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

DISSERTATION

Neurotoxizität von Pneumolysin - ein Mitochondrientoxin von *Streptococcus pneumoniae*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin
von

Miriam Kerstin Schickhaus
aus München

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. J. Braun

2. Prof. Dr. med. W. Neuhuber

3. Prof. Dr. med. R. R. Schumann

Datum der Promotion: 21.11.2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 5

1.1. Bakterielle Meningitis durch *Streptococcus pneumoniae* 5

1.1.1. Epidemiologie 5

1.1.2. Pathogenese der bakteriellen Meningitis 6

1.1.3. Klinik der bakteriellen Meningitis 9

1.1.4. Komplikationen und Folgeschäden 9

1.2. Molekulare Entzündungmechanismen 9

1.3. Pneumolysin 11

1.4. Apoptose 13

1.4.1. Mitochondrien und Apoptose induzierender Faktor AIF 15

1.4.2. Caspasen 16

2. Ziele der Arbeit 18

3. Material und Methoden 20

3.1. Methoden 20

3.1.1. Neuronale Zellkultur 20

3.1.2. Pneumolysin und seine Mutanten 21

3.1.3. Zelltodbestimmungen 21

3.1.3.1. Acridinorange/Ethidiumbromid (AO/EB) 21

3.1.3.2. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H Tetrazoliumbromid (MTT) 22

3.1.3.3. Transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 23

3.1.3.4. DNA-Laddering 26

3.1.4. Caspasen Aktivitätsmessungen 27

3.1.5. Immunzytochemie des Apoptose-induzierenden Faktors AIF 28

3.1.6. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mit Tetramethylrhodaminester (TMRE) 29

3.1.7. Kalzium-Messung mit Fluo-4 Acetoxymethyl 29

3.1.8. Messung der Sauerstoffradikale mit Dihydrorhodamin 123 (DHR-123) 30

3.1.9. Protein-Elektrophorese und Western Blot 30

3.1.10. Pulsfeldgelelektrophorese 32

3.1.11. Elektronenmikroskopie 33
3.1.12. Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure nach Pierce (BCA) 34
3.1.13. Proteinbestimmung nach Bradford 34
3.1.14. Fraktionierte Zentrifugation 35
3.2. Material 36
4. Ergebnisse 39
4.1. Apoptose in kortikalen Neuronen durch Pneumolysin 39
4.2. Anstieg von Kalzium und Sauerstoffradikalen durch Pneumolysin 47
4.3. Schädigung neuronaler Mitochondrien durch Pneumolysin 50
4.4. Freisetzung von AIF aus Mitochondrien durch Pneumolysin 54
4.5. DNS Fragmentierung durch Pneumolysin 57
4.6. Caspasen-unabhängige Apoptose durch Pneumolysin 60
4.7. Hochregulierung des Caspase-Inhibitors XIAP durch Pneumolysin 63
5. Diskussion 64
5.1. Apoptoseinduktion durch bakterielle Toxine 64
5.2. Intraneuronale Apoptosemediatoren 67
5.3. Mitochondrientoxizität 71
5.4. AIF-Freisetzung und DNS-Fragmentierung 75
5.5. Caspasen-unabhängige Apoptose 78
5.6. Endogene Inhibitoren der Apoptose 80
5.7. Ausblick 82
6. Zusammenfassung 84
7. Literaturverzeichnis 85
8. Danksagung 96
9. Eidesstattliche Erklärung 97
10. Lebenslauf 98
11. Publikationen 99

1. Einleitung

1.1. Bakterielle Meningitis durch *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae wurde 1881 entdeckt. Trotz intensivster Forschung und Entwicklung von Antibiotika bleiben die durch Pneumokokken verursachten Erkrankungen immer noch ein Problem. Pneumokokken rufen ernsthafte Infektionen mit hoher Morbidität und Mortalität wie Pneumonie, Sepsis und Meningitis hervor.

1.1.1. Epidemiologie

S. pneumoniae gehört heute weiterhin zu den gefährlichsten Erregern für Säuglinge, Kleinkinder unter 2 Jahren und ältere Menschen über 60 Jahren. Bei Kindern unter 2 Jahren beträgt die jährliche Inzidenz einer invasiven Pneumokokkeninfektion 45-145 Fälle/100.000 (Zangwill *et al.*, 1996). Pneumokokken sind die zweithäufigste Ursache nach *H. influenzae* Typ B, für eine bakterielle Meningitis bei Kindern. Sie sind ferner die häufigsten Erreger für ambulant erworbene Pneumonien und für bakterielle Meningitiden bei Erwachsenen. Trotz Antibiotikatherapie bleibt die Mortalität der Erkrankungen, die durch *S. pneumoniae* verursacht werden, hoch. Es gab schon in den 90er Jahren epidemiologische Hinweise, dass die Anzahl der Pneumokokken-Bakteriämie in Großbritannien und anderen Staaten zunimmt.

Vor allem in der dritten Welt sterben jährlich Millionen von Kindern unter 5 Jahren an einer akuten Pneumonie, wobei die Pneumokokken wahrscheinlich die Haupterreger sind. Trotz aller Maßnahmen wie Impfungen, Antibiotikatherapie und Hygiene besteht vor allem für immunsupprimierte Menschen ein hohes Risiko an Infektionen zu erkranken. Patienten mit HIV-Infektionen und AIDS haben ein besonders hohes Risiko sich zu infizieren. Grundsätzlich kann davon ausgegangen werden, dass durch den weltweiten Anstieg von Penicillinresistenzen unter den Pneumokokken und dem eingeschränkten Nutzen von Pneumokokken-Impfungen die Infektionen und Sterblichkeit durch Pneumokokken eher zunehmen werden.

1.1.2. Pathogenese der bakteriellen Meningitis

S. pneumoniae gelangt in den meisten Fällen über den Nasopharynx in den Organismus. In manchen Populationen sind bis zu 70% der Menschen transient mit *S. pneumoniae* im Nasopharynx besiedelt. Derart hohe Zahlen weisen insbesondere Menschen auf, die in beengten Verhältnissen leben. Aus der harmlosen Besiedelung entwickelt sich eine gefährliche Infektion, wenn Pneumokokken die lokalen Abwehrmechanismen der Mukosabarriere überwinden, in das Gefäßsystem gelangen und eine Bakteriämie entsteht. Die Anwesenheit des polymeren Immunglobulinrezeptors (pIgR) auf den Zellmembranen des Wirtes und CbpA, ein Oberflächenprotein der Pneumokokken, erweisen sich beim Übertritt ins Blut als wesentliche Faktoren. Der pIgR spielt eine wichtige Rolle in der Wirtsabwehr, indem er Antikörper durch die Mukosabarriere transportiert (Kaetzel, 2001). Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass *S. pneumoniae* mittels CbpA, welches direkt an pIgR bindet, die Mukosabarriere überwindet (Zhang *et al.*, 2000).

Durch seine Polysaccharidkapsel entgeht der Erreger zunächst den Abwehrmechanismen des Immunsystems (Sáez-Llorens *et al.*, 1990). Die genaue Eintrittspforte in den Subarachnoidalraum ist nicht bekannt. Es wird vermutet, dass *S. pneumoniae* im Bereich des Plexus choroideus oder der dünnwandigen meningealen Venulen die Blut-Hirn-Schranke überwinden und nach intrathekal gelangen kann. Im Liquor cerebrospinalis kann sich das Bakterium schnell und leicht vermehren. Während sich *S. pneumoniae* repliziert, entstehen unter anderem Zellwandbestandteile, welche starke Induktoren einer Entzündungsreaktion sind. Es werden daraufhin Wirtsfaktoren produziert, die die Entzündungsreaktion aufrechterhalten. Zu diesen Faktoren gehören beispielsweise der Tumornekrosefaktor α (TNF-α) oder das Interleukin 1 (IL-1). TNF-α und IL-1 gehören zu den Zytokinen, die in der Lage sind, adhäsionsfördernde Rezeptoren auf Endothelzellen zu aktivieren. Dadurch kommt es zum sog. „Rolling“, zur Adhäsion und Transmigration von Leukozyten durch das Endothel (Movat *et al.*, 1987).

In einem experimentellen Pneumokokken-Meningitismodell wurden wirtseigene Entzündungsmediatoren untersucht. Es konnten signifikante Anstiege bei multiplen Entzündungsmediatoren festgestellt werden. Darunter befanden sich IL-1β, IL-6, KC, MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein), MCP-1/CCL2 (Monocyte chemoattractant protein), sowie kürzlich identifizierte Proteine wie Lymphotaktin (XCL-1), MIP-1γ (CCL9), MCP-5 (CCL12), CRG-2/CXCL10 (Cytokine responsive gene-2), CXCL16,

IGFBP3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3), TCA-3/CCL1 (T-cell Activation-3), PF-4/CXCL4 (Platelet Factor-4), SDF-1α/CXCL13 (Stromal Derived Factor-1α) und IL-4 (Klein *et al.*, 2006). Ein Anstieg folgender Faktoren wurde bei der Pneumokokkenmeningitis gefunden: Macrophage Migration Inhibitory Factor, Monocyte Chemoattractant Protein-2 (CCL8), Pulmonary und Activation-regulated Chemokine (CCL18) und Macrophage Inflammatory Protein-3α (CCL20) (Kastenbauer *et al.*, 2005). Die Vielzahl der Mediatoren zeigt, welche Komplexität die Entzündungsreaktion bei der bakteriellen Meningitis aufweist.

Die Blut-Hirn-Schranke wird im Verlauf der Entzündung zerstört. Es kann sich im Zuge der Infektion ein Hirnödem entwickeln. Bei Fortschreiten der eitrigen Entzündung kann es zu erhöhtem intrakraniellen Druck, Reduktion des zerebralen Blutflusses, Aktivierung des Gerinnungssystems und einer zerebralen Hypoxie kommen (Täuber, 1989). Die Pathogenese der bakteriellen Meningitis ist in **Abbildung 1** schematisch dargestellt.

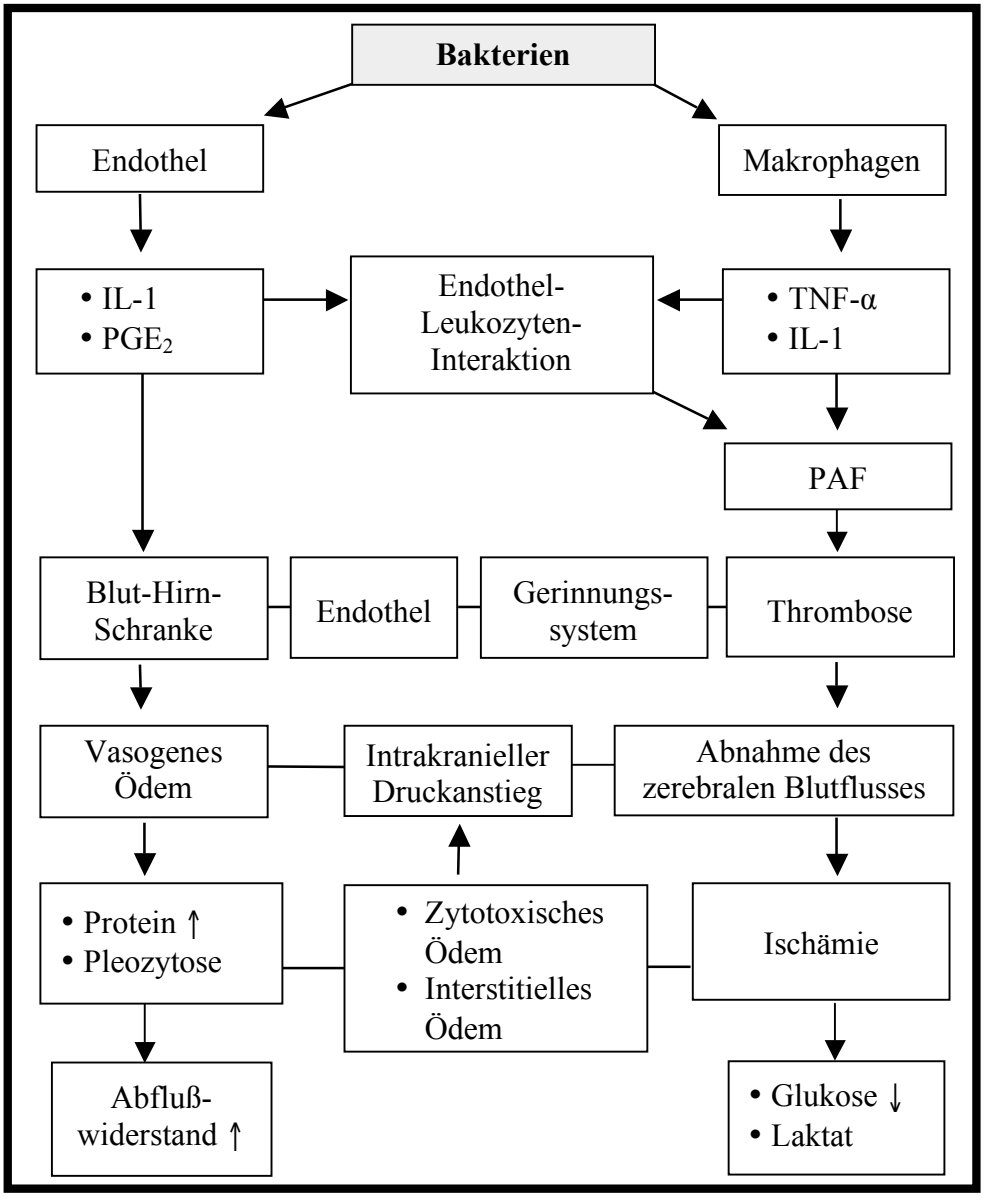


Abbildung 1: Darstellung der Pathogenese der bakteriellen Meningitis. Bakterien bewirken eine Aktivierung des Endothels und der Makrophagen. Zytokine wie Interleukin 1 (IL-1), Prostaglandin E_2 (PGE_2), Tumornekrosefaktor (TNF) und andere Entzündungsmediatoren werden freigesetzt. Dies führt zu einer Interaktion zwischen den angelockten Leukozyten und dem Endothel. Die Endothelaktivierung bewirkt eine Hochregulierung des Rezeptors für den Plättchen aktivierenden Faktor (PAF). Folgen der Inflammation können Schäden an der Blut-Hirn-Schranke, am Endothel, eine Aktivierung des Gerinnungssystems und die Entstehung einer Thrombose sein. Hieraus kann sich ein Hirnödem mit intrakraniellem Druckanstieg entwickeln. Dies hat zur Folge, dass der zerebrale Blutfluss abnimmt und der Abflusswiderstand ansteigt. Es kann eine zerebrale Ischämie entstehen. Proteinanstieg und Pleozytose fördern zusätzlich ein zytotoxisches und interstitielles Ödem, welches wiederum zu einem intrakraniellen Druckanstieg führt. Durch die Ischämie kommt es zu einer Reduktion des Nährstoffangebotes und einem Laktatanstieg im zerebralen Blutkreislauf (Sáez-Llorens *et al.*, 1990).

1.1.3. Klinik der bakteriellen Meningitis

Symptome der bakteriellen Meningitis sind in zwei Drittel aller Fälle Fieber, Nackensteifigkeit, Cephalgien und eine Vigilanzstörung. Zudem können Rückenschmerzen auftreten. Anfänglich kann eine Meningitis grippeähnliche Symptome zeigen. Es kann zu Übelkeit, Photophobie und Hyperpathie kommen. Manchmal treten makulopapulöse Erytheme auf. Jeder dritte Patient kann einen fokalen oder sekundär generalisierten epileptischen Anfall entwickeln. In einigen Fällen treten neurologische Ausfallerscheinungen wie eine Halbseitensymptomatik oder eine Aphasie auf. Abduzensparesen und Taubheit können weitere Symptome sein.

1.1.4. Komplikationen und Folgeschäden

Zu den schwerwiegenden Komplikationen zählt der Anstieg des intrakraniellen Hirndruckes mit der Gefahr der Herniation. Vaskulär-entzündliche Prozesse, Spasmen arterieller Gefäße, Sinusvenenthrombose mit anschließenden ischämischen oder hämorrhagischen Infarkten können ebenfalls auftreten. Als Folgeschäden können sich hieraus Paresen oder Epilepsien entwickeln. Die Patienten erleiden Hörstörungen bis hin zum Hörverlust. Bleibende Schäden können Augenmuskelparesen, Hydrozephalus occlusus und epileptische Anfälle sein. Selten können sich Abszesse im Subarachnoidalraum ausbilden, die dazu neigen, in das Hirnparenchym und den Blutkreislauf zu streuen. Beschwerden wie Konzentrationsstörungen, Reizbarkeit und Schwindel können selbst bei harmlos verlaufenden Meningitiden persistieren (Pfister *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 2006).

1.2. Molekulare Entzündungsmechanismen

S. pneumoniae gelingt es durch seine Eigenschaften im Wirtsorganismus zu persistieren. Die bakterielle Vermehrung im Blut bzw. Liquorraum induziert eine ausgeprägte Entzündungsreaktion. Durch seine Polysaccharidkapsel werden die Phagozytose und die Aktivierung des Komplementweges zunächst verhindert, dadurch gelingt dem Erreger die Invasion und Kolonisierung des Organismus (Tunkel *et al.*, 1990).

Kommt es zu einer Infektion und Entzündungsreaktion, sind körpereigene Zytokine bei der Aufrechterhaltung der Reaktion beteiligt. So werden bereits zwei Stunden nach einer Pneumokokken-Infektion aus ortsständigen Zellen Interleukine (IL-1β, IL-6) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF-α) ausgeschüttet. Diese lokal gebildeten Zytokine, insbesondere das Interleukin 6, stimulieren einwandernde immunkompetente Zellen. Es kommt zur Akut-Phase-Reaktion. TNF-α und Interleukine stimulieren außerdem Entzündungswege über die Phospholipase A_2 und den Arachidonsäureweg. Hieraus entstehen weitere Entzündungsmediatoren wie der Platelet Activated Factor (PAF), Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene (Sáez-Llorens *et al.*, 1990).

Es konnte gezeigt werden, dass Oberflächenproteine von *S. pneumoniae* strukturelle Ähnlichkeit mit PAF besitzen und ebenfalls an den PAF-Rezeptoren binden können (Cabellos *et al.*, 1992). *S. pneumoniae* aktiviert im Verlauf den alternativen Komplementweg und führt damit zu einer Erhöhung des Komplementfaktors C5a. Dieser trägt durch seine chemotaktische Wirkung zur Leukozyteninvasion in den Liquorraum bei. Eine Erhöhung des Faktors konnte bereits 2 bis 4 Stunden vor Invasion der Leukozyten im Liquor gemessen werden (Kadurugamuwa *et al.*, 1989). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Leukozyten nicht nur zur Infektionskontrolle beitragen, sondern Anteil am zerstörenden Entzündungsprozess haben (Tauber, 1989).

Zu weiteren Entzündungsmediatoren gehören niedermolekulare Substanzen wie Sauerstoffradiakale, die direkt oxidative Zytotoxizität verursachen (Quagliarello und Scheld, 1992). Die hohe Vulnerabilität des ZNS gegenüber Sauerstoffradikalen ist durch die hohe Konzentration an ungesättigten Fettsäuren, die niedrige Konzentration an endogenen Antioxidantien, die hohe Eisenkonzentration und die hohe Sauerstoffspannung bedingt (Muller, 1997). *S. pneumoniae* ist aufgrund mangelnder Katalase nicht in der Lage anfallendes Wasserstoffperoxid abzubauen. Das bedeutet, dass in Anwesenheit des Erregers hohe Konzentrationen H_2O_2 entstehen, welches wiederum neuronalen Schaden verursacht (Duane *et al.*, 1993).

Bestandteile aus der Zellwand des *S. pneumoniae* sind ebenfalls in der Lage, eine Entzündungsreaktion hervorzurufen (Winkelstein und Tomasz, 1978). Pneumokokken können die Durchlässigkeit von Gefäßen erhöhen, sie bewirken eine Degranulation von Mastzellen und können polymorphnukleäre neutrophile Granulozyten aktivieren (Johnston, 1991). Durch den Erreger kommt es zu einer vermehrten IL-1 Produktion, welche das Endothel schädigen kann (Geelen *et al.*, 1993). *S. pneumoniae* besitzt selbst weitere

Substanzen, die zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion beitragen. Dazu gehört unter anderem ein intrazelluläres Toxin, das Pneumolysin.

1.3. Pneumolysin

Pneumolysin wurde 1940 als hämolytisches Toxin entdeckt. Pneumolysin gehört zu den thiolaktivierten Zytolysinen. Es besteht aus einer 53 kDa schweren Polypeptidkette. Das Toxin reagiert empfindlich auf Oxidation, besitzt antigene Eigenschaften und kann durch Cholersterol irreversibel inaktiviert werden. Diese Eigenschaften sind nicht abhängig von der Wirtszelle, solange die Zelle eukaryot ist (Boulnois *et al.*, 1991; Rubins, 1995). Pneumolysin kommt in allen bisher isolierten Pneumokokkenstämmen vor. Es scheint essentiell für *S. pneumoniae* zu sein, da der Erreger mit seiner Hilfe gut im Nasopharynx persistieren kann. Eine Pneumokokken-Mutante, die kein Pneumolysin exprimiert (*plnA*$^-$), konnte wesentlich schlechter im Nasopharynx und respiratorischen Epithel überleben als ihr Wildtyp (Kadioglu *et al.*, 2002). Pneumolysin befindet sich intrazellulär im Erreger. Es wird erst aktiv, wenn es aus der Zelle freigesetzt wird. Dies geschieht zum Teil während des Wachstums und vor allem bei der Autolyse über eine Peptidoglykanhydrolase, das Autolysin, welches sich in der Zellwand der Pneumokokken befindet (Lopez *et al.*, 1997).

Die Eigenschaften des Pneumolysins sind weiterhin von seiner Konzentration abhängig. In niedrigen, nicht-lytischen Konzentrationen aktiviert Pneumolysin das Komplementsystem (Mitchell *et al.*, 1991) und bewirkt entzündungsfördernde Veränderungen in immunkompetenten Zellen (Cockeran *et al.*, 2001). So stimuliert Pneumolysin unter anderem die Freisetzung von Zytokinen aus Monozyten (Sáez-Llorens *et al.*, 1990). In höheren Konzentrationen kann das Toxin direkte zelluläre Schäden vermitteln, indem es sich in die Zellmembranen einlagert und Poren bildet (Gilbert *et al.*, 1999). Die Eigenschaft des Toxins, Poren in Membranen zu bilden, läuft in mehreren Schritten ab und hat Auswirkungen auf die Kalzium-Homöostase sowie die Leitfähigkeit der Membran (Gilbert *et al.*, 1999). Die Poren-bildende Aktivität des Pneumolysins kann durch geringste Mengen an Cholesterol (im nanomolaren Bereich) inhibiert werden. Dies führte zu der Annahme, dass Cholesterol den Rezeptor für das Toxin darstellt (Boulnois *et al.*, 1991).

Pneumolysin spielt auch eine wichtige Rolle bei der Vermehrung der Pneumokokken im Organismus. Es aktiviert in der frühen Phase der Entzündung das

Komplementsystem. Es werden Komplementfaktoren vom Wirtsorganismus produziert und ineffektiv verbraucht, was die bakterielle Replikation unterstützt (Rubins *et al.*, 1995).

Die Schäden, die durch Pneumolysin entstehen, basieren dementsprechend auf zwei Mechanismen. Zum einen auf der Bindung des Toxins an Zellmembranen und der Bildung von Membranporen, zum anderen auf der unspezifischen Aktivierung des Komplementsystems, indem Pneumolysin direkt mit der Fc-Domäne des Immunglobulin G interagiert (Mitchell *et al.*, 1991; Gilbert *et al.*,1998).

Nicht nur, dass Pneumolysin zellulären Schaden in der Lunge verursacht, so konnte auch in einem experimentellen Meningitis-Modell mit Meerschweinchen gezeigt werden, dass Pneumolysin zu direkten Schäden an der Cochlea führte und somit Hörschäden verursachte (Winter *et al.*, 1997). Weiterhin ist Pneumolysin in der Lage die Schlagfrequenz von Zilien-tragenden Zellen zu reduzieren (Hirst *et al.*, 2000).

Die Pneumolysin-defiziente Mutante *plnA*$^-$ löste eine reduzierte Entzündungsreaktion aus. Die Multiplikationsrate nahm deutlich ab und die Bakteriämie setzte wesentlich später ein als beim Wildtyp (Canvin *et al.*, 1995). Die *plnA*$^-$ Mutante konnte sich schwer in Lungengewebe ansiedeln und hatte dort weniger destruktives Potential an der alveokapillaren Grenze (Rubins *et al.*, 1995). Auch nach intraperitonealer oder intranasaler Injektion von *plnA*$^-$ zeigte sich bei den Versuchsmäusen eine reduzierte Virulenz im Vergleich zu einer Infektion mit dem Wildtyp (Berry *et al.*, 1989, 1992). Nach intravenöser Applikation führte *plnA*$^-$ zu einer konstanten chronischen Bakteriämie mit 10^7 CFU/ml (Colony Forming Units). Im Vergleich dazu erreichte der Wildtyp einige Tage nach der Infektion durch exponentielles Wachstum höhere Werte. Waren 10^{10} CFU/ml erreicht, starben die Tiere innerhalb von 28 Stunden (Benton *et al.*, 1995).

Zusammenfassend ist Pneumolysin ein wichtiges multifunktionales zyto-plasmatisches Pneumokokkenprotein mit zytotoxischen und proinflammatorischen Eigenschaften und eine wichtige Determinante der Pneumokokkenvirulenz **(Tabelle 1)**.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Eigenschaften des Pneumolysins

Eigenschaften des Pneumolysins	**Referenz**
Lyse von Erythrozyten	Mitchell *et al.*, 1989
Inhibition von Zilien-tragenden Zellen	Feldman *et al.* 1990
Frequenzsenkung der Zilienbewegung	Hirst *et al.*, 2000
Erhöhung der alveokapillären Permeabilität	Rubins *et al.*, 1995
Hemmung der Lymphozyten Antikörper-Produktion	Ferrante *et al.*, 1984
Aktivierung des klassischen Komplementweges	Boulnois *et al.*, 1991
Stimulierung der Produktion von TNF-α und IL-1β in humanen Monozyten	Sáez-Llorens *et al.*, 1990
Phospholipase A_2 Aktivierung in pulmonalen Endothelzellen	Rubins *et al.*, 1994
Auflösung von interepithelialen Verbindungen (tight junctions)	Rayner *et al.*, 1995
Stimulation der NO Produktion in Makrophagen	Braun *et al.*, 1999
Stimulation von IFNγ in Milzzellen	Baba *et al.*, 2002
Induktion der Synthese und Freisetzung von IL-8 aus neutrophilen Granulozyten	Cockeran *et al.*, 2002

1.4. Apoptose

Bei Apoptose handelt es sich um einen wichtigen physiologischen Mechanismus für einen Organismus, der sowohl in der Entwicklung bei der immunologischen Wiedererkennung als auch bei sterbenden Zellen eine zentrale Rolle spielt (Zychlinsky und Sansonetti, 1997). Um einen apoptotischen Vorgang auslösen zu können, bedarf es bestimmter Stimuli. Diese Stimuli können einerseits physiologischer Art und andererseits durch Stress bedingt sein. Die Art des Stimulus entscheidet auch über den Apoptoseweg. Bei physiologischen Stimuli werden Oberflächenrezeptoren wie CD95 oder Rezeptoren für TNF (Tumornekrosefaktor) aktiviert. Bei Stress-bedingten Stimuli handelt es sich

beispielsweise um UV-Licht, Bestrahlung, aber auch virale oder bakterielle Infektionen (Gulbins *et al.*, 2003).

Der apoptotische Weg bei Stress ist weniger erforscht als bei physiologischen Stimuli. Jedoch scheint Stress die Apoptose weitestgehend über die Einbeziehung der Mitochondrien zu triggern. Ein weiterer wichtiger Faktor scheinen Caspasen, insbesondere Caspase-2 bei zytotoxischem Stress, zu sein (Lassus *et al.*, 2002). In der Signaltransduktion der Apoptose zu den Mitochondrien spielen proapoptotische und Bcl-2 ähnliche Proteine eine wichtige Rolle (Adams und Cory, 2001). Zu den proapoptotischen Proteinen gehören beispielsweise Bax, Bak, Bad und eine Untergruppe der Bcl-2 ähnlichen Proteine, die nur Domänen wie BH3 besetzen können, die so genannten BH3-Proteine. BH3-Proteine sind zum Beispiel Bad, Bim, Bmf, Bid, Noxa und Puma (Huang und Strasser, 2000). Gegenregulierende Faktoren befinden sich ebenfalls in den Mitochondrien, hierzu gehören beispielsweise Bcl-2-Proteine, sie schützen die Zelle vor dem Zelltod. Auf welche Weise all diese Proteine an der Apoptose beteiligt sind, ist bislang nicht ausreichend geklärt. Als sicher gilt, dass Bax und Bak zentral an der mitochondrialen Dysfunktion beteiligt sind (Adams und Cory, 2001). Bid beispielsweise induziert eine Konformationsänderung und Oligomerisierung von Bax, was dazu führt, dass Bax in die äußere Membran der Mitochondrien integriert wird (Murphy *et al.*, 2000).

Das in vielen Versuchen, so auch in dieser Arbeit, als Positivkontrolle verwendete Staurosporin, triggert zum Beispiel einen Apoptoseweg über das 18 kDa Bax-Protein (Gao und Dou, 2000). Viele proapoptotische Signale werden über die Mitochondrien vermittelt. Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle in der Vermittlung von Apoptose. Eine Vielzahl von Stimuli führt zu einer Veränderung der Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran. Dies wiederum induziert die Freisetzung von verschiedenen intramitochondrial gelegenen Proteinen in das Zytoplasma der Zelle (Gulbins *et al.*, 2003). Zu diesen Proteinen, die an der Apoptose beteiligt sind, gehören Zytochrom c, Caspase-9, second mitochondrial activator of caspases und direct inhibitor of apoptosis proteins binding protein with low pI (Smac/DIABLO), Apoptose-induzierender Faktor (AIF), high temperature requiring proteins (HtrA2) und Endonuklease G (Susin *et al.*, 1999; Verhagen *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001). In fast allen Apoptosewegen scheinen Zytochrom c, Caspase-9 und Smac/DIABLO eine Rolle zu spielen, während HtrA2, Endonuklease G und das AIF besondere Funktionen übernehmen (Gulbins *et al.*, 2003).

1.4.1. Mitochondrien und AIF

Der Apoptose-induzierende-Faktor (AIF) befindet sich im Interzellulärraum zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran. Damit AIF in das Zytoplasma gelangen kann, muss das N-terminale Ende des Proteins abgespalten werden, da diese Sequenz ein Signal beinhaltet, welches AIF in Mitochondrien hält. Die Translokation von AIF scheint durch das C-terminale Ende des Proteins vermittelt zu werden (Susin *et al.*, 2000). AIF bindet direkt am Zellkern und führt zu einer Fragmentierung der DNS (Li *et al.*, 2001). Es vermittelt eine hochmolekulare DNS-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation. Zusätzlich spielt zytosolisches AIF bei der Depolarisation beziehungsweise bei Veränderungen an der Zellmembran der Mitochondrien eine Rolle (Susin *et al.*, 2000). Welche Mechanismen zu einer Freisetzung von intramitochondrialen Proteinen führen, ist bisher weitestgehend unbekannt. Einige Studien haben gezeigt, dass der so genannte permeability transition pore (PTP) Komplex eine zentrale Rolle spielt. Die Aktivierung dieses Ionenkanals verändert zumindest für niedermolekulare Proteine die Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran (Zamzami und Kroemer, 2001).

Es wird postuliert, dass pro-apoptotische Proteine wie Bcl-2 ähnliche Proteine mit Anteilen des PTP-Komplexes interagieren, um die Freisetzung von größeren Proteinen wie Zytochrom c zu ermöglichen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass anti-apoptotische Proteine existieren, die die Öffnung des PTP-Komplexes verhindern (Shimizu *et al.*, 2000). Sobald der PTP-Komplex eröffnet ist, kommt es zum Einströmen von Ionen und Wasser in die Mitochondrien. Die Mitochondrien schwellen daraufhin an. Die äußere Mitochondrienmembran kann rupturieren (Van der Heiden *et al.*, 1997). Die Freisetzung von Zytochrom c und Caspase-9 aus den Mitochondrien führt im Zytoplasma zur Bildung des so genannten Apoptosoms zusammen mit APAF-1 und dATP.

Im Zytoplasma befinden sich jedoch auch Apoptose-Inhibitoren (IAPs). IAPs, beispielsweise das so genannte human X-linked IAP (XIAP), inhibieren die Funktion von Caspasen. Daher müssen IAPs in ihrer Aktivität reguliert werden. Ihre Aktivität spielt eine wichtige Rolle bei der Entscheidung über Zelltod oder Zytoprotektion. Smac/DIABLO, welches sich auch in den Mitochondrien befindet, ist in der Lage IAPs zu inhibieren (Verhagen *et al.*, 2000). Zu den Inhibitoren der IAPs gehört ebenfalls HtrA2/Omi, eine Serin-Protease, die sich auch in den Mitochondrien befindet. HtrA2/Omi triggert zum einen eine Apoptosom-unabhängige Form der Apoptose, also unabhängig von Caspase-9

und APAF-1, zum anderen werden durch ihre Aktivität Caspasen aber auch erst aktiv (Suzuki *et al.*, 2001; Hedge *et al.*, 2002).

1.4.2. Caspasen

Zu den Cystein-enthaltenden Aspartat-spezifischen Proteasen, den so genannten Caspasen, zählen mindestens 12 verschiedene Cystein-Proteasen. Sie besitzen unterschiedliche Substratspezifität, binden aber alle an Aspartat-Enden ihres Substrates, existieren ubiquitär in allen Zellen und kommen als katalytisch inaktive Proenzyme im Zytoplasma vor. Um Caspasen zu aktivieren, muss das Proenzym proteolytisch an seinem spezifischen Aspartat-Ende gespalten werden.

Da Caspasen an Aspartat-Enden binden und in einer proteolytischen Kaskade angeordnet sind, die an die Komplementkaskade im Immunsystem erinnert, wurde angenommen, dass Caspasen für ihre eigene Aktivierung im Sinne einer Autoproteolyse verantwortlich sind. Die Kaskade spielt eine Rolle in der Vermittlung und Verstärkung von Apoptose-Signalen (Cryns und Yuan, 1998). Durch die Analyse der Caspasensubstrate und mit Hilfe von Radio-Kristallografie konnten drei Untergruppen der Caspasen klassifiziert werden. Zur ersten Gruppe gehören Caspase-1, -4 und -5; die zweite Gruppe beinhaltet Caspase-2, -3, -7 und CED-3 und die dritte Gruppe besteht aus den Caspasen 6, 8 und 9. Die Substratspezifität der Caspasen korreliert mit den intrazellulären Angriffspunkten der Caspasen (Thornberry *et al.*, 1997). Caspase-1 beispielsweise schneidet ihr intrazelluläres Substrat das Pro-Interleukin-1β an zwei spezifischen Stellen. Caspase-3 greift proteolytisch an einer Vielzahl von Struktur- und Signalproteinen während der Apoptose an, so auch am DNS-Reparatur-Enzym PARP (Lazebnik *et al.*, 1994). Caspase-6 besitzt Spezifität für Lamin A, ein bedeutendes Strukturprotein der Kernmembran während der Apoptose (Takahashi *et al.*, 1996).

Caspasen unterscheiden sich in ihrer Länge und der Aminosäurensequenz ihrer Pro-Enzymdomänen. In den Pro-Domänen konnten weitere spezifische Domänen unterschieden werden. Dazu gehört die „death effector domain“ (DED) bei den Caspasen 8 und 10 (Vincenz und Dixit, 1997). Diese Domäne spielt eine Rolle in der Interaktion mit dem Adapter-Protein FADD/MORT1. Einen Überblick über das bisher verstandene

Zusammenspiel aller Faktoren, die bekannt und an der Apoptose beteiligt sind, findet sich in **Abbildung 2**.

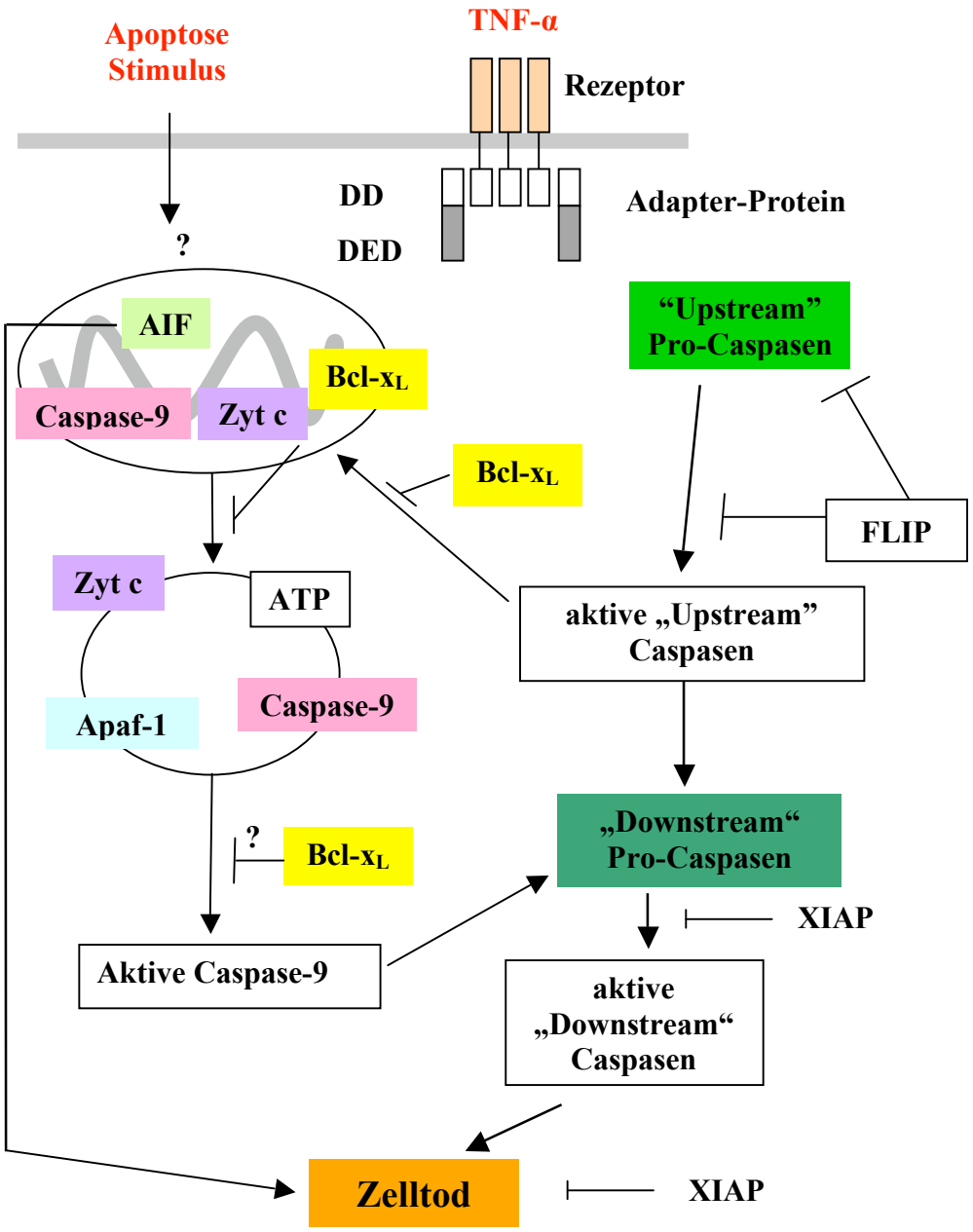


Abbildung 2: Caspasen können über zwei Wege aktiviert werden (Rezeptor oder Mitochondrien). Zytochrom c (Zyt c) wird durch noch unbekannte Faktoren aus den Mitochondrien freigesetzt. Dies kann durch Bcl-x_L inhibiert werden. Im Zytoplasma bindet Zytochrom c an APAF-1, welches mit der Caspase-9 unter ATP-Mitwirkung (Apoptosom-Bildung) interagieren kann. Die aktive Caspase-9 wiederum aktiviert die „Downstream" Caspasen, zu denen die Caspase-3 gehört. Diese Caspasen können von IAPs, beispielsweise XIAP (human X-linked IAP), inhibiert werden oder führen zum Zelltod. Der andere Weg der Apoptose wird über Rezeptoren vermittelt, hier z.B. bindet das TNF-α. Die Rezeptoren besitzen eine „Todesdomäne" (death domain: DD) auf der Innenseite der Zellmembran.

Durch Bindung von TNF-α an den Rezeptor werden DD tragende Adapter-Proteine aktiviert wie z.B. FADD. Dadurch werden die „Upstream“Pro-Caspase-8 und -10 über eine weitere Domäne auf dem Protein (DED) angelockt. Dies wiederum führt zur proteolytischen Aktivierung der Caspasen-Kaskade und damit zu aktiven Caspasen. Die aktiven Caspasen können direkt oder indirekt auf die Mitochondrien einwirken, um beispielsweise die Freisetzung von Zytochrom c zu erleichtern. Rezeptor-vermittelte Apoptose kann durch das Protein FLIP, dass eine DED-Domäne enthält inhibiert werden, damit kommt es nicht zu einer Pro-Caspasen-Aktivierung. XIAP ist ein aktiver Inhibitor der „Downstream“ Caspasen 3 und 7 und stellt den letzten Schutzmechanismus der Zelle vor dem Zelltod dar (Cryns und Yuan, 1998).

2. Ziele der Arbeit

Entsprechend der aktuellen Statistik der Weltgesundheitsorganisation sind Infektionskrankheiten zurzeit weltweit die Todesursache Nummer eins. Sie haben einen prozentualen Anteil von 41% an allen Todesursachen. Herz-Kreislauf-Erkrankungen folgen an zweiter Stelle mit 20%. *S. pneumoniae* gehört zu den Erregern von Infektionskrankheiten, die Schäden großen Ausmaßes im infizierten Organismus verursachen können. *S. pneumoniae* kommt ubiquitär vor. Maßnahmen gegen Infektionskrankheiten wie Hygiene, antibakterielle Chemotherapie und Impfungen haben nicht dazu geführt, Pneumokokkeninfektionen signifikant zu reduzieren. Vielmehr ist in den letzten Jahren eine zunehmende Tendenz von Infektionskrankheiten zu verzeichnen. Deshalb ist es wichtig, den immer noch nicht im Detail verstanden Pathomechanismus der Infektion weiter zu erforschen, um hier möglicherweise neue Ansätze für nachhaltige Therapien entwickeln zu können.

Pneumolysin ist für die Pneumokokken ein essentieller Virulenzfaktor. Was für den Erreger perfekte Anpassung bedeutet, heißt für den Menschen Krankheit und Leid. Je besser wir verstehen, wie Pneumolysin am molekularen Pathomechanismus des Zelltodes beteiligt ist, umso besser und exakter kann die entsprechende Therapie gestaltet werden. In vielen experimentellen Modellen konnte demonstriert werden, dass Pneumolysin-negative Mutanten der Pneumokokken wesentlich harmloser für den Organismus sind. Es konnte im Pneumonie- und Sepsis-Modell gezeigt werden, dass die Pneumolysin-defiziente Mutante *plnA*$^-$ im Vergleich zu Wildtyp-Pneumokokken deutlich an Virulenz verlor. Bestimmte Eigenschaften des Pneumolysins wurden dadurch verstanden, wie beispielsweise, dass es die Persistenz im Nasopharynx und Alveolarepithel erleichtert, an der Zerstörung der

alveolar-kapillaren Schranke mitwirkt, die Entstehung von Sepsis fördert und die Entzündungsreaktion im infizierten Organismus triggert (Kadioglu *et al.*, 2002; Rubins *et al.*, 1995; Benton *et al.*, 1995; Canvin *et al.*, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Toxizität des Pneumolysins in kortikalen Ratten-Neuronen erforscht. Insbesondere interessierten uns die Beteiligung der Mitochondrien und deren proapoptotischer Proteine im Zusammenspiel mit anderen Pneumolysin-induzierten zellulären Veränderungen. Wir untersuchten den Apoptose-induzierenden-Faktor AIF, die Rolle von Kalzium, Sauerstoffradikalen, Mitochondrien und Caspasen. Wir stellten die Hypothese auf, dass Pneumolysin der Pneumokokkenfaktor ist, welcher die Caspasenunabhängigkeit des Pneumokokken-induzierten neuronalen Zelltodes vermittelt. Um diese Hypothese zu belegen wurden kortikale Ratten-Neurone mit verschiedenen biochemischen und Morphologie-beurteilenden Methoden nach Inkubation mit Pneumolysin untersucht.

Hirnschädigung bei der Pneumokokkenmeningitis ist sowohl durch die ausgeprägte eitrige intrathekale Entzündung als auch durch Bakterien und deren Toxine selbst verursacht (Braun *et al.*, 1999 und 2002). Pneumolysin und bakterielles Hydrogenperoxid wurden bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis als wichtige Trigger neuronaler Schädigung identifiziert (Braun *et al.*, 2002): Pneumolysin bindet an Hippocampusneurone, welche apoptotisch sterben. Da Pneumokokken mehrere Toxine besitzen und die Zelltodmechanismen deshalb multifaktoriell sind, war es Ziel dieser Arbeit, die Rolle eines essentiellen Pneumokokkentoxins, nämlich Pneumolysin, bei der neuronalen Schädigung in vitro näher zu untersuchen. Pneumolysin besitzt eine wichtige Rolle bei der Pneumonie, Sepsis, Otitis media und auch Meningitis. Wir haben uns aus folgenden Gründen für die primäre neuronale Zellkultur entschieden: In vivo sind bei der bakteriellen Meningitis viele unterschiedliche Zelltodtrigger vorhanden, welche die Signaltransduktionswege der neuronalen Schädigung bedingen und beeinflussen. In vitro kann man die Signaltransduktion der einzelnen Zelltodtrigger gezielt und spezifisch untersuchen. Wir haben primäre Neurone verwendet um spezifische Signaltransduktionswege der Neurotoxizität von Pneumolysin zu untersuchen, da Zelllinien artifiziell immortalisiert und deren Zelltodwege nicht die realen Verhältnisse widerspiegeln.

3. Material und Methoden

3.1. Methoden

3.1.1. Neuronale Zellkultur

Die verwendeten Neurone wurden aus 18 Tage alten Rattenembryonen gewonnen. Die gesamte Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Embryonen wurden in PBS (Phosphate Buffered Saline) aus dem Uterus entnommen. Anschließend wurden die Gehirne der Embryonen in NBM + B27 Supplement entnommen (Neurobasalmedium, 2% B27 Supplement, 50.000 IE Penicillin/Streptomycin, 500 µM L-Glutamin). Von den Gehirnen wurde der Kortex unter dem Mikroskop präpariert. Die so gewonnenen Kortexanteile aller Embryonen wurden gesammelt, mit PBS gespült und in einer Trypsinlösung inkubiert (10fach konzentrierte Trypsin/EDTA-Mischung 1:10 verdünnt mit PBS ohne Kalzium-Zusatz; Inkubationsbedingungen: 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad). Die auf diese Weise grob vereinzelten Neurone wurden mit N-Med gewaschen (50 ml 10% fetales Kälberserum, 50.000 I.E. Penicillin/Streptomycin, 5 ml 2 mM L-Glutamin, 1,25 ml 0,25% Insulin, 5 ml 1% 1 M 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES), 0,8% Glucose aufgefüllt auf 500 ml Minimum Essential Medium (MEM)). Nun wurde die Suspension vorsichtig mehrmals in eine Pipette aufgezogen und wieder zurück ins Gefäß pipettiert. Es wurde im Anschluss über 2 Minuten lang mit 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Der Bodensatz wurde in Starter-Medium aufgenommen (5 ml 25 µM Glutamat auf 500 ml NBM + B27). In einer Fuchs-Rosenbauer-Kammer wurden die Zellen gezählt und auf Vitalität beurteilt (Trypan-Blau als Marker für tote Zellen). Im Durchschnitt lag die Rate der toten Zellen bei 10-20%. Um vergleichbare Zellkulturen zu bekommen, wurden die Zellsuspensionen auf 3 x 10^5 Zellen/ml verdünnt. Die Platten für die Neurone wurden mit Poly-L-Lysin-Lösung über eine Stunde lang benetzt (5 ml 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin auf 100 ml PBS). Die Platten wurden dann mit Kollagen-Medium behandelt (1 ml 3 mg/ml Collagen-G-Lösung auf 100 ml N-Med; Inkubationsbedingungen: 3 Stunden bei 37°C). Die Zellkulturplatten wurden vor dem Aussäen der Zellen mit PBS gespült. Als Nährmedium erhielten die Neurone

Starter-Medium (siehe oben). Die Neurone wurden 8 Tage in Kultur gehalten, bevor sie im Experiment verwendet wurden. Während dieser Zeit bildeten sie ein deutliches Neuritennetz aus.

3.1.2. Pneumolysin und seine Mutanten

Pneumolysin gehört zu einer Familie von thiolaktivierten Zytotoxinen, die von einer Vielzahl von grampositiven Bakterien produziert werden. Freies Cholesterol bewirkt eine starke Hemmung der zytotoxischen Wirkungen auf humane Zellen. Es hat aber keinen Einfluss auf die Fähigkeit des Pneumolysins, den klassischen Komplementweg zu aktivieren. Diese Tatsache spricht dafür, dass die Eigenschaften auf zwei unterschiedlichen Genabschnitten kodiert sind (Paton *et al.*, 1984). Der Austausch des Tryptophans an der Stelle 433 durch Phenylalanin bewirkte eine 10^3-fache Abschwächung der porenbildenden Aktivität (Mitchell and Andrew, 1997). Eine andere Punktmutation an Stelle 385, bei der Aspartat durch Asparagin ausgetauscht wurde, hatte zur Folge, dass Pneumolysin nicht mehr an Immunglobulin G bindet und den klassischen Komplementweg nicht mehr aktiviert (Mitchell *et al.*, 1991), währenddessen seine zytotoxische Aktivität weiterhin 100% beträgt. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Mutanten bezüglich ihrer pro-apoptotischen Wirkung verglichen. Die Mutante mit defekter porenbildenden Aktivität wurde in einigen Experimenten im Vergleich mit dem Wildtyp verwendet. Wildtyp-Pneumolysin und die Pneumolysin-Mutanten wurden freundlicherweise von Herrn Professor T. J. Mitchell (Abteilung für Infektiologie und Immunologie an der Universität Glasgow, Schottland) zur Verfügung gestellt.

3.1.3. Zelltodbestimmungen

3.1.3.1. Acridinorange / Ethidiumbromid (AO/EB)

Die AO/EB-Doppelfärbung ist eine Methode zur Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose. Beide Substanzen sind fluoreszierende interkalierende DNS-

Farbstoffe. AO gelangt aufgrund seiner positiven Ladung in das Zellinnere und färbt Zellkerne lebender Zellen grün. Da frühapoptotische Zellen noch eine intakte Zellmembran besitzen, wird Ethidumbromid ausgeschlossen und die Zellkerne fluroeszieren ebenfalls grün. Lebende und frühapoptotische Zellen können aber hinsichtlich ihrer Größe unterschieden werden, da frühapoptotische Zellen bereits geschrumpft sind und einen kondensierten Zellkern besitzen, während lebende Zellen eine reguläre Zell- und Zellkerngröße besitzen. EB dagegen färbt die Zellkerne rot fluoreszierend an. EB gelangt nur dann intrazellulär, wenn die Integrität der Zellmembran beeinträchtigt ist, was bei der Nekrose sehr früh der Fall ist. Nekrotische Zellen haben daher rot-fluoreszierende Zellkerne. Spätapoptotische Zellen erscheinen ebenfalls rot. Nekrotische und spätapoptotische Zellen lassen sich durch ihre Zellgröße unterscheiden. Nekrotische Zellen weisen einen regulären oder sogar vergrößerten Zellkern auf, während spätapoptotische Zellen einen kondensierten Zellkern besitzen (Pitrak *et al.*, 1996; Braun *et al.*, 2001).

Die gleichzeitige Anwendung beider Farbstoffe und die Bewertung der Zellmorphologie lassen zwischen lebenden, apoptotischen (früh- und spätapoptotischen) sowie nekrotischen Zellen unterscheiden. Nach Exposition der Neurone mit Pneumolysin (0,5 µg/ml) über unterschiedliche Zeiträume wurden die Farbstoffe hinzugefügt (2 µg/ml AO und 2 µg/ml EB in 35 µl PBS verdünnt). Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt.

3.1.3.2. MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H Tetrazoliumbromid

Erstmals wurde der MTT-Assay von Mosman beschrieben (Mosman, 1983). Das Prinzip des MTT-Assays besteht darin, die Stoffwechselaktivität lebender Zellen in Korrelation zu ihrer Zellzahl kolorimetrisch zu messen. Stoffwechselaktive Zellen reduzieren mit ihrer NADH-abhängigen Succinatdehydrogenase (SDH) der Mitochondrien das Tetrazoliumsalz (MTT) zu Formazan-Kristallen. Im MTT-Assay können diese Kristalle durch ein Detergenz (SDS und HCl) löslich gemacht werden und photometrisch lässt sich somit eine quantitative Aussage über die Aktivität treffen. Die Beziehung zwischen der Extinktion und der Zellzahl ist linear. Im konkreten Versuch wurden die kultivierten Neurone mit definierten Konzentrationen des Pneumolysins (0,5 µg/ml) über

unterschiedliche Zeiträume behandelt. Im Anschluss wurden 150 µl MTT (0,5 mg/ml) in jede Probe pipettiert. Nach 45 Minuten bei 37°C gab ich 200 µl 10%iges Sodiumdodecylsulfat (SDS) in H_2O und HCl in einer Endkonzentration von 0,01 M dazu. Die Zellkulturplatte wurde dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei einer Wellenlänge von 590 nm wurde die Extinktion mit dem ELISA-Plattenreader MRX $_{TC}$ Revelation (Thermo Labsystems) gemessen.

3.1.3.3. Transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)

Durch diese Färbung in Kombination mit der morphologischen Beurteilung der Zellen ist es möglich in Zytopräparaten zwischen apoptotischen und lebenden Zellen zu unterscheiden. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Anfärbbarkeit der 3'-OH-Enden von DNS-Fragmenten, welche bei der Apoptose entstehen.

Zur Herstellung der Zytopräparate wurden kleine Glasplättchen in die Vertiefungen der Zellkulturplatten gelegt. Erst dann wurden die Platten entsprechend dem Zellkultur-Protokoll behandelt. Die Neurone wurden wie beschrieben ausgesät und konnten auf den Glasplättchen anhaften. Nachdem die Neurone mit Pneumolysin behandelt wurden (über 3, 6, 9 Stunden mit einer Pneumolysin-Konzentration von 0,5 µg/ml), wurden die Glasplättchen aus den Wells genommen. Die Plättchen wurden anschließend luftgetrocknet. Die Neurone wurden fixiert. Dazu nahm ich 4%iges Paraformaldehyd (PFA) in Phosphatpuffer (PBS) und ließ dies über 30 Minuten einwirken. Es wurde dann dreimal mit PBS gespült. Zur Permeabilisierung der Zellwände und somit zur Steigerung der Sensitivität der Färbung wurden die Zellen mit Proteinase K behandelt (20 µg/ml in 0,01 M Tris-HCl (pH 8,0) für 8 Minuten). Auch nach diesem Schritt wurde wiederum dreimal mit PBS gespült. Um die endogene Peroxidase zu blockieren wurde eine Lösung aus 0,1 M Natriumazid und 0,2%igem H_2O_2 in PBS mit 0,3%igem Triton-X für 15 Minuten auf die Zellen gegeben. Es wurde erneut mit PBS gespült. Ein Equilibrierungspuffer (ApopTag®) wurde für etwa 10 Sekunden auf die Plättchen pipettiert. Danach wurde direkt das TdT-Enzym (ApopTag®) zusammen mit dem Reaktionspuffer (mit dUTP-Digoxigenin) (ApopTag®) auf die Zellen gegeben. Die Inkubation dauerte 90 Minuten bei 37°C. Das Verhältnis zwischen Enzym und Reaktionspuffer war 30:70.

Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit Stopp/Wasch-Puffer (ApopTag®) für 10 Minuten behandelt (100 µl Stopp/Wasch-Puffer auf 3,4 ml destilliertes Wasser). Im Anschluss wurde wieder mit PBS gewaschen. Jetzt wurde der Peroxidase-markierte Anti-Digoxigenin Antikörper (ApopTag®) zu den Zellen gegeben (1:500 in PBS gelöst; 30 Minuten bei Raumtemperatur). Es wurde dann mit PBS gewaschen. Das in PBS gelöste 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) wurde zu 0,05%igem DAB verdünnt und mit 0,3%igem H_2O_2 versetzt. Diese verdünnte DAB-Lösung wurde auf die Zellen pipettiert. Das DAB verblieb solange auf den Zellen bis eine Färbung der Zellen unter dem Mikroskop zu erkennen war. Nach spätestens 10 Minuten wurde die Reaktion in H_2O gestoppt. Die Zellen wurden in destilliertem Wasser gespült. Zur abschließenden Entwässerung wurde eine um je 10% aufsteigende Alkoholreihe verwendet (beginnend mit 70%igem Alkohol, je 3 Minuten, bis 100%igem Alkohol). Zuletzt wurden die Präparate 5 Minuten mit Rotihistol behandelt. Ein Deckglas wurde mit VitroClud® zum Schutz auf dem Präparat befestigt. Das Prinzip der Färbung ist schematisch in **Abbildung 3** dargestellt.

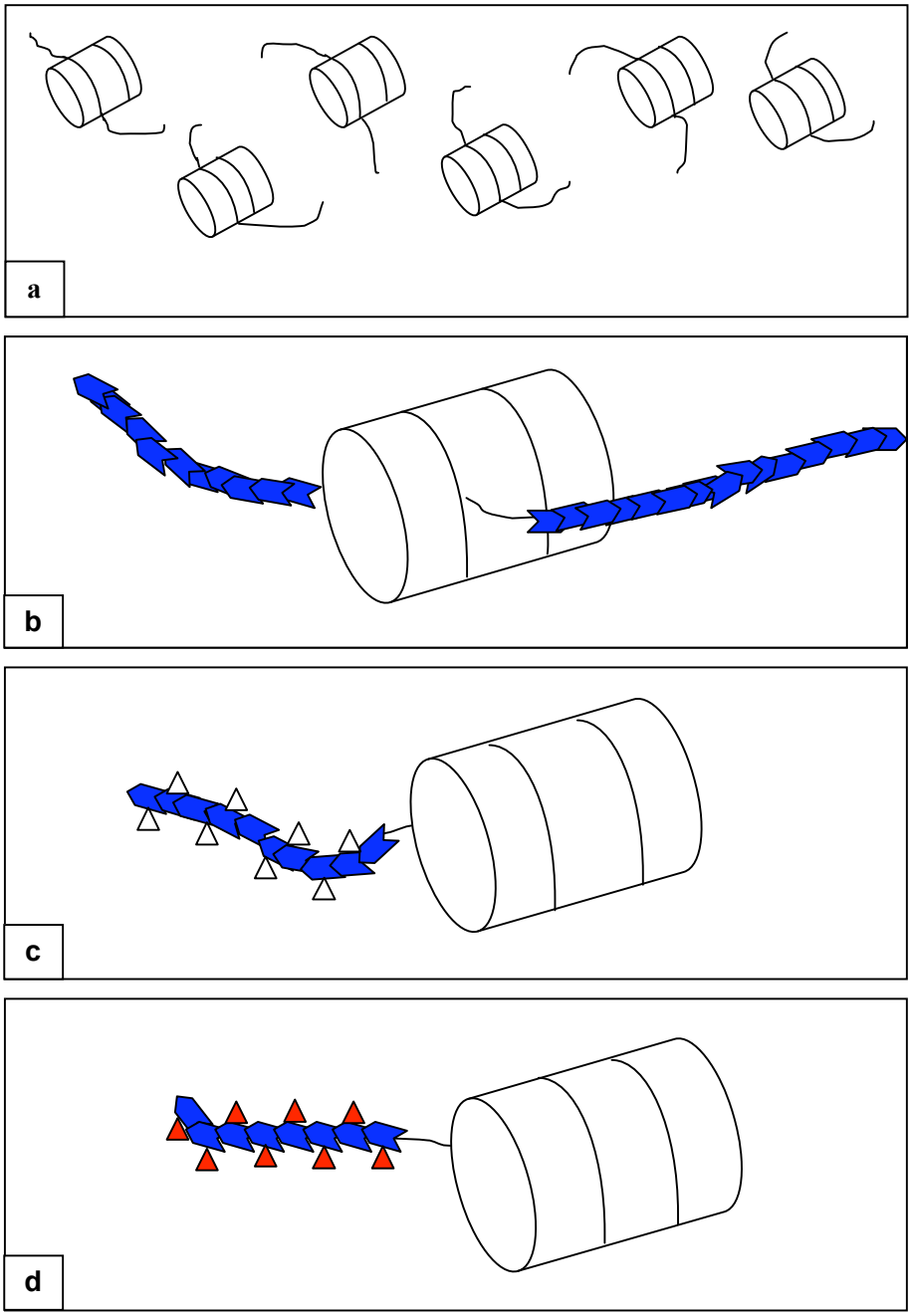


Abbildung 3: In der Darstellung (a) sind schematisch die DNS-Fragmente dargestellt wie sie nach der Apoptose mit ihren Nukleotidenden vorliegen. Im nächsten Bild (b) hat das Substrat Digoxigenin-dUTP mit Hilfe des TdT-Enzyms an die freien Nukleotidenden gebunden. Im folgenden Schritt (c) bindet der Peroxidase-markierte Antikörper an Digoxigenin. Anschließend (d) wird mit dem Peroxidasesubstrat DAB gefärbt. Unter dem Lichtmikroskop erscheinen die Neuronenzellkerne der apoptotischen Zellen als kondensierte dunkle Strukturen, die gut von Zellkernen noch lebender intakter Neurone zu unterscheiden sind (Schemazeichnung in Anlehnung an die Produktinformation des Apoptosis Detection Kits ApopTag® von der Firma Q-Biogene).

3.1.3.4. DNA-Laddering

Mit der Methode des DNA-Ladderings lassen sich kleinere DNS-Fragmente (180 - 220 bp) nachweisen. Spät im apoptotischen Prozess spalten durch Caspasen aktivierte endogene Endonukleasen chromosomale DNS zwischen ihren Nukleosomen und dabei entstehen viele solcher typischen DNS-Fragmente (Gong *et al.*, 1994).

Für das DNA-Laddering wurden Neurone (Inhalt eines Wells einer 6-Well-Zellkulturplatte) zusammen mit 1 ml Medium verwendet. Die Zell-Medium-Suspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen pipettiert. Bei 5000 Umdrehungen pro Minute wurde sie für 3 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die am Boden des Eppendorfgefäßes befindlichen Zellen (Pellet) wurden auf Trockeneis gefroren oder zwischengelagert.

Zur DNA-Isolation (DNA-Isolations-Kit von Invitrogen) wurde das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert. Im Anschluss wurden 350 µl einer gebrauchsfertigen Lösung (A) zu dem resuspendierten Pellet gegeben und beides wurde gut miteinander vermischt. Dann wurde die Suspension bei 65°C für 10 Minuten im Wasserbad inkubiert. Daran anschließend wurden 150 µl einer gebrauchsfertigen Lösung (B) pipettiert. Wieder wurden die Lösungen miteinander gut vermischt bis sie trübe wurden. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 15000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C.

Der nächste Schritt diente der DNA-Präzipitation. Die Probe wurde mit 1 ml eiskaltem (-20°C) 100%igem Ethanol vermischt. Eine Inkubation auf Eis folgte für 30 Minuten. Anschließend wurde bei 15000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. 500 µl eiskaltes Ethanol wurde zugegeben und das Pellet wurde dieses Mal nicht resuspendiert. Gleich im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation mit 15000 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt und der Restalkohol sollte verdunsten. TE-Puffer wurde nun mit RNAse (-20°C) zubereitet (2 µl RNAse/100µl Puffer). In 25 bis 50 µl RNAse/Puffer wurden die Pellets resuspendiert und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.

Um vergleichbare DNA-Mengen zu erhalten, wurden 2 µl Probe mit 78 µl H_20 verdünnt. Diese 80 µl wurden bei 260 nm photometrisch gemessen (E260 * 50 ng/µl * Verdünnung). Aus dem Ergebnis konnte der DNA-Gehalt der jeweiligen Probe in ng/µl bestimmt werden. Für den anschließenden Gellauf wurden 1 µg in 10 µl H_20 benötigt.

Für den Gellauf wurde 1 %ige Agarose in TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) angesetzt (5 µl Ethidiumbromid/100µl) und in eine Form gegossen. 10 µl der auf 1 µg/10µl eingestellten Probe wurden mit 3 µl Bromphenolblau auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte mit TBE bei 120 bis 140 Volt.

3.1.4. Caspasen Aktivitätsmessungen

Um Caspasen nachzuweisen, werden Substrate benutzt, die fluorogene Sequenzen enthalten (7-Amino-4-Trifluoromethyl Coumarin [AFC] und 7-Amino-4-Methyl Coumarin [AMC]). Caspasen spalten die für sie spezifischen Substrate. Die abgespaltenen fluoreszierenden Sequenzen können photometrisch nachgewiesen werden. Procaspasen werden auf diese Weise nicht nachgewiesen.

Die benötigten Neurone wurden mit Medium in ein Eppendorfröhrchen pipettiert. Die Suspension wurde bei 3000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde bei -80°C eingefroren oder auf Trockeneis zwischengelagert. Anschließend wurden die Neurone 5 Minuten bei 4°C in 150 µl Lyse Puffer (Pharmingen) lysiert. Die lysierten Neurone wurden bei 15000 Umdrehungen pro Minute und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfröhrchen pipettiert und auf Eis gelagert. Um die Aktivität der Caspasen zu messen wurde eine Zellkulturplatte mit 96 Wells verwendet. In jede Vertiefung (Well) wurden 80 µl Assaypuffer (100 mM HEPES-Puffer, 10% Sucrose, 10 mM Dithiothreitol und 7,5 mM EDTA [pH 7,5]) und 2 µl (1,5 mM) fluorogenes, spezifisches Caspase-Substrat pipettiert. Im Anschluss wurden 20 µl Probe (Überstand der lysierten Neurone) in die Wells pipettiert. Eine Reihe der Platte blieb ohne Probe und diente als Leerwert. Die Platte wurde mit Parafilm luftdicht abgeklebt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Fluoreszenz mit dem Fluoreszenzlesegerät gemessen. Für die Fluoreszenzfarbstoffe der jeweiligen spezifischen Caspasensubstrate wurde die entsprechende Wellenlänge zur Messung eingestellt (Caspasen 1, 3 und 6 spalten AMC, Caspasen 2, 4, 5, 9 und 8 spalten AFC). AFC wurde bei 400 nm (Exzitation) und 505 nm (Emission) gemessen. Das AMC bei den Wellenlängen 380 nm (Exzitation) und 460 nm (Emission). Die Aktivitäten der Caspasen wurden mit zuvor bestimmten AMC/AFC-Standardkurven berechnet. Die Proteinmenge der jeweiligen Proben wurde mit dem BCA-

Assay (siehe dort) errechnet und auf eine definierte Proteinmenge angeglichen. Somit war eine direkte Vergleichbarkeit der verschiedenen Caspasenaktivitäten pro eingesetztes Mikrogramm Protein möglich.

3.1.5. Immunzytochemischer Nachweis des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF)

Durch eine immunzytochemische Färbung kann die Freisetzung und mitochondrial-nukleäre Translokation des Apoptose-induzierenden Faktors nachgewiesen werden (Susin *et al.*, 1999/a).

Für die Färbung wurden Neurone benötigt, die auf Glasplättchen anhafteten (siehe bei TUNEL-Färbung). Die luftgetrockneten Präparate wurden mit 3%igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Anschließend wurde mit PBS gespült. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurde eine 0,1%ige SDS Lösung für 10 Minuten auf die Zellen pipettiert. Im Anschluss wurde erneut mit PBS gespült. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Neurone auf den Glasplättchen mit einer Mischung aus 1%igem bovinen Serumalbumin (BSA) und 10%igem nativem Ziegen-Serum (native goat serum [NGS]) in PBS für eine Stunde behandelt. Der AIF-Antikörper (Molecular Probes) wurde in einem Verhältnis 1:800 verdünnt und auf die Präparate pipettiert (Verdünnung mit PBS und 1%igem BSA). Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde drei Mal mit PBS gespült. Der Sekundärantikörper Cy3 (Invitrogen) wurde lichtgeschützt in einer Verdünnung 1:500 auf die Präparate pipettiert (Verdünnung in 1%igem BSA und PBS). Nach einer Stunde erfolgte die Zellkernfärbung für weitere 10 Minuten mit dem fluoreszierenden Farbstoff 33258 (Hoechst, 10 mg/ml), der 1:10.000 verdünnt wurde (Verdünnung in PBS). Als nächstes wurde erneut drei Mal mit PBS gespült. Die Präparate wurden mit Glasplättchen und Eindeckmedium abgedeckt und dunkel aufbewahrt.

3.1.6. Bestimmung des Membranpotentials der Mitochondrien mit Tetramethylrhodaminester (TMRE)

Tetramethylrhodaminester (TMRE) wird zur Quantifizierung von Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials verwendet. In den gesunden Zellen wird TMRE aktiv in die Mitochondrien aufgenommen. Bei einer Schädigung der Mitochondrien kommt es zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials. Dies führt zu einer Freisetzung und somit Reduktion von mitochondrial akkumuliertem TMRE, was mit dem Fluoreszenzlesegerät Cytofluor 4000 Gerät (Applied Biosystems) quantifiziert wurde (Li *et al.,* 1998).

Für die TMRE-Färbung wurden die verwendeten Neurone zunächst mit PBS gespült. Anschließend wurden sie mit 500 µl 100 nM TMRE für 35 Minuten in NBM und B27 präinkubiert. Das Medium mit TMRE wurde anschließend verworfen und durch 245 µl frisches Nährmedium sowie 5 µl Pneumolysin (0,5 µg/ml) ersetzt. Die mitochondriale TMRE-Fluoreszenz und deren Abfall im Verlauf der Inkubation mit Pneumolysin wurde mit dem Cytofluor 4000 Gerät gemessen (Exzitationsfilter 530 ± 25 nm, Emissionsfilter 590 ± 35 nm).

3.1.7. Kalzium-Messung mit Fluo-4 Acetoxymethylester

Mit dem Fluo-4 Assay ist es möglich, Änderungen von intrazellulärem Kalzium im millimolaren Bereich zu messen. Die Spezifität des Assays ist hoch. Fluo-4 fluoresziert, soblald es Kalzium gebunden hat (Minta *et al.*, 1989).

Neurone wurden nach einer Behandlung mit Pneumolysin (0,5 µg/ml) mit Fluo-4 Acetoxymethyl (Fluo-4, 10 µM) für 45 Minuten inkubiert. Das Fluo-4 wurde zunächst als Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mM hergestellt (50 µg Substrat in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst). Die gebrauchsfertige Lösung mit einer Konzentration von 10 µM wurde durch Verdünnen mit einem Kalzium-freien Puffer hergestellt. Mit dem Cytofluor 4000 Gerät (Applied Biosystems) wurde bei einer Exzitation von 485 ± 20 nm die Emission mit einem 530 ± 25 nm Filter gemessen.

3.1.8. Messung der Sauerstoffradikale mit Dihydrorhodamin 123 (DHR 123)

Die Quantifizierung freier Radikale erfolgte mittels des Farbstoffes Dihydrorhodamin 123 (DHR 123). Der Farbstoff wird in die Zellen aufgenommen und sobald sich freie Radikale in dieser befinden, wird das DHR gespalten und beginnt zu fluoreszieren (Kooy *et al.*, 1994).

Es wurde eine 1 µM DHR 123 Lösung auf die noch unbehandelten Neurone pipettiert. Nach einer Stunde wurde das Medium verworfen. Im Anschluss wurde das Medium NBM ohne B27 auf die Zellen gegeben (antioxidantienfrei). Die Neurone wurden mit Pneumolysin (0,5 µg/ml) behandelt. Als Positivkontrolle diente Wasserstoffperoxid, als Negativkontrolle wurden nur mit DHR behandelte Neurone verwendet. Die optische Dichte der Neurone wurde nach definierten Zeiten (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150 und 180 Minuten) mit dem Cytofluor Messgerät 4000 gemessen. Die Wellenlänge des Exzitationsfilters betrug 485 ± 20 nm und des Emissionsfilters 530 ± 25 nm.

3.1.9. Protein-Elektrophorese und Western Blot

Dem Western Blot ging eine elektrophoretische Auftrennung von Proteinen voran. Hierdurch wurden die Proteine in ihrem Molekulargewicht analysiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgt auf einem Polyacrylamidgel (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)). Die separierten Proteine werden auf eine Membran übertragen. Diese Membran kann mit Antikörpern inkubiert werden, die das gesuchte Protein detektieren (Bronfman *et al.*, 1998).

Die verwendeten Neurone wurden aus einer Zellkulturplatte genommen. Das Medium wurde zur Lyse der Neurone durch eiskalten Ripa-Puffer mit Proteinaseinhibitor (Boehringer) ersetzt (Ripa-Puffer: 50mM Trishydroxymethyl-aminomethan (Tris) pH 7,5, 150 mM Natriumchlorid, 1% Triton X-100, 0,1% Sodiumdodecylsulfat (SDS) und 0,5% Natriumdeoxycholat, 1 mM EDTA). Die Neurone wurden 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die lysierten Neurone in ein 2 ml Eppendorfröhrchen pipettiert. 5 µl wurden für die Proteinquantifizierung entnommen. Die Probenmenge wurde so gewählt, dass jede Probe 30 µg Protein enthielt.

Im Anschluss wurde das doppelte Volumen der Probe mit Lämmli-Puffer aufgefüllt (insgesamt maximales Volumen der Probe: 30 µl) (Lämmli-Puffer: 5 ml 1 M Tris pH 6,8, 2 g SDS, 0,1 g Bromphenolblau, 10 ml Glycerol auf 40 ml destilliertes Wasser aufgefüllt). Die Proben wurden 5 Minuten auf 95°C für erhitzt, anschließend eine Minute auf Eis gestellt. Als nächstes wurden sie zentrifugiert und wieder auf Eis gelagert. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Gelkammer (Biorad) für die Elektrophorese vorbereitet. Für die SDS-PAGE wurden die Proben (bis zu 30 µl in 9 x 8 cm Gele, BioRad) in die Taschen des Gels gefüllt. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingefügt. Die Kammer wurde mit Laufpuffer gefüllt (15 g Tris Base, 72 g Glycerin, 5 g SDS pro Liter destilliertem Wasser: zum Gebrauch 1:5 verdünnt; pH 8,3). Neben den einzelnen Proben wurde eine Tasche des Polyacrylamidgels mit Markern zur Bestimmung der Molekulargewichte (BioRad, München) beschickt. Die Elektrophorese dauerte 30 bis 40 Minuten bei 180 Volt.

Am Marker konnte erkannt werden, wann die Elektrophorese beendet werden konnte. Das Gel wurde dann aus der Kammer genommen und für mindestens 5 Minuten in Transferpuffer gelegt (5,8 g Tris Base, 2,9 g Glycerin auf 800 ml destilliertes Wasser, zusätzlich 200 ml Methanol). Eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) wurde für 5 Minuten in Methanol eingelegt und im Anschluss in Transferpuffer. Der Aufbau des halbtrockenen Transfers (Protein auf Membran) kann in der **Abbildung 4** gesehen werden. Das Whatman-Papier wurde vorher kurz in Transferpuffer gelegt. Die Membran und das Gel wurden luftblasenfrei aufeinander gelegt. Der Transfer dauerte 30 Minuten bei 15 Volt. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran für eine Stunde in einem Blockierungspuffer inkubiert (5%iges Milchpulver in Trishydroxymethyl-aminomethan buffered sodium [TBS] bei pH 7,6, 0,1‰ Tween 20). Im Anschluss wurde der primäre Antikörper in 5% Milchpulver und 0,1‰ Tween 20 entsprechend der Firmenempfehlung verdünnt. Die Membran wurde mit dem Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit TBS und 0,1‰ Tween 20 gespült. Anschließend wurde auf die Membran der sekundäre mit Meerrettichperoxidase markierte Antikörper im Verhältnis 1:5000 für eine Stunde pipettiert. Als nächstes wurde mit TBS und 0,1‰ Tween 20 gespült. Die gebundene Peroxidase wurde über Chemilumineszenz nachgewiesen. Dazu wurde für 5 Minuten die Färbung mit der Super Signal Ultra Chemilumineszenz durchgeführt (Sigma). Dabei wird von der Peroxidase ein Substrat (Luminol) oxidiert. Die daraus resultierende Lichtemission wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms (Biomax, Kodak) aufgenommen. Anschließend wurde der Röntgenfilm entwickelt und fixiert.

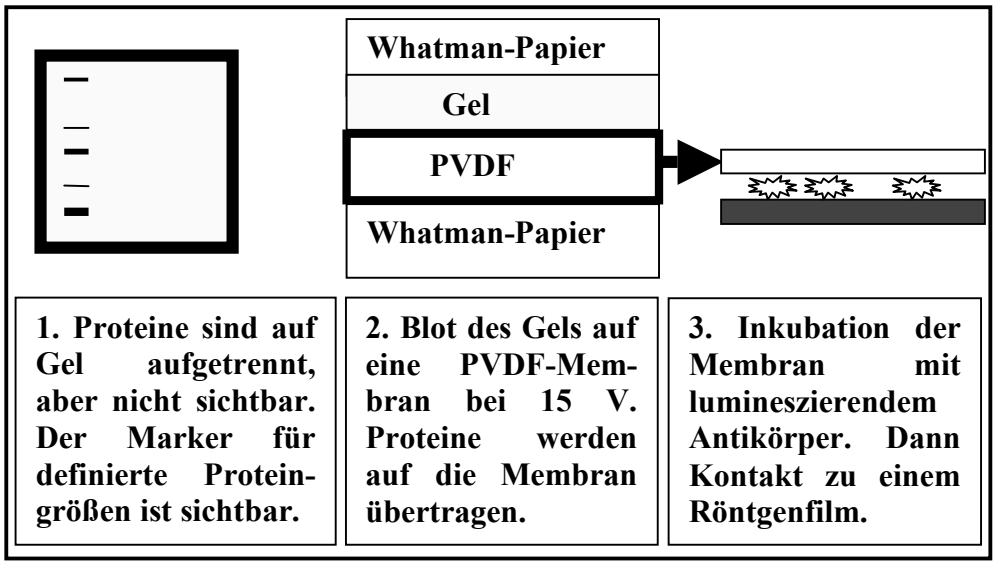


Abbildung 4: Prinzip des halbtrockenen Transfers beim Western Blot.

3.1.10. Pulsfeldgelelektrophorese

Bei der AIF-abhängigen Apoptose werden charakteristische DNS-Fragmente von 50 Kilobasen produziert, welche mittels der Pulsfeldgelelektrophorese nachgewiesen werden (Schwartz und Cantor, 1984).

Die isolierte DNS wurde auf ein Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch mit wechselnder Spannung zwischen mehreren Elektroden in einer hexagonalen Kammer aufgetrennt. Zur Herstellung des Agarose-Gels wurden 60 mg Agarose in 4 ml PBS ohne Zusatz von Magnesium und Kalzium in einem Wasserbad bei 65°C erhitzt. Die 1,5%ige Agarose wurde bei 50°C aufbewahrt. Zwischenzeitlich wurden Neurone einer Zellkulturplatte in 75 µl PBS suspendiert. Es wurden dann 75 µl suspendierte Neurone und 75 µl 1,5%ige Agarose in kleine Formen gefüllt. Die Formen wurden bei 4°C für 30 Minuten gekühlt. Danach wurde der Digestionspuffer zugegeben (0,5 M Ethylendiamintetraazetat (EDTA) bei pH 7,5, 1%iges Laurylsarcosin, 1 mg/ml Proteinase K). Die Agarose-DNS-Proben wurden bei 50°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Blöcke in TBS gespült. Für die Pulsfeldgelelektrophorese wurde ein Gel hergestellt, in das die Proben für die Auftrennung gelegt werden konnten (1%ige Agarose in 170 ml TBS).

Als Kontrollen für die Auftrennung wurden Marker für große (48,5 kB - 1018,5 kB) und kleine (0,13 kB - 194,0 kB) DNS-Fragmente verwendet (Biolabs). Als Laufpuffer wurde 0,5faches TBS verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 200 Volt und einer Pulsfrequenz von 60 Sekunden über 24 Stunden. Das Gel wurde am Ende mit 100 µl Ethidiumbromid in 500 ml TBS gefärbt. Anschließend wurde in TBS die überschüssige Farbe abgespült und das Gel mit einer UV-Kamera fotografiert.

3.1.11. Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Darstellung der Neurone wurden diese in 6-Well-Platten mit Pneumolysin (0,1 µg/ml für 4 Stunden) behandelt. Anschließend wurden sie mit 3% Glutaraldehyd und 3% Paraformaldehyd in PBS bei 4°C über Nacht fixiert. Im Anschluss wurden die Neurone mit 0,1 M Phosphatpuffer gespült. Mit Osmiumtetroxid (1%ig in Phosphatpuffer, 6% Saccharose) wurden die Neurone für eine Stunde postfixiert. Danach wurde mit Phosphatpuffer gespült. Die Entwässerung wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe durchgeführt (beginnend bei 50% bis 100% Ethanol). Die Neurone wurden in Hydroxypropylmetacrylat (HPMA) inkubiert. Im Anschluss wurde HPMA und Epon im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Zellen pipettiert. Nach 60 Minuten wurde diese Lösung verworfen und erneuert. Über Nacht wurden die Neurone in der Lösung belassen. Am nächsten Tag war das HPMA verdampft. Das verbliebene Epon wurde verworfen. Als nächstes wurde Epon 812 zusammen mit Aktivatorzusätzen auf die Neurone pipettiert. Zweimal wurde dieser Schritt wiederholt, bevor am Schluss Epon als dünne Schicht auf die Neurone aufgebracht wurde. Die Polymerisation fand bei 60°C für 24 bis 48 Stunden statt. Aus den so fixierten Neuronen-Blöcken wurden ultradünne Schnitte hergestellt. Diese Schnitte wurden auf im Durchmesser 1 mm große Kupferplättchen (Grid) mit Hilfe eines Formva-Filmes aufgebracht. Die Präparate wurden zur Erhöhung des Kontrasts nach einem festgelegten Programm im Kontrastierungsautomaten (Leica) mit Schwermetallionen behandelt [Uranylazetat (Serva), Bleizitrat (Leica)]. Nach dem Trocknen der Kupferplättchen konnten sie im Elektronenmikroskop (EM 900 von Zeiss) bei 80 kV und bis zu einer 50.000-fachen Vergrößerung betrachtet werden.

3.1.12. Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Der Bicinchoninsäure-Assay ist ein kolorimetrisches und quantitatives Verfahren zur Proteinbestimmung im Bereich 20 bis 2000 µg Protein/ml (Smith *et al.*, 1985).

Während der Reaktion wird in einem alkalischen Milieu Kupfer durch Protein reduziert (siehe **Abbildung 5**). Bicinchoninsäure (BCA) nimmt die Kupferkationen auf. Die optische Dichte wird anschließend bei 560 nm gemessen. Die Messergebnisse liegen linear auf einer erstellten Standardkurve des bovinen Serumalbumins (BSA). Als Kontrolle wurde Wasser und BSA-Standard verwendet. Es wurden jeweils 150 µl der Proben und der Kontrollen bei 560 nm gemessen. Die Extinktionen wurden in µg Protein/ml umgerechnet.

Protein + Cu^{++} + Bicinchoninsäure ⇨ Cu^{+}-Bicinchoninsäure-Komplex

Abbildung 5: Reduktionsreaktion des BCA-Protein-Nachweises zur photometrischen Protein-Quantifizierung.

3.1.13. Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Assay dient ebenfalls zur Bestimmung der Proteinmenge einer Probe (Bradford, 1976).

200 µl Bradford-Reagenz (Coomassie-Brilliant Blau G250 und Phosphorsäure, gelöst in Ethanol und destilliertem Wasser) wurden mit 1 µl Probe in einem Well einer 96-Well-Platte vermischt. Als Standard wurde bovines Serumalbumin in aufsteigenden Konzentrationen - beginnend mit 1 µg/ml - dazu pipettiert. Als Leerwert wurde die Absorption von 200 µl Bradford-Reagenz von allen gemessenen Werten abgezogen. Nach Bindung des Proteins an das Coomassie-Brilliant Blau kommt es zu einer Blaufärbung und Zunahme der Absorption, welche im Spektrophotometer bei 590 nm gemessen wurde. Diese Extinktionen wurden anhand der Standardkurve in µg Protein/µl umgerechnet.

3.1.14. Fraktionierte Zentrifugation

Isolierung von verschiedenen Zellfaktionen dient dem Informationsgewinn über die Lokalisation von proapoptotischen Proteinen während des Apoptosevorgangs. Daher isolierten wir die Mitochondrien- und die Zytosolfraktion, um den Apoptose induzierenden Faktor als eines der wesentlichen proapoptotischen Proteine in der jeweiligen Fraktion zu detektieren. Kortikale Neurone wurden 6, 9 und 12 Stunden lang mit 0,5 µg/ml Pneumolysin inkubiert.

Zur Gewinnung einer Probe wurden Zellen von 2 x 10 cm^2 (2 Wells einer 6-Well-Platte) verwendet. Die Zellen wurden nach Entfernung des Mediums mit 400 µl PBS / Well gewaschen. In 400 µl PBS wurden die Zellen suspendiert und anschließend in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Mit 2500 Umdrehungen pro Minute bei 4°C wurde für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die gewonnenen Pellets wurden gewogen. Nun wurden 400 µl Sucrose Puffer (Sucrose 250 nM; Imidazol 3 mM; 1 Roche's Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette) zusammen mit der Pellet-Probe bei 13.200 Umdrehungen pro Minute für 20 Sekunden in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 10 µg Pellet wurden in 100 µl Sucrose Puffer zusammen mit Digitonin (1 µg/ml) vermischt und sofort bei 13.200 Umdrehungen pro Minute für 20 Sekunden zentrifugiert.

Der Überstand entsprach der zytosolischen Fraktion. Das Pellet wurde in 350 µl Sucrose Puffer suspendiert und homogenisiert. Im Anschluss wurde mit 200 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 800 g für weitere 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in RIPA (75 µl) aufgenommen. Dies entsprach einer groben Kernfraktion, jedoch noch mit unaufgeschlossenen Zellen. Der Überstand wurde bei 12000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml RIPA suspendiert und entsprach der Mitochondrienfraktion.

3.2. Material

Acridinorange (AO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Anti-Digoxiginin-Peroxidase	Intergen/Chemicon, Temecula, CA, USA
Antikörper gegen Apoptose-induzierenden Faktor (AIF)	Invitrogen – Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
Antikörper IgG gegen Kaninchen (Biotin markiert)	Invitrogen – Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
Antikörper gegen Caspase 3	Invitrogen – Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
Antikörper Cy 3 (Ziege gegen Kaninchen)	Invitrogen – Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
Antikörper mitMeerettichperoxidase (Ziege gegen Kaninchen)	Invitrogen – Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
ApopTag® Apoptose Nachweis	Intergen/Chemicon, Temecula, CA, USA
B27 Supplement	Invitrogen - Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Bicinchoninsäure (BCA)-Reagenz	Pierce, Rockford, Il, USA
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Beta-Nicotinamidadenindinucleotid-hydrogen (NADH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bleizitrat	Leica Camera AG, Solms, Deutschland
Bradford Reagenz	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Caspasensubstrate	Calbiochem – Merck Biosciences GmbH, Bad Soden, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Collagen-G-Lösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dihydrorhodamin 123 (DHR 123)	Invitrogen – Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
Desoxyribonukleinsäure (DNS) Nachweis	Invitrogen – Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
Digitalkamera	Leica Camera AG, Solms, Deutschland

Digitonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Elektronenmikroskop	EM 900, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Epon	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraazetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ethidiumbromid (EB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Fötales Kälber Serum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Fluo-4	Invitrogen – Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
Fluoreszenz-Lesegerät Cytofluor 4000	PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Gelelektrophoresekammer (Ready Gel System)	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Glutamat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Grid für Elektronenmikrospie	Plano GmbH, Wetzlar
4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Calbiochem – Merck Biosciences GmbH, Bad Soden, Deutschland
Hoechst 33258 Zellkern-Färbung	Hoechst AG, Frankfurt a. M., Deutschland
Hydroxypropylmetacrylat (HPMA)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Lämmli- Puffer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Lysepuffer	BD Biosciences –Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Milchpulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromid (MTT)-Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Neurales basales Medium	Invitrogen - Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Osmiumtetroxid	Leica Camera AG, Solms, Deutschland

Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	Roche-Applied-Science, Mannheim, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS)	BD Biosciences – Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Photometer	PCP 6121, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pneumolysin	Mitchell (Abteilung für Infektiologie und Immunologie) Universität Glasgow, Schottland
Pneumolysin Antikörper Kaninchen gegen Ratte	Novocastra, Newcastle upon Tyne, England
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Proteinase K	Intergen/Chemicon, Temecula, CA, USA
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette	Roche Applied Science, Indianapolis, USA
Rotihistol®	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Semidry-Transfer-Gerät (Trans-Blot SD cell)	Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Super Signal Ultra Chemilumineszenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan buffered sodium (TBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Uranylazetat	Serva, Heidelberg, Deutschland
Versuchstiere (Wistaratten)	Charité Tierlabor, Berlin, Deutschland
VitroClud®	R. Langenbrück, Emmendingen, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Whatman Papier	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Zellkulturplatten	BD Biosciences - Falcon, Heidelberg, Deutschland

4. Ergebnisse

Im Folgenden stelle ich die Ergebnisse dar, die sich bei der Untersuchung der Mechanismen des Pneumolysin-induzierten neuronalen Zelltodes ergaben. Zu Beginn wird belegt, dass Pneumolysin in Neuronen apoptotischen Zelltod auslöst. Im Anschluss werde ich die wichtigsten Mechanismen der Apoptose darlegen, wie zum Beispiel die Erhöhung der Sauerstoffradikale und des Kalziumeinstroms. Des Weiteren zeige ich, dass es sich um eine Caspasen-unabhängige Exekution der Apoptose handelt. Eine essentielle Rolle beim Pneumolysin-induziertem neuronalen Zelltod kommt der frühen Mitochondrienschädigung mit konsekutiver AIF-Freisetzung zu. Zudem wird die Regulation von XIAP, einem Caspasen-Inhibitor, im Rahmen der Pneumolysin-induzierten Apoptose beeinflusst.

Die für die Versuche verwendeten kortikalen Neurone wurden aus Rattenembryonen präpariert. Die Konzentration des verwendeten Pneumolysin, sowie dessen Toxin-Mutanten, von 0,5 µg/ml entspricht einer äquivalenten Dosis an Toxin, welches in Liquorproben bei Patienten mit der Diagnose Pneumokokkenmeningitis gefunden wurde (10^7 CFU/ml) (Spreer *et al.*, 2003). Alle Experimente wurden mindestens dreimal unter identischen Versuchsbedingungen wiederholt.

4.1. Pneumolysin induziert Apoptose von kortikalen Neuronen

Nach 8 Tagen wurden die kortikalen Neurone zunächst nach ihrer Morphologie beurteilt. Die gesunden Neurone zeichneten sich durch ein ausgeprägtes Dendriten- und Axonnetz aus. Das Zytoplasma war groß und deutlich zu erkennen. Beim Bewegen der Zellkulturplatte blieben die Neurone unverändert an der Stelle, an der sie sich am Boden der Zellkulturplatte angehaftet hatten. Um vergleichbare Neuronenpopulationen zu beurteilen, wurden die Neurone stets in der Mitte einer Zellkulturplatte betrachtet. Ein geringer Prozentsatz der Neurone war in den verwendeten Zellkulturplatten bereits abgestorben, was sich bei der Kultur primärer Neurone nicht vermeiden lässt. Auch hier wurde darauf geachtet, dass die lebenden Neurone stets zwischen 85 und 90% betrugen. Die Neurone vor der Inkubation sind in **Abbildung 6** dargestellt.

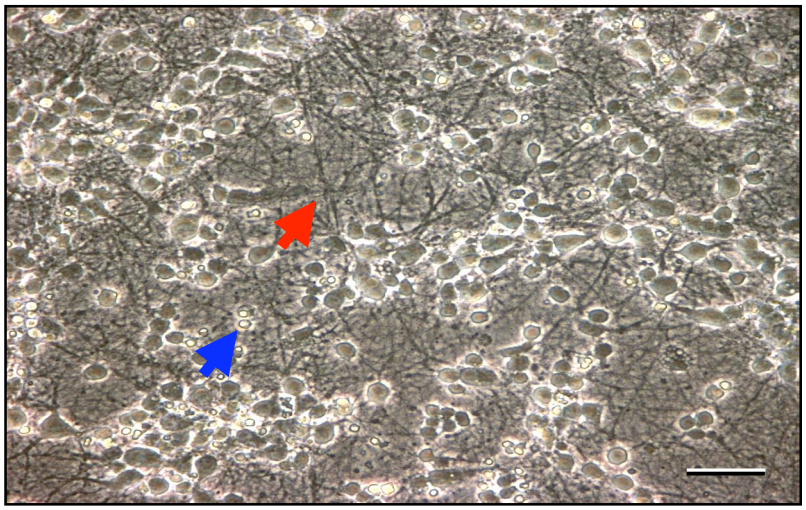


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Darstellung von gesunden kortikalen Neuronen in Zellkultur. Die Neurone zeichnen sich durch ein intaktes Dendriten- und Axongeflecht aus. Der rote Pfeil deutet auf ein ausgeprägtes Axon- und Dendritengeflecht. Der blaue Pfeil zeigt ein bereits apoptotisches Neuron. Es erscheint klein und kondensiert. Bei Bewegung der Zellkulturplatte schwimmt das Neuron (meist) im Medium, es hat alle Kontakte zu anderen Neuronen und zu seiner Umgebung abgebrochen, während die lebenden Neurone fest an ihrer Unterlage anhaften. Die gezeigten Neurone sind 8 Tage nach ihrer Präparation aus 18 Tage alten Rattenembryonen unter dem Lichtmikroskop auf ihre Vitalität untersucht worden. Die Zellen befinden sich in neuronalem Nährmedium, welches serumfrei ist, damit ein Wachstum von Gliazellen unterdrückt wird. Balken = 50 µm.

Zum Nachweis von Zelltod wurden die Lichtmikroskopie, die Acridinorange-Ethidiumbromid-Färbung (AO/EB) und die Transferase-mediated dUTP nick-end labeling-Färbung (TUNEL) verwendet. Als Positivkontrolle für den Zelltod wurde Staurosporin verwendet, welches den intrinsischen Weg des programmierten Zelltodes verursacht (Leist und Jäättelä, 2001).

Die Neurone wurden zunächst nach Inkubation mit Pneumolysin lichtmikroskopisch beurteilt. Es konnte gezeigt werden, dass die Neurone eine typische Morphologie der Apoptose aufwiesen. Die Verbindungen zu anderen Neuronen waren abgebrochen, die Neurone wiesen jetzt eine runde und kondensierte Form auf. Wurde die Zellkulturplatte bewegt, so zeigte sich, dass die kondensierten Neurone zum Teil auch den Kontakt zum Boden verloren hatten. Neurone nach einer Inkubation über 18 Stunden mit Pneumolysin (0,5 µg/ml) werden in **Abbildung 7** dargestellt.

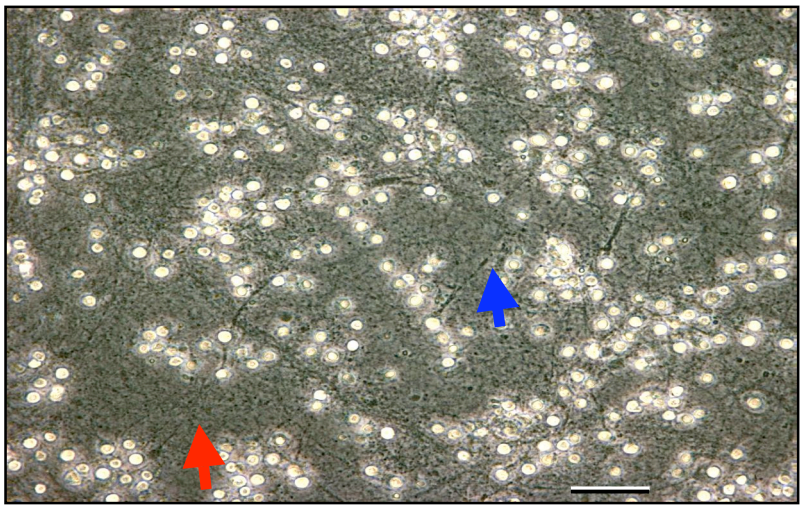
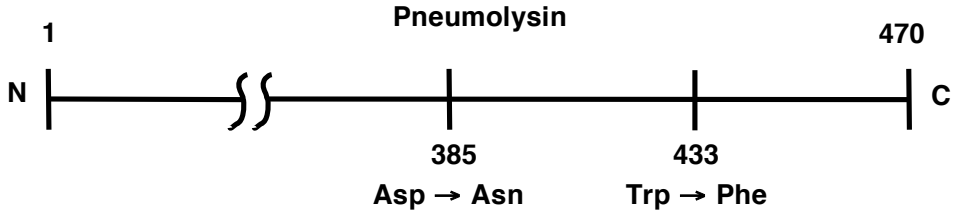


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Darstellung kortikaler Neurone in Zellkultur nach Inkubation über 18 Stunden mit 0,5 µg/ml Pneumolysin. Die kortikalen Neurone wurden in ihrem neuronalen Nährmedium belassen und es wurde Pneumolysin in einer Konzentration von 0,5 µg/ml in die Wells zu den kortikalen Neuronen pipettiert. Im Verlauf wurden die behandelten Zellkulturplatten wieder im Inkubator bei 37°C aufbewahrt. Dort, wo sich vorher ein gut ausgebildetes Dendriten- und Axonnetz befand, ist jetzt kaum noch eine Zellverbindung zu erkennen (roter Pfeil). Der blaue Pfeil deutet auf eine sich in Auflösung befindende Zell-Zell-Verbindung. Die Neurone sind kondensiert und in ihrer Form abgerundet, sie erscheinen unter dem Lichtmikroskop als kleine kugelige Strukturen. Der Versuch wurde unter den gleichen Bedingungen drei Mal durchgeführt. Balken = 50 µm.

Im Verlauf der Arbeit (siehe Kapitel 4.3) wurde auch im Vergleich zum Wildtyp des Pneumolysins eine Mutante verwendet, die die wesentliche Eigenschaft, Poren in Membranen zu bilden durch eine Mutation verloren hat. Professor Mitchell und seine Mitarbeiter produzierten eine Pneumolysin-Mutante (W433F), welche durch eine Mutation in der Aminosäuresequenz an der Stelle 433 nahezu komplett die Fähigkeit zur Porenbildung verloren hatte (Mitchell *et al.*, 1997). Diese Arbeitsgruppe stellte außerdem die Pneumolysin-Mutante D385N her, die durch eine Mutation an Stelle 385 nicht mehr in der Lage war, das Komplementsystem zu aktivieren. In **Abbildung 8** werden die Aktivitäten der Mutanten in einer Übersicht dargestellt. Die Poren-bildende und Komplement-aktivierende Eigenschaften wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Mitchell untersucht. Wir wollten wissen, ob die proapoptotische Aktivität von Pneumolysin von seiner Poren-bildenden oder Komplement-aktivierenden Eigenschaft abhängt. Beim Vergleich des Wildtyp-Pneumolysins mit den Toxin-Mutanten zeigte sich, dass die Mutante mit defekter Poren-Bildung (W433F) nicht in der Lage war, Apoptose auszulösen. Im Gegensatz dazu war die Mutante mit einem Defekt in der Komplement-Aktivierung (D385N) genauso toxisch gegenüber Neuronen wie das Wildtyp-Pneumolysin.

In den weiteren Versuchen wurde W433F mit dem Wildtyp-Pneumolysin verglichen, da wir die insbesondere die Auswirkungen der Porenbildung auf die Apoptose kortikaler Neurone untersuchen wollten.



Aktivität	WT	W433F	D385N
Poren bildend	100%	0,1%	100%
Komplement aktivierend	100%	100%	0%
Pro-apoptotisch	100%	<5%	100%

Abbildung 8: Es werden die Haupteigenschaften der Pneumolysin Mutanten W433F und D385N im Vergleich zum Wildtyp-Pneumolysin (WT) dargestellt (Poren bildend, Komplement aktivierend). Wildtyp-Pneumolysin ist in der Lage, Poren in Membranen zu bilden und das Komplementsystem zu aktivieren. WT-Pneumolysin wirkt stark pro-apoptotisch. Bei der Pneumolysin-Mutante W433F wurde die Aminosäure Tryptophan durch Phenylalanin ersetzt. Sie hat dadurch die Eigenschaft der Porenbildung durch eine Mutation an der Stelle 433 in ihrer Proteinsequenz nahezu komplett verloren. Dieser Defekt in der Poren-induzierenden Aktivität geht einher mit einer massiven Reduktion seiner pro-apoptotischen Eigenschaften. Pneumolysin mit einer Punktmutation bei der Aminosäure 385 von Aspartat zu Asparagin bewirkt einen Verlust der Komplement-aktivierenden Eigenschaften des Pneumolysins, beeinflusst jedoch nicht seine pro-apoptotische Potenz.

Zunächst wurden die kortikalen Neurone aber noch weiter bezüglich des Zelltodes untersucht. Eine einfache Methode zur qualitativen und quantitativen Zelltodbestimmung ist die Acridinorange-Ethidiumbromid-Färbung (AO/EB). Mit der AO/EB Färbung lassen sich die Neurone fluoreszierend darstellen. Es kann farblich und morphologisch zwischen lebenden (groß, grün), frühapoptotischen (klein, grün), spätapoptotisch (klein, rot) und nekrotischen (groß, rot) Neuronen differenziert werden. Lebende Neurone zeigen große und grün-gefärbte Zellkerne, da von lebenden Zellen AO aktiv aufgenommen wird (und die Zellkerne grün färbt), jedoch EB durch die intakte Zellmembran ausgeschlossen bleibt. Früh-apoptotische Neurone zeigen kleine, kondensierte und zum Teil fragmentierte Zellkerne, die grün sind, da im Frühstadium der Apoptose die Zellmembran noch intakt ist. Im Spätstadium der Apoptose sind zwar die Zellkerne weiterhin klein, kondensiert und zum Teil fragmentiert, jedoch rot gefärbt, da die Zellmembran nicht mehr intakt ist und EB die Zellkerne rot färbt. Nekrotische Neurone zeigen große und rot gefärbte Zellkerne, da durch die geschädigte Zellmembran EB eindringt und die Zellkerne rot färbt. In **Abbildung 9** werden unbehandelte Kontroll-Neurone gezeigt, die mit AO/EB gefärbt wurden. Nur vereinzelt wurden kleinere rote und kleinere grüne Neurone gesehen. Dies ist das Bild einer unbehandelten neuronalen Zellkultur.

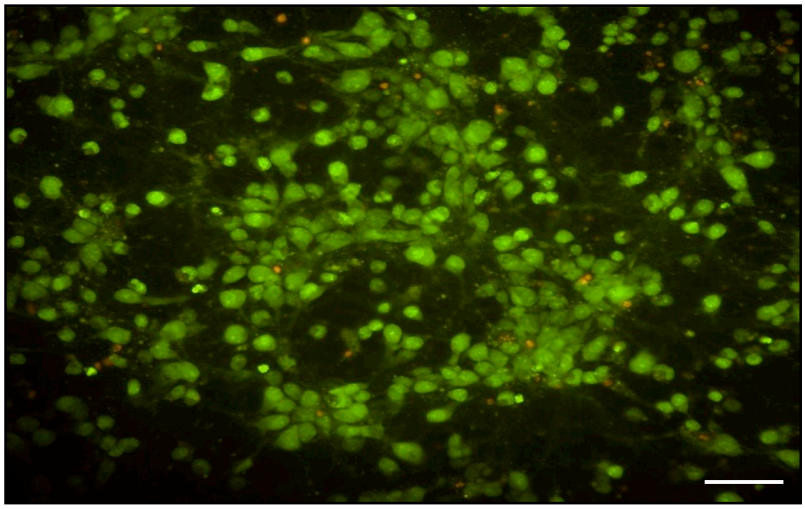


Abbildung 9: Mit Acridinorange und Ethidiumbromid gefärbte kortikale Neurone. Vitale Neurone erscheinen groß und grün gefärbt, spätapoptotische Neurone sind als kleine rote, frühapoptotische Neurone als kleine grüne Strukturen zu erkennen. Es handelt sich hier wiederum um 8 Tage alte kortikale Neurone. Die Farbstoffe wurden vorsichtig am Rand der Wells zum Neuronenmedium zugefügt und durch kurzes Bewegen der Zellkulturplatte gleichmäßig verteilt. Nach 5 Minuten wurde das Zentrum der Wells mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Balken = 50 µm.

Nach 18-stündiger Inkubation mit Pneumolysin in einer Konzentration von 0,5 µg/ml waren die Zellkerne der Neurone in ihrem Durchmesser deutlich reduziert und kondensiert wie in **Abbildung 10** zu erkennen ist. Die Anzahl der rot gefärbten hat zu diesem Zeitpunkt ebenfalls zugenommen.

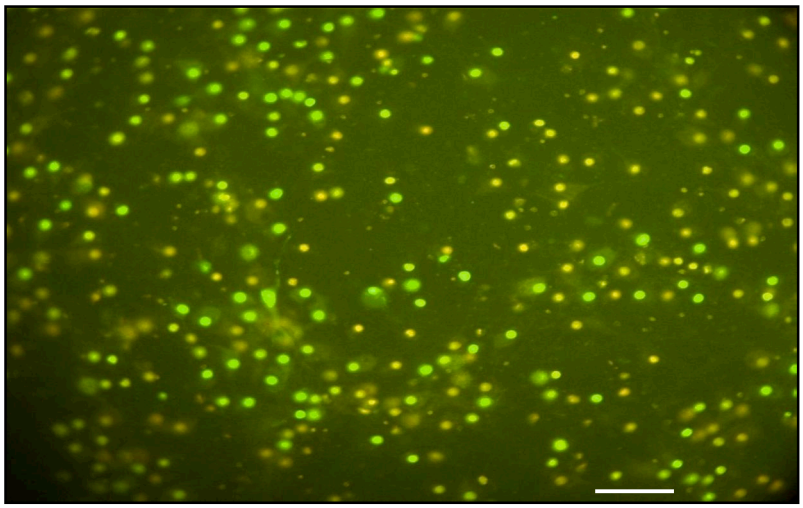


Abbildung 10: Nach Exposition kortikaler Neurone mit Pneumolysin (0,5 µg/ml, 18 Stunden) erfolgte die Färbung mit AO und EB (beides 2 µg/ml.). Die apoptotischen Neurone erschienen als kleine kondensierte Strukturen, früh-apoptotische Neurone grün, spätapoptotische Neurone rot. Der Versuch wurde drei Mal unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Balken = 50 µm.

Wurden die lebenden, apoptotischen und nekrotischen Neurone zu definierten Zeiten (3, 6, 9 und 12 Stunden) nach der Inkubation mit Pneumolysin (0,5 µg/ml) quantifiziert, ergab sich - wie in **Abbildung 11** dargestellt - ein fast lineares Ansteigen der apoptotischen Neurone. Bereits nach 3 Stunden Inkubationszeit mit Pneumolysin wiesen ca. 30% der Neurone Zeichen der Apoptose auf.

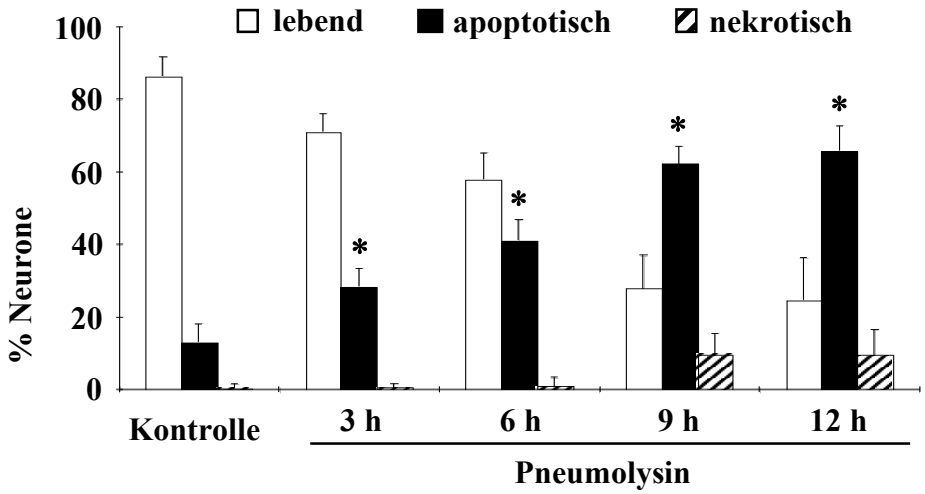


Abbildung 11: Quantifizierung und Differenzierung von lebenden, nekrotischen und apoptotischen Neuronen vor und nach Inkubation mit 0,5 µg/ml Pneumolysin. Abhängig von der Zeit der Inkubation mit Pneumolysin nahmen die apoptotischen Neurone immer weiter zu, während die lebenden Neurone im Verhältnis dazu an Anzahl abnahmen. Die Neurone wurden nach Acridinorange/Ethidiumbromid-Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt. Der Versuch wurde unter gleichen Bedingungen drei Mal durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardabweichung der Messung von jeweils drei Wells dargestellt. * = $p < 0,05$ im Vergleich mit der Kontrolle (Student's t test).

Die Anzahl der gesunden Neurone nahm parallel dazu ab. Im Gegensatz zur Apoptose traten Nekrosen nahezu kaum auf. Erst nach 8 Stunden Inkubation mit Pneumolysin waren einige nekrotische Neurone nachweisbar, welche auch nach 12 Stunden Inkubationszeit immer noch ca. 10% betrugen. Kontrollneurone zeigten zu 10% bis maximal 20% Zeichen der Apoptose, jedoch keine Nekrosen.

In der Transferase-mediated dUTP nick-end labeling-Färbung (TUNEL) hatten unbehandelte Kontrollneurone ein regelrecht großes Zytoplasma und ungefärbte Zellkerne. Ihr Axon- und Dendritenwerk war gut ausgeprägt. In **Abbildung 12** werden TUNEL-gefärbte Neurone dargestellt. Kontroll-Neurone grenzten sich gut gegeneinander ab. Nach der Inkubation mit Pneumolysin (0,5 µg/ml) über 18 Stunden stellten sich die Neurone in der TUNEL-Färbung dunkel (DAB-positiv) dar. Axone und Dendriten waren deutlich reduziert. Die Zellgröße hatte abgenommen, die Neurone waren noch als Zelle zu erkennen, wirkten aber deutlich kondensiert.

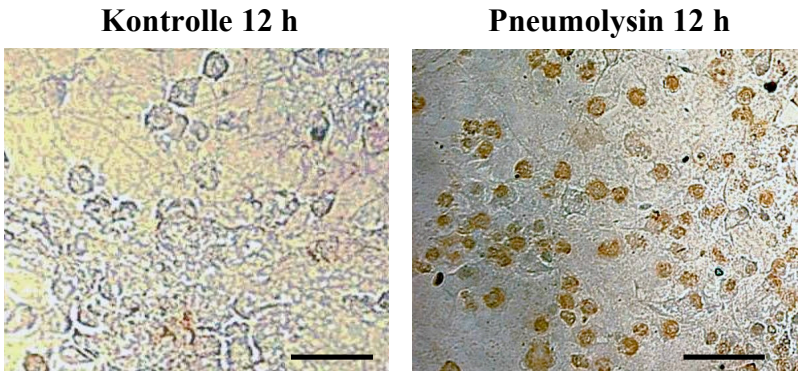


Abbildung 12: Kortikale Neurone nach TUNEL-Färbung. Das Axon- und Dendritennetz ist im Phasenkontrast erkennbar. Die kortikalen Neurone wurden auf Glasplättchen fixiert, mit der TUNEL-Methode gefärbt, wodurch apoptotische Neurone mit DNA-Strangbrüchen braun (DAB-positiv) erschienen. Die Neurone wurden in der Mitte des Glasplättchens beurteilt. Nach Inkubation mit Pneumolysin zeigten die kortikalen Neurone in der TUNEL-Färbung dunkel gefärbte und kondensierte Zellkerne. Die Axone und Dendriten waren deutlich reduziert. Die Versuche wurden unter den gleichen Bedingungen drei Mal wiederholt. Balken = 30 µm.

Die TUNEL-Färbung erlaubt, die morphologischen Kriterien der Apoptose (Zellschrumpfung) zusammen mit ihren biochemischen Charakteristika (DNA-Brüche) gemeinsam zu beurteilen.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass Pneumolysin neuronalen Zelltod, der die morphologischen und biochemischen Kriterien der Apoptose erfüllt, induziert.

Daraus ergab sich die Frage, ob Pneumolysin weitere Merkmale der Apoptose in Neuronen induziert und was die intraneuronale Signaltransduktion und Mechanismen der Pneumolysin-induzierten Neurotoxizität sind. Intrazelluläre Veränderungen wie Kalziumerhöhung und Anstieg der Sauerstoffradikale sind wichtige Zeichen in einigen Modellen der Apoptose. Im Folgenden untersuchten wir, ob es bei der Pneumolysin-induzierten Apoptose zu einer Veränderung in der Kalzium-Homöostase und Induktion von Sauerstoffradikalen kommt.

4.2. Intraneuronaler Anstieg des Kalziums und der Sauerstoffradikale durch Pneumolysin

Intrazellulärer Kalziumanstieg und intrazelluläre Erhöhung der Sauerstoffradikale gehört zum Pathomechanismus in mehreren Apoptosemodellen (Lipton und Nicotera, 1998). Im Folgenden sind wir der Frage nachgegangen, ob diese Mechanismen auch bei der Pneumolysin-induzierten neuronalen Apoptose eine Rolle spielen.

Um das intrazelluläre Kalzium nachzuweisen wurde Fluo-4, ein grün fluoreszierender Kalzium-spezifischer Farbstoff verwendet. Zunächst wurden Neurone bis auf die Kontrollneurone mit Pneumolysin inkubiert (0,5 µg/ml, unterschiedliche Zeitpunkte). Anschließend wurden die Neurone (Negativkontrolle, Positivkontrolle und Pneumolysin behandelte Neurone) mit Fluo-4 inkubiert. **Abbildung 13** zeigt die intrazellulär deutlich erhöhte Fluoreszenz. Als Positivkontrolle wurde Wasserstoffperoxid verwendet. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten kortikalen Neuronen.

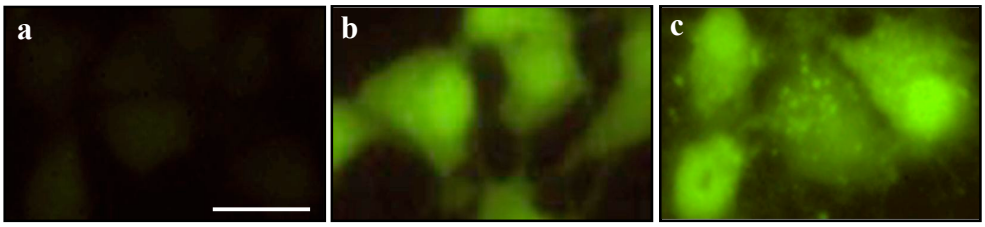


Abbildung 13: Kortikale Neurone nach Fluo-4 Färbung (10 µM für 45 Minuten). In Bild 14 a sind Kontrolleurone dargestellt. Abbildung b zeigt die Positivkontrolle, Neurone nach Wasserstoffperoxidbehandlung und in c erkennt man Neurone nach Inkubation mit Pneumolysin (0,5 µg/ml). Die Färbung lässt in den Positivkontrollen und den mit Pneumolysin behandelten Neuronen eine deutliche Grünfluoreszenz und somit eine erhöhte Kalziumkonzentration erkennen. Dieses Ergebnis war in drei unabhängig von einander durchgeführten Experimenten reproduzierbar. Balken = 10 µm (in a-c gleich).

Abbildung 14 verdeutlicht die Abhängigkeit der Kalziumerhöhung von der Konzentration des Pneumolysins. Eine geringe Dosis von 0,02 µg/ml Pneumolysin bewirkte eine kontinuierliche, aber langsame Erhöhung des intrazellulären Kalziums. Ein deutliches Maximum des Kalziums zeigte sich bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml Pneumolysin bereits nach 1 Stunde. Während bei einer um das fünffache reduzierten

Konzentration des Pneumolysins (0,1 µg/ml) der maximale relative Anstieg der Kalziumkonzentration nach 3 Stunden auftrat. Dies belegt, dass der durch Pneumolysin induzierte Anstieg des intrazellulären Kalziums konzentrations- und zeitabhängig ist.

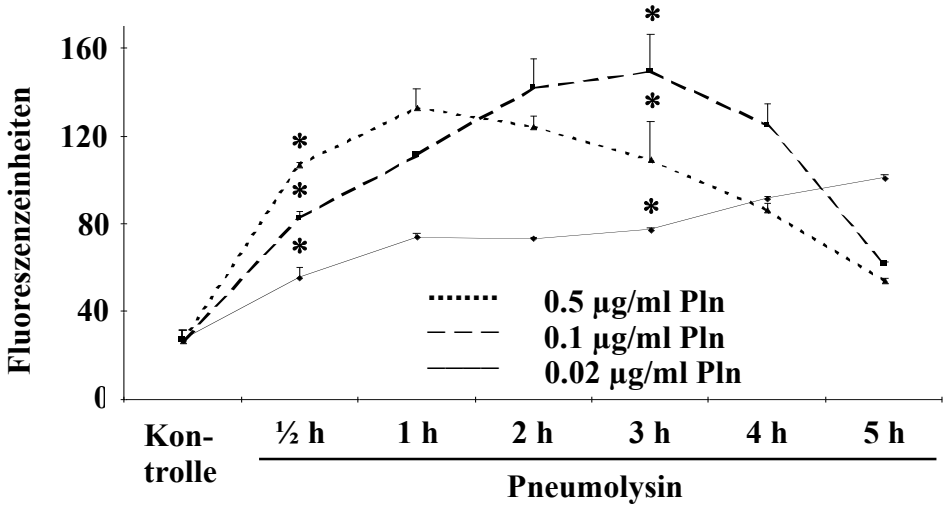


Abbildung 14: Intrazellulärer Anstieg von Kalzium ist abhängig von der Pneumolysin-Konzentration und der Zeit der Inkubation. Kortikale Neurone wurden mit unterschiedlichen Pneumolysin-Konzentrationen (0,5 µg/ml; 0,1 µg/ml und 0,02 µg/ml) fünf Stunden inkubiert. Danach wurde mit Fluo-4 (10 µg/ml) gefärbt, was den Anstieg des intraneuronalen Kalziums monitorte. Bereits nach 30 Minuten Inkubation mit 0.5 µg/ml Pneumolysin konnte ein Kalziumanstieg detektiert werden. Bei den niedrigeren Konzentrationen kam es langsamer zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Alle Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen. * = p < 0,05 im Vergleich mit der Kontrolle (Student's t test).

Um den Anstieg von intrazellulären Sauerstoffradikalen nachzuweisen, wurde der Dihydrorhodamin 123-Farbstoff verwendet (DHR 123). Kortikale Neurone wurden mit dem Farbstoff DHR 123 vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Pneumolysin. Als Positivkontrolle wurde (wie bei der Kalziumbestimmung) Wasserstoffperoxid verwendet. In **Abbildung 15** ist ein rascher Anstieg der Fluoreszenz bei den mit Pneumolysin behandelten Neuronen zu erkennen. Hier bildeten sich innerhalb von 15 Minuten intrazellulär Sauerstoffradikale. Während in der Positivkontrolle mit Wasserstoffperoxid ein langsamerer Anstieg zu sehen ist. Nach einer Stunde Inkubationszeit nähern sich die Werte einander an.

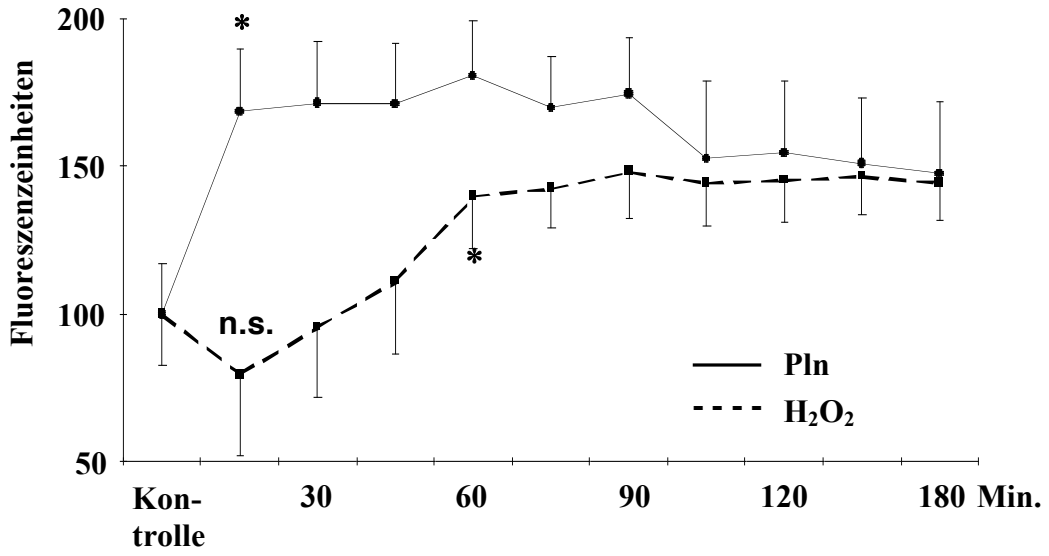


Abbildung 15: Darstellung intraneuronaler Sauerstoffradikale mit der DHR 123-Färbung nach Behandlung mit Pneumolysin (0.5 µg/ml) bzw. mit 0,3%igem Wasserstoffperoxid (Positivkontrolle). Bereits nach 15 Minuten steigt die Konzentration der intrazellulären Sauerstoffradikale in den mit Pneumolysin behandelten Neuronen an. Der Farbstoff DHR wurde in einer Konzentration von 1 µM auf die kortikalen Neurone pipettiert. Die Versuche wurden drei Mal unabhängig unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert und mit Standardabweichung graphisch wiedergegeben. * = p < 0,05 im Vergleich mit der Kontrolle (Student's t test); n.s. = nicht signifikant im Vergleich mit der Kontrolle.

Der Anstieg des intrazellulären Kalziums und der Sauerstoffradikale ist ein Teil des Pathomechanismus der Apoptose. Hier konnte gezeigt werden, dass Pneumolysin in der Lage ist, einen Anstieg von Kalzium und von Sauerstoffradikalen in Neuronen zu verursachen. Da wir nun wussten, dass Pneumolysin sowohl Apoptose verursacht, als auch Apoptose-typische intrazelluläre Veränderungen bewirkt, ergab sich für uns die Frage, ob Pneumolysin eine klassische Apoptose über die Aktivierung der Caspasen bewirkt oder ob andere Mechanismen den Zelltod hervorrufen. Da Kalzium und Sauerstoffradikale potentiell toxisch für Mitochondrien sind, untersuchten wir als nächstes die Rolle bzw. die Auswirkungen auf die Mitochondrien (Brustovetsky *et al.*, 2002).

4.3. Pneumolysin schädigt die neuronalen Mitochondrien

Mit Hilfe des 3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolbromid-Farbstoffes (MTT) konnte der Mitochondrien-Stoffwechsel beurteilt werden. Nach Inkubation mit Pneumolysin wurde die Aktivität des mitochondrialen Stoffwechsels der kortikalen Neurone quantifiziert. Das Tetrazoliumbromid (MTT) wurde von metabolisch aktiven Neuronen aufgenommen und intrazellulär zu unlöslich violetten Formazan-Kristallen reduziert. Durch ein Detergenz wurden die Kristalle löslich gemacht und konnten photometrisch gemessen werden. **Abbildung 16** zeigt die Ergebnisse. Die Inkubation mit MTT zeigte eine hohe Aktivität bei den Kontroll-Neuronen. Pneumolysin-behandelte Neurone zeigten nach 3 Stunden eine deutlich eingeschränkte Aktivität. Dieses Ergebnis verifiziert, dass Mitochondrien durch das Neurotoxin Pneumolysin geschädigt werden.

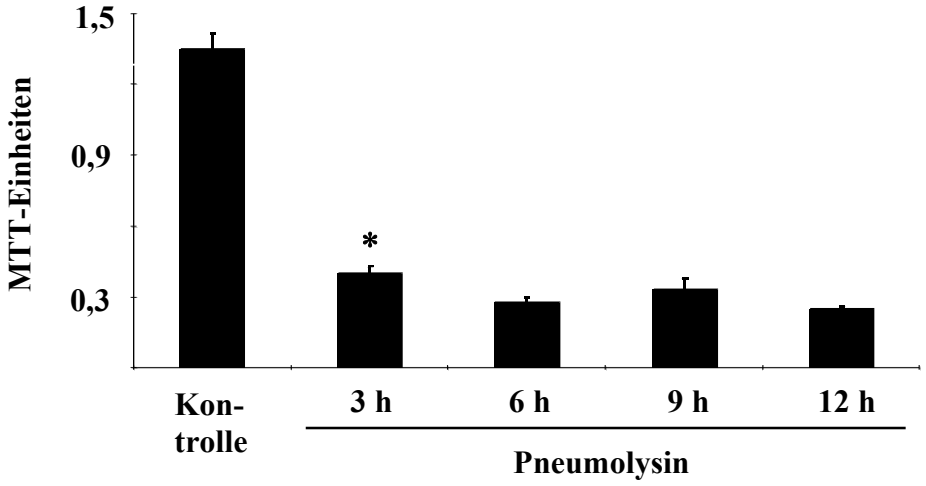


Abbildung 16: Darstellung der metabolischen Aktivität von neuronalen Mitochondrien zu unterschiedlichen Zeiten mit Hilfe des MTT-Assays nach Behandlung mit Pneumolysin (0,5 µg/ml). Die Lichtextinktion als Ausdruck der Aktivität wurde photometrisch bestimmt (mit einem ELISA-Plattenreader). Die Versuche sind unabhängig voneinander drei Mal bei gleichen Bedingungen durchgeführt worden. Die dargestellten Ergebnisse zeigen den Mittelwert mit den Standardabweichungen. Die Negativkontrolle weist eine hohe metabolische Aktivität auf, während die Pneumolysin behandelten Neurone bereits nach 3 Stunden deutlich an Aktivität eingebüßt haben. * = $p < 0,05$ im Vergleich mit der Kontrolle (Student's t test).

Um die Schädigung der Mitochondrien weiter zu untersuchen, verwendeten wir den Farbstoff Tetramethylrhodaminester (TMRE). Mitochondrien mit einem intakten

Mitochondrien-Membranpotential können den Farbstoff TMRE aufnehmen. Bei zerstörtem Mitochondrien-Membranpotential unterbleibt die Akkumulation von TMRE.

Hierzu wurden kortikale Neurone über unterschiedliche Dauer mit Pneumolysin inkubiert. Anschließend wurden die Neurone mit TMRE behandelt und dessen Aufnahme in die Mitochondrien mittels Fluoreszenz gemessen.

In **Abbildung 17** sind die Ergebnisse dargestellt. Die Kontroll-Neurone zeigten eine deutliche Fluoreszenz und damit eine ausgeprägte Aufnahme des TMRE-Farbstoffes in die Mitochondrien. Dies spricht für ein intaktes Mitochondrien-Membranpotential. Bereits nach drei Stunden Inkubation mit Pneumolysin kam es zu einem Abfall in der Fluoreszenzdetektion. Als Positivkontrolle dienten Neurone, die mit 0,3%igem Wasserstoffperoxid behandelt wurden.

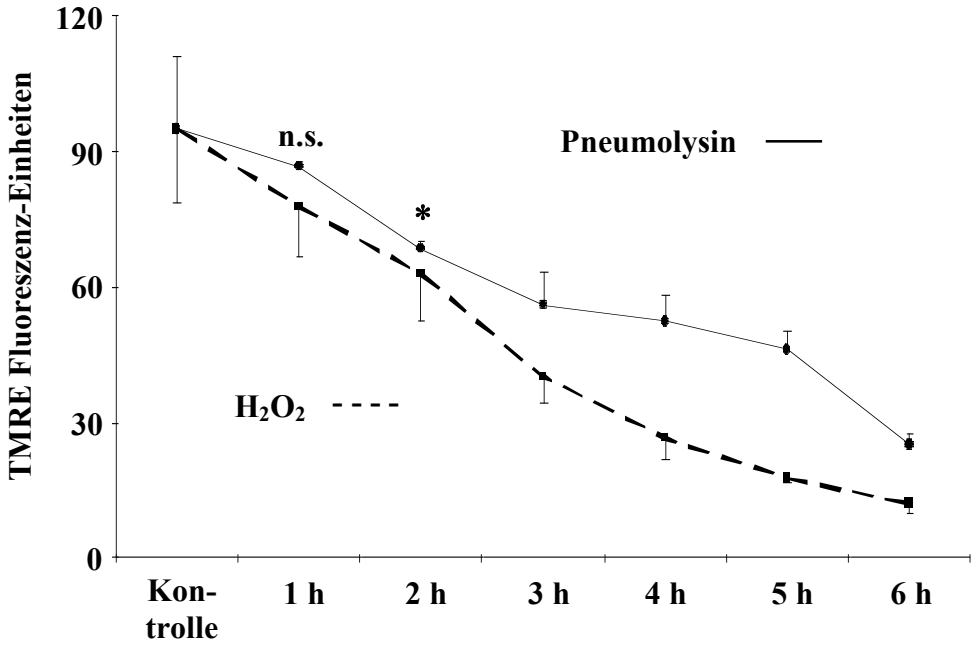


Abbildung 17: Darstellung von Fluoreszenzintensität zu unterschiedlichen Zeitpunkten als Ausdruck des intakten Mitochondrien-Membranpotentials bei kortikalen Neuronen, die mit Pneumolysin (0,5 µg/ml) oder Wasserstoffperoxid (0,3%) behandelt wurden. Die Abnahme der TMRE-Fluoreszenz korreliert mit dem Zerfall des Mitochondrien-Membranpotentials. Die Versuche wurden drei Mal unabhängig voneinander und unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte mit den Standardabweichungen. * = $p < 0,05$ im Vergleich mit der Kontrolle (Student's t test); n.s. = nicht signifikant im Vergleich mit der Kontrolle.

Abbildung 18 zeigt kortikale Neurone nach TMRE-Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Kontroll-Neurone wiesen eine intakte Zellstruktur und eine intrazelluläre Aufnahme des TMRE auf. Bereits nach einer zweistündigen Inkubationszeit mit Pneumolysin waren die Mitochondrien deutlich schwächer gefärbt und die Neurone in ihrer Struktur nur noch undeutlich zu identifizieren. Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass Pneumolysin die Mitochondrien schädigt und zum anderen, dass die Schädigung schon nach kurzer Zeit eintritt.

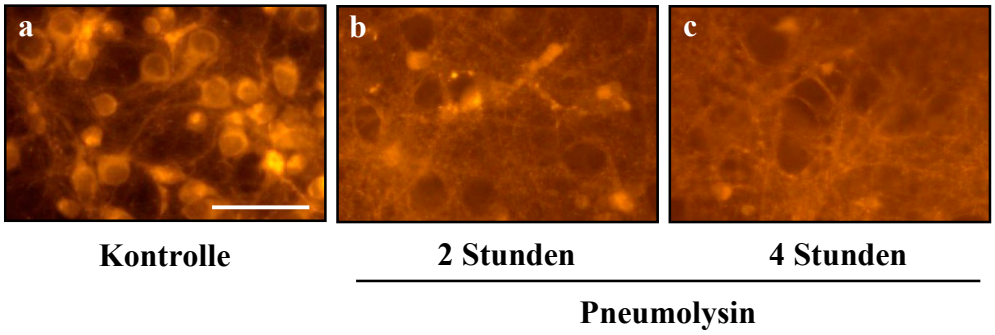


Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von kortikalen Neuronen nach TMRE-Färbung und Pneumolysin-Behandlung (0,5 µg/ml) zu unterschiedlichen Zeiten. Abbildung 18 a zeigt Neurone ohne Pneumolysin-Behandlung. Die Versuche wurden drei Mal unabhängig voneinander unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Balken = 30 µm.

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie habe ich untersucht, ob die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials mit Schädigungen der Ultrastruktur einhergeht. In **Abbildung 19** sind elektronenmikroskopische Bilder von kortikalen Neuronen dargestellt. Nach Pneumolysin-Behandlung waren die neuronalen Nuklei abgerundet, kondensiert und verkleinert. Die nuleäre Membran wies Ausstülpungen auf. Die Neurone hatten die Verbindungen zu anderen Neuronen verloren. Im Gesamtbild erschienen die Neurone kondensierter. Die Mitochondrien nahmen an Größe zu und ihre Struktur war zerstört. Die Neurone, die mit der Pneumolysin-Mutante (defizient in der Porenbildung) behandelt worden waren, wiesen diese Veränderungen nicht auf.

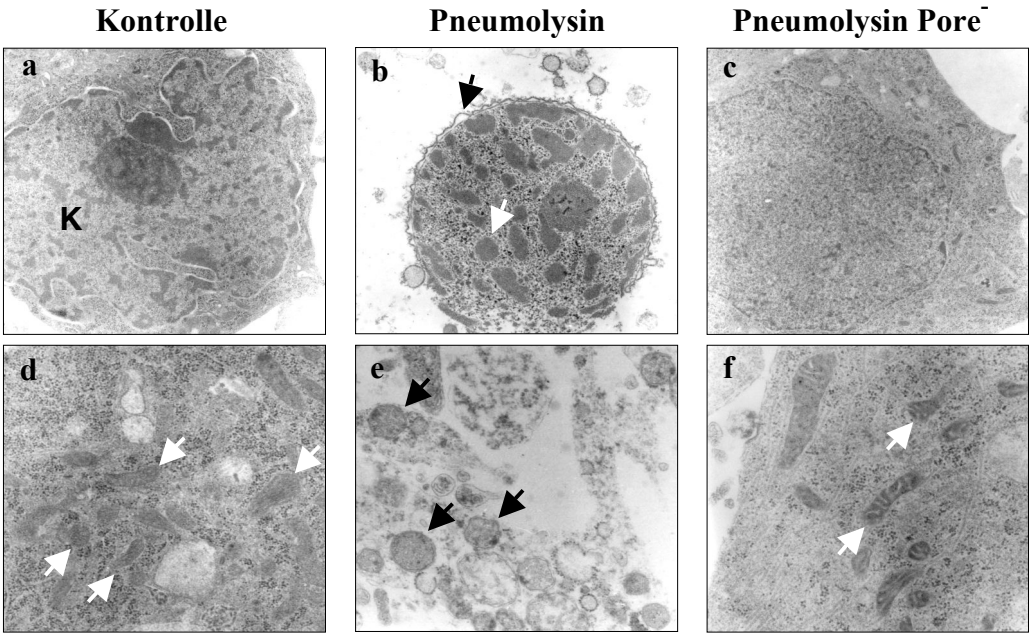


Abbildung 19: Elektronenmikroskopische Aufnahmen (a-f) von unbehandelten und mit Pneumolysin-WT sowie Pneumolysin-Mutante behandelten kortikalen Neuronen. In der oberen Reihe sind die Zellkerne dargestellt, in der unteren Mitochondrien. In Abbildung a erkennt man einen intakten Zellkern (K) eines unbehandelten Neurons. In Abbildung d sind intakte Mitochondrien (Pfeile) dargestellt. Bild b zeigt einen geschrumpften Zellkern mit Chromatin-Kondensation (weiβer Pfeil). Der schwarze Pfeil zeigt auf das so genannte Membranblebbing, welches mit der Porenbildung assoziiert wird. In Abbildung e sind die Mitochondrien (Pfeile) stark angeschwollen. Im Gegensatz dazu stellt Abbildung c einen Zellkern eines Neurons dar, der mit einer Pneumolysinmutante, die keine Poren bilden kann, behandelt wurde (0,5 µg/ml). Der Kern ist nicht geschrumpft, das Chromatin ist nicht kondensiert. Im Bild f erscheinen die Mitochondrien (Pfeile) nicht geschwollen. Der Vergrößerungsfaktor ist in a-c 4.000 und in d-f 12.000.

Zusammenfassend dargestellt schädigt Pneumolysin die mitochondriale Ultrastruktur und das mitochondriale Membranpotential der Neurone. Dies wird potentiell durch den intraneuronalen Anstieg von Kalzium und Sauerstoffradikalen vermittelt. Um der Hypothese einer direkten Pneumolysin induzierten Mitochondrienschädigung nachzugehen, untersuchten wir, ob Pneumolysin an die Mitochondrienmembran bindet. Dafür wurde die Immunelektronenmikroskopie benutzt. In **Abbildung 20** werden kortikale Neurone gezeigt, die mit Pneumolysin behandelt wurden. Anschließend wurden die Neurone mit einem Antikörper gegen Pneumolysin inkubiert. Die Bindungsstellen des Pneumolysinantikörpers wurden mit Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) sichtbar gemacht. Die Abbildung zeigt, dass Pneumolysin an den Mitochondrienmembranen bindet.

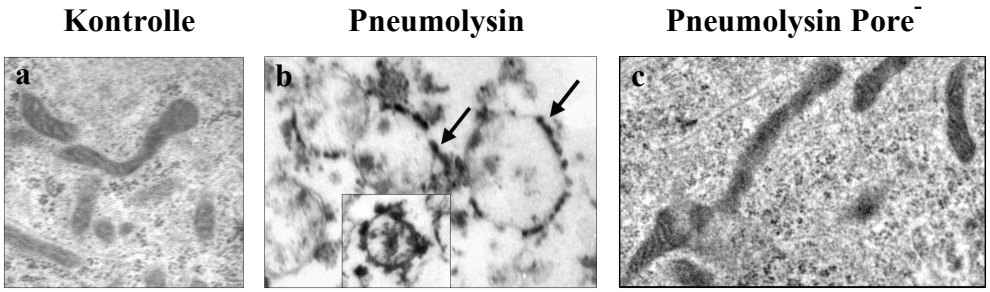


Abbildung 20: Nach Inkubation mit Pneumolysin (0,2 µg/ml) wurden kortikale Neurone mit einem Antikörper gegen Pneumolysin behandelt. Die Bindungsstellen von Pneumolysin wurden mit Diaminobenzidine visualisiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Abbildung a zeigt Mitochondrien eines unbehandelten kortikalen Neurons. In Abbildung b erkennt man die Bindungsstellen von Pneumolysin an die Membran von Mitochondrien mit zerstörter Ultrastruktur nach 5-stündiger (im Inset 10-stündiger) Inkubation mit Pneumolysin. Die Pneumolysinmutante mit defekter Porenbildung band nicht and die Mitochondrienmembran (Abbildung c). Die Aufnahmen sind mit einer Vergrößerung von 1:24.000 aufgenommen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass Pneumolysin Mitochondrien schädigt, ihr Membranpotential zerstört und direkt an die Mitochondrienmembranen bindet. Eine Bindung des Pneumolysins an die Mitochondrienmembran ist assoziiert mit der Schädigung der Organellen. Wenn Mitochondrien Defekte in der Membran aufweisen, kommt es zur Freisetzung von innermitochondrialen Proteinen. Ein wichtiges proapoptotisches Protein ist der Apoptose-induzierende Faktor (AIF). Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob Pneumolysin zu einer AIF-Freisetzung aus den Mitochondrien führt.

4.4. Pneumolysin bewirkt die Freisetzung von AIF aus Mitochondrien

Eine Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) aus den Mitochondrien ist ein Merkmal des programmierten Zelltodes und des Verlustes der Funktionalität der Mitochondrien (Susin *et al.*, 1999/a).

Es wurden kortikale Neurone nach Inkubation mit Pneumolysin (0,5 µg/ml) mit einem Antikörper gegen AIF behandelt. Kortikale Neurone wurden mit Pneumolysin Wildtyp (WT) (0,5 µg/ml) und einer Pneumolysin Mutante (0,5 µg/ml) mit defekter Poren-bildenden Aktivität behandelt (Pore$^-$). **Abbildung 21** zeigt Kontrollneurone sowie Neurone

nach Behandlung mit Pneumolysin-WT und Pneumolysin-Mutante. Die Ergebnisse stellen dar, dass Pneumolysin eine AIF-Freisetzung aus den Mitochondrien verursacht.

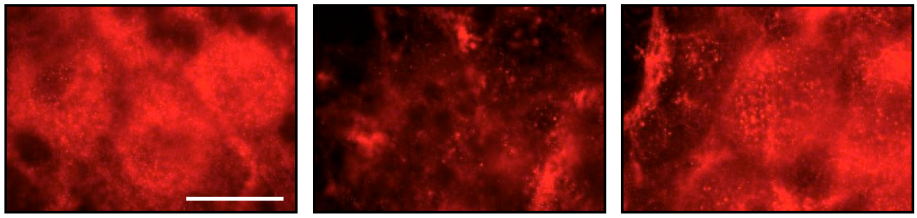


Abbildung 21: Dargestellt ist die Freisetzung von AIF aus den neuronalen Mitochondrien nach Inkubation mit Pneumolysin (Wildtyp und Mutante mit defekter Porenbildung). In den Kontroll-Neuronen findet keine AIF-Freisetzung statt. Wildtyp Pneumolysin setzt AIF in das Zytosol frei, während die Pneumolysin Mutante dazu nicht in der Lage ist. Die Neurone wurden mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml Pneumolysin Wildtyp und Pneumolysin Mutante über 12 Stunden behandelt. Die Versuche wurden drei Mal unter gleichen Bedingungen unabhängig voneinander wiederholt. Balken = 10 µm.

Freigesetztes mitochondriales AIF wird vom Zytosol zum Zellkern transloziert, wo es aufgrund seiner Endonuklease-Aktivität die apoptotische Zerstörung der DNS bewirkt. Um dies zu überprüfen, verwendeten wir eine Doppelfärbung von AIF mit dem Zellkernmarker Hoechst. **Abbildung 22** zeigt in einer Doppelfärbung die AIF-Freisetzung aus den Mitochondrien und die Translokation an den Zellkern.

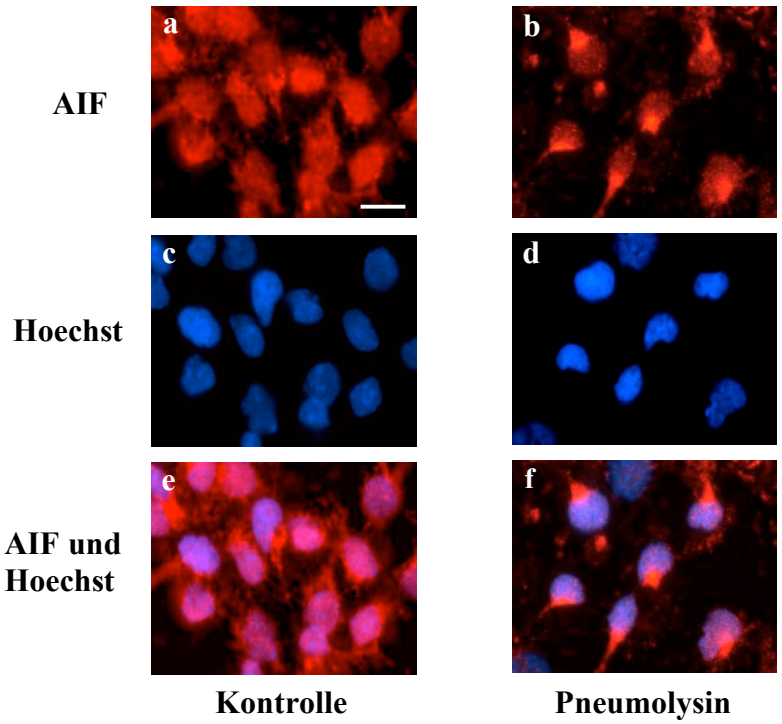


Abbildung 22: Abbildung a zeigt unbehandelte und Abbildung b zeigt mit Pneumolysin behandelte Neurone (0,5 µg/ml). Die Bindungsstellen des primaren Antikörper gegen AIF (1:500) wurden mit einem sekundären fluoreszierenden Antikörper Cy3 visualisiert. In den Abbildungen c und d wurde der Hoechst Farbstoff zur Anfärbung der Zellkerne verwendet. In der untersten Reihe e und f ist die Doppelfärbung (AIF und Hoechst) dargestellt. AIF kolokalisiert bei den mit Pneumolysin behandelten Neuronen mit den Randbereichen der Zellkerne. Die Experimente wurden drei Mal unter den gleichen Bedingungen wiederholt. Balken = 10 µm.

Um die mitochondrial-nukleäre Translokation des AIF zu verifizieren, wurde AIF in der zytosolischen und mitochondrialen Fraktion mit Hilfe des Western Blot und der Inkubation mit einem AIF-Antikörper untersucht. Diese Ergebnisse werden in **Abbildung 23** dargestellt. In unbehandelten Kontrollneuronen verbleibt AIF in der mitochondrialen Fraktion und lässt sich nicht in der zytosolischen Fraktion detektieren. Bei den mit Pneumolysin behandelten Neuronen nimmt AIF in der mitochondrialen Fraktion ab und in der zytosolischen Fraktion zu.

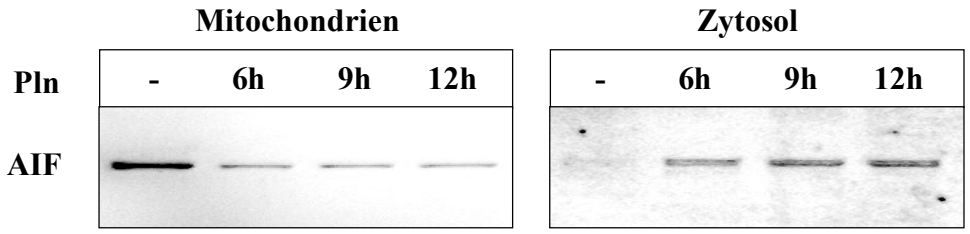


Abbildung 23: Nachweis von AIF in der Mitochondrien- und Zytosol-Fraktion von Neuronen mit Western Blot und AIF-Antikörper nach Pneumolysin-Inkubation (0,5 µg/ml). Es wurde durch graduierte Zentrifugation eine mitochondriale und zytosolische Fraktion der Neuronen hergestellt und mittels Western Blot auf ihren AIF Gehalt untersucht. Bei Kontrollneuronen blieb AIF in den Mitochondrien. Bei Pneumolysin-behandelten Neuronen nahm das mitochondriale AIF ab und erschien in der zytosolischen Fraktion.

Diese Daten zeigen, dass Pneumolysin zu einer Umverteilung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) führt. Zunächst nahm die Konzentration von AIF in den Mitochondrien ab, während sie im Zytosol anstieg. Anschließend kam es zu einer weiteren Translokation des AIF zu den Zellkernen.

4.5. Pneumolysin induziert DNS-Fragmentierung

Es wurde bereits gezeigt, dass AIF aus den Mitochondrien freigesetzt wird, zunächst in das Zytosol transloziert und dann zu den Zellkernen. AIF spaltet die DNS typischerweise in größere Fragmente. Während der klassischen Caspasen-abhängigen Apoptose werden typischerweise kleinere DNS-Fragmente gebildet. Es war zu erwarten, dass durch die mitochondrio-nuleäre Translokation des AIF, welches DNS degradierende Eigenschaften besitzt (Modjtahedi *et al.*, 2006), die DNS in größere Fragmente aufgetrennt wird. Um die DNS Degradierung zu untersuchen, wurde die reguläre Gelelektrophorese (zum Nachweis kleinerer DNS Fragmente) und die Pulsfeldgelelektrophorese (zum Nachweis größerer DNS Fragmente) verwendet. Hierzu wurden kortikale Neurone zum einen mit Pneumolysin und zum anderen mit Staurosporin (als Positiv-Kontrolle für Caspasen-abhängige Apoptose) inkubiert. Anschließend wurde die DNS isoliert und gelelektrophoretisch untersucht. **Abbildung 24** zeigt, dass Staurosporin, welches Apoptose durch Caspasen-Aktivierung induziert, die DNS in kleine typische Fragmente spaltete. Bei Pneumolysin-behandelten Neuronen konnte dies nicht beobachtet werden.

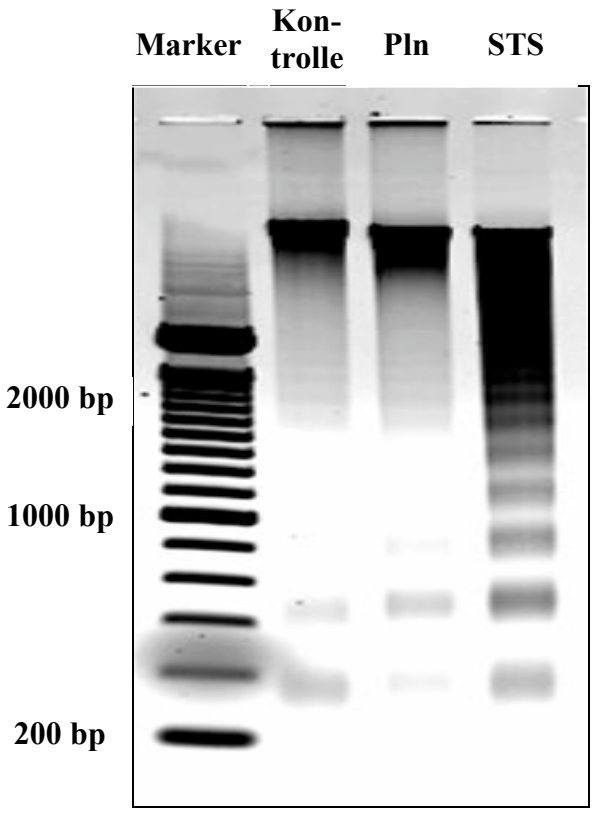


Abbildung 24: Darstellung typischer DNS-Fragmente (200-300 bp) während der klassischen Apoptose durch Staurosporin (STS). Kortikale Neurone wurden über 12 Stunden mit 0,5 µg/ml Pneumolysin (Pln) oder 0,1 µM Staurosporin behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Neurone. In den Pneumolysin-behandelten Neuronen konnten diese Fragmente nicht nachgewiesen werden. Der Marker links zeigt die Größe der Fragmente an.

Mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese konnte in **Abbildung 25** gezeigt werden, dass in Pneumolysin-behandelten Neuronen eine Degradierung der DNS in größere Fragmente (~50 kb) stattfindet. Während bei Staurosporin-behandelten Neuronen keine derartige Fragmentierung nachgewiesen werden konnte.

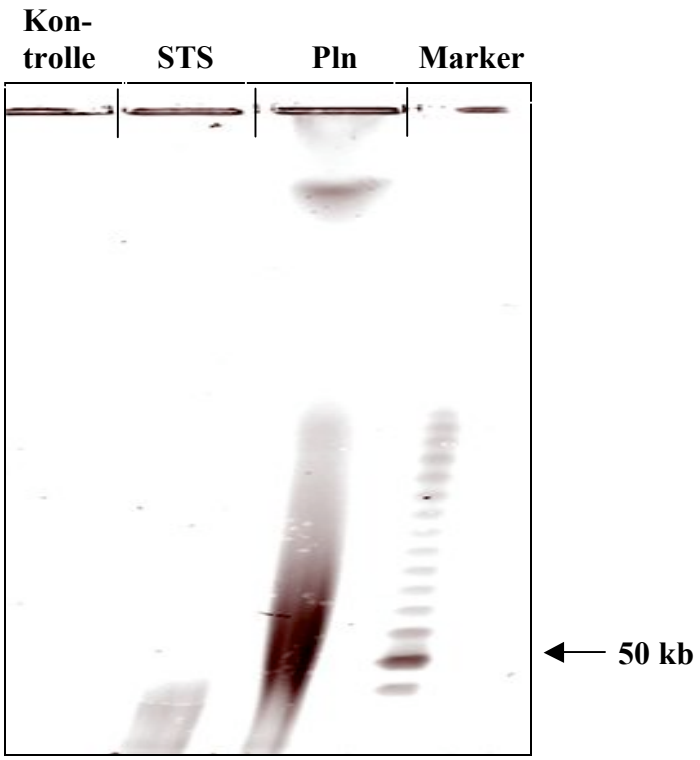


Abbildung 25: Pulsfeldgelelektrophoretische Auftrennung von größeren DNS-Fragmenten (~50 kb) in Pneumolysin-behandelten Neuronen. Die kortikalen Neurone wurden mit Pneumolysin (0,5 µg/ml) oder Staurosporin (0,1 µM) behandelt. Der Marker ist rechts abgebildet und zeigt die Größe der DNS-Fragmente an. Staurosporin (STS) gelingt die Aufspaltung in 50 kb-Fragmente der DNS nicht. Als Kontrolle wurden unbehandelte kortikale Neurone verwendet.

Resümierend bewirkt Pneumolysin durch die mitochondrio-nukleäre Umverteilung des Apoptose-induzierenden Faktors eine Fragmentierung der DNS in größere Fragmente, während die typische Fragmentierung der DNS in kleinere Bruchstücke, wie sie bei der klassischen Caspasen-abhängigen Apoptose gesehen werden kann, nicht stattfindet. Obwohl Staurosporin und Pneumolysin dasselbe Ausmaß von Apoptose in kortikalen Neuronen bewirken, unterscheidet sich somit der Mechanismus der Apoptose-Exekution. Es konnte gezeigt werden, dass Mitochondrien geschädigt werden und damit proapoptotische Proteine und Enzyme in das Zytosol freigesetzt werden können. Eine wichtige innermitochondrial gelegene Effektorcaspase ist unter anderem Caspase-9. Bei Freisetzung aktiviert sie Downstream-Caspasen und die nachfolgende Caspasen-Kaskade, die zur Exekution der Zelle führt. Ob eine Caspasenaktivierung in der Pneumolysin-induzierten Apoptose stattfindet, wollten wir als nächsten Schritt klären.

4.6. Pneumolysin induziert Caspasen-unabhängige Apoptose

Ein weiteres wichtiges Merkmal der klassischen Apoptose ist die Aktivierung der Caspasen. Caspasen sind Proteasen und tragen zu den typischen morphologischen Veränderungen bei, die eine apoptotische Zelle kennzeichnen (Nicholson und Thornberry, 1997).

Insofern war es naheliegend die Aktivität der Caspasen bei dem durch Pneumolysin induzierten Apoptoseweg zu überprüfen. Hierzu wurden kortikale Neurone mit Pneumolysin (0,5 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Substrate für die Caspasen 1, 3, 8 und 9 zu den Pneumolysin inkubierten Neuronen gegeben. Wurden die Substrate gespalten, fluroeszierten sie, was nur bei Anwesenheit der aktiven Caspasen geschehen konnte. Die Fluoreszenz wurde mit dem Cytofluor-4000 Messgerät nachgewiesen und quantifiziert. Als Positivkontrolle wurde Staurosporin verwendet, welches nahezu alle Caspasen aktivieren kann. In **Abbildung 26** werden die Aktivitäten der Caspasen bei Kontrollneuronen, die nicht mit Pneumolysin behandelt wurden, bei Staurosporin behandelten Neuronen und bei Pneumolysin behandelten Neuronen dargestellt. Bei den getesteten Caspasen erkennt man eine signifikante Erhöhung der neuronalen Caspasen-Aktivität durch Staurosporin, während Pneumolysin nicht in der Lage war, Caspasen zu aktivieren.

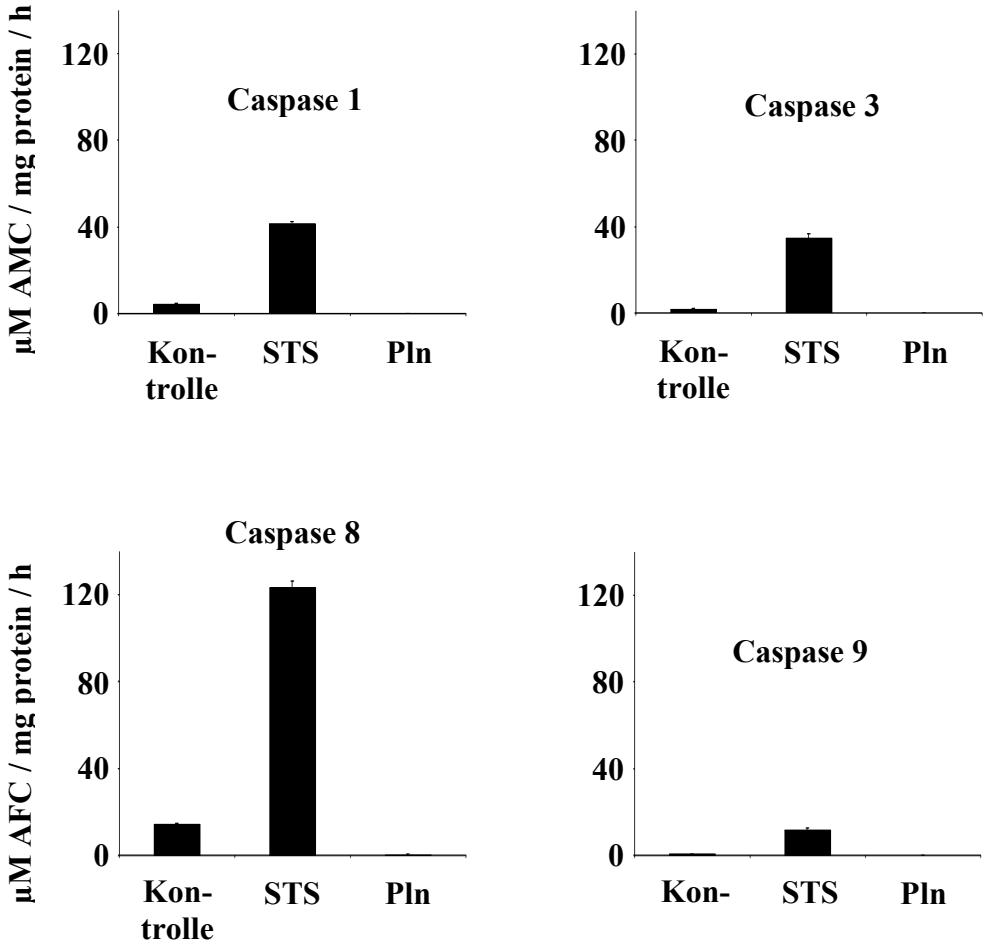


Abbildung 26: Darstellung der Caspasen-Aktivität in kortikalen Neuronen, die über 12 Stunden mit Pneumolysin (0,5 µg/ml) oder Staurosporin (0,1 µM) (Positivkontrolle) behandelt wurden. Staurosporin aktivierte Caspasen-1, -3, -8 und -9). Sobald die Caspasen die ihnen spezifischen Substrate (AMC und AFC) gespaltet hatten, konnte die abgetrennten fluoreszierenden Sequenzen photometrisch im Cytofluor-4000 Messgerät nachgewiesen werden. Die Experimente wurden drei Mal unabhängig voneinander zu den gleichen Bedingungen wiederholt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

Caspasen liegen als Pro-Caspasen in der Zelle und müssen aktiviert werden, bevor sie als Proteasen tätig werden können. In **Abbildung 27** wurde mit der Methode des Western Blot die Pro-Caspase-3 und Caspase-3 in Pneumolysin- beziehungsweise Staurosporin-behandelten Neuronen detektiert.

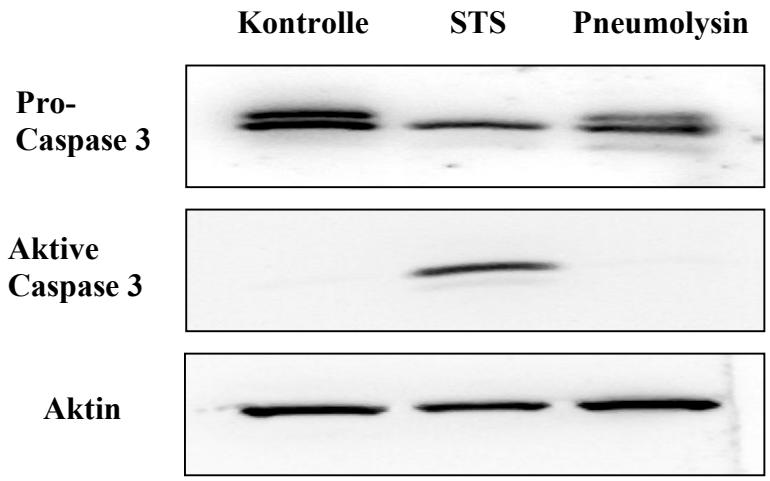


Abbildung 27: Darstellung von Pro-Caspase-3 und Caspase-3 in kortikalen Neuronen nach Pneumolysin- bzw. Staurosporin-Behandlung. Kortikale Neurone wurden 12 Stunden lang mit 0,5 µg/ml Pneumolysin und mit 0,1 µM Staurosporin (Positivkontrolle) behandelt. Unbehandelte Neurone dienten als Negativkontrolle. Die Neuronenlysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Antikörper gegen Pro-Caspase-3 und aktive Caspase-3 inkubiert. Aktin diente als Ladungskontrolle. Staurosporin aktivierte die Pro-Caspase zur aktiven Form. Aktive Caspase-3 konnte bei der Negativkontrolle und bei Pneumolysin-behandelten Neuronen nicht nachgewiesen werden.

Durch Pneumolysin wird demzufolge nicht der klassische Weg der Apoptose über Caspasenaktivierung induziert. Durch diese Ergebnisse stellten wir uns die Frage, ob es im Pneumolysin-induzierten Apoptoseweg zu einer Inhibierung der Caspasen kommt.

Dazu inkubierten wir Neurone in Zellkultur 4 Stunden lang mit Staurosporin allein, mit Pneumolysin allein oder gemeinsam mit Pneumolysin und Staurosporin. Anschließend wurde in den Zelllysaten die Caspase-3 mit dem Aktivitätsassay gemessen, was folgende Ergebnisse ergab: Staurosporin 22,0 ± 3,8 µM, Pneumolysin 7,5 ± 1,3 µM, Staurosporin und Pneumolysin Ko-Inkubation 12,5 ± 1,2 µM und Kontrolle (unbehandelte Neurone) 11 ± 1 µM. Diese Resultate deuteten darauf hin, dass Pneumolysin aktiv die durch Staurosporin aktivierten Caspasen inhibieren kann.

4.7. Pneumolysin induziert die Hochregulierung des Caspase Inhibitors XIAP

Da der Pneumolysin-induzierte neuronale Zelltod ohne Caspasenaktivierung exekutiert wird, wurde jetzt die Hypothese geprüft, ob eine Hochregulierung endogener Caspaseninhibitoren eine Rolle spielt. Um dieser Frage nachzugehen wurde der Caspasen-Inhibitor XIAP untersucht. XIAP ist ein Apoptose-inhibierendes Protein, welches Caspasenaktivierung inhibieren kann. In **Abbildung 28** wird gezeigt, dass in Kontrollneuronen kaum XIAP exprimiert wird, während in Pneumolysin behandelten Neuronen ein deutlicher Anstieg von XIAP mittels eines Antikörper gegen XIAP im Western Blot detektiert werden konnte.

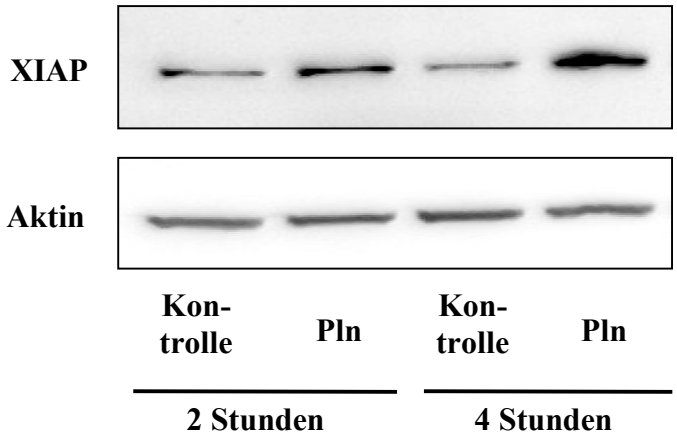


Abbildung 28: Darstellung der XIAP-Expression in Pneumolysin-behandelten kortikalen Neuronen mittels Western Blot und Antikörper-Inkubation. XIAP konnte in Pneumolysin behandelten (0,5 µg/ml) Neuronen detektiert werden. Nach 4 Stunden Inkubationszeit konnte in den Neuronenlysaten mit einem Antikörper gegen XIAP eine deutliche Zunahme des Caspaseninhibitors im Vergleich zu 2 Stunden Inkubation nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Neurone verwendet. Aktin diente als Ladungskontrolle.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Pneumolysin einen Caspasen-unabhängigen Apoptoseweg induziert, der sich vom klassischen Apoptoseweg unterscheidet. Es wird zudem ein Caspasen-Inhibitor, das XIAP, induziert, was eine mögliche Erklärung der fehlenden Caspasenaktivierung sein könnte.

5. Diskussion

Pneumolysin ist ein hochtoxisches und multifunktionales humanpathogenes bakterielles Protein. Es wurde bisher in allen isolierten Pneumokokkenstämmen gefunden. Pneumolysin ist nicht spezialisiert, es ist in der Lage toxisch auf alle eukaryoten Zellen zu wirken (Boulnois *et al.*, 1991; Rubins *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde mit kortikalen Neuronen in Zellkultur gearbeitet, um den Pathomechanismus der neuronalen Schädigung aufzuklären. Durch die Verwendung von Zellkulturen konnte der Frage nach dem Pathomechanismus, der durch Pneumolysin verursacht wird, am besten nachgegangen werden, da andere wirtseigene Faktoren der bei der Pneumokokkenmeningitis immer begleitenden massiven Entzündungsreaktion hierbei nicht vorhanden sind. Die Konzentration des verwendeten Pneumolysins von 0,5 µg/ml entsprach dabei einer üblichen Konzentration, die bei Patienten mit Pneumokokkenmeningitis im Liquor gefunden werden konnte (Spreer *et al.*, 2003). Bisher sind die genauen Mechanismen, die zum neuronalen Schaden in der Pneumokokkenmeningitis führen, noch nicht ausreichend aufgeklärt. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass Pneumolysin Zellschäden verursachen kann (Paton *et al.*, 1983; Lock *et al.*, 1992; Berry *et al.*, 1989). Im Folgenden werden die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit in den bereits vorhandenen Kenntnisstand eingeordnet und bezüglich der vorhandenen wissenschaftlichen Literatur diskutiert werden.

5.1. Apoptoseinduktion durch bakterielle Toxine

In der vorliegenden Arbeit wurde mit verschiedenen Assays und Färbungen anhand von Zellkulturen bestätigt, dass Pneumolysin zu einer deutlichen Apoptose in primären kortikalen Neuronen der Ratte führt. Die verwendeten Methoden zeigen ebenso wie die Durchführung der TUNEL-Färbung eine hohe Sensitivität beim Nachweis von apoptotischen Zellen. Die TUNEL-Färbung ist eine häufig verwendete Methode, um Apoptose nachzuweisen und kann bei den unterschiedlichsten Zellen angewendet werden. Da die Spezifität des Tests eingeschränkt ist, benutzten wir weitere Methoden zum Nachweis der Apoptose. Durch die kombinierte Anwendung von Acridinorange und Ethidiumbromid konnten einerseits das Ergebnis überprüft und andererseits verschiedene Stadien des Zelltodes bestimmt werden. Durch die Einfachheit der Methode und die

eindeutige Aussage, die sie liefert, konnte zwischen lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen differenziert werden (Braun *et al.*, 2001).

Des Weiteren wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von Neuronen angefertigt, um die Ultrastruktur bestimmen zu können. Hier zeigten sich die charakteristischen Merkmale des programmierten Zelltodes wie Veränderung der Zellmembran, der Mitochondrien und des Zellkerns. An der Zellmembran konnten Ausstülpungen beobachtet werden. Die Mitochondrien waren angeschwollen und der Zellkern zeigte eine kondensierte Form mit peripherer Auftrennung des Chromatins. Im Gesamtbild war die Zelle deutlich geschrumpft. Die Neurone durchliefen einen apoptotischen Prozess. Apoptose bedeutet im letzten Stadium, dass Zellen spezifische Marker auf ihrer Oberfläche exprimieren, welche zur Phagozytose durch die wirtseigenen Abwehrzellen führt. Ein Prozess, der am Ende verhindern soll, dass intrazellulär gelegene Bestandteile der Zelle sich unkontrolliert in den Extrazellulärraum gelangen und dort destruktiv wirksam werden (Müller *et al.*, 1999).

Diverse bakterielle Apoptose-induzierende Pathogene bei gram-positiven wie bei gram-negativen Bakterien wurden bisher entdeckt. Verschiedene biologische Strategien, die damit verbunden sind, konnten bislang analysiert werden. Zum einen dient die Aktivierung der Apoptose der Zerstörung der Zelle, zum anderen bewirkt sie die Induktion eines Entzündungsprozesses oder dient der immunologischen Abwehr (Liles, 1997; Zychlinsky und Sansonetti, 1997). *Shigella spp*. und *Salmonella spp.* nutzen ihre Pathogenität, um Apoptose in Makrophagen zu induzieren. Bei „professionellen“ Abwehrzellen Apoptose zu induzieren ist - vom Pathogen aus gesehen - eine effiziente Überlebensstrategie. Beide dieser Pathogene besitzen aber auch Mechanismen, um der Wirtsabwehr zu entgehen. *Shigella spp.* verhindert die Phagozytose beispielsweise, indem es in das Zytoplasma der Zelle transloziert und *Salmonella spp.* hat für sich einen speziellen intrazellulären endosomalen Schutzraum entwickelt (Siebers und Finlay, 1995). Auch über andere Pathogene wie Yersinien (Monack *et al.*, 1997) und Legionellen (Müller *et al.*, 1996) wurde berichtet, dass sie Apoptose induzieren können.

Durch viele Experimente konnte bisher gezeigt werden, dass Pneumolysin als Pneumokokkentoxin hinsichtlich des Zelltodes eine entscheidende Rolle spielt. So haben Untersuchungen belegt, dass die *S. pneumoniae* Mutante *plnA*$^-$, welche kein Pneumolysin exprimieren konnte, zu einer abgeschwächten Form der Meningitis führt (Wellmer *et al.*, 2002). Die *plnA*$^-$ Mutante verursacht nur eine abgeschwächte Sepsis (Wellmer *et al.*, 2000).

Es konnte auch belegt werden, dass eine Immunisierung mit Pneumolysin, Pneumokokken-infizierte Versuchstiere vor schwerwiegenden Infektionen und vor dem Tod schützt (Paton *et al.*, 1983, Lock *et al.*, 1992). Die *plnA*$^-$ Mutanten verursachen im Vergleich zu Wildtyp Pneumokokken reduzierte pathogene Effekte in den ersten Stunden der Pneumokokkenpneumonie, wie beispielsweise erniedrigte intraalveoläre bakterielle Replikation, weniger Translokation der Pneumokokken von den Alveolen in das Lungeninterstitium und weniger Invasion der Bakterien aus der Lunge in das Blutsystem (Rubins *et al.*, 1995).

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass *S. pneumoniae* (Wildtyp D39) dosisabhängig in vitro zu einer Migration von neutrophilen Granulozyten führt. Die *plnA*$^-$ Mutante war diesbezüglich deutlich weniger potent: 5 x 10^6 *plnA*$^-$ führten zu insgesamt 18,6% Granulozyten-Migration und 5 x 10^6 D39 bewirkten eine Granulozyten-Migration von 55,5%. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Pneumolysin, wenn es über ein Aerosol einem Versuchstier appliziert wurde, die kapilläre Permeabilität erhöht, und dadurch ein schweres Lungenödem verursachte. Pneumolysin wurde in Endothelzellen von Lungenarterien gefunden, die begleitend eine starke Vasokonstriktion aufzeigten. In einer Immunfluoreszenz-Darstellung von einschichtigen Endothelzellen, die mit Pneumolysin behandelt worden waren, konnte gezeigt werden, dass sich Poren und auch stressbedingt vermehrt Bindegewebe gebildet hatte (Witzenrath *et al.*, 2006).

Pneumolysin ist ein Toxin, welches ebenfalls eine Reihe von Interaktionen mit dem wirtseigenen Immunsystem eingeht und proinflammatorische Wirkungen besitzt, unter anderem stimuliert es die Produktion des Tumornekrosefaktors und Interleukin 1β in humanen Monozyten. Pneumolysin konnte als ein Hauptverursacher für die bakterielle Entzündungsreaktion detektiert werden. Zudem führt die Komplement-aktivierende Eigenschaft des Pneumolysins dazu, dass vor allem T-Zellen angelockt werden (Jounblat *et al.*, 2003).

Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die keinen Unterschied in der schädigenden Wirkung zwischen *plnA*$^-$ und Wildtyp-Pneumokokken gefunden haben. Diese Studien basieren auf in vivo Modellen (Friedland *et al.*, 1995). Allerdings konnten andere in vivo Studien wiederum zeigen, dass *plnA*$^-$ als einzige von weiteren Mutanten wie Neuraminidase- und Hyluronidase- defizienten Pneumokokken zu einer abgeschwächten Meningitis führte (Wellmer *et al.*, 2002).

Sowohl die überschießende Immunantwort als auch bakterielle Faktoren sind in vivo an der neuronalen Schadigung bei der Meningitis beteiligt. Das Verwenden einer neuronalen Zellkultur in der vorliegenden Arbeit hatte den Vorteil, die spezifischen Toxin-induzierten Schädigungsmechanismen ohne Begleiteffekte der Immunantwort des Wirtes zu untersuchen. Pneumolysin war ein sehr potenter Apoptose-Induktor. Die zytotoxische Eigenschaft des Pneumolysins beruhte auf der Fähigkeit Kanäle in Membranen zu bilden. Die Eigenschaft des Pneumolysins an Cholesterol zu binden, spielt hierbei wahrscheinlich eine entscheidende Rolle (Gilbert *et al.*, 1999). Diese Fähigkeit besitzen ebenfalls andere Bakterien mit ihren Toxinen, wie beispielsweise *S. pyogenes* durch das Streptolysin, oder *E.coli* durch das Hämolysin (Gilbert *et al.*, 1999). *Neisseria gonorrhoeae* ist ein weiteres Beispiel für ein Bakterium, welches in epitheliale Zellen ebenso wie in Phagozyten eindringen kann und Apoptose auslöst. Das Neisserien Porin PorB verursacht Poren in Membranen. Es konnte gezeigt werden, dass das Porin der Neisserien in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa Apoptose induziert, indem es einen raschen Kalziumeinstrom induziert, welcher die Aktivierung der Kalzium-abhängigen Cystein-Protease Calpain und der Caspasen bewirkt (Müller *et al.*, 1999).

Bei *Pseudomonas aeruginosa* konnte das Toxin Azurin identifiziert werden, welches Apoptose in Makrophagen induziert, indem intrazellulär Sauerstoffradikale gebildet werden (Jendrossek *et al.*, 2001). Auch bei Pneumolysin haben wir vermutet, dass Veränderungen im Kalzium-Haushalt und der intrazellulären Erhöhung der Sauerstoffradikale eine wichtige Rolle bei der Induktion neuronaler Apoptose zukommt.

5.2. Intraneuronale Apoptosemediatoren

Apoptose kann unter anderem durch eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels ausgelöst bzw. vermittelt werden (Goldstein *et al.*, 1991). Es ist bekannt, dass Pneumokokken zu einer Veränderung in der Kalzium-Homöostase führen. Die intrazelluläre Kalziumerhöhung ist auch bei anderen neuronalen Schädigungsmodellen (z. B. der Ischämie) ein wichtiger Faktor. Die Kalziumkonzentration wird in gesunden Zellen physiologisch reguliert. Kalzium gelangt elektrophoretisch über Kalzium-Unitransporter in die Mitochondrien (Crompton und Heid, 1978). Außerdem wird Kalzium gegen Natrium über den Natrium-Kalzium-Transporter aus den Mitochondrien ausgetauscht (Crompton *et*

al., 1977). Diese zwei Systeme gemeinsam mit dem Natrium-Wasserstoff-Antiporter sorgen für einen Kalzium-Transport, der langsam arbeitet und kontinuierlich Kalzium in den Mitochondrien zirkulieren lässt. Dieser Prozess wird durch die Produktion von Wasserstoffionen in der Atmungskette angetrieben (Crompton und Heid, 1978).

Der Kalzium-Einstrom in die Mitochondrien über den Uniporter wird durch einen elektrochemischen Kalziumgradienten vorangetrieben. Der Einstrom erhöht sich mit steigendem Membranpotential, jedoch nur bis etwa 110 mV (Goldstone *et al.*, 1987). Die physiologische Abnahme des inneren Mitochondrienpotentials verursacht keinen mitochondrialen Kalziumverlust. Der Kalziumkreislauf erlaubt Veränderungen des zytosolischen Kalziums. Diese Veränderungen wirken sich auch auf die mitochondriale Kalziumkonzentration aus. Diese Veränderungen des Kalziums liegen innerhalb der physiologischen Grenzen von 0,2 - 10 µM. Dies ist der normale Aktivitätsbereich für Kalzium-sensitive Enzyme in diesem Kompartiment. Dieser Kalziumtransportzyklus erlaubt, dass der mitochondriale oxidative Stoffwechsel auf Kalzium abhängige Ereignisse im Zytosol reagieren kann.

Die physiologische Schwankungsbreite von Kalzium ist wichtig für das Überleben der Zelle. Eindrücklich ist dies am Beispiel der Herzmuskelzellen zu beobachten. Wenn sich myokardiale Kontraktilität steigert, führt die zytosolische Kalziumkonzentrationserhöhung zu einer mitochondrialen Kalziumkonzentrations-steigerung, konsequenterweise zu einer Aktivierung des Tricarboxylsäurezyklus und zur oxidativen Phosphorylierung (Denton und McCormack, 1985). Auf diesem Weg wird die ATP-Synthese effektiv mit dem ATP-Verbrauch korreliert. Der Anstieg der kardialen Arbeit ist verbunden mit einem Anstieg des mitochondrialen Kalziums und erzeugt eine 2-4fache Erhöhung der oxidativen Phosphorylierung ohne detektierbare Veränderung des ATP/ADP-Verhältnisses (Denton und McCormack, 1985). Sobald die mitochondriale Kalziumaufnahme geblockt wird, kommt es zu einem Abfall des ATP/ADP-Quotienten und die Zelle setzt nun als eine Art „kataboles Signal“ Kalzium frei. Es bedarf etwa einer Minute, um einen neuen Gleichgewichtszustand im mitochondrialen Kalziumhaushalt zu erreichen, wenn sich das zytosolische Kalzium verändert (Crompton, 1985). Dies erklärt die grundlegende und lebenswichtige Funktion des mitochondrialen Kalziumtransportes (siehe **Abbildung 29**).

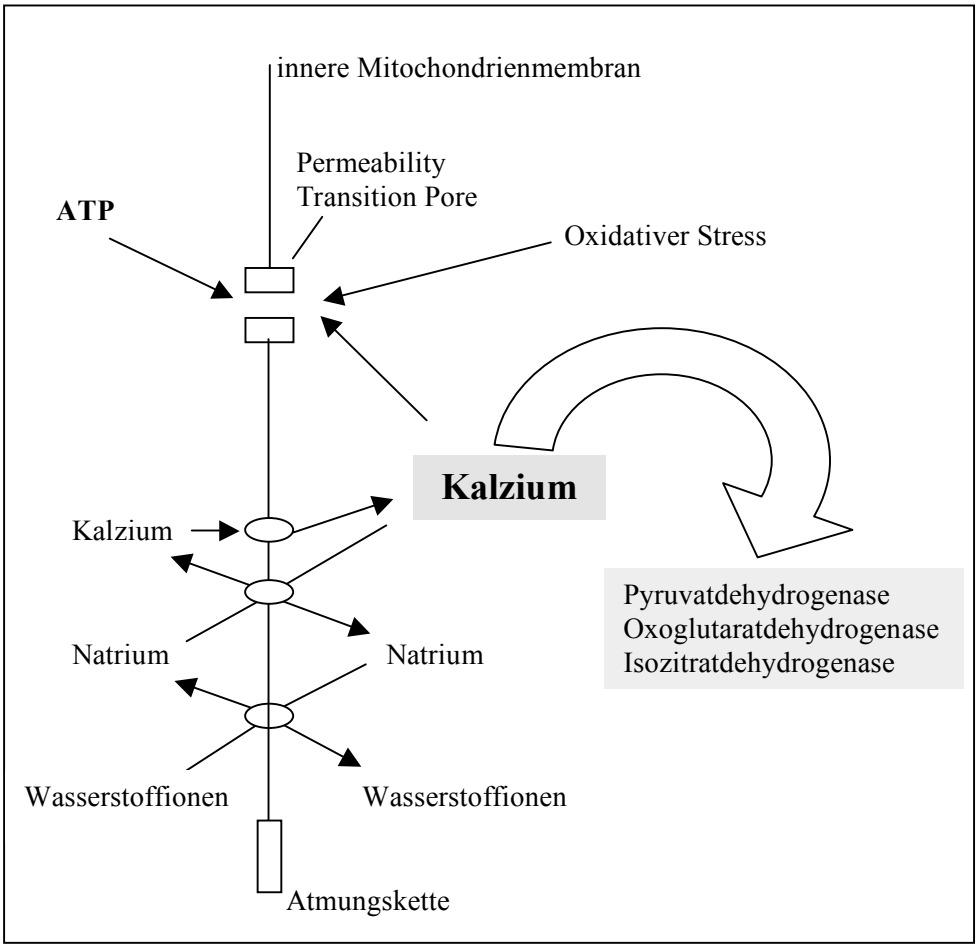


Abbildung 29: Darstellung der zentrale Rolle des mitochondrialen Kalziumaustausches. Mitochondriales Kalzium wird durch einen Transportkreislauf reguliert, der durch Protonenpumpen der Atmungskette aufrechterhalten wird. Der Transportkreislauf wird durch Kalzium-Unitransporter, Natrium-Kalzium-Antiporter und Natrium-Wasserstoffionen-Antiporter der inneren Mitochondrienmembran aufrechterhalten. Unter physiologischen Bedingungen kontrolliert mitochondriales Kalzium die regulierenden Schlüsselenzyme des Mitochondriums. Unter pathologischen Bedingungen, welche mit ATP-Mangel und oxidativen Stress einhergehen, triggert Kalzium die Öffnung des PT-Komplexes (Crompton, 1999).

In dieser Arbeit konnte erstmals in primären kortikalen Neuronen gezeigt werden, dass Pneumolysin zu einer intrazellulären Erhöhung des Kalziums und der Sauerstoffradikale führt. Andere Bakterientoxine koennen ebenfalls einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirken. Das Porin der Neisserien führt nicht nur zu einem raschen Kalziumeinstrom in epitheliale Zellen und Monozyten, sondern es triggert auch den extrazellulären Einstrom von Kalzium. Kalzium wird einerseits intrazellulär im Endoplasmatischen Retikulum, in den Mitochondrien oder im Zellkern gespeichert, andererseits wird Kalzium durch spezielle Kanäle der Zellmembran aus dem Extrazellulärraum in das Zellinnere transportiert (Müller *et al.*, 1999).

Porin hat die Fähigkeit Ionen-selektive Kanäle in eukaryoten Membranen zu bilden (Rudel *et al.*, 1996). Es ist daher wahrscheinlicher, dass das extrazelluläre Kalzium direkt durch diese Kanäle des Porins ins Zellinnere gelangt, als dass Porin spezifische Kalzium-Kanäle aktiviert. Auch durch die von Pneumolysin gebildeten Poren in der Zellmembran wird wahrscheinlich der Einstrom von extrazellulär gelegenem Kalzium in das Zellinnere ermöglicht. Die Eigenschaft des Pneumolysins, Poren in Zellmembranen zu bilden, ist ein mehrstufiger Prozess, der Konformationsveränderungen, Ansammlung von Liposomen und Membrandestabilisierungen voraussetzt (Gilbert *et al.*, 1999). Dieser Membranumbau führt zu einer Veränderung in der Leitfähigkeit und Homöostase des Kalziums (Herrington *et al.*, 1996). Die Veränderung im Kalziumhaushalt wiederum hat Auswirkungen auf die Mitochondrien (Brustovetsky *et al.*, 2002).

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die intrazelluläre Erhöhung des Kalziums einen Zeit- und Konzentrationsfaktor aufweist. Je geringer die Konzentration des Pneumolysins ist, umso langsamer kommt es zu einer intrazellulären Erhöhung des Kalziums. Bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml Pneumolysin, die üblicherweise bei einer Meningitis vorliegt, ist die maximale intrazelluläre Kalziumkonzentration bereits nach einer Stunde erreicht. Weiterhin haben wir gezeigt, dass es zu einer Erhöhung der intrazellulären Sauerstoffradikale kommt. Sauerstoffradikale bewirken direkt oxidative Zytotoxizität (Quagliarello und Scheld, 1992). Besonders das ZNS ist gegenüber Sauerstoffradikalen empfindlich (Muller, 1997).

Zur zellulären Abwehr gehören neben proteolytischen Enzymen auch Stickstoff- und Sauerstoffradikale. Kommt es zu einer Erhöhung der Sauerstoffradikale, entwickelt sich ein zellulärer Schaden. Antioxidative Substanzen reduzieren deutlich intrakranielle Komplikationen wie zerebrale Minderdurchblutung, erhöhten intrakraniellen Druck, die Bildung eines Hirnödems und auch neuronale Schäden bei der experimentellen Meningitis (Pfister *et al.*, 1992; Leib *et al.*, 1996; Auer *et al.*, 2000).

Sauerstoffradikale vermitteln während der Apoptose Signaltransduktion zu den Mitochondrien. Es kann dadurch zur Freisetzung von proapoptotischen Proteinen aus den Mitochondrien wie beispielsweise dem Zytochrom c kommen (Hajnoczky *et al.*, 2003). Mitochondrien haben eine wichtige Aufgabe in der Regulierung des zellulären Redoxzustandes. Durch die Unterbrechung der Atmungskette in den Mitochondrien kommt es zu einer Erhöhung von Superoxid. Durch den Abbau des während der Apoptose anfallenden Superoxids durch die Superoxiddismutase wird die Konzentration von

Wasserstoffperoxid, welches als Abbauprodukt anfällt, in der Zelle erhöht. Damit kommt es zu einer Abnahme des im reduzierten Zustand vorliegenden Glutathions. Dies führt wiederum zu einer Konzentrationserhöhung von Sauerstoffradikalen (Cai und Jones, 1999). Sauerstoffradikale führen zu einer Freisetzung von Kalzium aus dem Endoplasmatischen Retikulum und zu einer Konzentrationssteigerung des Kalziums in den Mitochondrien. Dies bewirkt wiederum eine Steigerung der Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran (Jacobson und Duchen, 2002).

In vielen Studien konnte ein Zusammenbrechen des inneren Mitochondrien-potentials während der Apoptose gemessen werden. Dies ist ein Zeichen dafür, dass sich ein Membrankanal öffnet, der so genannte „permeability transition pore complex“ (PT). Dies ermöglicht die Freisetzung von proapoptotischen Proteinen. Wie sie genau freigesetzt werden, ist letztlich noch unklar (Green und Reed, 1998). Der PT-Membrankanal und seine Regulierung ist komplex. Er besteht aus verschiedenen Teilen, unter anderem dem mitochondrialen Porin (auch bekannt unter dem Begriff spannungsabhängiger Anionenkanal (VDAC)), dem „adenin nucleotide translocator“ (ANT), dem peripheren Benzodiazepin-Rezeptor und Kinasen wie Hexokinase und/oder Kreatinkinase (Beutner *et al.*, 1998). Die Öffnung des PT-Komplexes wird durch proapoptotische Signale ausgelöst, die durch Kalzium, Oxidantien, Stickstoffoxid, Ceramid oder Caspasen vermittelt werden (Marzo *et al.*, 1998; Zamzami *et al.*, 2001).

Anstieg von intraneuronalem Kalzium und Hydrogenperoxid ist eine Schlüsselereignis bei diversen Apoptosemodellen. Beides wird durch Pneumolysin induziert. Im Folgenden wurden auch potentielle direkte Auswirkungen von Pneumolysin auf die Mitochondrien von Neuronen untersucht.

5.3. Mitochondriotoxizität

Pneumolysin bindet an Cholesterol von Zellmembranen und bildet durch Oligomerisation ringähnliche Strukturen in diese Membranen, so genannte Poren (Gilbert *et al.*, 1999). Werden durch Toxine Poren in Membranen gebildet, führt dies im Regelfall zu einem starken Kalzium-Einstrom in die Zelle. Wir haben gezeigt, dass durch Pneumolysin der Mitochondrienstoffwechsel rasch geschädigt wird. Pneumolysin verursachte eine rasche und massive Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass Pneumolysin nicht nur zu Zell- und Zellkernschrumpfung sowie zu Zellmembranausstülpungen führte, sondern auch deutliche strukturelle Veränderung der Mitochondrien verursachte und sogar an Mitochondrien gebunden hat. Es kam zur Schwellung und Zerstörung der Mitochondrien mit konsekutiver Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF).

Mitochondrienschädigung und Apoptoseinduktion durch Pneumokokken sind Folge einer gestörten zytoplasmatischen Homeostase (Kalzium, Sauerstoffradikale). Mittels Immunelektronenmikroskopie konnten wir zeigen, dass Pneumolysin direkt mitochondriale Funktion und Struktur zerstört. Die Pneumolysinmutante mit defekter Porenbildung war nicht in der Lage, Apoptose auszulösen, die mitochondriale Ultrastruktur zu zerstören oder AIF freizusetzen. Diese Ergebnisse belegen, dass die Schädigung der Membranintegrität durch Porenbildung die Basis der Pneumolysin-induzierten mitochondrialen Toxizität ist. Pneumolysin translozierte zu und band an die neuronalen Mitochondrien. Ein Vergleich mit *N. gonorrhoeae* zeigt, dass auch hier die Mitochondrien eine zentrale Rolle spielen. Das Neisserien-Porin PorB translociert zu den Mitochondrien. Infizierte Zellen setzen Zytochrom c ins Zytoplasma frei und es kommt zu einem kompletten Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (Müller *et al.*, 2000).

Der genaue Mechanismus der Pneumolysin-induzierten Mitochondrienschädigung bleibt noch unklar. Eine interessante Hypothese ist, dass Pneumolysin auf ähnliche Art und Weise wie die proapoptotischen Proteine Bax oder Bak in die Mitochondrienmembran integriert wird. In verschiedenen Apoptosemodellen konnte gezeigt werden, dass Gegenregulierungen einsetzen, durch welche die Zelle versucht, sich vor dem Zelltod zu schützen. Bcl-x_L spielt hierbei eine wichtige Rolle. Es wirkt protektiv durch die Abspaltung von BID, BIM und BAD von BAX und BAK. Diese BH3-Moleküle, BID, BIM und BAD, führen ansonsten zu einer Konformationsänderung von BAX und BAK, so dass diese in Mitochondrienmembranen integriert werden können und somit zu einer Freisetzung von proapoptotischen Proteinen führen (Murphy *et al.*, 2000). Ob Pneumolysin eine Strukturähnlichkeit mit bereits „aktivierten“ Proteinen wie BAX besitzt oder, ob Gegenregulationen zum Schutze der Zelle stattfinden beziehungsweise unterlaufen werden, bleibt noch zu klären. Bei dem Neisserien Protein Porin verhinderte das Überexprimieren von antiapoptotischen Proteinen der Bcl Familie wie Bcl-2 oder Bcl-x_L gänzlich einen Apoptoseprozess.

Verschiedene Modelle sind diskutiert worden, die die Freisetzung von proapoptotischen Proteinen erklären sollen. Eine Hypothese geht von einer Hyperpolarisation aus, die zum Anschwellen der Mitochondrien und dadurch zum Zusammenbruch der äußeren Mitochondrienmembran führt (Van der Heiden *et al*, 1997). Eine andere Überlegung ist, dass große Poren durch Bcl-Proteine wie Bax gebildet werden (Antonsson *et al*, 2000) und eine dritte Hypothese geht von einem raschen Verlust des inneren mitochondrialen Membranpotentials aus mit der konsekutiven Aktivierung des PT-Komplexes (Kroemer *et al*, 1997). Keines der Modelle erklärt umfassend die durch Pneumolysin induzierte Zerstörung der Mitochondrien und die daraus resultierende Freisetzung des AIF.

Wir haben beschrieben, dass auch die intrazelluläre Kalzium-Erhöhung im apoptotischen Prozess eine Rolle spielt. Porin beispielsweise, welches ebenfalls zu einer intrazellulären Kalziumerhöhung führt, aktiviert die Kalzium-abhängige Protease Calpain (Müller *et al*, 1999). Erhöhte Kalziumspiegel vermögen ebenso eigenständig eine Aktivierung des PT-Komplexes (Marzo *et al*, 1998). Mitochondrien haben in der durch Pneumolysin induzierten Apoptose eine zentrale Bedeutung. Bei der intrazellulären Kalziumerhöhung und dem Anstieg von Sauerstoffradikalen wirken sie modulierend mit. Mitochondrien sind in der Lage proapototische Proteine freizusetzen und sind ein zentrales Target für apoptotische Signale und deren Weiterleitung. Viele dieser Signale führen zu einer Mitochondrienmembranveränderung (Gulbins *et al.*, 2003). Die Rolle der Mitochondrien wurde auch als „gate keeper“ beschrieben (Gulbins *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in primären Neuronen in vitro Mitochondrien direkter Angriffspunkt des apoptotischen Stimulus Pneumolysin sind. Die Kalzium- und Sauerstoffradikalenerhöhung in der Zelle führen zusätzlich zu einer Permeabilitäts- und Stoffwechselveränderung der Mitochondrien und damit auch zur Zerstörung der Organellen (**Abbildung 30**).

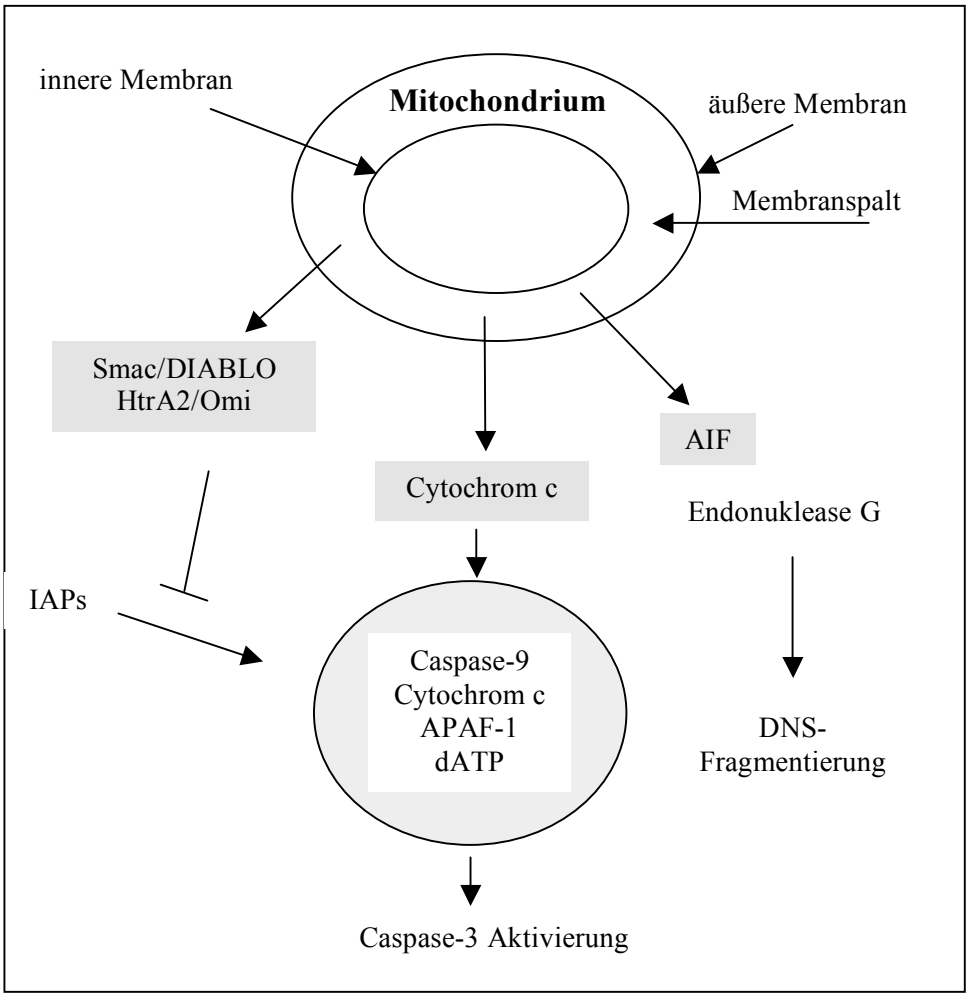


Abbildung 30: Die Rolle der Mitochondrien in der Apoptose. Apoptotische Stimuli setzen verschiedene pro-apoptotische Faktoren aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien frei. Diese Faktoren bewirken Caspasen-Aktivierung oder Caspasen-unabhängige Apoptose (AIF). Andere Proteine hemmen apoptotische Vorgänge wie IAPs (Inhibitoren der Apoptose). Wobei diese auch ihrerseits von proapoptotischen Proteinen gehemmt werden können (Smac/DIABLO, HtrA2/Omi). Manche Proteine vereinigen sich im Zytosol zu einem Komplex, dem Apoptosom, bestehend aus Caspase-9, Zytochrom c, APAF-1 und dATP, der proapoptotisch wirkt. Der Apoptose-induzierende Faktor AIF transloziert zum Zellkern und führt zu einer DNS-Fragmentierung in Zusammenarbeit mit der Endonuklease G, besitzt aber auch selbst Endonuklease-Aktivität (Gulbins *et al.*, 2003).

Durch welche Mechanismen Pneumolysin zu den Mitochondrien transloziert, kann bisher nur hypothetisiert werden. Für das Neisserien-Porin wurde angenommen, dass es möglicherweise eine Interaktion mit dem intrazellulären Vesikeltransportsystem eingeht, um zu den Mitochondrien zu gelangen. Diese Überlegung schließt ein, dass Porin aktiv mit dem Zytoskelett interagiert. Zytochalsin D, ein Inhibitor bei der Reorganisation von Aktin, als auch Colchizin konnten aber nicht verhindern, dass Porin zu den Mitochondrien

transloziert. Die Translokation von der Zellmembran zu den Mitochondrien vollzieht sich sehr rasch. Innerhalb von 20 Minuten post infectionem konnten schon Spuren von Porin detektiert werden (Müller *et al.*, 2000). Ob Pneumolysin, ähnlich wie für Porin postuliert, entweder mit Hilfe eines löslichen Botenstoffes zu den Mitochondrien gelangt oder ob es von Membran zu Membran durch einen noch ungeklärten Mechanismus transloziert, muss noch weiter untersucht werden. Für das Protein des Myxoma Virus, M11L, konnte gezeigt werden, dass über das C-terminale Ende des Proteins eine Translokation zu den Mitochondrien stattfindet. Diese Signalsequenz zeigt Übereinstimmungen mit Proteinen aus der Bcl-Familie (Everett *et al.*, 2000).

Geschädigte Mitochondrien setzen proapoptotische Faktoren frei. Dies ist möglicherweise eine Folge der PT-Aktivierung. Interessanterweise konnten für die Komponenten, die zum PT-Komplex gehören, Homologa in der Bakterienwelt gefunden werden. Der ANT (adenine nucleotide translocator) und der periphere Benzodiazepin-Rezeptor konnten bei *Rhodobacter capsulatus* entdeckt werden (Carmeli und Lifshitz, 1989). Proteine der Bcl-2 Familie gleichen Colicinen, Poren bildende Toxine von *Escherichia coli* (Muchmore *et al.*, 1996). Wie bereits erwähnt, zeigen auch eukaryote Porine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten mit dem Porin der Neisserien (Rudel *et al.*, 1996). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch AIF Ähnlichkeiten zu bakteriellen Oxidoreduktasen aufweist (Susin *et al.*, 1999/a). Auf diesen Überlegungen basierend entstand die Hypothese, dass Pneumolysin, nachdem es zu einer mitochondrialen Schädigung führte, auch zur Freisetzung von proapoptotischen Proteinen beiträgt.

5.4. AIF-Freisetzung und DNS-Fragmentierung

AIF befindet sich im Spalt zwischen beiden Mitochondrienmembranen und führt bei seiner Freisetzung und Translokation zum Zellkern zu einer hochmolekularen DNS-Fragmentierung (Li *et al.*, 2001; Susin *et al.*, 2000). AIF ist ein Flavoprotein, welches in gesunden Zellen in den Mitochondrien vorkommt. Dort übt es eine lebenswichtige Funktion im bioenergetischen und Redox-Stoffwechsel aus (Klein *et al.*, 2002; Vahsen *et al.*, 2004; Cande *et al.*, 2004; Urbano *et al.*, 2005). AIF wird im Zuge der Apoptose mit anderen proapoptotischen Proteinen ins Zytosol freigesetzt und gelangt zum Zellkern. Dort bewirkt es Chromatinkondensation und Chromatinolyse. AIF gehört zu einer Reihe von

Proteinen, die strukturelle Merkmale teilen, Redox-Aktivität und ein proapoptotisches Potential besitzen. Zwei weitere Proteine gehören beim Menschen zu dieser Familie, dies sind AMID und AIFL (Xie *et al.*, 2005). AIF besitzt ein N-terminales Ende, das MLS, welches den Aufenthaltsort im Mitochondrium (mitochondrial localization sequence) festlegt (Wu *et al.*, 2002).

Mausstämme mit reduzierter AIF-Aktivität entwickelten eine Neurodegeneration mit Ataxie aufgrund einer zerebellaren Atrophie und eine Blindheit aufgrund von retinaler Degeneration. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass AIF zytoprotektive Funktionen besitzt. Weiterhin reagierten Neurone dieser Mäuse sensibel auf oxidativen Stress mit vermehrtem Zelltod (Klein *et al.*, 2002). Dies weist darauf hin, dass AIF antioxidative Eigenschaften besitzt (Lipton und Bossy-Wetzel, 2002). AIF-defiziente Zellen zeigen verschiedene degenerierte Prozesse, jedoch nicht Hepatozyten und Myozyten (Klein *et al.*, 2002). Zellen, die kein AIF besitzen, zeigen aber auch eine geringere Produktion von Sauerstoffradikalen, jedoch höhere Anfälligkeit für Apoptose (Urbano *et al.*, 2005). AIF trägt dazu bei, dass das Glutathion-Niveau für den Fall oxidativen Stresses aufrechterhalten wird (Cande *et al.*, 2004). Über das verwandte AMID wurde berichtet, dass in Hefen, die AMID-defizient waren, die Produktion der Sauerstoffradikalen reduziert wurde, während eine Überexprimierung von AMID Zellen töten konnte (Li *et al.*, 2006). Für AIF gibt es Studien, die zeigen, dass eine AIF-Defizienz zu vermindertem Zelltod führt. Diese Effekte sind wohl zellspezifisch und es kann nicht von einem generellen Apoptose-Defekt in AIF-negativen Zellen ausgegangen werden (Urbano *et al.*, 2005).

AIF scheint in spezifischen Zelltod-Modellen und in bestimmten Zelltod-Phasen eine Rolle zu spielen (Modjtahedi *et al.*, 2006). Rekombinantes AIF bindet an isolierte DNS, bevorzugt an Einzelstrang-DNS (Vahsen *et al.*, 2006). AIF bindet eher an lineare Formen anstatt an zirkuläre Plasmide. Dieser Prozess bewirkt DNS-Kondensation und DNS-Oligomerisation. Er bedarf der Anwesenheit von Magnesium und wird durch NADP stimuliert (Vahsen *et al.*, 2004). AIF, welches freigesetzt wird, spielt ebenfalls eine Rolle bei der Veränderung der Mitochondrienmembran (Susin *et al.*, 2000).

AIF wird durch Pneumolysin aus den Mitochondrien freigesetzt. Die Fähigkeit des Pneumolysins Poren in Membranen zu bilden scheint dabei von Bedeutung zu sein. Wir konnten zeigen, dass die Pneumolysin-Mutante mit einem Defekt in der Porenbildung nicht in der Lage war, AIF aus den Mitochondrien freizusetzen. Die Endonuklease G kann

zusammen mit AIF zu einer Caspasen-unabhängigen oligonuklesomale DNS-Aufspaltung führen (Hansen und Nagley, 2003).

Die Endonuklease G kooperiert weiterhin mit Exonukleasen und DNase I, um die Aufspaltung zu erleichtern (Widlak *et al.*, 2001). Ob Pneumolysin bei der Freisetzung von AIF auch an den Mitochondrien direkt zu einer Porenbildung beiträgt oder ob es den bereits existierenden PT-Komplex (permeability transition pore protein) verändert oder aktiviert, ist noch unklar. Inwieweit hier Bcl-2 ähnliche Proteine wie BAX beziehungsweise eine Strukturähnlichkeit des Pneumolysins mit Bcl-2 ähnlichen Proteinen eine Rolle spielen, ist auch noch nicht geklärt. Es wird für Bcl-2 ähnliche Proteine postuliert, dass sie in der Lage sind, mit Anteilen des PT-Komplexes zu interagieren, damit größere proapoptotische Proteine ins Zytoplasma freigesetzt werden können (Shimizu *et al.*, 2000; Marzo *et al.*, 1998).

Bei der durch Pneumolysin induzierten Apoptose kam es zu einer hochmolekularen Fragmentierung der DNS. Der klassische Zelltod, wie er durch Staurosporin induziert wird, führt hingegen zu einer typischen Fragmentierung in kleinere DNS-Fragmente (ca. 200-300 Basenpaarfragmente). Die klassische Apoptose wird durch Caspasenaktivierung vermittelt. Durch Stress werden proapoptotische Proteine aus den Mitochondrien freigesetzt, die zu einer Aktivierung von „downstream“ Caspasen führt (Suzuki *et al.*, 2001). Freisetzung von Zytochrom c, Smac/Diablo und HtrA2/Omi bewirkt eine Caspasenaktivierung (Wang, 2001; Van Loo *et al.*, 2002). Andererseits kann die Öffnung eines Endonuklease G und/oder AIF leitenden Kanals zur Einleitung eines durch AIF oder Endonuklease G induzierten Zelltodes führen, welcher Caspase-unabhängig verläuft (Susin *et al.*, 1999/a; Li *et al.*, 2001).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der mit Pneumolysin behandelten kortikalen Neurone zeigen ein typisches Bild der Zellkernveränderung, welches in verschiedenen anderen Arbeiten als AIF-typisch charakterisiert wurde. Hier handelt es sich um eine periphere Kondensation des Chromatins des Zellkerns (Leist und Jäättelä, 2001; Susin *et al.*, 1999). Bei der Freisetzung des AIF aus den Mitochondrien kann einerseits das Pneumolysin direkt eine Rolle spielen, andererseits die Interaktion mit dem PT-Komplex. Ein bekannter Faktor für die Freisetzung des AIF aus den Mitochondrien ist auch das Kalzium, welches im Zuge des Apoptosevorganges ebenfalls erhöht ist (Susin *et al.*, 1999). Somit stellte sich die Frage, ob bei der Schädigung der Mitochondrien mit einer AIF-Freisetzung auch eine Caspasen-Aktivierung erfolgt.

5.5. Caspasen-unabhängige Apoptose

Der stereotype Verlauf der Apoptose beinhaltet DNS-Fragmentierung, Kondensation des Zellkerns, Schrumpfung der Zelle, Bildung von Ausstülpungen an Membranen und Abgabe von Phosphatidylserin. Vieles wird dabei durch die Aktivität der Caspasen reguliert (Thornberry und Lazebnik, 1998). Die Caspasen 1 - 10 sind am Ablauf und der Kontrolle der Apoptose beteiligt. Damit sie aktiv in den Apoptoseprozess eingreifen können, müssen sie, da sie als Proenzyme im Zytoplasma liegen, aktiviert werden. Es werden so genannte „upstream“ und „downstream“ Caspasen unterschieden. Die Caspasen 1, 2, 4, 5 und 8 - 10 sind an der Signaltransduktion vom Apopoptosestimulus zu den Mitochondrien respektive zu den „downstream“ Caspasen beteiligt.

Caspasen 3, 6 und 7 gehören zu den ausführenden Caspasen, die enzymatisch zelluläre Substrate spalten, was letztendlich zu den strukturellen Veränderungen bei der Apoptose führt (Adams, 2003). Aktuell sind vier Wege bekannt über welche Caspasen aktiviert werden können, zum einen der Weg über die Mitochondrien mit Zytochrom c, des Weiteren der Rezeptorweg über die Tumornekrosefaktor-Familie, dann eine direkte Caspasen-Aktivierung mit der zytolytischen T-Zell-Protease Granzym B und als letzte Möglichkeit der Weg über das endoplasmatische Retikulum (Carter *et al.*, 2005).

Wir konnten zeigen, dass durch Pneumolysin keine Aktivierung der Caspasen 1, 3, 8 und 9 stattfindet. Mit der Auswahl der Caspasen haben wir somit Caspasen aus dem „upstream” und aus dem „downstream“ Bereich untersucht. Diese Erkenntnis steht im Gegensatz zu dem Ergebnis, dass z-VAD-fmk, ein Caspasen-Inhibitor, einen partiellen Schutz vor der Pneumolysin-induzierten Toxizität bot (Stringaris *et al.*, 2002). Dies daran liegen liegen, dass in unserer Arbeit primäre kortikale Rattenneurone verwendet wurden und bei Stringaris und Mitarbeitern die Neuroblastom Zelllinie SH-SY5Y. *S. pneumoniae* kann in dendritischen Zellen Caspase-abhängige und Caspase-unabhängige Mechanismen induzieren (Colino und Snapper, 2003). Bei der klassischen Apoptose kommt es nach Freisetzung von Zytochrom c, Caspase-9 und der zytosolischen Verbindung mit Apaf-1 zusammen mit dATP zur Bildung vom so genannten Apoptosom. Dieses Apoptosom ist der Beginn der Caspasen-Kaskade. Warum die Capasenaktivierung bei der Pneumolysin-induzierten neuronalen Apoptose unterbleibt, kann mehrere Gründe haben.

Damit das Apoptosom aktiv werden kann, müssen endogene Apoptoseinhibitoren gehemmt werden (Verhagen *et al.*, 2000). Möglicherweise unterbleibt dies bei der Pneumolysin-induzierten Apoptose. Eine andere mögliche Erklärung wäre HtrA2/Omi, eine Serin-Protease, welche Apoptose ohne Caspase-9 und Apaf-1 Aktivierung triggert (Hedge *et al.*, 2002). Andererseits muss bedacht werden, dass es durch die Zerstörung der Mitochondrien und damit durch die Beeinträchtigung des Energiehaushaltes der Zelle zu einem Mangel an dATP kommen könnte, was erklären könnte, dass die Bildung des Apoptosoms am ATP-Mangel scheitert. Ähnliche Erklärungsversuche gab es bereits, die zeigten, dass der Energiegehalt der Zelle für die Caspasenaktivierung von entscheidender Bedeutung ist (Leist *et al.*, 1997). Schließlich existieren verschiedene andere Proteasen in einer Zelle, die ebenfalls in der Lage sind, Apoptose zu initiieren. Hier wären Enzyme wie Calpain, Serinproteasen oder Cathepsin D zu nennen (Leist und Jäättelä, 2001).

Wir haben beschrieben, dass AIF in den Mitochondrien eine wichtige Rolle in der Biogenese und der Aufrechterhaltung der Atmungsketten-Komplexe I und III hat. Sobald AIF zum Zellkern gelangt, kann es am Prozess des Zelltodes teilnehmen. Bei der Regulierung im Zytosol scheinen Caspasen eine Rolle zu spielen. Z-VAD-fmk, ein Caspasen-Inhibitor, konnte in einigen Studien die Freisetzung von AIF verhindern. Andere Studien wiederum konnten dies nicht beobachten. Z-VAD-fmk verhindert möglicherweise die Aktivierung von AIF, wenn der Apoptose induzierende Faktor in einer bestimmten Konstellation vorliegt. AIF liegt in einer löslichen (57 kDa) und einer membrangebunden (62 kDa) Form in den Mitochondrien vor. Die membrangebundene Variante wird leichter von Z-VAD-fmk inhibiert, indem es Cathepsine und Calpaine in ihrer Aktivität hindert. Dies mag auch erklären, weshalb Z-VAD-fmk in manchen Studien zu einer reduzierten apoptotischen Reaktion in Pneumolysin infizierten Zellen geführt hat.

Eine weitere mögliche Erklärung für die fehlende Caspasenaktivierung beim Pneumolysin-induzierten neuornalen Zelltod wären aktive Inhibitionsmechanismen. Hinweisend dafür war die Tatsache, dass Pneumolysin in der Lage war, die Staurosporin-induzierte Caspasenaktivierung zu unterdrücken. Eine andere Möglichkeit der aktiven Caspasen-Unterdrückung sind die endogenen Caspaseninhibitoren, die sog. Inhibitoren apoptotischer Proteine (IAPs).

5.6. Endogene Inhibitoren der Apoptose

Es existieren endogene Inhibitoren für apoptotische Proteine, die so genannten IAPs. Sie sind in der Lage, Caspasen in ihrer Aktivität zu inhibieren. Es sind 8 Mitglieder der humanen IAP-Familie bekannt, von denen das XIAP (human X-linked IAP) am besten beschrieben ist. XIAP inhibiert die Caspasen 3, 7 und 9, aber nicht 1, 6, 8 und 10 (Deveraux *et al.*, 1997). IAPs sind oft bei bestimmten Neoplasmen verstärkt exprimiert und verhindern dadurch den Zelltod (Deveraux und Reed, 1999). Einige Tumorzellen sind sogar in der Lage, Caspasen zu aktivieren, um offensichtlich die Aktivität der Caspasen durch Aktivierung von IAP Proteinen auszugleichen (Yang *et al.*, 2003).

Die Interaktion zwischen XIAP und den Caspasen ist sehr kompliziert. Einige Interaktionen sind bisher untersucht worden. So weiß man, dass XIAP drei Domänen besitzt, die spezifisch an den Caspasen 3, 7 und 9 binden können. Weiterhin ist bekannt, dass BIR3 (baculovirus IAP repeat) direkt an einer Untereinheit der Caspase-9 bindet (Deveraux und Reed, 1999; Srinivasula *et al.*, 2001). XIAP spaltet Caspase-9 zu einem inaktiven Protein (Shiozaki *et al.*, 2003). Es konnte auch gezeigt werden, dass BIR2 die Caspasen 3 und 7 inaktiviert (Huang *et al.*, 2001; Riedl *et al.*, 2001).

Ein anderes pro-apopototisches Protein, das Smac/DIABLO (vergleiche Kapitel 1.4.) fördert andererseits die Aktivität der Caspase-9 dadurch, dass es kompetetiv mit Caspase-9 an derselben Domäne des XIAPs, nämlich BIR3, bindet (Liu *et al.*, 2000). Smac bindet an XIAP-BIR3 mit seinen ersten vier Aminosäureresten (AVPI) (Liu *et al.*, 2000).

Bisher wurden erhöhte Konzentrationen von XIAP-Proteinen bei vielen akuten und chronischen Leukämien, Prostatakrebs, Lungenkrebs und anderen Tumorarten gefunden (Ferreira *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2002; Schimmer *et al.*, 2004).

Wir konnten zeigen, dass während der Pneumolysin-induzierten Apoptose XIAP hochreguliert wird. Pneumolysin ist somit offensichtlich in der Lage - neben einer aktiv die Caspasen inhibitierenden Funktion - auch indirekt (durch die Induktion des endogenen Inhibitors apoptotischer Protein XIAP) Caspasen-inhibitorisch zu wirken. Beide Mechanismen könnten somit für die fehlende Caspasenaktivierung (mit-)veranwortlich sein. Jedoch kann dadurch die Mitochondrientoxizität nicht verhindert werden. Andererseits ist zu bedenken, dass durch die Porenbildung in den Mitochondrien nicht nur die genannten apoptotischen und anti-apoptotischen Proteine freigesetzt werden, sondern auch andere, möglicherweise noch unbekannte Proteine, die sich in den Mitochondrien

befinden. Welche dabei pro- und welche antiapoptotische Effekte haben, ist eine wichtige Frage für die Entwicklung zukünftiger neuroprotektiver Strategien. Somit bleiben noch viele zukünftige Fragen nach dem exakten Ablauf der Pneumolysin induzierten Apoptose (vergleiche auch **Abbildung 31**).

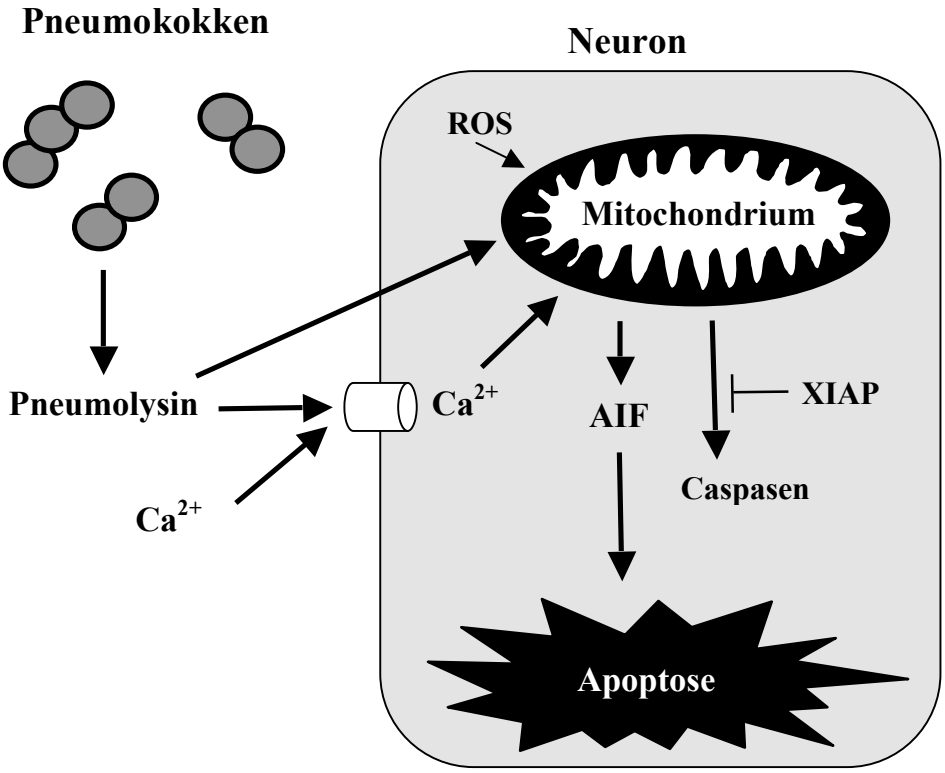


Abbildung 31: Zusammenfassung der Pathogenese des durch Pneumolysin induzierten neuronalen Zelltodes. Beim Wachstum, vor allem aber auch bei der Autolyse und der Antibiotika-induzierten Lyse kommt es zur Freisetzung von Pneumolysin aus den Pneumokokken. Pneumolysin bindet an die Cholesterol-haltige Zellmembran von Neuronen. und bildet Poren. Nachfolgend kommt es zum Einstrom von Kalzium und Pneumolysin, welches an die Mitochondrienmembran bindet. Es entstehen weiterhin Sauerstoffradikale (ROS). Die Mitochondrienmembran wird zerstört und es folgt die Freisetzung von AIF. Hierbei kommt es auch zur Aktivierung von IAPs (XIAP) und es werden Caspasen inhibiert. Unvermeidlich ist schließlich der Zelltod durch Apoptose.

5.7. Ausblick

Programmierter Zelltod bei der Pneumokokkenmeningitis beinhaltet sowohl Caspase-abhängige als auch Caspase-unabhängige Apoptose. In unserem gegenwärtigen Model ist bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis in vivo etwa die Hälfte des neuronalen Zelltodes durch bakterielle Faktoren bedingt, während die andere Hälfte durch die überschießende Immunantwort verursacht wird (Braun *et al.*, 1999, 2001 und 2002). Etwa die Hälfte des Zelltodes ist durch einen Breitspektrum-Caspaseninhibitor verhinderbar. Bei Abwesenheit der Inflammation in vitro hingegen verläuft die Pneumokokken-induzierte Apoptose Caspase-unabhängig. All das weißt darauf hin, dass in vivo die Caspasenaktivierung durch die massive Entzündung getriggert wird, während lebende Bakterien und Pneumolysin eine AIF-abhängige, aber Caspasen-unabhängige Apotptose induzieren.

Neuroprotektion ist ein wichtiges und in der Klinik immer noch unerreichtes Ziel in der Therapie der Penumokokkenmeningitis (wenn man von der partiellen Protektion durch Kortikosteroide absieht). Es kann wahrscheinlich nur durch die Hemmung mehrerer Zelltodmechanismen erreicht werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Pneumolysin über Caspase-unabhängige Wege neuronale Apoptose induziert. Hierbei spielen die Bindung von Pneumolysin an die Mitochondrienmembran, die konsekutive Mitochondrienschädigung mit Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors eine zentrale Rolle. Mögliche Ansatzpunkte für neuropotektive Strategien, die sich daraus ergeben könnten, sind die Hemmung der Bindung von Pneumolysin an die Mitochondrien und die Blockierung des Apoptose-induzierenden Faktors.

Pneumolysin bewirkt sowohl direkt durch seine Mitochondrienbindung als auch indirekt durch die intrazelluläre Erhöhung von Kalzium und Sauerstoffradikalen die AIF-Freisetzung. Diese Effekte scheinen alle durch die Eigenschaft des Pneumolysins, Poren in Membranen bilden zu können, verursacht zu sein. Somit könnten zukünftige pharmakologische Poreninhibitoren neuroprotektiv wirken.

Pneumolysin bewirkt die Hochregulierung des anti-apoptotischen Proteins XIAP. Welche weiteren anti-apoptotischen Proteine eine Rolle spielen ist noch offen. Möglicherweise könnte auch durch die Induktion endogener Anti-Apoptosesysteme Neuroprotektion erzielt werden.

Caspasen werden bei der Pneuomolysin-induzierten Apoptose in primären Neuronen nicht aktiviert. Ob andere Proteasen (beispielsweise Calpain und Serinproteasen sowie Cathepsin D) in primären Neuronen eine Rolle spielen ist in zukünftigen Experimenten zu klären.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pneumolysin ein extrem potentes Neurotoxin ist. Besonders kritisch ist hierbei die Freisetzung des Pneumolysins während der Antibiotika-induzierten bakteriellen Lyse bei der Therapie der Pneumokokkenmeningitis zu sehen. Eine zentrale Herausforderung ist es, welche Strategien die Freisetzung oder Inaktivierung des Pneumolysins verhindern könnten. Denn nicht nur die Toxizität des Pneumolysins, sondern auch seine Fähigkeit die wirtsspezifische Immunantwort zu triggern, spielt in der Pneumokokkenmeningitis eine Rolle. Je besser die Abläufe der Pneumolysin-induzierten Apoptose verstanden werden, desto effektiver und schonender können Therapiestrategien entwickelt werden, um Folgeschäden der bakteriellen Meningitis zu minimieren oder gar zu verhindern.

6. Zusammenfassung

S. pneumoniae ist einer der wichtigsten Erreger der bakteriellen Meningitis. Neurologische Folgeschäden sind häufig und schwerwiegend. Grund dafür ist der neuronale Zelltod. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Pneumolysin, ein membranbindendes und porenbildendes Toxin der Pneumokokken, eine wichtige Rolle in der Auslösung des neuronalen Zelltodes primärer Rattenneurone in vitro spielt.

Pneumolysin ist der Pneumokokkenfaktor, der die charakteristischen Kennzeichen der durch lebende Pneumokokken verursachten neuronalen Apoptose bewirkt, insbesondere die Caspasenunabhängigkeit und die Mitochondientoxizität. Pneumolysin induziert in vitro neuronalen Zelltod durch einen raschen Anstieg des intrazellulären Kalziums und der reaktiven Sauerstoffradikale. Pneumolysin bindet an die äußere Membran der neuronalen Mitochondrien und führt zu einer Membranpotentialveränderung. Es ist die Poren-bildende Aktivität von Pneumolysin, welche dessen Mitochondrientoxizität determiniert.

Die Mitochondrienultrastruktur wird durch Pneumolysin zerstört. Durch die Zerstörung der Mitochondrien kommt es zu einer Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF), der die DNS in große Fragmente spaltet. Die Neurone und ihre Zellkerne kondensieren und schrumpfen. Caspasen werden jedoch bei der Pneumolysin-induzierten Apoptose in primären Neuronen nicht aktiviert. Dies kann an der Fähigkeit von AIF liegen, Apoptose ohne Caspasenaktivierung auszuführen (Susin *et al.*, 1999/a). Weitere Gründe für die fehlende Caspasenaktivierung könnten sein, dass Pneumolysin aktiv Caspase-3 supprimiert und den endogenen Caspaseninhibitor XIAP (X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein) hochreguliert, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde.

In Anbetracht der neurologischen Schäden, die durch *S. pneumoniae* entstehen, ist es dringend nötig, den Pathomechanismus des durch Pneumokokken induzierten Zelltodes weiter zu verstehen. Pneumolysin als „Schlüsseltoxin“ der Pneumokokken ist ein extrem potentes Neurotoxin. Die Aktivität des Pneumolysins inhibieren zu können, würde meines Erachtens eine adjuvante Strategie darstellen, um die Hirnschäden bei der Pneumokokken Meningitis zu verhindern.

7. Literaturverzeichnis

Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. Trends Biochem Sci 2001; 26: 61-6.

Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. Gene Dev 2003; 17: 2481-95.

Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eske R, Martinou JC. Bax oligomerization is to require for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. Biochem J 2000; 345: 271-8.

Auer M, Pfister HW, Leppert D, Tauber MG, Leib SL. Effects of clinically used antioxidants in experimental pneumococcal meningitis. J Infect Dis 2000; 182: 347-50.

Baba H, Kawamura I, Kohda C. Induction of gamma interferon and nitric oxide by truncated pneumolysin that lacks pore-forming activity. Infect Immun 2002; 70: 107-13.

Benton KA, Everson MP, Briles DE. A pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae* causes chronic bacteraemia rather than acute sepsis in mice. Infect Immun 1995; 63: 448-55.

Berry AM, Yother J, Briles DE, Hansman D, Paton JC. Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 1989; 57: 2037-42.

Berry AM, Paton JC, Hansman D. Effect of insertional inactivation of the genes encoding pneumolysin and autolysin on the virulence of *Streptococcus pneumoniae* type 3. Microb Pathog 1992; 12: 87-93.

Beutner G, Ruck A, Riede B, Brdiczka D. Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. Biochem Biophys Acta 1998; 1368: 7-18.

Boulnois GJ, Paton JC, Mitchell TJ, Andrew PW. Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 1991; 5: 2611-6.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.

Braun JS, Novak R, Gao G, Murray PJ, Shenep JL. Pneumolysin, a protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*, induces nitric oxide production from macrophages. Infect Immun 1999; 67: 3750-6.

Braun JS, Novak R, Murray PJ, et al. Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus. J Infect Dis 2001; 184: 1300-9.

Braun JS, Sublett JE, Freyer D, et al. Pneumococcal pneumolysin and H_2O_2 mediate brain cell apoptosis during meningitis. J Clin Invest 2002; 109: 19-27.

Bronfman M, Loyola G, Koenig CS. Isolation of intact organelles by differential centrifugation of digitonin-treated hepatocytes using a table Eppendorf centrifuge. Anal Biochem 1998; 255: 252-6.

Brustovetsky N, Brustovetsky T, Jemmerson R, Dubinsky JM. Calcium-induced cytochrome c release from CNS mitochondria is associated with the permeability transition and rupture of the outer membrane. J Neurochem 2002; 80: 207-18.

Cabellos C, MacIntyre DE, Forrest M, Burroughs M, Prasad S, Tuomanen E. Differing roles for platelet-activating factor during inflammation of the lung and subarachnoid space. J Clin Invest 1992; 90: 612-8.

Cai J, Jones DP. Mitochondrial redox signaling during apoptosis. J Bioenerg Biomembr 1999; 31: 327-34.

Cande C, Vahsen N, Metivier D, et al. Regulation of cytoplasmatic stress granules by apoptosis-inducing factor. J Cell Sci 2004; 117: 4461-8.

Canvin JR, Marvin AP, Sivakumaran M. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. J Infect Dis 1995; 172: 119-23.

Carmeli C, Lifshitz Y. Nucleotide transport in *Rhodobacter capsulatus*. J Bacteriol 1989; 171: 6521-5.

Carter BZ, Gronda M, Wang Z, Welsh K, Pinilla C, Andreeff M et al. Small-molecule XIAP inhibitors derepress downstream effector caspases and induce apoptosis of acute myeloid leukemia cells. Blood 2005; 105: 4043-50.

Cockeran R, Theron AJ, Steel HC. Proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils. J Infect Dis 2001; 183: 604-11.

Cockeran R, Durandt C, Feldman C, Mitchell TJ, Anderson R. Pneumolysin activates the synthesis and release of interleukin-8 by human neutrophils in vitro. J Infect Dis 2002; 186: 562-5.

Colino J, Snapper CM. Two distinct mechanisms for induction of dendritic cell apoptosis in response to intact *Streptococcus pneumoniae*. J Immunol 2003; 171: 2354-65.

Crompton M, Kunzi M, Carafoli E. The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Evidence for a sodium-calcium carrier. Eur J Biochem 1977; 79: 549-58.

Crompton M, Heid I. The cycling of calcium, sodium, and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. Eur J Biochem 1978; 91: 599-608.

Crompton M. The regulation of mitochondrial calcium transport in heart. Curr Top Membr Transp 1985; 25: 231-76.

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem J 1999; 341: 233-49.

Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. Gene Dev 1998; 12: 1551-70.

Denton RM, McCormack JG. Ca^{2+} transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. Am J Physiol 1985; 249: E543-54.

Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases. Nature 1997; 388: 300-4.

Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins: suppressors of apoptosis. Gene Dev 1999; 13: 239-52.

Duane PG, Rubins JB, Weisel HR, Janoff EN. Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. Infect Immun 1993; 61: 4392-7.

Everett H, Barry M, Lee SF, Sun XJ, Graham K, Stone J. M11L: a novel mitochondria-localized protein of myxoma virus that blocks apoptosis of infected leukocytes. J Exp Med 2000; 191: 1487-98.

Feldman C, Mitchell TJ, Andrew PW. The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. Microb Pathog 1990; 9: 275-84.

Ferrante A, Rowan-Kelly B, Paton JC. Inhibition of in vitro human lymphocyte response by the pneumococcal toxin pneumolysin. Infect Immun 1984; 46: 585-9.

Ferreira CG, van der Valk P, Span SW, et al. Assessment of IAP (inhibitor of apoptosis) proteins as predictors of response to chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer patients. Ann Oncol 2001; 12: 799-805.

Friedland IR, Paris MM, Hickey S. The limited role of pneumolysin in the pathogenesis of pneumococcal meningitis. J Infect Dis 1995; 172: 805-9.

Gao G, Dou QP. N-terminal cleavage of Bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes Bcl-2-independent cytochrome c release and apoptotic cell death. J Cell Biochem 2000; 80: 53-72.

Geelen S, Bhattacharyya C, Tuomanen E. The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. Infect Immun 1993; 61: 1538-43.

Gilbert RJ, Crane D, Morgan PJ, et al. The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae.* J Mol Biol 1998; 284: 449-61.

Gilbert RJ, Jimenez JL, Chen S. Two structural transitions in membrane pore formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of *Streptococcus pneumoniae*. Cell 1999; 97: 647-55.

Goldstein P, Ojcius DM, Young JD. Cell death mechanisms and the immune system. Immunol Rev 1991; 121: 29-65.

Goldstone TP, Roos I, Crompton M. Effects of adrenergic agonists and mitochondrial energy state on the Ca^{2+} transport systems of mitochondria. Biochemistry 1987; 26: 246-54.

Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. Anal Biochem 1994; 218: 314-9.

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

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science 1998; 281: 1309-12.

Hajnoczky G, Davies E, Madesh M. Calcium signaling and apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 2003; 304: 445-54.

Hansen TM, Nagley P. AIF: a multifunctional cog in the life and death machine. Sci STKE 2003; 193: E31.

Hedge R, Srinivasula SM, Yhang Y, et al. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts IAP-caspase interaction. J Biol Chem 2002; 277: 432-8.

Herrington J, Park YB, Babcock DF, Hille B. Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca^{2+}-loads from rat adrenal chromaffin cells. Neuron 1996; 16: 219-28.

Hirst RA, Sikand KS, Rutman A, Mitchell TJ, Andrew PW, O'Callaghan C. Relative roles of pneumolysin and hydrogen peroxide from *Streptococcus pneumoniae* in inhibition of ependymal ciliary beat frequency. Infect Immun 2000; 68: 1557-62.

Hofmann HS, Simm A, Hammer A, Silber RE, Bartling B. Expression of inhibitors of apoptosis (IAP) proteins in non-small cell human lung cancer. J Cancer Res Clin Oncol 2002; 128: 554-60.

Huang DC, Strasser A. BH3 - only proteins - essential initiators of apoptotic cell death. Cell 2000; 103: 839-42.

Huang Y, Park Y, Rich RL, Segal D, Myszka DG, Wu, H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. Cell 2001; 104: 781-90.

Jacobson J, Duchen MR. Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes-requirement for stored Ca^{2+} and sustained opening of the permeability transition pore. J Cell Sci 2002; 115: 1175-88.

Jendrossek V, Grassmé H, Müller I, Lang V, Gulbins E. *Pseudomonas aeruginosa* induced apoptosis involves mitochondria and stress-activated protein kinases. Infect Immun 2001; 69: 2683-5.

Johnston RB Jr. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. Rev Infect Dis 1991; 13: S509-17.

Jounblat R, Kadioglu A, Mitchell TJ, Andrew PW. Pneumococcal behavior and host response during bronchopneumonia are affected by the cytolytic and complement-activating activities of pneumolysin. Infect Immun 2003; 71: 1813-9.

Kadioglu A, Taylor S, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, Andrew PW. Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. Infect Immun 2002; 70: 2886-90.

Kadurugamuwa JL, Hengstler B, Bray MA, Zak O. Inhibition of complement-factor-5a-induced inflammatory reactions by prostaglandin E_2 in experimental meningitis. J Infect Dis 1989; 160: 715-9.

Kaetzel CS. Polymeric Ig receptor: defender of the fort or Trojan horse? Curr Biol 2001; 11: R35-8.

Kastenbauer S, Angele B, Sporer B, Pfister HW, Koedel U. Patterns of protein expression in infectious meningitis: a cerebrospinal fluid protein array analysis. J Neuroimmunol 2005; 164: 134-9.

Klein JA, Longo-Gues CM, Rossmann MP, et al. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. Nature 2002; 419: 367-74.

Klein M, Paul R, Angele B, Popp B, Pfister HW, Koedel U. Protein expression pattern in experimental pneumococcal meningitis. Microbes Infect 2006; 8: 974-83.

Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. Free Radic Biol Med 1994; 16: 149-56.

Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. Immunol Today 1997; 18: 44-51.

Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. Science 2002; 297: 1352-4.

Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature 1994; 371: 346-7.

Leib SL, Kim YS, Chow LL, Sheldon RA, Täuber MG. Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. J Clin Invest 1996; 98: 2632-9.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. J Exp Med 1997; 185: 1481-6.

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

Li H, Zhu H, Xu CJ, J. Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell 1998; 9: 491-501.

Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. Nature 2001; 412: 95-9.

Li W, Sun L, Liang Q, Wang J, Mo W, Zhou B. Yeast AMID homologue Ndilp displays respiration-restricted apoptotic activity and is involved in chronological aging. Mol Biol Cell 2006; 17: 1802-11.

Liles WC. Apoptosis: role in infection and inflammation. Curr Opin Infect Dis 1997; 10: 165-70.

Lipton SA, Nicotera P. Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. Cell Calcium 1998; 23: 165-71.

Lipton SA, Bossy-Wetzel E. Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity. Cell 2002; 111: 147-50.

Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, et al. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. Nature 2000; 408: 1004-8.

Lock RA, Hansman D, Paton JC. Comparative efficacy of autolysin and pneumolysin as immunogens protecting mice against infection by *Streptococcus pneumoniae*. Microb Pathog 1992; 12: 137-43.

Lopez R, Garcia E, Garcia P, Garcia JL. The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins? Microb Drug Resist 1997; 3: 199-211.

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

Minta A, Kao JP, Tsien RY. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. J Biol Chem 1989; 264: 8171-8.

Mitchell TJ, Walker JA, Saunders FK, Andrew PW, Boulnois GJ. Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties. Biochem Biophys Acta 1989; 2007: 67-72.

Mitchell TJ, Andrew PW, Saunders FK, Smith AN, Boulnois GJ. Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein. Mol Microbiol 1991; 5: 1883-8.

Mitchell TJ, Andrew PW. Biological properties of pneumolysin. Microb Drug Resist 1997; 3: 19-26.

Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. Trends in Cell Biol 2006; 16: 265-72.

Monack DM, Mecsas J, Ghori N, Falkow S. Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 10385-90.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65: 55-63.

Movat H, Burrowes C, Cybulsky M, Dinarello C. Acute inflammation and a Shwartzman-like reaction induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. Am J Pathog 1987; 129: 463-76.

Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS. X-ray and NMR structure of human Bcl-x_L, an inhibitor of programmed cell death. Nature 1996; 381: 335-41.

Müller A, Hacker J, Brand BC. Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by *Legionella pneumophilia* infection. Infect Immun 1996; 64: 4900-6.

Müller A, Günther D, Düx F, Naumann M, Meyer TF, Rudel T. Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. EMBO J 1999; 18: 339-52.

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

Muller DP. Antioxidants in disease. Mechanisms and therapy. Neurol Dis 1997; 557-80.

Murphy KM, Streips UN, Lock RB. Bcl-2 inhibits a Fas induced conformational change in the Bax N-terminus and Bax mitochondrial translocation. J Biol Chem 2000; 275: 17225-8.

Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. Trends Biochem Sci 1997; 22: 299-306.

Paton JC, Lock RA, Hansman DJ. Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 1983; 40: 548-52.

Paton JB, Rowan-Kelly B, Ferrante A. Activation of human complement by the pneumococcal toxin, pneumolysin. Infect Immun 1984; 43: 1085-7.

Pfister HW, Feiden W, Einhäupl KM. Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. Results of a prospective clinical study. Arch Neurol 1993; 50: 575-81.

Pfister HW, Koedel U, Lorenzl S, Tomasz A. Antioxidants attenuate microvascular changes in the early phase of experimental pneumococcal meningitis in rats. Stroke 1992; 23: 1798-804.

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

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

Rayner CF, Jackson AD, Rutman A. Interaction of pneumolysin sufficient and -deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. Infect Immun 1995; 63: 442-7.

Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, et al. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. Cell 2001; 104: 791-800.

Rubins JB, Mitchell TJ, Andrew PW, Niewoehner DE. Pneumolysin activates phospholipase A in pulmonary artery endothelial cells. Infect Immun 1994; 62: 3829-36.

Rubins JB, Charboneau D, Paton JC, Mitchell TJ, Andrew PW, Janoff EN. Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. J Clin Invest 1995; 95: 142-50.

Rudel T, Schmid A, Benz R, Kolb HA, Lang F, Meyer TF. Modulation of *Neisseria* porin (PorB) by cytosolic ATP/GTP of target cells: parallels between pathogen accommodation and mitochondrial endosymbiosis. Cell 1996; 85: 391-402.

Sáez-Llorens X, Ramilo O, Mustafa MM, Mertsola J, McCracken GH Jr. Molecular pathophysiology of bacterial meningitis, current concepts and therapeutic implications. J Ped 1990; 116: 671-84.

Schimmer AD, Welsh K, Pinilla C, et al. Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad antitumor activity. Cancer Cell 2004; 5: 25-35.

Schmidt H, Heimann B, Djukic M, et al. Neuropsychological sequelae of bacterial and viral meningitis. Brain 2006; 129: 333-45.

Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 1984; 37: 67-75.

Shimizu S, Ide T, Yanagida T, Tsujimoto Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. J Biol Chem 2000; 275: 12321-5.

Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, et al. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. Mol Cell 2003; 11: 519-27.

Siebers A, Finlay BB. Models to study enteropathogenic bacteria: lessons learned from *Shigella*. Trends Microbiol 1995; 3: 207-9.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT. Measurement of protein using bichinconinic acid. Anal Biochem 1985; 150: 76-85.

Spreer A, Kerstan H, Bottcher T, Gerber J, Siemer A, Zysk G. Reduced release of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxone. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2649-54.

Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, et al. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. Nature 2001; 410: 112-6.

Stringaris AK, Geisenhainer J, Bergmann F, et al. Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. Neurobiol Dis 2002; 11: 355-68.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. J Exp Med 1999; 189: 381-94.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 1999/a; 397: 441-6.

Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. J Exp Med 2000; 192: 571-9.

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

Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, et al. Cleavage of lamin A by Mch2α but not CPP32: Multiple interleukin 1β-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. Proc Natl Acad Sci 1996; 93: 8395-400.

Täuber MG. Brain edema, intracranial pressure and cerebral blood flow in bacterial meningitis. Ped Infect Dis J 1989; 8: 915-7.

Thornberry NA, Rano T, Peterson E, et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. J Biol Chem 1997; 272: 17907-11.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science 1998; 281: 1312-6.

Tunkel AR, Wispelwey B, Scheld WM. Bacterial meningitis, recent advances in pathophysiology and treatment. Ann Int Med 1990; 112: 610-23.

Urbano A, Lakshmanan U, Choo PH, et al. AIF suppresses chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells. EMBO J 2005; 24: 2815-26.

Vahsen N, Cande C, Briere JJ, et al. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. EMBO J 2004; 4679-89.

Vahsen N, Cande C, Dupaigne P, et al. Physical interaction of apoptosis inducing factor (AIF) with DNA and RNA. Oncogene 2006; 25: 1763-74.

Van der Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-x_L regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. Cell 1997; 91: 627-37.

Van Loo G, Saelens X, Van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, van den Abeele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a russian roulette with more than one bullet. Cell Death Differ 2002; 9: 1031-42.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. Cell 2000; 102: 43-53.

Vincenz C, Dixit VM. Fas-associated death domain protein interleukin-1β-converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. J Biol Chem 1997; 272: 6578-83.

Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes Dev 2001; 15: 2922-33.

Wellmer A, Noeske C, Gerber J, Munzel U, Nau R. Spatial memory and learning deficits after experimental pneumococcal meningitis in mice. Neurosci Lett 2000; 296: 137-40.

Wellmer A, Zysk G, Gerber J. Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of *Streptococcus pneumoniae* in murine meningitis. Infect Immun 2002; 70: 6504-8.

Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. J Biol Chem 2001; 276: 48404-9.

Winkelstein JA, Tomasz A. Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal cell wall teichoic acid. J Immunol 1978; 120: 174-8.

Winter AJ, Comis SD, Osborne MP, et al. A role for pneumolysin but not neuraminidase in the hearing loss and cochlear damage induced by experimental pneumococcal meningitis in guinea pigs. Infect Immun 1997; 65: 4411-8.

Witzenrath M, Gutbier B, Hocke AC, et al. Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. Crit Care Med 2006; 34: 1947-54.

Wu M, Xu LG, Li X, Zhai Z, Shu HB. AMID, an apoptosis-inducing factor-homologous mitochondrion-associated protein, induces caspase-independent apoptosis. J Biol Chem 2002; 277: 25617-23.

Xie Q, Lin T, Zhang Y, Zheng J, Bonanno JA. Molecular cloning and characterization of a human AIF-like gene with ability to induce apoptosis. J Biol Chem 2005; 280: 19673-81.

Yang L, Mashima T, Sato S. Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine conjugated Smac peptide. Cancer Res 2003; 63: 831-7.

Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. Nature Reviews 2001; 2: 67-71.

Zangwill KM, Vadhelm CM, Vannier AM, Hemenway LS, Greenberg D, Ward JI. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in Southern California; implications for the design and conduct of a pneumococcal conjugate vaccine efficacy trial. J Infect Dis 1996; 174: 752-9.

Zhang JR, Mostov KE, Lamm ME, et al. The polymeric immunglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. Cell 2000; 102: 827-37.

Zychlinsky A, Sansonetti P. Apoptosis in bacterial pathogenesis. J Clin Invest 1997; 100: 493-6.

8. Danksagung

Für die Überlassung des Themas, und für die Betreuung möchte ich meinem Doktorvater Priv. Doz. Dr. Johann Sebastian Braun danken. Prof. Dr. Ulrich Dirnagl danke ich für die Möglichkeit in seiner Abteilung für Experimentelle Neurologie meine Experimente durchzuführen.

Mein Dank für die Einarbeitung in die Zellkultur und für viele praktische Hinweise geht an Dr. Dorette Freyer und Renate Gusinda. Weiterhin möchte ich Emilie Dagand für die technische Unterstützung und Gisela Duwe vom Institut für Anatomie der Charité für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen danken.

Zu guter Letzt danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung für Experimentelle Neurologie der Charité für die vielen Hilfen und für Anregungen sowohl wissenschaftlicher als auch praktischer Art.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Miriam Schickhaus, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: **Neurotoxizität von Pneumolysin - ein Mitochondrientoxin von *Streptococcus pneumoniae*** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe. Die benutzten Hilfsmittel und die verwendete Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 28.08.2008

Miriam Schickhaus

10. Lebenslauf

4.3.1969 in München geboren

Im Jahr *1988* Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Von *1991* bis *1993* Ausbildung zur Tierarzthelferin

Von *1996* bis *2004* Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin mit Abschluss des 3. Staatsexamens

Vollaprobation seit *7.10.2004*

August *2004* bis Juli *2005* als Pre-Registration House Officer in Grossbritannien in den Häusern Hull Royal Infirmary und Castle Hill Hospital in Kingston-upon-Hull in den Bereichen Chirurgie und Innere Medizin tätig.

Oktober *2005* bis Mai *2006* als Stationsärztin im Krankenhaus Angermünde im Bereich Psychiatrie / Suchtmedizin tätig.

Seit *1.7.2006* als Assistenzärztin im Krankenhaus St. Hedwig in Berlin im Bereich Anästhesie und Intensivmedizin tätig

11. Publikation

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