

Aus der Klinik für Neurologie und Abteilung für Experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neuronaler Zelltod durch Beta-Hämolyisin

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katja Hilgenfeld
geb. Jäger

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.06.2016

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| Ac-DEVD-AMC | Acetyl- L-aspartyl- L-glutamyl- L-valyl- L-aspartic acid α -(4-methyl- coumaryl- 7- amide) |
| AFC | Aminotrifluoromethylcumarin |
| AIDS | Acquired ImmunoDeficiency Syndrome |
| AIF | Apoptosis Inducing Factor |
| ALS | Amyotrophe Lateralsklerose |
| AMC | Aminomethylcumarin |
| AO | Akridinorange |
| Apaf | Apoptotic protease activating factor |
| β -H/Z | beta-Hämolyisin/Zytolysin |
| Bcl | B cell lymphoma/leukemia |
| BDNF | Brain-Derived Neurotrophic Factor |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| C | Komplementfaktor |
| CAD | Caspasen-aktivierte DNase |
| cAMP | zyklisches Adenosin-Monophosphat |
| CED | CELL Death abnormal mutations in Caenorhabditis elegans |
| CHAPS | 3-[3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat |
| COH 1 | B-Streptokokken Wildtyp |
| DDT | Dichlordiphenyltrichlorethan |
| DISC | Death-Inducing Signaling Complex |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DPPC | Dipalmitoylphosphatidylcholin |
| EB | Ethidiumbromid |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| Endo G | Endonuklease G |
| EPON | Epoxid-Kunstharz |
| FADD | Fas-Associated Death Domain |
| Fc | crystallisable fragment |
| g | Gramm; bzw. Erdbeschleunigung |
| GBS | Gruppe-B Streptokokken; <i>Streptococcus agalactiae</i> |

| | |
|-------------------------------|---|
| GM-CSF | Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor |
| Gro | Growth related oncogene |
| HEPES | 2-(4-(2-HydroxyEthyl)-1-Piperazinyl)-EthansulfonSäure |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HPMA | Hydroxypropylmetacrylat |
| HU | Hämolytische Einheiten |
| ICAD | Inhibitor of Caspase Activated DNase |
| ICAM | Intercellular Adhesion Molecule |
| ICE | Interleukin-1 β -Converting-Enzyme |
| IE | Internationale Einheiten |
| IL | Interleukin |
| iNOS | induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase |
| KBE | Koloniebildende Einheiten |
| kbp | Kilobasenpaare |
| μ | mikro |
| m | milli |
| M | Molekulargewicht |
| MAPK | Mitogen Activated Protein Kinase |
| n | nano |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADH | NicotinamidAdeninDinukleotid |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PFA | Paraformaldehyd |
| ROS | Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffradikale) |
| SDS | Sodiumdodecyl-Sulfat |
| SSW | Schwangerschaftswoche |
| TLR | Toll-like-Rezeptor |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TrkB | Tyrosine-related kinase B |
| TUNEL | Transferase-mediated dUTP nick-end labeling |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| z-DEVK-fmk | N-Benzyloxycarbonyl-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-fluoromethylketone |
| z-VAD-fmk | N-Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethylketone |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | ZUSAMMENFASSUNG | 5 |
| 2 | EINLEITUNG | 7 |
| 2.1 | Bakterielle Meningitis | 7 |
| 2.1.1 | Definition, Klinik und Therapie | 7 |
| 2.1.2 | Neonatale Meningitis | 8 |
| 2.1.3 | Pathogenese und Pathophysiologie der GBS-induzierten neonatalen Meningitis | 10 |
| 2.1.4 | Bedeutung bakterieller Toxine für den neuronalen Schaden bei der bakteriellen Meningitis | 13 |
| 2.2 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 14 |
| 2.2.1 | Der Erreger | 14 |
| 2.2.2 | β -Hämolysin/Zytolysin | 15 |
| 2.2.3 | Weitere Virulenzfaktoren | 17 |
| 2.3 | Apoptose | 17 |
| 2.3.1 | Definition und Bedeutung | 17 |
| 2.3.2 | Morphologische Kennzeichen und Abgrenzung zur Nekrose | 18 |
| 2.3.3 | Signaltransduktionswege in der Apoptose | 19 |
| 2.3.4 | Apoptose induzierender Faktor (AIF) und Caspasen-unabhängiger programmierter Zelltod | 22 |
| 2.4 | Zielsetzung der Arbeit | 24 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 26 |
| 3.1 | Methoden | 26 |
| 3.1.1 | Neuronale Zellkultur | 26 |
| 3.1.2 | β -Hämolysin | 27 |
| 3.1.3 | Akridinorange/Ethidiumbromid-Assay (AO/EB Assay) | 28 |
| 3.1.4 | Immunzytochemischer Nachweis des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) | 29 |
| 3.1.5 | Caspasen-Inhibitoren | 30 |
| 3.1.6 | Fluorometrische Analyse der Caspasen-Aktivität | 30 |
| 3.1.7 | Elektronenmikroskopie | 31 |
| 3.2 | Statistische Analyse | 32 |
| 3.3 | Materialien | 32 |
| 3.3.1 | Geräte | 32 |
| 3.3.2 | Chemikalien | 32 |
| 3.3.3 | Gebrauchslösungen | 34 |
| 4 | ERGEBNISSE | 35 |
| 4.1 | Charakterisierung des β-Hämolysin-induzierten Zelltodes als Apoptose | 35 |
| 4.1.1 | Lichtmikroskopie (LM) | 35 |
| 4.1.2 | Elektronenmikroskopie (EM) | 37 |
| 4.1.3 | Akridinorange/Ethidiumbromid-Färbung (AO-EB) | 38 |
| 4.1.4 | Immunzytochemie: Apoptose-induzierender Faktor AIF | 40 |
| 4.2 | Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der β-Hämolysin-induzierten neuronalen Apoptose | 41 |
| 4.2.1 | Zeitabhängigkeit im AO/EB-Assay | 42 |
| 4.2.2 | Quantifizierung der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit | 44 |
| 4.3 | Caspasen-Unabhängigkeit der β-Hämolysin-induzierten neuronalen Apoptose | 45 |
| 4.3.1 | Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der fehlenden Zelltod-Inhibition durch z-VAD-fmk und z-DEVD-fmk | 46 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.3.2 | Elektronenmikroskopische Darstellung der fehlenden Zelltod-Inhibition durch z-VAD-fmk | 48 |
| 4.3.3 | Graphische Darstellung der fehlenden Zelltod-Inhibition durch z-VAD-fmk und z-DEVD-fmk | 50 |
| 4.3.4 | Graphische Darstellung der fehlenden Caspase-3-Aktivierung durch β -Hämolyisin | 51 |
| 5 | DISKUSSION | 54 |
| 5.1 | Die Rolle des Toxins β-Hämolyisin in der Pathogenese des neuronalen Schadens | 54 |
| 5.1.1 | Pathogene Mechanismen und Einflussfaktoren | 55 |
| 5.1.2 | Morphologie der Apoptose | 58 |
| 5.1.3 | Inhibition der Apoptose | 60 |
| 5.1.4 | Mechanismen der Zellschädigung durch β -Hämolyisin | 61 |
| 5.2 | Rolle des Toxins β-Hämolyisin und der Gruppe-B Streptokokken für die Neugeborenenmeningitis | 63 |
| 5.2.1 | Pathophysiologische Besonderheiten der Neugeborenenmeningitis | 64 |
| 5.2.2 | β -Hämolyisin und Neugeborenenmeningitis | 65 |
| 5.3 | Therapeutische Möglichkeiten | 67 |
| 5.4 | Ausblick | 69 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 71 |
| 7 | LEBENS LAUF | 86 |
| 8 | EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG | 87 |
| 9 | DANKSAGUNG | 89 |

1 Zusammenfassung

Hintergrund und Zielsetzung: Gruppe-B Streptokokken (GBS) gehören zu den Haupterregern der peri- und neonatalen Meningitis. Die Erkrankung geht mit neurologischen Langzeitfolgen einher, die durch neuronale Schäden verursacht werden. Bakterientoxine spielen im Rahmen der intrazellulären Prozesse der Pathogenese bakterieller Erkrankungen eine Schlüsselrolle. Gruppe-B Streptokokken produzieren das porenformende Toxin β -Hämolyisin. Ziel dieser Arbeit war es, den durch β -Hämolyisin ausgelösten zytotoxischen Schaden in einer primären neuronalen Zellkultur zu untersuchen und die Schädigungsmechanismen darzustellen.

Methoden: Primäre Neuronen neonataler Ratten wurden in Zellkultur mit dem gereinigtem Toxin β -Hämolyisin inkubiert. Die Neuronenschädigung wurde licht- und elektronenmikroskopisch dargestellt. Zur Untersuchung der morphologischen, ultrastrukturellen und biochemischen Veränderungen erfolgte die Fluoreszenzfärbung mit Akridinorange/Ethidiumbromid (AO/EB), der immunzytochemische Nachweis des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF), die Messung der Caspaseaktivität und die Quantifizierung des neuronalen Schadens in An- und Abwesenheit von Caspasen-Inhibition.

Ergebnisse: Gereinigtes β -Hämolyisin verursachte in primären zerebralen Neuronen die charakteristischen lichtmikroskopischen und ultrastrukturellen Kennzeichen der Apoptose. β -Hämolyisin induzierte zeit- und konzentrationsabhängig neuronale Apoptose. Diese Apoptose verlief, im Gegensatz zur klassischen Apoptose, in dieser Untersuchungsreihe Caspasen-unabhängig. Eine Aktivierung der zentralen Effektorcaspase-3 lag nicht vor. Die neuronale Apoptose konnte mithilfe eines Breitspektrum-Caspaseinhibitors nicht verhindert werden. Die mitochondriale Freisetzung von AIF und seine Translokation zum Zellkern spielten eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der durch β -Hämolyisin ausgelösten neuronalen Apoptose.

Schlussfolgerungen: Bakteriellen Toxinen fällt eine wichtige pathogene Rolle während invasiver bakterieller Erkrankungen zu. β -Hämolyisin löst in primären zerebralen Neuronen eine Caspasen-unabhängige Apoptose aus. Die Neutralisation bzw. Elimination dieses Streptokokkentoxins stellt eine potentielle adjuvante neuroprotektive Strategie dar, um eine Neuronenschädigung bei der GBS-Meningitis zu verhindern. Eine Inhibition des GBS-Toxins β -Hämolyisin durch den Phospholipid-Inhibitor Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC) konnte bereits nachgewiesen werden. Der Apoptose-induzierende Faktor AIF und weitere Nicht-Caspase-Proteasen, welche die Pathogenese der durch β -Hämolyisin ausgelösten neuronalen Apoptose vermitteln, sind ein weiteres wichtiges Forschungsfeld zur Etablierung neuer adjuvanter Therapiealternativen. Eine

Inhibition der Schadenskaskade könnte neuroprotektive Effekte haben.

Summary

Background and goal: Group B streptococcus (GBS) are leading causes of peri- and neonatal meningitis. GBS meningitis is associated with long-term neurological sequelae caused by neuronal damage. Bacterial toxins play a key role in the pathogenesis of bacterial diseases, especially in the context of the intracellular processes. Group B streptococci produce the pore-forming cytolytic toxin β -hemolysin. The aim of this study was to investigate the cytotoxic damage, induced by β -hemolysin, in a primary neuronal cell culture and to demonstrate the damage mechanisms.

Methods: Primary neurons of neonatal rats in cell culture were incubated with the purified β -hemolysin toxin. The neuronal damage was shown by light and electron microscopy. The morphological, ultrastructural and biochemical alterations were examined by fluorescence staining with acridineorange/ethidiumbromide (AO/EB), immunocytochemical detection of apoptosis-inducing factor (AIF), measurement of caspase activity and quantifying of neuronal damage in the present and absence of caspase inhibition.

Results: Purified β -hemolysin induced characteristic lightmicroscopic and ultrastructural signs of apoptosis in primary cerebral neurons. β -hemolysin induced time- and concentration-dependent neuronal apoptosis. In contrast to the classical apoptosis, this apoptosis was caspase-independent. Activation of the central effector caspase-3 was absent. Neuronal apoptosis could not be prevented by a broad spectrum caspase-inhibitor. Mitochondrial release of AIF and its translocation to the nucleus played a crucial role in the pathogenesis of β -hemolysin-induced neuronal apoptosis.

Conclusions: Bacterial toxins play a major pathogenic role during invasive bacterial diseases. β -hemolysin causes a caspase-independent apoptosis in primary cerebral neurons. Neutralization or elimination of this streptococcal toxin represents a potential adjuvant neuroprotective strategy to prevent neuronal damage in GBS meningitis. Inhibition of GBS toxin β -hemolysin by the phospholipid inhibitor dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) has already been demonstrated. The apoptosis-inducing factor AIF and other non-caspase proteases, which are involved in the pathogenesis of β -hemolysin-induced neuronal apoptosis, are further important fields of research for the establishment of new adjuvant treatment alternatives. Inhibitory intervention in the biochemical cascade could have neuroprotective effects.

2 Einleitung

2.1 Bakterielle Meningitis

2.1.1 Definition, Klinik und Therapie

Die akute bakterielle Meningitis ist eine Infektion der Leptomeningen. Sie wird durch Bakterien ausgelöst, die die Blut-Hirn- bzw. Blut-Liquor-Schranke überwinden und geht mit charakteristischen biochemischen und zellulären Veränderungen des Liquor cerebrospinalis einher. Aufgrund der durch die Bakterien ausgelösten direkten Zellschädigung und einer überschießenden Immunantwort im Liquor bedingen sich fatale Hirnschädigungen.

Die Inzidenz beträgt abhängig von Faktoren wie Alter, Geschlecht oder Nationalität 3 – 10 pro 100.000 Menschen pro Jahr. Die bakterielle Meningitis rangiert auch heute noch unter den 10 häufigsten Infektionskrankheiten mit Todesfolge weltweit (Kim 2003).

Tabelle 1 stellt das breite Spektrum an Erregern dar, die sich in ihrer Häufigkeit altersspezifisch verteilen. Im Jugend- und Erwachsenenalter sind vorrangig die Erreger *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* und *Haemophilus influenzae* verursachend (Schuchat et al. 1997), bei neugeborenen Kindern und Säuglingen hingegen *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* sowie die Gruppe-B Streptokokken (*Streptococcus agalactiae*) (Pong und Bradley 1999).

| Patienten | Erreger |
|----------------------------------|---|
| Neugeborene | <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Listeria monocytogenes</i> |
| Kinder | <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> |
| Jugendliche und junge Erwachsene | <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> |
| Erwachsene | <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> |
| ältere Erwachsene | <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Listeria monocytogenes</i> |

Tabelle 1

Altersspezifische Verteilung der Erreger der bakteriellen Meningitis

Als besonders pathogene Erreger, die Infektionen mit schweren Verlaufsformen aufweisen, werden grampositive Bakterien angesehen. Vorrangig Erkrankungen durch die Erreger *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus agalactiae* verursachen häufig schwere neurologische Folgeschäden (Bedford et al. 2001).

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde eine erste gezielte Antiserumtherapie gegen die bakterielle Meningitis entwickelt (Flexner 1913). Erst die Antibiotikatherapie in den vierziger Jahren zeigte vielversprechende Heilerfolge (Quagliarello und Scheld 1992). Die Letalitätsrate konnte deutlich gesenkt werden. Trotz weiterentwickelter Antibiotikatherapien leiden noch heute bis zu 30% der Patienten, die an einer bakteriellen Meningitis erkranken, an neurologischen Folgeschäden (Harvey et al. 1999). Die überschießende Entzündungsreaktion (z. B. durch Zyto- und Chemokine) verursacht schwere, oft irreversible Gehirnschäden (Leib und Täuber 1999). Die Therapieerfolge mit Dexamethason als adjuvante Therapiemöglichkeit (McIntyre et al. 1997) zur Antibiotika-Therapie wurden zum Teil wieder revidiert (Thomas et al. 1999). In aktuellen Therapieentwicklungen wird versucht, in die Schadenskaskade einzugreifen, um eine Abschwächung der Zelldestruktion zu bewirken. Aufgrund zunehmender Antibiotikaresistenzen (Fluegge et al. 2004) ist davon auszugehen, dass die bakteriellen Erreger in Zukunft über einen längeren Zeitraum im Liquor verweilen. Daher ist es besonders dringlich, die Pathomechanismen bakterieller Neurotoxine zu identifizieren.

2.1.2 Neonatale Meningitis

Durch die medizinischen Fortschritte in der Geburtsmedizin und der neonatologischen Intensivbetreuung ist die Überlebensrate Frühgeborener und untergewichtiger Neugeborener gestiegen. Diese Kinder erkranken überdurchschnittlich häufig an einer bakterieller Sepsis und Meningitis (Pong und Bradley 1999).

In der Neonatalperiode werden zwei Gruppen von Infektionen unterschieden, welche auf einer unterschiedlichen Pathogenese beruhen:

1. „early-onset“ Infektion (intrapartal erworben, symptomatisch bis 72 Stunden nach Geburt)
 2. „late-onset“ Infektion (nosokomial erworben, symptomatisch > 72 Stunden nach Geburt)
- (McGuire et al. 2004)

Der wichtigste Erreger in der Neonatalperiode ist das Bakterium *Streptococcus agalactiae* (GBS) (Brouwer et al. 2010). Die „early-onset“ Infektion wird schon im Mutterleib oder während der

Geburt erworben. Sie äußert sich als fulminante Systemerkrankung, die eine Bakteriämie, Pneumonie, Meningitis und Infektion des Harnwegstraktes beinhalten kann (McGuire et al. 2004). Grund für die Infektion sind prä- oder perinatal ascendierende Keime, die das Neugeborene aufgrund einer rektovaginalen Besiedlung der Mutter erwirbt.

Das Erkrankungsrisiko steigt mit sinkendem Gestationsalter. Bei Frühgeborenen < 28. Schwangerschaftswoche liegt das Erkrankungsrisiko bei nahezu 100% (Center for Disease Control and Prevention 2002).

Durch ein prophylaktisches Screening der Mutter, das bei positiven B-Streptokokken-Nachweis durch eine peripartale Antibiotikagabe ergänzt wird, konnte die Inzidenz der Sepsis in den letzten Jahrzehnten stark gesenkt werden (Marió et al. 2013).

Die Sterblichkeit beträgt circa 15% (Marió et al. 2013), ist jedoch abhängig vom Gestationsalter, dem Geburtsgewicht und dem Zeitpunkt des Therapiebeginns. Eine adäquate Überwachung und Therapie auf neonatologischen Intensivstationen konnte die Letalität einer „early-onset“ Infektion in den letzten Jahren deutlich reduzieren.

Die Prognose der „late-onset“ Infektion ist wesentlich schlechter. Sie tritt mit einer hohen Inzidenz von rund 50% als Meningitis auf (Baker und Edwards 2001). Die „late-onset“ Infektion ist eine nosokomial erworbene Infektion (McGuire et al. 2004). Das Krankenhauspersonal oder die Angehörigen übertragen den Erreger, auch hier gehäuft Gruppe-B Streptokokken, auf das Kind. Die Einhaltung hygienischer Maßnahmen ist eine entscheidende Prophylaxemaßnahme. Bei Früh- und Neugeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht (Geburtsgewicht < 1500 g) ist das Infektionsrisiko besonders hoch (Stoll et al. 2004). Sie haben im Verhältnis zu erwachsenen Organismen nur eine eingeschränkte Möglichkeit, sich mit bakteriellen Infektionen auseinanderzusetzen (Doran 2002). Die gesteigerte Empfindlichkeit des Neugeborenen, speziell des Frühgeborenen für Infektionen liegt unter anderem in einer verzögerten Reifung der spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort der neonatalen B- und T-Zellen, einer nicht effektiven Aktivierung des Komplementsystems und eines Defizits des myeloopoetischen Systems. Auch eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke sowie eine verstärkte Vulnerabilität neonataler Neuronen wurde bereits tierexperimentell in vivo dargestellt (Reiß et al. 2011, Felderhoff-Mueser et al. 2005).

Aufgrund der Schwierigkeit, neonatale Infektionen rechtzeitig zu erkennen, erfolgt eine Therapieeinleitung häufig verzögert. Die Symptome sowohl der „early-onset“ als auch der „late-onset“ Meningitis sind sehr unspezifisch und reichen von Trinkunlust, Durchfall, Berührungsempfindlichkeit über Tachykardie bis zu Apnoen. Aufgrund auftretender Spätfolgen ist es sehr wichtig, eine Neugeborenenmeningitis möglichst frühzeitig zu erkennen und zu

behandeln. 10% - 20% der Patienten, die eine bakterielle Meningitis überleben, tragen neurologische Entwicklungsstörungen davon. Noch häufiger, in bis zu 50%, treten bleibende Verhaltensstörungen auf (Prober 1996).

In einer Studie von Bedford et al. wurden Kinder, die in ihrem ersten Lebensjahr eine bakterielle Meningitis überlebten, bis zu einem Alter von 5 Jahren begleitet. Dabei fiel auf, dass eine neonatale Meningitis häufiger schwere Folgeschäden aufwies, als eine Meningitis, die nach dem 1. Lebensmonat auftrat (Bedford et al. 2001).

Eine Studie von Stevens et al. ergab, dass Kinder nach einer Meningitis im ersten Lebensjahr einen signifikant niedrigeren mittleren Intelligenzquotienten besitzen, als gleichaltrige Kinder ohne Meningitis (Stevens et al. 2003). Zu dieser verminderten intellektuellen Leistungsfähigkeit, die sich oftmals als Lernstörung manifestiert (Quagliarello und Scheld 1992), gesellen sich häufig sensorische Störungen wie Hörverlust, Blindheit, Verhaltensstörungen, psychomotorische Retardierungen sowie Manifestationen epileptischer Erkrankungen.

Die Erfahrungen der Vergangenheit haben gezeigt, dass es durch neue Therapiekonzepte zwar möglich war, die Mortalität der neonatalen Meningitis zu senken, Folgeerkrankungen stellen jedoch weiterhin ein großes Problem dar.

Wäre es möglich, sehr früh therapeutisch in die bakterielle Schadenskaskade einzugreifen, könnten Langzeitschäden verhindert werden. Die Identifizierung der zuständigen Neurotoxine und das Verständnis der Pathomechanismen ist ein wichtiger Schritt in diese Richtung.

2.1.3 Pathogenese und Pathophysiologie der GBS-induzierten neonatalen Meningitis

Ausgangspunkt für eine bakterielle Meningitis ist meist eine bakterielle Besiedlung im Nasopharyngealbereich. Die Bakterien besitzen Pili, welche es ihnen ermöglichen, sich an die Schleimhautoberflächen anzuheften. Auf diesem Weg dringen *Streptococcus pneumoniae* (Zhang et al. 2000), *Neisseria meningitidis* (McGee et al. 1983) und *Haemophilus influenzae* (Guerina et al. 1982) in den Körper ein. Gruppe-B Streptokokken heften sich bevorzugt im sauren pH-Milieu der Vaginalschleimhaut an (Tamura et al. 1994). Die Pathogenese der neonatalen GBS-Infektion beginnt häufig mit der asymptomatischen Kolonisation des mütterlichen Genitaltraktes. Von dort aus kommt es zu einer aufsteigenden Infektion durch die Plazenta in den Uterus mit daraus folgender intrapartaler Infektion des ungeborenen Kind oder zu einer Aspiration der infizierten Vaginalflüssigkeit während der Geburt. Bei nosokomial erfolgter „late-onset“ Infektion liegt eher eine nasopharyngeale Besiedlung vor. Eine vereinfachte Darstellung der GBS-Invasion ist in

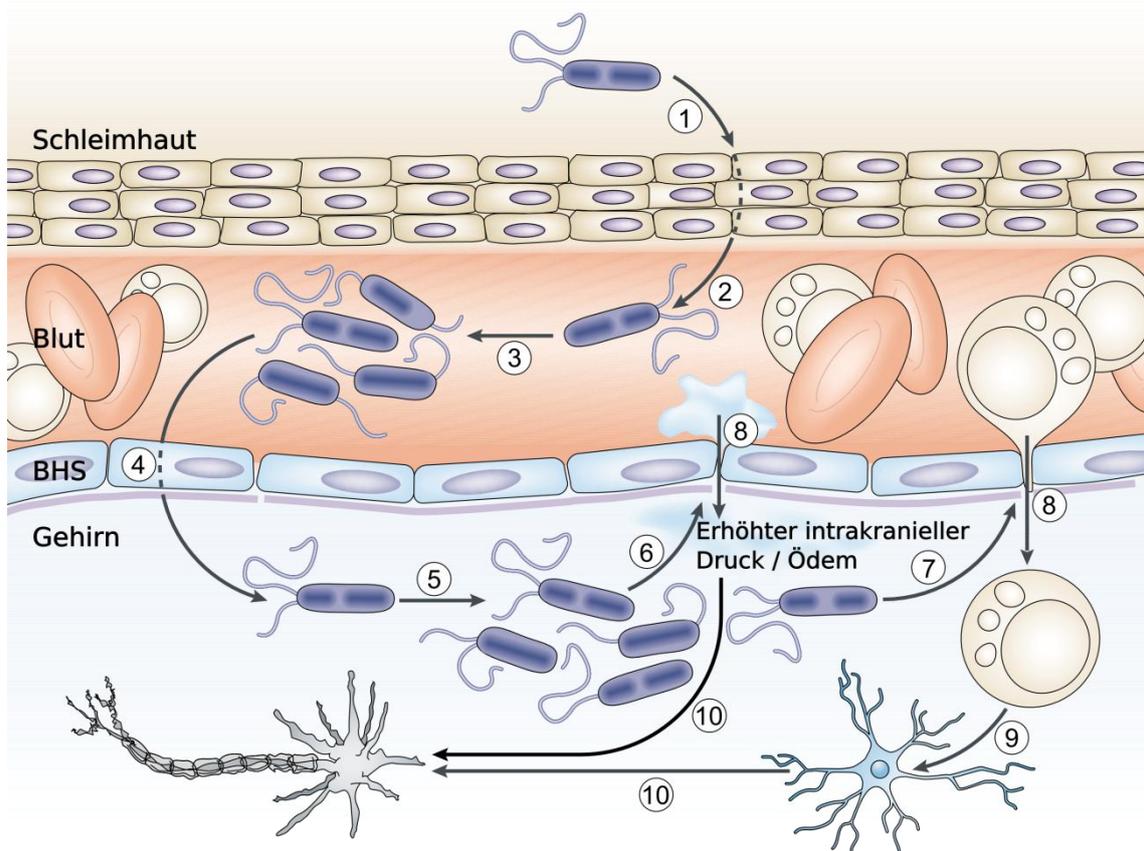


Abbildung 1

Ablauf der GBS-Wirt-Interaktion während der Pathogenese der bakteriellen Meningitis

Die Pathogenese verläuft über folgende Schritte: (1) Kolonisation der Schleimhaut, (2) Invasion des Blutkreislaufs, (3) Vermehrung der Bakterien, (4) Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) mit anschließender (5) Invasion der Meningen und des ZNS. Die Bakterien induzieren eine Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke (6) und dadurch eine Pleozytose (7). Dies führt zu einem Hirnödem und erhöhtem intrakraniellen Druck (8) und zur Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren aus infiltrierten weißen Blutzellen und anderen Wirtszellen (9). Letztendlich führt der Prozess zu einem neuronalen Schaden (10). (Abbildung modifiziert nach Kim 2003)

Abbildung 1 dargestellt.

Die Lunge ist der initiale Fokus für die GBS-Infektion. Um in die Blutbahn zu gelangen, müssen die Erreger zwei Barrieren überwinden: das Alveolarepithel und das Endothel der Lungenkapillaren. Gruppe-B Streptokokken besitzen die Eigenschaft, in Zellen einzudringen und intrazellulär in Vakuolen zu überleben (Gibson et al. 1993). Auf diesem Weg gelangen sie in die Blutbahn. Mithilfe pathogener Faktoren, insbesondere mithilfe des Toxins β -Hämolysin, wirken sie direkt zytotoxisch (Gibson et al. 1999). Zudem induzieren sie im neugeborenen Lungengewebe einen Schaden durch die ausgelöste neutrophile Entzündungsantwort (Nizet et al. 2000). Der Verlust der Barrierefunktion ermöglicht es den Gruppe-B Streptokokken, direkt ins

Blut überzutreten. Es kommt zu einer hämatogenen Verteilung der Bakterien im gesamten Körper und zu deren Vermehrung. Gruppe-B Streptokokken verfügen über Strategien, welche ein Überleben in der Blutbahn ermöglichen. Der wichtigste Schutz ist die Polysaccharidkapsel. Sie stellt eine Art Mimikri dar, denn der Wirt reagiert auf bekapselte Erreger weit weniger, als auf unbekapselte Mutanten (Doran et al. 2003). Die in der Kapsel enthaltene Sialinsäure inhibiert die Komplementkaskade und verhindert eine Anlagerung von neutrophilen Granulozyten und daraus folgender Phagozytose (Doran et al. 2003).

Die Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke stellen wichtige Hindernisse zur Vermeidung zerebraler Infektionen dar (Abbildung 1). Gruppe-B Streptokokken sind in der Lage - wie in alveoläre Epithelzellen und pulmonale Endothelzellen - auch in zerebrale Endothelzellen einzudringen und dort einige Zeit intrazellulär zu überleben (Nizet et al. 1997). Durch Transzytose gelangen die Bakterien in den Subarachnoidalraum.

Der zytotoxische Virulenzfaktor β -Hämolysin spielt eine wichtige Rolle bei der Schädigung des Endothels von Hirngefäßen. Aufgrund der reduzierten Barrierefunktion gelangen zahlreiche Bakterien in das ZNS (Abbildung 1). Gruppe-B Streptokokken beeinflussen die Regulierung der Genexpression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in den zerebralen Endothelzellen. Hierfür ist der Virulenzfaktor β -Hämolysin hauptverantwortlich. β -Hämolysin-negative Mutanten weisen eine signifikant geringere Geninduktion von Zyto- und Chemokinen auf (Doran et al. 2003).

Besonders stark induziert werden die Chemokine IL-8, Gro α und Gro β . IL-8 ist ein sehr potentes Chemokin, welches Leukozytenaktivierung, -chemotaxis und -adhäsion bewirkt. Die ebenso hochregulierten Zytokine ICAM-1 und GM-CSF führen zusätzlich zu einer Adhäsion und Migration von neutrophilen Granulozyten durch die Blut-Hirn-Schranke (Doran et al. 2003). Im frühen Stadium der Meningitis initiieren Gruppe-B Streptokokken auf diesem Weg die Leukozyteninfiltration in den Liquorraum. Dann werden auch die Meningitis-typischen Zytokine TNF- α und IL-1 produziert. Sie sind Aktivitätsparameter der zunehmenden Entzündungsreaktion. Leukozyten können die Bakterien nur schwer eliminieren, da diese durch ihre Kapsel vor Phagozytose geschützt sind. Es kommt zu einer schnellen Vermehrung der Erreger im Liquorraum. Die überschießende Entzündungsreaktion und bakterielle Toxine führen zur Zerstörung von Hirngewebe.

Die toxisch und inflammatorisch bedingte Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke bedingt eine Extravasation von Flüssigkeit und Proteinen ins Hirnparenchym. Die Folge ist ein vasogenes Hirnödem, welches einen gesteigerten Hirndruck bedingt. Der gesteigerte Hirndruck und eine gestörte Autoregulation des Blutflusses können zu einer Ischämie führen (Pfister et al. 1994).

Zusätzlich können neurotoxische Stoffe der Bakterien im Subarachnoidalraum eine Vaskulitis verursachen, die eine Einengung der Gefäße bzw. eine Thrombenbildung verursachen. Daraus kann eine ischämische Gewebestörung oder -infarzierung resultieren. Viele schwere neurologische Spätschäden sind Folge von diesen pathologischen Veränderungen größerer Gefäße (Förderreuther et al. 1992).

Die Ischämie in Kombination mit dem zunehmenden Ödem und Hirndruck und die Ausschüttung neurotoxischer Stoffe bewirken zwei wesentliche Veränderungen im zerebralen Gewebe bei einer Meningitis. Kortikaler Gewebeschaden manifestiert sich überwiegend als nekrotischer Neuronenschaden. Dieser ist vornehmlich ausgelöst durch eine ischämische Infarzierung (Pfister et al. 2000). Dahingegen findet man vor allem im Hippokampus einen apoptotischen Gewebeschaden. Der Entstehungsmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass Neurotoxine, unter anderem ROS („reactive oxygen species“, Reaktive Sauerstoffradikale), entlang eines Diffusionsgradienten innerhalb des Ventrikels bis zum Hippokampus vordringen (Leib et al. 1996). Hier lösen sie einen apoptotischen Zellschaden aus. Der Hippokampus ist eine Hirnregion, die vornehmlich für das Lernen und für das Gedächtnis zuständig ist. Dies erklärt, warum Kinder und Jugendliche nach durchgemachter Meningitis gehäuft an Gedächtnis- und Lernschwierigkeiten leiden (Loeffler et al. 2001).

2.1.4 Bedeutung bakterieller Toxine für den neuronalen Schaden bei der bakteriellen Meningitis

Während die Bedeutung der überschießenden intrathekalen Immunantwort für den Ausgang und die Schäden bei der bakteriellen Meningitis hinreichend bekannt ist, besteht hinsichtlich der Bedeutung bakterieller Toxine für den neuronalen Zelltod wenig Wissen.

Es existiert die Erkenntnis, dass bakterielle Toxine einen direkten neuronalen Zellschaden auslösen können. Das porenformende Toxin Pneumolysin, welches von *Streptococcus pneumoniae* produziert wird, induziert direkt mikrogliale und neuronale Apoptose (Braun et al. 2001). In tierexperimentellen Versuchen fand man Pneumolysin kolokalisiert zu den apoptotisch zerstörten Neuronen im Hippokampus (Braun et al. 2002).

Etliche Bakterien können mithilfe ihrer Toxine oder durch bestimmte Zelleigenschaften eine Apoptose in Zellen des Immunsystems induzieren. Folgende sollen als Beispiele dienen: Adenylat-Cyclase-Hemolysin von *Bordetella pertussis* (Khelef et al. 1993), Listeriolysin von *Listeria monocytogenes* (Guzmán et al. 1996), α -Toxin von *Staphylococcus aureus* (Jonas et al.

1993) und Escherichia coli-Hämolysin von *Escherichia coli* (Jonas et al. 1994).

Für das *Escherichia coli*-Hämolysin konnte jedoch auch ein nekrotischer Zellschaden nachgewiesen werden (Zychlinky et al. 1992). Bakterielle zytotoxische Mechanismen können zu unterschiedlichen Formen des Zelltods führen. Durch die Eigenschaft der Einflussnahme auf den Zelltod von Immunzellen sind Bakterien befähigt, sich über den Blutkreislauf im Körper zu verbreiten und an die Bluthirnschranke vorzudringen.

Für das β -Hämolysin der Gruppe-B Streptokokken konnte bereits nachgewiesen werden, dass es einen direkten Schaden an neuronalen Endothelzellen verursacht (Nizet et al. 1997). β -Hämolysin spielt im Rahmen der Entstehung der Meningitis eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der Blut-Hirn-Schranke und der resultierenden Expression von IL-8 und ICAM-1 (Doran et al. 2003).

Gruppe-B Streptokokken lösen einen apoptotischen Zellschaden an Mikrogliazellen aus (Lehnardt et al. 2007). Ebenso konnte kürzlich β -Hämolysin als Verursacher einen direkten Zellschaden an Leptomeningen und Astrozyten nach Behandlung neuronaler Zellkulturen mit Gruppe-B Streptokokken identifiziert werden (Alkuwaity et al. 2012).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, inwiefern das Toxin β -Hämolysin der Gruppe-B Streptokokken zellschädigend an primären Neuronen wirkt.

2.2 *Streptococcus agalactiae*

2.2.1 Der Erreger

Die Gruppe-B Streptokokken, die den Erreger *Streptococcus agalactiae* als einzigen Vertreter beinhalten, fanden erstmals 1887 als pathogene Erreger Beachtung. Entdeckt wurden sie von Nocard und Mollerau. Aufgrund der Eigenschaft, eine Mastitis bei Rindern hervorzurufen, wurden sie als *Streptococcus mastitidis contagiosa* bezeichnet (Guillebeau 1890). Erst im 20. Jahrhundert wurden sie als humanpathogene Erreger erkannt.

Streptococcus agalactiae ist ein grampositives β -hämolisierendes Bakterium. Die bekannte Streptokokkenforscherin Rebecca Lancefield nahm in den 30er Jahren eine Einteilung vor, die sich an den Zellwandbestandteilen orientierte. Danach teilte sie die Streptokokken in die Gruppen A - S ein (Lancefield 1933).

Heute haben Gruppe-B Streptokokken eine große Bedeutung auf neonatologischen Krankenstationen. Sie sind hauptverantwortlich für Sepsis, Pneumonie und Meningitis bei Neugeborenen (Brouwer et al. 2010). Gehäuft tritt der Keim auch bei alten Menschen oder

Patienten mit chronischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, AIDS oder malignen Neoplasmen auf. Er verursacht Infektionen der Haut, des Gewebes und des Knochens, außerdem Bakteriämie, Urosepsis, Meningitis, Pneumonie und Peritonitis (Farley et al. 1993).

Gruppe-B Streptokokken werden in 9 Serotypen eingeteilt. Die Einteilung basiert auf den Unterschieden in der Polysaccharidkapsel. Es lassen sich die Typen Ia, Ib, II – VIII unterscheiden (Hickman et al. 1999). Die Serotypen sind in unterschiedlichen geographischen Regionen und Altersstufen mit unterschiedlicher Inzidenz vorhanden (Lachenauer et al. 1999). Während bei Neugeborenen die „early-onset“ Sepsis von allen Serotypen in unterschiedlicher Häufigkeit ausgelöst wird, dominiert bei der „late-onset“ Sepsis, welche mit einer Meningitis vergesellschaftet ist, der Serotyp III (Teatero et al. 2014).

2.2.2 β -Hämolysin/Zytolysin

Das Toxin β -Hämolysin/Zytolysin (des weiteren β -Hämolysin genannt) der Gruppe-B Streptokokken wurde erstmals 1934 von Todd beschrieben und 1981 von Marchlewicz und Duncan isoliert und charakterisiert. Das sauerstoffstabile, saure, hitzelabile und nicht immunogene Toxin ist für den typischen Hämolysehof zuständig, den man bei Kultivierung von Gruppe-B Streptokokken auf Blutagarplatten beobachtet. Der Genlocus *cylE*, der für die Expression des Toxins verantwortlich ist, wurde von Pritzlaff und Mitarbeitern entdeckt und beschrieben (Pritzlaff et al. 2001).

Es ist nicht möglich, reines aktives β -Hämolysin von GBS-Kultur-Überständen zu isolieren. Nur im Beisein sogenannter „Carrier“-Moleküle in Lösung kann die extrazelluläre Toxinaktivität nachgewiesen werden (Ginsburg 1970). Als „Carrier“-Moleküle fungieren Albumin, Stärkepolymere, Tween 80 und Lipoteichonsäure (Marchlewicz und Duncan 1981). Trennt man das Toxin von dem Träger, geht seine Aktivität verloren. Die Frage nach dem physiologischen Träger von β -Hämolysin ist noch nicht geklärt. Es bestand die Vermutung, dass ein orangefarbenes Pigment, welches in enger Assoziation zu dem Toxin steht und über denselben Genlocus (*cylE*) exprimiert wird, diese Funktion übernimmt. Liu und Mitarbeiter beschrieben jedoch, dass dieses Pigment eine andere Funktion innehat. Es ist in der Lage, phagozytierte Gruppe-B Streptokokken vor der Inaktivierung durch oxidierende Stoffe wie H_2O_2 zu schützen. Die Fähigkeit der Gruppe-B Streptokokken, der Phagozytose zu entgehen, ist nicht nur den

toxischen Eigenschaften des β -Hämolytins zuzuschreiben, sondern auch diesem orange-karotenoiden Pigment (Liu et al. 2004).

β -Hämolytin ist über verschiedene Mechanismen an der Pathogenese und Letalität GBS-assoziiierter Krankheiten beteiligt. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass nicht-hämolytische Mutanten weitaus weniger pathogen als hyperhämolytische Mutanten sind (Liu et al. 2004, Doran et al. 2003). Das Toxin wirkt in hohen Konzentrationen auf eukaryote Zellen direkt zytolytisch. Dies konnte beispielsweise gezeigt werden für Lungenepithelzellen (Nizet et al. 1996, Doran et al. 2002), Lungenendothelzellen (Gibson et al. 1999), zerebrale Endothelzellen (Nizet et al. 1997), Makrophagen (Fettucciari et al. 2000, Liu et al. 2004) und Kardiomyozyten (Hensler et al. 2008).

Die Aktivität des Toxins korreliert mit dem auftretenden Zellschaden (Nizet et al. 1996, Gibson et al. 1999). Die Zytolyse der Zelle wird nach Toxineinwirkung durch einen Ionenfluss und Aktivierung einer inflammatorische Signalkaskade eingeleitet. β -Hämolytin wirkt direkt proinflammatorisch. In Lungenepithelzellen fördert es eine intrazelluläre Invasion von Gruppe-B Streptokokken und eine Freisetzung von IL-8, einem potenten neutrophilen Chemokin (Doran et al. 2002). In Makrophagen induziert β -Hämolytin die Expression der NO-Synthase (iNOS) und die Freisetzung von NO, einem Vasodilatator und Mediator der Sepsiskaskade (Ring et al. 2000). Eine Sepsis wird zudem begünstigt durch eine Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-6, das in der Leber an der Freisetzung Akuter-Phase-Proteine beteiligt ist (Puliti et al. 2000). Außerdem besitzt β -Hämolytin die Fähigkeit, neutrophile Granulozyten und Makrophagen zu lysieren bzw. deren Apoptose zu triggern und dadurch lange im Organismus zu verweilen (Liu et al. 2004). Die Verbindung zwischen dem Toxin β -Hämolytin und einem apoptotischen Zellschaden konnte beispielsweise für Makrophagen (Fettucciari et al. 2000, Liu et al. 2004), Milzzellen (Liu et al. 2004) und Leberzellen (Ring et al. 2002) nachgewiesen werden.

β -Hämolytin induziert auch direkt einen nekrotischen Zellschaden. Es zeigte sich eine deutliche quantitative Abhängigkeit des nekrotischen Schadens in Abhängigkeit von der Expression von β -Hämolytin unter Verwendung hyperhämolytischer und nichthämolytischer Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (Liu und Nizet 2004).

Inwiefern β -Hämolytin eine Rolle in der Pathogenese der neuronalen Apoptose spielt, ist noch nicht geklärt und soll mithilfe dieser Arbeit weiter erläutert werden.

2.2.3 Weitere Virulenzfaktoren

Neben dem Toxin β -Hämolyisin besitzen Gruppe-B Streptokokken noch weitere Virulenzfaktoren. Eine Übersicht über die Eigenschaften wichtiger Vertreter zeigt Tabelle 2.

| Virulenzfaktor (Genlocus) | Molekulare bzw. zelluläre Eigenschaften | Beitrag zur Pathogenese |
|---|---|---|
| Polysaccharidkapsel (<i>cpsA-L</i> <i>neuA-D</i>) | Beeinträchtigt Ablagerung und Aktivierung von Komplementfaktor C3 Verhindert Erkennung durch Immunsystem (molekulares Mimikri) | Blockiert die Eliminierung durch Phagozytose Verzögert Rekrutierung neutrophiler Granulozyten |
| Hyaluronat Lyase (<i>hylB</i>) | Spaltet Hyaluron- und Chondroitinsulfat | Ausbreitung von GBS im Gewebe |
| C5a Peptidase (<i>scpB</i>) | Spaltet humanes C5a Bindet Fibronectin | Hemmt die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten Bindung an extrazelluläre Matrix, epitheliale Anhaftung und Invasion |
| CAMP Faktor (<i>cfb</i>) | CAMP Reaktion (Co-Hämolyisin) Bindet an Fc-Teil von Immunglobulinen | Direkte Gewebsverletzung Beeinträchtigt Antikörperfunktion |

Tabelle 2

Weitere wichtige Virulenzfaktoren von *Streptococcus agalactiae* (modifiziert nach Doran und Nizet 2004, Liu und Nizet 2004)

2.3 Apoptose

2.3.1 Definition und Bedeutung

„Philosophen haben viele Jahrhunderte damit verbracht, nach Sinn und Bedeutung des Lebens zu suchen, aber in den letzten Jahrzehnten sind immer mehr Zellbiologen fasziniert von Sinn und Bedeutung des Todes“ (nach Renehan et al. 2001).

1842 beschrieb der deutsche Wissenschaftler Carl Vogt erstmals eine neue Form des Zelltods (Vogt 1842). Eine Zusammenfassung zum Zelltod in der Entwicklung von Wirbeltieren wurde 1951 von Glucksmann verfasst (Glucksmann 1951). Schließlich war es Kerr, der dieser neuen

Form des Zelltods einen Namen gab: Apoptose (Kerr et al. 1972).

Der Begriff „Apoptose“ wird häufig gleichgesetzt mit dem Begriff „programmierter Zelltod“, es wurden jedoch auch schon Formen eines nichtapoptotischen programmierten Zelltodes entdeckt (Sperandio et al. 2000). Der Begriff muss daher genauer definiert werden: Die Apoptose beschreibt einen genetisch regulierten Untergang von Zellen. In jeder Zelle des Körpers ist ein genetisches Programm für diesen „Selbstmord“ festgelegt. Der apoptotische Zelltod läuft nach genauen morphologischen Charakteristika ab und unterscheidet sich damit von anderen Formen des Zelluntergangs.

Die Apoptose ist integriert in die biologischen Prozesse des Körpers. Apoptose steuert die physiologische Gewebshomöostase, ist aber auch an der Genese verschiedener Erkrankungen beteiligt. Die Apoptose ist verantwortlich für die Gestaltung der Organe beginnend mit der Embryogenese. Im Erwachsenenalter sterben im Rahmen von Umbau- und Abbauprozessen täglich 10 Milliarden Zellen im Körper (Renehan et al. 2001).

Eine Vielzahl von Erkrankungen lässt sich auf eine Dysregulation des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Zelltod zurückführen: AIDS und neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Parkinson oder ALS (Amyotrophe Lateralsklerose) sind gekennzeichnet durch eine erhöhte Apoptoserate. Eine verminderte Rate lässt sich bei Malignomen, Autoimmunerkrankungen und einigen viralen Erkrankungen ausmachen (Thompson 1995).

2.3.2 Morphologische Kennzeichen und Abgrenzung zur Nekrose

Die Formen des unterschiedlichen Zelltodes kann man anhand morphologischer und biochemischer Kennzeichen definieren.

Die Nekrose ist ein akzidentielles und passives Ereignis. Es ist ein unphysiologischer Vorgang, der durch Traumen, Ischämien oder andere Verletzungen ausgelöst wird (Kerr et al. 1972). Als Folge dieser Ereignisse verlieren die Zellen ihre Fähigkeit, den Wasser- und Elektrolythaushalt zu steuern. Sie beginnen aufgrund eines zunehmenden intrazellulären onkotischen Drucks zu schwellen bis sie diesem nicht mehr standhalten können und die Funktion der Zellmembran verloren geht (Kroemer et al. 2008). Es tritt Zellinhalt aus und Entzündungsmediatoren werden freigesetzt. Bei der Nekrose ist die einsetzende Entzündungsreaktion der umliegenden Zellen eine charakteristische Erscheinung. Es ist keine einzelne Zelle, sondern ein Zellverband betroffen.

Bei der Apoptose hingegen handelt es sich um ein physiologisches aktives Ereignis. Es läuft ein genetisch festgelegtes Programm ab. Zu Beginn der Apoptose ist eine Verringerung des Zellvolumens zu beobachten. Die Organellen bleiben, im Gegensatz zum Prozess während der Nekrose, (initial) intakt und der Stoffwechsel der apoptotischen Zelle besteht weiter. Der Zellkern schrumpft (Pyknosis), das Chromatin verdichtet sich und fragmentiert (Karyorrhesis). Intensives „*membrane blebbing*“ - die Bildung von Ausstülpungen und Bläschen - ist an der Zytoplasmamembran zu beobachten. Schließlich beginnen sich membranumschlossene Vesikel - die sogenannten apoptotischen Körperchen oder „*apoptotic bodies*“ - von der Zelle abzuschneiden. Sie werden anschließend schnell durch Makrophagen oder benachbarte Zellen durch Phagozytose abgebaut. Darin begründet sich auch die ausbleibende Entzündungsreaktion (Kroemer et al. 2008). Die Apoptose betrifft im Gegensatz zur Nekrose nur ausgewählte Einzelzellen.

2.3.3 Signaltransduktionswege in der Apoptose

2.3.3.1 Mechanismen der Apoptose

Die Apoptose ist ein regulierter und programmierter Vorgang. Es existieren hauptsächlich folgende Mechanismen, die Apoptose initiieren (Abbildung 2):

1. der „extrinsische“ todesrezeptorvermittelte Signalweg
2. der „intrinsische“ rezeptorunabhängige, mitochondriale Signalweg

Zwischen beiden Wegen bestehen Verknüpfungen, sie regulieren sich gegenseitig (Chipuk et al. 2006).

Der „Todesrezeptor“ ist ein membranständiger trimere Rezeptor. Er gehört zur Gruppe der Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)-Rezeptoren. Das CD95-Rezeptor/CD95-Ligand-System (CD-95/CD-95L) ist das bis heute am besten charakterisierte Todesrezeptormodell (Peter et al. 2007). Die Apoptose-induzierenden Liganden binden an das Rezeptorsystem und lösen eine Veränderung im Rezeptor aus. Es bildet sich der Komplex DISC (Death-Including Signaling Complex) aus der Todesdomäne des Rezeptors (DD), aus dem Adaptermolekül FADD (Fas-Associated Death Domain) und aus der Procaspase-8. An diesem Komplex findet die autokatalytische Spaltung von Procaspase-8 in die (Initiator)Caspase-8 statt (Gupta 2001).

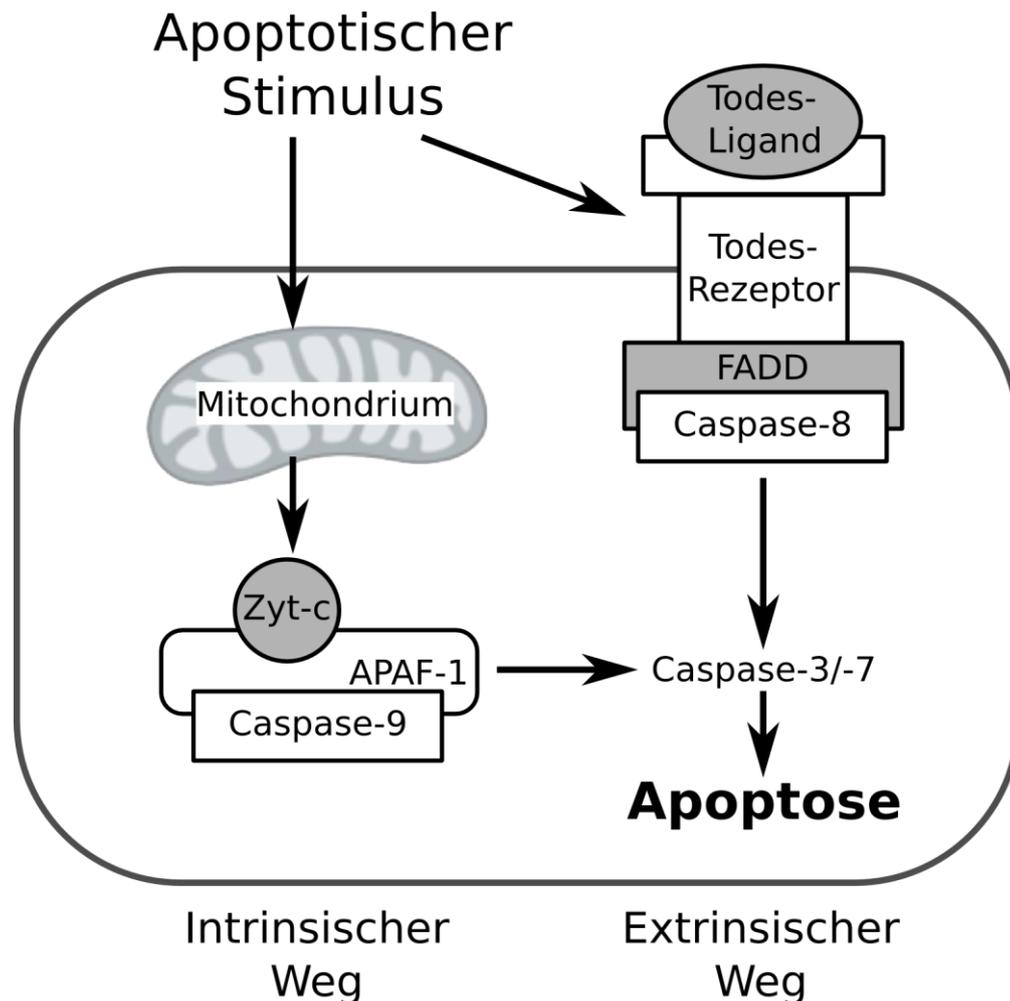


Abbildung 2

Mechanismus der klassischen Apoptose (nach Roy et al. 2000)

Rezeptorunabhängige, mitochondriale Signalkaskade und todesrezeptorvermittelte Signalkaskade. Zyt c = Zytochrom c, APAF-1= Apoptosis Protease Activating Factor-1, FADD = Fas Associated Death Domain

Für die „mitochondriale“ Auslösung der Apoptose in der Zelle können verschiedenen Ereignisse ausschlaggebend sein: z. B. Hypoxie, UV-Strahlung, Chemotherapeutika, Stress-Moleküle (reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies).

Am Mitochondrium kommt es zu einer Permeabilisierung der inneren Membran und zu einem Verlust des elektrochemischen Gradienten sowie zur Bildung von Kanälen durch proapoptotisch wirkende Mitglieder der Bcl-2-Familie (z. B. Bax) (Zamzami und Kroemer 2001). Es resultiert eine Durchlässigkeit der Membran und Zytochrom c wird freigesetzt. Zytochrom c bildet zusammen mit dem Adaptermolekül Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) und Procaspase-9 einen Komplex, das Apoptosom. In diesem Komplex findet die Spaltung von Procaspase-9 in die aktive Caspase-9 statt (Gupta 2001).

Die aktivierten Initiatorcaspasen aktivieren über die Caspasekaskade die Effektorcaspasen (-3, -6,

-7) und leiten damit den gemeinsamen Endweg der Apoptose ein (Roy und Nicholson 2000) (Abbildung 2).

Die Effektorcaspasen führen durch Spaltung zellulärer Proteine zu den für eine klassische Apoptose typischen morphologischen Veränderungen. Die Aufspaltung caspaseabhängiger Desoxyribonuklease (CAD) in ca. 180 Basenpaare umfassende Fragmente führen mikroskopisch sichtbar zu einer kompakten Kondensation des Chromatins ohne oder mit Bildung von Apoptosekörperchen (Loeffler et al. 2001).

2.3.3.2 Bedeutung der Caspasen

Caspasen sind Enzyme, die im Verlauf der Apoptose aktiviert werden. Es sind Cysteinproteasen, die Proteine nach Aspartateinheiten spalten. Daher der Name: C-Asp-ase (engl. *cysteinyl-aspartate-cleaving proteases*).

Sie liegen in jeder Zelle als inaktive Proenzyme vor und werden durch Spaltung aktiviert. Dies kann entweder autokatalytisch erfolgen, wie es bei den sogenannten Initiatorcaspasen (Caspase-8 und -9) auftritt, oder die sogenannte Procaspase wird durch eine schon aktivierte Caspase gespalten (Hengartner 2000). Es resultiert eine Kaskade sich aktivierender Caspasen, die in den Ablauf der Apoptose integriert ist.

In der Gruppe der Säugetiere sind bisher 14 Caspasen identifiziert, 11 davon sind humane Vertreter (Denault und Salvesen 2002) (Abbildung 3). Acht der Vertreter sind mit den Aspekten des Zelltods assoziiert (Los et al. 2001).

Alle Caspasen sind Homologe des menschlichen Interleukin-1 β -Converting-Enzyme (ICE/Caspase 1) (Thornberry und Lazebnik 1998).

Die humanen Caspasen lassen sich funktionell in 2 Gruppen einteilen. Die erste Gruppe, auch ICE-Familie, ist für die Prozessierung von Zytokinen zuständig (Caspasen-1, -4, -5 und -13). Die zweite Gruppe, auch CED-3-Familie, ist am Ablauf der Apoptose beteiligt. Sie beinhaltet die Caspasen-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10 und -14. Die an der Apoptose beteiligte Gruppe der Caspasen teilt man in Initiator- und Effektorcaspasen ein (Abbildung 3).

Initiatorcaspasen können sich autokatalytisch selbst aktivieren. Daraufhin aktivieren sie über eine Kaskade die Effektorcaspasen. Caspase-3 ist die wichtigste Effektorcaspase. Aktivierte Effektor-Caspasen führen durch Spaltung von ungefähr 100 unterschiedlichen zellulären Proteinen zu deren Funktionsverlust und zu den für die Apoptose typischen morphologischen Veränderungen (Hengartner 2000). Zielproteine sind beispielsweise Proteine des Zytoskeletts

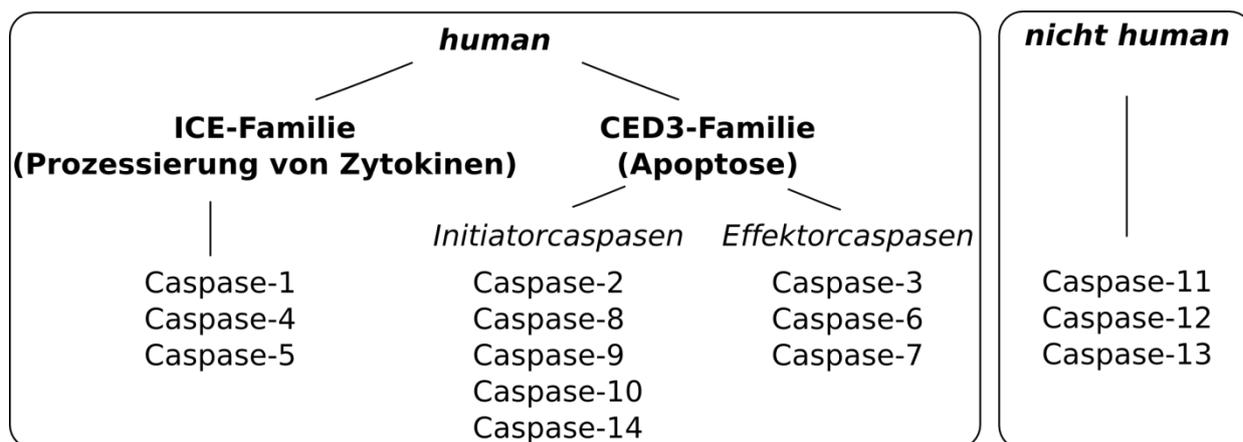


Abbildung 3

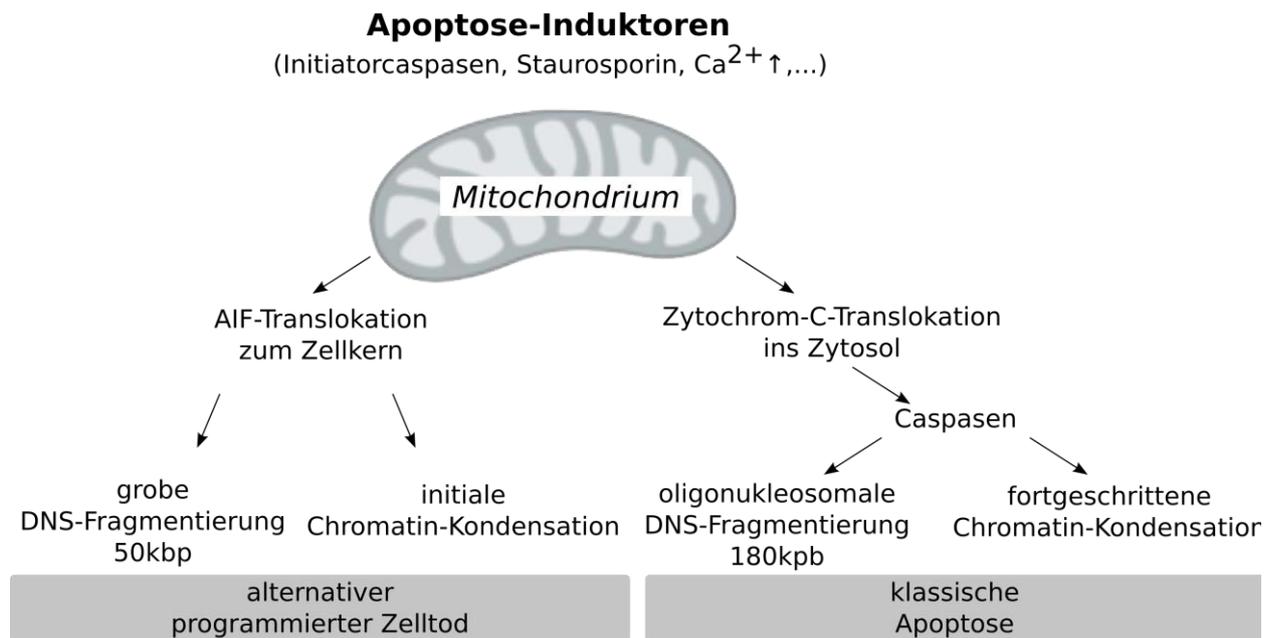
Unterteilung der Caspasen

(Aktin, Lamin), Proteine, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (Zyclin A) oder Proteine des DNA- und RNA-Metabolismus (ICAD=Inhibitor of Caspase Activated DNase).

2.3.4 Apoptose induzierender Faktor (AIF) und Caspasen-unabhängiger programmierter Zelltod

Neben der klassischen Apoptose beweisen neue Erkenntnisse einen alternativen programmierten Zelltod (Abbildung 4). Am Kaninchen-Meningitis-Modell bewirkte eine Caspasen-Inaktivierung zwar eine Reduktion, jedoch keine vollständige Blockade der neuronalen Apoptose (Braun et al. 1999). Dies ließ darauf schließen, dass es neben dem Caspasen-abhängigen auch einen Caspasen-unabhängigen Weg zur Apoptose gibt. Es ist bekannt, dass neben den Caspasen auch weitere Proteasen in der Lage sind, apoptotische Signale zu vermitteln.

Eine wesentliche Rolle spielt das Protein AIF (Apoptosis Inducing Factor). Es reguliert eine frühe Phase der Apoptose, eine genetische Inaktivierung von AIF führt zu einer ausbleibenden Apoptose (Joza et al. 2001). AIF ist ein in Mitochondrien lokalisiertes Protein, welches zur Aktivierung ins Zytosol und anschließend in den Zellkern transloziert. Hier wirkt AIF als Endonuklease und induziert eine Spaltung des Chromatins in ca. 50 kbp Fragmente (Lorenzo et al. 1999) sowie eine peripher lockere Chromatinkondensation (Daugas et al. 2000). Dieses Stadium der Apoptose verläuft Caspasen-unabhängig. AIF ist ein zentraler Wirkmechanismus bei verschiedenen Modellen der Caspasen-unabhängigen Apoptose (Cande et al. 2004).

**Abbildung 4****Intrazelluläre Ereignisse im Rahmen der Apoptose** (nach Daugas et al. 2000)

Verschiedene Apoptose-Induktoren wirken auf Mitochondrien und bewirken eine Permeabilisierung der Membran. AIF und Cytochrom c werden ins Zytosol freigesetzt. AIF transloziert zum Zellkern, wo eine grobe DNS-Fragmentierung und lockere Chromatinkondensation stattfindet. Cytochrom c aktiviert Caspasen, diese initiieren eine oligonukleosomale DNS-Fragmentierung und eine fortgeschrittene Chromatinkondensation

Die Freisetzung von AIF ins Zytosol ergibt sich aus einer Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials. Intrazelluläre Vorgänge, die sich auf das Membranpotential auswirken, können beispielsweise sein: Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, pro-apoptische Proteine der Bcl-2 Familie, oxidativer Stress (van Gurp et al. 2003). Die Freisetzung kann ebenso direkt über Initiatorcaspasen bzw. andere apoptotische Stimuli (z. B. Staurosporin) erfolgen.

Der direkte toxische Effekt der *Pneumokokken* resultiert aus einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Induktion transmembranärer Poren durch das Toxin Pneumolysin. Die Kaskade des programmierten Zelltods über das Protein AIF wird somit caspasen-unabhängig direkt durch das bakterielle Toxin ausgelöst (Stringaris et al. 2002).

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Gruppe-B Streptokokken sind die Haupterreger der bakteriellen Meningitis im Neugeborenenalter (Fluegge et al. 2005). Obwohl die Mortalität durch intensivmedizinische Fortschritte reduziert werden konnte, bestehen unverändert schwerwiegende und langfristige neurologische Folgeschäden wie Blindheit, Taubheit, Zerebralparese, Krampfleiden, Hydrozephalus oder kognitive Beeinträchtigungen (Berardi 2007), für die nur unzureichende therapeutische Bewältigungsstrategien vorliegen.

Die Vulnerabilität der Neuronen ist besonders in den ersten Lebenswochen extrem hoch (Felderhoff-Mueser et al. 2005). In dieser Zeit finden wesentliche Entwicklungsprozesse (Migration, Formation der Synapsen, physiologische Apoptose) statt, welche die hohe Vulnerabilität sowohl für Verletzungen als auch für Infektionen und die damit einhergehenden Folgeschäden erklären. Während einer Meningitis kommt es durch autolytische Prozesse oder in Folge eines Antibiose-induzierten Untergangs der Bakterien zu einer Freisetzung von Neurotoxinen aus den Bakterien und zu einer intrathekalen Verweildauer. Für einige Erreger, beispielhaft Pneumokokken, konnte gezeigt werden, dass deren Neurotoxine Pneumolysin und Wasserstoffperoxid einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung des neuronalen Schadens leisten (Braun et al. 2002).

Die Gruppe-B Streptokokken spielen als Erreger eine wesentliche Rolle bei der neonatalen Sepsis (Liu et al. 2004), Pneumonie (Hensler et al. 2005) und bei der Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke (Doran et al. 2003).

Für β -Hämolysin, das Toxin der Gruppe-B Streptokokken, wurde bereits eine direkte zytotoxische Wirkung an Erythrozyten (Marchlewitz et al. 1981), Lungenepithelien und -endothelien (Nizet et al. 1997), Hirnendothelien (Nizet et al. 1997) und Makrophagen (Ring et al. 2000, Liu et al. 2004) nachgewiesen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Hypothesen untersucht:

1. Neurotoxizität von β -Hämolysin an primären, nicht immortalisierten Neuronen: Was sind die zytotoxischen Effekte des essentiellen Streptokokkentoxins β -Hämolysin an primären neonatalen zerebralen Neuronenkulturen in vitro?
2. Untersuchung der morphologischen (licht- und fluoreszenzmikroskopisch), ultrastrukturellen und biochemischen Charakteristika der β -Hämolysin-induzierten neuronalen Veränderungen: Induziert β -Hämolysin neuronale Apoptose oder Nekrose? Ist

die β -Hämolyisin-induzierte Neuronentoxizität konzentrations- bzw. zeitabhängig von der Toxinwirkung?

3. Caspasenabhängigkeit: Aktiviert β -Hämolyisin die Effektorcaspase-3? Können die Toxineffekte durch Caspasen-Inhibitoren verhindert werden?

4. Effekte von β -Hämolyisin an neuronalen Mitochondrien und Apoptose-induzierender Faktor AIF: Zerstört β -Hämolyisin die Ultrastruktur neuronaler Mitochondrien? Setzt β -Hämolyisin AIF aus Mitochondrien frei?

3 Material und Methoden

3.1 Methoden

3.1.1 Neuronale Zellkultur

Wir verwendeten für unsere Versuchreihe lebende primäre neuronale Zellkulturreihen, welche nicht immortalisiert wurden.

Die Präparation der kortikalen Neuronen für die neuronale Zellkultur wurde nach einer modifizierten Methode nach Brewer (Brewer et al. 1995) durchgeführt.

Eine schwangere Wistar-Ratte (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin) mit einer Trächtigkeitsdauer von 16 - 18 Tagen wurde mit Fluothane narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Anschließend wurde sofort der Uterus frei präpariert und die Embryonen entnommen. Die Gehirne der Embryonen wurden extrahiert und die Meningen in PBS unter dem Präparationsmikroskop unter sterilen Bedingungen entfernt. Der Kortex wurde in Neurobasalmedium + B27 Supplement (Neurobasal-Medium, 2% B27 Supplement, 50.000 I. E. Penicillin /Streptomycin, 500 µM L-Glutamin) frei präpariert. Nach Überführung des Kortex in ein Reagenzglas erfolgte eine zweifache Spülung mit PBS, um Reste des Neurobasalmediums zu entfernen. Zur Lösung der interzellulären Kontakte wurde der Kortex 15 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad mit einer Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Danach erfolgte eine Spülung in einer Dissoziationslösung (Neurobasalmedium, 10% fötales Kälberserum, 10 mM HEPES, 44 nM Glucose, 50.000 I.E. Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 100 IE Insulin/l), anschließend wurden die Zellen mit einer abgeflamten Pipette auf- und abpipettiert und somit vorsichtig mechanisch dissoziiert. Nach Zentrifugation bei 21°C mit 1200 U/min (210 x g) für 2 Minuten zur Elimination von Zellbruchstücken und Erythrozyten erfolgte eine Resuspension des Zellpellets in Starter-Medium (Neurobasalmedium + B27, 100 U Penicillin + Streptomycin/ml, 0,5 mM L-Glutamin, 25 µM Glutamat). In einer Fuchs-Rosenbauer-Zählkammer wurde die Zellsuspension gezählt und soweit verdünnt, dass die Zellen mit einer Zelldichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen/cm² ausgesät werden konnten.

Zur Vorbereitung wurden die Zellkulturplatten eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit Poly-L-Lysin-Lösung (5 ml Poly-L-Lysin auf 100 ml PBS) behandelt, anschließend im Inkubator bei 37°C für 1 - 3 Stunden mit Kollagen-Medium (Dissoziationslösung + 3 mg/ml Collagen-G-Lösung) beschichtet. Daraufhin wurden die Zellen nach zweimaligem Spülen der Zellkulturplatten mit PBS in Starter-Medium ausgesät. Die Zellkulturen wurden bei 36,5°C und 5% CO₂ kultiviert, zwei Mal pro Woche wurde ein Kultivierungsmedium (Startermedium ohne

Glutamat) zugefügt. Am 7. Tag *in vitro* erfolgten die Experimente mit gereinigtem β -Hämolysin.

3.1.2 β -Hämolysin

Ziel der Arbeit die Exposition primärer Neurone mit dem Toxin β -Hämolysin der Gruppe-B Streptokokken, um den direkten neuronalen Zellschaden qualitativ und quantitativ zu erfassen und näher zu untersuchen. Um die Effekte anderer Bakterientoxine zu eliminieren, wurden nicht ganze, intakte Bakterien, sondern gereinigtes und stabilisiertes β -Hämolysin verwendet. Dieses wurde aus dem Überstand des stark hämolytischen Typ V-Bakterienstamms NCTC 10/84 gewonnen, welcher eine Aktivität von 25 hämolytischen Einheiten (Hemolytic Units) pro μl (HU/ μl) aufwies (Nizet et al. 1996).

Der in dieser Arbeit verwendete gereinigte β -Hämolysinextrakt aus dem hyperhämolytischem Bakterienstamm NCTC 10/84 wurde freundlicherweise von Victor Nizet bereitgestellt. Die Methode der Herstellung des Überstands wird im Folgenden kurz dargestellt:

Die Isolierung des Bakterienstammes erfolgte aus dem Blut eines von einer GBS-Sepsis betroffenen Neugeborenen. Todd-Hewitt-Broth (THB) mit zugesetzter Glucose 0,2 % wurde mit dem isolierten Stamm NCTC 10/84 beimpft. Das Wachstum erfolgte bis zur optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 0.4$ ($\sim 4 \times 10^8$ KBE/ml). Die Zellen wurden daraufhin abgenommen und in PBS + 2% Stärke + 0,2% Glucose resuspendiert, um das aktive β -Hämolysin von der Zelloberfläche zu extrahieren. Nach einer einstündigen Inkubation wurde der Überstand abgenommen, filtriert und im Volumenverhältnis 1:1 kaltem 100 %igem Methanol zugeführt. Daraufhin erfolgte eine Inkubation von 1 Stunde bei -20°C . Der Überstand wurde danach zentrifugiert und das Pellet anschließend in PBS resuspendiert.

Um die hämolytische Aktivität zu messen, wurde eine modifizierte Methode von Marchlewitz und Duncan (Marchlewitz und Duncan 1980) angewendet: In Todd-Hewitt-Broth inkubierte GBS wurde bei 10^8 CFU bei $3000 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert, anschließend das Pellet in PBS gewaschen und dann in 1 ml PBS + 0,2% Glucose resuspendiert. In eine 96-Loch Mikrotiterplatte wurden $100 \mu\text{l}$ (10^7 CFU) der resuspendierten Bakterienlösung in das erste Loch gefüllt, anschließend die weiteren Löcher jeweils in einer verdoppelten Verdünnung mit PBS-Glucose jeweils mit dem Volumen von $100 \mu\text{l}$ aufgefüllt. Daraufhin wurde jeder Vertiefung eine 1%ige in PBS-Glucose verdünnte Schaf-Erythrozyten-Lösung in gleichem Anteil zugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde bei 37°C in 5% CO_2 für 1 Stunde inkubiert. PBS-Glucose diente als Negativ-, lysierte Schaf-Erythrozyten mit 0,1% Sodiumdodecyl-Sulfat (SDS) als Positivkontrolle.

Nach dem Inkubieren wurde die Platte bei 3000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, um die unlysierten Schafererythrozyten und GBS zu pelletieren. 100 µl vom Überstand wurden jeweils in gleicher Anordnung auf eine zweite Mikrotiterplatte übertragen. Die Hämoglobinfreisetzung wurde auf dieser Platte mithilfe einer Messung bei A_{420} gemessen, der Hämolysetiter wurde festgelegt als Kehrwert der höchsten Verdünnung, die 50% Hämoglobinfreisetzung aufzeigt im Vergleich zur SDS-Kontrolle.

Um den Hämolysetiter des extrahierten Hämolysins festzulegen, wurden jeweils 100 µl des angefertigten Extraktes in zunehmender Verdünnung wie eben beschrieben mit PBS-Glucose auf Mikrotiterplatten aufgetragen und bearbeitet. Auf diese Weise erreichte man eine standardisierte Meßskala für den Hämolysetiter von GBS, wobei für den Wildtypstamm COH1 und den dazugehörigen Hämolysinextrakt als Vergleichswert der Hämolysintiter von 1 festgelegt wurde (Doran et al. 2003, Nizet et al. 1996).

Die Behandlung der neuronalen Zellkultur erfolgte für die Versuchsreihe in drei unterschiedlichen Konzentrationen (0,25 HU/µl, 0,1 HU/µl, 0,05 HU/µl) sowie mit unterschiedlichen Einwirkzeiten (1,5 bis 9 Stunden).

3.1.3 Akridinorange/Ethidiumbromid-Assay (AO/EB Assay)

Zur Bewertung der Form des Zelltods nach Behandlung neuronaler Zellen wurden die Eigenschaften der fluoreszierenden und interkalierenden DNS-Farbstoffe Akridinorange (AO) und Ethidiumbromid (EB) verwendet.

Akridinorange ist ein Lebendfarbstoff, der die Zellmembran frei permeieren kann. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran nehmen AO ins Zytoplasma auf. In der Zelle führt AO zu einer Grünfärbung gesunder Zellkerne.

Ethidiumbromid kann die Zellmembran lebender Zellen nicht permeieren. Nur bei geschädigter Zellmembran gelangt EB ins Zytoplasma. Dort führt EB zu einer Rotfärbung des Zellkerns.

Eine Doppelfärbung der behandelten neuronalen Zellen macht eine Differenzierung zwischen lebenden/gesunden, apoptotischen und nekrotischen Zellen möglich (Tabelle 3).

Den mit β -Hämolysin behandelten Zellkulturen wurden 2 µg/ml AO und 2 µg/ml EB für eine Zeit von 5 Minuten zugefügt. Danach erfolgte eine Bewertung und Auszählung der Zellen mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops mit integrierter Kamera (Leica, Solms, Deutschland).

| Zustand | Zellkern | | |
|---------------|----------|---|--|
| | Farbe | | Form und Größe |
| Lebend | grün |  | normal |
| Apoptose früh | grün |  | verkleinert, kondensiert, fragmentiert |
| Apoptose spät | rot |  | verkleinert, kondensiert, fragmentiert |
| Nekrose | rot |  | vergrößert, geschwollen |

Tabelle 3

Mechanismus der AO/EB-Doppelfärbung

Die AO/EB-Doppelfärbung macht eine Differenzierung des neuronalen Zelltods anhand Färbung und Form der Zellkerne möglich: 1. grüner Zellkern mit normaler Größe bei lebenden Zellen 2. grüner, verkleinerter und/oder kondensierter Zellkern bei früher Apoptose, wenn die Zellmembran noch ungeschädigt ist 3. roter, verkleinerter und/oder kondensierter Zellkern bei später Apoptose, wenn die Zellmembran bereits geschädigt ist und 4. roter, normal großer oder vergrößerter Zellkern bei Nekrose (Pittrak et al. 1996)

3.1.4 Immunzytochemischer Nachweis des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF)

AIF kann immunzytochemisch nachgewiesen werden (Braun et al. 2002). Hierfür wurden die Neurone in der Zellkultur auf Glasplättchen angezchtet und mit Zellkulturmedium allein (Negativkontrolle), Staurosporin (0,5 μM) (Positivkontrolle) und β -Hämolyisin (0,1 HU/ μl) behandelt. Anschließend wurden die Neurone auf den Glasplättchen rasch luftgetrocknet und mit 3% Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Danach wurden sie gründlich und vorsichtig mit PBS gespült. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte in 0,1%iger SDS Lösung (10 Minuten). Danach wurde erneut gründlich und vorsichtig mit PBS gespült. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine einstündige Inkubation mit 1%igem bovinem Serumalbumin (BSA) und 10%igem

nativem Ziegenserum (native goat serum = NGS) in PBS blockiert. Danach wurden die Neurone auf den Glasplättchen mit einem primären AIF-Antikörper in einer Verdünnung von 1:800 für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde erneut gründlich und vorsichtig mit PBS gespült. Schließlich wurde der rot fluoreszierende Sekundärantikörper Cy3 1:500 auf die Neurone pipettiert und eine Stunde lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden die Zellkerne für 10 Minuten mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff Hoechst 33258 in einer Verdünnung von 1:1.000 gefärbt. Abschließend erfolgte eine dreimalige Spülung mit PBS und Abdeckung der Glasplättchen mit Eindeckmedium (Fluoreszenz Antifading Mounting Medium) und die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung.

3.1.5 Caspasen-Inhibitoren

Um die Caspasen-Funktion zu blockieren, wurden der neuronalen Zellkultur nach Stimulation mit β -Hämolyisin Caspasen-Inhibitoren zugefügt. Verwendet wurden der irreversible Breitspektrum-Caspasen-Inhibitor z-VAD-fmk und der Caspase-3-Inhibitor z-DEVK-fmk.

Die Caspasen-Inhibitoren wurden in einer 10 mM Stammlösung angesetzt und jeweils in einer Endkonzentration von 100 μ M angewendet. Nach einem Zeitintervall von 3, 6 und 9 Stunden erfolgte die AO/EB-Färbung zur Auswertung und die fluorometrische Analyse der Caspasen-Aktivität.

3.1.6 Fluorometrische Analyse der Caspasen-Aktivität

Ziel der Messung war die Bestimmung der Caspasen-Aktivität im Zellextrakt. Hierzu wurde den neuronalen Lysaten ein Caspasen-spezifisches Substrat zugefügt. Dieses Substrat ist an ein Fluorophor (Ac-DEVD-AMC (AMC = 7-Amino-4-methylcoumarin)) gekoppelt. Ac-DEVD-AMC ist fluorogenes Substrat für Caspase-3, (zum Teil auch für Caspase-1, -4, -7 und -8). Ist aktive Caspase-3 im Zellysat vorhanden, wird durch diese das Fluorophor spezifisch abgespalten. Die Menge des freien Fluorophors wurde durch Messung der Fluoreszenz quantitativ bestimmt und erlaubte somit eine Quantifizierung der Caspase-Aktivität.

Nach Inkubation mit β -Hämolyisin bzw. Staurosporin (Positivkontrolle) wurden die zerebralen Neuronen in gekühlte Eppendorfröhrchen überführt und bei 2000 U/min zentrifugiert. Danach erfolgte eine Lyse des Pellets (5 Minuten) auf Eis (mit 50 mM HEPES, 1 mM DDT, 0,1 mM EDTA, 0,1% CHAPS, pH 7,4). Nach anschließender Zentrifugation bei 15.000 U/min wurden 20 μ l Überstand zu 80 μ l Reaktionspuffer (100 mM NaCl, 50 mM HEPES, 10 mM DTT, 1 mM

EDTA, 10% Glycerol, 0,1% CHAPS, pH 7,4) und 75 μ M eines fluorogenen spezifischen Caspasen-Substrats (Ac-DEVD-AMC, Calbiochem) in einer 96-er Platte hinzugefügt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Fluoreszenzintensität mithilfe eines Fluoreszenz-Plattenmessgeräts (Cytofluor II, Calbiochem) gemessen und die Caspasen-Aktivität im Vergleich mit einem Standard (AMC: 7-amino-4-methylcoumarin) anhand einer erstellten Standardkurve errechnet.

3.1.7 Elektronenmikroskopie

Die zerebralen Neurone wurden hierzu in Kulturplatten mit 6 Vertiefungen kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation der neuronalen Zellkultur für 6 Stunden mit β -Hämolyysin (0,1 HU/ μ l) bzw. als Positivkontrolle mit Staurosporin (0,5 μ M/ μ l), danach eine Spülung mit PBS und eine Fixierung über Nacht bei pH 7,4 in 4°C PBS mit 3% Paraformaldehyd und 3% Glutaraldehyd. Zum Postfixieren wurden die Zellen in einer Osmiumtetroxid-Lösung (0,7% in PBS) mit 0,2 M Saccharose inkubiert. Danach erfolgte eine Entwässerung der Neuronen durch eintauchen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50% bis 100% Ethanol).

Die Neuronen wurden nun in Hydroxypropylmetacrylat (HPMA) inkubiert. Anschließend wurde ein 1:1 Gemisch HPMA und EPON 812 (Epoxid-Kunstharz mit Beschleunigerzusatz) aufpipettiert, welches nach 60 Minuten verworfen und erneuert wurde. Nach Inkubation über Nacht war das HPMA verdampft. Das verbliebene EPON wurde abgetragen. Dann wurden die Neuronen zweimal in EPON 812 und Aktivatorzusätzen inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen in eine dünne Schicht EPON 812 eingebettet und dieses für 1 - 2 Tage auspolymerisiert und getrocknet.

Von diesen Neuronenblöcken wurden mit einem Reichert Ultracut S Ultramicrotome ca. 600 nm dünne Schnitte hergestellt. Diese Schnitte wurden auf Kupfer-Trägernetzchen (AGAR-Grids) aufgetragen und mit Formvarfilm (Fluka) überzogen. Nach dem Trocknen der Schnitte erfolgte das Positivkontrastieren (Anlagern von Schwermetallen ans Gewebe) mit Uranylacetat und Bleicitrat mithilfe eines Schnittkontrastierungs-Automaten (Reichert UltraStainer).

Nach dem Trocknen der Schnitte erfolgten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit einem EM900 Elektronenmikroskop der Firma Zeiss bei 80 kV und bis zu 50.000 facher Vergrößerung.

3.2 Statistische Analyse

Die angegebenen Werte werden präsentiert als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mehreren, mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde entweder mit dem Mann-Whitney rank sum test oder mit dem ungepaarten Student's t-Test bestimmt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3.3 Materialien

3.3.1 Geräte

(soweit nicht anders angeführt, deutsche Firmen)

| | |
|--------------------------------|--|
| Digitalkamera | Leica Camera AG, Solms |
| Elektronenmikroskop | EM 900, Carl Zeiss AG, Oberkochen |
| Fluoreszenz-Plattenmessgerät | Cytofluor II, PerSeptive Biosystems, USA |
| Fluoreszenz-Mikroskop | Leica Camera AG, Solms |
| Schnittkontrastierungs-Automat | Reichert UltraStainer |
| Ultramicrotome | Reichert Ultracut S Ultramicrotome |

3.3.2 Chemikalien

(soweit nicht anders angeführt, deutsche Firmen)

| | |
|-----------------------------|---|
| Ac-DEVD-AMC | Calbiochem, USA |
| AIF-Antikörper | Invitrogen-Molecular Probes, Karlsruhe |
| Akridinorange | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| AGAR Grids | Plano GmbH, Wetzlar |
| B27 Supplement | Invitrogen-Gibco, Karlsruhe |
| Bleizitrat | Leica Camera AG, Solms |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Caspase-3-Substrat | MW 675,6, AMC-gekoppelt Calbiochem, Heidelberg |

| | |
|---|--|
| Cy3-Antikörper | Invitrogen-Molecular Probes, Karlsruhe |
| DMSO | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Eindeckmedium (Antifading Mounting Medium) | Dianova, Hamburg |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| EPON 812 | Fluka, Schweiz |
| Formvar Film | Fluka, Schweiz |
| Fötale Kälberserum | Biochrom AG, Berlin |
| Glukose | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Glutamat | Biochrom AG, Berlin |
| Glutaraldehyd | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| HEPES | Calbiochem, Heidelberg |
| Hoechst 33258 Zellkern-Färbung | Hoechst AG, Frankfurt a. M. |
| HPMA (Hydroxypropylmetacrylat) | Plano GmbH, Wetzlar |
| <i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit | Roche, Mannheim |
| Insulin | NovoNordisk Pharma GmbH, Mainz |
| Kollagen | Biochrom AG, Berlin |
| L-Glutamin | Biochrom AG, Berlin |
| Neurobasalmedium | Invitrogen-Gibco, Karlsruhe |
| Osmiumtetroxid | Plano GmbH, Wetzlar |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) | Invitrogen-Gibco, Karlsruhe |
| Penicillin/Streptomycin | Biochrom AG, Berlin |
| Poly-L-Lysin | Biochrom AG, Berlin |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Staurosporin | Sigma, St. Louis, USA |

| | |
|-------------------|------------------------------------|
| Trypsin | Biochrom AG, Berlin |
| Uranylacetat | Serva, Heidelberg |
| Zellkulturplatten | BD Biosciences-Falcon, Heidelberg |
| z-DEVD-fmk | Enzyme Systems Products, Livermore |
| z-VAD-fmk | Enzyme Systems Products, Livermore |

3.3.3 Gebrauchslösungen

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung):
140 mM NaCl, 50 mM Na₂PO₄ in Aqua bidest, pH 7,4

PFA (Paraformaldehydlösung):
4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, den durch das bakterielle Toxin β -Hämolyysin induzierten neuronalen Zelltod zu untersuchen, seine Konzentrations- und Zeitabhängigkeit sowie morphologische und ultrastrukturelle Kriterien und biochemische Mechanismen zu beschreiben.

Werden neuronale Zellen mit lebenden Bakterien inkubiert, so ist davon auszugehen, dass vielfältige und undefinierte, von den Bakterien ausgehende Faktoren, Einfluss auf den neuronalen Schaden haben können. Deshalb wurden in dieser Arbeit die isolierten Auswirkungen des β -Hämolyysin auf primäre Neurone analysiert. Es wurde gereinigtes und stabilisiertes β -Hämolyysin verwendet (freundlicherweise von V. Nizet bereitgestellt), welches mit unterschiedlichen Verdünnungs- und Zeitparametern und mit Zusätzen zur Inhibition der Caspasen angewendet wurde.

Auf diesem Weg konnten Aussagen über die Morphologie des neuronalen Schadens sowie über dessen Quantität und Qualität gemacht und Rückschlüsse auf die Caspasen-Aktivität und Mitochondrientoxizität gezogen werden.

Am 7. Tag nach der Präparation wurde die neuronale Zellkultur mit gereinigtem β -Hämolyysin inkubiert und die lichtmikroskopischen und ultrastrukturellen Veränderungen untersucht.

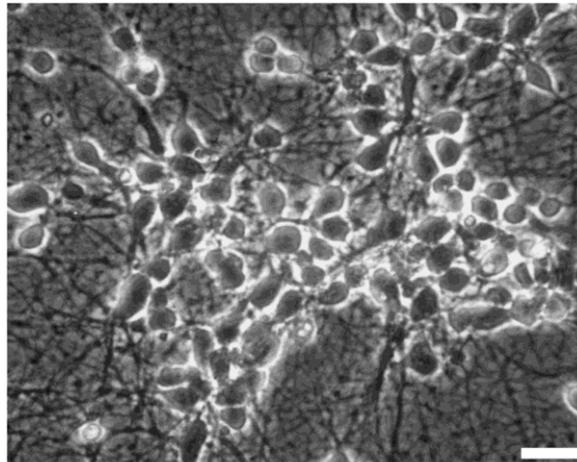
4.1 Charakterisierung des β -Hämolyysin-induzierten Zelltodes als Apoptose

4.1.1 Lichtmikroskopie (LM)

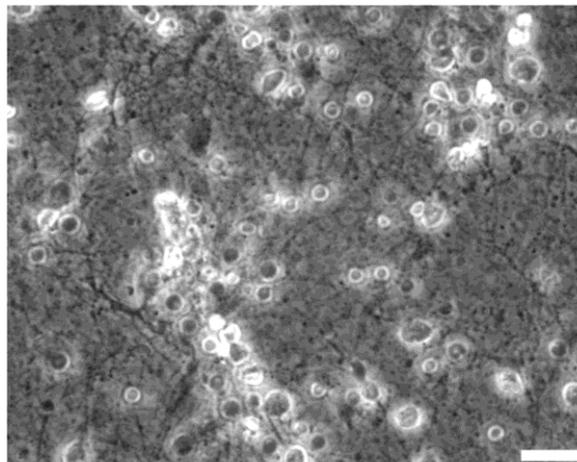
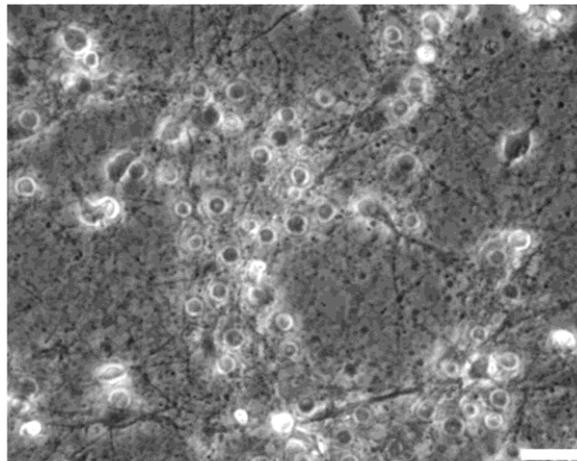
Zur ersten morphologischen Einschätzung der Auswirkungen von β -Hämolyysin auf die Neuronenkultur wurden die primären neuronalen Zellkulturen für 9 Stunden mit β -Hämolyysin inkubiert und lichtmikroskopisch untersucht. Als Positivkontrolle diente die Behandlung mit Staurosporin, als Negativkontrolle die Behandlung mit dem Zellkulturmedium. Staurosporin ist ein bekannter Auslöser von Apoptose.

In der lichtmikroskopischen Aufnahme (siehe Abbildung 5) zeigten sich typische morphologische Zeichen eines apoptotischen Zelltodes. Diese traten sowohl in den mit Staurosporin behandelten Neuronen als auch in den mit β -Hämolyysin behandelten Neuronen auf. Die Neurone stellten sich insgesamt verkleinert und verdichtet dar. Die Axone präsentierten sich in Ihrer Anzahl deutlich reduziert. Die Integrität des Zellverbandes war aufgelöst. Die Negativkontrolle zeigte eine unveränderte physiologische neuronale Morphologie.

Negativ-Kontrolle



Staurosporin

 β -Hämolyysin**Abbildung 5****Lichtmikroskopische (LM) Untersuchung des β -Hämolyysin-induzierten neuronalen Zelltodes**

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen primäre Neurone in Zellkultur, welche entweder mit β -Hämolyysin (0,1 HU/ μ l), Staurosporin (0,5 μ M) (Positivkontrolle) oder Zellkulturmedium (Negativkontrolle) 9 Stunden lang behandelt wurden. Es sind klassische Zeichen der Apoptose erkennbar, wie beispielsweise Verkleinerung der Zellkörper und Reduktion der Axone. Vergrößerungsbalken = 30 μ m.

4.1.2 Elektronenmikroskopie (EM)

Zur weiteren Untersuchung der β -Hämolyisin-induzierten Neurotoxizität wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (siehe Abbildung 6). Anhand der Ultrastruktur war es möglich, die charakteristischen Veränderungen des apoptotischen Zelltods zu erkennen. Es wurden Aufnahmen vom Zellkern sowie von den Mitochondrien behandelter und unbehandelter Neuronen mit einer Vergrößerung von 1:4.400 (Zellkern) bzw. 1:12.000 (Mitochondrien) angefertigt. Als Positivkontrolle diente Staurosporin, als Negativkontrolle das Zellkulturmedium.

Die Zellkerne der mit β -Hämolyisin und mit Staurosporin behandelten Neurone wiesen eine für die Apoptose typische Schrumpfung auf. Die Kondensation und Marginalisierung des Chromatins ist erkennbar und charakteristisch.

Das Chromatin in den mit β -Hämolyisin behandelten Zellen wirkte locker und weniger gedrängt. Es war nur eine partielle Kondensation des Chromatins eingetreten. Die Mitochondrien wirkten geschwollen und zum Teil in Auflösung begriffen. Das Anschwellen der Mitochondrien ist mit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials verknüpft (Reis et al. 2012). Die morphologischen und ultrastrukturell erkennbaren Veränderungen des durch β -Hämolyisin ausgelösten neuronalen Zelltods entsprachen einer Apoptose.

Die Morphologie der mit Staurosporin behandelten Neurone zeigte das klassische Bild einer Apoptose mit stark geschrumpftem Zellkern und vollständiger Chromatinkondensation mit Marginalisierung. Auch hier waren die Mitochondrien geschwollen und zerstört. Sowohl β -Hämolyisin als auch Staurosporin lösten an neuronalen Zellkulturen einen apoptotischen Zelluntergang aus. Ultrastrukturell waren morphologische Unterschiede auszumachen, die darauf hinwiesen, dass β -Hämolyisin nicht das Vollbild einer klassischen Apoptose induziert.

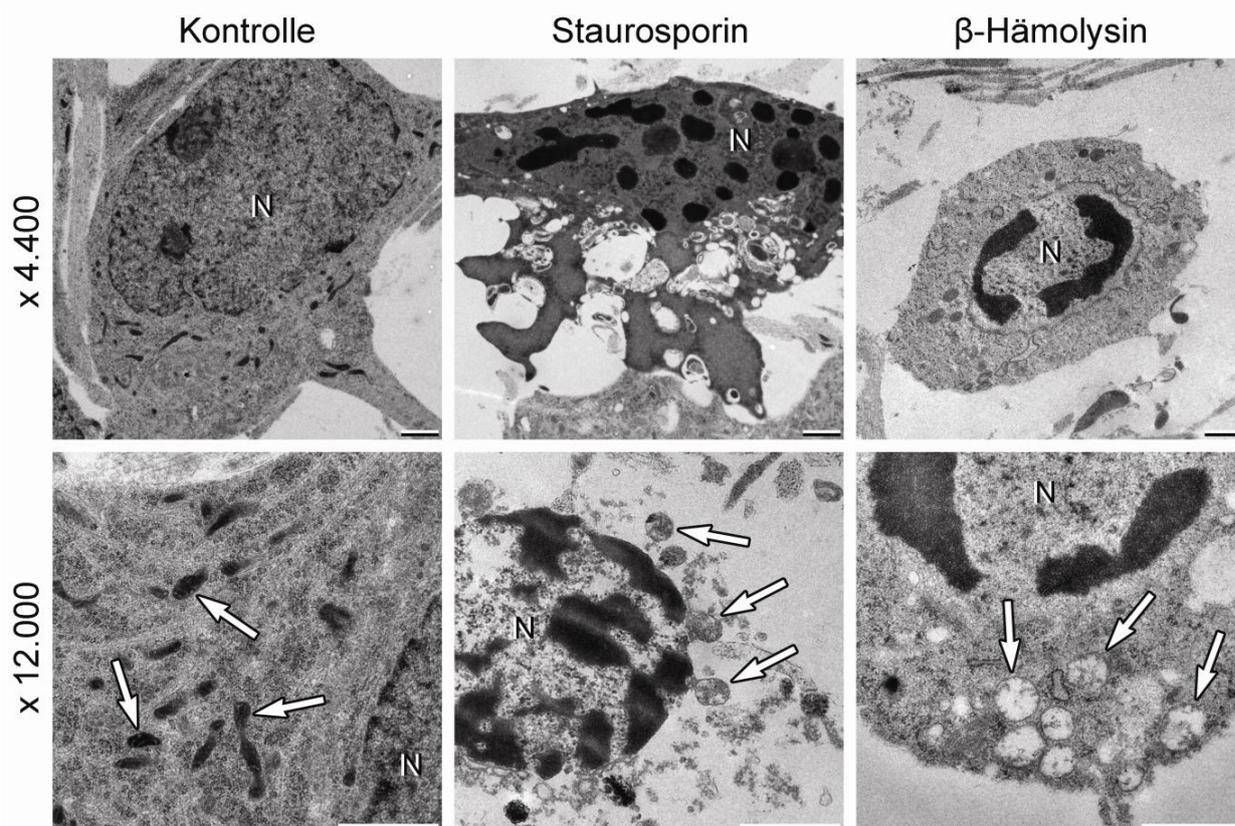


Abbildung 6

Elektronenmikroskopische (EM) Untersuchung des β-Hämolyisin-induzierten neuronalen Zelltodes

Die EM Aufnahmen zeigen die Nuklei (= N) (x 4.400) und Mitochondrien (Pfeile) (x 12.000) von Neuronen, die 6 Stunden lang entweder mit β-Hämolyisin (0,1 HU/μl), Staurosporin (0,5 μM) (Positivkontrolle) oder Zellkulturmedium (Kontrolle) behandelt wurden. Sowohl die mit Staurosporin als auch die mit β-Hämolyisin behandelten Neurone zeigen ultrastrukturelle Kennzeichen der Apoptose, wie geschrumpfte Zellen und Zellkerne mit kondensiertem, fragmentiertem und zum Teil marginalisiertem Chromatin sowie geschwollene und zerstörte Mitochondrien. Pfeile zeigen auf Mitochondrien. Vergrößerungsbalken = 1 μm.

4.1.3 Akridinorange/Ethidiumbromid-Färbung (AO-EB)

Mithilfe der Anfärbung der neuronalen Zellen mit Ethidiumbromid (EB) und Akridinorange (AO) können die klassischen morphologischen und insbesondere nukleären Kriterien der Apoptose sichtbar gemacht werden.

Abbildung 7 zeigt das fluoreszenzmikroskopische Bild nach Behandlung der neuronalen Zellkultur mit β-Hämolyisin und Staurosporin bzw. unbehandelte Neurone.

Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid und Akridinorange und der fluoreszenzmikroskopischen

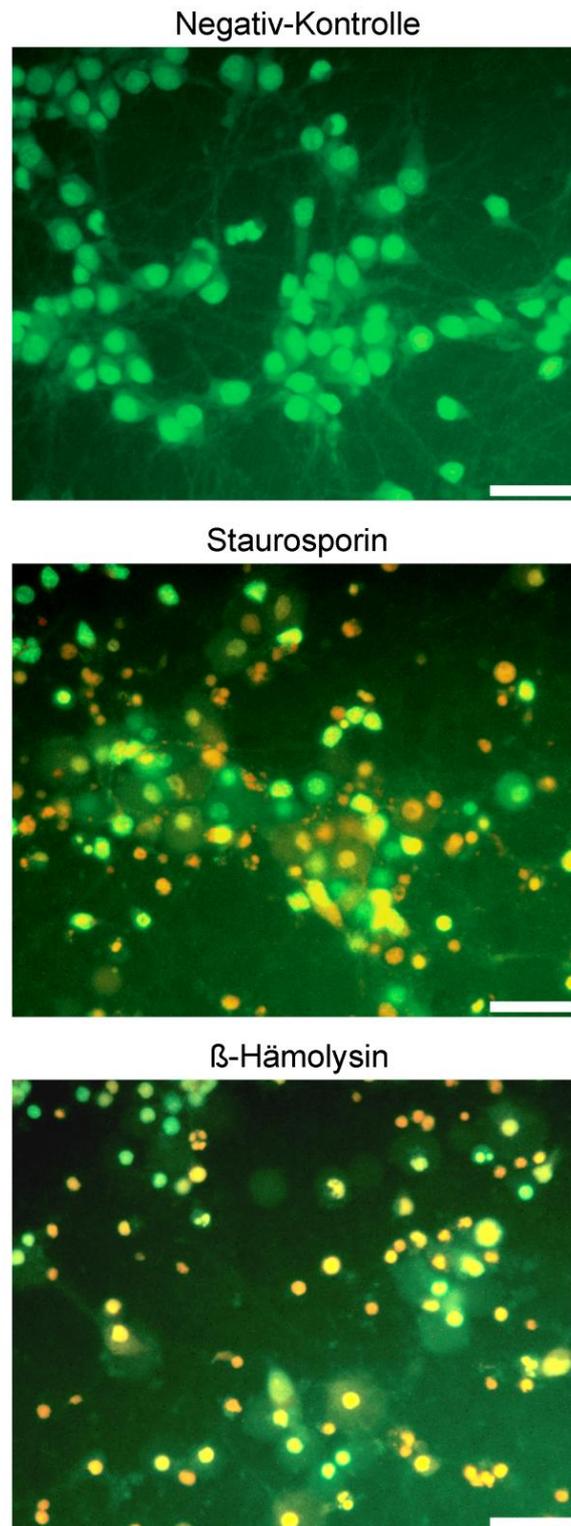


Abbildung 7

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des β -Hämolyisin-induzierten neuronalen Zelltodes

Neurone in Zellkultur wurden mit β -Hämolyisin (0,1 HU/ μ l), Staurosporin (0,5 μ M) oder mit Zellkulturmedium 6 Stunden lang inkubiert. Apoptosekriterien im Akridinorange/Ethidiumbromid-Assay (AO-EB) waren Verkleinerung oder Fragmentierung der Zellkerne. Zellkerne sind grün, solange die Zellmembran intakt ist, und rot, sobald die Zellmembran durchlässig wird. Vergrößerungsbalken = 30 μ m.

Auswertung fielen bei den mit β -Hämolysin und mit Staurosporin inkubierten Neuronen vergleichbare morphologische Veränderungen auf. Die Zellkörper waren geschrumpft und die Zellkerne verkleinert und zum Teil fragmentiert. Durch die Rotfärbung der Zellkerne ließ sich darstellen, dass es aufgrund der zytotoxischen Wirkung beider Toxine zu einer Durchlässigkeit der Zellmembran und einer Destruktion der Zelle kam.

Neurone mit grün angefärbten Zellkernen besaßen eine intakte Zellmembran. Morphologisch wirkten jedoch auch diese Zellkerne sowohl in den mit Staurosporin als auch in den mit β -Hämolysin behandelten Neuronen verkleinert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Eindeutige Unterschiede in der morphologischen Struktur in den mit Staurosporin und mit β -Hämolysin inkubierten Neuronen waren nicht zu erkennen. Man erkannte in beiden Fällen die klassischen fluoreszenzmikroskopischen Kriterien der Apoptose.

4.1.4 Immunzytochemie: Apoptose-induzierender Faktor AIF

Die Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien ist ein klassisches Kennzeichen der Schädigung der Mitochondrien bei der Mitochondrien-abhängigen und Caspasen-unabhängigen Apoptose (Susin et al. 1999). Um eine mögliche AIF-Freisetzung zu untersuchen, wurden kortikale Neurone mit β -Hämolysin (0,1 HU/ μ l) behandelt. Als Negativkontrolle dienten mit Zellkulturmedium behandelte Neurone. Als Positivkontrolle wurde der klassische Apoptose-Auslöser Staurosporin (0,5 μ M) verwendet. Anschließend erfolgte eine immunzytochemische Färbung mit einem Primärantikörper gegen AIF, dessen Bindungsstellen mit einem Sekundärantikörper Cy3 visualisiert wurde (rote Anfärbung). Danach wurden die neuronalen Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt (blaue Anfärbung).

In den Kontrollneuronen zeigte sich eine gleichmäßige mitochondriale Verteilung von AIF über das gesamte Zytosol bis in die neuronalen Fortsätze hinein sowie morphologisch unauffällige Zellkerne (Abbildung 8).

β -Hämolysin induzierte genauso wie Staurosporin eine Kondensierung und Verkleinerung der neuronalen Nuklei. Ebenso konnte sowohl bei den mit β -Hämolysin als auch den mit Staurosporin behandelten Neuronen eine Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien und eine massive Reduktion des AIF Signals beobachtet werden. Die Translokation von AIF in den Zellkern ließ sich in der Doppelfärbung nachweisen. Hier zeigte sich die Kolokation von AIF in den Randbereichen der Zellkerne. β -Hämolysin wirkt mitochondrientoxisch und bewirkt eine

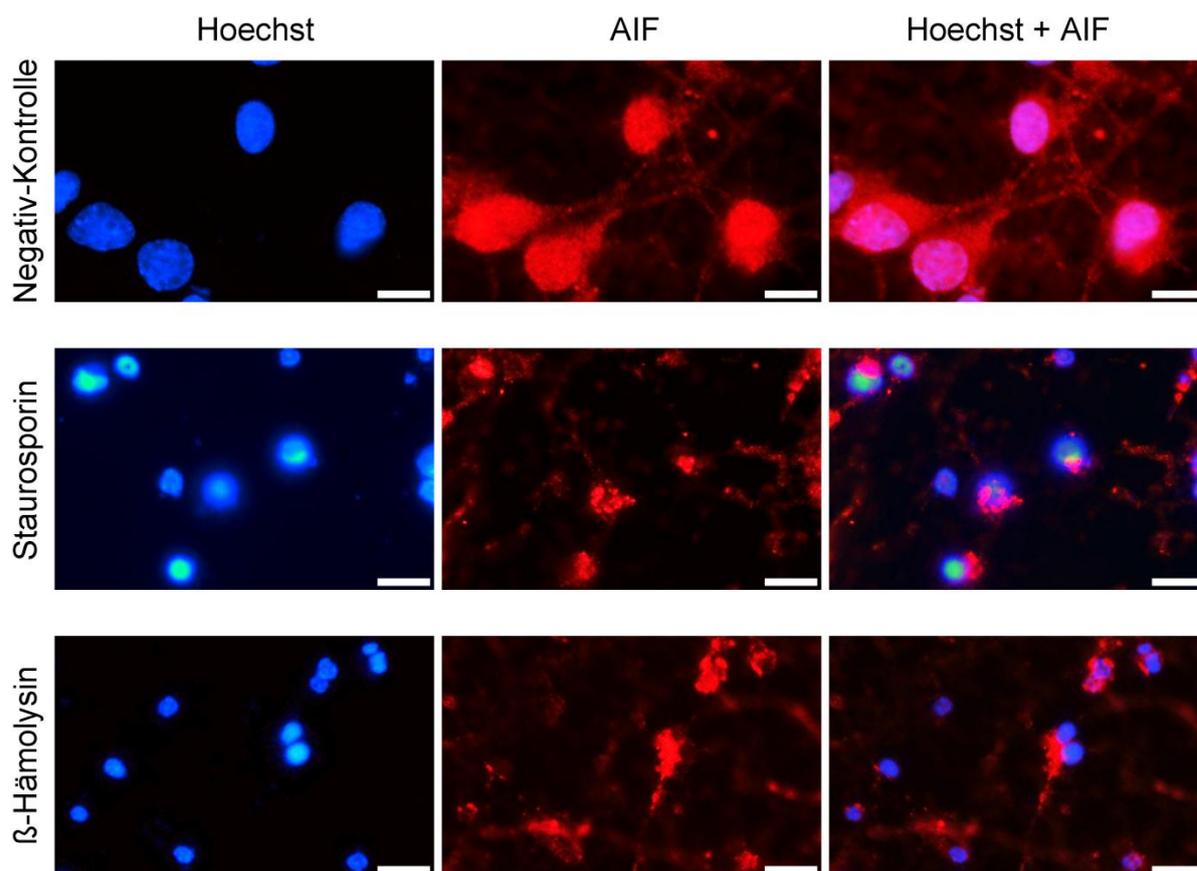


Abbildung 8

Immunzytochemische Untersuchung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) beim β -Hämolyisin-induzierten neuronalen Zelltod

Neurone in Zellkultur wurden 9 Stunden lang mit β -Hämolyisin (0,1 HU/ μ l), Staurosporin (0,5 μ M) (Positiv-Kontrolle) oder Zellkulturmedium (Negativ-Kontrolle) inkubiert. Anschließend wurden die Neurone mit Hoechst (blau = Zellkerne) und einem Antikörper gegen den Apoptose-induzierenden Faktor (AIF, rot) immunzytochemisch untersucht. In den Kontrollneuronen zeigten sich normal große Zellkerne und keine mitochondriale AIF-Freisetzung. Klassische Zeichen der Apoptose sind Verkleinerung oder Kondensierung der Zellkerne sowie Verminderung von mitochondrialem AIF und mitochondrial-nukleäre Translokation von AIF. Die Experimente wurden dreimal unter den gleichen Bedingungen wiederholt. Vergrößerungsbalken = 10 μ m.

Umverteilung von AIF in primären Neuronen. Es ließ sich eine Reduzierung von mitochondrialem AIF und dessen Translokation aus den Mitochondrien in den Zellkern nachweisen. AIF ist an der durch β -Hämolyisin verursachten neuronalen Apoptose beteiligt.

4.2 Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der β -Hämolyisin-induzierten neuronalen Apoptose

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass β -Hämolyisin in primären zerebralen Neuronen eine Apoptose auslöst, sollte weiterhin untersucht werden, inwiefern die Faktoren der Einwirkzeit des Toxins und der Toxinkonzentration einen Einfluß auf das Ausmaß des apoptotischen Schadens

haben.

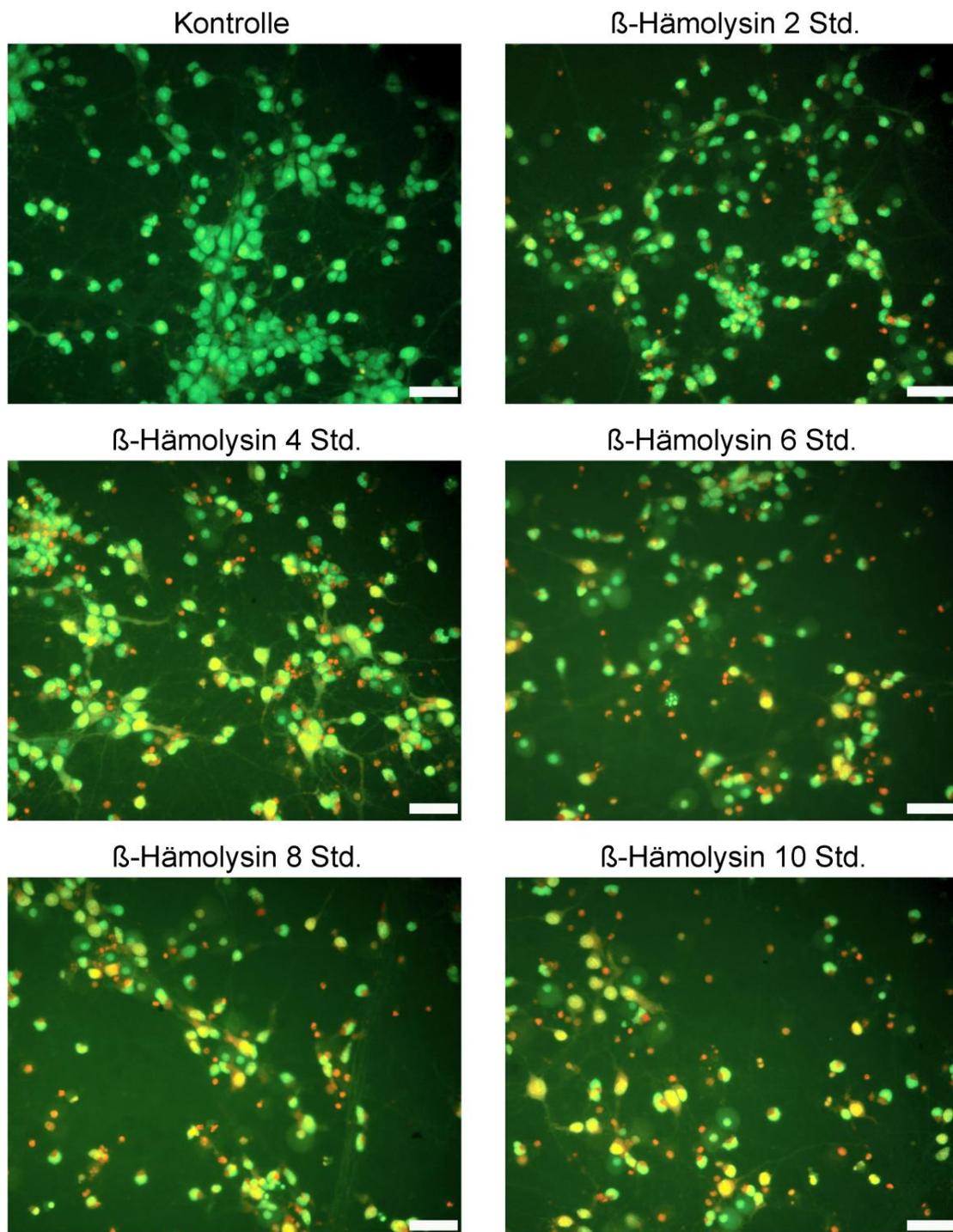
4.2.1 Zeitabhängigkeit im AO/EB-Assay

Desweiteren wurde untersucht, inwieweit die Zelltodstadien und die Zelltodmorphologie von der Einwirkungszeit des β -Hämolytins auf die Neuronen abhängig sind. Zur Darstellung einer Abhängigkeit der Apoptoseinduktion von unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit β -Hämolytins wurden die Akridinorange/Ethidiumbromid-Färbung und die anschließende fluoreszenzmikroskopische Bildgebung verwendet. Die Einwirkzeiten lagen zwischen 2 bis 10 Stunden.

In Abbildung 9 sind die morphologischen Veränderungen der Neurone dargestellt. Deutlich wird eine über die Zeit zunehmende Verkleinerung der Zellen. Insbesondere die Zellkerne stellten sich mit zunehmender Einwirkzeit verkleinert, kondensiert und zum Teil fragmentiert dar. Diese morphologischen Veränderungen zeigten typische Merkmale einer Apoptose.

Die Dauer der β -Hämolytins-Exposition bedingte die Zellkernmorphologie und Zellkernfärbung im AO/EB Assay und war ein Indiz des Zelltodmechanismus und des Zelltodstadiums (grün = Zellmembran intakt, rot = Zellmembran geschädigt). Normal große, grüne Zellkerne zeigten lebende Neurone. Geschrumpfte kondensierte grüne Zellkerne zeigten früh-apoptotische Neurone. Diese überwogen in den über zwei bis vier Stunden behandelten Zellkulturen. Ab sechs Stunden Einwirkzeit änderte sich das Verhältnis zwischen grün und rot dargestellten Neuronen. Die rot gefärbten Neuronen zeigten eine dysfunktionale Zellmembran an. In diesen Neuronen war der apoptotische Prozess bereits soweit fortgeschritten, dass es zu einer Destruktion der Zellmembran kam und dadurch der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in die Zelle und zu den Zellkernen gelangte und diese rot anfärbte. Mit zunehmender Einwirkzeit des β -Hämolytins nahm die Zahl der rot angefärbten, verkleinerten Zellen zu und die Zahl der grün angefärbten verkleinerten Zellen ab. Mit zunehmender Einwirkzeit wurde eine Abnahme der interzellulären Verbindungen sichtbar. Der Zellzusammenhang löste sich mit fortschreitendem apoptotischen Prozess auf. Es ließ sich eine Abhängigkeit des Ausmaßes des apoptotischen Schadens von der Länge der Einwirkzeit des Toxins darstellen.

Ein nekrotischer Zellschaden konnte mithilfe des AO/EB Assays ausgeschlossen werden. In diesem Fall hätten sich die Zellkerne vergrößert und geschwollen darstellen müssen. Diese Form des Zelltods spielt in vitro in der neuronalen durch β -Hämolytins ausgelösten Schädigung keine Rolle.

**Abbildung 9****Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zeitabhängigkeit des β -Hämolyysin-induzierten neuronalen Zelltodes**

Die Neurone in Zellkultur wurden mit β -Hämolyysin (0,1 HU/ μ l) oder mit Zellkulturmedium (Kontrolle) über verschiedene Zeiträume inkubiert. Danach wurde die Zellkultur mit dem Akridinorange-Ethidiumbromid-Assay untersucht. Apoptosekriterien waren Verkleinerung oder Kondensierung oder Fragmentierung des Zellkerns. Akridinorange färbt die Zellkerne grün, solange die Zellmembran intakt ist. Ethidiumbromid färbt die Zellkerne rot, sobald die Zellmembran durchlässig wird. Vergrößerungsbalken = 20 μ m.

4.2.2 Quantifizierung der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit

Um die Abhängigkeit der Apoptoserate sowohl von der Einwirkzeit des Toxins als auch von der Toxinkonzentration darzustellen, wurden die primären neuronalen Zellkulturen über ansteigende Einwirkzeiten mit unterschiedlichen β -Hämolyisinkonzentrationen (0,05 HU/ μ l; 0,1HU/ μ l; 0,25 HU/ μ l) inkubiert. Anschließend wurden die apoptotischen Neuronen mithilfe der Akridinorange/Ethidiumbromid-Färbung und fluorometrischer Bildgebung identifiziert und die Apoptoserate quantifiziert.

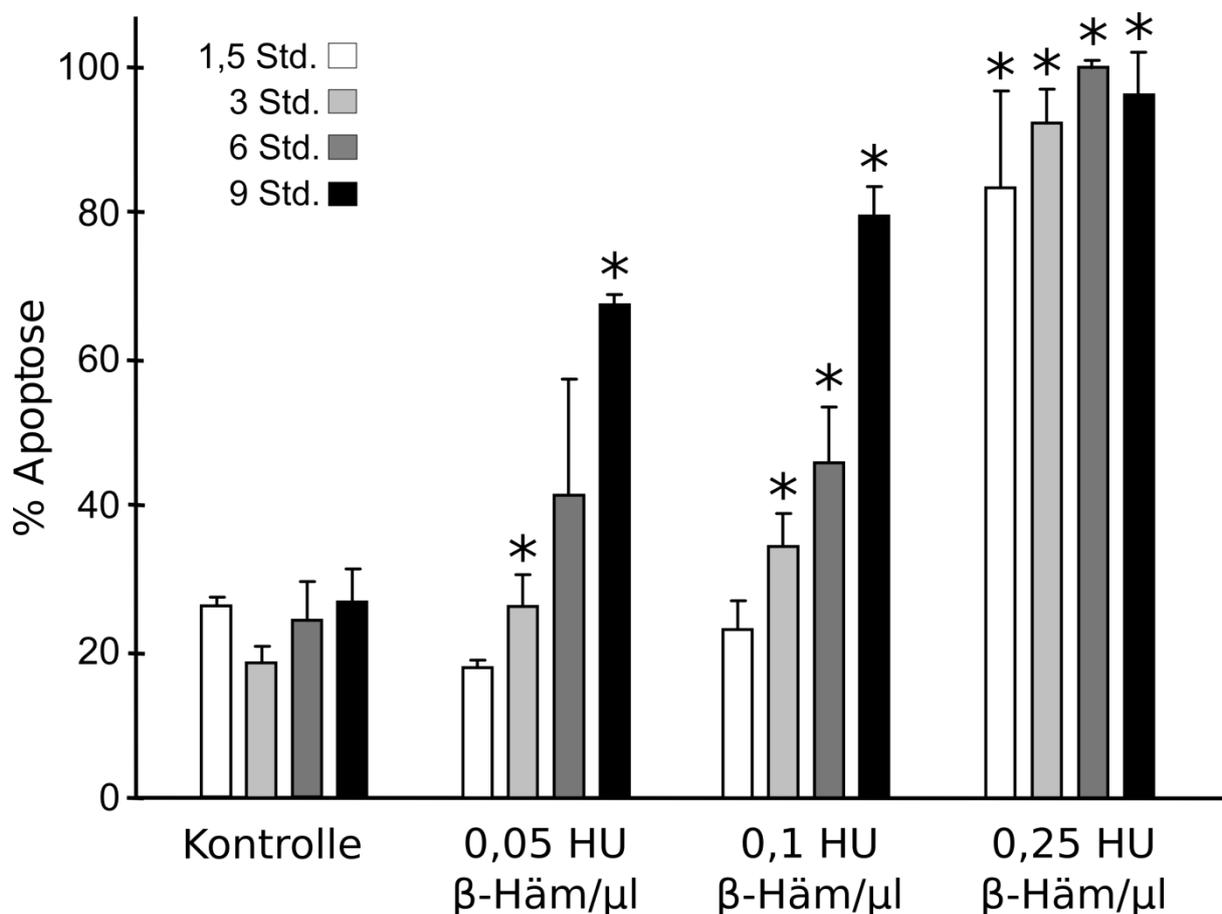


Abbildung 10

Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des β -Hämolyisin-induzierten neuronalen Zelltodes

Die primären kortikalen Neurone wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des gereinigten β -Hämolyisin β -H/Z (0,05, 0,1 und 0,25 HU/ μ l) im Zellkulturmedium inkubiert. Die Kontrollneurone blieben unbehandelt. Der programmierte Zelltod (Apoptose) wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten (1,5 bis 9 Stunden) mithilfe der Akridinorange/Ethidiumbromid-Färbung quantifiziert.

* = $p < 0,05$ im Vergleich zu den jeweils zeitgleichen Kontrollen

In Abbildung 10 zeigt sich, dass die Rate der Apoptose mit steigender Toxinkonzentration zunahm. Besonders bei hohen Konzentrationen des Toxins ließ sich eine neuronale Apoptose in

einer hohen Quantität nachweisen. Die höchste verwendete β -Hämolyisin-Konzentration (0,25 HU/ μ l) verursachte sehr rasch neuronale Apoptose. Bereits nach 1,5-stündiger Toxinexposition waren über 80% der Neurone apoptotisch.

Hinsichtlich der Inkubationsdauer des Toxins ließ sich ebenfalls eine Abhängigkeit der Apoptoserate erkennen. Hier zeigte sich insbesondere bei niedrigen Toxinkonzentrationen eine deutliche Zunahme der neuronalen Apoptose mit zunehmender Einwirkzeit. Bei hoher Toxinkonzentration war die Zunahme der Apoptose auch bei längerer Inkubationszeit aufgrund der bereits sehr früh induzierten hohen Apoptoserate nicht mehr so eindeutig.

Bei der höchsten verwendeten Konzentration von 0,25 HU β -Häm/ μ l und einer Einwirkzeit von 9 Stunden waren annähernd 100% der Neurone apoptotisch verändert.

Es lag eine statistisch signifikante Abhängigkeit im quantitativen Ausmaß der neuronalen Apoptose in Abhängigkeit von der β -Hämolyisin-Konzentration und der Länge der Einwirkzeit vor.

4.3 Caspasen-Unabhängigkeit der β -Hämolyisin-induzierten neuronalen Apoptose

Nachdem die Morphologie des β -Hämolyisin-induzierten neuronalen Zellschadens als Apoptose definiert wurde, wird in den folgenden Ausführungen dargestellt, inwiefern eine Aktivierung von Caspasen, welche den klassischen Mechanismus der Apoptose vermittelt, bei der Zelltodexekution der β -Hämolyisin-induzierten Apoptose eine Rolle spielt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Pneumokokken einen alternativen Weg der Apoptose auslösen, der nicht durch Caspasen vermittelt wird (Braun et al. 2002). An Makrophagen konnte bereits eine Caspasen-unabhängige Apoptose durch β -Hämolyisin nachgewiesen werden (Fettuciari et al. 2000, Liu und Nizet 2004).

Um der Hypothese, dass das Toxin β -Hämolyisin der Gruppe-B Streptokokken über einen Caspasen-unabhängigen Weg in den Zelltod der primären Neuronen eingreift, nachzugehen, wurden für diese Arbeit die Caspasen-Aktivierung und die Zelltod inhibition durch Caspasen-Inhibitoren der β -Hämolyisin-induzierten neuronalen Apoptose untersucht.

4.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der fehlenden Zelltod-Inhibition durch z-VAD-fmk und z-DEVD-fmk

Die klassische Apoptose ist ein Caspasen-abhängiger Prozess. Sie lässt sich durch Caspasen-Inhibitoren hemmen.

Um zu überprüfen, ob die β -Hämolyisin-induzierte neuronale Apoptose durch eine Caspasen-Aktivierung ausgelöst wurde, wurde verändernd in die durch Caspasen vermittelte Schadenskaskade eingegriffen. In dieser Versuchsreihe wurden zwei Inhibitoren genutzt: zum einen der zellmembrangängige irreversible Breitspektrum-Caspasen-Inhibitor z-VAD-fmk, der alle Caspasen blockiert und zur Gruppe der synthetischen Peptidinhibitoren gehört. Mithilfe seines Benzyloxycarbonylrests bindet z-VAD-fmk unspezifisch an die aktiven Zentren aller bisher bekannter Caspasen. Die Fluoromethylgruppe von z-VAD-fmk bindet kovalent an das aktive Zentrum der Caspasen und führt zu einer sofortigen und irreversiblen Hemmung der Caspasen-Aktivität. Des Weiteren nutzte ich den spezifischen Caspasen-Inhibitor z-DEVD-fmk, der ausschließlich Proteasen der Caspase-3-Familie hemmt (Garcia-Calvo et al. 1998).

Die neuronalen Zellkulturen wurden mit β -Hämolyisin (0,1 HU/ μ l) und jeweils 100 μ M der Inhibitoren z-VAD-fmk oder z-DEVK-fmk bzw. ohne Zusatz von Caspasen-Inhibitoren inkubiert. Die Auswertung der Inhibition erfolgte quantitativ mithilfe des Akridinorange/Ethidiumbromid-Assays (Abbildung 11) und ultrastrukturell mithilfe der Elektronenmikroskopie (Abbildung 12).

Die Behandlung der neuronalen Zellkultur mit β -Hämolyisin und mit Staurosporin zeigten in der Akridinorange/Ethidiumbromid-Färbung die morphologischen Merkmale einer Apoptose. Die Zellkerne stellten sich verkleinert und kondensiert dar, die Integrität der neuronalen Zellmembran ging größtenteils verloren. Diese Erkenntnisse entsprachen den bereits oben Dargestellten.

Ein Zusatz der Caspasen-Inhibitoren machte wesentliche morphologische Unterschiede der neuronalen Apoptose nach Inkubation der Neuronen mit β -Hämolyisin und nach Inkubation mit dem klassischen Apoptoseauslöser Staurosporin deutlich.

Wie in Abbildung 11 erkennbar, wurde die durch Staurosporin verursachte Apoptose sowohl durch den Breitspektrum-Inhibitor z-VAD-fmk als auch durch den Caspase-3-Inhibitor z-DEVD-fmk deutlich reduziert. Morphologisch zeigten sich die Zellkerne der Neuronen im Wesentlichen unverändert im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Die Grünfärbung der Neurone und der

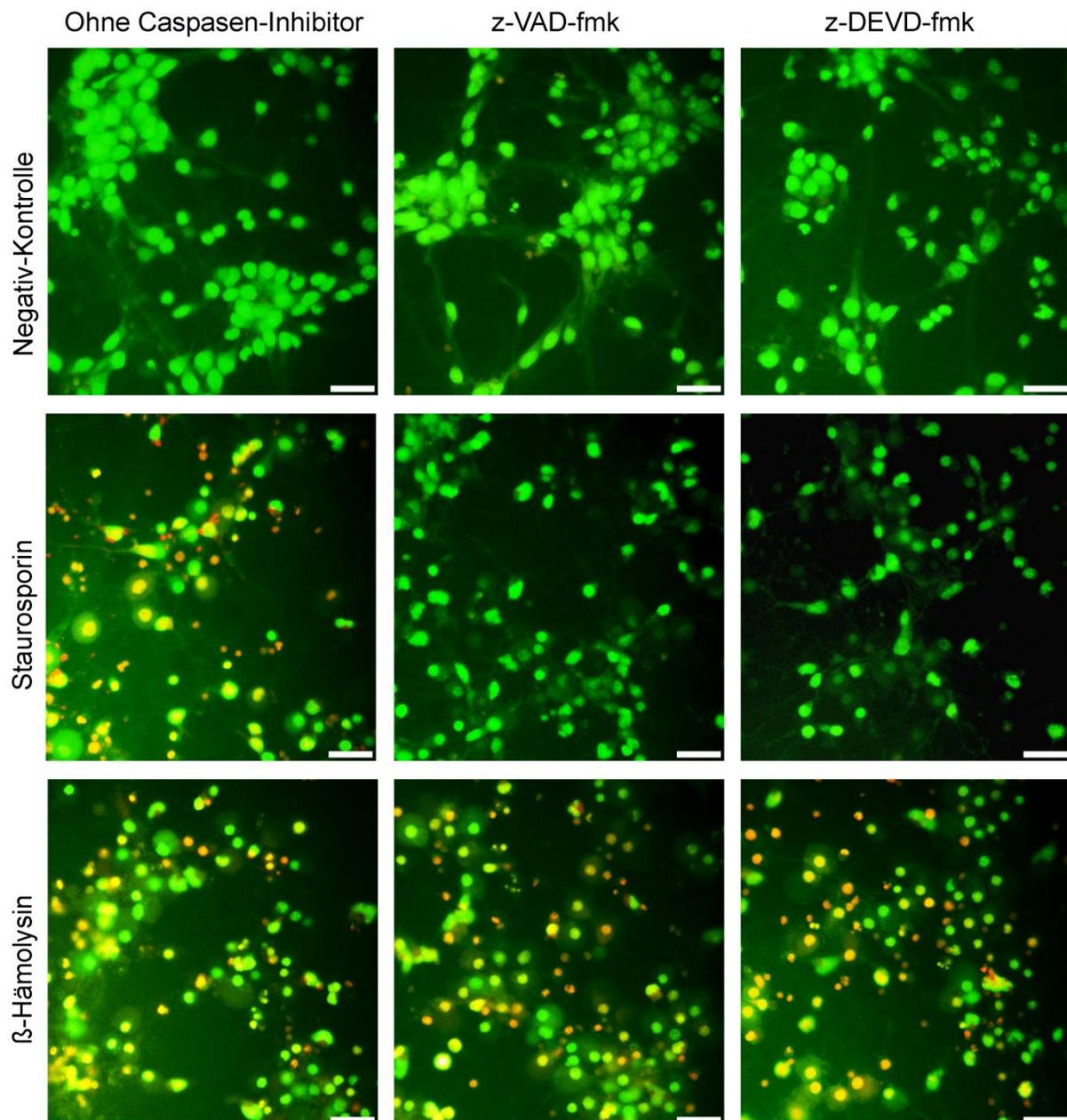


Abbildung 11

Caspasen-Inhibitoren reduzieren nicht β -Hämolyisin-induzierte neuronale Apoptose

Die Neurone wurden 6 Stunden mit Zellkulturmedium (Negativ-Kontrolle), β -Hämolyisin (0,1 HU/ μ l) oder mit Staurosporin (0,5 μ M) (Positivkontrolle) inkubiert und zwar in Abwesenheit oder in Anwesenheit des Caspase-3-Inhibitors z-DEVD-fmk (100 μ M/ μ l) oder des Breitspektrum-Caspasen-Inhibitors z-VAD-fmk (100 μ M/ μ l). Danach erfolgte die Akridinorange/Ethidiumbromid-Färbung. Zellkerne sind grün, solange die Zellmembran intakt ist, und rot, sobald die Zellmembran durchlässig wird. Caspasen-Inhibitoren reduzierten signifikant die Staurosporin-induzierte, aber nicht die β -Hämolyisin-induzierte Rotfärbung und Verkleinerung der neuronalen Nuklei. Vergrößerungsbalken = 20 μ m.

Ausschluß des roten Farbstoffs Ethidiumbromid ließen auf eine intakte Zellmembran schließen. Das morphologische Erscheinungsbild entsprach dem der unbehandelten Zellkultur. Die durch

Staurosporin ausgelöste Apoptose konnte durch den Zusatz der Caspasen-Inhibitoren verhindert werden.

Die mit β -Hämolyisin inkubierten Neuronen hingegen zeigten morphologisch auch nach Zugabe der Caspasen-Inhibitoren die typischen Merkmale einer Apoptose. Morphologisch stellten sich die Zellkerne verkleinert und das Chromatin verdichtet dar. Die Zellkerne waren durch Ethidiumbromid rot eingefärbt, es bestand eine Dysfunktionalität der Zellmembran.

Die durch β -Hämolyisin ausgelöste neuronale Apoptose ließ sich durch die Zugabe der Caspasen-Inhibitoren nicht verhindern oder reduzieren.

4.3.2 Elektronenmikroskopische Darstellung der fehlenden Zelltod-Inhibition durch z-VAD-fmk

Um diese Ergebnisse ultrastrukturell zu belegen, wurde die neuronale Zellkultur mit Staurosporin und β -Hämolyisin und anschließend mit dem Breitspektrum-Caspasen-Inhibitor z-VAD-fmk behandelt und die Neuronen elektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung 12).

Staurosporin- und β -Hämolyisin-behandelte Neurone zeigten morphologische Merkmale einer Apoptose: verkleinerte Zellen, verkleinerte und fragmentierte Nuklei, Marginalisierung und/oder Kondensierung des Chromatins, Schwellung und Destruktion der mitochondrialen Ultrastruktur.

Bei gleichzeitiger Behandlung der Neurone mit Staurosporin und z-VAD-fmk blieb die neuronale Ultrastruktur intakt. Die Nuklei waren nicht geschrumpft, die Mitochondrien morphologisch unversehrt. Die Ausbildung klassischer ultrastruktureller Apoptosekriterien konnte mithilfe des Caspasen-Inhibitors z-VAD-fmk verhindert werden.

Ein anderes morphologisches Bild ergab sich nach gleichzeitiger Behandlung der Neurone mit β -Hämolyisin und z-VAD-fmk. Hier zeigten sich trotz Caspasen-Inhibition deutlich morphologische Merkmale der Apoptose. Es kam zu einem nukleären Schrumpfen sowie einer Marginalisierung und Kondensierung des Chromatins. Die Mitochondrien wirkten geschwollen und zerstört. Morphologisch ergab sich dasselbe Bild wie bei alleiniger Behandlung der Neurone mit β -Hämolyisin. Die Caspasen-Inhibition mit z-VAD-fmk führte in diesem Fall nicht zu einer Verhinderung ultrastruktureller Apoptosekriterien.

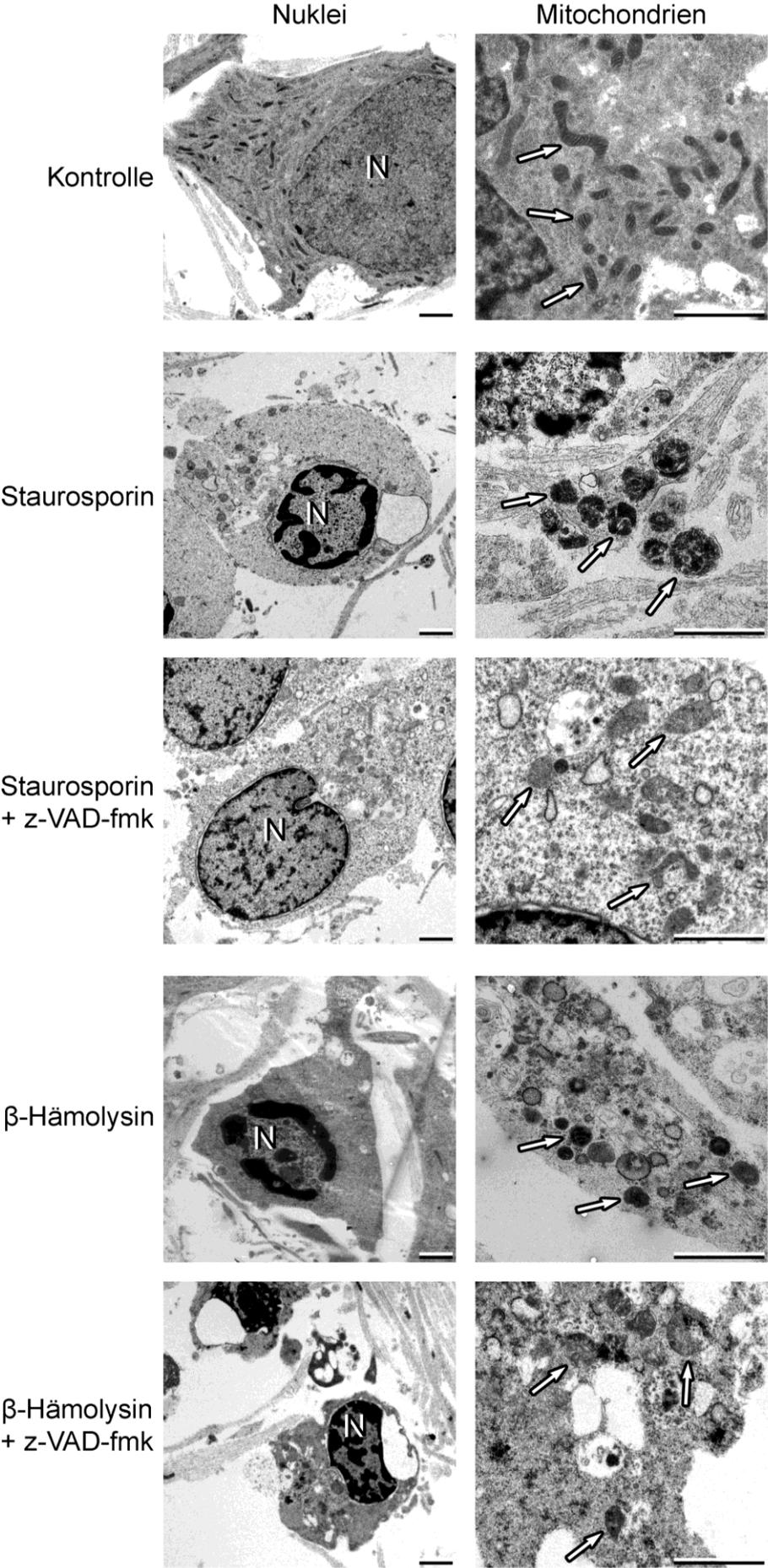


Abbildung 12**Caspasen-Inhibitor schützt nicht vor β -Hämolyisin-induzierten ultrastrukturellen neuronalen Schäden**

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen Nuklei (N) ($\times 4.400$) und Mitochondrien (Pfeile) ($\times 12.000$) von Neuronen, die mit β -Hämolyisin ($0,1 \text{ HU}/\mu\text{l}$), Staurosporin ($0,5 \mu\text{M}$) (Positivkontrolle) oder Zellkulturmedium allein (Negativkontrolle) behandelt wurden. Klassische Zeichen neuronaler Apoptose im Elektronenmikroskop sind geschrumpfte Nuklei mit marginalisiertem und kondensiertem Chromatin und teilweise Blasenbildung der nukleären Membran sowie geschwollene und zerstörte Mitochondrien. Der Breitspektrum-Caspasen-Inhibitor z-VAD-fmk reduzierte signifikant die Staurosporin-, aber nicht die β -Hämolyisin-induzierten ultrastrukturellen Schädigungszeichen der neuronalen Apoptose. Vergrößerungsbalken = $1 \mu\text{m}$.

Die ultrastrukturelle Untersuchung der Neurone bestätigte die licht- und fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse.

Die neuronale durch Staurosporin ausgelöste Apoptose konnte durch die Zugabe von z-VAD-fmk reduziert werden.

Die morphologischen Veränderungen nach Inkubation mit β -Hämolyisin unterschieden sich trotz Zusatz von Caspasen-Inhibitoren nicht von denen nach alleiniger Toxininkubation, eine Apoptoseinhibition über die Blockierung der Caspasen-Aktivität war nicht wirksam.

4.3.3 Graphische Darstellung der fehlenden Zelltod-Inhibition durch z-VAD-fmk und z-DEVD-fmk

In Abbildung 13 wurde quantitativ die Apoptoserate nach Inkubation der neuronalen Zellkultur mit β -Hämolyisin und zusätzlicher Inkubation mit den Caspasen-Inhibitoren z-VAD-fmk und z-DEVD-fmk dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der Akridinorange/Ethidiumbromid-Färbung.

Die graphische Darstellung zeigt die fehlende Inhibition der Apoptose durch beide Caspasen-Inhibitoren. β -Hämolyisin löste in der neuronalen Zellkultur eine Apoptose aus. Diese ließ sich nach Behandlung mit dem Breitspektrum-Caspasen-Inhibitor z-VAD-fmk bzw. dem Caspase-3-Inhibitor z-DEVD-fmk quantitativ nicht signifikant reduzieren.

Es bestätigten sich die bereits oben aufgeführten Erkenntnisse, daß die neuronale durch β -Hämolyisin ausgelöste Apoptose durch Caspasen-Inhibitoren nicht gehemmt werden konnte.

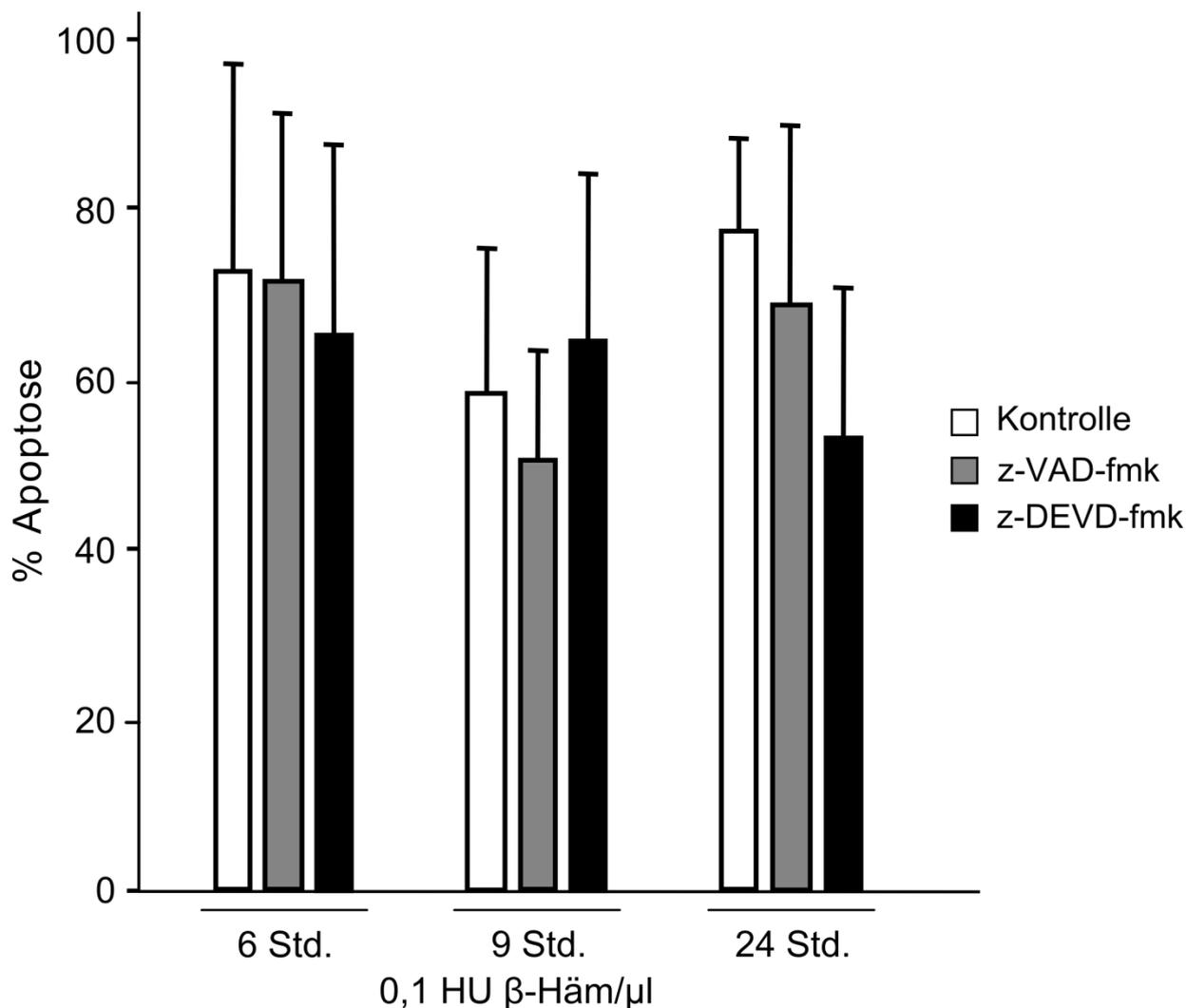


Abbildung 13

Caspasen-Inhibitoren reduzieren nicht β -Hämolyisin-induzierte neuronale Apoptose

Die Neurone wurden mit β -Hämolyisin (0,1 HU/ μ l) von 6 bis 24 Stunden inkubiert und zwar in Abwesenheit (Kontrolle) oder in Anwesenheit des Caspase-3-Inhibitors z-DEVD-fmk (100 μ M/ μ l) oder des Breitspektrum-Caspasen-Inhibitors z-VAD-fmk (100 μ M/ μ l). Apoptose wurde mit dem Akridinorange/Ethidiumbromid-Assay quantifiziert. Zu keinem der gemessenen Zeitpunkte bewirkte z-VAD-fmk oder z-DEVD-fmk eine signifikante Reduktion der β -Hämolyisin-induzierten neuronalen Apoptose im Vergleich zu den Kontrollen ohne Caspase-Inhibitoren ($p > 0,05$).

4.3.4 Graphische Darstellung der fehlenden Caspase-3-Aktivierung durch β -Hämolyisin

Um zu überprüfen, ob an der β -Hämolyisin-induzierten Apoptose Caspasen beteiligt sind, wurde die direkte Messung der Caspase-3-Aktivität vorgenommen.

Caspase-3 ist eine Effektor-Caspase, die den gemeinsamen Endweg der extrinsisch und intrinsisch getriggerten klassischen Apoptose einleitet.

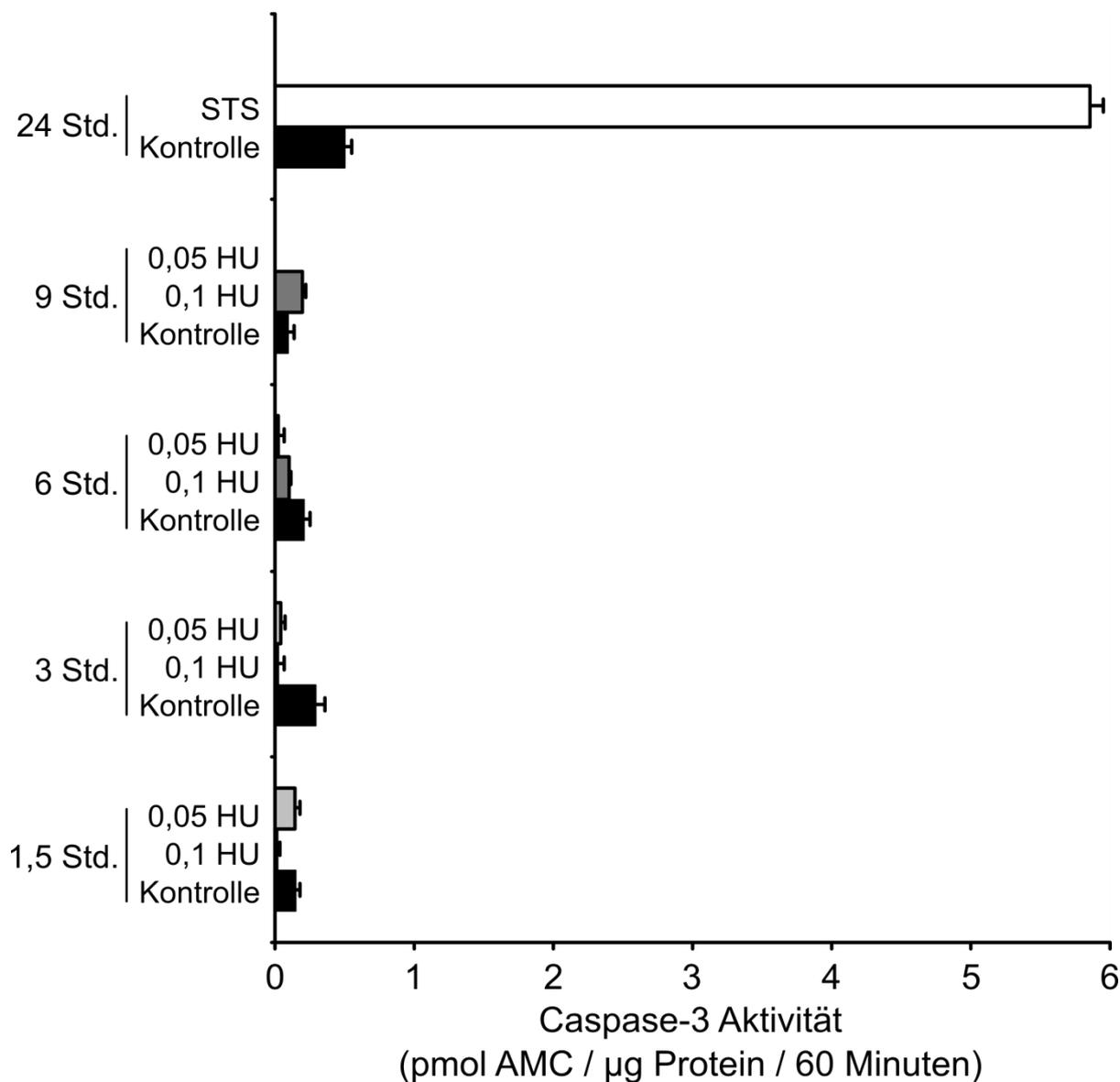


Abbildung 14

β-Hämolyysin induziert Apoptose ohne Caspasen-Aktivierung

Die neuronale Zellkultur wurden mit 2 verschiedenen Konzentrationen von β-Hämolyysin (0,05 HU/µl und 0,1 HU/µl), bzw. mit Staurosporin (STS) (0,5 µM/µl) als Positivkontrolle (weißer Balken) und mit Zellkulturmedium als Negativkontrolle (schwarze Balken) über verschiedene Zeiträume behandelt. Danach wurden die Neurone lysiert und mit einem Caspase-3-Substrat inkubiert. Anschließend wurde die Caspase-3-Aktivität mithilfe eines Multiwell-Fluoreszenzmessgeräts quantifiziert. Hierbei wird die Spaltung eines nicht fluoreszierenden Caspase-3 Substrates zu einem fluoreszierenden Produkt gemessen. Zu keinem Zeitpunkt induzierte β-Hämolyysin eine signifikante Caspase-3-Aktivität im Vergleich zu den Negativkontrollen ($p > 0,05$).

Mithilfe Ihrer Aktivitätsbestimmung konnte eine Aussage über die durch β-Hämolyysin ausgelöste Caspasen-Aktivität getroffen werden (Abbildung 14).

In Abbildung 14 zeigt sich die fehlende Caspase-3-Aktivierung nach Inkubation primärer zerebraler Neuronenkulturen mit β -Hämolysin. Es kam weder durch eine höhere Toxinkonzentration noch durch eine Verlängerung der Inkubationszeit zu einer Caspase-3-Aktivierung. Die Positivkontrolle zeigte eine starke Caspase-3-Aktivierung nach Behandlung mit dem klassischen Apoptoseauslöser Staurosporin.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe eines *in vitro*-Modells primärer zerebraler Neuronen die Bedeutung des bakteriellen Toxins β -Hämolyisin als Mediator eines neuronalen apoptotischen Zellschadens in Hinblick auf Morphologie, Ultrastruktur, Caspasen-Aktivierung und Mitochondrienschädigung zu untersuchen. Die Behandlung der Neuronen erfolgte mit dem gereinigten Toxin β -Hämolyisin der Gruppe-B Streptokokken.

Die Hauptergebnisse der vorliegenden Arbeit sind folgende:

- Das Toxin β -Hämolyisin der Gruppe-B Streptokokken induziert direkt einen neuronalen Zellschaden.
- Der Zellschaden zeigt die typischen Merkmale eines programmierten Zelltods in Form einer Apoptose.
- Die Quantität des neuronalen Zellschadens korreliert mit der Höhe der Toxinkonzentration und der Einwirkzeit des Toxins.
- Caspasen-Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die Quantität und Qualität des Zellschadens.
- Das Toxin β -Hämolyisin löst in den Neuronen keine Caspasen-Aktivierung aus.
- β -Hämolyisin induziert Mitochondrienschädigung und die Freisetzung des mitochondrialen Faktors AIF, welcher in der Lage ist, Caspasen-unabhängige Apoptose zu vermitteln

5.1 Die Rolle des Toxins β -Hämolyisin in der Pathogenese des neuronalen Schadens

Diese Arbeit beruht auf einem *in vitro*-Modell mit lebenden primären neonatalen Kortexneuronen der Ratte. Ziel der Arbeit war es, die Morphologie und die intrazellulären Wirkmechanismen des Zellschadens nach Behandlung neonataler zerebraler Neurone mit dem porenformenden Toxin β -Hämolyisin der Gruppe-B Streptokokken, den Hauptverursachern der neonatalen Meningitis, zu untersuchen. Das verwendete *in vitro*-Modell hatte den Vorteil, dass die beobachteten Effekte und intraneuronalen Vorgänge unbeeinflusst von Wachstum, Sauerstoffverbrauch und anderweitigen Einflüssen bewertet werden konnten. Die Verwendung primärer Neurone hat den Vorteil, dass Apoptoseprozesse unbeeinflusst von den Immortalitätseffekten bei Zelllinien untersucht werden konnten.

Die Behandlung der zerebralen Neuronen erfolgte mit isoliertem β -Hämolysin, um andere zytotoxische Faktoren der Gruppe-B Streptokokken zu eliminieren und insgesamt äußere Einflüsse und anderweitige Schädigungsmomente so gering wie möglich zu halten.

5.1.1 Pathogene Mechanismen und Einflussfaktoren

Bakterielle Zytotoxine spielen im Rahmen der Schadenskaskade bei bakteriellen Infektionen eine entscheidende Rolle. Die Wirkmechanismen der Toxine sind vielfältig und sollen anhand der Exotoxine kurz dargestellt werden. Exotoxine werden von Bakterien produziert und freigesetzt. Es handelt sich um makromolekulare Polypeptide. Sie beeinflussen gezielt Regulationsmechanismen in der Zelle. Die Virulenzfaktoren wirken verschiedenartig:

1. Proteinsynthese-hemmende Exotoxine: Hemmung der Proteinsynthese und des Zellwachstums durch Blockade an Ribosomen (z. B. Diphtherie-Toxin von *Corynebacterium diphtheriae*, Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae*)
2. zellfunktionsverändernde Exotoxine: modifizieren Syntheserate von second-messenger-Molekülen (z. B. Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae*, hitzelabiles Enterotoxin von *Escherichia coli*) oder hemmen Synapsen durch Besetzen der Rezeptoren (z. B. Tetanus-Toxin von *Clostridium tetani*)
3. membranschädigende Exotoxine: verändern Membranen z. B. durch Einlagerung, bewirken Lyse der Zelle (z.B. Alpha-Toxin von *Clostridium perfringens*, Streptolysin-O von *Streptococcus pyogenes*)
4. Invasivfaktoren: hydrolytische Enzyme, die die extrazelluläre Matrix und Zelloberflächenmoleküle verändern, zugehörig sind die porenformenden Toxine (z. B. Hyaluronidase von A-Streptokokken, Pneumolysin von Pneumokokken, β -Hämolysin der Gruppe-B Streptokokken) (Rolle und Mayr 2007, www.ChemgaPedia.de)

Ein entscheidender Virulenzfaktor der Gruppe-B Streptokokken ist das in dieser Arbeit verwendete Toxin β -Hämolysin. Es gehört wie das Toxin Pneumolysin der Pneumokokken zu den porenformenden Toxinen (Spellerberg 2000, Nizet et al. 2000). Die Pathomechanismen der Pneumokokken als Hauptverursacher der Meningitis im Erwachsenenalter wurden in den vergangenen Jahren bereits in verschiedenen Modellen untersucht. Pneumokokken sind in der Lage, *in vivo* in Neuronen des Gyrus dentatus einen apoptotischen Zelltod auszulösen (Braun et al. 1999). Eine direkte Schädigung in Form eines apoptotischen Zellschadens ergab ein *in vitro*-

Modell an Endothelzellen (Berpohl et al. 2005). Es konnte eine direkte zytotoxische Wirkung von Pneumolysin als wichtigem pathogenen Wirkfaktor nachgewiesen werden (Zysk et al. 2001). Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Toxins β -Hämolyysin der Gruppe-B Streptokokken in der Pathogenese der neonatalen Meningitis genauer zu untersuchen und zu beschreiben. Im Rahmen der experimentellen Versuche war es möglich, eine morphologische Qualifizierung und Quantifizierung des neuronalen Schadens durch β -Hämolyysin vorzunehmen.

Der direkte Nachweis der Neurotoxizität durch gereinigtes β -Hämolyysin wurde bisher noch nicht untersucht. Jedoch ergaben Experimente mit lebenden Bakterien bereits Hinweise auf eine neurotoxische Komponente des Toxins.

In einem *in vitro*-Modell an neuronalen Meningen konnte eine destruktive Wirkung von β -Hämolyysin durch vergleichende Behandlung einer Zellkultur mit toxin-normexprimierenden Gruppe-B Streptokokken und überexprimierenden bzw. nicht exprimierenden Mutanten nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass die norm- und überexprimierenden Mutanten einen apoptotischen Zelltod, welcher anhand der LDH-Freisetzung quantitativ meßbar gemacht wurde, auslösten. Die nichtexprimierende Mutante zeigte lediglich eine nicht signifikante LDH-Freisetzung (Alkuwaity et al. 2012).

Weiterhin konnte die Abhängigkeit des Zellschadens vom Ausmaß der Expression von β -Hämolyysin an neuronalen Endothelzellen der Bluthirnschranke *in-vitro* nachgewiesen werden (Nizet et al. 1997). β -Hämolyysin induziert in Endothelzellen direkt die IL-8-Ausschüttung. IL-8 ist als Chemokin ein starker Aktivator der neutrophilen Immunantwort. Durch diese Eigenschaft spielt β -Hämolyysin eine wesentliche Rolle in der Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke (Doran et al. 2003).

Eine weitere Eigenschaft von β -Hämolyysin ist die Induktion der Synthese von NO (nitric oxid/Stickstoffmonoxid), welches als Vasodilatator in der Sepsiskaskade fungiert (Ring et al. 2002).

Das Ausmaß der Expression von β -Hämolyysin spielt eine entscheidende Rolle bei der Apoptoseinduktion nach Stimulation mit Gruppe-B Streptokokken.

In einer Versuchsreihe von Fettucciari wurde an Makrophagen mithilfe lebender Gruppe-B Streptokokken die Induktion der Apoptose vom Vorhandensein von β -Hämolyysin dargestellt. Es wurde die Apoptoserate vom normal exprimierendem Wildtyp GBS-III mit der genetisch veränderten Mutante gGBS-III mit fehlender β -Hämolyysin-Aktivität verglichen. Die Mutante ohne β -Hämolyysin-Aktivität löste im Gegensatz zum Wildtyp keine Apoptose aus. Nach

Behandlung mit DPPC, einem sehr wirksamen Inhibitor der β -Hämolyisin-Aktivität, zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der Inhibition der Apoptose bei Abnahme der β -Hämolyisin-Aktivität. Nach Behandlung der Makrophagen mit unterschiedlich exprimierenden GBS-Stämmen zeigte sich die Abhängigkeit im Ausmaß der Apoptose von der Zunahme der Expression von β -Hämolyisin. Je höher der hämolytische Titer war, umso größer war die Apoptoserate (Fettucciari et al. 2000).

In neueren Untersuchungen an *in vitro*-Zellreihen von meningealen Zellen zeigte sich ebenfalls eine Abhängigkeit des Ausmaßes des Zelltods von der Höhe der Expression von β -Hämolyisin. Während die norm- und hyperhämolytischen Bakterienstämme A909 und NCTC 10/84 einen Zellschaden auslösten, war dieser nach Inkubation mit den jeweiligen nichthämolytischen Mutanten nicht nachweisbar. DPPC konnte auch in dieser Versuchsreihe die Zellschädigung inhibieren (Alkuwaity et al. 2012).

β -Hämolyisin stellt einen entscheidenden pathogenen Faktor während einer GBS-Infektion dar. In vivo ist das Schadensausmass abhängig von der Höhe der Expression des Toxins. In unserer Versuchsreihe konnte die Vermutung bestätigt werden, dass β -Hämolyisin nicht nur für eine direkte toxische Schädigung an zerebralen Neuronen verantwortlich ist, sondern dass die neuronale Zellschädigung direkt von der Dosis und der Einwirkungszeit des Toxins abhängig ist. Die Anwesenheit von β -Hämolyisin führt nicht zwangsläufig zu einem apoptotischen Zelluntergang. Eine Untersuchung an Kaninchen ergab, dass die intravenöse Behandlung mit Gruppe-B Streptokokken bei einer hohen Toxinkonzentration zu einer Nekrose von Hepatozyten führte. Bei einer moderaten Konzentration des Toxins war ein apoptotischer Zellschaden nachweisbar (Ring et al. 2002).

Nach Behandlung von Mikrogliazellen und primären Neuronen *in-vitro* mit Pneumolysin, dem Toxin der Pneumokokken, konnte ebenfalls eine Abhängigkeit der Form des Zelltods von der Toxinkonzentration beobachtet werden. In niedrigen Konzentrationen war ein proinflammatorischer Effekt zu beobachten, wurden die Zellreihen mit dem Toxin in einer höheren Konzentration inkubiert, ergab sich vorwiegend ein apoptotischer Zelltod. Abhängig von der Dauer der Behandlung mit Pneumolysin und der Toxinkonzentration war nach langer Inkubation mit hoher Toxinkonzentration auch ein nekrotischer Zellschaden zu beobachten (Braun et al. 2001). Die Apoptose scheint ein sensibler Marker für die Anwesenheit porenformender Toxine zu sein, bei sehr hoher Konzentration wird in einigen Fällen ein nekrotischer Zelltod ausgelöst.

In dieser Arbeit zeigte sich bei hoher Toxinkonzentration kein nekrotischer Zellschaden, vielmehr ergab sich eine Abhängigkeit der Apoptoserate von der Höhe der Toxinkonzentration.

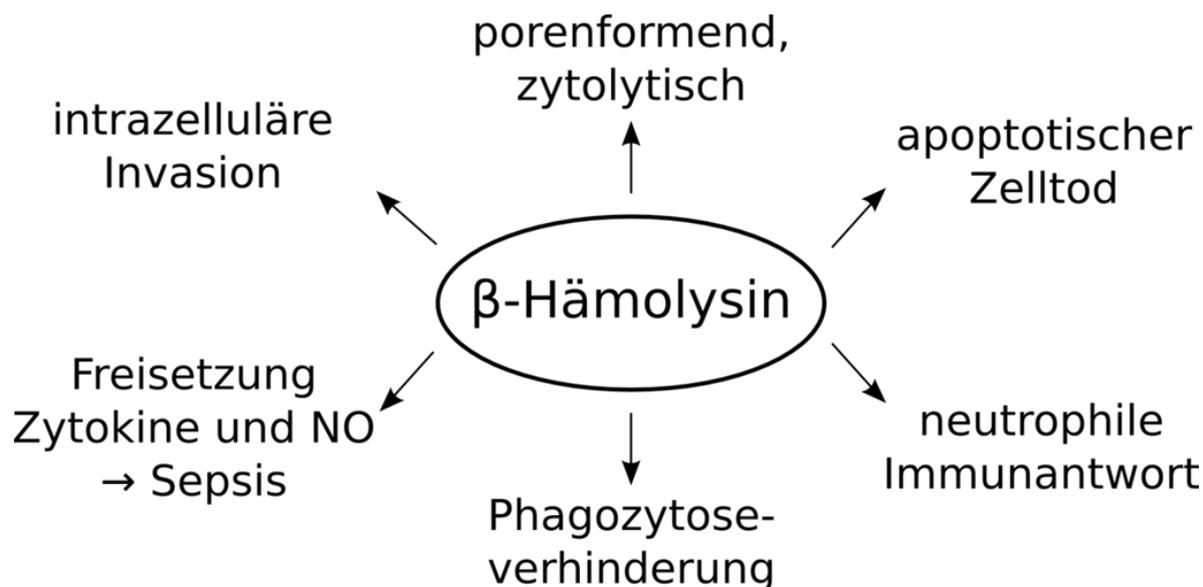


Abbildung 15

Die Pathomechanismen von β -Hämolyysin der GBS

β -Hämolyysin ist ein multifunktionelles Toxin und Virulenzfaktor in der Pathogenese invasiver Infektionen (nach Liu und Nizet 2006)

β -Hämolyysin ist ein vielfältiges Toxin. Es verfügt neben den hier untersuchten direkten proapoptischen Effekten über vielfältige pathogene Mechanismen (Abbildung 15).

Im Rahmen dieser Arbeit wollen wir uns insbesondere auf die proapoptischen Pathomechanismen von β -Hämolyysin konzentrieren. Jedoch spielen alle bisher bereits dargestellten Schädigungsmechanismen im Zusammenhang bei der Entwicklung von Erkrankungen *in vivo* eine wesentliche Rolle.

5.1.2 Morphologie der Apoptose

Morphologische Auffälligkeiten von Zellen nach Behandlung mit Gruppe-B Streptokokken wurden bereits in verschiedenen Versuchsreihen nachgewiesen. Beispielhaft zeigten sich nach Stimulation mit GBS an Lungenepithelzellen morphologische Auffälligkeiten in Form von geschwollenen Mitochondrien, Vakuolenbildung, verminderte Zytoplasmadichte, Zerstörung der Zellmembran und Chromatinkondensation (Nizet et al. 1996). In Makrophagen ergab die Stimulation mit GBS eine vergleichbare Morphologie: Schrumpfen der Zelle, Chromatinkondensation, Fragmentation des Zellkerns und Vakuolenbildung des Zytoplasmas.

Mithilfe der TUNEL-Methode konnte der Zelltod als Apoptose definiert werden (Fettucciari et al 2000).

Durch die Anfärbung mit den fluoreszierenden DNS-Farbstoffen Akridinorange und Ethidiumbromid wurden die zerebralen Neuronen in dieser Versuchsreihe nach Behandlung mit β -Hämolyisin fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Mithilfe der Elektronenmikroskopie konnten die ultrastrukturellen Veränderungen eindeutig als Apoptose identifiziert werden.

Durch die aufgeführten Methoden wurde nachgewiesen, dass isoliertes β -Hämolyisin in zerebralen Neuronen morphologische Veränderungen auslöst: Es kam zu einem Schrumpfen der Zellkörper, mit zunehmender Dosis an β -Hämolyisin und mit Zunahme der Einwirkzeit löste sich die Zellmembranintegrität auf und die Zellmembranen wurden permeabel. Die Zellkerne stellten sich geschrumpft und teilweise fragmentiert dar, es waren eine Kondensation und Marginalisierung sowie periphere Kondensierung des Chromatins erkennbar. β -Hämolyisin induzierte ultrastrukturelle Zellkernveränderungen in den Neuronen, welche in vielen Publikationen als AIF-typisch charakterisiert wurden (Leist und Jäättelä 2001, Susin et al. 1999).

Es zeigte sich, dass Mitochondrien Ziel und Angriffspunkt der β -Hämolyisin induzierten neuronalen Apoptose sind. Die Mitochondrien waren nach Inkubation mit β -Hämolyisin geschwollen und teilweise zerstört. β -Hämolyisin verursachte ultrastrukturelle Mitochondrienschäden und eine Freisetzung sowie mitochondrio-nukleäre Translokation von AIF. Mitochondrienschädigung ist ein wichtiger Mechanismus der Apoptose-Induktion. Es ist bekannt, dass AIF im Nukleus als Endonuklease wirkt und die apoptotische Fragmentierung der DNS bewirkt (Gulbins et al. 2003).

Auch andere bakterielle Toxine können Mitochondrien schädigen. Für Pneumokokken konnte nachgewiesen werden, dass das Toxin Pneumolysin ebenfalls mitochondriales AIF freisetzt und Apoptose verursacht (Braun et al. 2007). Pneumolysin induzierte in primären Neuronen eine Apoptose, die morphologisch der Apoptose in unseren durch β -Hämolyisin behandelten primären Neuronen entspricht.

Auch das Porin von *Neisseria gonorrhoeae* wirkt über die AIF-vermittelte Apoptose direkt zytotoxisch (Müller et al. 2000).

Diese bakteriellen Toxine können an die Mitochondrienmembran binden, das mitochondriale Membranpotential schädigen und offensichtlich Poren bilden (Kozjak-Pavlovic et al. 2009).

5.1.3 Inhibition der Apoptose

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, inwiefern der durch β -Hämolyisin induzierte programmierte Zelltod an die Aktivierung von Caspasen gebunden ist. Caspasen sind wesentlich an der intrazellulären Signalkaskade einer klassischen Apoptose beteiligt. Caspasen-Aktivierung ist für viele Apoptoseprozesse charakteristisch. Todeszellrezeptoren, Cytochrom c, Procaspase-9 und andere mitochondriale Proteine bewirken eine Aktivierung einer Caspasenkaskade, welche in die Aktivierung der finalen Exekutionscaspase 3 mündet (Suzuki et al. 2001).

Durch Bestimmung der Caspase-3-Aktivität konnte sowohl eine Aktivität des intrinsischen als auch des extrinsischen Weges gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit ergab sich nach Behandlung der zerebralen Neuronen mit β -Hämolyisin zu keinem Zeitpunkt eine Aktivierung von Caspase 3. Jedoch zeigten die mit Staurosporin behandelten Zellen mit dem Vollbild einer klassischen Apoptose eine eindeutige Caspase-3-Aktivierung. Um diese Aussage zu verifizieren erfolgte neben der Messung der Caspasen-Aktivität auch der Versuch, die Apoptoserate durch die Caspasen-Inhibitoren z-VAD-fmk und z-DEVK-fmk zu reduzieren. Beide Inhibitoren waren nicht imstande, auf signifikante Weise eine Apoptose zu verhindern.

Im Rahmen des Verständnisses um die pathogene Wirkung der Gruppe-B Streptokokken gab es Versuchsreihen in denen gezeigt werden konnte, dass die ausgelöste Apoptose Caspasen-unabhängig verläuft. In einem *in vitro*-Modell an Makrophagen erfolgte eine GBS-induzierte Apoptose ohne die Aktivierung von Caspase-1 und -3 (Fettuciari et al. 2000, Liu und Nizet 2004). Auch lebende Pneumokokken oder *Chlamydia psittaci* lösen Caspasen-unabhängig Apoptose aus (Braun et al. 2001, Ojcius et al. 1998).

β -Hämolyisin induziert Apoptose, ohne die Effektorcaspase-3 zu aktivieren und Caspasen-Inhibitoren können β -Hämolyisin-induzierte Apoptose nicht verhindern. Caspasen-unabhängige Apoptose ist in verschiedenen Modellen in der Literatur beschrieben. In diesen Modellen nimmt oft AIF eine zentrale Rolle in der Zelltodexekution ein. So bewirken beispielsweise Pneumolysin der Pneumokokken oder das Porin von *Neisseria gonorrhoeae* eine AIF-vermittelte, Caspasen-unabhängige Apoptose (Müller et al. 2000, Braun et al. 2002).

5.1.4 Mechanismen der Zellschädigung durch β -Hämolyysin

In vorangegangenen Untersuchungen wurden bereits durch bakterielle Toxine ausgelöste intrazelluläre pathogene Mechanismen entdeckt, die in Zellen eine Caspasen-unabhängige Apoptose auslösen können. Gut untersucht sind die pathogenen Mechanismen von Pneumolysin, dem porenformenden Toxin der Pneumokokken. Pneumolysin ist in der Lage, in Neuronen konzentrationsabhängig eine Apoptose auszulösen (Braun et al. 2002). Es induziert die Ausbildung transmembranärer Poren, wodurch ein Kalziumeinstrom in die Zelle erfolgt (Gilbert 2002). Durch das einströmende Kalzium kommt es zu einer Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials und zur Freisetzung von AIF. Das ins Zytosol freigesetzte AIF spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der durch Pneumolysin ausgelösten Apoptose (Braun et al. 2001).

AIF ist ein Flavoprotein zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran mit wichtigen Funktionen im bioenergetischen und Redox-Stoffwechsel (Sevrioukova 2011). Es wirkt physiologischsweise als NADH-Oxidase und besitzt eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Atmungskette. Wird es jedoch im Rahmen einer Mitochondrienschädigung zusammen mit anderen pro-apoptotischen Proteinen aus den Mitochondrien freigesetzt, translokiert es zum Nukleus und bewirkt dort eine Chromatinkondensierung und DNS-Fragmentierung (Norberg et al. 2010, Sevrioukova 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass es durch die Behandlung der primären zerebralen Neuronenkulturen mit β -Hämolyysin zu einer Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien und zu einer Translokation in den Zellkern kam.

Unklar ist bisher der genaue Mechanismus der AIF-Freisetzung durch β -Hämolyysin. Möglicherweise wird β -Hämolyysin so wie auch das Porin von *Neisseria gonorrhoeae* durch eine Interaktion mit dem intrazellulären Vesikeltransportsystem zu den Mitochondrien transportiert (Müller et al. 2000). Ziel weiterführender Untersuchungen ist es auch zu klären, ob sich β -Hämolyysin so wie auch Pneumolysin in den Mitochondrien anreichert (Braun et al. 2002).

An Makrophagen konnte bereits gezeigt werden, dass β -Hämolyysin einen Einstrom von Kalzium in die Zellen auslöst. Die daraus resultierende Apoptose der Makrophagen ist von der β -Hämolyysin-Expression abhängig. Sie ist zwar durch Inhibitoren des Kalzium-Einstroms zu reduzieren, nicht jedoch durch Caspasen, es handelt sich demzufolge um eine Caspasen-unabhängige Form der Apoptose (Fettucciari et al. 2000). Vielmehr wird in den Makrophagen eine Kaskade über das kalziumsensitive Calpain, besonders das m-Calpain induziert. Dieses wird durch den massiven Kalziumeinstrom aktiviert und wirkt selbst wiederum auf wichtige

mitochondriale Regulatoren der Bcl-2 Familie (Bax, Bid). Durch die Aktivierung dieser Regulatoren kommt es zur Freisetzung von AIF und Endonuklease G (Fettucciari et al. 2006). Sowohl AIF als auch Endonuklease G induzieren die Caspasen-unabhängige Apoptose (Cande et al. 2002). Diese Eigenschaft befähigt β -Hämolyisin, in die Membranintegrität von Zellen schädigend einzugreifen (siehe Abbildung 16).

Die Rolle der proapoptotischen Proteine (z.B. Bax, Bid aus der Bcl-2-Familie) im Rahmen der durch Toxine ausgelösten Caspasen-unabhängigen Apoptose und der Mechanismus der Freisetzung sind aktuell Thema vielzähliger Forschungsprojekte.

Wird die Freisetzung von Bax im Makrophagenmodell herunterreguliert, resultiert eine deutliche Abnahme der Apoptoserate (Fettucciari et al. 2006).

Bax ist in verschiedenen Apoptosemodellen in der Lage, durch Porenbildung an der Mitochondriemembran (sog. permeability transition pore = PTP-Komplex) oder direkte Interaktion mit dem PTP-Komplex Apoptose zu induzieren (Antonsson et al. 2000). Die Aktivierung des PTP-Komplexes erfolgt ebenso durch einen erhöhten Kalziumspiegel (Marzo et al. 1998) oder durch einen Verlust des inneren mitochondrialen Membranpotentials (Kroemer et al. 2008). Es wäre hypothetisch zu untersuchen, ob β -Hämolyisin in der Lage ist, den PTP-Komplex zu aktivieren oder ob es eine Strukturähnlichkeit mit Bax besitzt.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass in zerebralen Neuronen ein Caspasen-unabhängiger programmierter Zelltod durch β -Hämolyisin induziert wird. Es ließ sich eine Translokation von AIF in den Zellkern nachweisen. Die Beteiligung von AIF lässt vermuten, dass es als Mediator der Caspasen-unabhängigen Apoptose fungiert.

Ob die intrazellulären Mechanismen in den hier untersuchten primären zerebralen Neuronen mit denen in den Makrophagen übereinstimmen, kann nur spekuliert werden und muß Thema weiterer Forschungsprojekte sein.

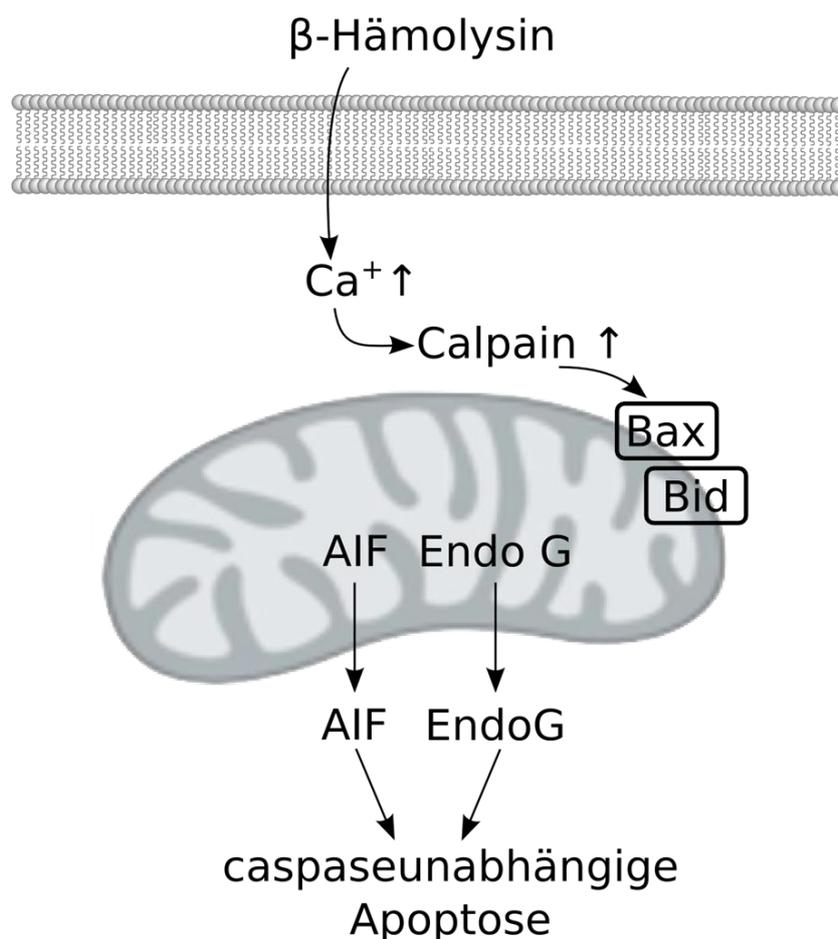


Abbildung 16

GBS-induzierte mitochondriale Caspase-unabhängige Apoptosekaskade (nach Fettucciari et al. 2006)

β -Hämolyysin induziert durch Porenbildung einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen. Daraufhin kommt es zur Aktivierung von Calpain im Zytosol, welches zur Spaltung von Bax und Bid aus der Bcl-2-Familie führt. Es resultiert eine Freisetzung von AIF und Endonuklease G aus den Mitochondrien ins Zytosol. Diese lösen die morphologischen Veränderungen der Caspase-unabhängigen Apoptose aus.

5.2 Rolle des Toxins β -Hämolyysin und der Gruppe-B Streptokokken für die Neugeborenenmeningitis

Gruppe-B Streptokokken sind die Hauptverursacher der neonatalen Meningitis. Sie spielen insbesondere im Rahmen der late-onset Infektion eine wesentliche Rolle. Während die early-onset Infektionen durch pränatales Screening und Antibiotikaprophylaxe wesentlich eingedämmt werden konnte, trifft dies auf die late-onset Infektionen nicht zu (Schrag et al. 2000). Die durch GBS ausgelöste neonatale Meningitis und besonders die resultierenden Folgeschäden besitzen nach wie vor einen hohen Stellenwert in der Neonatologie (Harvey et al. 1999).

5.2.1 Pathophysiologische Besonderheiten der Neugeborenenmeningitis

Die Meningitis ist eine akute Entzündung der Leptomeningen. Voraussetzung ist ein Übertritt der Erreger an der Blut-Hirn- oder Blut-Liquor-Schranke.

Im Rahmen der Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke finden Umbauprozesse statt, die gelegentlich auch die Passage von größeren Molekülen gewährleisten. Neben den im erwachsenen Gehirn vorliegenden „tight-junctions“, die ein wesentlicher Teil der Barriere sind, existieren in immaturren Gehirnen weitere Barriereformen, sogenannte „strap junctions“ (Møllgård et al. 1987). Die Barrieren befinden sich in einem ständigen Umbauprozess. An Kortexneuronen von Ratten konnte vergleichend festgestellt werden, dass die Reifung des Gehirns und der Blut-Hirn- oder Blut-Liquor-Schranke Einfluss auf das Ausmaß der Schädigung nach Behandlung neonataler Ratten mit Pneumokokken hat. Sieben Tage alte Ratten zeigten einen signifikant größeren Schaden, als elf Tage alte Ratten (Reiß et al. 2011). Der Übertritt schädigender Substanzen scheint abhängig vom Entwicklungsgrad der Blut-Hirn- bzw. Blut-Liquor-Schranke zu sein.

In der perinatalen und neonatalen Phase zeigt das menschliche Immunsystem eine Unreife, die besonders bei Früh- bzw. Leichtgeborenen zu einer mangelhaften Immunabwehr führt. In diesem Fall kommt es häufiger zu einer zerebralen Invasion aufgrund der hochgradigen Bakteriämie. Insbesondere die Zahl der neutrophilen Granulozyten spielt eine wesentliche Rolle beim klinischen Verlauf einer Bakteriämie mit anschließender Meningitis (Doran et al. 2002).

Das neonatale Gehirn unterliegt physiologischen Entwicklungsschritten. Dabei spielt die physiologische Apoptose als wesentlicher Regulierungsmechanismus für überschüssige Neurone eine entscheidende Rolle (Taylor et al. 1999). Die Vulnerabilität ist besonders in der Phase des größten Hirnumbaus, dem „Brain growth spurt“ sehr hoch (Dzietko et al. 2004). In dieser Zeit kommt es zu Umbauvorgängen mit Migration und Differenzierung von Gliazellen und Neuronen, zur Synaptogenese und zu einem physiologischen apoptotischen Neuronenverlust. Diese Phase beginnt beim Menschen im letzten Trimenon und dauert bis in das 2. Lebensjahr hinein an (Dobbing und Sands 1979). Um tierexperimentelle Ergebnisse zu vergleichen, müssen die dort vorhandenen Phasen des „Brain growth spurt“ beachtet werden. Bei der Ratte findet diese Phase wenige Tage vor der Geburt bis ca. 2 Wochen nach Geburt statt (Dobbing und Sands 1979). Die in diesem *in vitro*-Experiment verwendeten Neurone lassen sich in einem frühen Zeitfenster der vulnerablen Hirnentwicklung verankern. Man geht davon aus, dass schädigende Einflüsse in

dieser Zeit besonders schnell einen apoptotischen Schaden verursachen, da eine Überaktivierung apoptotischer Mechanismen aufgrund des physiologischen Zelluntergangs vorliegen könnten (Bittigau et al. 1999).

Die Neuronen des Hippokampus, hierbei insbesondere des Gyrus dentatus scheinen bei Infektionen sehr empfindlich mit apoptotischem Zellschaden reagieren (Braun et al. 1999). Es wird insbesondere die Nähe zum liquorgefüllten Seitenventrikel diskutiert, die den eindringenden Bakterien den Weg weisen könnten. Kortikale Neuronen zeigen im Gegensatz zu hippokampalen Neuronen mit zunehmenden Entwicklungsalter eine geringere Vulnerabilität (Reiß et al. 2011).

Er lässt sich die Erklärung ableiten, dass von neonataler Meningitis betroffene Kinder besonders Langzeitschäden in Form von Lern- und Gedächtnisstörungen aufweisen. Diese Funktionen sind im Wesentlichen im Hippokampus lokalisiert (Loeffler et al. 2001).

5.2.2 β -Hämolyisin und Neugeborenenmeningitis

Trotz intensiver Bemühungen um präventive Massnahmen gehören Infektionen mit Gruppe-B Streptokokken weiterhin zu den Hauptverursachern schwerer neonataler Erkrankungen. Obwohl die Mortalität aufgrund fortgeschrittener intensivmedizinischer Maßnahmen rückläufig ist, verursacht eine GBS-Meningitis insbesondere bei Kindern in 25 - 40% der Fälle schwerwiegende neurologische Langzeitschäden (Liu und Nizet 2006).

Neben der Pneumonie und der Sepsis ist die Meningitis eine der drei häufigsten klinischen Manifestationen der neonatalen GBS-Infektion. Late-onset Infektionen besitzen mit ca. 50% eine besonders hohe Inzidenz für die Ausbildung einer Meningitis (Baker und Edwards 2001).

Die Invasion von GBS ins zerebrale Nervensystem durchläuft vielfältige Pathomechanismen. Eine Meningitis wird ausgelöst, wenn Gruppe-B Streptokokken die Blut-Hirn bzw. Blut-Liquor-Schranke passieren. Gruppe-B Streptokokken sind in der Lage, *in vitro* Endothelzellen invasiv mittels Transzytose zu passieren. Bei hoher bakterieller Keimzahl findet eine direkte zytolytische Endothelschädigung statt (Nizet et al. 1997). In mikrovaskulären Endothelzellen induziert GBS die Expression eines potenten Repressor der Proteine Zona Occludin (ZO)-1 und Occludin, die für die Regulation der Barrierefunktion der tight-junctions-Komplexe verantwortlich sind. Die Abnahme dieser regulierenden Proteine führt zu einem Verlust der Barrierefunktion in den tight-junctions-Komplexen und ermöglicht die Invasion von GBS ins ZNS (Kim et al. 2012).

Nach Passieren der Blut-Hirn bzw. Blut-Liquor-Schranke wird im Liquor eine inflammatorische

Schadenskaskade durch neutrophiles Recruitment ausgelöst (Doran et al. 2003). Aufgrund einer Gefäßinflammation kommt es zu lokalen Läsionen mit nachfolgender Hypoxie und zerebralem Ödem (Kim et al. 1995). Für Gliazellen (Mikroglia, Oligodendrozyten, Astrozyten) konnte nachgewiesen werden, dass GBS TLR2-abhängig Apoptose auslösen (Lehnardt et al. 2006). Für zerebrale Neuronen trifft dies nicht zu, da sie kein TLR2 exprimieren.

Neben dem Keimnachweis war der beständige Nachweis einer hohen Aktivität von β -Hämolysin am Infektionsherd der Grund, dieses Toxin genauer zu untersuchen, um dessen Pathomechanismen besser zu verstehen (Liu und Nizet 2006).

Tierexperimentelle Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass eine Abhängigkeit zwischen der Expression von β -H/Z und der Invasion der Bakterien ins ZNS besteht, demzufolge das Ausmaß der Zerstörung der Blut-Hirn- bzw. Blut-Liquor-Schranke abhängig von der Quantität der β -Hämolysinausschüttung ist (Doran et al. 2003). β -Hämolysin stimuliert direkt die intrazelluläre Invasion der Gruppe-B Streptokokken (Doran et al. 2003). In den Endothelzellen findet eine durch β -H/Z ausgelöste inflammatorische Genexpression statt. Es werden bevorzugt Cyto- und Chemokine (z. B. Il-8, GRO α , GRO β , GM-CSF oder ICAM-1) exprimiert, die zu einer Aktivierung neutrophiler Granulozyten führen. Diese gelangen durch transendotheliale Migration in die betroffenen Endothelzellen und führen zur zytolytischen Destruktion der zerebralen Endothelzellen und somit zur Inaktivierung der Blut-Hirn-Schranke (Doran et al. 2003).

Intrathekal in neonatale Ratten injizierte Gruppe-B Streptokokken lösen sowohl im Kortex als auch im Hippokampus (dort 10-fach höher) einen apoptotischen Zellschaden aus. Toxindexiziente Mutanten zeigen eine signifikant geringere pathogene Wirkung (Reiß et al. 2011).

Bakterielle Meningitiden besitzen gemeinsame Pathomechanismen. Durch die Leukozyteninvasion nach Übertritt der Bakterien ins ZNS und die inflammatorische Immunantwort erfolgt eine Gewebeerstörung im ZNS. Reaktive Sauerstoffradikale (ROS) spielen als Mediatoren der Neurotoxizität eine wichtige Rolle in diesem Prozeß. Im neonatalen Rattenmodell konnten ROS in einer durch GBS ausgelösten Meningitis als Induktoren von neuronaler Nekrose und Apoptose nachgewiesen werden (Leib et al. 1996). Pneumokokken lösten im Hippocampus und im Gyrus dentatus einen apoptotischen Zellschaden aus. Dieser konnte durch Caspasen-Inhibitoren signifikant verringert werden (Braun et al. 1999). Diese Form des apoptotischen Schadens machte jedoch nur etwa die Hälfte des Anteils am Gesamtschaden am Gyrus dentatus aus und war im Wesentlichen durch die neutrophile Immunantwort begründet. In Zellkulturreihen ohne körpereigene Immunabwehr konnte an Endothelzellen, Mikrogliazellen

und zerebralen und Hippokampusneuronen nachgewiesen werden, daß Pneumokokken eine Caspasen-unabhängige Apoptose verursachen (Braun et al. 2001). Dabei zeigte sich ein Anstieg der proapoptotischen Faktoren c-AMP und AIF. Als Verursacher dieser Caspasen-unabhängigen Apoptose konnte das Toxin Pneumolysin der Pneumokokken nachgewiesen werden (Braun et al. 2007).

In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich, dass β -Hämolysin ebenfalls einen direkten toxischen Effekt auf primäre zerebrale Neuronen hat und in der Lage ist, durch Caspasen-unabhängige Apoptose eine Neurodegeneration zu verursachen. Auch hier lag ein Nachweis des proapoptotischen Faktors AIF vor.

β -Hämolysin ist wesentlich an der Pathogenese der Neugeborenenmeningitis beteiligt. Das Toxin ist verantwortlich für die Induktion der Apoptose in mikrovaskulären Endothelzellen, Mikrogliazellen und zerebralen Neuronen. Die Erforschung adjuvanter Therapiemöglichkeiten einer durch GBS ausgelösten Meningitis muß die Rolle des Toxins β -Hämolysin in der Pathogenese der Erkrankung berücksichtigen.

5.3 Therapeutische Möglichkeiten

Trotz der Möglichkeit der antibiotischen Behandlung gestaltet sich die neonatale Meningitis als klinisch relevante Erkrankung mit einer hohen Rate an Komplikationen (Harvey et al. 1999). Neben der Abtötung der ursächlichen Bakterien sind adjuvante neuroprotektive Strategien von eminenter Bedeutung, um die durch bakterielle Toxine und sekundär überschießender Inflammationsreaktion ausgelösten neuronalen Schäden und damit bleibenden neurologischen Langzeitdefekte bei Überlebenden zu vermeiden.

Bisherige Therapie der Wahl bei einer GBS-Infektion in der Neonatalperiode ist eine hochdosierte Behandlung mit Penicillin G oder bevorzugt eine Kombinationsbehandlung mit Ampicillin und Gentamicin (Swingle et al. 1985).

Die zunehmende Entwicklung von Antibiotikaresistenzen führt zu einer längeren Verweildauer von Erregern und Toxinen im Liquor (Fluegge et al. 2004). Der Effekt der Antibiotika selbst führt durch die Lyse der Bakterien und konsekutiver Freisetzung von Bestandteilen und Toxinen zu einer irreversiblen inflammatorischen Schädigung von zerebralen Strukturen (Leib und Täuber 1999). In den vorliegenden Versuchen konnte dargestellt werden, dass der neuronale Schaden mit der Toxinkonzentration korreliert.

Aufgrund der überschießenden körpereigenen inflammatorischen Reaktion nach Übertritt der Blut-Hirn- bzw. Blut-Liquor-Schranke wurde als adjuvante Therapiemöglichkeit die

gleichzeitige Gabe von Dexamethason zur Eindämmung der Entzündungsreaktion als neuroprotektiv gewertet (Kim et al. 1995). Dieser protektive Effekt ist jedoch umstritten. Weiterführende klinische und experimentelle Studien zeigen eine fehlende neuroprotektive Wirkung (Daoud et al. 1999).

Vielfältige Studien setzen an den unterschiedlichen Stellen der neuroinflammatorischen Schadenskaskade an. In einem *in vivo* Rattenmodell mit durch GBS ausgelöster Meningitis führte die Neutralisation der TNF- α -Wirkung mittels monoklonaler Antikörper zu einer deutlichen Verringerung von einem apoptotischem Zelluntergang im Hippokampus (Bogdan et al. 1997). Eine Behandlung mit Metalloproteaseninhibitoren führte zu einer verringerten Blut-Hirn-Schrankenstörung (Leib et al. 2000). Metalloproteasen sind wichtige Mediatoren in der inflammatorischen Schadenskaskade. Sie lösen die subendotheliale Basalmembran auf und ihre Aktivität erzeugt dadurch eine Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke und konsequenterweise ein Hirnödem.

An einem GBS-Meningitis-Modell an Ratten konnte nachgewiesen werden, dass Antioxidantien einen neuroprotektiven Effekt besitzen. Sie inhibieren die bei einer Meningitis auftretenden Sauerstoffradikale, die einen Zellschaden durch Oxidation verursachen (Leib et al. 1996).

Eine sinnvolle therapeutische Option scheint der direkte Eingriff in die Schadenskaskade zu sein. Das Toxin β -Hämolyysin, welches in unserer Versuchsreihe als direkter Auslöser einer neuronalen Apoptose nachgewiesen werden konnte, ist hierbei Angriffspunkt vielfacher Studien. Bekannt ist der wirkvolle Nutzen des Phospholipid-Inhibitors DPPC (Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin). DPPC ist nachweislich in der Lage, sowohl die lytischen Fähigkeiten von β -Hämolyysin zu hemmen (Liu und Nizet 2004) als auch die Zytokinsekretion, die Auslösung einer Apoptose und die intrazelluläre Invasion zu blockieren (Doran et al. 2002, Liu et al. 2004). DPPC ist ein Hauptbestandteil von Surfactant, einem Therapeutikum, welches zur Lungenreifung bei Frühgeborenen eingesetzt wird. Dies erklärt die Tatsache, dass besonders Früh- und sehr leichtgewichtig geborene Säuglinge mit Surfactant-Mangel häufig und an sehr schweren Verläufen GBS-assoziiierter Krankheiten leiden (Doran and Nizet 2004). Positive Effekte von Surfactant im Sinne einer Verhinderung von Lungenschäden nach GBS-Infektion konnten bereits beobachtet werden (Herting et al. 2000).

Eine Regulation der Expression von β -Hämolyysin zeigte *in vivo* eine signifikante Abhängigkeit der Entwicklung einer Meningitis von der Höhe der Toxinexpression (Lembo et al. 2010). Durch Verwendung eines Repressors der β -Hämolyysin-Transkription konnte die Rate der koloniebildenden Einheiten an GBS im Liquor reduziert werden.

Die Inhibition von β -Hämolyisin *in vitro* an der Blut-Hirn-Schranke führte zu einer verminderten Freisetzung von IL-8 und somit zu einer deutlichen Reduktion der neutrophilen Migration (Doran et al. 2003).

Eine Studie von Bifare et al. ergab, dass der „Brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) in der Lage ist, sowohl einen nekrotischen Schaden im Kortex als auch einen Caspase-3-abhängigen und einen Caspase-3-unabhängigen Schaden im Hippokampus zu reduzieren. BDNF ist ein physiologisches Neurotrophin, welches über den trkB-Rezeptor eine regulative Aufgabe in der neuronalen Entwicklung und Differenzierung übernimmt. Es ist in der Lage, die Caspase-3-Aktivierung zu blockieren, die Translokation von AIF zu unterbinden, die Toxizität von Glutamat abzuschwächen und antioxidative Enzymaktivitäten zu erhöhen (Bifare et al. 2005).

Neueste Erkenntnisse sehen einen Zusammenhang zwischen β -Hämolyisin in sublytischer Konzentration und der Aktivierung von p38 MAPK (mitogen activated protein kinase), welches über IL-10 zu einer Inhibition der Immunabwehr durch Blockierung der Makrophagenaktivität führt (Bebien et al. 2012).

Diese Studien lassen einen Ausblick auf die Bedeutsamkeit des Toxins β -Hämolyisin in Hinsicht auf Therapiemöglichkeiten bei Infektionen des neonatalen Gehirns mit Gruppe-B Streptokokken und die eminente Bedeutung einer frühzeitigen Intervention zu.

Aktuell laufen mehrere klinische Studien zu einer möglichen GBS-Impfung (VacZine Analytics). Hierfür nutzt man gereinigte GBS-Kapselpolysaccharid-Antigene, welche an einen immunogenen Proteinträger gekoppelt werden (Baker und Edwards 2003). Zielführend wäre die rechtzeitige Immunisierung junger Frauen, um eine GBS-Besiedlung in der Schwangerschaft und eine mögliche Übertragung auf das Neugeborene zu verhindern.

5.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass β -Hämolyisin in einem *in vitro*-Modell primärer neonataler zerebraler Neuronen einen direkten neuronalen Zellschaden auslöst. Dieser imponierte als Caspasen-unabhängiger programmierter Zelltod in einer frühen Form der Apoptose. Äquivalente Schäden durch β -Hämolyisin konnten bereits an anderen Zellformen (z.B. Makrophagen, Hepatozyten, Endothelzellen, pulmonale Epithelzellen) nachgewiesen werden. Die zugrundeliegenden pathogenen intrazellulären Mechanismen sind noch nicht ausreichend geklärt. In dieser Arbeit konnte die Freisetzung von AIF aus neuronalen Mitochondrien und dessen mitochondrio-nukleäre Translokation nachgewiesen werden. In *in vitro*-Versuchen mit

weiteren porenformenden Toxinen (z. B. Pneumolysin) konnte ein äquivalenter Caspasen-unabhängiger Mechanismus, der mit einer Freisetzung von AIF einhergeht, nachgewiesen werden. Nicht-Caspasen-Proteasen spielen als mögliche Exekutoren der Caspasen-unabhängigen Apoptose eine wichtige Rolle. Die genauen Mechanismen der Caspasen-unabhängigen apoptotischen Kaskade über die proapoptischen Proteine aus der Bcl-2-Familie und der Freisetzung von AIF und Endonuklease G bieten ein weites Feld für weitere intensive Forschungen.

Die Ergründung der pathogenen Mechanismen Toxin β -Hämolyisin ist von großer Bedeutung. Erst mithilfe eines ausreichenden Verständnisses über Schadenmechanismus und -regulation ist es möglich, neue adjuvante Therapiekonzepte zu entwickeln.

Trotz präventiver peripartaler Antibiotikagaben können GBS-Infektionen bei Neugeborenen bisher nicht in ausreichendem Maße verhindert werden (Spellerberg et al. 2000). Die Etablierung alternativer präventiver und insbesondere adjuvanter neuroprotektiver Maßnahmen wäre ein wichtiger Schritt, um insbesondere die Fälle von langfristigen neurologischen Schäden und Ausfällen zu reduzieren. Die aktuellen GBS-Impfstudien sind ein wichtiger Schritt in diese Richtung.

Adjuvante Therapieansätze, welche die Antibiotikatherapie ergänzen, sind wegweisend für die zukünftige Behandlung, da Resistenzen und antibiotikaverursachte Schäden (inflammatorische Schadenskaskade und toxinverursachte Schäden) eine Barriere in der Behandlung darstellen. Neben DPPC sind bereits BDNF und p38MAPK als erfolgversprechende Möglichkeiten dargestellt worden. Durch die Möglichkeit des Eingriffs in die Genexpression des Toxins β -Hämolyisin konnte experimentell eine deutliche Reduktion der Pathogenität einer GBS-Infektion *in vivo* und *in vitro* nachweisen. Insbesondere der Erhalt der Funktion der Blut-Hirn-Schranke als wichtige neuroprotektive Massnahme wurde in diesem Zusammenhang untersucht.

Die (neonatale) Meningitis als Infektion in einem eigenen Kompartement besitzt im Rahmen der Infektiologie eine Sonderstellung. Die Mechanismen der neuronalen Schädigung und der Schadensregulation im ZNS beinhalten Besonderheiten in der Immunmodulation und in der Funktion der Blut-Hirn-Schranke. Die neuronale Schädigung, die mit neurologischen Langzeitkomplikationen einhergeht, wird im Wesentlichen durch die Wirkung der bakteriellen Toxine beeinflusst. Daher sollte im Rahmen der weiteren Erforschung neuroprotektiver Strategien die bakterielle Toxinneutralisation und -elimination eine vordergründige Rolle spielen.

6 Literaturverzeichnis

Alkuwaity K, Taylor A, Heckels JE, Doran KS, Christodoulides M (2012) Group B streptococcus interactions with human meningeal cells and astrocytes in vitro. *PloS One* 7, e42660

Antonsson B, Martinou JC (2000) The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256: 50-7

Baker CJ, Edwards MS (2001) Group B streptococcal infections. In: Infectious diseases of the fetus and newborn infant. Remington JS, Klein JO (eds.) Philadelphia, PA: WB Saunders: 1091-156

Baker, CJ, Edwards MS (2003) Group B streptococcal conjugate vaccines. *Arch Dis Child* 88: 375-8

Bebien M, Hensler ME, Davanture S, Hsu L-C, Karin M, Park JM, Alexopoulou L, Liu GY, Nizet V, Lawrence T (2012) The pore-forming toxin β hemolysin/cytolysin triggers p38 MAPK-dependent IL-10 production in macrophages and inhibits innate immunity. *PloS Pathog* 8: 1-11

Bedford H, de Louvois J, Halket S, Peckham C, Hurley R, Harvey D (2001) Meningitis in infancy in England and Wales: follow up at age 5 years. *BMJ* 323: 1-5

Berardi A, Tzialla C, Riva M, Cerbo RM, Creti R (2007) Group B streptococcus: early- and late-onset infections. *J Chemother* 19: 24-7

Bermpohl D, Halle A, Freyer D, Dagand E, Braun JS, Bechmann I, Schröder NWJ, Weber JR (2005) Bacterial programmed cell death of cerebral endothelial cells involves dual death pathways. *J Clin Invest* 115: 1607-15

Bifrare Y-D, Kummer J, Joss P, Täuber MG, Leib SL (2005) Brain-derived neurotrophic factor protects against multiple forms of brain injury in bacterial meningitis. *J Infect Dis* 191: 40-5

Bittigau P, Sifringer M, Pohl D, Stadthaus D, Ishimaru M, Shimizu H, Ikeda M, Lang D, Speer A, Olney JW, Ikonomidou C (1999) Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly

enhanced in the immature brain. *Ann Neurol* 45: 724–35

Bogdan I, Leib SL, Bergeron M, Chow L, Täuber MG (1997) Tumor necrosis factor- α contributes to apoptosis in hippocampal neurons during experimental group B streptococcal meningitis. *J Infect Dis* 176: 693-7

Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen EI (1999) Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med* 5: 298-302

Braun JS, Novak R, Murray PJ, Eischen CM, Susin SA, Kroemer G, Halle A, Weber JR, Tuomanen EI, Cleveland JL (2001) Apoptosis-inducing factor mediates microglial und neuronal apoptosis caused by pneumococcus. *J Infect Dis* 184: 1300-9

Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR (2002) Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* 109: 19-27

Braun JS, Hoffmann O, Schickhaus M, Freyer D, Dagand E, Bempohl D, Mitchell TJ, Bechmann I, Weber JR (2007) Pneumolysin causes neuronal cell death through mitochondrial damage. *Infect Immun* 75: 4245-54

Brewer GJ (1995) Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res* 42: 674-83

Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D (2010) Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 23: 467-92

Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* 115: 4727-34

Cande C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G (2004) Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-

independent after all. *Cell Death Differ* 11: 591-5

Center for Disease Control and Prevention (2002) Prevention of perinatal group B streptococcal Disease. *MMWR* 51: 1-25

Chipuk J, Green D (2006) Dissecting p53-dependent apoptosis. *Nat Rev Cell Death Differ* 13: 994-1002

Crompton M (2000) Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 12: 414-9

Daoud AS, Batieha A, Al-Sheyyab M, Abuekteish F, Obeidat A, Mahafza T (1999) Lack of effectiveness of dexamethasone in neonatal bacterial meningitis. *Eur J Pediatr* 158: 230-3

Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G (2000) Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* 476: 118-23

Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G (2000) Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 14: 729-39

Denault JB, Salvesen GS (2002) Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 102: 4489-500

Dobbing J, Sands J (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 3: 79-83

Doran KS, Chang JC, Benoit VM, Eckmann L, Nizet V (2002) Group B streptococcal β -hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. *J Infect Dis* 185: 196-203

Doran KS, Benoit VM, Gertz RE, Beall B, Nizet V (2002) Late-onset group B streptococcal

infection in identical twins: insight to disease pathogenesis. *J Perinatol* 22: 326-30

Doran KS, Liu GY, Nizet V (2003) Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. *J Clin Invest* 112: 736-44

Doran KS, Nizet V (2004) Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Mol Microbiol* 54: 23-31

Dzietko M, Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Krutz B, Bittigau P, Thor F, Heumann R, Bühner C, Ikonomidou C, Hansen HH (2004) Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 15: 177-87

Farley MM, Harvey RC, Stull T, Smith JD, Schuchat A, Wenger JD, Stephens DS (1993) A population-based assessment of invasive disease due to group B streptococcus in nonpregnant adults. *N Engl J Med* 328: 1807-11

Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Polley O, Dzietko M, Leineweber B, Mahler L, Baier M, Bittigau P, Obladen M, Ikonomidou C, Bühner C (2005) Caspase-1-processed interleukins in hyperoxia-induced cell death in the developing brain. *Ann Neurol* 57: 50-9

Fettucciari K, Rosati E, Scaringi L, Cornacchione P, Migliorati G, Sabatini R, Fettriconi I, Rossi R, Marconi P (2000) Group B streptococcus induces apoptosis in macrophages. *J Immunol* 165: 3923-33

Fettucciari K, Fettriconi I, Mannucci R, Nicoletti I, Bartoli A, Coaccioli S, Marconi P (2006) Group B streptococcus induces macrophage apoptosis by calpain activation. *J Immunol* 176: 7542-56

Flexner SJ (1913) The results of serum treatment in thirteen hundred cases of epidemic meningitis. *Exp Med* 17: 553-76

Fluegge K, Supper S, Siedler A, Berner R (2004) Antibiotic susceptibility in neonatal invasive isolates of *Streptococcus agalactiae* in a 2-year nationwide surveillance study in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4444-6

Fluegge K, Supper S, Siedler A, Berner R (2005) Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in infants: Results from a nationwide active laboratory surveillance study over 2 years in Germany. *Clin Infect Dis* 40: 760-3

Förderreuther S, Tatsch K, Einhäupl KM, Pfister HW (1992) Abnormalities of cerebral blood flow in the acute phase of bacterial meningitis in adults. *J Neurol* 239: 431-6

Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA (1998) Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 273: 32608-13

Gibson RL, Lee MK, Soderland C, Chi EY, Rubens CE (1993) Group B streptococci invade endothelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion. *Infect Immun* 61: 478-85

Gibson RL, Nizet V, Rubens CE (1999) Group B streptococcal beta-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. *Pediatr Res* 45:626-34

Gilbert RJ (2002) Pore-forming toxins. *Cell Mol Life Sci* 59: 832-44

Ginsburg I (1970) Streptolysin S. In: Microbial Toxins, Vol. 3. Bacterial Protein Toxins (eds. Montiel TC, Kadis S, Ajl SJ), pp 97-176. Academic Press, New York.

Glucksmann A (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 26: 59-86

Guerina NG, Langermann S, Clegg HW (1982) Adherence of piliated *Haemophilus influenzae* type b to human oropharyngeal cells. *J Infect Dis* 146: 564

Guillebeau A (1890) Studien über Milchfehler und Euterentzündungen bei Rindern und Ziegen. *Landwirt Jahrb Schweiz* 4: 27-44

Gulbins E, Dreschers S, Bock J (2003) Role of mitochondria in apoptosis. *Exp Physiol* 88: 85-90

Gupta S (2001) Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci* 69: 2957-64

Guzmán CA, Domann E, Ronde M, Bruder D, Darji A, Weiss S, Wehland J, Chakraborty T, Timmis KN (1996) Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 20: 119-126

Harvey D, Holt DE, Bedford H (1999) Bacterial meningitis in the newborn: a prospective study of mortality and morbidity. *Semin Perinatol* 23: 218-25

Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-6

Hensler ME, Liu GY, Sobczak S, Benirschke K, Nizet V, Heldt GP (2005) Virulence role of group B streptococcus beta-hemolysin/cytolysin in a neonatal rabbit model of early-onset pulmonary infection. *J Infect Dis* 191: 1287-91

Hensler ME, Miyamoto S, Nizet V (2008) Group B streptococcal β -hemolysin/cytolysin directly impairs cardiomyocyte viability and function *PLoS One* 3: e2446

Herting E, Gefeller O, Land M, van Sonderen L, Harms K, Robertson B (2000) Surfactant treatment of neonates with respiratory failure and group B streptococcal infection. Members of the Collaborative European Multicenter Study Group. *Pediatrics* 106: 957-64

Hickman ME, Rench MA, Ferrieri P, Baker CJ (1999) Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics* 104: 203-9

Jonas D, Schultheis B, Klas C, Krammer PH, Bhakdi S (1993) Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes. *Infect Immun* 61: 1715-21

Jonas D, Walev J, Berger T, Liebetrau M, Palmer M, Bhakdi S (1994) Novel path to apoptosis:

small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infect Immun* 62: 1304-12

Joza N, Susin S A, Daugas E, Stanford W L, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410: 549-54

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57

Khelef N, Zychlinsky A, Guiso N (1993) Bordetella pertussis induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* 61: 4064-71

Kim BJ, Mu R, Banerjee A, Doran KS (2012) Regulation of tight junction complexes in brain endothelium by *Streptococcus agalactiae*. In: *4th International Conference on Gram-Positive Pathogens*, 7-12 October 2012, Omaha, NE, USA

Kim KS (2003) Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nature* 4: 376-85

Kim YS, Sheldon RA, Elliott BR, Liu Q, Ferriero DM, Tauber MG (1995) Brain injury in experimental neonatal meningitis due to group B streptococci. *J of Neuropath and Exp Neurol* 54: 531-9

Kozjak-Pavlovic V, Dian-Lothrop EA, Meinecke M, Kepp O, Ross K, Rajalingam K, Harsman A, Hauf E, Brinkmann V, Günther D, Herrmann I, Hurwitz R, Rassow J, Wagner R, Rudel T (2009) Bacterial porin disrupts mitochondrial membrane potential and sensitizes host cell to apoptosis. *PLoS Pathog* 5(10): e1000629. doi:10.1371/journal.ppat.1000629

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El Deiry WS, Golstein P, Green DR (2008) Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differ* 12: 1463-7

Lachenauer CS, Kasper DL, Shimada J, Ichiman Y, Ohtsuka H, Kaku M, Paoletti LC, Ferrieri P (1999) Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *J Infect Dis* 179: 1030-3

Lancefield RC (1933) A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 57: 571-95

Lehnardt S, Henneke P, Lien E, Kasper DL, Volpe JJ, Bechmann I, Nitsch R, Weber JR, Golenbock DT, Vartanian T (2006) A mechanism for neurodegeneration induced by group B streptococci through activation of the TLR2/MyD88 pathway in microglia. *J Immunol* 177: 583-92

Lehnardt S, Wennkamp J, Freyer D, Liedtke C, Krueger C, Nitsch R, Bechmann I, Weber JR, Henneke P (2007). TLR2 and caspase-8 are essential for group B streptococcus-induced apoptosis in microglia. *J Immunol* 179: 6134-43

Leib SL, Kim YS, Chow LL, Sheldon RA, Täuber MG (1996) 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* 98: 2632-9

Leib SL, Täuber MG (1999) Pathogenesis of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* 13: 527-48

Leib SL, Leppert D, Clements J, Täuber MG (2000) Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infect Immun* 68: 615-20

Leist M, Jäättelä M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 589-98

Lembo A, Gurney MA, Burnside K, Banerjee A, de los Reyes M, Connelly JE, Lin WJ, Jewell KA, Vo A, Renken CW, Doran KS, Rajagopal L (2010) Regulation of CovR expression in

Group B Streptococcus impacts blood–brain barrier penetration. *Molecular Microbiology* 77: 431-43

Liu GY, Doran KS, Lawrence T, Turkson N, Puliti M, Tissi L, Nizet V (2004) Sword and shield: Linked group B streptococcal β -hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14491-6

Liu GY, Nizet V (2004) Extracellular virulence factors of group B streptococcus. *Front Biosci* 9: 1794-802

Liu GY, Nizet V (2006) The group B streptococcal β -hemolysin/cytolysin. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Alouff and Popoff) Elsevier Inc.: 735-45

Loeffler M, Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Metivier D, Nieminen AL, Brothers G, Penninger JM, Kroemer G (2001) Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J* 15: 758-67

Loeffler JM, Ringer R, Hablutzl M, Tauber MG, Leib SL (2001) The free radical scavenger alpha-phenyl-tert-butyl nitron aggravates hippocampal apoptosis and learning deficits in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 183: 247-252

Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G (1999) Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Diff* 6: 516-24

Los M, Stroh C, Jänicke RU, Engels IH, Schulze-Osthoff K (2001) Caspases: more than just killers? *Trends Immunol* 22: 31-4

Marchlewicz BA, Duncan JL (1981) Lysis of erythrocytes by a hemolysin produced by a group B streptococcus sp. *Infect Immun* 34: 787-94

Marchlewicz BA, Duncan JL (1980) Properties of a hemolysin produced by group B streptococci. *Infect Immun* 30: 805-13

Marió MJ, Valenzuela I, Vásquez AE, Illanes SE (2013) Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease. *Rev Obstet Gynecol* 6: 63-8

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D (1998) The permeability transition pore complex - a target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187: 1261-71

McGee ZA, Stephens DS, Hoffmann LH (1983) Mechanism of mucosal invasion by pathogenic *Neisseria*. *Rev Infect Dis* 5: 708S-14S

McGuire W, Clerihew L, Fowlie PW (2004) ABC of preterm birth infection in the preterm infant. *BMJ* 329: 1277-80

McIntyre PB, Berkey CS, King SM, Schaad UB, Kilpi T, Kanra GY, Perez CM (1997) Dexamethasone as adjunctive therapy in bacterial meningitis. A meta-analysis of randomized clinical trials since 1988. *JAMA* 278: 925-31

Møllgård K, Balslev Y, Lauritzen B, Saunders NR (1987) Cell junctions and membrane specializations in the ventricular zone (germinal matrix) of the developing sheep brain: A CSF-brain barrier. *J Neurocyt* 16: 433-44

Müller A, Günther D, Brinkmann V, Hurvitz R, Meyer TF, Rudel T (2000) Targeting of the proapoptotic VDAC-like porin (PorB) of *Neisseria gonorrhoeae* to mitochondria of infected cells. *EMBO J* 19: 5332-43

Nizet V, Ronald L, Gibson RL, Chi EY, Framson PE, Hulse M, Rubens CE (1996) Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect Immun* 64: 3818-26

Nizet V, Gibson RL, Rubens CE (1997) The role of group B streptococci β -hemolysin expression in newborn lung injury. *Adv Exp Med Biol* 418: 627-30

Nizet V, Kim KS, Stins M, Jonas M, Chi EY, Nguyen D, Rubens CE (1997) Invasion of brain

microvascular endothelial cells by group B streptococci. *Infect Immun* 65: 5074-81

Nizet V, Ferrieri P, Rubens CE (2000) Molecular pathogenesis of group B streptococcal disease in newborns. In: Stevens DL, Kaplan EL, eds. Streptococcal infections: clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis. New York: Oxford University Press: 181-221.

Nizet V, Rubens CE (2000) Pathogenic mechanisms and virulence factors of group B streptococci. In: The Gram-Positive Pathogens (Fischetti VA et al. Eds) ASM press: 125-136

Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B (2010) Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun* 396: 95-100

Ojcius DM, Souque P, Perfettini J-L, Dautry-Varsat A (1998) Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia psittaci*. *J Immunol* 161: 4220

Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedricks SM, Hueber AO, Newell MK, Owen LB, Pope RM, Tschopp J, Wajant H, Wallach D, Wiltrott RH, Zörnig M, Lynch DH (2007) The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell* 129: 447-50

Pitrak DL, Tsai HC, Mullane KM, Sutton SH, Stevens P (1996) Accelerated neutrophil apoptosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Invest* 98: 2714-9

Pfister HW, Fontana A, Täuber MG, Tomasz A, Scheld WM (1994) Mechanisms of brain injury in bacterial meningitis: workshop summary. *Clin Infect Dis* 19: 463-79

Pfister LA, Tureen JH, Shaw S, Christen S, Ferriero DM, Täuber MG, Leib SL (2000) Endothelin inhibition improves cerebral blood flow and is neuroprotective in pneumococcal meningitis. *Ann Neurol* 47: 329-35

Pong A, Bradley JS (1999) Bacterial meningitis and the newborn infant. *Infect Dis Clin North Am* 13: 711-33

Pritzlaff CA, Chang JCW, Kuo SP, Tamura GS, Rubens CE, Nizet V (2001) Genetic basis for the β -haemolytic/cytolytic activity of group B streptococcus. *Mol Microbiol* 39: 236-47

Prober CG (1996) Central nervous system infections. In: Nelson Textbook of Pediatrics, 15th edn. Eds. Behrman RE, Kleigman RM, Nelson WE, Vaughan VC. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 707-13

Puliti M, Nizet V, von Hunolstein C, Bistoni F, Mosci P, Orefici G, Tissi L (2000) Severity of group B streptococcal arthritis is correlated with beta-hemolysin expression. *J Infect Dis* 182: 824-32

Quagliarello V, Scheld WM (1992) Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology and progress. *N Engl J Med* 327: 864-72

Reis Y, Bernardo-Faura M, Richter D, Wolf T, Brors B, Hamacher-Brady A, Eils R, Brady NR (2012) Multi-Parametric Analysis and Modeling of Relationships between Mitochondrial Morphology and Apoptosis. *PLoS One* 2012 7: e28694 DOI: 10.1371/journal.pone.0028694

Reiß A, Braun JS, Jäger K, Freyer D, Laube G, Bühner C, Felderhoff-Mueser U, Stadelmann C, Nizet V, Weber JR (2011) Bacterial pore-forming cytolysins induce neuronal damage in a rat model of neonatal meningitis. *J Infect Dis* 203: 393-400

Renahan AG, Booth C, Potten CS (2001) What is apoptosis and why is it important? *BMJ* 322: 1536-8

Ring A, Braun JS, Nizet V, Stremmel W, Shenep JL (2000) Group B streptococcal beta-hemolysin induces nitric oxide production in murine macrophages. *J Infect Dis* 182: 150-7

Ring A, Braun JS, Pohl J, Nizet V, Shenep JL (2002) Group B streptococcal beta-hemolysin induces mortality and liver injury in experimental sepsis. *J Infect Dis* 185: 1745-53

Ring A, Depnering C, Pohl J, Nizet V, Shenep JL, Stremmel W (2002) Synergistic action of

nitric oxide release from murine macrophages caused by group B streptococcal cell wall and beta-hemolysin/cytolysin. *J Infect Dis* 186: 1518-21

Rolle M, Mayr A (2007) Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, Georg-Thieme-Verlag, 8. überarbeitete Auflage

Roy S, Nicholson DW (2000) Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med* 192: F21-5

Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB, Hadler JL, Danila R, Cieslak PR, Schuchat A (2000) Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med* 342: 15-20

Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, Lefkowitz L, Perkins BA (1997) Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active surveillance team. *N Engl J Med* 337: 970-6

Sevrioukova IF (2011) Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxid Redox Signal* 14: 2545-79

Spellerberg B (2000) Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes Infect* 2: 1733-42

Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE (2000) An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Nat Acad Sci* 97: 14376-81

Stevens JP, Eames M, Kent A, Halket S, Holt D, Harvey D (2003) Long term outcome of neonatal meningitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 88: F179-84

Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK (2004) To tap or not to tap: high likelihood of meningitis without sepsis among very low birth weight infants. *Pediatrics* 113: 1181-6

Stringaris AK, Geisenhainer J, Bergmann F, Balshusemann C, Lee U, Zysk G, Mitchell TJ, Keller BU, Kuhnt U, Gerber J, Spreer A, Bahr M, Michel U, Nau R (2002) Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiol Dis* 11: 355-68

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-6

Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8: 613-21

Swingle HM, Bucciarelli RL, Ayoub EM (1985) Synergy between penicillins and low concentrations of gentamicin in the killing of group B streptococci. *J Infect Dis* 152: 515-20

Tamura GS, Kuypers JM, Smith S, Raff H, Rubens CE (1994) Adherence of group B streptococci to cultured epithel cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infect Immun* 62: 2450-8

Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H (1999) Oxidative metabolism, apoptosis und perinatal brain injury. *Brain Pathol* 9: 93-117

Teatero S, McGeer A, Low DE, Li A, Demczuk W, Martin I, Fittipaldi N (2014) Characterization of invasive group B streptococcus strains from the greater Toronto area, Canada. *J Clin Microbiol* 52: 1441-7

Thomas R, Le Tulzo Y, Bouget J, Camus C, Michelet C, Le Corre P, Bellissant E (1999) Trial of dexamethasone treatment for severe bacterial meningitis in adults. Adult Meningitis Steroid Group. *Intensive Care Med* 25: 475-80

Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-62

- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-6
- Todd EW (1934) A comparative serological study of streptolysins derived from human and animal infections with note on pneumococcal hemolysin, tetanolysin, and streptococcal toxin. *J Pathol Bacteriol* 39: 299-321
- VacZine Analytics. Market VIEW: Group B Streptococcus vaccines (CAT No: VAMV008), published Mai 2014.
- van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P (2003) Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 487-97
- Vogt C (1842) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte. (Alytes obstetricians), Solothurn: Jent und Gassman: 1-135
- Zamzami N, Kroemer G (2001) The mitochondrion in apoptosis: how pandora`s box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 67-71
- Zhang JR, Mostov KE, Lamm ME, Nanno M, Shimida S, Ohwaki M, Toumanen E (2000) The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* 102: 827-37
- Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ (1992) *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 358: 167-9
- Zysk G, Schneider-Wald BK, Hwang HJ, Bejo L, Kim KS, Mitchell TJ, Hakenbeck R, Heinz HP (2001) Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69: 845-52
- Internet: www.chemgapedia.de

7 Lebenslauf

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

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Katja Hilgenfeld, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neuronaler Zelltod durch Beta-Hämolyisin“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

04.05.2015

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Katja Hilgenfeld (geb. Jäger) hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Reiss*, A., Braun*, J.S., Jaeger, K., Freyer, D., Laube, G., Buehrer, C., Felderhoff-Mueser, U., Stadelmann, C., Nizet, V., Weber, J.R. Bacterial pore-forming cytolysins induce neuronal damage in a rat model of neonatal meningitis. Journal of Infectious Diseases 2011, 203:393-400. (*A.R. and J.S.B. contributed equally to this work)

Beitrag im Einzelnen:

- Mitarbeit an der Konzeption der Experimente und Hypothesen während der Labormeeetings und Arbeitsbesprechungen
- Planung und Durchführung der Tierexperimente und Zellkultur-Versuchsreihen
- Akquirierung der Daten der Abbildung 4a, 4b und 4c. Statistische Auswertung der Daten
- Beitrag von Daten zu den Abbildungen 1, 2 und 3
- Mitarbeit an der Analyse und Interpretation der Daten der Abbildungen
- Beteiligung an der Fertigstellung im Rahmen fachlicher Diskussionen
- Intellektuelle und schriftliche Mitarbeit bei der Verfassung des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Prof. Dr. Johann Braun, 07.12.14

Unterschrift der Doktorandin

Katja Hilgenfeld

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Johann S. Braun und Herrn Prof. Dr. Jörg Weber für die Überlassung des Themas und die freundliche Arbeitsatmosphäre in Ihrer Arbeitsgruppe.

Herrn Prof. Dr. Johann S. Braun danke ich für die geduldige Begleitung dieser Arbeit sowie seine umfangreiche Hilfestellung bei der Fertigstellung dieser.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Experimentellen Neurologie, die mich tatkräftig unterstützt haben, insbesondere Frau Dr. Dorette Freyer und Frau Renate Gusinda.

Ich danke dem wissenschaftlichen Kooperationspartner Herrn Prof. Victor Nizet, UCSD, San Diego, USA für die Bereitstellung des gereinigten β -Hämolysinextrakt aus dem hyperhämolytischen Bakterienstamm NCTC 10/84.

Fr. Dr. Anja Reiß möchte ich für die gemeinsame Zeit im Labor danken. Sie hat mich angeleitet, motiviert, in ausgesprochen hohem Maß unterstützt und war immer Ansprechpartnerin für Diskussionen und fachlichen Austausch.

Danke Hannes, dass Du mir ohne jegliche Ungeduld jederzeit die Möglichkeit gegeben hast, an dieser Arbeit weiter zu schreiben und sie schließlich zu beenden.

Marten, Dir gebührt besonderer Dank, denn Du hast mir die Dinge ermöglicht, von denen ich nicht zu hoffen wagte.

Ich widme diese Arbeit meinem Mann Hannes und meinen Kindern Jakob und Karl, die nie das Interesse an dieser Arbeit verloren haben und meinen lieben Eltern, die immer an die Fertigstellung geglaubt haben.