

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

DISSERTATION

**Die Rolle der MAP-Kinasen bei der  
Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jasmin Strackharn

aus Reinbek

Gutachter/in:       1. Priv.-Doz. Dr. med. J. Braun  
                          2. Prof. Dr. med. A. Fontana  
                          3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H. Fan

Datum der Promotion: 04.02.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Akute bakterielle Meningitis.....	1
1.2. Meningitis und Neuronenschädigung durch <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	2
1.3. Programmierter Zelltod - Apoptose .....	7
1.4. MAP-Kinasen und Apoptose .....	13
1.5. Fragestellung und Zielsetzung .....	17
<b>2. Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1. Bakterienkulturen.....	19
2.2. Kulturen primärer Kortexneurone.....	20
2.3. Stimulationsversuche.....	22
2.4. Western Blots.....	23
2.5. Zelltod-Assays zur Quantifizierung von Apoptose.....	27
2.6. Messung von intraneuronalem Kalzium, reaktiven Sauerstoffradikalen und mitochondrialem Membranpotential mit fluoreszierenden Farbstoffen.....	29
2.7. Angewandte statistische Verfahren.....	31
<b>3. Material und Geräte.....</b>	<b>32</b>
3.1. Material.....	32
3.2. Geräte.....	34
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
4.1. Regulation der MAP-Kinasen in primären Rattenkortexneuronen bei Stimulation mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	35
4.2. MAPK-Inhibitoren PD 98059, SB 203580 und UO 126 verzögern die Apoptose primärer Kortexneurone während der Stimulation mit <i>S. pneumoniae</i> .....	41
4.3. ELISA zur Quantifizierung der Apoptose .....	46

4.4.	MAPK-Inhibitoren PD 98059 und SB 203580 beeinflussen die Phosphorylierung von p38, p44/42 und JNK in Kortexneuronen während der Stimulation mit <i>S. pneumoniae</i> .....	47
4.5.	Untersuchung des Einflusses von Bcl-2 und Bax auf das verbesserte Überleben der mit PD/SB behandelten Neurone.....	50
4.6.	Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die Pneumokokken-induzierte Produktion intraneuronaler reaktiver Sauerstoffradikale .....	51
4.7.	Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die Pneumokokken-induzierte Zunahme von intraneuronalem Kalzium.....	54
4.8.	Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die Pneumokokken-induzierte Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ .....	56
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>59</b>
5.1.	Pneumokokken-Stimulation von Kortexneuronen beeinflusst konzentrations- und zeitabhängig deren MAPK-Phosphorylierung .....	60
5.2.	Verzögerung der Apoptose Pneumokokken-stimulierter Kortexneurone durch MAPK-Inhibitoren .....	64
5.3.	Dephosphorylierung von p38 und p44/42 durch SB 203590 und PD 98059 bei erhaltener Phosphorylierung von JNK .....	68
5.4.	Verzögerte Phosphorylierung von p44/42 und p38 und fehlende Dephosphorylierung von JNK durch die <i>S. pneumoniae</i> -Doppelmutante <i>spxB/plnA</i> <sup>-</sup> .....	69
5.5.	Kein Effekt auf die Expression von Bax und Bcl-2 im Zytosol durch MAPK-Inhibition ..	70
5.6.	MAPK-Inhibition führt zu einer verminderten Generierung reaktiver Sauerstoffradikale.....	72
5.7.	MAPK-Inhibition reduziert den Anstieg des intrazellulären Kalziums .....	74
5.8.	MAPK-Inhibition führt zu einer verminderten Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials .....	76
5.9.	Mechanistische Betrachtung der MAP-Kinase-induzierten Apoptose Pneumokokken-stimulierter Kortexneurone .....	78
5.10.	Medizinische Relevanz und Ausblick .....	82
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>82</b>



<b>7. Literatur.....</b>	<b>84</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>97</b>
8.1. Abkürzungsverzeichnis .....	97
8.2. Danksagung.....	99
8.3. Lebenslauf.....	100
8.4. Eidstattliche Erklärung.....	101

# 1. Einleitung

## 1.1. Akute bakterielle Meningitis

Die bakterielle Meningitis galt lange Zeit als eine tödliche, unheilbare Erkrankung. Erste Therapieerfolge wurden Anfang des 20. Jahrhunderts mit einer intrathekalen und intravenösen Gabe von spezifischen Pferde-Antisera und nach Einführung der antiinfektiven Therapie mit Sulfonamiden und Chloramphenicol beobachtet - jedoch nur bei der *Neisseria meningitidis*- und *Haemophilus influenzae*-Meningitis, während der Erfolg der Behandlung einer *Streptococcus pneumoniae*-Meningitis ausblieb. Der eigentliche Durchbruch in der Therapie der Pneumokokken-Meningitis gelang Mitte der vierziger Jahre mit der Einführung des Penicillins (Flexner, 1913; Dowling *et al.*, 1949). Dennoch weist die Pneumokokken-Meningitis auch heute noch - trotz des Einsatzes neuerer Penicillin-Abkömmlinge und trotz aller intensivmedizinischer Maßnahmen - eine sehr hohe Sterblichkeit von ca. 20-30% auf. Sie hat damit die schlechteste Prognose aller akuten bakteriellen Meningitiden. Gleichzeitig ist sie seit der Einführung der Impfung gegen *H. influenzae* Typ B mit einem Anteil von ca. einem Drittel die am häufigsten auftretende ambulant erworbene bakterielle Meningitis bei Erwachsenen und Kindern (Schuchat *et al.*, 1997; van de Beek *et al.*, 2004; Weisfelt *et al.*, 2006).

Ein zusätzliches Problem stellt die hohe neurologische Morbidität nach akuter bakterieller Meningitis dar, von der über die Hälfte der Überlebenden betroffen ist. Hier sind insbesondere epileptische Anfälle, Hörverlust, kognitive Störungen und Paresen zu nennen (Durand *et al.*, 1993; Kastenbauer und Pfister, 2003; Weisfeld *et al.*, 2006; van de Beek *et al.*, 2002).

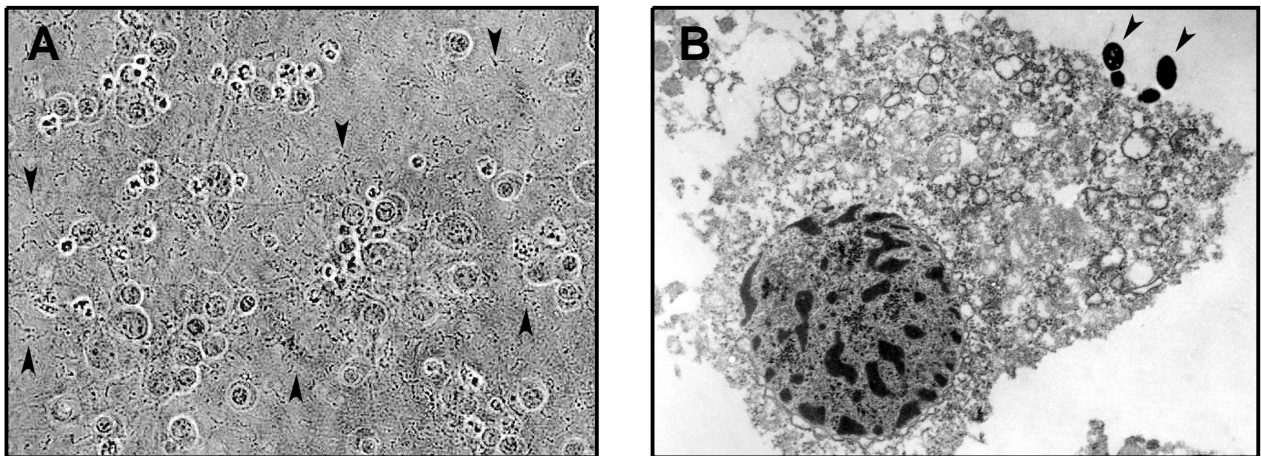
Diese schlechte Prognose der Pneumokokken-Meningitis liegt zum einen an der hohen Virulenz von *S. pneumoniae*. Außerdem trägt die weltweit zunehmende Antiinfektivaresistenz der Bakterienstämme dazu bei (Tan, 2003). Auf der anderen Seite kann gerade der unter Antiinfektivtherapie stattfindende bakterielle Zerfall mit Freisetzung hochinflammatorischer Zellwandbestandteile eine Immunreaktion des Körpers in Gang setzen, die zur Störung der Blut-Hirn-Schranke, Zunahme des Hirnödems und Schädigung des ZNS führt (Tuomanen *et al.*, 1985). Die immunsupprimierende adjuvante Therapie mit Dexamethason kann die Mortalität und Rate neurologischer Defektzustände senken (van de Beek *et al.*, 2007), allerdings stellt dies eine sehr unspezifische Therapie dar. So wird zwar durch Dexamethason die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke verringert, gleichzeitig aber auch der Durchtritt von Antiinfektiva ins ZNS

erschwert (Paris *et al.*, 1994). Im Tiermodell konnte durch Dexamethason eine Zunahme der hippocampalen Apoptose und kognitiver Defizite beobachtet werden (Leib *et al.*, 2003).

Entscheidend scheint daher in der Therapie der Pneumokokken-Meningitis die Entwicklung neuer adjuvanter Medikamente, welche spezifisch die Schadensmechanismen hemmen, die durch das Immunabwehrsystem oder durch das Bakterium selbst ausgelöst werden.

## 1.2. Meningitis und Neuronenschädigung durch *Streptococcus pneumoniae*

### 1.2.1 Eigenschaften von *Streptococcus pneumoniae*

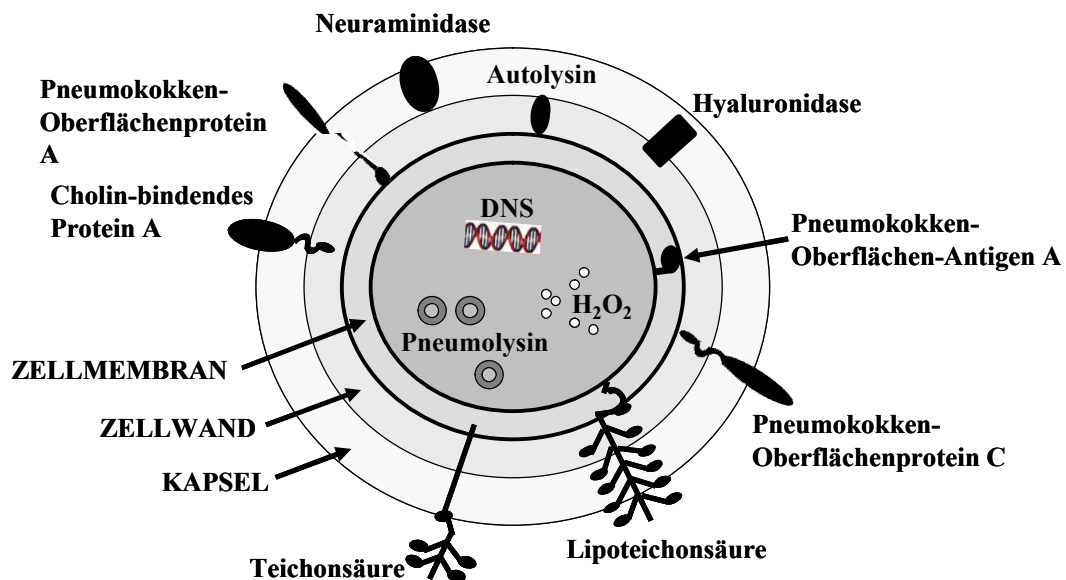


**Abbildung 1: Neuronen mit Pneumokokken (Pfeile).** A) Phasenkontrast-lichtmikroskopische Aufnahme. B) Elektronenmikroskopische Aufnahme.

*S. pneumoniae* ist ein grampositives, rund-oval bis lanzettförmiges Bakterium mit einer Größe von 0,5 - 1,25  $\mu\text{m}$  und gehört zur Gruppe der  $\alpha$ -hämolyisierenden Streptokokken (Abbildung 1). Die frühere Bezeichnung „*Diplococcus pneumoniae*“ bringt zum Ausdruck, dass es oft paarweise gelagert ist. Die Bakterien sind von einer Polysaccharidkapsel umgeben, die sie vor Phagozytose durch Granulozyten schützt und eine Bindung von Antikörpern und Komplementfaktoren an innere Strukturen verhindert (Hollingshead und Briles, 1991). Es existieren auch ungekapselte Stämme, die jedoch als nicht humanpathogen gelten.

## Virulenzfaktoren

Neben der Polysaccharidkapsel sind weitere Proteine entscheidend an der Pathogenität beteiligt (Abbildung 2). Pneumokokken produzieren zwei Exotoxine, das Enzym Pneumolysin und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). In der Zellwand befinden sich Enzyme wie Neuraminidase und Hyaluronidase sowie virulenzvermittelnde Proteine wie Cholin-bindende Proteine (CbP), das Pneumokokken-Oberflächenprotein A (Pneumococcal-surface protein A, PspA), das Pneumokokken-Oberflächen-Antigen A (Pneumococcal-surface antigen A, PsaA) und das Enzym Autolysin. Außerdem ist die Zellwand selbst ein wichtiger Virulenzfaktor; bei Lyse der Bakterien werden aus ihr Peptidoglykane, Teichon- und Lipoteichonsäuren freigesetzt, die wesentlich zur Stimulation des Immunsystems des Wirtes beitragen (Tuomanen *et al.*, 1986).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Aufbaus und der Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*.

Die DNS sowie Exotoxine befinden sich im Zytoplasma, das von einer Zellwand umgeben ist. Diese ist wiederum von einer Polysaccharidkapsel umgeben. Verschiedene Virulanzfaktoren befinden sich in der Zellwand und werden bei Lyse des Bakteriums aus ihr freigesetzt.

**Pneumolysin.** Es handelt sich um ein porenbildendes 53kD Protein, das sich im Zytoplasma von *S. pneumoniae* befindet. Es wird nicht sezerniert, sondern während des Wachstums und bei der Lyse des Bakteriums freigesetzt (Walker *et al.*, 1987). Hierfür ist das Enzym Autolysin entschei-

dend, das z. B. bei Nährstoffmangel oder unter Antiinfektivabehandlung aktiviert wird und durch Degradierung des Peptidoglykans und der Teichonsäure in der Zellwand zur Autolyse der Bakterienzelle führt. Dadurch können proinflammatorische Zellwandbestandteile und das Exotoxin Pneumolysin freigesetzt werden (Johnson, 1977). Pneumolysin bindet am Cholesterol eukaryoter Zellmembranen und bewirkt eine Porenbildung und konsekutive Lyse der Zellen. Niedrigere Konzentrationen, die besonders im Anfangsstadium der Infektion freigesetzt werden, sind in der Lage, über die Aktivierung von Komplementfaktoren proinflammatorische Reaktionen in Abwehrzellen zu induzieren (Boulnois *et al.*, 1991). Außerdem können apoptotische Prozesse ausgelöst werden, auf die in dieser Arbeit näher eingegangen werden wird (Braun *et al.*, 2002).

Pneumolysin wird von allen Pneumokokken-Serotypen gebildet und ist essentiell für ihre Virulenz, denn Pneumolysin-defiziente Pneumokokken-Mutanten zeigen eine stark verminderte Pathogenität. Pneumolysin-defiziente Stämme lösten in Mäusen nur eine abgeschwächte Meningitis aus und waren in einem Zellkulturmodell nicht in der Lage, die Endothelzellbarriere zu überwinden (Wellmer *et al.*, 2002; Zysk *et al.*, 2001).

**Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ).** Da *S. pneumoniae* das Enzym Katalase fehlt, kann es sein Stoffwechselprodukt Wasserstoffperoxid nicht abbauen (Avery und Morgan, 1924). Pneumokokken produzieren ähnlich große Mengen  $H_2O_2$ , wie auch von aktivierten neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden, von denen bekannt ist, dass sie toxische Effekte aufgrund ihrer  $H_2O_2$ -Produktion besitzen (Duane *et al.*, 1993). Unter intravenöser Verabreichung von Katalase konnte bei Ratten mit einer experimentell induzierten Pneumokokken-Meningitis der Anstieg des zerebralen Blutflusses sowie des intrakraniellen Druckes reduziert werden (Pfister *et al.*, 1992).  $H_2O_2$  kann durch Zellmembranen diffundieren und intrazellulär durch Oxidation Mitochondrien und DNA schädigen (Cochrane, 1991). Bei der Pneumokokken-Meningitis führt es zu einer Freisetzung von Sauerstoffradikalen, Kalzium und AIF (Apoptosis-inducing factor) und kann so die Apoptose von Zellen induzieren (Braun *et al.*, 2001).

### **1.2.2. Pathogenese der Pneumokokken-Meningitis**

Infektionen des ZNS durch *S. pneumoniae* gehen meist von lokalen Infektionen wie einer Otitis media oder einer Sinusitis oder von einer Invasion der nasopharyngealen Mukosa mit konsekutiver hämatogener Streuung aus. Eine Immunschwächung z. B. durch Virusinfektionen, Asplenie, chronische Krankheiten oder höheres Lebensalter prädisponiert zur Ausbreitung des Bakteriums.

An der Besiedlung und Invasion der Mukosa des Nasopharynx ist das CbpA (Cholin-bindendes Protein) der Pneumokokken-Zellwand wesentlich beteiligt (Gosink *et al.*, 2000). Nach Erreichen des Blutkreislaufs bieten die Polysaccharidkapsel und die bakteriellen Oberflächenproteine PspA und PspC als Komplementinhibitoren Schutz vor wirtseigenen Abwehrmechanismen. Pneumolysin kann zu Komplementverbrauch fernab vom eigentlichen Infektionsgeschehen führen (Koedel *et al.*, 2002).

Um in den Liquorraum zu gelangen, müssen Pneumokokken die Blut-Hirn-Schranke zerebraler Kapillaren oder die Blut-Liquor-Schranke am Plexus choroideus der Ventrikel überwinden. Bisherige Tierexperimente sprechen eher für eine Invasion über die Blut-Hirn-Schranke, wo der unspezifische Transport stark eingeschränkt ist. Bei höhergradiger Bakteriämie können Pneumokokken mittels Transzytose nach Bindung an den PAF (platelet-activating factor) - Rezeptor aktivierter Endothelzellen die Zelle in einer Vakuole passieren (Koedel *et al.*, 2002; Ring *et al.*, 1998). Im Liquorraum herrscht ein Mangel an Komplementfaktoren, Immunglobulinen und Leukozyten, so dass Bakterien sich relativ ungestört vermehren können. Ortsständige und später auch eingewanderte Immunzellen sowie Endothelzellen selbst produzieren Zytokine und Matrixmetalloproteasen (MMPs), die zur Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke führen. Pneumokokken können außerdem Apoptose zerebraler Endothelzellen induzieren (Freyer *et al.*, 1999; Bermpohl *et al.*, 2005). Durch Freisetzung vasoaktiver Stoffe wie Endothelin und NO kommt es zusätzlich zum Versagen der zerebrovaskulären Autoregulation, und es entsteht ein vasogenes Hirnödem. Dieses bewirkt wiederum eine Abnahme des Perfusionsdruckes und eine Ischämie des Hirngewebes. Zusammen mit zytotoxischen Mediatoren wie exzitatorischen Aminosäuren wird so die Entstehung eines zytotoxischen Hirnödems und bleibender neurologischer Schäden begünstigt (Pfister *et al.*, 2000).

### ***1.2.3. Pathophysiologie der neuronalen Schädigung***

Obwohl die Meningitis primär eine Erkrankung der Hirnhäute ist, ist sie bei weitem nicht auf diese beschränkt. Auch Ependym-, Glia- und intrazerebrale Gefäßzellen sowie Neurone sind bei der Erkrankung mitbetroffen. Es ist bekannt, dass insbesondere die Apoptose von Neuronen im Hippokampus wesentlich zu den Komplikationen und bleibenden Schäden nach Pneumokokken-Meningitis beiträgt (Zysk *et al.*, 1996; Nau *et al.*, 1999). Verantwortlich für diese Prozesse sind zum einen das wirtseigene Immunabwehrsystem, zum anderen *S. pneumoniae* und seine Bestandteile selbst (Braun und Tuomanen, 1999).

### **Schädigung durch das wirtseigene Immunabwehrsystem**

Pneumokokken setzen während ihrer Vermehrung und nach Lyse hochinflammatorische subzelluläre Komponenten frei. Hierzu gehören Peptidoglykan, Lipoteichonsäure, bakterielle DNS sowie die beiden Exotoxine Pneumolysin und  $H_2O_2$ . Diese aktivieren verschiedene, sogenannte Toll-like-Rezeptoren (TLR) und rufen so eine Inflammationsreaktion mit Produktion inflammatorischer Chemokine und Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 hervor. TNF- $\alpha$  ist hierbei nicht nur ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr, sondern teilweise auch an der neuronalen Apoptose im Hippokampus beteiligt (Koedel *et al.*, 2002; Braun *et al.*, 1999).

Schließlich führen diese Entzündungsvermittler zur Entstehung niedermolekularer Mediatoren wie reaktiver Sauerstoffradikale (reactive oxygen species, ROS), reaktiver Stickstoffmetabolite und exzitatorischer Aminosäuren, die als finale Effektormoleküle auch das Hirngewebe schädigen. ROS wie z. B. Wasserstoffperoxid, Superoxid- und Hydroxylradikale können Zellen durch Oxidation von Membranphospholipiden, Nukleinsäuren und Proteinen schädigen. Das Gehirn ist aufgrund einer hohen Sauerstoffspannung, vieler ungesättigter Fettsäuren an den Lipidmembranen und eines relativ niedrigen Gehaltes an endogenen Antioxidanzien besonders empfindlich für oxidative Schädigungen. In Neuronen des Hippokampus induzieren ROS einen apoptotischen, in Kortexneuronen hingegen einen nekrotischen Zelltod. Die Anwendung freier Radikalfänger konnte die Höhe der neuronalen Apoptose und Nekrose im Tiermodell der Meningitis signifikant verringern (Leib *et al.*, 1996).

### **Schädigung durch direkte Faktoren von *S. pneumoniae***

In einem Tiermodell der Pneumokokken-Meningitis konnte eine Blockierung der Leukozytenmigration in den Liquor und die Verwendung von Apoptoseverhindernden Caspasen-Inhibitoren die Apoptose von Neuronen des Gyrus dentatus nur teilweise verhindern (Braun *et al.*, 1999). Dies weist darauf hin, dass weitere Mechanismen an der Auslösung der Apoptose während der Pneumokokken-Meningitis beteiligt sind.

Zwar penetrieren die Bakterien meist nicht aus dem Liquor in die Gehirnsubstanz, sie akkumulieren aber in den Seitenventrikeln. Von hier können lösliche Toxine in die Extrazellulärsubstanz des eng benachbarten Hippokampus diffundieren. Im Tierversuch konnten hier immunhistochemisch hohe Level von Pneumolysin nach Pneumokokken-Infektion nachgewiesen werden (Braun *et al.*, 2001; Nau *et al.*, 1999). Lebende Pneumokokken können *in vitro* direkt eine Apoptose von Neuronen und Mikrogliazellen auslösen. Als wichtigste Apoptose-induzierende Mediatoren konnten hier die Exotoxine Pneumolysin und  $H_2O_2$  identifiziert wer-

den. Diese Apoptose ist jedoch nicht durch die typische Aktivierung von Caspasen gekennzeichnet (Braun *et al.*, 2002). Im folgenden Kapitel sollen zunächst allgemein die verschiedenen Formen und die Regulation der Apoptose erläutert werden sowie dann speziell auf die Pneumokokken-induzierte Apoptose eingegangen werden.

### **1.3. Programmierter Zelltod - Apoptose**

Απόπτωση - in Anlehnung an dieses altgriechische Wort, das das Herunterfallen von Blättern vom Baum beschreibt, wurde der durch ein genetisch determiniertes Selbstmordprogramm ausgelöste Zelltod benannt. Bereits Galen von Pergamon (129-203 nach Christus) erkannte einen koordinierten Zelluntergang im Rahmen der Embryonalentwicklung. Die Apoptose ist als funktioneller Gegenpol zur Mitose in der Embryonalentwicklung und zur Aufrechterhaltung der Homöostase von Organismen essentiell. Sie sorgt für die Atrophie und Involution von Geweben und wirkt der Entwicklung von Neoplasien entgegen.

#### ***1.3.1. Morphologie und Pathophysiologie der Apoptose***

Die Apoptose ist ein geplanter, aktiver und energieverbrauchender Zelltod. Die Nekrose hingegen ist ein durch verschiedene Noxen ausgelöster passiver Zelltod, der auf einer Energiedepression beruht. Ionenverschiebungen führen hierbei zum Anschwellen und zur Rupturierung der Zelle sowie zu einer begleitenden Entzündungsreaktion (Barros *et al.*, 2001).

Bei der Apoptose beobachtet man zunächst eine Kondensation des Chromatins, gefolgt vom Schrumpfen der Zelle. Es zeigen sich Ausstülpungen der Zellmembran (membrane blebbing), und es werden membranumschlossene Vesikel („apoptotic bodies“) abgeschnürt (Earnshaw, 1995; Kerr *et al.*, 1972). Die Zellmembran bleibt intakt, verliert aber ihre charakteristische Asymmetrie, indem eine Translokation von Phosphatidylserin von ihrer Innen- auf die Außenseite erfolgt. Benachbarte phagozytierende Zellen erkennen die apoptotischen Vesikel mit Hilfe ihres Phosphatidylrezeptors und räumen sie ohne eine entzündliche Begleitreaktion ab (Fadok *et al.*, 2001).

Die Apoptose wird entweder durch Stimuli von außen (extrinsisch) oder durch zelleigene Stimuli (intrinsisch) initiiert (Abbildung 3). Klassischerweise wird letztlich eine Kaskade von Proteasen,



die Caspasen (Cystein-abhängige Aspartatproteasen), angestoßen. Dabei werden entweder über die Initiatorcaspasen 2, 8, 9 und 10 oder über das Apoptosom die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 aktiviert. Die Effektorcaspasen spalten mehr als 100 verschiedene Substrate wie z. B. Zytoskelett-proteine, DNS-Reparaturproteine, Zellzyklus-regulierende Proteine und das DNS-spaltende Protein CAD (caspase-activated deoxyribonuclease), so dass es zum Zelltod mit einer charakteristischen internukleosomalen Spaltung der DNS in Fragmente von 180 Basenpaaren bzw. ein Vielfaches davon kommt (Jin und El-Deiry, 2005).

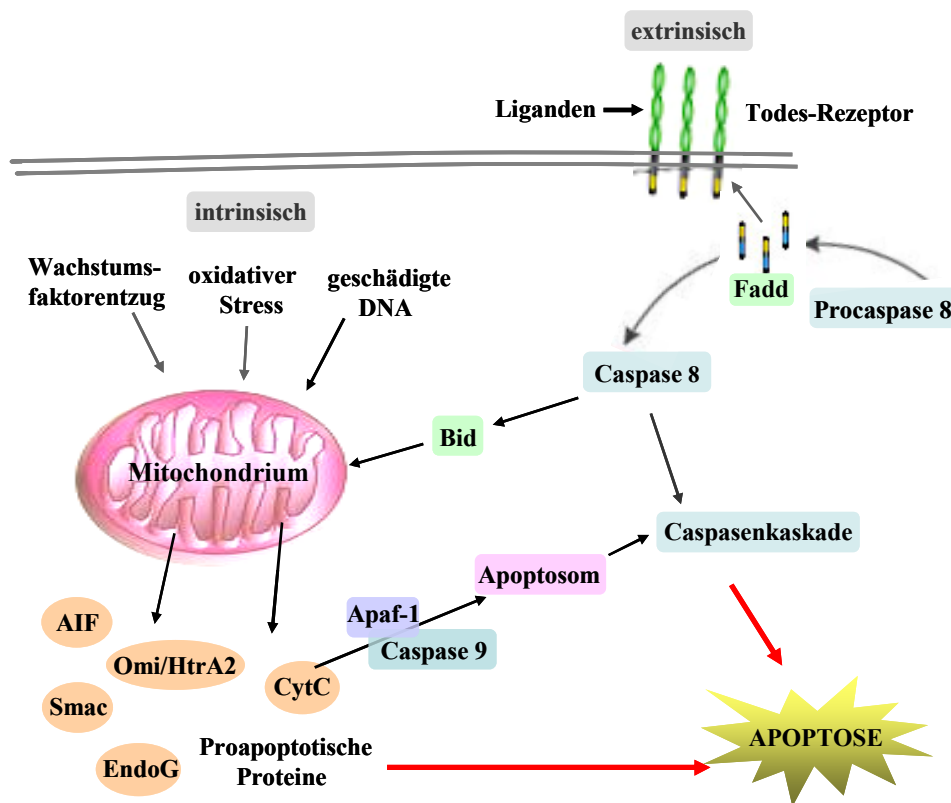


Abbildung 3: Schematische Darstellung der extrinsischen und intrinsischen Apoptose.

### Extrinsische (rezeptorvermittelte) Apoptose (Abbildung 3)

Der extrinsische Weg benötigt Zelloberflächen-Rezeptoren (sog. „Todesrezeptoren“), an die eine Reihe von extrazellulären Agonisten binden kann. Dazu gehören Rezeptoren aus der Familie der TNF- (tumor necrosis factor-) Rezeptoren (z. B. TNF-R1 und sein Ligand  $TNF\alpha$ , Fas/CD95 und der Ligand Fas-L/CD95-L und die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5). Über Adaptermoleküle wie z. B. das Protein FADD (Fas associated death domain) kann die Initiatorcaspase 8 aktiviert werden, welche dann die Aktivierung von Effektorcaspasen bewirkt. Über die Caspase 8 existiert

aber auch eine Verknüpfung zur intrinsischen Apoptose, da sie über Aktivierung des Proteins Bid (s.u.) die Integrität der Mitochondrienmembran beeinflussen kann (Luo *et al.*, 1998). Dies zeigt, dass intrinsische und extrinsische Apoptose parallel aktiviert sein und sich gegenseitig verstärken können.

Außer den Caspasen können über diese Rezeptoren auch die weiter unten näher beschriebenen MAP-Kinasen aktiviert werden, die u. a. über Transkriptionsfaktoren und Induktion bestimmter Gene die Apoptose beeinflussen (Strasser *et al.*, 2000).

### **Intrinsische (mitochondriale) Apoptose (Abbildung 3)**

Die intrinsische Apoptose ist die häufigste Form der Apoptose bei Neuronen. Geschädigte DNS, zellulärer Stress und eine Reihe von proapoptotischen Proteinen können eine Apoptose auslösen, bei der die Mitochondrien eine zentrale Rolle spielen (Stefanis, 2005).

Die Mitochondrienmatrix ist umhüllt von einer inneren und einer äußeren Membran. Im Intermembranraum stellt die Elektronentransportkette eine ungleiche Protonenverteilung her und schafft einen elektrochemischen Gradienten, das mitochondriale Membranpotential. Ein Verlust dieses Membranpotentials durch Trigger, die z. B. das Gleichgewicht von pro- und antiapoptotisch wirkenden Proteinen aus der Bcl-2-Familie stören, führt zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus dem Intermembranraum. Der bekannteste dieser Faktoren ist Cytochrom c, das zusammen mit mitochondrialen Hitzeschockproteinen (Hsps), Apaf-1, Procaspase-9 und ATP das Apoptosom bildet. Als Resultat dieser Interaktion wird Caspase-9 aktiviert, die daraufhin wieder andere Effektorcaspasen aktivieren kann (Li *et al.*, 1997). Andere apoptoseauslösende Proteine aus dem Inneren der Mitochondrienmembran sind die Antagonisten der IAPs (inhibitor of apoptosis proteins), Smac/DIABLO und HtrA2/Omi genannt. Endonuklease G und AIF (s.u.) können nach Freisetzung aus dem Intermembranraum unabhängig von Caspasen Apoptose induzieren (Jin und El-Deiry, 2005; Polster und Fiskum, 2004).

### **Regulation der mitochondrialen Apoptose durch die Bcl-2-Protein-Familie**

Die Integrität der Mitochondrienmembran wird durch das Gleichgewicht vieler verschiedener pro- und antiapoptotischer Proteine aus der Bcl-2-Familie kontrolliert. Zu den antiapoptotischen Proteinen dieser Familie gehören u. a. Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub>, zu den proapoptotischen Proteinen beispielsweise Bax und Bak sowie die sogenannten BH3-only-Proteine (Donovan und Cotter, 2004). Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit untersuchten Proteine Bax und Bcl-2 näher dargestellt werden.

**Bax.** Wird eine Zelle durch einen apoptotischen Stimulus gereizt, erfolgt eine Konformationsänderung des zytosolisch lokalisierten Bax, die von seiner Translokation und Integration in die äußere Mitochondrienmembran gefolgt ist. Hier kommt es durch Oligomerisierung mehrerer Bax-Moleküle zur Bildung eines Kanals, über den lösliche mitochondriale Proteine des Intermembranraumes ohne Zerstörung der mitochondrialen Ultrastruktur in das Zytosol freigesetzt werden können (Antonsson *et al.*, 2000 und 2001).

**Bcl-2.** Bcl-2 kann als antiapoptotisches Protein diesen Vorgängen und der Freisetzung mitochondrialer apoptoseinduzierender Proteine entgegenwirken. Es blockiert die Funktion aktivierter proapoptotischer Proteine, indem es insbesondere mit den Proteinen aus der Gruppe der BH3-only-Proteine Heterodimere bildet (Cheng *et al.*, 2001). Unabhängig von dieser Heterodimerisierung beruht die antiapoptotische Funktion von Bcl-2 auch auf einer Beeinflussung der intrazellulären Kalziumkonzentration, denn erhöhte Kalziumkonzentrationen können die Permeabilität der Mitochondrienmembran verstärken. Bcl-2 befindet sich nicht nur in der mitochondrialen, sondern auch in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), das eine kalziumspeichernde Funktion besitzt. Es kann hier eine Inositoltriphosphat- (IP<sub>3</sub>-) medierte Kalziumfreisetzung verhindern (Erin *et al.*, 2003).

### **Regulation der mitochondrialen Apoptose durch Kalzium**

Eine gestörte Kalziumhomöostase scheint bei der neuronalen Apoptose eine entscheidende Rolle zu spielen, und in zahlreichen Schadensmodellen kann ein Anstieg der intraneuronalen Kalziumkonzentration beobachtet werden (Duchen, 2000). Generell dient Kalzium als Signalbotenstoff bei sehr vielen intrazellulären Prozessen wie der Zellkontraktion, der Exozytose, der Regulation von Plasmamembrankanälen, der Genexpression und dem Zelltod (Verkhratsky und Toescu, 2003). Mitochondrien sind in der Lage, große Mengen an Kalzium abzupuffern. Treibende Kraft für die Aufnahme von Kalzium ist der durch die Atmungskette geschaffene Gradient über der Mitochondrienmembran. Eine übermäßige Kalziumakkumulation während pathologischer Zustände kann jedoch, v. a. im Zusammenhang mit anderen, die Mitochondrien schädigenden Zuständen wie oxidativem Stress oder ATP-Mangel, einen Anstieg der Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran (mitochondrial permeability transition, MPT) durch das Öffnen von Poren bewirken. Der resultierende Abfall des Mitochondrienpotentials kann nun entweder aufgrund einer Depletion an ATP einen nekrotischen Zelltod induzieren oder aufgrund einer Schwellung des Mitochondriums zum Reißen der äußeren Membran führen und einen

apoptotischen Zelltod durch Freisetzung proapoptotischer Proteine aus dem Intermembranraum einleiten (Duchen, 2000).

### **Regulation der mitochondrialen Apoptose durch reaktive Sauerstoffradikale (ROS)**

Die Senkung des mitochondrialen Potentials führt auch zur Generierung von ROS im Mitochondrium. ROS führen ihrerseits wieder zu einer Schädigung des Mitochondriums, indem sie DNS-Strangbrüche, die Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren und eine Inhibition des Elektronentransports der Atmungskette hervorrufen. Zudem führen ROS zu einer weiteren Erhöhung der Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran, und sie können wiederum die Freisetzung von Kalzium aus dem ER fördern. Das genaue Zusammenspiel der beiden Mediatoren ist noch weitgehend unverstanden (Jacobson und Duchen, 2004).

Weiterhin können ROS apoptosefördernde Cathepsine aus Lysosomen freisetzen und möglicherweise über eine Oxidation von Phosphatidylserin der Zellwand zu dessen Externalisation auf apoptotischen Zellplasmamembranen führen, was ebenfalls die Apoptose begünstigt. Außerdem sind ROS über eine Oxidation und Aktivierung volumensensitiver Chloridkanäle beteiligt an der Volumenabnahme von apoptotischen Zellen (Hail *et al.*, 2006).

### **1.3.2. Caspasen-unabhängige Apoptose**

Der programmierte Zelltod kann neben der oben beschriebenen Caspasen-abhängigen, klassischen Apoptose sehr viele unterschiedliche, apoptose- oder eher nekroseähnliche Formen annehmen. Morphologische Unterschiede bestehen z. B. in einer weniger dichten oder fehlenden Kondensierung und weniger geometrischen Anordnung des Chromatins, einer fehlenden internukleosomalen Spaltung der DNS sowie einer zeitlichen Verzögerung der Todesprozesse. Meistens werden bei diesen alternativen Zelltodprogrammen die Caspasen nicht aktiviert oder frühzeitig blockiert. Stattdessen sind hier Proteine für die Auslösung des Zelltodes verantwortlich, die bei der klassischen Apoptose auch parallel zu Caspasen aktiviert sein können oder deren Aktivierung der der Caspasen möglicherweise zeitlich nachfolgt (Leist und Jäätelä, 2001). So können andere Proteasen wie Cathepsine und Calpaine typische Substrate der Caspasen ebenfalls spalten. Bei der intrinsischen Apoptose können reaktive Sauerstoffradikale (ROS), die im Mitochondrium erzeugt wurden, Caspasen-unabhängig einen nekroseähnlichen programmierten Zelltod auslösen, der durch Antioxidanzien vermindert werden kann (Vercammen *et al.*, 1998). Auch AIF, ein Protein aus dem mitochondrialen Intermembranraum, kann Caspasen-unabhängig

Apoptose auslösen. Nach seiner Freisetzung aus dem Mitochondrium transloziert es zum Zellkern und spaltet als Endonuklease Chromatin in große Fragmente von 50 kbp, im Gegensatz zu der durch Caspasen ausgelösten oligonukleosomalen DNS-Fragmentierung (Susin *et al.*, 1999). Es ist auch bekannt, dass eine Caspasen-unabhängige Apoptose durch Aktivierung von MAP-Kinasen ausgelöst werden kann. MAP-Kinasen können über Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z. B. c-Fos und c-Jun und Bildung des AP-1-Transkriptionsfaktor-Komplexes sowie Induktion sogenannter „immediate early genes“ die Apoptose Caspasen-unabhängig beeinflussen (Sastry und Rao, 2000). So kann in verschiedenen Zelllinien eine extrinsische Apoptose nach Aktivierung des Fas-Rezeptors und des Adapterproteins Daxx ausgelöst werden, die über die JNK-Kinase-Kaskade vermittelt wird (Chang *et al.*, 1998). Auch über den TNF-Rezeptor und das Adapterprotein TRAF-2 ist eine Aktivierung der Kinasen ASK1 und JNK bekannt. Über Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun kann schließlich Apoptose eingeleitet werden (Baker und Reddy, 1998). Die MAP-Kinase p44/42 ist ebenfalls bei der Caspasen-unabhängigen Apoptose verschiedener neuronaler und nicht-neuronaler Zellen essentiell beteiligt. Neben der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren kann p44/42 auch Calpaine aktivieren und so Apoptose fördern (Subramaniam und Unsicker, 2006).

### ***1.3.3. Pneumokokken-induzierte Apoptose in Neuronen***

Die Apoptose von Neuronen im Hippokampus, die während einer Pneumokokken-Meningitis zu permanentem Zellverlust und bleibenden Schäden führt, kann durch das Verhindern der Leukozytenmigration in das ZNS oder durch den Caspasen-Inhibitor z-VAD-fmk jeweils um ca. 50% bzw. 60% reduziert werden (Braun *et al.*, 1999). Dies impliziert, dass zum einen die Entzündungsreaktion des Wirtes Apoptose induziert, die durch Caspasen vermittelt wird, zum anderen aber weitere Mechanismen existieren, die unabhängig von der Aktivierung der Caspasen zu neuronaler Apoptose führen.

Hierfür kommen direkte Effekte von *S. pneumoniae* in Frage. Die Exotoxine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Pneumolysin sind in der Lage, über eine Schädigung der Mitochondrien und Verlust des mitochondrialen Intermembranpotentials Cytochrom c und AIF in das Zytosol freizusetzen. Cytochrom c ist hier jedoch nicht in der Lage, Caspasen zu aktivieren, möglicherweise aufgrund eines nicht funktionalen Apoptosoms. Stattdessen transloziert AIF in den Zellkern und führt zu einer Apoptose, die durch eine periphere Chromatinkondensation, fehlende Kernfragmentierung und Spaltung der DNS in große 50 kbp-Fragmente gekennzeichnet ist (Braun *et al.*, 2001).

Eine Blockierung der Funktion von AIF kann im Gegensatz zum Breitband-Caspasen-Inhibitor z-VAD-fmk diese durch bakterielle Toxine ausgelöste Apoptose deutlich verringern. Der Freisetzung von AIF geht eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums sowie ROS voraus. Antioxidanzien oder die Senkung des Kalziums mit Hilfe des Chelators BAPTA-AM können die neuronale Apoptose effektiv vermindern (Braun *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002).

Ob weitere Signaltransduktionswege in Neuronen durch die Pneumokokken selbst aktiviert werden und zur Apoptose führen, ist nicht bekannt. Daher wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, inwieweit hier die Beteiligung von MAP-Kinasen eine Rolle spielt. Auf sie soll im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden.

#### **1.4. MAP-Kinasen und Apoptose**

Die MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) sind eine Familie von pleiotropen Serin/Threonin-Kinasen. Alle eukaryotischen Zellen besitzen multiple MAPK-Signalwege, die gemeinsam zelluläre Vorgänge regulieren. Man unterteilt die MAPKs in drei Subfamilien:

1. p44/42 MAPK oder auch ERK1 und 2 (extracellular signal-regulated kinases 1 und 2)
2. JNK (c-jun N-terminal kinases) oder auch SAPKs (stress-activated protein kinases)
3. p38-MAPK

Ihre Aktivierung erfolgt über mehrschrittige Signaltransduktionskaskaden, in denen zunächst eine Proteinkinase phosphoryliert wird, die nun wiederum in der Lage ist, das jeweils nachfolgende Kaskadenglied ebenfalls zu phosphorylieren und somit zu aktivieren.

Diese Kinasekaskaden können durch verschiedene Signale wie z. B. Wachstumsfaktoren, Toxine, Stress und inflammatorische Zytokine entweder über eine Interaktion mit Zelloberflächenrezeptoren oder über intrazelluläre Signale wie geschädigte DNS und oxidativen Stress aktiviert werden. Am Ende steht die Aktivierung der MAP-Kinasen, die nun ihre Substrate, zu denen v. a. Transkriptionsfaktoren, aber auch zytoplasmatische Proteine gehören, durch Phosphorylierung an Serin- und/oder Threoninresten aktivieren oder inaktivieren können. Dabei überlappen sich die MAPK-Familien teilweise in ihrer Substratspezifität. Sie sind dadurch an der Modulation von Genexpression, Immunreaktionen, Zellwachstum und -differenzierung beteiligt (Abbildung 4).

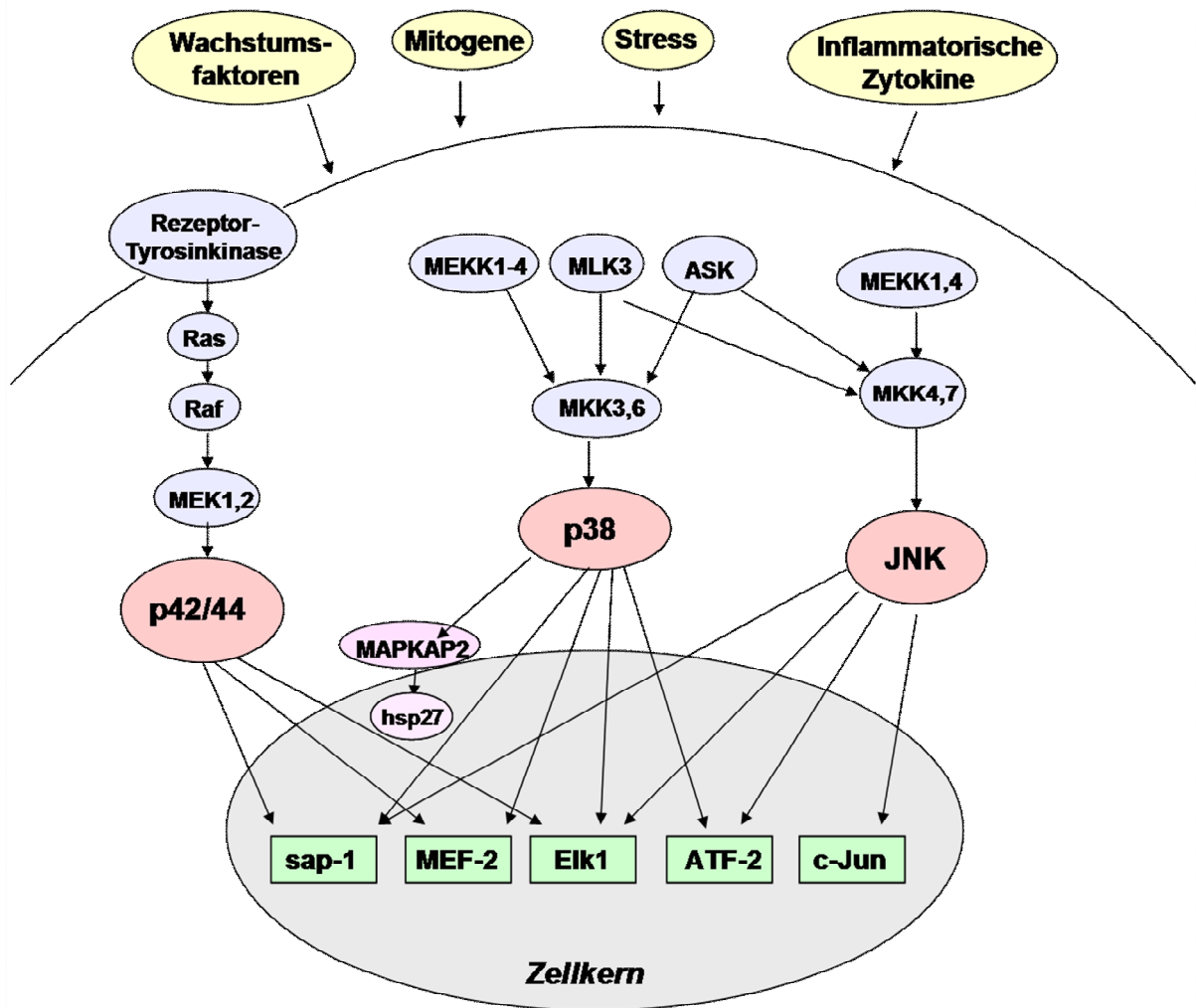


Abbildung 4: Schematische Übersicht der MAP-Kinase-Signalkaskaden.

Es ist auch bekannt, dass MAPKs bei der Apoptose von Zellen eine wichtige Rolle spielen. Dabei wurden der Aktivierung von JNK und p38 MAPK im Allgemeinen proapoptotische, der Aktivierung von p44/42 MAPK hingegen antiapoptotische Effekte zugeschrieben. So konnten Xia und Mitarbeiter im Jahre 1995 in einer Arbeit über Apoptose durch Entzug des Wachstumsfaktors NGF (nerve growth factor) bei PC12-Zellen eine Aktivierung von JNK und p38 MAPK sowie eine reziproke Inhibition von ERK1/2 zeigen. Es hat sich mittlerweile jedoch gezeigt, dass sich die Beteiligung der MAPKs bei der Apoptose weitaus komplexer gestaltet. In Abhängigkeit vom Zelltyp, von der Art und Dauer der auslösenden Signale und v. a. auch von der gegenseitigen Beeinflussung mit anderen, gleichzeitig aktivierten Signaltransduktions-Mechanismen kön-

nen alle MAPKs sowohl als anti- als auch als proapoptotische Mediatoren dienen (Tibbles und Woodgett, 1999; Wada und Penninger, 2004).

#### **1.4.1. p44/42 MAPK (ERK1/2)**

Die MAP-Kinasen p44 und p42 sind zwei ubiquitär vorkommende, auch in Neuronen sehr hoch exprimierte Proteine mit einer Schlüsselfunktion in der Regulation von Zellproliferation und -überleben. Sie sind involviert in die Regulation von Meiose und Mitose, der Inflammation und Apoptose, und auch an neoplastischen Transformationen beteiligt. Am Anfang der Aktivierungskette von p44/42 stehen Oberflächenrezeptoren wie z. B. Tyrosinkinase und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die durch Bindung externer Stimuli aktiviert werden (Abbildung 4). Daraufhin kann über die Rekrutierung verschiedener intrazellulär am Rezeptor lokalisierter Adapterproteine z. B. das GTP-bindende Protein Ras aktiviert werden. Ras interagiert mit verschiedenen Effektorproteinen wie Proteinen der Raf-Familie, die anschließend die MAPK-Kinasen MEK1 oder MEK2 aktivieren. Diese bilden im inaktiven Zustand einen Komplex mit p44/42 im Zytoplasma; nach Aktivierung durch eine zweifache Phosphorylierung von p44 und/oder p42 erfolgt die Dissoziation aus dem Komplex, so dass nun eine Translokation in den Zellkern erfolgen kann (Abbildung 4) (Force *et al.*, 1994).

Im Zellkern können nukleäre Proteine und Transkriptionsfaktoren wie z. B. Proteine der AP-1 (activating protein-1) - Familie phosphoryliert werden. Zu dieser gehören das Protoonkogen c-Fos, das an der Vermittlung von Zellproliferation, -differenzierung und -entwicklung beteiligt ist und c-jun, von dem bekannt ist, dass es Apoptose vermittelt, jedoch unter bestimmten Umständen auch antiapoptotische Funktionen besitzt. Aus einer anderen Klasse von Transkriptionsfaktoren, den TCFs (ternary complex factors), stammt Elk-1, das wiederum an der Vermittlung der Induktion von c-Fos beteiligt ist. Daneben kann p44/42 verschiedene zytosolische Substrate wie Membran- und Zytoskelettproteine in ihrer Funktion beeinflussen und über eine Reihe von MAPK-aktivierten Proteinen (MKs) indirekt in die Regulation der Genexpression eingreifen (Bonni *et al.*, 1999).

Die p44/42-MAP-Kinase galt lange als ein Protein, das das Überleben von Zellen fördert. In vielen Experimenten wurde gezeigt, dass sie durch Transduktion von extrazellulären Überlebenssignalen sowie durch Aktivierung von Verteidigungsmechanismen Zellschäden bzw. -tod verhindern kann. Vor allem in jüngerer Zeit sind jedoch zunehmend auch zelltodfördernde Funktionen von p44/42 in Neuronen und anderen Zelltypen entdeckt worden (Hetman und Gozdz, 2004).



### **1.4.2. p38 MAPK**

Die p38 MAP-Kinasen-Familie besteht aus vier Isoformen, der p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ . Davon sind p38 $\alpha$  und  $\beta$  ubiquitär vorhandene Proteine, die als einzige dieser Familie im Gehirn vorkommen und hier sehr hoch exprimiert werden. Die Isolierung der p38-MAP-Kinase gelang ursprünglich in ihrer Funktion als proinflammatorischer Mediator. Mittlerweile ist bekannt, dass die p38 MAP-Kinase auch Zellwachstum, -differenzierung, den Zellzyklus und den Zelltod beeinflusst (Ono und Han, 2000).

Ihre Aktivierung erfolgt beispielsweise durch Osmolaritätsänderungen, Nahrungsentzug, Stresssignale wie UV-Strahlung oder inflammatorische Zytokine. Diese Stimuli aktivieren zunächst eine sehr große Anzahl verschiedener MAPKK-Kinasen, z. B. MEKK1-4, TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase 1) und ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1). Durch diese können die MAPK-Kinasen MKK3, 4 und 6 phosphoryliert werden, welche wiederum eine oder mehrere p38-Isoformen aktivieren können (Abbildung 4) (Kyriakis und Avruch, 2001).

Die Substrate der p38-MAPK decken sich zum Teil mit den durch p44/42 und JNK aktivierten Proteinen, was auf eine Integration der Signale auf dieser Ebene hinweist. Sie aktiviert u. a. die Transkriptionsfaktoren Elk-1 und Sap-1, die am Promoter des Protoonkogens c-Fos binden, außerdem ATF-1 und ATF-2 sowie CREB und beeinflusst so Wachstum, Proliferation, Differenzierung, Überleben und Apoptose von Zellen (Ono und Han, 2000). Im Zytosol phosphoryliert p38 Kinasen wie MSK, MNK, MAPKAP-2 und -3, die in zellulären Stresssituationen Hitzeschockproteine wie z. B. das neuroprotektive Chaperon Hsp27 aktivieren (Rouse *et al.*, 1994).

Hinsichtlich der Regulation von Apoptose galt p38 zunächst als apoptoseförderndes Protein; mittlerweile wurde jedoch auch in verschiedenen Modellen eine Verminderung von Apoptose über p38-vermittelte Signaltransduktion gezeigt (Xia *et al.*, 1995; Okamoto *et al.*, 2000).

### **1.4.3. JNK**

Von mindestens zehn Isoformen der JNKs werden JNK1 und 2 ubiquitär exprimiert, während JNK3 primär im Nervensystem vertreten ist. Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich im Molekulargewicht und auch funktionell, v. a. im Hinblick auf die Affinität zu ihren Substraten. Zur Aktivierung der JNK-Signalkaskade sind vielzählige extrazelluläre Stimuli bekannt, darunter Zytokine, zelluläre Stressstimuli wie z. B. UV-Licht, Cycloheximid oder Hitzeschock, wobei die Art der Regulation und die selektive Aktivierung einzelner Isoformen sowohl vom Zelltyp als auch von der Art der Stimuli abhängig ist (Harper und LoGrasso, 2001).

Zur vollständigen Aktivierung von JNK ist eine Phosphorylierung an Threonin 183 und Tyrosin 185 erforderlich, die durch die MAPK-Kinasen MKK4 und MKK7 erfolgt. MKK4 und 7 haben wieder zahlreiche Aktivatoren wie MEKK1, MLK3, ASK1, TAK1 und TPL-2 (Lin, 2002).

JNK kann nach Aktivierung wiederum Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und so die Genexpression beeinflussen. So kann beispielsweise bei Mäusen die Phosphorylierung der AP-1-Transkriptionsfaktoren ATF-2 und c-jun zur Apoptose von neuronalen Zellen führen. Weiterhin wird der Transkriptionsfaktor Elk-1 phosphoryliert und über NFAT nimmt JNK Einfluss auf die Vermittlung der Immunantwort (Ip und Davis, 1998). Das als Tumorsuppressor und proapoptotisch agierende Protein p53 kann posttranslational von JNK durch Phosphorylierung in seiner Funktion reguliert werden und so verstärkt Apoptose auslösen (Hu *et al.*, 1997).

Daneben können auch zytosolische Proteine wie die mitochondrialen Proteine aus der Bcl-2-Familie beeinflusst werden. Durch Phosphorylierung der BH3-only-Proteine Bim und Bmf kann eine Bax/Bak-abhängige mitochondriale Apoptose induziert werden (Lei und Davis, 2003). Neben der Beteiligung an der Auslösung von Apoptose ist JNK jedoch auch an der Zellproliferation und Verhinderung des Zelltodes beteiligt. Es gibt Hinweise sowohl auf eine Förderung als auch auf eine Verhinderung von onkogenen Transformationen verschiedener Zellen und Gewebe. Zudem spielt JNK bei Inflammationsreaktionen eine wichtige Rolle, u. a. ist sie an der Differenzierung der T-Zellen und an der Produktion von Zytokinen beteiligt (Ip und Davis, 1998).

## **1.5. Fragestellung und Zielsetzung**

Trotz Antiinfektivtherapie und intensivmedizinischer Möglichkeiten ist die Pneumokokken-Meningitis weiterhin mit einer sehr schlechten Prognose behaftet. Das schlechte Outcome erklärt sich zum Teil durch die vom wirtseigenen Immunsystem ausgelösten Inflammationsvorgänge, zum Teil durch direkt vom Bakterium ausgelöste Schäden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Fokussierung auf die durch *S. pneumoniae* selbst ausgelösten Schadensmechanismen in den Nervenzellen. Hier kommt der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose ein wesentlicher Stellenwert zu. In den vorhergegangenen Kapiteln wurde die Pathophysiologie dieser durch Pneumokokken ausgelösten Apoptose dargestellt. Die genauen intrazellulären Vorgänge und Signaltransduktionsmechanismen sind dabei bei Weitem nicht geklärt. Es kommt jedoch zu kei-

ner Aktivierung der Caspasen, hingegen kann die Apoptose durch AIF getriggert werden. Die Rolle anderer Signaltransduktoren wie der MAP-Kinasen ist bislang unklar.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle der MAP-Kinasen während der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose zu klären. Mit Hilfe von Zellkulturen und molekularbiologischen Methoden wurde der Aktivierungsstatus der MAP-Kinasen während der Apoptose untersucht. Mit der Frage nach einer möglichen Schadensreduktion wurde eine pharmakologische Inhibition unterschiedlicher MAP-Kinasen während der Exposition primärer Neurone mit Pneumokokken durchgeführt. Schließlich wurden als mögliche Downstream- bzw. Effektormoleküle der MAP-Kinasen Proteine aus der Bcl-2-Familie, reaktive Sauerstoffmetabolite, Kalzium sowie das Mitochondrienpotential sowie deren Beeinflussbarkeit durch MAP-Kinasen-Inhibition bei der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose untersucht. Da Caspasen-Inhibition keine Protektion der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose bewirkt, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine pharmakologische Kinasen-Inhibition das mitochondriale Membranpotential schützt, den Anstieg intraneuronalen Kalziums und intraneuronaler Sauerstoffradikale verhindert und letztendlich durch Kinasen-Inhibitoren eine Protektion bei der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose erreicht werden kann.

Die bessere Kenntnis von Signaltransduktionsmechanismen könnte die Möglichkeit neuer therapeutischer adjuvanter Angriffspunkte bei der Pneumokokken-induzierten Hirnschädigung eröffnen.

## 2. Methoden

### 2.1. Bakterienkulturen

**Bakterienstämme:** - D39 Kapseltyp 2 (Rockefeller University, New York, USA)  
- *plnA*<sup>-</sup>/*spxB*<sup>-</sup>, Pyruvatoxidase- und Pneumolysin-negative  
Doppelmutante (Braun *et al.*, 2002)

Die Pneumokokkenstämme wurden in 15% Glycerol bei -80 °C aufbewahrt. Die Kultivierung erfolgte in **C+Y (casein hydrolysate + yeast extract)-Medium**, das sich wie folgt zusammensetzt:

- |                              |                                      |
|------------------------------|--------------------------------------|
| 1.) 400 ml Pre C Medium      | 5.) 5 ml Pyruvat (2%)                |
| 2.) 13 ml Ergänzungsmedium   | 6.) 15 ml Kaliumphosphatpuffer (1 M) |
| 3.) 10 ml Glutamin (1 mg/ml) | 7.) 10 ml Hefe (5%)                  |
| 4.) 10 ml Adam's 3 Lösung    |                                      |

#### zu 1.) *Pre 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

#### zu 2.) *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)

#### *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

**zu 4.) Adam's 3 Lösung**

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

**Adam's 1 Lösung**

- 60 µl Biotin (0,5 mg/ml)
- 30 mg Nikotinsäure
- 35 mg Pyridoxin
- 120 mg Ca-pentithotat
- 32 mg Thiamin
- 14 mg Riboflavin
- 400 ml H<sub>2</sub>O

**Adam's 2 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

Die Adam's Lösungen wurden in lichtgeschützten Mediumflaschen bei 4 °C aufbewahrt.

**Durchführung:** Es wurden 3 ml steriles C+Y-Medium mit dem jeweiligen tiefgefrorenen Bakterienstamm beimpft. Zur Anzucht der Doppelmutanten, die mit zwei Resistenzgenen gegen Erythromycin und Chloramphenicol versehen waren, wurden dem Medium diese Antiinfektiva jeweils in einer Konzentration von 2 µg/ml hinzugefügt, um eine Rekonversion zum Wildtypen zu verhindern. Nach einer Inkubation von ca. 10 Stunden über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte zur Rückverdünnung eine Aufnahme von ca. 700 µl der Bakterien-suspension in 3 ml frisches C+Y-Medium, wobei photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm eine optische Dichte (OD) von 0,1 - 0,2 angestrebt wurde. Es folgte eine erneute Inkubation im Brutschrank bis zu einer OD von 0,4 - 0,6. Von dieser Pneumokokkensuspension wurde nun die benötigte Menge in ein Eppendorfgesäß überführt und für 3 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspension und Verdünnung des Pellets mit Zellkulturmedium auf eine OD von 0,01, was einer Konzentration von 10<sup>7</sup> Kolonie-bildenden Einheiten (KBE)/ml entspricht.

## 2.2. Kulturen primärer Kortexneurone

**Wachstumsmedium:**

- 500 ml Neurobasal-Medium (NBM)
- 2% B27-Supplement
- 500 µM L-Glutamin

**Starter-Medium:**

- 500 ml Wachstumsmedium
- 500 µl Glutamat 25 mM

**Dissoziationsmedium (N-Med):**

- MEM
- 10% FKS
- 2 mM L-Glutamin
- Penicillin/Streptomycin (100 E/100 µg/ml)
- 10 mM HEPES
- 8 g/l Glucose
- 100 IE Insulin

**Trypsin-Lösung:**

- Trypsin/EDTA
- 1:10 mit Aqua dest.

**Kollagenmedium:**

- MEM
- 5% FKS
- 1% 1M HEPES
- 1% Penicillin/Streptomycin
- 1% Kollagen-G-Lösung

**PLL-Lösung (5%):**

- 5 ml Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml)
- 100 ml PBS

**Durchführung:** Eine am 17. oder 18. Tag trächtige weibliche Wistar-Ratte wurde mit Isofluran narkotisiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Nach keimarmen Entnahme des Uterus wurde dieser in PBS gelagert, die Embryos unter sterilen Bedingungen entnommen und in steriles PBS überführt. Nun wurden die Gehirne entnommen; unter mikroskopischer Sicht wurden in NBM mit B27-Supplement die Meningen entfernt, die Kortizes herauspräpariert. Die gewonnenen Kortizes wurden in ein Reagenzglas überführt, zweimal mit steriler PBS gespült und dann mit 5 ml Trypsinlösung über 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin durch zweimaliges Waschen mit N-Med inaktiviert, da dieses aufgrund des darin enthaltenen FKS Anti-Trypsin-Aktivität besitzt. Im nächsten Schritt erfolgte die Dissoziation und Homogenisierung des Gewebes in N-Med durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer abgeflämmten Glaspipette. Die Zellsuspension wurde bei 1200 rpm für zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand danach abgenommen und das Zellpellet möglichst schnell in antiinfektiva-freies Starter-Medium aufgenommen. Die Zellzählung erfolgte in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer nach Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau in einem Verhältnis von 1:10.

Vor Aussaat der Zellen in die Zellkulturplatten wurden diese vorbehandelt, um die Zelladhäsion zu fördern. Hierfür wurden sie zunächst für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit PLL-Lösung inkubiert. Nach einmaliger vorsichtiger Spülung mit PBS folgte eine Inkubation der Platten mit Kollagen-Medium für ein bis vier Stunden bei 37 °C im Brutschrank. Das Kollagen-Medium wurde durch zweimaliges Spülen mit PBS entfernt und anschließend die Zellen in einer

Zelldichte von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Starter-Medium ohne Antiinfektivazusätze ausgesät und im Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub>/95% Luft, 95% Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 36,5 °C angezüchtet. Am 4. und am 7. Tag wurden bei Verwendung von Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen jeweils 700µl des Zellkulturmediums entfernt und gegen 1000 µl frisches Medium gewechselt, bei Platten mit 96 Vertiefungen wurde 50 µl frisches Medium hinzugegeben, welches kein Glutamat enthielt.

## 2.3. Stimulationsversuche

### Chemikalien

**PD 98059** (2'-Amino-3'-methoxyflavone) ist ein Inhibitor der MEK1 und MEK2, die Aktivatoren der p42 MAP-Kinase sind. Er hemmt *in vitro* und *in vivo* selektiv und nichtkompetitiv die Phosphorylierung und Aktivierung der unphosphorylierten MEK1 und MEK2. In Abhängigkeit von Stärke und Art der stimulierenden Faktoren kommt es durch PD 98059 zu einer unterschiedlich starken Inhibierung von p42 (Dudley *et al.*, 1995).

**UO 126** (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiene) inhibiert ebenfalls selektiv und nichtkompetitiv MEK1 und MEK2. Im Gegensatz zur Inhibition durch PD 98059 wird diese Funktion jedoch nicht durch den Phosphorylierungszustand von MEK1/2 beeinflusst. Zudem weist UO 126 eine wesentlich höhere Potenz in der Inhibierung der p42 MAP-Kinase auf (Favata *et al.*, 1998). Sowohl PD 98059 als auch UO 126 weisen nur sehr geringfügige Effekte auf andere Proteinkinasen auf, allerdings mit Ausnahme der MEK5 (Kamakura *et al.*, 1999).

**SB 203580** (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole) ist der erste beschriebene selektive p38-Inhibitor, der die katalytische Aktivität der p38 MAP-Kinase hemmt, ohne dabei mit ihrem Aktivierungs- bzw. Phosphorylierungszustand zu interferieren. Allerdings hemmt SB 203580 lediglich die p38 $\alpha$  und p38 $\beta_2$  und es ist mittlerweile bekannt, dass schon in niedrigen Dosierungen im Mikromolarbereich auch andere Proteinkinasen wie z. B. die JNK2 $\beta_2$  und c-Raf inhibiert werden können (Lee *et al.*, 2000).

**AG 126** (Tyrphostin AG 126;  $\alpha$ -Cyano-(3-hydroxy-4-nitro)cinnamonnitril) greift ebenfalls in die p44/42-Signalkaskade ein und vermindert die Phosphorylierung von p44/42, wobei sein An-

griffspunkt oberhalb der Kaskade von MEK1/2 liegt. Es handelt sich um eine niedermolekulare Substanz, die zu einer Gruppe von Tyrosinkinaseinhibitoren gehört, die als antiproliferative, gegen die EGF-Rezeptorkinase gerichtete Pharmaka entwickelt worden sind (Gazit *et al.*, 1999).

**Durchführung:** Die Stimulationsversuche erfolgten nach Maturation der Kortexneurone am 8. Tag nach Aussaat. Vor Versuchsbeginn wurde das Zellkulturmedium bei Versuchen an Zellen in großen Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen komplett gegen 900 µl und in Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen gegen 90 µl frisches Neurobasalmedium ohne B-27-Supplement und ohne Antiinfektivzusätze ausgetauscht. Falls eine Vorbehandlung der Zellen mit Kinasen-Inhibitoren vorgenommen wurde, erfolgte die Zugabe dieser im selben Arbeitsschritt, wobei von allen Inhibitoren 30 µM verwendet wurde. Anschließend wurden die im gleichen Zellkulturmedium aufgenommenen Pneumokokken in einer Konzentration von  $10^7$  KBE/ml dazugegeben. Die Kontrollzellen erfuhren lediglich einen Mediumwechsel. Die Zellen wurden mit den Bakterien bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten entsprechend weiterbehandelt. Zur Kontrolle der Bakterienkonzentration und -viabilität wurden der Bakterienansatz verdünnt und auf Blutagarplatten ausgestrichen, 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend die Kolonien gezählt. Wildtyp und Mutante zeigten ein vergleichbares Wachstum.

## 2.4. Western Blots

### 2.4.1. Zell-Lyse

#### *RIPA-Lysepuffer*

- 50 M TRIS (pH 7,4)
  - 150 mM NaCl
  - 1% Triton X-100
  - 1% SDS
  - 1% Natriumdeoxycholat
  - in bidestilliertem Wasser
- 1 Protease Inhibitor Cocktail-Tablette in 8 ml des RIPA-Lysepuffers, Lagerung auf Eis.

**Durchführung:** Nach Inkubation der Kortexneurone in Zellkulturplatten mit je sechs Vertiefungen mit den Bakterien mit bzw. ohne MAPK-Inhibitoren wurden die Neurone mit eiskalter PBS einmal vorsichtig gewaschen. Nach Zugabe von 200 µl eiskalten RIPA-Lysepuffers in jede der



Vertiefungen wurde das Zell-Lysat in Eppendorfgefäße überführt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis wurde das Lysat bei 15.000 rpm und 4 °C vier Minuten lang zentrifugiert und der Überstand sofort in neuen Eppendorfgefäßen auf Trockeneis und dann bei -80 °C gelagert.

#### **2.4.2. BCA-Proteinbestimmung (Bicinchinonic acid)**

Die Ermittlung der Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten erfolgte mit dem „BCA Protein Reagent Kit“ der Firma Pierce nach Herstellerangaben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C wurde die Absorption des gebildeten Farbkomplexes bei 560 nm im Plattenphotometer gemessen. Nach Erstellen einer Eichgerade anhand der BSA-Standardreihe konnte die gemessene Absorption der Probe einer Konzentration auf der Eichkurve zugeordnet werden.

#### **2.4.3. SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gel Electrophoresis)**

<b><i>Trenngellösung</i></b>	<b><u>6%</u></b>	<b><u>12%</u></b>
- Rotiphorese (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	1,2 ml	2,4 ml
- 1,88 M TRIS/HCl (pH 8,8)	1,2 ml	1,2 ml
- SDS 0,5%	1,2 ml	1,2 ml
- Aqua bidest.	2,4 ml	1,2 ml
- TEMED	5 µl	5 µl
- APS 10%	30 µl	30 µl
<b><i>Sammelgellösung</i></b>	<b><u>5%</u></b>	
- Rotiphorese (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	0,33 ml	
- 0,0625 M TRIS/HCl (pH 6,8)	0,4 ml	
- SDS 0,5%	0,4 ml	
- Aqua bidest.	0,87 ml	
- TEMED	2 µl	
- APS 10%	10 µl	

***Laemmli Ladepuffer*** (Biorad), 1:20 mit β-Merkaptoethanol verdünnt

### ***5-fach SDS/Glycin Laufpuffer***

- 15,1 g Tris Base
- 94 g Glycin
- 5 g SDS
- mit Aqua bidest. aufgefüllt auf 1000 ml

**Durchführung:** Die SDS-PAGE ist eine Variante der Proteinelektrophorese, die der Auftrennung eines Proteingemisches in einem elektrischen Feld dient. Für das Herstellen der Gele wurde zunächst die Trenngellösung hergestellt und zwischen zwei senkrecht stehenden Glasplatten bis ca. 1,5 cm unter den oberen Rand gegossen, so dass sie eine Dicke von 1 mm und eine Größe von 8 x 9 cm aufwies. Das Trenngel wurde bis zur vollständigen Polymerisierung mit Isopropanol beschichtet. Anschließend wurde die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen; durch Einsetzen eines Kammes wurden Auftragstaschen im Sammelgel geformt. Die Proben in Form der Zell-Lysate wurden im Verhältnis 1:1 mit Laemmli-Ladepuffer gemischt, so dass eine konstante Proteinkonzentration aller Proben erzielt wurde. Das im Lade-puffer enthaltene SDS und ein Erhitzen der Proben über 5 Minuten bei 95 °C im Wärmeblock zerstörte die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine durch Unterbrechen nichtkovalenter Bindungen. Die stark negative Ladung von SDS nivellierte zudem alle Ladungen der Proteine, so dass die nachfolgende Auftrennung nur nach dem Molekulargewicht der Proteine erfolgte. Das dem Ladepuffer zugefügte  $\beta$ -Merkaptoethanol spaltete außerdem die vorhandenen Disulfidbrücken durch Reduktion. Die Proben sowie ein farbiger Proteinstandard wurden in die auspolymerisierten Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese der beschickten Gele erfolgte in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer für 15 Minuten bei einer Stromspannung von 60 V, anschließend bei 120 V, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

### ***2.4.4. Proteintransfer im Western Blot***

#### ***Transferpuffer***

- 3,03 g Tris Base
- 15 g Glycin
- 200 ml Methanol
- Auffüllen mit Aqua bidest. auf 1000 ml

**Durchführung:** Beim Immunoblotten wurden die auf dem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Trägermembran transferiert. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen blieben die Proteine an der Membranoberfläche haften, ohne dabei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung zu verlieren.

Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese für 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol benetzt, in Wasser bis zur vollständigen Benetzung geschwenkt und anschließend für ca. 10 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Danach folgte mit Hilfe von Whatman-Filterpapieren der Aufbau eines Blot-Sandwiches in der Transferkammer, so dass die PVDF-Membran zur Anode, das Gel zur Kathode gerichtet war. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 200 mA für zwei Membranen über 60 Minuten.

#### ***2.4.5. Detektion der Proteine auf dem Western Blot***

***TBS:***

- 8,766 g NaCl
- 20 ml 1 M TRIS (pH 7,4)
- Aqua bidest. auf 1000 ml

***TBST:***

- 0,1% Tween 20 in TBS

***Blockierungspuffer:***

- 5% Milchpulver in TBST

**Durchführung:** Nach Beendigung des Transfers wurde die PVDF-Membran mit den transferierten Proteinen zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rüttler im Blockierungspuffer inkubiert. Es folgte über Nacht bei 4 °C die Inkubation mit dem in Blockierungspuffer angesetzten ersten Antikörper (Verdünnung nach Herstellerempfehlung, siehe Kapitel 3.1), der spezifisch gegen das zu bestimmende Protein gerichtet war. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal 5 Minuten mit TBST gewaschen und dann eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem in Blockierungspuffer angesetzten, Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörper inkubiert. Nach einem weiteren dreimaligen Waschvorgang erfolgte nun die Detektion der Proteinbande über eine Chemilumineszenzreaktion, indem die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase die Umsetzung des im Chemilumineszenz-Kit enthaltenen Luminols in seine oxidierte Form katalysierte. Die bei dieser Reaktion freigesetzte Lumineszenz wurde durch Schwärzung eines Röntgenfilmes detektiert.

### **2.4.6. Stripping des Western Blots**

Die an den PVDF-Membranen haftenden Antikörper wurden entfernt, indem die Membran für 15 Minuten mit einem Stripping-Puffer (*Western Blot Stripping Buffer*, Pierce) bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert wurde. Anschließend wurde sie zweimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen, erneut einer einstündigen Inkubation mit dem Blockierungspuffer unterzogen und stand nun einer erneuten Behandlung mit anderen Antikörpern zur Verfügung.

## **2.5. Zelltod-Assays zur Quantifizierung von Apoptose**

### **2.5.1. Acridinorange/Ethidiumbromid-Färbung (AO/EB-Assay)**

Diese Färbung dient der Darstellung der Zellkernmorphologie und ermöglicht eine Differenzierung zwischen vitalen, früh- und spätapoptotischen sowie nekrotischen Zellen. Acridinorange und Ethidiumbromid sind zwei fluoreszierende, DNS-interkalierende Farbstoffe. Acridinorange fluoresziert grün, kann durch intakte Zellmembranen diffundieren und so gesunde Zellkerne anfärben, während Ethidiumbromid nur durch geschädigte Zellmembranen in den Zellkern gelangen kann und diesen dann rot anfärbt.

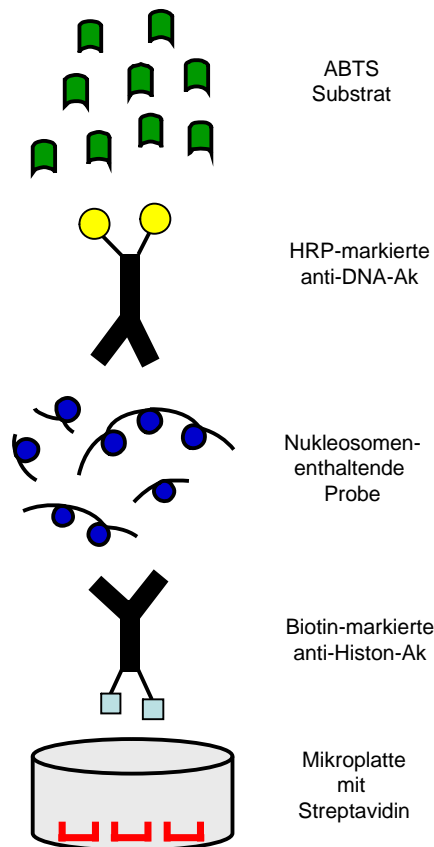
So weisen gesunde Zellen einen grünen und normal großen Zellkern auf. Zellen, die sich in der frühen Phase der Apoptose befinden und noch eine intakte Membran besitzen, kennzeichnen sich morphologisch durch einen kondensierten, intensiv grünen Zellkern, während spätapoptotische Zellen nach Verlust der Membranintegrität klein oder fragmentiert und rot imponieren. Nekrotische Zellen besitzen einen normal großen oder geschwollenen Zellkern und färben sich rot (Braun *et al.*, 2001).

**Durchführung:** Nach Inkubation der Neurone mit Pneumokokken in der An- bzw. Abwesenheit von MAPK-Inhibitoren in Zellkulturschalen mit 96 Vertiefungen wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und jeweils 2 µg/ml AO und 2 µg/ml EB in 100 µl PBS in jede Vertiefung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop in 400-facher Vergrößerung begutachtet und jeweils 3 Bilder aus der Mitte jeder Vertiefung photographisch dokumentiert. Es folgte dann eine Differenzierung und Auszählung der Zellen in gesunde, apoptotische und nekrotische Zellen nach den genannten Kriterien sowie ihre prozentuale Berechnung in Bezug auf die Gesamtzellzahl.

### 2.5.2. Apoptose-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Das Prinzip des ELISA ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, wodurch die gesuchten Proteine an einer beschichteten Zellkulturplatte haftenbleiben. Nach Bindung eines weiteren, an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörpers kann nun ein entsprechendes Substrat umgesetzt werden. Dessen Menge ist proportional zur Konzentration des an die Platte adsorbierten Proteins und kann anhand der entstehenden Farbintensität im Photometer gemessen werden.

Während der Apoptose entstehen DNS-Fragmente, die sich im Zytoplasma der Zellen anreichern, da die Zellmembran noch einige Zeit nach der DNS-Degradation intakt bleibt. Die Quantifizierung der neuronalen Apoptose mittels ELISA erfolgte zum einen mit Hilfe von Antikörpern, die diese DNS-Fragmente erkennen, zum anderen mit Antikörpern, die gegen Histone gerichtet sind. Diese liegen in einem Komplex mit der DNS in Nukleosomen gebündelt vor.



**Abbildung 5: Quantitativer Sandwich-Enzym-Immunoassay zur Quantifizierung der Apoptose durch den spezifischen Nachweis von Mono- und Oligonukleosomen in neuronalen Lysaten.** Nach Apoptose-Induktion werden die Neurone lysiert. Das Lysat wird auf die mit Streptavidin beschichtete Mikroplatte pipettiert und mit dem anti-Histon- und anti-DNS-Ak enthaltenden Immunreagenz inkubiert. Im Lysat enthaltene und HRP-markierte Nukleosomen werden mit dem ABTS-Substrat visualisiert.

**Durchführung:** Nach vierstündiger Pneumokokken-Stimulation wurden die Neurone 30 Minuten bei Raumtemperatur lysiert und das Lysat 10 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. In die mit Streptavidin beschichteten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 20 µl des Überstands (= zytoplasmatische Fraktion) gegeben. Pro Vertiefung wurden nun 80 µl des Immunreagenzes pipettiert, in dem sowohl Antikörper gegen Histone als auch gegen DNS-Fragmente enthalten waren. An die anti-Histon-Antikörper war zudem das Protein Biotin gekoppelt, das an das Streptavidin auf dem Boden der Vertiefungen der Mikrotiterplatte band und somit die Histone mit den daran befindlichen DNS-Fragmenten immobilisierte. An diese Fragmente konnte der anti-DNS-Antikörper binden, an dem das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Diese Reaktionen fanden während einer Inkubation von 2 Stunden bei Raumtemperatur unter sanftem Schütteln statt. Dann wurde das Immunreagenz entfernt und die Vertiefungen der Mikrotiterplatte dreimal mit 250 µl des Inkubationspuffers gewaschen. In jeder Vertiefung wurden 100 µl des Substratreagenzes ABTS (2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolinesulfonate]) 10 Minuten lang unter Schütteln inkubiert, bis eine deutliche Grünfärbung der Lösung sichtbar war. Die Intensität der Farbentwicklung wurde mit dem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen das reine Substratreagenz als Nullwert gemessen.

## **2.6. Messung von intraneuronalem Kalzium, reaktiven Sauerstoffradikalen und mitochondrialem Membranpotential mit fluoreszierenden Farbstoffen**

Die in Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen ausgesäten primären Rattenkortexneurone wurden mit Pneumokokken in der An- bzw. Abwesenheit von MAP-Kinase-Inhibitoren inkubiert. Nach verschiedenen Versuchszeitpunkten wurden die Zellen lichtmikroskopisch beurteilt. Die Messung intraneuronalen Kalziums, intraneuronaler reaktiver Sauerstoffradikale und des mitochondrialen Membranpotentials erfolgte mit jeweils dafür spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen und deren Quantifizierung im Plattenreader. Jedes Experiment wurde 3-4-fach durchgeführt und jede Versuchsbedingung wurde dabei jeweils in 5-6 Vertiefungen der Zellkulturplatte repliziert.

### **2.6.1. Messung von intraneuronalem Kalzium**

Fluo-4-Acetoxymethyl(AM)-Ester ist ein fluoreszierender Farbstoff und Kalziumindikator, der nach Bindung von Kalzium um mehr als 100-fach verstärkte fluoreszierende Eigenschaften besitzt. Die Emission dieses Fluoreszenzsignals korreliert mit der intrazellulären Kalziumkonzentration. Fluo-4 ist als AM-Ester zellpermeabel, kann dann jedoch nach intrazellulärer Spaltung durch Esterasen die Zelle nicht mehr verlassen (Gee *et al.*, 2000).

**Durchführung:** Die Neurone wurden mit Pneumokokken (D39,  $10^7$  KBE/ml) allein bzw. in Anwesenheit der unterschiedlichen Kinase-Inhibitoren (jeweils 1 mg/ml in 90  $\mu$ l Zellkulturmedium) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Danach wurde die Neurone mit Fluo-4 in einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M (50  $\mu$ g in 45  $\mu$ l) in Zellkulturmedium für 45 Minuten bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und im Fluoreszenzreader bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 530 nm gemessen.

### **2.6.2. Messung der intraneuronalen reaktiven Sauerstoffradikale**

DHR (Dihydrorhodamin) 123 ist ein ungeladenes, zellpermeables, nichtfluoreszierendes Molekül. Nach Oxidation durch reaktive Sauerstoffradikale entsteht fluoreszierendes Rhodamin 123, das positiv geladen ist und vorzugsweise im Mitochondrium akkumuliert (Royall und Ischiropoulos, 1993).

**Durchführung:** DHR 123 wurde auf eine Konzentration von 10  $\mu$ M in Zellkulturmedium verdünnt. In jede Vertiefung wurde 50  $\mu$ l der Lösung pipettiert und die Neurone für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen, für 30 Minuten mit den entsprechenden Kinase-Inhibitoren (jeweils 1 mg/ml in 90  $\mu$ l Zellkulturmedium) bzw. nur mit dem Zellkulturmedium inkubiert und anschließend die Bakterien hinzugefügt (D39, 10  $\mu$ l, Endkonzentration  $10^7$  KBE/ml). Jede Versuchsbedingung wurde in 5-6 Vertiefungen der Zellkulturplatte repliziert. Danach wurde zu den angegebenen Zeitpunkten die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Emission bei 530 nm im Fluoreszenzreader gemessen.

### **2.6.3. Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\phi_M$**

TMRE (Tetramethylrhodaminethylester) ist ein positiv geladener fluoreszierender Farbstoff, welcher aufgrund seiner Lipophilie frei durch Membranen diffundieren kann. Da das mitochondriale Membranpotential an der Innenseite der Mitochondrienmembran ein negativ geladenes Milieu schafft, akkumuliert TMRE im Mitochondrium. Hier ändert TMRE seine Fluoreszenzeigenschaften, indem es eine Verlagerung in den Rotbereich bezüglich seiner optimalen Exzitations- und Emissionswellenlänge erfährt.

Kommt es aufgrund einer Schädigung des Mitochondriums zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, erfolgt nun gleichzeitig auch eine Abnahme des Fluoreszenzfarbstoffes, da er kaum Bindungen im Mitochondrium eingeht und daher frei diffundieren kann. Veränderungen in der Stärke der Rotverschiebung seines Fluoreszenzspektrums können daher als Maß für die Höhe des mitochondrialen Membranpotentials herangezogen werden (Scaduto und Grotyohann, 1999).

**Durchführung:** TMRE wurde in einer Konzentration von 100 nM in Zellkulturmedium angewendet. Die Zellen wurden mit Pneumokokken (D39, Endkonzentration  $10^7$  KBE/ml) allein bzw. in Anwesenheit der unterschiedlichen Kinase-Inhibitoren (jeweils 1 mg/ml in 90  $\mu$ l Zellkulturmedium) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Danach wurden die Neurone mit 50  $\mu$ l der TMRE-Lösung 30 Minuten bei 37° Celsius inkubiert und anschließend dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Exzitationswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 580 nm im Fluoreszenzreader.

## **2.7. Angewandte statistische Verfahren**

Alle Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Zur Berechnung der Signifikanzen wurde der Student's t-Test verwendet.



### 3. Material und Geräte

#### 3.1. Material

Acridinorange	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
AG 126	Calbiochem, EMD Bioscience, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<u>Antikörper - primäre</u>	
Anti-Aktin (I-19)-Ziegen-Ak (1:2000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Bax-Kaninchen-Ak (1:1000)	Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Bcl-2-Kaninchen-Ak (1:1000)	Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Phospho-JNK-Maus-Ak (1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Phospho-p44/42- und Anti-p44/42-Kaninchen-Ak (1:1000)	Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Anti-Phospho-p38-Kaninchen-Ak (1:500)	Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt a.M.
<u>Antikörper - sekundäre</u>	
Anti-Kaninchen-IgG-Ak-HRP (1:2000)	Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Anti-Ziegen-IgG-Ak-HRP (1:5000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Maus-IgG-Ak-HRP (1:5000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
β-Merkaptoethanol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
B27-Supplement	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
BCA-Protein-Assay-Kit	Pierce, Rockford, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<i>Cell Death Elisa Plus</i> -Kit	Roche Applied Science, Mannheim
Chemilumineszenz-Kit HRP - Western Blot Detection System LumiGLO Reagent und Peroxid	Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Chemilumineszenz Kodak Film	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dihydrorhodamin 123 (DHR 123)	Invitrogen Molecular Probes, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Elektrophorese-Gradient (8-16%) -	
TrisHCl-Polyacrylamidgel	Biorad Laboratories, Hercules, USA
Entwickler und Fixierer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fluo-4-AM	Invitrogen Molecular Probes, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glutamat	Biochrom AG, Berlin
Glycin	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
HEPES	Biochrom AG, Berlin
Insulin	NovoNordisc Pharma GmbH, Mainz
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kollagen-G	Biochrom AG, Berlin
Laemmli-Puffer	Biorad Laboratories, Hercules, USA
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Methanol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Modified Eagle Medium (MEM)	Biochrom AG, Berlin
NaCl	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Neuro Basal Medium	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
PBS	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
PD 98059	Calbiochem, EMD Bioscience, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Poly-L-Lysin	Biochrom AG, Berlin
Protease-Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Proteinstandard Precision Plus	Biorad Laboratories, Hercules, USA
PVDF-Membran	Biorad Laboratories, Hercules, USA
Reader-Multiwell-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Rotiphorese Gel (30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
SB 203580	Calbiochem, EMD Bioscience, Darmstadt
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Stripping Buffer	Pierce/Perbio Science, Bonn
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
TMRE (Tetramethylrhodaminethylester)	Invitrogen Molecular Probes, Karlsruhe
Tris-Base	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Triton-X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Trypsin	Biochrom AG, Berlin
Tween-20	Invitrogen-Zymed, Karlsruhe
UO 126	Calbiochem, EMD Bioscience, Darmstadt
Whatman-Filterpapier	Biorad Laboratories, Hercules, USA
Zellkulturplatten	Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, Heidelberg

### 3.2. Geräte

Digitalkamera	Leica Camera AG, Solms, Deutschland
Elektrophoresekammern	Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA und Whatman Biometra, Göttingen
Fluoreszenzlesegerät Cytofluor 4000	PerSeptive Biosystems, Framingham, USA
Photometer Helios Epsilon	Thermospectronic, Thermo Electron Corporate, Waltham, USA
Plattenphotometer MRX TC Revelation	Thermo Electron Corporate, Waltham, USA
Semi-Dry Transferkammer	Trans Blot SD Cell, Biorad Laboratories, Hercules, USA

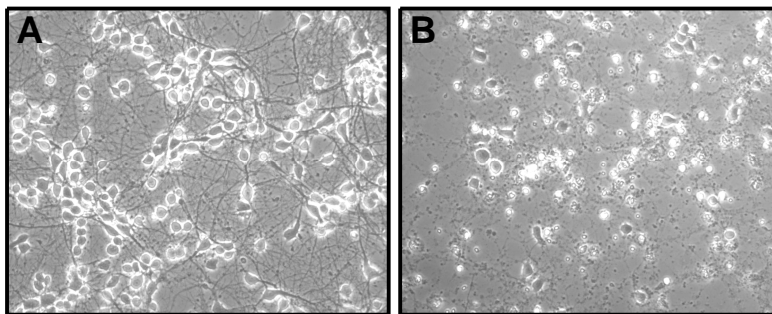
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Regulation der MAP-Kinasen in primären Rattenkortexneuronen bei Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae*

#### 4.1.1. Bakterienkonzentrations-abhängige Regulation der MAP-Kinasen

In neuronalen Zellkulturen, die mit *Streptococcus pneumoniae* inkubiert werden, wird - abhängig von der Dosis der Bakterien - eine Apoptose der Zellen induziert. Es ist bekannt, dass bei dieser Apoptose keine Caspasen-Aktivierung erfolgt.

Abbildung 6 A zeigt exemplarisch lichtmikroskopisch angefertigte Fotos vitaler Neurone vor Pneumokokken-Inkubation, die untereinander durch ein komplexes Axonnetzwerk verbunden waren. Nach 4,5 Stunden Pneumokokken-Inkubation (Abbildung 6 B) waren größtenteils apoptotische Neurone zu erkennen, die abgerundet und geschrumpft sind.



**Abbildung 6: Lichtmikroskopische Aufnahme der neuronalen Zellkultur.** Dargestellt sind Kontrollneurone ohne Pneumokokken (A) und Neurone 4,5 h nach Inkubation mit Pneumokokken (B).

Die MAP-Kinasen sind in der Literatur bei einer ganzen Reihe von Apoptosemodellen involviert, wobei die gleiche Kinase je nach Zellart, Stimulus und Umweltbedingungen einmal pro-, ein andermal antiapoptotische Funktionen besitzen kann. MAP-Kinasen sind im unphosphorylierten Zustand weitestgehend inaktiv, und werden nach Phosphorylierung in ihren aktiven Zustand versetzt. Um die Frage zu klären, ob die MAP-Kinasen p44/42, JNK und p38 während der Pneumokokken-induzierten Apoptose von Kortexneuronen aktiviert werden, wurde ihr Phosphorylierungszustand mittels Western Blot untersucht. Hierfür wurden Neurone mit dem bekapselten Pneumokokken-Wildtypstamm D39 über insgesamt 4,5 Stunden stimuliert. Um eine

mögliche konzentrationsabhängige Regulation zu erkennen, wurden unterschiedliche Konzentrationen von  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  KBE/ml Pneumokokken verwendet. Solche Pneumokokken-Konzentrationen werden auch bei Meningitis-Patienten gefunden. Als Kontrollzellen dienten Neurone, die zu Versuchsbeginn weder die Zugabe von Pneumokokken noch einen Mediumwechsel erfuhren. Um den Einfluss eines alleinigen Mediumwechsels ohne Pneumokokken-Inkubation auf Neurone zu differenzieren, wurden weitere Kontrollzellen nur einem Mediumwechsel unterzogen.

#### **Bakterienkonzentrations-abhängige Regulation der neuronalen p44/42 MAPK (Abb. 7 A)**

Bei Pneumokokken-Konzentrationen von  $10^4$  und  $10^5$  KBE/ml zeigte sich im Western Blot keine Veränderung des Phosphorylierungszustandes von p44/42 im Vergleich zu den Kontrollzellen. Bei einer Pneumokokkenkonzentration von  $10^6$  KBE/ml war eine leichte Zunahme, bei einer Konzentration von  $10^7$  KBE/ml eine sehr starke Zunahme der phosphorylierten p44/42-MAPK zu sehen. Die Kontrollneurone, die zu Versuchsbeginn nicht behandelt wurden, zeigten ebenso wie diejenigen Kontrollzellen, die einen Mediumwechsel erfuhren, nur ein schwaches Bandensignal für Phospho-p44/42. Die Banden der unphosphorylierten MAPK p44/42, die hier als Housekeeping-Protein verwendet wurde, zeigten sich weitestgehend konstant; bei einer Konzentration von  $10^7$  KBE/ml nahm dieses Protein leicht ab.

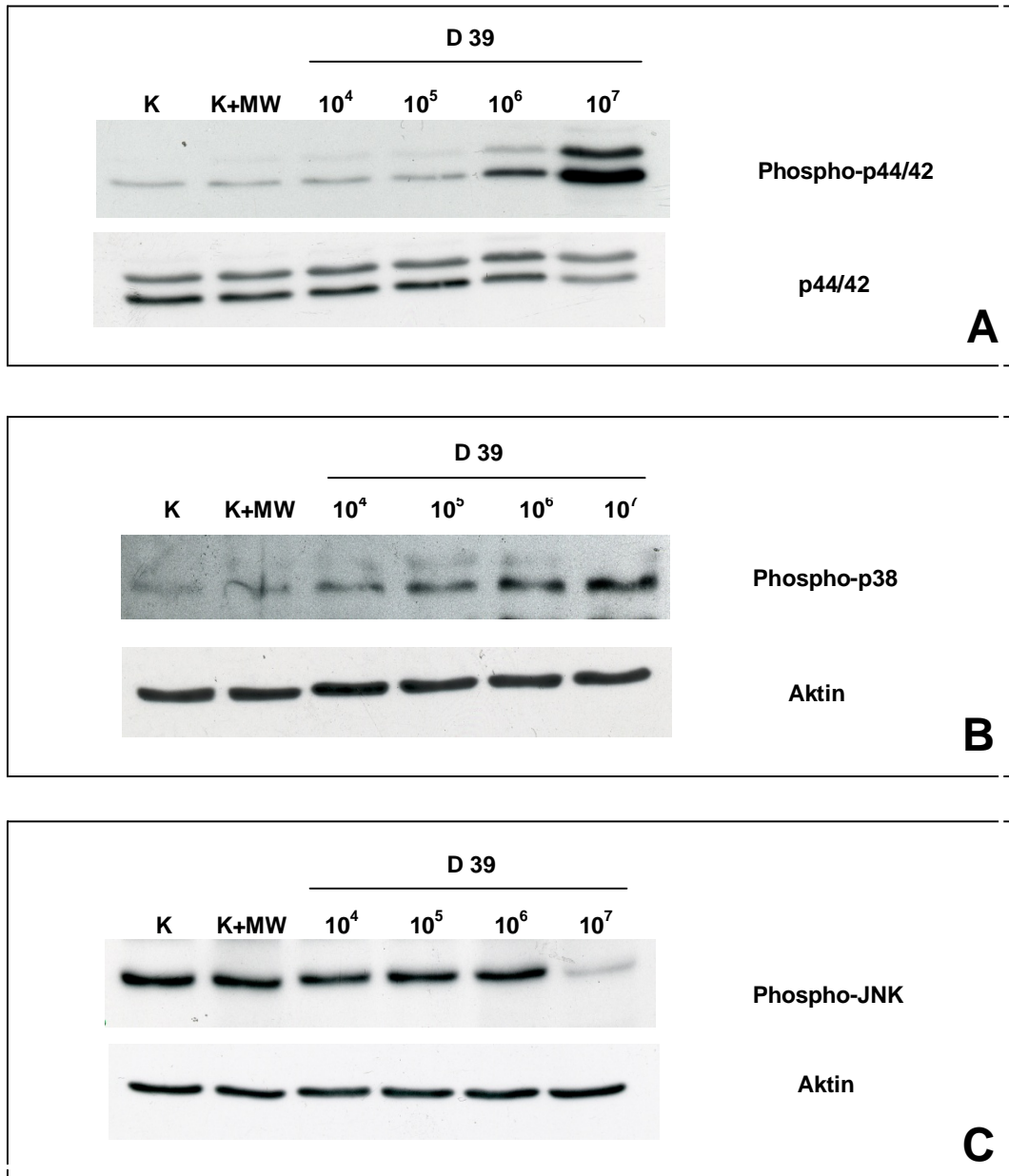
#### **Bakterienkonzentrations-abhängige Regulation der neuronalen p38 MAPK (Abb. 7 B)**

Ebenfalls abhängig von der Pneumokokken-Konzentration zeigte sich eine Zunahme der Phosphorylierung der p38 MAPK. Während die Kontrollzellen und die Zellen unter Stimulation mit einer niedrigen Bakterienkonzentration von  $10^4$  KBE/ml eine schwache Bande für Phospho-p38 aufwiesen, war im Vergleich hierzu schon bei einer Konzentration von  $10^5$  KBE/ml eine leichte Zunahme der Phosphorylierung zu erkennen. Eine Konzentration von  $10^6$  KBE/ml bewirkte eine deutlichere Zunahme, eine Konzentration von  $10^7$  KBE/ml eine starke Zunahme der Phosphorylierung der p38 Kinase. Für das Housekeeping-Protein Aktin ließ sich bei allen Konzentrationen eine gleich starke Bande nachweisen.

#### **Bakterienkonzentrations-abhängige Regulation der neuronalen JNK (Abb. 7 C)**

Bei der Untersuchung dieses Proteins zeigte sich eine gleichmäßig starke Bande für Phospho-JNK bei den niedrigeren Pneumokokken-Konzentrationen von  $10^4$ ,  $10^5$  und  $10^6$  KBE/ml. Bei den Kontrollzellen (mit und ohne Mediumwechsel) war die Phospho-JNK Expres-

sion gleich stark. Bei einer Konzentration von  $10^7$  KBE/ml war im Gegensatz dazu eine fast vollständige Dephosphorylierung von Phospho-JNK zu erkennen. Als Housekeeping-Protein diente Aktin, das stets eine gleichmäßige Bande zeigte.



**Abbildung 7: Darstellung der Bakterienkonzentrations-abhängigen Phosphorylierung der neuronalen MAPK p44/42, p38 und pJNK nach Stimulation mit dem Pneumokokken-Wildtyp D39 im Western Blot.** Verwendung der Konzentrationen  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  KBE/ml Pneumokokken, Stimulationsdauer 4,5 h. K: Kontrollzellen ohne Mediumwechsel, K+MW: Kontrollzellen mit Mediumwechsel. Die Ergebnisse wurden in mehreren unabhängigen Versuchen reproduziert. **A:** Bakterienkonzentrations-abhängige Zunahme der Phospho-p44/42. **B:** Bakterienkonzentrations-abhängige Zunahme von Phospho-p38. **C:** Bakterienkonzentrations-abhängige Abnahme von Phospho-JNK.

#### **4.1.2. Zeitabhängige MAPK-Regulation bei Stimulation mit dem *S. pneumoniae*-Wildtyp D39 und der *plnA*<sup>-</sup>/*spxB*<sup>-</sup> Doppelmutante**

Als nächstes stellte sich die Frage, ob neben der Konzentrations- auch eine Zeitabhängigkeit in der MAP-Kinasen-Aktivierung während der Pneumokokken-induzierten Apoptose von Kortexneuronen vorliegt. Die beiden Exotoxine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Pneumolysin von *S. pneumoniae* sind wesentlich an der neuronalen Apoptose beteiligt. Daher sollte außerdem untersucht werden, inwieweit diese Toxine den Phosphorylierungsstatus der MAPK während der Apoptose beeinflussen.

Die Neurone wurden deshalb sowohl mit dem Wildtypstamm D39 als auch mit der Pneumolysin- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-defizienten Doppelmutante (*plnA*<sup>-</sup>/*spxB*<sup>-</sup>) inkubiert. Es wurde eine Konzentration von 10<sup>7</sup> KBE/ml der beiden Pneumokokkenstämme verwendet. Als Kontrollzellen dienten Neurone, die nur einen Mediumwechsel ohne Bakterieninkubation erfuhren. Als Stimulationszeiten wurden 30 Minuten, 1 Stunde, 1,5 Stunden und 3 Stunden gewählt.

In der mikroskopischen Beurteilung während des Versuches waren nach 3-stündiger Pneumokokkeninkubation ca. 30% der Neurone apoptotisch, während bei den mit der Doppelmutante inkubierten Neurone deutlich weniger Neurone apoptotisch waren (Braun *et al.*, 2002).

#### **Zeitabhängige Regulation der neuronalen p44/42 MAPK bei Inkubation mit D39 oder *plnA*<sup>-</sup>/*spxB*<sup>-</sup> (Abbildung 8 A)**

Im Western Blot war bei den mit dem Wildtyp D39 stimulierten Neuronen bereits nach 1,5 Stunden eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung von p44/42 nachweisbar, die auch zum Zeitpunkt von 3 Stunden noch bestand.

Die mit der Pneumolysin- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-defizienten Doppelmutante (*plnA*<sup>-</sup>/*spxB*<sup>-</sup>) behandelten Neurone zeigten erst beim Zeitpunkt von 3 Stunden eine Zunahme der Phosphorylierung der MAPK p44/42.

Die Kontrollzellen zeigten zum Zeitpunkt von 0, 1, 1,5 und 3 Stunden schwache Banden für Phospho-p44/42. Zum Zeitpunkt von 30 Minuten nach Versuchsbeginn war sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den stimulierten Zellen eine Zunahme der Phospho-p44/42 zu sehen. Diese war beim Zeitpunkt von 1 Stunde wieder rückläufig. Als Housekeeping-Protein zeigte die unphosphorylierte p44/42-MAPK eine durchgehend gleichmäßige Bandenstärke.

### **Zeitabhängige Regulation der neuronalen p38 MAPK bei Inkubation mit D39 oder *plnA<sup>-</sup>/spxB<sup>-</sup>* (Abbildung 8 B)**

Bei Stimulation der Kortexneurone mit dem Wildtypstamm D39 war im Western Blot nach 30 Minuten, 1 und 1,5 Stunden im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollzellen keine Veränderung des Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinase p38 zu beobachten. Es zeigte sich hier überall eine deutliche Bande für Phospho-p38. Zum Zeitpunkt von 3 Stunden nach Versuchsbeginn konnte eine leichte Zunahme der Bandenstärke gesehen werden.

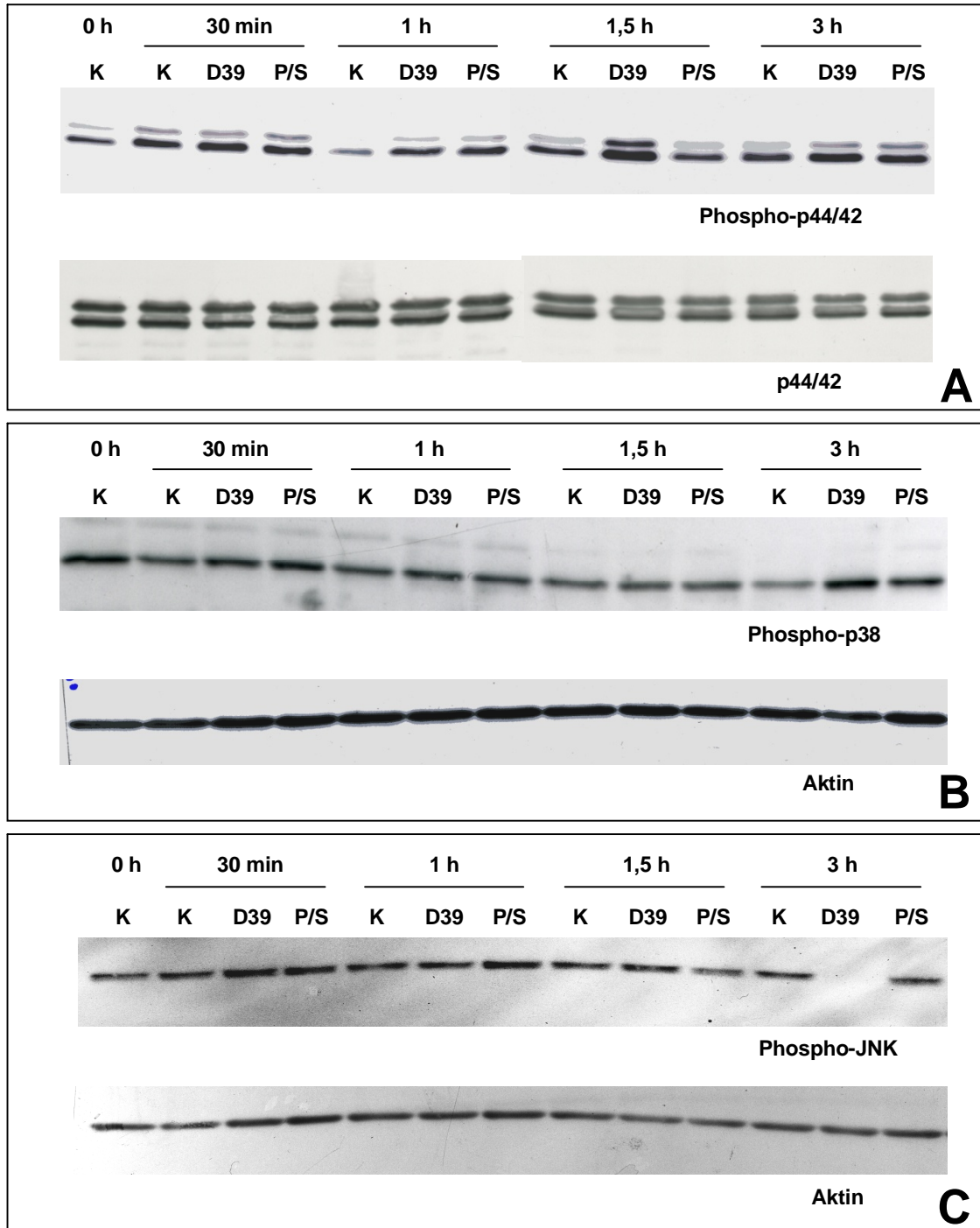
Unter Verwendung der Doppelmutante ließ sich im Vergleich zu den mit dem Wildtyp stimulierten Neuronen nach 3-stündiger Stimulation eine schwächer ausgeprägte Zunahme des phosphorylierten Anteils der p38 MAPK ausmachen. Das Housekeeping-Protein Aktin zeigte weitgehend konstante Bandenstärken.

### **Zeitabhängige Regulation der neuronalen JNK bei Inkubation mit D39 oder *plnA<sup>-</sup>/spxB<sup>-</sup>* (Abbildung 8 C)**

Zu den früheren Zeitpunkten 30 Minuten, 1 und 1,5 Stunden konnte sowohl bei den mit dem Wildtypstamm D39 als auch bei den mit der *plnA<sup>-</sup>/spxB<sup>-</sup>* Doppelmutante stimulierten Neuronen eine gleichmäßig starke Bande für Phospho-JNK nachgewiesen werden. Diese glich in etwa der Bandenstärke der Kontrollzellen.

Unter Verwendung des Wildtyps zeigte sich zum Zeitpunkt von 3 Stunden nach Versuchsbeginn ein fast komplettes Fehlen der Bande für phosphorylierte JNK. Dahingegen wiesen die mit der Doppelmutante behandelten Zellen nach 3 Stunden noch eine unverändert deutliche Bande für Phospho-JNK auf. Für stabil exprimiertes Aktin ließ sich eine durchgehend gleichmäßige Bande nachweisen.





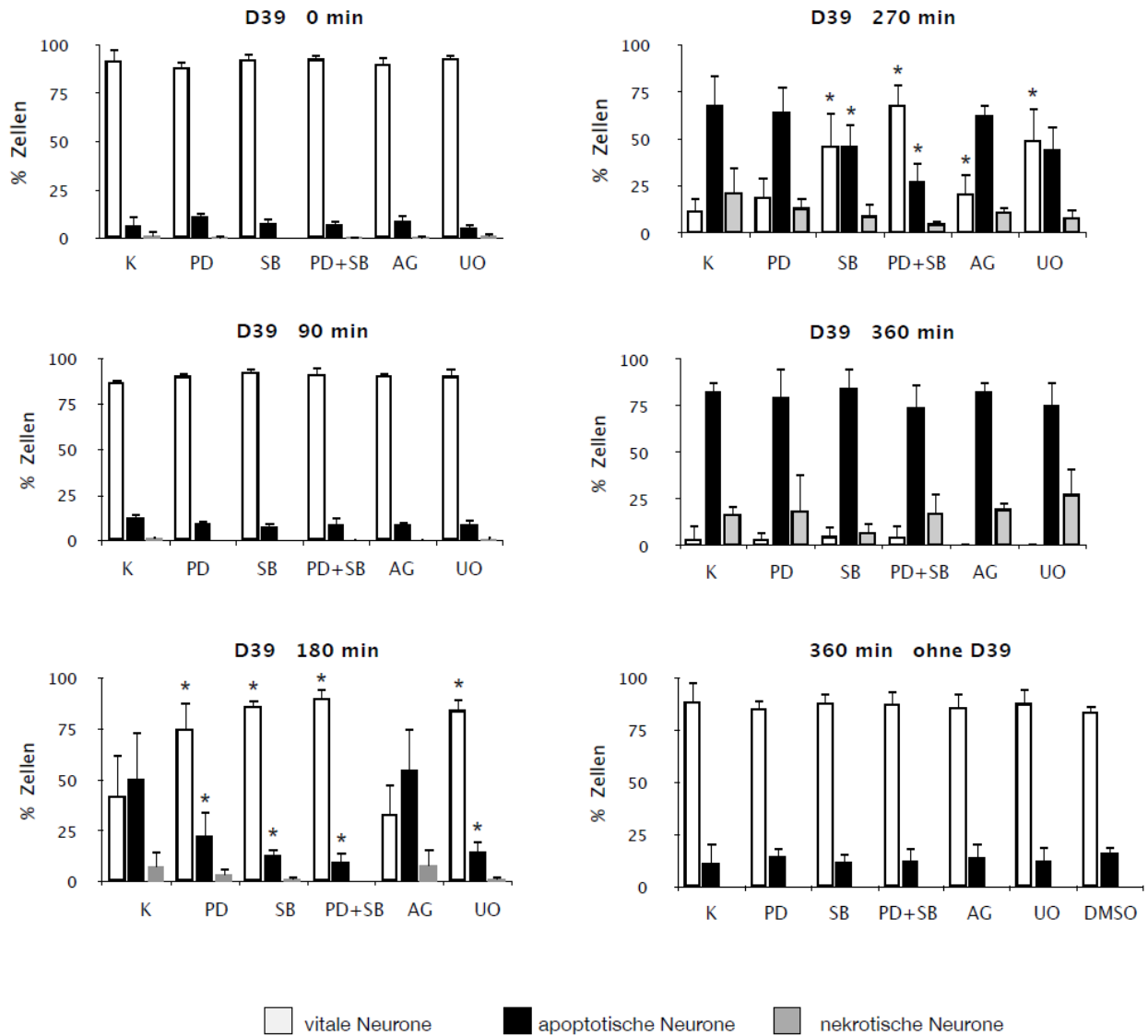
**Abbildung 8:** Darstellung der zeitabhängigen Phosphorylierung der neuronalen p44/42, p38 und JNK nach Stimulation mit dem Pneumokokken-Wildtyp D39 oder der Pneumolysin- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-defizienten Doppelmutante (P/S) im Western Blot. Inkubation mit 10<sup>7</sup> KBE/ml Pneumokokken über unterschiedliche Zeiten. K: Kontrollzellen, die nur einen Mediumwechsel erfuhren. Daten repräsentativ für drei unabhängige Versuche. **A:** Verzögerte Zunahme der Phospho-p44/42 bei Stimulation mit der Doppelmutante. **B:** Geringere Zunahme von Phospho-p38 bei Stimulation mit der Doppelmutante. **C:** Keine Abnahme der Phospho-JNK bei Stimulation mit der Doppelmutante.

## **4.2. MAP-Kinasen-Inhibitoren PD 98059, SB 203580 und UO 126 verzögern die Apoptose primärer Kortexneurone während der Stimulation mit *S. pneumoniae***

Um die Bedeutung der MAP-Kinasen in der Regulation der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose näher zu charakterisieren, wurden diese pharmakologisch inhibiert. Es wurden Rattenkortexneurone mit dem Wildtypstamm D39 in einer Konzentration von  $10^7$  KBE/ml über unterschiedliche Zeiten in An- bzw. Abwesenheit von MAP-Kinasen-Inhibitoren inkubiert. Als Kontrollzellen dienten Neurone, die lediglich einen Mediumwechsel bei Versuchsbeginn erfahren hatten. Es kamen folgende zellpermeable MAP-Kinasen-Inhibitoren zum Einsatz:

- **PD 98059**, ein MEK1/2-Inhibitor und indirekter Inhibitor der p42-MAP-Kinase.
- **UO 126**, ebenfalls ein MEK1/2-Inhibitor mit höherer Potenz in der Inhibierung der p42 MAP-Kinase als PD 98059.
- **SB 203580**, ein selektiver p38 $\alpha$ - und p38 $\beta$ -Inhibitor, der die katalytische Aktivität der p38 MAP-Kinase hemmt.
- **AG 126** (Tyrphostin AG 126), ein Tyrosinkinaseinhibitor, der die Phosphorylierung von p44/42 vermindert, wobei sein Angriffspunkt oberhalb von MEK1/2 liegt.
- **PD 98059 und SB 203580**, also die Kombination eines p42- und eines p38-Inhibitors.

Von allen MAPK-Inhibitoren wurde eine Endkonzentration von 30  $\mu$ M verwendet. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden die Neurone in den Zellkulturplatten mit der Acridinorange/Ethidiumbromid-Methode angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden lebende, nekrotische und apoptotische Zellen anhand der Zellkernmorphologie und -anfärbung differenziert: Lebende Zellen zeigten einen normal großen, grün gefärbten Kern. Apoptotische Neurone besaßen dagegen einen geschrumpften und kondensierten Zellkern, wobei sich frühapoptotische Zellen aufgrund ihrer noch intakten Membran grün anfärbten, spätapoptotische mit geschädigter Membran hingegen rot. Nekrotische Zellen hatten einen normal großen oder geschwollenen, rot gefärbten Zellkern. Die Neurone wurden nach diesen Kriterien zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert und der prozentuale Anteil vitaler, apoptotischer und nekrotischer Neurone ermittelt.



**Abbildung 9: AO/EB-Färbung, Kinetik des neuronalen Zelltodes nach Inkubation über verschiedene Zeiträume mit dem Pneumokokken-Wildtypstamm D39 mit und ohne die MAPK-Inhibitoren PD 98059, SB 203580, AG 126 oder UO 126.** Prozentuale Darstellung vitaler (weiß), apoptotischer (schwarz) und nekrotischer (grau) Neurone. K = Kontrollneurone ohne MAPK-Inhibitoren. N=9 aus 3 unabhängigen Versuchen. \* =  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (Student's t-test).

Abbildung 9 zeigt, dass zu Versuchsbeginn und nach 1,5 Stunden Inkubation mit Pneumokokken sowohl in An- als auch in Abwesenheit der MAPK-Inhibitoren fast nur vitale Neurone zu finden waren. Danach ließen sich folgende Änderungen nachvollziehen:

1.) Nach Inkubation über 3 Stunden mit Pneumokokken war eine deutliche Änderung der Fluoreszenz und der Morphologie der Neuronenzellkerne nach alleiniger Inkubation mit Pneumo-

kokken (ohne MAPK-Inhibition) zu erkennen. Es wiesen nun  $50,6 \pm 23,0\%$  der Neurone einen geschrumpften, abgerundeten Zellkern als Zeichen für Apoptose auf. Zu den späteren Zeitpunkten zeigte sich eine weitere Zunahme der Apoptose auf  $68,2 \pm 16,5\%$  nach 4,5 Stunden und auf  $82,7 \pm 6,1\%$  nach 6 Stunden.

2.) Bei den Neuronen, die zusätzlich mit dem indirekten p42-Inhibitor PD 98059 vorbehandelt worden waren, zeigte sich nach 3 Stunden eine im Vergleich hierzu statistisch signifikant geringere Zunahme apoptotischer Neurone auf nur  $22,5 \pm 12,3\%$ . Zu den späteren Zeitpunkten war kein wesentlicher Unterschied zu der Apoptoserate der Neurone ohne Inhibitor-Behandlung zu erkennen.

3.) Dahingegen ließ sich bei den mit dem indirekten p42-Inhibitor UO 126 vorbehandelten Neuronen sowohl nach 3 Stunden als auch nach 4,5 Stunden eine statistisch signifikant geringere Apoptoserate nachweisen. Sie betrug nach 3 Stunden  $14,4 \pm 6,0\%$  und nach 4,5 Stunden  $44,3 \pm 13,0\%$ . Nach 6 Stunden waren ähnlich wie bei den Neuronen ohne Inhibitor-Behandlung überwiegend apoptotische und teilweise nekrotische Neurone zu erkennen.

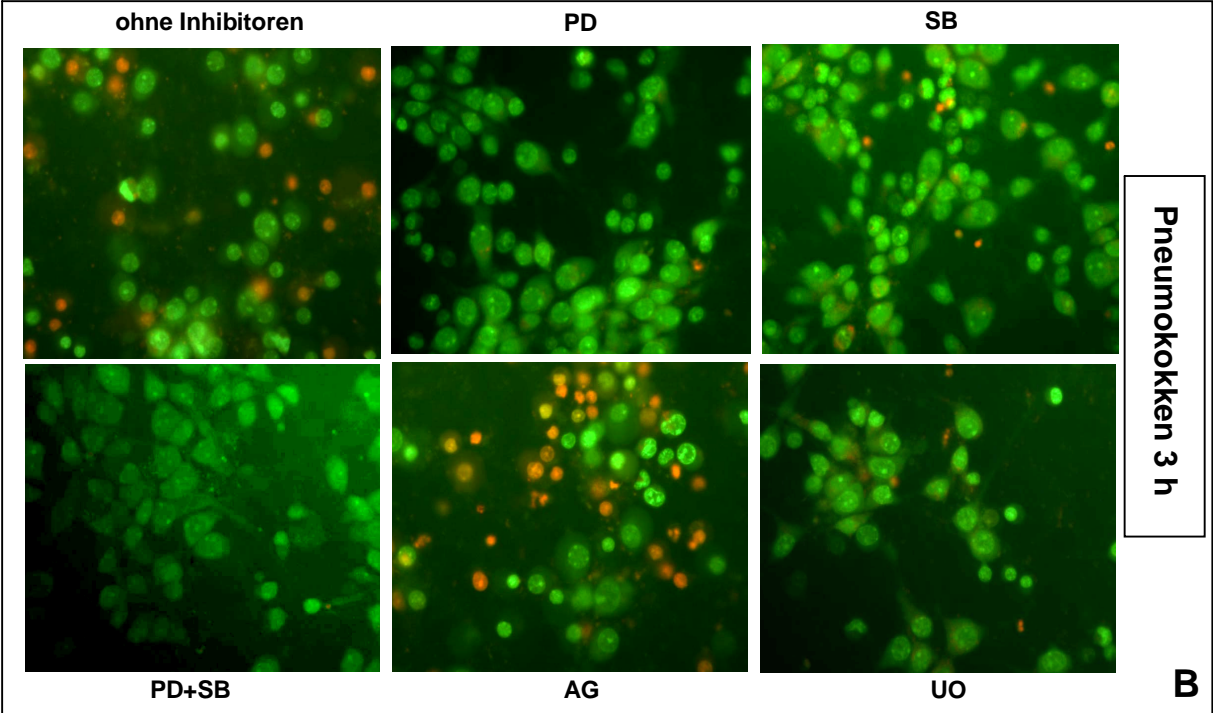
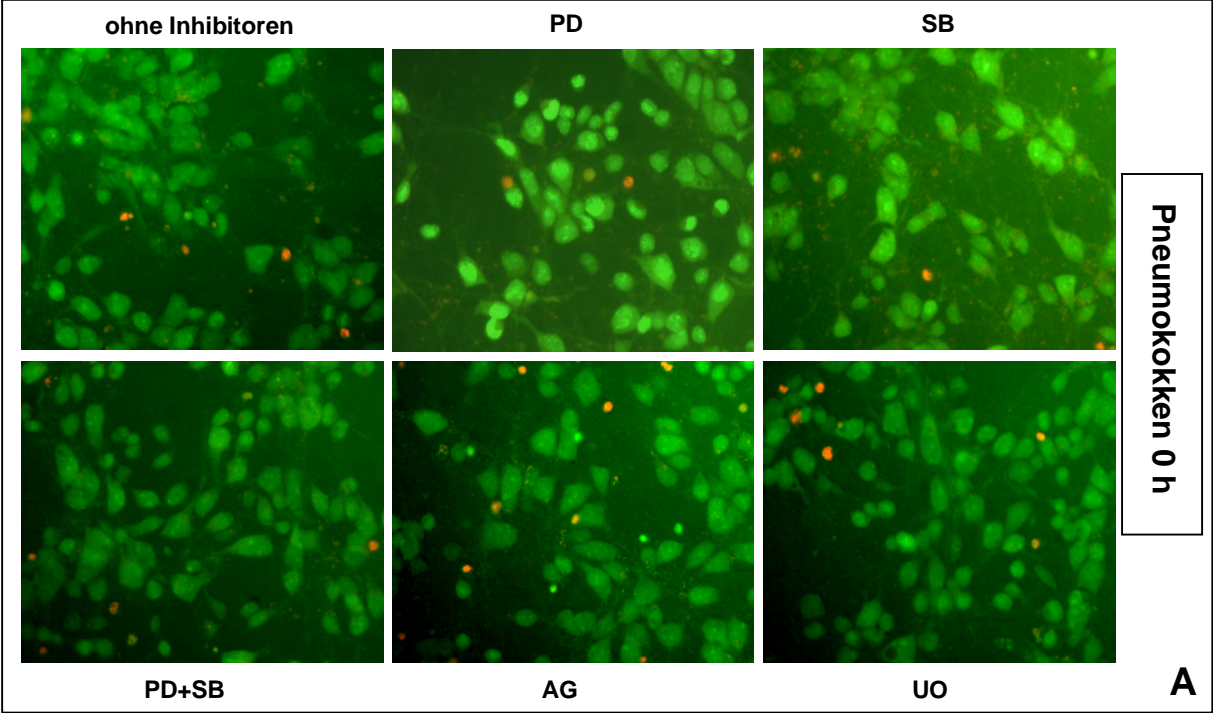
4.) Vorbehandlung mit dem p38-Inhibitor SB 203580 führte nach 3 Stunden Pneumokokken-Inkubation ebenfalls zu einer statistisch signifikant niedrigeren Anzahl apoptotischer Neurone von  $12,7 \pm 4,0\%$ . Nach 4,5 Stunden zeigte sich eine geringere Apoptoserate von  $46,1 \pm 12,2\%$ , die jedoch statistisch nicht signifikant war. Nach 6 Stunden Inkubation ließ sich kein Unterschied mehr zu den Kontrollneuronen ohne MAPK-Inhibitoren erkennen.

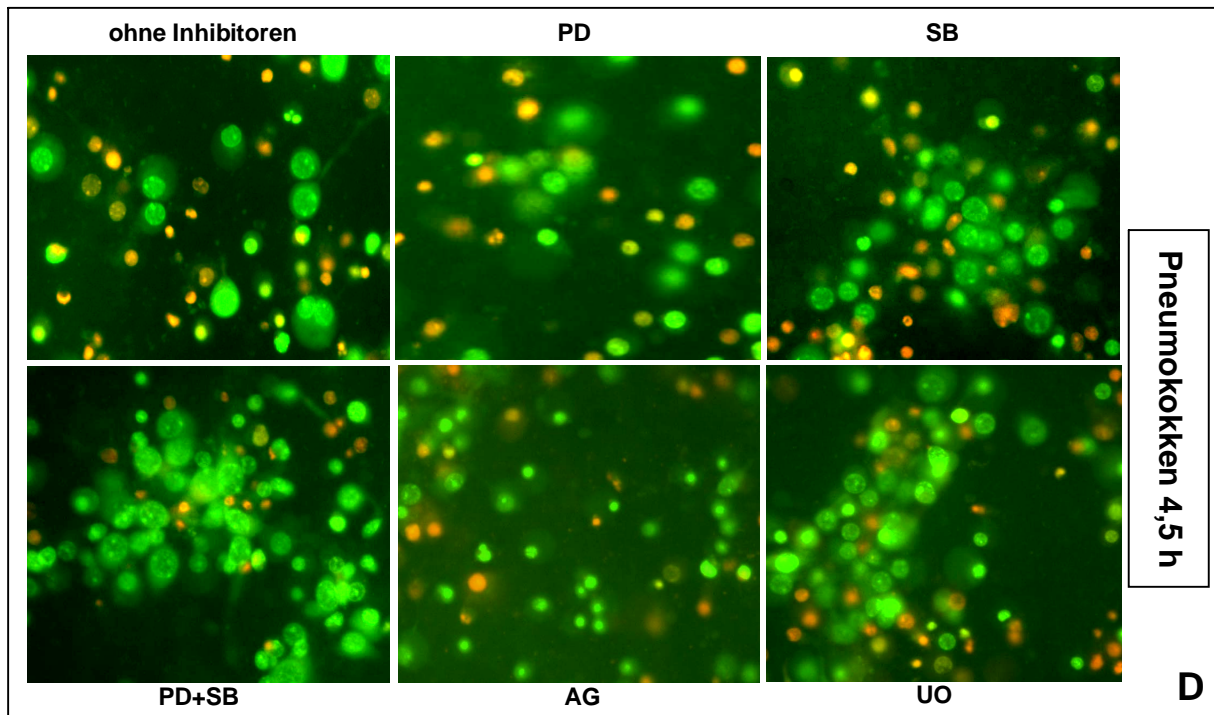
5.) Mit der Kombination aus SB 203580 und PD 98059 behandelte Neurone zeigten nach 3 Stunden eine wiederum statistisch signifikant geringere Apoptoserate von nur  $9,7 \pm 5,3\%$ . Auch nach 4,5 Stunden war eine niedrigere Apoptoserate von  $27,6 \pm 10,4\%$  zu verzeichnen, die im Vergleich zu der Apoptose der Neurone ohne Inhibitor-Vorbehandlung ebenfalls statistisch signifikant niedriger war. Nach 6-stündiger Inkubation war keine Reduktion der Apoptose mehr nachweisbar.

6.) Bei den mit dem Tyrosinkinaseinhibitor AG 126 behandelten Neuronen war lediglich nach 4,5 Stunden Inkubation mit Pneumokokken bei  $20,8 \pm 10,8\%$  vitalen Neuronen (bei den Kontrollzellen  $11,9 \pm 6,8\%$ ) ein gering, aber statistisch signifikant verbessertes Überleben der Neurone zu verzeichnen. Zu allen anderen Zeitpunkten war kein Unterschied zu den Neuronen ohne Inhibitor-Vorbehandlung zu erkennen.

7.) Zum Ausschluss eines alleinigen Einflusses der MAPK-Inhibitoren oder des Vehikels DMSO auf die neuronale Apoptose wurden Kontrollneurone untersucht, die nur mit diesen Chemikalien

ohne Pneumokokken inkubiert wurden. Es zeigte sich hier keine Zunahme der Apoptose im Vergleich zu den Kontrollneuronen ohne Behandlung.





**Abbildung 10: AO/EB Assay. Neurone nach Inkubation mit Pneumokokken (D39) mit und ohne MAPK-Inhibitoren PD 98059, SB 203580, AG 126 oder UO 126.** Nach Inkubation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten das Zellkulturmedium entfernt, Fluoreszenzfarbstoffe hinzugefügt und innerhalb von 10 Minuten die Aufnahmen angefertigt. Große, grüne Zellkerne = lebende Neurone. Kondensierte, geschrumpfte grüne Zellkerne = frühapoptotische Neurone. Kondensierte, geschrumpfte rote Zellkerne = spätapoptotische Neurone. Große, rote Zellkerne = nekrotische Neurone. **A:** Zeitpunkt 0 h. **B:** Zeitpunkt 3 h. **C:** Zeitpunkt 4,5 h.

Abbildung 10 zeigt exemplarisch die fluoreszenzmikroskopisch angefertigten Fotos der Neurone zu Versuchsbeginn (Abbildung 10 A) sowie 3 Stunden (Abbildung 10 B) und 4,5 Stunden (Abbildung 10 C) nach Inkubation mit dem Pneumokokken-Wildtypstamm D39 in der An- und Abwesenheit unterschiedlicher MAPK-Inhibitoren.

Es ist zu erkennen, dass 3 Stunden nach alleiniger Inkubation mit Pneumokokken (D39) ohne MAPK-Inhibition viele Neurone einen geschrumpften, abgerundeten Zellkern im Sinne apoptotischer Kerne aufwiesen. Diese waren größtenteils grün gefärbt, einige Zellen hatten einen kondensierten roten Kern. Bei Neuronen, die entweder mit den p42-Inhibitoren PD 98059 bzw. UO 126 oder mit dem p38-Inhibitor SB 203580 vorbehandelt worden waren, ließen sich nach 3 Stunden zum großen Teil normal große, grün gefärbte Zellkerne erkennen; einzelne Zellen ließen geschrumpfte, grüne Kerne erkennen. Mit der Kombination aus SB 203580 und PD 98059 be-

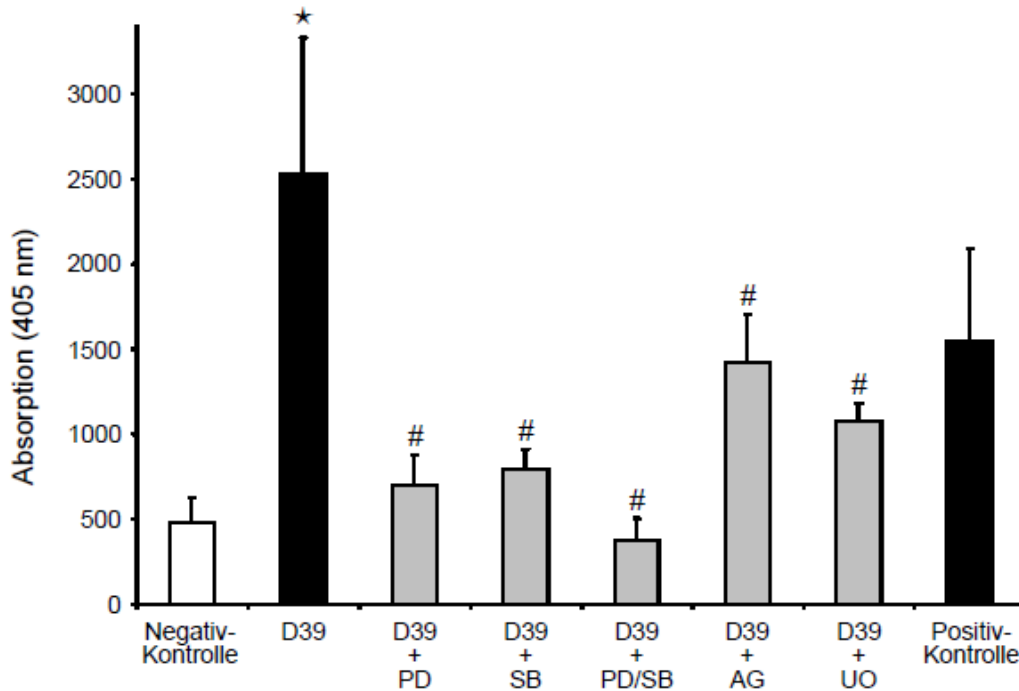
handelte Zellen hatten nach 3 Stunden fast sämtlich normale grüne Zellkerne. Die Inkubation mit Pneumokokken führte bei den mit dem Tyrosinkinaseinhibitor AG 126 behandelten Neuronen nach 3 Stunden zu größtenteils kondensierten roten oder grünen Zellkernen (Abbildung 10 B). Nach Inkubation über 4,5 Stunden waren bei den Kontrollneuronen sowie bei den mit PD 98059 oder AG 126 behandelten Neuronen fast nur noch geschrumpfte rote oder grüne Zellkerne nachzuweisen. Bei den mit SB 203580 oder UO 126 behandelten Neuronen waren hingegen neben vielen geschrumpften auch viele normale Zellkerne, bei den mit PD 98059 und SB 203580 behandelten Neuronen noch überwiegend normale Zellkerne zu erkennen (Abbildung 10 C).

### **4.3. ELISA zur Quantifizierung der Apoptose**

Zusätzlich zu den oben beschriebenen morphologischen Kriterien der Apoptose wurde ein biochemischer Assay (Apoptose-ELISA) zur weiteren Quantifizierung der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose und der protektiven Wirkung der MAPK-Inhibitoren verwendet. Dieser Assay quantifiziert die bei der Apoptose entstehenden DNS-Fragmente als Ausmaß der Apoptose und beruht auf dem sogenannten Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip. Die Neurone wurden am 8. Kulturtag mit  $10^7$  KBE/ml Pneumokokken in Zellkulturmedium in An- und Abwesenheit der MAP-Kinase-Inhibitoren PD 98059, SB 203580, AG 126 und UO 126 über 4 Stunden inkubiert.

Abbildung 11 zeigt, dass die Stimulation mit dem Pneumokokken-Wildtyp D39 alleine zu einer etwa fünffach erhöhten Apoptoserate der Neurone führte. Zusätzliche Inkubation mit den MAPK-Inhibitoren führte bei allen Inhibitoren im Vergleich hierzu zu einer statistisch signifikant niedrigeren Apoptoserate. Dabei lag die Apoptosesrate bei Verwendung von PD 98059 oder SB 203580 nur wenig über der der Kontrollzellen ohne Pneumokokken-Stimulation. Inkubation mit diesen beiden MAPK-Inhibitoren zusammen ließ eine noch weiter verringerte Apoptoserate der Neurone erkennen. Bei Behandlung mit UO 126 war eine geringere Reduktion der Apoptose auf etwa die Hälfte im Vergleich zu nur mit D39 inkubierten Neuronen zu erkennen. Eine noch etwas schwächere Apoptosereduktion war unter dem Tyrosinkinaseinhibitor AG 126 zu erkennen.





**Abbildung 11: Quantifizierung der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose mittels ELISA.** Die Neurone wurden mit  $10^7$  KBE/ml Pneumokokken (D39) in An- und Abwesenheit der MAP-Kinase-Inhibitoren (PD 98059, SB 203580, AG 126 oder UO 126) 4 Stunden inkubiert. Die während der Apoptose entstandenen DNS-Fragmente wurden mittels ELISA HRP-markiert und photometrisch quantifiziert. Als Negativ-Kontrolle dienten unbehandelte Neurone, als Positiv-Kontrolle mit Staurosporin behandelte Neurone. Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 Experimenten. \* =  $p < 0,001$  im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. # =  $p < 0,01$  im Vergleich zu D39.

#### **4.4. MAPK-Inhibitoren PD 98059 und SB 203580 beeinflussen die Phosphorylierung von p38, p44/42 und JNK in Kortexneuronen während der Stimulation mit *S. pneumoniae***

Die vorhergehenden Abschnitte haben belegt, dass die Verwendung der MAPK-Inhibitoren, insbesondere der Kombination des p42-Inhibitors PD 98059 und des p38-Inhibitors SB 203580, die Pneumokokken-induzierte neuronale Apoptose deutlich reduzierte.

Zur Untersuchung eines veränderten Phosphorylierungsstatus der p44/42 und der p38 MAP-Kinase während dieser Versuche wurden die Kinasen an verschiedenen Zeitpunkten anhand der



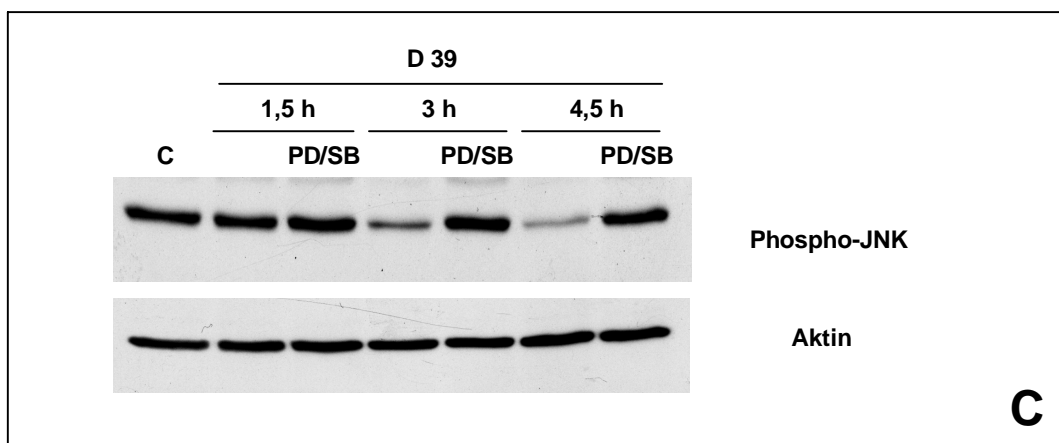
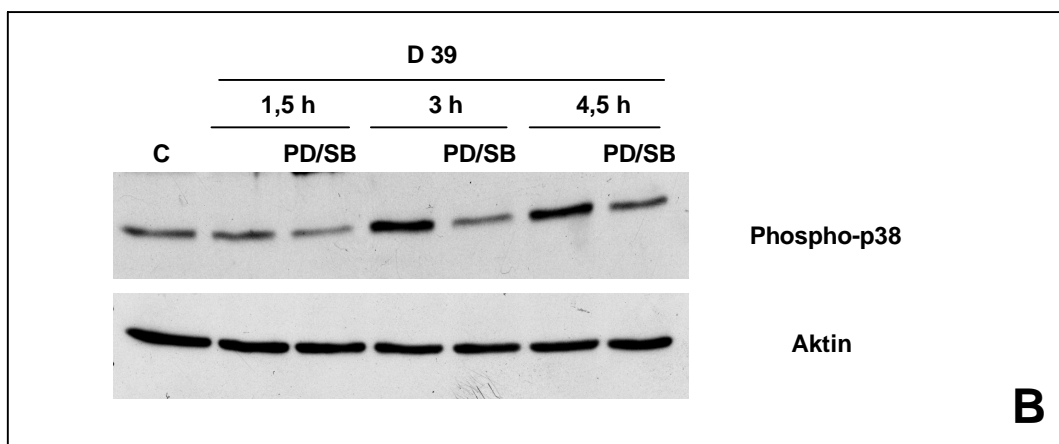
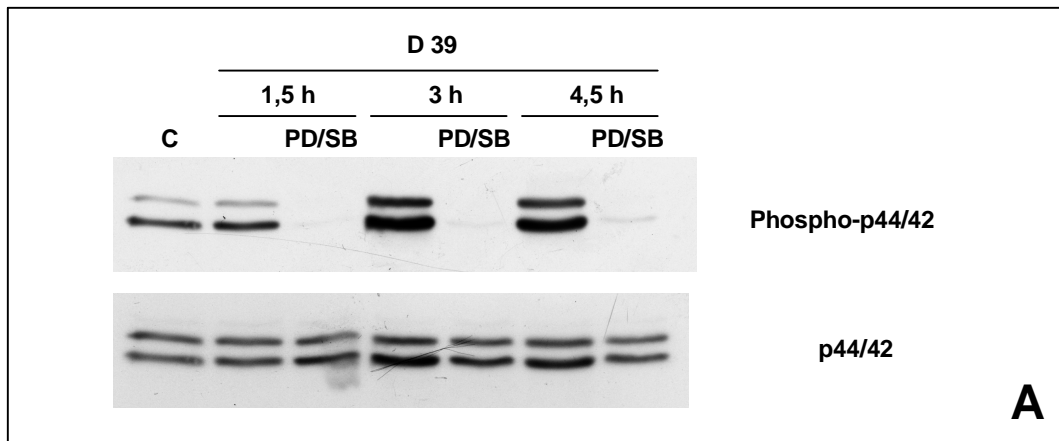
Western Blot-Methode untersucht. Zusätzlich wurden ebenfalls mittels Western Blot die Auswirkungen dieser Inhibitoren auf die Aktivierung der JNK, die nicht direkt durch diese Inhibitoren blockiert wird, untersucht. Hierzu wurden Rattenkortexneurone über unterschiedliche Zeiträume (1,5 h, 3 h und 4,5 h) mit dem *S. pneumoniae*-Wildtypstamm D39 in einer Konzentration von  $10^7$  KBE/ml inkubiert. Ein Teil der Neurone wurde zusätzlich über diesen Zeitraum mit den beiden MAPK-Inhibitoren PD 98059 und SB 203580 inkubiert. Als Kontrollzellen dienten Neurone, die weder mit Bakterien noch mit Inhibitoren inkubiert wurden.

Abbildung 12 A zeigt bei den Neuronen, die mit den Inhibitoren behandelt worden waren, im Western Blot zu allen Zeitpunkten keine oder nur sehr schwache Banden für Phospho-p44/42. Bei nur mit Pneumokokken behandelten Neuronen war eine Zunahme der Phospho-p44/42 nach 3 Stunden und nach 4,5 Stunden im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollneuronen zu erkennen. Unphosphorylierte p44/42 MAPK als Housekeeping-Protein wies zu allen Zeitpunkten etwa gleich starke Banden auf.

Auch für die Phospho-p38 MAPK (Abbildung 12 B) ließ sich bei nur mit Pneumokokken behandelten Neuronen nach 3 und 4,5 Stunden eine deutliche Zunahme nachweisen. Bei den mit Inhibitoren behandelten Kortexneuronen war hingegen zu allen drei Zeitpunkten im Vergleich dazu eine schwächere Bande mit nur leichter Zunahme der Bandenstärke nach 4,5 Stunden zu erkennen. Die Banden für das Housekeeping-Protein Aktin waren zu allen Zeitpunkten ungefähr gleich stark.

Bezüglich der MAPK JNK (Abbildung 12 C) waren unter Verwendung der MAPK-Inhibitoren PD 98059 und SB 203580 im Vergleich zu den Kontrollzellen gleich starke Banden für die phosphorylierte Kinase zu erkennen. Stimulation der Neurone mit Pneumokokken ohne MAPK-Inhibitoren führte, wie schon zuvor gezeigt (Kapitel 3.1.), zu einer deutlichen Abnahme von Phospho-JNK nach 3 und noch stärker nach 4,5 Stunden. Aktin zeigte ein etwa gleichbleibend starkes Bandenmuster.

Zusammenfassend verhinderte die zeitgleiche Anwendung eines p38-Inhibitors und eines MEK1/2-Inhibitors bei Pneumokokken-stimulierten Kortexneuronen die Aktivierung von p42, p44 und p38 sowie die Deaktivierung von JNK.



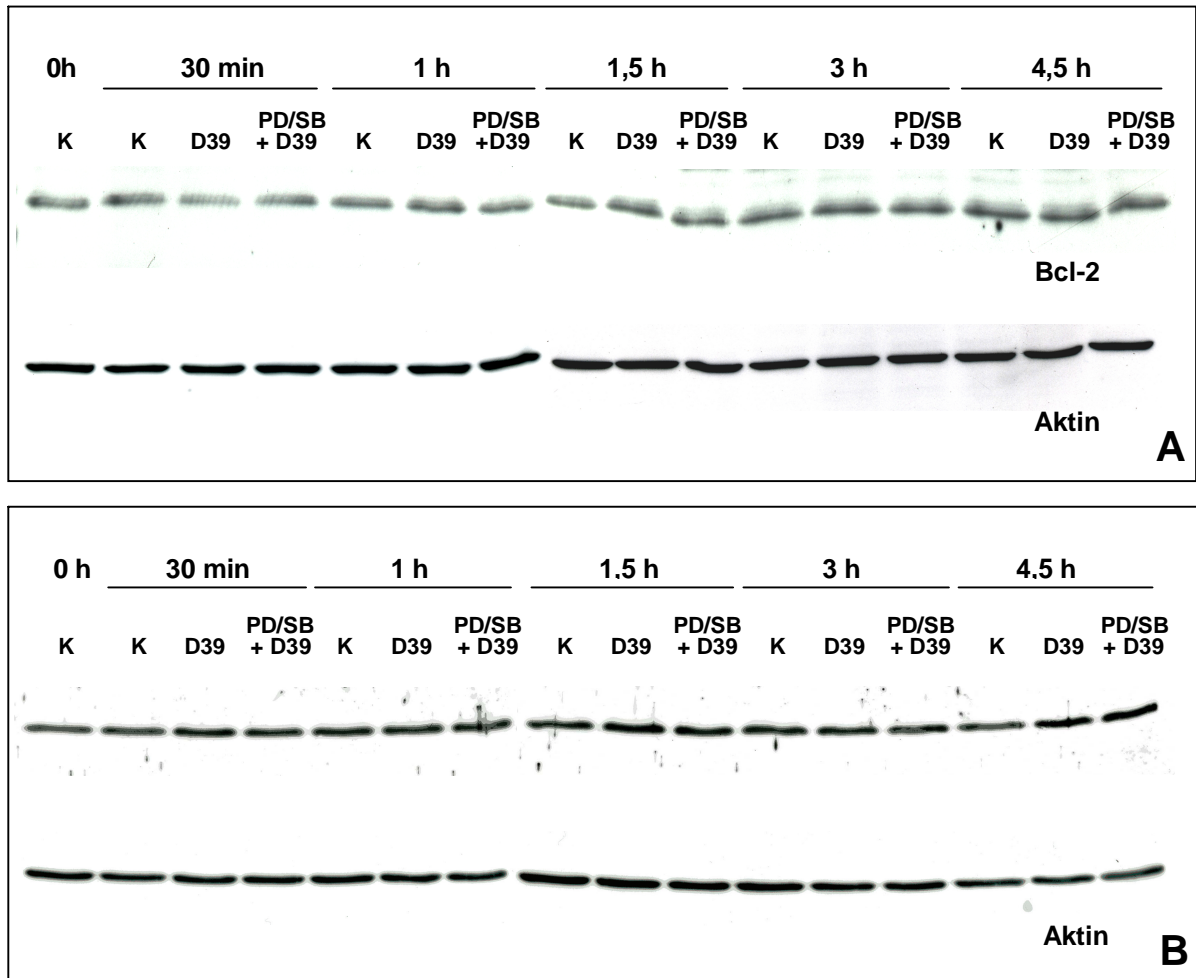
**Abbildung 12: Phosphorylierung der MAP-Kinasen in Kortexneuronen während der Pneumokokken-induzierten Apoptose unter Verwendung von MAPK-Inhibitoren im Western Blot.** Inkubation mit  $10^7$  KBE/ml D39; kombinierte Verwendung der MAPK-Inhibitoren PD 98059 und SB 203580. K: Kontrollneurone ohne Pneumokokken und ohne MAPK-Inhibitoren. **A:** Deutliche Abnahme des Bandensignals für Phospho-p44/42 unter MAPK-Inhibition. **B:** Abnahme der Phospho-p38 bei Behandlung mit MAPK-Inhibitoren. **C:** Gleichbleibend starkes Signal der Bande für Phospho-JNK unter MAPK-Inhibition.

#### **4.5. Untersuchung des Einflusses von Bcl-2 und Bax auf das verbesserte Überleben der mit PD/SB behandelten Neurone**

In den vorhergehenden Kapiteln konnte eine Beteiligung der MAP-Kinasen bei der Pneumokokken-induzierten Apoptose von Rattenkortexneuronen gezeigt werden. Unter Verwendung von MEK1/2- und p38 MAPK-Inhibitoren konnte eine Minderung dieser Apoptose erzielt werden. Unklar ist, über welche nachgeschalteten Mechanismen die Minderung der Apoptose vermittelt wird. Ein möglicher Mechanismus könnte die Beeinflussung der mitochondrialen Apoptose über eine Aktivierung oder Inaktivierung von Proteinen der Bcl-2-Proteinfamilie sein.

Daher wurde die Expression des antiapoptotischen Bcl-2 und des proapoptotischen Bax auf Proteinebene mit Hilfe des Western Blots untersucht. Hierzu wurden Kortexneurone mit dem Pneumokokken-Wildtypstamm D39 in einer Konzentration von  $10^7$  KBE/ml über Zeiträume von 30 Minuten, 1 Stunde, 1,5, 3 oder 4,5 Stunden in An- und Abwesenheit von MAPK-Inhibitoren stimuliert. Hierfür wurde wiederum die Kombination aus dem p38-Inhibitor SB 203580 und dem indirekten p42-Inhibitor PD 98059 verwendet. Zu jedem Zeitpunkt wurden Kontrollneurone untersucht, denen weder Bakterien noch Kinasen-Inhibitoren zugesetzt wurden.

Die Western Blots (Abbildung 13 A + B) zeigen, dass weder Pneumokokken allein noch die zusätzliche Applikation der MAP-Kinasen-Inhibitoren zu irgendeinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer Änderung der Expression von Bcl-2 oder Bax auf Proteinebene führte. Die Banden für Bcl-2 und Bax waren zu jedem der Zeitpunkte unter den verschiedenen Bedingungen ähnlich stark wie die der Kontrollzellen. Aktin als Housekeeping-Protein zeigte ebenfalls ein gleich bleibendes Signal.



**Abbildung 13 A + B: Kein Nachweis eines Einflusses der MAPK-Inhibition während der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose auf die Expression von Bcl-2 und Bax im Western Blot.** Stimulation über verschiedene Zeiträume mit  $10^7$  KBE/ml Pneumokokken-Wildtyp D39; kombinierte MAPK-Inhibition mit PD 98059 und SB 203580 (PD/SB). K: Kontrollneurone ohne D39 und ohne PD/SB. Das Ergebnis wurde in mehreren unabhängigen Versuchen reproduziert.

#### **4.6. Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die Pneumokokken-induzierte Produktion intraneuronaler reaktiver Sauerstoffradikale**

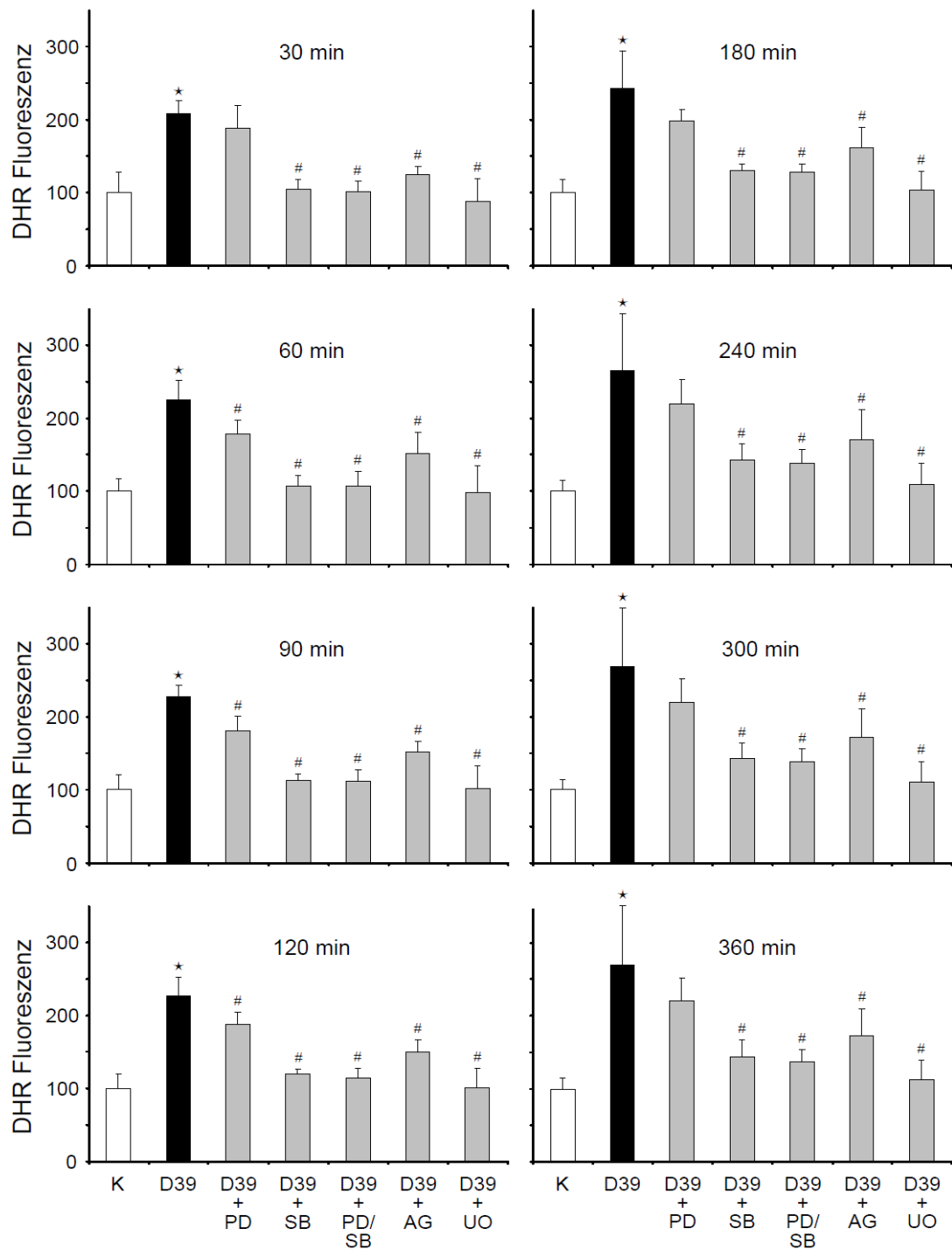
Ein weiterer Mechanismus, über den die MAPK-Inhibitoren zu einer Verzögerung der neuronalen Apoptose führen könnten, ist ein Einfluss auf die Generierung intraneuronaler reaktiver Sauerstoffradikale (ROS). Die übermäßige Bildung von ROS kann apoptotische Prozesse auslösen

oder diese verstärken. Daher wurde der Anstieg von ROS in primären Rattenkortexneuronen nach Inkubation mit dem *S. pneumoniae*-Wildtyp D39 in An- und Abwesenheit der MAPK-Inhibitoren SB 203580, PD 98059, UO 126 und AG 126 untersucht. Die Zellen wurden über unterschiedliche Zeiträume mit Pneumokokken in einer Konzentration von  $10^7$  KBE/ml sowie den unterschiedlichen Inhibitoren und anschließend mit dem ROS-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DHR (Dihydrorhodamin) 123 inkubiert. DHR 123 wird durch ROS oxidiert und fluoresziert infolgedessen.

Die Ergebnisse der relativen DHR-Fluoreszenz (Fluoreszenz der Kontrollneurone ohne D39-Stimulation entspricht 100%) sind in Abbildung 14 dargestellt. Bereits nach 30 Minuten Inkubation mit Pneumokokken (D39) zeigte sich eine etwa doppelt so starke Fluoreszenz der mit D39 stimulierten Neurone im Vergleich zu den nicht mit D39 behandelten Kontrollneuronen. Bei den weiteren Messpunkten zeigte sich eine weitere kontinuierliche Zunahme der DHR-Fluoreszenz der D39-stimulierten Neurone bis auf ca. 270% nach 4, 5 und 6 Stunden. Die zusätzlich mit dem MEK1/2-Inhibitor PD 98059 inkubierten Neurone wiesen im Vergleich dazu bei allen Messzeitpunkten eine geringfügig, bis zum Zeitpunkt von 120 Minuten statistisch signifikant verringerte DHR-Fluoreszenz auf. Bei den mit dem p38-Inhibitor SB 203580 sowie bei den mit der Kombination von PD 98059 und SB 203580 behandelten, D39-stimulierten Neuronen ließ sich zu allen Zeitpunkten eine deutliche, statistisch signifikante Reduktion der Fluoreszenz nachweisen. Sie war bis zum Zeitpunkt von 90 Minuten nur geringfügig und zum Zeitpunkt von vier Stunden etwa 1,5-fach stärker als die der unbehandelten Kontrollneurone.

Bei Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor AG 126 zeigte sich eine im Vergleich hierzu etwas geringere, zu allen Zeitpunkten statistisch signifikante Reduktion der DHR-Fluoreszenz. Nach 1 Stunde war hier eine etwa 1,5-fach, nach 4 Stunden eine etwa 1,7-fach stärkere Fluoreszenz im Vergleich zu den nicht mit D39 inkubierten Neuronen nachzuweisen. Durch Behandlung der Neurone mit dem MEK1/2-Inhibitor UO 126 konnte die stärkste Reduktion des Fluoreszenzanstieges gemessen werden. Sie lag zu allen Messzeitpunkten nur knapp über der Fluoreszenz der nicht mit D39 inkubierten Kontrollneurone.

Es kann also konstatiert werden, dass durch Inhibition der MAP-Kinasen die Generierung intraneuronaler reaktiver Sauerstoffradikale vermindert wird. Besonders effektiv war diese Minderung unter Inhibition der p38 MAPK mit SB 203580, der MEK1/2 und konsekutiv der p42 MAPK mit dem Inhibitor UO 127 sowie die gleichzeitige Hemmung von p38 und p42 mit den Inhibitoren SB 203580 und PD 98059. Geringeren Effekt hatten die alleinige Inhibition von p42 mit PD 98059 und die Inhibition der Tyrosinkinase durch AG 126.



**Abbildung 14: Messung von intraneuronalen Sauerstoffradikalen (ROS).** Die Neurone wurden mit Pneumokokken (D39,  $10^7$  KBE/ml) in An- und Abwesenheit von MAPK-Inhibitoren unterschiedlich lang inkubiert und mit dem ROS-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff DHR 123 gefärbt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen DHR 123-Fluoreszenzstärke aus jeweils 6 Vertiefungen der Zellkulturplatte (repliziert in 3 unabhängigen Experimenten), gemessen bei einer Wellenlänge von 530 nm.  $\star = p \leq 0.001$  im Vergleich zur Kontrolle.  $\# = p \leq 0.05$  im Vergleich zu Pneumokokken ohne MAPK-Inhibitoren.

#### **4.7. Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die Pneumokokken-induzierte Zunahme von intraneuronalem Kalzium**

Eine gestörte Kalziumhomöostase fördert die Apoptose von Zellen. In vielen Modellen konnte während der Apoptose von Zellen ein Anstieg des intrazellulären Kalziums beobachtet werden, so auch bei der Pneumokokken-induzierte Apoptose (Sastry und Rao, 2000; Braun *et al.*, 2002). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der verringerten Apoptoserate von Neuronen, die mit MAP-Kinasen-Inhibitoren behandelt wurden, und der Höhe des intrazellulären Kalziums besteht.

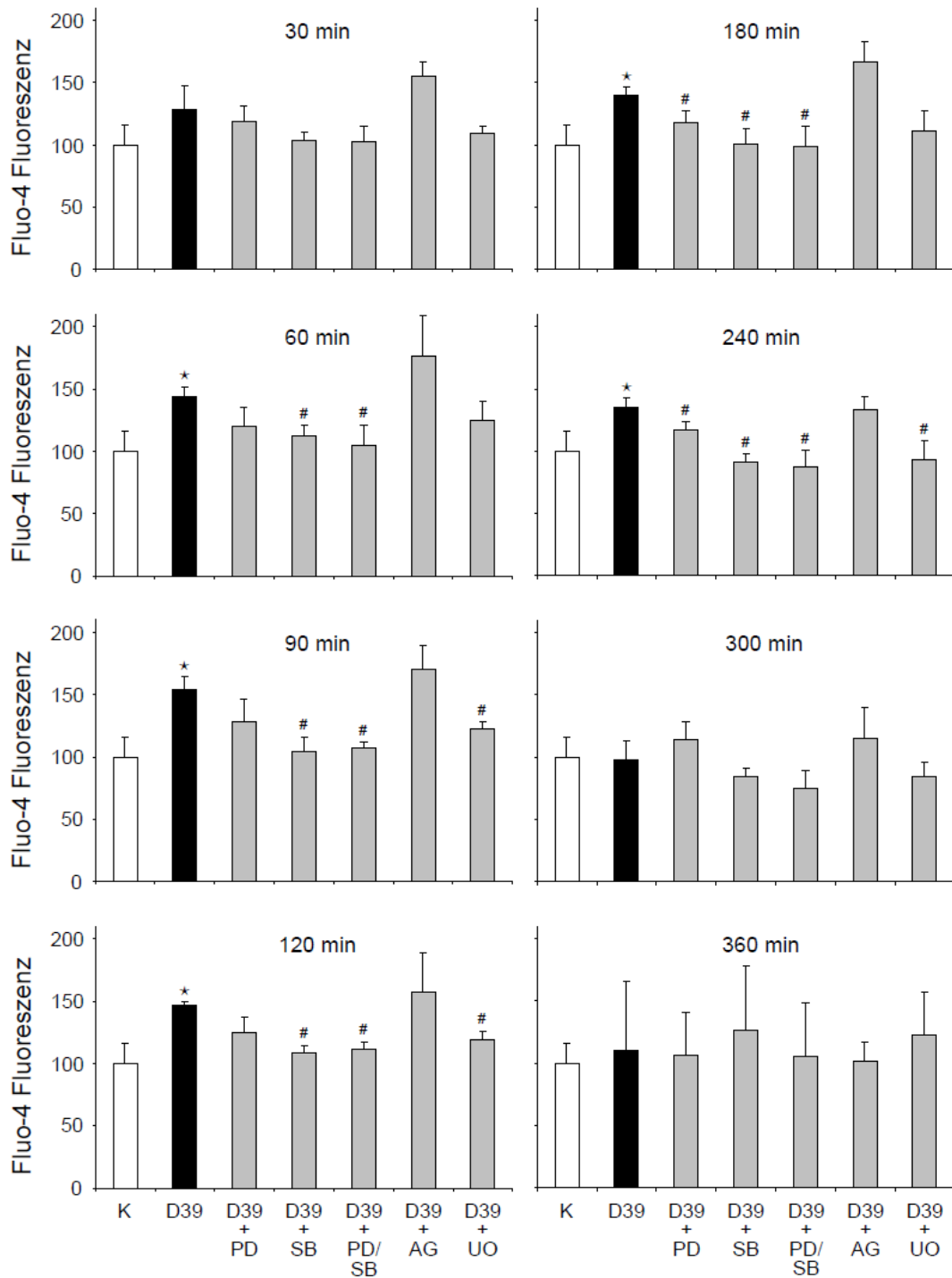
Hierzu wurden primäre Rattenkortexneurone mit dem *S. pneumoniae*-Wildtyp D39 in An- und Abwesenheit der MAPK-Inhibitoren PD 98059, SB 203580, AG 126 und UO 126 inkubiert. Die Messung des intrazellulären Kalziums erfolgte mit Hilfe des zellpermeablen Farbstoffes Fluo-4-AM, ein Kalziumindikator, dessen Fluoreszenz nach Kalziumbindung verstärkt wird.

Die Ergebnisse der relativen Fluo-4-Fluoreszenz (Fluoreszenz der Kontrollneurone ohne D39-Stimulation entspricht 100%) sind in Abbildung 15 dargestellt. Bei den nur mit D39 behandelten Neuronen war bis zu zwei Stunden nach Stimulationsbeginn ein Anstieg der Fluoreszenz auf ca. 150% zu erkennen. Im weiteren Zeitverlauf war diese Zunahme der Fluoreszenz wieder rückläufig; nach fünf und sechs Stunden Stimulation war kein relevanter Unterschied zur Fluoreszenz der Kontrollneurone mehr zu erkennen.

Bei den Neuronen, die zusätzlich mit PD 98059 inkubiert wurden, war im Vergleich hierzu nach 3 und 4 Stunden Inkubation eine statistisch signifikant geringere Zunahme der Fluoreszenz zu verzeichnen. Sie lag zu diesen beiden Zeitpunkten bei ca. 120% (gegenüber einem Anstieg der Fluoreszenz auf ca. 140% bei den nur mit Pneumokokken behandelten Neuronen).

Dahingegen konnte die Verwendung von SB 203580 alleine oder in Kombination mit PD 98059 bei Inkubationszeiten zwischen 1 und 4 Stunden die Zunahme der Fluoreszenz statistisch signifikant verringern. Sie war hier nur geringfügig höher als bei den unbehandelten Kontrollneuronen.

Bei Verwendung von AG 126 war zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzzunahme zu erkennen. Inkubation der Neurone mit dem MAPK-Inhibitor UO 126 führte bei einer Inkubationsdauer von 1,5 Stunden, 2 und 4 Stunden zu einer signifikanten Senkung der Fluoreszenzanstieges. Die Fluoreszenzstärke lag hier nach 1,5 und nach 2 Stunden bei 120% (im Vergleich zu ca. 150% bei alleiniger Behandlung mit Pneumokokken) und nach 4 Stunden etwa in Höhe der Fluoreszenzstärke der Kontrollneurone.



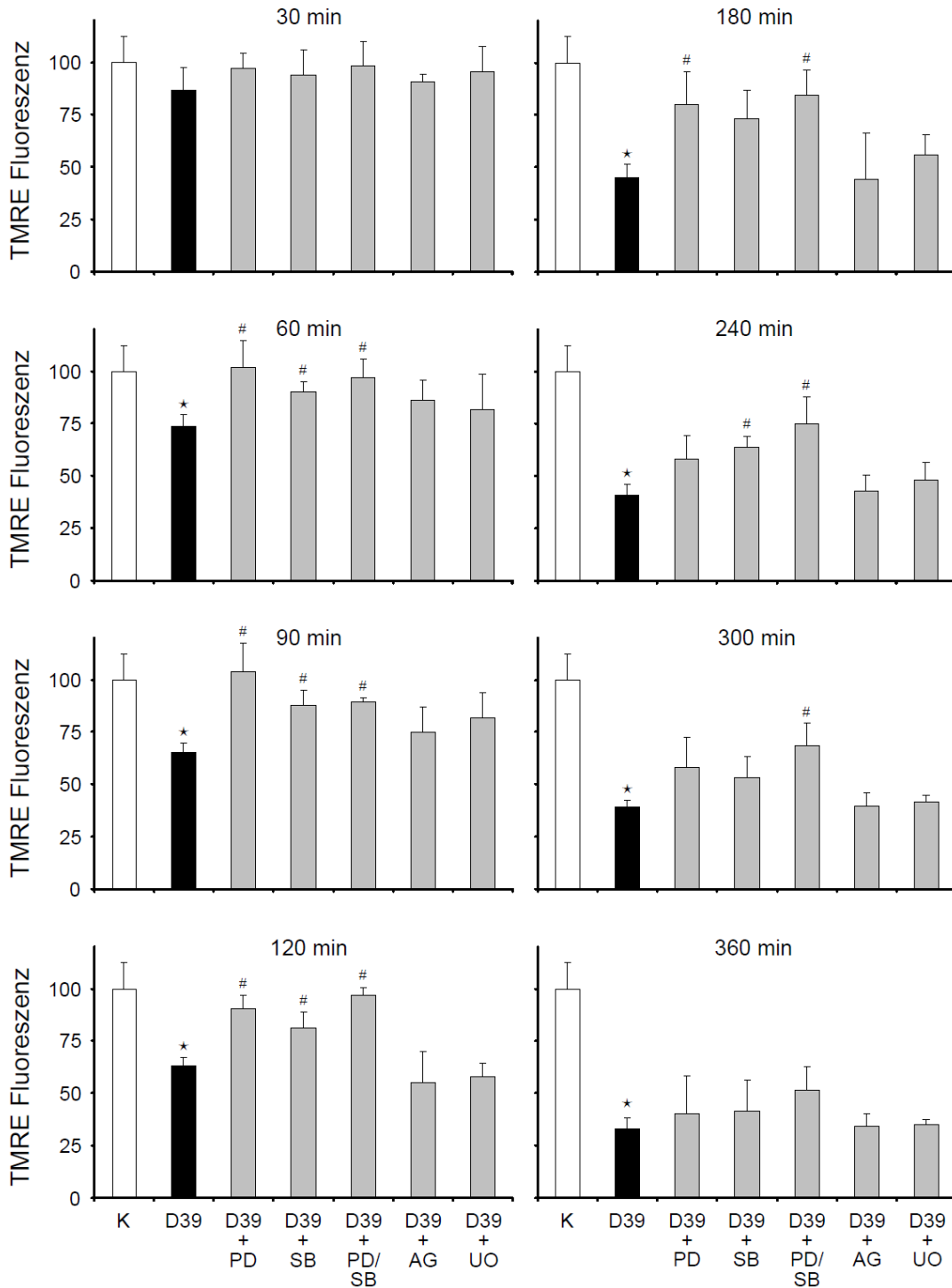
**Abbildung 15: Messung des intraneuronalen Kalziums.** Die Neurone wurden mit Pneumokokken (D39,  $10^7$  KBE/ml) in An- und Abwesenheit von MAPK-Inhibitoren unterschiedlich lange inkubiert und mit dem Kalzium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 gefärbt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Fluo-4-Fluoreszenzstärke aus 3 unabhängigen Experimenten, gemessen bei einer Wellenlänge von 530 nm.  $\star = p \leq 0.05$  D39 im Vergleich zur Kontrolle (K).  $\# = p \leq 0.05$  D39 mit MAPK-Inhibitoren im Vergleich zu D39 ohne MAPK-Inhibitoren.



Zusammenfassend führte die Stimulation von Neuronen mit dem Pneumokokken-Wildtypstamm D39 zunächst zu einem Anstieg, dann wieder zu einer Abnahme des intraneuronalen Kalziums. Durch kombinierte pharmakologische Inhibition von p38 und MEK1/2 (und somit p42) konnte der Anstieg des intraneuronalen Kalziums zu den untersuchten Zeitpunkten verhindert werden. Alleinige Hemmung von p38 oder von MEK1/2 mit dem Inhibitor UO 126 bewirkte einen verringerten und zeitlich verzögerten Anstieg des intraneuronalen Kalziums. Alleinige MEK1/2-Inhibition durch PD 98059 verringerte und verzögerte ebenfalls, allerdings in geringerem Maße, zunächst den Kalziumanstieg in den Neuronen, konnte jedoch nicht den anschließenden Abfall des intraneuronalen Kalziums verhindern. Die Verwendung des Tyrosinkinase-Inhibitors AG 126 führte hingegen zu einem zeitweise verstärkten Anstieg des intraneuronalen Kalziums.

#### **4.8. Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die Pneumokokken-induzierte Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$**

Das Absinken des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\Psi_m$  ist ein typisches Ereignis während der mitochondrialen Apoptose. Auch bei der Pneumokokken-induzierten Apoptose kommt es zu einem Abfall dieses Membranpotentials (Braun *et al.*, 2001 und 2007). Das Ausmaß des Absinkens stellt einen Marker für die Stärke der mitochondrialen Schädigung dar und kann mit der Abnahme der Fluoreszenz des Farbstoffes TMRE gemessen werden, der in intakten Mitochondrien akkumuliert (Bernardi *et al.*, 1999). In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob MAPKinasen-Inhibitoren Einfluss auf das mitochondriale Membranpotential während der Pneumokokken-induzierten Apoptose von Rattenkortexneuronen haben. Die Stimulation erfolgte mit dem Pneumokokken-Wildtypstamm D39 in einer Konzentration von  $10^7$  KBE/ml in An- und Abwesenheit der MAPK-Inhibitoren PD 98059, SB 203580, UO 126 oder AG 126. Zur Kontrolle wurde ein weiterer Teil der Zellen weder mit Pneumokokken noch mit MAPK-Inhibitoren inkubiert (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Messung des neuronalen Mitochondrien-Membranpotentials  $\Delta\Psi_m$ .** Die Neurone wurden mit Pneumokokken (D39,  $10^7$  KBE/ml) in An- und Abwesenheit von MAPK-Inhibitoren unterschiedlich lange inkubiert und mit dem Mitochondrienpotential-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff TMRE gefärbt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen TMRE-Fluoreszenzstärke von 3 unabhängigen Experimenten, gemessen bei einer Wellenlänge von 580 nm. \* =  $p \leq 0.05$  D39 im Vergleich zur Kontrolle (K). # =  $p \leq 0.05$  D39 mit MAPK-Inhibitoren im Vergleich zu D39 ohne MAPK-Inhibitoren.

Abbildung 16 zeigt ein kontinuierliches Absinken der TMRE-Fluoreszenz der alleinig mit D39 stimulierten Neurone. Bereits 60 Minuten nach Beginn der Stimulation war die Fluoreszenz signifikant niedriger als die der Kontrollneurone. Nach 4 Stunden betrug sie nur noch ca. 45%, nach 6 Stunden ca. 35% der Fluoreszenz der Kontrollneurone. Zusätzliche Inkubation mit PD 98059 führte im Vergleich zu den nur mit Pneumokokken behandelten Neuronen bei den Stimulationszeiten von bis zu 3 Stunden zu einer signifikant geringeren Abnahme der Fluoreszenz. Bis zu 90 Minuten nach Stimulationsbeginn war noch keine Abnahme der Fluoreszenz zu erkennen; nach 3 Stunden betrug sie noch ca. 80% der Fluoreszenzstärke der Kontrollneurone. Zu den späteren Zeitpunkten war kein signifikanter Unterschied zur Fluoreszenzstärke der alleinig mit Pneumokokken behandelten Neurone nachzuweisen.

Bei Verwendung von SB 203580 konnte - mit Ausnahme des Zeitpunktes 3 Stunden - bis zu einer Stimulationsdauer von 4 Stunden ein statistisch signifikant geringerer Fluoreszenzabfall im Vergleich zu den nur mit Bakterien inkubierten Neuronen erzielt werden. Es zeigte sich hier nach 1 Stunde eine leichte Abnahme der TMRE-Fluoreszenz auf ca. 90%, nach 4 Stunden auf ca. 65% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollneuronen.

Die gleichzeitige Inkubation mit PD 98059 und SB 203580 von Pneumokokken-stimulierten Neuronen führte sogar bis zu einem Stimulationszeitpunkt von 5 Stunden zu einer signifikanten Reduktion des Abfalls der TMRE-Fluoreszenz. Sie lag nach 4 Stunden noch bei ca. 75%, nach 5 Stunden bei ca. 65% der Fluoreszenzstärke der unbehandelten Kontrollneurone.

Bei zusätzlicher Inkubation mit den Inhibitoren AG 126 oder UO 126 waren zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede zur Fluoreszenzstärke der alleinig mit Pneumokokken inkubierten Neurone zu verzeichnen.

Es kann also zusammengefasst werden, dass die MAPK-Inhibition den Pneumokokken-induzierten Abfall des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\Psi_m$  von Neuronen zeitlich verzögern und verringern konnte. Die kombinierte Inhibition der p38 und p42-MAPK-Kaskade mittels SB 203580 und PD 98059 war effektiver als die alleinige Inhibition einer der beiden Kaskaden. Die Hemmung von p42 mit PD 98059 war besser wirksam als mit UO 126. UO 126 sowie auch der Tyrosinkinaseinhibitor AG 126 konnten ein Absinken des Membranpotentials während der Pneumokokken-Stimulation von Neuronen nicht verringern.

## 5. Diskussion

Trotz multimodaler Therapieansätze verursacht die Pneumokokken-Meningitis auch heute noch eine hohe Mortalität und Morbidität. Ein entscheidender pathophysiologischer Mechanismus ist hierbei die durch Pneumokokken induzierte neuronale Apoptose. Wie in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, ist diese im Gegensatz zu klassischen Apoptosemodellen nicht durch Caspasen gesteuert (Braun *et al.*, 2001). Ziel dieser Arbeit war es daher, die Pneumokokken-induzierten Apoptosesignalwege näher zu charakterisieren. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Rolle der MAP-Kinasen.

Zunächst sollen im Folgenden die erzielten Ergebnisse kurz zusammengefasst werden:

- 1) Durch die Stimulation von primären embryonalen Rattenkortexneuronen mit *S. pneumoniae* war zeit- und dosisabhängig eine Phosphorylierung und somit Aktivierung der MAP-Kinasen p44/42 und p38, hingegen eine Dephosphorylierung und somit Deaktivierung der MAP-Kinase JNK zu beobachten.
- 2) Bei der Pneumolysin- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-defizienten Pneumokokkenmutante (*plyA<sup>-</sup>/spxB<sup>-</sup>*) kam es im Vergleich zum Wildtyp verzögert zu einer Zunahme von Phospho-p44/42, einer mildereren Zunahme von Phospho-p38 und keiner Abnahme von Phospho-JNK.
- 3) Die MEK1/2-Inhibitoren (und somit p42-Inhibitoren) PD 98059 und UO 126 sowie der p38-Inhibitor SB 203580 verzögerten, insbesondere in Kombination, die Apoptose Pneumokokken-stimulierter primärer Kortexneurone, während der Tyrosinkinase-inhibitor AG 126 zu keiner Verminderung der Apoptose führte.
- 4) Die kombinierte Anwendung der MAPK-Inhibitoren PD 98059 und SB 203580 führte zu einer verminderten Phosphorylierung der MAP-Kinasen p44/42 und p38 während der Pneumokokken-Stimulation von primären Rattenkortexneuronen. Zugleich verhinderten diese MAPK-Inhibitoren die Dephosphorylierung der MAP-Kinase JNK und erhielten somit deren Aktivität. Dies spricht für eine proapoptotische Funktion der p44/42 MAP-Kinase sowie der p38 MAP-Kinase und für eine antiapoptotische Funktion von JNK bei der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose.

- 5) Eine Änderung der Quantität des proapoptotischen Proteins Bax oder des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 im Zytosol ließ sich bei der durch MAP-Kinase-Inhibitoren verzögerten neuronalen Apoptose nicht nachweisen. Hier konnte kein Zusammenhang der Quantität dieser Proteine mit der Verminderung der Apoptose unter MAP-Kinase-Inhibition festgestellt werden.
- 6) Die Hemmung der MAP-Kinasen p44/42 und p38 durch pharmakologische Inhibitoren verminderte und verzögerte den Anstieg des intraneuronalen Kalziums und reaktiver Sauerstoffradikale sowie das Absinken des Mitochondrienpotentials Pneumokokken-stimulierter Neurone. Dieses könnten mögliche Mechanismen darstellen, über den die MAP-Kinase-Inhibitoren neuronale Apoptose verzögern.

## **5.1. Pneumokokken-Stimulation von Kortexneuronen beeinflusst konzentrations- und zeitabhängig deren MAPK-Phosphorylierung**

MAP-Kinase-Kaskaden sind in allen eukaryoten Zellen vorkommende, kontextabhängig regulierte, amplifizierende Signaltransduktoren. In vielen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sie an essentiellen Funktionen der Zellen wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Immunabwehr und Zelltod beteiligt sind (Tibbles und Woodgett, 1999). Die Rolle der MAP-Kinasen an der Pneumokokken-induzierten Apoptose von Neuronen ist bislang noch nicht untersucht worden. Caspasen, die noch vor kurzem beinahe synonym mit dem Begriff des apoptotischen Zelltod betrachtet wurden, werden bei dieser Apoptose nicht aktiviert (Braun *et al.*, 2001 und 2002).

In der vorliegenden Arbeit gelang mit Hilfe des Western Blots der quantitative Nachweis einer Zu- oder Abnahme des Phosphorylierungszustandes (und somit Aktivierungszustandes) der MAP-Kinasen während Pneumokokken-induzierter Apoptose von Neuronen.

### **5.1.1. Aktivierung der p44/42 während der Pneumokokken-induzierten Apoptose**

Im Falle der MAP-Kinase p44/42 zeigte sich eine Zunahme des Anteils des phosphorylierten Proteins. Dies weist darauf hin, dass es zu einer Aktivierung dieses Signalweges kommt. Bei einer Konzentration vom  $10^7$  KBE/ml Pneumokokken, welche oft im Liquor cerebrospinalis von Patienten mit Pneumokokken-Meningitis vorkommt, war eine sehr starke Zunahme der p44/42

Phosphorylierung messbar. Bei einer niedrigeren Konzentration zeigte sich keine oder nur eine geringe Zunahme der Phospho-p44/42. Somit ist die Aktivierung des p44/42-Signaltransduktionsweges von der Konzentration der Pneumokokken abhängig. Denkbar wäre, dass die Aktivierung der p44/42-MAP-Kinase bzw. übergeordneter Aktivatoren einen bestimmten Schwellenwert erfordert, der von Pneumokokken in niedriger Konzentration nicht erreicht wird.

Darüber hinaus war auch eine zeitabhängige Zunahme der Phospho-p44/42 MAPK zu beobachten. Zu den frühen Zeitpunkten (30 Minuten und 1 Stunde nach Pneumokokken-Applikation), also vor einer lichtmikroskopisch sicher identifizierbaren Apoptose der Neurone, konnte eine leichte Zunahme der aktivierten p44/42 gesehen werden. Nach 3 Stunden zeigten etwa die Hälfte der Zellen lichtmikroskopisch die Zeichen einer Apoptose mit geschrumpftem Kern und Zytoplasma. Dazu korrelierend fand sich eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung von p44/42 nach 1,5 Stunden und nach 3 Stunden.

Ob diese zeit- und dosisabhängige Aktivierung der MAPK p44/42 tatsächlich auf einen Einfluss auf die Apoptose im Sinne einer Förderung des Zelltodes hinweist, konnte zu diesem Zeitpunkt der Experimente jedoch nicht geschlussfolgert werden. Denkbar wäre diese Reaktion z. B. auch im Rahmen einer zellulären Abwehrreaktion und somit Protektion der Neurone.

In der Literatur finden sich sehr viele Beispiele, in denen p44/42 in Abhängigkeit vom Zelltyp und Stimulus entweder eine apoptosefördernde oder -protektive Rolle einnimmt. Lange Zeit galten die MAP-Kinasen p44 und p42 als zellprotektive Proteine. In vielen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sie durch Transduktion von extrazellulären Überlebenssignalen und Aktivierung von Verteidigungsmechanismen Zellschäden bzw. -tod verhindern können. Beispielsweise bewirken nach neuronaler Schädigung verschiedene Substanzen wie cAMP, der Wachstumsfaktor BDNF oder Substanz P über die Aktivierung von p44/42 eine Zellprotektion. In Kulturen von neuronalen Kortex- und Hippokampuszellen konnte nach Exposition mit DNS-schädigenden Substanzen eine p44/42-Aktivierung im Sinne einer „Verteidigungsreaktion“ der Zellen gesehen werden. Hier führte eine gleichzeitige Inhibition dieser Kinasekaskade entweder pharmakologisch oder unter Verwendung dominant-negativer MKK1-Mutanten zu einer erhöhten Apoptoserate und einem verringerten Überleben (Lu *et al.*, 2002; Hetman und Gozdz, 2004). Außerdem konnte in zerebellären Körnerzellen nach Entzug von trophischen Faktoren eine Förderung des BDNF-induzierten Überlebens über die ERK1/2-vermittelte Aktivierung von Rsk2 gezeigt werden. Diese führte zu einer Inaktivierung des proapoptotischen Proteins

Bad, zum anderen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP response element binding protein) (Bonni *et al.*, 1999).

Auf der anderen Seite sind jedoch zunehmend auch zelltodfördernde Funktionen von p44/42 bei Neuronen, aber auch anderen Zelltypen entdeckt worden. Murray und Mitarbeiter postulierten 1998 in einer Studie an einem neuronalen Zellkulturmodell für epileptische Aktivität eine Beteiligung von p44/42 am Zelltod (Murray *et al.*, 1998). Vor allem oxidativer Stress mit Beteiligung reaktiver Sauerstoffradikale führte zu einer p44/42-Aktivierung mit zellschädigenden Folgen, wie bei der Glutamat-induzierten neuronalen Schädigung und beim neuronalem Zelltod nach Gluthation-Entzug gezeigt wurde (Stanciu *et al.*, 2000; de Bernardo *et al.*, 2004). Als weitere Beispiele für schädigende Funktionen einer p44/42-Phosphorylierung sind die Entdeckung einer aberranten neuronalen Expression von phosphorylierter p44/42 in Form von granulären zytoplasmatischen Aggregaten in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten (Zhu *et al.*, 2002) sowie ein gesteigertes Auftreten von phosphorylierter p44/42 in der Penumbra von infarziertem Gewebe bei Patienten nach akutem ischämischen Schlaganfall (Slevin *et al.*, 2000) zu nennen. Wichtig scheint hierbei auch das zeitliche Muster der p44/42-Aktivierung zu sein, denn es zeigten sich Hinweise auf eine Zelltodförderung von p44/42 vor allem im Zusammenhang mit einer verzögerten und persistierenden Aktivierung (Zhu *et al.*, 2002; Stanciu *et al.*, 2000). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben diese Form von später und persistierender Aktivierung gezeigt.

### **5.1.2. Aktivierung der p38 während der Pneumokokken-induzierten Apoptose**

In der vorliegenden Arbeit konnte im Western Blot die Zunahme von Phospho-p38 bei Pneumokokken-stimulierten Neuronen nachgewiesen werden, die wiederum konzentrations- und zeitabhängig war. Dies weist auf eine Aktivierung auch dieses Signalweges und eine möglicherweise proapoptotische Funktion in diesem Apoptosemodell hin.

Die Rolle der p38 MAP-Kinase bei der Apoptose variiert wiederum stark in Abhängigkeit von Zelltyp und Zusammenhang. Als erste stellten Xia und Mitarbeiter die Hypothese auf, dass p38 den Zelltod fördert, da sie in ihren Versuchen eine korrelierende Aktivierung von p38 und der Apoptose von PC12-Zellen unter Entzug von NGF feststellen konnten (Xia *et al.*, 1995). Kummer und Mitarbeiter bestätigten diese Korrelation bei PC12-Zellen nach Wachstumsfaktorentzug und beschrieben eine Verringerung des Zelltodes über eine verminderte p38-Aktivierung sowohl

durch Insulin als auch durch den p38-Inhibitor PD 169316 (Kummer *et al.*, 1997). Auch die p38-Inhibitoren SB 203580 und SB 202190 konnten *in vitro* das Überleben von sensorischen, sympathischen, Ziliar- und Motoneuronen von Hühnerembryos fördern (Horstmann *et al.*, 1998).

Auf der anderen Seite ist ebenso gezeigt worden, dass die p38 MAPK-Kaskade das Überleben von Zellen fördern kann, u. a. in der Studie von Cheng und Mitarbeitern, in der ein neuroprotektiver Effekt von IGF-1 über eine p38-Aktivierung während des Glukose-induzierten programmierten Zelltodes in Neuroblastomzellen nachgewiesen wurde (Cheng und Feldmann, 1998). Zudem kann eine Inhibition von p38 die Apoptose von Zellen verstärken, was in Versuchen mit humanen Kolonkarzinomzellen gezeigt wurde. Bei diesen wurde durch das nichtsteroidale antiinflammatorische Medikament Sulindac Apoptose induziert, welche durch Verwendung des p38-Inhibitors SB 203580 gesteigert wurde (Sun und Sinicrope, 2005).

### ***5.1.3. Inaktivierung der JNK während der Pneumokokken-induzierten Apoptose***

Im Gegensatz zu den MAP-Kinasen p44/42 und p38 konnte mittels Western Blot unter der Pneumokokken-Exposition von Neuronen eine dosis- und zeitabhängige Reduktion des phosphorylierten, aktivierten Anteils der MAP-Kinase JNK gesehen werden. So zeigte sich bei der Behandlung mit einer hohen Konzentration von  $10^7$  KBE/ml Pneumokokken über 4,5 Stunden eine fast vollständige Dephosphorylierung; bei niedrigeren Bakterienkonzentrationen konnte dies nicht nachgewiesen werden. Zeitlich ließ sich 3 und 4,5 Stunden nach Inkubationsbeginn eine Dephosphorylierung nachweisen. Dies weist auf eine Inhibierung des JNK-abhängigen Signalweges während der Pneumokokken-induzierten Apoptose hin.

Insgesamt findet sich also eine umso deutlichere Dephosphorylierung, je weiter die Apoptose der Neurone in den Zellkulturen fortschreitet. Dies steht im Widerspruch zu der lange Zeit vorherrschenden Meinung, dass JNK ein proapoptotisches Protein sei. Die Arbeitsgruppe von Xia und Mitarbeitern zeigte 1995 als erste, dass die JNK-Signalkaskade für die neuronale Apoptose benötigt wird. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von JNK unabhängig von Caspasen-Aktivität ist und Inhibitoren dieses Signalweges Apoptose verhindern können (Park *et al.*, 1996). Weitere Versuche ergaben, dass Hippokampuszellen von Jnk3-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen vor der Exzitotoxizität des Glutamat-Rezeptoragonisten Kainat geschützt waren (Yang *et al.*, 1997). Ebenso wiesen Sympathikusneurone, denen das Gen für



Jnk3 fehlte, eine Resistenz gegenüber einer Apoptose durch den Entzug des Wachstumsfaktors NGF auf (Bruckner *et al.*, 2001).

Dahingegen muss aber die Aktivierung von JNK nicht zwangsläufig an die Auslösung der Apoptose gekoppelt sein. Beispielsweise führte bei Jurkat T-Zellen die Bindung von Fas zu einer JNK-Aktivierung, jedoch erst im Anschluss an die Aktivierung von Caspasen, also nachdem die Mechanismen der Apoptose hier bereits in Gang gesetzt worden sind. Hier konnte keine Verhinderung der resultierenden Apoptose durch Inhibition der JNK-Signalkaskade gesehen werden (Lenczowski *et al.*, 1997).

Im Rahmen einer Stressantwort ist auch eine protektive Funktion von JNK denkbar, wie in Experimenten an Fibroblasten gezeigt wurde, die aufgrund einer c-Jun- und c-Fos-Defizienz eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-Bestrahlung aufwiesen (Whitmarsh und Davis, 1996). Ebenfalls im Sinne einer protektiven Funktion von JNK zeigten jnk1- und jnk2-defiziente Mäuse während der Embryonalentwicklung in verschiedenen Hirnarealen eine gesteigerte Apoptose (Kuan *et al.*, 1999). Auch bei T- und B-Lymphozyten scheint JNK eine antiapoptotische Funktion zu besitzen. T-Zellen mit Verlust des MKK4-Gens zeigten eine erhöhte Rate der durch Fas/CD95- und CD3-vermittelten Apoptose (Nishina *et al.*, 1997). Bei B-Lymphozyten konnte eine Phosphorylierung und Inaktivierung des proapoptotischen Proteins Bad durch JNK gezeigt werden (Yu *et al.*, 2004).

Möglicherweise können die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse, die eine konzentrations- und zeitabhängige Abnahme der JNK-Aktivität nachgewiesen haben, diese zellprotektiven Funktionen von JNK stützen. Zu diesem Stand der Experimente konnte jedoch noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei der Deaktivierung von JNK nicht auch möglicherweise um ein von der Apoptose unabhängiges, zufälliges Phänomen handelte.

## **5.2. Verzögerung der Apoptose Pneumokokken-stimulierter Kortexneuronen durch MAPK-Inhibitoren**

Um eine tatsächliche Bedeutung der MAP-Kinasen innerhalb der neuronalen Apoptose von einem unabhängigen Epiphänomen zu unterscheiden, erfolgte die Untersuchung der Pneumokok-

ken-induzierten Apoptose von Kortexneuronen unter Verwendung pharmakologischer Inhibitoren der p38- und p44/42-MAP-Kinase-Signaltransduktion, also der MAP-Kinasen, die in den zuvor erwähnten Experimenten eine vermehrte Aktivität während der Apoptose gezeigt hatten. Die Quantifizierung der Apoptose erfolgte zum einen morphologisch mit einer Fluoreszenzfärbung der neuronalen Nuklei (Acridinorange/Ethidiumbromid-Assay), die die Unterscheidung gesunder, apoptotischer und nekrotischer Zellen erlaubt. Zum anderen erfolgte die Quantifizierung biochemisch mittels ELISA, mit dem die durch Apoptose entstehenden DNS-Bruchstücke im Zytosol detektiert und photometrisch quantifiziert wurden.

Zur Anwendung kam zunächst der direkte p38-Inhibitor SB 203580. Dieser hemmt durch Bindung an der ATP-Bindungsstelle kompetitiv die katalytische Aktivität der p38 $\alpha$ - und der p38 $\beta$ -Isoformen, ohne deren Phosphorylierungs- und Aktivitätszustand zu beeinflussen (Lee *et al.*, 2000). Dieser p38-Inhibitor bewirkte im AO/EB-Essay nach 3-stündiger Inkubation von Kortexneuronen mit dem Pneumokokken-Stamm D39 eine Minderung der Apoptoserate von 51% auf 13% und nach 4,5-stündiger Inkubation von 68% auf 46%. Auch im Apoptose-ELISA bewirkte die p38-Inhibition eine statistisch signifikante, massive Reduktion der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose.

Die Inhibierung der MAPK p42 erfolgte mit Hilfe der MEK1/2-Inhibitoren PD 98059 und UO 126. MEK1 und MEK2 sind MAPK-Kinasen, die selektiv und nichtkompetitiv die Phosphorylierung der MAP-Kinase p42 katalysieren. Während PD 98059 die Phosphorylierung von unphosphorylierter MEK1/2 hemmt, agiert UO 126 unabhängig vom Phosphorylierungszustand seines Substrates (Dudley *et al.*, 1995; Favata *et al.*, 1998). PD 98059 bewirkte im AO/EB-Assay bei den Pneumokokken-stimulierten Neuronen nach 3 Stunden eine Minderung der Apoptoserate von 51% auf 23%, nach 4,5 Stunden ließ sich jedoch keine Reduktion der Apoptose mehr nachweisen. Auch der ELISA wies eine statistisch signifikante, deutliche Reduktion der Pneumokokken-induzierten neuronale Apoptose durch PD 98059 nach.

UO 126 konnte in der AO/EB-Färbung ein im Vergleich zu PD 98059 besseres Überleben der Neurone bewirken, hier zeigte sich zum Zeitpunkt 3 Stunden eine Minderung der Apoptose von 51% auf 14%, zum Zeitpunkt 4,5 Stunden immer noch von 68% auf 44%. Im Apoptose-ELISA war die Apoptosereduktion unter UO 126 geringer als unter PD 98059. Hier zeigte sich nach vierstündiger Stimulation eine Halbierung der Apoptoserate.

Die kombinierte Inhibition der p38- und p42-Signaltransduktion unter Verwendung von SB 203580 und PD 98059 ergab bei Anwendung beider Methoden die im Vergleich beste Protektion der Neurone. Im AO/EB-Assay konnte nach 3 Stunden eine Apoptosereduktion von 51% auf 10% und nach 4,5 Stunden immer noch von 68% auf 28% nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde der Tyrosinkinaseinhibitor AG 126 verwendet, welcher die Rezeptor-Tyrosinkinase hemmt und so Einfluss auf die p44/42-MAP-Kinase-Aktivität nimmt. Hier konnte in der AO/EB-Färbung keine Verringerung der Pneumokokken-induzierten Apoptose gesehen werden. Im ELISA zeigte sich dahingegen eine Reduktion der Apoptoserate um etwas weniger als die Hälfte. Möglicherweise ist diese Diskrepanz zwischen den beiden Zelltod-Assays damit zu erklären, dass der ELISA eine höhere Sensitivität aufweist und morphologisch nicht sichtbare Unterschiede hinsichtlich des Fortschreitens apoptotischer Prozesse noch nachweisen kann.

Zusammenfassend ist also von einer deutlichen Verzögerung der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose bei Hemmung der p38- oder p42-Signaltransduktion sowie insbesondere bei der gemeinsamen Hemmung beider Transduktionskaskaden auszugehen. Der Tyrosinkinase-Inhibitor AG 126 hatte eine nur im ELISA nachweisbare, geringe protektive Wirkung.

In der Literatur finden sich mehrere Beispiele für eine apoptosemindernde Wirkung von MAP-Kinase-Inhibitoren. Der p38-Inhibitor SB 203580 war ursprünglich als CSAID (cytokine-suppressive anti-inflammatory drug) entwickelt worden und an der Entdeckung der p38-MAP-Kinase beteiligt (Lee *et al.*, 1994). In mehreren Modellen, in denen eine apoptosekorrelierende Aktivitätszunahme von p38 detektiert worden war, hatte sich unter der Inhibition der p38-Signaltransduktion ein verbessertes Überleben der Zellen gezeigt. So konnten die p38-Inhibitoren SB 203580 und SB 202190 *in vitro* das Überleben neuronaler Zellen von Hühnerembryos nach Entzug von NGF (nerve growth factor) fördern. Der Ceramid-induzierte Zelltod primärer Rattenkortexneurone, der zu einer Aktivierung der p38-MAP-Kinase und konsekutiven Freisetzung mitochondrialer, apoptosefördernder Proteine führte, konnte unter Verwendung von SB 203580 oder SB 202190 ebenfalls vermindert werden (Horstmann *et al.*, 1998; Stoica *et al.*, 2005).

Auch bezüglich der Inhibierung der p44/42-MAP-Kinase existieren mehrere Publikationen, die protektive Effekte mit Verminderung von neuronalem Zelltod nach Noxen wie z. B. Peroxynitrit,

Glutathion-Entzug, Glutamat oder oxidativem Stress nachweisen konnten. Beispielsweise konnte ein protektiver Effekt des MEK1/2-Inhibitors UO 126 bei hippokampalen Zelllinien und primären Kortexneuronen nach Glutamat-induziertem oxidativem Stress gezeigt werden. Beim Zink-induzierten Zelltod von PC12-Zellen konnte dieser durch die Inhibition der hier aktivierten MAP-Kinase p44/42 mit PD 98059 reduziert werden (Chu *et al.*, 2004; Stanciu *et al.*, 2000).

Das Tyrophostin AG 126 wurde ursprünglich als antikarzinogener Tyrosinkinase-Inhibitor entwickelt. Im Tierversuch konnte AG 126 während einer durch Pneumokokken-Zellwandbestandteile ausgelösten Meningitis die übermäßige Inflammationsreaktion durch Senkung der Leukozyteninvasion und der TNF- $\alpha$ -Produktion reduzieren (Angstwurm *et al.*, 2004). Die Stimulation von Mikrogliazellen mit Pneumokokken-Zellwänden führte zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums und Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Diese Kalziuserhöhung sowie Freisetzung von Zytokinen konnte durch AG 126 vermindert werden (Kann *et al.*, 2004). In Bezug auf die Pneumokokken-induzierte Apoptose von Neuronen konnte jedoch nur eine geringe Reduktion der Apoptose nachgewiesen werden. Die geringere Wirksamkeit des ebenfalls die p44/42-Signaltransduktion hemmenden AG 126 könnte möglicherweise darin begründet sein, dass dieses eher unspezifisch an einem sehr frühen Punkt in die Signaltransduktionskaskade eingreift, während PD 98059 und UO 126 die direkten Aktivatoren von p42, nämlich MEK 1 und 2 hemmen. So könnten trotz Tyrosinkinaseinhibition viele weitere intrazelluläre Signale zu einer Aktivierung der p44/42 Signalkaskade führen, so dass die Minderung der Aktivierung von p44/42 über AG 126 nicht ausreicht, um die Apoptose der Zellen zu beeinflussen. Außerdem könnten über Tyrosinkinaserzeptoren auch andere, möglicherweise apoptosemindernde Signalwege aktiviert werden, die durch AG 126 ebenfalls gehemmt werden würden.

Im Zusammenhang betrachtet, lassen sich die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse gut mit den Daten aus der Literatur in Einklang bringen. Allerdings existieren bislang nur wenig Arbeiten, welche die Wirkung von MAPK-Inhibitoren bei Bakterien-induzierter Apoptose untersucht haben. So konnte unter Anwendung von SB 203580 die durch *Staphylococcus aureus* induzierte Apoptose von Neutrophilen verringert werden (Lundqvist-Gustafsson *et al.*, 2001). Bei der durch *Helicobacter pylori*-induzierten Apoptose von Magenepithelzellen konnte unter Verwendung dieses Inhibitors ebenfalls eine Apoptosereduktion gesehen werden. Die Anwendung von PD 98059 hingegen hatte einen im Vergleich zur vorliegenden Arbeit gegenteiligen Effekt mit einer Verstärkung der *Helicobacter pylori*-induzierten Apoptose gezeigt (Choi *et al.*,

2003). Dies zeigt erneut die in Abhängigkeit von der Art des Stimulus und vom Zelltyp unterschiedliche MAPK-Regulation.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse sprechen für eine direkte ursächliche Beteiligung der hier diskutierten MAP-Kinasen in einem Modell einer bakteriell-induzierten Apoptose, nämlich bei der Exekution der Pneumokokken-induzierten, Caspasen-unabhängigen Apoptose primärer Neurone.

### **5.3. Dephosphorylierung von p38 und p44/42 durch SB 203590 und PD 98059 bei erhaltener Phosphorylierung von JNK**

In einem weiteren Versuch wurde mittels der Western Blot-Methode untersucht, welche Auswirkungen die MAPK-Inhibitoren auf den Phosphorylierungsstatus von p38, p44/42 und JNK haben. Da die gleichzeitige Gabe von SB 203580 und PD 98059 während der Pneumokokken-Inkubation die effektivste Apoptoseminderung zur Folge hatte, war insbesondere die Auswirkung dieser kombinierten Inhibition auf den Phosphorylierungs- und somit Aktivierungszustand der MAP-Kinasen von Interesse.

Es zeigte sich in diesem Versuch eine deutliche Minderung der Phosphorylierung von p44 und p42, gleichzeitig war auch eine leichtere Abnahme der Phosphorylierung von p38 zu sehen. Hierzu muss erwähnt werden, dass der p38-Inhibitor SB 203580 nur die katalytische Aktivität von Phospho-p38 hemmt, ohne Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus zu nehmen. Die Dephosphorylierung von p38 ist möglicherweise auf eine nicht vollständig selektive Wirkung des MEK1/2-Inhibitors PD 98059 zurückzuführen. Diese Unselektivität stellt ein generelles Problem bei der Verwendung von MAP-Kinase-Inhibitoren dar. So ist umgekehrt auch bekannt, dass SB 203580 bereits in niedrigen Dosierungen im  $\mu\text{mol}$ -Bereich c-Raf, ein Mitglied der p44/42-Kinasekaskade, inhibieren kann (Lee *et al.*, 2000). Möglicherweise kann so auch eine Abnahme der Phosphorylierung von p44 erklärt werden, denn PD 98059 hemmt über Inhibition von MEK1/2 nur die Phosphorylierung der MAPK p42 (Dudley *et al.*, 1995). Die gemeinsame Hemmung von p44, p42 und p38 bewirkte die effektivste Protektion der Pneumokokken-induzierten Apoptose von Neuronen.

Interessanterweise war im gleichen Versuch unter der Anwendung von PD 98059 und SB 203580 auch eine Verminderung der Dephosphorylierung von JNK im Western Blot zu erkennen. Aufgrund der verminderten Aktivität von p44/42 und p38 entstehen vermutlich auch geringere Wechselwirkungen zwischen diesen Kinasen und JNK, was möglicherweise zu einer persistierenden Aktivierung von JNK führt. Diese anhaltende Aktivierung könnte ebenfalls zu dem verbesserten Überleben der Neurone beitragen. Ob die bei der Pneumokokken-Inkubation stattfindende Dephosphorylierung von JNK tatsächlich apoptosefördernd ist, kann zum momentanen Zeitpunkt nur gemutmaßt und nicht sicher beantwortet werden. Die Klärung dieser Frage wird nachfolgenden Arbeiten überlassen bleiben.

#### **5.4. Verzögerte Phosphorylierung von p44/42 und p38 und fehlende Dephosphorylierung von JNK durch die *S. pneumoniae*-Doppelmutante *plnA*<sup>-</sup>/*spxB*<sup>-</sup>**

Pneumolysin und Wasserstoffperoxid sind zwei für die Virulenz von *S. pneumoniae* wesentliche Exotoxine. Da sich Pneumokokken im Subarachnoidalraum vermehren und selbst nicht in direkten Kontakt zu den Nervenzellen gelangen können, interessiert die Rolle der löslichen bakteriellen Bestandteile wie Toxine und Zellwandbestandteile, die in den zerebralen Extrazellularraum diffundieren können. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit zeigte sich in den versuchsbegleitend durchgeführten, lichtmikroskopischen Kontrollen eine deutlich geringere Apoptoserate zum Zeitpunkt von 3 Stunden und 4,5 Stunden nach Stimulationsbeginn bei Verwendung der Pneumolysin- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-defizienten Pneumokokken-Doppelmutante (*plnA*<sup>-</sup>/*spxB*<sup>-</sup>) im Vergleich zum Wildtyp. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die beiden Exotoxine an der neuronalen Apoptose beteiligt sind. Hier wurde nachgewiesen, dass die Exotoxine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Pneumolysin in der Lage sind, über eine Schädigung der Mitochondrien und den Verlust des mitochondrialen Intermembranpotentials Cytochrom-c und AIF in das Zytosol freizusetzen. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und Pneumolysin-defiziente Pneumokokkenstämme lösten deutlich weniger neuronale Apoptose aus (Braun *et al.*, 2002).

Somit stellte sich die Frage, ob diese Verminderung der Apoptoserate bei Verwendung Pneumolysin- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-defizienter Pneumokokken möglicherweise mit einer veränderten Aktivierung der MAP-Kinasen korreliert. Hier ließ sich in den Stimulationsversuchen mit kortikalen Neuronen im Western Blot im Vergleich zur Inkubation mit dem Wildtyp eine Verzögerung der

Phosphorylierung bzw. Aktivierung der MAP-Kinase p44/42 nachweisen. Hinsichtlich der MAP-Kinase p38 war bei Verwendung der Doppelmutante *plnA<sup>-</sup>/spxB<sup>-</sup>* nach 3-stündiger Inkubation im Vergleich zu Wildtyp-Pneumokokken eine geringere Aktivierung nachzuweisen. Außerdem zeigte sich keine Dephosphorylierung und somit keine Inaktivierung der MAP-Kinase JNK bei Inkubation mit der Doppelmutante *plnA<sup>-</sup>/spxB<sup>-</sup>*. Rückschließend könnte dies möglicherweise bedeuten, dass die Pneumolysin- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-defiziente Pneumokokken-Doppelmutante aufgrund der beschriebenen verzögerten bzw. schwächeren p44/42- und p38-Aktivierung sowie der fehlenden JNK-Inaktivierung eine verminderte Apoptose verursacht. Diese veränderte Aktivierung der MAP-Kinasen könnte ein Grund für die geringere Neurotoxizität der Pneumokokken-Doppelmutante *plnA<sup>-</sup>/spxB<sup>-</sup>* sein.

## **5.5. Kein Effekt auf die Expression von Bax und Bcl-2 im Zytosol durch MAPK-Inhibition**

Offenbar hat eine verminderte Aktivierung der MAP-Kinasen p44/42 und p38 und/oder eine verminderte Inaktivierung von JNK Einfluss auf das verbesserte Überleben der Kortexneurone während der Stimulation mit Pneumokokken: Die Zellen, die mit PD 98059 und SB 203580 inkubiert worden waren, zeigten eine deutlich verminderte Apoptose. Der genaue Mechanismus dieser Zellprotektion ist jedoch unklar. Eine mögliche Erklärung könnte eine Veränderung im Gleichgewicht der apoptoseregulierenden Proteine der Bcl-2-Familie sein, die durch die veränderte MAPK-Regulation verursacht wird. Diese Proteine beeinflussen v. a. die Integrität der Mitochondrienmembran und regulieren so die Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Intermembranraum der Mitochondrien. Dazu gehören Cytochrom-c, das über Bildung des Apoptosoms zur Caspasen-Aktivierung und Apoptose führt, aber auch mitochondriale Proteine, die Caspasen-unabhängig Apoptose auslösen können, wie AIF, Endonuklease G und Omi/HtrA2. Die Bcl-2-Proteinfamilie ist damit ein entscheidender Regulator der mitochondrialen Apoptose (Donovan und Cotter, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb zwei Schlüsselproteine der Bcl-2-Familie untersucht, zum einen das proapoptotische Protein Bax, zum anderen das antiapoptotische Protein Bcl-2. In den in Kapitel 3.5 vorgestellten Untersuchungen konnten im Western Blot zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in der quantitativen Proteinexpression von Bcl-2 oder Bax in Neuronen nach Sti-

mulation mit Pneumokokken detektiert werden. Auch die gleichzeitige Anwendung von MAPK-Inhibitoren hatte keinen Einfluss auf die Expression dieser Proteine in Kortexneuronen.

Daraus lässt sich schließen, dass die protektive Wirkung der verwendeten MAP-Kinase-Inhibitoren nicht mit der Menge des antiapoptotischen Bcl-2 oder des proapoptotischen Bax korreliert. Möglicherweise spielen diese Proteine also keine Rolle im verwendeten Pneumokokken-induzierten und durch MAP-Kinasen beeinflussten Apoptosemodell. Es könnten beispielsweise andere Proteine der Bcl-2-Familie von entscheidender Bedeutung sein. Beispielsweise konnte in zerebellären Körnerzellen nach Exposition mit verschiedenen Noxen zeitabhängig eine Bax- und Caspasen-unabhängige, Calpain- und AIF-abhängige Apoptose nachgewiesen werden (Diwakarla *et al.*, 2009). Bei der Celecoxib-induzierten Apoptose von T-Lymphomzellen konnte eine wesentliche Beteiligung des proapoptotischen Proteins Bak und eine fehlende protektive Wirkung bei Überexpression von Bcl-2 gezeigt werden (Müller *et al.*, 2008).

Dennoch kann ein Einfluss von Bcl-2 und Bax auf das verbesserte Überleben der Neurone in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell unter Verwendung der MAPK-Inhibitoren nicht ausgeschlossen werden. In der Literatur ist die Beeinflussung der Bcl-2-Proteine durch MAP-Kinasen in Neuronen beschrieben. Entscheidend für die Aktivität und die Wirkung der Proteine der Bcl-2-Familie sind nicht allein die Menge bzw. eine verstärkte Neusynthese oder ein verstärkter Abbau des vorhandenen Proteins, sondern insbesondere auch posttranslationale Modifikationen in Form von Phosphorylierungen oder Spaltung der Proteine, Konformationsänderungen, Oligomerisierungen und Translokationen in andere Zellkompartimente. In den dargestellten Experimenten erfolgte die Verwendung des gesamten Zelllysats, also des zytosolischen und kompartimentalisierten Proteins. Insbesondere eine Untersuchung des mitochondrialen Anteils von Bax nach subzellulärer Fraktionierung muss für weiterführende Untersuchungen gefordert werden, da die Translokation dieses Proteins vom Zytosol in die mitochondriale Membran entscheidend für seine Funktion ist.

Über Bcl-2 ist bekannt, dass posttranslationale Phosphorylierung seine Funktion beeinflussen kann. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass p44/42 in der Lage ist, Bcl-2 zu phosphorylieren und damit seine antiapoptotische Funktion zu reduzieren (Tamura *et al.*, 2004). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass p44/42 durch eine Phosphorylierung von Bcl-2 die Translokation von Bax ins Mitochondrium fördert und somit die Apoptose begünstigt (Ishikawa



*et al.*, 2003). Dahingegen kann eine Phosphorylierung von Bcl-2 durch JNK dessen antiapoptotische Aktivität verstärken (Deng *et al.*, 2001).

Die Rolle der hier vorgestellten apoptoseregulierenden Proteine Bax und Bcl-2 erscheint im Zusammenhang betrachtet komplex und stets kontextabhängig zu sein. Weiterführende molekularebiologische Untersuchungen, wie etwa die Analyse der subzellulären Lokalisation dieser Proteine oder die Aufklärung ihrer spezifischen, posttranslationalen Modifikationen könnten Aufschluss über die genaue Rolle von Bax und Bcl-2 bei der durch MAP-Kinasen vermittelten Apoptose in Neuronen geben.

## **5.6. MAPK-Inhibition führt zu einer verminderten Generierung reaktiver Sauerstoffradikale**

Eine weitere Möglichkeit, wie die MAPK-Inhibition neuronale Apoptose vermindern kann, könnte ein Einfluss auf die Generierung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) sein. ROS fungieren als Signaltransduktoren, über die eine Beeinflussung apoptotischer Prozesse erfolgen kann. Sie werden vorwiegend in Mitochondrien bei Störungen des Elektronentransportes in der Atmungskette gebildet, die z. B. auch im Rahmen apoptotischer Prozesse durch Verlust von Cytochrom c auftreten. Außerdem können Pneumokokken aufgrund ihrer Produktion des Exotoxins H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> den Gehalt an reaktiven Sauerstoffradikalen noch erhöhen. ROS können zum einen zur Auslösung einer Caspasen-abhängigen oder -unabhängigen mitochondrialen Apoptose führen, zum anderen auch zur Unterhaltung der Apoptose beitragen. Durch eine übermäßige Bildung von ROS kommt es zu einer zunehmenden Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, zum Absinken des mitochondrialen Intermembranpotentials und zur Freisetzung proapoptotischer Proteine. Außerdem können ROS proapoptotische Proteine aus der Bcl-2-Familie modifizieren und so deren Funktion verstärken, die Permeabilität der Mitochondrienmembran weiter zu erhöhen. ROS führen zudem zur Freisetzung anderer apoptosefördernder Mediatoren wie Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum und Cathepsinen aus Lysosomen (Hail *et al.*, 2006).

Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass die durch den Pneumokokken-Wildtyp D39 induzierte Apoptose von Mikrogliazellen zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoffradikale führt. Dieser Anstieg ist ebenfalls bei der Pneumolysin-induzierten Apoptose von primären Neu-

ronen zu verzeichnen. Die Antioxidanzien Katalase und N-Acetyl-Cystein (NAC) konnten *in vitro* bei Mikrogliazellen sowie *in vivo* bei Hippokampusneuronen von Kaninchen die durch die Pneumolysin-defiziente Pneumokokken-Mutante (*plnA*<sup>-</sup>) ausgelöste Apoptose reduzieren (Braun *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2007). Dies spricht für eine ursächliche Beteiligung von ROS bei der Pneumokokken-induzierten Apoptose.

Unklar ist bislang, welche genauen Mechanismen zu diesem Anstieg an reaktiven Sauerstoffradikalen führen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der MAP-Kinasen p38 und p42 neben der zeitlichen Verzögerung der Apoptose von primären Neuronen auch eine Reduktion der ROS-Produktion dieser Zellen zur Folge hatte. Dabei war die Inhibition der p42 MAP-Kinase durch den Inhibitor UO 126 besonders effektiv. Die Inhibition von p38 durch den Inhibitor SB 203580 konnte ebenfalls ähnlich effektiv die ROS-Produktion vermindern. Eine gleichzeitige Inhibition von p42 durch den Inhibitor PD 98059 war der alleinigen p38-Inhibition durch SB 203580 nicht überlegen, was auf eine geringe Wirksamkeit von PD 98059 hinsichtlich der Senkung von ROS hinweist.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Aktivierung der p38- und p44/42-Signalkaskaden zu dem Anstieg der reaktiven Sauerstoffradikale während der neuronalen Apoptose beiträgt. Möglicherweise sind die proapoptotischen Eigenschaften dieser MAP-Kinasen teilweise durch Induktion der Generierung von ROS bedingt.

In der Literatur sind zahlreiche Zusammenhänge zwischen ROS und MAP-Kinasen während der Apoptose verschiedenster Zellsysteme beschrieben. Diese Zusammenhänge beruhen jedoch größtenteils auf einer Aktivierung der MAP-Kinasen, die bedingt ist durch einen intrazellulären Anstieg an ROS (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Dahingegen findet sich nur sehr wenig Literatur über eine umgekehrte Beeinflussung, also eine Induktion von ROS nach MAPK-Aktivierung. Als Beispiel konnten Han und Mitarbeiter bei der Arsenitoxid-induzierten Apoptose von Lungenzellen eine Zunahme von ROS sowie auch der Apoptose unter der Inhibition von JNK und p38 nachweisen (Han *et al.*, 2009). Bei Alveolarmakrophagen, bei denen die p44/42 MAP-Kinase und ihr Aktivator MEK konstitutiv aktiv sind, führten eine pharmakologische MEK-Inhibition mit UO 126 sowie Versuche mit MEK-defizienten Makrophagen zu einer Reduktion des mitochondrialen Anteils von p44/42 und zu einem Anstieg von ROS, einem raschen Abfall des Mitochondrienpotentials und zu verstärktem apoptotischen und nekrotischen Zelltod (Monick *et al.*, 2008). Diese Arbeiten zeigen also im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit eine Zunahme von ROS und Förderung von Apoptose durch MAP-Kinase-Inhibition. Es ist wahr-

scheinlich, dass durch Inhibition der MAPK-Signalkaskaden wiederum in Abhängigkeit vom Zelltyp und Stimulus pro- oder antiapoptotische Vorgänge über Beeinflussung der ROS-Produktion unterstützt werden.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass durch die aktivierten p38- und p44/42-Signalwege die Generierung reaktiver Sauerstoffradikale im Mitochondrium gesteigert wird. Ein denkbarer Mechanismus, über den MAP-Kinasen eine Zunahme der ROS-Produktion beeinflussen könnten, wäre beispielsweise eine Phosphorylierung und Verstärkung proapoptotischer Funktionen von Proteinen der Bcl-2-Familie. Diese führen über eine Verstärkung der Permeabilität der Mitochondrienmembran zu einem Abfall des Mitochondrienpotentials und konsekutiv zur Störung des Elektronentransportes der Atmungskette und ROS-Generierung. Gestützt wird diese Hypothese durch den ebenfalls in dieser Arbeit gezeigten verminderten Abfall des Mitochondrienpotentials bei Verwendung der MAPK-Inhibitoren bei der Pneumokokken-induzierten Apoptose (siehe Kapitel 4.8).

## **5.7. MAPK-Inhibition reduziert den Anstieg des intrazellulären Kalziums**

Der intrazelluläre Kalziumgehalt spielt bei Auslösung von apoptotischen Vorgängen eine entscheidende Rolle. Die Kalziumspeicherung und Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase in den Zellen erfolgt größtenteils im endoplasmatischen Retikulum (ER). Ein erhöhter zellulärer Kalziumgehalt fördert die Permeabilität der Mitochondrienmembran, einen Ionen- und Flüssigkeitseinstrom in den Intermembranraum und schließlich die Freisetzung proapoptotischer Proteine. Außerdem wird bei anhaltend erhöhtem intrazellulärem freiem Kalzium Apoptose gefördert, indem kalziumabhängige proapoptotische Proteine wie Calpaine, Endonukleasen und Phospholipasen im Zytoplasma aktiviert werden. Bei erhöhtem intrazellulärem Kalziumspiegel kann das proapoptotische Bcl-2-Protein Bad dephosphoryliert werden und zum Mitochondrium translozieren oder es könne Caspasen aktiviert werden (Hail *et al.*, 2006; Sastry und Rao, 2000). Sowohl bei der durch den Pneumokokken-Wildtyp D39 ausgelösten Apoptose von Mikrogliazellen und zerebralen Endothelzellen als auch bei der durch Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierten Apoptose von primären Rattenneuronen konnte ein Anstieg des intrazellulären Kalziums gemessen werden. Gleichzeitige Anwendung des Kalziumchelators BAPTA-AM konnte die zuvor ge-

sehene Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium der Neurone und die Apoptose der Zellen verhindern (Braun *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2007; Bempohl *et al.*, 2005).

Daher stellte sich in dieser Arbeit die Frage, ob die MAPK-Inhibition über eine Verringerung des intrazellulären Kalziums eine Minderung der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose verursachen könnte. In den hier vorgestellten Experimenten zeigte sich bei der Pneumokokken-induzierten Apoptose zunächst ein Anstieg, im weiteren Zeitverlauf und Fortschreiten der apoptotischen Vorgänge hingegen wieder ein Absinken des intraneuronalen Kalziums. Durch kombinierte pharmakologische Inhibition von p38 und p42 konnte diese Zu- und Abnahme des Kalziums verhindert werden. Alleinige Hemmung von p38 mit dem Inhibitor SB 203580 oder von p42 mit dem Inhibitor UO 126 konnte den Anstieg des intraneuronalen Kalziums verringern und zeitlich verzögern, während alleinige p42-Inhibition durch PD 98059 diesbezüglich geringer wirksam war. Die Verwendung des Tyrosinkinaseinhibitors AG 126 hingegen verstärkte den Anstieg des intraneuronalen Kalziums; in Kapitel 4.2. wurde bereits erläutert, dass unter dieser Inhibition keine Protektion der Neurone im AO/EB-Assay gesehen werden konnte.

Insgesamt korrelieren die Daten des verzögerten Kalziumanstieges unter der MAPK-Inhibition gut mit der in Kapitel 4.2. dargestellten verzögerten Pneumokokken-induzierten Apoptose der mit MAPK-Inhibitoren behandelten Neurone. Somit kann die Hypothese gefolgert werden, dass der protektive Effekt der p38- und p42-Inhibition teilweise auf eine Verhinderung des raschen Kalziumanstieges zurückzuführen sein kann.

Während bekannt ist, dass Änderungen der Kalziumkonzentration über Beteiligung von Kalzium/Calmodulin-Kinasen Einfluss auf die MAP-Kinasen-Aktivierung hat (Tibbles und Woodgett, 1999), ist bislang nur wenig darüber bekannt, wie sich umgekehrt eine MAPK-Aktivierung auf die Regulation des intrazellulären Kalziums auswirkt. In einer Arbeit über die protektive Wirkung von 17 $\beta$ -Estradiol induzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Hippokampus-Neuronen die Phosphorylierung von p44/42, einen Anstieg des intrazellulären Kalziums und Apoptose der Zellen. Diese Prozesse konnten sowohl durch den MEK-Inhibitor UO 126 als auch durch 17 $\beta$ -Estradiol verhindert werden, was auf eine Beteiligung von p44/42 in der Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration hinweist (Numakawa *et al.*, 2007). Die Mechanismen, über die MAP-Kinasen intrazelluläres Kalzium erhöhen, sind unklar. Eine Möglichkeit könnte eine Glutamat-induzierte Öffnung ionotroper Glutamatrezeptoren und spannungsgesteuerter Kalziumkanäle sein, denn Aktivierung von MAP-Kinasen kann zu einer massiven Freisetzung von Glutamat führen (Numakawa *et al.*, 2002). Denkbar wäre auch, dass die in Kapitel 5.6. erläuterte Zunahme von intrazellulärem ROS

zu einer Freisetzung von Kalzium aus dem ER führt, und die vorgeschädigten Mitochondrien aufgrund eines Energiemangels den Anstieg des Kalziums nicht ausreichend abpuffern können.

### **5.8. MAPK-Inhibition führt zu einer verminderten Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials**

Der Einfluss von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und Kalzium auf die Apoptose ist eng mit einem Absinken des mitochondrialen Membranpotentials verknüpft. Mitochondrien sind zur Aufrechterhaltung der Zellfunktionen essentiell, da sie für die Energieproduktion der Zelle zuständig sind. Sie sind jedoch gerade deshalb auch von entscheidender Funktion bei der Regulation des Zelltodes. Die wichtigsten Abläufe, die hierfür verantwortlich sind, spielen sich im Intermembranraum des Mitochondriums ab. Die im Intermembranraum befindliche Elektronentransportkette sorgt hier für eine ungleiche Protonenverteilung und schafft so einen elektrochemischen Gradienten, das mitochondriale Membranpotential (siehe hierzu auch Kapitel 1.3.1) (Stefanis, 2005).

Proteine der Bcl-2-Familie können zu einer Störung der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran durch Porenbildung führen. Dieses führt zum Abfall des Mitochondrienmembranpotentials und zur Freisetzung von Proteinen, die einen apoptotischen Zelltod auslösen. Als Beispiele seien hier die in die Caspasen-abhängige Apoptose involvierten Proteine Cytochrom c, Smac/DIABLO und HtrA2/Omi sowie die Caspasen-unabhängig agierenden Proteine AIF und Endonuklease G genannt (Donovan und Cotter, 2004).

Die Integrität der inneren Mitochondrienmembran kann hingegen durch verschiedene Regulatoren der sogenannten „mitochondrial permeability transition“ (MPT) gestört werden. Diese Störung soll eher einen nekrotischen Zelltod hervorrufen. Man nimmt an, dass die MPT aus einer Interaktion zwischen den in der inneren Membran lokalisierten Proteinen Cyclophilin D und Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) mit einem spannungsgesteuerten Anionenkanal (VDAC) der äußeren Membran besteht. ROS oder Kalzium können zu einer Porenformung dieses Proteinkomplexes führen, was zum Abfall des mitochondrialen Membranpotentials und vermutlich zu zwei verschiedenen Phänomenen führt: Zum einen wird der Elektronentransport der Atmungskette und somit die Energieproduktion in Form von ATP beeinflusst und so ein nekrotischer Zelltod ausgelöst. Zum anderen kommt es über die Pore zu einer Verschiebung von Ionen und

Wasser aus dem Zytosol in das Mitochondrium, was konsekutiv zur Schwellung und schließlich zur Rupturierung des Mitochondriums führt. Durch Freisetzung seiner Bestandteile inklusive der proapoptischen Proteine wird ein apoptotischer Zelltod ausgelöst (Crompton, 1999).

Es kommt also sowohl bei Störungen der äußeren als auch der inneren Mitochondrienmembran zu einem Abfall des Intermembranpotentials. Wahrscheinlich sind beide Mechanismen eng miteinander verzahnt, so dass es häufig zu gemischten Zelltodformen kommt, die mehr oder weniger apoptose- oder nekroseähnlich sind (Armstrong, 2006).

Bezugnehmend auf die Pneumokokken-induzierte Apoptose konnte durch Stimulation mit dem Wildtypstamm D39 bei Mikrogliazellen und primären zerebralen Endothelzellen ein Abfall des Mitochondrienpotentials nachgewiesen werden. Dieser Abfall ging den morphologischen apoptotischen Veränderungen der Zellen voraus und war von einer Abnahme von mitochondrialem AIF und dessen Translokation in das Zytosol begleitet (Braun *et al.*, 2001; Bermpohl *et al.*, 2005). Die Stimulation primärer Rattenneurone mit Pneumolysin führte ebenfalls zu einem raschen Abfall des Mitochondrienpotentials. Außerdem konnte hier eine massive Schwellung der Mitochondrien und Translokation von AIF in das Zytosol gezeigt werden. Interessanterweise ließ sich im Gegensatz zu intaktem Pneumolysin keine Translokation von Pneumolysin, dem die porenformende Aktivität fehlt, an die Mitochondrien nachweisen. Dies lässt vermuten, dass Pneumolysin durch Porenformung in der Mitochondrienmembran aktiv zum Abfall des Mitochondrienpotentials und Freisetzung proapoptischer Proteine beiträgt (Braun *et al.*, 2007).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein Abfall des mitochondrialen Membranpotentials in primären Rattenkortexneuronen nach Inkubation mit dem Pneumokokken-Wildtyp D39 gezeigt werden. Dieser Abfall ließ sich durch pharmakologische Inhibition der MAP-Kinasen p38 und p42 vermindern. Besonders effektiv war hier wiederum die kombinierte Inhibition beider Kinasekaskaden mittels SB 203580 und PD 98059. Hemmung der p42 MAPK durch UO 126 sowie auch der Tyrosinkinaseinhibitor AG 126 konnten ein Absinken des Membranpotentials nicht wesentlich verringern.

Diese Ergebnisse korrelieren mit der in Kapitel 4.2. dargestellten verzögerten neuronalen Apoptose unter kombinierter und alleiniger Inhibition von p38 und p42. Weniger gut korreliert jedoch der geringe Effekt des p42-Inhibitors UO 126 auf das Absinken des mitochondrialen Membranpotentials in Hinblick auf die in 4.2. dargestellte gute Verminderung der neuronalen Apoptose unter Verwendung dieses Inhibitors.

In der publizierten Literatur wurde beschrieben, dass die MAP-Kinasen p38, p44/42 und JNK auch in den Mitochondrien lokalisiert sind bzw. dorthin translozieren und hier Apoptose modifizieren können. So wurde bei PC12-Zellen durch Stimulation mit Hydroxydopamin eine Apoptose ausgelöst, die von einem Anstieg der phosphorylierten JNK2 im Mitochondrium begleitet war. Pharmakologische Inhibition von JNK durch SB 600125 reduzierte hier die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol sowie die Apoptose (Eminel *et al.*, 2004). Die Ceramid-induzierte Apoptose von Kardiomyozyten wurde von einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials und einer Phosphorylierung des mitochondrialen Anteils der p38 MAP-Kinase begleitet. Der p38-Inhibitor SB 202190 konnte diesen Abfall des Membranpotentials und Apoptose verringern (Kong *et al.*, 2005). Bei Alveolarmakrophagen konnte gezeigt werden, dass die hier konstitutiv aktive p44/42 MAP-Kinase und dessen Aktivator MEK an den Mitochondrien lokalisiert sind und an der Aufrechterhaltung des Mitochondrienpotentials sowie dem optimalen Funktionieren des Elektronentransportes in der Atmungskette wesentlich beteiligt sind. Eine pharmakologische MEK-Inhibition mit UO 126 sowie Versuche mit MEK-defizienten Makrophagen führten zu einer Reduktion des mitochondrialen Anteils von p44/42 und zu einem raschen Abfall des Mitochondrienpotentials. Außerdem kam es zu einem Anstieg von ROS und zu verstärktem apoptotischen und nekrotischen Zelltod (Monick *et al.*, 2008).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann in dem Modell der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose eine Förderung dieser Apoptose durch Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials über möglicherweise hier direkt lokalisierte p44/42- und p38-MAP-Kinasen vermutet werden. Wahrscheinlich liegt eine enge Verzahnung mit der ebenfalls durch diese MAP-Kinasen beeinflussten Zunahme von ROS und Kalzium während dieser Apoptose vor.

## **5.9. Mechanistische Betrachtung der MAP-Kinase-vermittelten Apoptose Pneumokokken-stimulierter Kortexneurone**

Die Rolle der MAP-Kinasen bei der durch direkte Effekte der Pneumokokken ausgelösten neuronalen Apoptose ist deswegen interessant, da es sich hierbei um eine Caspasen-unabhängige Apoptose handelt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Exotoxine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Pneumolysin in der Lage sind, über eine Schädigung der Mitochondrien und den Verlust des mitochondrialen Intermembranpotentials Cytochrom-c und AIF in das Zytosol freizusetzen. Cytochrom-c ist hier

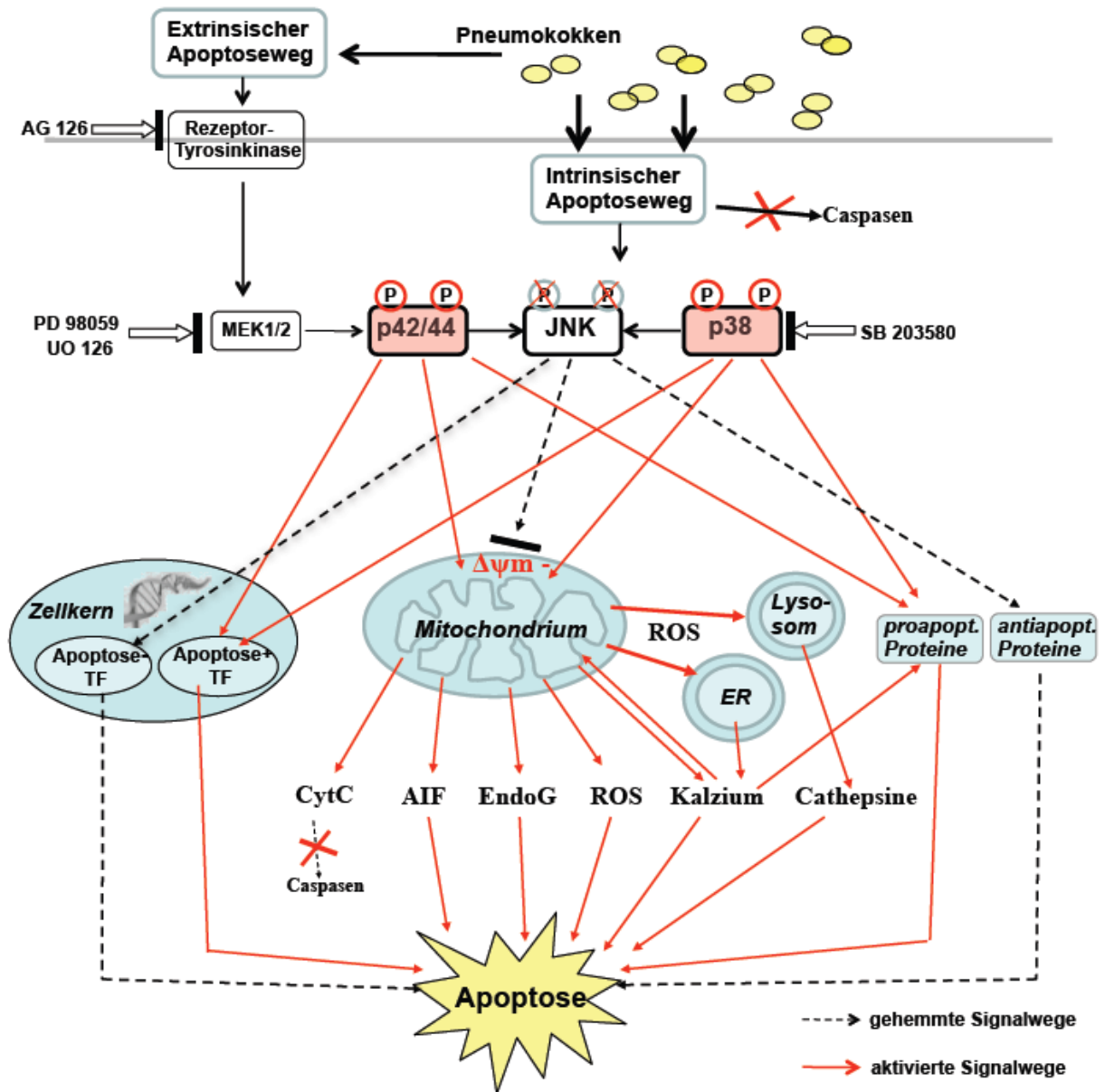
jedoch nicht in der Lage, Caspasen zu aktivieren, möglicherweise aufgrund eines nicht funktionalen Apoptosoms. Als eine Alternative konnte bei der Pneumokokken-induzierten Apoptose nachgewiesen werden, dass AIF in den Zellkern transloziert und zu einer Apoptose führt, welche durch eine periphere Chromatinkondensation, eine fehlende Kernfragmentierung und Spaltung der DNS in große 50 kbp-Fragmente gekennzeichnet ist. Der Freisetzung von AIF geht eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums sowie reaktiver Sauerstoffradikale voraus. Antioxidanzien oder die Senkung des Kalziums mit Hilfe des Chelators BAPTA-AM können die Apoptose effektiv vermindern (Braun *et al.*, 2001, 2002 und 2007).

Weitere Mechanismen waren bislang bei diesem Apoptosemodell nicht bekannt. Die Caspasen-unabhängige Apoptose ist in jüngerer Zeit immer mehr erforscht worden und es ist bekannt, dass auch die MAP-Kinasen an der Auslösung eines programmierten Zelltod beteiligt sein können.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Phosphorylierung der MAPK-Kinasen p38 und p44/42 sowie eine Beteiligung dieser Kinasen bei der Pneumokokken-induzierten Apoptose von Neuronen gezeigt werden. Gleichzeitig kann aufgrund der vorliegenden Daten vermutet werden, dass die Apoptose auch über eine Dephosphorylierung und Inaktivierung der MAP-Kinase JNK gefördert wird. Die möglichen Mechanismen, über die Pneumokokken diese unterschiedliche MAPK-Regulation und neuronale Apoptose fördern könnten, sollen nachfolgend dargestellt werden (Abbildung 17):

Die Aktivierung von p38 und p44/42 führt möglicherweise (wie in anderen Modellen) zu deren Translokation in den Zellkern und zur Aktivierung proapoptotischer Transkriptionsfaktoren. Sie könnten desweiteren zytosolische proapoptotische Proteine, z. B. aus der Familie der Bcl-2-Proteine, aktivieren oder antiapoptotische zytosolische Proteine inaktivieren. Wesentlich an der Förderung der Apoptose sind auch die Mitochondrien beteiligt, denn es konnte nachgewiesen werden, dass p38 und p44/42 das Absinken des mitochondrialen Membranpotentials fördert. Konsekutiv könnte die Freisetzung der proapoptotische Proteine AIF und Endonuklease G aus dem mitochondrialen Intermembranraum folgen, die Caspasen-unabhängig Apoptose auslösen. Außerdem werden die Mediatoren ROS und Kalzium aus dem Mitochondrium freigesetzt.





**Abbildung 17: Mögliche Mechanismen der Beteiligung der MAP-Kinasen bei der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose.** P: Phosphorylierung, TF: Transkriptionsfaktoren, ER: Endoplasmatisches Retikulum, CytC: Cytochrom c, EndoG: Endonuklease G.

In dieser Arbeit konnte eine Reduktion der intraneuronalen Zunahme dieser Mediatoren durch die Inhibition von MAPK p38 und p44/42 nachgewiesen werden. Erhöhtes intrazelluläres Kalzium kann proapoptische zytoplasmatische Proteine wie Calpaine, Endonukleasen, Phospholipasen oder auch das Bcl-2-Protein Bad aktivieren. Zunahme von ROS fördert direkt oder über eine Verstärkung der Funktion proapoptischer Proteine aus der Bcl-2-Familie eine

zunehmende Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und somit Freisetzung proapoptotischer Proteine. Sie führen außerdem zur Freisetzung von apoptosefördernden Cathepsinen aus Lysosomen. Im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus führen ROS zudem zur Freisetzung von Kalzium aus dem ER; dies fördert zusätzlich über Zunahme des Kalziumgehaltes in den Mitochondrien deren Permeabilisierung und Depolarisierung. Es kommt aufgrund der konsekutiven Störung des Elektronentransportes der Atmungskette und verminderter Energiegenerierung wiederum zur vermehrten Bildung von ROS (Hail *et al.*, 2006; Sastry und Rao, 2000). Die p38- bzw. MEK1/2-Inhibitoren SB 203580, PD 98059 und UO 126 vermindern in unserem Modell über Hemmung bzw. Abschwächung der genannten Mechanismen die neuronale Apoptose.

Die MAPK JNK fungiert in diesem Apoptosemodell hingegen als ein vermutlich apoptoseminderndes Glied. Ihre Deaktivierung führt möglicherweise zu einer verminderten Aktivierung antiapoptotischer Transkriptionsfaktoren und zytosolischer Proteine sowie zu einer Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Die Anwendung der oben genannten MAPK-Inhibitoren verhindert die Dephosphorylierung von JNK, so dass evtl. deren antiapoptotische Funktionen wieder zum Tragen kommen und auf diesem Weg neuronale Apoptose vermindert wird.

Warum die MAP-Kinasen sowohl anti- als auch proapoptotische Signale vermitteln können, könnte zum einen damit erklärt werden, dass dies Unterschiede der Eigenschaften verschiedener Zellarten widerspiegelt. Andererseits existieren aber auch in ein und derselben Zelle abhängig vom auslösenden Agens sowohl MAPK-abhängige als auch MAPK-unabhängige Apoptosesignalwege. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die verschiedenen Isoformen der MAP-Kinasen für unterschiedliche Signalantworten verantwortlich sind. Auch die Dauer der MAPK-Aktivierung spielt offenbar eine wichtige Rolle, wobei hier wiederum eine prolongierte Aktivierung zur Förderung von Apoptose postuliert wird (Chen *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2002; Stanciu *et al.*, 2000). Am wichtigsten scheint jedoch die Entscheidung, welches Signal welche Antwort auslöst, das Resultat der Integration multipler Signalwege zu sein, also das Resultat einer gegenseitigen Beeinflussung mehrerer, durch ein Signal gleichzeitig aktivierter Proteinkaskaden (Lin, 2003; Ip und Davis, 1998).

## 5.10. Medizinische Relevanz und Ausblick

Die Pneumokokken-Meningitis ist trotz moderner, multimodaler Behandlungskonzepte auch heute noch mit einer schlechten Prognose assoziiert. Einer der wesentlichen Pathomechanismen hierbei ist die durch verschiedene Faktoren induzierte Apoptose von Neuronen. Von einem vollständigen Verständnis der genauen, molekularbiologischen Hintergründe ist man zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch weit entfernt. Nur ein Teil des apoptotischen Zelltodes kann durch die bekannten Inflammations-getriggerten, Caspasen-abhängigen Kaskaden erklärt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation lassen den Schluss zu, dass bestimmten MAP-Kinasen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung Caspasen-unabhängiger, direkt durch Pneumokokken ausgelöster neuronaler Apoptose zukommt. Durch pharmakologische Inhibition dieser Signalkaskaden kann *in vitro* zwar der neuronale Zelltod zeitlich inhibiert, jedoch (wegen des Wachstums der Pneumokokken) nicht komplett gestoppt werden. Auch wenn sich diese Ergebnisse nicht ohne weiteres auf *in vivo*-Modelle oder gar den Menschen übertragen lassen, könnten sich künftig daraus interessante Möglichkeiten ergeben. Es bleibt abzuwarten, ob neue pharmakologische oder gentherapeutische Ansätze in Zukunft Therapiestrategien ermöglichen, welche die neuronalen MAP-Kinasekaskaden als pharmakologisches Target einschließen und dazu beitragen, die Prognose der Pneumokokken-Meningitis zu verbessern.

## 6. Zusammenfassung

Die Pneumokokken-Meningitis ist trotz weiterentwickelter antiinfektiver Therapien, dem nachgewiesenen klinischen Benefit einer additiven Kortikosteroidtherapie und aller intensivmedizinischer Maßnahmen nach wie vor mit einer sehr hohen Mortalität und Morbidität verbunden. Dieses schlechte Outcome ist zum einen durch wirtseigene Immunabwehrmechanismen, zum anderen durch bakterieninduzierte Vorgänge zu erklären. Deshalb ist es von entscheidender Bedeutung für eine Verbesserung der Prognose dieser Erkrankung, die spezifischen Schadensmechanismen zu identifizieren, um so die Grundlage für die Entwicklung neuer, spezifischer Medikamente zu schaffen.

Ein entscheidender Punkt vor allem auch in Hinblick auf die hohe Morbidität mit häufig auftretendem Hörverlust, epileptischen Anfällen oder kognitiven Behinderungen - um nur einige Bei-

spiele zu nennen - ist die durch Pneumokokken ausgelöste Apoptose von Neuronen, auf deren Mechanismen in der vorliegenden Arbeit eingegangen wurde. Es ist aus Vorarbeiten bekannt, dass hierbei nicht der „klassische“ Apoptosemechanismus über eine Caspasen-Aktivierung stattfindet. Um eine Minderung der neuronalen Apoptose zu erzielen, ist es daher erforderlich, die stattfindenden alternativen Apoptosemechanismen zu identifizieren.

MAP-Kinasen (Mitogen-activated protein kinases) haben in Form von Kinasekaskaden pleiotrope Effekte in Hinblick auf Zelldifferenzierung, Zellteilung, Zellimmunantworten und auch den Zelltod. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass MAP-Kinasen Einfluss auf die Pneumokokken-induzierte neuronale Apoptose ausüben. So konnte mit Hilfe des Western Blots - konzentrations- und zeitabhängig - eine Aktivierung der MAP-Kinasen p44/42 und p38 sowie eine Inaktivierung der MAP-Kinase JNK während der Apoptose von primären Rattenneuronen nachgewiesen werden. Offenbar sind die beiden Virulenzfaktoren Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wesentlich an der Aktivierung bzw. Inaktivierung dieser MAP-Kinasen beteiligt, denn die Pneumolysin- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-defiziente Pneumokokken-Doppelmutante konnte diese Vorgänge nicht oder nur in abgeschwächter Form auslösen. Eine pharmakologische Inhibition der p44/42- und p38-Kinasekaskaden führte einzeln und insbesondere auch in Kombination zu einer Neuroprotektion, was fluoreszenzmikroskopisch und im ELISA quantifiziert werden konnte. Unter dieser MAPK-Inhibition konnte eine statistisch signifikante Reduktion der apoptoseinduzierenden Effektoren ROS und Kalzium in den Neuronen erzielt werden. Gleichzeitig konnte eine Protektion des mitochondrialen Intermembranpotentials erreicht werden. Hinsichtlich den MAP-Kinasen nachgeschalteter, apoptoseregulierender Proteine konnte im Western Blot keine Änderung der Quantität sowohl des proapoptotischen Proteins Bax als auch des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 im Zytosol nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine ursächliche Beteiligung der MAP-Kinasen bei der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose, die zumindest teilweise über die Bildung intraneuronaler reaktiver Sauerstoffradikale und Kalzium sowie die Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials vermittelt wird. Die Inhibition der MAPK-Kaskaden stellt damit einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt in der Behandlung der Pneumokokken-Meningitis dar, der zur Reduktion der hohen Mortalität und Morbidität dieser Erkrankung beitragen könnte.

## 7. Literatur

1. Angstwurm K, Hanisch UK, Gassemi T, et al. Tyrosine kinase inhibition reduces inflammation in the acute stage of experimental pneumococcal meningitis. *Infect Immun* 2004;72:3294-8.
2. Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 2000;345:271-8.
3. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001;276:11615-23.
4. Armstrong JS. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays* 2006;28:253-60.
5. Avery OT, Morgan HJ. The occurrence of peroxide in cultures of pneumococcus. *J Exp Med* 1924;39:275-88.
6. Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998;17:3261-70.
7. Barros LF, Hermosilla T, Castro J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001;130:401-9.
8. van de Beek D, Schmand B, de Gans J, et al. Cognitive impairment in adults with good recovery after bacterial meningitis. *J Infect Dis* 2002;186:1047-52.
9. van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma J, Vermeulen M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2004;351:1849-59.
10. van de Beek D, de Gans J, McIntyre P, Prasad K. Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;1:CD004405.

11. Bermpohl D, Halle A, Freyer D, et al. Bacterial programmed cell death of cerebral endothelial cells involves dual death pathways. *J Clin Invest* 2005;115:1607-15.
12. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 1999;264:687-701.
13. de Bernardo S, Canals S, Casarejos MJ, Solano RM, Menendez J, Mena MA. Role of extracellular signal-regulated protein kinase in neuronal cell death induced by glutathione depletion in neuron/glia mesencephalic cultures. *J Neurochem* 2004;91:667-82.
14. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Grennberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 1999;286:1358-62.
15. Boulnois GJ, Paton JC, Mitchell TJ. Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *S. pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1991;5:2611-6.
16. Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen EI. Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med* 1999;5:298-302.
17. Braun JS, Tuomanen EI. Molecular mechanisms of brain damage in bacterial meningitis. *Adv Pediatr Infect Dis* 1999;14:49-71.
18. Braun JS, Novak R, Murray PJ, et al. Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus. *J Infect Dis* 2001;184:1300-9.
19. Braun JS, Sublett JE, Freyer D, et al. Pneumococcal pneumolysin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* 2002;109:19-27.
20. Braun JS, Hoffmann O, Schickhaus MK, et al. Pneumolysin causes neuronal cell death through mitochondrial damage. *Infect Immun* 2007;75:4245-54.

21. Bruckner SR, Tammariello SP, Kuan CY, Flavell RA, Rakic P, Estus S. JNK3 contributes to c-Jun activation and apoptosis but not oxidative stress in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurochem* 2001;78:298-303.
22. Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, Baltimore D. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 1998;281:1860-3.
23. Chen YR, Wang X, Templeton D, Davis RJ, Tan TH. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem* 1996;271:31929-36.
24. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2001;8:705-11.
25. Cheng HL, Feldmann EL. Bidirectional regulation of p38 kinase and c-Jun N-terminal protein kinase by insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem* 1998;273:14560-5.
26. Choi IJ, Kim JS, Kim JM, Jung HC, Song IS. Effect of inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 pathway on apoptosis and bcl-2 expression in *Helicobacter pylori*-infected AGS cells. *Infect Immun* 2003;71:830-7.
27. Chu C, Levinthal D, Kulich S, Chalovich E, DeFranco DB. Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. *Eur J Biochem* 2004;271:2060-6.
28. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991;91:23S-30S.
29. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999;341:233-49.
30. Deng X, Xiao L, Lang W, Gao F, Ruvolo P, May WS Jr. Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem* 2001;276:23681-8.

31. Diwakarla S, Nagley P, Hughes MLR, Chena B, Beart PM. Differential insult-dependent recruitment of the intrinsic mitochondrial pathway during neuronal programmed cell death. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:156-72.
32. Donovan M, Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644:133-47.
33. Dowling HF, Sweet LK, Robinson JA, et al. The treatment of pneumococcal meningitis with massive doses of systemic penicillin. *Am J Med Sci* 1949;217:149-56.
34. Duane PG, Rubins JB, Weisel HR, Janoff EN. Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 1993;61:4392-7.
35. Duchen MR. Mitochondria and  $Ca^{2+}$  in cell physiology and pathophysiology. *Cell Calcium* 2000;28:339-48.
36. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7686-9.
37. Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, et al. Acute bacterial meningitis in adults: a review of 493 episodes. *N Engl J Med* 1993;328:21-8.
38. Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:337-43.
39. Eminel S, Klettner A, Roemer L, Herdegen T, Waetzig V. JNK2 translocates to the mitochondria and mediates cytochrome c release in PC12 cells in response to 6-hydroxydopamine. *J Biol Chem* 2004;279:55385-92.
40. Erin N, Bronson SK, Billingsley ML. Calcium-dependent interaction of calcineurin with Bcl-2 in neuronal tissue. *Neuroscience* 2003;117:541-55.



41. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* 2001;276:1071-7.
42. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 1998;273:18623-32.
43. Flexner S. The results of the serum treatment in thirteen hundred cases of epidemic meningitis. *J Exp Med* 1913;17:553-76.
44. Force T, Bonventre JV, Heidecker G, Rapp U, Avruch J, Kyriakis JM. Enzymatic characteristics of the c-Raf protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1270-4.
45. Freyer D, Manz R, Ziegenhorn A, et al. 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* 1999;163:4308-14.
46. Gazit A, Yaish P, Gilon C, Levitzki A. Tyrphostins I: Synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 1989;32:2344-52.
47. Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca<sup>2+</sup>-indicator dyes. *Cell Calcium* 2000;27:97-106.
48. Gosink KK, Mann ER, Guglielmo C, Tuomanen EI, Masure HR. Role of novel choline binding proteins in virulence of streptococcus pneumoniae. *Infect Immun* 2000;68:5690-95.
49. Hail N Jr, Carter BZ, Konopleva M, Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis* 2006;11:889-904.
50. Harper SJ, LoGrasso P. Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cell Signal* 2001;13:299-310.

51. Hetman M, Gozdz A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur J Biochem* 2004;271:2050-5.
52. Hollingshead SK, Briles DE. *Streptococcus pneumoniae*: new tools for an old pathogene. *Curr Opin Microbiol* 1991;4:71-7.
53. Horstmann S, Kahle PJ, Borasio GD. Inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase promote neuronal survival in vitro. *J Neurosci Res* 1998;52:483-90.
54. Hu MC, Qui WR, Wang YP. JNK1, JNK2 and JNK3 are p53 N-terminal serine 34 kinases. *Oncogene* 1997;15:2277-87.
55. Ishikawa Y, Kusaka E, Enokido Y, Ikeuchi T, Hatanaka H. Regulation of Bax translocation through phosphorylation at Ser-70 of Bcl-2 by MAP kinase in NO-induced neuronal apoptosis. *Mol Cell Neurosci* 2003;24:451-9.
56. Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun NH2-terminal kinase (JNK/SAPK) - from inflammation to drosophila development. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:205-19.
57. Jacobson J, Duchon MR. Interplay between mitochondria and cellular calcium signalling. *Mol Cell Biochem* 2004;256-257:209-18.
58. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005; 4:139-63.
59. Johnson MK. Cellular location of pneumolysin. *FEMS Microbiol Lett* 1977;2:243-5.
60. Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E. Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem* 1999;274:26563-71.

61. Kann O, Hoffmann A, Schumann RR, Weber JR, Kettenmann H, Hanisch UK. The tyrosine kinase inhibitor AG 126 restores receptor signaling and blocks release functions in activated microglia (brain macrophages) by preventing a chronic rise in the intracellular calcium level. *J Neurochem* 2004;90:513-25.
62. Kastenbauer S, Pfister HW. Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain* 2003;126:1015-25.
63. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
64. Koedel U, Scheld WM, Pfister HW. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2002;2:721-36.
65. Kong JY, Klassen SS, Rabkin SW. Ceramide activates a mitochondrial p38 mitogen-activated protein kinase: a potential mechanism for loss of mitochondrial transmembrane potential and apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2005;278:39-51.
66. Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 1999;22:667-76.
67. Kummer JL, Rao PK, Heidenreich KA. Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272:20490-4.
68. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001;81:807-69.
69. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994;372:739-46.
70. Lee JC, Kumar S, Griswold DE, Underwood DC, Votta BJ, Adams JL. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology* 2000;47:185-201.

71. Lei K, Davis RJ. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2432-7.
72. Leib SL, Kim YS, Chow LL, Sheldon RA, Tauber MG. Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. *J Clin Invest* 1996;98:2632-9.
73. Leib SL, Heimgartner C, Bifrare YD, Loeffler JM, Tauber MG. Dexamethasone aggravates hippocampal apoptosis and learning deficiency in pneumococcal meningitis in infant rats. *Pediatr Res* 2003;54:353-7.
74. Leist M, Jäättelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:589-98.
75. Lenczowski JM, Dominguez L, Eder AM, King LB, Zacharchuk CM, Ashwell JD. Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997;17:170-81.
76. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.
77. Lin A. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays*. 2003;25:17-24.
78. Lu C, Fu W, Zhao D, Mattson MP. The DNA damaging agent etoposide activates a cell survival pathway involving alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptors and mitogen-activated protein kinases in hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 2002;70:671-9.
79. Lundqvist-Gustafsson H, Norrman S, Nilsson J, Wilsson A. Involvement of p38-mitogen-activated protein kinase in *Staphylococcus aureus*-induced neutrophil apoptosis. *J Leukoc Biol* 2001;70:642-8.

80. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a bcl2 interacting protein, mediates cytochrome C release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;94:481-90.
81. Matsuzawa A, Ichijo H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:472-81.
82. Monick MM, Powers LS, Barrett CW, et al. Constitutive ERK MAPK activity regulates macrophage ATP production and mitochondrial integrity. *J Immunol* 2008;180:7485-96.
83. Müller AC, Handrick R, Elsaesser SJ, et al. Importance of Bak for celecoxib-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2008;76:1082-96.
84. Murray B, Alessandrini A, Cole AJ, Yee AG, Furshpan EJ. Inhibition of the p44/42 MAP kinase pathway protect hippocampal neurons in a cell culture model of seizure activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11975-80.
85. Nau R, Soto A, Bruck W. Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58:265-74.
86. Nishina H, Fischer KD, Radvanyi L, et al. Stress-signaling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* 1997;385:350-3.
87. Numakawa T, Yokomaku D, Kiyosue K, et al. Basic fibroblast growth factor evokes a rapid glutamate release through activation of the MAPK pathway in cultured cortical neurons. *J Biol Chem* 2002;277:28861-9.
88. Numakawa Y, Matsumoto T, Yokomaku D, et al. 17beta-estradiol protects cortical neurons against oxidative stress-induced cell death through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase and in the accumulation of intracellular calcium. *Endocrinology* 2007;148:627-37.
89. Okamoto S, Krainc D, Sherman K, Lipton SA. Antiapoptotic role of the p38 mitogen-activated protein kinase-myocyte enhancer factor 2 transcription factor pathway during neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7561-6.90.

90. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signaling* 2000;12:1-13.
91. Paris MM, Hickey SM, Uscher MI, Shelton S, Olsen KD, McCracken GH Jr. Effect of dexamethasone on therapy of experimental penicillin- and cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1320-4.
92. Park DS, Stefanis L, Yan CYI, Farinelli SE, Greene LA. Ordering the cell death pathway. Differential effects of BCL2, an interleukin-1-converting enzyme family protease inhibitor, and other survival agents on JNK activation in serum/nerve growth factor-deprived PC12 cells. *J Biol Chem* 1996;271:21898-905.
93. Pfister HW, Koedel U, Dirnagl U, Haberl RL, Ruckdeschel G, Einhaupl KM. Effect of catalase on regional blood flow and brain edema during the early phase of experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 1992;166:1442-5.
94. Pfister LA, Tureen JH, Shaw S, et al. Endothelin inhibition improves cerebral blood flow and is neuroprotective in pneumococcal meningitis. *Ann Neurol* 2000;47:329-35.
95. Polster BM, Fiskum G. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *J Neurochem* 2004;90:1281-9.
96. Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* 1998;102:347-60.
97. Rouse J, Cohen P, Trigon S, et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock protein. *Cell* 1994;78:1027-37.
98. Royall JA, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 1993;302:348-55.

99. Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 2000;74:1-20.
100. Scaduto RC Jr, Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J* 1999;76:469-77.
101. Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, et al. Bacterial meningitis in the United States in 1995. *N Engl J Med* 1997;337:970-6.
102. Slevin M, Krupinski J, Slowik A, Rubio F, Szczudlik A, Gaffney J. Activation of MAP kinase (ERK-1/ERK-2), tyrosine kinase and VEGF in the human brain following acute ischemic stroke. *Neuroreport* 2000;11:2759-64.
103. Stanciu M, Wang Y, Kentor R, et al. Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J Biol Chem* 2000;275:12200-6.
104. Stefanis L. Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist* 2005;11:50-62.
105. Stoica BA, Movsesyan VA, Knoblach SM, Faden AI. Ceramide induces neuronal apoptosis through mitogen-activated protein kinases and causes release of multiple mitochondrial proteins. *Mol Cell Neurosci* 2005;29:355-71.
106. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000;69:217-45.
107. Subramaniam S, Unsicker K. Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. *Neuroscience* 2006;138:1055-65.
108. Sun Y, Sinicrope FA. Selective inhibitors of MEK1/ERK44/42 and p38 mitogen-activated protein kinases potentiate apoptosis induction by sulindac sulfide in human colon carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2005;4:51-9.

109. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-6.
110. Tamura Y, Simizu S, Osada H. The phosphorylation status and anti-apoptotic activity of Bcl-2 are regulated by ERK and protein phosphatase 2A on the mitochondria. *FEBS Lett* 2004; 569:249-55.
111. Tan TQ. Antibiotic resistant infections due to *Streptococcus pneumoniae*: impact on therapeutic options and clinical outcome. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:271-7.
112. Tibbles LA, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:1230-54.
113. Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis* 1985;151:859-68.
114. Tuomanen E, Hengstler B, Zak O, Tomasz A. The role of complement in inflammation during experimental pneumococcal meningitis. *Microb Pathog* 1986;1:15-32.
115. Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, et al. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med* 1998;188:919-30.
116. Verkhatsky A, Toescu EC. Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> homeostasis and neuronal death. *J Cell Mol Med* 2003;7:351-61.
117. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004;23:2838-49.
118. Walker JA, Allen RL, Falmagne P, Johnson MK, Boulnois GJ. Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1987;55:1184-9.



119. Weisfelt M, van de Beek D, Spanjaard L, Reitsma JB, de Gans J. Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series. *Lancet Neurol* 2006;5:104-5.
120. Wellmer A, Zysk G, Gerber J, et al. Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of *S. pneumoniae* in murine meningitis. *Infect Immun* 2002;70:6504-8.
121. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 1996;74:589-607.
122. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270:1326-31.
123. Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, et al. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene. *Nature* 1997;389:865-70.
124. Yu C, Minemoto Y, Zhang J, et al. JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell* 2004;13:329-40.
125. Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G, Smith MA. The role of mitogene-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals* 2002;11:270-81.
126. Zysk G, Schneider-Wald BK, Hwang JH, et al. Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity in brain microvascular endothelial cells caused by *S. pneumoniae*. *Infect Immun* 2001;96:845-52.
127. Zysk G, Brück W, Gerber J, Brück Y, Prange HW, Nau R. Anti-inflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:722-8.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptosis Inducing Factor
AO	Acridinorange
AP-1	Activator Protein 1
Apaf-1	Apoptosis activating protease-1
ASK1	Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
ATF-1/2	Activating Transcription Factor1/ 2
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA-AM	Bis-ethyleneglycol-tetraacetic acid tetraacetoxymethyl ester
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia-2
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Cbp	Cholin-bindendes Protein
CREB	cAMP response element-binding protein
Daxx	Death associated protein 6
DHR 123	Dihydrorhodamin 1,2,3
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI (=Smac)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EB	Ethidiumbromid
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FKS	Fötales Kälberserum
FADD	Fas associated death domain
g	Erdbeschleunigung
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
Hsp	Hitzeschockprotein
IL-1	Interleukin-1
IP3	Inositoltriphosphat

JNK	c-jun-N-terminal kinase
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKAP	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase
MEK	Meiosis-specific serine/threonine-protein kinase
MEKK	MEK kinase
MKK	Mitogen-activated Protein Kinase Kinase
MNK	MAPK-interacting kinase
MSK	Mitogen- and stress-activated protein kinase 1
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NGF	Nerve Growth Factor
NO	Nitric Oxide
OD	Optische Dichte
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PsaA	Pneumococcal-surface antigen A
PspA	Pneumococcal-surface protein A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffradikale)
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
TAK	Tat-associated kinase
TBS	Tris-buffered saline
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TPL-2	Tumor progression locus 2
TRAF-2	TNF Receptor Associated Factor
TRAIL	Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand
ZNS	Zentrales Nervensystem
zVAD-fmk	z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone

## 8.2. Danksagung

Ich danke ganz besonders meinem Doktorvater Privatdozent Dr. Johann Braun für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung dieser Arbeit und die persönliche und fachliche Unterstützung. Herrn Prof. Dr. Jörg Weber danke ich für die freundliche Aufnahme in die Meningitis-Arbeitsgruppe der Experimentellen Neurologie sowie die konstruktiven Anregungen und Hilfen.

Sehr herzlich möchte ich Annett Halle danken, die mir mit vielen aufmunternden Worten, methodischen Tipps und der freundschaftlichen Zusammenarbeit eine unschätzbare Hilfe war.

Ein großer Dank geht auch an die Mitarbeiter des Labors für Experimentelle Neurologie. Insbesondere danke ich Dr. Dorette Freyer und Renate Gusinda, die mir bei der Einarbeitung und bei allen Problemen in der Zellkultur stets hilfreich zur Seite standen, außerdem Émilie Dagand und Cordula Mahrhofer für ihre Anleitung und die gute Zusammenarbeit in der Molekularbiologie.

Timm Krause-Plonka danke ich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und computertechnische Hilfen. Meiner Mutter danke ich für ihren steten Rückhalt.

Mario Menk danke für die viele Geduld und die Bereitschaft, mich mit Rat und Tat bei der Entstehung dieser Arbeit zu unterstützen.

### **8.3. Lebenslauf**

**Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.**

#### **8.4. Eidstattliche Erklärung**

Ich, Jasmin Strackharn, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Die Rolle der MAP-Kinasen bei der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 03.08.2010

Jasmin Strackharn