

Diplomarbeit

**Plasmalogenderivate als Biomarker bei Entzündlichen
Erkrankungen des Zentralen Nervensystems**

eingereicht von

Marcel Hack

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Neurologie

Medizinische Universität Graz

unter der Anleitung von

Ass.-Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. PhD. Michael Khalil

und

Priv.Doiz. Dr.med.univ. Thomas Seifert-Held

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 17.06.2016

Marcel Hack eh

Danksagungen

Hier seien in erster Linie meine beiden Betreuer, Michael Khalil und Thomas Seifert-Held, erwähnt, die mir bei der Verfassung dieser Arbeit zur Seite standen. Darüber hinaus möchte ich Herrn Professor Wolfgang Sattler vom Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Medizinischen Universität Graz für die Bereitstellung der Messergebnisse meinen Dank aussprechen.

Mein ganz persönlicher Dank gilt außerdem meiner Mutter, Beatrix und meinem Vater, Wolfgang – beide haben mich durch mein gesamtes Medizinstudium hindurch geduldig mit Wort und Tat unterstützt.

Zuletzt will ich noch Claudia, meine Freundin, an dieser Stelle würdigen – sie hat meine mentale Intaktheit während der Erstellung dieser Arbeit mit großen Mengen an Zuwendung und Kaffee gesichert.

Zusammenfassung

Einleitung: Entzündungen des zentralen Nervensystems (ZNS) unterscheiden sich stark in Hinblick auf zelluläre und humorale Prozesse. Insbesondere infektiöse Erkrankungen weisen ein breites pathophysiologisches Spektrum auf, wobei jeder Erreger jeweils andere Kaskaden löst. Allerdings ist allen Entzündungen im ZNS eine Aktivierung Neutrophiler Granulozyten gemein, welche sich unter anderem des Enzyms Myeloperoxidase (MPO) bedienen, um schädliche Mikroorganismen abzutöten. Die MPO greift auch Plasmalogene an, eine besondere Gattung von Glycerophospholipiden, welche im gesamten menschlichen Körper als Teil zellulärer und subzellulärer Membranen zu finden ist, jedoch in besonders hohen Konzentrationen in der weißen Substanz des ZNS auftritt. Ein solcher Angriff führt zur Bildung chlorierter Plasmalogenderivate, was eine Eignung derselben (z.B. 2-Chloradipinsäure, 2ClAdA) zum Biomarker für entzündliche Prozesse plausibel erscheinen lässt.

Methoden: Liquor- und dazu korrespondierende Serumproben von 42 Patienten und Patientinnen wurden aus dem Liquorlager des Universitätsklinikums für Neurologie, Medizinische Universität Graz, gesammelt. Sämtliche Liquorproben wurden von 2006 bis 2013 mittels diagnostischer Lumbalpunktion akquiriert. Parallel dazu wurden Serumproben genommen. Die Proben wurden in die zwei Kategorien entzündlich (n=22) und nichtentzündlich (n=20) eingeteilt. Eine Zellzahl von >4 Zellen/ μ l im Liquor wurde als Kriterium herangezogen. Klinische Daten wie Liquorbefunde, Verdachtsdiagnose, Enddiagnose, Serumparameter, Medikation und Vorerkrankungen wurden retrospektiv erhoben. Die Konzentrationen von 2-ClAdA wurden am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Medizinischen Universität Graz mittels negativer Chemischer Ionisations-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (NCI-GC-MS) gemessen.

Ergebnisse: Die Konzentrationen von 2-ClAdA waren im Serum höher als im Liquor. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich des 2-ClAdA-Index (I(2ClAdA)) ($p < 0,001$). I(2ClAdA) korrelierte außerdem signifikant mit etablierten Entzündungsparametern des Liquors, wie etwa Zellzahl ($r = -0,538$; $p < 0,001$), Laktatkonzentration ($r = -0,390$; $p < 0,05$), IgM-Index ($r = -0,539$; $p < 0,001$) und IgA-Index ($r = -0,480$; $p < 0,01$)

Diskussion: Unsere Ergebnisse deuten daraufhin, dass I(2ClAdA) zur Detektion von entzündlichen Prozessen im zentralen Nervensystem nützlich sein könnte. Es wird jedoch noch weiterer Forschung bedürfen, um diese Resultate abzusichern.

Abstract

Introduction: There is wide variety in cytokine expression patterns and cellular contributions to inflammation in the central nervous system (CNS). Especially infectious diseases of the brain and its coverings are characterized by a wide range of pathophysiological processes that are individually induced by different infectious agents. However, inflammation in the CNS always more or less leads to activation of neutrophil granulocytes, which utilize Myeloperoxidase (MPO) to eliminate harmful microorganisms. MPO also attacks plasmalogens, a species of glycerophospholipids that are basically abundant throughout the whole body, being part of cellular and subcellular membranes, but occurring particularly concentrated in the white matter of the CNS. This attack leads to formation of chlorinated derivatives of plasmalogens. Therefore it stands to reason, that such chlorinated derivatives (e.g. 2-chloroadipic acid, 2-ClAdA) could be useful biomarkers to detect inflammation.

Methods: Serum and cerebrospinal fluid (CSF) samples were acquired from 42 patients. They had previously been stored at the Clinical Department of Neurology, Medical University of Graz, Austria. All patients had undergone diagnostic lumbar puncture from years 2006 to 2013 and matching serum samples had been taken as well. The samples were divided into two groups, one inflammatory (n=22) and one non-inflammatory (n=20). A cell count of >4 cells/ μ l was used as criterion for the inflammatory group. Clinical data was gathered retrospectively, including routine parameters of CSF diagnostics, suspected diagnosis, definitive diagnosis, serum parameters, medication and previous diseases. The concentrations of 2-ClAdA were measured at the Institute for Molecular Biology and Biochemistry, Medical University of Graz by means of negative chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry (NCI-GC-MS).

Results: Concentrations of 2-ClAdA were higher in serum than in CSF. The index for 2-ClAdA (I(2ClAdA)) was significantly different ($p < 0,001$) between groups. It also significantly correlated with established parameters of inflammation in the CSF, such as cell count ($r = -0,538$; $p < 0,001$), concentration of lactate ($r = -0,390$; $p < 0,05$), IgM index ($r = -0,539$; $p < 0,001$) and IgA index ($r = -0,480$; $p < 0,01$).

Discussion: Our findings point towards a possible usefulness of 2-ClAdA as a biomarker for inflammation of the CNS. Further investigation into the subject will be necessary to consolidate our results.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Möglichkeiten der Entzündung im zentralen Nervensystem | 1 |
| 1.1.1 | Autoimmunologische Entzündungen..... | 1 |
| 1.1.2 | Entzündliche Komponenten neurodegenerativer Erkrankungen | 3 |
| 1.1.3 | Posttraumatisch persistierende entzündliche Prozesse | 4 |
| 1.1.4 | Entzündliche Prozesse bei neurovaskulären Erkrankungen..... | 4 |
| 1.1.5 | Infektiöse Entzündungen | 5 |
| 1.2 | Übersicht der Infektiösen Meningitiden und Enzephalitiden..... | 6 |
| 1.2.1 | Bakterielle Entzündungen von Hirn und Meningen | 6 |
| 1.2.1 | Virale Entzündungen von Hirn und Meningen | 12 |
| 1.2.2 | Durch Spirochäten verursachte Entzündungen von Hirn und Meningen | 18 |
| 1.2.3 | Durch Mykobakterien verursachte Entzündungen von Hirn und Meningen | 20 |
| 1.2.4 | Durch Pilze verursachte Entzündungen von Hirn und Meningen | 22 |
| 1.2.5 | Durch Parasiten verursachte Entzündungen von Hirn und Meningen | 23 |
| 1.3 | Liquordiagnostik der Infektiösen Meningitiden und Enzephalitiden..... | 25 |
| 1.3.1 | Das 4-Kompartimente-Modell | 25 |
| 1.3.2 | Makroskopische Beurteilung des Liquors..... | 26 |
| 1.3.3 | Zellzahl und Zellbild | 26 |
| 1.3.4 | Glucose und Lactat..... | 28 |
| 1.3.5 | Eiweiß..... | 28 |
| 1.3.6 | Zusätzliche Parameter..... | 29 |
| 1.4 | Plasmalogene..... | 30 |
| 1.4.1 | Definition und prototypische Struktur | 30 |
| 1.4.2 | Verteilung im menschlichen Organismus | 30 |
| 1.4.3 | Synthese | 31 |
| 1.4.4 | Funktionen..... | 31 |
| 1.4.5 | Chlorierte Derivate..... | 34 |
| 2 | Material und Methoden | 36 |
| 2.1 | Kohorte | 36 |
| 2.2 | Klinische Daten..... | 37 |

| | | |
|-----|--|----|
| 2.3 | Proben | 37 |
| 2.4 | Messung | 38 |
| 2.5 | Statistische Auswertung | 39 |
| 3 | Ergebnisse | 40 |
| 3.1 | 2-CIAdA-Konzentrationen in Serum und Liquor und abgeleitete Parameter..... | 40 |
| 3.2 | Korrelationen zwischen I(2CIAdA) und Routineliquorparametern... | 41 |
| 4 | Diskussion | 43 |
| 4.1 | Entstehung von 2-CIAdA im Rahmen von Entzündung..... | 43 |
| 4.2 | 2-CIAdA-Konzentrationen in Serum und Liquor und abgeleitete Parameter..... | 43 |
| 4.3 | Zusammenfassung und Ausblick | 44 |
| 5 | Literaturverzeichnis | 46 |

Glossar und Abkürzungen

| | |
|---------------|---|
| 2-ClAdA | 2-Chloradipinsäure |
| 2-ClHA | 2-Chlorohexadecansäure |
| 2-ClHDA | 2-Chlorohexadecanal |
| 2-CITDDA | 2-Chloro-1,14-Tetradecandisäure |
| AD | Alzheimer'sche Erkrankung (Alzheimer's Disease) |
| ADEM | akute disseminierte Enzephalomyelitis |
| ALS | amyotrophe Lateralsklerose |
| ANI | Asymptomatische neurokognitive Beeinträchtigung (asymptomatic neurocognitive impairment) |
| App | Adhäsions- und Penetrationsprotein (adhesion and penetration protein) |
| AQP4 | Aquaporin 4 |
| BDG | 1,3-beta-d-Glucan |
| BMEC | Endothelzellen der Mikrovaskulatur des Gehirns (brain microvascular endothelial cells) |
| CbpA,E | Cholinbindendes Protein A,E (choline binding protein A,E) |
| CEACAM | karzinoembryonisches Antigen-assoziiertes Zell-Adhäsionsmolekül (carcinoembryonic antigen-related cell-adhesion molecule) |
| ChoP | Phosphorylcholin |
| COX2 | Cyclooxygenase 2 |
| FSME | Frühsommermeningoenzephalitis |
| HAD | HIV-assoziierte Demenz |
| HAND | HIV-assoziiertes neurokognitives Defizit (HIV-associated neurocognitive disorder) |
| Hib | Haemophilus Influenzae b |
| HIV | humanes Immundefizienzvirus |
| HIVE | HIV-Enzephalitis |
| HMW | Adhäsion mit hohem Molekulargewicht (high-molecular-weight-adhesine) |
| hpIgR | humaner polymerischer Immunglobulinrezeptor (human polymeric immunoglobulin receptor) |
| HSPG | Heparansulfatproteoglykane |
| HSV-1,2 | Herpes Simplex Virus 1,2 |
| IFN- γ | Interferon gamma |

| | |
|---------------|--|
| IL | Interleukin |
| IP-10 | durch Interferon induzierbares Protein 10 (interferon inducible protein 10) |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MCP-1 | Monozyten anlockendes Protein 1 (monocyte chemoattractant protein 1) |
| MIP-1 β | entzündliches Makrophagenprotein 1 beta (macrophage inflammatory protein 1 beta) |
| MND | mildes neurokognitives Defizit (mild neurocognitive disorder) |
| MS | multiple Sklerose |
| NadA | Neisseria-Adhäsion A (neisserial adhesine A) |
| NCAM | neurales Zelladhäsionsmolekül (neural cell-adhesion molecule) |
| NhhA | Neisseria hia Homolog A (Neisseria hia homologue A) |
| NLRP3 | nod-ähnliches Rezeptorprotein 3 (nod like receptor protein 3) |
| NMO | Neuromyelitis Optica |
| Op a,c | Opazitäts-Protein a,c (opacity protein a,c) |
| PAF | Plättchen aktivierender Faktor |
| PGE-2 | Prostaglandin E2 |
| PPMS | primär progrediente multiple Sklerose |
| Q(2-ClAdA) | 2-Chloradipinsäurequotient |
| Q(Alb) | Albuminquotient |
| RANTES | bei Aktivierung reguliert, normal T-exprimiert und sezerniert (regulated on activation, normal T-expressed and secreted) |
| ROS | radikale/reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species) |
| RRMS | schubförmige multiple Sklerose (relapsing remitting multiple sclerosis) |
| SMON | Subakute Myeloptikoneuropathie |
| sPLA2 | plasmalogenselektive Phospholipase A2 |
| SPMS | sekundär progrediente multiple Sklerose |
| SSPE | subakut sklerosierende Panenzephalitis |
| TLR | toll-like receptor |
| TNF- α | Tumor-Nekrose-Faktor Alpha |
| TRAIL | Tumor-Nekrose-Faktor assoziierter Apoptose induzierender Ligand (TNF-related apoptosis-inducing ligand) |
| VZV | Varizella-Zoster-Virus |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Darstellung der Kohortenzusammensetzung in einem Flussdiagramm..... | 36 |
| Abbildung 2: Vergleich der beiden Gruppen bezüglich I(2ClAdA)..... | 41 |
| Abbildung 3: Korrelation von I(2ClAdA) mit der Zellzahl im Liquor..... | 41 |
| Abbildung 4: Korrelation des 2-ClAdA-Index mit IgA-(A) und IgM-Index (B). | 42 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Aufschlüsselung der Kohorte nach Diagnosen und Zellbildern..... | 37 |
| Tabelle 2: Übersicht der Kohorte nach demographischen Faktoren, Liquorbefunden und unseren Messergebnissen. | 40 |

1 Einleitung

1.1 Möglichkeiten der Entzündung im zentralen Nervensystem

1.1.1 Autoimmunologische Entzündungen

Als autoimmunologisch bedingt werden solche Entzündung betrachtet, die durch eine pathologische Reaktion der körpereigenen Leukozyten gegen den Organismus, dem sie innewohnen, getragen werden. (1) Im Nervensystem wird eine Reihe verschiedener Entitäten dieser Art unterschieden.

1.1.1.1 Demyelinisierende Erkrankungen

Diese umfassen die Multiple Sklerose (auch als Encephalitis Disseminata bezeichnet, MS), die Retrobulbärneuritis, sowie die Neuromyelitis Optica nach Devic (NMO), nebst einigen anderen Erkrankungen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, wie der akuten disseminierten Encephalitis (ADEM), der subakuten Myelooptikoneuropathie (SMON), der diffusen Sklerose nach Schilder und der konzentrischen Sklerose nach Baló. (2) Ihnen allen ist gemein, dass das Myelin der zentralen Nervenscheiden einer entzündlichen Zerstörung anheimfällt.

Bedeutendste Vertreterin dieser Gruppe ist die MS mit einer Prävalenz von 98,5/100.000 Einwohnern in Österreich. (3) Sie manifestiert sich meistens zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. (4)

Man unterscheidet je nach Krankheitsverlauf verschiedene Formen. Die häufigste Form ist die schubförmige MS (Relapsing Remitting Multiple Sclerosis, RRMS), welche im Verlauf meist in die sekundär progrediente Form (SPMS) übergeht. Primär progrediente Verläufe (PPMS) machen 10-15% der MS-Erkrankungen aus. (5)

Pathophysiologisch kommt es bei der RRMS zu einer Infiltration insbesondere der weißen Substanz durch CD8-positive T-Zellen, die sich in umschriebenen Arealen perivaskulär sammeln. Makroskopisch imponieren diese Läsionen als Plaques. Neben T-Zellen finden sich darin auch Makrophagen, sowie wenige B- und Plasmazellen, wobei neuere Befunde Anlass zur Definition einer komplexeren Klassifikation gegeben haben. Demnach werden vier verschiedene pathologische Muster unterschieden. (6) Es gibt außerdem Hinweise, dass die Entzündung zumindest teilweise durch B-Zellen und humorale Faktoren in relevanten Ausmaßen amplifiziert wird. Mit dem Übergang zur SPMS übernimmt schließlich die angeborene Abwehr die Oberhand, sodass der Mikroglia hier eine wichtige Funktion zukommt. (5)

Bezüglich der Ätiologie der MS besteht keine Klarheit. Keine einzelne Substanz kann bislang als Ziel des autoimmunologischen Angriffes ausgemacht werden. Stattdessen gibt es eine Vielzahl beschriebener Myeloproteine und anderer Moleküle, welche als Antigene in Frage kommen und nebst immunologischen Faktoren in variabler Weise zur Pathophysiologie der Erkrankung beitragen. (6) Auch warum es überhaupt zum Ausbruch der Krankheit kommt, ist noch Gegenstand der wissenschaftlichen Debatte. Insbesondere eine virale Infektion auf Basis genetischer Prädisposition wird diskutiert, wobei das Epstein-Barr-Virus im Zentrum der Aufmerksamkeit steht. Die Daten hierzu sind jedoch widersprüchlich. (7)

Lange Zeit wurde die NMO für eine spezielle Verlaufsform der MS gehalten. Mittlerweile ist sie jedoch als eigenständige Krankheitsentität etabliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen Aquaporin 4 (AQP 4), einem Porenprotein, welches hauptsächlich an Astrozyten exprimiert wird, deutlich mit der Krankheit korreliert. Darüber hinaus zeigen Fluktuationen der Titer Veränderungen der Krankheitsaktivität an. (8) Pathogenes Potential entfalten die Antikörper selbst aber nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Komplementfaktoren oder einer vorbestehenden Entzündung. In Zentren der Krankheitsaktivität, welche in Analogie zur MS als Plaques auftreten, finden sich vorwiegend Vertreter der angeborenen Immunabwehr, wie Makrophagen und Granulozyten. Ebenso können Nekrosen und Höhlenbildung beobachtet werden, wobei zunächst insbesondere Astrozyten attackiert und destruiert werden. (9)

Eine sichere Krankheitsursache kann für die NMO noch nicht festgestellt werden. Auffällig ist allerdings, dass sie häufig mit anderen Autoimmunerkrankungen vergesellschaftet ist. Es wird ein genetischer Rahmen angenommen, innerhalb dessen dann eine Infektion oder eine Paraneoplasie die eigentliche Krankheit auslöst. (9)

1.1.1.2 Autoimmunenzephalitiden

Diese können in mehrere Gruppen eingeteilt werden, wobei die Lokalisation des eigentlichen Antigens zur Differenzierung herangezogen wird.

Antikörper gegen intrazelluläre Strukturen richten sich gegen die Proteine Hu, Ma2, Ri, Yo, PCA-2, ANNA-3, CRMP-5 und entfalten selbst keine krankheitserzeugende Wirkung. Stattdessen werden T-Zell-vermittelte Angriffe auf Nervenzellen, welche dadurch zugrunde gehen, verantwortlich gemacht. Die Prognose ist als schlecht einzuschätzen. In dieser Gruppe zeigt sich darüber hinaus eine deutliche Assoziation mit Tumoren, sodass auch von paraneoplastischen Syndromen die Rede ist. (10,11)

An der Zelloberfläche scheinen insbesondere NMDA-Rezeptoren, die Proteine DPPX und Caspr2, AMPA-, GABA-A-, GABA-B-Rezeptoren, die metabotropen Glutamatrezeptoren 1 und 5 (mGluR1 und mGluR5), sowie der DNE- und der Glycin-Rezeptor bevorzugte Ziele von Autoantikörpern zu sein. (10) Die Symptome dieser Gruppe sind vergleichbar mit pharmakologisch verursachten Fehlfunktionen der entsprechenden Moleküle. (11) Die durch NMDA-Rezeptor-Autoantikörper definierte Enzephalitis soll stellvertretend als gut erforschte Entität herausgegriffen werden. Bei dieser kommt es zu diversen psychiatrischen und motorischen Symptomen, welche allesamt eine starke Korrelation mit den Antikörpertitern aufweisen. Im Tierversuch konnte nachgewiesen werden, dass die Antikörper selbst an einer extrazellulären Domäne der NMDA-Rezeptoren binden und zu einer vorübergehenden Verminderung derselben an postsynaptischen, dendritischen Membranen führen. (12)

Daneben kommen noch Antikörper gegen intrazelluläre, synaptische Proteine in Frage, die sich an GAD 65 und Amphiphysin anlagern. (10,13) Sie zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Bindungsstellen im Rahmen von Prozessen des synaptischen Membranverkehrs Antikörpern zugänglich werden. Bezüglich ihrer Pathophysiologie wird vermutet, dass sowohl die Antikörper selbst, als auch T-Zellen bedeutende Rollen einnehmen. (11)

1.1.2 Entzündliche Komponenten neurodegenerativer Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen sind durch den mehr oder minder spontanen Untergang von Nervenzellen im Hirn gekennzeichnet. Zu ihnen zählen dementielle Syndrome wie die Alzheimer-Krankheit (AD) oder die frontotemporale Demenz, aber auch vorwiegend motorische Erkrankungen wie der Morbus Parkinson oder die amyotrophe Lateralsklerose (ALS). (2)

Zunehmend stellt sich heraus, dass entzündliche Prozesse einen deutlichen Beitrag zur Krankheitsprogredienz leisten. (14,15) So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine Reihe von Zytokinen bei der AD in den typischer Weise betroffenen Hirnregionen deutlich hochreguliert werden, begleitet von einer mikroglialen Aktivierung und der Ansammlung von Astrozyten. Als Stimulus dürften Konglomerate von Amyloid-Beta dienen, welche sich für gewöhnlich im Hirn von Alzheimerkranken finden und eines der prominentesten pathohistologischen Merkmale dieser Demenzform darstellen. (14) Umgekehrt scheinen neuroinflammatorische Prozesse die Akkumulation von intrazellulären Proteinen durch eine Störung der Proteasomenfunktion zu begünstigen. (16)

Dementsprechend könnten sich zukünftige Therapieoptionen ergeben, die auf antiphlogistischen Mechanismen basieren. Eine mögliche Krankheitsverlangsamung durch Nichtsteroidale Antirheumatika bei AD wird jedenfalls bereits diskutiert. (14)

1.1.3 Posttraumatisch persistierende entzündliche Prozesse

Selbst milde Schädel-Hirn-Traumata können relativ ausgeprägte Spätfolgen und Sekundärkomplikationen haben, die auch lange nach dem eigentlichen Ereignis noch persistieren, bzw. progredient bleiben. Dafür verantwortlich werden neuroinflammatorische Prozesse im Gefolge der anfänglichen Primärverletzung gemacht. (17)

Eine Besonderheit traumatisch induzierter Neuroinflammation besteht darin, dass periphere Leukozyten aufgrund einer Störung der Blut-Hirn-Schranke rekrutiert werden können und dann selbst wiederum amplifizierend wirken. Ansonsten steht die Microglia als zelluläre Steuereinheit der Entzündung im Mittelpunkt und kann sowohl protektive, als auch schädigende und zytotoxische Mechanismen in Gang setzen. (17)

In der Akutphase des Traumas scheint es noch zu keiner Aktivierung der Microglia zu kommen. Stattdessen entspinnt sich die Neuroinflammation in der subakuten Phase. Im Rahmen dessen kommt es zu einer Zerstörung von Axonen mit einem von traumatischen Axonopathien unterscheidbaren Muster, wobei insbesondere das Corpus Callosum betroffen ist. Diese pathohistologische Morphe konnte bei einer Testperson 18 Jahre nach dem eigentlichen Trauma festgestellt werden, was die ausgesprochene Langlebigkeit der Neuroinflammation unterstreicht. (18) Darüber hinaus findet eine überregionale Stimulation von Microglia mit nachfolgenden Pathologien statt. (18,19)

Möglicherweise lassen sich die auffälligen Sekundärkomplikationen nach traumatischen Hirnverletzungen durch eine persistente Neuroinflammation erklären. (17)

1.1.4 Entzündliche Prozesse bei neurovaskulären Erkrankungen

Ischämien des Gehirns sind begleitet von entzündlichen Antworten auf den entstandenen Schaden. Die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke steigt durch den Zerfall der Tight-Junctions und so sind nun auch Leukozyten aus der peripheren Zirkulation in der Lage, ins Parenchym des Gehirns einzudringen. Dementsprechend wird diese Form der Neuroinflammation sowohl von der gewebständigen Microglia, wie auch von gerade erst migrierten Makrophagen, T-Zellen und neutrophilen Granulozyten getragen. (20) Letztere invadieren bereits 30 Minuten nach Eintritt der Ischämie das Gewebe. Ihre Aktivität

erreicht einen Gipfel nach einem bis drei Tagen und flaut dann zügig wieder ab. Die Reaktion der Microglia kann dafür wochenlang bestehen bleiben. (21)

Auch im erwachsenen Gehirn kann eine relevante Neuentstehung von Neuronen aus Vorläuferzellen (Neurogenese) nachgewiesen werden, wobei bestimmte Zentren, wie der Hippocampus, von besonderer Relevanz zu sein scheinen. Ob sich daraus tatsächlich Heilungsmöglichkeiten ergeben, ist noch umstritten. Ebenso scheint der Effekt von Neuroinflammation auf die Neurogenese widersprüchlich. Einerseits besteht er in einer deutlichen Hemmung, andererseits in einer Steigerung, wobei unterschiedliche Zellinteraktionen und Zytokinexpressionsmuster offenbar ausschlaggebend sind. So kann etwa festgestellt werden, dass eine kurzzeitige Aktivierung der Microglia einer Neubildung von Nervenzellen eher entgegensteht, während eine länger währende Stimulation diese sogar fördert. Nach Schlaganfällen kommt es darüber hinaus zum Auftauchen eines besonderen Subtyps von Microglia, der neurotrophe Mediatoren zu sezernieren im Stande ist. (20)

Tierversuche weisen die Neuroinflammation bereits als mögliches Ziel neuer therapeutischer Ansätze aus, wenngleich in klinischen Studien noch kein zufriedenstellender Effekt erreicht werden konnte. (21)

1.1.5 Infektiöse Entzündungen

Mit infektiösen Entzündungen sind solche gemeint, die durch die Präsenz eines fremden Mikroorganismus oder eines zur Ansteckung fähigen Proteinpartikels ausgelöst werden. In Frage kommen daher Bakterien, Mykobakterien, Pilze, Viren, Parasiten und sogenannte Prionen (proteinacious infectious particles). (22)

Man unterscheidet nach anatomischer Lokalisation eine Entzündung der Hirnhäute (Meningitis), wobei Pia Mater, Arachnoidea Mater und Liquorräume betroffen sind, von einer diffusen Inflammation des Hirnparenchyms (Enzephalitis). Bestehen beide Entitäten nebeneinander, so wird von einer Meningoenzephalitis gesprochen. (23)

Da der infektiöse Entzündungsmodus den Fokus dieser Arbeit darstellt, ist ihm das gesamte nächste Kapitel gewidmet.

1.2 Übersicht der Infektiösen Meningitiden und Enzephalitiden

1.2.1 Bakterielle Entzündungen von Hirn und Meningen

1.2.1.1 Erregerspektrum

Wichtigste Meningitiserreger bei Erwachsenen sind im Mitteleuropäischen Raum *Neisseria Meningitidis*, *Streptococcus Pneumoniae* und *Haemophilus Influenzae*, wobei letzterer aufgrund des mittlerweile verfügbaren Impfstoffes erheblich an Bedeutung verloren hat. (24,25) Daneben treten noch *Escherichia Coli*, *Streptococcus Agalactiae* (Gruppe B Streptokokken), nicht-typhoide Salmonellen, *Listeria Monocytogenes* und, insbesondere in Afrika, *Streptococcus Suis* auf, welcher von Tier zu Mensch übertragen wird. (25) Aufgrund der recht uniformen Mechanismen der bakteriellen Meningitis sollen in diesem Kapitel die pathophysiologischen Mechanismen genauer dargestellt werden.

1.2.1.2 Pathophysiologie

Prinzipiell gibt es drei Wege, auf denen Bakterien das Gehirn und seine Häute erreichen können: auf dem Blutweg (hämatogen), durch Fortleitung bei regionalen Entzündungen wie der Otitis Media (per continuitatem) oder durch direkte Einbringung im Rahmen von Schädel-Hirn-Verletzungen mit Eröffnung der Dura, bzw. neurochirurgischen Eingriffen. Letztere beide Eintrittswege sollten klinisch auszumachen sein. (1,24) Die hämatogene Invasion gestaltet sich dagegen deutlich komplexer. Dieser geht eine asymptomatische Besiedelung respiratorischer Schleimhäute voran. (24,25)

1.2.1.2.1 Mechanismen der Besiedelung

Streptococcus Pneumoniae kann im Nasopharynx bei bis zu 4% (26) der Menschen ausgemacht werden, wobei Entzündungen in variablem Ausmaß (von einfachen Sinusitiden und Otitiden bis hin zu Pneumonien) durchaus möglich sind. Entsprechend kann dieses Bakterium das ZNS per continuitatem befallen oder aber die mucosalen Barrieren durchbrechen und den hämatogenen Pfad beschreiten. (25) Schleimfilm und Lysozym halten Pneumokokken für gewöhnlich davon ab, das eigentliche respiratorische Epithel zu erreichen. Mittels negativer Oberflächenladung, einiger Enzyme (Neuraminidase A und B, Beta-Galactosidase A, Beta-N-Acetylglucosaminidase), die die Viskosität des Mukus verringern, sowie eines porenbildenden Toxins namens Pneumolysin, welches den Zilienschlag abzuschwächen im Stande ist, kann *Streptococcus Pneumoniae* jedoch verhindern, vom Strom mitgerissen und aus dem Atemtrakt entfernt zu werden. Der Spaltung seiner Kapsel kann er durch zwei eigene Enzyme (N-Acetylglucosamin-Deacetylase A und O-Acetyltransferase) entgehen. (26)

Nach diesem ersten, eher physikalischen Hindernis, muss das Bakterium noch die humoral-immunologische Abwehr der Schleimhaut überwinden. Diese besteht aus Immunglobulin A (IgA), Laktoferrin und Anteilen des Komplementsystems. IgA und Komplementfaktoren (insbesondere C1q) haben dabei in erster Linie die Opsonisierung und Förderung der Phagozytose des Keims zum Zweck. Laktoferrin dient als Scavenger für Eisenmoleküle, welche viele Bakterien für ihren eigenen Stoffwechsel benötigen. Vor IgA schützt den Pneumokokkus seine IgA-Protease und eine Anlagerung von Komplementfaktoren wird zum Teil durch das bereits erwähnte Pneumolysin verhindert, sowie diverse vom Erreger exprimierte Eiweißmoleküle (PspA, PspC, PsaA, PhpA). Die Kapsel des Bakteriums trägt ebenfalls zum Schutz vor IgA und Komplement bei. Laktoferrin wird schließlich durch ein Oberflächenprotein (PspA) neutralisiert. (26)

Welche Moleküle nun die Anlagerung ans Epithel vermitteln ist noch nicht vollends bekannt. Jedenfalls sind Glykokonjugate der epithelialen Zellmembran dafür von Bedeutung. (26)

Etwa 10-35 % der Erwachsenen dürften mit *Neisseria Meningitidis* besiedelt sein, wobei es, wie auch bei den Pneumokokken, bestimmter zusätzlicher Faktoren bedarf, damit es überhaupt zur Krankheit kommt. Meningokokken selbst weisen eine Reihe von Werkzeugen zur Besiedelung und Wirtsinvasion auf. (27)

Pathogene Formen von *Neisseria Meningitidis* verfügen in der Regel über eine Kapsel, welche mit einer Vielzahl von Molekülen ausgestattet ist, die dem Bakterium bei der Immunevasion behilflich sind. Lipopolysaccharidstrukturen (LPS) und Sialinsäuren spielen dabei eine bedeutende Rolle. So wird eine besondere Sialinsäure, welche einem neuronalen Oberflächenantigen (neural cell-adhesion molecule, NCAM) ähnelt, für die in der Regel schwache Abwehr gegen Meningokokken der Serogruppe B verantwortlich gemacht. Für ein ähnliches molekulares Mimikry ist wohl die Lactoneotetraose zuständig, welche sich in manchen LPS findet. (27)

Ähnlich den Pneumokokken exprimiert *Neisseria Meningitidis* außerdem eine IgA-Protease, die die Anlagerung an den Schleimhäuten des Nasopharynx unterstützen dürfte. (28) Allerdins müssen Meningokokken zügig an das respiratorische Epithel binden, um nicht im Schleimstrom fortgerissen zu werden. Dazu sind sie auf sogenannte Pili angewiesen, Zellfortsätze, mit denen sie in die Tiefe langen und zu den Epithelzellen Kontakt herstellen können. Diese Notwendigkeit besonderer Zellstrukturen für die Anheftung scheint auch dadurch bedingt zu sein, dass die oben erwähnte Kapsel die Präsentation von Adhäsinen (Oberflächenmolekülen zur Anhaftung) eher behindert. Durch

Modifikationen der Kapsel nach einer ersten Interaktion der Pili mit dem Epithel können jedoch Proteine wie Opa (opacity protein A) und Opc (opacity protein C) zur Adhäsion deutlich beitragen. Opa bindet dabei an sogenannte CEACAMs (carcinoembryonic antigen-related cell-adhesion molecules) und Hspgs (Heparansulfatproteoglykane), während Opc die Adhäsion über Bildung eines eigenen Molekülkomplexes unter Einbezug von Serumproteinen oder über die Bindung an HSPGs zu vermitteln scheint. Daneben gibt es noch eine Reihe eher minder bedeutsamer Adhäsine wie NadA (neisserial adhesine A), NhhA (Neisseria hia homologue A) und App (adhesion and penetration protein). (27)

Interessant ist daneben, dass Meningokokken Epithelzellen ohne Zilien bevorzugen, um an deren Oberflächen kleine Kolonien zu bilden. (28)

Etwa 50-80% der gesunden Individuen sind mit nicht bekapselten Subformen von Haemophilus Influenzae besiedelt und nur etwa 5% tragen bekapselte Arten. Virulentester Vertreter der letzteren ist Haemophilus Influenzae vom Typ B (Hib), der entsprechend hohes Potential zur Wirtsinvasion und Krankheitsauslösung besitzt. (29)

Hib verfügt ebenso über Pili, denen eine bedeutende Rolle bei der Besiedlung von mucosalen Oberflächen zukommt, und welche eine komplexe Biologie aufweisen. Sie verschwinden wieder nach erfolgter Anhaftung. Hib verfügt außerdem über einige zusätzliche Adhäsine wie HMW (high-molecular-weight-adhesine) 1 und 2, sowie ein IgA-Protease-ähnliches Protein. (29) Daneben versetzen seine Fimbrien Hib in die Lage, mit der Extrazellulärmatrix zu interagieren und an Kollagen oder Fibronectin zu binden. (30)

1.2.1.2.2 Mechanismen der Invasion

Streptococcus Pneumoniae bedient sich des human polymeric immunoglobulin receptor (hpIgR) zum Transfer über das nasopharyngealen Epithels, wobei ähnliche Moleküle von anderen Spezies nicht ausreichen. Dabei fungiert choline binding protein A (CbpA) als Ligand. (26,31) Darüber hinaus soll auch eine Interaktion von Phosphorylcholin (ChoP) mit dem Rezeptor für den Plättchenaktivierenden Faktor (PAF) eine Translokation von Pneumokokken über die epitheliale Barriere in Gang setzen. (26)

Als ein für das Durchqueren der Extrazellulärmatrix, wie auch das Aufbrechen von interzellulären Verbindungen wichtiges Agens konnte choline binding protein E (CbpE) ausgemacht werden, welches Plasminogen bindet, aktiviert und für die Migration des Pneumokokken nutzbar macht. (26, 32)

Neisseria Meningitidis tritt in die Epithelzellen mithilfe von Opc ein und Opa ein, wobei ersteres CEACAM und HSPGs und letzteres mit Integrinen und HSPGs zu interagieren in

der Lage ist. HSPGs und Integrine scheinen schließlich den Übergang in den Blutstrom an der basolateralen Seite von Endothelzellen zu vermitteln. (27)

Auch interzelluläre Wege stehen Meningokokken zum Eindringen in den Blutstrom zur Verfügung. (28)

Hib induziert nach Anheftung ans Epithel eine Zerstörung der Tight-Junctions und dringt so über die interzelluläre Route ein. (28)

1.2.1.2.3 Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Zunächst wird angenommen, dass eine ausgeprägte Bakteriämie zur Adhäsion an die zellulären Strukturen der Blut-Hirn-Schranke notwendig ist. Die sogenannten brain microvasculature endothelial cells (BMECs) stellen das morphologische Korrelat dieser Barriere dar, die dem Schutz des zentralen Nervensystems vor schädlichen Milieueinflüssen dient. Den bakteriellen Pathogenen stehen dieselben beiden Mechanismen zur Verfügung, die sie auch zum Durchbrechen der mucosalen Barrieren verwenden: Sie können die Blut-Hirn-Schranke auf transzellulärem oder parazellulärem Wege passieren. Bestimmte Erreger, wie etwa Mykobakterium Tuberculosis, sollen darüber hinaus im Inneren von Phagozyten das ZNS erreichen. (33)

Streptococcus Pneumoniae scheint zunächst in den Blutgefäßen des Subarachnoidalraumes aus dem Blut überzutreten. (34) Dazu bedient sich der Pneumokokkus einerseits seiner Lipoteichonsäure, andererseits seines Oberflächenproteines CbpA und seines Phosphorylcholins. Als Liganden an den Membranen der BMECs dienen der Lamininrezeptor, der PAF-Rezeptor, sowie Beta-Arrestin. So kann der Pneumokokkus in die BMECs aufgenommen werden und das Hirn transzellulär erreichen. (35)

An welcher Stelle genau Neisseria Meningitidis das Zentralnervensystem betritt, ist noch Gegenstand der Debatte. Neben dem Plexus Choroideus scheinen heute subpiale und subarachnoidale Venen und Venolen ebenfalls als Pforte wahrscheinlich. (36,37) Dieser Prozess beginnt ähnlich der oben beschriebenen Anlagerung an die Schleimhäute des Nasopharynx. Der Meningokokkus heftet sich mittels seiner Pili an die BMECs. Diese Interaktion induziert in den Endothelien der Blut-Hirn-Schranke die Bildung sogenannter kortikaler Plaques, Proteinkomplexe, die zu einer Fältelung und Aufwerfung der zellulären Membran führen. In den dadurch entstehenden Höhlen findet Neisseria Meningitidis Schutz vor dem Blutstrom. Daneben kommt es durch die Verformung der BMECs zu einem Bruch der interzellulären Tight-Junctions und einer konsekutiven Öffnung der parazellulären Passage. (37) Außerdem sind für Meningokokken transzelluläre Mechanismen beschrieben, bei denen ihr Oberflächenprotein Opc an Fibronectin, bzw.

CD46 bindet. Ebenso wird eine Ausnutzung des PAF-Rezeptors, sowie des Laminins und des $\alpha 5\beta 1$ -Integrins postuliert. (33,35)

Haemophilus Influenzae scheint über den Plexus Choroideus das Gehirn zu erreichen. Es konnte gezeigt werden, dass das Bakterium im Stande ist, die Permeabilität der Blut-Hirn-, sowie die Blut-Liquor-Schranke zu erhöhen. Dazu nutzt es Lipooligosaccharide und möglicherweise ein Porin. Durch das Aufbrechen interzellulärer Verbindungen könnte Hib dann parazellulär ins Hirn, bzw. den Liquor eindringen. (38)

1.2.1.2.4 Entzündungsmechanismen

Im Zentrum der Abwehr eingedrungener Mikroorganismen steht die Mikroglia, welche das angeborene Immunsystem im ZNS repräsentiert. Ihre Aufgabe besteht einerseits in der Initiation einer Immunantwort, andererseits in der Rekrutierung von Leukozyten aus der Zirkulation. Außerdem trägt sie über die Expression unterschiedlichster Signalstoffe zum Verlauf der Entzündung, wie auch zum Schadensprofil der Meningitiden und Enzephalitiden bei. (39,40)

Neutrophile Granulozyten und Monozyten, sowie auch andere weiße Blutkörperchen können durch den Plexus Choroideus in den Liquor eintreten oder aber direkt die Blut-Hirn-Schranke passieren. (41,42) Die Rolle der zirkulierenden Leukozyten wird ambivalent beurteilt. Ihre Anwesenheit im Nervensystem scheint weniger protektiven als destruktiven Effekt auf das Gewebe zu haben, sodass ihr Fernbleiben sogar mit einer besseren Prognose vergesellschaftet zu sein scheint. (43) Als endogener Regulator leukozytärer Reaktionen bei bakteriellen Meningitiden konnte TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) ausgemacht werden. (44)

Streptococcus Pneumoniae induziert über derzeit noch nicht vollends geklärte Mechanismen eine Aktivierung von Entzündungszellen. Dabei nehmen Zellwandbestandteile eine zentrale Position ein. Lipoteichonsäure oder Peptidoglycan dürften an CD14-Rezeptoren binden, welche dann nach einer weiteren Aktivierung von Toll-like-receptor 2 (TLR-2) die entsprechenden Signalkaskaden auslösen dürften. Ein TLR-2-unabhängiger Pfad könnte durch Pneumolysin beschriftet werden. Dieses löst außerdem die Bildung sogenannter nod-like receptor protein 3 (NLRP3) -Inflammasomen aus. Letztere sind Proteinkomplexe, welche über intrazelluläre Signale die Sekretion wichtiger Zytokine vorantreiben und einen protektiven Effekt entfalten. Neben Zellwandbestandteilen haben DNA-Fragmente entzündungsaktivierende Wirkung, wobei TLR-9 dafür benötigt wird. (45,46,47)

Als Zytokine sind insbesondere Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- α), Interleukin-1Beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), sowie Interferon-Gamma (IFN- γ) von Relevanz und nehmen in unterschiedlicher Weise an der Steuerung der Entzündung teil. (26)

Im Tierversuch kommt es bei Meningitiden durch Inokulation mit Streptococcus Pneumoniae nach etwa 30 Stunden zu einer diffusen, lymphozytären Infiltration des Hirnparenchyms mit zusätzlichen intraparenchymatösen oder subarachnoidalen Einblutungen. (48) Charakteristischerweise tritt darüber hinaus in hippokampalen Neuronen 18 Stunden nach Infektionsbeginn vermehrt Apoptose ein, welche nach 24 Stunden in eine zweite, anders gesteuerte Phase übergeht. (49)

Neisseria Meningitidis löst zunächst eine Entzündung im Subarachnoidalraum aus und verursacht eine erhebliche Sekretion von TNF- α , IL-1 β , IL-6, Interleukin-8 (IL-8) und anderen Zytokinen, die mitunter auch Leukozyten anlocken. Dabei fungiert LPS als zentraler Stimulus, wobei auch andere Komponenten des Bakteriums einen Beitrag leisten. (25)

Auch bei Hib dürften Zellwandbestandteile die Entzündungsantwort bedingen, die bezüglich des Zytokinmusters ähnlich den obigen verläuft. (28)

Insgesamt sind die Mechanismen der Hirnschädigung im Rahmen bakterieller Infektionen vielfältig und beinhalten die Wirkungen bakterieller Toxine, wie auch die Beiträge immunkompetenter, körpereigener Zellen. Jedenfalls kommt es im Gefolge der Entzündung zu Zellschäden, zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke, zum Hirnödem und zur Verminderung des zerebralen Blutflusses. (24,28,45)

1.2.1.3 Klinik

Die typische Trias der bakteriellen Meningitis besteht aus Fieber, Nackensteifigkeit und einer Beeinträchtigung des Bewusstseins, wobei nur ein kleiner Teil der Erkrankten sich tatsächlich mit diesen Symptomen präsentiert. Erweitert man das Spektrum um Kopfschmerzen, so zeigen sämtliche an Meningitis leidenden Patienten zumindest zwei der vier Zeichen. Zur Diagnosesicherung dient die Liquoruntersuchung (siehe Kapitel Liquordiagnostik).

Therapeutisch ist der bakteriellen Meningitis mit einer empirischen, intravenös applizierten antibiotischen Therapie beizukommen. Es werden Ceftriaxon oder Cefotaxim empfohlen. Bei Patienten über 50 Jahre sollte außerdem zusätzlich Ampicillin verabreicht werden, da bei diesen Listeria Monocytogenes ebenso in Frage kommt. (50)

1.2.1 Virale Entzündungen von Hirn und Meningen

Als Viren werden Partikel bezeichnet, welche aus Nukleinsäuren und Proteinen bestehen. Sie sind obligate Zellparasiten und daher auf den Stoffwechsel einer lebenden Zelle angewiesen, um sich zu vermehren. Dementsprechend müssen sie auch über Mechanismen verfügen, um in Zellen einzudringen. Innerhalb dieser können sie dann eine Schädigung auslösen, welche in den morphologischen Mustern der Zytolyse, der Apoptose, der Synzytienbildung oder der Immortalisierung der befallenen Zelle ihren Ausdruck findet. (22)

1.2.1.1 Erregerspektrum

Häufigste Erreger viraler Entzündungen des Hirns und seiner Häute sind Enteroviren, Arboviren, Herpesviren, Retroviren, Adenoviren, Myxoviren, sowie Arena- und Rhabdoviren. Diese Pathogene zeigen unterschiedliche Tendenzen zu Meningitiden, Enzephalitiden oder Meningoenzephalitiden. Einige neigen auch zur Auslösung von Enzephalomyelitiden. (4) Im Anschluss soll eine Auswahl an wichtigen viralen Erkrankungen des zentralen Nervensystems näher beleuchtet werden.

1.2.1.2 Infektionen durch Enteroviren

Pathogene Vertreter dieser Subgruppe sind Echoviren, Coxsackieviren, Enterovirus 71 und das Poliovirus. Sie erreichen das Nervensystem nach einer initialen Replikationsphase im Darm, wobei der retrograde axonale Transport als zentraler Mechanismus beschrieben wird. Allerdings kann eine zusätzliche Invasion des Nervensystems durch direkte oder indirekte (mittels einer Infektion von Monozyten) Überwindung der Blut-Hirn-Schranke nicht ausgeschlossen werden. (51)

Gegenüber anderen viralen Infektionen des Nervensystems führen Enteroviren zu einer stärkeren Erhöhung von Interleukin-17 (IL-17), Interleukin-6 (IL-6) und TNF- α . (52) Zumindest für Coxsackie B konnte gezeigt werden, dass es die Rekrutierung sogenannter Nestin-positiver Myeloidzellen induziert, welche seiner Verbreitung im zentralen Nervensystem Vorschub leisten. Das Virus weist außerdem einen besonderen Tropismus für neuronale Stammzellen auf. (53) Es befällt daneben bevorzugt Hippocampus, entorhinalen und temporalen Kortex, sowie Bereiche in der Nähe der Seitenventrikel und kann auch in reifen Neuronen Apoptosen induzieren. (54)

Enteroviren verfügen über besondere Fähigkeiten der Immunevasion. Sie sind im Stande, durch Proteasen die normale Funktion von Wirtsgeweben zu stören und den NF- κ B-Signalweg, sowie die Interferon-Beta Bildung zu kompromittieren. Interessanterweise

scheinen Cyclooxygenase-2 und Prostaglandin E2 sogar der viralen Replikation behilflich zu sein, was jedenfalls für Enterovirus 71 nachgewiesen werden konnte. (55)

Durch Enteroviren verursachte Meningitiden verlaufen für gewöhnlich milde und selbstlimitierend, wenngleich gerade bei Neugeborenen enzephalitische Krankheitsbilder auftreten können. Es sind die typischen Symptome Fieber, Nackensteifheit, Erbrechen und Kopfschmerzen zu beobachten. Eine besondere Entität stellt die durch Polioviren verursachte Myelitis dar. (56)

1.2.1.3 Infektionen durch Herpesviren

Herpesviren vermögen den physiologischen Mechanismus des retrograden axonalen Transports zu nutzen, um über sensorische Nervenfasern in sensible Ganglien zu gelangen. Dort können sie latent weiterhin bestehen bleiben. (57,58) Das Herpes-Simplex-Virus 1 (HSV1) bevorzugt das Ganglion Trigeminales, während das Varicella-Zoster-Virus (VZV) in nahezu sämtlichen vegetativen und sensiblen Ganglien erscheinen kann. (59)

Weltweit liegt die Durchseuchung mit HSV1 bei 80-90%, sodass gesagt werden kann, dass beinahe jeder Mensch im Laufe seines Lebens infiziert wird. Eine Affektion des Nervensystems tritt bei immunkompetenten, erwachsenen Personen für gewöhnlich aufgrund einer Reaktivierung des noch im Organismus vorhandenen Virus auf. (60)

Etwa 6 Tage nach Beginn der Erkrankung erreicht die zelluläre Antwort im Gehirn einen ersten Höhepunkt. Neutrophile Granulozyten und monozytäre Makrophagen infiltrieren das zentrale Nervensystem, wobei sie insbesondere in jene Bereiche eindringen, in denen sich die meisten Viruspartikel befinden. Erstere exprimieren danach mikrogliale Proteine, was eine Differenzierung zu einem Zelltyp nahelegt, welcher den residenten Immunzellen ähnelt. (61) Zweitere scheinen nur in Hirnnervenkernen und dem Riechkolben präsent zu sein, wo vermehrt nekrotische Areale anzutreffen sind. (60)

An Lymphozyten nehmen insbesondere zytotoxische T-Zellen und T-Helfer-Zellen an der entzündlichen Antwort teil, wobei erstere die T-Zell-Fraktion mengenmäßig anführen. Interessanterweise überdauert ihre Anwesenheit die der Viruspartikel, sodass erst 56 Tage nach Erkrankungsbeginn keine erhöhte T-Zell-Aktivität mehr festgestellt werden kann. (62)

IL-1 β , IL-18 und TNF- α scheinen für eine effiziente Immunantwort gegen HSV-1 von erheblicher Bedeutung zu sein. (63,64) Es gibt darüber hinaus Hinweise, dass die entzündliche Antwort selbst für die Prognose der Herpesenzephalitis entscheidend ist. So könnten Makrophagen und neutrophile Granulozyten deutlich zum Gewebsschaden beitragen. (65)

Varizella-Zoster-Viren können eine Vielzahl verschiedener neurologischer Krankheitsbilder verursachen. Dabei kommt es in der Regel im Kindesalter zur Erstinfektion, die ihren Ausdruck in dem als „Windpocken“ bezeichneten Ausschlag findet. Die spätere Reaktivierung des Virus geht mit Herpes Zoster, Post-Zoster-Neuralgie, Zoster-Vaskulopathie, Zoster-Myelopathie, Netzhautnekrosen, Meningitis, Meningoenzephalitis, Cerebellitis oder Meningoradikulitis einher. (66,67) Jedoch wird die Existenz einer reinen VZV-Enzephalitis mittlerweile in Frage gestellt und stattdessen vermutet, dass die Zoster-Vaskulopathie das klinische Bild der Enzephalitis imitiert oder zumindest deutlich häufiger auftritt. (68)

1.2.1.4 Infektionen durch Flaviviren

Das Frühsommermeningoenzephalitis-Virus (FSME-Virus) wird durch Zecken der Gattung Ixodes auf den Menschen übertragen und gehört, zusammen mit dem West-Nil-Virus, dem Japanische-Enzephalitis-Virus, dem Dengue-Virus, dem St. Louis-Enzephalitis-Virus und dem Murray-Valley-Enzephalitis-Virus zur Gattung der Flaviviren. (69,70)

Nach seinem Eintritt ins Wirtsgewebe vermehrt sich das Virus vermutlich in Langerhanszellen der Haut. Dieser Replikationsphase nachfolgend gelangt er in Lymphknoten, wo er Zellen der monozytären Reihe infiziert und sich abermals vermehrt. Im Verlauf der sich daran anschließenden Virämie erreicht der Erreger schließlich das Gehirn. Wie er jedoch die Blut-Hirn-Schranke überwindet, kann derzeit nur spekuliert werden. Eine Infektion der BMVECs oder zirkulierender Leukozyten wird diskutiert. (69)

Im Verlauf einer Flavivirusinfektion des Gehirns kommt es nach etwa 6 Tagen zur starken Vermehrung und Aktivierung der Mikroglia mit anschließender Invasion durch Makrophagen der peripheren Zirkulation, welche ebenfalls zu Zellen differenzieren, die von Mikroglia kaum mehr zu unterscheiden sind. Daneben werden neutrophile Granulozyten, NK-Zellen, B-Zellen und T-Zellen rekrutiert, deren Menge jedoch im zentralen Nervensystem deutlich geringer ausfällt, sodass die ortsständige Entzündung in erster Linie durch die Makrophagen/Mikroglia-Fraktion getragen wird. (71) Deren Vertreter produzieren vorwiegend TNF und Stickstoffmonoxid (NO). Daneben sind Interferone, sowie IL-12 und IL-18 (die die Produktion von IFN- γ steuern) von besonderer Bedeutung für die Abwehr von Flaviviren. (72) Entzündungsherde mit perivaskulärer lymphozytärer Infiltration und Gliaaggregaten finden sich in Medulla Oblongata, Pons, Cerebellum, Basalganglien, Thalamus, Rückenmark, und motorischem Kortex. (73)

Wenn es zur klinischen Manifestation der FSME kommt, was tatsächlich nur in der Minderheit der Infektionsfälle geschieht, so verläuft die Erkrankung – wie der deutsche Name bereits suggeriert - am ehesten in Form von Meningitiden und Enzephalitiden. Isolierte Myelitiden kommen wesentlich seltener vor. Die Entzündung der Hirnhäute geht mit hohem Fieber, Erbrechen, Photophobie und dem Auftreten meningealer Reizzeichen einher, während die Enzephalitis in Bewusstseinsstörungen, aber auch Veränderungen der Persönlichkeit, kognitiven Beeinträchtigungen, Zungenfaszikulationen und Extremitätentremor ihren Ausdruck finden kann. (73)

1.2.1.5 Infektionen durch Retroviren

Die Beteiligung des Nervensystems bei Infektion durch das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) wird durch den klinischen Begriff der HIV-assoziierten neurokognitiven Störung (HIV-associated neurocognitive disorder, HAND) beschrieben. Nach Schweregrad unterscheidet man darüber hinaus asymptomatische neurokognitive Beeinträchtigungen (asymptomatic neurocognitive impairment, ANI), milde kognitive Beeinträchtigungen (mild neurocognitive disorder, MND) und HIV-assoziierte Demenz (HAD). Die pathologischen Prozesse im Gehirn selbst werden als HIV-Enzephalitis (HIVE) bezeichnet. (74)

Es wird vermutet, dass das HI-Virus die Blut-Hirn-Schranke indirekt passiert, indem es Makrophagen befällt, die im Rahmen ihrer physiologischen Patrouille, angelockt durch kontinuierlich sezernierte Zytokine das zentrale Nervensystem betreten. Infizierte, also aktivierte Makrophagen neigen außerdem eher dazu, auf die Locksignale anzusprechen. (74)

Bei der HIVE kommt es zur Bildung relativ unspezifischer mikroglialer Knötchen und mehrkerniger Riesenzellen, wobei letztere pathognomisch sind und aus mehreren verschmolzenen Makrophagen bestehen. Darüber hinaus sind Lymphozyten anzutreffen. Sie treten allerdings in eher geringer Zahl auf. Bezüglich der Leukozyten wird das parenchymatöse Infiltrat von Makrophagen der mononukleären Zellreihe dominiert, während neutrophile Granulozyten nur spärlich erscheinen. Areale neuronalen Zellunterganges sind unter anderem Putamen, frontaler Kortex, Kleinhirn und Substantia Nigra. (74, 75)

Die Entwicklung der antiretroviralen der Therapie führte jedoch dazu, dass Infektionen des zentralen Nervensystems durch das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) ihr Erscheinungsbild änderten und das klassische Bild der HIVE deutlich seltener anzutreffen ist. (74, 75) Die begleitenden kognitiven Veränderungen im Rahmen von HIV-Infektionen

sind zwar indessen nicht mehr derart häufig zu beobachten, können jedoch trotz effizienter Behandlung und Fehlen eindeutiger HIV-assoziierter Befunde bestehen. (76)

Als zugrundeliegender Mechanismus wird das oben beschriebene Eindringen infizierter Makrophagen aus der Peripherie diskutiert. Durch eine geringere Blut-Hirn-Passage der antiretroviralen Medikamente könnten sich auf solche Weise Viruspartikel im Hirnparenchym verbergen und einer pharmakologischen Kontrolle teilweise entgehen. Auf diesem Wege käme es zu ähnlichen entzündlichen Veränderungen, jedoch nicht in der Ausprägung einer HIV. (77) Tatsächlich ähneln die pathologischen Veränderungen im Gehirn HIV-Infizierter ohne Enzephalitis denen der HIV, sodass ein Kontinuum zwischen geringerer und höherer Viruslast angenommen wird. (78)

1.2.1.6 Subakut Sklerosierende Panenzephalitis

Die subakut sklerosierende Panenzephalitis (SSPE) stellt eine besondere Komplikation einer durchgemachten Maserninfektion dar. Das Morbillivirus wird dabei über die Atemwege aufgenommen, gelangt ins lokale lymphatische Gewebe und wird von dort über den Organismus verteilt. Es vergehen in der Regel etwa 6-10 Jahre nach Auftreten des maserntypischen Krankheitsbildes bis zum Ausbruch der SSPE, wobei diese auch schon nach einem oder erst nach 24 Jahren auftreten kann. Ungefähr eines von 10.000 Kindern entwickelt eine SSPE aufgrund einer Persistenz des Virus. (79)

Den Beginn der SSPE markiert eine leichte, vorwiegend perivaskuläre Infiltration von Hirnparenchym und Meningen durch Lymphozyten und Plasmazellen. Die perivaskulären Leukozytenansammlungen werden von T-Helfer-Zellen dominiert, während sich im Parenchym eher Plasmazellen einfinden. Begleitend sind auch Makrophagen auszumachen. Auffällig ist die ausgeprägte Demyelinisierung, welche auf eine Virusinfektion von Oligodendrozyten zurückgeführt wird. Daneben sind typischerweise Einschlusskörperchen und Konglomerate neurofibrillärer Proteine (neurofibrillary tangles) anzutreffen. Im späteren Verlauf kommt es zur nekrotischen Zerstörung der hirneigenen Zytoarchitektur mit besonderem Befall des parietookzipitalen Kortex. Die Entzündung breitet sich daraufhin weiter aus und erfasst schließlich die vorderen Anteile der Hirnrinde, subkortikale Strukturen, sowie Hirnstamm und Rückenmark. (80)

Klinisch präsentiert sich die SSPE mit kognitivem Verfall, Ataxie, Myoklonien, epileptischen Anfällen und Sehstörungen. (81) Der Verlauf der Erkrankung kann in 6 Stadien eingeteilt werden. Bestehen im Stadium 0 noch sehr subtile intellektuelle Störungen und unspezifische neurologische Symptome, so kommt es in Stadium 1 zu einer deutlicheren Ausprägung dieser Beschwerden. Stadium 2 ist über charakteristische

Myokloni definiert, während die Betroffenen in Stadium 3 vegetativ-psychomotorische Symptome aufweisen. Überraschenderweise ist in Stadium 4 eine vorübergehende Besserung zu erwarten, die jedoch durch einen Rückfall in Stadium 5 zunichte gemacht wird. (82) Die SSPE schreitet üblicherweise fort und führt nach 1-3 Jahren zum Tod. Eine effiziente Therapie gibt es derzeit nicht. (80)

1.2.1.7 Tollwut

Tollwut, auch als Rabies oder Lyssa bezeichnet, ist eine Erkrankung, die durch Infektion mit Lyssaviren aus der Familie der Rhabdoviridae zustande kommt. (83) Das Virus erreicht das Hirn, indem es periphere Nerven infiltriert und den physiologischen retrograden axonalen Transport für sich ausnutzt. Dies ermöglicht ihm, die Blut-Hirn-Schranke zu umgehen. Das weitere Los des Virus kann nun darin bestehen, dass es vom Immunsystem unbehelligt bleibt, da die intakte Blut-Hirn-Schranke keine effiziente entzündliche Antwort aus der Peripherie erlaubt. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Detektion des Virus durch patrouillierende Leukozyten, wobei die Immunantwort selbst zur Krankheitsprogression beitrüge. Zuletzt kann die entzündliche Reaktion für eine Elimination des Virus sorgen, wobei diese Variante beim Menschen eine verschwindend geringe Wahrscheinlichkeit aufweist. (84)

Die zelluläre Antwort auf das Eindringen des Virus in das Hirn wird vorwiegend von T-Zellen geleitet und von B-Zellen begleitet. Letztere dürften von besonderer Bedeutung für die Ausschaltung des Virus sein. Interessanterweise unterscheiden sich die Infiltrationsmuster bei den beiden klinischen Formen der Rabies lediglich im Hirnstamm, wobei die paralytische Variante durch eine besonders starke Entzündung in diesem Bereich charakterisiert zu sein scheint. (83, 84)

Eine Reihe von Zytokinen werden darüber hinaus exprimiert, um die Abwehr einzuleiten. Darunter befinden sich TNF- α , regulated on activation, normal T-expressed and secreted (RANTES), durch IFN-induzierbares Protein 10 (IP-10) und monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), welche Leukozyten samt Monozyten anlocken. (85)

Betroffen sind Hirnstamm, Thalamus, Rückenmark, Basalganglien, Kleinhirn, Hippocampus und Kortex. Die beiden klinischen Formen der paralytischen und der tollwütigen Rabies unterscheiden sich durch die Viruslast, wobei eine stärkere Entzündung im Hirnstamm (siehe oben) mit einer geringeren Viruslast einhergeht. (83,86)

Rabies führt beim Menschen in aller Regel zum Tod. Bislang gibt es nur 6 dokumentierte Fälle einer überlebten Tollwut. (83)

1.2.2 Durch Spirochäten verursachte Entzündungen von Hirn und Meningen

Als Spirochäten werden schraubenförmig gewundene, gramnegative Bakterien bezeichnet. Von ihnen abgegrenzt müssen die starren Spirillen werden. Spirochäten sind nämlich im Gegensatz zu letzteren zu Bewegung in der Lage und verfügen über einen elastischen Zelleib. Zwei Familien können diesem Begriff untergeordnet werden: die Spirochaetaceae, deren Angehörige, nämlich Treponemen und Borrelien nachfolgend behandelt werden und die Leptospiraceae, auf die hier nicht eingegangen wird. (22)

1.2.2.1 Erregerspektrum

Als besonders neurotrope Erreger unter den Spirochäten sollen im Folgenden *Borrelia burgdorferi*, Keim der Lyme-Borreliose und *Treponema pallidum*, Keim der Syphilis, dargestellt werden.

1.2.2.2 Neuroborreliose

Die Übertragung von *Borrelia burgdorferi* findet in Mitteleuropa über die Zeckenspezies *Ixodes ricinus* statt. Es gibt eine Reihe verschiedener Vertreter der Borrelien, besonderen Tropismus zum Nervensystem zeigt jedoch *Borrelia burgdorferi garinii*. (87)

Um überhaupt in den Wirtsorganismus eindringen zu können, muss das Bakterium bereits in den Eingeweiden der Zecke suffiziente Mechanismen zur Immunevasion ausbilden. Spätestens beim Zeckenstich und dem Eindringen von Wirtsblut ist *Borrelia burgdorferi* den Komponenten des humanen Immunsystems ausgesetzt. Um diesen zu entkommen bedient sich das Bakterium prinzipiell dreier unterschiedlicher Strategien. Einerseits ist es im Stande, immunogene Oberflächenstrukturen durch Herabregulation zu vermindern. Andererseits kann es sich in schwer zugänglichen Arealen des Organismus verbergen. Schließlich vermag es, Anteile des Immunsystems durch eigens produzierte Substanzen zu neutralisieren. (88)

Wie *Borrelia burgdorferi* das zentrale Nervensystem erreicht ist noch nicht geklärt. Zwar scheint eine Invasion auf dem Blutweg mit nachfolgender Überwindung der Blut-Hirn-Schranke wahrscheinlich, jedoch gibt es Hinweise auf eine mögliche direkte Invasion von oberflächlichen Nerven in der Nähe des Zeckenstiches und nachfolgender Migration ins Rückenmark. (88)

Klassischer Weise tritt die Neuroborreliose in Form der Trias Meningitis, kranialer Radikulitis und periphere Radikulitis in Erscheinung. Seltener Manifestationsformen stellen dagegen die Encephalomyelitis, Enzephalopathie oder Zerebellitis dar. (89)

Die von den Borrelien induzierte Entzündung führt zur Bildung von IL1- β , IL-6, IL-8, TNF- α , sowie CXCL13, einem chemotaktisch auf B-Zellen wirkenden Stoff. Astrozyten und Microglia sind für die Synthese dieser Zytokine verantwortlich. Daneben kommt es unter Einwirkung von *Borrelia Burgdorferi* zu einer vermehrten Apoptose von Oligodendrozyten und Neuronen. (90)

Als periphere Leukozyten wirken insbesondere B- und T-Lymphozyten an der Entzündung mit und erscheinen dementsprechend auch im Liquor. Makrophagen treten dagegen in deutlich geringerer Anzahl auf. (91)

Unter ungünstigen Bedingungen ist das Bakterium darüber hinaus in der Lage, seine Form zu ändern. Diese zystischen Varianten von *Borrelia Burgdorferi* konnten bei Patienten mit chronischer Neuroborreliose beobachtet werden. (92)

1.2.2.3 Neurosyphilis

Treponema Pallidum wird vorwiegend durch sexuelle Aktivität übertragen, wobei der Primäraffekt am Ort der bakteriellen Invasion in der Regel als Schanker imponiert. Von dort breitet sich die Spirochäte im gesamten Organismus aus und kann eine Vielzahl von verschiedenen Organen und Geweben besiedeln. (93) Entgegen der früheren Meinung findet eine Invasion des Nervensystems oft schon Tage bis Wochen nach der Erstinfektion statt und nicht etwa erst im Tertiärstadium der Erkrankung. (93,94)

Frühe neurologische Manifestationen umfassen Ausfälle der Hirnnerven und Meningitiden. Im Tertiärstadium der Erkrankung, also bis zu 30 Jahre nach Infektion, können eine Meningitis mit begleitender Vaskulitis der zerebralen Gefäße, sowie die eigens abgegrenzten Entitäten der Tabes Dorsalis und Progressiven Paralyse auftreten. (4,93)

Seine lange Persistenz im Wirtsorganismus scheint der Erreger durch mehrere Mechanismen zu erreichen. So kann er dem humanen Immunsystem entkommen indem er nur wenige Antigene exprimiert, diese darüber hinaus variiert und schließlich eine Oponisierung durch Antikörper vermeidet. Außerdem scheint *Treponema Pallidum* in der Lage zu sein, die Entwicklung regulatorischer T-Zellen zu fördern, welche ihrerseits immunsuppressive Effekte entfalten. (95)

Die entzündliche Antwort im Nervensystem ist noch nicht gut charakterisiert. Ein ähnlicher Mechanismus wie der der Neuroborreliose wird durch erhöhte Werte von CXCL13 im Liquor von an Neurosyphilis Erkrankten nahegelegt. (96) In anderen Geweben scheinen jedoch T-Helferzellen im Zusammenschluss mit zytotoxischen T-Zellen als Vertreter der Leukozyten und IFN- γ als Zytokin vorzuherrschen. (97)

1.2.3 Durch Mykobakterien verursachte Entzündungen von Hirn und Meningen

Als Mykobakterien werden stäbchenförmige, säurefeste Bakterien bezeichnet, welche Sporen bilden können und selbst unbeweglich sind. Sie sind in der klassischen Gramfärbung nicht darstellbar und müssen daher mittels der Ziehl-Neelsen-Methode gefärbt werden. Der hohe Lipidgehalt ihrer Zellwand, der diese Eigenschaft bedingt, hilft ihnen auch bei der Immunevasion. (22)

1.2.3.1 Erregerspektrum

Unter den nichttuberkulösen Mykobakterien verursacht Mykobakterium Avium die meisten Infektionen. Ein weiterer Erreger aus der Gruppe der nichttuberkulösen Mykobakterien, der im frühen zwanzigsten Jahrhundert für zahlreiche Infektionen verantwortlich war, ist Mykobakterium Bovis. (98,99) Im Folgenden soll auf die klassische Tuberkulose des zentralen Nervensystems eingegangen werden, die durch Mykobakterium Tuberculosis ausgelöst wird, einem Erreger, der bereits durch Robert Koch im Jahre 1886 beschrieben wurde. (100)

Daneben gibt es noch eine Reihe humanpathogener Mykobakterien, wie etwa *M. abscessus*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. marinum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. ulcerans* und *M. xenopi*. (22)

1.2.3.2 Pathophysiologie

M. Tuberculosis wird über die Lungen in den Organismus aufgenommen. Dort infiziert der Erreger Alveolarmakrophagen, wodurch es zur klassischen Lungentuberkulose kommt. Während dieser Erkrankung kann das Bakterium nun Lymphknoten erreichen und die sich daran anschließende Bakteriämie ermöglicht letztlich die Verteilung des Keims über den gesamten Organismus. Auf diesem Wege gelangt *M. Tuberculosis* auch ins zentrale Nervensystem. (101)

Um die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden scheint *M. Tuberculosis* in der Lage zu sein, seine eigene Endozytose an den BMECs zu induzieren. Diese Fähigkeit dürfte pathogene Mykobakterien auch von apathogenen Stämmen unterscheiden. (102) Im Anschluss daran bildet das Bakterium sogenannte Rich-Foci aus, verkäsende Herde in Hirnparenchym und/oder Meningen, welche den Ausgangspunkt für den weiteren Verlauf der zerebralen Tuberkulose darstellen sollen und es dem Erreger erlauben, lange nach der initialen Bakteriämie Subarachnoidalraum und Liquor zu invadieren. (101)

Im Parenchym des Hirns infiziert *M. Tuberculosis* insbesondere die Mikroglia, wobei das Oberflächenprotein CD14 diesen Prozess gemeinsam mit TLR4 vermittelt. Neuronen und Astrozyten werden nur zu einem geringen Anteil befallen. (103) Die residenten Makrophagen beginnen daraufhin, Zytokine zu sezernieren. Diese sind unter anderem TNF- α , IL-1 β und IL-6, CCL2, CCL5 und CXCL10. Astrozyten produzieren lediglich das letztere Zytokin bei Infektion mit *M. Tuberculosis*. (104)

Pathologischerseits werden drei Entitäten unterschieden. Bei der tuberkulösen Meningitis kommt es zur Ausbildung eines zähen, entzündlichen Exsudats, das den Subarachnoidalraum teilweise ausfüllt und seine höchste Dichte in der Fossa Interpeduncularis und der suprasellären Region hat. Dieses Exsudat setzt sich aus neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und in späteren Phasen auch Lymphozyten zusammen. Das Tuberkulom stellt einen nicht rupturierten Rich-Fokus dar. Es besteht aus Epitheloid-, Riesenzellen und Lymphozyten, welche eine zentrale Verkäsung umstellen. Vom Tuberkulom abgegrenzt muss schließlich der tuberkulöse Abszess werden, der einen Eiterherd ohne die charakteristischen granulomatösen Veränderungen darstellt. (105)

1.2.3.3 Klinik

Klinisch präsentiert sich die tuberkulöse Meningitis mit den klassischen Symptomen. Nackensteife, Kopfschmerzen, Fieber und mehr oder minder stark ausgeprägte neurologische Defizite zeichnen das typische Bild. In bis zu 50% der Fälle kann eine pulmonale Beteiligung mittels Lungenröntgen festgestellt werden, ansonsten fehlen jedoch oftmals klare anamnestische Hinweise. Der Schweregrad der Erkrankung kann mithilfe des Medical Research Council Staging-Systems abgeschätzt werden. Dabei bestehen bei Grad I noch keinerlei neurologische Defizite, während Grad III mit erheblichen Defiziten in Form von Koma, Hirnnerven- und peripheren Paresen einhergeht. Alternativ kann eine Einteilung auch nach dem Glasgow Coma Scale erfolgen. (105)

Hirnnervenparesen treten mit einer Häufigkeit von bis zu 30% auf, wobei meistens der N. Abducens betroffen ist. Darüber hinaus können Sehstörungen auf eine Läsion des N. Opticus verweisen. Vaskulopathien mit entsprechenden territorial zuzuordnenden Symptomen können ebenfalls beobachtet werden. (106)

Tuberkulom und tuberkulöser Hirnabszess bedingen ein Beschwerdebild, das von der jeweiligen Lokalisation des entzündlichen Prozesses abhängt. Häufig treten epileptische Anfälle oder Zeichen des erhöhten Hirndrucks auf, wie etwa ein Papillenödem. (105,106)

1.2.4 Durch Pilze verursachte Entzündungen von Hirn und Meningen

Pilze können als Einzeller oder in mehrzelliger Struktur vorkommen. Nur vergleichsweise wenige Angehörige dieser Art sind für den Menschen als Pathogene von Bedeutung. Da sie praktisch kaum Virulenzfaktoren besitzen befallen sie den Menschen als opportunistische Erreger bei Immunsuppression. (22)

1.2.4.1 Erregerspektrum

Viele Pilze sind potenzielle Pathogene, welche das zentrale Nervensystem infizieren können. Es kommen Hefepilze wie *Candida Albicans*, *Cryptococcus Neoformans* und *Cryptococcus Gatti* nebst dimorphen Pilzen wie *Histoplasma Capsulatum*, *Coccidioides Immitis*, *Paracoccidioides Brasiliensis* und *Blastomyces Dermatidis*, Fadenpilze wie *Aspergillus* und *Zygomycetes*arten, sowie diverse weitere Schimmelpilze wie *Bipolaris Spicifera* und andere in Frage. Selten werden auch Infektionen mit *Mucor*- und *Rhizopus*spezies beschrieben. Da Meningitiden durch *Cryptococcus Neoformans* eine gut erforschte Entität und darüber hinaus die häufigste Variante mykotischer Infektionen des zentralen Nervensystems darstellen, soll im Folgenden insbesondere darauf eingegangen werden. (107,108,109)

1.2.4.2 Pathophysiologie

C. Neoformans findet sich praktisch überall in der Umwelt, bevorzugt jedoch Taubenkot. Seine Sporen werden vom Menschen über die Lunge aufgenommen, wo sie Kolonien bilden und asymptomatisch die Atemwege besiedeln können, um bei Auftreten einer Immunsuppression in den Wirt oder die Wirtin einzudringen. Insbesondere bei einer Defizienz der Makrophagen, welche bei der Abwehr von *C. Neoformans* eine herausragende Rolle spielen, ist der Pilz in der Lage, den Organismus zu infiltrieren. Er nutzt dabei eben die Zellen aus, die ihn eigentlich zurückhalten sollen. Wird *C. Neoformans* nämlich durch Endozytose in die geschwächten Makrophagen aufgenommen, kann er sich innerhalb dieser vermehren und sie gleichzeitig als Vehikel zu seiner systemischen Verteilung nutzen. (107) Alternativ scheint *C. Neoformans* auch nach einer Besiedelung der nasalen Mucosa entlang des N. Olfactorius in das Hirn eindringen zu können, wenngleich die Bedeutung dieser Invasionsroute in Frage gestellt werden darf. (38)

Die Blut-Hirn-Schranke kann *C. Neoformans* sowohl trans- und parazellulär, als auch innerhalb infizierter Makrophagen überwinden. (38,107)

Innerhalb des zentralen Nervensystems läuft die Entzündungsreaktion erst langsam an, sodass 3 Tage nach Beginn der Fungämie noch kein relevantes Infiltrat in Hirn oder Meningen zu finden ist, trotz Anwesenheit der Pilze in den perivaskulären Räumen. Die Immunantwort wird im Anschluss zunächst von T-Lymphozyten sowohl der Helfer-, als auch der zytotoxischen Reihe angeführt, welche sich dicht um, mit Pilzmaterial gefüllten, Mikrozysten versammeln, begleitet von wenigen B-Zellen. Im Verlauf tauchen zunehmend Makrophagen auf und die anfangs eher milde mikrogliale Aktivierung steigt drastisch an. Zuletzt kommt es zu einem granulomatösen Entzündungsmuster im Nervengewebe. (110)

Die Bedeutung neutrophiler Granulozyten in der Abwehr von Pilzen wird als hoch eingeschätzt. Ein Molekül namens CARD9 scheint für die Pilzabwehrkapazitäten derselben verantwortlich zu sein, wobei diese Abhängigkeit in erster Linie für *Candida Albicans* gilt. Allerdings scheint eine Mutation von CARD9 die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten Hyphen von *C. Albicans* aus dem Nervengewebe zu entfernen, nicht zu beeinträchtigen, sodass die Bedeutung des Immunmoleküls eher in der systemischen Abwehr liegen dürfte. (111)

Das Zytokinexpressionsmuster im Rahmen einer Meningitis durch *C. Neoformans* besteht vorwiegend aus TNF- α , IL-6, IL-8 und IL-12 und IFN- γ , welche Makrophagen anlocken und zum Zwecke der Granulombildung rekrutieren können. Dafür verantwortlich sind Th1-Zellen. (112)

1.2.4.3 Klinik

Meningitiden durch *C. Neoformans* führen in erster Linie zu subakuten Kopfschmerzen und Verwirrungszuständen, welche durchaus mit Erhöhungen des intrakraniellen Druckes und daraus folgenden Hirnnervenlähmungen oder epileptischen Anfällen einhergehen können. Klassische meningeale Reizzeichen treten vergleichsweise selten auf, sodass weniger als ein Fünftel der Patienten und Patientinnen sich damit präsentieren. Eine besondere Verlaufsform stellen Kryptokokkome dar, die Hydrozephalus und Blindheit zur Folge haben können. (113)

1.2.5 Durch Parasiten verursachte Entzündungen von Hirn und Meningen

Hier sind insbesondere Endoparasiten von Bedeutung, die innerhalb des Wirtsorganismus leben. Diese können ein- oder mehrzellig sein und werden dementsprechend in Protozoen und Helminthen eingeteilt. In diesem Kapitel werden die Protozoen im Mittelpunkt stehen.

Dies sind bewegliche, eukaryote Organismen, die entsprechend ihrer parasitären Veranlagung einen Wirten oder eine Wirtin zur Vermehrung benötigen. (22)

1.2.5.1 Erregerspektrum

Toxoplasma Gondii, Trypanosoma Cruzi, Taenia Solium, Schistosomen, sowie Plasmodiumspezies, Mikrosporidien, Leishmanien und Strongyloides Stercoralis sind Parasiten, die prinzipiell zur Infektion des zentralen Nervensystems im Stande sind. (114,115) Aufgrund seiner besonderen Bedeutung soll aber hier das Augenmerk auf T. Gondii gelegt werden.

1.2.5.2 Pathophysiologie

Die Toxoplasmose kann als Zoonose betrachtet werden, da sie von Katzen auf den Menschen übertragen wird. Dabei scheiden die Tiere Oozysten von T. Gondii in ihrem Kot aus. Die Aufnahme erfolgt meist fäkal-oral. Im Gastrointestinaltrakt dringt der Erreger in den Organismus ein und kann sich nach seiner systemischen Verteilung praktisch in jeder kernhaltigen Zelle verbergen, sodass beim Immunkompetenten von einer latenten Infektion ausgegangen werden kann. Bei AIDS-Kranken entsteht die floride Infektion durch die Reaktivierung des Parasiten aufgrund der Immunsuppression. (114)

Entscheidend für die Fähigkeit des Mikroorganismus, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, dürfte die Anwesenheit von Makrophagen sein. Es wird angenommen, dass der Erreger diese infiziert und dann ihre Motilität erhöht, um eine Migration über das Endothel der Hirngefäße zu stimulieren. Ob extrazelluläre Partikel des Parasiten in der Lage sind, in das zentrale Nervensystem einzudringen ist noch nicht klar. (116)

Im Parenchym dringt T. Gondii in Neuronen, Astrozyten und Mikroglia ein, wodurch es zur Toxoplasma-Enzephalitis kommt. Insbesondere T-Zellen leiten die Entzündung ein. Sind in der akuten Phase der Inflammation noch zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen beteiligt, so kommt es mit der Chronifizierung zu einer deutlichen Abnahme der CD8+-T-Zellen. (117) NK-Zellen tragen daneben deutlich zur Steuerung der Immunantwort bei. Die Rolle der Microglia besteht in der Proliferationshemmung des Erregers. Interessanterweise scheinen die residenten Makrophagen die eigentlichen Verursacher neuronaler Apoptosen im von T. Gondii infizierten Gehirn zu sein, da der Erreger dergleichen auszulösen nicht im Stande zu sein scheint. (118,119)

Eine bedeutende Rolle in der Orchestrierung der zellulären Immunprozesse nehmen die Zytokine TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6 und IL-12 ein. In der chronischen Phase wiederum ist es an IL-10, die Inflammation zu kontrollieren und zu dämpfen. (117,118)

1.2.5.3 Klinik

Bei AIDS-Kranken stellt *T. Gondii* den prominentesten Erreger unter den zahlreichen opportunistischen Keimen dar, die diese Gruppe von Patienten und Patientinnen bedrohen. Für gewöhnlich entwickeln sich im Laufe der zerebralen Toxoplasmose uni- oder multifokale Herde im Hirn, welche zusammen das Bild einer nekrotischen Enzephalitis ergeben. Symptome der Erkrankung sind Fieber, Kopfschmerzen, Bewusstseinsveränderungen, zerebelläre Dysfunktionen, psychiatrische Auffälligkeiten, Sensibilitätsstörungen, meningeale Reizzeichen, epileptische Anfälle, Hirnnervenläsionen und weitere, wobei die Lokalisationen der zerebralen Herde entscheidend sind. (117,119)

1.3 Liquordiagnostik der Infektiösen Meningitiden und Enzephalitiden

1.3.1 Das 4-Kompartimente-Modell

Um Proteinzusammensetzungen und Zellbilder im Liquor Cerebrospinalis diagnostisch nutzbar zu machen, müssen zunächst Überlegungen zu den unterschiedlichen Räumen angestellt werden, welche innerhalb des zentralen Nervensystems abgegrenzt werden können. Zur schematischen Darstellung reicht die Annahme von vier Kompartimenten. Das intravaskuläre Kompartiment ist durch das Lumen der kleinsten Gefäße in Parenchym und Leptomeningen, sowie des Plexus Choroideus repräsentiert. Die Plasmamembranen von Neuronen und Gliazellen grenzen das intrazelluläre Kompartiment ab. Außerhalb davon findet sich das extrazelluläre Kompartiment, welches sich labyrinthartig zwischen den Zellfortsätzen erstreckt und zum Liquorraum hin offen steht. Letzterer besteht schließlich aus den Ventrikeln und dem Subarachnoidalraum samt seiner Zisternen. (120)

Drei Schranken limitieren den Stoffaustausch zwischen den oben genannten Räumen. Die Blut-Hirn-Schranke, morphologisch vertreten durch Tight-Junctions in den Hirnkapillaren, erlaubt vornehmlich lipophilen Substanzen transendothelial das zentrale Nervensystem zu erreichen, wobei zahlreiche eigene Transportproteine zur Verfügung stehen. Durch den Plexus Choroideus findet das Konzept der Blut-Liquor-Schranke sein anatomisches Korrelat. Dort wird der Liquor durch Filtration an lecken Endothelien produziert. Schließlich stellen die Plasmamembranen der parenchymatösen Zellen selbst noch eine Barriere dar, die den intra- vom extrazellulären Raum trennt. (120)

Zwar kommunizieren extrazellulärer Raum und Liquorkompartiment miteinander, doch findet ein tatsächlicher Substanzausgleich nur entlang des angrenzenden Parenchyms statt, sodass die Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit nur in diesem Streifen von

wenigen Millimetern Breite mit der des Liquors übereinstimmt. Die restliche Extrazellulärsubstanz des Hirns ist bislang schlecht charakterisiert.

Die Blut-Liquor-Schranke erlaubt selbst großen, hydrophilen Molekülen die Passage, sodass etwa 83% der im Liquor nachweisbaren Proteine aus dem Serum stammen. Dieser Anteil steigt im Rahmen von Schrankenstörungen. Lediglich Chlorid, welches im Liquor in höheren Konzentrationen als im Serum vorliegt, geht den umgekehrten Weg, sodass seine Konzentration in diesem Falle sinkt. Diese Tatsache lässt sich zu diagnostischen Interpretationen nutzen. Kommt es zu einem Anstieg von Molekülen, welche die Schranken für gewöhnlich nicht passieren können, so kann es sich entweder um eine Schrankenstörung oder um eine intrathekale Synthese handeln. (120) Die differentialdiagnostische Abgrenzung dieser beiden Entitäten wird weiter unten behandelt.

1.3.2 Makroskopische Beurteilung des Liquors

Frisch entnommener Liquor Cerebrospinalis erscheint für gewöhnlich klar und farblos, wobei sich die optische Beurteilung auf die Gegensatzpaare klar-trüb und farblos-farbig beschränkt. Es braucht in etwa 1000 rote Blutkörperchen/Mikroliter, um den Liquor makroskopisch rosa zu färben. Analog dazu nimmt er ab 1000 Leukozyten/Mikroliter ein weißes bis gelbliches Kolorit an. Eine Gelbfärbung im Sinne der Xanthochromie kann jedoch auch durch Blutplasma- oder Lymphbeimischung, sowie durch den Abbau von Erythrozyten bei stattgehabter Blutung in den Liquorraum entstehen. Bei noch aktiver Blutung kann es auch zu einer Braunfärbung des Liquors durch parallele Hämolyse und Bilirubinbildung kommen. (121)

1.3.3 Zellzahl und Zellbild

Grundsätzlich verläuft die Entzündungsreaktion im Liquor in drei Phasen, deren Dauer in Abhängigkeit von zahlreichen Faktoren deutlich variiert. Dabei müssen Ort der Entzündung, Erreger, Infektionsweg und Zeitpunkt der Liquorabnahme, sowie Alter des Patienten oder der Patientin und klinischer Verlauf ins Kalkül gezogen werden. Zu Anfang kommt es typischerweise zu einer durch neutrophile Granulozyten getragenen Reaktion im Liquor. Als archetypische Erstreaktion auf entzündliche Reize tritt sie zwar bei allen Erregern auf, erweist sich aber als eingeschränkt erregerspezifisch durch Schwankungen in Dauer und Ausprägung. Nach etwa 3-5 Tagen beginnen Zellen der lymphozytären und monozytären Zellreihe, das Bild zu dominieren, was auf eine zunehmend spezifische Immunreaktion schließen lässt. Man bezeichnet die zweite Phase daher als mononukleäre Phase. Die letzte Phase, auch als Reparationsphase bezeichnet, ist durch einen Rückgang

von Zellen gekennzeichnet, wobei einzelne Entzündungszellen durchaus noch verbleiben können. (122)

1.3.3.1 Bakterielle Infektionen

Man unterscheidet eitrige (purulente) von nicht-eitrigen (apurulenten) bakteriellen Infektionen. Bei den purulenten Infektionen kommen als Erreger jene in Frage, die im Kapitel über die bakteriellen Entzündungen des Hirns und seiner Häute diskutiert wurden, nämlich Meningokokken, Pneumokokken, Haemophilus Influenzae und weitere. Im Rahmen der purulenten Infektionen sind Zellzahlen zwischen 1000 Zellen/Mikroliter und 10.000 Zellen/Mikroliter zu erwarten, wobei insbesondere neutrophile Granulozyten mit Anteilen von 85-99% nachzuweisen sind, sodass hier die initiale polynukleäre Phase im Zentrum der entzündlichen Liquorreaktion steht. Die Verabreichung einer antibiotischen Therapie kann allerdings auch die Konversion zur mononukleären Phase begünstigen. (122,123)

Der Begriff der apurulenten bakteriellen Infektionen bezieht sich auf jene bakteriellen Erreger, die zuvor in gesonderten Kapiteln behandelt wurden. Die Neurotuberkulose lässt, sofern überhaupt, nur zu Beginn eine granulozytäre Reaktion erkennen, während ein Mischbild mit lymphozytärer Dominanz viel eher charakteristisch ist. Spirochäteninfektionen sind ebenfalls durch ein mononukleäres Zellbild gekennzeichnet. (122)

1.3.3.2 Virale Infektionen

Die Zellzahlerhöhungen bei viralen Infektionen fallen deutlich geringer aus und bewegen sich in der Größenordnung von 10 Zellen/Mikroliter bis 1000 Zellen/Mikroliter, wobei auch normale Zellzahlen im Rahmen von Enzephalitiden beobachtet werden. Typischerweise wird das Zellbild von Vertretern der lymphozytären Reihen angeführt, wobei berücksichtigt werden muss, dass praktisch bei jeder infektiösen Entzündung zunächst ein granulozytäres Zellbild auftritt. Virale Entzündungen unterscheiden sich lediglich in der Dauer dieser Phase, sodass innerhalb von 12-72 Stunden nach Krankheitsbeginn bereits eine Konversion zur mononukleären Phase stattfindet. (122,123)

Aus dem zytologischen Liquorbefund selbst ist allerdings kein sicherer Rückschluss auf den Erreger möglich. Zwar gibt es unterstützende Hinweise, wie etwa vereinzelte Erythrozyten bei hämorrhagischer Enzephalitis, wie sie bei Herpesinfektionen auftritt, jedoch kann das mononukleäre Zytoprogramm auch ohne Anwesenheit eines Erregers bei para- und postinfektiösen Meningitiden nachgewiesen werden. (123)

Eine Besonderheit stellt die HIV-Infektion des Nervensystems dar, deren verschiedene Verlaufsformen allesamt ebenfalls durch eine lymphozytäre Pleozytose gekennzeichnet sind. Granulozytäre Zellbilder, die im Rahmen dieser Erkrankung ebenfalls auftreten können, verweisen eher auf eine opportunistische Sekundärinfektion. (123)

1.3.3.3 Mykotische Infektionen

Pilzinfektionen führen nicht zwingend zu Zellzahlerhöhungen, zumal sie vornehmlich bei Immunsupprimierten vorkommen. Sollte dennoch eine Pleozytose auftreten, so kann diese bis zu 1000 Zellen/Mikroliter umfassen. Das Zellbild selbst ist bunt durchmischt mit Lymphozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, sowie Monozyten. (123)

1.3.3.4 Parasitäre Infektionen

Bei Parasitären Infektionen verhält sich die zelluläre Immunreaktion ähnlich jener bei mykotischen Infektionen, sodass Zellzahlen bis von bis zu 1000 Zellen/Mikroliter beobachtet werden. Regelmäßig stellen sich jedoch Werte zwischen 20 und 300 Zellen/Mikroliter ein. Eosinophile Granulozyten treten in allen Krankheitsphasen auf, während ansonsten sämtliche oben beschriebenen Zellbilder anzutreffen sein können. (123)

1.3.4 Glucose und Lactat

Glucose und Laktatkonzentrationen geben Hinweise auf die Situation des Energiestoffwechsels in den Liquorräumen. Insbesondere Glucose muss jedoch in Zusammenschau mit dem Serumspiegel betrachtet werden und erst durch Aufstellung des Konzentrationsquotienten zwischen Liquor und Serum erlangt dieser Parameter seinen diagnostischen Wert. Dabei können Erniedrigungen des Glucosequotienten Schädigungen der Glucose-spezifischen Transportproteine oder aber glucosekonsumierende Prozesse im Liquorraum anzeigen. (121)

Ein Anstieg der Laktatkonzentration kommt im Rahmen ischämischer Prozesse vor, aber auch bei Blutungen und insbesondere bakteriellen Infektionen. Im Vergleich zur Glucose stellt das Laktat einen zuverlässigeren Parameter dar. (121) Insbesondere die Differenzierung zwischen Meningitiden viraler und bakterieller Genese wird durch die Laktatwerte im Liquor erleichtert. (124)

1.3.5 Eiweiß

Da Albumin ein klassisches Serumprotein darstellt und in neuronalen Geweben nicht synthetisiert werden kann, eignet sich der Konzentrationsquotient zwischen Liquor und Serum nach der Formel
$$\frac{[Albumin(Liquor)]}{[Albumin(Serum)]} = Q(Alb)$$
 zur Feststellung etwaiger

Schrankenstörungen. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass Albumin auch dann im Liquor vermehrt akkumulieren kann, wenn der Liquorabfluss gestört oder altersbedingt verändert ist. Daher sind die Normwerte nach Alter angepasst. Die Absolutkonzentration von Albumin im Liquor kann Unterschiede in der hepatischen Synthese und andere systemische Einflüsse nicht berücksichtigen und ist daher von untergeordnetem Wert. (121)

Eine weitere bedeutende Proteinfraction im Liquor ist jene der Immunglobuline (Ig). Eine mögliche intrathekale Synthese derselben kann auf Basis des Albuminquotienten abgeschätzt werden. Die Auftragung von Ig-Quotienten gegen Albuminquotienten ist im Reiber-Schema verwirklicht, mithilfe dessen die vier Fälle von intrathekaler Ig-Synthese mit oder ohne Schrankenstörung, bzw. Schrankenstörung ohne Ig-Synthese und Normalfall gut quantifiziert werden können. (120)

1.3.6 Zusätzliche Parameter

Neben den oben genannten klassischen Parametern der klinischen Liquoranalyse stehen noch andere Moleküle zur Verfügung, deren Konzentrationen möglicherweise bestimmte entzündliche Prozesse im Liquor anzeigen können.

Für bakterielle Meningitiden liegt die Sensitivität der klassischen mikroskopischen Liquoranalyse bei etwa 40-50%, was den möglichen Nutzen alternativer krankheitsanzeigender Moleküle hervorhebt. (124) Im Rahmen einer durch Meningokokken verursachter Meningitis kommt es zu einer deutlicheren Erhöhung von IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8, sowie des macrophage inflammatory protein 1 β (MIP-1 β) und des monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) im Liquor, verglichen mit den korrespondierenden Serumkonzentrationen. (125)

Als Biomarker zur Abschätzung der Krankheitsaktivität bei Infektion mit *Borrelia burgdorferi* wird CXCL-13 diskutiert. Dieses zeigt Fluktuationen in der Liquorkonzentration, welche stark mit dem Vorhandensein einer floriden Entzündung korreliert zu sein scheinen, wenngleich die Dauer der Symptomatik in keinerlei Zusammenhang zu den CXCL-13-Werten steht. Auch für *Treponema pallidum* steht CXCL-13 als Biomarker im Raum. (126,127)

Für mykobakterielle Entzündungen des Hirns und seiner Häute könnte ein Protein namens Rv2623 als Biomarker verwendet werden. Es stellt einen Bestandteil von *M. Tuberculosis* selbst dar. (128)

(1,3)- β -d-Glucan (BDG) kommt in den Zellwänden von Pilzen vor, wovon Kryptokokken allerdings ebenso wie Schleimpilze ausgenommen sind. Überraschenderweise sind die

Liquorkonzentrationen von BDG auch bei Kryptokokkeninfektionen erhöht, wenngleich in wesentlich geringerer Ausprägung als bei anderen Pilzinfektionen. (129) Ein Nutzen von BDG wird für Histoplasmose, Aspergillose und eingeschränkt für Kryptokokkose des Hirns suggeriert. (130)

1.4 Plasmalogene

Um die Wahl der Plasmalogenderivate als potenzielle Biomarker begreifbar zu machen, muss zunächst darauf eingegangen werden, woraus diese entstehen und wie ihre Vorläufermoleküle im Organismus eingebunden sind. Nachfolgend soll ein zusammenfassender Überblick der Plasmalogene gegeben werden.

1.4.1 Definition und prototypische Struktur

Der Begriff Plasmalogen wurde 1924 von Feulgen und Voigt eingeführt. Er diente zunächst dazu, eine Substanz zu beschreiben, welche bei Behandlung mit Säure ein Plasma-Aldehyd entstehen lässt. Erst 1957 wurde durch Marinetti und Erbland aufgeklärt, dass es sich bei den Plasmalogenen um spezielle Glycerophospholipide handelt. Dies sind Fette, deren Grundgerüst von Glycerin, einem einfachen Alkohol, gebildet wird und die eine polare Kopfgruppe in Form von Cholin, Ethanolamin oder seltener Inositol, Serin, oder Threonin tragen. Unterschieden werden die Glycerophospholipide anhand der Substituenten, die an den jeweiligen Seitenketten des Glycerins (Positionen sn-1, sn-2 und sn-3) gebunden sind, wobei die polare Gruppe an Position sn-3 sitzt. (131,132)

Strukturell sind Plasmalogene (bisweilen auch als Plasm~~en~~yl-Glycerophospholipide bezeichnet) im Speziellen dadurch definiert, dass sie eine Enol-Ether-Bindung an der sn-1 Position aufweisen, im Gegensatz zu sogenannten Plasmanyl-Glycerophospholipiden, welche über eine nicht weiter modifizierte Enol-Bindung an dieser Stelle verfügen. Gesättigte oder einfach ungesättigte Fettsäuren sind die Substituenten an der sn-1 Position, während sich an der sn-2 Position mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure oder Docosahexansäure anlagern. Die polaren Kopfgruppen werden in der Regel von Cholin oder Ethanolamin gestellt. (131,132)

1.4.2 Verteilung im menschlichen Organismus

Plasmalogene sind als Bestandteil zellulärer Membranen praktisch im gesamten menschlichen Körper zu finden, wobei etwa fünfzehn bis zwanzig Prozent der Phospholipide auf Plasmalogene entfallen. Im Hirn stellen sie jedoch die dominante Fraktion dar, mit zwischen den unterschiedlichen Regionen variierenden Anteilen, wobei

ihr Anteil in der weißen Substanz des Parietallappens sogar einhundert Prozent erreicht. (131)

Daneben kommen Plasmalogene in subzellulären Membranen, wie der Kernmembran, dem endoplasmatischen Reticulum, dem post-Golgi-Netzwerk, sowie den Mitochondrien vor und sind nicht zuletzt in den Membranen von synaptischen Vesikeln und Sekretgranula enthalten.

Die Menge der in Geweben enthaltenen Plasmalogene zeigt eine deutliche Altersabhängigkeit. Während der Myelination zentraler Bahnen steigt sie etwa erheblich an und sinkt allgemein mit zunehmendem Alter. (131)

1.4.3 Synthese

1.4.3.1 Peroxisomale Schritte

Peroxisomen sind kleine, elektronendichte Zellorganellen, welche eine Reihe von Enzymen enthalten. Diese dienen unter anderem der Synthese komplexer Lipide, wie sie im zentralen Nervensystem im Myelin vorkommen. Daneben wird in den Peroxisomen die Synthese von Docosahexansäure vollendet, welche – wie oben erwähnt – in Plasmalogenen enthalten ist. (133)

Die Plasmalogensynthese beginnt mit Dihydroxyacetonphosphat, welches in den Peroxisomen unter Katalyse durch Glyceronphosphat-O-Acyltransferase und Alkylglyceronphosphatsynthase zu 1-0-Alkyldihydroxyacetonphosphat umgewandelt wird. (131)

1.4.3.2 Schritte im Endoplasmatischen Reticulum

1-0-Alkyldihydroxyacetonphosphat wird im endoplasmatischen Reticulum reduziert und in einer komplexen Kaskade zu 1-0-(1Z-Alkenyl)-2-acyl-sn-Glycerophosphocholin umgewandelt, wobei in einem Zwischenschritt Glycerophosphoethanolamin entsteht. (131)

1.4.4 Funktionen

1.4.4.1 Bestandteil des Myelins und Rolle in der Myelinisierung

Wie oben erwähnt, steigt die Gesamtmenge der Plasmalogene im Hirngewebe während der Myelinisierung der Fasertrakte deutlich an. Entsprechend weist im reifen Cerebrum die weiße Substanz die deutlich höchste Konzentration an Plasmalogenen auf. (131,134)

Im Cerebellum von Mäusen mit einem Mangel an Ether-Lipiden (deren größte Fraktion sind im Gehirn abermals die Plasmalogene) finden sich eine geringere Myelinisierung,

sowie eine dadurch bedingte, herabgesetzte Nervenleitgeschwindigkeit. (135) Außerdem scheinen Plasmalogene direkt an der Koordination der Myelinisierung beteiligt zu sein. Für das periphere Nervensystem gibt es Indizien, dass ein Fehlen von Plasmalogenen die Regeneration von Schwannzellen deutlich beeinträchtigt. (136)

1.4.4.2 Antioxidative Eigenschaften

Bezüglich der möglichen Funktion der Plasmalogene als Scavenger-Moleküle, die freie Radikale, bzw. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) einfangen, besteht bislang keine einhellige Meinung. Was die Reaktivität der Enolether-Bindung anbelangt, so kann gesagt werden, dass diese ein formidables Ziel für Oxidationen durch Sauerstoffradikale abgibt. (132)

Ebenso darf festgestellt werden, dass es in Anwesenheit von Plasmalogenen zu einer geringeren Oxidation anderer Lipidspezies kommt, wobei die Plasmenyl-Glycerophospholipide in dieser Reaktion verbraucht werden. Die dabei entstehenden Produkte könnten allerdings selbst toxische Potenziale entfalten (131,132,137)

Wurde zunächst noch angenommen, dass der Enolether primär oxidiert werde, so wird nun davon ausgegangen dass zunächst die mehrfach ungesättigten Fettsäuren – insbesondere die Arachidonsäure - Ziel der ROS sind und dessen Oxidationsprodukte den Enolether erst in Folge weiter oxidieren. (132)

Die oben genannten chemischen Eigenschaften lassen allerdings keinen sicheren Schluss auf die tatsächliche biologische Bedeutung der Plasmalogene zu. Die derzeitige Datenlage weist die Plasmenyl-Glycerophospholipide jedoch als potente und für das Überleben der Zelle relevante Antioxidantien aus. Zelllinien, etwa, die einen Defekt in der Plasmalogensynthese aufweisen, zeigen sich deutlich sensibler, wenn sie mit Cyanid oder anderen Substanzen behandelt werden, welche die intrazelluläre ROS-Bildung begünstigen und gehen rascher zu Grunde. Bei Substitution der fehlenden Plasmalogene ist ihre Widerstandsfähigkeit gegen die chemische Hypoxie jedoch vergleichbar mit dem Wildtyp. (138) Ähnliches geht aus Studien mit durch Bestrahlung mit UV-Licht erzeugten ROS hervor. (132)

1.4.4.3 Einfluss auf die Membranfluidität

In Vitro lässt sich zeigen, dass Plasmalogene die Fluidität von Lipidmembranen herabsetzen und darüber hinaus zu einem veränderten Gel-zu-flüssig Phasenübergang führen.

Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass Plasmalogene in nicht durch Proteine vermittelten Membranfusionen eine Rolle spielen. Diese Beobachtung wird durch den hohen Gehalt von Plasmalogenen in sekretorischen Granula und synaptischen Vesikeln gestützt. Dafür verantwortlich dürfte die Enolether-Kette an der sn-1 Position sein. (131,132,139)

Das Spaltprodukt Lysoplasmalogen (siehe unten) verflüssigt hingegen die Zellmembran und ist an der Fusionierung von Zellen beteiligt. (140)

1.4.4.4 Beteiligung an zellulären Signalwegen

Das Vorhandensein von Arachidonsäure oder Docosahexansäure an den sn-2 Positionen von Plasmalogenen legt nahe, dass diese als Lager von Mediatorsubstanzen innerhalb der Zellmembran dienen. (132) Schließlich fungiert die Arachidonsäure als Vorläufermolekül für Prostaglandine, Leukotriene und anderer Eicosanoide (proinflammatorische Mediatoren), während die Docosahexansäure den Ausgangspunkt für die Synthese von Resolvinen und Protektinen (antiinflammatorische Mediatoren) bildet. (141) Tatsächlich existiert ein Enzym, welches mittels Hydrolyse im Stande ist, Arachidonsäure, bzw. Docosahexansäure freizusetzen und als plasmalogenselektive Phospholipase A2 (sPLA2) bezeichnet wird. Diese Reaktion führt daneben zur Entstehung von Lysoplasmalogen, welches selbst ebenfalls bioaktiv ist und zu einer intrazellulären Aktivierung der Proteinkinase A führt, welche wiederum mittels Phosphorylierung weiterer Enzyme Signalkaskaden in Gang setzt. (131,132,140)

Außerdem ist gesichert, dass die Hydrolyse von Ethanolamin-Plasmalogenen in neutrophilen Granulozyten zur Bildung von Plättchen aktivierendem Faktor (PAF) führt, der als potenter Mediator in Blutgerinnung und Inflammation auftritt. (142)

Nicht zuletzt scheinen Plasmalogene selbst in der Lage zu sein, in zelluläre Prozesse einzugreifen, etwa indem sie eine mitochondrial induzierte Apoptose hemmen. (143)

1.4.4.5 Rolle bei neuroinflammatorischen Prozessen

Wie bereits angedeutet, sind Plasmalogene auf vielfältige Weise in entzündliche Prozesse verstrickt. Sie dienen als Reservoir für entzündungsfördernde, wie entzündungshemmende Signalmoleküle. In einem komplizierten Zusammenspiel sollen sie so für die Beendigung von Entzündungen im zentralen Nervensystem verantwortlich sein. (141)

Die Plasmalogene selbst scheinen im Gehirn ebenfalls antiinflammatorische Eigenschaften zu besitzen, da sie offenbar in der Lage sind, die entzündliche Antwort von Microglia auf systemisch injizierte Lipopolysaccharide, sowie die Formation von Beta-Amyloid zu reduzieren. (144)

1.4.5 Chlorierte Derivate

In dieser Arbeit wird insbesondere die Eignung eines chlorierten Plasmalogenderivates zum Biomarker untersucht. Im Folgenden soll dargestellt werden, wie derlei Moleküle zustande kommen und warum sie als Biomarker für Entzündungen plausibel scheinen.

1.4.5.1 Bedeutung der Myeloperoxidase

Die Myeloperoxidase ist ein Enzym, das in neutrophilen Granulozyten exprimiert wird. Sie dient in erster Linie der Abwehr phagozytierter, bakterieller Erreger. Dabei werden die Keime zuerst in membranöse Vesikel, sogenannte Phagosomen, aufgenommen. Anschließend wird die Myeloperoxidase, welche sich im ruhenden neutrophilen Granulozyten in Granula des Zytoplasmas befindet, in den phagosomalen Raum abgegeben. Dort entfaltet sie ihre Wirkung und oxidiert Chlorid (nebst Iodid und Thiocyanat). Die entstehende Hypochlorsäure (HOCl) trägt mit hoher Effizienz zur Zerstörung der in den Phagosomen enthaltenen Bakterien bei. (145)

Myeloperoxidase findet sich außerdem in sogenannten neutrophil extracellular traps (NETs), welche ein proteinöses Geflecht darstellen, das neutrophile Granulozyten als Reaktion auf immunologische Stimuli in die Umgebung abgeben können. (146)

Die Hypochlorsäure greift erwiesenermaßen Plasmalogene an und führt zur Formation verschiedener chlorierter Plasmalogenderivate, unter anderem 2-Chlorohexadecanal, 2-Chlorooctadecanal und 2-Chlorooctadecanal. (139)

Da Myeloperoxidase schon vielfach zumindest in durch Lipopolysaccharide verursachten, und autoimmun-entzündlichen Läsionen des zentralen Nervensystems nachgewiesen wurde, mutet ein erhöhtes Vorkommen dieses Enzyms in infektiös-entzündlichen Herden von Gehirn und Rückenmark ebenfalls plausibel an. (147,148,149) Dass die Aktivität der Myeloperoxidase (angezeigt entweder durch systemische Inflammation oder direkte Stimulation neutrophiler Granulozyten) zur Formation chlorierter Plasmalogenderivate führt, welche folglich geeignete Biomarker darstellen dürften, konnte ebenfalls mehrfach bestätigt werden. (149,150)

1.4.5.2 2-Chlorohexadecanal

Im Mausmodell konnte die Formation von 2-Chlorohexadecanal (2-ClHDA) im Rahmen einer durch Lipopolysaccharid-Injektion verursachten Neuroinflammation nachgewiesen werden. Dies wird auf die Aktivität der Myeloperoxidase (siehe oben) zurückgeführt: Die Hypochlorsäure attackiert Plasmalogene an ihrer Enoether-Bindung und führt zur Bildung von 2-Chloroaldehyden, zu denen auch 2-ClHDA gezählt wird. (151)

Dieses hat selbst einen biologischen Effekt und kompromittiert die Blut-Hirn-Schranke. (149) Außerdem wird ihm eine chemotaktische Wirkung zugesprochen. (152)

Im Hirn der Versuchstiere ließ sich 2-CIHDA darüber hinaus in erhöhten Konzentrationen bis zu achtundvierzig Stunden nach Auslösung der systemischen Entzündung nachweisen. (149)

Neutrophile Granulozyten, ebenso wie Endothelzellen von Koronargefäßen sind in der Lage, 2-CIHDA zu 2-Chlorohexadecansäure (2-CIHA) umzuwandeln und in die Umgebung zu sezernieren. Diese chlorierte Fettsäure dient nebst Fettalkoholen als Ausgangsprodukt für die weiteren Stoffwechselwege von 2-CIHDA. (153)

1.4.5.3 2-Chloradipinsäure

2-Chloradipinsäure (2-Chloro-1,6-Hexandisäure, 2-ClAdA) konnte als Metabolit von 2-CIHA identifiziert werden. Dabei wird 2-CIHA in humanen Leberzellen unter Katalyse von Cytochrom P450 zunächst an der Gamma-Position oxidiert, was zur Entstehung von ω -hydroxy-2CIHA führt. Dieses wird über weitere Zwischenschritte in 2-Chlorohexa-(1,16)-diansäure (2-CIHDDA) umgewandelt. In einer letzten Serie von Beta-Oxidationen entsteht zunächst 2-Chloro-1,14-Tetradecandisäure (2-CITDDA) und daraus schließlich 2-ClAdA. (154)

Dass dieser Metabolismus auch in vivo eine Rolle spielt, konnte ebenfalls im Tiermodell nachgewiesen werden. So erreichten die Konzentrationen von 2-ClAdA im Urin von Ratten, denen intraperitoneal 2-CIHA injiziert worden war, nach etwa zwei Stunden einen Gipfel. Im Plasma hingegen war ein derartig vermehrter Anfall von 2-ClAdA nicht messbar, sodass auf eine besonders effiziente Ausscheidung geschlossen werden kann. (154)

2 Material und Methoden

2.1 Kohorte

Es wurden 42 Liquor- und dazu korrespondierende Serumproben der Universitätsklinik für Neurologie, Medizinische Universität Graz, akquiriert. Insgesamt entstand so eine Kohorte aus 42 Patienten und Patientinnen, wovon 22 als entzündlich und 20 als nichtentzündlich eingestuft wurden. Für die Zuordnung zur entzündlichen Gruppe wurde eine Zellzahl im Liquor von >4 Zellen/ μl als Kriterium verwendet, wobei das Minimum bei 50 Zellen/ μl und das Maximum bei 16000 Zellen/ μl lag. Eine weitere Einteilung innerhalb dieser Gruppe wurde anhand der Zellbilder vorgenommen, sodass drei Subgruppen entstanden (Abb.1).

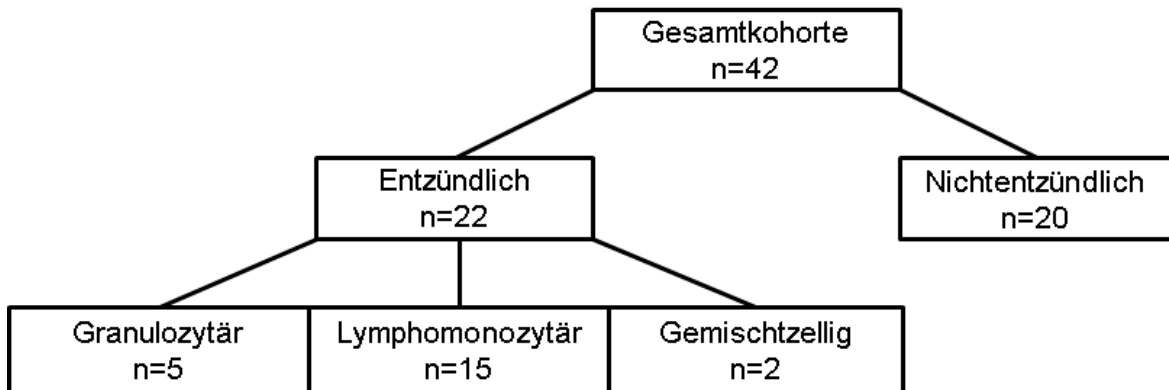


Abbildung 1: Darstellung der Kohortenzusammensetzung in einem Flussdiagramm.

In erster Linie, jedoch nicht ausschließlich, waren die entzündlichen Veränderungen der Liquores auf infektiöse Erkrankungen zurückzuführen.

Innerhalb der granulozytären Subgruppe fanden sich 2 eitrige Meningitiden, 1 bakterielle Meningoenzephalitis, sowie 2 Ventrikulitiden.

Die lymphomonozytären Subgruppe setzte sich aus 2 Enzephalitiden, 6 Meningitiden, 3 Meningoenzephalitiden, 1 Multiplen Sklerose und 3 unterschiedlichen Manifestationen einer Neuroborreliose (1 Polyradikulitis, 1 periphere Fazialisparese, 1 Meningitis) zusammen.

Die gemischtzellige Subgruppe enthielt 1 Meningitis, sowie 1 Meningoenzephalitis.

Als Diagnosen fanden sich in der nichtentzündlichen Gruppe 7 periphere Nervenläsionen, 11 sensible, sensorische oder motorische Beschwerden ohne eindeutig objektivierbares morphologisches Korrelat, sowie 1 axonale, sensomotorische Polyneuropathie und ein primärer Kopfschmerz.

Eine Übersicht der Diagnosen und zugehörigen Zellbilder findet sich in Tabelle 1:

| n = 42 | Enddiagnose | Gz. | Lmz. | Gem. | Gesamt |
|-------------------------|--|------------|-------------|-------------|---------------|
| Entzündlich | Meningitis | 2 | 6 | 1 | 9 |
| | Enzephalitis | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | Meningoenzephalitis | 1 | 3 | 1 | 5 |
| | Ventrikulitis | 2 | 0 | 0 | 2 |
| | Neuroborreliose | 0 | 3 | 0 | 3 |
| | Multiple Sklerose | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | Gesamt | 5 | 15 | 2 | 22 |
| Nichtentzündlich | Periphere Nervenläsion | | | | 7 |
| | Beschwerden ohne eindeutiges organisches Korrelat | | | | 11 |
| | Polyneuropathie | | | | 1 |
| | Primärer Kopfschmerz | | | | 1 |
| | Gesamt | | | | 20 |

Tabelle 1: Aufschlüsselung der Kohorte nach Diagnosen und Zellbildern. Gz: granulozytär, Lmz: lymphomonozytär, Gem.: gemischtzellig.

2.2 Klinische Daten

Die Klinischen Daten wurden für die jeweiligen Patienten und Patientinnen retrospektiv aus dem Medocs-Krankenhausinformationssystem der steirischen KAGes und dem ArchiMed-Informationssystem entnommen. Dabei wurden Alter zum Zeitpunkt der Probenentnahme, Geschlecht, Liquorbefunde (native Färbung, Zellzahl, Anzahl der Erythrozyten im Liquor, Laktatkonzentration, Gesamteiweißgehalt, Albuminkonzentration, Albuminquotient, IgA-, IgG- und IgM- Indices, sowie Ergebnisse etwaiger isoelektrischer Fokussierungen), Verdachtsdiagnose (Anlass der Liquorpunktion), endgültige Diagnose, Vorerkrankungen, Medikation, sowie Erregernachweise und Serumbefunde (Leukozytenzahl, Anteil der Neutrophilen Granulozyten, Kreatiningehalt, errechnete GFR, gamma-GT, AST, ALT, sowie CRP) erhoben.

2.3 Proben

Sämtliche Proben wurden zwischen 2006 und 2013 akquiriert. Per Lumbalpunktion wurden 8-10ml Liquor Cerebrospinalis gewonnen. Der nicht zur Routinediagnostik

verwendete Überschuss wurde bei -80°C gelagert. Serumproben im Umfang von 8 ml/Probe wurden parallel abgenommen und gleichermaßen eingelagert.

Die Zellzahl im Liquor wurde mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Kammer von biomedizinischen Analytikerinnen der Universitätsklinik für Neurologie, Graz ausgezählt. Albumin- und Immunglobulingehalt wurden mittels Nephelometrie unter Verwendung eines Analysegeräts Beckman Coulter Image 800 (Beckman Coulter Inc, Brea, USA) bestimmt. Der Albuminquotient wurde anhand der im Kapitel Liquordiagnostik erörterten Formel errechnet und so die Intaktheit der Blut-Hirn-Schranke überprüft. (121) Durch Errechnung der jeweiligen Immunglobulinindices (IgM, IgA, IgG) wurde eine mögliche intrathekale Synthese derselben untersucht. (155) Bei einigen Patienten und Patientinnen wurden darüber hinaus isoelektrische Fokussierungen von Liquor und Serum durchgeführt. (156)

2.4 Messung

Die Messung erfolgte, wie andernorts beschrieben (154). In Kürze zusammengefasst wurden zu 1 nl der Probe 500 μl destilliertes Wasser, 1 ml Ethylacetat, 200 μl Salzsäure (HCl) und 50 ng d_{10} -Adipinsäure hinzugefügt, wobei letztere als stabiler, isotopenmarkierter interner Standard diente. Die so präparierten Proben wurden anschließend 2 Minuten am Vortex extrahiert. Dem folgte eine Zentrifugation bei 18°C und 3000 rpm (Umdrehungen/Minute) für insgesamt 10 Minuten. Anschließend wurde die Ethylacetatfraktion entfernt und die wässrige Phase mit je 1 ml Ethylacetat 2 mal nachgespült, wonach die Vereinigung der Ethylacetatfraktionen erfolgte und diese unter N_2 getrocknet wurden.

Nach Versetzung mit 100 μl 7,5%igem Pentafluorbenzylbromid in Aceton als Derivatisierungsreagenz und 20 μl Diisopropylethylamin wurden die Proben gevortext und eine Stunde lang bei 45°C derivatisiert. Nach neuerlicher Trocknung unter N_2 wurden die Proben in 100 μl Ethylacetat resuspendiert. 1 μl dieser Mischung wurde dann zur Analyse mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) verwendet. Zur Analyse wurde ein Thermo Scientific Trace GC Ultra (Helium als Trägergas, 2ml/min; SGE BPX5 Kapillarsäule, 15m, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 μm Methylsilikonbeschichtung), welcher mit einem DSQII Massenspektrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) verbunden war, verwendet. Die Injektortemperatur lag bei 230°C und die Ionenquellentemperatur bei 225°C . Es kam ein Temperaturprogramm nach folgendem Regime zur Anwendung: $150^{\circ}\text{C}/3,5$ min; $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf 280°C , $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf 310°C , wobei die Schlusstemperatur noch für 1min gehalten wurde. Zur Darstellung und

Dokumentation der Spektren wurde die negative chemische Ionisation mit Methan als Reaktionsgas im Scan- oder „selected ion monitoring“-Modus (SIM, $m/z=358$ und 360) angewandt. Durch den Peakflächenvergleich mit 50ng/Probe stabiler, deuterierter Adipinsäure (d_{10} -AdA) – dem internen Standard – konnte schließlich eine Quantifizierung vorgenommen werden.

2.5 Statistische Auswertung

Sämtliche Berechnungen und statistische Analysen wurden mithilfe des Statistikprogrammes SPSS Statistics (IBM Corporation, Armonk, New York, USA, Version 23) und des Grafikprogrammes SigmaPlot (Systat Software Inc., Chicago, Illinois, USA, Version 13) durchgeführt. Die Daten wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests auf Normalverteilung untersucht. Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test angestellt, die Geschlechtsverteilung zwischen den Gruppen wurde mittels Fishers exaktem Test überprüft. Korrelationen wurden mittels Berechnung des Spearman-Koeffizienten eruiert. P-Werte von $<0,05$ wurden als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

Eine zusammenfassende Darstellung der Kohorte bezüglich demographischer Faktoren, Liquorroutinebefunden und unseren Messergebnissen zeigt Tabelle 2:

| | Entzündlich(n=22) | Nichtentzündlich(n=20) | p-Wert |
|---|------------------------|------------------------|--------|
| weiblich (Anzahl)^a | 13 (59%) | 12 (60%) | ns |
| Alter (Jahre)^b | 51,3 (18,8) | 41,1 (14,6) | ns |
| Zellzahl (n/μl)^c | 74,5 (54,0-355,0) | 3,0 (2,0-3,0) | <0,001 |
| Q(Alb)*10³ ^c | 14,1 (9,0-25,8) | 5,3 (4,1-5,8) | <0,001 |
| Laktat (mmol/l)^c | 2,1 (1,6-3,6) | 1,5 (1,4-1,6) | <0,01 |
| IgG-Index^c | 0,6 (0,5-0,8) | 0,5 (0,4-0,6) | <0,01 |
| IgM-Index^c | 0,3 (0,2-0,4) | 0,09 (0,06-0,14) | <0,001 |
| IgA-Index^c | 0,4 (0,3-0,5) | 0,3 (0,2-0,3) | <0,001 |
| [L] 2-ClAdA (pg/ml)^c | 454,9 (364,1-573,4) | 436,6 (413,6-521,2) | ns |
| [S] 2-ClAdA (pg/ml)^c | 2135,6 (1711,3-2662,8) | 2510,0 (1207,3-2781,4) | ns |
| I(2ClAdA)^c | 12,4 (6,9-27,9) | 51,2 (28,6-75,7) | <0,001 |

Tabelle 2: Übersicht der Kohorte nach demographischen Faktoren, Liquorbefunden und unseren Messergebnissen. Die Werte sind als ^aAnzahl (prozentueller Anteil), ^bMittelwert (Standardabweichung) und ^cMedian (Interquartilabstand) angegeben.

Q(Alb): Albuminquotient, [L] 2-ClAdA: Konzentration von 2-ClAdA im Liquor, [S] 2-ClAdA: Konzentration von 2-ClAdA im Serum, I(2ClAdA): 2-ClAdA-Index, ns: nicht signifikant.

3.1 2-ClAdA -Konzentrationen in Serum und Liquor und abgeleitete Parameter

Unsere Auswertungen ergaben, dass die beiden Gruppen hinsichtlich Liquorroutineparametern wie Zellzahl im Liquor, Albuminquotient, Laktatkonzentration im Liquor und Ig-Indices signifikant unterschiedlich waren. Bezüglich der bloßen Serum- und Liquorkonzentrationen von 2-ClAdA fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen entzündlicher und nichtentzündlicher Gruppe (Tab.2). Serum- und Liquorkonzentration waren über die Gesamtkohorte gerechnet nicht signifikant korreliert.

Das Alter der Patienten und Patientinnen hatte über die Gesamtkohorte gerechnet keinen signifikanten Einfluss auf die 2-ClAdA-Konzentrationen in Serum und Liquor. Ebenso konnten wir zwischen Geschlecht und 2-ClAdA-Konzentrationen in Serum und Liquor innerhalb der Gesamtkohorte keinen signifikanten Unterschied ausmachen.

Um für Hirnschrankenstörungen zu korrigieren wurde zunächst der Liquor/Serum-Quotient nach der Formel $\frac{[2ClAdA(Liquor)]}{[2ClAdA(Serum)]} = Q(2ClAdA)$ und mit dessen Hilfe anschließend der entsprechende Index nach der Formel $\frac{Q(2ClAdA)}{Q(Alb)} = I(2ClAdA)$ in Analogie zu den Ig-Indices berechnet. (155) Es zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen hinsichtlich des 2-ClAdA-Index ($p < 0,001$) (Abb.2).

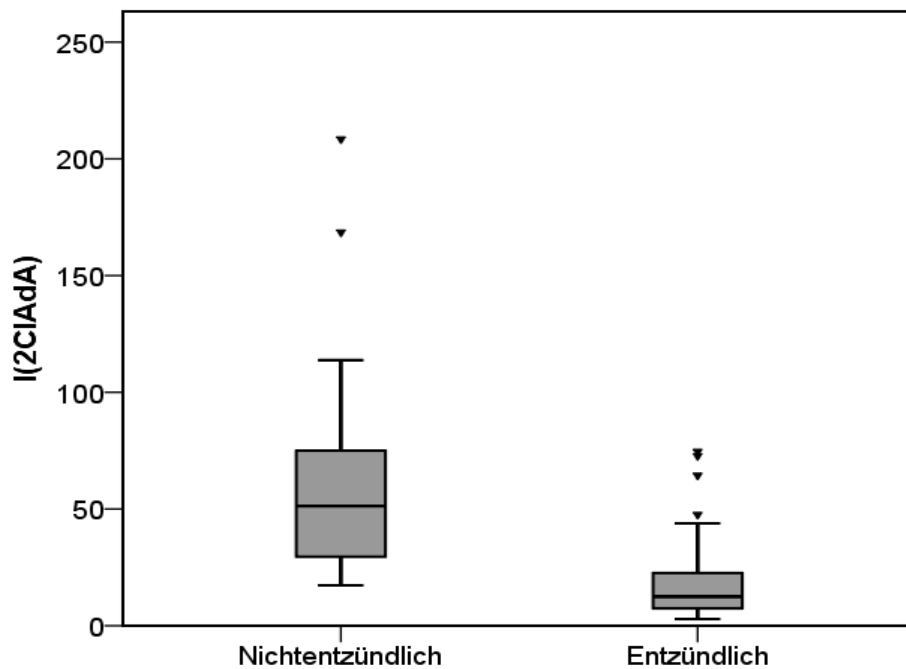


Abbildung 2: Vergleich der beiden Gruppen bezüglich I(2CIAdA). Innerhalb der entzündlichen Gruppe ist I(2CIAdA) signifikant niedriger. ($p < 0,001$)

3.2 Korrelationen zwischen I(2CIAdA) und Routineliquorparametern

Aufgrund des deutlich unterschiedlichen I(2CIAdA) wurden Korrelationen desselben mit Routineliquorparametern der Liquordiagnostik untersucht. Dabei konnten wir feststellen, dass I(2CIAdA) mit der Zellzahl ($r = -0,538$; $p < 0,001$) (Abb.3) und der Laktatkonzentration im Liquor ($r = -0,390$; $p < 0,05$) (Abb.4) bei Rechnung über die gesamte Kohorte signifikant korrelierte.

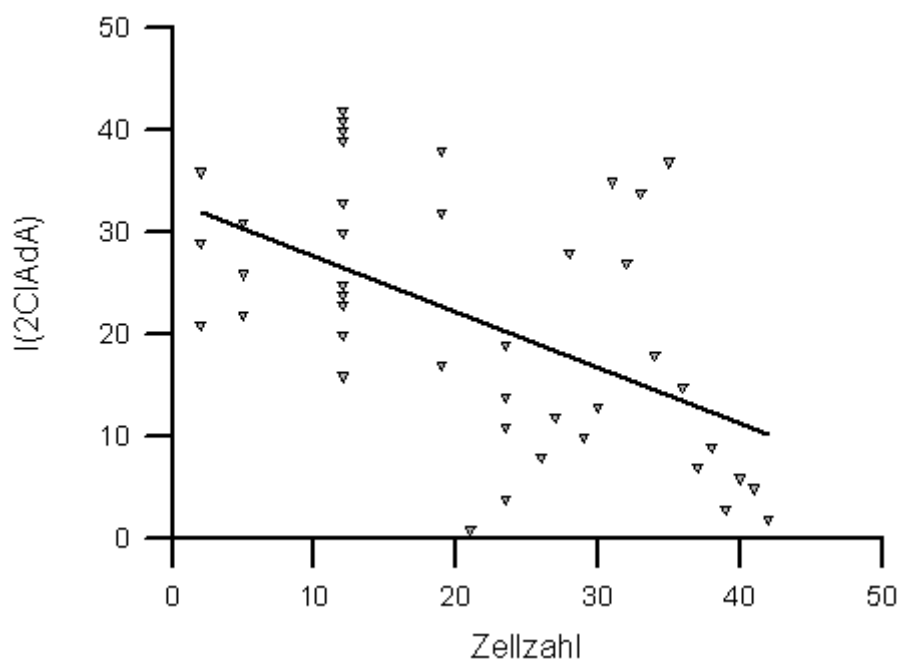


Abbildung 3: Korrelation von I(2CIAdA) mit der Zellzahl im Liquor ($r = -0,538$; $p < 0,001$). Aufgrund der enormen Streuung der Werte wurden für diese Grafik Rangzahlen zur übersichtlicheren Darstellung verwendet.

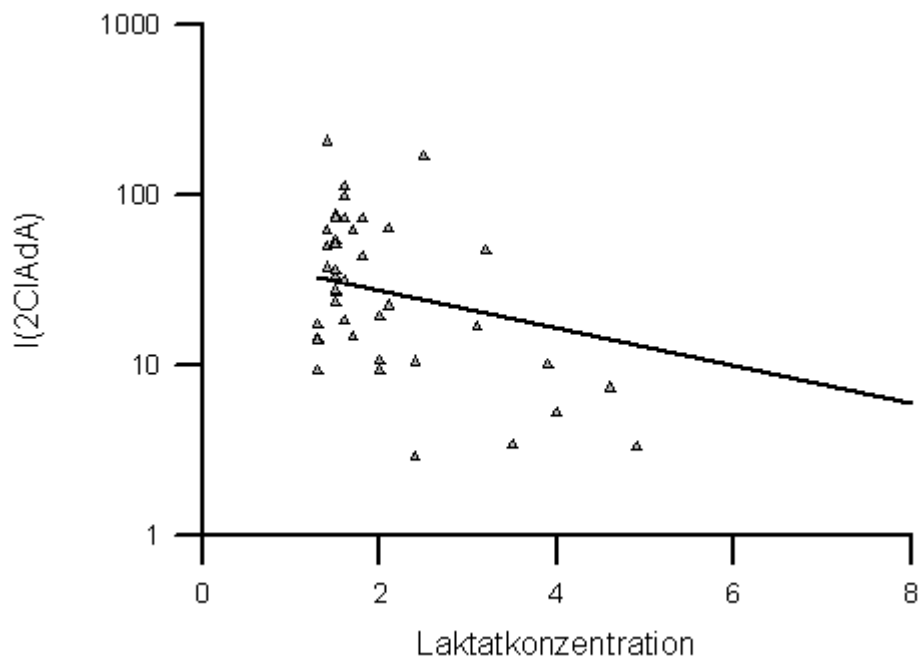


Abbildung 4: Korrelation zwischen I(2CIAdA) und der Laktatkonzentration im Liquor ($r = -0,390$; $p < 0,05$)
 Ein einzelner Ausreißer mit einer Laktatkonzentration von 14,8 mmol/l ist in dieser Grafik nicht zu sehen.

Ähnlich verhielt es sich mit dem IgM-Index ($r = -0,539$; $p < 0,001$) und mit dem IgA-Index ($r = -0,480$; $p < 0,01$) (Abb.4). Für den IgG-Index konnten wir eine solche Korrelation jedoch nicht feststellen.

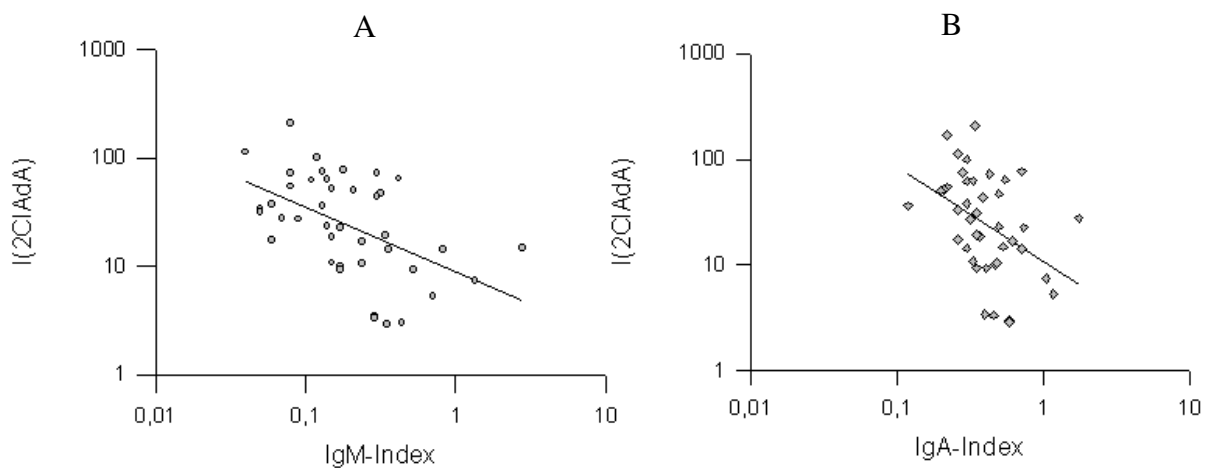


Abbildung 4: Korrelation des 2-CIAdA-Index mit IgM- ($r = -0,539$; $p < 0,001$) (A) und IgA-Index ($r = -0,480$; $p < 0,01$) (B).

4 Diskussion

4.1 Entstehung von 2-ClAdA im Rahmen von Entzündung

Bei infektiösen Entzündungen des Gehirns und seiner Häute kommt es unabhängig vom Erreger zunächst zu einem Einwandern neutrophiler Granulozyten in den Liquorraum. (122) Diese nutzen das in den zytoplasmatischen Granula enthaltene Enzym Myeloperoxidase (MPO) nicht nur zur Elimination von phagozytierten Mikroorganismen, sondern können es auch in Form sogenannter NETs (neutrophil extracellular traps) in die Umgebung abgeben. Die Myeloperoxidase ihrerseits oxidiert Chlorid und lässt so Hypochlorsäure (HOCl) entstehen. (145,146) Hypochlorsäure ist ein wesentliches Agens bei der Zerstörung eingedrungener Keime, attackiert jedoch auch Plasmalogene. (145, 139) Diese Glycerophospholipidspezies kommt im gesamten menschlichen Organismus in zellulären Membranen vor, findet sich aber in besonders hohen Mengen in der weißen Substanz des zentralen Nervensystems. (131) Der Angriff der Hypochlorsäure lässt nun nebst anderen chlorierten Plasmalogenderivaten 2-Chlorohexadecanal (2-ClHDA) entstehen. (139) Neutrophile Granulozyten können dann 2-ClHDA zu 2-Chlorohexadecansäure (2-ClHA) umwandeln. (153) 2-ClHA kann schließlich über eine Reihe oxidativer Zwischenschritte zu 2-Chloradipinsäure (2-ClAdA) transformiert werden. Dieser Metabolismus von 2-ClHA konnte zumindest für humane Leberzellen gezeigt werden. (154) Auch bei autoimmunentzündlichen Prozessen spielt die MPO eine Rolle, sodass das sich Potential von chlorierten Plasmalogenderivaten als Biomarker nicht auf infektiös-entzündliche Erkrankungen beschränkt. (147,148,149)

Es konnte bereits von Michael et al. in einer klinischen Studie demonstriert werden, dass MPO-Konzentrationen mit entzündlicher Aktivität und besonders im Liquor mit der Zahl neutrophiler Granulozyten korrelieren, wobei jedoch festgestellt wurde, dass bei infektiösen Enzephalitiden und solcher unklarer Ätiologie tendenziell höhere Spiegel anzutreffen waren, als bei autoimmunmedierten Prozessen. Darüberhinaus korrelieren MPO-Spiegel von Serum und Liquor signifikant miteinander. (157)

4.2 2-ClAdA-Konzentrationen in Serum und Liquor und abgeleitete Parameter

Zwar konnten wir zwischen entzündlicher und nichtentzündlicher Gruppe bezüglich der bloßen Konzentrationen von 2-ClAdA in Serum und Liquor keinen signifikanten Unterschied feststellen, jedoch ergab sich ein solcher für I(2ClAdA). Wir berechneten den Index, da bei intrathekalen Entzündungen von einer Hirnschrankenstörung ausgegangen

werden muss, wie sie durch eine Erhöhung des Albuminquotienten angezeigt wird und wie wir sie auch für unsere entzündliche Gruppe fanden (Tab.2). Diese Schrankenfunktionsstörung führt zu einem vermehrten Übertritt von Substanzen aus dem Blut in den Liquor. Um nun für eine etwaige Verfälschung der Liquorkonzentrationen von 2-ClAdA durch die im Serum synthetisierte 2-ClAdA zu korrigieren, setzten wir – analog zu den Immunglobulinindices – den 2-ClAdA-Quotienten in Verhältnis zum Albuminquotienten und damit zur Schrankenstörung nach der Formel $\frac{Q(2ClAdA)}{Q(Alb)} = I(2ClAdA)$. (120,155) Dabei stellten wir fest, dass $I(2ClAdA)$ in der entzündlichen Gruppe deutlich niedriger ausfiel als in der nichtentzündlichen. Dieser Befund steht in Widerspruch zu unserer Hypothese, wonach höhere Konzentrationen von 2-ClAdA bei intrathekaler Entzündung im Liquor zu erwarten wären, wird jedoch durch die gegenläufigen Korrelationen von $I(2ClAdA)$ mit anderen Entzündungsparametern wie Zellzahl im Liquor, Laktatkonzentration im Liquor und IgM- und IgA-Indices gestützt. Dies verweist in Zusammenschau auf eine andere Regulation von 2-ClAdA als die von uns angenommene.

Wir konnten außerdem bestätigen, dass 2-ClAdA im Menschen auch unter nichtentzündlichen Bedingungen in messbaren Mengen im Serum vorkommt und diesen Befund auch auf den Liquor erweitern. Ebenso konnten wir in einer ersten Annäherung das Verhältnis zwischen Serum- und Liquorkonzentration von 2-ClAdA aufdecken. So finden sich im Serum wesentlich höhere Konzentrationen, was auf einen vermehrten Anfall durch den hepatischen Metabolismus zurückzuführen sein könnte. (154)

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Wir konnten zeigen, dass $I(2ClAdA)$ bei intrathekaler Entzündung sinkt und gegenläufig mit etablierten Parametern der Entzündung im Liquor, wie Laktatkonzentration, Zellzahl und Ig-Indices korreliert. Daneben konnten wir die Ergebnisse von Brahmhatt et al. bestätigen, wonach 2-ClAdA auch unter nichtentzündlichen Bedingungen im humanen Serum zu finden ist und diese Feststellung auf den Liquor erweitern. (154)

Unsere Arbeit unterlag einigen Einschränkungen. So verfügten wir nur über eine kleine Kohorte, welche außerdem eine hohe Heterogenität aufwies. Dementsprechend war es uns noch nicht möglich, eine Beziehung zwischen bestimmten Zellbildern und 2-ClAdA-Konzentrationen, bzw. -Indices zu etablieren. Dennoch sind wir der Ansicht, mit unserer Arbeit eine gute Basis für weitere Forschungen geschaffen zu haben. Darüber hinaus gab

es bislang noch keine Informationen über die Rolle von 2-ClAdA als Entzündungsmarker, sodass wir erstmals diese Frage adressieren konnten.

Es bräuchte in Zukunft größere Kohorten, die eine Unterteilung in entzündliche Subgruppen nach Zellbild und Ätiologie erlauben, sodass neben autoimmunologischen und infektiös-inflammatorischen Prozessen auch granulozytäre, lymphomonozytäre und gemischtzellige Pleozytosen bezüglich ihrer 2-ClAdA-Konzentrationen und den daraus abgeleiteten Parametern verglichen, sowie etwaige Korrelationen untersucht werden können. Eine gleichzeitige Messung von MPO-Konzentrationen könnte zudem wichtige zusätzliche Informationen erbringen, um die Beziehung des Enzyms zu 2-ClAdA in vivo zu untersuchen.

Abschließend kann gesagt werden, dass mit unserer Arbeit der Grundstein für weitere Untersuchungen gelegt ist, derer es allerdings mit Sicherheit bedarf, um die Qualitäten von 2-ClAdA und möglicherweise auch anderen chlorierten Plasmalogenderivaten als Biomarker für den klinischen Gebrauch zu erarbeiten.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Böcker W, Denk H, Moch H, Herausgeber. Pathologie. 4. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag. 2008.
- [2] Hufschmidt A, Lücking CH, Rauer S, Herausgeber. Neurologie compact. 6. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 2013.
- [3] Baumhackl U, Eibl G, Ganzinger U, Hartung HP, Mamoli B, Pfeiffer KP, Fazekas F, Vass K. Prevalence of Multiple Sclerosis in Austria. Results of a Nationwide Survey. *Neuroepidemiology*. 2002; 21:226-234.
- [4] Masuhr KF, Masuhr F, Neumann M. Duale Reihe Neurologie. 7. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 2013.
- [5] Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2012; 122(4):1180-1188.
- [6] Wu GF, Alvarez E. The immuno-pathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 2011; 29(2):257-278.
- [7] Owens GP, Gilden D, Burgoon MP, Yu X, Bennett JL. Viruses and Multiple Sclerosis. *Neuroscientist*. 2011; 17(6):659-676.
- [8] Jarius S, Wildemann B, Paul F. Neuromyelitis optica: clinical features, immunopathogenesis and treatment. *Clin Exp Immunol*. 2014; 176(2):149-164.
- [9] Bukhari W, Barnett MH, Prain K, Broadley SA. Molecular Pathogenesis of Neuromyelitis Optica. *Int J Mol Sci*. 2012; 13(10):12970-12993.
- [10] Lancaster E. The Diagnosis and Treatment of Autoimmune Encephalitis. *J Clin Neurol*. 2016; 12(1): 1-13.
- [11] Lancaster E, Dalmau J. Neuronal autoantigens – pathogenesis, associated disorders and antibody testing. *Nat Rev Neurol*. 2012; 8(7): 380-390.
- [12] Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, Dessain SK, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Lynch DR. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol*. 2008; 7(12):1091-1098.
- [13] Armangue T, Leypoldt F, Dalmau J. Auto-immune encephalitis as differential diagnosis of infectious encephalitis. *Curr Opin Neurol*. 2014; 27(3):361-368.
- [14] Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WST, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrazek R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000; 21(3):383-421.
- [15] Komine O, Yamanaka K. Neuroinflammation in motor neuron disease. *Nagoya J Med Sci*. 2015; 77(4):537-549.
- [16] Pintado C, Gavilán MP, Gavilán E, García-Cuervo L, Gutiérrez A, Vitorica J, Castaño A, Ríos RM, Ruano D. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation leads to the accumulation of ubiquitinated proteins and increases susceptibility to neurodegeneration induced by proteasome inhibition in rat hippocampus. *J Neuroinflammation*. 2012; 9:87.
- [17] Mayer CL, Huber BR, Peskind E. Traumatic Brain Injury, Neuroinflammation, and Post-Traumatic Headaches. *Headache*. 2013; 53(9): 1523-1530.
- [18] Johnson VE, Stewart JE, Begbie FD, Trojanowski JQ, Smith DH, Stewart W. Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. *Brain*. 2013; 136(1): 28-42.
- [19] Acosta SA, Tajiri N, Shinozuka K, Ishikawa H, Grimmig B, Diamond D, Sanberg PR, Bickford PC, Kaneko Y, Borlongan CV. Long-Term Upregulation of Inflammation and Suppression of Cell Proliferation in the Brain of Adult Rats Exposed to Traumatic Brain Injury Using the Controlled Cortical Impact Model. *PLoS One*. 2013; 8(1):e53376.
- [20] Tobin MK, Bonds JA, Minshall RD, Pelligrino DA, Testai FD, Lazarov O. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014; 34(10): 1573-1584.
- [21] Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013; 6(5): 834-851.
- [22] Hof H, Dörries R, Geginat G, Schlüter D, Wendt C. Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie. 5 überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 2014.
- [23] Mumenthaler M, Mattle H. Neurologie. 12. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 2008.
- [24] Hoffman O, Weber JR. Pathophysiology and treatment of bacterial meningitis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2009; 2(6): 401-412.
- [25] Doran KS, Fulde M, Gratz N, Brandon JK, Nau R, Nemani P, Schubert-Unkmeir A, Tuomanen EI, Valentin-Weigand P. Host-pathogen interactions in bacterial meningitis. *Acta Neuropath*. 2016; 131:185-209.

- [26] Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, van de Beek D. Pathogenesis and Pathophysiology of Pneumococcal Meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24(3):557-591.
- [27] Hill DJ, Griffiths NJ, Borodina E, Virji M. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. *Clin Sci (Lond).* 2010; 118(9): 547-565.
- [28] Tunkel AR, Scheld WM. Pathogenesis and Pathophysiology of Bacterial Meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 118-136.
- [29] Gilsdorf JR, McCrea KW, Marrs CF. Role of pili in *Haemophilus influenzae* adherence and colonization. *Infect Immun.* 1997; 65(8):2997-3002.
- [30] Virkola R, Brummer M, Rauvala H, van Alphen L, Korhonen TK. Interaction of Fimbriae of *Haemophilus influenzae* Type B with Heparin-Binding Extracellular Matrix Proteins. *Infect Immun.* 2000; 68(10):5696-5701.
- [31] Zhang JR, Mostov KE, Lamm ME, Nanno M, Shimida S, Ohwaki M, Tuomanen E. The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell.* 2000; 102(6): 827-837.
- [32] Attali C, Frolet C, Durmort C, Offant J, Vernet T, Di Guilmi AM. *Streptococcus pneumoniae* Choline-Binding Protein E Interaction with Plasminogen/Plasmin Stimulates Migration across the Extracellular Matrix. *Infect Immun.* 2008; 76(2):466-476.
- [33] Pulzova L, Bhide MR, Andrej K. Pathogen translocation across the blood-brain barrier. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009; 57(3):203-213.
- [34] Iovino F, Orihuela CJ, Moorlag HE, Molema G, Bijlsma JJE. Interactions between Blood-Borne *Streptococcus pneumoniae* and the Blood-Brain Barrier Preceding Meningitis. *PLoS One.* 2013; 8(7):e68408.
- [35] van Sorge NM, Doran KS. Defense at the border: the blood-brain barrier versus bacterial foreigners. *Future Microbiol.* 2012; 7(3):383-394.
- [36] Coureuil M, Join-Lambert O, Lécuyer H, Bourdoulous S, Marullo S, Nassif X. Mechanism of meningeal invasion by *Neisseria meningitidis*. *Virulence.* 2012; 3(2):164-172.
- [37] Schwerk C, Papandreou T, Schuhmann D, Nickol L, Borkowski J, Steinmann U, Quednau N, Stump C, Weiss C, Berger J, Wolburg H, Claus H, Vogel U, Ishikawa H, Tenenbaum T, Schroten H. Polar Invasion and Translocation of *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus suis* in a Novel Human Model of Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. *Plos One.* 2012; 7(1): e30069.
- [38] Dando SJ, Mackay-Sim A, Norton R, Currie BJ, John JAS, Ekberg JAK, Batzloff M, Ulett GC, Beacham IR. Pathogens Penetrating the Central Nervous System: Infection Pathways and the Cellular and Molecular Mechanisms of Invasion. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 24(4):691-726.
- [39] Rock RB, Gekker G, Hu S, Wheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK. Role of Microglia in Central Nervous System Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17(4):942-964.
- [40] Mariani MM, Kielian T. Microglia in Infectious Diseases of the Central Nervous System. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009; 4(4): 338-461.
- [41] Steinmann U, Borkowski J, Wolburg H, Schröppel B, Findeisen P, Weiss C, Ishikawa H, Schwerk C, Schroten H, Tenenbaum T. Transmigration of polymorphonuclear neutrophils and monocytes through the human blood-cerebrospinal fluid barrier after bacterial infection in vitro. *J Neuroinflammation.* 2013; 10:31.
- [42] Kleine TO, Benes L. Immune surveillance of the human central nervous system (CNS): different migration pathways of immune cells through the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier in healthy persons. *Cytometry A.* 2006;69(3):147-151.
- [43] Tuomanen EI, Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, Wright SD. Reduction of inflammation, tissue damage, and mortality in bacterial meningitis in rabbits treated with monoclonal antibodies against adhesion-promoting receptors of leukocytes. *J Exp Med.* 1989; 170(3): 959-969.
- [44] Hoffmann O, Priller J, Prozorovskii T, Schulze-Toppf U, Baeva N, Lunemann JD, Aktas O, Mahrhofer C, Stricker S, Zipp F, Weber JR. TRAIL limits excessive host immune responses in bacterial meningitis. *J Clin Invest.* 2007; 117: 2004-2013.
- [45] Scheld MW, Koedel U, Nathan B, Pfister H. Pathophysiology of Bacterial Meningitis: Mechanism(s) of Neuronal Injury. *J Infect Dis.* 2002; 186(2):225-233.
- [46] Geldhoff M, Mook-Kanamori BB, Brouwer MC, Troost D, Leemans JC, Flavell RA, Van der Ende A, Van der Poll T, Van de Beek D. Inflammasome activation mediates inflammation and outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis. *BMC Infect Dis.* 2013; 13:358.
- [47] McNeela EA, Burke A, Neill DR, Baxter C, Fernandes VE, Ferreira D, Smeaton S, El-Rachkidy R, McLoughlin RM, Mori A, Moran B, Fitzgerald KA, Tschoop J, Pétrilli V, Andrew PW, Kadioglu A, Lavelle EC. Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog.* 2010; 6(11): e1001191.

- [48] Mook-Kanamori B, Geldhoff M, Troost D, van der Poll T, van de Beek D. Characterization of a pneumococcal meningitis mouse model. *BMC Infect Dis.* 2012; 12:71.
- [49] Mitchell L, Smith SH, Braun JS, Herzog KH, Weber JR, Tuomanen EI, Dual phases of apoptosis in pneumococcal meningitis. *J Infect Dis.* 2004; 190(11):2039-2046.
- [50] Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, Diagnosis, and Antimicrobial Treatment of Acute Bacterial Meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2010; (3):467-492.
- [51] Huang H, Shih S. Neurotropic Enterovirus Infections in the Central Nervous System. *Viruses.* 2015; 7(11): 6051-6066.
- [52] Bastos MS, Coelho-dos-Reis JG, Zauli DAG, Naveca FG, Monte RL, Pimentel JP, Macário VMK, da Silva NL, Peruhype-Magalhães V, Pascoal-Xavier MA, Guimaraes A, Carvalho AT, Malheiro A, Martins-Filho OA, Mourão MPG. Divergent cerebrospinal fluid cytokine network induced by non-viral and different viral infections on the central nervous system. *BMC Infect Dis.* 2015; 15:345.
- [53] Puccini JM, Ruller CM, Robinson SM, Knopp KA, Buchmeier MJ, Doran KS, Feuer R. Distinct neural stem cell tropism, early immune activation, and choroid plexus pathology following coxsackievirus infection in the neonatal central nervous system. *Lab Invest.* 2014; 94(2):161-181.
- [54] Feuer R, Mena I, Pagarigan RR, Harkins S, Hassett DE, Whitton JL. Coxsackievirus B3 and the Neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral dissemination, and disease. *Am J Pathol.* 2003; 163(4): 1379-1393.
- [55] Ho B, Yang P, Yu S. MicroRNA and Pathogenesis of Enterovirus Infection. *Viruses.* 2016; 8(1):11.
- [56] Irani DN. Aseptic Meningitis and Viral Myelitis. *Neurol Clin.* 2008; 26(3):635-655.
- [57] Bearer EL, Breakefield XO, Schuback D, Reese TS, LaVail JH. Retrograde axonal transport of herpes simplex virus: Evidence for a single mechanism and a role for tegument. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(14):8146-8150.
- [58] Gilden D, Mahalingam R, Nagel MA, Pugazhenthis S, Cohrs RJ. The neurobiology of varicella zoster virus infection. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011; 37(5): 441-463.
- [59] Kinchington PR, Leger AJS, Guedon JG, Hendricks RL. Herpes simplex virus and varicella zoster virus, the house guests who never leave. *Herpesviridae.* 2012; 3(1):5.
- [60] Armien AG, Hu S, Little MR, Robinson N, Lokensgard JR, Low WC, Cheeran MC. Chronic Cortical and Subcortical Pathology with Associated Neurological Deficits ensuing Experimental Herpes Encephalitis. *Brain Pathol* 2010; 20(4): 738-750.
- [61] Menasria R, Canivet C, Piret J, Boivin G. Infiltration Pattern of Blood Monocytes into the Central Nervous System during Experimental Herpes Simplex Encephalitis. *PLoS One.* 2015; 10(22): e0145773.
- [62] Marques CP, Cheeran MC, Palmquist JM, Hu S, Urban SL, Lokensgard JR. Prolonged Microglial Cell Activation and Lymphocyte Infiltration Following Experimental Herpes Encephalitis. *J Immunol.* 2008; 181(9): 6417-6426.
- [63] Sergerie Y, Rivest S, Boivin G. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. *J Infect Dis.* 2007; 196(6): 853-860.
- [64] Ma Y, He B. Recognition of Herpes Simplex Viruses: Toll-like Receptors and Beyond. *J Mol Biol.* 2014; 426(6): 1133-1147.
- [65] Lundberg P, Ramakrishna C, Brown J, Tyszka JM, Hamamura M, Hinton DR, Kovats S, Nalcioglu O, Weinberg K, Openshaw H, Cantin EM. The Immune Response to Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Susceptible Mice Is a Major Cause of Central Nervous System Pathology Resulting in Fatal Encephalitis. *J Virol.* 2008; 82(14): 7078-7088.
- [66] Mueller NH, Gilden DH, Cohrs RJ, Mahalingam R, Nagel MA. Varicella Zoster Virus Infection: Clinical Features, Molecular Pathogenesis of Disease, and Latency. *Neurol Clin.* 2008; 26(3): 675-697.
- [67] Gilden D, Nagel MA, Cohrs RJ, Mahalingam R. The Variegated Neurological Manifestations of Varicella Zoster Virus Infection. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013; 13(9): 374.
- [68] Gilden D, Cohrs RJ, Mahalingam R, Nagel MA. Varicella zoster virus vasculopathies: diverse clinical manifestations, laboratory features, pathogenesis, and treatment. *Lancet Neurol.* 2009; 8(8): 731-740.
- [69] Turtle L, Griffiths MJ, Solomon T. Encephalitis caused by flaviviruses. *QJM.* 2012; 105(3): 219-223.
- [70] Blom K, Braun M, Pakalniene J, Dailidyte L, Béziat V, Lampen MH, Klingström J, Lagerqvist N, Kjerstadius T, Michaëlsson J, Lindquist L, Ljunggren H, Sandberg JK, Mickiene A, Gredmark-Russ S. Specificity and Dynamics of Effector and Memory CD8 T Cell Responses in Human Tick-Borne Encephalitis Virus Infection. *PLoS Pathog.* 2015; 11(1): e1004622.
- [71] Bréhin AC, Mouri, Mouriès J, Frenkiel MP, Dadaglio G, Desprès P, Lafon M, Couderc T. Dynamics of immune cell recruitment during West Nile encephalitis and identification of a new CD19+B220-BST-2+ leukocyte population. *J Immunol.* 2008; 180(10):6760-6767.

- [72] Ashhurst TM, van Vreden C, Munoz-Eraza L, Niewold P, Watabe K, Terry RL, Deffrasnes C, Getts DR, King NJC. Antiviral macrophage responses in flavivirus encephalitis. *Indian J Med Res.* 2013; 138(5): 632-647.
- [73] Bogovic P, Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin Cases.* 2015; 3(5): 430-441.
- [74] Gras G, Kaul M. Molecular mechanisms of neuroinvasion by monocytes-macrophages in HIV-1 infection. *Retrovirology.* 2010; 7:30
- [75] Gelman BB. Neuropathology of HAND With Suppressive Antiretroviral Therapy: Encephalitis and Neurodegeneration Reconsidered. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2015; 12(2): 272-279.
- [76] Spudich S, González-Scarano F. HIV-1-Related Central Nervous System Disease: Current Issues in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2(6): a007120.
- [77] Valcour V, Sithinamsuwan P, Letendre S, Ances B. Pathogenesis of HIV in the Central Nervous System. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2011; 8(1):54-61.
- [78] Tavazzi E, Morrison D, Sullivan P, Morgello S, Fischer-Smith T. Brain inflammation is a common feature of HIV-infected patients without HIV encephalitis or productive brain infection. *Curr HIV Res.* 2014; 12(2): 97-110.
- [79] Griffin DE, Lin W, Pan C. Measles virus, immune control and persistence. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36(3): 649-662.
- [80] Garg R. Subacute sclerosing panencephalitis. *Postgrad Med J.* 2002; 78(916): 63-70.
- [81] Jagtap SA, Nair MD, Kambale HJ. Subacute sclerosing panencephalitis: A clinical appraisal. *Ann Indian Acad Neurol.* 2013; 16(4): 631-633
- [82] Dhib-Jalbut SS, Abdelnoor AM, Haddad FS. Cellular and humoral immunity in subacute sclerosing panencephalitis. *Infect Immun.* 1981; 33(1): 34-42.
- [83] Shuangshoti S, Thepa N, Phukpattaranont P, Jitmittraphap A, Intarut N, Tepsumethanon V, Wacharapluesadee S, Thorner PS, Hemachudha T. Reduced viral burden in paralytic compared to furious canine rabies is associated with prominent inflammation at the brainstem level. *BMC Vet Res.* 2013; 9:31
- [84] Hooper DC, Phares TW, Fabis MJ, Roy A. The Production of Antibody by Invading B Cells is Required for the Clearance of Rabies Virus from the Central Nervous System. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3(10): e535.
- [85] Roy A, Phares T, Koprowski H, Hooper DC. Failure To Open the Blood-Brain Barrier and Deliver Immune Effectors to Central Nervous System Tissues Leads to the Lethal Outcome of Silver-Haired Bat Rabies Virus Infection. *J Virol.* 2007; 81(3): 1110-1118.
- [86] Juntrakul S, Ruangvejvorachai P, Shuangshoti S, Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Mechanisms of escape phenomenon of spinal cord and brainstem in human rabies. *BMC Infect Dis.* 2005; 5:104
- [87] Tilly K, Rosa PA, Stewart PE. Biology of Infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin North Am.* 2008; 22(2): 217-234.
- [88] Rupprecht TA, Koedel U, Fingerle V, Pfister H. The Pathogenesis of Lyme Neuroborreliosis: From Infection to Inflammation. *Mol Med.* 2008; 14(3-4):205-212.
- [89] Ramesh G, Benge S, Pahar B, Philipp MT. A possible role for inflammation in mediating apoptosis of oligodendrocytes as induced by the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *J Neuroinflammation.* 2012; 9:72.
- [90] Ramesh G, Borda JT, Dufuor J, Kaushal D, Ramamoorthy R, Lackner AA, Philip MT. Interaction of the Lyme Disease Spirochete *Borrelia burgdorferi* with Brain Parenchyma Elicits Inflammatory Mediators from Glial Cells as Well as Glial and Neuronal Apoptosis. *Am J Pathol.* 2008; 174(5):1415-1527.
- [91] Ramesh G, Borda JT, Gill A, Ribka EP, Morici LA, Mottram P, Martin DS, Jacobs MB, Didier PJ, Philipp MT. Possible role of glial cells in the onset and progression of Lyme neuroborreliosis. *J Neuroinflammation.* 2009; 6:23.
- [92] Miklossy J, Kasas S, Zurn AD, McCall S, Yu S, McGeer PL. Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *J Neuroinflammation.* 2008; 5:40.
- [93] LaFond RE, Lukehart SA. Biological Basis for Syphilis. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):29-49.
- [94] Ho EL, Lukehart SA. Syphilis: using modern approaches to understand an old disease. *J Clin Invest.* 2011 Dec1; 121(12): 4584-4592.
- [95] Li K, Wang C, Lu H, Gu X, Guan Z, Zhou P. Regulatory T Cells in Peripheral Blood and Cerebrospinal Fluid of Syphilis Patients with and without Neurological Involvement. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(11):e2528.
- [96] Dersch R, Hottenrott T, Senel M, Lehmensiek V, Tumani H, Rauer S, Stich O. The chemokine CXCL13 is elevated in the cerebrospinal fluid of patients with neurosyphilis. *Fluids Barriers CNS.* 2015; 12:12.

- [97] Leader BT, Godornes C, VanVoorhis WC, Lukehart SA. CD4+ lymphocytes and gamma interferon predominate in local immune responses in early experimental syphilis. *Infect Immun.* 2007; 75(6):3021-3026.
- [98] Wu HS, Kolonoski P, Chang YY, Bermudez LE. Invasion of the brain and chronic central nervous system infection after systemic *Mycobacterium avium* complex infection in mice. *Infect Immun.* 2000; 68(5): 2979-2984.
- [99] Wilkins EG, Griffiths RJ, Roberts C, Green HT. Tuberculous meningitis due to *Mycobacterium bovis*: a report of two cases. *Postgrad Med J.* 1986; 62(729): 653-655.
- [100] Thwaites G, Chau T, Mai N, Drobniewski F, McAdam K, Farrar J. Tuberculous meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000; 68(3): 289-299.
- [101] Be NA, Kim KS, Bishai WR, Jain SK. Pathogenesis of Central Nervous System Tuberculosis. *Curr Mol Med.* 2009; 9(2): 94-99.
- [102] Jain SK, Paul-Satyaseela M, Lamichhane G, Kim KS, Bishai WR. *Mycobacterium tuberculosis* invasion and traversal across an in vitro human blood-brain barrier as a pathogenic mechanism for central nervous system tuberculosis. *J Infect Dis.* 2006; 193(9): 1287-1295.
- [103] Spanos JP, Hsu N, Jacobs M. Microglia are crucial regulators of neuro-immunity during central nervous system tuberculosis. *Front Cell Neurosci.* 2015; 9:182.
- [104] Rock RB, Hu S, Gekker G, Sheng WS, May B, Kapur V, Peterson PK. *Mycobacterium tuberculosis*-induced cytokine and chemokine expression by human microglia and astrocytes: effects of dexamethasone. *J Infect Dis.* 2005; 192(12):2054-2058.
- [105] Rock RB, Olin M, Baker CA, Molitor TW, Peterson PK. Central Nervous System Tuberculosis: Pathogenesis and Clinical Aspects. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(2):243-261.
- [106] Cherian A, Thomas SV. Central nervous system tuberculosis. *Afr Health Sci.* 2011; 11(1):116-127.
- [107] Liu T, Perlin D, Xue C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. *Virulence.* 2012; 3(2): 173-181.
- [108] Franco-Paredes C, Womack T, Bohlmeyer T, Sellers B, Hays A, Patel K, Lizarazo J, Lockhart SR, Siddiqui W, Marr KA. Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. *Lancet Infect Dis.* 2015; 15(3): 348-355.
- [109] Malik AN, Bi WL, McCray B, Abedalthagafi M, Vaitkevicius H, Dunn IF. Isolated cerebral mucormycosis of the basal ganglia. *Clin Neurol Neurosurg.* 2014; 124: 102-105.
- [110] Chrétien F, Lortholary O, Kansau I, Neuville S, Gray F, Dromer F. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. *J Infect Dis.* 2002; 186(4): 522-530.
- [111] Drummond RA, Collar AL, Swamydas M, Rodriguez CA, Lim JK, Mendez LM, Fink DL, Hsu AP, Zhai B, Karauzum H, Mikelis CM, Rose SR, Ferre EMN, Yockey L, Lemberg K, Kuehn HS, Rosenzweig SD, Lin X, Chittiboia P, Datta SK, Belhorn TH, Weimer ET, Hernandez ML, Hohl TM, Kuhns DB, Lionakis MS. CARD-9 Dependent Neutrophil Recruitment Protects against Fungal Invasion of the Central Nervous System. *PLoS Pathog.* 2015; 11(12):e1005293.
- [112] Mora DJ, Fortunato LR, Andrade-Silva LE, Ferreira-Paim K, Rocha ICH, Vasconcelos RR, Silva-Teixeira DN, Nascentes GAN, Silva-Vergara ML. Cytokine Profiles at Admission Can Be Related to Outcome in AIDS Patients with Cryptococcal Meningitis. *PLoS One.* 2015; 10(3): e0120297.
- [113] Sloan DJ, Parris V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. *Clin Epidemiol.* 2014; 6: 169-182.
- [114] Walker M, Zunt JR. Parasitic Central Nervous System Infections in Immunocompromised Hosts. *Clin Infect Dis.* 2005; 40(7): 1005-1015.
- [115] Walker M, Kublin JG, Zunt JR. Parasitic Central Nervous System Infections in Immunocompromised Hosts: Malaria, Microsporidiosis, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis. *Clin Infect Dis.* 2006; 42(1): 115-125.
- [116] Masocha W, Kristensson K. Passage of parasites across the blood-brain barrier. *Virulence.* 2012; 3(2): 202-212.
- [117] Halonen SK, Weiss LM. TOXOPLASMOSIS. *Handb Clin Neurol.* 2013; 114: 125-145.
- [118] Suzuki Y. Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis.* 2002; 185(1): 58-65.
- [119] Zhang Y, Chen H, Chen Y, Wang L, Cai Y, Li M, Wen H, Du J, An R, Luo Q, Wang X, Lun Z, Xu Y, Shen J. Activated microglia contribute to neuronal apoptosis in Toxoplasmic encephalitis. *Parasit Vectors.* 2014; 7:372.
- [120] Thomas L. Labor und Diagnose. 8. Auflage, Band 2. Frankfurt am Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH. 2012.
- [121] Zettl UK, Lehmitz R, Mix E, Herausgeber. *Klinische Liquordiagnostik.* 1. Auflage. Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG; 2003.
- [122] Kluge H, Wiczorek V, Linke E, Zimmermann K, Witte OW, Herausgeber. *Atlas der praktischen Liquorzytologie.* 1. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2005.

- [123] Worofka B, Lassmann J, Bauer K, Kristoferitsch W. *Praktische Liquorzell Diagnostik*. 1. Auflage. Wien: Springer Verlag; 1997.
- [124] Viallon A, Desseigne N, Marjollet O, Birynczyk A, Belin M, Guyomarch S, Borg J, Pozetto B, Bertrand JC, Zeni F. Meningitis in adult patients with a negative direct cerebrospinal fluid examination: value of cytochemical markers for differential diagnosis. *Crit Care*. 2011; 15(3): R136
- [125] Beran O, Lawrence DA, Andersen N, Dzubova O, Kalmusova J, Musilek M, Holub M. Sequential analysis of biomarkers in cerebrospinal fluid and serum during invasive meningococcal disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009; 28(7):793-799.
- [126] Hytönen J, Kortela E, Waris M, Puustinen J, Salo J, Oksi J. CXCL13 and neopterin concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis and other diseases that cause neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2014; 11:103.
- [127] Bremell D, Mattsson N, Edsbacke M, Blennow K, Andreasson U, Wikkelö C, Zetterberg H, Hagberg L. Cerebrospinal fluid CXCL13 in Lyme neuroborreliosis and asymptomatic HIV infection. *BMC Neurol*. 2013; 13:2.
- [128] Jain RK, Nayak AR, Husain AA, Panchbhai MS, Chandak N, Purohit HJ, Taori GM, Dagainawala HF, Kashyap RS. Mycobacterial Dormancy Regulon Protein Rv2623 as a Novel Biomarker for the Diagnosis of Latent and Active Tuberculous Meningitis. *Dis Markers*. 2013; 35(5): 311-316.
- [129] Lyons JL, Thakur KT, Lee R, Watkins T, Pardo CA, Carson KA, Markley B, Finkelman MA, Marr KA, Roos KL, Zhang SX. Utility of Measuring (1,3)- β -D-Glucan in Cerebrospinal Fluid for Diagnosis of Fungal Central Nervous System Infection. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(1): 319-322.
- [130] Mikulska M, Furfaro E, Del Bono V, Raiola AM, Di Grazia C, Bacigalupo A, Viscoli C. (1-3)- β -D-glucan in cerebrospinal fluid is useful for the diagnosis of central nervous system fungal infections. *Clin Infect Dis*. 2013; 56(10): 1511-1512.
- [131] Braverman NE, Moser AB. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1822(9):1442-1452.
- [132] Gorgas K, Teigler A, Komljenovic D, Just WW. The ether lipid-deficient mouse: tracking down plasmalogen functions. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(12):1511-1526.
- [133] Berger J, Dorninger F, Forss-Peter S, Kunze M. Peroxisomes in brain development and function. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1863(5):934-955.
- [134] Macala LJ, Yu RK, Ando S. Analysis of brain lipids by high performance thin-layer chromatography and densitometry. *J Lipid Res*. 1983; 24 (9): 1243-1250.
- [135] Teigler A, Komljenovic D, Draguhn A, Gorgas K, Just WW. Defects in myelination, paranode organization and Purkinje cell innervation in the ether lipid-deficient mouse cerebellum. *Human Molecular Genetics* 2009;18(11):1897-1908.
- [136] Ferreira da Silva T, Eira J, Lopes AT, Malheiro AR, Sousa V, Luoma A, Avila RL, Wanders RJA, Just WW, Kirschner DA, Sousa MM, Brites P. Peripheral nervous system plasmalogens regulate Schwann cell differentiation and myelination. *J Clin Invest*. 2014;124 (6): 2560-2570.
- [137] Reiss D, Beyer K, Engelmann B. Delayed oxidative degradation of polyunsaturated diacyl phospholipids in the presence of plasmalogen phospholipids in vitro. *Biochem J*. 1997; 323(3):807-814.
- [138] Zoeller RA, Lake AC, Nagan N, Gaposchkin DP, Legner MA. Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem J*. 1999; 338(3): 769-776.
- [139] Üllen A, Fauler G, Köfeler H, Waltl S, Nussold C, Bernhart E, Reicher H, Leis H, Wintersperger A, Malle E, Sattler W. Mouse brain plasmalogens are targets for hypochlorous acid mediated modification in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2010; 49(11):1655-1665.
- [140] Wu L, Pfeiffer DR, Calhoun EA, Madias F, Marcucci G, Liu S, Jurkowitz MS. Purification, Identification and Cloning of Lysoplasmalogenase, the Enzyme That Catalyzes Hydrolysis of the Vinyl Ether Bond of Lysoplasmalogen. *J Biol Chem*. 2011; 286(28): 24916-24930.
- [141] Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem*. 2007; 101 (3): 577-599.
- [142] Nieto ML, Venable ME, Bauldryll SA, Greene DG, Kennedy M, Bassil DA, Wykle RL. Evidence That Hydrolysis of Ethanolamine Plasmalogens Triggers Synthesis of Platelet-activating Factor via a Transacylation Reaction. *J Biol Chem*. 199; 266(28):18699-18706.
- [143] Hossain S, Ifuku M, Take S, Kawamura J, Miake K, Katafuchi T. Plasmalogens Rescue Neuronal Cell Death through an Activation of AKT and ERK Survival Signaling. *PLoS One*. 2013; 8(12):e83508.
- [144] Ifuku M, Katafuchi T, Mawatari S, Noda M, Miake K, Sugiyama M, Fujino T. Anti-inflammatory/anti-amyloidogenic effects of plasmalogens in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in adult mice. *J Neuroinflammation*. 2012; 9:197.

- [145] Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourne CC, Nausee WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol.* 2013; 93(2):185-198.
- [146] Guimarães-Costa AB, Wardini AB, Pinto-da-Silva LH, Saraiva EM. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J Parasitol Res.* 2012; 2012: 929743.
- [147] Pulli B, Bure L, Wojtkiewicz GR, Iwamoto Y, Ali M, Li D, Schob S, Li-Chun Hsieh K, Jacobs AH, Chen JW. Multiple Sclerosis: Myeloperoxidase Immunoradiology Improves Detection of Acute and Chronic Disease in Experimental Model. *Radiology.* 2015; 275(2): 480-489.
- [148] Chen JW, Breckwoldt MO, Aikawa E, Chiang G, Weissleder R. Myeloperoxidase-targeted imaging of active inflammatory lesions in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* 2008; 131(4): 1123-1133.
- [149] Üllen A, Singewald E, Konya V, Fauler G, Reicher H, Nusshold C, Hammer A, Kratky D, Heinemann A, Holzer P, Malle E, Sattler W. Myeloperoxidase-Derived Oxidants Induce Blood-Brain Barrier Dysfunction In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE.* 2013; 8 (5):e64034.
- [150] Anbukumar DS, Shornick LP, Albert CJ, Steward MM, Zoeller RA, Neumann WL, Ford DA. Chlorinated lipid species in activated human neutrophils: lipid metabolites of 2-chlorohexadecanal. *J Lipid Res.* 2012; 51 (5): 1085-1092.
- [151] Albert CJ, Crowley JR, Hsu F, Thukkani AK, Ford DA. Reactive Chlorinating Species Produced by Myeloperoxidase Target the Vinyl Ether Bond of Plasmalogens: Identification of 2-Chlorohexadecanal. *J Biol Chem.* 2001; 276(26): 23733-23741.
- [152] Thukkani AK, Hsu FF, Crowley JR, Wysolmerski RB, Albert CJ, Ford DA. Reactive chlorinating species produced during neutrophil activation target tissue plasmalogens: production of the chemoattractant, 2-chlorohexadecanal. *J Biol Chem.* 2002; 277(6):3842-3849.
- [153] Wildsmith KR, Albert CJ, Anbukumar DS, Ford DA. Metabolism of myeloperoxidase-derived 2-chlorohexadecanal. *J Biol Chem.* 2006; 281(25): 16849-16860.
- [154] Brahmabhatt VV, Albert CJ, Anbukumar DS, Cunningham BA, Neumann WL, Ford DA. ω -Oxidation of α -Chlorinated Fatty Acids: identification of α -chlorinated dicarboxylic acids. *J Biol Chem.* 2010; 285(53):41255-41269.
- [155] Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest.* 1977; 37(5): 397-401.
- [156] Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S, Gallo P, Grimaldi LM, Grønning M. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1994; 57(8):897-902.
- [157] Michael BD, Griffiths MJ, Granerod J, Brown D, Davies NW, Borrow R, Solomon T. Characteristic Cytokine and Chemokine Profiles in Encephalitis of Infectious, Immune-Mediated, and Unknown Aetiology. *PLoS One.* 2016; 11(1): e0146288.