Liquorproben, die wir 24 Stunden später gewonnen hatten. Die S100A8/A9-Konzentrationen im Liquor waren nach einer Infektion mit der PLY-defizienten Mutante signifikant niedriger als nach intrazisternaler Inokulation des entsprechenden Wildtyp-Stamms ( $14,9 \pm 8,7 \mu\text{g/ml}$  bei Mäusen, die mit D39 $\Delta$ PLY infiziert worden waren, *versus*  $50,9 \pm 26,2 \mu\text{g/ml}$  in Mäusen, die mit dem D39-Wildtypstamm infiziert worden waren;  $p = 0,03$ ). Dieses Ergebnis unterstreicht unsere Beobachtungen bei ER-Hoxb8- und Knochenmarks-Granulozyten.

#### **4.3 S100A8/A9 verstärkt die Entzündungsreaktion unter antibiotischer Therapie**

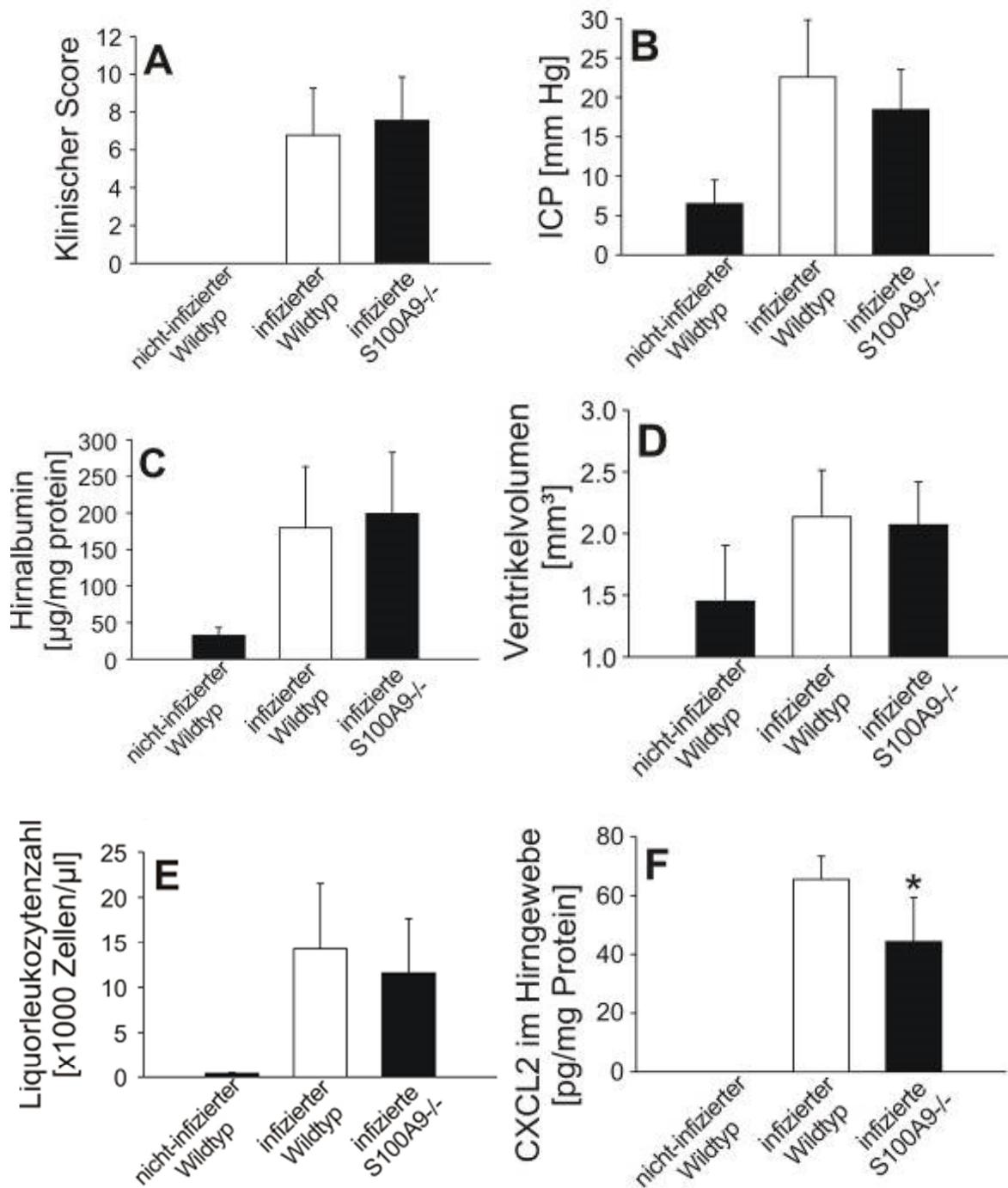
Zur Charakterisierung der funktionellen Bedeutung von S100A8/A9 im frühen oder fortgeschrittenen Stadium der Pneumokokkenmeningitis infizierten wir S100A9-defizierte und WT-Mäuse intrazisternal mit *S. pneumoniae* und untersuchten sie entweder 24 oder 48 Stunden später. Da die Überlebenszeit der unbehandelten Meningitis in unserem Modell bei 36 – 60 Stunden liegt, wurden die Mäuse bei einer geplanten Beobachtungszeit von 48 Stunden 24 Stunden *post infectionem*

antimikrobiell behandelt, um die Ausfalls(Sterbe)rate möglichst niedrig zu halten (die Ausfallsrate bei den WT-Mäusen betrug 1/10, bei den S100A9<sup>-/-</sup>-Mäusen 0/9).

Die genetische Depletion von S100A9 hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung der Meningitis. Vierundzwanzig Stunden nach der Infektion zeigten S100A9-defiziente Mäuse eine ähnliche Krankheitssymptomatik wie WT-Mäuse: beide Mäusestämme wiesen vergleichbare klinische Score-Werte (Abb. **16 A**), Körpertemperaturen und Gewichtsverluste auf (Tabelle **2**). Dementsprechend waren die intrakraniellen Komplikationen, wie z.B. die intrakranielle Druckerhöhung, die Störung der Blut-Hirn-Schranke oder die Anzahl der intrazerebralen Blutungen, bei beiden Mäusestämmen vergleichbar ausgeprägt (Abb. **16 B - D**). Überdies waren die Anzahl der Leukozyten im Liquor sowie die bakteriellen Titer in Hirn und Blut bei S100A9-defizienten und WT-Mäusen vergleichbar hoch (Abb. **16 E**, Tabelle **2**). Lediglich die Konzentration des Neutrophilen-Chemokins CXCL-2 war im Hirnhomogenat von S100A9-defizienten Mäusen geringfügig (um 32%), aber signifikant niedriger als bei WT-Mäusen (Abb. **16 F**).

Völlig differente Befunde lieferten unsere Untersuchungen an S100A9-defizienten Mäusen im fortgeschrittenen Krankheitsstadium. In dieser Versuchsreihe wurden die Mäuse mit Ceftriaxon behandelt, um sie vor einer fulminanten Infektion mit tödlichem Ausgang zu schützen. Ceftriaxon ist das Antibiotikum der Wahl bei der Pneumokokkenmeningitis und führt zur raschen Eliminierung von *S. pneumoniae* aus dem Liquor und der Blutbahn. Dementsprechend können 24 Stunden nach Therapiebeginn keine oder nur sehr wenige Bakterien in Blut, Liquor und aus dem Hirngewebe kultiviert werden (Koedel et al., 2009; Grandgirard et al., 2010). Die S100A9-Defizienz beeinflusste die Antibiotika-induzierte Elimination von *S. pneumoniae* nicht (Tabelle **2**).

**Abbildung 16: S100A9-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Entwicklung der Meningitis**



**Legende:** S100A9-defizienten Mäuse wurden intrazisternal mit dem Pneumokokkenstamm D39 infiziert und mit WT-Mäusen verglichen ( $n = 9$  in jeder Gruppe). Als Negativkontrollen wurden Mäuse verwendet, denen PBS in die *Zisterna magna* injiziert wurde (nicht infizierte WT-Mäuse,  $n = 4$ ). Vierundzwanzig Stunden später wurden die Tiere evaluiert. [A] Die S100A9-Defizienz hatte keinen Einfluss auf den klinischen Status [B - D]. Ebenso waren der Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP), die Störung der Blut-Hirn-Schranke (als Indikator fungierte der zerebrale Albumingehalt) und die Entwicklung eines Hydrozephalus (an einem vergrößerten Ventrikelvolumen erkennbar) bei beiden Mäusestämmen vergleichbar. [E]

Zudem fanden sich bei infizierten WT- und S100A9-defizienten Mäuse ähnliche Leukozytenzahlen im Liquor. [F] Die Konzentrationen von CXCL-2 waren im Gehirn infizierter S100A9-defizienter Mäuse signifikant niedriger als in dem von WT-Mäusen. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SDV angegeben. \*  $p < 0,05$ , im Vergleich mit infizierten WT-Mäusen (berechnet mit ANOVA und Bonferroni Post Hoc-Test).

**Tabelle 2: Klinische Parameter 24 und 48 Stunden nach Induktion der Pneumokokkenmeningitis**

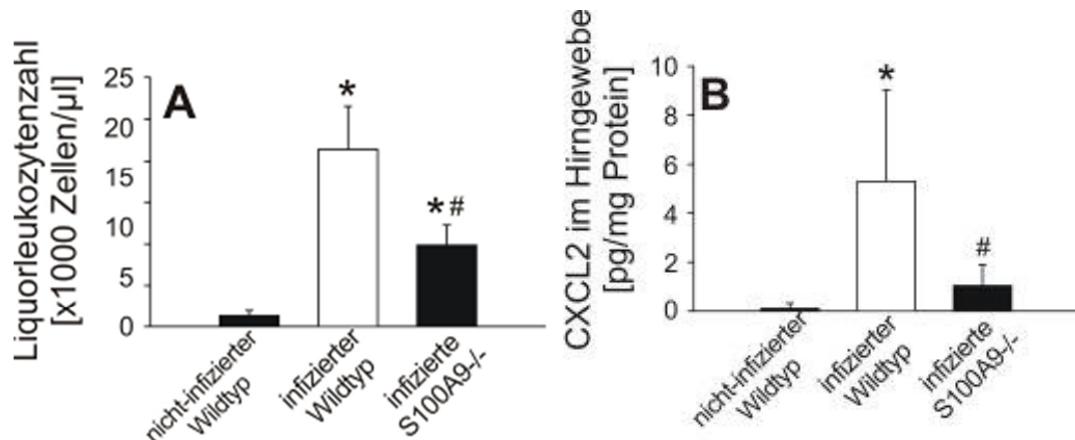
Experimentelle Gruppe [n]		Körpertemperatur [°C]	Änderung des Körpergewichts [%]	Bakterielle Titer im Gehirn [log <sub>10</sub> KBE/Organ]	Bakterielle Titer im Blut [ml]
PBS-injizierte Kontrollen	24 h <sup>a</sup> [4]	37,8 $\pm$ 0,4	- 3,5 $\pm$ 4,4	0	0
	48 h [4]	37,3 $\pm$ 0,3	+ 2,4 $\pm$ 4,5	0	0
Infizierte Wildtyp-Mäuse	24 h [9]	37,2 $\pm$ 0,9	-13,4 $\pm$ 3,3 *	6,5 $\pm$ 0,7 *	5,6 $\pm$ 1,4 *
	48 h [9]	36,0 $\pm$ 0,9 *	-18,6 $\pm$ 2,6 *	2,9 $\pm$ 1,2 *	0,5 $\pm$ 1,5
Infizierte S100A9-defiziente Mäuse	24 h [10]	36,8 $\pm$ 0,9 *	-11,7 $\pm$ 2,7 *	6,2 $\pm$ 0,7 *	4,6 $\pm$ 1,1 *
	48 h [10]	36,4 $\pm$ 0,5 *	-15,6 $\pm$ 1,6 *#	3,0 $\pm$ 1,3 *	0,4 $\pm$ 1,3

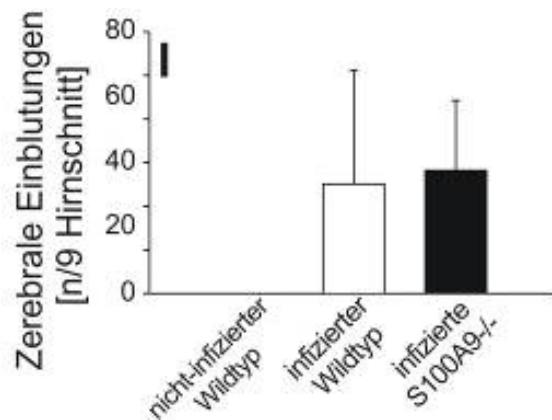
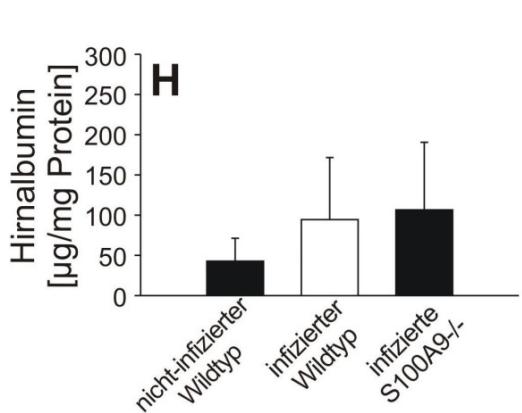
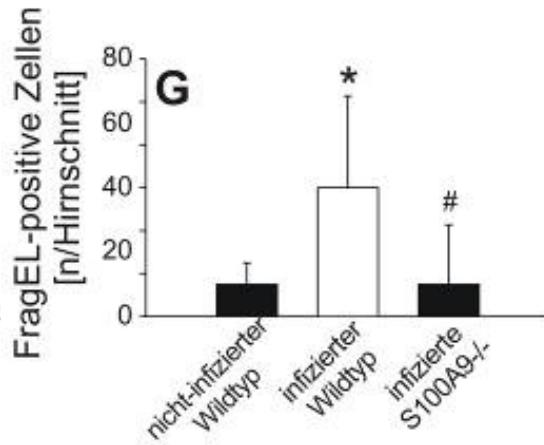
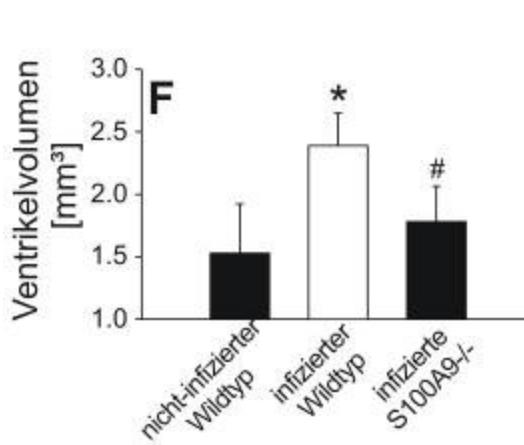
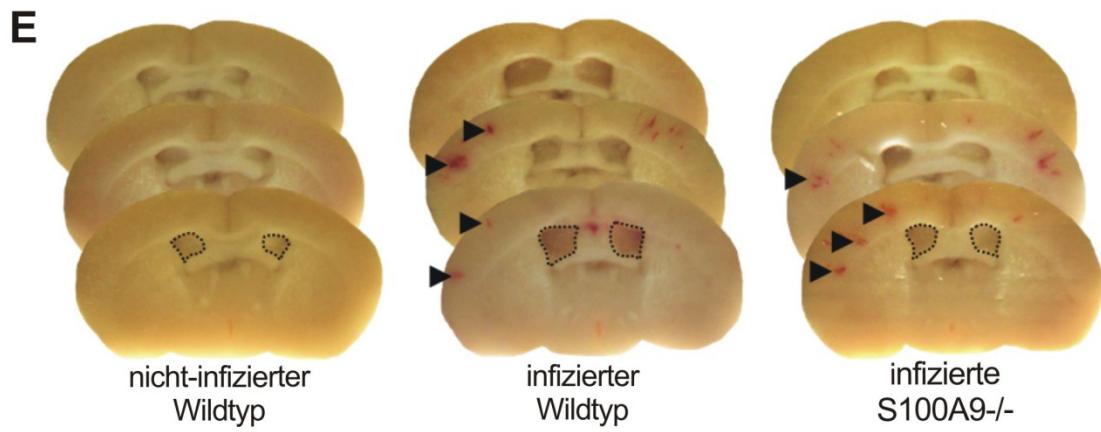
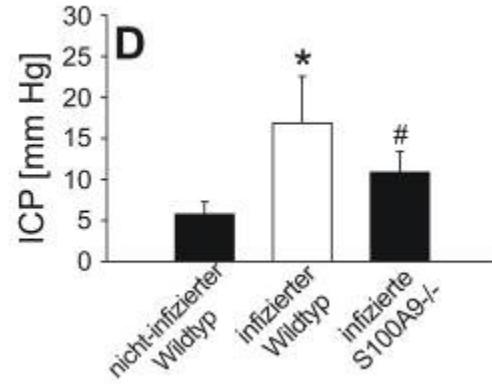
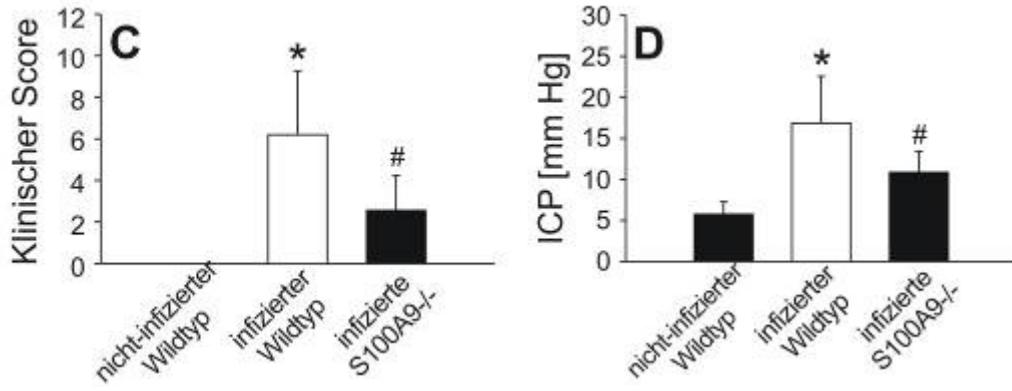
**Legende:** <sup>a</sup> Zeitpunkt nach Infektion. \*  $p < 0,05$ , im Vergleich mit Kontroll-Tieren, und #  $p < 0,05$ , im Vergleich mit infizierten WT-Mäusen (zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt; die statistische Auswertung wurde mittels einseitiger Varianzanalyse (ANOVA) und Fisher's Least-Significant-Difference Post Hoc-Test durchgeführt). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SDV dargestellt.

Allerdings wiesen S100A9-defiziente Mäuse 48 Stunden nach der Infektion signifikant geringere Liquorleukozytenzahlen als WT-Mäuse auf (Abb. 17 A). Die weniger ausgeprägte Liquorpleozytose wurde von einer signifikanten Reduktion der

CXCL-2-Konzentration im Hirn begleitet (um ca. 80%; Abb. 17 **B**). Entsprechend dem Konzept, dass die Entzündungsantwort bei der Pneumokokkenmeningitis mehr Schaden als Nutzen verursacht (Koedel et al., 2010; Mook-Kanamori et al., 2011), war die Reduktion der Liquorpleozytose mit einer signifikanten klinischen Verbesserung vergesellschaftet. Dies zeigte sich sowohl in einer geringeren Gewichtsabnahme (Tabelle 2) als auch einem besseren klinischen Score-Wert (Abb. 17 **C**). Der mildere Krankheitsverlauf wiederum wurde von geringeren intrakraniellen Druck-Werten, einer Rückbildung des Meningitis-assoziierten Hydrozephalus und weniger FragEL™-positiver apoptotischer Neuronen im Hippocampus begleitet (Abb. 17 **D - G**). Das Ausmaß der Blut-Hirn-Schranken-Störung und der zerebralen Einblutungen war bei S100A9-defizienten und WT-Mäusen vergleichbar (Abb. 17 **H, I**). Diese Ergebnisse sprechen für eine wesentliche Rolle von S100A8/A9 bei der Persistenz der Leukozyteninfiltrate unter antibiotischer Therapie. Die leukozytären Infiltrate könnten der Rückbildung des Hydrozephalus entgegenwirken, indem sie beispielsweise den Liquorabfluss stören. Diese These wird von unserer Beobachtung gestützt, dass die Liquorleukozytenzahl positiv mit dem Ventrikelvolumen korrelierte ( $r = 0,687$ ;  $p = 0,002$ ).

**Abbildung 17: S100A9-Defizienz wirkt bei antibiotisch behandelter Meningitis protektiv**





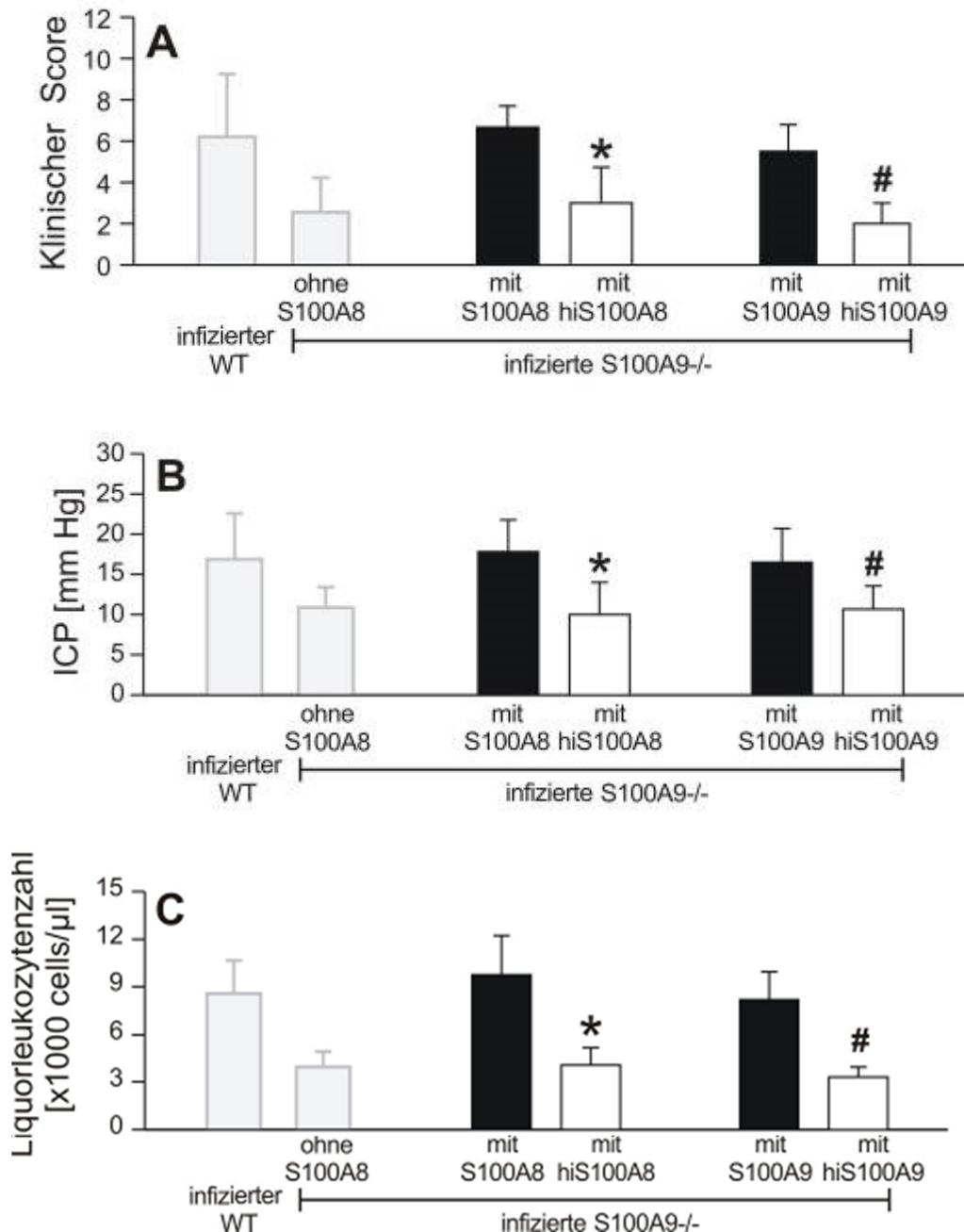
**Legende:** Die Pneumokokkenmeningitis wurde durch intrazisternale Injektion von *Streptococcus pneumoniae* (D39-Stamm) induziert. Vierunzwanzig Stunden später wurden die Mäuse intraperitoneal mit Ceftriaxon behandelt ( $n = 10$  in jeder Gruppe). Als Negativkontrollen dienten Mäuse, denen PBS in die *Cisterna magna* injiziert wurde ( $n = 4$ ). Vierunzwanzig Stunden nach Beginn der antibiotischen Therapie (48 Stunden nach Infektion) wurden die Tiere evaluiert. S100A9-defiziente Mäuse zeigten im Vergleich zu infizierten WT-Mäusen eine signifikant geringere Anzahl an weißen Blutkörperchen im Liquor [A]. Die Reduktion der Liquorpleozytose ging mit einer signifikant geringeren CXCL-2-Konzentration im Hirngewebe einher [B]. Die reduzierte Immunreaktion war mit einer signifikanten Reduktion der Hirnpathologien und der klinischen Symptome assoziiert, was beispielsweise an niedrigeren klinischen Scorewerten [C] und intrakraniellen Druckwerten sichtbar wurde [D]. Zudem wiesen S100A9-defiziente Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen ein signifikant kleineres Ventrikelvolumen [E, F] und weniger FragEL™-positive Zellen im Gyrus dentatus [G] auf. Infizierte WT- und S100A9-defiziente Mäuse unterschieden sich hinsichtlich der Albuminkonzentrationen im Gehirn [H] und der Anzahl zerebraler Einblutungen [I] nicht. Unter [E] sind repräsentative Hirnschnitte von drei zufällig ausgewählten Mäusen pro Gruppe zu sehen. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Seitenventrikel. Die Pfeilspitzen deuten auf zerebrale Einblutungen. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SDV dargestellt. \*  $p < 0,05$ , im Vergleich mit nicht infizierten WT-Mäusen. #  $p < 0,05$ , im Vergleich mit infizierten WT-Mäusen. Als statistischer Test wurde eine ANOVA mit Bonferroni Post Hoc-Test durchgeführt.

#### 4.4 Extrazelluläres S100A8/A9 ist ein entscheidender Faktor für die Wirkung bei der Pneumokokkenmeningitis

S100A8 und S100A9 sind multifunktionelle Proteine, die intra- und extrazelluläre Funktionen haben (Corbin et al., 2008; Ehrchen et al., 2009). Unsere Beobachtung einer massiven Freisetzung von S100A8/A9 in den Liquor deutet darauf hin, dass extrazelluläres S100A8/A9 für deren Wirkung bei der Pneumokokkenmeningitis verantwortlich ist. Um diese These zu verifizieren, führten wir sogenannte Rekonstitutionsexperimente mit gereinigtem S100A8 und S100A9 durch (Vogl et al., 2007). In dieser Versuchsreihe wurden S100A8 oder S100A9 in einer Dosierung, die den Konzentrationen dieser Proteine im Liquor infizierter WT-Mäusen entsprach, in die *Zisterna magna* von S100A9-defizienten Mäusen injiziert. Die Kontrolltiere erhielten stattdessen hitzeinaktiviertes S100A8 oder S100A9. Durch die intrazisternale Gabe mit S100A8 bzw. S100A9 vor der Infektion (nicht aber von hitzeinaktivierten Proteinen) konnte die bei S100A9-defizienten Mäusen beobachtete klinische Verbesserung sowie die Reduktion der intrakraniellen Druckwerte und der Liquorleukozytenzahlen verhindert werden (Abb. 18 A - C). Das bedeutet, dass S100A9-defiziente Mäuse nach einer Rekonstitution von S100A8 oder S100A9 einen

den WT-Mäusen sehr ähnlichen Krankheitsphänotyp zeigen. Da durch die extrazelluläre Applikation der Proteine der Effekt der Gendefizienz reversibel war, scheint extrazelluläres S100A8/A9 für die beobachteten Effekte während der Meningitis hauptverantwortlich zu sein.

**Abbildung 18: Extrazelluläres S100A8/A9 ist für seine Wirkung in der Pneumokokkenmeningitis verantwortlich**



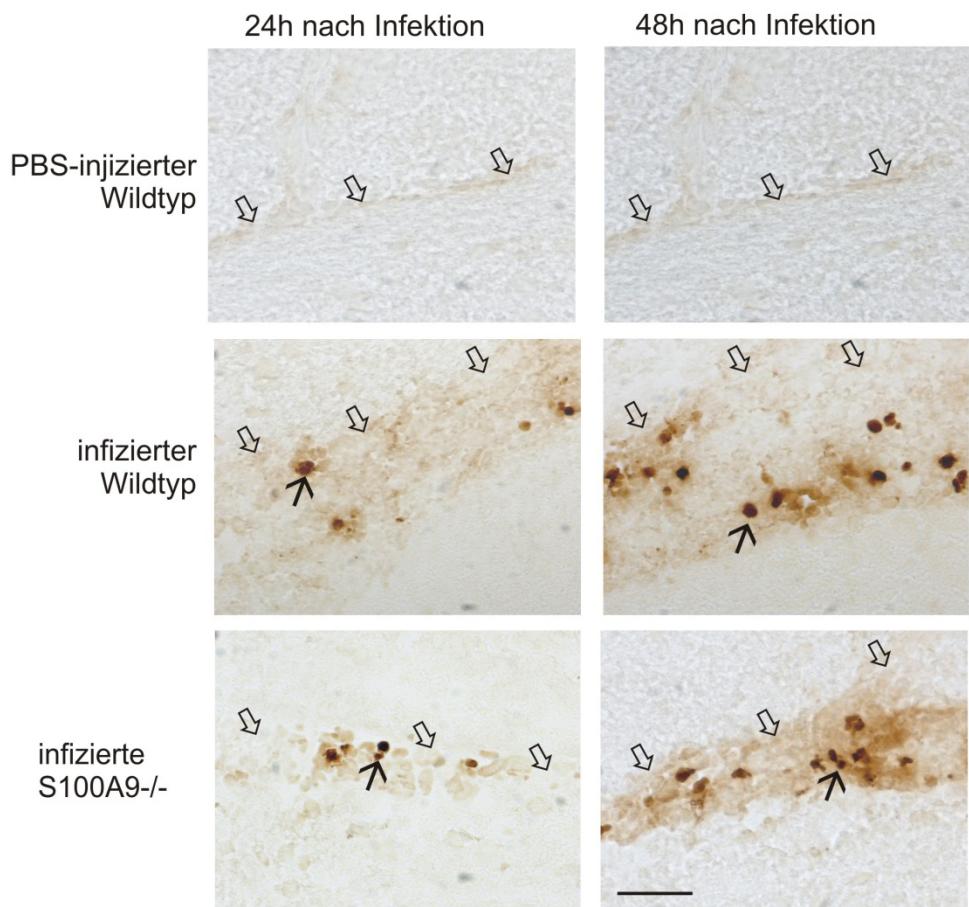
**Legende:** S100A9-defizienten Mäusen wurde eine Stunde vor Infektion intrazisternal S100A8 oder S100A9 injiziert (10 µg/Maus, n = 6). Achtundvierzig Stunden später wurden die Tiere evaluiert. Kontrollmäuse erhielten stattdessen hitzeinaktiviertes S100A8 oder S100A9 (hiS100A8, hiS100A9, jeweils n = 6, 80°C für 30 min). Die intrazisternale

Rekonstitution mit S100A8 oder S100A9 führte den Phänotyp der S100A9-defizienten Mäuse auf den der WT-Mäuse zurück. Sichtbar wurde dies an ähnlichen klinischen Score-Werten [A], intrakraniellen Druckwerten [B] und Leukozytenzahlen im Liquor [C]. Die beiden linken Säulen entsprechen denen aus den Abbildungen 17 A, C, D. \* p < 0,05, im Vergleich mit S100A9-defizienten Mäusen, denen intrazisternal hiS100A8 injiziert worden war, # p < 0,05, im Vergleich mit S100A9-defizienten Mäusen, die hiS100A9 erhalten hatten (der unverbundene Student's-t-Test fungierte als statistisches Testverfahren).

#### **4.5 Wirkmechanismus von extrazellulärem S100A8/A9 bei der Pneumokokkenmeningitis**

Extrazelluläres S100A8/A9 kann eine Entzündungsreaktion über verschiedene Mechanismen beeinflussen: [i] S100A8/A9 kann die Produktion von Zytokinen und Chemokinen in Immunzellen induzieren und verstärken (Vogl et al., 2007), [ii] S100A8/A9 kann chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirken (Ryckman et al., 2003). [iii] Zudem kann es dem apoptotischen Zelltod von neutrophilen Granulozyten entgegenwirken (Atallah et al., 2012) und [iv] antimikrobielle Wirkung zeigen (Corbin et al., 2008). Diese Funktionen scheinen - zumindest zum Teil - durch die Interaktion von S100A8/A9 mit TLR4 und/oder RAGE vermittelt zu werden (Vogl et al., 2007; Boyd et al., 2008). Unsere Beobachtung, dass die S100A9-Defizienz keinerlei Auswirkung auf die bakteriellen Konzentrationen im Hirn und im Blut hatte, sprechen gegen einen direkten antimikrobiellen Effekt von S100A8/A9 auf *S. pneumoniae* *in vivo*. Um die Hypothese zu überprüfen, ob die Persistenz der Entzündungsreaktion bei der Pneumokokkenmeningitis nach Beginn der Antibiotikagabe auf einer S100A8/A9-vermittelten Hemmung der Leukozytenapoptose basiert, bestimmten wir mit einem Kit zur Detektion von DNA-Bruchstücken (sogenannter „FragEL™-Kit“) die Zahl apoptotischer Leukozyten in Hirnschnitten von S100A9-defizienten Mäusen und WT-Mäusen. Achtundvierzig Stunden nach der Infektion lag der Anteil FragEL™-positiver Leukozyten im ventrikulären Infiltrat von WT-Mäusen bei  $8,6\% \pm 2,6\%$ . Ein ähnlicher Prozentwert apoptotischer Zellen ( $9,3\% \pm 1,8\%$ ) wurde im entzündlichen Infiltrat S100A9-defizienter Mäuse beobachtet (Abb. 19). Somit scheinen die niedrigeren Leukozytenzahlen in S100A9-defizienten Mäusen nicht durch eine vermehrte Leukozytenapoptose verursacht zu werden.

**Abbildung 19: Histochemische Detektion apoptotischer Leukozyten in murinen Hirnschnitten**



**Legende:** Mit Hilfe eines kommerziellen histochemischen *in situ* Tests (Klenow-FragEL™ DNA fragmentation detection kit) wurden apoptotische Zellen nachgewiesen. Man beachte die FragEL™-positiven Zellen (schwarze Pfeile) innerhalb der Ventrikel (schwarz umrandete Pfeile) von infizierten WT- und S100A9-defizienten Mäusen. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

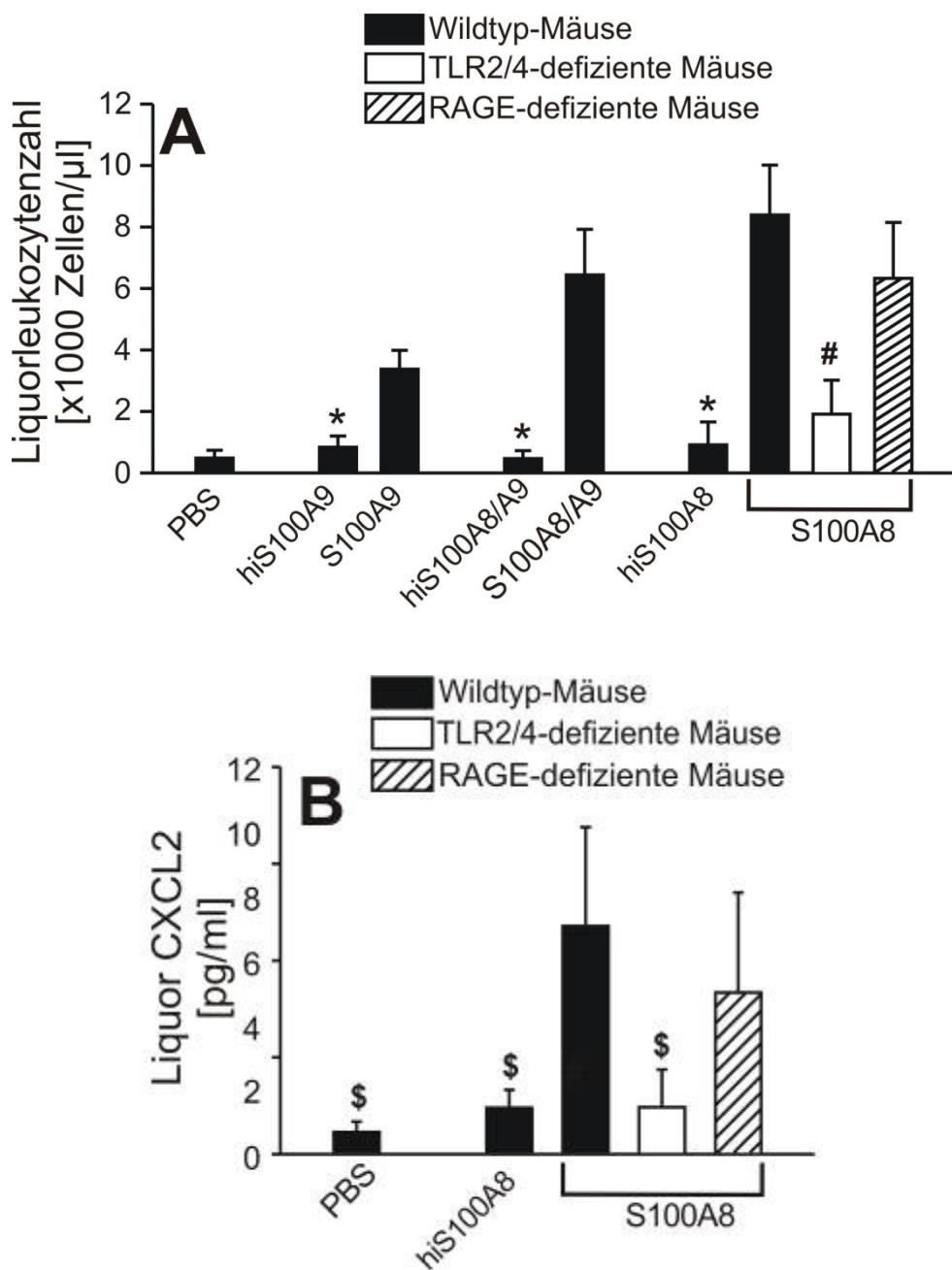
In weiteren Versuchsreihen gingen wir der Frage nach, ob S100A8/A9 die Leukozytenrekrutierung im Verlauf der Entzündungsreaktion fördert. Vorstellbar wäre sowohl ein direkter chemoattraktiver Effekt von S100A8/A9 als auch ein indirekter, nämlich durch Stimulation der Produktion von Chemokinen. In dieser Versuchsreihe injizierten wir gereinigte S100A8-, S100A9- oder S100A8/A9-Proteine in den Liquor von WT-Mäusen und bestimmten 6 Stunden später sowohl die Liquorleukozytenzahl als auch die Liquor-CXCL-2-Konzentration. Die Injektion der gereinigten Proteine führte zur signifikanten Zunahme der Leukozytenzahlen im Vergleich zu sogenannten Negativkontrollen, die entweder PBS oder hitzeinaktiviertes S100A8, S100A9 bzw. S100A8/A9 erhalten hatten (Abb. 20 A). Die Zunahme der

Liquorleukozytenzahl wurde von einem Anstieg der CXCL-2-Konzentration im Liquor begleitet (Abb. **20 B**). Um mögliche Rezeptoren zu identifizieren, die die S100A8/A9-induzierte Leukozytenmigration vermitteln, applizierten wir anschließend S100A8-Protein in TLR2-TLR4-doppeldefiziente und RAGE-defiziente Mäuse. TLR2-TLR4-doppeldefiziente Mäuse (nicht aber RAGE-defiziente Mäuse) zeigten niedrigere Leukozytenzahlen und CXCL-2-Konzentrationen als WT-Mäuse (Abb. **20 A, B**).

In der Folge versuchten wir an murinen Makrophagen-Zellkulturen den Einfluss von S100A8/A9 auf die CXCL-2-Produktion genauer zu charakterisieren. Das Heterodimer S100A8/A9 konnte die CXCL-2-Expression dosisabhängig induzieren (Abb. **21 A**). Dieser Effekt wurde durch Zusatz des Anti-Maus TLR4-Antikörpers 1A6 (nicht aber eines Isotyp-Kontrollantikörpers) in das Zellmedium aufgehoben. Wurden die Makrophagen mit Pneumokokken stimuliert, die 2 Stunden zuvor durch Gabe von Antibiotika inaktiviert worden waren, ließ sich eine ausgeprägte Freisetzung von CXCL-2 messen (Abb. **21 B**). Wurden die Pneumokokken jedoch 20 Stunden lang mit Antibiotika prä-inkubiert, führte dies zum fast vollständigen Verlust ihrer stimulierenden Wirkung. Gab man zu dieser Pneumokokken-Präparation S100A8/A9 hinzu, stieg die CXCL-2-Produktion um das 7,5-fache im Vergleich zu der von Makrophagen, die nur Bakterien ausgesetzt worden waren, und um das 3,5-fache im Vergleich zu der von Makrophagen, in deren Medium ausschließlich S100A8/A9 zugegeben worden war.

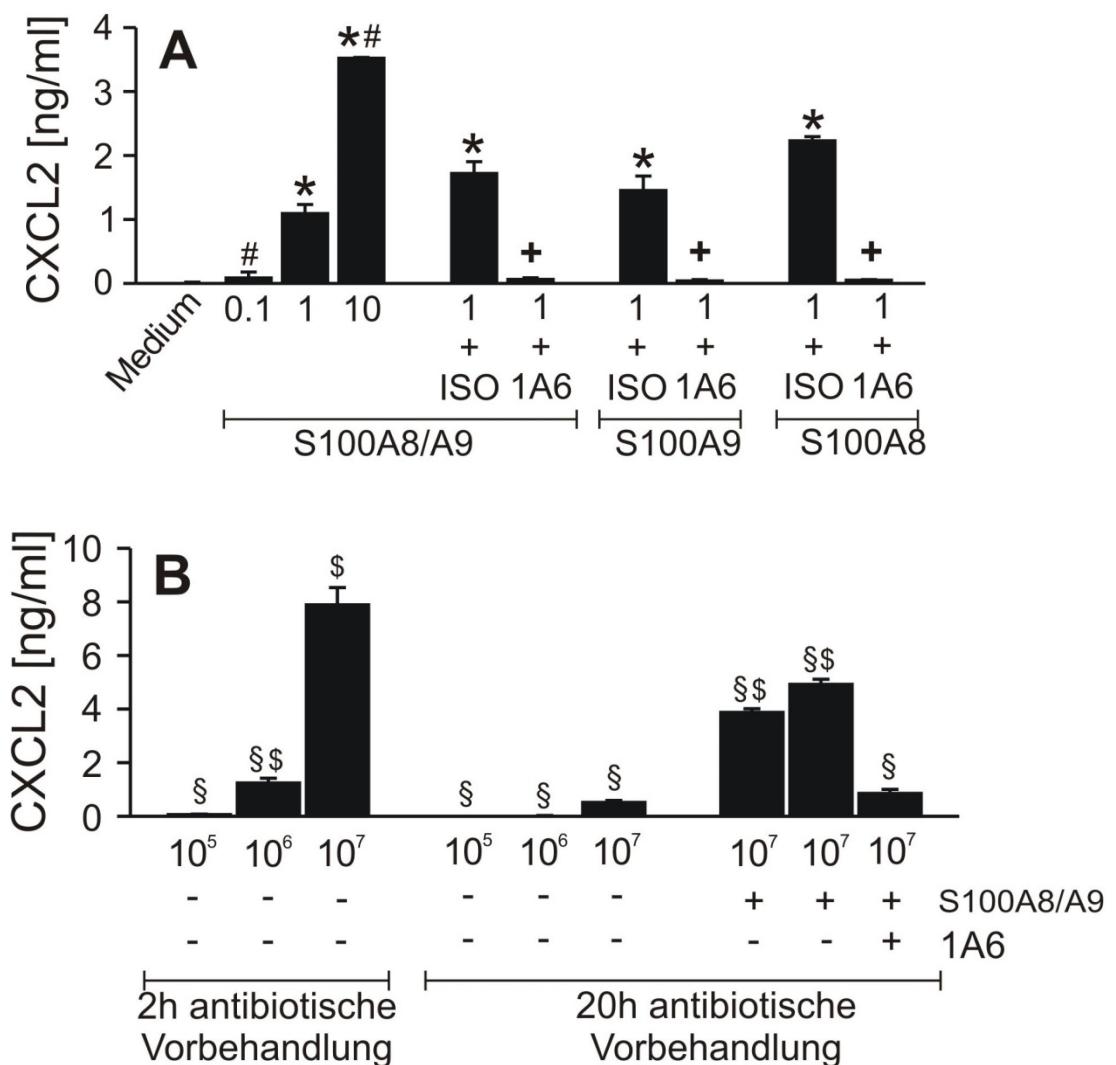
Diese Beobachtung spricht dafür, dass S100A8/A9 und Pneumokokkenbestandteile eine synergistische Wirkung auf die Freisetzung von CXCL-2 besitzen. Ähnliche Effekte wurden erzielt, wenn anstelle des Heterodimers S100A8/A9 die einzelnen Proteine S100A8 und S100A9 als Ko-Stimulantien eingesetzt wurden (Abb. **21 A**). In Zusammenschau weisen diese Daten daraufhin, dass S100A8/A9, sobald es in den Liquor freigesetzt wird, die Leukozyteninfiltration durch eine TLR-abhängige Verstärkung der CXCL-2-Produktion fördern kann.

**Abbildung 20: S100A8, S100A9 und S100A8/A9 induzieren eine Liquorpleozytose**



**Legende:** Um die inflammatorische Aktivität von S100A8/A9 *in vivo* genauer zu charakterisieren, wurden 1 µg S100A8, S100A9 oder S100A8/A9 in den Liquorraum injiziert (jeweils n = 4). Sechs Stunden später wurden Liquorproben gewonnen und die Anzahl weißer Blutkörperchen (WBC) [A] und die Konzentration von CXCL-2 [B] bestimmt. PBS = Kontrollen, denen PBS injiziert wurde. HI = hitzeinaktiviert. Die Daten wurden als Mittelwerte ± SDV angegeben. \* p < 0,05, im Vergleich zu Mäusen, die das entsprechende nicht hitzebehandelte S100-Protein erhalten hatten; # p < 0,05, im Vergleich zu Mäusen, denen 1 µg S100A8 appliziert worden war; \$ p < 0,05, verglichen mit WT-Mäusen, die S100A8 erhielten. Als statistischer Test wurde eine ANOVA mit Bonferroni Post Hoc-Test eingesetzt.

**Abbildung 21: S100A8/A9 moduliert die CXCL-2-Produktion durch Makrophagen**



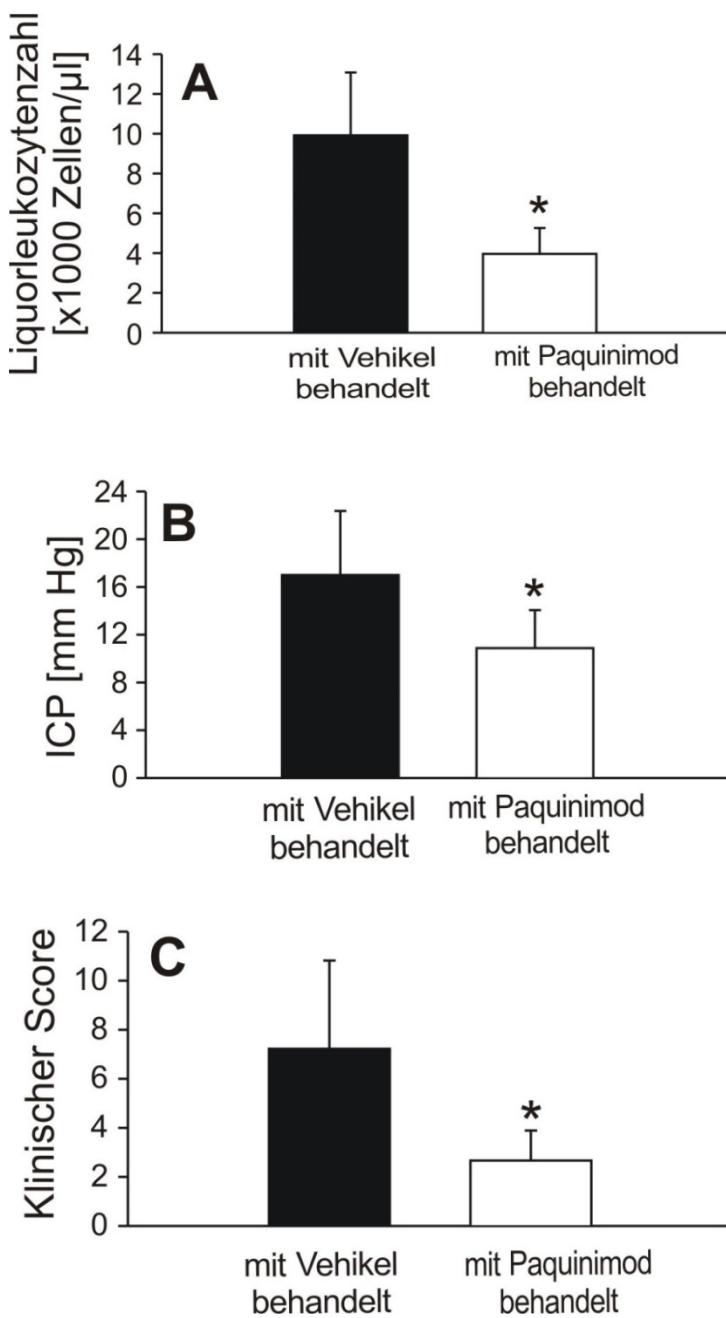
**Legende:** Um die CXCL-2-induzierende Wirkung von S100-Proteinen *in vitro* zu untersuchen, wurden murine Knochenmarks-Makrophagen mit S100A8, S100A9 und S100A8/A9 allein oder in Kombination mit *Streptococcus pneumoniae* stimuliert. Vor ihrer Nutzung wurden die Pneumokokken entweder für 2 oder für 20 Stunden mit Penicillin/Streptomycin inkubiert. Vier Stunden nach der Exposition mit S100A8, S100A9 oder S100A8/A9 [A] und/oder *S. pneumoniae* [B] wurden die Zellkulturüberstände entnommen und auf CXCL-2 untersucht. Alle Versuche wurden zweimal im Duplikat durchgeführt. ISO = Isotyp-Kontroll-Antikörper (Ratten IgG2b; 25 µg/ml). 1A6 = Anti-Maus-TLR4-Antikörper (25 µg/ml). Die Daten wurden als Mittelwerte ± SDV dargestellt. \* p < 0,05, im Vergleich mit der Medium-Kontrolle; # p < 0,05, im Vergleich mit Zellen, die mit 1 µg/ml S100A8/A9 stimuliert wurden; + p < 0,05, verglichen mit Zellen, die dem jeweiligen S100-Protein in Gegenwart von Isotyp-Kontroll-Antikörpern ausgesetzt waren; § p < 0,05, im Vergleich mit Zellen, die mit 10<sup>7</sup> KBE/ml *S. pneumoniae* stimuliert wurden, die vorher 2 Stunden lang mit Antibiotika behandelt worden waren; \$\$ p < 0,05, im Vergleich zu Zellen, die mit 10<sup>7</sup> KBE/ml *S. pneumoniae* stimuliert wurden, die vorher 20 Stunden lang mit Antibiotika

behandelt worden waren. Eine univariate Varianzanalyse mit Bonferroni Post Hoc-Test wurde für die statistische Auswertung verwendet.

#### **4.6 S100A8/A9 könnte ein Angriffsziel für eine adjuvante Behandlungsmaßnahme bei der Pneumokokkenmeningitis sein**

Da die Gendefizienz von S100A9 im Maus-Meningitis-Modell protektiv wirkte, stellte sich die Frage, ob eine pharmakologische Antagonisierung der S100A9-Aktivität eine mögliche Strategie für adjuvante Therapiemaßnahmen bei dieser Erkrankung ist. Vor kurzem wurde berichtet, dass Quinolin-3-Carboxamide wie ABR-215757 (Paquinimod) die Interaktion von S100A9 mit TLR4 blockieren und damit die immunmodulierende Effekte von S100A9 antagonisieren können (Bjork et al., 2009). Um das therapeutische Potential dieser S100A9-Antagonisten während der Meningitis zu prüfen, behandelten wir WT-Mäuse 24 Stunden nach der Infektion mit einer Kombination aus Ceftriaxon und Paquinimod oder dessen Trägerstoff. Die Behandlung mit Paquinimod hatte keinen negativen Einfluss auf die antimikrobielle Wirkung von Ceftriaxon ( $2,76 \pm 1,38 \log_{10}$  KBE/Organ bei Placebo-behandelten Mäusen *versus*  $2,34 \pm 1,66 \log_{10}$  KBE/Organ bei Paquinimod-behandelten Mäusen). Jedoch waren 48 Stunden nach der Infektion bei mit Paquinimod behandelten Mäusen die Liquorleukozytenzahlen signifikant niedriger als bei Mäusen, denen die entsprechende Trägerstoff injiziert worden war (Abb. 22 A). Die Reduktion der Liquorpleozytose ging mit einer signifikanten Verbesserung der klinischen Verlaufs einher, was durch niedrigere intrakranielle Druckwerte (Abb. 22 B), einer weniger ausgeprägten Hypothermie ( $35,6 \pm 0,7^\circ\text{C}$  in Vehikel-behandelten Mäusen *versus*  $36,6 \pm 0,3^\circ\text{C}$  in Paquinimod-behandelten Mäusen;  $p < 0,01$ ), geringer ausgeprägtem Hydrozephalus ( $2,29 \pm 0,28 \text{ mm}^3$  in Vehikel-behandelten Mäusen *versus*  $1,68 \pm 0,29 \text{ mm}^3$  in Paquinimod-behandelten Mäusen;  $p < 0,01$ ), sowie geringeren klinischen Score-Werten verdeutlicht wurde (Abb. 22 C). Diese Daten sprechen dafür, dass S100A8/A9 ein neuer vielversprechender Angriffspunkt für eine adjuvante Therapie der Pneumokokkenmeningitis sein könnte.

**Abbildung 22: Die adjuvante Behandlung mit Paquinimod zeigte eine protektive Wirkung bei der murinen Pneumokokkenmeningitis**



**Legende:** Die Pneumokokkenmeningitis wurde durch intrazisternale Injektion von *Streptococcus pneumoniae* induziert. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Mäuse intraperitoneal mit einer Kombination aus Ceftriaxon (100 mg/kg) und dem S100A9-Antagonisten Paquinimod (ABR-215757, 10 mg/kg, n = 9) oder dessen Vehikel (PBS mit 25% DMSO; n = 9) behandelt. Weitere vierundzwanzig Stunden später wurden die Mäuse klinisch evaluiert. Die Begleittherapie mit Paquinimod führte zu einer Reduktion der Liquorpleozytose [A], des intrakraniellen Druckanstiegs [B] und der klinischen Score-Werte [C]. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SDV dargestellt. \* p < 0,05, im Vergleich mit Mäusen, die mit dem Vehikel behandelt wurden. Als statistischer Test wurde der unverbundene Student's-t-Test verwendet.

## **5. Diskussion**

Die Pneumokokkenmeningitis zeichnet sich durch eine massive granulozytäre Entzündungsreaktion im Leptomeningealraum aus. Die Entzündungsreaktion trägt entscheidend zu Gewebeschäden und ungünstigen klinischen Verläufen bei. Bei Gewebeuntergängen werden körpereigene Moleküle freigesetzt, die als sogenannte „Alarmsignale“ fungieren können. Als endogene „Alarmsignale“ wurden eine Reihe von Molekülen wie S100-Proteine (insbesondere S100A8/A9) beschrieben, die beim nekrotischen Zelluntergang aus dem Intra- in den Extrazellulärraum gelangen und als Aktivatoren von Immunzellen wirken können. „Alarmsignale“ wie S100A8/A9 können überdies von Immunzellen als Reaktion auf diverse Stressoren aktiv (ohne Zelluntergang) freigesetzt werden. Da eine Pneumokokkenmeningitis regelhaft zu Zelluntergängen führt, zudem mit einer massiven Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen einhergeht, postulierten wir, dass [i] bei dieser Erkrankung große Mengen endogener „Alarmsignale“ in den Extrazellulärraum gelangen und [ii] diese „Alarmsignale“ zur Perpetuierung und Verstärkung der Entzündungsreaktion und damit zu einem ungünstigeren Verlauf der Erkrankung beitragen können. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden im Rahmen dieser Dissertationsarbeit folgende Untersuchungen durchgeführt: [i] Charakterisierung der Freisetzung von S100A8/A9 im Krankheitsverlauf der Pneumokokkenmeningitis, [ii] Analyse der funktionellen Bedeutung von S100A8/A9 bei der Regulation der Entzündungsreaktion und der Entstehung Meningitis-assozierter intrakranieller Komplikationen, [iii] Identifizierung möglicher Wirkmechanismen von S100A8/A9 bei der Pneumokokkenmeningitis, und [iv] Überprüfung eines S100A9-Antagonisten in der adjuvanten Behandlung der Pneumokokkenmeningitis. Kurz zusammengefasst konnten wir in Untersuchungen von Liquorproben eine massive Erhöhung der extrazellulären S100A8/A9-Konzentrationen bei erwachsenen Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis feststellen (im Vergleich zu Kontrollpatienten). In Übereinstimmung mit den Patientenbefunden fanden wir in unserem Mausmodell bei infizierten Mäusen deutlich höhere S100A8/A9-Werte im Liquor als bei Kontrolltieren. Zusätzliche immunhistochemische Analysen und Granulozyten-Depletionsexperimente im Mausmodell belegten, dass S100A8/A9 vorwiegend aus in den Liquorraum eingewanderten Leukozyten freigesetzt wird. Um Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von S100A8/A9 in der Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis zu bekommen, untersuchten wir in der Folge

S100A9 - defiziente Mäuse im Akutmodell (24 Stunden Infektion) und im kliniknahen Modell (Antibiotikabehandlung 24 Stunden nach der Infektion, Auswertung weitere 24 Stunden später). Im Akutmodell konnten wir mit Ausnahme niedrigerer CXCL-2-Konzentrationen im Hirnhomogenat keine Unterschiede zwischen infizierten WT- und S100A9-defizienten Mäusen feststellen. Im kliniknahen Modell hingegen zeigten S100A9-defiziente Mäuse eine signifikant geringere Zahl an Liquorleukozyten, die mit einer deutlichen Reduktion der Hirn-CXCL-2-Spiegel einherging. Die mildere Immunreaktion ging mit einem besseren klinischen (Kurzzeit)-Verlauf und geringeren intrakraniellen Komplikationen einher. S100A8/A9 scheint also eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Leukozyteninfiltration in den Liquorraum bei antimikrobiell behandelten Tieren zu spielen. Um den Freisetzungsmechanismus näher zu charakterisieren, wurden zellkulturelle Untersuchungen an ER-Hoxb8- und primären Knochenmarks-Granulozyten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Freisetzung von S100A8/A9 passiv aus sterbenden Zellen erfolgte und dieser Zelluntergang entscheidend von der Wirkung des bakteriellen Toxins Pneumolysin abhing. Durch Rekonstitutionsversuche im Maus-Meningitis-Modell sowie durch *in vivo*- und *in vitro*-Experimente mit aufgereinigten S100-Proteinen konnten wir ferner demonstrieren, dass die entzündungsverstärkende Wirkung vermutlich von der extrazellulären Präsenz dieser Proteine, deren Interaktion mit dem Mustererkennungsrezeptor TLR4 sowie der konsekutiven Freisetzung des Chemokins CXCL-2 abhängig ist. In einer abschließenden Versuchsreihe im Mausmodell mit dem S100A9-Antagonisten Paquinimod beobachteten wir eine anti-inflammatorische und protektive Wirkung dieser Substanz im kliniknahen Modell, d.h. wenn sie in Kombination mit Ceftriaxon appliziert wurde. Somit scheint S100A8/A9 ein potentieller neuer Angriffspunkt für adjuvante Behandlungsmaßnahmen bei der Pneumokokkenmeningitis zu sein.

## **5.1 Charakterisierung der Freisetzung von S100A8/A9 im Krankheitsverlauf der Pneumokokkenmeningitis**

Im Hirngewebe von Patienten mit zerebraler Malaria kann man eine erhöhte Expression von S100A8/A9 in Mikrogliazellen beobachten (Schluesener et al., 1998). In zerebralem Gewebe von Patienten, die ein Schädel-Hirn-Trauma erlitten hatten, wurde 72 Stunden nach dem Ereignis eine vermehrte Expression von S100A8/A9 in

aktivierten Makrophagen und Mikroglia nachgewiesen, während im Tiermodell des Ischämie-Reperfusionsschadens bereits drei Stunden nach dem Insult S100A8/A9 im Hirngewebe detektiert werden konnte (Postler et al., 1997; Engel et al., 2000). Überdies wurde eine erhöhte S100A9-Expression in menschlichen Gehirnen mit aktiven Entmarkungsherden in der Frühphase der Multiplen Sklerose gefunden (Bruck et al., 1995). Bis heute wurden jedoch nur wenige Studien veröffentlicht, die sich mit der Freisetzung von S100A8/A9 in den Liquor bei ZNS-Erkrankungen beschäftigten.

Zwei Arbeitsgruppen berichteten über leicht erhöhte Konzentrationen von S100A9 in Hirngewebe und in Liquorproben von Patienten mit Morbus Alzheimer (Ha et al., 2010; Kummer et al., 2012). In dieser Dissertationsarbeit konnte nun gezeigt werden, dass S100A8/A9 in hohen Konzentrationen im Liquor von Patienten sowie von Mäusen mit Pneumokokkenmeningitis zu finden ist. Hohe Konzentrationen von S100A8/A9 wurden in früheren Studien bei anderen Infektionskrankheiten in Mensch und Maus beschrieben, wie beispielsweise der Klebsiellenpneumonie (Achouiti et al., 2012), der *Escherichia coli*-Peritonitis (van Zoelen et al., 2009) und der Pneumokokkenpneumonie (Raquil et al., 2008). Bei diesen Infektionskrankheiten wurden die deutliche Erhöhung der S100A8/A9-Konzentration auf eine aktive Sekretion dieser Proteine aus stimulierten ortsständigen Makrophagen sowie eingewanderten Monozyten und Neutrophilen zurückgeführt (Vogl et al., 2007; van Zoelen et al., 2009). Unsere immunhistochemischen Untersuchungen sprechen dafür, dass eingewanderte Leukozyten, vorrangig neutrophile Granulozyten, die in der Akutphase der Meningitis zwischen 80% und 90% der Zellen des Leukozyteninfiltrats repräsentieren (Koedel et al., 2009), die primäre Quelle von S100A8/A9 darstellen. Diese Annahme wird von den Ergebnissen unserer Granulozyten-Depletionsversuche unterstützt; in dieser Versuchsreihe beobachteten wir dramatisch niedrigere S100A8/A9-Konzentrationen in Liquorproben neutropenischer Mäuse als in denen normaler Mäuse. Außerdem setzten *in vitro* nur neutrophile Granulozyten (nicht aber Makrophagen) S100A8/A9 als Reaktion auf eine Infektion mit *S. pneumoniae* frei. Bei diesen zellkulturellen Untersuchungen stellten wir ferner einen engen zeitlichen Zusammenhang zwischen der Freisetzung von S100A8/A9 ins Kulturmedium und der von LDH, einem Marker für Plasmamembranschädigung und einem nekrotischen Zelluntergang, fest. Für eine passive Freisetzung von S100A8/A9 sprechen ferner unsere Befunde mit selektiven

Hemmstoffen des klassischen ER-Golgi-Sekretionswegs (Brefeldin A) und nicht-klassischer Sekretionswege (Demecolcin). Andere Arbeitsgruppen hatten berichtet, dass Demecolcin die Freisetzung von S100A8/A9 aus Monozyten nach Aktivierung von Proteinkinase C verhindern kann (Rammes et al., 1997). In unseren Experimenten wurde von keinem der eingesetzten Hemmstoffe die Pneumokokken-induzierte S100A8/A9-Freisetzung beeinflusst.

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass murine Granulozyten signifikant weniger S100A8/A9 in die Zellkultur-Überstände freisetzen, wenn sie anstelle mit Pneumolysin-produzierenden Pneumokokkenstämmen mit Pneumolysin-defizienten Stämmen stimuliert wurden. Pneumolysin ist ein zentraler Virulenzfaktor von *S. pneumoniae*. Es wird durch Autolyse der Bakterien, die am Ende ihres logarithmischen Wachstums oder durch die Behandlung mit bakteriolytischen Antibiotika ausgelöst wird, freigesetzt und wirkt in höheren Konzentrationen auf eukaryotische Zellen zytotoxisch (Zysk et al., 2001; Spreer et al., 2003; Wall et al., 2012). In unseren Experimenten ging die Stimulation mit Pneumolysin-defizienten Stämmen nicht nur mit einer geringeren S100A8/A9-Freisetzung einher, sondern wir beobachteten überdies reduzierte LDH-Konzentrationen im Kulturmedium. Dieser Befund ist im Einklang mit früheren experimentellen Studien, die eine zytotoxische Aktivität von PLY gegenüber neutrophilen Granulozyten demonstriert hatten (Johnson et al., 1981; Zysk et al., 2000), und spricht für den passiven Freisetzungsmechanismus von S100A8/A9 aus von Pneumolysin geschädigten Zellen. Des Weiteren ist diese Beobachtung als Bestätigung für die Bedeutung von Pneumolysin in der Immunopathogenese der Pneumokokkenmeningitis zu werten.

In einer früheren Studie hatten Hirst et al. (Hirst et al., 2008) gezeigt, dass Ratten, die mit Wildtyp-Pneumokokken intrazisternal infiziert worden waren, innerhalb von 26 Stunden eine Meningitis entwickelten. Wurden die Tiere jedoch mit isogenen Pneumolysin-defizienten Mutanten infiziert, kam es zu einem deutlich milderen Verlauf der Erkrankung oder gar keiner Meningitis. Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Arbeitsgruppe um Wellmer (Wellmer et al., 2002): diese zeigte in einem Mausmodell, dass Tiere 36 Stunden nach einer intrazerebraler Infektion mit PLY-defizienten Pneumokokken eine geringere klinische Symptomatik zeigten, niedrigere Bakterientiter im Blut aufwiesen und insgesamt länger überlebten als Tiere, die mit dem entsprechenden Wildtyp-Stamm infiziert worden waren. Die bakteriellen Titer im Kleinhirn sowie das Ausmaß der Entzündungsreaktion und des

neuronalen Schadens blieben in dieser Studie jedoch von der PLY-Defizienz unbeeinflusst (Wellmer et al., 2002). Einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Rolle von Pneumolysin bei der Störung der Blut-Hirn-Schranke im Verlauf einer Pneumokokkenmeningitis lieferte eine *in vitro* Studie, die zeigen konnte, dass PLY-defizierte Pneumokokken auf mikrovaskuläre Endothelzellen nicht zytotoxisch wirken (Zysk et al., 2001; Hirst et al., 2008).

Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von Friedland *et al.* aus dem Jahre 1995 (1995). Diese Arbeitsgruppe beobachtete in einem Kaninchen-Modell, dass die intrazisternale Injektion von rekombinantem PLY eine rasche Immunreaktion auslöst. Allerdings fand diese Arbeitsgruppe keinen Unterschied im Verlauf der meningealen Inflammation nach einer Infektion mit einem PLY-defizienten und einem PLY-produzierendem Stamm. Die Ergebnisse der Studie von Friedland *et al.* (1995) deuten darauf hin, dass PLY im ZNS zwar pro-inflammatorisch wirken kann, für die Entstehung der meningealen Inflammation im Rahmen einer Pneumokkeninfektion aber nicht unbedingt erforderlich ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass [i] im Liquor erkrankter Mäuse hohe Konzentrationen von S100A8/A9 gefunden werden und [ii] Granulozyten die primäre Quelle von S100A8/A9 zu sein scheinen. Dabei scheint S100A8/A9 aus diesen Zellen vorwiegend passiv und Pneumolysin-abhängig freigesetzt zu werden.

## **5.2 Bedeutung von S100A9 bei der Pneumokokkenmeningitis**

Ist S100A8/A9 erst einmal in den Extrazellulärraum freigesetzt, kann es als DAMP (*damage associated molecular patterns*) agieren: DAMPs können Immunreaktionen bei Infektionen oder anderen Gefahren induzieren und verstärken. Im Gegensatz zu sogenannten PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster), die vor allem in der Frühphase der Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis eine entscheidende Rolle spielen, scheinen DAMPs wie S100A8/A9 erst in der Spätphase der Inflammation entscheidend zu sein. In Übereinstimmung mit diesem Konzept konnte in dieser Dissertationsarbeit gezeigt werden, dass die S100A9-Defizienz nicht die Entstehung der meningealen Entzündungsreaktion beeinflusst, aber zur Abschwächung der Immunreaktion unter antibiotischer Therapie beiträgt. Diese Erkenntnis entspricht Beobachtungen einer früheren Untersuchung unserer Arbeitsgruppe, nämlich dass HMGB 1, eines der am besten charakterisierten DAMPs

(Chan et al., 2012), zur Verstärkung der Entzündungsreaktion im fortgeschrittenem Krankheitsstadium beitragen kann (Hohne et al., 2013). Die funktionelle Bedeutung von HMGB1 und S100A8/A9 in diesem Krankheitsstadium dürfte - zumindest teilweise - durch das zeitliche Freisetzungprofil der beiden Alarmsignale zu erklären sein. Hohe Konzentrationen beider Moleküle konnten erst 18 Stunden nach der Infektion nachgewiesen werden. Ähnliche Zeitverläufe der S100A8/A9-Freisetzung konnten auch in Tiermodellen der *Escherichia coli*-Peritonitis und der Klebsiellenpneumonie beobachtet werden (van Zoelen et al., 2009; Achouiti et al., 2012). Beachtenswert ist auch eine Studie von Tuomanen *et al.* (1985), die zeigen konnte, dass die Präsenz von Pneumokokken-Zellwandbestandteilen im Liquor genügt, um eine Meningitis zu induzieren. In Zusammenschau der Ergebnisse ist folgendes Szenario der Immunregulation bei der Pneumokokkenmeningitis vorstellbar: Ist *S. pneumoniae* erst einmal in den Liquor gelangt, kann es sich dort aufgrund der örtlichen Infektabwehrschwäche, die vor allem durch niedrige Konzentrationen an löslichen Opsoninen und wenige Phagozyten bedingt ist (Koedel et al., 2010), leicht vermehren. Das exponentielle Wachstum der Erreger verursacht eine Liquorazidose, die wiederum die Autolyse von *S. pneumoniae* auslösen und fördern kann (Pinas et al., 2008). In der Folge werden Zellwandbestandteile in den Liquor freigesetzt. Ihre dortige Präsenz wird von körpereigenen PRRs (*pattern recognition receptors*) erkannt. Dies führt letztendlich zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten an den Ort der Infektion (Klein et al., 2008). Die Neutrophilen sind jedoch nur bedingt in der Lage, das Wachstum der Pneumokokken zu begrenzen. Als Folge dessen erreichen die bakteriellen Titer so hohe Konzentrationen, dass sie körpereigene Abwehrzellen (wie Neutrophile) schädigen können (Zysk et al., 2000). Diese setzen daraufhin S100A8/A9 in den Liquor frei. In der Folge können diese Proteine als treibende Kraft der Entzündungsreaktion agieren. Dieser Mechanismus scheint vor allem während der antibiotischen Therapie von Bedeutung zu sein. Nach Beginn der antimikrobiellen Therapie nehmen die Bakterienzahlen, aber auch die Konzentration der bakteriellen Zellwandbestandteile innerhalb von Stunden ab (Stucki et al., 2007). In dieser Situation scheinen endogene DAMPs wie S100A8/A9 die Rolle von PAMPs - zumindest teilweise - zu übernehmen und die Entzündungsreaktion aufrechtzuerhalten.

### **5.3 Wirkmechanismen von S100A8/A9 bei der Pneumokokkenmeningitis**

Extrazelluläres S100A8/A9 ist in der Lage, Immunantworten auf verschiedene Arten zu modulieren. S100-Proteine können sowohl direkt als auch indirekt zur Elimination von Bakterien beitragen. Direkt scheint S100A8/A9 über Chelatbildung, indirekt via Rekrutierung von Phagozyten und Förderung der Phagozytoserate zu wirken. Die Chelatbildung von S100A8/A9 mit bivalenten Kationen wie Zink und Mangan, die den Bakterien dadurch nicht für essentielle Stoffwechselprozesse zur Verfügung stehen (Corbin et al., 2008), trägt unter *in vitro*-Bedingungen zur Wachstumsinhibition einer Vielzahl von Bakterien bei, wie z.B. *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*. In Übereinstimmung damit zeigten S100A9-defiziente Mäuse höhere bakterielle Titer in Leberabszessen nach intravenöser Infektion mit *Staphylococcus aureus* (Corbin et al., 2008) sowie eine gesteigerte bakterielle Dissemination nach Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* (Achouitti et al., 2012). Auf die indirekte Wirkung von S100A8/A9 wies eine Studie von Simard et al. (Simard et al., 2011) hin. Bei Untersuchungen an isolierten menschlichen Granulozyten beobachteten sie, dass eine Exposition mit S100A9 die Phagozytoserate von *Escherichia coli* durch die Abwehrzellen signifikant erhöht. Im Gegensatz zu den genannten Studien lieferten Untersuchungen in anderen Tiermodellen, wie z.B. der durch *Escherichia coli* ausgelösten Sepsis (van Zoelen et al., 2009) oder der Pneumokokkenpneumonie (Raquil et al., 2008), keine Hinweise auf eine antimikrobielle Rolle von S100A8/A9. In unseren Untersuchungen konnte ebenfalls kein Unterschied in den bakteriellen Titern im Hirn von infizierten WT- oder S100A9-defizienten Mäusen festgestellt werden. Folglich scheint die antimikrobielle Aktivität von S100A8/A9 vom Bakterium und dem Ort der Entzündungsreaktion abzuhängen.

Ein weiterer möglicher Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion ist eine durch S100A8/A9-vermittelte Hemmung der Neutrophilen-Apoptose. Atallah et al. (2012) berichteten, dass die konstitutive Apoptose von Neutrophilen über deren Zellkonzentration reguliert wird. In anderen Worten: je höher die Zahl der Neutrophilen, desto geringer die Apoptoserate. Verantwortlich für diesen Effekt machten die Autoren S100A8/A9-Proteine, die aus den sterbenden Granulozyten freigesetzt werden und in der Folge über TLR4-abhängige Signalwege das Überleben benachbarter Granulozyten fördern. Ein weiterer Hinweis auf einen möglichen anti-apoptotischen Effekt von S100A8/A9 ist die verminderte Anzahl neutrophiler Granulozyten im Knochenmark S100A9-defizienter Mäuse (Manitz et al.,

2003). Da neutrophile Granulozyten die vorherrschende Leukozytensubpopulation im Liquor bei einer Pneumokokkenmeningitis darstellen, könnte die beobachtete Reduktion der Liquorpleozytose auf einer vermehrten Apoptose dieser Leukozytensubpopulation in Abwesenheit von S100A8/A9 beruhen. Dieser Mechanismus scheint jedoch eher unwahrscheinlich zu sein, da in unserer Studie die Anzahl apoptotischer Granulozyten im meningealen Infiltrat sowohl 24 Stunden als auch 48 Stunden nach der Infektion bei S100A9-defizienten- und WT-Mäusen nahezu identisch war. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen hatten auch Raquil *et al.* (2008) in einem Modell der Pneumokokkenpneumonie keine Unterschiede bei der Anzahl apoptotischer Granulozyten in der bronchoalveolaren Lavageflüssigkeit gefunden, unabhängig davon, ob die Mäuse mit Antikörpern gegen S100A8 und S100A9 behandelt worden waren oder nicht.

Ein weiterer denkbarer Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion könnte darin bestehen, dass S100A8/A9 zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zum Entzündungsherd beiträgt. Frühere Studien hatten gezeigt, dass S100A8 und S100A9 *per se* und im Zusammenspiel eine direkte chemotaktische Aktivität auf neutrophile Granulozyten *in vivo* und *in vitro* besitzen (Cornish *et al.*, 1996; Newton und Hogg, 1998; Ryckman *et al.*, 2003). Die biologische Relevanz dieser Beobachtung wird durch Studienergebnisse in experimentellen Krankheitsmodellen gestützt. So führte in einem Tiermodell der Gichtarthritis eine passive Immunisierung mit Antikörpern gegen S100A8 und S100A9 (nicht aber gegen die murinen Neutrophilen-Chemokine CXCL-1 und CXCL-2) zur Hemmung der Neutrophilen-Akkumulation im betroffenen Gelenk (Ryckman *et al.*, 2003). In einem Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie konnte durch eine Vorbehandlung mit anti-S100A8- und anti-S100A9-Antikörpern die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in den Alveoli signifikant reduziert werden, obwohl die Antikörper-Gabe gleichzeitig mit einer Erhöhung der lokalen Chemokin-Produktion einherging (Raquil *et al.*, 2008). Zusätzlich zur direkten chemotaktischen Aktivität kann S100A8/A9 auch indirekt durch Induktion einer Zytokin- und Chemokinproduktion die Leukozyteninfiltration ins entzündete Gewebe fördern. So demonstrierten beispielsweise Cesaro *et al.* (2012), dass [i] S100A9 *per se* die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sowie von Chemokinen wie CXCL-2 aus Monozyten induzieren kann und [ii] eine Behandlung mit S100A9-neutralisierenden Antikörpern zu einer Abnahme der Zytokinfreisetzung und Leukozyteninfiltration in einem Arthritismodell

führt. Eine gemeinsame Reduktion von leukozytärem Infiltrat und lokaler Zytokin-/Chemokinproduktion wurde ebenfalls in Mausmodellen der Sepsis und von Gefäßschäden beschrieben (Croce et al., 2009; van Zoelen et al., 2009; Cesaro et al., 2012). Weitere Befunde, die das Konzept der indirekten chemotaktischen Wirkung stützen, lieferte die Arbeitsgruppe von Makino (2006). Diese berichtete, dass sowohl durch eine Exposition mit S100A8/A9 als auch mit S100A9 alleine die Freisetzung von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  aus isolierten humanen Monozyten und ausdifferenzierten Makrophagen ausgelöst werden kann. Ferner demonstrierten Vogl und Mitarbeiter (2007), dass [i] S100A8 die pro-inflammatorische Wirkung des PAMP *Escherichia coli* LPS verstärken kann und [ii] dieser Effekt vorwiegend durch dessen Interaktion mit TLR4 vermittelt wird (Vogl et al., 2007). Neuere Studien zeigten zudem, dass auch S100A9 an TLR4 binden und dadurch pro-inflammatorisch wirken kann (Riva et al., 2012). In Übereinstimmung mit den zitierten Arbeiten beobachteten wir in unseren Untersuchungen im Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis eine reduzierte Liquorpleozytose und verminderte zerebrale CXCL-2-Konzentrationen in S100A9-defizienten Mäusen. Der Chemokin-Ligand 2 (CXCL-2) ist ein kleines Zytokin, das zur Familie der CXC-Chemokine gehört. Es wird von Monozyten und Makrophagen sezerniert und wirkt chemotaktisch auf polymorphe Leukozyten und hämatopoetische Stammzellen. In seiner Aminosäure-Sequenz ist es zu 90% identisch mit dem Chemokin CXCL-1 (Wolpe et al., 1989; Iida und Grotendorst, 1990). Es aktiviert Zellen, in dem es mit seinem Zelloberflächenrezeptor CXC chemokine receptor CXCR-2 interagiert (Pelus und Fukuda, 2006). In Untersuchungen an Kaninchen war gezeigt worden, dass die intrazisternale Injektion von CXCL-2 *per se* eine Liquorpleozytose auslösen kann (Saukkonen et al., 1990). Ferner beobachteten Diab et al. (1999) in einem Rattenmodell der HIB-Meningitis, dass die Neutralisation von CXCL-2 durch Gabe spezifischer Antikörper zu einer Abschwächung der Neutrophilen-Rekrutierung in den Liquorraum führt. Zu ähnlichen Befunden kam unsere Arbeitsgruppe bei Untersuchungen im Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis (Woehrl et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte zudem demonstriert werden, dass [i] eine Stimulation von Makrophagen mit S100A8, S100A9 und S100A8/A9 eine Freisetzung von CXCL-2 bedingt, [ii] die S100-Proteine diesbezüglich synergistisch mit Pneumokokkenbestandteilen wirken können, [iii] die intrazisternale Applikation von S100-Proteinen sowohl eine Liquorpleozytose als auch eine Erhöhung der CXCL-2-Spiegel im Liquor zur Folge hat, und [iv]

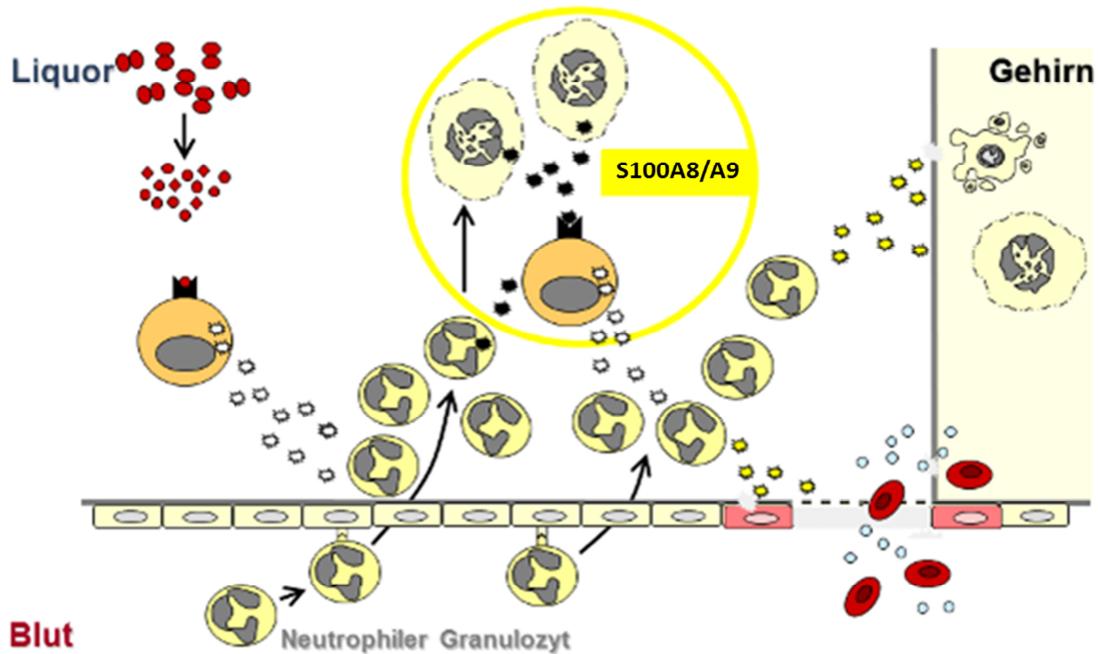
letztgenannte Effekte von der Interaktion mit TLR4 abhängen. Somit scheint S100A8/A9 (als Heterodimer oder als Homodimer) vorwiegend über eine Regulation der CXCL-2-Produktion an der Rekrutierung von Leukozyten bei der Pneumokokkenmeningitis beteiligt zu sein.

#### **5.4 Einordnung von S100A8/A9 in das derzeit gültige Konzept zur Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis**

In den vergangenen 10 Jahren hat sich unser Verständnis der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis, insbesondere aufgrund von tierexperimentellen Studien, erheblich verbessert (Abb. 23) (Koedel et al., 2010). Heute gilt als gesichert, dass die Detektion bestimmter PAMPs durch Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) auf und in den Immunzellen das zentrale initiale Ereignis der Immunaktivierung bei der Pneumokokkenmeningitis darstellt. Wichtige PAMPs von *Streptococcus pneumoniae* sind die Zellwandbausteine Peptidoglykan (PG) und Lipoteichonsäure (LTA) sowie das Toxin Pneumolysin (PLY). An deren Erkennung wirken Mitglieder der *toll-like* Rezeptor-Familie (insbesondere TLR2 und TLR4) und NOD-*like* Rezeptoren (wie NLRP3, *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat and purine domain containing gene product family receptor 3*) mit. Die Interaktion zwischen PAMPs und TLRs führt zu einer vom intrazellulären Adaptermolekül MyD88-abhängigen Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Nuklearfaktor NF-κB. Diese Transkriptionsfaktoren steuern die Expression zahlreicher Gene, die für pro-inflammatorische Zytokine (wie Interleukin-1β, IL-1β), Chemokine und bestimmte Adhäsionsmoleküle kodieren. In der Folge wandern aktivierte Leukozyten, in erster Linie Granulozyten, in den Liquorraum ein. Parallel zur Leukozyteninfiltration wird über einen MyD88-abhängigen Signalweg die zerebrale Expression von Komplementfaktoren, die bei Primärinfektionen von Lunge oder Blut entscheidend für die Opsonophagozytose von Pneumokokken sind, stark hochreguliert. Allerdings funktioniert diese Abwehrstrategie im Liquorraum nur eingeschränkt; die Phagozyten können die Pathogene nur partiell eliminieren. Infolge der Persistenz der Pathogene und einer geringen Apoptoserate eingewanderter Granulozyten entwickeln sich die neuropathologisch charakteristischen, massiven granulozytären Infiltrate im Liquorraum. Greift man dem Immunsystem „unter die Arme“, indem man die Betroffenen antimikrobiell behandelt, führt die dadurch induzierte bakterielle Lyse zur

Freisetzung großer PAMP-Mengen und konsekutiv zur Verstärkung der Entzündungsreaktion („*inflammatory burst*“). In der klinischen Situation verläuft die Immunreaktion oft protrahiert und führt häufig zu Zellschädigungen. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre die Freisetzung sogenannter endogener (wirtseigener) Alarmsignale (DAMPs) aus geschädigten Zellen. In dieser Arbeit konnten wir nun demonstrieren, dass große Mengen des Alarmsignals S100A8/A9 aus geschädigten Granulozyten in den Liquorraum freigesetzt werden, dass extrazelluläres S100A8/A9 die Produktion des Chemokins CXCL-2 fördert und dadurch die Rekrutierung weiterer Granulozyten in den Liquorraum und in angrenzendes Gewebe bewirkt. Da die Immunreaktion entscheidend zur Entstehung von Gewebeschäden bei der Pneumokokkenmeningitis beiträgt, geht die Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion vermutlich mit einer Zunahme des Meningitis-assoziierten Gewebeschadens einher.

**Abbildung 23: Rolle von S100A8/A9 in der Pneumokokkenmeningitis**



## **5.5 S100A9: Mögliches Ziel für eine adjuvante Behandlung der Pneumokokkenmeningitis**

Ein pharmakologischer Eingriff in die Wirkung von DAMPs bei der Pneumokokkenmeningitis hat nicht nur pathophysiologische Relevanz, sondern bietet neue Möglichkeiten der Begleittherapie um die Meningitis-assoziierten zerebralen Schädigungen zu reduzieren. Ein möglicher begleitender Therapieansatz neben der Gabe von Antibiotika könnte die Anwendung des S100A9-Antagonisten Paquinimod sein (Bjork et al., 2009). Vergleichbar mit der S100A9-Gendefizienz führte auch die Applikation von Paquinimod zu einer schnelleren Entzündungsresolution und einem günstigeren klinischen Verlauf im Mausmodell. Wir beobachteten eine anti-inflammatoryische und protektive Wirkung dieser Substanz im kliniknahen Modell, d.h. wenn sie in Kombination mit Ceftriaxon appliziert wurde. Somit scheint vor allem S100A9 ein potentieller neuer Angriffspunkt für adjuvante Behandlungsmaßnahmen bei der Pneumokokkenmeningitis zu sein.

S100A8/A9-Proteine zeigen ein nahezu identisches Expressionsmuster in Mensch und Maus (Goebeler et al., 1993). Daher bietet es sich an, die Funktionen dieser beiden Proteine im Mausmodell zu untersuchen. Allerdings stellte sich heraus, dass die Deletion des Gens für S100A8 in der Maus zur frühen Resorption des Embryos *in utero* führt. S100A8 scheint also eine wichtige Rolle in der murinen Embryogenese zu spielen (Passey et al., 1999). Im Gegensatz dazu führt die Gendeletion von S100A9 zu keinem auffälligen Phänotyp. Die Mäuse sind fertil und verhaltensauffällig; sie erreichen ein normales Körpergewicht und haben eine normale Lebenserwartung. Sie zeigen überdies keine Auffälligkeiten in der Zahl und Morphologie peripherer Leukozyten.

Bemerkenswerterweise exprimieren S100A9-defiziente Mäuse auch kein S100A8. Grund hierfür ist der Abbau von S100A8 in Abwesenheit von S100A9. Daher könnte der Phänotyp der S100A9-defizienten Mäuse - zumindest teilweise - auch auf der Defizienz von S100A8 beruhen. Die Tatsache, dass Paquinimod, das vornehmlich die Wirkung von S100A9 antagonisieren soll, einen vergleichbare Wirkung wie die S100A9-Gendefizienz hat, spricht jedoch dafür, dass S100A9 entscheidend für die beobachteten Effekte bei der Pneumokokkenmeningitis zu sein scheint.

## **6. Zusammenfassung**

Bei der Pneumokokkenmeningitis handelt es sich um eine lebensbedrohliche Infektionserkrankung. Trotz gezielter Therapie sterben weiterhin etwa 15% der Patienten; ein Drittel der Überlebenden leidet an neurologischen Folgeschäden (Thigpen et al., 2011). Hauptverantwortlich für ungünstige klinische Verläufe sind intrakranielle Komplikationen wie Hirnödem, Hydrozephalus oder zerebrale Ischämie (van de Beek et al., 2004). Diese Komplikationen entstehen vor allem durch die übermäßige granulozytäre Immunreaktion (Koedel et al., 2010). Die granulozytäre Entzündungsreaktion persistiert häufig über Tage, obwohl die antibiotische Therapie innerhalb von Stunden zur Elimination des Erregers und seiner Bestandteile führt (Stucki et al., 2007). Ein mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass endogene Alarmsignale (DAMPs), die aus aktivierten und geschädigten Zellen freigesetzt werden, die Funktion Pathogen-assozierter molekularer Muster (PAMPs) übernehmen und die Entzündungsreaktion aufrechterhalten.

In den letzten Jahren fanden sich Hinweise darauf, dass S100-Proteine (darunter S100A8 und S100A9) als DAMPs wirken können (Chan et al., 2012). S100A8 und S100A9 werden konstitutiv in hohen Mengen in neutrophilen Granulozyten exprimiert (Chan et al., 2012). Darüber hinaus wurde eine Expression dieser Proteine in Makrophagen (Hu et al., 1996), Endothel- und Epithelzellen – insbesondere nach einer Stimulation mit Entzündungsmediatoren – beobachtet (Nisapakultorn et al., 2001). S100A8 und S100A9 (als Homo- und Heterodimer) können von Immunzellen als Reaktion auf diverse Stressoren aktiv sezerniert werden (Rammes et al., 1997). Überdies können sie beim nekrotischen Zelluntergang passiv in den Extrazellularraum gelangen. In Analogie zu PAMPs wird die extrazelluläre Präsenz von DAMPs durch Mustererkennungsrezeptoren erkannt. Dabei scheinen sowohl der *toll-like* Rezeptor (kurz TLR) 4 als auch der Rezeptor für fortgeschrittene Stoffwechselprodukte der Glykierung (kurz RAGE) als Sensoren von S100A8, S100A9 und S100A8/A9 zu fungieren (Vogl et al., 2007; Boyd et al., 2008; Bjork et al., 2009). Die Interaktion von S100A8, S100A9 und S100A8/A9 mit PRRs führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuklearfaktor NF-κB und fördert die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (Vogl et al., 2007). Überdies scheinen diese S100-Proteine direkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten zu wirken (Ryckman et al., 2003). Abgesehen von diesen immunmodulatorischen

Eigenschaften können extrazelluläre S100-Proteine auch zum Zelltod durch Nekrose oder Apoptose beitragen (Viemann et al., 2007).

Da S100A8 und S100A9 in großen Mengen im Zytoplasma neutrophiler Granulozyten vorhanden sind und diese Zellen die vorherrschende Leukozytensubpopulation im meningealen Infiltrat bei der Pneumokokkenmeningitis darstellen, stellten wir uns die Frage, ob und, wenn ja, welche Rolle diese Proteine in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis spielen. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde beabsichtigt [i] die Freisetzung von S100A8/A9-Proteinen im Krankheitsverlauf der Pneumokokkenmeningitis zu charakterisieren, [ii] die funktionelle Bedeutung dieser Proteine bei der Regulation der Entzündungsreaktion und der Entstehung Meningitis-assozierter intrakranieller Komplikationen zu analysieren, und [iii] die zugrundeliegenden Mechanismen der S100A8/A9-abhängigen Effekte bei der Pneumokokkenmeningitis genauer zu definieren. Die Untersuchungen wurden [i] in einem etablierten Mausmodell der Meningitis, in dem die beim Menschen beobachteten entzündlichen und neuropathologischen Veränderungen gut nachvollzogen werden können, [ii] an primären murinen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und murinen ER-Hoxb8-Granulozyten, sowie [iii] mit menschlichen Liquorproben durchgeführt.

In Untersuchungen von Liquorproben konnten wir eine massive Erhöhung der extrazellulären S100A8/A9-Konzentrationen bei erwachsenen Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis feststellen (im Vergleich zu Kontrollpatienten). In Übereinstimmung mit den Patienten-Befunden fanden wir in unserem Mausmodell bei infizierten Tieren deutlich höhere S100A8/A9-Werte im Liquor als bei Kontrolltieren; die S100A8/A9-Konzentrationen waren nach 6 Stunden um das 4-fache, nach 24 und 48 Stunden sogar um das 30-fache erhöht. Dabei wurden die S100A8- und S100A9-Proteine entsprechend unserer immunhistochemischen Befunde vornehmlich von in den Subarachnoidalraum immigrierten Leukozyten exprimiert. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung zeigten nachfolgende Granulozyten-Depletionsversuche im Mausmodell eine massive Reduktion der S100A8/A9-Konzentrationen im Liquor. Somit scheinen bei der Pneumokokkenmeningitis neutrophile Granulozyten die Hauptquelle von S100A8/A9 zu sein. Anhand von Zellkulturversuchen an murinen neutrophilen Granulozyten konnten wir in der Folge demonstrieren, dass das Pneumokokkentoxin Pneumolysin die Wirtszellen schädigt und konsekutiv S100A8/A9 passiv in den Extrazellulärtraum

gelangt. Um Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von S100A8/A9 in der Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis zu bekommen, untersuchten wir in der Folge S100A9-defiziente Mäuse im Akutmodell (24 Stunden Infektion) und kliniknahen Modell (Antibiotikabehandlung 24 Stunden nach der Infektion, Auswertung weitere 24 Stunden später).

Im Akutmodell konnten wir - abgesehen von geringfügig geringeren Konzentrationen des Chemokins CXCL-2 bei den S100A9-defizienten Mäusen - keine signifikanten Unterschiede zwischen den gendefizienten Mäusen und den entsprechenden WT-Mäusen feststellen. Allerdings führte die Gendefizienz von S100A9 zu einer Verbesserung des klinischen Zustands im fortgeschrittenen Krankheitsstadium. Diese klinische Verbesserung ging mit einer Abnahme der Liquorleukozytenzahl und der Hirn-CXCL-2-Konzentration, einer Reduktion der Hydrozephalusentwicklung und des intrakraniellen Druckanstiegs, nicht aber der intrazerebralen Einblutungen einher. Durch eine intrazisternale Vorbehandlung mit hoch aufgereinigtem S100A8 oder S100A9 konnte der Phänotyp der S100A9-defizienten Mäuse auf den der WT-Mäuse zurückgeführt werden. Dieser Befund spricht dafür, dass die Wirkung der Gendefizienz bei der Pneumokokkenmeningitis vornehmlich auf einem Ausfall der Funktion von extrazellulären S100A8/A9-Proteinen beruht. Diese Hypothese konnte in Folgeuntersuchungen bekräftigt werden: die intrathekale Applikation von gereinigtem S100A8, S100A9 und S100A8/A9 *per se* kann eine Meningitis verursachen. Diese biologische Aktivität konnte in WT- und RAGE-defizienten Mäusen, nicht aber TLR2 und TLR4-doppeldefizienten Mäusen beobachtet werden und war mit einer Erhöhung der CXCL-2-Konzentrationen im Liquor vergesellschaftet. Zur weiteren Charakterisierung der pro-inflammatorischen Wirkung von extrazellulärem S100A8, S100A9 und S100A8/A9 führten wir Experimente an primären murinen Knochenmarksmakrophagen durch. Dabei zeigte sich, dass alle drei S100-Proteinpräparationen über einen TLR4-abhängigen Mechanismus die Produktion von CXCL-2 durch Makrophagen induzieren können und dieser Effekt durch die Anwesenheit von Pneumokokkenfragmenten synergistisch verstärkt werden kann. In einer abschließenden Versuchsreihe überprüften wir in einem kliniknahen Mausmodell, ob sich S100A9-Antagonisten (in unserem Fall: Paquinimod) möglicherweise zur adjuvanten Behandlung einer Pneumokokkenmeningitis eignen. Vergleichbar mit der S100A9-Gendefizienz führte

auch die Applikation von Paquinimod zu einer schnelleren Entzündungsresolution und einem günstigeren klinischen Verlauf.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass [i] S100A9 und S100A8 im Verlauf einer Pneumokokkenmeningitis (vorwiegend) passiv aus untergehenden Granulozyten freigesetzt werden, [ii] in der Folge als DAMP zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion und damit zur Verschlimmerung der pathophysiologischen Veränderungen beitragen, [iii] die biologische Aktivität der S100-Proteine (zumindest zum Teil) CXCL-2- und TLR4-abhängig ist, und [iv] die Antagonisierung der Wirkung von S100A8/A9 ein vielversprechendes Ziel für die begleitende Therapie dieser Erkrankung zu sein scheint.

## **7. Ausblick**

Ein pharmakologischer Eingriff in die Wirkung von DAMPs könnte eine neue Option in der adjuvanten Behandlung der Pneumokokkenmeningitis sein. Ein möglicher Therapieansatz wäre die Gabe des S100A9-Antagonisten Paquinimod (Bjork et al., 2009). Das Quinolin-3-Carboxamid Paquinimod scheint die Bindung von S100A9 an TLR 4 kompetitiv zu hemmen (Bjork et al., 2009) und folglich die Immunzellaktivierung zu verhindern (Riva et al., 2012). Zurzeit befindet sich diese Substanz in klinischer Entwicklung zur Behandlung von Multipler Sklerose (Polman et al., 2005; Comi et al., 2008; Comi et al., 2010), Prostatakrebs (Bratt et al., 2009), systemischem Lupus erythematoses (Bengtsson et al., 2012) und systemischer Sklerose.

Bevor an eine klinische Translation von S100A9-Antagonisten bei der Pneumokokkenmeningitis gedacht werden kann, müssen noch verschiedene Fragen experimentell geklärt werden. Eine wichtige Frage ist, ob der Antagonist auch dann noch wirkt, wenn er nach Beginn der Antibiotikabehandlung gegeben wird. Zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion bei der Pneumokokkenmeningitis scheinen auch andere DAMPs, wie beispielsweise HMGB1, beizutragen (Hohne et al., 2013). Daher sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden, ob durch die Applikation unterschiedlicher DAMP-Antagonisten (wie beispielsweise Paquinimod und funktionsblockierende anti-HMGB1-Antikörper) eine additive protektive Wirkung erzielt werden kann. Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, ob die gemeinsame Applikation von DAMP-Antagonisten und Daptomycin, einem nicht-bakteriolytischen Antibiotikum, das der Freisetzung von mikrobiellen Alarmsignalen während der antimikrobiellen Therapie entgegenwirkt, synergistische protektive Effekte aufweist. Abschließend sollte noch getestet werden, ob die zusätzliche Gabe von DAMP-Antagonisten und/oder Daptomycin die protektive Wirkung von Dexamethason verstärken kann. Diese Versuchsreihe ist für eine spätere Translation in die Klinik wichtig, da Dexamethason Bestandteil der Standardtherapie der Pneumokokkenmeningitis ist (siehe Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie; [www.dgn.org](http://www.dgn.org)).

## **8. Quellenverzeichnis**

### **Apparaturen und Geräte:**

Material	Typ	Herkunft
Körpergewichtswaage	ABS/ABJ	KERN&SOHN, Balingen, Deutschland
Digitalthermometer	GTH 1160	GREISINGER electronic, Regenstauf, Deutschland
Stoppuhr		Junghans, Schramberg, Deutschland
Narkosemittel-Verdampfer	Vet.Med.Vapor	Dräger, Lübeck, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	HERAsafe®	Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA
Heizkissen	HK 20	Beurer, Ulm, Deutschland
Lampe	150 HL	Flexilux®
Skalpell		Feather®
große Schere		Biochem luox
kleine Schere		Quadrolab, Meckenheim, Deutschland
Pinzette	INOX, Biologie No. 5	Dumont®
Bohrer	Micromot 50	Proxxon, Föhren, Deutschland
Druckwandler	SIRECUST 403 R	Siemens, München, Deutschland
Perfusor	Precidor	Infors AG Basel, Schweiz
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal	Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland
Mikroskop	TMS, ROBRA Micro	Nikon Deutschland, Düsseldorf

Zentrifuge	5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
feine Waage	ABJ	KERN&SOHN, Balingen, Deutschland
Zerstäuber	Ultra-Turrax®	Janke&Kunkel KG, Staufen, Deutschland
Vortexer	Mixer UZUSIO VTX-3000L	LMS, Tokio, Japan
Pipetten		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryostat-Mikrotom	CM 3050 S	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Antirollplatte	Glas, 70 mm	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Probenhalter	Aluminium, geriffelt, rund, 40 mm	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Digitalkamera	EasyShare DX 4330	Kodak Deutschland, Stuttgart

#### **Verbrauchsmaterialien:**

Material	Typ	Herkunft
Einmalhandschuhe	Manufix, powder-free, sensitive	Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalmundschutz	Surgical face mask, Standard, Barrier®	Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath- Unterfeldhaus, Deutschland
Reaktionsgefäße	PP-Tubes, 14 ml steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße	15 ml, 50 ml BlueMax Falcon	BD Biosciences, Deutschland, Heidelberg
Pipettenspitzen	20, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	1,5 ml Eppendorf-Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Einmal-Mikropipetten	100 µl, Blaubrand®, Brand GmbH + Co. KG, intraEnd	Wertheim, Deutschland
Gewebekleber	0,5 ml Histoacryl®	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Plastikschauch	Portex Non Sterile Polythene Tubing 0,58 mm ID 0,96 mm OD	Sims Portex Ltd., Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn
sterile Einmalspritzen	5 ml, 20 ml, Discardit™ II	BDMedical Deutschland, Heidelberg
sterile Einmalinjektionsspritzen ohne Nadel	Omnifix®-F, Luer 1 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
sterile Feindosierspritzen mit Nadel	Omnican®-F, 1 ml, 30 G x ½	Braun, Melsungen, Deutschland
Kanülen	Microlance™ 3, 22 G 1¼	BD Medical, Deutschland, Heidelberg
Tupfer	Maicell XT®, Zellstoff	MaiMed Medical, Neuenkirchen, Deutschland
Plastikschälchen	Plastic Tissue Dispomolds 24 x 24 x 5 mm	Diapath S.p.A., Martinengo, Italien
Agar-Platten	COL-S, Columbia	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland
96-Well-Platten	Nunc 96 MicroWell,	Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark
serologische Pipetten	steril, 5 ml, 10 ml Falcon®	BD Heidelberg, Deutschland
Rollenpflaster	Leukoplast® hospital	BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland
Verschlussfolie	Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, USA
Objektträger	SuperFrost®, geschliffen	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland

Einbettmedium	Jung tissue freezing medium	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Mikrotomklingen	High-profile disposable microtome blades 818	Leica Biosystems, Nussloch, Germany

### Reagenzien:

Material	Typ	Herkunft
Antikoagulans	Heparin-Natrium 25000 I.E., 5 ml Injektionslösung	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Narkotikum	Ketaminhydrochlorid, 10 ml 50 mg/ml Injektionslösung	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland
Sedativum	Xylazinhydrochlorid, ≥ 99%, wasserlöslich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Desinfektionsmittel	Ethanol, 70% vergällt mit 1% MEK (Methylethylketon)	bezogen vom Klinikbedarf des Klinikums Großhadern, München
Inhalationsnarkotikum	Forene® (Isofluran), 250 ml, Flüssigkeit zur Herstellung eines Dampfes zur Inhalation	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Lokalanästhetikum	Xylocain 1% (Lidocainhydrochlorid), 50 ml Injektionsflaschen	AstraZeneca Deutschland GmbH Wedel
Färbelösung	Türksche Lösung zur Leukozytenzählung (Wasser, Gentianaviolett)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## **9. Literaturverzeichnis**

- Achouiti, A., T. Vogl, et al. (2012). "Myeloid-related protein-14 contributes to protective immunity in gram-negative pneumonia derived sepsis." *PLoS Pathog* **8**(10): e1002987.
- Atallah, M., A. Krispin, et al. (2012). "Constitutive neutrophil apoptosis: regulation by cell concentration via S100 A8/9 and the MEK-ERK pathway." *PLoS One* **7**(2): e29333.
- Auburtin, M., M. Wolff, et al. (2006). "Detimental role of delayed antibiotic administration and penicillin-nonsusceptible strains in adult intensive care unit patients with pneumococcal meningitis: the PNEUMOREA prospective multicenter study." *Crit Care Med* **34**(11): 2758-2765.
- Averill, M. M., S. Barnhart, et al. (2011). "S100A9 differentially modifies phenotypic states of neutrophils, macrophages, and dendritic cells: implications for atherosclerosis and adipose tissue inflammation." *Circulation* **123**(11): 1216-1226.
- Basu, S., R. J. Binder, et al. (2000). "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." *Int Immunol* **12**(11): 1539-1546.
- Bengtsson, A. A., G. Sturfelt, et al. (2012). "Pharmacokinetics, tolerability, and preliminary efficacy of paquinimod (ABR-215757), a new quinoline-3-carboxamide derivative: studies in lupus-prone mice and a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, repeat-dose, dose-ranging study in patients with systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* **64**(5): 1579-1588.
- Berntzen, H. B., U. Olmez, et al. (1991). "The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis." *Scand J Rheumatol* **20**(2): 74-82.
- Bianchi, M. E. (2007). "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger." *J Leukoc Biol* **81**(1): 1-5.

- Bjork, P., A. Bjork, et al. (2009). "Identification of human S100A9 as a novel target for treatment of autoimmune disease via binding to quinoline-3-carboxamides." PLoS Biol **7**(4): e97.
- Boulnois, G. J., J. C. Paton, et al. (1991). "Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*." Mol Microbiol **5**(11): 2611-2616.
- Boyd, J. H., B. Kan, et al. (2008). "S100A8 and S100A9 mediate endotoxin-induced cardiomyocyte dysfunction via the receptor for advanced glycation end products." Circ Res **102**(10): 1239-1246.
- Bozinovski, S., M. Cross, et al. (2005). "S100A8 chemotactic protein is abundantly increased, but only a minor contributor to LPS-induced, steroid resistant neutrophilic lung inflammation in vivo." J Proteome Res **4**(1): 136-145.
- Bratt, O., M. Haggman, et al. (2009). "Open-label, clinical phase I studies of tasquinimod in patients with castration-resistant prostate cancer." Br J Cancer **101**(8): 1233-1240.
- Braun, J. S., R. Novak, et al. (2001). "Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus." J Infect Dis **184**(10): 1300-1309.
- Braun, J. S., J. E. Sublett, et al. (2002). "Pneumococcal pneumolysin and H(2)O(2) mediate brain cell apoptosis during meningitis." J Clin Invest **109**(1): 19-27.
- Bruck, W., P. Porada, et al. (1995). "Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions." Ann Neurol **38**(5): 788-796.
- Brun, J. G., R. Jonsson, et al. (1994). "Measurement of plasma calprotectin as an indicator of arthritis and disease activity in patients with inflammatory rheumatic diseases." J Rheumatol **21**(4): 733-738.
- Cesaro, A., N. Añceriz, et al. (2012). "An inflammation loop orchestrated by S100A9 and calprotectin is critical for development of arthritis." PLoS One **7**(9): e45478.
- Chan, J. K., J. Roth, et al. (2012). "Alarmins: awaiting a clinical response." J Clin Invest **122**(8): 2711-2719.

Clohessy, P. A. and B. E. Golden (1995). "Calprotectin-mediated zinc chelation as a biostatic mechanism in host defence." Scand J Immunol **42**(5): 551-556.

Cockeran, R., A. J. Theron, et al. (2001). "Proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils." J Infect Dis **183**(4): 604-611.

Cohen, M. L. (1997). "Epidemiological factors influencing the emergence of antimicrobial resistance." Ciba Found Symp **207**: 223-231; discussion 231-227.

Comi, G., O. Abramsky, et al. (2010). "Oral laquinimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: 36-week double-blind active extension of the multicentre, randomized, double-blind, parallel-group placebo-controlled study." Mult Scler **16**(11): 1360-1366.

Comi, G., A. Pulizzi, et al. (2008). "Effect of laquinimod on MRI-monitored disease activity in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study." Lancet **371**(9630): 2085-2092.

Corbin, B. D., E. H. Seeley, et al. (2008). "Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses." Science **319**(5865): 962-965.

Cornish, C. J., J. M. Devery, et al. (1996). "S100 protein CP-10 stimulates myeloid cell chemotaxis without activation." J Cell Physiol **166**(2): 427-437.

Croce, K., H. Gao, et al. (2009). "Myeloid-related protein-8/14 is critical for the biological response to vascular injury." Circulation **120**(5): 427-436.

Dawson, K. G., J. C. Emerson, et al. (1999). "Fifteen years of experience with bacterial meningitis." Pediatr Infect Dis J **18**(9): 816-822.

de Gans, J. and D. van de Beek (2002). "Dexamethasone in adults with bacterial meningitis." N Engl J Med **347**(20): 1549-1556.

De Lorenzo, B. H., L. C. Godoy, et al. (2010). "Macrophage suppression following phagocytosis of apoptotic neutrophils is mediated by the S100A9 calcium-binding protein." Immunobiology **215**(5): 341-347.

Devery, J. M., N. J. King, et al. (1994). "Acute inflammatory activity of the S100 protein CP-10. Activation of neutrophils in vivo and in vitro." J Immunol **152**(4): 1888-1897.

Diab, A., H. Abdalla, et al. (1999). "Neutralization of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and MIP-1 $\alpha$  attenuates neutrophil recruitment in the central nervous system during experimental bacterial meningitis." Infect Immun **67**(5): 2590-2601.

Donato, R. (2001). "S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles." Int J Biochem Cell Biol **33**(7): 637-668.

Dumitriu, I. E., P. Baruah, et al. (2005). "HMGB1: guiding immunity from within." Trends Immunol **26**(7): 381-387.

Echchannaoui, H., K. Frei, et al. (2002). "Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation." J Infect Dis **186**(6): 798-806.

Edgeworth, J., M. Gorman, et al. (1991). "Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells." J Biol Chem **266**(12): 7706-7713.

Ehrchen, J. M., C. Sunderkotter, et al. (2009). "The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer." J Leukoc Biol **86**(3): 557-566.

Engel, S., H. Schluesener, et al. (2000). "Dynamics of microglial activation after human traumatic brain injury are revealed by delayed expression of macrophage-related proteins MRP8 and MRP14." Acta Neuropathol **100**(3): 313-322.

Ernst, J. D., J. M. Decazes, et al. (1983). "Experimental pneumococcal meningitis: role of leukocytes in pathogenesis." Infect Immun **41**(1): 275-279.

Eue, I., C. Langer, et al. (2000). "Myeloid related protein (MRP) 14 expressing monocytes infiltrate atherosclerotic lesions of ApoE null mice." Atherosclerosis **151**(2): 593-597.

Feeney, D. M., A. Gonzalez, et al. (1982). "Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury." Science **217**(4562): 855-857.

Foell, D., M. Frosch, et al. (2004). "Methotrexate treatment in juvenile idiopathic arthritis: when is the right time to stop?" Ann Rheum Dis **63**(2): 206-208.

Foell, D., M. Frosch, et al. (2004). "Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation." Clin Chim Acta **344**(1-2): 37-51.

Foell, D., J. Hernandez-Rodriguez, et al. (2004). "Early recruitment of phagocytes contributes to the vascular inflammation of giant cell arteritis." J Pathol **204**(3): 311-316.

Foell, D., F. Ichida, et al. (2003). "S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease." Lancet **361**(9365): 1270-1272.

Foell, D. and J. Roth (2004). "Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease." Arthritis Rheum **50**(12): 3762-3771.

Foell, D., S. Seeliger, et al. (2003). "Expression of S100A12 (EN-RAGE) in cystic fibrosis." Thorax **58**(7): 613-617.

Foell, D., H. Wittkowski, et al. (2004). "Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations." Arthritis Rheum **50**(4): 1286-1295.

Foell, D., H. Wittkowski, et al. (2007). "S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules." J Leukoc Biol **81**(1): 28-37.

Friedland, I. R., M. M. Paris, et al. (1995). "The limited role of pneumolysin in the pathogenesis of pneumococcal meningitis." J Infect Dis **172**(3): 805-809.

Frosch, M., A. Strey, et al. (2000). "Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(3): 628-637.

Frosch, M., T. Vogl, et al. (2003). "Expression of myeloid-related proteins 8 and 14 in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **48**(9): 2622-2626.

Ghavami, S., M. Eshragi, et al. (2010). "S100A8/A9 induces autophagy and apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes that involves BNIP3." Cell Res **20**(3): 314-331.

Goebeler, M., J. Roth, et al. (1993). "Expression and complex assembly of calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 during differentiation of murine myelomonocytic cells." J Leukoc Biol **53**(1): 11-18.

Goebeler, M., J. Roth, et al. (1995). "Increase of calcium levels in epithelial cells induces translocation of calcium-binding proteins migration inhibitory factor-related protein 8 (MRP8) and MRP14 to keratin intermediate filaments." Biochem J **309** (Pt 2): 419-424.

Goossens, H., M. Ferech, et al. (2005). "Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study." Lancet **365**(9459): 579-587.

Grandgirard, D., K. Oberson, et al. (2010). "Attenuation of cerebrospinal fluid inflammation by the nonbacteriolytic antibiotic daptomycin versus that by ceftriaxone in experimental pneumococcal meningitis." Antimicrob Agents Chemother **54**(3): 1323-1326.

Ha, T. Y., K. A. Chang, et al. (2010). "S100a9 knockdown decreases the memory impairment and the neuropathology in Tg2576 mice, AD animal model." PLoS One **5**(1): e8840.

Hirst, R. A., B. Gosai, et al. (2008). "Streptococcus pneumoniae deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis." J Infect Dis **197**(5): 744-751.

Hirst, R. A., A. Kadioglu, et al. (2004). "The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis." Clin Exp Immunol **138**(2): 195-201.

Hoban, D. J., G. V. Doern, et al. (2001). "Worldwide Prevalence of Antimicrobial Resistance in Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Moraxella

- catarrhalis in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999." *Clinical Infectious Diseases* **32**(Supplement 2): S81-S93.
- Hobbs, J. A., R. May, et al. (2003). "Myeloid cell function in MRP-14 (S100A9) null mice." *Mol Cell Biol* **23**(7): 2564-2576.
- Hoegen, T., N. Tremel, et al. (2011). "The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release." *J Immunol* **187**(10): 5440-5451.
- Hofmann, M. A., S. Drury, et al. (1999). "RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides." *Cell* **97**(7): 889-901.
- Hohne, C., M. Wenzel, et al. (2013). "High mobility group box 1 prolongs inflammation and worsens disease in pneumococcal meningitis." *Brain* **136**(Pt 6): 1746-1759.
- Hsu, H. E., K. A. Shutt, et al. (2009). "Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis." *N Engl J Med* **360**(3): 244-256.
- Hu, S. P., C. Harrison, et al. (1996). "Induction of the chemotactic S100 protein, CP-10, in monocyte/macrophages by lipopolysaccharide." *Blood* **87**(9): 3919-3928.
- Iida, N. and G. R. Grotendorst (1990). "Cloning and sequencing of a new growth transcript from activated human monocytes: expression in leukocytes and wound tissue." *Mol Cell Biol* **10**(10): 5596-5599.
- Ikemoto, M., H. Murayama, et al. (2007). "Intrinsic function of S100A8/A9 complex as an anti-inflammatory protein in liver injury induced by lipopolysaccharide in rats." *Clin Chim Acta* **376**(1-2): 197-204.
- Ionita, M. G., A. Vink, et al. (2009). "High levels of myeloid-related protein 14 in human atherosclerotic plaques correlate with the characteristics of rupture-prone lesions." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(8): 1220-1227.
- Ishii, K. J., K. Suzuki, et al. (2001). "Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs." *J Immunol* **167**(5): 2602-2607.

Jin, Y., A. Sharma, et al. (2013). "The expression of inflammatory genes is upregulated in peripheral blood of patients with type 1 diabetes." *Diabetes Care* **36**(9): 2794-2802.

Jit, M. (2010). "The risk of sequelae due to pneumococcal meningitis in high-income countries: a systematic review and meta-analysis." *J Infect* **61**(2): 114-124.

Johnson, M. K., D. Boese-Marrazzo, et al. (1981). "Effects of pneumolysin on human polymorphonuclear leukocytes and platelets." *Infect Immun* **34**(1): 171-176.

Jones, S. C., B. Bose, et al. (1989). "CO<sub>2</sub> reactivity and heterogeneity of cerebral blood flow in ischemic, border zone, and normal cortex." *Am J Physiol* **257**(2 Pt 2): H473-482.

Kane, D., J. Roth, et al. (2003). "Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis." *Arthritis Rheum* **48**(6): 1676-1685.

Kastenbauer, S. and H. W. Pfister (2003). "Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases." *Brain* **126**(Pt 5): 1015-1025.

Kempski, O. (2001). "Cerebral edema." *Semin Nephrol* **21**(3): 303-307.

Kerkhoff, C., W. Nacken, et al. (2005). "The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2." *FASEB J* **19**(3): 467-469.

Klein, M., U. Koedel, et al. (2006). "Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy?" *Prog Neurobiol* **80**(6): 269-280.

Klein, M., B. Obermaier, et al. (2008). "Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4." *J Infect Dis* **198**(7): 1028-1036.

Klein, M., R. Paul, et al. (2006). "Protein expression pattern in experimental pneumococcal meningitis." *Microbes Infect* **8**(4): 974-983.

Kleinegger, C. L., D. C. Stoeckel, et al. (2001). "A comparison of salivary calprotectin levels in subjects with and without oral candidiasis." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **92**(1): 62-67.

Klenow, H. and I. Henningsen (1970). "Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from Escherichia coli B by limited proteolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **65**(1): 168-175.

Koedel, U. (2009). "Acute Bacterial Meningitis: Current Trends in Research and Clinical Practice."

Koedel, U., B. Angele, et al. (2003). "Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis." J Immunol **170**(1): 438-444.

Koedel, U., I. Bayerlein, et al. (2000). "Pharmacologic interference with NF-kappaB activation attenuates central nervous system complications in experimental Pneumococcal meningitis." J Infect Dis **182**(5): 1437-1445.

Koedel, U., T. Frankenberg, et al. (2009). "Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis." PLoS Pathog **5**(5): e1000461.

Koedel, U., M. Klein, et al. (2010). "Modulation of brain injury as a target of adjunctive therapy in bacterial meningitis." Curr Infect Dis Rep **12**(4): 266-273.

Koedel, U., M. Klein, et al. (2010). "New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis." Curr Opin Infect Dis **23**(3): 217-223.

Koedel, U., T. Rupprecht, et al. (2004). "MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS." Brain **127**(Pt 6): 1437-1445.

Koedel, U., W. M. Scheld, et al. (2002). "Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis." Lancet Infect Dis **2**(12): 721-736.

Kretsinger, R. H. and C. E. Nockolds (1973). "Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description." J Biol Chem **248**(9): 3313-3326.

Kummer, M. P., T. Vogl, et al. (2012). "Mrp14 deficiency ameliorates amyloid beta burden by increasing microglial phagocytosis and modulation of amyloid precursor protein processing." J Neurosci **32**(49): 17824-17829.

Lagasse, E. and R. G. Clerc (1988). "Cloning and expression of two human genes encoding calcium-binding proteins that are regulated during myeloid differentiation." Mol Cell Biol **8**(6): 2402-2410.

Leib, S. L., D. Leppert, et al. (2000). "Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis." Infect Immun **68**(2): 615-620.

Lemarchand, P., M. Vaglio, et al. (1992). "Translocation of a small cytosolic calcium-binding protein (MRP-8) to plasma membrane correlates with human neutrophil activation." J Biol Chem **267**(27): 19379-19382.

Lewis, K. (2000). "Programmed death in bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **64**(3): 503-514.

Lewit-Bentley, A. and S. Rety (2000). "EF-hand calcium-binding proteins." Curr Opin Struct Biol **10**(6): 637-643.

Limburg, P. J., D. A. Ahlquist, et al. (2000). "Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy." Am J Gastroenterol **95**(10): 2831-2837.

Lugering, N., R. Stoll, et al. (1995). "Serum 27E10 antigen: a new potential marker for staging HIV disease." Clin Exp Immunol **101**(2): 249-253.

Manitz, M. P., B. Horst, et al. (2003). "Loss of S100A9 (MRP14) results in reduced interleukin-8-induced CD11b surface expression, a polarized microfilament system, and diminished responsiveness to chemoattractants in vitro." Mol Cell Biol **23**(3): 1034-1043.

Marenholz, I., C. W. Heizmann, et al. (2004). "S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature)." Biochem Biophys Res Commun **322**(4): 1111-1122.

McCormick, M. M., F. Rahimi, et al. (2005). "S100A8 and S100A9 in human arterial wall. Implications for atherogenesis." J Biol Chem **280**(50): 41521-41529.

Mitchell, T. J., P. W. Andrew, et al. (1991). "Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein." Mol Microbiol **5**(8): 1883-1888.

Mook-Kanamori, B. B., M. Geldhoff, et al. (2011). "Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis." Clin Microbiol Rev **24**(3): 557-591.

Nacken, W., J. Roth, et al. (2003). "S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity." Microsc Res Tech **60**(6): 569-580.

Nau, R. and W. Bruck (2002). "Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy." Trends Neurosci **25**(1): 38-45.

Newton, R. A. and N. Hogg (1998). "The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils." J Immunol **160**(3): 1427-1435.

Ni, H., J. Capodici, et al. (2002). "Extracellular mRNA induces dendritic cell activation by stimulating tumor necrosis factor-alpha secretion and signaling through a nucleotide receptor." J Biol Chem **277**(15): 12689-12696.

Niederkorn, J. Y. (2006). "See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege." Nat Immunol **7**(4): 354-359.

Nisapakultorn, K., K. F. Ross, et al. (2001). "Calprotectin expression inhibits bacterial binding to mucosal epithelial cells." Infect Immun **69**(6): 3692-3696.

Odink, K., N. Cerletti, et al. (1987). "Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis." Nature **330**(6143): 80-82.

Ortega, F. J., J. M. Mercader, et al. (2013). "Targeting the association of calgranulin B (S100A9) with insulin resistance and type 2 diabetes." J Mol Med (Berl) **91**(4): 523-534.

Pachter, J. S., H. E. de Vries, et al. (2003). "The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system." J Neuropathol Exp Neurol **62**(6): 593-604.

Passey, R. J., E. Williams, et al. (1999). "A null mutation in the inflammation-associated S100 protein S100A8 causes early resorption of the mouse embryo." J Immunol **163**(4): 2209-2216.

Paulson, O. B., P. Brodersen, et al. (1974). "Regional cerebral blood flow, cerebral metabolic rate of oxygen, and cerebrospinal fluid acid-base variables in patients with acute meningitis and with acute encephalitis." Acta Med Scand **196**(3): 191-198.

Pechkovsky, D. V., O. M. Zalutskaya, et al. (2000). "Calprotectin (MRP8/14 protein complex) release during mycobacterial infection in vitro and in vivo." FEMS Immunol Med Microbiol **29**(1): 27-33.

Pelus, L. M. and S. Fukuda (2006). "Peripheral blood stem cell mobilization: the CXCR2 ligand GRObeta rapidly mobilizes hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties." Exp Hematol **34**(8): 1010-1020.

Pinas, G. E., P. R. Cortes, et al. (2008). "Acidic stress induces autolysis by a CSP-independent ComE pathway in *Streptococcus pneumoniae*." Microbiology **154**(Pt 5): 1300-1308.

Polman, C., F. Barkhof, et al. (2005). "Treatment with laquinimod reduces development of active MRI lesions in relapsing MS." Neurology **64**(6): 987-991.

Postler, E., A. Lehr, et al. (1997). "Expression of the S-100 proteins MRP-8 and -14 in ischemic brain lesions." Glia **19**(1): 27-34.

Progress in introduction of pneumococcal conjugate vaccine-worldwide, -. (2008). "Progress in introduction of pneumococcal conjugate vaccine--worldwide, 2000-2008." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **57**(42): 1148-1151.

Ramakrishnan, M., A. J. Ulland, et al. (2009). "Sequelae due to bacterial meningitis among African children: a systematic literature review." BMC Med **7**: 47.

Rammes, A., J. Roth, et al. (1997). "Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway." J Biol Chem **272**(14): 9496-9502.

Raquil, M. A., N. Añceriz, et al. (2008). "Blockade of antimicrobial proteins S100A8 and S100A9 inhibits phagocyte migration to the alveoli in streptococcal pneumonia." J Immunol **180**(5): 3366-3374.

Reiss, A., J. S. Braun, et al. (2011). "Bacterial pore-forming cytolysins induce neuronal damage in a rat model of neonatal meningitis." J Infect Dis **203**(3): 393-400.

Riva, M., E. Kallberg, et al. (2012). "Induction of nuclear factor-kappaB responses by the S100A9 protein is Toll-like receptor-4-dependent." Immunology **137**(2): 172-182.

Robinson, M. J., P. Tessier, et al. (2002). "The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells." J Biol Chem **277**(5): 3658-3665.

Roth, J., F. Burwinkel, et al. (1993). "MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner." Blood **82**(6): 1875-1883.

Ruckinger, S., M. van der Linden, et al. (2009). "Reduction in the incidence of invasive pneumococcal disease after general vaccination with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in Germany." Vaccine **27**(31): 4136-4141.

Rupprecht, T. A., B. Angele, et al. (2007). "Complement C1q and C3 are critical for the innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the central nervous system." J Immunol **178**(3): 1861-1869.

Ryckman, C., S. R. McColl, et al. (2003). "Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis." Arthritis Rheum **48**(8): 2310-2320.

Ryckman, C., K. Vandal, et al. (2003). "Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion." J Immunol **170**(6): 3233-3242.

Saukkonen, K., S. Sande, et al. (1990). "The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis." J Exp Med **171**(2): 439-448.

Scheld, W. M. (1984). "Bacterial meningitis in the patient at risk: intrinsic risk factors and host defense mechanisms." Am J Med **76**(5A): 193-207.

Scheld, W. M., R. G. Dacey, et al. (1980). "Cerebrospinal fluid outflow resistance in rabbits with experimental meningitis. Alterations with penicillin and methylprednisolone." J Clin Invest **66**(2): 243-253.

Schiopu, A. and O. S. Cotoi (2013). "S100A8 and S100A9: DAMPs at the crossroads between innate immunity, traditional risk factors, and cardiovascular disease." Mediators Inflamm **2013**: 828354.

Schluesener, H. J., P. G. Kremsner, et al. (1998). "Widespread expression of MRP8 and MRP14 in human cerebral malaria by microglial cells." Acta Neuropathol **96**(6): 575-580.

Schmidt, H., B. Heimann, et al. (2006). "Neuropsychological sequelae of bacterial and viral meningitis." Brain **129**(Pt 2): 333-345.

Schnekenburger, J., V. Schick, et al. (2008). "The calcium binding protein S100A9 is essential for pancreatic leukocyte infiltration and induces disruption of cell-cell contacts." J Cell Physiol **216**(2): 558-567.

Schuchat, A., K. Robinson, et al. (1997). "Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team." N Engl J Med **337**(14): 970-976.

Seeliger, S., T. Vogl, et al. (2003). "Expression of calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 in inflammatory muscle diseases." Am J Pathol **163**(3): 947-956.

Shi, Y., J. E. Evans, et al. (2003). "Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells." Nature **425**(6957): 516-521.

Simard, J. C., D. Girard, et al. (2010). "Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism." J Leukoc Biol **87**(5): 905-914.

Simard, J. C., M. M. Simon, et al. (2011). "Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis." J Immunol **186**(6): 3622-3631.

Sohnle, P. G., M. J. Hunter, et al. (2000). "Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14)." J Infect Dis **182**(4): 1272-1275.

Spreer, A., H. Kerstan, et al. (2003). "Reduced release of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxone." Antimicrob Agents Chemother **47**(8): 2649-2654.

Srikrishna, G., K. Panneerselvam, et al. (2001). "Two proteins modulating transendothelial migration of leukocytes recognize novel carboxylated glycans on endothelial cells." J Immunol **166**(7): 4678-4688.

Sroussi, H. Y., Y. Lu, et al. (2010). "S100A8 and S100A9 inhibit neutrophil oxidative metabolism in-vitro: involvement of adenosine metabolites." Free Radic Res **44**(4): 389-396.

Steinbakk, M., C. F. Naess-Andresen, et al. (1990). "Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin." Lancet **336**(8718): 763-765.

Strasser, F., P. L. Gowland, et al. (1997). "Elevated serum macrophage inhibitory factor-related protein (MRP) 8/14 levels in advanced HIV infection and during disease exacerbation." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **16**(4): 230-238.

Stucki, A., M. Cottagnoud, et al. (2007). "Daptomycin produces an enhanced bactericidal activity compared to ceftriaxone, measured by [<sup>3</sup>H]choline release in the cerebrospinal fluid, in experimental meningitis due to a penicillin-resistant pneumococcal strain without lysing its cell wall." Antimicrob Agents Chemother **51**(6): 2249-2252.

Sunahori, K., M. Yamamura, et al. (2006). "The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear

factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **8**(3): R69.

Thigpen, M. C., C. G. Whitney, et al. (2011). "Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007." N Engl J Med **364**(21): 2016-2025.

Thjodleifsson, B., G. Sigthorsson, et al. (2003). "Subclinical intestinal inflammation: an inherited abnormality in Crohn's disease relatives?" Gastroenterology **124**(7): 1728-1737.

Toomey, J. and F. Roach (1939). "Pneumococcal meningitis." Ohio State M J: 35: 841ff.

Tsuchiya, K., K. Toyama, et al. (2007). "Pneumococcal peptidoglycan-polysaccharides induce the expression of interleukin-8 in airway epithelial cells by way of nuclear factor-kappaB, nuclear factor interleukin-6, or activation protein-1 dependent mechanisms." Laryngoscope **117**(1): 86-91.

Tuomanen, E., H. Liu, et al. (1985). "The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall." J Infect Dis **151**(5): 859-868.

Tyler, K. L. (2010). "Chapter 28: a history of bacterial meningitis." Handb Clin Neurol **95**: 417-433.

Urban, C. F., D. Ermert, et al. (2009). "Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*." PLoS Pathog **5**(10): e1000639.

van de Beek, D., J. de Gans, et al. (2004). "Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis." N Engl J Med **351**(18): 1849-1859.

van de Sande-Bruinsma, N., H. Grundmann, et al. (2008). "Antimicrobial drug use and resistance in Europe." Emerg Infect Dis **14**(11): 1722-1730.

van den Bos, C., J. Roth, et al. (1996). "Phosphorylation of MRP14, an S100 protein expressed during monocytic differentiation, modulates Ca(2+)-dependent translocation from cytoplasm to membranes and cytoskeleton." J Immunol **156**(3): 1247-1254.

van Zoelen, M. A., T. Vogl, et al. (2009). "Expression and role of myeloid-related protein-14 in clinical and experimental sepsis." Am J Respir Crit Care Med **180**(11): 1098-1106.

Viemann, D., K. Barczyk, et al. (2007). "MRP8/MRP14 impairs endothelial integrity and induces a caspase-dependent and -independent cell death program." Blood **109**(6): 2453-2460.

Viemann, D., A. Strey, et al. (2005). "Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells." Blood **105**(7): 2955-2962.

Voganatsi, A., A. Panyutich, et al. (2001). "Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex." J Leukoc Biol **70**(1): 130-134.

Vogl, T., S. Ludwig, et al. (2004). "MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes." Blood **104**(13): 4260-4268.

Vogl, T., K. Tenbrock, et al. (2007). "Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock." Nat Med **13**(9): 1042-1049.

Wall, E. C., S. B. Gordon, et al. (2012). "Persistence of pneumolysin in the cerebrospinal fluid of patients with pneumococcal meningitis is associated with mortality." Clin Infect Dis **54**(5): 701-705.

Wang, G. G., K. R. Calvo, et al. (2006). "Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8." Nat Methods **3**(4): 287-293.

Weber, J. R. and E. I. Tuomanen (2007). "Cellular damage in bacterial meningitis: an interplay of bacterial and host driven toxicity." J Neuroimmunol **184**(1-2): 45-52.

Wellmer, A., G. Zysk, et al. (2002). "Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of *Streptococcus pneumoniae* in murine meningitis." Infect Immun **70**(11): 6504-6508.

Woehrl, B., M. C. Brouwer, et al. (2011). "Complement component 5 contributes to poor disease outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis." J Clin Invest **121**(10): 3943-3953.

Wolpe, S. D., B. Sherry, et al. (1989). "Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(2): 612-616.

Wulffraat, N. M., P. J. Haas, et al. (2003). "Myeloid related protein 8 and 14 secretion reflects phagocyte activation and correlates with disease activity in juvenile idiopathic arthritis treated with autologous stem cell transplantation." Ann Rheum Dis **62**(3): 236-241.

Zwadlo, G., J. Bruggen, et al. (1988). "Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues." Clin Exp Immunol **72**(3): 510-515.

Zysk, G., L. Bejo, et al. (2000). "Induction of necrosis and apoptosis of neutrophil granulocytes by Streptococcus pneumoniae." Clin Exp Immunol **122**(1): 61-66.

Zysk, G., B. K. Schneider-Wald, et al. (2001). "Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by Streptococcus pneumoniae." Infect Immun **69**(2): 845-852.

## **10. Danksagung**

Herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Uwe Ködel für die Überlassung des Themas dieser Dissertation. Im Besonderen möchte ich ihm danken für seine persönlichen Betreuung, die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und Erstellung dieser Arbeit, sowie unzählige wertvolle Anregungen und Antworten auf meine Fragen. Großer Dank gilt auch Frau Barbara Angele, die sich viel Zeit und Geduld nahm mir wesentliche labortechnische Methoden zu vermitteln und bei Problemen im Laboralltag immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Herrn Prof. Dr. Hans-Walter Pfister möchte ich ganz herzlich danken für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Neuroinfektiologischen Labor durchzuführen. Mein Dank gilt auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihre Hilfe und das angenehme Arbeitsklima.

Ebenso danken möchte ich meinen Mitdoktoranden, die mir wesentliche Methoden beigebracht und viele Fragen bereitwillig beantwortet haben.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Armin Giese und Frau Angelika Henn vom Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU München für die Einbettung von Hirnschnitten und immunhistochemische Färbungen. Des Weiteren bedanke ich mich bei PD Dr. Thomas Vogl vom Institut für Immunologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, der uns die S100A8/A9-Antikörper und S100A9-defizienten Mäuse überließ, die S100A8/A9-ELISAs durchführte und immer als wertvoller Diskussionspartner zur Verfügung stand. Prof. Dr. Tomas Leanderson von der Universität Lund danke ich dafür, dass er den S100A9-Antagonisten Paquinimod zur Verfügung stellte. Besonderer Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Sperandio vom Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der LMU München, Frau Monika Prünster, PhD und Frau Susanne Bierschenk für die überlassene Präparationsanleitung zu den primären murinen Knochenmarkszellen.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt von der Abteilung Genetik der Mikroorganismen der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald der zuverlässig die benötigten Bakterienstämme zur Verfügung stellte, sowie Hans Häcker, MD, PhD vom Institut für Infektionskrankheiten des St. Jude Children's Research Hospital Memphis für die überlassenen Hoxb8-Zellen. Außerdem möchte ich Herrn Christian Ostergaard, MD, PhD vom Institut für Klinische Mikrobiologie des Universitätskrankenhauses Kopenhagen für die zur Verfügung gestellten Liquorproben von Patienten mit Pneumokokkenmeningitis danken.

Vielen Dank ganz besonders an meine Eltern, die mir das Studium ermöglichten. Dank gilt insbesondere meiner Mutter, sowie meiner gesamten Familie, für ihre Unterstützung, die Hilfe in jeder Situation und den Glauben an mich.

## **11. Eidesstattliche Versicherung**

**Wache, Christina**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Rolle von S100A8/A9 in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**München, 16.02.2015**

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand