

Aus der Klinik für Neurologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

***Streptococcus pneumoniae* induziert Apoptose in zerebralen  
Endothelzellen:  
Die Rolle bakterieller Toxine**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Annett Halle  
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Weber  
2. Prof. Dr. O. Liesenfeld  
3. Prof. Dr. E. Latz

Datum der Promotion: 24.01.2005

## **Zusammenfassung**

Die bakterielle Meningitis ist trotz der Anwendung modernster Antibiotika mit einer hohen Letalität und neurologischen Spätkomplikationen verbunden. Ein entscheidendes Ereignis ist dabei der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Die genauen Mechanismen, die zu ihrer Schädigung führen, sind bis heute unklar. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob lebende Pneumokokken in einem Zellkulturmodell der BHS zu einer apoptotischen Zellschädigung von zerebralen Endothelzellen, als wichtigstem zellulären Bestandteil der BHS, führen und damit zu ihrer strukturellen Schädigung beitragen. Mittels verschiedener Detektionsmethoden (TUNEL, Fluoreszenzmikroskopie, Elektronenmikroskopie) konnte nachgewiesen werden, daß *S. pneumoniae* zu einem apoptotischen endothelialen Zelltod führt. Eine Beteiligung von Caspasen konnte weder mit direkter Aktivitätsmessung noch mittels Inhibitionsexperimenten oder dem Nachweis von Caspase-spezifischen Substraten gezeigt werden. Insgesamt sind die Morphologie der Zellkerne und die spezifische Degradation der endothelialen DNS hinweisend für einen *Apoptosis-Inducing-Factor*-vermittelten Zelltod ohne Caspasenbeteiligung. Diese Form des Zelltodes ist bereits in anderen Zellmodellen, bisher jedoch nicht bei zerebralen Endothelzellen beschrieben worden. Auf Seiten des Bakteriums konnten Wasserstoffperoxid und Pneumolysin als Auslöser der Apoptose identifiziert werden. Die zytotoxische Potenz des Pneumolysins ist dabei an dessen Poren-formende Aktivität gebunden. Die Ergebnisse sind von potentieller klinischer Relevanz, da es bei einer Bakteriämie und während der Invasion der Pneumokokken in das ZNS zu einem direkten Kontakt zwischen Bakterien und zerebralen Endothelzellen kommt und sich daraus eine Möglichkeit zur Entwicklung adjuvanter Therapien ergeben könnte.

**Schlagwörter:** bakterielle Meningitis, *Streptococcus pneumoniae*, Blut-Hirn-Schranke, zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen

## **Abstract**

Despite sufficient antibiotic treatment, pneumococcal meningitis has remained a disease associated with high mortality and neurological sequelae. The disruption of the blood brain barrier (BBB) is regarded a key event in the initial phase of pneumococcal meningitis. However, the exact molecular mechanisms involved in this process are still unknown. The aim of this study was to determine if living pneumococci are able to induce apoptosis in cerebral endothelial cells – the main cellular component of BBB – and therefore might contribute to its damage. Using several different detection methods (TUNEL, fluorescence and electron microscopy), induction of apoptotic cell death of endothelial cells by pneumococci could be verified. An accompanying

activation of caspases was not detectable, despite the use of specific detection techniques such as inhibition experiments, direct enzyme measurements and detection of caspase-specific protein cleavage. These results as well as the specific nuclear morphology and degradation of endothelial DNA suggest an involvement of the mitochondrial protein *Apoptosis inducing factor* (AIF). This is the first time this specific form of apoptotic, AIF-driven cell death has been described to be engaged in endothelial cells. On the part of the bacterium, pneumolysin and hydrogen peroxide were identified as the two main inducers of apoptosis. The cytotoxic potency of pneumolysin is related to its pore-forming activity. These results are of clinical relevance since pneumococci are known to reside in close proximity to cerebral endothelial cells during bacteremia and their entry into the CNS. These findings could contribute to the development of adjuvant treatment of bacterial meningitis.

**Keywords:** bacterial meningitis, *Streptococcus pneumoniae*, blood-brain-barrier, cerebral microvascular endothelial cells

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Bakterielle Meningitis .....	1
1.2	Virulenzfaktoren von <i>S. pneumoniae</i> .....	4
1.3	Die Blut-Hirn-Schranke .....	6
1.4	Apoptose - Der programmierte Zelltod .....	10
1.5	Zielsetzung der Arbeit .....	18
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
2.1	Kulturen der primären zerebralen Kapillarendothelzellen .....	19
2.2	Bakterienkulturen .....	21
2.3	Stimulation der zerebralen Endothelzellen .....	24
2.4	Untersuchung der Zellkernmorphologie mit DNS-Farbstoffen (AO/EB).....	26
2.5	Untersuchung der DNS-Degradation mit der TUNEL-Methode .....	27
2.6	Elektronenmikroskopische Aufnahmen .....	28
2.7	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) .....	29
2.8	Messung der Caspaseaktivität .....	30
2.9	Messung der intrazellulären Calciumkonzentration .....	31
2.10	Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\phi_M$ .....	32
2.11	Proteinbestimmung .....	32
2.12	Subzelluläre Fraktionierung .....	32
2.13	Western-Blot .....	34
2.14	Angewandte statistische Verfahren .....	37
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>38</b>
3.1	Nachweis des Pneumokokken-induzierten endothelialen Zelltodes .....	38
3.2	Untersuchung der Rolle der Caspasen .....	44
3.3	Untersuchung weiterer intrazellulärer Mechanismen .....	48
3.4	Untersuchung der Beteiligung von <i>Apoptosis Inducing Factor</i> (AIF).....	50
3.5	Untersuchung der Rolle Pneumokokken-spezifischer Eigenschaften.....	52
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>59</b>
4.1	Pneumokokken als Auslöser von programmiertem Zelltod .....	60
4.2	Nachweis des programmierten Zelltodes .....	61

4.3	Fehlende Aktivierung der Caspasen.....	63
4.4	Intrazelluläres Calcium und mitochondriales Membranpotential .....	65
4.5	Beteiligung von <i>Apoptosis Inducing Factor</i> (AIF) .....	67
4.6	Kapsel- und Adhärenzeigenschaften von <i>S. pneumoniae</i> .....	70
4.7	Rolle von Wasserstoffperoxid und Pneumolysin .....	70
4.8	Ausblick .....	73
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>92</b>
	Abkürzungsverzeichnis .....	92
	Danksagung.....	94
	Veröffentlichungen.....	95
	Lebenslauf.....	96
	Eidesstattliche Erklärung.....	97

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Bakterielle Meningitis

### 1.1.1 Einführung

Eine frühe Beschreibung der Meningitis geht auf Hippokrates zurück. Er schreibt in *De morbis*: „Wenn das Hirn unter dem Druck der Entzündung an Volumen zunimmt, gibt es Kopfschmerzen. Die Blutgefäße sind gespannt und sie klopfen. Fieber und Schauer tun sich kund, doch der Schmerz nimmt nicht ab, er lässt nur nach, wenn sich das Fieber ausbreitet. Wenn sich Wasser im Hirn bildet, entstehen heftige Schmerzen in den Schläfen und anderen Teilen des Kopfes. Die Gegend der Augen ist schmerzhaft, die Sicht verdunkelt, die Pupille deformiert. Erhebt sich der Kranke, so bekommt er Schwindelgefühle. Er erträgt weder Wind noch Licht. Diese Krankheit ist verhängnisvoll. Man kann nicht beurteilen, an welchem Tag der Tod eintritt.“ (Schreiber und Mathys, 1986).

Neben einigen typischen klinischen Symptomen – Kopfschmerzen, Fieber, Photophobie – weist Hippokrates bereits auf eine Mitbeteiligung der zerebralen Gefäße sowie auf die Bedeutung des Hirnödems hin – und nicht zuletzt auch auf die Fatalität dieser Erkrankung.

Bis Mitte des 20. Jahrhunderts endete eine bakterielle Meningitis in nahezu allen Fällen tödlich. Es ist letztlich der Antibiotikatherapie zu verdanken, daß die Letalität von fast 100 % auf 10 bis 30% gesenkt werden konnte (Durand *et al.*, 1993; Aronin, 1998). Dennoch ist die bakterielle Meningitis heute noch eine der zehn häufigsten Infektions-assoziierten Todesursachen (Kim, 2003).

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) ist bei Erwachsenen und Kindern der häufigste und zugleich aggressivste Erreger der bakteriellen Meningitis (Schuchat *et al.*, 1997; Aronin *et al.*, 1998; de Gans und Beek, 2002). Nicht nur die Letalität ist bei der Pneumokokkenmeningitis mit 28% bis 34% höher als bei den anderen Erregern, auch bezüglich bleibender Schäden sind Patienten mit Pneumokokkenmeningitis häufig schwerer betroffen (Pfister *et al.*, 1993; Schuchat *et al.*, 1997; de Gans und Beek, 2002). Bis zu 54% der Überlebenden behalten Spätschäden mit zum Teil schwersten neurologischen und neuropsychologischen Defiziten zurück (Kragstbjerg *et al.*, 1994; Aronin *et al.*, 1998).

Diese vergleichsweise schlechte Prognose steht im Gegensatz zur raschen Entwicklung potenter Antibiotika und intensivmedizinischer Therapiemöglichkeiten. Die Gründe dafür werden kontrovers diskutiert.

Von Bedeutung ist einerseits, daß in den letzten Jahren eine zunehmende Antibiotikaresistenz bei *S. pneumoniae* beobachtet wurde. Beispielsweise haben sich die Resistenzraten gegenüber Penicillin in Nordamerika von unter 0,02% im Jahre 1987 auf 3 % im Jahre 1994 und über 30% in manchen Kommunen der USA vervielfacht (Breiman *et al.*, 1998).

Es ist davon auszugehen, daß Bakterien durch diese fulminante Resistenzentwicklung (Stanek und Mufson, 1999) trotz antibiotischer Therapie länger im Körper des Patienten überleben werden und daher bakterielle Toxine, die von diesen prokaryonten Organismen freigesetzt werden, von größter Bedeutung sind (Fiore *et al.*, 2000; McCullers *et al.*, 2000).

Zusätzlich führt gerade die Antibiotikatherapie zu einer massiven Freisetzung von Zellwandbestandteilen von *S. pneumoniae*, die durch die Initiation einer Inflammationskaskade für einen großen Teil der Schädigung verantwortlich gemacht werden (Tomasz, 1989; Tuomanen *et al.*, 1985).

Aus diesem Grunde wäre es wichtig, neben der Antibiotikatherapie über weitere, adjuvante Behandlungsmöglichkeiten zu verfügen. Diese sollten eine spezifischere Wirkung aufweisen als Kortikoide, die heute schon in klinischen Studien bei der bakteriellen Meningitis eingesetzt worden sind (de Gans und Beek, 2002; Molyneux *et al.*, 2002).

Hierfür ist ein tieferes Wissen über den Pathomechanismus der bakteriellen Meningitis notwendig. Im Mittelpunkt dabei steht die Blut-Hirn-Schranke, deren Schädigung ein zentrales Ereignis im Rahmen einer Meningitis ist und zu den typischen Veränderungen, wie Hirnödem, Einwanderung von Leukozyten und Erhöhung der Proteinkonzentrationen im Liquor führt (Pfister *et al.*, 1994). Die daraus resultierende intrazerebrale Drucksteigerung wird neben möglicher direkter Effekte von *S. pneumoniae* auf die Neuronen (Braun *et al.*, 1999) für die permanenten Schäden des Gehirns verantwortlich gemacht (Pfister *et al.*, 1994; Durand *et al.*, 1993).

Neben der bereits nachgewiesenen Schädigung der Blut-Hirn-Schranke durch inflammatorische Prozesse könnten auch noch direkte, von den Bakterien selbst ausgehende Mechanismen bei der Pathogenese eine Rolle spielen.

Deshalb werden in der vorgelegten Arbeit die Effekte lebender Pneumokokken und deren Toxine auf zerebrale Endothelzellen, dem zellulären Hauptbestandteil der Blut-Hirn-Schranke, untersucht.

Es ging insbesondere um die Frage, ob der programmierte Zelltod (Apoptose) dabei von Bedeutung ist, da ein programmierter Ablauf des Zelltodes auch immer die Möglichkeit der Hemmung und damit eine potentielle Entwicklung von Therapeutika beinhaltet.



### 1.1.2 Pathogenese und Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis

Die Übertragung von Pneumokokken erfolgt aerogen und führt zunächst zu einer Besiedelung des Nasen-Rachen-Raumes. Eine asymptomatische Kolonisierung kommt bei bis zu 40% gesunder Erwachsener und Kinder vor (Gray *et al.*, 1986).

Durch eine kontinuierliche Ausbreitung können typische Infektionen, wie Sinusitis, Otitis media, ambulant erworbene Pneumonie und akute Exazerbation einer chronischen Bronchitis entstehen. Infektionen des ZNS und sehr selten auch der Gelenke, der Herzklappen, der Peritonealhöhle und des Knochensystems werden dagegen meist durch eine hämatogene Ausbreitung verursacht. Das Risiko, an einer Infektion durch *S. pneumoniae* zu erkranken, ist durch eine geschwächte Abwehrlage des Organismus erhöht, z.B. bei Milzdysfunktionen, Zustand nach Splenektomie, Alkoholismus, Herzinsuffizienz, Neoplasien und den verschiedenen Immundefizienzsyndromen, einschließlich AIDS (Bruyn *et al.*, 1991; Turett *et al.*, 2001).

Ausgangspunkt für eine Pneumokokkenmeningitis ist in der Regel eine Kolonisierung des Nasopharynx durch den Erreger. Dafür sind bestimmte bakterielle Oberflächenproteine verantwortlich, die die Interaktion mit der Wirtszelle erleichtern. *S. pneumoniae* besitzt über 500 Oberflächenproteine (Wizemann *et al.*, 2001), wobei die Beteiligung einiger dieser Proteine bereits gezeigt werden konnte (Koedel *et al.*, 2002).

Begünstigt durch Schleimhautdefekte, z.B. als Folge von Virusinfektionen oder Austrocknung, kann es dem Bakterium gelingen, die Mukosa zu durchdringen und eine Bakteriämie auszulösen. Danach muß *S. pneumoniae* weitere Abwehrmechanismen des Wirtes überstehen, um im Blutstrom zu überleben und anschließend die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren. Die Polysaccharidkapsel ist dafür ein wesentliches Virulenzmerkmal, da sie die Aktivierung des alternativen Komplementsystems und des Komplementfaktors C3b an Phagozyten verhindert (Morona *et al.*, 2000). Nach Übertritt über die Blut-Hirn-Schranke kommt es bei weitgehend fehlenden Abwehrmechanismen zu einer Vermehrung der Pneumokokken und zur Freisetzung von Zellwandbestandteilen, die einwandernde Leukozyten aktivieren, die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen induzieren und so zu einer Zunahme der Entzündung und Veränderung der Gefäßdurchlässigkeit beitragen (van Furth *et al.*, 1996).

Über einen Zeitraum von einigen Stunden werden nun Räume zwischen den zerebralen Endothelzellen geöffnet, Leukozyten wandern ein und die zytochemischen Parameter des Liquors verändern sich (Tuomanen *et al.*, 1985). Die fortschreitende Störung der Blut-Hirn-Schranke fördert die Entstehung eines Hirnödems, das über einen erhöhten intrakraniellen Druck und gleichzeitigen Verlust der Autoregulation des zerebralen Blutflusses zur Ischämie führt (Pfister *et al.*, 1994). Eine Kombination von bakteriellen Faktoren und inflammatorischen

Mediatoren bewirkt nun nicht nur die Schädigung von Haarzellen des Innenohrs und damit die häufig auftretenden Hörstörungen nach Pneumokokkenmeningitis, sondern auch eine Schädigung des Gehirns. Hier ist insbesondere der Gyrus dentatus des Hippocampus betroffen, eine Gehirnstruktur, die für das Lernen und das Gedächtnis von Bedeutung ist. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, daß das Ausmaß der Schädigung in dieser Region mit dem Ausmaß der Lernstörung korreliert. Damit könnte dieser spezielle Hirnschaden nach Meningitis möglicherweise für die vor allem bei Kindern auftretenden Lern- und Intelligenzstörungen verantwortlich sein (Loeffler *et al.*, 2001a).

## 1.2 Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* ist ein 1-3 µm langes, in Diplokokkenform wachsendes, grampositives Bakterium, das zur Gruppe der α-hämolysierenden Streptokokken gehört.

Es besitzt eine Vielzahl von gut charakterisierten Virulenzmerkmalen. Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, gehören zu ihnen neben der schon erwähnten externen Polysaccharidkapsel bestimmte Oberflächenproteine, z.B. Autolysin und das Choline-binding protein A (*CbpA*) sowie intrazelluläre Toxine, wie Pneumolysin und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) (Mitchell, 2000).

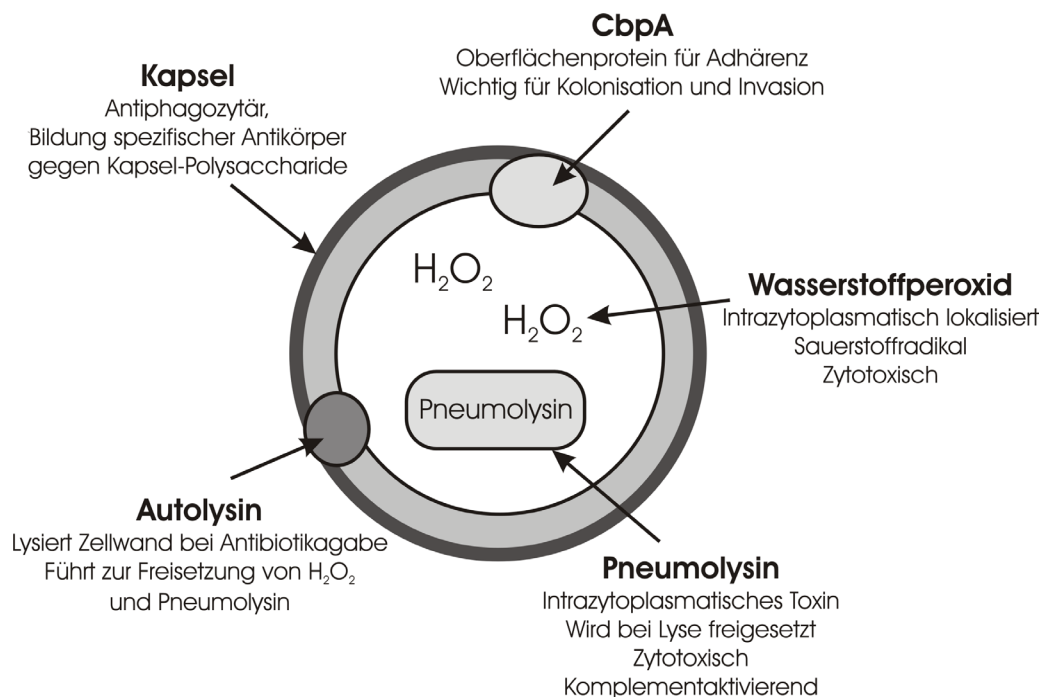


Abbildung 1: Schematische Darstellung ausgewählter Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* einschließlich ihrer Lokalisation und Funktion.  $H_2O_2$  = Wasserstoffperoxid. *CbpA* = Cholin-binding protein A.

### 1.2.1 Autolysin

Autolysin ist ein Enzym, das an der Kapsel lokalisiert und normalerweise inaktiv ist. Kommt es jedoch zum Abbruch der Zellwandbiosynthese z.B. bei Behandlung mit Penizillinen oder Fehlen von Nährstoffen, wird Autolysin aktiviert und die Bakterienzelle lysiert (Mitchell, 2000). Dadurch werden Zellwandprodukte und intrazelluläre Toxine wie Pneumolysin freigesetzt. Dies ist der Grund dafür, daß in Tiermodellen Autolysin-negative Mutanten von *S. pneumoniae* eine deutlich herabgesetzte Virulenz zeigen (Mitchell, 2000).

### 1.2.2 CbpA

Das *Choline-binding protein A* (CbpA) ist für die Adhärenz von *S. pneumoniae* an Wirtszellen mitverantwortlich. Es ist in der Lage, ein Brückenelement zwischen Zytokin-aktivierten humanen Zellen und bestimmten Bestandteilen der Pneumokokkenzellwand zu bilden (Jedrzejak, 2001). Dadurch und aus Experimenten mit CbpA-negativen Pneumokokken ist bekannt, daß dieses Oberflächenprotein für die Kolonisation von Pneumokokken im Nasopharynx und für deren Invasion wichtig ist (Mitchell, 2000; Jedrzejak, 2001). Außerdem wurde nachgewiesen, daß CbpA sekretorisches IgA binden kann, so daß neben der Adhärenzfunktion auch eine inhibitorische Wirkung gegen IgA vermutet wird (Mitchell, 2000).

### 1.2.3 Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

*S. pneumoniae* ist das einzige Bakterium unter den Erregern der bakteriellen Meningitis, dem das wichtige Wasserstoffperoxid-abbauende Enzym Katalase fehlt. Es bildet deshalb hohe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen, etwa mit der von neutrophilen Granulozyten vergleichbar, von denen bekannt ist, daß sie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Zytotoxin einsetzen (Braun *et al.*, 2002; Duane *et al.*, 1993). In Pneumokokken-Pneumonie-Modellen konnte bereits die pathogenetische Bedeutung des freigesetzten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für alveoläre Epithelzellen und den Zilienschlag des respiratorischen Epithels nachgewiesen werden (Duane *et al.*, 1993; Hirst *et al.*, 2000). Es wird vermutet, daß H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> von der bakteriellen Membran in die Wirtszelle diffundieren und dort über einen oxidativen Schaden Apoptose induzieren kann (Cochrane, 1991; Chandra *et al.*, 2000).

### 1.2.4 Pneumolysin

Pneumolysin ist ein Toxin, das im Zytoplasma von *S. pneumoniae* lokalisiert ist (Paton *et al.*, 1983). Durch das Fehlen einer sekretorischen Signalsequenz, wird Pneumolysin nicht aktiv vom Bakterium sezerniert, sondern erst nach Autolyse des Bakterium durch das schon oben beschriebene Enzym Autolysin entweder in einer späten Phase des Wachstums oder nach Antibiotikabehandlung passiv aus dem Zytosol freigesetzt (Cockeran *et al.*, 2002).

Es besitzt mindestens zwei wichtige biologische Aktivitäten, die für die Virulenz wichtig sind: einerseits die Fähigkeit zur Lyse von Zellen und andererseits die Fähigkeit, das klassische Komplementsystem durch die Bindung an den Fc-Teil von IgG zu aktivieren (Mitchell, 2000).

Mit seiner zytolytischen Aktivität gehört Pneumolysin zu einer Klasse von Toxinen, den „thiol-aktivierte Zytolysinen“, die von verschiedenen grampositiven Bakterien produziert werden. Diese Zytolysine funktionieren alle in ähnlicher Weise. Zuerst kommt es zu einer Bindung des Toxins an das Cholesterol der Zielzellmembran und zu einer Insertion des Toxins zwischen die beiden Lipidschichten. Nach Zusammenlagerung von 20-80 Pneumolysin-Molekülen bildet sich eine Pore, die die Zellmembran der Zielzelle durchdringt und damit die Zellintegrität zerstört (Bhakdi *et al.*, 1986). Durch diese Pore wird das intrazelluläre Milieu der angegriffenen Zelle irreversibel geschädigt. Zusätzlich führt Pneumolysin zu einer Aggregation und Fusion der betroffenen Zellen (Bonev *et al.*, 2001).

Beide Eigenschaften, die Fähigkeit zur Zell-Lyse und die zur Komplementaktivierung, sind für die Virulenz von *S. pneumoniae* von Bedeutung. Dies konnte in zahlreichen experimentellen Modellen gezeigt werden, indem durch Punktmutationen veränderte Varianten von Pneumolysin hergestellt wurden, denen entweder die lytische oder die Komplement-aktivierende Wirkung fehlten (Mitchell und Andrew, 1997). Genetisch verändertes Pneumolysin, dem die Fähigkeit zur Komplementaktivierung oder zur Zytolyse fehlt, wurde auch in dieser Arbeit verwendet.

## 1.3 Die Blut-Hirn-Schranke

### 1.3.1 Aufbau der Blut-Hirn-Schranke und Besonderheiten des zerebralen Endothels

Die Hauptaufgabe der Blut-Hirn-Schranke besteht in der Aufrechterhaltung und Regulation der neuronalen Umgebung. Durch sie bildet das Gehirn ein eigenes, gegenüber dem Blutstrom abgeschlossenes Kompartiment, wodurch für die Neuronen ein stabiles, von den Schwankungen der Blutzusammensetzung unabhängiges inneres Milieu geschaffen wird.

Die Blut-Hirn-Schranke wird – wie vereinfacht in Abbildung 2 dargestellt - von einem komplexen zellulären System aus zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen, Astroglia, Perizyten, perivaskulären Makrophagen und einer Basalmembran gebildet (Rubin und Staddon, 1999; Li *et al.*, 2001).

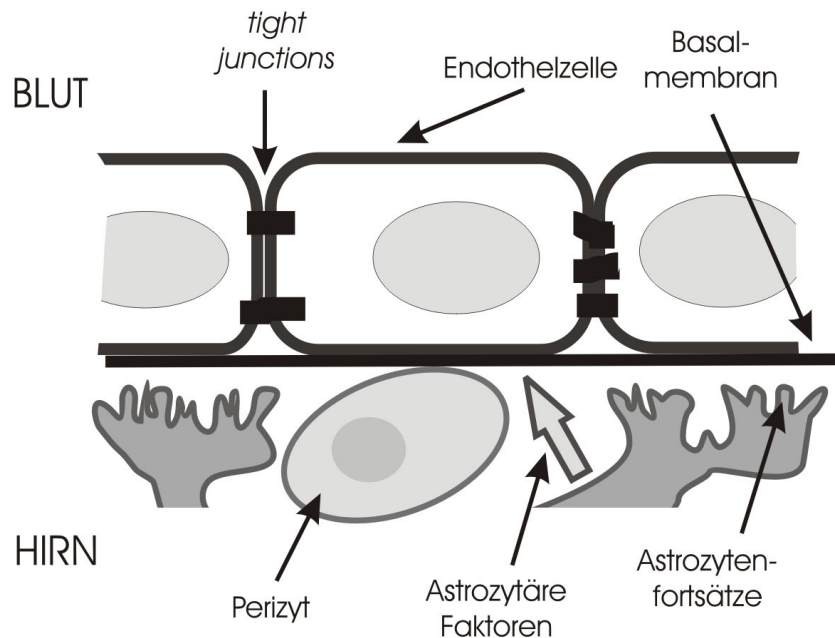


Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke (nach Rubin, 1999).

Dabei sind die zerebralen Endothelzellen das hauptsächliche zelluläre Substrat. Sie unterscheiden sich von Endothelzellen anderer Gewebe durch drei bedeutende Aspekte: 1. durch *tight junctions* mit extrem hohem elektrischen Widerstand, die die parazelluläre Permeabilität stark begrenzen; 2. durch eine fast fehlende pinozytotische Aktivität und daher geringem transzellulären Flux und 3. durch ein spezifisches Carrier- und Transportsystem. Durch die Kombination dieser drei Faktoren wird der unspezifische Transport von Ionen, Proteinen, Zellen und Erregern in das ZNS stark eingeschränkt (Pardridge *et al.*, 1999; Kniesel *et al.*, 2000, Gloor *et al.*, 2001).

Die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke wird außerdem von Astrozyten und deren Faktoren mitbestimmt, die Transporteigenschaften und Organisation der *tight junctions* regulieren (Abbott, 2002).

### 1.3.2 Pathophysiologie der Blut-Hirn-Schranke bei der bakteriellen Meningitis

Durch die Blut-Hirn-Schranke können neben bestimmten Stoffen und Mikroorganismen auch Blutzellen nur schwer in das ZNS gelangen. Aus diesem Grund existiert im ZNS ein besonderer Immunstatus, der durch eine geringe Leukozyten-Präsenz, niedrige Immunglobulinkonzentration sowie mangelnde opsonierende Aktivität gekennzeichnet ist (Stahel *et al.*, 1997). Das ZNS ist daher auch als Gebiet mit einer lokalisierten Immunschwäche bezeichnet worden (Koedel *et al.*, 2002).

Bei der bakteriellen Meningitis stellt der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke ein elementares Ereignis der Pathogenese dar. Es kommt plötzlich zu einem Übertritt von höhermolekularen Plasmabestandteilen und einem Verlust der zerebrovaskulären Autoregulation, die unter normalen Umständen einen konstanten zerebralen Perfusionsdruck gewährleistet. Dies führt zur Erhöhung des intrazerebrales Blutvolumen und zur Entwicklung eines Hirnödems. Klinisch kommt dies durch einen Anstieg des Hirndrucks und durch eine sogenannte Schrankenstörung, also einer Erhöhung der Proteinkonzentration im Liquor zum Ausdruck. Was sind die Mechanismen des Zusammenbruchs und wie kann es überhaupt zum Überschreiten von Bakterien über die Endothelzellen mit *tight junctions* kommen?

Zwar ist bekannt, daß eine hochgradige Bakteriämie Voraussetzung dafür ist, damit Mikroorganismen in den Subarachnoialraum übertreten können (Tuomanen *et al.*, 1996), jedoch ist der präzise Eintrittsort der Meningitiserreger in den Liquor noch immer weitgehend unklar. Für *S. pneumoniae* existieren viele Hinweise, daß die Invasion in das Gehirn über das zerebrale Endothel - und nicht über das choroidale Ependym - erfolgt (Koedel *et al.*, 2002). Deshalb wurden in dieser Arbeit zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen als Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke bei Pneumokokkenmeningitis eingesetzt.

Wie genau *S. pneumoniae* die Blut-Hirn-Schranke überwindet, ist unzureichend bekannt. Es wird spekuliert, daß das Bakterium mehrere Strategien benutzen könnte: 1. Transport durch die Endothelzellen durch aktive oder passive Transzytose; 2. Überqueren der Barriere zusammen mit oder im Inneren von Leukozyten und 3. parazelluläre Passage durch Sprengung der *tight junctions* und/oder Schädigung des Endothels (Tuomanen *et al.*, 1996).

Die tatsächliche Relevanz einiger dieser Mechanismen konnte bereits nachgewiesen werden.

So kann *S. pneumoniae* durch intakte Endothelzellen (der ersten Strategie entsprechend) transportiert werden (Ring *et al.*, 1998). Nach Anlagerung der Bakterien an die Zelloberfläche durch verschiedene Glukokonjugate (Cundell *et al.*, 1994), werden die Endothelzellen aktiviert. Dabei werden *Platelet-activating-factor*-(PAF)-Rezeptoren an der Oberfläche der Endothelzellen verstärkt exprimiert, die wiederum Phosphorylcholin der Pneumokokkenzellwand binden

(Cundell *et al.*, 1995). Nach dieser Interaktion kommt es zur schnellen Internalisierung des Rezeptors. Hierdurch gelangen die Pneumokokken zusammen mit den PAF-Rezeptoren in die Vakuolen der Zelle, wo sie sterben oder durch die Zelle transportiert werden (Ring *et al.*, 1998). Die zweite beschriebene Strategie trifft insbesondere für intrazellulären Bakterien, wie *Mycobacterium tuberculosis* und *Listeria monocytogenes* zu. Sie können in die Meningen eindringen, indem sie infizierte Leukozyten als „Trojanisches Pferd“ verwenden (Drevets und Leenen, 2000). Diese Strategie scheint jedoch bei Pneumokokken nur von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Bei Pneumokokkenmeningitis kommt es, wie in der dritten Strategie vermutet, zu Veränderungen der *tight junctions*, was zum Teil auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin 6 und 1 sowie TNF $\alpha$ , zurückgeführt wird (Wispelwey *et al.*, 1988). Im Liquor von Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis sind diese Zytokine erhöht (Täuber *et al.*, 1999). Die Liquorkonzentration von TNF $\alpha$  korreliert mit der Schwere der Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (Sharief *et al.*, 1992). In experimentellen Meningitis-Modellen konnte zudem gezeigt werden, daß auch die alleinige Injektion von TNF $\alpha$  zu einer schnellen Zunahme der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke führt (Kim *et al.*, 1992). Umgekehrt kann in einem *in-vivo*-Modell einer hämatogenen Pneumokokkenmeningitis durch die Blockade von TNF $\alpha$  mit einem neutralisierenden Antikörper die Störung der Blut-Hirn-Schranke und die Invasion von *S. pneumoniae* in das Gehirn verringert werden (Tsao *et al.*, 2002). Wahrscheinlich tragen unterschiedliche Mechanismen zur Wirkung von TNF $\alpha$  bei, wobei u.a. Metalloproteinasen, Adhäsionsmoleküle, NO-Produktion und der Cyclooxygenase-Signalweg eine Rolle spielen (Mayhan, 2002).

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß neben den Immunzellen auch die Endothelzellen selbst zur inflammatorischen Immunantwort durch die Bildung von TNF $\alpha$  beitragen (Freyer *et al.*, 1999). Ob zerebrale Endothelzellen allerdings von Pneumokokken bzw. ihren Bestandteilen nur aktiviert werden oder ob es auch zu einer Zellschädigung kommt, wurde bisher nicht genauer untersucht. Das Bakterium wäre damit nicht nur durch die Initiation einer Inflammationskaskade, sondern ganz direkt durch zytotoxische Mechanismen an der Destruktion der Blut-Hirn-Schranke beteiligt.

## 1.4 Apoptose - Der programmierte Zelltod

### 1.4.1 Biologisches Phänomen

Vielzellige Lebewesen sind darauf angewiesen, überschüssige und gefährliche Zellen beseitigen zu können. Dies trifft in besonderer Weise auf den Menschen zu, dessen komplex aufgebauter Organismus nur mit Hilfe einer Homöostase zwischen Zellproliferation und Zelltod Bestand haben kann. Dies wird eindrucksvoll durch die Rechnung illustriert, daß ein 80 Jahre alter Mensch ohne die Balance zwischen Zellteilung und natürlicher Absterberate der Zellen zwei Tonnen Knochenmark und Lymphknotengewebe sowie einen 16 km langen Darm hätte (Melino, 2001). Aus diesem Grund entstand früh in der evolutionären Entwicklung ein genetisch verankertes Programm des natürlichen Zelltodes, auch „Programmierter Zelltod“ genannt.

John Kerr beobachtete in den frühen siebziger Jahren mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen, daß es bei bestimmten Formen des Zelltodes zu einem geordneten Untergang der Zelle kommt, bei dem die intakten Zellorganellen in Membranvesikel eingeschnürt werden und die sterbende Zelle schließlich von Phagozyten inkorporiert und abgebaut wird (Kerr *et al.*, 1972). Er schlug eine Einteilung des Zelltodes in zwei große Kategorien vor. Entsprechend diesem Vorschlag wurde der Begriff *Necrosis*, der bis zu diesem Zeitpunkt für alle Formen des Zelltodes benutzt worden war, neu definiert und nur für solche Ereignisse verwendet, die „*gewalttätig sind und rapide zu einem Kollaps der inneren Homöostase führen*“ (Kerr *et al.*, 1972). Der Begriff *Apoptosis* wurde geprägt, um eine Kategorie des Zelltodes zu beschreiben, die „*eine ergänzende aber gegensätzliche Rolle zur Mitose in einer Zellpopulation spielt und deren morphologische Merkmale für ein aktives, vererbtes Phänomen spricht, das durch verschiedene, sowohl physiologische als auch pathologische Stimuli der Umwelt ausgelöst und inhibiert werden kann*“ (Kerr *et al.*, 1972). *Apoptosis*, abgeleitet von *apo* (ab, weg, los) und *ptosis* (Senkung, Fallen), sollte die Ähnlichkeit des programmierten Zelltodes mit dem Abfallen der Blätter eines Baumes verdeutlichen, da nur einzelne Zellen eines Zellverbandes zu Grunde gehen.

### 1.4.2 Die Bedeutung des Programmierten Zelltodes

Seit Kerrs Entdeckung wurden apoptotische Zelluntergänge für eine ganze Reihe physiologischer Mechanismen beschrieben. Zu diesen gehören beispielsweise die Modellierung



der Organe und Entstehung der Finger- und Zehenzwischenräume während der Embryogenese oder die Zellmauserung von Geweben mit hohem Zellumsatz (Renehan *et al.*, 2001).

Eine weitere wichtige Funktion der Apoptose besteht in der Entsorgung geschädigter Zellen. Dabei ist eine Kontrolle der Apoptose wichtig, da einerseits eine übersteigerte apoptotische Antwort das Risiko von degenerativen Erkrankungen und andererseits eine zu geringe Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli das Risiko von malignen Neubildungen erhöhen würde. Fehler in der Apoptoseregulation spielen daher eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von Krankheiten (Renehan *et al.*, 2001). Zu den Krankheiten, für die eine erhöhte Apoptoserate charakteristisch ist, zählen AIDS, neurodegenerative Krankheiten (Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose) und ischämische Ereignisse (Herzinfarkt oder Schlaganfall). Andere Erkrankungen sind mit einer verminderten Apoptose assoziiert. Hierzu gehören Virusinfektionen sowie Autoimmun- und Tumorerkrankungen (Renehan *et al.*, 2001; Hotchkiss *et al.*, 2002).

### 1.4.3 Morphologische Kennzeichen

Die Unterscheidung der beiden Formen des Zelltodes - Apoptose und Nekrose – erfolgt durch morphologische und biochemische Kriterien. Apoptose ist nach dieser Definition ein Vorgang, der morphologisch mit einer Schrumpfung (*Pyknosis*) und Fragmentierung (*Karyorrhexis*) des Zellkernes, Veränderungen und Blasenbildung der Membranen (*Membran-Blebbing*) und der Bildung von so genannten apoptotischen Körperchen (membransumgeschlossene Vesikel) verbunden ist (Wyllie, 1997). Durch das letztgenannte Merkmal bleibt eine Inflammationsantwort aus, da die Zellfragmente umhüllt bleiben und durch Makrophagen und benachbarten Zellen rasch abgebaut werden können. Die beschriebenen Prozesse sind energieabhängig. Lange vor dem Abschluß dieser Prozesse werden spezifische Phagozytosesignale auf der Zelloberfläche exprimiert (Savill *et al.*, 2000; Strasser *et al.*, 2000). Diese entstehen in eukaryonten Zellen durch die Externalisierung von Phosphatidylserin in der Membran-Doppelschicht (Fadok *et al.*, 1992).

Nekrose ist dagegen durch ein Anschwellen der Zelle und des Zellkernes, durch eine wahllose, ungeordnete Degradation des Chromatins und durch den frühen Verlust der Membranintegrität gekennzeichnet. Frühe Phagozytosesignale fehlen und durch die Lyse der Zelle mit Freisetzung von Zellbestandteilen wird eine entzündliche Reaktion ausgelöst (Haslett, 1992). Insgesamt handelt es sich um ein akzidentielles Ereignis, das nur durch die Aufhebung des auslösenden pathologischen Stimulus` verhindert werden kann (Leist und Jäättelä, 2001).

Tabelle 1: Zusammenfassung der wichtigsten morphologischen Unterschiede zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod. DNS = Desoxyribonucleinsäure

Morphologisches Merkmal	Apoptose	Nekrose
Membranöse Vesikel	+	-
Kondensation des Chromatins	+	-
DNS-Fragmentierung	+	-
Membran-Blebbing	+	-
Zytoplasmatische Vakuolen	-	+
Anschwellen der Zelle	-	+

#### 1.4.4 Ablauf der Apoptose

Die zur Apoptose erforderlichen Proteine sind in jeder Körperzelle vorhanden. Eine spontane, unkontrolliert ausgelöste Apoptose wird dadurch verhindert, daß diese Proteine entweder als inaktive Vorstufen vorliegen oder sich in abgeschlossenen Zellorganellen befinden, wo sie nicht wirksam werden können. Die Auslösung der Apoptose erfolgt durch spezifische Stimuli, wobei der zeitliche Ablauf schematisch in drei nacheinander ablaufende Schritte eingeteilt werden kann: Induktions-, Regulations- und Terminationsphase. Zunächst soll die gemeinsame Endstrecke aller Apoptosewege, die Terminationsphase, besprochen werden.

##### 1.4.4.1 Termination der Apoptose

Die Apoptose endet in den bereits aufgelisteten morphologischen Veränderungen der Zelle (s. Tabelle 1). Diese werden durch spezifische Enzyme hervorgerufen, die Cystein-Aspartat-Proteasen (*Caspasen*) genannt werden. Jede Säugetierzelle enthält eine ganze Anzahl von Caspasen. Insgesamt sind 14 verschiedene Caspasen identifiziert worden, zu denen 12 humane Homologe bekannt sind (Nicholson, 1999; Earnshaw, 1999; Nicholson 2000). Sie sind auch deshalb interessant, weil die Möglichkeit ihrer Inhibierung ein wichtiger Ansatzpunkt in der Entwicklung neuer Medikamente ist, die sich zum Teil bereits im Stadium der vorklinischen und klinischen Erprobung befinden (Nicholson, 2000).

Bis zu ihrer Aktivierung liegen die Caspasen als ungespaltene Proenzyme in der Zelle vor. Durch proteolytische Prozesse können sie aktiviert werden.

Funktionell unterteilen sich die Caspasen in zwei große Familien. Die erste besteht aus Mitgliedern, die mit Caspase-1 verwandt sind. Dies ist eine Caspase, die auch ICE (*Interleukin-1 $\beta$ -Converting enzyme*) genannt wird, weil sie für die proteolytische Reifung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1 $\beta$  eine Rolle spielt (Thornberry, 1992; Cerretti, 1992). Neben Caspase-1 sind dies Caspase-4 und -5. Ihre Funktion besteht zum überwiegenden Teil, wenn nicht sogar ausschließlich, aus der Prozessierung von Zytokinen.

Die andere Familie ist an der Regulation und Ausführung von Apoptose beteiligt. Sie lässt sich in die Initiator-Caspasen (z.B. Caspase-8, -9 und -10), die auf proapoptotische Stimuli reagieren und in die Effektor-Caspasen (z.B. Caspase-3, -6 und -7) unterteilen.

Die letztgenannten führen durch die Spaltung von über 100 zellulären Proteinen zu den für die Apoptose typischen Veränderungen der Zelle (Nicholson, 2000). Eine wichtige Substratgruppe der Caspasen sind dabei Zytoskelettproteine, zu denen zum Beispiel Aktin (Mashima, 1997), Gelsolin (Kamada, 1998) und  $\alpha$ -Fodrin (Martin, 1996) gehören.

Auch die morphologischen Veränderungen des Zellkernes mit der typischen Kondensation und Fragmentation des Chromatins sind an eine Aktivierung der Caspasen gekoppelt. Durch die Caspasen-abhängige Desoxyribonuklease (CAD) wird die DNS zwischen den Nukleosomen spezifisch gespalten, so daß 180 Basenpaare (bp) umfassende Fragmente entstehen, die bei Auftrennung in einem Agarosegel zum Bild einer *Apoptoseleiter* führen (Sakahira, 1998). Dieses, auch als Stadium II bezeichnete Endstadium der nukleären Apoptose ist durch eine sehr kompakte Kondensation des Chromatins ohne (IIa) oder mit (IIb) Bildung apoptotischer Körperchen gekennzeichnet (Loeffler *et al.*, 2001b; Daugas *et al.*, 2000). Ihr voran geht das Stadium I der nukleären Apoptose, für das eine periphere Chromatinkondensation sowie eine Spaltung der DNS in größere 50 kbp-Fragmente charakteristisch ist. Im Gegensatz zum Stadium II ist Stadium I ein von Caspasen unabhängiger Prozeß, der an eine Translokation des mitochondrialen Proteins *apoptosis inducing factor* (AIF) in den Kern gebunden ist (Daugas *et al.*, 2000).

### **1.4.4.2 Induktion und Regulation der Apoptose**

Zwei große Regulationswege können zur Induktion der Apoptose führen: ein extrinsischer Weg durch so genannte Todesrezeptoren und ein intrinsischer Weg, bei dem das Mitochondrium die zentrale Rolle spielt (Roy und Nicholson, 2000) [s. Abbildung 3].

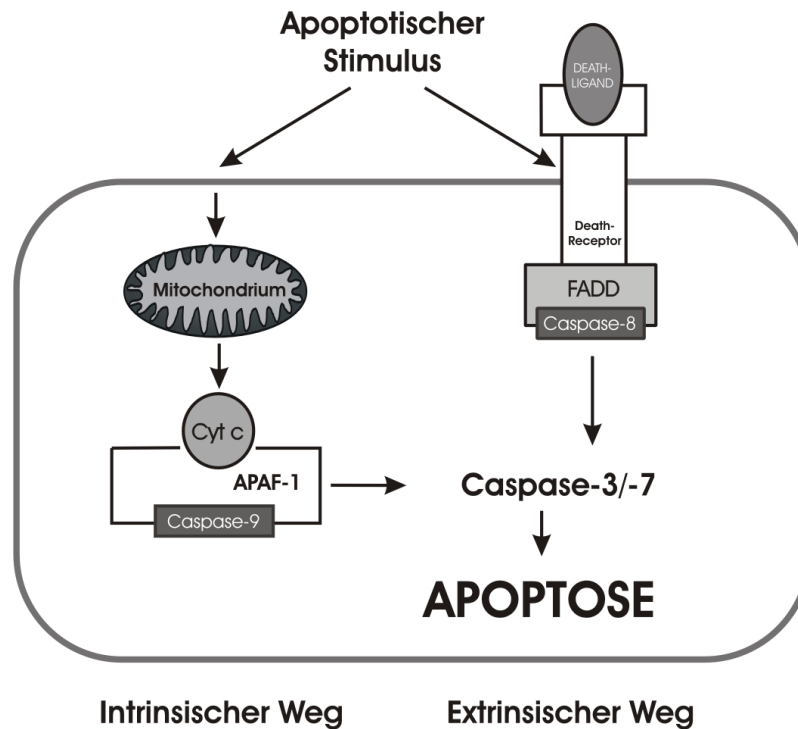


Abbildung 3: Vereinfachte schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Weges der klassischen Apoptose (nach Roy, 2000).  $\Delta\varphi_M$  = Symbol für das Mitochondriale Membranpotential. APAF-1 = Apoptosis activating protease-1. Cyt c = Cytochrom c. FADD = Fas-associated death domain.

Die intrinsische Signaltransduktion wird durch sehr unterschiedliche Stimuli, wie Sauerstoffradikale, Strahlung und Chemotherapeutika in Gang gesetzt (Hotchkiss *et al.*, 2002). Eigentlicher Auslöser der Apoptose ist das Mitochondrium, das hierbei als allgemeiner Schadenssensor und Monitor des metabolischen Zustandes der Zelle fungiert. Nach der Freisetzung eines proapoptischen Proteins (*Cytochrom c*) aus dem Mitochondrium, wird der Zelltod durch die Bildung eines makromolekularen Komplexes (*Apoptosom*) initiiert, indem durch die proteolytische Funktion eines in diesem Komplex enthaltenen Enzyms (APAF-1) Caspase-9 aktiviert wird (Green, 2000).

Der zweite, extrinsische Weg leitet Signale von extrazellulären Todes-Liganden, die meist zur TNF-Superfamilie gehören (z.B. TNF $\alpha$  und Fas-Ligand), weiter. Durch Bindung dieser Liganden an vorbestehende Rezeptorkomplexe wird letztlich die Aktivierung von Caspase-8 durch ein spezielles Adaptermolekül (*Fas-associated death domain* [FADD]) eingeleitet (Siegel *et al.*, 2000).

Sowohl Caspase-8 des extrinsischen Weges als auch Caspase-9, die durch den intrinsischen Weg aktiviert wird, können nun in einem gemeinsamen Endweg die bereits erwähnten Effektor-

Caspasen (Caspase-3/7) aktivieren und so die endgültige Exekution der klassischen Apoptose bewirken (Roy und Nicholson, 2000).

#### **1.4.5 Caspasen-unabhängiger programmierter Zelltod**

Neuere Erkenntnisse haben zu einer Lockerung der beschriebenen strikten Trennung zwischen Apoptose und Nekrose geführt. Es gibt verschiedene Argumente, die dafür sprechen, daß neben der klassischen (Caspasen-abhängigen) Apoptose auch andere Varianten des programmierten Zelltodes existieren, die mit ihr neben einigen wichtigen morphologischen Kriterien eben auch den programmierten Ablauf und damit die potentielle Hemmbarkeit gemeinsam haben.

So zeigte sich, daß verschiedene Zellen nach einer Aktivierung von proapoptotischen Caspasen überleben (Wright *et al.*, 1997; Jäättelä *et al.*, 1998; Foghsgaard *et al.*, 2001). Auch konnten in einem bestimmten Apoptosemodell typische Apoptosemerkmale wie Chromatinkondensation und *Membran-Blebbing* durch eine Blockierung von Caspasen nicht vollständig verhindert werden (Xiang *et al.*, 1996). In anderen Modellen konnte nachgewiesen werden, daß für einen programmierten Zelltod mit klaren morphologischen Kriterien der Apoptose eine Aktivierung von Caspasen nicht unbedingt nötig ist (Joza *et al.*, 2001). Zudem scheint auch die rasche Entsorgung der Reste der sterbenden Zelle nicht von einer Aktivierung der Caspasen abhängig zu sein (Chung *et al.*, 2000; Hirt *et al.*, 2000).

Die genannten Gründe machen eine differenziertere Definition des Zelltodes nötig, in der der Begriff „Programmierter Zelltod“ nicht mit „Klassischer Apoptose“ und mit der Aktivierung von Caspasen gleichgesetzt wird, sondern vielmehr auf der Morphologie und dem Schicksal der sterbenden Zellen basiert. Dies soll auch in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt werden.

#### **1.4.6 Mechanismen des Caspasen-unabhängigen programmierten Zelltodes**

Während die molekularen Mechanismen der klassischen Apoptose in den letzten Jahren bis ins Detail erforscht wurden, ist bei den meisten alternativen Wegen des programmierten Zelltodes meist nur wenig bekannt, was über morphologische Kriterien hinausgeht.

Man weiß jedoch, daß ähnlich wie bei der klassischen Apoptose bestimmte Proteasen - vergleichbar den Caspasen - eine Rolle spielen und daß der alternative Zelltod analog zum oben beschriebenen extrinsischen und intrinsischen Weg der klassischen Apoptose durch Todesrezeptoren oder mitochondriale Veränderungen ausgelöst werden kann (Leist und Jäättelä, 2001).

Ein in den letzten Jahren verstärkt untersuchtes Protein, der bereits erwähnte *apoptosis inducing factor* (AIF), ist an der Regulation eines großen Teils der publizierten Formen des Caspasen-unabhängigen Zelltodes beteiligt. Aus diesem Grund soll es im folgenden Abschnitt näher vorgestellt werden.

### 1.4.6.1 AIF

AIF nimmt in der intakten Zelle wahrscheinlich zwei wichtige Funktionen wahr. Zum einen ist dieses Protein ein Radikalfänger, der in der Lage ist, Wasserstoffperoxid abzubauen (Klein *et al.*, 2002) und zum anderen wird eine Funktion in der Atmungskette als Redoxpartner von NADH diskutiert (Mate *et al.*, 2002).

Neben diesen Funktionen in der lebenden Zelle ist das 57 kDa große Protein auch an der Regulation des Caspasen-unabhängigen Zelltodes beteiligt.

So konnte gezeigt werden, daß AIF in einem bestimmten Modell die frühe Phase der Apoptose kontrolliert und alle morphologischen Merkmale der Apoptose durch die Ausschaltung von AIF verhindert werden können (Joza *et al.*, 2001). Zur Erlangung der vollen Funktion wird es aus dem Mitochondrium in das Zytosol freigesetzt und in den Zellkern transloziert. Hier induziert AIF eine Spaltung des Chromatins in große (50 kbp-) Fragmente sowie eine periphere Chromatinkondensation, und damit eine Veränderung und Kondensation des Zellkerns, die für den alternativen programmierten Zelltod typisch sind und dem nukleären Apoptosestadium I entsprechen (van Gurp *et al.*, 2003). Die Spaltung der DNS in kleine oligonukleosomale 180 bp-Fragmente und eine kompaktere Chromatinkondensation ist, wie bereits erwähnt, typisch für die klassische Apoptose und eine Aktivierung von Caspasen (Susin *et al.*, 1999). Dieser Unterschied drückt sich in der Form des Chromatins aus: durch AIF lagert sich das Chromatin peripher am Kern an, bei der klassischen Apoptose dagegen entstehen kleine kompakte Chromatinstrukturen (s. Tabelle 2).

Wie AIF genau in der Lage ist, DNS zu degradieren, ist unbekannt, denn das Protein selbst besitzt keine intrinsische Nuklease-Aktivität (Miramar *et al.*, 2001; van Gurp *et al.*, 2003). Es gibt jedoch Hinweise, daß AIF mit der *Endonuclease G*, einem weiteren mitochondrialen Protein, das unabhängig von Caspasen DNS degradieren kann, interagiert (Wang *et al.*, 2002; Hansen und Nagley, 2003).

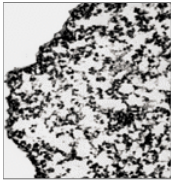
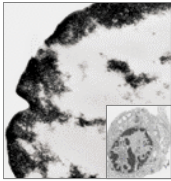
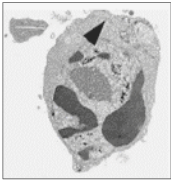
Neben den Veränderungen des Kernes löst AIF auch weitere, für den apoptotischen Zelltod typische Veränderungen in der Zelle aus, wie die Exposition des Phagozytosesignals

Phosphatidylserin an der Zelloberfläche oder den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (Ravagnan *et al.*, 2002; van Gorp *et al.*, 2003).

Insbesondere für neuronale Systeme, zum Beispiel bei traumatischem Hirnschaden (Zhang *et al.*, 2002), zerebraler Ischämie (Zhu *et al.*, 2003) sowie interessanterweise bei Pneumokokkeninfektion (Braun *et al.*, 2001) konnte nachgewiesen werden, daß AIF als wichtigster auslösender Faktor ohne jegliche Aktivierung von Caspasen zum programmierten Zelltod führt. Dabei konnte der induzierte Zelltod durch eine Inhibierung von AIF komplett blockiert werden.

Für den Zelltod zerebraler Endothelzellen wurde bisher nicht gezeigt, daß AIF ein entscheidender oder alleiniger Auslöser von Zelltod sein könnte, so daß dies ein neuer Ansatz wäre, der in der vorliegenden Arbeit untersucht werden soll.

*Tabelle 2: Nukleäre Veränderungen beim AIF-induzierten Zelltod und der klassischen Apoptose im Vergleich (nach Leist, 2000). Kbp = Kilobasenpaare. DNS = Desoxyribonukleinsäure.*

	<b>Lebende Zellen</b>	<b>AIF-induzierter Zelltod</b>	<b>Klassische Apoptose</b>
DNS-Fragmentierung	keine	große 50-kbp-Fragmente	oligonukleosomale 180-bp-Fragmente
Chromatin	homogene Verteilung	periphere Kondensation (=Stadium I)	kompakte Kondensation, (=Stadium II)
Kernmorphologie (Elektronenmikroskopie)			

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke ist ein wichtiges Ereignis in der Pathophysiologie der bakteriellen Meningitis, da das entstehende Hirnödem und die intrazerebrale Drucksteigerung für die immer noch hohe Letalität und Morbidität der bakteriellen Meningitis hauptsächlich verantwortlich sind.

Es konnte gezeigt werden, daß Inflammationsprozesse zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke beitragen. Mögliche direkte toxische Effekte von *S. pneumoniae* auf die Blut-Hirn-Schranke wurden bisher jedoch nicht untersucht. Dies ist deshalb relevant, da während einer bakteriellen Meningitis ein direkter Kontakt zwischen *S. pneumoniae* und zerebralen Endothelzellen, dem Hauptbestandteil der Blut-Hirn-Schranke, besteht (Leib und Täuber, 1999).

Wichtige Toxine, die zu einer solchen direkten Schädigung von zerebralen Endothelzellen führen könnten, sind Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, von denen nachgewiesen wurde, daß sie eine toxische Wirkung auf alveoläre Epithelzellen besitzen (Duane *et al.*, 1993; Rubins *et al.*, 1993).

Der programmierte Zelltod ist neben anderen wichtigen Erkrankungen an der Pathophysiologie von Infektionen und Sepsis beteiligt (Hotchkiss, 2002). Auch *S. pneumoniae* ist in der Lage, einen programmierten Zelltod in unterschiedlichen Zellsystemen zu induzieren. In Mikrogliazellen und Neuronen kommt es, begleitet von einer Freisetzung von *apoptosis inducing factor* (AIF), zu einem raschen Eintritt von Zelltod (Braun *et al.*, 2001).

Um zu überprüfen, ob lebende Pneumokokken bzw. ihre Toxine über die Initiation von programmiertem Zelltod zu einem Untergang der die Blut-Hirn-Schranke bildenden Endothelzellen führen, wurden in einem *in-vitro*-System Kulturen zerebraler mikrovaskulärer Endothelzellen mit lebenden Pneumokokken inkubiert und der Einfluss auf Morphologie und Viabilität mittels verschiedener biochemischer und morphologischer Verfahren getestet.

#### **Die Arbeitshypothesen zu Beginn der Untersuchungen lauteten:**

1. Lebende Pneumokokken induzieren einen programmierten Zelltod (Apoptose) in Kulturen zerebraler mikrovaskulärer Endothelzellen.
2. Beim Pneumokokken-induzierten endothelialen Zelltod kommt es zu einer Aktivierung von Caspasen.
3. Die Virulenzfaktoren Pneumolysin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und das Adhärenzprotein CbpA sind für die Induktion des endothelialen Zelltodes entscheidend.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Kulturen der primären zerebralen Kapillarendothelzellen

Die Zellkulturmedien, fötales Kälberserum (FKS) und sonstige Zusatzlösungen wurden von Biochrom KG, Berlin, bezogen. Vom FKS wurde über den gesamten Zeitraum die gleiche Charge verwendet und vor Gebrauch eine Hitze-Inaktivierung vorgenommen. Als Standardpuffer diente, wenn nicht anders bezeichnet, grundsätzlich Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (Life Technology, Karlsruhe). Kollagenase/Dispase, Desoxyribonuklease (DNase), E.C.3.1.21.1 und Endothelzell-Wachstumsfaktor (ECGF) wurden von Böhlinger/Mannheim, Mannheim, Kollagenase von SERVA, Heidelberg und Rinderserumalbumin (BSA) von PAA, Cölbe, bezogen.

Die Primärkulturen wurden von Wistar-Ratten, die vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterenärmedizin (BgVV) Berlin geliefert wurden, gewonnen. Die Narkotisierung der Tiere erfolgte mit Narkoseether der Hoechst AG, Frankfurt M. Die für die Zellkultur verwendeten sterilen Plastikartikel wurden von den Firmen Becton Dickinson, Heidelberg, und Nunc GmbH, Wiesbaden, bezogen.

### Medien und Lösungen

#### Wachstumsmedium

HAM'S F10 (mit 1,2 g/l  $\text{NaHCO}_3$ ) mit den nachfolgend aufgeführten Zusätzen:

- 20 % FKS
- Penicillin/Streptomycin (100E/ $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
- Amphotericin B (100E/ $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
- 1,2 mM N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin, so genanntes "stabiles L-Glutamin"
- 20 mg/l Endothelial Cell Growth Factor (ECGF)
- 100 U/l Heparin
- 250  $\mu\text{g}$  Vitamin C

#### Präparationsmedium (DMEM mit den Zusätzen:)

- 10 % FKS
- 2 mM L-Glutamin
- 1 % Penicillin/Streptomycin

### **Kollagenase**

Vom Lyophilisat wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 25 U/ml in DMEM hergestellt. Diese wurde steril filtriert und in Aliquots zu je 2 ml bei -20 °C gelagert. Die Endkonzentration betrug 2,5 U/ml.

### **Kollagenase/Dispase**

100 mg Lyophilisat wurden in 1 ml destilliertem Wasser aufgenommen, mit PBS auf 10 ml aufgefüllt, steril filtriert und in Aliquots zu je 1 ml bei -20 °C gelagert. Das Enzymgemisch wurde in einer Endkonzentration von 0,1 U/ml (Kollagenase) bzw. 0,8 U/ml (Dispase) verwendet.

### **BSA (Albumin bovine Fraction V, pH 7,0)**

25 g BSA wurden in 75 ml PBS aufgelöst, mit Sterilfilter easy-flow 0,45 µm filtriert und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### **DNase**

8 mg Trockensubstanz wurden in 10 ml PBS aufgelöst, steril filtriert, aliquotiert zu je 250 µl und bei -20 °C aufbewahrt. Die DNase wurde in einer Endkonzentration von 10 U/ml verwendet.

### **Präparation und Kultivierung**

Drei bis vier Wochen alte Wistar-Ratten wurden narkotisiert und danach dekapitiert. Das Gehirn wurde sofort entfernt und in eiskaltem PBS gelagert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Kortizes wurden präpariert und die Meningen durch Abrollen auf einem sterilen Löschpapier sorgfältig entfernt. Anschließend erfolgte mit Hilfe eines Skalpell und durch mehrmaliges Aufziehen in einer 2 ml-Spritze eine mechanische Zerkleinerung des Gewebes. Das homogenisierte Gewebe wurde in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, mit Präparationsmedium auf 18 ml aufgefüllt und Kollagenase (2,5 U/l) zugegeben. Es folgten eine einstündige Kollagenase-Verdauung bei 37 °C im Wasserbad und eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Im Anschluss wurde das Gewebhomogenisat mit kalter 25 %iger BSA-Lösung in einem Verhältnis von 1:1 aufgefüllt und gut durchmischt. Nach einer 25-minütigen Zentrifugation bei 1400 g und 4 °C wurde das entstandene Pellet in 10 ml Präparationsmedium resuspendiert und Kollagenase/Dispase zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde das Homogenisat bei 4 °C und 550 g für 10 min zentrifugiert, und das Pellet in 5 ml Präparationsmedium resuspendiert. Der Zugabe von 125 µl DNase und kurzer Inkubation folgte eine erneute 10-minütige Zentrifugation

bei 550 g und 4 °C. Das Pellet wurde in 10 ml Präparationsmedium resuspendiert, nochmals bei 550 g abzentrifugiert, in Wachstumsmedium aufgenommen und sorgfältig homogenisiert. Diese Suspension von zerebralen Mikrokapillaren wurde in die beschichteten Kulturgefäße ausgesät. Dies erfolgte abhängig vom Experiment in Multischalen mit 6, 24 oder 96 Vertiefungen. Die Kulturgefäße wurden am Tag der Präparation mit Kollagen G, das zuvor in PBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  1:6 verdünnt wurde, beschichtet. Nach einer Einwirkzeit von 2-3 min wurde zweimal mit PBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen. Nach 2-3 h erfolgte der erste Mediumwechsel, danach wurde täglich das Medium erneuert. Ab dem 3. Tag nach Präparation wurde beim Mediumwechsel zusätzlich mit PBS gespült. Die Kulturen wurden bei 5 %  $\text{CO}_2/95$  % Luft, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37 °C gehalten. Nach 6-8 d bildeten die Kulturen einen konfluenten Monolayer und wurden für die Experimente verwendet.

In Anlehnung an Freyer *et al.* (1999) wurde die Reinheit der Endothelzellkulturen mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen, die gegen die Gliamarker saures Gliafaser-Protein (Dako, Hamburg), OX-42 (Genzyme, Cambridge, USA) und CD14 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) gerichtet waren. Endothelzellen wurden durch Antikörper gegen von-Willebrandt-Faktor VIII (Dako, Hamburg) identifiziert. Die Darstellung der Zellen erfolgte mit HRP-konjugierten sekundären Antikörpern (Dako, Hamburg). Zur Auswertung wurden die Zellmonolayer von zwei erfahrenen Untersuchern lichtmikroskopisch (Vergrößerung 200-fach) untersucht, wobei die Gliamarker-positiven zu den von-Willebrandt-Faktor-positiven Zellen in Relation gesetzt wurden. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt. 0,05 % der Zellen waren GFAP-positiv, und 1 % der Zellen ließ sich mit Antikörpern gegen OX-42 und CD 14 anfärben. 99 % der Zellen zeigten eine positive Färbung für den von-Willebrandt-Faktor VIII.

## 2.2 Bakterienkulturen

### Bakterienstämme (*S. pneumoniae*)

- D39 Kapseltyp 2 (Rockefeller University, New York, USA)
- PInA<sup>-</sup>, Pneumolysin-negative Mutante von D39 (D. Briles, University of Alabama, Birmingham, USA; Berry *et al.*, 1989)
- PInA<sup>-</sup>/SpxB<sup>-</sup>, Pyruvatoxidase- und Pneumolysin-negative Doppelmutante von D39 (E. Tuomanen, Memphis, USA; Braun *et al.*, 2002)

- R6, unbekapseltes Derivat von D39 (Rockefeller University, New York, USA)
- CbpA<sup>-</sup>, *Choline-binding protein A* negative Mutante von R6 (Rosenow *et al.*, 1997)

### Medien und Lösungen

- Erythromycin (Biochrom, Deutschland)
- Chloramphenicol (Biochrom, Deutschland)
- Blutagarplatten (Merckoplate<sup>®</sup>, Merck, Deutschland)

### C+Y-Medium

- 400 ml Prä C Medium
- 13 ml Ergänzungsmedium
- 5 ml Pyruvat (2 %)
- 15 ml Kaliumphosphatpuffer (1M)
- 10 ml Adams III Lösung
- 10 ml Hefe (5 %)
- 10 ml Glutamin (1 mg/ml)

### Prä C Medium (ph 7.4)

- 1,45 g Natriumacetat
- 6 mg L-Tryptophan
- 60 mg L-Cystein
- 6 g Casamino Acids
- 1,2 l H<sub>2</sub>O

### 3-fach-Salzlösung

- 10 g MgCl<sub>2</sub>
- 50 mg CaCl<sub>2</sub>
- 20 µl MnSO<sub>4</sub>
- 100 ml H<sub>2</sub>O

### Ergänzungsmedium

- 60 ml 3-fach Salzlösung
- 120 ml Glucose (20 %)
- 6 ml Sucrose (50 %)
- 120 ml Adenosin (2 mg/ml)
- 120 ml Uridin (2 mg/ml)
- 14 mg Riboflavin

### Adams I Lösung

- 60 µl Biotin (0.5 mg/ml)
- 30 mg Nikotinsäure
- 35 mg Pyridoxin
- 120 mg Ca-pentithotat
- 32 mg Thiamin

### Adams II Lösung

- 64 ml Adams I Lösung
- 16 ml Adams III Lösung
- 800 mg Asparagin
- 80 mg Cholin
- 0,64 ml CaCl<sub>2</sub> (1%)
- 400 ml H<sub>2</sub>O

### Adams III Lösung

- 50 mg FeSO<sub>4</sub>
- 50 mg CuSO<sub>4</sub>
- 50 mg ZnSO<sub>4</sub>
- 20 mg MgCl<sub>2</sub>
- 1 ml HCl
- 100 ml H<sub>2</sub>O

### Durchführung

Die Pneumokokkenstämme wurden in C+Y-Medium und 15 % Glycerol bei - 80 °C aufbewahrt. Zur Durchführung der Experimente wurden in Anlehnung an Braun *et al.* (2002) 4 ml C+Y-Medium mit der jeweiligen tiefgefrorenen Bakteriensuspension beimpft und über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Anzucht der Mutanten wurde das Medium mit Erythromycin in einer Endkonzentration von 1,5 µg/ml versetzt, die Doppelmutante zusätzlich mit Chloramphenicol (Endkonzentration 2 µg/ml). Am nächsten Morgen erfolgte eine Rückverdünnung der Pneumokokkensuspension mit 3 ml frischem Medium auf 1 ml Bakteriensuspension, wobei die Optische Dichte (OD), gemessen im Helios Σ Spectrometer von Thermospectronic bei einer Wellenlänge von 620 nm, unter 0,2 betragen sollte. Die Bakterienkulturen wurden daraufhin im Brutschrank bis zu einer OD von 0,5-0,6 inkubiert. Bei dieser Dichte kann von einer linearen Phase des Wachstums der Bakterien ausgegangen werden. Danach wurden sie in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 8000 rpm in einer Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415 D) für 3 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1400 µl Zellstimulationsmedium ohne Antibiotika vorsichtig resuspendiert und durch Verdünnung mit Zellstimulationsmedium auf eine OD von 0,1 eingestellt. Diese Optische Dichte korrespondiert mit einer Pneumokokkenkonzentration von 10<sup>8</sup> colony forming units pro ml (cfu/ml). Dies wurde durch entsprechende Verdünnungen und das Ausstreichen auf Blutagarplatten verifiziert. Durch weiteres Verdünnen mit Zellstimulationsmedium wurde die jeweils benötigte Pneumokokkenkonzentration eingestellt und zur Stimulation auf die vorbereiteten Endothelzellen pipettiert.

## 2.3 Stimulation der zerebralen Endothelzellen

### Medien und Chemikalien

- zVAD-fmk (Pan-Caspase Inhibitor, Calbiochem, Heidelberg)
- Katalase (Sigma, St. Louis, USA)
- Wasserstoffperoxid (Merck KGaA, Darmstadt)
- Staurosporin (Sigma, St. Louis, USA)
- Pneumolysin (Wildtyp, D385N, W433F, Braun *et al.*, 2001)

### Zellstimulationsmedium

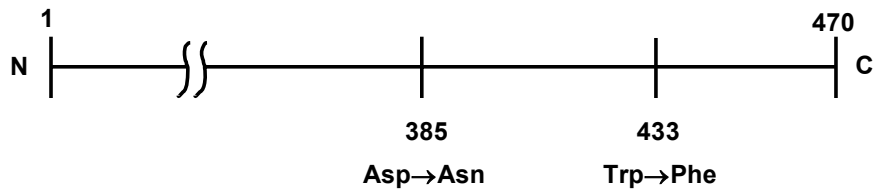
Die Stimulation der Zellkulturen erfolgte in Wachstumsmedium (s. oben), dem keine Antibiotika zugesetzt wurden. Es kam nur Medium mit einem Endotoxingehalt  $< 0,01$  ng/ml zum Einsatz.

### Caspaseninhibitor

Der Caspaseninhibitor zVAD-fmk (irreversibler Pan-Caspase Inhibitor, Calbiochem, Heidelberg) wurde in einer 10 mM Stammlösung in DMSO angesetzt und in einer Endkonzentration von 100  $\mu$ M angewendet. Die Stammlösung wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### Pneumolysin

Durch eine Punktmutation im Pneumolysin-Gen in der Domäne für Komplementaktivierung (D385N) sowie für die zytolytische Aktivität (W433F) entstanden in ihren Eigenschaften veränderte Pneumolysin-Proteine. Die Herstellung und Testung der Eigenschaften erfolgte nach Mitchell *et al.* (1997). In Abbildung 4 sind die Eigenschaften der veränderten Pneumolysin-Proteine zusammengefaßt.



Aktivität	WT	W433F	D385N
hämolytisch	100%	1%	100%
Komplement-aktivierend	100%	100%	0%

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Proteins Pneumolysin. Durch Punktmutation entstanden Pneumolysin-Proteine mit veränderten Eigenschaften. Bei D385N ("Komplement") führte der Austausch von Aspartat durch Asparagin an Stelle 385 zum Verlust der Komplementaktivierung, bei W433F ("Zytolyse") kam es durch den Austausch von Tryptophan durch Phenylalanin an Stelle 433 zu einem Verlust der zytolytischen Aktivität.

### Durchführung

Die Endothelzellen wurden nach 7-tägiger Kultivierung in Zellkulturplatten mit 6, 24 oder 96 Vertiefungen 2 x mit sterilem PBS gespült, um das antibiotikahaltige Wachstumsmedium vollständig zu entfernen. Anschließend wurde die in Stimulationsmedium verdünnte Pneumokokkensuspension in der gewünschten Konzentration ( $10^6$ ,  $10^7$  oder  $10^8$  cfu/ml) auf die Zellen gegeben und im Brutschrank bis zum jeweiligen Zeitpunkt (z.B. 3, 6, 9, 12 h) inkubiert. Als Negativkontrolle erfolgte die Zugabe der gleichen Menge PBS. In den Zellkulturschalen kam es zu einem weiteren langsamen Wachstum der Pneumokokken mit einer Vermehrung von etwa 1 log pro 6 h. Zur Kontrolle der Konzentration und der Kultur wurde die Bakteriensuspension verdünnt und auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Dabei zeigten die miteinander verglichenen Bakterienstämme jeweils eine vergleichbare Wachstumskurve. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> konnten die gewachsenen Kolonien gezählt und mit der Ausgangskonzentration korreliert werden. Für die Experimente mit dem Caspaseninhibitor wurden die Zellen mit zVAD-fmk in Stimulationsmedium (ohne Antibiotika) 1 h präinkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von einer so großen Menge Pneumokokkensuspension, daß eine Endkonzentration von  $10^7$  cfu/ml Pneumokokken entstand. Zum gleichen Zeitpunkt wurde Katalase in einer Endkonzentration von 1250 U/ml zugegeben. Die Inkubation der Zellen mit Staurosporin (Endkonzentration: 1 µM), Wasserstoffperoxid und dem gereinigten Pneumolysin in der jeweiligen Konzentration wurde ebenfalls im Brutschrank bis zum gewünschten Zeitpunkt durchgeführt.

## 2.4 Untersuchung der Zellkernmorphologie mit DNS-Farbstoffen (AO/EB)

### Chemikalien und Lösungen

- Ethidiumbromid (Sigma, St. Louis, USA)
- Acridinorange (Sigma, St. Louis, USA)

### Durchführung

Ethidiumbromid und Acridinorange sind fluoreszierende, interkalierende DNS-Farbstoffe. Acridinorange wird als Lebendfarbstoff von vitalen Zellen aufgenommen und färbt gesunde Zellkerne grün. Ethidiumbromid wird von der Zelle nur durch eine geschädigte Zellmembran aufgenommen und färbt den Zellkern rot bzw. orange. Die Doppelfärbung mit Ethidiumbromid und Acridinorange erlaubt eine Differenzierung zwischen verschiedenen Zustandsformen der Zelle:

- Lebende Zellen weisen einen grünen Zellkern und eine normale Zellgröße auf,
- frühapoptotische Zellen zeigen einen grünen kondensierten, geschrumpften oder fragmentierten Zellkern,
- spätapoptotische Zellen haben einen roten kondensierten, geschrumpften oder fragmentierten Zellkern und
- nekrotische Zellen fallen durch einen roten normalkonfigurierten oder ballonierten Zellkern auf.

Acridinorange (AO) und Ethidiumbromid (EB) wurden als Stammlösung in einer Konzentration von 1 mg/ml angesetzt. Die zu Versuche benutzte Endkonzentration des Doppelfarbstoffes betrug 2 µg/ml und wurde durch Verdünnung der Stammlösung mit PBS erreicht. Die Acridinorange/Ethidiumbromid-Färbung wurde in Platten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Nach Inkubation mit Bakterien oder anderen Apoptose induzierenden Reagenzien wurden 2 x mit PBS gewaschen und jeweils 2 µg/ml AO und 2 µg/ml EB in 100 µl PBS pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop in einer 400-fachen Vergrößerung begutachtet und die einzelnen Zellen nach oben genannten Kriterien differenziert und gezählt. Die Auswertung der Versuche erfolgte unter prozentualer Angabe der lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen in Bezug auf die Gesamtzellzahl.



## 2.5 Untersuchung der DNS-Degradation mit der TUNEL-Methode

### Material

- ApopTAG<sup>®</sup> Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit S 7100 (Intergen Company, New York, USA)

### Durchführung

Die zerebralen Endothelzellen wurden in kleinen Petrischalen mit einem Parafinring ausgesät und wie oben beschrieben über 7 Tage in Endothelzellmedium kultiviert. Die Zellstimulation erfolgte anschließend mit lebenden Pneumokokken (R6, D39 oder PlnA<sup>-</sup>) in einer Konzentration von  $10^7$  cfu/ml und/oder Katalase (1250 U/ml) bzw. gleicher Menge PBS. 12 h nach Inkubationsbeginn wurden die Zellen 2 mal mit PBS gespült und anschließend die gesamte Flüssigkeit abgesaugt. Die Zellen blieben danach zum Trocknen unter dem Abzug stehen. Die Fixierung der Zellen erfolgte für 30 min mit 4 % PFA-Lösung. Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurden die Zellen für 8 min mit Proteinase K (20 mg/ml in TrisHCl) inkubiert. Nach erneuter Spülung mit PBS (3 x 5 min) erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit Na Azide (0,1 M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1 %, Triton X 0,3 %). Die Zellen wurden wiederum mit PBS (3 x 5 min) gespült und kurz (30 s) mit Äquilibriumspuffer inkubiert. Anschließend erfolgte eine 60-minütige Inkubation der Zellen mit TdT-Enzym bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Die Petrischale wurde dazu mit einem Deckel versehen, in eine Schachtel mit angefeuchtetem Zellstoff gestellt und mit Parafilm abgedichtet. Daraufhin wurde eine 10-minütige Inkubation mit Stop/Waschpuffer und eine weitere Spülung mit PBS (3 x 5 min) durchgeführt. Die Inkubation mit dem Alpha Digoxigenin Peroxidase-Konjugat fand danach für 30 min bei Raumtemperatur statt. Nach erneuter Spülung mit PBS (3 x 5 min) wurde das Substratgemisch, bestehend aus einem Tropfen Reagenz (Nickel) und 2,5 ml dH<sub>2</sub>O gemischt und auf die Zellen gegeben. Die Inkubationszeit betrug etwa 2 min. Nach einem erneuten Waschschrift mit dH<sub>2</sub>O (3 x 5 min) wurde der Parafinring vorsichtig abgekratzt und ein Tropfen Einbettmedium auf die gefärbten Zellen gegeben. Nachdem ein Deckglas vorsichtig auf den Zellen platziert wurde, erfolgte das Trocknen über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Zellen unter einem Lichtmikroskop begutachtet und in einer Vergrößerung von 1:100 fotografiert.

## 2.6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

### Chemikalien

- Osmiumtetroxid (Plano GmbH, Wetzlar)
- Hydroxypropylmetacrylat (Roth, Karlsruhe)
- Epon (Roth, Karlsruhe)
- Uranylacetat (Serva, Heidelberg)
- Bleicitrat (Leica, Bensheim)

### Durchführung

Die EM-Bilder wurden nach einem modifizierten Protokoll von Schulz (1977) hergestellt. Dazu wurden zerebrale Endothelzellen in Kulturplatten mit 6 Vertiefungen kultiviert, mit Pneumokokken oder PBS inkubiert, 2 x mit PBS gespült und mit jeweils 3% PFA und Glutaraldehyd in PBS bei einem pH von 7,4 und einer Temperatur von 4°C über Nacht fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 3 x 10 min mit Phosphatpuffer (0,1-0,2 M) gespült und mit Osmiumtetroxid in einer 1%igen Lösung in Phosphatpuffer mit 6% Saccharose für 1 h inkubiert. Nach vorsichtigem Absaugen wurde wiederholt mit Phosphatpuffer gespült. Die Zellen wurden nun entwässert und dazu in eine aufsteigenden Alkoholreihe getaucht, beginnend bei 50 % für 5 min, dann 70 % für eine Stunde, 90 % für 5 min, 96 % für 5 min und zum Schluß in 100 %igem Alkohol für 2 x 10 min. Um die Löslichkeit des Epons zu erhöhen, wurden die Zellen für 2 x 10 min in Hydroxypropylmetacrylat (HPMA) getaucht und anschließend für 1 h mit HPMA-Epon (1:1) inkubiert. Nach sorgfältigem Entfernen des Gemisches erfolgte eine erneute Inkubation mit HPMA-Epon über Nacht. Durch das Verdampfen des HPMA kam es dabei zu einer allmählichen Eindickung des Epon. Diese Masse wurde erneut entfernt und Epon 812 (mit Aktivator- und Beschleunigerzusätzen) auf die Zellen gegeben. Dieser Vorgang wurde 2 x wiederholt, wobei das Epon je 1 h auf den Zellen belassen wurde. Als letzter Schritt wurde Epon so dünn wie möglich auf die Zellen gegeben und bei 60°C für 24 bis 48 h auspolymerisieren lassen. Die Platte konnte nun rückwärtig mit einem Spezialbohrer angebohrt werden. Das herausgebohrte Stück wurde getrennt und der Kunststoff vom Zellrasen am Epon gelöst. Eine leere Gelatine kapsel wurde mit Epon gefüllt und oben abgeschnitten. Auf diese Stelle wurde ein wenig Sekundenkleber gegeben und das Stück Epon und Zellrasen mit der Eponseite auf der Kapsel befestigt. Mit einem Schnittgerät (Ultra Cut S) wurden nun ca. 600 nm dünne Schnitte hergestellt. Die Schnitte konnten aus destilliertem Wasser auf so genannte *Grids* (Plano GmbH,

Wetzlar) einzeln mit einer Pinzette aufgenommen werden. Danach wurden die Schnitte mit Schwermetallionen (Uranylacetat und Bleicitrat) nach einem festgelegten Programm in einem Schnittkontrastierungs-Automaten von Leica kontrastiert. Die *Grids* wurden getrocknet und bis zum Einschleusen in das Elektronenmikroskop in abgeschlossenen Boxen aufbewahrt. Zum Herstellen der Aufnahmen wurde ein EM 900 der Firma Zeiss benutzt. Die Präparate wurden bei durchschnittlich 80 kV betrachtet. Vergrößerungen waren bis 50 000-fach einstellbar.

### 2.7 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

#### **Puffer und Chemikalien**

- InCert Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf)
- 0,5 x TBE
- Ethidiumbromid (Sigma, St. Louis, USA)

#### **5 x TBE**

- 500ml Aqua bidest
- 54g Trisbase
- 27,5 g BorAcid
- 3,802 g EDTA

#### **NDS Puffer**

- 0,5 M EDTA pH 7,5
- 1 % Laurylsarcosin
- 1 mg/ml Proteinase K

#### **Durchführung**

In Platten mit 6 Vertiefungen kultivierte zerebrale Endothelzellen wurden nach Stimulation mit Pneumokokken oder PBS 2 x mit PBS gewaschen, in PBS vorsichtig abgekratzt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 75 µl PBS resuspendiert. 60 mg InCert Agarose wurden in 4 ml PBS gelöst (Konzentration 1,5 %), im Wasserbad bei ca. 65 °C geschmolzen und danach bei 50 °C warmgehalten. Inzwischen wurde die Form für die Blöckchen (Geiger Handling GmbH, Dornhan) gründlich mit destilliertem Wasser gespült und mit Tesafilm abgeklebt. Nach Zusammenpipettieren und Mischen von 75 µl Zellsubstrat und 75 µl der erwärmten 1,5 %igen InCert Agarose konnte das Zell-Agarose-Gemisch in die Form gefüllt werden und bei 4 °C für 30 min abkühlen. Danach erfolgte ein Proteinverdau der entstandenen Zell-Agarose-Blöckchen mit NDS Puffer für 36-48 h bei 50 °C.

Ein 1 %-iges Agarosegel in 0,5 x TBE wurde gegossen und für 1 h auspolymerisiert. Die Blöckchen wurden 3 x mit TBE gewaschen, aus der Form genommen und in die Taschen des

Agarosegels gefüllt, die anschließend mit Agarose versiegelt wurden. Als Elektrophoresepuffer wurden 2,5 l 0,5 x TBE verwendet. In einem Bio-Rad CHEF-DR II-Gerät (Richmond, CA) erfolgte eine 24-stündige Elektrophorese bei 190 V und einer Pulsrichtungsveränderung alle 60 s im Winkel von 120 °. Das Gel wurde in einem Ethidiumbromid-Bad für 30 min gefärbt, in TBE wieder entfärbt und in einem Typhoon-Gerät gescannt und ausgewertet. Als kb-Marker wurde der Lamda Ladder PFG Marker (New England Biolabs, USA) benutzt.

### 2.8 Messung der Caspaseaktivität

#### Material

- Lysepuffer (Pharmlingen, Heidelberg)
- HEPES (Calbiochem, Heidelberg)

#### Caspasesubstrate (Calbiochem, Heidelberg)

- Caspase-3 (MW 675,6; AMC-gekoppelt, Stammlösung: 1,5 mM in DMSO)
- Caspase-8 (MW 821,8; AFC-gekoppelt, Stammlösung: 1,5 mM in DMSO)
- Caspase-9 (MW 765,7; AFC-gekoppelt, Stammlösung: 1,5 mM in DMSO)

#### Durchführung

Zur Bestimmung der Aktivität von Caspasen in Extrakten, wurden diese mit Tetrapeptidsubstraten für Caspasen versetzt. Der Umsatz dieser Substrate lässt sich durch die Freisetzung einer fluorophoren (Aminotrifluoromthylcoumarin, AFC bzw. Aminomethylcoumarin, AMC) Gruppe, die an Position 1 des Tetrapeptids gekoppelt ist, quantifizieren. Die Aktivität berechnet sich aus der freigesetzten Gruppe (AFC bzw. AMC) in pmol der Inkubationszeit (in min) und der eingesetzten Gesamtproteinmenge (in mg) nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität} = \text{Produktmenge (pmol)} / \text{Proteinmenge (mg)} \times \text{Inkubationszeit (min)}.$$

In Anlehnung an Braun *et. al* (2001) wurden die Caspaseaktivitätsbestimmungen als Einzeitmessungen nach 60 min durchgeführt. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, weil in diesem Zeitraum auch für höhere Caspasekonzentrationen eine nahezu lineare Korrelation zwischen Reaktionszeit und gemessener Fluoreszenz (Emission) angenommen werden kann, wie Implementierungsversuche in unserem Labor sowie Namura *et al.* (1998) zeigten.

Die Endothelzellen wurden stimuliert, 2 x mit PBS gewaschen und anschließend in PBS abgekratzt. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte 2 ml Eppendorfröhrchen überführt und zentrifugiert (5 min/1000 g/4 C°). Der Überstand wurde verworfen und das trockene Pellet schnell auf Trockeneis überführt und bei -80C° gelagert. Das Pellet wurde in 180µl kaltem Lysepuffer resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und gut durchmischt. Nach einer Zentrifugation (10 min/23000 g/4 C°) wurde das Zellysate auf Eis gestellt und das Pellet verworfen. Im Anschluß wurden folgende Substanzen in eine Vertiefung einer 96-ger Platte pipettiert:

- 80 µl HEPES
- 2 µl fluoreszenzgekoppeltes Caspasesubstrat (Stamm: 1,5mM)
- 20 µl Zellysate

Die Platte wurde mit Parafilm oder Alufolie abgedichtet und für 1h bei 37 °C inkubiert.

Die Messung der Caspaseaktivität erfolgte in einem Fluoreszenzreader (Cyto Fluor, Per Septive Biosystems, Framingham, USA). Jede Platte wurde bei verschiedenen Lichtstärken (gains) gemessen. Die Exzitations-Emissionsspektren betragen für AMC-gekoppelte Substrate 360/40-400/30 und für AFC-gekoppelte Substrate 400/30-508/20. Standard-7-Amino-4-Methyl-Coumarin- und -7-4-Trifluoromethyl-Coumarin-Lösungen wurden als Standards zur Berechnung der Caspaseaktivität nach oben beschriebener Formel eingesetzt. Die Proteinmengen wurden mit der BCA-Methode quantifiziert.

## 2.9 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration

### Material

Fluo-4 AM (Molecular Probes-Mobitec, Heidelberg) 50 µg in 45 µl DMSO (Stamm: 1mM)

### Durchführung

Die in Platten mit 24 Vertiefungen ausgesäten primären Endothelzellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit Pneumokokken  $10^7$  cfu/ml bzw. PBS (Kontrollen) behandelt. Nach Abschluß der Stimulation wurde das Zellkulturmedium verworfen und die Endothelzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM in einer Endkonzentration von 5 µM (in Zellkulturmedium) inkubiert (45 min/37 C°). Im Anschluß an die Inkubation wurden die Zellen vorsichtig 2-3 x mit 400 µl PBS gespült und vor der Messung für 10 min bei einer Temperatur von 37°C gelagert. Die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration erfolgte in 400 µl PBS in einem Fluoreszenzreader bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 530 nm.

## 2.10 Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\phi_M$

### Material

Tetramethylrhodaminethylester TMRE (Molecular Probes-Mobitec, Heidelberg)

### Durchführung

Die in Platten mit 24 Vertiefungen ausgesäten primären Endothelzellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit Pneumokokken  $10^7$  cfu/ml bzw. PBS (Kontrollen) behandelt. Nach Abschluß der Stimulation wurde das Zellkulturmedium verworfen, die Zellen 2 x mit PBS gespült und anschließend für 35 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff TMRE in einer Endkonzentration von 100 nM (in Zellkulturmedium) inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gespült und vor der Messung für 10 min bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  gelagert. Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials erfolgte in  $400\mu\text{l}$  PBS bei einer Exzitation von 530 nm und Emission von 580 nm.

## 2.11 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde die von Detergentien nicht-beeinflußbare BCA-Methode (Bicinchoninsäure-Methode) verwendet. Die dazu benötigten Lösungen wurden als "BCA Protein Assay Reagentkit" (Pierce, Rockford, IL, USA) bezogen. Die Durchführung erfolgte nach Firmenvorschrift.

## 2.12 Subzelluläre Fraktionierung

### Lösungen und Chemikalien

- Digitonin (Sigma; St. Louis, MO) 0,25 mg/ml in Puffer A

#### RIPA-Puffer

- 150 mM NaCl
- 50 mM Tris (pH 7,4)
- 1% Triton X-100
- 0,1% SDS
- 1% NaDeoxycholat

#### Puffer A (pH 7,4)

- Sucrose 0,25 M
- Imidazol 3 mM
- Aqua bidest

### **Durchführung**

Die Auftrennung der Zellen in ihre subzellulären Bestandteile (zytosolische und mitochondriale Fraktion) wurde nach einem leicht modifizierten Protokoll nach Bronfman *et al.* (1998) durchgeführt. Diese Methode basiert einerseits auf der spezifischen Digitonin-induzierten Freisetzung von zellulären löslichen Enzymen und Komponenten zur Gewinnung der cytosolischen Fraktion und andererseits auf einer Differential-Zentrifugation zur Trennung der weiteren subzellulären Bestandteile.

Alle Schritte wurden, wenn nicht anders beschrieben, auf Eis durchgeführt. Nach Inkubation der Endothelzellen mit lebenden Pneumokokken bzw. PBS für 2, 3 und 5h wurden die Zellen 2 x mit PBS gespült, anschließend in PBS abgekratzt, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei 370 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet gewogen. Das Pellet wurde daraufhin in je 400 µl Puffer A resuspendiert und bei 16.000 g für 20 s zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wurde 0,25 mg/ml Digitonin in Puffer A (10µl/mg Pellett) zupipettiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 16.000 g für 20 s. Der Überstand, der für 20 min bei 62.000 g zentrifugiert wurde, enthält nun alle löslichen Komponenten und Enzyme der Zelle und stellt damit die zytosolische Fraktion der Zellen dar. Die zytosolische Fraktion wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingefroren. Das verbliebene Pellet wurde in 350 µl Puffer A resuspendiert und mit 30 Hüben in einem *dounce Homogenisator* homogenisiert. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 200 g wurde der Überstand in ein anderes Röhrchen verbracht und erneut für 10 min bei 800 g zentrifugiert. Um die mitochondriale Fraktion zu erhalten, wurde der Überstand für 30 min bei 13200 g zentrifugiert und das Pellet in 50 µl RIPA-Puffer aufgenommen. Auch diese Probe wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Die Proteine der erhaltenen zytosolischen und mitochondrialen Fraktionen wurden in ihrer Konzentration quantifiziert (siehe 2.11.) und einem Western-Blot-Verfahren zugeführt. Dabei erfolgte der Nachweis von AIF unter Verwendung eines Anti-AIF-Antikörpers von Santa Cruz.

## 2.13 Western-Blot

### Lyse der Zellen

#### Lysepuffer

- 8,5 ml RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette (Roche)

#### Durchführung

Zur Lyse wurden die Zellen zuerst mit eiskaltem PBS gewaschen und dann mit 300 µl eiskaltem Lysepuffer lysiert. Das Zellhomogenat wurde mit einem Zellschaber abgekratzt und für 30 min in einem Eppendorfgefäß auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 23000 g) befanden sich im Überstand die gelösten Proteine.

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### Puffer und Lösungen:

##### 5 x SDS/Glycine-Laufpuffer (pH 8,3)

- 25 mM TrisHCl
- 192 mM Glycin
- 0,5 % (w/v) SDS
- H<sub>2</sub>O bis zu einem Gesamtvolumen von 1000 ml

##### Probenpuffer (1 x)

- 60 mM TrisHCl, pH 6,8
- 5 % (w/v) 2-Mercaptopropandiol
- 0,003 % (w/v) Bromphenolblau
- 10 % (w/v) Glycerin
- 3 % (w/v) SDS

##### Puffer A

- 30 % (w/v) Acrylamid
- 0,8 % (w/v) Bis

##### Puffer C

- 1,5 M Tris-HCl, ph 8,8
- 0,2 % (w/v) SDS

##### Puffer B (Trenngelpuffer)

- 0,5 M Tris-HCl, ph 6,8
- 0,2 % (w/v) SDS



Gelansätze

	Trenngel (je 10 ml) 10 %	Sammelgel (je 10 ml) 4 %
- Puffer A (ml)	3,3	1,0
- Puffer B (ml)	2,5	-
- Aqua bidest (ml)	4,2	6,5
- Puffer C (ml)	-	2,5
- APS (10 %) (µl)	50	40,0
- TEMED (µl)	5,0	10,0

**Durchführung**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in Anlehnung an Laemmli (1970) durchgeführt.

Es wurden kleine Gele (9 x 8 cm bei 0,75 mm Dicke; BioRad, München) verwendet. Die Lösungen für das Trenngel (5 ml für ein kleines Gel) wurden auf Eis gemischt, bis kurz unter den Rand der zusammengebauten Glasplatten gegossen und vorsichtig mit Aqua bidest überschichtet. Nach der Polymerisation wurde dieses Wasser entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Durch die Benutzung eines Kammes konnten im Sammelgel Auftragsaschen für die Proben geformt werden. Für die SDS-PAGE unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen wurden die Proben (bis zu 30 µl im kleinen Gel) mit Probenpuffer (1:1 mit dem 1 x Probenpuffer) für 5 min im Wasserbad gekocht und danach in die Taschen des auspolymerisierten Sammelgels gefüllt. Die Gele wurden mit Laufpuffer überschichtet und in die Elektrophoresekammer eingebaut. Die Elektrophorese wurde mit konstanter Spannung bei 180 V gefahren, bis die Bromphenolblaubande das untere Ende des Trenngels erreicht hatte. Jeweils eine Bahn eines Polyacrylamidgels wurde mit Markern zur Bestimmung der Molekulargewichte (Precision protein standard, BioRad, München) beschickt.

## **Transfer**

### Transfer-Puffer

- 0,37 g SDS
- 2,9 g Glycine
- 5,8 g Tris-HCl
- 800 ml dH<sub>2</sub>O
- 200 ml Methanol

## **Durchführung**

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf die Blotmatrices wurde im Semi-Dry-Verfahren durchgeführt. 5 min vor Abschluß der SDS-PAGE wurde die PVDF-Membran (BioRad, München) in Methanol getränkt und anschließend für weitere 5 min in Transfer-Puffer äquilibriert. Bei Verwendung von Nitrocellulose-Membranen (Phosphorylcholin-Western-Blot) wurde auf eine Behandlung mit Methanol verzichtet und die Membran ausschließlich in Transfer-Puffer äquilibriert. Das Blot-Sandwich wurde nach Beendigung der Elektrophorese luftblasenfrei mit Hilfe von *Whatman-Papieren* (BioRad, München) zusammengesetzt, wobei die PVDF- bzw. Nitrocellulose-Membran zur Anode, das Gel zur Kathode gerichtet waren. Der Transfer fand bei Raumtemperatur statt. Die kleinen Gele wurden für 30 min bei einer konstanten Spannung von 15 V transferiert.

## **Immunblot**

### **Antikörper und Lösungen**

- Anti-Fodrin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) 1:500
- Anti-AIF (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA; sc 9416) 1:800
- Sekundärantikörper: Anti-goat (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA; sc 2020) 1:2000

### Waschpuffer

- 0,1 % (v/v) Twen 20
- in TBS, pH 7,2

### Blockierungspuffer

- 5 % Trockenmilch (Roth, Karlsruhe)
- in Waschpuffer

### **Durchführung**

Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF- bzw. Nitrocellulose-Membran mit Blockierungspuffer bei RT für 1 h geschüttelt und danach bei 4 °C über Nacht mit dem ersten Antikörper inkubiert (Anti-AIF 1:800, Anti-Fodrin 1: 500). Am nächsten Tag wurde der Blot 3 x 10 min mit PBS gewaschen und mit Peroxidase-gekoppelten Rabbit-Anti-Goat-Antikörpern, die zuvor 1:1000 in Blockierungspuffer verdünnt worden waren, für 1 h bei RT inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen (4 x 10 min in Waschpuffer) wurde der Blot auf eine Plastikfolie gelegt, mit Filterpapier getrocknet und unter Rotlicht für 1 min mit 4 ml ECL-Luminol (je 2 ml Enhancer und Developer, Pierce, Rockford, IL, USA) bedeckt. Erneut wurde der Blot sorgfältig getrocknet und mit einer zweiten Lage Plastikfolie bedeckt, um anschließend auf einen Kodak X-Omat-Film gelegt zu werden. Üblicherweise wurden mehrere Belichtungszeiten (15 s, 1 min, 3 min) gewählt, um das bestmögliche Verhältnis von Sensitivität und Auflösung/Hintergrund zu erreichen. Der Film wurde anschließend durch übliche fototechnische Methoden entwickelt.

### **2.14 Angewandte statistische Verfahren**

Mit dem Kolmogoroff-Smirnoff-Test für die Güte der Anpassung wurde die Normalverteilung der Meßwerte überprüft. Die statistische Signifikanz der Meßwerte wurde anschließend entweder mit dem ungepaarten *t*-Test, dem One-Way-ANOVA-Test oder dem Student-Newman-Keuls-Test bestimmt. Die Fehlerbalken in den Abbildungen zeigen in dieser Arbeit durchgehend die Standardabweichung (SD) an.

## **3 ERGEBNISSE**

### **3.1 Nachweis des Pneumokokken-induzierten endothelialen Zelltodes**

#### **3.1.1 Lebende Pneumokokken induzieren einen programmierten Zelltod in zerebralen Endothelzellen**

Ausgehend von der Hypothese, daß lebende Pneumokokken in zerebralen Endothelzellen, dem wichtigsten zellulären Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke, einen programmierten Zelltod induzieren, wurden primäre zerebrale Endothelzellen aus Ratten präpariert und unter Zellkulturbedingungen für 6-8 Tage kultiviert. Nach dieser Zeit bildeten die Zellen einen vollständig konfluenten *Monolayer*. In Anlehnung an Freyer *et al.* (1999) wurde eine etwa 99%ige Reinheit der Endothelzellkulturen nachgewiesen.

Die zerebralen Endothelzellen wurden mit lebenden Pneumokokken (unbekapselter Stamm R6) in einer Konzentration von  $10^7$  colony forming units pro ml (cfu/ml) inkubiert. Diese Konzentration wurde gewählt, da sie etwa der Bakterienkonzentration entspricht, die im Liquor von Patienten mit Pneumokokkenmeningitis vorliegt (Mariani-Kurkdijan *et al.*, 1999).

Zum Nachweis des programmierten Zelltodes in zerebralen Endothelzellen wurden drei verschiedene Detektionsverfahren angewandt.

##### **3.1.1.1 Untersuchung der Kernmorphologie mit der Acridinorange-Ethidiumbromid-Methode**

Die erste Nachweismethode erfolgte durch die Färbung der Zellkerne mit den fluoreszierenden DNS-Farbstoffen Acridinorange und Ethidiumbromid.

Acridinorange wird als Lebendfarbstoff von vitalen Zellen aufgenommen und färbt die Zellkerne grün. Ethidiumbromid dagegen wird von der Zelle nur durch eine geschädigte Zellmembran aufgenommen und färbt den Zellkern orange. Bei Rotfärbung der Zellen liegt entweder Nekrose oder Apoptose in einem späten Stadium vor. Eine Unterscheidung von Nekrose und Apoptose ist anhand der Morphologie der Zellkerne möglich. Apoptotische Zellkerne sind geschrumpft und kondensiert; Kerne nekrotischer Zellen dagegen sind balloniert und größer als Zellkerne intakter, lebender Zellen.

Als Positivkontrolle wurden Endothelzellen mit Staurosporin (1  $\mu$ M), einem pflanzlichen Zytotoxin, das in den verschiedensten Zellkultursystemen als Induktor des intrinsischen Weges der klassischen Apoptose eingesetzt wird (Leist und Jäätelä, 2001), inkubiert.

Bei der Inkubation von zerebralen Endothelzellen mit Staurosporin zeigten sich typische Merkmale der klassischen Apoptose, wie das Schrumpfen der Zelle und die Kondensation des Zellkernes. Es bildeten sich so genannte apoptotische Körperchen, d.h. von Membran umschürnte fragmentierte DNS-Bruchstücke (Abbildung 5 B), die Zellmembran blieb zunächst intakt (grüne Färbung), erst in einem späteren Stadium kam es zu einem Verlust der Integrität der Zellmembran (rote Färbung).

Mit *S. pneumoniae* inkubierte Zellen zeigten eine ähnliche Morphologie. Auch hier waren die Zellen insgesamt deutlich kleiner als die Kontrollzellen, die Zellkerne geschrumpft, kondensiert und im frühen Stadium grün gefärbt, was auf die Integrität der Zellmembran hinweist. Im Gegensatz zum Staurosporin-induzierten Zellschaden kam es nicht zur vollständigen Fragmentierung des Kernes oder zur Bildung apoptotischer Körperchen (Abbildung 5 A).

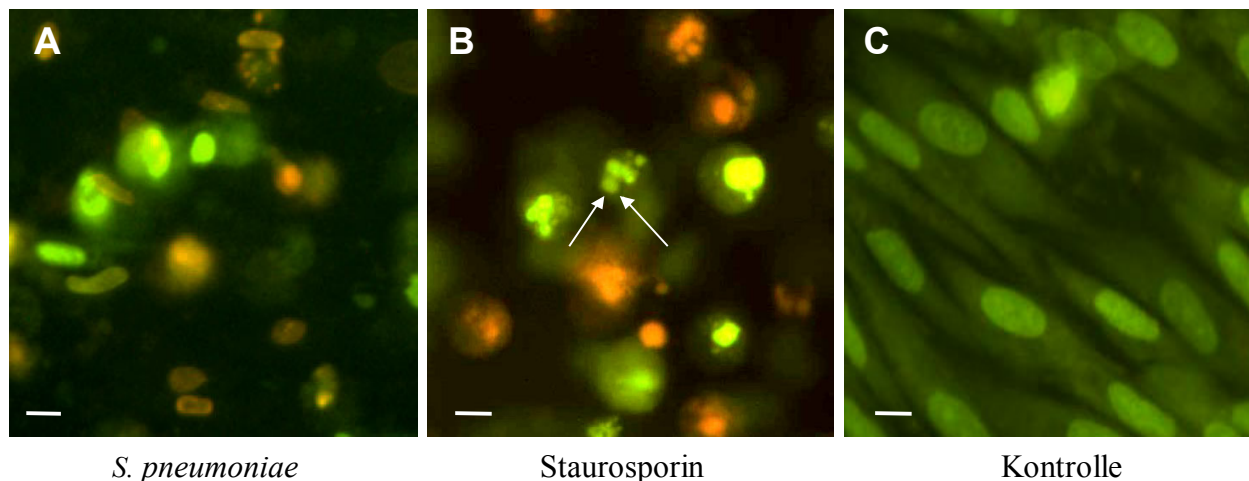


Abbildung 5: Färbung zerebraler Endothelzellen mit Acridinorange und Ethidiumbromid nach 12-stündiger Inkubation mit *S. pneumoniae* (Stamm R6,  $10^7$  cfu/ml) [A], Staurosporin ( $1\mu\text{M}$ ) [B] oder PBS (Kontrolle) [C]. Fluoreszenzmikroskop, Vergrößerung 1:400. Balken = 10  $\mu\text{m}$ . Die Pfeile markieren apoptotische Körperchen.

### 3.1.1.2 Untersuchung der Zellmorphologie mit Hilfe der Elektronenmikroskopie

Die zweite Detektionsmethode des programmierten Zelltodes erfolgte mit Hilfe von elektronenmikroskopische Aufnahmen. Durch stärkere Vergrößerungen konnten dabei auch Veränderungen auf subzellulärer Ebene z.B. der Mitochondrien oder des Zellkernes berücksichtigt werden.

In der ersten EM-Aufnahme (Abbildung 6 A und B, Vergrößerung 1:4400) ist eine Endothelzelle nach Inkubation mit *S. pneumoniae* im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollzelle

dargestellt, in der typische Merkmale des programmierten Zelltodes erkennbar sind. Die Gesamtgröße der Pneumokokken-behandelten Zelle ist im Vergleich zur Negativkontrolle geringer und der geschrumpfte, pyknotische Zellkern erscheint kondensiert. Zudem zeigt sich an der Kernmembran ein sogenanntes *Membran-Blebbing*. Es handelt sich dabei um eine Blasenbildung oder Ausstülpung der Kernmembran - ein typisches Merkmal des programmierten Zelltodes.

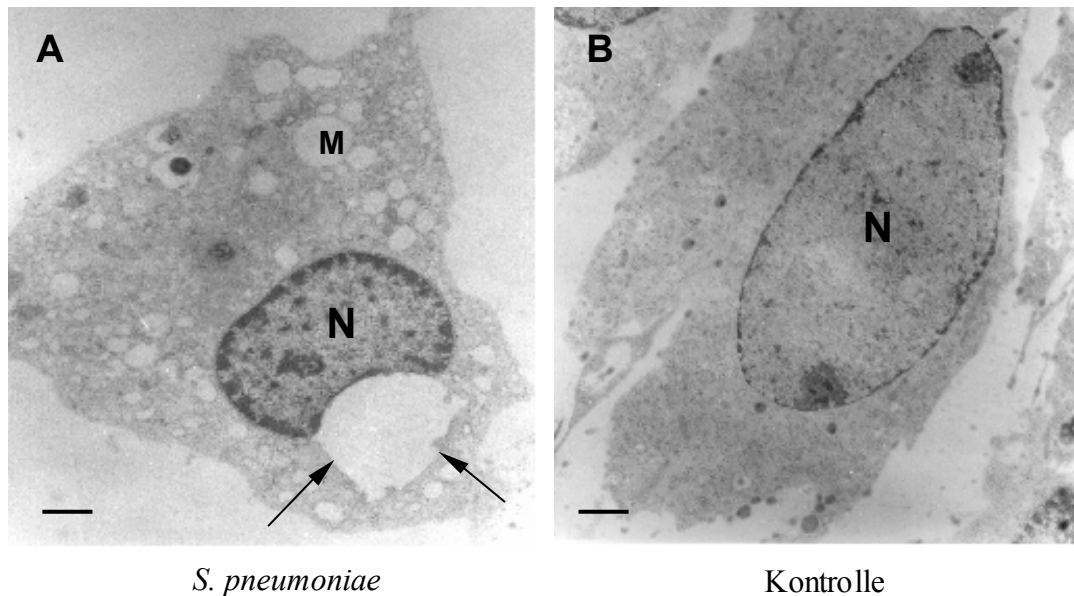


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme zerebraler Endothelzellen nach 4-stündiger Inkubation mit Pneumokokken (R6,  $10^7$  cfu/ml) [A] oder PBS (Kontrolle) [B]. Vergrößerung 1:4400. Der Balken entspricht  $1,4 \mu\text{m}$ . Die Pfeile markieren das „Blebbing“ der Kernmembran. N = Nukleus, M = Mitochondrium.

In einer noch stärkeren Vergrößerung (1:12000) konnte die Anordnung des Chromatins im Zellkern beurteilt werden (Abbildung 7). Hier fiel auf, daß das Chromatin in der mit *S. pneumoniae* behandelten Zelle im Gegensatz zur Kontrolle nicht gleichmäßig und homogen im Kern verteilt war, sondern an den Rand gedrängt (marginalisiert) und kondensiert, ohne in kompakte, abgeschlossene Einheiten eingeteilt zu sein, wie dies bei der klassischen Apoptose der Fall wäre. Insgesamt erinnerte die Anordnung des Chromatins in dieser Aufnahme an die inkomplette Kondensation des Chromatins durch *apoptosis inducing factor* (AIF), die auch dem nukleären Apoptosestadium I entspricht (Daugas *et al.*, 2000) [zum Vergleich s. Tabelle 2].

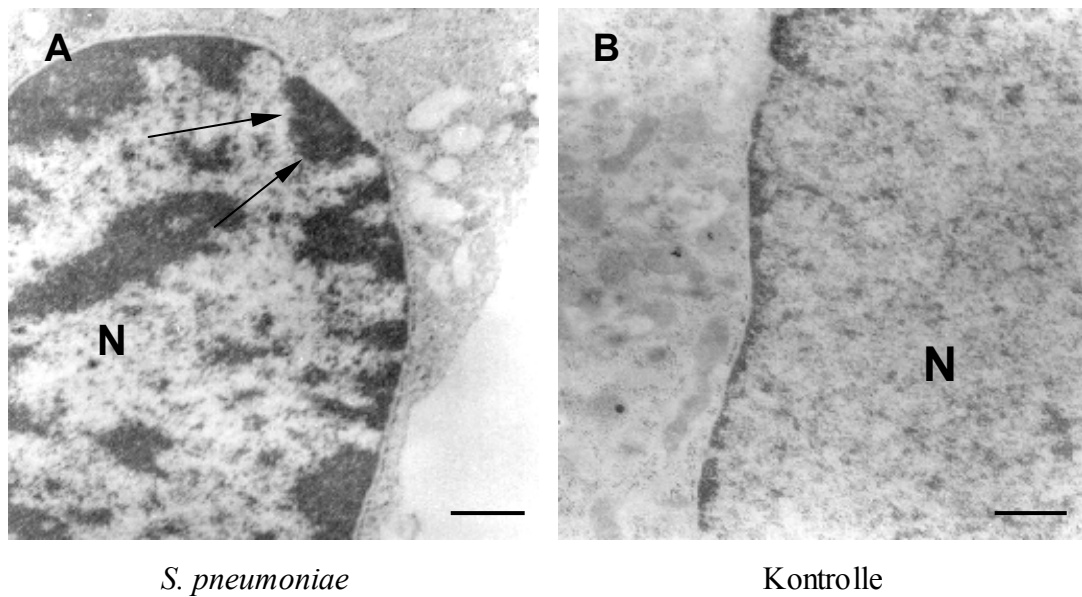


Abbildung 7: EM-Aufnahme zerebraler Endothelzellen mit Darstellung des Chromatins. Vergrößerung 1:12.000. Der Balken entspricht einer Länge von 0,6  $\mu\text{m}$ . Die Pfeile markieren die periphere Kondensation des Chromatins. N = Nukleus.

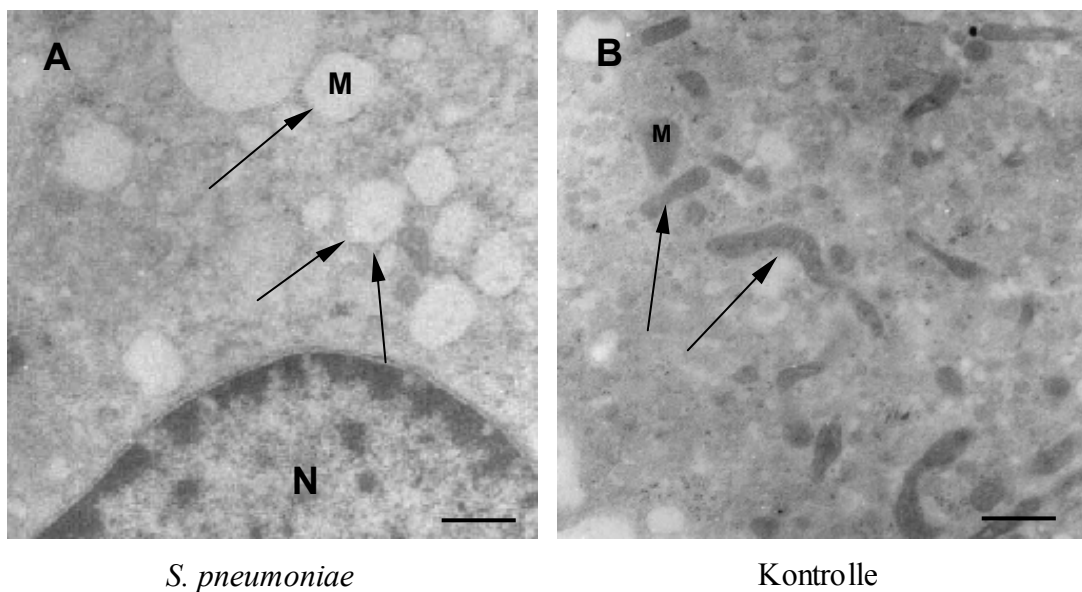


Abbildung 8: EM-Aufnahme der Mitochondrien von Endothelzellen 4 h nach Inkubation mit Pneumokokken (Stamm R6,  $10^7$  cfu/ml) [A] oder PBS [B]. Vergrößerung 1:12000. Balken = 0,6  $\mu\text{m}$ . N = Nukleus, M = Mitochondrium. Die Pfeile markieren die Mitochondrien.

Die Mitochondrien Pneumokokken-stimulierter Endothelzellen zeigen im EM-Bild ebenfalls Veränderungen, die für programmierten Zelltod und eine frühe Schädigung typisch sind (Abbildung 8). Man erkennt deutlich eine Größenzunahme und Ballonierung der Mitochondrien.

### 3.1.1.3 Untersuchung der DNS-Degradation mit der TUNEL-Methode

In einem nächsten Schritt wurde das Vorliegen von programmiertem Zelltod mit Hilfe der TUNEL-Methode überprüft. Bei dieser sehr sensitiven Methode werden modifizierte Nukleotide enzymatisch mittels Tdt (*Terminal deoxynucleotid transferase*) an DNS-Einzel- und Doppelstrangbrüche gebunden und dadurch angefärbt. Auf diese Weise können Zellkerne mit DNS-Brüchen, die beim programmierten Zelltod typischerweise entstehen, mikroskopisch dargestellt werden.

Die in Abbildung 9 dargestellten Endothelzell-Präparate wurden 12 h nach Inkubation mit lebenden Pneumokokken ( $10^7$  cfu/ml) oder mit gleicher Menge PBS als Negativkontrolle angefertigt. Zu diesem Zeitpunkt zeigten in den mit Pneumokokken stimulierten Endothelzellen fast alle Kerne eine positive Reaktion (dunkel gefärbte Zellkerne). Dagegen ließen sich in den Endothelzellen der Kontrollgruppe nur sehr wenige Kerne durch die TUNEL-Methode anfärben.

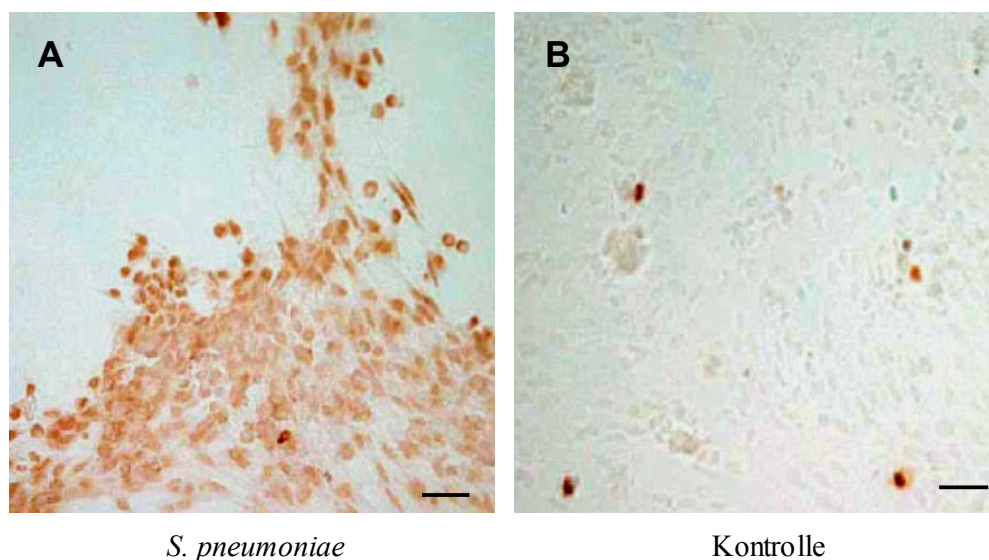


Abbildung 9: TUNEL-Färbung (*Tdt mediated dUTP Nick End Labeling*). Zerebrale Endothelzellen wurden 12 h mit Pneumokokken (Stamm R6,  $10^7$  cfu/ml) [A] oder PBS (Kontrolle) [B] inkubiert, mit der TUNEL-Methode gefärbt und unter einem Lichtmikroskop (Vergrößerung 1:100) betrachtet. Der Balken entspricht einer Länge von 50 µm.

### 3.1.2 Der Zelltod zerebraler Endothelzellen ist direkt abhängig von Inkubationszeit und Konzentration der Pneumokokken

Nachdem nachgewiesen wurde, daß es nach Inkubation von zerebralen Endothelzellen mit *S. pneumoniae* zu einem programmierten Zelltod kommt, sollte der Frage nachgegangen werden, in welcher Zeit der Zelltod induziert wird und ob eine direkte Abhängigkeit von der Konzentration



der Pneumokokken als potentielle Produzenten zytotoxischer Stoffe besteht. Um diese Frage zu beantworten, wurden zerebrale Endothelzellen mit lebenden Pneumokokken (Stamm R6,  $10^7$  cfu/ml) für 3, 6, 9 oder 12 h inkubiert. Danach wurden sie mit den fluoreszierenden DNS-Farbstoffen Acridinorange und Ethidiumbromid gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop nach den genannten Kriterien in lebende und nekrotische Zellen sowie Zellen mit einer für den programmierten Zelltod typischen Kernmorphologie eingeteilt, quantifiziert und der prozentuale Anteil ermittelt.

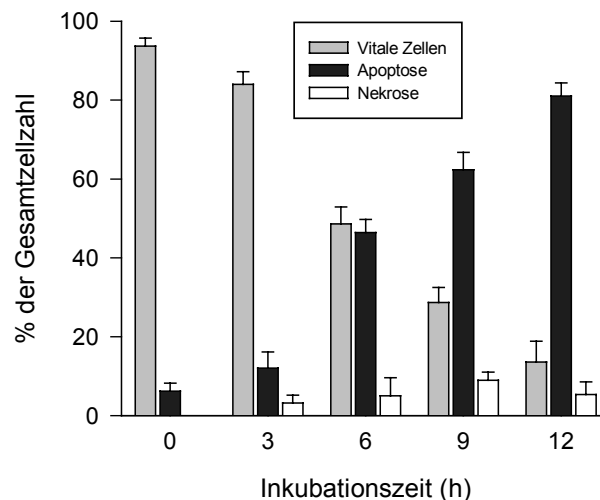


Abbildung 10: Kinetik des Zelltodes zerebraler Endothelzellen nach Inkubation mit *S. pneumoniae* (R6,  $10^7$  cfu/ml). Prozentuale Darstellung der lebenden Zellen (grau), der Zellen mit typischer Morphologie eines programmierten Zelltodes [Apoptose] (schwarz) und nekrotischen Zellen (weiß). Acridinorange-Ethidiumbromid-Methode.  $n = 9$  bei 3 unabhängigen Experimenten.

Aus Abbildung 10 ist ersichtlich, daß bereits nach 3 h ein Anstieg des Anteils von Zellen mit kondensierten Zellkernen als Zeichen für einen programmierten Zelltod zu beobachten war, der mit fortgesetzter Inkubationszeit weiter anstieg und nach 12 h mit  $79,5 \pm 3,34\%$  bei inkubierten Zellen im Vergleich zu  $6,2 \pm 2,01\%$  zu Versuchsbeginn den Höhepunkt erreichte. Insgesamt machte der programmierte Zelltod mit kondensierten Zellkernen im Vergleich zum nekrotischen Zelltod mit normal großen oder ballonierten Zellkernen den weitaus größeren Anteil aus. In einem weiteren Experiment wurden die Endothelzellen mit  $10^6$  bzw.  $10^8$  cfu/ml behandelt und wiederum die Rate der kondensierten Kerne als Zeichen des programmierten Zelltodes mit Hilfe der Acridinorange-Ethidiumbromid-Methode quantifiziert. Abbildung 11 zeigt, daß die Erhöhung bzw. Erniedrigung der Bakterienkonzentration um 1 log zu einer Beschleunigung bzw. Verzögerung der Zelltod-Induktion von etwa 3 h führte, was auf eine klare Abhängigkeit von der bakteriellen Konzentration hindeutet.

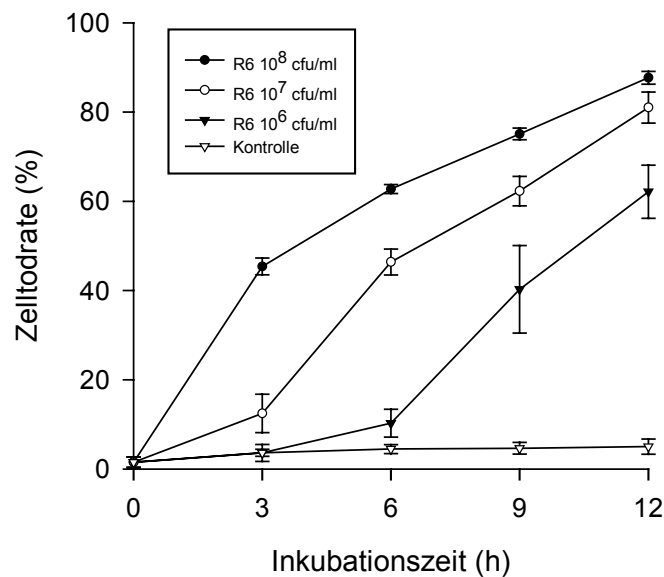


Abbildung 11: Konzentrationsabhängigkeit des Zelltodes zerebraler Endothelzellen nach Inkubation mit *S. pneumoniae* ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  cfu/ml) oder PBS (Negativkontrolle).  $n = 9$  bei 3 unabhängigen Experimenten.

## 3.2 Untersuchung der Rolle der Caspasen

### 3.2.1 Der Pneumokokken-induzierte Zelltod ist durch den Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk nicht blockierbar

Im Zuge der klassischen Apoptose kommt es zu einer Aktivierung von Caspasen. Im Gegensatz dazu steht der AIF-induzierte programmierte Zelltod, bei dem eine Apoptoseexekution ohne die Beteiligung von Caspasen ablaufen kann. Welche Proteasen und Nukleasen dabei eine Rolle spielen, ist noch weitgehend unbekannt (Leist und Jäätelä, 2001).

Um zu überprüfen, ob der endotheliale Zelltod von einer klassischen Caspasenaktivierung begleitet wird, wurde zunächst ein Blockierungsversuch mit dem Caspaseninhibitor zVAD-fmk, einem irreversiblen Breitspektrumhemmer aller Caspasen durchgeführt. zVAD-fmk ist ein synthetisches Peptid und fungiert als Pseudosubstrat. Damit hemmt es einerseits die Prozessierung einer Pro-Caspase in eine aktivierte Caspase und andererseits bindet es an bereits aktivierte Stufen und hemmt somit ihre proteolytische Aktivität.

Zerebrale Endothelzellen wurden zur Sicherstellung einer vollständigen Blockierung der Caspasen-Aktivität 1 h mit zVAD-fmk (100  $\mu$ M) präinkubiert und anschließend mit *S. pneumoniae* (Stamm R6,  $10^7$  cfu/ml), Staurosporin (Postivkontrolle, 1  $\mu$ M) bzw. PBS behandelt.

Die Zelltod-Detektion und –quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Acridinorange-Ethidiumbromid-Methode. Hierbei kam es, wie in Abbildung 12 dargestellt, in den Staurosporin-behandelten Zellen durch den Zusatz von zVAD-fmk zu einer signifikanten Verringerung der Zelltodrate von  $68,3 \pm 6,6\%$  auf  $22,01 \pm 2,17\%$ . Im Gegensatz dazu führte die Präinkubation mit zVAD-fmk bei den R6-behandelten Zellen nicht zu einer signifikanten Reduktion des Zelltodes ( $81,4 \pm 3,54\%$  versus  $83,25 \pm 1,69\%$ ).

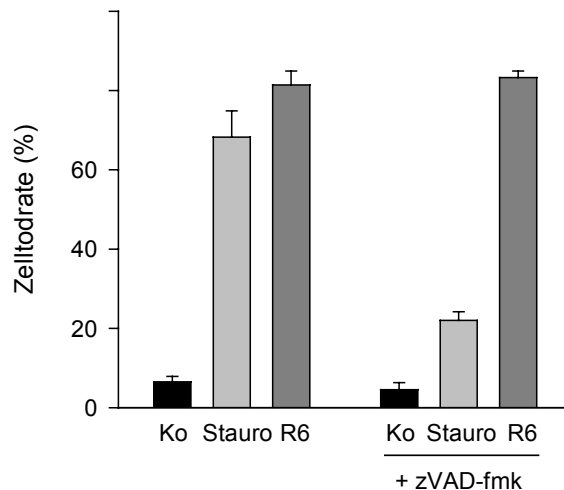


Abbildung 12: Hemmbarkeit der Staurosporin-induzierten sowie fehlende Hemmbarkeit des Pneumokokken-induzierten Zelltodes durch den Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk ( $100 \mu\text{M}$ ). Acridinorange-Ethidiumbromid-Methode.  $n = 9$  bei 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz markiert mit \* für  $p < 0,001$  (ungepaarter t-Test).

### 3.2.2 Die Caspasen-3, -8 und -9 werden beim endothelialen Zelltod durch lebende Pneumokokken nicht aktiviert

Nachdem durch die fehlende Blockierbarkeit des Zelltodes durch einen Caspaseninhibitor ein erster Hinweis gegeben war, daß der endotheliale Zelltod unabhängig von einer Aktivierung von Caspasen sein könnte, wurde als nächster Schritt die Aktivität von 3 Hauptvertretern der Caspasefamilie (Caspasen-3, -8 und -9) mit Hilfe eines Aktivitätsassays direkt gemessen. Dazu wurden zerebrale Endothelzellen erneut mit  $1 \mu\text{M}$  Staurosporin (Positivkontrolle), Pneumokokken (Stamm R6,  $10^7$  cfu/ml) oder PBS (Negativkontrolle) inkubiert und die Caspaseaktivität nach verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Zur Bestimmung der Aktivität von Caspasen in Extrakten, wurden diese mit Tetrapeptidsubstraten für Caspasen versetzt. Der Umsatz der Substrate läßt sich durch die Freisetzung einer an das Substrat gekoppelten fluorophoren Gruppe (Aminotrifluoromthylcoumarin, AFC bzw. Aminomethylcoumarin, AMC)

quantifizieren. Die Aktivität berechnet sich aus der freigesetzten Gruppe (AFC bzw. AMC) in pmol pro Inkubationszeit (min) und der eingesetzten Gesamtproteinmenge (mg). Zu keinem Zeitpunkt und bei keiner der gemessenen Caspasen kam es zu einem relevanten Anstieg der Aktivität. Eine signifikante Caspasenaktivierung war lediglich bei der Positivkontrolle mit Staurosporin zu beobachten (s. Abbildungen 13 und 14).

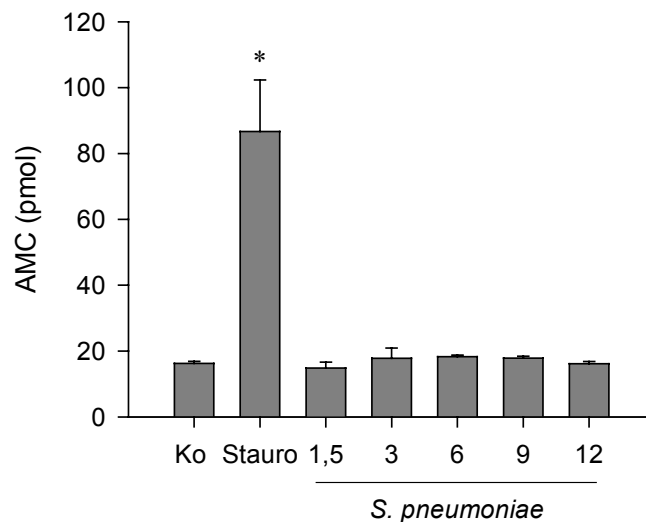


Abbildung 13: Caspase-3-Aktivität in zerebralen Endothelzellen. Die Zellstimulation erfolgte mit Staurosporin (12 h, 1  $\mu$ M), *S. pneumoniae* (R6,  $10^7$  cfu/ml) oder PBS (Kontrolle).  $n = 9$  bei 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz markiert mit \* für  $p < 0,001$  (ungepaarter t-Test).

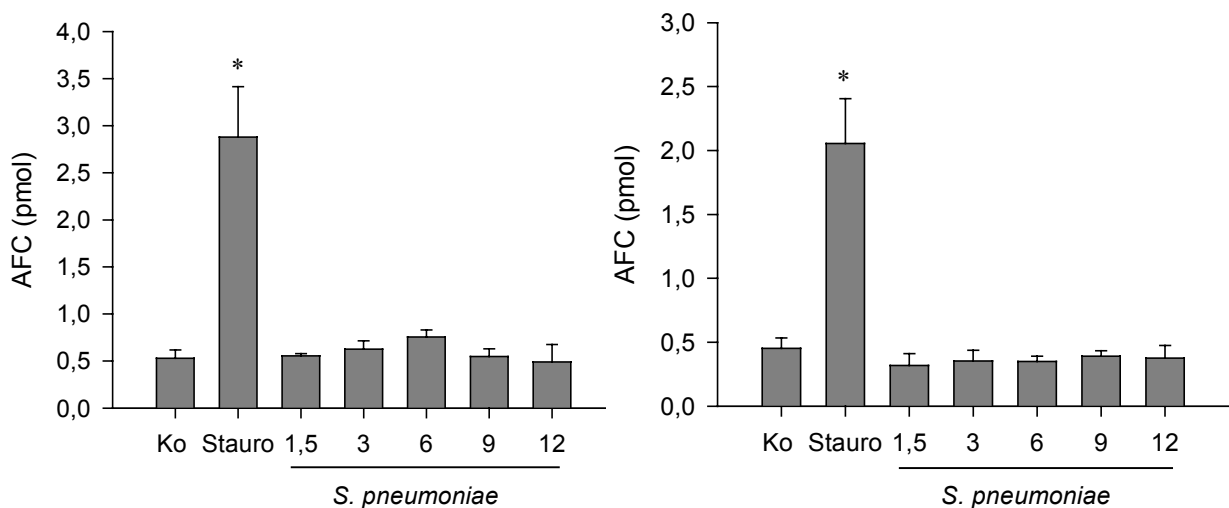


Abbildung 14: Aktivitäten der Caspase-8 (links) und der Caspase-9 (rechts) in zerebralen Endothelzellen. Die Zellstimulation erfolgte mit Staurosporin (12 h, 1  $\mu$ M), *S. pneumoniae* (R6,  $10^7$  cfu/ml) oder PBS (Kontrolle).  $n = 9$  bei 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz bei \* für  $p < 0,001$  (ungepaarter t-Test).

### 3.2.3 Beim endothelialen Zelltod kommt es nicht zur Entstehung Caspasen-abhängiger Spaltprodukte von $\alpha$ -Fodrin

Aktivierte Caspasen führen im Rahmen der klassischen apoptotischen Signalkaskade zu einer Spaltung von Proteinen, die z.B. eine Rolle bei DNS-Reparaturvorgängen oder im Aufbau des Zytoskelettes spielen. Ein Protein, das zum Nachweis einer Aktivierung der Caspasen häufig bestimmt wird, ist das Zytoskelettprotein  $\alpha$ -Fodrin. Das 213 kDa große Protein wird durch aktivierte Caspasen spezifisch in eine 140 kDa- und eine 120 kDa-Untereinheit gespalten.

Um zu überprüfen, ob im Rahmen des endothelialen Zelltodes übereinstimmend mit den bisherigen Ergebnissen eine Caspasenaktivierung und damit spezifische Spaltung des Zytoskelettproteins  $\alpha$ -Fodrin ausbleibt, wurden zerebrale Endothelzellen mit 1  $\mu$ M Staurosporin, *S. pneumoniae* ( $10^7$  cfu/ml) oder PBS behandelt und das zu untersuchende Protein in einem Western-Blot-Verfahren mit Hilfe eines spezifischen Anti- $\alpha$ -Fodrin-Antikörper nachgewiesen.

In Abbildung 15 ist erkennbar, daß es zwar bei den Staurosporin-behandelten, nicht jedoch bei den Pneumokokken- oder PBS-behandelten Proben zu einer Spaltung von  $\alpha$ -Fodrin in seine spezifischen Untereinheiten kam.

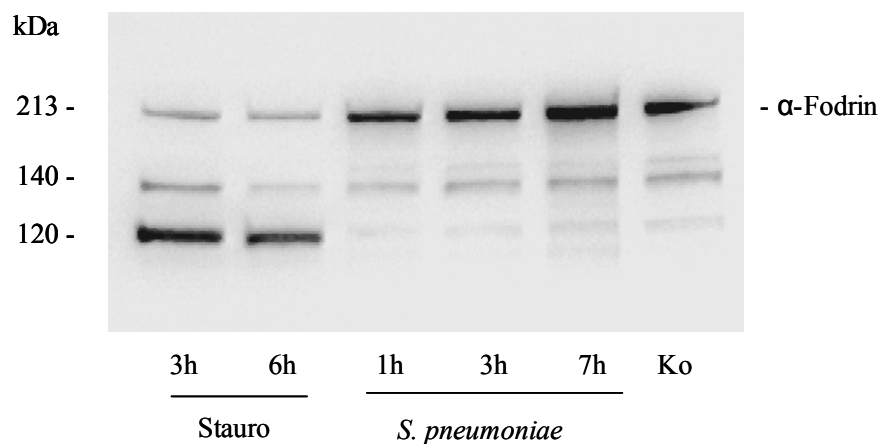


Abbildung 15: Fehlende Spaltung des Zytoskelettproteins  $\alpha$ -Fodrin (240 kDa) in seine Caspasen-spezifischen Spaltprodukte (140 und 120 kDa). Zerebrale Endothelzellen wurden 3 und 6 h mit Staurosporin (1  $\mu$ M), 1, 3 und 7 h mit *S. pneumoniae* (R6,  $10^7$  cfu/ml) oder PBS (Kontrolle) inkubiert und ein Western-Blot mit einem Anti- $\alpha$ -Fodrin-Antikörper durchgeführt. KDa = Kilo-Dalton. Stauro = Staurosporin

Zusammenfassend konnte somit mit drei verschiedenen Methoden nachgewiesen werden, daß den Caspasen bei der Exekution des endothelialen Zelltodes durch lebende Pneumokokken keine entscheidende Funktion zukommt.

### 3.3 Untersuchung weiterer intrazellulärer Mechanismen

#### 3.3.1 Nach Stimulation zerebraler Endothelzellen mit Pneumokokken kommt es zu einem raschen Anstieg des intrazellulären Calciums

Um die intrazelluläre Schadenskaskade noch genauer zu beschreiben, wurde zusätzlich untersucht, ob es bei Inkubation von zerebralen Endothelzellen mit lebenden Pneumokokken zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciums kommt. Die Endothelzellen wurden nach unterschiedlich langer Stimulation mit *S. pneumoniae* ( $10^7$  cfu/ml) oder PBS für 45 min mit dem Calcium-Indikator Fluo-4 AM ( $5 \mu\text{M}$ ) inkubiert. Durch eine Bindung des Calciums an den fluoreszierenden Indikator Fluo-4 AM wird dessen Fluoreszenzsignal verstärkt, was zu einer erhöhten, im Fluoreszenz-Reader meßbaren Extinktion bei 488 nm führt.

Abbildung 16 zeigt die Veränderungen des intrazellulären Calciums in zerebralen Endothelzellen während der Inkubation mit lebenden Pneumokokken. Es ist zu erkennen, daß es bereits nach 60 min zu einem ersten Anstieg des Calciums kommt, der nach weiteren 60 min nochmals zunimmt. In einem weiteren Experiment wurden die Endothelzellen mit dem intra- und extrazellulären Calciumchelator BAPTA-AM in einer Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  vorinkubiert und anschließend mit Pneumokokken behandelt. Hierbei konnte eine signifikante Reduktion der Zelltodrate nach 12 Stunden festgestellt werden (s. Abbildung 17).

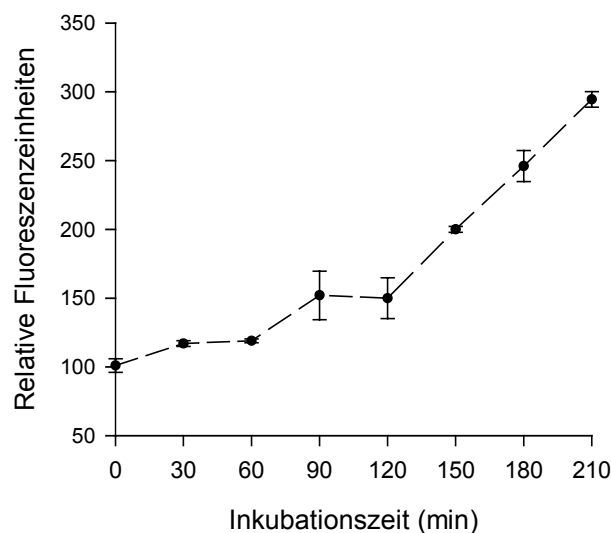


Abbildung 16: Kinetik des intrazellulären Calciums nach Stimulation mit lebenden Pneumokokken ( $R6$ ,  $10^7$  cfu/ml). Die Messung des intrazellulären Calciumgehaltes erfolgte mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fluo-4 AM nach verschiedenen Stimulationszeiten.  $n=9$ , aus 3 unabhängigen Experimenten.

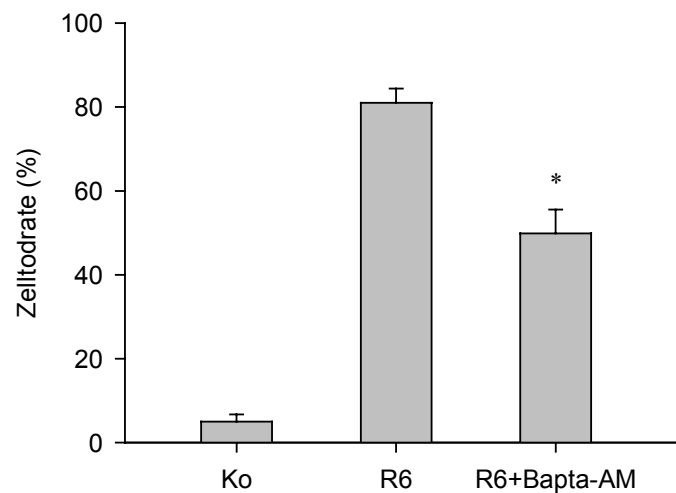


Abbildung 17: Hemmung der endothelialen Zelltodrate durch Präinkubation mit dem Calcium-Chelator BAPTA-AM (5  $\mu$ M). 12 h Inkubation der Zellen mit R6, PBS (Kontrolle) mit oder ohne BAPTA-AM.  $n = 9$  bei 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz bei \* für  $p < 0,001$  (ungepaarter t-Test).

**Beim Pneumokokken-induzierten Zelltod kommt es früh zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\phi_M$**

In weiteren Experimenten sollte herausgefunden werden, ob und wann es zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\phi_M$  in zerebralen Endothelzellen kommt, da sowohl bei der klassischen Apoptose als auch für den Caspasen-unabhängigen programmierten Zelltod eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\phi_M$  als Zeichen für eine mitochondriale Schädigung typisch sind.

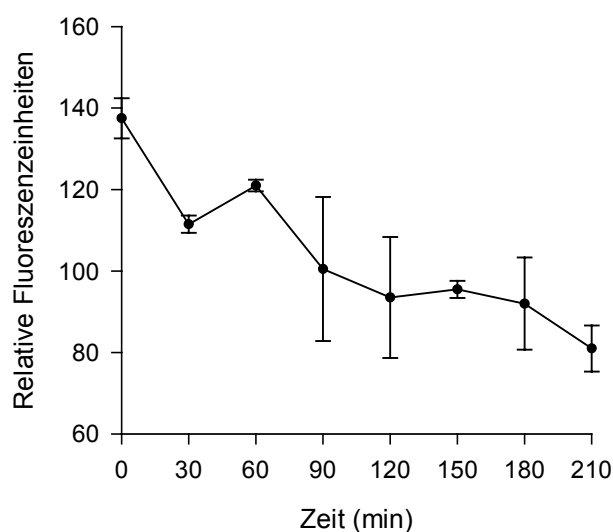


Abbildung 18: Kinetik des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\phi_M$  nach Inkubation von zerebralen Endothelzellen mit lebenden Pneumokokken (R6,  $10^7$  cfu/ml). Die Messung erfolgte mit dem Farbstoff Tetramethylrhodaminester (TMRE).  $n = 9$ , aus 3 unabhängigen Experimenten.

Zerebrale Endothelzellen wurden dazu mit *S. pneumoniae* ( $10^7$  cfu/ml) inkubiert und nach unterschiedlicher Zeit der mitochondriale Indikator Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) zugegeben. Die Änderungen des Fluoreszenzsignals wurden bei einer Exzitation von 530 nm und einer Emission von 580 nm gemessen. In Abbildung 18 ist die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials in Abhängigkeit von der Stimulationszeit dargestellt. Man erkennt, daß es innerhalb von 210 min fast zu einer Halbierung des Fluoreszenzsignals kommt.

### 3.4 Untersuchung der Beteiligung von *Apoptosis Inducing Factor* (AIF)

#### 3.4.1 Lebende Pneumokokken induzieren eine AIF-spezifische DNS-Degradation in zerebralen Endothelzellen

Das Protein AIF spielt beim alternativen programmierten Zelltod eine wichtige Rolle, da es unabhängig von Caspasen apoptotische Veränderungen in Zellen auslösen kann. Wesentliche Merkmale sind dabei die Kondensation des Zellkernes, die periphere Anordnung des Chromatins und die Spaltung der DNS in 50 kbp große Fragmente [*large scale fragmentation*] (Strasser *et al.*, 2000; Susin *et al.*, 1999). Nachdem bereits in der Elektronenmikroskopie die für AIF typische Morphologie der Kerne der Endothelzellen beobachtet worden war, konnte in einem weiteren Experiment die spezifische Degradation der DNS in 50 kbp-Fragmente nachgewiesen werden (Abbildung 19).

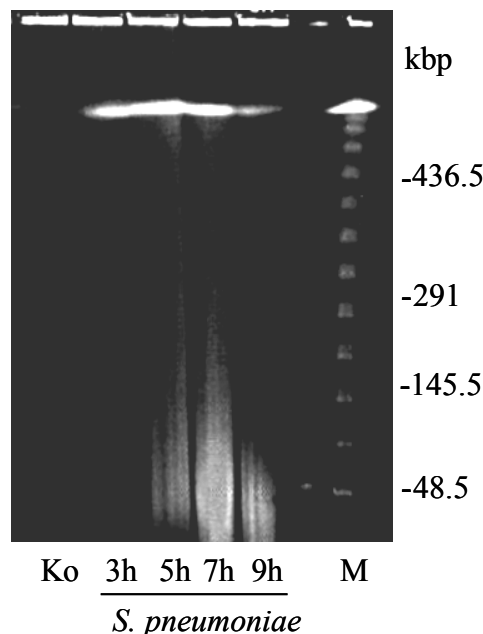


Abbildung 19: Nachweis einer *large scale fragmentation* in 50-kbp-Fragmente. Endothelzellen wurden mit *S. pneumoniae* (R6,  $10^7$  cfu/ml) oder PBS (Kontrolle) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung der DNS mit Hilfe einer Pulsfeldgelelektrophorese. Ko=Kontrolle, M=Marker, kbp=Kilobasenpaare.



Zerebrale Endothelzellen wurden hierzu 3, 5, 7 und 9 h mit *S. pneumoniae* in einer Konzentration von  $10^7$  cfu/ml inkubiert und eine Pulsfeldgelelektrophorese, die eine Auftrennung auch größerer DNS-Fragmente zuläßt, durchgeführt.

### 3.4.2 Beim endothelialen Zelltod durch lebende Pneumokokken kommt es zur Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien in das Zytosol

In einem weiteren experimentellen Schritt sollte gezeigt werden, daß AIF von den Mitochondrien in das Zytosol transloziert wird.

Um dies zu untersuchen, wurde eine Fraktionierung der Bestandteile der zerebralen Endothelzellen in eine mitochondriale und eine zytosolische Komponente durchgeführt und AIF in einem Western Blot mit einem spezifischen Anti-AIF-Antikörper nachgewiesen.

In diesem in Abbildung 20 dargestellten Western Blot ist eine Abnahme von AIF in der mitochondrialen Fraktion und eine Zunahme im zytosolischen Kompartiment zu sehen, die etwa 3 h nach Inkubation mit *S. pneumoniae* beginnt und sich nach 5 h verstärkt.

Dies zeigt, daß AIF aus den Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt wird und daß die Kinetik der Freisetzung mit der des beobachteten programmierten Zelltodes in zerebralen Endothelzellen übereinstimmt.

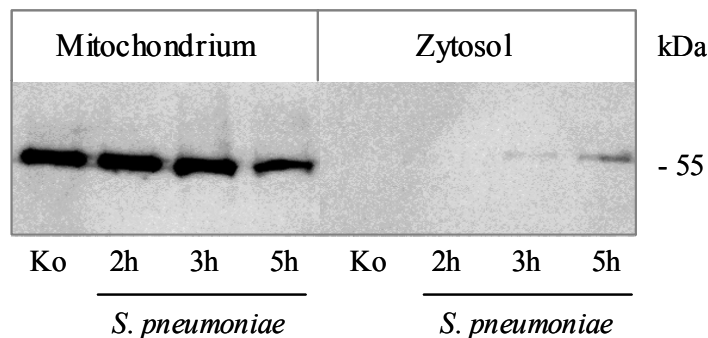


Abbildung 20: Translokation von AIF aus den Mitochondrien in das Zytosol. Die Endothelzellen wurden mit *S. pneumoniae* (Stamm R6,  $10^7$  cfu/ml) oder PBS (Kontrolle) inkubiert und eine zytosolische und mitochondriale Fraktion hergestellt. Anschließend wurde ein Western Blot mit einem spezifischen Anti-AIF-Antikörper durchgeführt. Ko = Kontrolle, kDa = Kilodalton

### 3.5 Untersuchung der Rolle Pneumokokken-spezifischer Eigenschaften

#### 3.5.1 Kapsel- und Adhäsionseigenschaften der Pneumokokken haben keinen Einfluß auf den programmierten Zelltod zerebraler Endothelzellen

Nach einer näheren Beschreibung und Untersuchung der Prozesse auf Seiten der Endothelzelle, sollte nun die Bedeutung verschiedener Eigenschaften von *S. pneumoniae* näher beleuchtet werden.

Hierzu wurde als erstes der Einfluß der Kapsel, einem wesentlichen Virulenzfaktor von Pneumokokken untersucht. Mit Hilfe der Acridinorange-Ethidiumbromid-Methode wurde die endotheliale Zelltodesrate durch den bekapselten Laborstamm D39 mit der seines unbekapselten jedoch sonst identischen Derivat R6 verglichen, wobei sich beide Pneumokokkenstämme im Verlauf der Inkubation der zerebralen Endothelzellen in vergleichbarer Weise vermehrten.

Abbildung 21 zeigt die Zelltod-Kinetik im Vergleich. Es traten keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil des programmierten Zelltodes auf, was darauf hinweist, daß die Kapsel keine entscheidende Rolle bei der Induktion des endothelialen Zelltodes spielt.

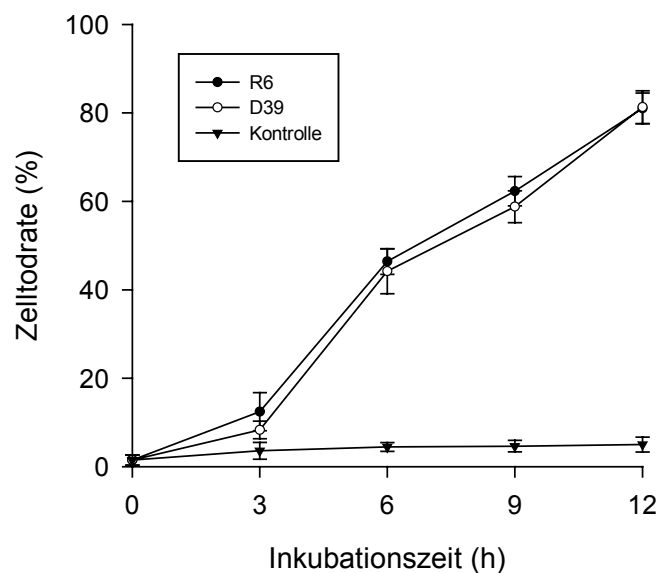


Abbildung 21: Kinetik des Zelltodes durch R6 (unbekapselt) und D39 (bekapselt). Zerebrale Endothelzellen wurden mit R6 ( $10^7$  cfu/ml), D39 ( $10^7$  cfu/ml) oder PBS (Kontrolle) inkubiert. Acridinorange-Ethidiumbromid-Methode.  $n = 9$  bei 3 unabhängigen Experimenten.

Ähnliche Resultate wurden beim Vergleich des Stammes R6 mit seinem Derivat CbpA<sup>-</sup> erhoben. Durch eine Mutation fehlt dem Pneumokokkenstamm CbpA<sup>-</sup> das *Choline-binding protein A*, ein Protein, das für die Bindung und Adhäsion von *S. pneumoniae* an Wirtszellen wichtig ist. Durch dieses Experiment sollte untersucht werden, ob die Adhäsion von *S. pneumoniae* beim Pneumokokken-induzierten Zelltod zerebraler Endothelzellen eine entscheidende Bedeutung hat. Es zeigte sich, daß das Fehlen des CbpA und damit das Binden der Pneumokokken an die Endothelzellen keinen Einfluß auf die Rate des endothelialen Zelltodes hatte (Abbildung 22).

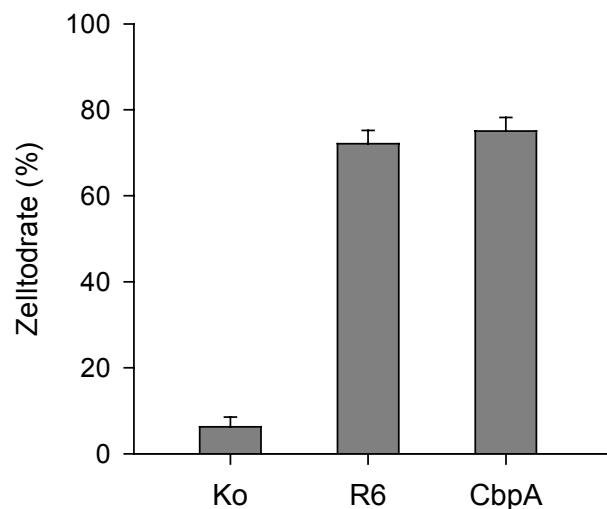


Abbildung 22: Rate des Zelltodes durch R6 (unbekapselter Pneumokokkenstamm) und CbpA<sup>-</sup> (Derivat von R6 mit fehlendem Choline-binding protein A). Zerebrale Endothelzellen wurden mit R6 ( $10^7$  cfu/ml), CbpA<sup>-</sup> ( $10^7$  cfu/ml) oder PBS (Kontrolle) für 12 h inkubiert. Acridinorange-Ethidiumbromid-Methode.  $n = 9$  bei 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.5.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Pneumolysin sind gemeinsam für den endothelialen Zelltod verantwortlich

Nachdem durch die oben beschriebenen Experimente ein Zusammenhang zwischen endothelialelem Zelltod und bakteriellen Adhäsions- und Kapsel-eigenschaften unwahrscheinlich war, stellte sich die Frage, ob andere Faktoren, die z.B. nach der Lyse von Pneumokokken freigesetzt werden, für den endothelialen Zelltod verantwortlich sein könnten.

Es ist bekannt, daß *S. pneumoniae* mindestens zwei solcher Faktoren, Wasserstoffperoxid und das Poren-formende Toxin Pneumolysin, produziert, von denen bereits in Tierexperimenten eine Toxizität für Alveolar-Epithelzellen nachgewiesen werden konnte (Duane *et al.*, 1993; Hirst *et al.*, 2000).

Um zunächst den Einfluß von Pneumolysin auf die Zelltodesrate zu untersuchen, wurde zur Inkubation ein von D 39 abstammender Pneumokokkenstamm verwandt, dem durch Mutation die Fähigkeit zur Produktion von Pneumolysin fehlt (PInA<sup>-</sup>) und die endotheliale Zelltodrate mit der durch D 39 verglichen. Der zytotoxische Einfluß von Wasserstoffperoxid wurde durch die Zugabe des Enzyms Katalase näher untersucht, das durch die Katalysierung der Reaktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub> zu einer Eliminierung von Wasserstoffperoxid führt. Durch die gleichzeitige Eliminierung von Pneumolysin (durch Verwendung des Stammes PInA<sup>-</sup>) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (durch Zugabe von Katalase) sollte zudem ein möglicher synergistischer Effekt der beiden Toxine nachgewiesen werden. Zerebrale Endothelzellen wurden hierzu mit D39 bzw. dem Pneumolysin-defizienten Stamm PInA<sup>-</sup> in einer Konzentration von je 10<sup>7</sup> cfu/ml für 12 h inkubiert und in je 2 Untergruppen geteilt, von denen die eine zusätzlich mit Katalase (1250 U/ml) und die andere mit gleicher Menge PBS versetzt wurde. Anschließend wurden sie mit Ethidiumbromid und Acridinorange gefärbt und die Zelltodesrate der Endothelzellen quantifiziert. Als weiterer Zelltod-Nachweis wurde eine Anfärbung der apoptotischen Zellkerne mittels TUNEL durchgeführt. Es zeigte sich, daß die alleinige Blockierung einer der beiden Toxine nicht zu einer Inhibition des *S. pneumoniae*-induzierten Zelltodes führte. Bei einer gemeinsamen Blockierung von Pneumolysin und Wasserstoffperoxid konnte dagegen eine signifikanten Reduktion des Zelltodes erreicht werden (Abbildung 23 und 24).

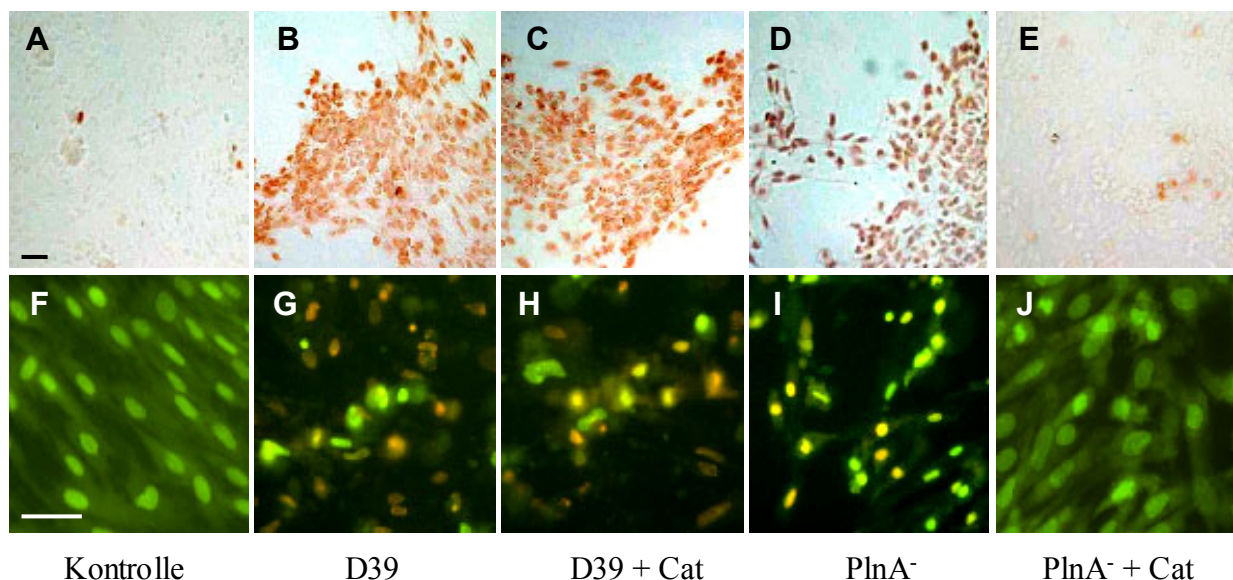


Abbildung 23: Die gemeinsame Blockierung von Pneumolysin und Wasserstoffperoxid führt zur Inhibition des *S. pneumoniae*-induzierten Zelltodes. Inkubation der Zellen mit D39, PInA<sup>-</sup> (je 10<sup>7</sup> cfu/ml) oder PBS mit oder ohne Katalase (1250 U/ml) für 12 h und Färbung mit TUNEL (A-E) sowie mit Acridinorange und Ethidiumbromid (F-J). Balken = 50 µm.

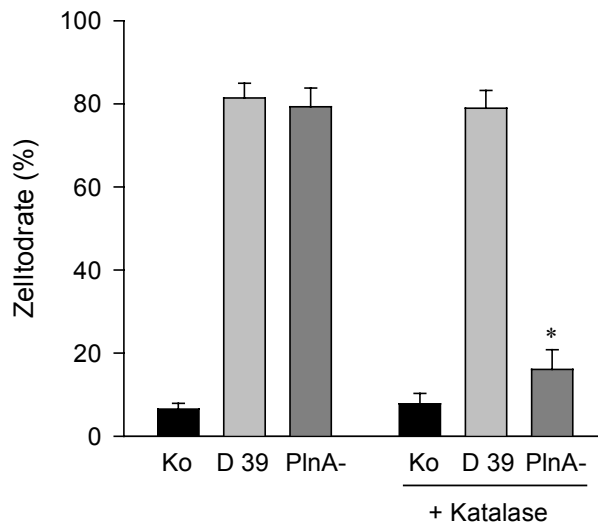


Abbildung 24: Die gemeinsame Blockierung von Pneumolysin und Wasserstoffperoxid führt zur Inhibierung des Zelltodes. 12 h Inkubation der Zellen mit D39, dem Pneumolysin-defizienten Stamm *PlnA<sup>-</sup>* (je  $10^7$  cfu/ml) oder PBS (Kontrolle) mit oder ohne Katalase (1250 U/ml). Acridinorange-Ethidiumbromid-Färbung.  $n=9$  bei 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz bei \* für  $p<0,001$  (ungepaarter *t*-Test).

Die Hypothese, daß Pneumolysin und  $H_2O_2$  gemeinsam für den Tod zerebraler Endothelzellen durch Pneumokokken verantwortlich sein könnte, konnte durch weitere Versuche bestätigt werden, in denen die Zelltod-Induktion eines unveränderten Pneumokokkenstammes (D 39) mit der eines Stammes mit einer zweifachen Mutation (*PlnA<sup>-</sup>/SpxB<sup>-</sup>*) verglichen wurde.

Die Doppelmutante *PlnA<sup>-</sup>/SpxB<sup>-</sup>* besitzt neben einem veränderten Gen für Pneumolysin auch eine fehlerhafte Pyruvatoxidase, und ist dadurch nicht in der Lage ist, adäquate Mengen  $H_2O_2$  zu bilden. Aus diesem Grund liegen die von der Doppelmutante gebildeten Wasserstoffperoxid-Mengen deutlich unter 5 % im Vergleich zum Wildtyp D 39 (Braun *et al.*, 2002).

Im Zeitverlauf war bereits nach 6 h mit  $58,8 \pm 5,1$  % beim Wildtyp D 39 und  $6,9 \pm 1,8$ % bei der Doppelmutante *PlnA<sup>-</sup>/SpxB<sup>-</sup>* eine signifikante Inhibition des Zelltodes festzustellen. Auch nach 12-stündiger Inkubation zeigte sich zwischen D 39 ( $81,3 \pm 3,7$  %) und *PlnA<sup>-</sup>/SpxB<sup>-</sup>* ( $23,3 \pm 3,7$  %) wegen der fehlenden Pneumolysin- und  $H_2O_2$ -Produktion ein signifikanter Unterschied (Abbildung 25).

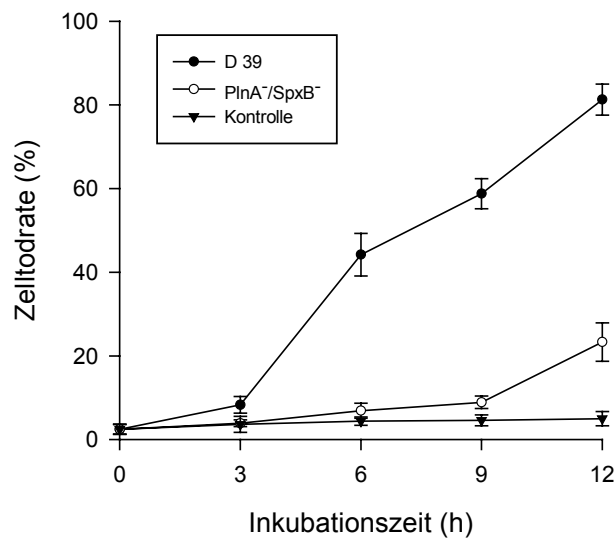


Abbildung 25: Der Pneumolysin- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-defiziente Stamm PlnA<sup>-</sup>/SpxB<sup>-</sup> führt zur Inhibierung des endothelialen Zelltodes. 12-stündige Inkubation der Zellen mit D 39, dem Pneumolysin- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-defizienten Stamm PlnA<sup>-</sup>/SpxB<sup>-</sup> (je 10<sup>7</sup> cfu/ml) oder PBS (Kontrolle). Acridinorange-Ethidiumbromid-Methode. n = 9 bei 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.5.3 Purifiziertes Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> können jeweils einen Zelltod in zerebralen Endothelzellen auslösen

Um zu untersuchen, ob Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auch unabhängig voneinander in der Lage sind Zelltod zu induzieren, wurden zerebrale Endothelzellen mit purifiziertem Pneumolysin (0,1 µg/ml) oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20-2000 µg/ml) inkubiert und deren Morphologie mit Hilfe der Acridinorange-Ethidiumbromid-Methode beurteilt und quantifiziert. Die Konzentrationen der beiden Toxine wurden so gewählt, daß sie etwa pathophysiologischen Bedingungen entsprechen (Houldsworth *et al.*, 1994; Pericone *et al.*, 2000). Es zeigte sich, daß zugefügtes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Veränderungen der Zellkerne, einschließlich der Kondensation der Kerne sowie der peripheren Anordnung des Chromatins, führte, die mit den Veränderungen durch lebende Pneumokokken vergleichbar war. Bei einer Konzentration von 2000 µM trat eine Rate des programmierten Zelltodes von 67,5 ± 2,87 % auf (s. Abbildung 26).

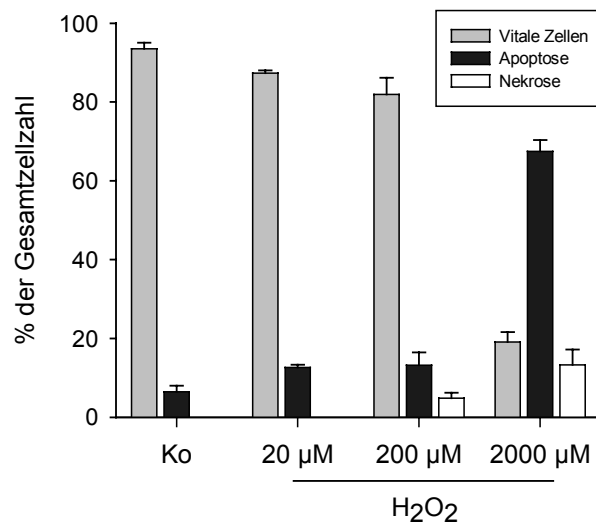


Abbildung 26: Zelltod zerebraler Endothelzellen nach Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20-2000 μM) für 12 h. Prozentuale Darstellung der lebenden Zellen (grau), nekrotischen Zellen (weiß) und Zellen mit typischer Morphologie für programmierten Zelltod (grau). Acridinorange-Ethidiumbromid-Methode. n = 9 bei 3 unabhängigen Experimenten

Auch durch Pneumolysin allein kam es zu einer Induktion eines programmierten Zelltodes in zerebralen Endothelzellen, die, wie in Abbildung 27 ersichtlich, der Kinetik des Zelltodes durch *S. pneumoniae* ähnelte.

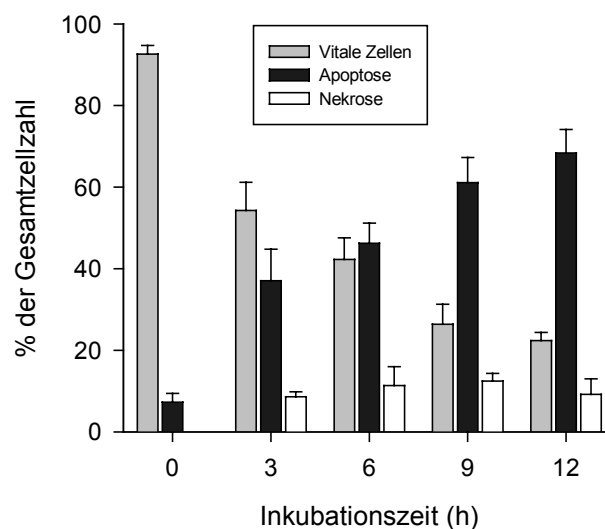


Abbildung 27: Kinetik des Zelltodes zerebraler Endothelzellen nach Stimulation mit purifiziertem Pneumolysin (0,1 μg/ml). Quantifizierung mit der Acridinorange-Ethidiumbromid-Methode. n=6, bei drei voneinander unabhängigen Experimenten.

### 3.5.4 Die Induktion des endothelialen Zelltodes durch purifiziertes Pneumolysin ist an dessen zytolytische Aktivität gebunden

Die Virulenz von Pneumolysin ist mit mindestens zwei wichtigen Eigenschaften des Toxins verbunden: mit seiner Fähigkeit, die Komplementkaskade zu aktivieren und seiner zytolytischen Aktivität, die durch die Bildung einer transmembranären Pore zustande kommt (Mitchell, 2000). Um die jeweilige Rolle dieser beiden Eigenschaften bei der Induktion des endothelialen Zelltodes zu testen, wurde die Zelltodrate durch Pneumolysin (*Pln wt*) mit denen zweier durch Mutationen veränderter Pneumolysin-Proteine, denen entweder die Fähigkeit zur Komplementaktivierung (D385N; *Pln Kompl*) oder die zytolytische Aktivität (W433F; *Pln Lys*<sup>-</sup>) fehlten, verglichen. Die Herstellung und Testung der Eigenschaften des rekombinanten Pneumolysins erfolgte nach Mitchell *et al.* (1997).

Die Abbildung zeigt, daß nach 12-stündiger Inkubation mit dem veränderten Pneumolysin *Pln Kompl* eine vergleichbare Zelltodrate erreicht wurde wie beim unveränderten Pneumolysin (*Pln wt*), während das Zytolyse-defiziente Pneumolysin (*Pln Lys*<sup>-</sup>) nicht in der Lage war, einen signifikanten Zellschaden in zerebralen Endothelzellen zu induzieren.

Dies weist darauf hin, daß die Fähigkeit von Pneumolysin, eine Zell-Lyse zu induzieren, hauptsächlich für dessen Fähigkeit zur Zelltodinduktion in zerebralen Endothelzellen verantwortlich ist.

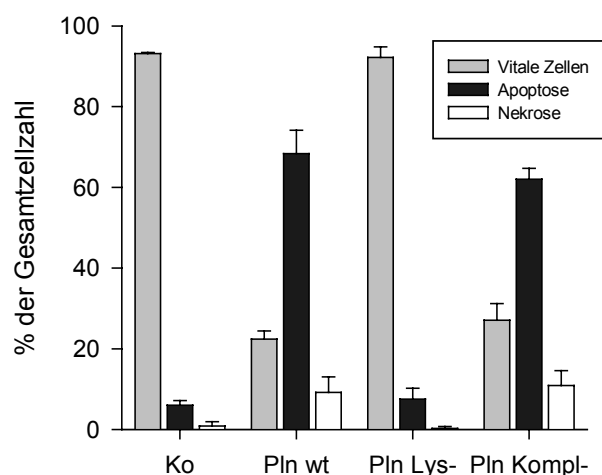


Abbildung 28: Vergleich der Rate des Zelltodes nach 12 h Inkubation mit unverändertem Pneumolysin (*Pln wt*), Zytolyse-defizientem (*Pln Zyt*) und Komplement-defizientem Pneumolysin (*Pln Kompl*).  $n = 9$ , bei drei unabhängigen Experimenten.



## 4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Effekt lebender Pneumokokken auf die Viabilität und Morphologie zerebraler mikrovaskulärer Endothelzellen, dem zellulären Hauptbestandteil der Blut-Hirn-Schranke, in einem Zellkultur-Modell zu untersuchen.

Insbesondere ging es dabei um die Frage, ob *S. pneumoniae* einen programmierten Zelltod in Endothelzellen induzieren kann und welche Eigenschaften von *S. pneumoniae* dabei eine Rolle spielen.

Hierbei ergaben sich folgende Resultate:

- *S. pneumoniae* wirkt zytotoxisch auf zerebrale Endothelzellen und verursacht in ihnen morphologische Veränderungen, die wichtige Kriterien des programmierten Zelltodes erfüllen.
- Bei diesem Pneumokokken-induzierten endothelialen Zelltod kommt es nicht zu einer Aktivierung von Caspasen.
- Der endotheliale Zelltod durch *S. pneumoniae* ist durch einen raschen Influx von Calcium und einen raschen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials gekennzeichnet.
- Beim Pneumokokken-induzierten Zelltod wird das proapoptotische Protein *apoptosis inducing factor* (AIF) in das Zytoplasma transloziert und eine AIF-spezifische Degradation der DNS in 50-kbp-Fragmente induziert.
- *S. pneumoniae* verursacht einen Zelltod in zerebralen Endothelzellen, der abhängig von der Konzentration der Bakterien und der Inkubationszeit ist.
- Kapsel- und Adhärenzeigenschaften von *S. pneumoniae* sind nicht entscheidend für den endothelialen Zelltod.
- Zwei Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* - Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - sind gemeinsam für den Zelltod zerebraler Endothelzellen verantwortlich.

Diese Ergebnisse sollen in den folgenden Abschnitten im Einzelnen diskutiert werden.

#### 4.1 Pneumokokken als Auslöser von programmiertem Zelltod

Die Induktion und Modulation von programmiertem Zelltod scheint eine wichtige Strategie von Bakterien bei der Pathogenese von Infektionen zu sein. Extrazelluläre Bakterien profitieren durch diesen Mechanismus, indem sie Wirtszellen und Immunzellen eliminieren, inflammatorische Prozesse modulieren und dadurch der effektiven Bekämpfung durch das Immunsystem entgehen (Zychlinsky und Sansonetti, 1997). Dabei benutzen die verschiedenen Erreger unterschiedliche Wege, um Apoptose auszulösen, z.B. über die direkte Aktivierung von Caspase 1 (Hersh *et al.*, 1999), Caspase 3 (Gao *et al.*, 1999), die Inhibierung von NF $\kappa$ B (Ruckdeschel *et al.*, 1998) und die Signaltransduktion über Fas- oder *Toll-Like*-Rezeptoren (Baran *et al.*, 2001; Aliprantis *et al.*, 1999). Auf der anderen Seite ist es auch aus Sicht des Immunsystems sinnvoll, daß Zellen, die mit intrazellulären Erregern infiziert sind, durch Apoptose sterben und eliminiert werden. Da diese intrazellulären Bakterien vom Überleben der Wirtszellen abhängen, wird so eine weitere Ausbreitung eingeschränkt (Hotchkiss *et al.*, 2002).

Auch *S. pneumoniae* kann Apoptose auslösen. Untersuchungen an Tiermodellen zeigten, daß die Apoptose von Neuronen im Gyrus dentatus ein entscheidender Schädigungsmechanismus bei der Pneumokokkenmeningitis ist (Zysk *et al.*, 1996; Braun *et al.*, 1999). Damit übereinstimmend führte im Tiermodell die Gabe des Caspaseninhibitors zVAD-fmk zu einer Verringerung des neuronalen Zelltodes um etwa 50 % und zu einer signifikanten Reduktion der Liquor-Zellzahl (Braun *et al.*, 1999). Diese neuronale Apoptose scheint zu einem großen Teil durch wirtseigene Entzündungsmediatoren (TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) ausgelöst zu werden. Jedoch wurde zusätzlich aufgrund der selektiven Vulnerabilität der Neuronen des Gyrus dentatus und ihrer Nähe zum Ventrikelsystem als dem Replikationsort der Bakterien spekuliert, daß auch direkte toxische Effekte von *S. pneumoniae* von Bedeutung sein könnten (Braun *et al.*, 1999).

Einschränkend muß zu dieser Theorie über eine direkte Schädigung der Neuronen durch *S. pneumoniae* allerdings festgestellt werden, daß sich die Bakterien im Subarachnoidalraum vermehren und erst in der Endphase der bakteriellen Meningitis in das Hirnparenchym eindringen. Dies bedeutet, daß es erst sehr spät zu einem direkten Kontakt zwischen Neuronen und Pneumokokken im Gyrus dentatus kommt.

Im Gegensatz zu einem möglichen späten Kontakt mit Neuronen kommen lebende Pneumokokken bereits in einem viel früheren Stadium mit den Zellen der Blut-Hirn-Schranke in direkten Kontakt (Leib und Täuber, 1999), ohne daß es einer intraparenchymatösen Invasion bedarf. Daher dürften direkte toxische Effekte von *S. pneumoniae* auf zerebrale Endothelzellen

und der dadurch ausgelöste Zelltod von Endothelzellen von tatsächlicher biologischer Bedeutung für die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und von klinischer Relevanz sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß lebende Pneumokokken in einer klinisch relevanten Konzentration von  $10^7$  cfu/ml über eine Induktion von programmiertem Zelltod rasch zu einer Destruktion von zellulären Bestandteilen der Blut-Hirn-Schranke führten.

Für diesen Nachweis wurde ein *in-vitro*-Zellkultursystem mit primären mikrovaskulären Endothelzellen aus zerebralen Kapillaren von Ratten verwendet. Dieses Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke ist deshalb für die durchgeführten Untersuchungen geeignet, da die Zellen einen konfluenten Monolayer ausbilden und bestimmte Transporteigenschaften besitzen, die mit denen der Blut-Hirn-Schranke *in vivo* vergleichbar sind (Audus *et al.*, 1996). Zudem hat das Zellkulturmodell einem *in-vivo*-Modell gegenüber entscheidende Vorteile. Unabhängig von zusätzlichen Einflüssen, z.B. der wirtseigenen Immunantwort eines tierexperimentellen Modells, können die direkten Effekte von Pneumokokken auf zelluläre Bestandteile der Blut-Hirn-Schranke untersucht und genauer charakterisiert werden. Hinzu kommt, daß der Nachweis des apoptotischen Zelltodes von Endothelzellen *in vivo* nur sehr schwierig zu führen ist, da sich Endothelzellen nach Abschluß des Zelltodes von der Basalmembran ablösen und mit dem Blutstrom weggeschwemmt oder durch Makrophagen phagozytiert werden (Hotchkiss *et al.*, 2002).

Aus diesen Gründen war es trotz der technisch anspruchsvollen und zeitaufwendigen Präparation der Endothelzellen aus 3 Wochen alten Ratten von Vorteil, primäre zerebrale Endothelzellen als Modell zur Untersuchung der Interaktion von Pneumokokken und der Blut-Hirn-Schranke zu verwenden.

### **4.2 Nachweis des programmierten Zelltodes**

Die Detektion der Apoptose erfolgte durch unterschiedliche Methoden.

Die erste, auf einem Nachweis von DNS-Strangbrüchen basierende TUNEL-Methode gehört zu den am meisten verwendeten Apoptoseassays. Zu den Vorteilen dieser Methode gehört die vergleichsweise einfache Durchführbarkeit und die große Sensitivität. Sie kann sowohl bei adhärennten Zellen (wie den Endothelzellen) als auch bei nicht-ahärennten Zellen angewendet werden (Sgonc und Gruber, 1998). Nachteilig ist die eingeschränkte Spezifität. Es sind Fälle beschrieben worden, in denen unbehandelte und eigentlich vitale Zellen abhängig vom verwendeten Protokoll eine falsch-positive Reaktion zeigten (Stähelin *et al.*, 1998). Dies trat jedoch erst ab einer Inkubationszeit mit Proteinase K, einem Inkubationsschritt der TUNEL-Methode, von über 15 min auf. In dieser Arbeit wurde ein Protokoll mit einer nur 8-minütigen

Inkubation mit Proteinase K verwendet, so daß eine falsch-positive Färbung von vitalen Zellen unwahrscheinlich ist.

Des weiteren ist gezeigt worden, daß auch nekrotische Zellen, bei denen eine massive DNS-Degradation auftritt, falsch-positiv angefärbt werden können (Mirakian *et al.*, 2002). Um dies im Fall des untersuchten Zelltodes auszuschließen, wurden die Endothelzellen nach Infektion mit Pneumokokken zusätzlich mit zwei weiteren Methoden evaluiert, die auf dem Nachweis von charakteristischen morphologischen Merkmalen der Zelle bei Apoptose basieren. Diese gehören zum Goldstandard unter den Detektionsmethoden des programmierten Zelltodes (Smolewski *et al.*, 2003).

Durch eine Färbung mit den fluoreszierenden DNS-Farbstoffen Acridinorange und Ethidiumbromid wurde die Morphologie von zerebralen Endothelzellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Verwendung zweier Farbstoffe, von denen der eine durch intakte Zellmembranen diffundieren kann (Acridinorange) und der andere ausgeschlossen wird (Ethidiumbromid), ist deshalb von Vorteil, da zusätzlich die Aussage getroffen werden kann, ob die Zellmembran intakt oder durchlässig ist, und damit, ob es sich um ein frühes oder spätes Stadium des Zelltodes handelt. Dadurch ist eine Differenzierung zwischen lebenden Zellen und Zellen mit apoptotischer oder nekrotischer Morphologie leichter möglich (Braun *et al.*, 2001).

Zusätzlich wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt, in denen durch die noch stärkere Vergrößerung auch subzelluläre Merkmale wie die Anordnung des Chromatins im Zellkern gut dargestellt werden konnten.

Durch diese beiden Methoden konnte nachgewiesen werden, daß es in Pneumokokken-behandelten Zellen zu Veränderungen in der Zellmorphologie kommt: zu einem Schrumpfen der gesamten Zelle, einer Kondensation des Zellkernes und zu einer peripheren Anordnung des Chromatins im Zellkern. Zusätzlich zeigte sich eine Blasenbildung (*Blebbing*) der Kernmembran. Erst spät im Zuge des endothelialen Zelltodes war eine Permeabilisierung der Zellmembran und damit Rotfärbung der Zellen durch den nicht-diffusiblen Kernfarbstoff Ethidiumbromid festzustellen.

Diese morphologischen Merkmale sind untypisch für den nekrotischen Zelltod, da bei Nekrose der Zellkern in der Regel nicht kondensiert und schon früh eine Permeabilisierung der Zellmembran eintritt. Vielmehr sind wichtige morphologische Kriterien der Apoptose erfüllt.

Auffällig ist, daß es, im Gegensatz zu den mit Staurosporin inkubierten Zellen, nicht zu einer kompletten Fragmentierung des Kernes, einer vollständigen Kondensation des Chromatins oder zur Bildung von apoptotischen Körperchen kam. Mit dieser nur partiellen Kondensation des

Chromatins entspricht das Aussehen der Zellkerne dem Stadium I der apoptotischen Chromatinkondensation, das in einer frühen Phase der Apoptose auftritt und zeitlich mit einer Translokation von AIF in den Kern assoziiert ist (Daugas *et al.*, 2000).

Stadium II ist als Endstadium der nukleären Apoptose durch eine kompaktere Kondensation des Chromatins ohne (IIa) oder mit (IIb) Bildung apoptotischer Körperchen gekennzeichnet (Loeffler *et al.*, 2001b; Daugas *et al.*, 2000) und vom Vorhandensein von aktiven Caspasen und einer Aktivierung der *Caspase activated DNase* (CAD) abhängig. Die Zugabe von Caspasen-Inhibitoren in *in-vitro*-Experimenten führt zu einem Arrest einer Staurosporin-induzierten nukleären Apoptose im Stadium I (Daugas *et al.*, 2000).

Da beim Zelltod durch *S. pneumoniae* lediglich Stadium I, nicht jedoch Stadium II nachzuweisen ist, kann spekuliert werden, daß die Exekution der nukleären Apoptose nicht vollständig abläuft.

### 4.3 Fehlende Aktivierung der Caspasen

Caspasen spielen bei der Initiierung und Exekution der klassischen Apoptose eine wichtige Rolle. Zur näheren Charakterisierung des endothelialen Zelltodes durch *S. pneumoniae* sollte überprüft werden, ob und zu welchem Zeitpunkt hierbei Caspasen aktiviert werden.

Aus diesem Grund wurde zunächst ein Blockierungsversuch mit dem Breitspektrum-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk durchgeführt, einem Caspase-Hemmer, der alle Mitglieder der Caspasefamilie irreversibel inhibiert und deshalb für den allgemeinen Nachweis der Beteiligung von Caspasen häufig verwandt wird.

Es zeigte sich, daß der Pneumokokken-induzierte Zelltod durch die Zugabe von zVAD-fmk nicht signifikant reduziert werden konnte. Da die Inkubation mit zVAD-fmk in den Staurosporin-behandelten Zellen zu einer fast vollständigen Hemmung der Apoptose führte, ist nicht eine mangelnde Aktivität von zVAD-fmk in unserem Assay, sondern eher eine fehlende Beteiligung der Caspasen anzunehmen.

Als nächster Schritt wurde eine direkte Messung der Caspasen-3, -8 und -9 durchgeführt. Diese drei Caspasen wurden ausgewählt, da sie mit der Caspase-8 aus dem extrinsischen Signalweg, der Caspase-9 aus dem intrinsischen Weg und der Caspase-3 als wichtigster Exekutor-Caspase die entscheidenden Caspasen darstellen (Nicholson, 2000). Die Messung der Caspaseaktivität erfolgte in Anlehnung an Braun *et al.* (2001) als Einzeitmessungen nach 60 min. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, weil in diesem Zeitraum auch für höhere Caspasekonzentrationen eine nahezu lineare Korrelation zwischen Reaktionszeit und gemessener

Fluoreszenz (Emission) angenommen werden kann, wie aus Implementierungsversuchen in unserem Labor sowie bei Namura *et al.* (1998) zu erkennen war.

Die Caspaseaktivität der Pneumokokken-behandelten Proben war dabei nicht signifikant gegenüber der Negativkontrolle erhöht, was die Hypothese einer fehlenden Beteiligung zumindest dieser drei gemessenen Caspasen unterstützt.

Um einen weiteren Anhalt für die Richtigkeit dieser Hypothese zu erhalten, wurde in einem Western Blot untersucht, ob ein bestimmtes zelluläres Protein ( $\alpha$ -Fodrin), das während der klassischen Apoptose von aktivierten Caspasen in typische Untereinheiten gespalten wird, nach Exekution des endothelialen Zelltodes in dieser gespaltenen Form vorliegt. Auch hier konnte nur in der Positivkontrolle mit Staurosporin eine Spaltung von  $\alpha$ -Fodrin als Zeichen von aktivierten Caspasen detektiert werden, während die Pneumokokken-behandelten Zellen nicht dieses für die Aktivierung von Caspasen typische Muster zeigten.

Aus den Ergebnissen dieser drei unterschiedlichen experimentellen Ansätze kann geschlußfolgert werden, daß Caspasen – zumindest die direkt gemessenen bzw. durch den Breitspektrum-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk hemmbaren – für den Ablauf des Zelltodes von zerebralen Endothelzellen keine entscheidende Funktion haben.

Zusätzlich wird dies durch die Beobachtung gestützt, daß die Morphologie der Zellkerne der Endothelzellen nie über das nukleäre Apoptose-Stadium I hinausgeht, es also zu keiner Caspasen-abhängigen kompletten Fragmentation des Kernes oder Bildung apoptotischer Körperchen kommt. Dies ist deshalb von Bedeutung, da die Exekution der klassischen Apoptose per definitionem strikt an die Aktivierung von Caspasen gebunden ist.

In den letzten Jahren gibt es jedoch immer mehr Evidenz für einen programmierten Zelltod ohne Aktivierung von Caspasen (Leist und Jäättelä, 2001). Dieser Caspasen-unabhängige programmierte Zelltod, der auch bei dem hier untersuchten Phänomen vorzuliegen scheint, hebt sich klar von der klassischen Apoptose ab, teilt aber auch wichtige Merkmale mit ihr. So kann auch der Caspasen-unabhängige programmierte Zelltod durch Todesrezeptoren und durch mitochondriale Veränderungen ausgelöst werden. Zudem sind auch die Auswirkungen auf benachbarte Zellen (Elimination der Zellreste ohne Inflammation) mit denen der klassischen Apoptose vergleichbar.

Die Exekution des Zelltodes übernehmen dabei Proteasen, die nicht zur Familie der Caspasen gehören (Leist und Jäättelä, 2001). Zu den „Nicht-Caspase-Proteasen“ gehören z.B. Calpain, Cyscathepsine, Serinproteasen und Cathepsin D (Leist und Jäättelä, 2001). Diese können die klassischen Caspase-Substrate spalten und so die zellulären Effekte von Caspasen nachahmen (Johnson *et al.*, 2000; Wang, 2000). So sind beispielsweise Cathepsin D im Camptothecin-

induzierten Zelltod von Leber-Karzinom-Zellen (Roberts *et al.*, 1999), Cathepsin B in mit TNF $\alpha$  behandelten Fibrosarkomzellen (Foghsgaard *et al.*, 2001) oder Calpain in Vitamin-D-behandelten Brustkrebszellen (Mathiasen *et al.*, 1999) für die Exekution des Zelltodes hauptsächlich verantwortlich.

Auch beim hier untersuchten Pneumokokken-induzierten programmierten Zelltod ist eine Beteiligung von „Nicht-Caspase-Proteasen“ vorstellbar. Die Identifizierung der beteiligten Proteasen wird dabei weiteren Projekten vorbehalten sein.

#### **4.4 Intrazelluläres Calcium und mitochondriales Membranpotential**

Der Influx von extrazellulärem Calcium bzw. die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Depots in das Zytoplasma und in die Mitochondrien werden in verschiedenen Apoptosemodellen vor dem Auftreten von morphologischen Apoptosecharakteristika beobachtet (Rizzuto *et al.*, 2003). Eine Erhöhung der mitochondrialen Calciumkonzentration führt zu einer Freisetzung von proapoptischen Proteinen (z.B. Cytochrom c und AIF) und/oder zu einer Störung der mitochondrialen Atmungskette (Hajnoczky *et al.*, 2003). Die hierdurch entstehenden Sauerstoffradikale bewirken eine Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum und eine weitere Erhöhung der Calciumkonzentration im Mitochondrium, was wiederum die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und den oxidativen Streß erneut steigert. Dieser *Circulus vitiosus* führt letztlich zum Tod der Zelle (Jacobson *et al.*, 2002). Die genauen Mechanismen der Calcium-Homöostase in der Zelle bzw. den Zellorganellen im Zusammenhang mit dem Zelltod sind äußerst komplex reguliert. Dabei spielen auch die Mitglieder der Bcl-2-Familie, einer großen an der Regulation von Apoptose beteiligten Familie von Proteinen, eine Rolle. So führt beispielsweise eine Überexpression von bcl-2 zu einer Senkung der endoplasmatischen Calciumkonzentration und daraus folgend zu einer Änderung der Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli (Rizzuto *et al.*, 2003).

Im folgenden Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob es auch beim Pneumokokken-induzierten endothelialen Zelltod zu einer Erhöhung des intrazellulären freien Calciums kommt, das wiederum über eine Schädigung der Mitochondrien an der Destruktion der Zelle beteiligt sein könnte.

Hierzu wurden zerebrale Endothelzellen mit dem unbekapselten Pneumokokkenstamm R6 stimuliert und anschließend mit dem Calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM behandelt. Dieser Stoff bindet hochspezifisch an freies Calcium und ist durch seine Acetoxyacetyler-(AM)-Gruppe in der Lage, die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran zu

überqueren. Im Zytoplasma der Zelle werden diese AM-Gruppen durch unspezifische Esterasen gespalten. Hierdurch kann Fluo-4 an freie Calcium-Ionen binden, was letztlich in einer etwa 100-fachen Erhöhung der Emission des Fluoreszenzfarbstoffes resultiert. Zusätzlich führt die Abspaltung der AM-Gruppe zu einer Abnahme der Lipophilität von Fluo-4, so daß der Calcium-Indikator nicht mehr aus der Zelle diffundieren kann. Dadurch kann eine Aussage über die relative Veränderungen des intrazellulären Calciumgehaltes getroffen werden. Zu beachten ist allerdings, daß verschiedene Faktoren, die von der eigentlichen intrazellulären Calciumkonzentration unabhängig sind, zu einer Beeinflussung des Fluoreszenzsignals führen können (Takahashi *et al.*, 1999),

Solche beeinflussenden Faktoren sind beispielsweise die Autofluoreszenz des zellulären Monolayers insbesondere durch die Pyridin-enthaltenden Nukleotide oder eine inkomplette Hydrolyse der Estergruppe mit daraus folgender unzureichender Bindung von Calcium-Ionen. Weiterhin ist eine unspezifische Bindung an intrazelluläre Proteine und Ionen z.B. Mangan vorstellbar, die mit zu geringen Emissionswerten einhergehen würden. Auch ein Übertreten des intrazellulär lokalisierten Farbstoffes in das extrazelluläre Medium wäre möglich. Dieses *leakage* würde ebenfalls zu erniedrigten Meßwerten führen. Aus diesen Gründen ist eine kritische Interpretation der Ergebnisse nötig.

Trotz dieser methodischen Einschränkungen, wurde die Färbung mit Fluo-4 AM für eine relative Aussage über die Veränderungen des intrazellulären Calciumgehaltes häufig für vergleichbare Fragestellungen verwendet (Braun *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 1999).

Die Behandlung von zerebralen Endothelzellen mit lebenden Pneumokokken in einer Konzentration von  $10^7$  cfu/ml führte zu einer raschen und signifikanten Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Innerhalb von 2,5 h kam es zu einer Verdopplung des gemessenen Ausgangswertes, nach einer weiteren Stunde zu einer Verdreifachung. Vergleicht man nun die Kinetik der intrazellulären Calciumkonzentration mit der Kinetik der morphologischen Veränderungen der Zellen, läßt sich feststellen, daß der Calciumanstieg früher auftritt. Übereinstimmend mit Untersuchungen in Neuronen, in denen unterschiedliche Agentien über eine intrazelluläre Erhöhung von Calcium zu Apoptose führen (Lipton und Nicotera, 1998) ist es demnach wahrscheinlich, daß die Veränderungen des Calciumgehaltes an der Regulation des endothelialen Zelltodes ursächlich beteiligt sind.

Um diese Annahme zu bestätigen, wurden die Endothelzellen mit dem intra- und extrazellulären Calciumchelator BAPTA-AM vorinkubiert und anschließend mit Pneumokokken behandelt. Hierbei konnte eine signifikante Reduktion der Zelltodrate auf etwa die Hälfte festgestellt



werden, was demonstriert, daß die Konzentrationszunahme des Calciums für den Pneumokokken-induzierten Zelltod zumindest teilweise von Bedeutung sein muß.

Die Zunahme der mitochondrialen Calciumkonzentration kann zu einer Schädigung des Mitochondriums und zu einer Öffnung der *permeability transition pores* in den Mitochondrien führen (Crompton, 1999). Diese Poren, die durch einen Komplex von mitochondrialen Proteinen zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran entstehen, führen im Rahmen des intrinsischen Apoptoseweges zur Freisetzung von proapoptotischen Proteinen. Zudem geht die Öffnung mit einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\varphi_M$  einher, da das Mitochondrium nicht mehr in der Lage ist, einen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran aufrechtzuerhalten (Zamzami *et al.*, 1996).

Um der Frage nachzugehen, ob die Stimulation mit Pneumokokken zu einer frühen Abnahme von  $\Delta\varphi_M$  als Ausdruck einer (Calcium-induzierten) Schädigung der Mitochondrien führt, wurden Pneumokokken-behandelte Endothelzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodaminester (TMRE), einem Rhodamin-Farbstoff, inkubiert. Diese sind kationische, lipophile Stoffe, die selektiv Mitochondrien abhängig von ihrem negativen Membranpotential anfärben. Veränderungen des transmembranären Potentials führen zu einer Änderung der mitochondrialen Fähigkeit, diesen Farbstoff aufzunehmen bzw. zu speichern, was letztlich in einer meßbaren Abnahme des Fluoreszenzsignals resultiert.

Dies konnte bereits nach einer kurzen Zeit nach Inkubation mit *S. pneumoniae* festgestellt werden: nach etwa 3 h kam es nahezu zu einer Halbierung der TMRE-Fluoreszenz, was die Aussage über eine frühe Schädigung der Mitochondrien stützt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß es durch *S. pneumoniae* zu einem Einstrom von Calcium aus intrazellulären Depots und/oder aus dem extrazellulären Medium in das Zytoplasma kommt, was, wahrscheinlich über eine rasche mitochondriale Schädigung, ursächlich zum endothelialen Zelltodes beiträgt.

#### **4.5 Beteiligung von *Apoptosis Inducing Factor* (AIF)**

Nachdem der Nachweis einer frühen mitochondrialen Schädigung erbracht war, stellte sich die Frage, ob AIF, als ein zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran lokalisiertes Protein, im Rahmen dieser Schädigung freigesetzt wird. Dies ist insbesondere deshalb von Interesse, da AIF unabhängig von der Aktivierung von Caspasen zu programmiertem Zelltod führen kann und aus diesem Grund als wichtiger auslösender Faktor in Frage kommt.

Wahrscheinlich war die Annahme einer Beteiligung von AIF auch deshalb, da bei den Pneumokokken-behandelten Endothelzellen eine charakteristische, durch eine periphere Kondensation des Chromatins gekennzeichnete Kernmorphologie zu beobachten war. Diese dem Apoptosestadium I entsprechende Kondensation des Zellkernes konnte in verschiedenen Arbeiten als AIF-spezifisches Phänomen identifiziert werden (Leist und Jäättelä, 2001; Susin *et al.*, 1999; Dougas *et al.*, 2000).

Durch welche Mechanismen bzw. Interaktionen AIF zu dieser nukleären Veränderung führt, ist noch unbekannt, da AIF selbst keine Nuklease-Aktivität aufweist (van Gurp *et al.*, 2003). Bekannt ist jedoch, daß AIF mit der Endonuclease G interagiert, die Caspasen-unabhängig DNS degradieren kann (Hansen und Nagley, 2003).

Biochemisch geht die periphere AIF-induzierte Fragmentierung des Kernes mit einer Degradation der genomischen DNS in 50 kbp-große Fragmente einher (van Gurp *et al.*, 2003).

Durch die Auftrennung der DNS von Pneumokokken-behandelten zerebralen Endothelzellen in einer Pulsfeldgelelektrophorese, mit der man insbesondere große DNS-Fragmente gut darstellen kann, konnte in dieser Arbeit dieses spezifische Degradationsmuster nachgewiesen werden. Diese auch als *large scale fragmentation* bezeichnete Spaltung stellte sich ab einer 5-stündigen Inkubation der Endothelzellen mit *S. pneumoniae* deutlich dar und nahm im Laufe einer weiteren 2-stündigen Inkubation zu. Damit stimmt diese Kinetik mit der Kinetik der morphologischen Veränderungen der Endothelzellen weitestgehend überein, die ebenfalls zwischen der dritten und sechsten Stunde nach Inkubation mit Pneumokokken auftreten und im weiteren Verlauf zunehmen.

Des weiteren sollte nachgewiesen werden, ob AIF im Rahmen des endothelialen Zelltodes aus den Mitochondrien in das Zytosol transloziert wird. Hierzu wurde eine Fraktionierung der Endothelzellen in ihre mitochondrialen und zytosolischen Untereinheiten durchgeführt und AIF mit einem spezifischen Antikörper in einem Western Blot nachgewiesen. In Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit *S. pneumoniae* nahm AIF in der mitochondrialen Fraktion ab und in der zytosolischen Fraktion zu. Hieraus kann geschlußfolgert werden, daß AIF (ausgelöst durch eine Calcium-induzierte mitochondriale Schädigung) in das Zytosol gelangt und darauffolgend zu den apoptosetypischen Veränderungen des Zellkernes und der Zelle führt, wobei Calcium als ein Faktor für die Freisetzung von AIF bereits bekannt ist (Susin *et al.*, 1999).

Geht man davon aus, daß neben AIF auch das ebenfalls im intermembranären Spalt lokalisierte proapoptotische Protein *Cytochrom c* in das Zytosol gelangt, stellt sich die Frage, warum es nicht zu einer Aktivierung von Caspasen und damit zum Ablauf einer klassischen Apoptose kommt. Im normalen Fall bildet *Cytochrom c* im Rahmen des intrinsischen, durch die Mitochondrien

regulierten Apoptoseweges mit Apaf-1, Procaspase 9 und dATP einen Komplex (*Apoptosom*), durch den eine Aktivierung der Caspasen-Kaskade initiiert wird (Green, 2000).

Ausgehend von dieser Überlegung kann spekuliert werden, daß möglicherweise ein nicht vollständig funktionstüchtiges *Apoptosom* vorliegt, wodurch der Ablauf einer klassischen, intrinsisch ausgelösten Apoptose verhindert wird. Für die fehlende Funktionalität könnte es verschiedene Gründe geben.

Vorstellbar ist zum einen, daß es im Zuge des endothelialen Zelltodes und der frühen Schädigung der Mitochondrien zu einem Mangel an dATP kommt. Damit würde ein essentieller Bestandteil des *Apoptosoms* fehlen und seine mangelnde Funktionstüchtigkeit sowie fehlende Aktivierung der Caspase 9 und 3 erklären. Schon 1997 konnte gezeigt werden, daß bei gleichem auslösenden apoptotischen Stimulus der Energielevel in der Zelle entscheidet, ob der Zelltod mit oder ohne Aktivierung von Caspasen abläuft (Leist *et al.*, 1997). Für diese Theorie spräche auch die Tatsache, daß die nukleären und zellulären Prozesse durch AIF nicht ATP-abhängig sind. Im Hinblick auf den endothelialen Zelltod hieße dies beispielsweise, daß es zwar durch AIF ATP-unabhängig zu einer nukleären Apoptosestadium I kommt, eine vollständige Exekution der klassischen Apoptose (mit einem nukleären Apoptosestadium II) durch Energiemangel jedoch nicht ablaufen kann.

Weiterhin wäre es auch möglich, daß eine Überaktivierung von intrazellulär vorhandenen Inhibitoren der Caspasen, z.B. den sogenannten IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*), eine Initiierung der Caspasen-Kaskade verhindert.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind 8 verschiedene IAPs in der Säugetierzelle bekannt (LeBlanc, 2003). Sie können Caspasen durch zwei verschiedene Mechanismen hemmen: durch eine direkte Interaktion und durch eine Proteasom-vermittelte Degradation von Caspasen. Neben einer transskriptionalen Regulation der IAPs beispielsweise durch NF $\kappa$ B und MAP-Kinasen, werden sie durch verschiedene Faktoren (z.B. Smac/Diablo) negativ posttranslational reguliert, d.h. in ihrer Aktivität gehemmt (LeBlanc, 2003).

Würde man nun eine Funktion der IAPs im hier untersuchten Caspasen-unabhängigen endothelialen Zelltod annehmen, wäre es wegen der raschen Kinetik des Zelltodes von besonderem Interesse nachzuweisen, ob posttranslational negativ regulierende Proteine hieran beteiligt sind und ob eventuell direkte Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* dabei eine Rolle spielen.

Diese Fragestellungen sind zukünftigen Studien vorbehalten.

#### **4.6 Kapsel- und Adhärenzeigenschaften von *S. pneumoniae***

Neben den ablaufenden Mechanismen auf Seiten der Endothelzelle sind in einem weiteren Teil der Arbeit Eigenschaften von *S. pneumoniae* untersucht worden, die zur Induktion des Zelltodes beitragen könnten.

Hierzu wurde als erster Schritt der Einfluß der Kapsel- und Adhärenzeigenschaften von *S. pneumoniae* auf die Zelltodrate näher untersucht.

Der Vergleich zwischen einem bekapselten (D39) und einem unbekapselten Pneumokokkenstamm (R6) bei sonst identischen Eigenschaften zeigte keinen Unterschied in Kinetik und Ausmaß des endothelialen Zelltodes. Dies weist darauf hin, daß die Kapsel von *S. pneumoniae* keinen entscheidenden Einfluß auf die hier untersuchten Prozesse hat.

Ein ähnliches Ergebnis erbrachte der Vergleich zwischen dem unbekapselten Wildtyp-Stamm (R6) und einer Pneumokokken-Mutante (CbpA<sup>-</sup>), bei der das Gen für das Oberflächenprotein *Choline-binding protein A* (CbpA) ausgeschaltet ist. Durch CbpA wird die Bindung und Adhärenz von *S. pneumoniae* an Endothelzellen erleichtert. Dieses Protein trägt neben dem in der Bakterienzellwand lokalisierten Phosphorylcholin durch seine Interaktion mit einem endothelialen Rezeptor (PAF-Rezeptor) hauptsächlich zum Übertritt von *S. pneumoniae* über endotheliale Barrieren und damit zur Invasivität des Erregers bei (Ring *et al.*, 1998). Wegen der Bedeutung von CbpA für die bakterielle Invasion sollte untersucht werden, ob CbpA zu einer Modulation des Zelltodes, etwa durch eine stärkere Adhärenz der Pneumokokken an die Endothelzellen, führt. Dies konnte im Vergleich zwischen Wildtyp- und dem CbpA-defizienten Pneumokokkenstamm nicht bestätigt werden.

#### **4.7 Rolle von Wasserstoffperoxid und Pneumolysin**

Durch die Verwendung von Pneumokokkenmutanten konnten im letzten Abschnitt dieser Arbeit die beiden Faktoren von *S. pneumoniae* identifiziert werden, die für den endothelialen Zelltod verantwortlich sind: Wasserstoffperoxid und Pneumolysin. Diese beiden Toxine wirken dabei synergistisch, sind aber auch jeweils unabhängig voneinander in der Lage, einen Zelltod in Endothelzellen auszulösen. Wird nur eines dieser beiden Toxine (durch Knockout-Mutation oder Zugabe des Wasserstoffperoxid-abbauenden Enzyms Katalase) gehemmt, stellt man eine ähnlich hohe Zelltodrate fest, wie dies ohne inhibierende Behandlung der Fall ist.

Eine gleichzeitige Hemmung beider Faktoren führt zu einer nahezu vollständigen Aufhebung der zytotoxischen Potenz von *S. pneumoniae*. Hinsichtlich der wahrscheinlichen pathogenetischen

Bedeutung für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke ist dieses Ergebnis deshalb von Bedeutung, weil diese beiden Toxine gemeinsames Ziel einer potentiellen Entwicklung von Therapeutika sein könnten bzw. sollten.

Wasserstoffperoxid, das in großen Mengen von *S. pneumoniae* gebildet wird (Duane *et al.*, 1993) kann leicht in eukaryonte Zellen diffundieren und dort eine oxidative Schädigung anrichten. Zusätzlich kann es auch von der Wirtszelle selbst bei gestörter mitochondrialer Funktion produziert werden. Um zu untersuchen, ob das bakterielle und/oder das intrinsisch in der Endothelzelle entstehende  $H_2O_2$  für die Zytotoxizität verantwortlich sind, wurde einerseits eine Pneumokokkenmutante (PInA<sup>-</sup>/SpxB<sup>-</sup>) verwendet, der neben Pneumolysin auch das Enzym zur Bildung von  $H_2O_2$  fehlt. Andererseits konnte durch Zugabe des  $H_2O_2$ -abbauenden Enzyms Katalase zur Pneumolysin-defizienten Pneumokokkenmutante (PInA<sup>-</sup>) untersucht werden, ob auch eine intrinsische Bildung von  $H_2O_2$  beteiligt sein könnte. Da die Ausschaltung der bakteriellen Produktion von  $H_2O_2$  zu einer signifikanten Reduktion des endothelialen Zelltodes führte, kann man davon ausgehen, daß diese die hauptsächliche Quelle für die Bildung des  $H_2O_2$  darstellt. Jedoch kann auch eine intrinsische Produktion von  $H_2O_2$  angenommen werden, da die Behandlung mit Katalase zu einer leicht höheren Hemmung der Zelltodesrate führte.

Es ist bekannt, daß Wasserstoffperoxid über eine Schädigung von Membranen und eine Störung der ATP-Produktion zu Apoptose führen kann (Cochrane, 1991). Vor kurzem wurden zwei Publikationen veröffentlicht, in denen in Neuronen nach Exposition von  $H_2O_2$  ein Caspasen-unabhängiger Zelltod mit einer Translokation von AIF, einer peripheren Kondensation des Chromatins und einer *large scale fragmentation* nachgewiesen werden konnte (Zhang *et al.*, 2002; Fonfria *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse stimmen mit den hier angeführten Untersuchungen überein. Einen weiteren Hinweis für die Beteiligung von  $H_2O_2$  bei der Pneumokokkenmeningitis lieferte eine andere, ältere Arbeit: in einem Meningitismodell in Ratten, die mit Pneumokokken infiziert wurden, führte die gleichzeitige Behandlung mit Katalase nach 6 Stunden zu einer signifikanten Reduktion des regionalen zerebralen Blutflusses und des Hirnödems sowie zu einem Rückgang des intrakraniellen Druckes (Pfister *et al.*, 1992).

Pneumolysin, das zweite an der Zelltodinduktion beteiligte Virulenzmerkmal, ist ein Toxin, das viele Funktionen einnimmt: es kann Zytolyse, die Aktivierung des Komplementsystems und die Produktion von NO und Zytokinen induzieren (Mitchell *et al.*, 1997; Braun *et al.*, 1999; Paton, 1996). Spezifische Domänen des Pneumolysins sind unabhängig voneinander für die proinflammatorische und zytolytische (Poren-bildende) Aktivität verantwortlich (Mitchell *et al.*, 1997). Verändertes Pneumolysin, das durch Mutation in der jeweiligen Domäne entstanden ist, wurde verwendet, um zu untersuchen, welche Eigenschaften von Pneumolysin zur Zytotoxizität

beitragen. Ähnlich wie  $H_2O_2$  ist Pneumolysin in der Lage, im endothelialen Zellkulturmodell einen programmierten Zelltod auszulösen. Hierzu benötigt es die Fähigkeit zur Bildung von transmembranären Poren, wie im Experiment mit dem Zytolyse-defizienten Pneumolysin-Protein nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu hat die komplementaktivierende Komponente von Pneumolysin auf den endothelialen Zelltod keinen Einfluß.

Folgende Hypothese kann aufgestellt werden: über die durch Pneumolysin entstandenen Poren, die etwa einen Durchmesser von 35-45 nm haben (Gilbert *et al.* 1999), kommt es zu einem Influx von extrazellulärem Calcium, dem nachgewiesenen raschen Anstieg des intrazellulären Calciums und nachfolgend über eine mitochondriale Schädigung und die Freisetzung von AIF zum endothelialen Zelltod.

Weniger wahrscheinlich ist eine von Pneumolysin ausgelöste Apoptose mit einer Signaltransduktion über *Toll-like*-(TLR)-Rezeptoren. TLR-Rezeptoren können verschiedenste bakterielle Moleküle erkennen, die als *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) zusammengefasst werden. Zu ihnen gehören neben den Lipopolysacchariden (LPS) auch Lipoproteine sowie Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren. Die Aktivierung dieser TLR-Rezeptoren führt nicht nur zu einer Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Medzhitov und Janeway, 1997), sondern kann auch über eine Rekrutierung des Adaptermoleküls *Fas associated death domain* (FADD), d.h. über den extrinsischen Weg eine klassische Apoptose hervorrufen (Aliprantis *et al.*, 2000). Zwar konnte nachgewiesen werden, daß Pneumolysin über den TLR-4-Rezeptor zur Bildung von verschiedenen Zytokinen führt (Malley *et al.*, 2003), jedoch spricht die verzögerte, nach etwa 18 h eintretende proinflammatorische Antwort des Pneumolysins sowie die im TLR-System beobachtete Unabhängigkeit von der zytolytischen Aktivität des Pneumolysins gegen eine Induktion der endothelialen Apoptose über TLR-Rezeptoren. Zudem ist auch der frühe Abfall des mitochondrialen Membranpotentials eher für einen intrinsisch (über eine mitochondriale Schädigung) als einen extrinsisch (durch Rezeptoren) ausgelösten Zelltod typisch.

Pneumolysin ist verwandt mit Hämolytinen anderer bakterieller Erreger der Meningitis. Von diesen Hämolytinen, z.B. dem Lysteriolysin von *Listeria monocytogenes* und dem  $\beta$ -Hämolyysin der Gruppe-B-Streptokokken, ist bereits nachgewiesen worden, daß sie Apoptose induzieren können (Guzman *et al.*, 1996; Fettucciari *et al.*, 2000). Es wäre daher von besonderem Interesse zu untersuchen, ob diese Hämolyysin-Familie über einen ähnlichen Mechanismus, wie den hier beschriebenen, d.h. Caspasen-unabhängig und AIF-abhängig, Apoptose verursachen kann.

Dafür spricht, daß es beim Zelltod von Makrophagen durch das  $\beta$ -Hämolyysin von Gruppe-B-Streptokokken, ähnlich wie bei den hier untersuchten Mechanismen, nicht zu einer Aktivierung

von Caspase-1 und -3 kommt. Zudem kann auch der Zelltod der Makrophagen durch Calcium-Chelatoren verringert werden, so daß auch in diesem Fall ein rascher Calcium-Influx als hauptsächlicher Auslöser vermutet wurde (Fettucciari *et al.*, 2000).

### 4.8 Ausblick

Nachdem gezeigt werden konnte, daß lebende Pneumokokken über die Freisetzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Pneumolysin unabhängig von der Aktivierung von Caspasen einen programmierten Zelltod in primären zerebralen Endothelzellen verursachen, sollten nun in weiteren Projekten die Mechanismen dieses Zellschadens näher charakterisiert werden. Besonderes Interesse gilt dabei den potentiellen bei der Exekution beteiligten Nicht-Caspase-Proteasen, da deren Identifizierung einen wesentlichen Beitrag zur Erforschung von bakteriellen Wirkungsmechanismen und zur Entwicklung von Inhibitoren, analog etwa den sich in klinischer Erprobung befindenden Caspasen-Inhibitoren, leisten könnte.

Desweiteren stellt sich die Frage, aus welchem Grund eine Aktivierung von Caspasen trotz Freisetzung proapoptotischer Proteine ausbleibt. Neben einem kritischen Energiehaushalt der Zelle könnten auch bakterielle Eigenschaften etwa über eine Regulierung der Caspasen-hemmenden Familie der IAPs eine Rolle spielen.

Auch erscheint eine weitere Erforschung der Mechanismen, die durch AIF in Gang gesetzt werden, wichtig. Ziel der Untersuchungen könnten hierbei die Regulation der Translokation von AIF in den Zellkern sowie die Interaktion mit weiteren Faktoren, z.B. Endonukleasen, sein.

In Zukunft könnte eine nähere Charakterisierung der *S. pneumoniae*-induzierten Destruktion zerebraler mikrovaskulärer Endothelzellen zum besseren Verständnis der Blut-Hirn-Schranken-Störung bei bakterieller Meningitis und damit zur Entwicklung adjuvanter Therapiemöglichkeiten beitragen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die bakterielle Meningitis ist trotz der Anwendung modernster Antibiotika mit einer hohen Letalität und neurologischen Spätkomplikationen assoziiert. Die genauen molekularen Mechanismen, die zum Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke bei bakterieller Meningitis führen, sind bis heute unklar. Neben einer überschießenden Immunantwort könnten auch von *S. pneumoniae* gebildete Toxine zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke beitragen.

Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob lebende Pneumokokken bzw. ihre Produkte *in vitro* zu einer apoptotischen Zellschädigung von zerebralen Endothelzellen führen und welche Mechanismen dieser Schädigung zugrunde liegen.

Zunächst konnte mittels verschiedener Detektionsmethoden (TUNEL, Fluoreszenzmikroskopie, Elektronenmikroskopie) nachgewiesen werden, daß *S. pneumoniae* zu einem apoptotischen Zelltod führt. Die Zellkerne der zerebralen Endothelzellen zeigten dabei die Morphologie des nukleären Apoptosestadiums I, das durch das mitochondriale Protein *apoptosis inducing factor* (AIF) hervorgerufen wird. Das fortgeschrittenere nukleäre Apoptosestadium II, das durch eine Caspasen-abhängige Nuklease entsteht, war im Gegensatz dazu nicht nachzuweisen.

Auch konnte eine generelle Beteiligung von Caspasen weder mit direkter Aktivitätsmessung noch mittels Inhibitionsexperimenten oder dem Nachweis von Caspase-spezifischen Substraten gezeigt werden. Insgesamt sprechen die Morphologie der Zellkerne sowie die spezifische Degradation der endothelialen DNS und die Tatsache, daß AIF aus den Mitochondrien transloziert wird, dafür, daß es sich beim endothelialen Zelltod um einen AIF-vermittelten Zelltod ohne Caspasenbeteiligung handelt. Diese Form des Zelltodes ist bereits in anderen Zellmodellen, bisher jedoch noch nicht bei zerebralen Endothelzellen beschrieben worden.

Weitere Charakteristika des hier untersuchten Prozesses sind ein rascher Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration sowie simultan ein Abfall des mitochondrialen Membranpotentials. Hierbei scheinen die Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration ursächlich für die Zelltodinduktion zu sein, da es bei Hemmung des Calciums durch den Calciumchelator BAPTA-AM zu einer deutlichen Inhibierung der Zellschädigung kommt.

Desweiteren konnten in der vorliegenden Arbeit Wasserstoffperoxid und Pneumolysin als ursächliche Auslöser des endothelialen Zelltod identifiziert werden. Die zytotoxische Potenz des Pneumolysins ist dabei an dessen Poren-formende Aktivität gebunden.

Abbildung 29 faßt die in dieser Arbeit identifizierten Mechanismen der Schädigung zerebraler Endothelzellen durch *S. pneumoniae* schematisch zusammen.



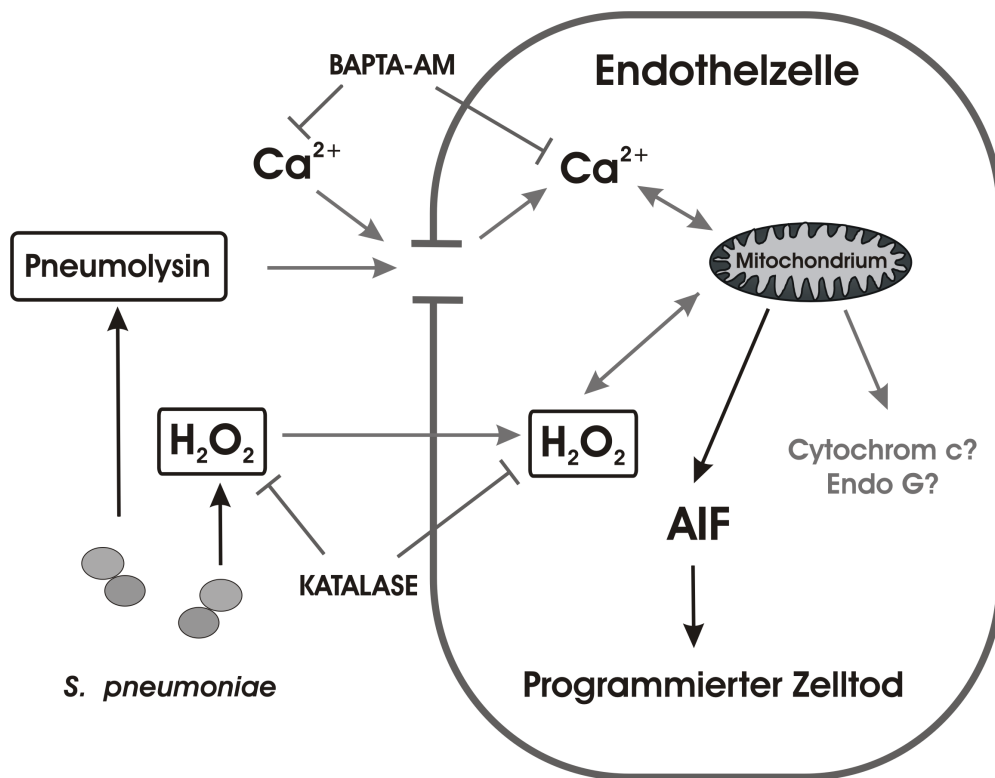


Abbildung 29: Schematische Zusammenfassung der Mechanismen beim *S. pneumoniae*-induzierten endothelialen Zelltod. AIF = apoptosis inducing factor.  $H_2O_2$  = Wasserstoffperoxid. BAPTA-AM (Bis-ethyleneglycol-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester) = intrazellulärer Calciumchelator. Endo G = Endonuklease G

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind von klinischer Relevanz, da es bei einer Bakteriämie bzw. während der Invasion der Pneumokokken in das ZNS zu einem direkten Kontakt zwischen Bakterien und zerebralen Endothelzellen, als wichtigem Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke kommt. Zum Schutz der Blut-Hirn-Schranke könnten adjuvante Therapeutika entwickelt werden, die vom Wirkprinzip an einem oder mehreren der hier untersuchten Mechanismen ansetzen könnten. Beispielsweise wäre der adjuvante Einsatz von Wasserstoff-abbauenden, antioxidativen Agentien oder von AIF-inhibierenden Antikörpern vorstellbar. Dies gilt es, in entsprechenden *in-vivo*-Experimenten zu überprüfen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Abbott, N. J. (2002): Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability, *J.Anat.* 200 [6], Seite 629-638.

Aliprantis, A. O.; Yang, R. B.; Mark, M. R.; Suggett, S.; Devaux, B.; Radolf, J. D.; Klimpel, G. R.; Godowski, P. und Zychlinsky, A. (1999): Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2, *Science* 285 [5428], Seite 736-739.

Aliprantis, A. O.; Yang, R. B.; Weiss, D. S.; Godowski, P. und Zychlinsky, A. (2000): The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2, *EMBO J.* 19 [13], Seite 3325-3336.

Aronin, S. I.; Peduzzi, P. und Quagliariello, V. J. (1998): Community-acquired bacterial meningitis: risk stratification for adverse clinical outcome and effect of antibiotic timing, *Ann.Intern.Med.* 129 [11], Seite 862-869.

Audus, K. L.; Ng, L.; Wang, W. und Borchardt, R. T. (1996): Brain microvessel endothelial cell culture systems, *Pharm.Biotechnol.* 8, Seite 239-258.

Baran, J.; Weglarczyk, K.; Mysiak, M.; Guzik, K.; Ernst, M.; Flad, H. D. und Pryjma, J. (2001): Fas (CD95)-Fas ligand interactions are responsible for monocyte apoptosis occurring as a result of phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*, *Infect.Immun.* 69 [3], Seite 1287-1297.

Berry, A. M.; Yother, J.; Briles, D. E.; Hansman, D. und Paton, J. C. (1989): Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*, *Infect.Immun.* 57 [7], Seite 2037-2042.

Bhakdi, S. und Trantum-Jensen, J. (1986): Membrane damage by pore-forming bacterial cytolytins, *Microb.Pathog.* 1 [1], Seite 5-14.

Bonev, B. B.; Gilbert, R. J.; Andrew, P. W.; Byron, O. und Watts, A. (2001): Structural analysis of the protein/lipid complexes associated with pore formation by the bacterial toxin pneumolysin, *J.Biol.Chem.* 276 [8], Seite 5714-5719.

Braun, J. S.; Novak, R.; Herzog, K. H.; Bodner, S. M.; Cleveland, J. L. und Tuomanen, E. I. (1999): Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis, *Nat.Med.* 5 [3], Seite 298-302.

Braun, J. S.; Novak, R.; Murray, P. J.; Eischen, C. M.; Susin, S. A.; Kroemer, G.; Halle, A.; Weber, J. R.; Tuomanen, E. I. und Cleveland, J. L. (2001): Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus, *J.Infect.Dis.* 184 [10], Seite 1300-1309.

Braun, J. S.; Sublett, J. E.; Freyer, D.; Mitchell, T. J.; Cleveland, J. L.; Tuomanen, E. I. und Weber, J. R. (2002): Pneumococcal pneumolysin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate brain cell apoptosis during meningitis, *J.Clin.Invest* 109 [1], Seite 19-27.

Breiman, R. F. (1998): Prevention of pneumococcal disease--a new romance begins, *Clin.Infect.Dis.* 26 [5], Seite 1124-1126.

Bronfman, M.; Loyola, G. und Koenig, C. S. (1998): Isolation of intact organelles by differential centrifugation of digitonin-treated hepatocytes using a table Eppendorf centrifuge, *Anal.Biochem.* 255 [2], Seite 252-256.

Bruyn, G. A. und van Furth, R. (1991): Pneumococcal polysaccharide vaccines: indications, efficacy and recommendations, *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 10 [11], Seite 897-910.

Cerretti, D. P.; Kozlosky, C. J.; Mosley, B.; Nelson, N.; Van Ness, K.; Greenstreet, T. A.; March, C. J.; Kronheim, S. R.; Druck, T.; Cannizzaro, L. A. und . (1992): Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme, *Science* 256 [5053], Seite 97-100.

Chandra, J.; Samali, A. und Orrenius, S. (2000): Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress, *Free Radic.Biol.Med.* 29 [3-4], Seite 323-333. URL: PM:11035261

Chung, S.; Gumienny, T. L.; Hengartner, M. O. und Driscoll, M. (2000): A common set of engulfment genes mediates removal of both apoptotic and necrotic cell corpses in *C. elegans*, *Nat.Cell Biol.* 2 [12], Seite 931-937.

Cochrane, C. G. (1991): Cellular injury by oxidants, *Am.J.Med.* 91 [3C], Seite 23S-30S.

Cockeran, R.; Anderson, R. und Feldman, C. (2002): The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection, *Curr.Opin.Infect.Dis.* 15 [3], Seite 235-239.

Crompton, M.; Virji, S.; Doyle, V.; Johnson, N. und Ward, J. M. (1999): The mitochondrial permeability transition pore, *Biochem.Soc.Symp.* 66, Seite 167-179.

Cundell, D. R. und Tuomanen, E. I. (1994): Receptor specificity of adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human type-II pneumocytes and vascular endothelial cells in vitro, *Microb.Pathog.* 17 [6], Seite 361-374.

Cundell, D. R.; Gerard, N. P.; Gerard, C.; Idanpaan-Heikkila, I. und Tuomanen, E. I. (1995): *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor, *Nature* 377 [6548], Seite 435-438.

Daugas, E.; Nochy, D.; Ravagnan, L.; Loeffler, M.; Susin, S. A.; Zamzami, N. und Kroemer, G. (2000): Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis, *FEBS Lett.* 476 [3], Seite 118-123.

de Gans, J. und van de, Beek D. (2002): Dexamethasone in adults with bacterial meningitis, *N.Engl.J.Med.* 347 [ 20], Seite 1549-1556 . URL: PM:12432041

Drevets, D. A. und Leenen, P. J. (2000): Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into the central nervous system, *Microbes.Infect.* 2 [13], Seite 1609-1618.

Duane, P. G.; Rubins, J. B.; Weisel, H. R. und Janoff, E. N. (1993): Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells, *Infect.Immun.* 61 [10], Seite 4392-4397.

Durand, M. L.; Calderwood, S. B.; Weber, D. J.; Miller, S. I.; Southwick, F. S.; Caviness, V. S., Jr. und Swartz, M. N. (1993): Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes, *N.Engl.J.Med.* 328 [1], Seite 21-28.

Earnshaw, W. C.; Martins, L. M. und Kaufmann, S. H. (1999): Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, *Annu.Rev.Biochem.* 68, Seite 383-424.

Fadok, V. A.; Voelker, D. R.; Campbell, P. A.; Cohen, J. J.; Bratton, D. L. und Henson, P. M. (1992): Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages, *J.Immunol.* 148 [7], Seite 2207-2216.

Fettucciari, K.; Rosati, E.; Scaringi, L.; Cornacchione, P.; Migliorati, G.; Sabatini, R.; Fettriconi, I.; Rossi, R. und Marconi, P. (2000): Group B Streptococcus induces apoptosis in macrophages, *J.Immunol.* 165 [7], Seite 3923-3933.

Fiore, A. E.; Moroney, J. F.; Farley, M. M.; Harrison, L. H.; Patterson, J. E.; Jorgensen, J. H.; Cetron, M.; Kolczak, M. S.; Breiman, R. F. und Schuchat, A. (2000): Clinical outcomes of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in the era of antibiotic resistance, *Clin.Infect.Dis.* 30 [1], Seite 71-77.

Foghsgaard, L.; Wissing, D.; Mauch, D.; Lademann, U.; Bastholm, L.; Boes, M.; Elling, F.; Leist, M. und Jaattela, M. (2001): Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor, *J.Cell Biol.* 153 [5], Seite 999-1010.

Fonfria, E.; Dare, E.; Benelli, M.; Sunol, C. und Ceccatelli, S. (2002): Translocation of apoptosis-inducing factor in cerebellar granule cells exposed to neurotoxic agents inducing oxidative stress, *Eur.J.Neurosci.* 16 [10], Seite 2013-2016.

Freyer, D.; Manz, R.; Ziegenhorn, A.; Weih, M.; Angstwurm, K.; Docke, W. D.; Meisel, A.; Schumann, R. R.; Schonfelder, G.; Dirnagl, U. und Weber, J. R. (1999): Cerebral endothelial cells release TNF-alpha after stimulation with cell walls of *Streptococcus pneumoniae* and regulate inducible nitric oxide synthase and ICAM-1 expression via autocrine loops, *J.Immunol.* 163 [8], Seite 4308-4314.

Gao, L. Y. und Abu, Kwaik Y. (1999): Activation of caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis, *Infect.Immun.* 67 [9], Seite 4886-4894.

Gilbert, R. J.; Jimenez, J. L.; Chen, S.; Tickle, I. J.; Rossjohn, J.; Parker, M.; Andrew, P. W. und Saibil, H. R. (1999): Two structural transitions in membrane pore formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of *Streptococcus pneumoniae*, *Cell* 97 [5], Seite 647-655.

Gloor, S. M.; Wachtel, M.; Bolliger, M. F.; Ishihara, H.; Landmann, R. und Frei, K. (2001): Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier, *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36 [2-3], Seite 258-264.

Gray, B. M. und Dillon, H. C., Jr. (1986): Clinical and epidemiologic studies of pneumococcal infection in children, *Pediatr. Infect. Dis.* 5 [2], Seite 201-207.

Green, D. R. (2000): Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors, *Cell* 102 [1], Seite 1-4.

Guzman, C. A.; Domann, E.; Rohde, M.; Bruder, D.; Darji, A.; Weiss, S.; Wehland, J.; Chakraborty, T. und Timmis, K. N. (1996): Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*, *Mol. Microbiol.* 20 [1], Seite 119-126.

Hajnoczky, G.; Davies, E. und Madesh, M. (2003): Calcium signaling and apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304 [3], Seite 445-454. URL: PM:12729578

Hansen, T. M. und Nagley, P. (2003): AIF: a multifunctional cog in the life and death machine, *Sci. STKE.* 2003 [193], Seite E31.

Haslett, C. (1992): Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes, *Clin. Sci. (Lond)* 83 [6], Seite 639-648.

Hersh, D.; Monack, D. M.; Smith, M. R.; Ghori, N.; Falkow, S. und Zychlinsky, A. (1999): The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 [5], Seite 2396-2401.

Hirst, R. A.; Sikand, K. S.; Rutman, A.; Mitchell, T. J.; Andrew, P. W. und O'Callaghan, C. (2000): Relative roles of pneumolysin and hydrogen peroxide from *Streptococcus pneumoniae* in inhibition of ependymal ciliary beat frequency, *Infect. Immun.* 68 [3], Seite 1557-1562.

Hirt, U. A.; Gantner, F. und Leist, M. (2000): Phagocytosis of nonapoptotic cells dying by caspase-independent mechanisms, *J.Immunol.* 164 [12], Seite 6520-6529.

Hotchkiss, R. S.; Tinsley, K. W.; Swanson, P. E. und Karl, I. E. (2002): Endothelial cell apoptosis in sepsis, *Crit Care Med.* 30 [5 Suppl], Seite S225-S228.

Houldsworth, S.; Andrew, P. W. und Mitchell, T. J. (1994): Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes, *Infect.Immun.* 62 [4], Seite 1501-1503.

Jaattela, M.; Wissing, D.; Kokholm, K.; Kallunki, T. und Egeblad, M. (1998): Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases, *EMBO J.* 17 [21], Seite 6124-6134.

Jacobson, J. und Duchon, M. R. (2002): Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes--requirement for stored Ca<sup>2+</sup> and sustained opening of the permeability transition pore, *J.Cell Sci.* 115 [Pt 6], Seite 1175- 1188.

Jedrzejak, M. J. (2001): Pneumococcal virulence factors: structure and function, *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 65 [2], Seite 187-207.

Johnson, D. E. (2000): Noncaspase proteases in apoptosis, *Leukemia* 14 [9], Seite 1695-1703.

Joza, N.; Susin, S. A.; Daugas, E.; Stanford, W. L.; Cho, S. K.; Li, C. Y.; Sasaki, T.; Elia, A. J.; Cheng, H. Y.; Ravagnan, L.; Ferri, K. F.; Zamzami, N.; Wakeham, A.; Hakem, R.; Yoshida, H.; Kong, Y. Y.; Mak, T. W.; Zuniga-Pflucker, J. C.; Kroemer, G. und Penninger, J. M. (2001): Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death , *Nature* 410 [6828], Seite 549-554.

Kamada, S.; Kusano, H.; Fujita, H.; Ohtsu, M.; Koya, R. C.; Kuzumaki, N. und Tsujimoto, Y. (1998): A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: cloning of the antiapoptotic gene gelsolin, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 [15], Seite 8532-8537.

Kerr, J. F.; Wyllie, A. H. und Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br.J.Cancer* 26 [4], Seite 239-257.

Kim, K. S. (2003): Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury, *Nat.Rev.Neurosci.* 4 [5], Seite 376-385.

Kim, K. S.; Wass, C. A.; Cross, A. S. und Opal, S. M. (1992): Modulation of blood-brain barrier permeability by tumor necrosis factor and antibody to tumor necrosis factor in the rat, *Lymphokine Cytokine Res.* 11 [6], Seite 293-298.

Klein, J. A.; Longo-Guess, C. M.; Rossmann, M. P.; Seburn, K. L.; Hurd, R. E.; Frankel, W. N.; Bronson, R. T. und Ackerman, S. L. (2002): The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor, *Nature* 419 [6905], Seite 367-374.

Kniesel, U. und Wolburg, H. (2000): Tight junctions of the blood-brain barrier, *Cell Mol.Neurobiol.* 20 [1], Seite 57-76.

Koedel, U.; Scheld, W. M. und Pfister, H. W. (2002): Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis, *Lancet Infect.Dis.* 2 [12], Seite 721-736.

Kragshjerg, P.; Kallman, J. und Olcen, P. (1994): Pneumococcal meningitis in adults, *Scand.J.Infect.Dis.* 26 [6], Seite 659-666.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [259], Seite 680-685.

LeBlanc, A. C. (2003): Natural cellular inhibitors of caspases, *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 27 [2], Seite 215-229.

Leib, S. L. und Tauber, M. G. (1999): Pathogenesis of bacterial meningitis, *Infect.Dis.Clin.North Am.* 13 [3], Seite 527-5vi.



Leist, M.; Single, B.; Castoldi, A. F.; Kuhnle, S. und Nicotera, P. (1997): Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis, *J.Exp.Med.* 185 [8], Seite 1481-1486.

Leist, M. und Jaattela, M. (2001): Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2 [8], Seite 589-598.

Li, J. Y.; Boado, R. J. und Pardridge, W. M. (2001): Blood-brain barrier genomics, *J.Cereb.Blood Flow Metab* 21 [1], Seite 61-68.

Lipton, S. A. und Nicotera, P. (1998): Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis, *Cell Calcium* 23 [2-3], Seite 165-171.

Loeffler, J. M.; Ringer, R.; Hablutzel, M.; Tauber, M. G. und Leib, S. L. (2001): The free radical scavenger alpha-phenyl-tert-butyl nitron aggravates hippocampal apoptosis and learning deficits in experimental pneumococcal meningitis, *J.Infect.Dis.* 183 [2], Seite 247-252.

Loeffler, M.; Daugas, E.; Susin, S. A.; Zamzami, N.; Metivier, D.; Nieminen, A. L.; Brothers, G.; Penninger, J. M. und Kroemer, G. (2001): Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor, *FASEB J.* 15 [3], Seite 758-767.

Malley, R.; Henneke, P.; Morse, S. C.; Cieslewicz, M. J.; Lipsitch, M.; Thompson, C. M.; Kurt-Jones, E.; Paton, J. C.; Wessels, M. R. und Golenbock, D. T. (2003): Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 [4], Seite 1966-1971.

Mariani-Kurkdjian, P.; Doit, C.; Le, Thomas, I; Aujard, Y.; Bourrillon, A. und Bingen, E. (1999): [Bacterial concentration in the cerebrospinal fluid in childhood meningitis], *Presse Med.* 28 [23], Seite 1227-1230.

Martin, S. J.; Finucane, D. M.; Amarante-Mendes, G. P.; O'Brien, G. A. und Green, D. R. (1996): Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity, *J.Biol.Chem.* 271 [46], Seite 28753-28756.

Mashima, T.; Naito, M.; Noguchi, K.; Miller, D. K.; Nicholson, D. W. und Tsuruo, T. (1997): Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis, *Oncogene* 14 [9], Seite 1007-1012.

Mate, M. J.; Ortiz-Lombardia, M.; Boitel, B.; Haouz, A.; Tello, D.; Susin, S. A.; Penninger, J.; Kroemer, G. und Alzari, P. M. (2002): The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF, *Nat.Struct.Biol.* 9 [6], Seite 442-446.

Mathiasen, I. S.; Lademann, U. und Jaattela, M. (1999): Apoptosis induced by vitamin D compounds in breast cancer cells is inhibited by Bcl-2 but does not involve known caspases or p53, *Cancer Res.* 59 [19], Seite 4848-4856.

Mayhan, W. G. (2002): Cellular mechanisms by which tumor necrosis factor-alpha produces disruption of the blood-brain barrier, *Brain Res.* 927 [2], Seite 144-152.

McCullers, J. A.; English, B. K. und Novak, R. (2000): Isolation and characterization of vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* from the cerebrospinal fluid of a patient who developed recrudescence meningitis, *J.Infect.Dis.* 181 [1], Seite 369-373.

Medzhitov, R. und Janeway, C. A., Jr. (1997): Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition, *Cell* 91 [3], Seite 295-298.

Melino, G. (2001): The Sirens' song, *Nature* 412 [6842], Seite 23.

Mirakian, R.; Nye, K.; Palazzo, F. F.; Goode, A. W. und Hammond, L. J. (2002): Methods for detecting apoptosis in thyroid diseases, *J.Immunol.Methods* 265 [1-2], Seite 161-175.

Miramar, M. D.; Costantini, P.; Ravagnan, L.; Saraiva, L. M.; Haouzi, D.; Brothers, G.; Penninger, J. M.; Peleato, M. L.; Kroemer, G. und Susin, S. A. (2001): NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *J.Biol.Chem.* 276 [19], Seite 16391-16398.

Mitchell, T. J. und Andrew, P. W. (1997): Biological properties of pneumolysin, *Microb.Drug Resist.* 3 [1], Seite 19-26.

Mitchell, T. J. (2000): Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Res.Microbiol.* 151 [6], Seite 413-419.

Molyneux, E. M.; Walsh, A. L.; Forsyth, H.; Tembo, M.; Mwenechanya, J.; Kayira, K.; Bwanaisa, L.; Njobvu, A.; Rogerson, S. und Malenga, G. (2002): Dexamethasone treatment in childhood bacterial meningitis in Malawi: a randomised controlled trial, *Lancet* 360 [9328], Seite 211-218.

Morona, J. K.; Paton, J. C.; Miller, D. C. und Morona, R. (2000): Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *streptococcus pneumoniae*, *Mol.Microbiol.* 35 [6], Seite 1431-1442.

Namura, S.; Zhu, J.; Fink, K.; Endres, M.; Srinivasan, A.; Tomaselli, K. J.; Yuan, J. und Moskowitz, M. A. (1998): Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia, *J.Neurosci.* 18 [10], Seite 3659-3668.

Nicholson, D. W. (1999): Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death, *Cell Death.Differ.* 6 [11], Seite 1028-1042.

Nicholson, D. W. (2000): From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents, *Nature* 407 [6805], Seite 810-816.

Pardridge, W. M. (1999): Blood-brain barrier biology and methodology, *J.Neurovirol.* 5 [6], Seite 556-569.

Paton, J. C.; Lock, R. A. und Hansman, D. J. (1983): Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae*, *Infect.Immun.* 40 [2], Seite 548-552.

Paton, J. C. (1996): The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*, *Trends Microbiol.* 4 [3], Seite 103-106.

Pericone, C. D.; Overweg, K.; Hermans, P. W. und Weiser, J. N. (2000): Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract, *Infect.Immun.* 68 [7], Seite 3990-3997.

Pfister, H. W.; Kodel, U.; Dirnagl, U.; Haberl, R. L.; Ruckdeschel, G. und Einhaupl, K. M. (1992): Effect of catalase on regional cerebral blood flow and brain edema during the early phase of experimental pneumococcal meningitis, *J.Infect.Dis.* 166 [6], Seite 1442-1445.

Pfister, H. W.; Fontana, A.; Tauber, M. G.; Tomasz, A. und Scheld, W. M. (1994): Mechanisms of brain injury in bacterial meningitis: workshop summary, *Clin.Infect.Dis.* 19 [3], Seite 463-479.

Ravagnan, L.; Roumier, T. und Kroemer, G. (2002): Mitochondria, the killer organelles and their weapons, *J.Cell Physiol* 192 [2], Seite 131-137.

Renahan, A. G.; Booth, C. und Potten, C. S. (2001): What is apoptosis, and why is it important?, *BMJ* 322 [7301], Seite 1536-1538.

Ring, A.; Weiser, J. N. und Tuomanen, E. I. (1998): Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway, *J.Clin.Invest* 102 [2], Seite 347-360.

Rizzuto, R.; Pinton, P.; Ferrari, D.; Chami, M.; Szabadkai, G.; Magalhaes, P. J.; Di Virgilio, F. und Pozzan, T. (2003): Calcium and apoptosis: facts and hypotheses, *Oncogene* 22 [53], Seite 8619-8627.

Roberts, L. R.; Adjei, P. N. und Gores, G. J. (1999): Cathepsins as effector proteases in hepatocyte apoptosis, *Cell Biochem.Biophys.* 30 [1], Seite 71-88.

Rosenow, C.; Ryan, P.; Weiser, J. N.; Johnson, S.; Fontan, P.; Ortqvist, A. und Masure, H. R. (1997): Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*, *Mol.Microbiol.* 25 [5], Seite 819-829.

Roy, S. und Nicholson, D. W. (2000): Cross-talk in cell death signaling, *J.Exp.Med.* 192 [8], Seite F21-F25.

Rubin, L. L. und Staddon, J. M. (1999): The cell biology of the blood-brain barrier, *Annu.Rev.Neurosci.* 22, Seite 11-28.

Rubins, J. B.; Duane, P. G.; Clawson, D.; Charboneau, D.; Young, J. und Niewoehner, D. E. (1993): Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells, *Infect.Immun.* 61 [4], Seite 1352-1358.

Ruckdeschel, K.; Harb, S.; Roggenkamp, A.; Hornef, M.; Zumbihl, R.; Kohler, S.; Heesemann, J. und Rouot, B. (1998): *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production, *J.Exp.Med.* 187 [7], Seite 1069-1079.

Sakahira, H.; Enari, M. und Nagata, S. (1998): Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, *Nature* 391 [6662], Seite 96-99.

Savill, J. (2000): Apoptosis in resolution of inflammation, *Kidney Blood Press Res.* 23 [3-5], Seite 173-174.

Schreiber W und Mathys FK (1986): *Infectio - Ansteckende Krankheiten in der Geschichte der Medizin*, 1. Auflage, Editiones Roche, F.Hoffmann – La Roche & Co. AG, Basel, Seite 113-115

Schuchat, A.; Robinson, K.; Wenger, J. D.; Harrison, L. H.; Farley, M.; Reingold, A. L.; Lefkowitz, L. und Perkins, B. A. (1997): Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team, *N.Engl.J.Med.* 337 [14], Seite 970-976.

Schulz, A. (1977): A reliable method of preparing undecalcified human bone biopsies for electron microscopic investigation, *Microsc.Acta* 80 [1], Seite 7-18.

Sgonc, R. und Gruber, J. (1998): Apoptosis detection: an overview, *Exp.Gerontol.* 33 [6], Seite 525-533.

Sharief, M. K.; Ciardi, M. und Thompson, E. J. (1992): Blood-brain barrier damage in patients with bacterial meningitis: association with tumor necrosis factor-alpha but not interleukin-1 beta, *J.Infect.Dis.* 166 [2], Seite 350-358.

Siegel, R. M.; Frederiksen, J. K.; Zacharias, D. A.; Chan, F. K.; Johnson, M.; Lynch, D.; Tsien, R. Y. und Lenardo, M. J. (2000): Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations, *Science* 288 [5475], Seite 2354-2357.

Smolewski, P.; Darzynkiewicz, Z. und Robak, T. (2003): Caspase-mediated cell death in hematological malignancies: theoretical considerations, methods of assessment, and clinical implications, *Leuk.Lymphoma* 44 [7], Seite 1089-1104.

Stahel, P. F. und Barnum, S. R. (1997): Bacterial meningitis: complement gene expression in the central nervous system, *Immunopharmacology* 38 [1-2], Seite 65-72.

Stahelin, B. J.; Marti, U.; Solioz, M.; Zimmermann, H. und Reichen, J. (1998): False positive staining in the TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by endogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate, *Mol.Pathol.* 51 [4], Seite 204-208.

Stanek, R. J. und Mufson, M. A. (1999): A 20-year epidemiological study of pneumococcal meningitis, *Clin.Infect.Dis.* 28 [6], Seite 1265-1272.

Strasser, A.; O'Connor, L. und Dixit, V. M. (2000): Apoptosis signaling, *Annu.Rev.Biochem.* 69, Seite 217-245.

Susin, S. A.; Lorenzo, H. K.; Zamzami, N.; Marzo, I.; Snow, B. E.; Brothers, G. M.; Mangion, J.; Jacotot, E.; Costantini, P.; Loeffler, M.; Larochette, N.; Goodlett, D. R.; Aebersold, R.; Siderovski, D. P.; Penninger, J. M. und Kroemer, G. (1999): Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature* 397 [6718], Seite 441-446.

Takahashi, A.; Camacho, P.; Lechleiter, J. D. und Herman, B. (1999): Measurement of intracellular calcium, *Physiol Rev.* 79 [4], Seite 1089-1125. URL: PM:10508230

Tauber, M. G. und Moser, B. (1999): Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications, *Clin.Infect.Dis.* 28 [1], Seite 1-11.

Thornberry, N. A.; Bull, H. G.; Calaycay, J. R.; Chapman, K. T.; Howard, A. D.; Kostura, M. J.; Miller, D. K.; Molineaux, S. M.; Weidner, J. R.; Aunins, J. und . (1992): A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes, *Nature* 356 [6372], Seite 768-774.

Tomasz, A. und Saukkonen, K. (1989): The nature of cell wall-derived inflammatory components of pneumococci, *Pediatr.Infect.Dis.J.* 8 [12], Seite 902-903.

Tsao, N.; Chang, W. W.; Liu, C. C. und Lei, H. Y. (2002): Development of hematogenous pneumococcal meningitis in adult mice: the role of TNF-alpha, *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 32 [2], Seite 133-140.

Tuomanen, E.; Liu, H.; Hengstler, B.; Zak, O. und Tomasz, A. (1985): The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall, *J.Infect.Dis.* 151 [5], Seite 859-868.

Tuomanen, E. (1996): Entry of pathogens into the central nervous system, *FEMS Microbiol.Rev.* 18 [4], Seite 289-299.

Turett, G. S.; Blum, S. und Telzak, E. E. (2001): Recurrent pneumococcal bacteremia: risk factors and outcomes, *Arch.Intern.Med.* 161 [17], Seite 2141-2144.

van Furth, A. M.; Roord, J. J. und van Furth, R. (1996): Roles of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathophysiology of bacterial meningitis and effect of adjunctive therapy, *Infect.Immun.* 64 [12], Seite 4883-4890.

van Gurp, M.; Festjens, N.; van Loo, G.; Saelens, X. und Vandenabeele, P. (2003): Mitochondrial intermembrane proteins in cell death, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 304 [3], Seite 487-497.

Wang, K. K. (2000): Calpain and caspase: can you tell the difference?, *Trends Neurosci.* 23 [1], Seite 20-26.

Wang, X.; Yang, C.; Chai, J.; Shi, Y. und Xue, D. (2002): Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*, *Science* 298 [5598], Seite 1587-1592.

Wispelwey, B.; Lesse, A. J.; Hansen, E. J. und Scheld, W. M. (1988): Haemophilus influenzae lipopolysaccharide-induced blood brain barrier permeability during experimental meningitis in the rat, *J.Clin.Invest* 82 [4], Seite 1339-1346.

Wizemann, T. M.; Heinrichs, J. H.; Adamou, J. E.; Erwin, A. L.; Kunsch, C.; Choi, G. H.; Barash, S. C.; Rosen, C. A.; Masure, H. R.; Tuomanen, E.; Gayle, A.; Brewah, Y. A.; Walsh, W.; Barren, P.; Lathigra, R.; Hanson, M.; Langermann, S.; Johnson, S. und Koenig, S. (2001): Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection, *Infect.Immun.* 69 [3], Seite 1593-1598.

Wright, S. C.; Schellenberger, U.; Wang, H.; Kinder, D. H.; Talhouk, J. W. und Larrick, J. W. (1997): Activation of CPP32-like proteases is not sufficient to trigger apoptosis: inhibition of apoptosis by agents that suppress activation of AP24, but not CPP32-like activity, *J.Exp.Med.* 186 [7], Seite 1107-1117.

Wyllie, A. H. (1997): Apoptosis: an overview, *Br.Med.Bull.* 53 [3], Seite 451-465.

Xiang, J.; Chao, D. T. und Korsmeyer, S. J. (1996): BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 [25], Seite 14559-14563.

Zamzami, N.; Susin, S. A.; Marchetti, P.; Hirsch, T.; Gomez-Monterrey, I.; Castedo, M. und Kroemer, G. (1996): Mitochondrial control of nuclear apoptosis, *J.Exp.Med.* 183 [4], Seite 1533-1544.

Zhang, X.; Chen, J.; Graham, S. H.; Du, L.; Kochanek, P. M.; Draviam, R.; Guo, F.; Nathaniel, P. D.; Szabo, C.; Watkins, S. C. und Clark, R. S. (2002): Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite, *J.Neurochem.* 82 [1], Seite 181-191.



Zhu, C.; Qiu, L.; Wang, X.; Hallin, U.; Cande, C.; Kroemer, G.; Hagberg, H. und Blomgren, K. (2003): Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain, *J.Neurochem.* 86 [2], Seite 306-317.

Zychlinsky, A. und Sansonetti, P. (1997): Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis, *J.Clin.Invest* 100 [3], Seite 493-495.

Zysk, G.; Bruck, W.; Gerber, J.; Bruck, Y.; Prange, H. W. und Nau, R. (1996): Anti-inflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis, *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 55 [6], Seite 722-728.

## 7 ANHANG

### Abkürzungsverzeichnis

AFC	Aminotrifluoromethylcoumarin
AIDS	<i>Aquired immune deficiency syndrome</i>
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
AMC	Aminomethylcoumarin
AO	Acridinorange
Apaf-1	<i>Apoptosis activating protease-1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA-AM	<i>Bis-ethyleneglycol-tetraacetic acid tetraacetoxymethyl ester</i>
bcl-2	<i>B cell lymphoma/leukemia-2</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CbpA	<i>Choline-binding protein A</i>
cfu/ml	<i>colony forming units pro ml</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DIABLO	<i>Direct IAP binding protein with low pl (=Smac)</i>
Cyt c	Cytochrom c
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EB	Ethidiumbromid
ECGF	<i>Endothelial cell growth factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
Endo G	Endonuklease G
FKS	Fötales Kälberserum
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>

ICE	<i>Interleukin-1<math>\beta</math> converting enzyme</i>
Ig	Immunglobulin
IL-1	Interleukin-1
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
min	Minuten
MW	<i>Molecular weight</i>
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
OD	Optische Dichte
PAF	<i>Platelet activating factor</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Smac	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases (= DIABLO)</i>
Stauro	Staurosporin
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TUNEL	<i>Tdt mediated dUTP Nick End Labeling</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
zVAD-fmk	<i>z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone</i>

## **Danksagung**

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jörg Weber für die fachliche und persönliche Unterstützung sowie für die Möglichkeit, in der ebenso engagierten wie freundschaftlichen Atmosphäre der Arbeitsgruppe zu forschen und die Ergebnisse auf Fachkongressen zu präsentieren.

Besonderen Dank schulde ich meiner Betreuerin Frau Dr. Dorette Freyer, deren methodische Anleitung, wissenschaftlicher Rat und Motivation eine unschätzbare Hilfe für mich waren.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Experimentellen Neurologie, die mich bereitwillig und tatkräftig unterstützt haben, allen voran Renate Gusinda, Claudia Muselmann und Émilie Dagand. Sie haben durch viele Hilfestellungen und eine gute Arbeitsatmosphäre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Daniela BERPohl danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und zahlreiche fruchtbare Diskussionen.

Ich danke den wissenschaftlichen Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Ingo Bechmann vom Institut für Anatomie der Charité Berlin für die Hilfestellung bei den Elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie Frau Prof. Elaine Tuomanen vom Department of Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA für die Überlassung der Pneumokokkenmutanten.

Meinem Freund Gabor Petzold danke ich für die Korrektur des Manuskripts und seine liebevolle Unterstützung.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken, deren materielle und ideelle Unterstützung die Entstehung dieser Arbeit möglich gemacht hat. Ihnen widme ich diese Arbeit.

## Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

Isaev NK, Stelmashook EV, **Halle A**, Harms C, Lautenschlager M, Weih M, Dirnagl U, Victorov IV, Zorov DB (2000) Inhibition of Na(+),K(+)-ATPase activity in cultured rat cerebellar granule cells prevents the onset of apoptosis induced by low potassium. *Neurosci Lett* 283: 41-44.

Braun JS, Novak R, Murray PJ, Eischen CM, Susin SA, Kroemer G, **Halle A**, Weber JR, Tuomanen EI, Cleveland JL (2001) Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus. *J Infect Dis* 184: 1300-1309.

### Kongreßbeiträge

**Halle A**, Stenke D, Freyer D, Schumann RR, Dirnagl U, Angstwurm K, Braun JS, Weber JR. (2000) Pneumococci induce apoptosis in primary brain microvascular endothelial cells via two different pathways. *Soc Neurosci Abstr* Society for Neuroscience Meeting, New Orleans, USA.

Stenke D, **Halle A**, Freyer D, Dagand E, Angstwurm K, Braun JS, Weber JR. (2001) Pneumococcal cell wall components induce apoptosis in brain microvascular endothelial cells via a caspase-3 and -8 dependent pathway. *Soc Neurosci Abstr* Society for Neuroscience Meeting, San Diego, USA.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Annett Halle  
Geburtsdatum und -ort: 08. Februar 1976 in Berlin

### **Schulbildung**

1984 – 1995 Musisches Gymnasium Georg Friedrich Händel  
Berlin-Friedrichshain (Abitur, Note: 1,3)

### **Hochschulausbildung**

1996 – 1998 Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin  
1998 – 2003 Studium der Medizin an der Humboldt-Universität Berlin  
2000 Beginn des experimentellen Teils der Dissertation in der AG Prof.  
J.R. Weber, Neurologische Klinik und Institut für Experimentelle  
Neurologie, Charité, Berlin  
2001 Auslandssemester als ERASMUS-Stipendiatin  
Medizinische Fakultät der Università degli Studi di Padova, Italien  
2003 Ärztliche Prüfung, Berlin (Gesamtnote: 1,4)

### **Praktische Berufserfahrung**

2002 – 2003 Praktisches Jahr  
Chirurgie: Charité Berlin, Campus Virchow-Klinikum  
Innere Medizin: St. Hedwig-Krankenhaus, Berlin  
Innere Medizin: UCSD, San Diego, USA  
Neurologie: Charité Berlin, Campus Mitte  
  
Seit 2003 Tätigkeit als ÄiP an der Neurologischen Klinik und im Institut für  
Experimentelle Neurologie Charité, Berlin

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Annett Halle, an Eides statt, daß die vorliegende Dissertationsarbeit von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde.

Die benutzten Hilfsmittel und die verwendete Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 20.06.2004

Annett Halle