

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

DISSERTATION

Bakterielle Toxine sind wesentliche Mediatoren neuronaler Apoptose im neonatalen Meningitis-Modell

Zur Erlangung

des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

von Anja Reiß

aus Henningsdorf

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. Weber
 2. Prof. Dr. med. B. Spellerberg
 3. Prof. Dr. med. W. Brück

Datum der Promotion: 07.12.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	6
1.1	Die bakterielle Meningitis	6
1.1.1	Epidemiologie	6
1.1.2	Klinik	8
1.1.3	Pathogenese der Erkrankung	9
1.1.4	Die Erreger und ihre Toxine	12
1.1.4.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	12
1.1.4.2	Das Poren-formende Toxin beta-Hämolyisin/Zytolysin	13
1.1.4.3	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15
1.1.4.4	Das Poren-formende Toxin Pneumolysin	16
1.2	Apoptose	18
1.2.1	Definition und Bedeutung	18
1.2.2	Morphologische Charakteristika	19
1.2.3	Die Bedeutung der Caspasen während der Apoptose	19
1.2.4	Induktion und Regulation der Apoptose	20
1.3	Das neonatale Ratten-Meningitis-Modell	22
1.4	Hypothesen	23
2	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Bakterienstämme	24
2.1.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	24
2.1.2	beta-hämolyisierende Streptokokken der Gruppe B	24
2.2	Medien und Lösungen	24
2.2.1	Casein plus Yeast (C+Y-Medium)	25
2.2.2	Prä-C-Medium	25
2.2.3	Ergänzungsmedium	25
2.2.4	Adams-1-Lösung	26
2.2.5	Adams-2-Lösung	26
2.2.6	Adams-3-Lösung	26
2.2.7	Todd-Hewitt-Hefe-Mediums	27
2.3	Bakterienansätze	27
2.3.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	27
2.3.2	Beta-hämolyisierende Streptokokken der Gruppe B	28
2.4	Tierexperimentelles Modell	28
2.4.1	Induktion der Meningitis	28
2.4.2	Zisternalpunktion	29
2.4.3	Perfusionfixierung	30
2.4.3.1	Materialien und Lösungen	30
2.4.3.1.1	Phosphat-gepufferte Salz-Lösung (PBS)	30
2.4.3.1.2	Herstellung des Fixativs (PFA 4%)	30
2.4.3.2	Durchführung	31
2.4.4	Aufarbeitung der Gehirne für die histologische Untersuchung	31
2.4.4.1	Materialien und Lösungen	32
2.4.4.2	Entwässerung der Gehirne	32
2.4.4.3	Paraffineinbettung	32
2.4.5	Histologische Färbe-Methoden	33
2.4.5.1	Materialien und Lösungen	33

Inhaltsverzeichnis

2.4.5.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung)	33
2.4.5.3	Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte in absteigender Alkoholreihe	34
2.4.5.4	Färbung	34
2.4.5.5	Rehydrierung und Eindeckeln	34
2.4.6	“TdT-mediated d UTP-Biotin nick end labeling” (TUNEL-Methode)	35
2.4.6.1	Materialien und Lösungen	35
2.4.6.2	Prinzip	35
2.4.6.3	Protokoll DAB-TUNEL	36
2.4.7	Auswertung	37
2.4.7.1	Beurteilung des neuronalen Schadens im Kortex	37
2.4.7.2	Beurteilung des neuronalen Schadens im Gyrus dentatus	38
2.4.7.3	Angewandte statistische Verfahren	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Induktion der Meningitis durch Streptococcus pneumoniae, Streptococcus agalactiae und ihre Toxin-defizienten Mutanten	39
3.1.1	Beurteilung des klinischen Zustandes	39
3.1.1.1	Klinischer Score	39
3.1.1.2	Gewichtsverlauf	41
3.1.2	Nachweis der Meningitis	43
3.1.2.1	Beurteilung der Pleozytose	43
3.1.2.2	Nachweis der Vitalität der Bakterien durch Kultivierung auf Blutagarplatten	46
3.2	Pneumokokken und beta-hämolysierende Streptokokken der Gruppe B induzieren apoptotischen Zelltod kortikaler Neurone	48
3.3	Pneumokokken und beta-hämolysierende Streptokokken der Gruppe B induzieren apoptotischen Zelltod im Gyrus dentatus	52
3.4	Das Verteilungsmuster der Apoptose im Rahmen der Pneumokokken-Meningitis ist altersabhängig	55
4	DISKUSSION	58
4.1	Der Einfluss bakterieller Toxine auf Pleozytose und Bakterienwachstum im Liquor cerebrospinalis	58
4.2	Der Einfluss bakterieller Toxine auf den klinischen Verlauf der Meningitis	59
4.3	Der Einfluss bakterieller Toxine auf das Ausmass des neuronalen Schadens während der bakteriellen Meningitis	60
4.4	Die Rolle bakterieller Toxine in der Pathogenese des neuronalen Schadens	62
4.5	Der Einfluss des Alters auf die Ausprägung des neuronalen Schadens	64
4.6	Ausblick	66
5	ZUSAMMENFASSUNG	68
6	LITERATURVERZEICHNIS	70
7	LEBENS LAUF	91

8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	93
9	ERKLÄRUNG	95
10	DANKSAGUNG	96

1 EINLEITUNG

1.1 DIE BAKTERIELLE MENINGITIS

1.1.1 EPIDEMIOLOGIE

Die bakterielle Meningitis ist eine akute entzündliche Erkrankung der weichen Hirnhäute, Pia mater und Arachnoidea, und des von ihnen umschlossenen Liquorraums. Eine wesentliche Erkenntnis der klinischen und experimentellen Forschung der letzten Jahre ist, dass es im Rahmen dieser Erkrankung zu einer direkten Schädigung von Neuronen kommt. Je nach Alter und Vorerkrankungen der Patienten findet sich ein unterschiedliches Erregerspektrum. Die häufigsten Erreger einer bakteriellen Meningitis im Erwachsenenalter sind in Europa und Nordamerika *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* und *Haemophilus influenzae* [1]. Im Neugeborenen- und Säuglingsalter werden Meningitiden besonders häufig von beta-hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe B (GBS) [2,3], *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiellen* und anderen grampositiven Enterokokken verursacht [2,4], wobei sich in den letzten Jahren die Häufigkeit zugunsten der GBS verschoben hat [5]. Das Erregerspektrum ist in dieser Altersstufe wesentlich breiter als in anderen und weist große geographische Unterschiede auf [6]. So ist zum Beispiel *Streptococcus pneumoniae* ein häufiger Erreger der neonatalen Meningitis in Entwicklungsländern [7]. Die bakterielle Meningitis weist in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand des jeweiligen Landes eine Inzidenz von 0,2 - 2,66/1000 Lebendgeburten auf [6]. Das Erkrankungsrisiko liegt zwischen 5 und 75 % und steigt mit sinkendem Gestationsalter [8,9]. Insbesondere im Neugeborenenalter finden sich im Vergleich zu Erkrankungen bei Säuglingen und Kleinkindern eine höhere Letalität und Morbidität [6,10].

In der Neonatalperiode ist eine Meningitis selten die Erstmanifestation einer Erkrankung. In 25 Prozent der Fälle entsteht sie sekundär in Folge einer Sepsis [8], die mit einer Inzidenz von 1 - 8/1000 Lebendgeburten auftritt. Einerseits konnte durch die Entwicklung spezifischer Antibiotika die Mortalität der Erkrankung im Kindesalter in den letzten fünfzig Jahren auf unter zehn Prozent gesenkt werden [6], andererseits gelang es bisher jedoch nicht, das Auftreten neurologischer Spätkomplikationen wesentlich zu reduzieren, nach wie vor leiden etwa 20 - 58% der Kinder nach einer Meningitis unter neurologischen Folgeschäden [6]. Das Ausmaß und die Art der Defizite scheinen zum Teil vom Erreger abzuhängen. So sind Kinder, die eine *E. coli*-induzierte Meningitis

überlebt haben, häufiger von Langzeitschäden betroffen als Kinder nach einer GBS-induzierten Meningitis [6,11]. Das Spektrum der neurologischen Störungen ist groß und beinhaltet zum Beispiel eine Verzögerung der Sprachentwicklung, die Ausbildung peripherer Paresen oder die Manifestation epileptischer Anfälle. Weitere Spätfolgen sind ausgeprägte Lerndefizite und psychomotorische Retardierung [12]. Mit dem Auftreten von sensorischen Hörstörungen ist in etwa 10 % der Fälle zu rechnen [13]. Sowohl in verschiedenen *in-vivo*- und *in-vitro*-Modellen, als auch in humanem Autopsiematerial konnte gezeigt werden, dass es nach einer Meningitis zum permanenten Verlust kortikaler und hippocampaler Neurone kommt [14]. Apoptotischer Neuronenuntergang im Kortex, Hippokampus oder Innenohr ist vermutlich die Ursache für die verschiedene neurologische Defizite nach einer Meningitis [14,15,16,17].

Bei der Entstehung der neonatalen Sepsis lassen sich zwei Manifestationszeitpunkte unterscheiden. Ihnen entsprechend spricht man von einer Früh- oder early-onset- und einer Spät- oder late-onset-Form [8]. Die Frühsepsis tritt innerhalb der ersten fünf Lebenstage auf. Die Erreger (*S. agalactiae*, *E. coli*, *Klebsiellen*, *Enterokokken*, *Listeria monocytogenes*, Anaerobier) stammen aus der Rektovaginalflora der Schwangeren. Bei etwa 50 % der erkrankten Kinder findet sich anamnestisch ein vorzeitiger Blasensprung. Dieser ist häufig Folge eines Amnioninfektionssyndroms (AIS), welches meist durch Aszension von Keimen der Rektovaginalflora verursacht wird. Bei bloßer Besiedlung der Mutter mit GBS kommt es bei etwa 0,5 – 1 % der Neugeborenen zu einer durch Streptokokken der Gruppe B ausgelösten Sepsis [18], bei zusätzlich bestehendem Amnioninfektionssyndrom steigt die Infektionshäufigkeit um das Zehnfache an. Ein besonders hohes Infektionsrisiko haben Frühgeborene vor der 32. Schwangerschaftswoche (SSW).

Tritt die Infektion nach dem fünften Lebenstag auf, spricht man von einer Spätsepsis (late-onset-Form). Häufige Erreger sind hier Koagulase-negative Staphylokokken, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter* und *Staphylococcus aureus*. Die Übertragung der Krankheitserreger erfolgt horizontal aus der Umgebungsflora durch das Pflegepersonal oder die Eltern. Gelegentlich kommt es zu einer endogenen Infektion des Kindes durch eine Besiedlung mit Keimen. Risikofaktoren für beide Formen der neonatalen Sepsis sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Risikofaktoren für die Entstehung einer neonatalen Sepsis

Mütterliche Risikofaktoren	Kindliche Risikofaktoren
Amnioninfektionssyndrom (AIS)	Unreife und Hypotrophie
Fieber	Atemnotsyndrom
früher Blasensprung (>18h)	Beatmung
Vorzeitige Wehen	Parenterale Ernährung
Protrahierte Geburt	Intravasale Katheter
Grünes Fruchtwasser	Mangel humoraler Antikörper
Mütterliche Infektionen	Hautwunden, Schleimhautdefekte

Streptococcus pneumoniae und *Neisseria meningitidis* sind die häufigsten Erreger einer bakteriellen Meningitis im Säuglings- und Kleinkindalter [1,19]. Die bakterielle Meningitis entwickelt sich häufig sekundär nach einer Otitis media, die eine Hauptmanifestationsform einer Pneumokokkeninfektion bei Kindern im Alter bis zu zwei Jahren darstellt [20,21]. Die Infektion mit Pneumokokken verläuft in der Regel endogen, nur sehr selten wird sie von Mensch zu Mensch übertragen. Die Eintrittspforte ist der obere Respirationstrakt. Dort kommt es zu einer Vermehrung der Erreger im Epithel. Auf bisher nicht vollständig geklärte Weise gelangen die Erreger dann in die Paukenhöhle, die Nasennebenhöhlen, die Lungen und lösen dort das entsprechende Krankheitsbild aus. Die vermutlich Pneumolysin-bedingte Zerstörung der Zilien-tragenden Epithelzellen erleichtert die Einwanderung der Bakterien in die verschiedenen Gewebe.

Einen zweiten Gipfel haben Pneumokokkenerkrankungen bei Patienten in hohem Lebensalter. Hier manifestieren sie sich typischerweise als Lobärpneumonie [22]. Bei immunsuppremierten Patienten kann es unabhängig vom Lebensalter zu schweren Verläufen bei Infektionen mit *S. pneumoniae* kommen. In diesem Patientenkollektiv findet sich ebenfalls eine erhöhte Sterblichkeit [23].

1.1.2 KLINIK

Die Meningitis kann sowohl als Folge der Früh-, als auch der Spätsepsis auftreten, ist aber wesentlich häufiger Folge der Spätsepsis [8]. Anders als die Meningitis im Kindes- und Erwachsenenalter manifestiert sich eine Meningitis bei Früh- und Neugeborenen nicht mit den typischen Symptomen des meningealen Syndroms wie Nackensteifigkeit, Fieber und Kopfschmerzen, vielmehr treten unspezifische klinische Zeichen wie Hypotonie, blasses Hautkolorit und eine Verlängerung der peripheren

Rekapillarierungszeit über drei Sekunden als Folge einer verminderten Hautperfusion bei beginnender bzw. manifester Zentralisation auf. Des Weiteren findet sich ein gehäuftes Auftreten von Bradykardien und Atemstörungen bis hin zu Apnoen. Hinweisend auf eine Meningitis können eine gespannte Fontanelle, Erbrechen, epileptische Anfälle oder in seltenen Fällen auch Hemiparesen sein.

1.1.3 PATHOGENESE DER ERKRANKUNG

Während der Meningitis kommt es unter anderem zur Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und zur Neurodegeneration [24]. Man unterscheidet derzeit verschiedene Mechanismen, die zu Zellschädigungen im zentralen Nervensystem (ZNS) und zum Tod der Patienten führen:

1. die lokale Inflammation als Antwort des Immunsystems auf die Invasion der Erreger, die mit Leukozytenextravasation, Vaskulitis, Hirnödemen und sekundärer Ischämie einhergeht,
2. die direkte Wirkung bakterieller Toxine auf zerebrale Neurone.

Die bakterielle Meningitis entwickelt sich typischerweise in vier verschiedenen Phasen [12,24,25]:

1. nasopharyngeale Kolonisation
2. Invasion des intravasalen Raums mit Entwicklung einer Bakteriämie
3. Penetration der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und Besiedelung der Meningen
4. Inflammation der Meningen und des Gehirns

Zunächst besiedelt der Erreger während der Geburt die Haut, die Schleimhäute des Ohres und des Nasopharynx, die Konjunktiven oder die Nabelschnur. Von dort aus dringen, zum Beispiel nach einer Verletzung der Haut bzw. der Schleimhaut oder nach Anlage eines Nabelvenenkatheters, eines zentralen oder peripheren Gefäßzugangs, Erreger in die Blutbahn ein. Nicht selten findet sich auch eine bakterielle Superinfektion bei bestehender viraler Erkrankung, die eine gesteigerte Vulnerabilität des Epithels verursacht und dadurch die Absiedlung der Bakterien begünstigt. Viele Bakterien besitzen spezielle Oberflächenbestandteile wie Pili, Polysaccharide oder Proteine, die eine Adhäsion an die Mukosa erleichtern [26]. Es erfolgt eine Passage der Bakterien durch die Mukosa und die Penetration der subepithelialen Blutgefäße. Der Durchtritt der Erreger durch die Gewebsschichten kann durch unterschiedliche Mechanismen

erfolgen. *Neisseria meningitidis* und GBS werden beispielsweise mittels Endozytose in Membran-gebundenen Vakuolen durch die Zellen der Mukosa transportiert [12,24,26], während *Haemophilus influenzae* zwischen den Zellen hindurch migriert [26]. *S. pneumoniae* bindet an den PAF-Rezeptor und gelangt an diesen gebunden mittels Transzytose durch das Endothel, nachfolgend kommt es dann zur hämatogenen Verbreitung der Bakterien. Im Falle der Meningitis gelangen die Erreger über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) in den Liquorraum. Dort kommt es zu einer unkontrollierten Vermehrung, da im Liquorraum zu Beginn der Invasion nur wenige Abwehrmechanismen vorhanden sind. Phagozyten, Komplementfaktoren und Immunglobuline können die intakte BHS kaum penetrieren. Es kommt je nach Erreger zur Freisetzung verschiedener Zellwandbestandteile wie dem Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien, Teichonsäuren, Peptidoglykanen, aber auch Bakterien-eigener Toxine wie dem beta-Hämolysin der GBS oder dem Pneumolysin und Wasserstoffperoxid der Pneumokokken. Dies geschieht entweder durch aktive Sekretion oder als Folge einer Autolyse der Bakterien [27,28,29]. Die freigesetzten Bakterienbestandteile aktivieren meningeale Makrophagen und Mastzellen und führen zur Einwanderung von Leukozyten, es entwickelt sich eine ausgeprägte granulozytäre Entzündungsreaktion im Liquorraum [30]. Diese überwiegend neutrophile Entzündung stimuliert Astrozyten, Mikrogliazellen und die Epithelzellen des Plexus choroideus zur Freisetzung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine [31]. Die Freisetzung der Zyto- und Chemokine führt zu einer Reihe von verschiedenen Kaskaden, an deren Ende der Tod der Bakterien, aber auch der der Wirtszellen im ZNS steht. Letzterer scheint zum Teil für die ausgeprägten Folgeerscheinungen nach einer Meningitis verantwortlich zu sein. Die Freisetzung von Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha) bewirkt zum einen eine vermehrte Einwanderung von Granulozyten und zum anderen die Freisetzung verschiedenster Substanzen wie Prostaglandinen, dem Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF), Stickstoffmonoxid (NO) oder freien Sauerstoffradikalen. Diese verschiedenen Mediatoren führen teilweise zur Eliminierung der Erreger, haben aber auch Effekte auf die Funktion körpereigener Systeme. So kommt es zu einer ausgeprägten Störung der BHS, die wiederum eine Veränderung der zerebralen Durchblutung nach sich zieht. Die gesteigerte Permeabilität der BHS führt zu einer vermehrten Extravasation von Flüssigkeit, die mit der Ausbildung eines vasogenen Hirnödems einhergeht [32] und sich klinisch in einer Erhöhung des intrakraniellen Drucks manifestiert. Die Steigerung des intrakraniellen Drucks [33] führt,

kombiniert mit einer gestörten Blutflussregulation, zu diffusen hypoxischen Hirnschäden [34].

Es kommt auch zu einer direkten Beteiligung der Gefäße in Form von Vasospasmen und Vaskulitis mit Ausbildung von Mikrothromben und nachfolgend zu ischämischen Infarkten [35,36,37]. Diese Infarkte können sich klinisch als sensomotorische Störungen oder kortikale Blindheit widerspiegeln. Somit ist das vasogene Hirnödem mit seinen Folgeerscheinungen auch wesentlich an der Pathogenese der Langzeitschäden der Patienten beteiligt.

Das entstehende Hirnödem kann man bei den Neugeborenen sehr einfach mittels Ultraschall durch die offene Fontanelle nachweisen. Man findet häufig eine Einengung der Ventrikel mit begleitender Ventrikulitis, Infarzierungen des Hirngewebes und die nachfolgende Ausbildung von Zysten [38].

Es kann jedoch auch zu einer direkten Schädigung der Neurone durch bakterielle Faktoren kommen. Für Pneumolysin, das Poren-formende Toxin der Pneumokokken, ist dieser direkt toxische Effekt auf Neurone des Hippokampus *in-vitro* und *in-vivo* beschrieben [39]. Der neuronale Schaden ist also das Ergebnis einer Vielzahl von Ereignissen, die im Rahmen der bakteriellen Meningitis ablaufen.

Verschiedene *in-vivo*- und *in-vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, dass im Rahmen der Meningitis zwei verschiedene Formen des Zelltodes auftreten [15,40]. Zellen sterben entweder durch Nekrose oder Apoptose [41]. Die Art des Zelltodes hängt von verschiedenen Faktoren wie dem Alter des Wirts, der betroffenen Hirnregion und dem Erreger ab.

Apoptotischer Zelltod wird insbesondere im Bereich des Hippokampus, einer für das Lernen und Gedächtnis verantwortlichen Hirnregion beobachtet [42]. Dort ist insbesondere der Gyrus dentatus betroffen [15,40]. In Untersuchungen an humanem Autopsiematerial konnte in 70 Prozent der Fälle apoptotischer Zelltod im Gyrus dentatus nachgewiesen werden [14]. Eine Untersuchung an Überlebenden zeigte die Atrophie des Hippokampus [43]. Diese Hippokampus-Atrophie könnten das morphologische Korrelat der bei den Patienten zu beobachteten Lern- und Gedächtnisstörungen sein.

Nekrotischen Zelltod findet man besonders in den Regionen CA1-CA4 des Hippokampus sowie im Kortex [40,44]. Die Nekrosen im Kortex lassen sich vermutlich auf vaskulitische Veränderungen mit nachfolgender Ischämie zurückführen, denn die nekrotischen Zellen liegen häufig im Bereich kortikaler Infarkte [40].

1.1.4 DIE ERREGER UND IHRE TOXINE

1.1.4.1 *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Streptococcus agalactiae gehört zu den beta-hämolisierenden Streptokokken der Gruppe B (GBS). Der grampositive Erreger ist häufig Ursache von Harnwegsinfekten, Sepsis, Wund- und Weichteilinfektionen. Besonders häufig sind Erwachsene mit Diabetes mellitus, Immundefekten oder malignen Erkrankungen betroffen [45,46]. *S. agalactiae* ist der häufigste Erreger einer Sepsis bzw. Meningitis bei Neugeborenen [2,3]. Streptokokken der Gruppe B lassen sich bei etwa 16 - 30 Prozent der schwangeren und nicht schwangeren Frauen in Vaginal- und Rektalabstrichen nachweisen [47,48,49]. Die Trägerinnen sind zumeist asymptomatisch, haben jedoch ein höheres Risiko, eine Frühgeburt zu erleiden [50]. Während der Geburt kommt es in etwa 50 - 70 Prozent der Fälle zu einer Übertragung der Streptokokken auf das Neugeborene [50] und zu dessen Besiedelung. B-Streptokokken sind mit einer Inzidenz von etwa 35 Prozent weltweit die häufigsten Erreger von Sepsis, Meningitis und Pneumonie bei Neonaten [2,3], es gibt jedoch deutliche regionale Unterschiede. Diese könnten durch verschiedene Faktoren wie z.B. die Art der intrapartualen Antibiotika-Therapie (generelles Screening aller Schwangeren in der späten Schwangerschaft vs. Risiko-basierter Applikation) sowie ethnische und genetische Unterschiede in den verschiedenen Populationen, bedingt sein.

Ende der 90-ziger Jahre wurde in den USA mit der Einführung der prophylaktischen präpartualen Antibiotika-Therapie aller Schwangeren mit GBS-Besiedelung begonnen. Dadurch konnte dort die Inzidenz einer Early onset-Sepsis von 1,7 / 1000 Lebendgeburten auf 0,8 Fälle pro 1000 Lebendgeburten gesenkt werden[51]. In England, wo eine Risiko-basierte Antibiotika-Therapie durchgeführt wird, liegt die Inzidenz bei 0,72 Fällen pro 1000 Lebendgeburten [52], in den Niederlanden bei 1,9 Fällen pro 1000 Lebendgeburten [53]. Zwischen 2001 und 2003, nach Einführung der generellen Antibiotika-Prophylaxe, wurde in Deutschland erstmals eine prospektive Multicenterstudie zur Inzidenz, Morbidität und Mortalität von Erkrankungen mit Streptokokken der Gruppe in den ersten drei Lebensmonaten durchgeführt. Die dabei erhobenen Daten sind mit denen aus den USA Stammenden vergleichbar. Die Inzidenz der GBS-Infektion lag im untersuchten Zeitraum bei 0,47 Fällen pro 1000 Lebendgeburten. In 60 Prozent der Fälle manifestierte sich die Erkrankung als Early onset-Sepsis, dabei war eine Meningitis in 16 Prozent der Fälle nachweisbar, beim

Auftreten einer Late onset-Sepsis war eine Meningitis in etwa 60% Prozent der Fälle nachweisbar [54].

In den letzten Jahren ergaben sich viele neue Erkenntnisse über die Pathogenese von GBS-Erkrankungen. Es gelang, einige Virulenzfaktoren des Erregers zu identifizieren und charakterisieren. Eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Infektion scheint die Kapsel des Erregers zu spielen. Alle aus Abstrichen isolierten GBS waren bekapselt [55]. Bisher ist es gelungen, neun verschiedene Kapselpolysaccharidserotypen zu identifizieren. Die unterschiedlichen Serotypen sind für die geographischen Inzidenzunterschiede und das Auftreten bestimmter Krankheitsbilder in den verschiedenen Altersstufen verantwortlich [56]. Auslöser der neonatalen Sepsis bzw. Meningitis ist vorwiegend der Erreger mit dem Kapselpolysaccharid Typ III [56,57]. Die Kapsel hat antiphagozytäre Eigenschaften [58] und enthält Lipoteichonsäure und Peptidoglykane [59]. Der vermutlich wichtigste Virulenzfaktor der GBS ist das beta-Hämolysin/Zytolysin (beta-H/Z). Das Toxin lässt sich bei 99 Prozent der isolierten B-Streptokokken nachweisen [55]. Es führt zur Auflösung von Lungenepithel- und Endothelzellen und zerstört somit deren Barrierefunktion. Die Invasion der Keime ist damit deutlich erleichtert [60,61]. Ein weiterer Faktor, der eine Rolle bei der Überwindung körpereigener Barrieren zu spielen scheint, ist die Hyaluronatlyase, ein Enzym, das Hyaluronsäure, einen Hauptbestandteil von Bindegewebe, spaltet [62]. GBS produzieren außerdem cAMP-Faktor, ein extrazelluläres Protein, das in Zellmembranen oligomerisiert, kleine Poren bildet und somit ebenfalls die Lyse der Zellen triggert [63].

1.1.4.2 DAS POREN-FORMENDE TOXIN BETA-HÄMOLYSIN/ZYTOLYSIN

Beta-Hämolysin/Zytolysin ist ein Sauerstoff-stabiles, vermutlich Membran-gebundenes Toxin. Es wird von den meisten *S. agalactiae*-Stämmen gebildet und ist vermutlich für die Entstehung des die Bakterienkultur umgebenden Hämolysehof auf Blutagarplatten verantwortlich. Diese Form der Hämolyse wird auch beta-Hämolyse genannt [64,65]. Es gibt Hinweise darauf, dass die Bildung des β -Hämolysins ist vom Vorhandensein des *cyl*-Operon abhängig ist, dabei scheint insbesondere *cylA* und *cylB* eine entscheidende Rolle zu spielen [66,67]. Verschiedene *in-vitro*-Untersuchungen an und mit isogenetischen hyper- und nicht hämolytischen Mutanten des Erregers haben zu neuen Erkenntnissen über die Rolle dieses Toxins in

der Pathogenese typischer GBS-induzierter Erkrankungen geführt. So konnte gezeigt werden, dass isogenetische, nicht hämolysierende Mutanten weitaus weniger virulent sind als hyperhämolytische Mutanten [68]. Die Letalität einer GBS- Erkrankung korreliert eng mit der Menge des freiwerdenden Toxins [69]. Beta-H/Z ist ein pluripotenter Virulenzfaktor, der vermutlich zur Zellschädigung durch Zytolyse führt und durch Induktion von Inflammation wesentlich an der Pathogenese der GBS-Erkrankungen beteiligt zu sein scheint [70,71]. Die beta-H/Z-Produktion korreliert mit der Schädigung von Lungenepithelzellen, zerebralen Endothelzellen und Makrophagen durch Zytolyse [72,73]. Das Toxin induziert die Transkription der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS), triggert die Produktion und Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus Makrophagen [74] und kann deren apoptotischen Zelltod auslösen. In geringen, nicht lytischen Dosen begünstigt beta-H/Z die Invasion der Streptokokken in Lungenepithelzellen und triggert die Freisetzung von Interleukin-8 (IL-8) aus neutrophilen Granulozyten [75]. Das Toxin führt auch zur Freisetzung von Interleukin-6 (IL-6), einem Hauptmediator für die Produktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber [69]. Beta-H/Z induziert die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Gene und Adhäsionsmoleküle in Zellen der Blut-Hirn-Schranke, triggert dadurch die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und somit die Inflammation während der GBS-Meningitis. In Untersuchungen an zerebralen Endothelzellen konnte kürzlich ein direkt zytotoxischer Effekt von beta-H/Z nachgewiesen werden [76]. Das Toxin wirkt auch direkt zytolytisch auf Makrophagen und neutrophile Granulozyten und kann so der körpereigenen Abwehr entgegenwirken. Bei Verwendung beta-H/Z-defizienter Mutanten zeigte sich eine schnellere Eliminierung der Bakterien aus dem Organismus der Versuchstiere [77,78]. Ähnlich wie das Pneumolysin der Pneumokokken scheint das Toxin Temperatur- und Konzentrationsabhängig Poren in die Zellmembranen der Zielzellen zu bilden [79]. In Experimenten mit murinen Makrophagen konnte gezeigt werden, dass beta-H/Z für Defekte in der Zellmembran verantwortlich zu sein scheint, des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die durch das Toxin induzierte Apoptose vom Einstrom extrazellulären Kalziums abhängig zu sein scheint. Bei Bindung des extrazellulären Kalziums durch Chelatoren wurde dessen Einstrom in die Zelle verhindert, es ließ sich keine Apoptose nachweisen [80]. Die Virulenz des Toxins kann durch das im Surfactant enthaltene Protein Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) beeinträchtigt werden [60,81]. Das könnte erklären, warum Streptokokkenerkrankungen gerade bei Frühgeborenen mit Surfactantmangel besonders schwer verlaufen. In diesem Patientenkollektiv ist bis

zur Vollendung der 34. Schwangerschaftswoche die Surfactantkonzentration aufgrund mangelnder Synthese sehr gering.

1.1.4.3 STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Streptococcus pneumoniae gehört ebenfalls zur Gruppe der Streptokokken und lässt sich hier der alpha-hämolyisierenden Untergruppe zuordnen. Der grampositive Erreger lagert sich typischerweise paarweise zusammen und wurde deshalb früher auch als *Diplococcus pneumoniae* bezeichnet. Mit einer Größe von etwa 2 µm sind Pneumokokken gerade noch lichtmikroskopisch sichtbar. Im Jahr 1881 wurden sie erstmals von G. M. Sternberg und L. Pasteur isoliert. *S. pneumoniae* kommt bei Menschen und verschiedenen Säugetierarten als Bestandteil der Standortflora des Nasen- und Rachenraums vor. Etwa 40 – 70 % der Bevölkerung tragen Pneumokokken in der Rachenschleimhaut, die Träger stellen jedoch keine direkte Infektionsquelle dar, da es sich in der Regel um unbekapselte, nicht pathogene Stämme handelt. Einer der Hauptvirulenzfaktoren von *S. pneumoniae* ist die Kapsel. Nur bekapselte Pneumokokken-Stämme sind virulent. Dabei handelt es sich um eine aus Polysacchariden bestehende Struktur, die einen Schutz gegenüber Phagozytose durch Granulozyten und Makrophagen sowie Komplementinaktivierung [82,83,84] darstellt. Innerhalb der Pneumokokkenfamilie lassen sich allein mehr als neunzig verschiedene Kapsel-Polysaccharide nachweisen [85]. Zehn der über 90 Kapseltypen zeichnen sich durch eine besonders hohe Virulenz aus [21] und sind für über 80 Prozent der Pneumokokkeninfektionen im Kindesalter verantwortlich. Die Virulenz des Erregers steht in direktem Verhältnis zur Dicke der Kapsel. Nach Angaben der WHO stellen Pneumokokken, die etwa zwei Millionen Todesfälle jährlich bedingen, nach *Plasmodium spp.* den zweithäufigsten Krankheitserreger dar [86]. Pneumokokken produzieren Autolysin. Es ist auf der Kapsel der Erreger lokalisiert und liegt zunächst in seiner inaktiven Form vor. Die Störungen des Zellwandstoffwechsels, zum Beispiel durch Nährstoffmangel oder Antibiotika, haben eine Aktivierung des Proteins, die Auflösung der Muringervernetzung und die Lyse der Bakterien zur Folge. Des Weiteren produziert *S. pneumoniae* ein intrazelluläres Zytolysin, das Pneumolysin [87]. Dieses Polypeptid wird nach der oben beschriebenen Autolyse vermehrt freigesetzt [88,89].

1.1.4.4 DAS POREN-FORMENDE TOXIN PNEUMOLYSIN

Poren-formende Toxine stellen die größte Gruppe bakterieller Toxine dar. Neben dem Toxin der Listerien, Clostridien und Bacillus-Spezies gehört Pneumolysin zur Familie der Thiol-aktivierten Toxine [90]. Der Name ist auf frühere Theorien zurückzuführen, die davon ausgingen, dass die Aktivierung der Toxine durch Addition eines Thiol-reduzierenden Restes geschieht. In neueren Untersuchungen konnte diese Theorie nicht bestätigt werden [91]. Allen Toxinen dieser Familie ist die Bindung wasserlöslicher Monomere an den Cholesterolrezeptor, die nachfolgende Oligomerisation und anschließende Porenbildung in der Zellmembran mit folgender Lyse der Zelle gemein. Die Tatsache, dass Pneumokokken ein Hämolysin produzieren, wurde erstmals im Jahre 1905 von Libman beobachtet. Eine erste Charakterisierung des Pneumolysins gab es in den dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts. Shumway und Mitarbeiter beschrieben 1958 die Rolle des Pneumolysins in der Pathogenese von Pneumokokkenerkrankungen. Sie beobachteten die Bildung von Sphärozyten und eine Verminderung der osmotischen Resistenz von Kaninchen-Erythrozyten während einer Pneumokokkenerkrankung. Durch spätere Versuche mit gereinigtem Pneumolysin konnten die Beobachtungen verifiziert werden [92]. Pneumolysin ist ein hydrophiles, aus 471 Aminosäuren bestehendes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 53 kDa. Das Toxin, welches im Zytosol der Pneumokokken lokalisiert ist, liegt hier zum größten Teil in Form von Monomeren, in geringen Konzentrationen auch als Pneumolysindimer vor [90] und wird vermehrt nach Lyse des Bakteriums freigesetzt. Dabei kann die Lyse durch Aktivierung des Bakterien- eigenen Autolysin oder durch äußere Einflüsse, z.B. durch Antibiotika induziert werden [87,93,94]. Pneumolysin setzt sich aus vier verschiedenen Domänen zusammen, wobei Aufbau und Anordnung der Domänen im Protein ausschlaggebend für biochemische, aber auch funktionelle Eigenschaften des Toxins sind. So ist die Domäne 1 maßgeblich an der Oligomerisation der Monomere und somit an der Porenbildung beteiligt. Die Domäne 4 hat große strukturelle Ähnlichkeit mit dem Fc-Teil von Immunglobulinen, was eine Rolle bei der Antikörper-unabhängigen Aktivierung der klassischen Komplementkaskade spielen könnte. Beiden Strukturen ist die Ausbildung eines beta-Sandwichs gemein. Die C1-Komponente des Komplementsystems bindet normalerweise an den Fc-Teil von IgG-Polymeren. Die Membran-gebundenen Pneumolysinoligomere erinnern in ihrer Struktur sehr an diese Immunglobulinpolymere und werden vermutlich vom

Komplementsystem als solche erkannt. Das könnte erklären, warum Pneumokokken das Komplementsystem trotz des Fehlens spezifischer Anti-Pneumokokken-Antikörper aktivieren können [95]. Auch eine partielle Ähnlichkeit mit Teilen des C-reaktiven-Proteins (CRP) wird als Ursache für die Komplementaktivierung diskutiert, denn auch das CRP aktiviert Antikörper-unabhängig das Komplementsystem [96,97]. In den Domänen 2 und 3 scheinen die Sequenzen für die zytolytische Aktivität des Toxins zu liegen [98]. Pneumolysin ist an verschiedenen intra- und extrazellulären Prozessen beteiligt und hat Effekte auf verschiedene Systeme im Organismus. Dabei gibt es zwei Haupteigenschaften, die in der Pathogenese der Pneumokokkenerkrankungen im Vordergrund stehen, zum einen die zytolytische Aktivität des Toxins und zum anderen die Fähigkeit, den klassischen Weg der Komplementkaskade zu aktivieren [95,96,99]. Verschiedene *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen haben gezeigt, dass es bei der Verwendung von Pneumolysin-Mutanten mit verminderter lytischer und Komplement-aktivierender Fähigkeit zu einer abgeschwächten inflammatorischen Antwort, zu leichteren Krankheitsverläufen und geringeren Schäden im entsprechenden Modell kam [100]. Geringe Pneumolysindosen hemmen die Ausschüttung polymorphkerniger Leukozyten. In Folge dessen kommt es zur verminderten Opsonierung der Pneumokokken und damit zu geringerer Elimination durch die körpereigenen Abwehrmechanismen. Das Toxin stört die Leukozytenfunktion, was zu verminderter Chemotaxis und Migration dieser Zellen führt [101]. Pneumolysin schädigt Zilien-tragende Epithelien. *In-vitro*-Untersuchungen an Bronchialepithelien haben gezeigt, dass es zu einer Abnahme der Zilienfunktion und unter Einfluss hoher Toxindosen zur Zerstörung der Epithelzellen kommt [102]. Auch im ZNS konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Das Toxin führt zur Schädigung Zilien-tragender Ependymzellen des Plexus choroideus. Nach Zerstörung der Zellen wird die Vermehrung der Pneumokokken und der Übertritt von Bakterien aus dem Liquor in das umliegende Gehirngewebe während einer Meningitis begünstigt [103]. Pneumolysin führt zur Zerstörung von „tight junctions“ zwischen Epithelzellen, heftet sich an die freien Enden der Zellen an und gelangt so durch die Epithelbarriere. Die beschriebenen Effekte begünstigen die Invasion des Erregers, reduzieren die Elimination der Bakterien aus dem Respirationstrakt oder ZNS und fördern somit die Ausprägung einer Pneumonie, Sepsis oder Meningitis. Pneumolysin fördert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF-alpha und Interleukin-1-beta (IL-1-beta) aus Monozyten [104].

Bedingung für die Porenbildung ist das Vorhandensein von Cholesterolemolekülen in der Zellmembran der Wirtszelle [105,106]. Nach der Freisetzung einzelner Pneumolysin-Mono- und -Dimere verläuft die Ausbildung der Poren in zwei Schritten. Zunächst binden die im Zytosol vorliegenden Mono- und Dimere an die Cholesterolemoleküle der Zellmembranen [107] und werden in die Lipidschicht integriert. Dabei spielt die Domäne 4 eine entscheidende Rolle. Sie enthält eine Tryptophan-reiche Sequenz. Dieser hydrophobe Rest wird in der Zellmembran der Wirtszelle verankert. Später kommt es durch sequentielle Addition weiterer Monomere zur Oligomerisation, und Ausbildung typischer Ringstrukturen (Durchmesser 30-45 nm) [108,109]. Die Oligomerisierung ist die Voraussetzung zur Bildung von Poren in Zellmembranen eukaryoter Zellen und deren nachfolgender Lyse.

1.2 APOPTOSE

1.2.1 DEFINITION UND BEDEUTUNG

Als Apoptose bezeichnet man den programmierten Zelltod. Im Genom jeder Zelle ist ein Programm für diese Form des Zelltodes festgelegt. Diese physiologische Form des Zelltodes ist ein aktiver, Energie-abhängiger Prozess, der durch verschiedene endogene und exogene Faktoren angestoßen oder inhibiert werden kann [110]. John Kerr beobachtete in den frühen siebziger Jahren mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen, dass es bei bestimmten Formen des Zelltodes zu einem geordneten Untergang der Zelle kommt, bei dem die intakten Zellorganellen in Membranvesikel eingeschnürt werden und die sterbende Zelle schließlich von Phagozyten inkorporiert und abgebaut wird [110]. Nach der Beschreibung der Apoptose durch Kerr und der Abgrenzung von dem bisher verwendeten Begriff der Nekrose wurde diese Art des Zelltodes für viele physiologische Mechanismen beschrieben. Zu diesen gehören zum Beispiel die Veränderung der Organe während der Embryogenese oder die Zellmauserung von Geweben mit hohem Zellumsatz [111]. Der Beseitigung geschädigter Zellen aus dem Gewebeverband kommt ebenfalls eine besondere Bedeutung zu. Physiologisch ist dabei ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Initiierung und Inhibition des apoptotischen Zelltodes. Für verschiedene Erkrankungen wurde eine Störung dieses Gleichgewichtes beschrieben [111]. So sind zum Beispiel Tumorerkrankungen mit einer

verminderten [111,112], AIDS oder verschiedene neurodegenerative Erkrankungen mit einer verstärkten Apoptoserate verbunden.

1.2.2 MORPHOLOGISCHE CHARAKTERISTIKA

Zur Differenzierung des Zelltodes in Apoptose oder Nekrose werden morphologische und biochemische Kriterien verwendet. Apoptose ist nach Kerrs Definition durch die Schrumpfung (Pyknosis) und Fragmentierung (Karyorrhesis) des Zellkernes, Veränderungen von Membraneigenschaften und Ausbildung von Blasen in den Membranen sowie der Bildung Membran-umschlossener Vesikel, so genannter apoptotischer Körperchen charakterisiert [113]. In der Umgebung apoptotischer Zellen findet man im Gegensatz zur Nekrose keine Inflammation. Dieses Phänomen lässt sich mit der Ausbildung der Vesikel in Verbindung bringen. Die dort eingeschlossenen Zellfragmente werden durch Makrophagen und benachbarte Zellen rasch abgebaut. Bei der Nekrose handelt es sich um ein akzidentelles Ereignis, das durch verschiedene Stimuli induziert wird und durch deren Ausschaltung verhindert werden kann [114]. Charakteristische morphologische Veränderungen sind das Anschwellen der Zelle und des Zellkernes. Es kommt zur ungeordneten Degradation des Chromatins und sehr früh zum Verlust der Membranintegrität und zur Lyse der Zelle mit Freisetzung von Zellbestandteilen. Dadurch wird in der Umgebung der Zellen eine entzündliche Reaktion ausgelöst [115].

1.2.3 DIE BEDEUTUNG DER CASPASEN WÄHREND DER APOPTOSE

In jeder Körperzelle sind die verschiedenen, zur Apoptose-Induktion notwendigen Proteine vorhanden. Diese liegen entweder als inaktive Vorstufen oder in abgeschlossenen Zellorganellen vor und werden erst nach Beginn des Apoptoseprogramms aktiviert bzw. freigesetzt. Dadurch wird eine unkontrollierte Apoptose verhindert. In der Apoptosekaskade spielen Cystein-Aspartat-Proteasen, sogenannte Caspasen, eine entscheidende Rolle. In jeder Säugetierzelle ist eine gewisse Anzahl dieser spezifischen Enzyme vorhanden. Bisher wurden insgesamt 14 verschiedene Caspasen identifiziert, zu denen zwölf humane Homologe bekannt sind [116,117,118]. Bis zu ihrer Aktivierung liegen die Caspasen als ungespaltene Proenzyme in der Zelle vor. Durch proteolytische Prozesse können sie aktiviert werden. Caspasen können funktionell in zwei große Gruppen eingeteilt werden. Die Mitglieder

der einen Gruppe sind an der Prozessierung von Zytokinen beteiligt. Dazu zählen neben der Caspase-1, die auch „Interleukin-1-beta-converting enzyme“ genannt wird, auch die Caspase-4 und die Caspase-5. Caspase-1 spielt, wie ihr Name sagt, bei der Umwandlung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1-beta eine entscheidende Rolle [119,120]. Die Angehörigen der anderen Gruppe sind an der Regulation und Ausführung von Apoptose beteiligt. Hier können Initiator-Caspasen (z.B. Caspase-8, Caspase-9 und Caspase-10) und Effektor-Caspasen (z.B. Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7) unterschieden werden. Diese führen durch die Spaltung zellulärer Proteine zu den Apoptose-typischen morphologischen Veränderungen der Zelle [117]. Eine wichtige Substratgruppe der Caspasen sind dabei Zytoskelettproteine [121,122,123]. Auch die morphologischen Veränderungen des Zellkernes mit der Kondensation und Fragmentation des Chromatins sind an die Aktivierung der Caspasen gekoppelt. Durch die Caspasen-abhängige Desoxyribonuklease (CAD) wird die DNS zwischen den Nukleosomen so gespalten, dass 180 Basenpaare (bp) umfassende Fragmente entstehen. Dieses Endstadium der nukleären Apoptose ist durch eine sehr kompakte Kondensation des Chromatins ohne oder mit Bildung apoptotischer Körperchen gekennzeichnet [124,125]. Das Stadium I der nukleären Apoptose, ist durch die periphere Chromatinkondensation sowie eine Spaltung der DNS in ca. 50 kb große Fragmente charakterisiert. Im Gegensatz zum Stadium II ist das Stadium I ein von Caspasen unabhängiger Prozess, der an eine Translokation des mitochondrialen Proteins apoptosis inducing factor (AIF) in den Kern gebunden ist [124].

1.2.4 INDUKTION UND REGULATION DER APOPTOSE

Die Induktion der Apoptose kann durch zwei Regulationswege erfolgen. Es existieren ein extrinsischer, durch so genannte Todesrezeptoren vermittelter Prozess und ein intrinsischer, durch die Beteiligung der Mitochondrien bestimmter Prozess [126]. Im Verlauf der extrinsischen Kaskade werden Signale von extrazellulären Todes-Liganden, z.B. TNF-alpha und Fas-Ligand, weitergeleitet. Durch Bindung dieser Liganden an vorbestehende Rezeptorkomplexe wird letztlich die Aktivierung der Caspase-8 durch ein spezielles Adaptermolekül [„Fas-associated death domain“ (FADD)] eingeleitet [127]. Die intrinsische Kaskade kann durch verschiedene Stimuli wie Sauerstoffradikale, Strahlung und Chemotherapeutika induziert werden [128]. Das Mitochondrium spielt hierbei eine zentrale Rolle und ist durch die Freisetzung des

proapoptotischen Proteins Cytochrom c selbst Vermittler der Apoptose. Cytochrom c induziert die Bildung des so genannten Apoptosoms, eines makromolekularen Komplexes, in dem durch die proteolytische Funktion eines in diesem Komplex enthaltenen Enzyms (APAF-1) Caspase-9 aktiviert wird [129]. Sowohl am Ende des extrinsischen, als auch des intrinsischen Weges, können Effektor-Caspasen (Caspase-3 und Caspase 7) aktiviert werden und so die klassische Apoptose ablaufen [126]. Es gibt Hinweise darauf, dass neben der klassischen, Caspasen-abhängigen Apoptose auch andere Formen des programmierten Zelltodes stattfinden, die neben gleichen morphologischen Kriterien auch einen programmierten Ablauf wie die klassische Apoptose aufweisen. Die genauen Mechanismen dieser alternativen Prozesse des programmierten Zelltodes sind derzeit noch weitgehend unbekannt und Gegenstand der aktuellen Forschung. Bekannt ist, dass bestimmte Proteasen beim Ablauf dieser Prozesse eine Rolle spielen und dass diese alternativen Formen des Zelltods ebenfalls durch Todesrezeptoren oder mitochondriale Veränderungen ausgelöst werden können [114]. Die Mechanismen, die im Rahmen der Pneumokokken-Meningitis zur Apoptose führen, sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Braun et al. zeigten, dass eine Inaktivierung von Caspasen durch den Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk zwar zu einer Verminderung der Apoptose im Kaninchen-Meningitismodell, jedoch nicht zu deren vollständiger Blockade führt [16,17]. Es scheinen also auch Caspase-unabhängige Mechanismen eine Rolle in der Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis zu spielen. *In-vitro*-Untersuchungen an humanen Mikrogliazellen und Neuronen, murinen Gehirnzellen und Ratten-Hippokampus-Neuronen zeigten, dass Pneumokokken in der Lage sind, Apoptose ohne die Aktivierung von Caspasen auszulösen [130,131,132]. Die durch Pneumolysin induzierten transmembranären Poren bedingen den Einstrom von Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) in das Zytosol [133]. Dieser bewirkt eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotenzials und nachfolgend die Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) ins Zytosol. Dieses Protein ist an der Regulation eines großen Teils des Caspasen-unabhängigen Zelltodes beteiligt. Es resultiert auch hier programmierter Zelltod, in diesem Falle Caspasen-unabhängig. Eine Fragmentierung der DNS wird ebenfalls beobachtet, jedoch sind die DNS-Fragmente bei dieser Form des programmierten Zelltodes typischerweise 50 - 150 kb groß [134,135]. Der Ablauf dieser AIF-induzierten DNS-Fragmentierung ist bisher nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass AIF mit einem anderen mitochondrialen Protein, der

Endonuklease G interagiert. Dieses Protein induziert unabhängig von der Aktivierung von Caspasen die Fragmentierung der DNS [136,137].

1.3 DAS NEONATALE RATTEN-MENINGITIS-MODELL

In den letzten Jahren kommt der Erforschung bakterieller Toxine in der Pathogenese bakterieller Erkrankungen zunehmend Bedeutung zu. Es existieren verschiedene *in-vivo*- und *in-vitro*-Modelle, um unterschiedliche Infektionskrankheiten wie Pneumonie, Sepsis oder Meningitis zu untersuchen. Dazu werden verschiedene Tier- und Zell-Typen unterschiedlicher Alterstufen verwendet. Gut etabliert ist ein juveniles Ratten-Meningitismodell mit elf Tage alten Ratten [40,138,139]. Die Induktion erfolgt hier durch intrazisternale Inokulation der Bakterien.

Das immature Rattengehirn befindet sich am Ende der ersten Lebenswoche in einer Phase schnellen Hirnwachstums. Beim Menschen beginnt die Phase des so genannten „brain growth spurt“ im letzten Trimenon der Schwangerschaft und setzt sich in den ersten Lebensjahre fort [140]. Trotz dieser Parallelen existierte bisher aber kein Modell, bei dem eine Meningitis in neonatalen Ratten (PND 7) durch intrazisternale Bakterien-Injektion induziert wurde. Da Früh- und Neugeborene - unter anderem durch die Unreife ihres Immunsystems - besonders häufig eine Sepsis mit nachfolgender Meningitis erleiden, erschien die Etablierung eines solchen neonatalen Meningitsmodells zur Untersuchung der Rolle bakterieller Toxine als möglicher Ursache neuronalen Schadens jedoch sinnvoll. Beim Menschen ist das Ausmaß der Folgeschäden nach einer Meningitis in der Neonatalperiode ausgeprägter als bei älteren Kindern. Neuronale Unreife und gesteigerte Vulnerabilität gegenüber schädigenden Noxen sind mögliche Ursachen dafür. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neonatales Ratten-Meningitsmodell an sieben Tage alten Wistar-Ratten etabliert. Um auch im Tiermodell mögliche altersspezifische, durch Reifung bedingte Unterschiede im Ausmaß der Schädigung zu untersuchen, wurde auch das oben genannte juvenile Meningitismodell verwendet. Um die Rolle bakterieller Toxine in der Pathogenese bakterieller Meningitiden zu untersuchen, ist die Verwendung unterschiedlicher Toxin-defizienter Bakterien-Mutanten etabliert [39,100,141,142].

1.4 HYPOTHESEN

Der neuronale Schaden im Rahmen der Meningitis entsteht durch das Zusammenspiel wirtseigener Abwehrmechanismen und direkter Toxizität der Bakterien. Welchen direkten Einfluss Bakterien und deren Toxine auf neuronalen Zelltod haben, ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt. Völlig offen ist ebenfalls die Frage, welchen Einfluss diese Toxine auf die Entwicklung neuronalen Schadens insbesondere im unreifen Gehirn haben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Hypothesen untersucht:

- *Streptococcus pneumoniae* und beta-hämolyisierende Streptokokken der Gruppe B induzieren im neonatalen Ratten-Meningitismodel neuronale Apoptose im Kortex und Hippokampus.
- Wesentliche Mediatoren dieser neuronalen Apoptose sind die von diesen Bakterien freigesetzten Toxine Pneumolysin und beta-Hämolysin.
- Die neuronale Apoptose ist bei Verwendung Toxin-defizienter Mutanten reduziert.
- Das Ausmaß der neuronalen Apoptose ist vom Reifungsgrad der Rattengehirne abhängig.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 BAKTERIENSTÄMME

2.1.1 *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

- *D39*: Pneumokokken-Wildtyp, Kapseltyp 2 (Rockefeller University, New York, USA)
- *plnA*⁻: Pneumolysin-negative Mutante von *D39* (D. Briles, University of Alabama, Birmingham, USA [100])
- *spxB*⁻: Pyruvatoxidase-/Wasserstoffperoxid-defiziente Mutante von *D39* [143,144]
- *plnA*⁻/*spxB*⁻: Pyruvatoxidase- und Pneumolysin- und Pyruvatoxidase-negative Mutante von *D39* [39]

2.1.2 BETA-HÄMOLYSIERENDE STREPTOKOKKEN DER GRUPPE B

- *COH-1*: GBS-Wildtyp, Serotyp III (V. Nizet, University of California, San Diego, USA [145])
- *COH-1cylEΔcat*: Hämolysin-defiziente Mutante von *COH-1* (V. Nizet, University of California, San Diego, USA [145])

2.2 MEDIEN UND LÖSUNGEN

Der Ansatz der Pneumokokken-Bakterienkultur erfolgte in einem speziellen Nährmedium, im weiteren C+Y genannt. Die GBS wurden in einem Instant-Hefe-Medium kultiviert, im weiteren TH-Medium genannt. Die Zusammensetzung der Medien wird im Folgenden erklärt. Darüber hinaus wurden verwendet:

- Erythromycin (Biochrom Deutschland)
- Chloramphenicol (Biochrom Deutschland)
- Blutagarplatten (Merkoplate®, Merck, Deutschland)
- PBS (0.1 M, pH 7,4; Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- pyrogenfreies destilliertes Wasser (dH₂O Delta Pharma)

2.2.1 CASEIN PLUS YEAST (C+Y)-MEDIUM

- 400 ml Prä-C-Medium (s.u.)
- 13 ml Ergänzungsmedium (s.u.)
- 10 ml Glutamin
- 10 ml Adams-3-Lösung (s.u.)
- 5 ml Pyruvat (2 %)
- 15 ml Kaliumphosphatpuffer (1 M)
- 10 ml Hefeextrakt (5 %)

2.2.2 PRÄ-C-MEDIUM

- 1,45 g Natriumacetat
- 6 mg L-Tryptophan
- 60 mg L-Cystein
- 6 g Casaminoäure
- 1200 ml dH₂O
- pH auf 7,4 einstellen

2.2.3 ERGÄNZUNGSMEDIUM

- 60 ml 3-fach Salzlösung
- 10 g MgCl₂
- 50 mg CaCl₂
- 20 µl MnSO₄
- 100 ml dH₂O
- 120 ml Glukose (20 %)
- 6 ml Sucrose (50 %)
- 120 ml Adenosin (2 mg/ml)
- 120 ml Uridin (2 mg/ml)

2.2.4 ADAMS-1-LÖSUNG

- 60 µl Biotin (0.5 mg/ml)
- 30 mg Nikotinsäure
- 35 mg Pyridoxin
- 120 mg Ca-Pantheonat
- 32 mg Thiamin-HCl
- 14 mg Riboflavin
- 200 ml dH₂O

2.2.5 ADAMS-2-LÖSUNG

- 50 mg FeSO₄
- 50 mg CuSO₄
- 50 mg ZnSO₄
- 20 mg MgCl₂
- 100 ml dH₂O
- 1 ml HCl

2.2.6 ADAMS-3-LÖSUNG

- 64 ml Adams-1-Lösung (s.o.)
- 16 ml Adam-2-Lösung (s.o.)
- 800 mg Asparagin
- 80 mg Cholin-Chlorid
- 0,64 ml CaCl₂ (1%)
- 400 ml dH₂O

Die verwendeten Vitamine wurden steril filtriert, die übrigen Komponenten nach dem Ansetzen für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert und bei 4 °C im Kühlschrank, gelagert, die Adams-3-Lösungen zusätzlich lichtgeschützt. Vor Verwendung des Mediums erfolgte das Mischen der Komponenten in den angegebenen Mengen unter sterilen Bedingungen. Das fertige C+Y-Medium konnte bei 4 °C mehrere Wochen aufbewahrt

werden. Zum Ausschluss einer Kontamination wurde bei jedem Bakterienansatz ein Röhrchen C+Y als Sterilkontrolle inkubiert. Zeigte sich Bakterienwachstum in der Kontrolle, wurde auch der nachfolgend beschriebene Bakterienansatz verworfen.

2.2.7 TODD-HEWITT-HEFE-MEDIUMS

Für die Herstellung des Todd-Hewitt-Hefe-Mediums (TH-Medium) wurde ein Instantmedium (DIFCO) verwendet. Einem Liter destilliertem, pyrogenfreien Wasser (Delta Pharma) wurden 30 g des Pulvers zugesetzt. Unter ständigem Rühren wurde die Lösung erhitzt. Nach vollständigem Auflösen des Pulvers wurde das fertige Medium 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert und bis zur Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Zum Ausschluss einer Kontamination wurde bei jedem Bakterienansatz ein Röhrchen TH-Medium als Sterilkontrolle inkubiert. Bei nachgewiesenem Bakterienwachstum in der Kontrolle, wurde auch der nachfolgend beschriebene Bakterienansatz verworfen.

2.3 BAKTERIENANSÄTZE

2.3.1 STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

In ein steriles Zentrifugen-Röhrchen (Falcon) wurden zu 4 ml C+Y-Medium Pneumokokken (*D39*), die bei - 80 °C in 15 % Glycerol gelagert wurden, gegeben. Dieser Ansatz wurde für sechs Stunden bei 37 °C und 4 % CO₂ inkubiert. Bei der Verwendung der Toxin-defizienten Pneumokokken-Mutanten (*plnA*⁻ oder *spxB*⁻) wurden dem Medium Erythromycin (2 µg/ml) zugesetzt. Bei der Verwendung der Doppel-Mutante (*plnA*⁻/*spxB*⁻) wurden dem Medium zusätzlich noch Chloramphenicol (2 µg/ml) zugesetzt. In den Einzelmutanten ist die Mutation mit einem Erythromycin-Resistenzgen gekoppelt. Durch das Zuführen des Antibiotikums werden die Bakterien selektioniert, die auch die Mutation tragen. Dem gleichen Prinzip folgend ist in der Doppelmutante die zweite Mutation an ein Resistenzgen für Chloramphenicol gekoppelt. Die Zugabe des Antibiotikums verhindert auch hier die Elimination der eingefügten Mutation. Um alle Bakterien möglichst in der gleichen Wachstumsphase zu verwenden, erfolgte nach der oben beschriebenen Inkubationszeit die Verdünnung der Stammlösung. Dazu wurde ein Milliliter der Bakteriensuspension mit drei Millilitern vorgewärmtem C+Y-Medium verdünnt und für eine weitere Stunde bei oben genannten

Bedingungen inkubiert. Danach erfolgte bei einer Wellenlänge von 620 nm die Bestimmung der optischen Dichte (OD) (Helios Σ Spektrometer von Thermospectronic). Bei einer OD zwischen 0,4 bis 0,6 - diese entspricht der linearen Wachstumsphase - wurde der Ansatz verwendet. 2 ml der Suspension wurden in einem sterilen Eppendorfgefäß drei Minuten bei 8000 U/min zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415D). Der Überstand wurde entfernt und das entstandene Bakterienpellet in 1 ml sterilem PBS resuspendiert. Entsprechend der gemessenen OD wurde die Bakteriensuspension auf eine Konzentration von 10^8 Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) pro ml verdünnt (eine OD von 0,1 entsprechen bei dem verwendeten Spektrometer einer Bakterienkonzentration von 10^8 KBE/ml). Nachfolgend wurde eine serielle Verdünnung bis auf die gewünschte Zielkonzentration (10^5 KBE/ml) angefertigt. Durch Ausstreichen auf Blutagarplatten wurde die vorher bestimmte Konzentration der Bakterien kontrolliert, gleichzeitig war das Wachstum der Bakterien auf den Agar-Platten Beweis für deren Viabilität und ein Test auf Kontamination. Der Ansatz der Bakterienkultur erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Braun et al. [39].

2.3.2 BETA-HÄMOLYSIERENDE STREPTOKOKKEN DER GRUPPE B

In ein steriles Zentrifugen-Röhrchen wurden zu 4 ml TH-Medium Streptokokken der Gruppe B (*COH1*-WT, Serotyp III), die bei -80 °C in 20 % Glycerol gelagert wurden, gegeben. Dieser Ansatz wurde für sechs Stunden bei 37 ° C und 4 % CO_2 inkubiert. Bei der Verwendung der Toxin-defizienten Mutante (*COH-1cyIE Δ cat*) wurden dem Medium 2 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol zugesetzt. Das weitere Prozedere erfolgte wie im Abschnitt 2.3.1 beschrieben.

2.4 TIEREXPERIMENTELLES MODELL

2.4.1 INDUKTION DER MENINGITIS

Für die Versuche wurden Wistar-Ratten (Fa. Charles River, Deutschland GmbH/Sulzfeld) am siebten und elften postnatalen Tag (PND7/PND11) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 15g (PND7) und 25g (PND 11) verwendet. Vor Versuchsbeginn wurde das Gewicht der Tiere bestimmt. Die Tiere wurden von der Mutter getrennt und für die Zeit der Injektion in einem separaten Käfig, der mit einer Wärmelampe versehen war, aufbewahrt. Nach einer Äther-Kurzarkose erfolgte die

langsame Injektion von 10 µl einer Bakteriensuspension in die Zisterna magna mit 10^3 KBE/Ratte. Die Punktion erfolgte mittels einer 30-Gauche-Kanüle, welche mit einem Plastikschlauch so überzogen wurde, dass nur 2,5 mm der Nadel freilagen, was die Eindringtiefe entsprechend begrenzte. Nach der Injektion wurden die Jungtiere wieder zur Mutter zurückgegeben. Im Abstand von vier Stunden erfolgten erneute Gewichtsbestimmungen sowie die subkutane Injektion von 0,5 ml einer Glukose-Elektrolytlösung (Jonosteril PÄD II, Fresenius GmbH, Deutschland). Der Allgemeinzustand der Tiere verschlechterte sich im Verlauf des Experiments zunehmend, so dass die Tiere nicht mehr in der Lage waren, ihren Bedarf an Flüssigkeit und Glukose durch Saugen zu decken. Die subkutane Substitution erfolgte, um Hypoglykämien und Hypotension vorzubeugen. Vor jeder Injektion erfolgte die klinische Beurteilung des Versuchstieres. Es wurden die Spontanaktivität sowie das Umdrehen in die Bauchlage beurteilt. Auf einer Skala von null bis zu fünf Punkten erfolgte dann die Einteilung des klinischen Zustandes. Fünf Punkte entsprachen einer normalen spontanen Aktivität mit sofortigem Umdrehen aus der Rücken- in die Bauchlage, vier Punkte entsprachen einer leicht verminderten spontanen Aktivität mit einem Umdrehen innerhalb von fünf Sekunden. Bei drei Punkten erfolgte das Umdrehen in mehr als fünf Sekunden, bei zwei Punkten erfolgte kein Umdrehen in die Bauchlage mehr und bei einem Punkt war keine spontane Bewegung mehr nachweisbar [44]. Nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von etwa 20 Stunden erfolgte letztmalig die Bestimmung des Gewichtes und des klinischen Scores. Bei deutlicher Einschränkung des klinischen Zustandes wurden die nachfolgenden Arbeitsschritte vorzeitig durchgeführt.

2.4.2 ZISTERNALPUNKTION

Nach der letzten Feststellung des klinischen Zustandes erfolgte die Punktion der Cisterna cerebromedullaris. Dazu wurde die von Meyding-Lamade und Mitarbeitern 1996 beschriebene Methode leicht abgewandelt. Die Versuchstiere wurden mit 120 µl einer Narkoselösung aus Ketanest und Xylazine tief anästhesiert. Die Stammlösung setzte sich aus 2 ml Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml, 1 ml Xylazinhydrochlorid 2 % und 5,5 ml PBS zusammen. Danach erfolgten eine Inzision der Nackenhaut über der Zisterna magna sowie die Entfernung der Muskeln in diesem Bereich bis zur Darstellung der Zisterne. Im Anschluss erfolgte die Punktion der Zisterna magna durch

die noch intakte harte Hirnhaut (Dura mater) mittels einer 27-G-Butterfly-Kanüle (Vycon). Unter leichter Aspiration einer angeschlossenen Hamilton-Spritze wurden 10 – 15 µl Liquor entnommen. In einer Fuchs-Rosenthal-Kammer (Poly-Optik, Bad Blankenburg) erfolgte die Quantifizierung der Liquor-Pleozytose. Zur Quantifizierung des Bakterienwachstums wurde eine serielle Verdünnungsreihe des Liquors bis 10^{-7} angefertigt und auf Blutagarplatten ausgestrichen. Die Bestimmung der KBE aus dem Liquor erfolgte nach 48 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C und 4 % CO₂.

2.4.3 PERFUSIONFIXIERUNG

2.4.3.1 MATERIALIEN UND LÖSUNGEN

- PBS (0,1 M, pH 7,4; Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- Paraformaldehyd-Pulver (Sigma, pH 7,4)
- Natriumhydrogencarbonat-Plättchen (NaOH, Merck)

2.4.3.1.1 PHOSPHAT-GEPUFFERTE SALZ-LÖSUNG (PBS)

Zur Herstellung der PBS-Lösung wurde ein Zehnfach-Fertigkonzentrat verwendet. Dieses wurde im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Nachfolgend wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Das zum Ansetzen der Bakterienkulturen und zum Verdünnen der Liquorproben verwendete PBS wurde unter der Sterilarbeitsbank mit sterilem, pyrogenfreiem, destilliertem Wasser (Delta Pharma) hergestellt.

2.4.3.1.2 HERSTELLUNG DES FIXATIVS (PFA 4%)

Die nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten unter einem Abzug. Das Fixativ wurde vor jedem Versuch neu hergestellt.

50 g Paraformaldehyd (Sigma) und 250 ml destilliertes Wasser (Millipore-Anlage) wurden unter ständigem Rühren auf 60 °C erhitzt. Um die Löslichkeit von PFA zu verbessern, wurden zwei Plättchen Natriumhydrogencarbonat (Merck) dazugegeben. Nach vollständigem Aufklaren der, initial trüben Lösung wurde ein Liter PBS zugegeben. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung auf 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bis zur Verwendung bei 4 °C.

2.4.3.2 DURCHFÜHRUNG

Für die histochemischen Untersuchungen wurden die Rattengehirne durch transkardiale Perfusion fixiert. Dazu wurde die Methode von Somogyi leicht modifiziert [146]. Nach der Zisternalpunktion wurden die noch tief anästhesierten Tiere in Rückenlage fixiert. Es erfolgte die Eröffnung des Abdomens durch einen Hautschnitt unterhalb des Zwerchfells und des Thorax durch beidseitige Durchtrennung der Rippen. Nach Eröffnung des rechten Atriums erfolgte die Inzision des linken Ventrikels an der Herzspitze. Nach Einlage einer Butterfly-Kanüle wurde diese mit einer Gefäßklemme fixiert, und es erfolgte eine Spülung mit 10 ml Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung bis aus dem rechten Vorhof klare Flüssigkeit austrat. Nachfolgend wurden mit Hilfe einer Spritze langsam 10 ml 4-%-iges Paraformaldehyd infundiert. Anschließend erfolgte eine zehnminütige PFA-Tropfinfusion. Auf diese Weise erfolgt eine gleichmäßige Durchströmung des Gewebes mit dem Fixativ. Das fixierte Tier wurde dekapitiert, das Gehirn zur weiteren Fixierung vorerst im knöchernen Schädel belassen und über Nacht in 4 % PFA bei 4 °C nachfixiert. Danach erfolgte die Präparation des Gehirns aus dem Schädel. Mit Hilfe einer Kunststoff-Matrize wurde das Gehirn in Höhe des Chiasma opticum koronar durchgeschnitten. Auf diese Weise erhielt man zwei Teile des Gehirns, die jeweils Hippokampus-Strukturen enthielten. Die Gehirnscheiben wurden für weitere vier Stunden bei 4°C in 4% PFA nachfixiert. Danach erfolgte die Weiterbehandlung bis zur Einbettung in Paraffinblöcke.

2.4.4 AUFARBEITUNG DER GEHIRNE FÜR DIE HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

Vor der Einbettung in Paraffin wurden die Gehirne entwässert, anschließend erfolgte die Einbettung in Paraplast. Die Paraffinblöcke wurden am Mikrotom (Microm HM 330) geschnitten und auf industriell beschichtete Objektträger aufgebracht. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Objektträger in Aufbewahrungskästen bei Raumtemperatur gelagert.

2.4.4.1 MATERIALIEN UND LÖSUNGEN

- Paraplast (Sigma, Deutschland)
- Ethanol 100%, 96%, 80%, 70% (J. T. Baker, Deutschland)
- Chloroform (J. T. Baker)
- Objektträger (Super Frost ® Plus, Menzel GmbH & Co. KG /Braunschweig)

2.4.4.2 ENTWÄSSERUNG DER GEHIRNE

Jedes Gehirn wurde in ein separates Plastikröhrchen gegeben. Das Fixativ wurde verworfen. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt. Die grob geschnittenen Gehirne wurden zunächst für vier Stunden in 70%-igem Ethanol gelagert, anschließend erfolgte die Umsetzung in 80%-iges Ethanol. Hier verblieben die Gehirne über Nacht. Danach wurden die Gehirne jeweils zwei Stunden in 96%-igem bzw. 100%-igem Ethanol gelagert. Nachfolgend wurden sie für jeweils 25 Minuten in ein Gemisch aus 100%-igem Ethanol und Chloroform umgesetzt. Nach jeder Inkubationsphase wurde das Mischungsverhältnis Ethanol zu Chloroform zu Gunsten des Chloroform geändert (I. Ethanol: Chloroform 2:1, II. 1:1, III. 1:2). Anschließend folgte die Inkubation in reinem Chloroform für 60, 40 und 20 Minuten. Nach jeder Inkubation wurde die Lösung erneuert.

2.4.4.3 PARAFFINEINBETTUNG

Nun wurden die Gehirne in flüssigen Paraplast (synthetisches Paraffin) umgesetzt und für zunächst zweimal 20 Minuten bei 60 °C im Brutschrank inkubiert, nach jeder Inkubation erfolgte ein Wechsel des Paraplasts. Zuletzt wurden die Gehirne über Nacht bei 60 °C in Paraplast belassen. Am nächsten Morgen wurden die Gehirne mit Hilfe von Edelstahlformen zu Paraffinblöcken gegossen, auf das noch weiche Paraplast wurde eine Kunststoffplatte aufgelegt, diese fungiert nach Härtung des Paraplast als Träger der Paraffinblöcke und kann in das Mikrotom eingespannt werden. Nach Aushärtung wurden am Mikrotom (Microm HM 330) 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Es wurde von jedem Tier eine Serie von Schnitten angefertigt. Dazu wurden die Gehirne vor dem Ausgießen so in den Metallförmchen fixiert, dass die beiden Schnittflächen (siehe Anfertigung der Grobschnitte) direkt auflagen. Das führte dazu, dass beim Anschneiden der Paraffinblöcke immer ein

vorderer und ein hinterer Schnitt des jeweiligen Hippokampus entstanden. Es wurden nun koronare Schnitte in sechs verschiedenen Ebenen angefertigt. Von jeder Schnittebene wurden sechs Objektträger angefertigt. Um eine geeignete Konsistenz des Paraffins zu erreichen wurden die Blöcke auf Eis gelagert. Die hergestellten Schnitte wurden in ein 30-35°C warmes Wasserbad eingebracht, dort gestreckt und anschließend schwimmend auf die Objektträger aufgebracht. Anschließend erfolgte über Nacht die Trocknung der Schnitte in einem Wärmeschrank bei 37°C. Die Schnitte konnten in diesem Zustand bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.4.5 HISTOLOGISCHE FÄRBE-METHODEN

2.4.5.1 MATERIALIEN UND LÖSUNGEN

- Xylol (J. T. Baker)
- Hämatoxylin Gill Nr. 2 (SIGMA)
- Eosin (Chromagesellschaft, Deutschland)
- Alkoholreihe (J. T. Baker)
- Vitro clud ® (Fa. R. Langenbrink/ Emmerdingen)

2.4.5.2 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG (H&E-FÄRBUNG)

Zur quantitativen Beurteilung der Hirnhistologie wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) angefertigt. Gefärbt wurde jeweils der erste Schnitt einer Schnittstufe. Insgesamt wurden also sechs Objektträger pro Tier gefärbt. Dazu wurden die Schnitte auf den Objektträgern zunächst entparaffiniert und wie nachfolgend beschrieben rehydriert. Nach Rehydrierung erfolgte die H&E-Färbung. Es wurden industriell gefertigte Hämatoxylin- und Eosin-Lösungen verwendet. Nach Durchführung der Färbung nach einem Standardprotokoll [147] wurde die oben beschriebene Alkoholreihe in aufsteigender Reihenfolge zur Entwässerung der Schnitte verwendet und die Objektträger mit Deckgläsern und einem Eindeckmedium (Vitro clud ®) luftdicht verschlossen.

2.4.5.3 ENTPARAFFINIERUNG UND REHYDRIERUNG DER SCHNITTE IN ABSTEIGENDER

ALKOHOLREIHE

- Xylol für 5 Minuten
- Xylol für 5 Minuten
- 100 % Ethanol für 5 Minuten
- 100 % Ethanol für 5 Minuten
- 96 % Ethanol für 5 Minuten
- 80 % Ethanol für 5 Minuten
- 70 % Ethanol für 5 Minuten
- Spülen in PBS für 5 Minuten
- Spülen in PBS für 5 Minuten
- Spülen in PBS für 5 Minuten

2.4.5.4 FÄRBUNG

- Spülen mit Aqua dest. (2 x 5 min)
- Hämatoxylin-Lösung (5 min)
- Differenzierung mit Aqua dest. und HCl (10 s)
- Spülen in Leitungswasser (30 s)
- Bläuen in Leitungswasser (5 min)
- Spülen in Aqua dest.
- Eosin-Lösung (15 s)
- Spülen in Aqua dest.

2.4.5.5 REHYDRIERUNG UND EINDECKELN

- Aufsteigende Alkoholreihe (vgl. 2.5.2.1)
- Xylol (2 x 5 min)
- Eindecken mit Vitro clud ® gemäß Herstellerangaben

2.4.6 "TdT-MEDIATED D UTP-BIOTIN NICK END LABELING" (TUNEL-METHODE)**2.4.6.1 MATERIALIEN UND LÖSUNGEN**

- Apop TAG® Peroxidase in situ Apoptosis Detection Kit S7100 (Intergen Company, New York, USA)
- PBS
- Proteinase K (20 µg/ml in Tris-HCl, Sigma)
- Tris-HCl (Sigma)

2.4.6.2 PRINZIP

Mit der TUNEL-Methode werden die für den apoptotischen Zelltod typischen DNA-Doppelstrangbrüche, die zu freien 3'-OH-Gruppen führen, dargestellt [148]. Eine freie 3'-OH-Gruppe wird auch als nick end bezeichnet. Die terminale Desoxynukleotid-Transferase (TdT) katalysiert die kovalente Bindung von Desoxynukleotiden an freie 3'-OH-Gruppen. Bei der TUNEL-Methode dient ihr an Digoxygenin konjugiertes 2'-Desoxy-uridin-5'-triphosphat (dUTP) als Substrat. Die eingebauten dUTP-Digoxygenin-Komplexe werden von einem anti-Digoxygenin-Antikörper erkannt. Man hat nun die Möglichkeit diese Antikörperbindung mittels einer bindenden Peroxidase sichtbar zu machen. Es wurde der kommerziell erhältliche Apop-Tag-Kit S 7100 (Intergen, Heidelberg) verwendet. Die nachfolgend verwendeten Begriffe „Äquilibrierungs-Puffer“, „Stopp-Lösung“ und „Reaktions-Puffer“ sind die von der Herstellerfirma verwendeten Produktbezeichnungen.

Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte erfolgte wie im Abschnitt H&E-Färbung beschrieben. Die Inkubation mit Proteinase K führt zum Abbau zelleigener DNAsen und denaturiert umgebende Proteine, was die Zugänglichkeit an die kondensierte DNS erleichtert. Durch die Blockade der endogenen Peroxidase mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird die unspezifische Bindung des 3,3-Diaminobenzidin (DAB) am Ende der Reaktion minimiert. Das Aufbringen des Äquilibrierungs-Puffer führt zur Einstellung eines für die Reaktion optimalen pH-Wertes. Dieser Puffer wird vom Hersteller gebrauchsfertig geliefert. Das TdT-Enzym katalysiert die Bindung der im Reaktionspuffer enthaltenen Digoxygenin-gekoppelten Nukleotide an die freien 3'-OH-Enden der DNS. Beide Reagenzien werden kurz vor Gebrauch in einem definierten Verhältnis gemischt und auf die Schnitte aufgebracht. Die Stopp-Lösung unterbricht

diese Reaktion. Sie wird als Konzentrat vom Hersteller geliefert und 30 Minuten vor Gebrauch mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:35 gemischt. Das nachfolgend aufgebrauchte Anti Digoxygenin-Peroxidase-Konjugat (ebenfalls gebrauchsfertig) bindet an die neu angebrachten Nukleotidenden und ist Bindungsstelle für das im letzten Arbeitsschritt verwendete DAB, welches bei einer enzymatischen Reaktion mit H_2O_2 oxidiert wird, der resultierende braune Farbumschlag wird im histologischen Präparat sichtbar. Um eine bessere Zuordnung der TUNEL-positiven Zellen in die anatomischen Regionen und eine Darstellung der Zellkerne zu ermöglichen, erfolgte eine kurze Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Nachfolgend wurden die Schnitte, wie im Abschnitt 2.4.5.5 über die H&E-Färbung beschrieben, entwässert und mit Deckgläsern versehen.

2.4.6.3 PROTOKOLL DAB-TUNEL

1. Entparaffinierung (wie bei H&E)
2. Spülen mit PBS (3 x 5 Minuten)
3. Inkubation mit Proteinase K (8 Minuten, Konzentration 20 μ g/ml)
4. Spülen mit PBS (3 x 5 Minuten)
5. Inkubation mit 3 % H_2O_2 (5 Minuten)
6. Spülen der Objektträger mit PBS
7. Inkubation mit dem Äquilibrierungspuffer (10 Sekunden)
8. Inkubation des TdT-Enzym-/Reaktions-Puffer-Gemisches aus 70 % Reaktionspuffer und 30 % TdT-Enzym (90 Minuten, 37°C und 4 % CO_2)
9. Spülen in der Stopp-Lösung (10 Minuten)
10. Spülen mit PBS (3 x 5 Minuten)
11. Inkubation mit dem Anti Digoxygenin-Peroxidase-Konjugat für 45 Minuten
12. Spülen mit PBS (3 x 5 Minuten)
13. Inkubation mit DAB für 8 Minuten (0,05 % DAB, 0,01 % H_2O_2 in PBS)
14. Stoppen der Reaktion in destilliertem Wasser für 5 Minuten
15. Spülen mit PBS (3 x 5 Minuten)
16. kurzes Eintauchen in Hämatoxylin (3 Sekunden)
17. Spülen in destilliertem Wasser
18. Bläuen in Leitungswasser

19. Spülen in Aqua dest.
20. Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe
21. Eindeckeln der Objektträger mit Vitro clud®

Mit Ausnahme der Spülvorgänge wurden alle Arbeitsschritte in einer feuchten Kammer durchgeführt. Das Spülen erfolgte in einer Glasküvette. Die Inkubation mit dem TdT-Enzym erfolgte bei 37°C und 4 % CO₂, die übrigen Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Arbeitsschritte 3, 8 und 11 wurden die Objektträger zusätzlich mit Parafilm abgedeckt, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Das pro Schnitt verwendete Probenvolumen betrug 30 µl.

2.4.7 AUSWERTUNG

2.4.7.1 BEURTEILUNG DES NEURONALEN SCHADENS IM KORTEX

Nach Anfertigung der Serienschnitte und Durchführung H&E-Färbung an jeweils sechs Schnitten pro Tier erfolgte die histologische Beurteilung der Präparate. Die Differenzierung in Apoptose oder Nekrose erfolgte nach Kriterien wie Zellschrumpfung, -vergrößerung und Kernkondensation sowie Ballonierung. Die histologische Beurteilung erfolgte durch einen verblindeten Untersucher. Durch die oben beschriebene koronare Schnittführung durch das Chiasma opticum und die entsprechende Anordnung während der Paraffineinbettung erhielt man auf jedem Objektträger einen „frontalen“ und einen „okzipitalen“ Schnitt. Es wurden pro Objektträger der „frontale“ und der „okzipitale“ Schnitt, sowie jeweils rechte und linke Hemisphäre beurteilt, pro Tier ergaben sich somit 24 Werte. Es wurde die Zahl der apoptotischen Zellen pro Kubikmillimeter bestimmt, dazu wurde die Größe der beurteilten Fläche mit Hilfe eines Objektivs mit 40-facher Vergrößerung und einem im Okular des Mikroskops integrierten Zählgitter bestimmt. Das Zählgitter bestand aus 100 Kästchen mit einer jeweiligen Abmessung von 0,025 x 0,025 mm (bei 40-facher Vergrößerung). Durch Multiplikation mit der Schichtdicke der Schnitte (5 µm) ergab sich das Volumen des beurteilten Kortex. Das Zählgitter wurde im Bereich des Kortex pro Hemisphäre an dreißig verschiedenen Stellen angelegt. Aus allen Werten eines Tieres wurde der Mittelwert gebildet. Aus allen Mittelwerten einer Gruppe wurde dann ein Mittelwert gebildet der für die weitere Auswertung verwendet wurde.

2.4.7.2 BEURTEILUNG DES NEURONALEN SCHADENS IM GYRUS DENTATUS

Im Fall des Gyrus dentatus wurden ebenfalls - wie oben beschrieben - jeweils der frontale und der okzipitale Schnitt sowie die rechte und die linke Hemisphäre beurteilt. Es wurde hier noch zusätzlich zwischen oberem Anteil und unterem Anteil unterschieden. Aufgrund der unregelmäßigen Form des Gyrus dentatus erfolgte die Bestimmung der Fläche des beurteilten Areals mit Hilfe einer Stereologieeinrichtung. Nach Multiplikation mit der Schichtdicke ergab sich das Volumen der beurteilten Region. Aus allen Werten eines Tieres wurde der Mittelwert bestimmt, aus allen Mittelwerten einer Gruppe wurde wiederum ein Mittelwert gebildet, welcher für die nachfolgende Auswertung verwendet wurde.

2.4.7.3 ANGEWANDTE STATISTISCHE VERFAHREN

Die statistische Signifikanz der Messwerte wurde entweder mit dem ungepaarten t-Test oder dem Mann-Whitney Rank Sum Test bestimmt. Die Fehlerbalken in den Abbildungen zeigen im Fall der Histologie-Auswertung den Standardfehler der Mittelwerte (SERM) in allen anderen Abbildungen die Standardabweichung der Mittelwerte an (SD).

3 ERGEBNISSE

3.1 INDUKTION DER MENINGITIS DURCH STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE, STREPTOCOCCUS AGALACTIAE UND IHRE TOXIN-DEFIZIENTEN MUTANTEN

3.1.1 BEURTEILUNG DES KLINISCHEN ZUSTANDES

3.1.1.1 KLINISCHER SCORE

Zur Untersuchung der Hypothesen wurde ein neonatales Ratten-Meningitismodell etabliert. Dazu wurde die Meningitis bei sieben Tage alte Ratten durch intrazisternale Injektion verschiedener Bakterien-Wildtypen und Toxin-defizienter Mutanten induziert. Dabei fanden ein humanpathogener Pneumokokken- (*D39*) und GBS-Wildtyp (*COH-1*) Verwendung. Beide Erreger wurden aus Patientenmaterial isoliert. Um den Einfluss bakterieller Toxine auf das Ausmaß der neuronalen Schädigung zu untersuchen, wurde die Meningitis durch verschiedene Toxin-defiziente Mutanten induziert. Als Toxin-defizienten Mutanten von *D39* wurden *plnA*⁻, eine Pneumolysin-defiziente Mutante, *spxB*⁻ eine Wasserstoffperoxid-defiziente Mutante und die Doppelmutante *plnA*⁻/*spxB*⁻, die keinen der beiden Virulenzfaktoren produziert, verwendet. Um die Rolle des beta-Hämolysin/Zytolysin zu untersuchen, wurde die isogenetische Hämolysin-defiziente Mutante *COH-1cyIEΔcat* verwendet. Den Kontrolltieren wurde sterile PBS-Lösung intrazisternal injiziert. Während des Versuches wurden die Tiere vierstündlich gewogen und erhielten zur Prävention von Hypoglykämien und Hypotension eine subkutane Glukose-Elektrolyt-Injektion. Nach einer Versuchsdauer von 20 Stunden erfolgte zunächst die klinische Beurteilung der Versuchstiere. Parameter zur Beurteilung des klinischen Zustandes war das Umdrehen aus der Rücken- in die Bauchlage, es wurden Punkte auf einer Skala von Null bis Fünf vergeben. Erfolgte, bei normaler spontanen Aktivität das sofortige Umdrehen in die Bauchlage, wurden fünf, bei leicht verminderter spontaner Aktivität und einem Umdrehen innerhalb von fünf Sekunden vier Punkte vergeben. Dauerte das Umdrehen mehr als fünf Sekunden gab es drei, bei fehlendem Umdrehen zwei und bei vollständigem Fehlen spontaner Bewegung einen Punkt. Das Versterben eines Tieres wurde mit null Punkten bewertet. Die Ergebnisse der klinischen Evaluation sind für alle Experimente in Abbildung 1 (Pneumokokken) und 2 (GBS) jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aller Tiere einer Gruppe dargestellt.

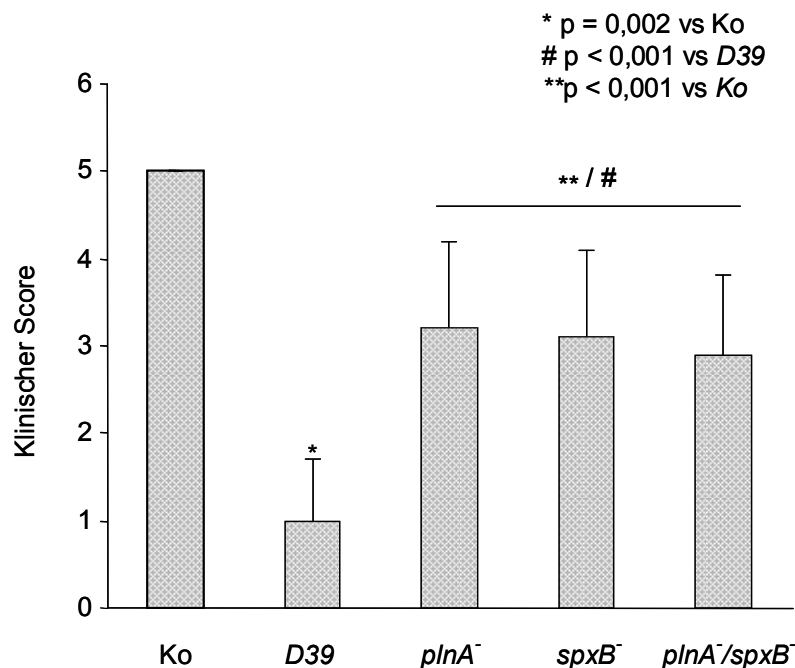


Abbildung 1: Klinischer Score bei Pneumokokken-Meningitis

Deutliche Einschränkung des Allgemeinzustandes bei Verwendung von *D39* ($p = 0,002$) und Mutanten ($p < 0,001$) gegenüber den Kontrollen. Bei Verwendung der Bakterien-Mutanten verglichen mit der Wildtyp-Gruppe ist der klinische Score im Vergleich zu *D39* signifikant verbessert ($p < 0,001$). (Ko: $n = 7$; *D39*: $n = 9$; *plnA*⁻: $n = 10$; *spxB*⁻: $n = 12$; Doppelmutante: $n = 11$; Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten im Mann-Whitney Rank Sum Test.)

Es zeigte sich bei den mit Pneumokokken-Wildtypen und -Mutanten behandelten Tieren eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes gegenüber den PBS-Kontrollen (Ko 5 ± 0 ; *D39*: $1,0 \pm 0,7$; *plnA*⁻: $3,2 \pm 1,0$; *spxB*⁻: $3,1 \pm 1,0$; *plnA*⁻/*spxB*⁻: $2,9 \pm 0,9$). Das Fehlen eines bakteriellen Faktors (H_2O_2 /Pneumolysin) bewirkte eine signifikant geringere Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes der Tiere. Fehlten beide oben genannten Faktoren (Doppelmutante) führte dies nicht zu einer signifikanten Verbesserung des klinischen Zustandes verglichen mit den Einzelmutanten.

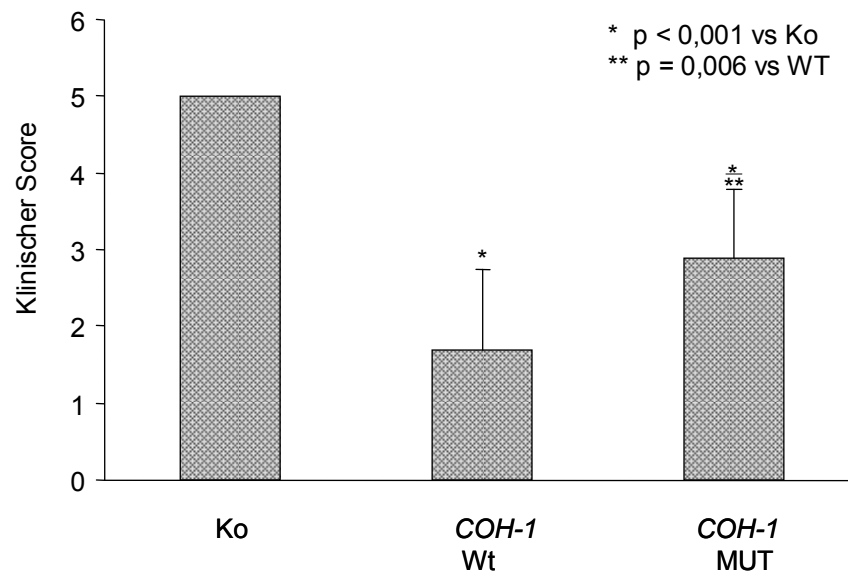


Abbildung 2: Klinischer Score bei GBS-Meningitis

Deutliche Einschränkung des Allgemeinzustandes bei Verwendung des Wildtypstammes ($p < 0,001$) und der Mutanten verglichen mit der Kontrollgruppe. Der klinische Zustand ist bei Verwendung der Mutante verglichen mit der Wildtyp-Gruppe signifikant verbessert ($p = 0,006$) (Ko: $n = 12$; COH-1-WT: $n = 20$; COH-1-MUT: $n = 12$; Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten im Mann-Whitney Rank Sum Test)

Während der GBS-induzierten Meningitis zeigte sich sowohl bei Verwendung des Wildtyps, als auch der Mutante eine deutliche Verschlechterung des klinischen Zustandes verglichen mit der Kontrollgruppe (Ko: $5,0 \pm 0$; COH-1-WT: $1,7 \pm 1,03$; COH-1-MUT: $2,9 \pm 0,87$). Bei Verwendung der Toxin-defizienten Mutante war die Einschränkung des Allgemeinzustandes verglichen mit der Wildtyp-Gruppe jedoch deutlich weniger ausgeprägt.

3.1.1.2 GEWICHTSVERLAUF

Als weiterer Parameter zur Beurteilung des Allgemeinzustandes der Tiere diente das Körpergewicht. Dazu wurden die Tiere vierstündlich sowie am Ende des Versuches gewogen. Das subkutan verabreichte Volumen wurde dabei vom Endgewicht subtrahiert. In Abbildung 3 (Pneumokokken) und 4 (GBS) sind Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere einer Gruppe dargestellt.

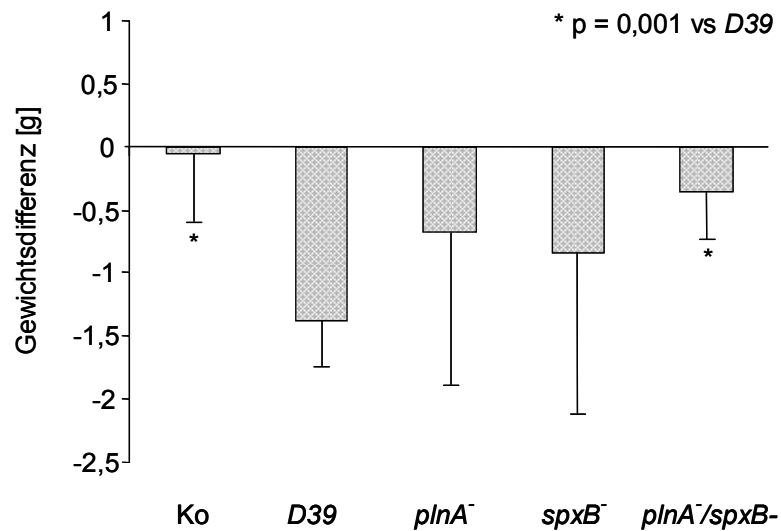


Abbildung 3: Gewichtsverlauf während der Pneumokokken-Meningitis

Deutliche Gewichtsabnahme der Wildtyp-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe ($p = 0,001$), kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Einzel-Mutanten. Bei Verwendung der Doppel-Mutante signifikante Gewichtsabnahme verglichen mit der Wildtyp-Gruppe ($p = 0,001$). (Ko: $n = 7$; D39: $n = 9$; *plnA*⁻: $n = 10$; *spxB*⁻: $n = 11$; *plnA*⁻/*spxB*⁻: $n = 12$; Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten. t-Test)

Im Rahmen der Pneumokokken-Meningitis kam es bei den mit D39 infizierten Tieren zu einer deutlichen Gewichtsreduktion verglichen mit der Kontroll- und der Doppelmutanten-Gruppe (Ko: $-0,06 \pm 0,53\text{g}$; D39: $-1,37\text{g} \pm 0,38\text{g}$; *plnA*⁻/*spxB*⁻: $-0,36 \pm 0,37\text{g}$). Die mit den Mutanten (*plnA*⁻, *spxB*⁻ und *plnA*⁻/*spxB*⁻) behandelten Tiere zeigten hingegen keine signifikante Gewichtsreduktion verglichen mit der Kontrollgruppe (*plnA*⁻: $-0,67 \pm 1,23\text{g}$; *spxB*⁻: $-0,84 \pm 1,27\text{g}$).

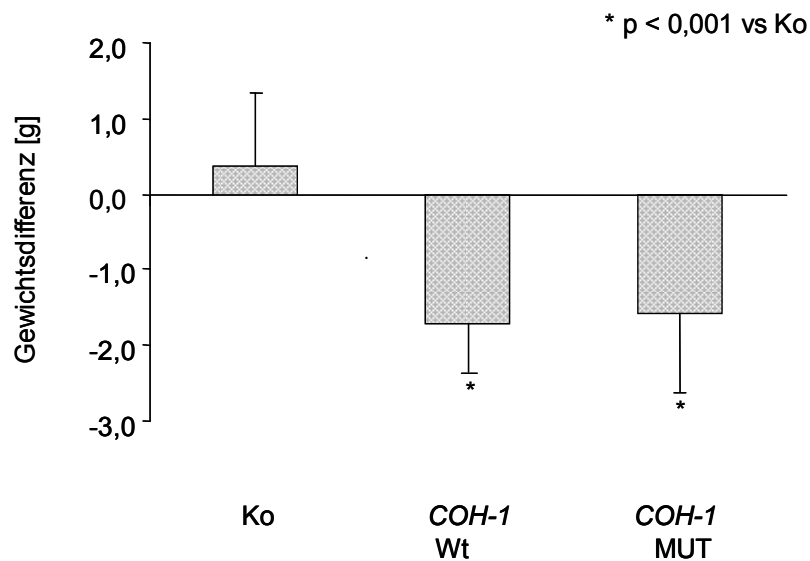


Abbildung 4: Gewichtsverlauf während der GBS-Meningitis

Es zeigt sich eine signifikante Reduktion des Körpergewichtes sowohl in der Wildtyp-, als auch in der Mutanten-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und Mutantengruppe. (Ko: $n=12$; COH-1-WT: $n=20$; COH-1-MUT: $n=12$; Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten, t-Test)

Im Falle der GBS-Meningitis kam es sowohl bei einer Infektion mit dem GBS-Wildtyp, als auch der Hämolysin-defizienten Mutante zu einer signifikanten Reduktion des Körpergewichtes verglichen mit der Kontrollgruppe. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Wildtyp- und der Mutanten-Gruppe (Ko $0,36g \pm 0,97$; COH-1-WT: $-1,7g \pm 0,65$; COH-1-MUT: $-1,6g \pm 1,0$)

3.1.2 NACHWEIS DER MENINGITIS

3.1.2.1 BEURTEILUNG DER PLEOZYTOSE

Zum Nachweis der Meningitis erfolgte die lichtmikroskopische Untersuchung des Liquors. Dazu wurde in dem aus der Zisterna magna entnommenen Liquor mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer die Zahl der Leukozyten/ μ l Liquor bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 5 (Pneumokokken) und Abbildung 6 (GBS) als Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Gruppen dargestellt. Mit Blut kontaminierter Liquor wurde nicht in die Auswertung einbezogen.

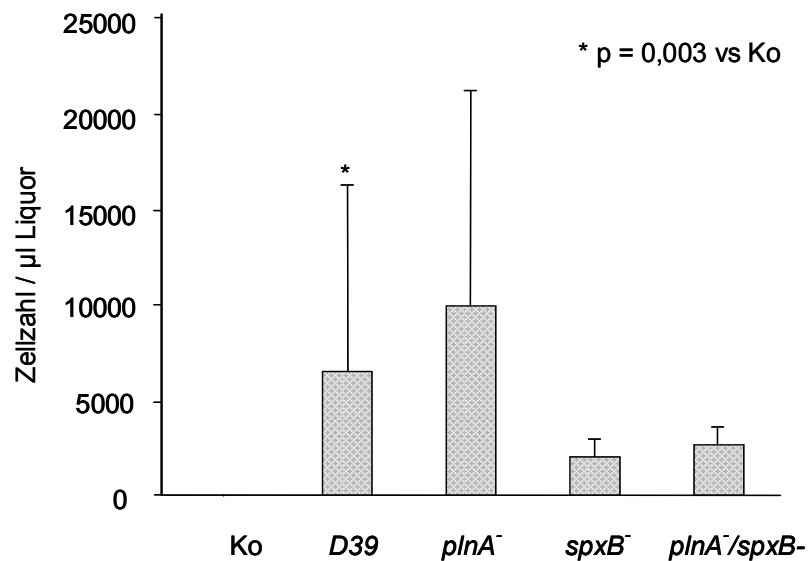


Abbildung 5: Liquor-Pleozytose während der Pneumokokken-Meningitis

Deutliche Pleozytose in allen Meningitis-Tieren. Kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Meningitis-Gruppen. Keine Pleozytose im Liquor der Kontrollgruppe. (Ko: n = 5; D39: n = 5, *plnA*⁻: n = 4, *spxB*⁻: n = 6; Doppelmutante: n = 7; Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten. Mann-Whitney Rank Sum Test)

Sowohl die Wildtyp-Bakterien als auch die verschiedenen Mutanten induzierten in diesem Modell eine Meningitis, die durch den Leukozyten-Einstrom verifiziert wurde. Eine Pleozytose ließ sich sowohl in der Wildtyp-, als auch in den Mutanten-Gruppen nachweisen (D39: 6443/µl ± 9794; *plnA*⁻: 9896/µl ± 11266,3; *spxB*⁻: 1925/µl ± 1019,2; Doppel-Mutante: 2589/µl ± 986,3). Die Leukozytenzahl im Liquor der Kontrolltiere lag im physiologischen Bereich (Ko: 6,7 ± 12,5). Beim Vergleich der Wildtypstämme mit den Toxin-defizienten Mutanten zeigte sich im Falle der Pneumokokken-Meningitis keine signifikante Differenz der Leukozytenzahl im Liquor. Es lag eine große interindividuelle Schwankungsbreite der Zellzahl in den einzelnen Versuchsgruppen vor.

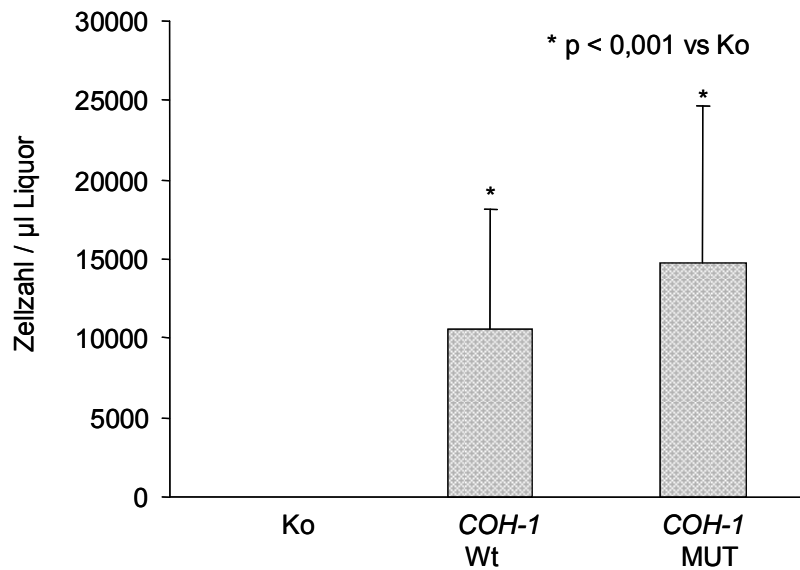


Abbildung 6: Liquor-Pleozytose während der GBS-Meningitis

Vergleichbare Pleozytose in der Wildtyp und Mutanten-Gruppe ohne signifikanten Unterschied. Keine Pleozytose in der Kontrollgruppe. Signifikanter Unterschied zwischen Meningitis- und Kontrollgruppe ($p < 0,001$; t-Test) (Ko: $n = 7$; COH-1-WT: $n = 7$; COH-1-MUT: $n = 4$; Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten)

Sowohl bei Verwendung des Wildtyps, als auch der Mutante ließ sich ein gegenüber der Kontrolle signifikanter Einstrom von Leukozyten in den Liquor beobachten. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wildtyp- und der Mutanten-Gruppe (COH-1-WT: $10590/\mu\text{l} \pm 7497,8$; COH-1-MUT: $14682/\mu\text{l} \pm 9924,9$). Im Liquor der Kontrolltiere konnte keine unphysiologische Pleozytose nachgewiesen werden (Ko: $13,7/\mu\text{l} \pm 19$). Wie bei den mit Pneumokokken behandelten Tieren zeigte sich eine große interindividuelle Schwankung der Zellzahl in den einzelnen Versuchsgruppen.

3.1.2.2 NACHWEIS DER VITALITÄT DER BAKTERIEN DURCH KULTIVIERUNG AUF BLUTAGARPLATTEN

Der verbleibende Liquor wurde auf Blutagarplatten kultiviert. Dazu wurde mit 5 µl Liquor eine Verdünnungsreihe angefertigt. Für die Auswertung wurden die Stufen 10^{-1} , 10^{-6} und 10^{-7} auf den Agarplatten ausgestrichen. Das Ablesen der Platten erfolgte nach 48 Stunden. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere einer Gruppe. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung des Liquors nach Pneumokokken-Meningitis, in Abbildung 8 ist die Auswertung der GBS-Meningitis dargestellt.

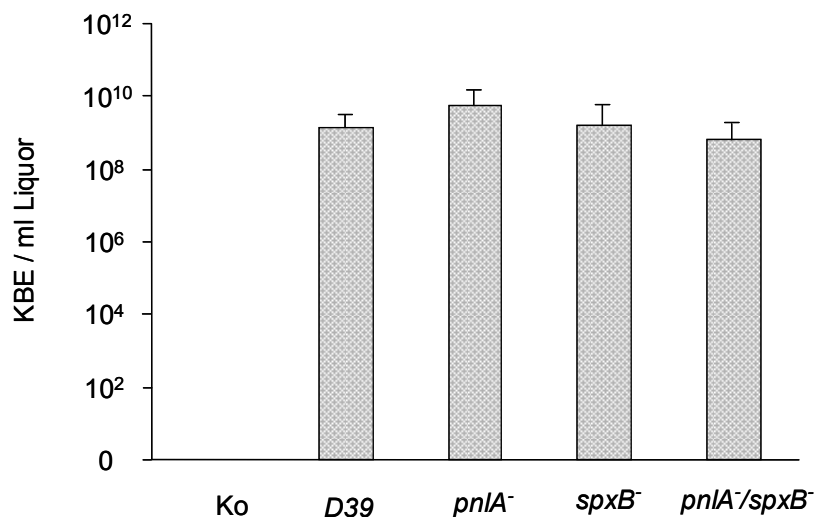


Abbildung 7: Bakterienwachstum im Liquor nach Pneumokokken-Meningitis

Vergleichbares Wachstum der Bakterien im Liquor während der Inkubationszeit ohne signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und Mutantengruppen (t-Test). Kein Bakterienwachstum in der Kontrollgruppe. (Ko: n = 5; D39: n = 5, *plnA*⁻: n = 4, *spxB*⁻: n = 6, *plnA*⁻/*spxB*⁻: n = 7; Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten.)

Sowohl bei den mit D39 (Wildtyp), als auch bei den mit den Mutanten behandelten Tieren fand sich nach Injektion von 10^3 KBE/Tier eine deutliche Vermehrung der Bakterien im Liquor (D39: $1,42 \times 10^9 \pm 1,5 \times 10^8$ KBE/ml; *plnA*⁻: $5,37 \times 10^9 \pm 8,1 \times 10^8$ KBE/ml; *spxB*⁻: $1,63 \times 10^9 \pm 3,9 \times 10^8$ KBE/ml; Doppelmutante: $6,39 \times 10^8 \pm 1,04 \times 10^7$ KBE). Zwischen den verschiedenen Bakterienstämmen waren keine signifikanten Unterschiede in der bakteriellen Wachstumsrate nachweisbar. Im Liquor der Kontrollen zeigte sich kein Bakterienwachstum.

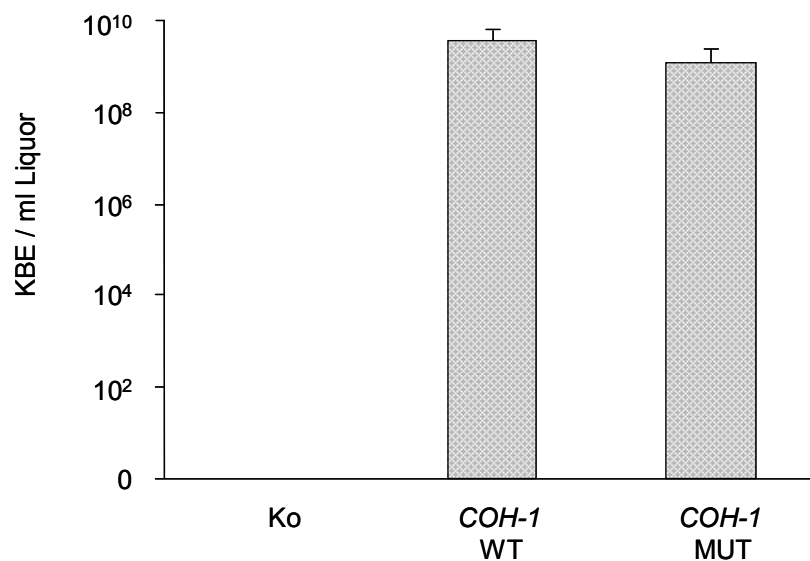


Abbildung 8: Bakterienwachstum im Liquor nach GBS-Meningitis

Vergleichbares Wachstum der GBS im Liquor während der Inkubationszeit. Kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten-Gruppe (t-Test). Kein Bakterienwachstum in der Kontrollgruppe. (Ko: n = 7, COH-1-WT: n = 7, COH-1-MUT: n = 4; Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten.)

Nach intrazisternaler Injektion von 10^3 KBE/Tier fand sich bei allen GBS-Meningitistieren (Wildtyp und Mutante) eine deutliche Vermehrung der Bakterien im Liquor (COH-1-WT: $3,55 \times 10^9 \pm 2,7 \times 10^8$ KBE; COH-1-MUT: $1,16 \times 10^9 \pm 1,1 \times 10^7$ KBE). Es bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der Wachstumsrate zwischen den beiden Gruppen. Bei den Kontrollen konnte kein Bakterienwachstum nachgewiesen werden.

3.2 PNEUMOKOKKEN UND BETA-HÄMOLYSIERENDE

STREPTOKOKKEN DER GRUPPE B INDUZIEREN APOPTOTISCHEN

ZELLTOD KORTIKALER NEURONE

Die histologische Untersuchung der Rattenhirne hinsichtlich eines neuronalen Schadens erfolgte nach Perfusionsfixierung und Einbettung in Paraffin. Es wurden pro Tier je zwölf verschiedene Schnitte pro Hemisphäre beurteilt. Aus allen Werten wurde pro Gehirn ein Mittelwert gebildet. Zunächst erfolgte anhand der Morphologie die Differenzierung des Schadens in Apoptose oder Nekrose. Dazu wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Die Differenzierung in Apoptose oder Nekrose erfolgte nach Kriterien wie Zellschrumpfung, Vergrößerung und Kernkondensation sowie Ballonierung. Die histologische Beurteilung erfolgte durch einen verblindeten Untersucher. Die Anzahl der apoptotischen Zellen/mm³ Kortex ist in den Abbildungen 9 (Pneumokokken) und 12 (GBS) als Mittelwert mit Standardfehler der einzelnen Gruppen dargestellt. Es fand sich überwiegend apoptotischer Zelltod mit den typischen lichtmikroskopisch nachweisbaren Merkmalen wie Zellschrumpfung und Zellkernkondensation. Als Apoptose-Nachweis diente zusätzlich die TUNEL-Methode (Tdt mediated dUTP Nick End Labeling), dabei werden modifizierte Nukleotide enzymatisch durch die terminale Deoxynukleotid Transferase an DNS-Einzel- und Doppelstrangbrüche gebunden und mittels DAB angefärbt. Die Zellkerne apoptotischer Zellen können auf diese Weise lichtmikroskopisch dargestellt werden. Die histologischen Präparate sind in Abbildung 10 (H&E) und 11 (TUNEL-Methode) für die Pneumokokken- und in Abbildung 13 (H&E) und 14 (TUNEL-Methode) für die GBS-Meningitis dargestellt

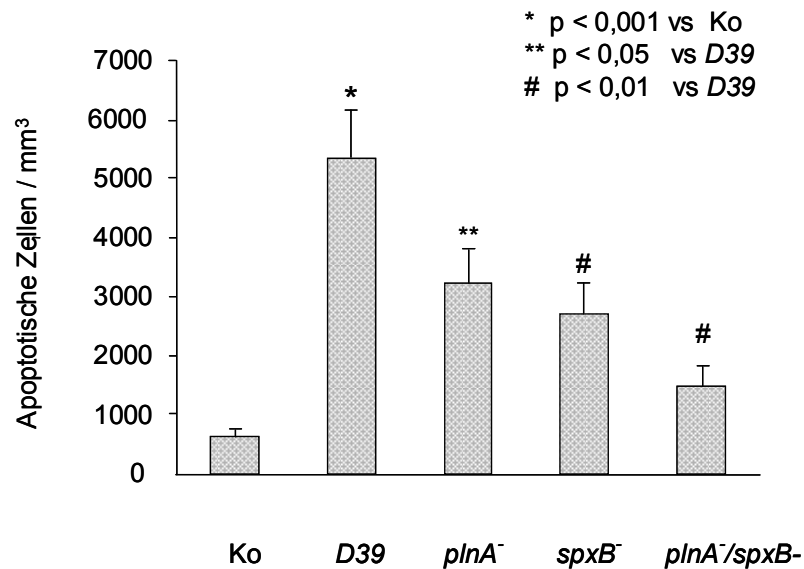


Abbildung 9: Histologie des Kortex nach Pneumokokken-Meningitis

Ausgeprägter kortikaler Schaden bei Verwendung von *D39* (10^3 KBE/Tier) im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,001$), signifikante Verminderung des kortikalen Schadens gegenüber dem Wildtyp bei Verwendung der Toxin-defizienten Mutanten *plnA*⁻ ($p < 0,05$), *spxB*⁻ ($p = 0,01$) und *plnA*⁻/*spxB*⁻ ($p = 0,002$). Bei Verwendung der Einzelmutanten signifikant mehr Schaden verglichen mit den Kontrolltieren (*plnA*⁻ $p = 0,005$ vs Ko; *spxB*⁻ $p = 0,004$ vs Ko). Bei Verwendung der Doppelmutante kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. (Ko: $n = 7$, *D39*: $n = 7$, *plnA*⁻: $n = 9$, *spxB*⁻: $n = 12$; Doppelmutante: $n = 11$; Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten, t-Test)

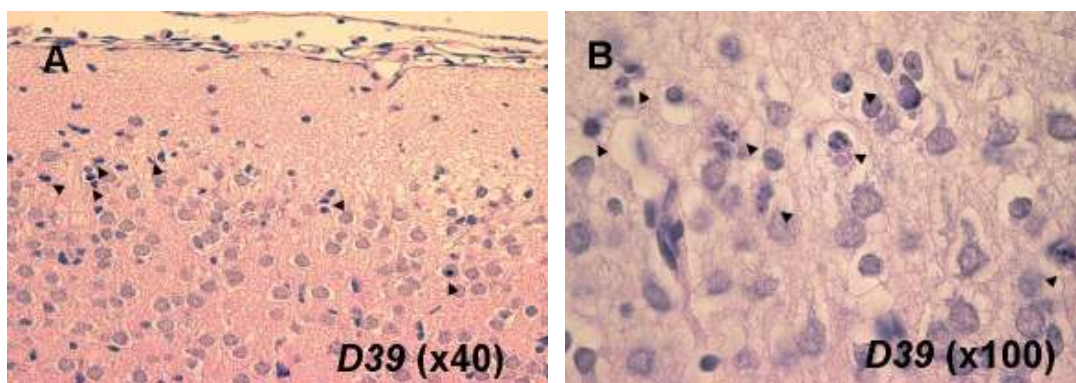


Abbildung 10: Histologie des Kortex nach Inkubation mit dem Pneumokokken-Wildtypstamm *D39* (H&E-Färbung)

Lichtmikroskopische Darstellung apoptotischer Kortex-Neurone. A: H&E-Färbung, 40-er Objektiv. B: H&E-Färbung, 100-er Objektiv. Die Pfeile kennzeichnen apoptotische Neurone

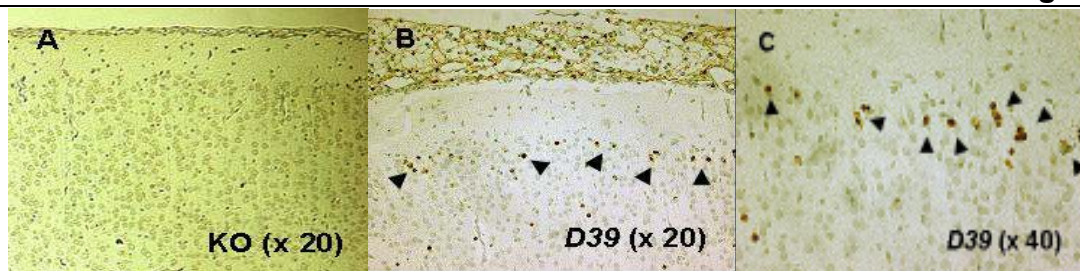


Abbildung 11: Histologie des Kortex nach Inkubation mit dem Pneumokokken-Wildtypstamm *D39* (TUNEL-Methode)

Lichtmikroskopische Darstellung apoptotischer Kortex-Neurone. A: unbehandelte Kontrolle, 20-er Objektiv. B: *D39*, 20-er Objektiv. C: *D39*, 40-er Objektiv. Die Pfeile kennzeichnen TUNEL-positive Neurone.

Bei Injektion von *D39* und den Einzelmutanten (*plnA*⁻ und *spxB*⁻) konnte ein ausgeprägter apoptotischer Zellschaden im Bereich des Kortex verglichen mit den Kontrolltieren nachgewiesen werden (Ko: $626,6 \pm 114,4/ \text{mm}^3$; *D39*: $5345,7 \pm 814,0/ \text{mm}^3$; *plnA*⁻: $3240 \pm 543,6/ \text{mm}^3$; *spxB*⁻: $2690 \pm 522,7/ \text{mm}^3$). Bei Injektion der Doppelmutante zeigte sich keine signifikante Zunahme der Apoptoserate verglichen mit den Kontrollen (*plnA*⁻/*spxB*⁻: $1498,2 \pm 321,2/ \text{mm}^3$), jedoch eine signifikante Reduktion verglichen mit dem Wildtyp. Lichtmikroskopisch fanden sich in der durchgeführten Hämatoxylin- Eosin Färbung Apoptose-typische morphologische Veränderungen der Zellen wie zum Beispiel Zellschrumpfung und Kernkondensation. Die apoptotischen Zellen sind in Abbildung 10 durch Pfeile gekennzeichnet. Als Apoptose-Nachweis wurden weiterhin die für diese Form des Zelltodes typischen DNA-Doppelstrangbrüche mittels TUNEL-Methode dargestellt. Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte analog zur H&E-Färbung. Die Rate und die Verteilung der so angefärbten Zellen korrelierte mit der Zahl der apoptotischen Zellen in den H&E-gefärbten Schnitten. Die Daten sind nicht gezeigt. Abbildung 11 zeigt TUNEL-positive Zellen im Kortex bei *D39*- induzierter Meningitis, diese sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

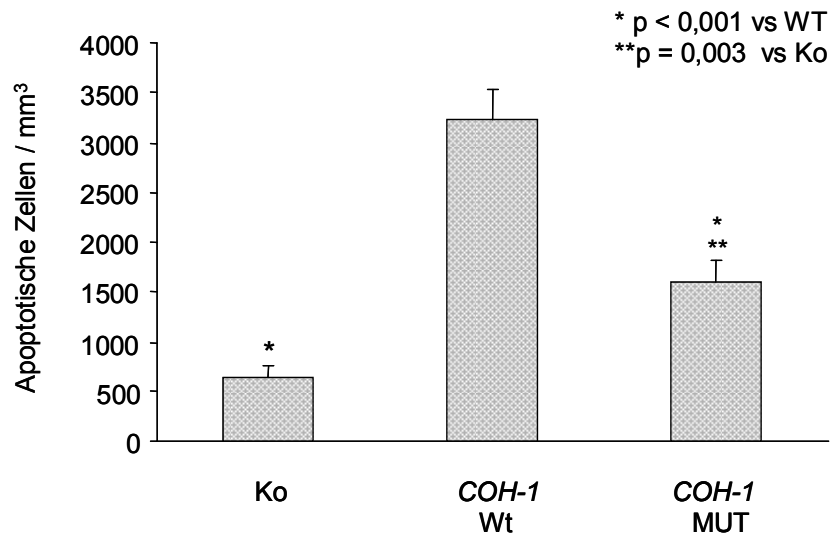


Abbildung 12: Histologie des Kortex nach GBS-Meningitis

Ausgeprägter kortikaler Schaden bei Verwendung des *COH-1*-WT (103 KBE/Tier) und der Toxin-defizienten Mutante gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,001$ Ko vs Wt, $p=0,003$ Ko vs Mut), Verminderung des kortikalen Schadens bei Verwendung der Toxin-defizienten Mutante *COH-1* *cylE* Δ *cat* im Vergleich zum Wildtyp ($p < 0,001$). (Ko: $n = 8$, *COH-1*-WT: $n=16$, *COH-1*-MUT: $n=10$, Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten, Mann-Whitney Rank Sum Test und t-Test)

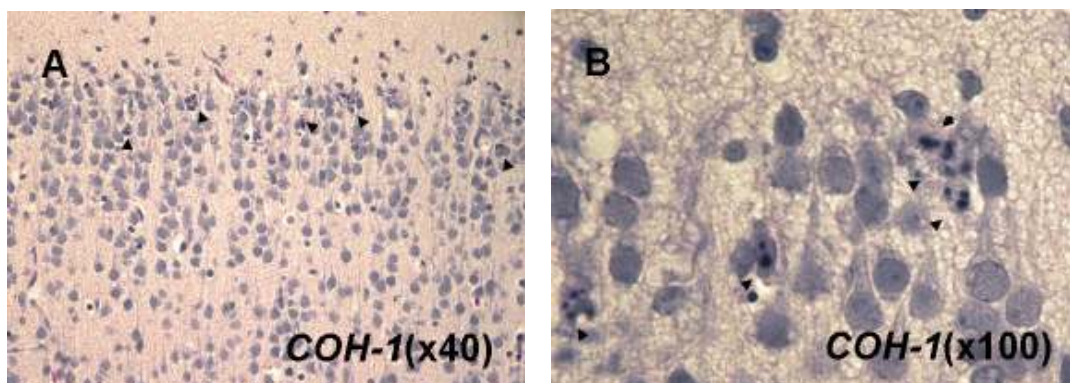


Abbildung 13: Histologie des Kortex nach Inkubation mit dem GBS-Wildtypstamm *COH-1* (H&E-Färbung)

Lichtmikroskopische Darstellung apoptotischer Kortex-Neurone. A: H&E-Färbung, 40-er Objektiv. B: H&E-Färbung, 100-er Objektiv. Die Pfeile kennzeichnen apoptotische Neurone

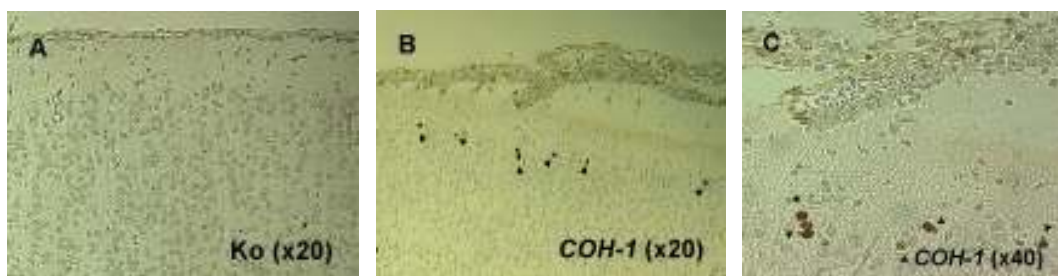


Abbildung 14: Histologie des Kortex nach Inkubation mit COH-1 (TUNEL-Methode)

Lichtmikroskopische Darstellung apoptotischer Kortex-Neurone. A: unbehandelte Kontrolle, TUNEL-Methode, 20-er Objektiv. B: *COH-1*-Wildtyp, TUNEL-Methode, 20-er Objektiv. C: *COH-1*-Wildtyp, TUNEL-Methode, 40-er Objektiv. Die TUNEL-positiven Zellen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Nach Injektion des GBS-Wildtyps und der Mutante kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate verglichen mit der Kontrollgruppe (Ko: $645,8 \pm 101,5 / \text{mm}^3$; *COH-1*- WT: $3225,2 \pm 303,4 / \text{mm}^3$; *COH-1*-MUT: $1595,6 \pm 221,9 / \text{mm}^3$). Nach Injektion der Mutante zeigt sich eine signifikante Reduktion des kortikalen Schadens im Vergleich zum Wildtyp ($p < 0,05$). Auch bei der GBS-induzierten Meningitis fanden sich lichtmikroskopisch in der Hämatoxylin- Eosin Färbung typische Apoptosemerkmale. Die apoptotischen Zellen sind in Abbildung 13 durch Pfeile gekennzeichnet. In der Abbildung 14 sind die Ergebnisse einer DAB-TUNEL-Methode dargestellt. Es finden sich hier keine TUNEL-positiven Zellen im Kortex des Kontrolltieres. Die Zahl der TUNEL-positiven Zellen korreliert auch bei der GBS-induzierten Meningitis mit der Apoptoserate der mit H&E gefärbten Schnitte. Die Daten sind nicht gezeigt.

3.3 PNEUMOKOKKEN UND BETA-HÄMOLYSIERENDE

STREPTOKOKKEN DER GRUPPE B INDUZIEREN APOPTOTISCHEN

ZELLTOD IM GYRUS DENTATUS

Darüber hinaus erfolgte die histologische Beurteilung des Gyrus dentatus. Die Anzahl der apoptotischen Zellen / mm^3 Gyrus dentatus ist in Abbildungen 15 für die Pneumokokken-Meningitis und Abbildung 18 für die B-Streptokokken-Meningitis als Mittelwert und Standardfehler aller Tiere einer Gruppe dargestellt.

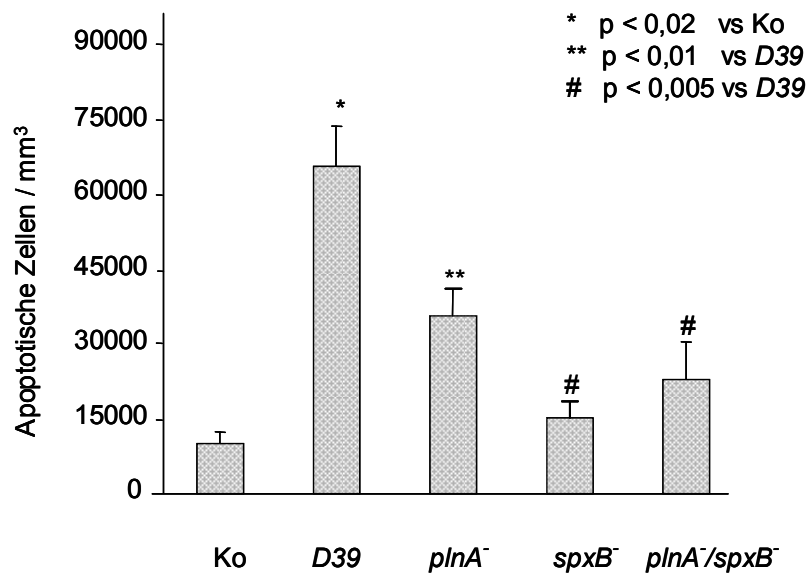


Abbildung 15: Histologie des Gyrus dentatus nach Pneumokokken-Meningitis

Ausgeprägter Schaden im Gyrus dentatus bei Verwendung des Pneumokokken-Wildtyps (*D39*) ($p < 0,02$ vs Ko, Mann-Whitney Rank Sum Test). Signifikante Verminderung des Schadens bei Verwendung der Toxin-defizienten Mutanten ($p < 0,01$ für den Vergleich mit *plnA*⁻; $p < 0,05$ für den Vergleich mit *spxB*⁻ und der Doppelmutante *plnA*⁻/*spxB*⁻). Kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den drei Mutantengruppen. (Ko: $n = 7$, *D39*: $n = 7$, *plnA*⁻: $n = 9$, *spxB*⁻: $n = 12$; Doppelmutante: $n = 11$; Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten.)

D39 induzieren ein großes Maß an Apoptose im Gyrus dentatus (Ko: $9836,3 \pm 2484,1/ \text{mm}^3$; *D39*: $65572,6 \pm 8351,02/ \text{mm}^3$). Die Injektion der Doppelmutante führte zu einer signifikanten Reduktion des apoptotischen Schadens (*plnA*⁻/*spxB*⁻: $22624,9 \pm 7645,3/ \text{mm}^3$) verglichen mit dem Wildtyp. Wie auch im Kortex fand sich eine signifikante Verminderung der Neurodegeneration bei Verwendung der Einzelmutanten (*plnA*⁻: $35839,6 \pm 4969,5/ \text{mm}^3$; *spxB*⁻: $15108,8 \pm 3566,2/ \text{mm}^3$). Das Ausmaß der *D39*-induzierten neuronalen Apoptose war im Gyrus dentatus um das Zwölfwache höher als im Kortex. In Abbildung 16 (H&E) und 17 (TUNEL-Methode) sind histologische Beispiele dargestellt.

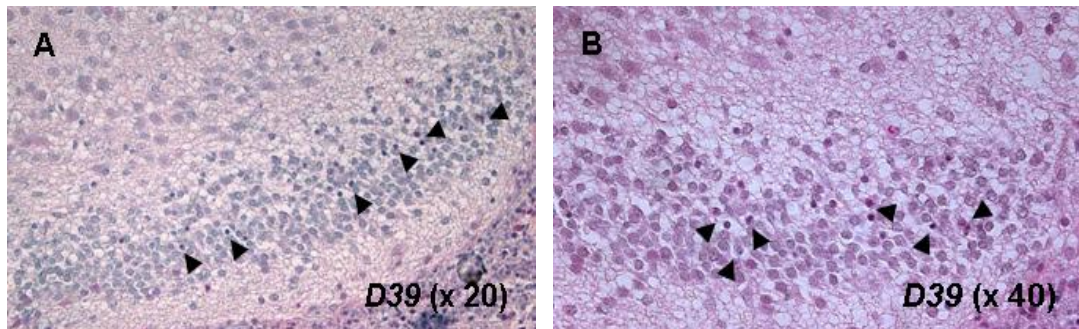


Abbildung 16: Histologie des Gyrus dentatus nach Inkubation mit dem Pneumokokken-Wildtypstamm *D39* (H&E-Färbung)

Lichtmikroskopische Darstellung apoptotischer Neurone im Gyrus dentatus. A: H&E-Färbung, 20-er Objektiv. B: H&E-Färbung, 40-er Objektiv. Die Pfeile kennzeichnen apoptotische Neurone

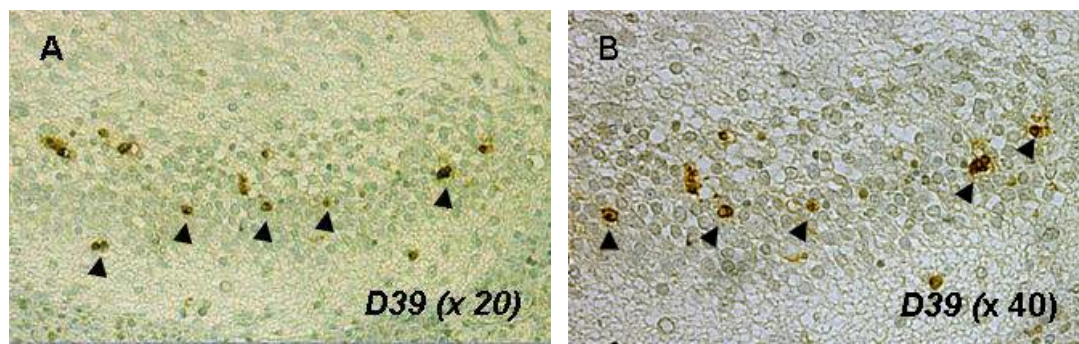


Abbildung 17: Histologie des Gyrus dentatus nach Inkubation mit dem Pneumokokken-Wildtypstamm *D39* (TUNEL-Methode)

Lichtmikroskopische Darstellung apoptotischer Neurone im Gyrus dentatus. A: *D39*, 20-er Objektiv Vergrößerung. B: *D39*, 40-er Objektiv. Die Pfeile kennzeichnen TUNEL-positive Neurone

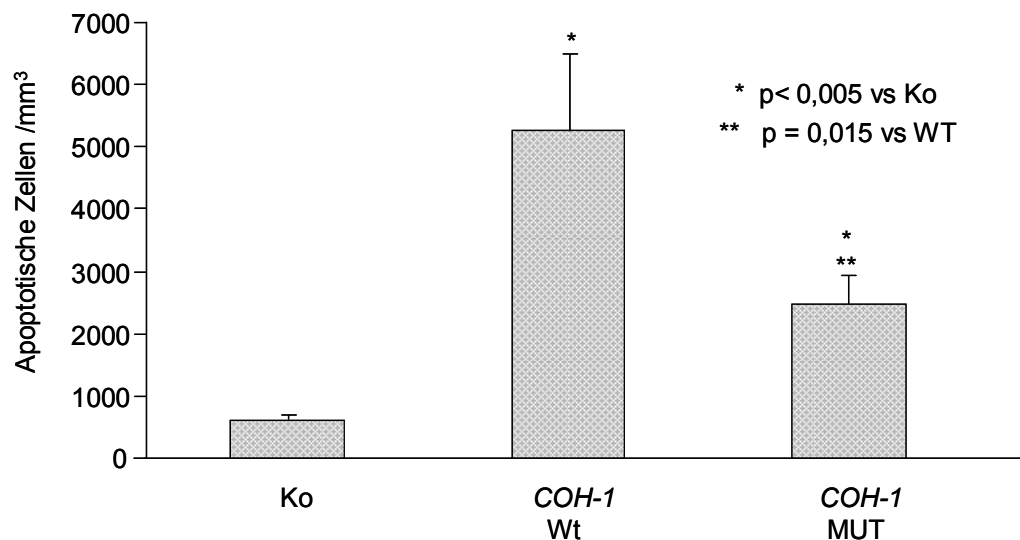


Abbildung 18: Histologie des Gyrus dentatus nach GBS-Meningitis

Ausgeprägter Schaden im Gyrus dentatus bei Verwendung des GBS-Wildtyps *COH-1* und der Toxin-defizienten Mutante. ($p < 0,005$ vs Ko, Mann-Whitney Rank Sum Test). Signifikante Verminderung des Schadens bei Verwendung der Toxin-defizienten Mutanten im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe ($p = 0,015$; Mann-Whitney Rank Sum Test) Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten; Ko: $n = 8$, *COH-1*-WT: $n=16$, *COH-1*-MUT: $n=10$,

Im Rahmen der B- Streptokokkenmeningitis kommt es sowohl bei der Verwendung des Wildtypstammes als auch bei der Verwendung der Hämolyysin-defizienten Mutante zu Apoptose im Gyrus dentatus (Ko: $600 \pm 67,8/ \text{mm}^3$; *COH-1* WT: $5268,7 \pm 1226,5/ \text{mm}^3$, *COH-1*- Mut $2463,3 \pm 468,7$). Die Injektion der Toxin -defizienten Mutante führt zu einer signifikanten Reduktion des apoptotischen Schadens verglichen mit dem Wildtypstamm. Auch bei den durch *COH-1* und die Mutante infizierten Tieren ließen sich im Gyrus dentatus TUNEL-positive Zellen nachweisen. Die Zahl der TUNEL – positiven Zellen korreliert mit den in der H&E- Färbung erhobenen Werten. Daten und Fotos sind hier nicht gezeigt

3.4 DAS VERTEILUNGSMUSTER DER APOPTOSE IM RAHMEN DER PNEUMOKOKKEN-MENINGITIS IST ALTERSABHÄNGIG

Um den Einfluss des Reifegrades des Gehirns auf das Ausmaß des neuronalen Schadens zu untersuchen, wurden eine Pneumokokken-Meningitis bei sieben (PND7) und elf Tage (PND11) alten Tieren induziert. Der Versuchsablauf erfolgte wie unter 2.3. beschrieben. In den Abbildungen 19 und 20 ist die Zahl der apoptotischen

Neurone /mm³ Kortex (Abbildung 19) und Gyrus dentatus (Abbildung 20) bei sieben und elf Tage alten Tieren als Mittelwert und Standardfehler dargestellt.

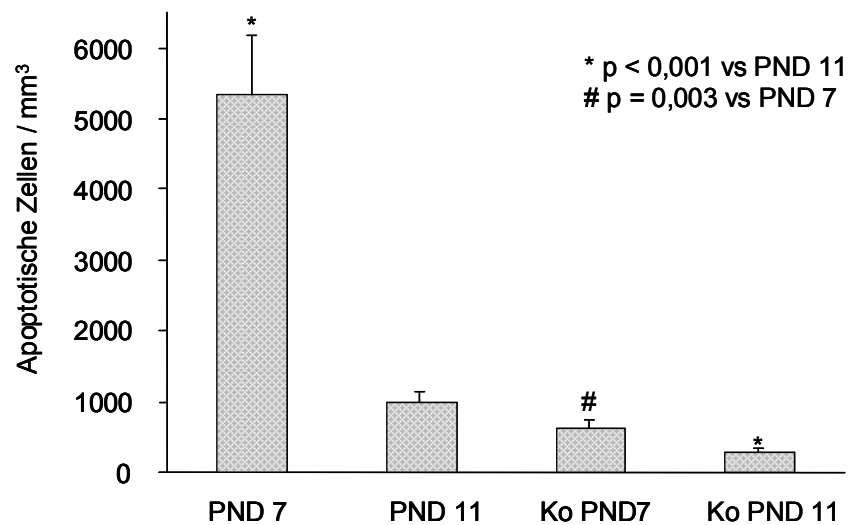


Abbildung 19: Neuronaler Schaden im Kortex nach Pneumokokken-Meningitis bei Ratten unterschiedlichen Alters

Histologische Untersuchung des Kortex. Dargestellt ist die Zahl der apoptotischen Zellen als Mittelwert mit Standardfehler für beide Versuchsgruppen. Es findet sich eine signifikante Reduktion des kortikalen Schadens mit steigendem Lebensalter ($p < 0,001$, Mann-Whitney Rank Sum Test)

Verglichen mit den sieben Tage alten Tieren zeigte sich bei den elf Tage alten Tieren eine signifikante Verminderung des kortikalen Schadens. (PND7: 5345,7 ± 814/ mm³; PND11: 999,1 ± 140,2/ mm³)

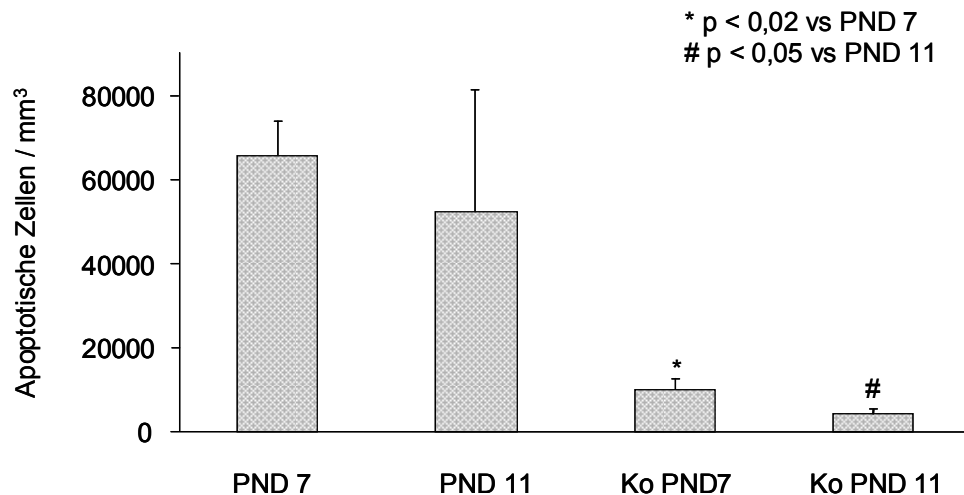


Abbildung 20: Neuronaler Schaden im Gyrus dentatus nach Pneumokokken-Meningitis bei Ratten unterschiedlichen Alters

Histologische Untersuchung des Gyrus dentatus. Dargestellt ist die Zahl der apoptotischen Zellen als Mittelwert mit Standardfehler für beide Versuchsgruppen. Signifikanter Schaden im Vergleich zu den altersentsprechenden Kontrollgruppen ($p < 0,02$ vs PND 7, $p > 0,05$ vs PND 11). Es findet sich keine signifikante Reduktion des Schadens mit steigendem Lebensalter (Mann-Whitney Rank Sum Test),

Beim Vergleich des Gyrus dentatus bezüglich neuronaler Schädigung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den sieben Tage und elf Tagen alten Tieren (PND7: $65572,7 \pm 8351 / \text{mm}^3$; PND11: $52477,7 \pm 28990,6 / \text{mm}^3$).

4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines *in-vivo*-Meningitismodells die Bedeutung bakterieller Toxine als Mediatoren in der Pathogenese neuronaler Apoptose im Rahmen der neonatalen Meningitis zu untersuchen. Voraussetzung dafür war, ein neonatales Ratten-Meningitis-Modell zu etablieren. Um die Rolle bakterieller Toxine zu untersuchen, wurden Toxin-defiziente Bakterien-Mutanten verwendet.

Dabei ergaben sich folgende Resultate:

- I. **Pneumokokken und beta-hämolysierende Streptokokken der Gruppe B induzieren Meningitis im neonatalen Rattenmodell.**
- II. **Pneumokokken und beta-hämolysierende Streptokokken der Gruppe B induzieren neuronale Apoptose im neonatalen Ratten-Meningitismodell im Kortex und Gyrus dentatus.**
- III. **Der neuronale Schaden wird wesentlich durch die Poren-bildenden Toxine Pneumolysin und beta-Hämolysin und durch Wasserstoffperoxid vermittelt.**
- IV. **Eine Reduktion des neuronalen Schadens führt zu einer Verbesserung des klinischen Zustandes.**
- V. **Es zeigt sich ein altersspezifischer Unterschied im Verteilungsmuster der Apoptose.**

Die Ergebnisse sollen nachfolgend im Einzelnen diskutiert werden.

4.1 DER EINFLUSS BAKTERIELLER TOXINE AUF PLEOZYTOSE UND BAKTERIENWACHSTUM IM LIQUOR CEREBROSPINALIS

Durch intrazisternale Injektion von *S. pneumoniae* und *S. agalactiae*-Wildtypen konnte in diesem Modell zuverlässig eine Meningitis induziert werden. Auch bei Verwendung der verschiedenen Toxin-defizienten Mutanten kam es zur Ausbildung einer Meningitis. Diese wurde durch Liquorpleozytose und Bakterienwachstum im Liquor verifiziert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Wachstum der verschiedenen Bakterienstämme zwischen den beiden Wildtypen und den entsprechenden Mutanten. Hinsichtlich der Liquor-Pleozytose fanden sich sowohl bei der Pneumokokken- als auch bei der GBS-Meningitis keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und

Mutantengruppen. Es zeigte sich eine große interindividuelle Schwankungsbreite der Zellzahlen in den einzelnen Versuchsgruppen. Welchen Einfluss bakterielle Toxine auf den Leukozyteneinstrom und das Wachstum der Erreger im Liquor haben, ist bisher nicht vollständig geklärt. In einem Kaninchen-Meningitis-Modell wurde nach intrazisternaler Injektion von *D39* und *plnA*⁻ gezeigt, dass das Poren-formende Toxin Pneumolysin keinen Einfluss auf die Liquor-Pleozytose und das Wachstum der Bakterien im Liquor hat. Bei Verwendung der Toxin-defizienten Mutante (*plnA*⁻) fand sich bezüglich der Pleozytose und der Zahl der KBE im Liquor in dieser Studie kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Mutanten-Gruppe [141]. In einem murinen Meningitismodell konnte ebenfalls gezeigt werden, dass bei Verwendung einer Pneumolysin-defizienten Mutante die Inflammation im Subarachnoidalraum nicht vermindert ist [142]. Es gibt Hinweise darauf, dass die Pneumolysin-defiziente Mutante sich im Blut schlechter vermehrt als der Wildtypstamm [100,142]. Das liegt vermutlich daran, dass Pneumolysin in geringen Konzentrationen die bakterizide Aktivität polymorphkerniger Granulozyten und Makrophagen inhibiert [101,149]. Da Pneumolysin von der Mutante nicht mehr produziert wird, können die Bakterien durch phagozytierende Zellen schneller aus dem Blutstrom eliminiert werden. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass in *in-vitro*-Versuchen keine Unterschiede in der Wachstumsrate zu finden sind. Der Liquorraum zeichnet sich durch geringe Leukozyten-Präsenz, niedrige Immunglobulin-Konzentrationen und mangelnde opsonierende Aktivität aus [150], es herrscht hier also eine lokale Immunschwäche [151]. Das könnte die Erklärung dafür sein, dass das Wachstum der Toxin-defizienten Mutante im Liquor im Vergleich zum Wildtyp - anders als im Blut - nicht vermindert ist. Für beta-Hämolysin/Zytolysin existieren bisher keine Daten über Pleozytose und Wachstum in Abhängigkeit vom Vorhandensein des Toxins. Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch dieses Poren-formende Toxin keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien im Liquorraum und auf das Ausmaß der Liquorpleozytose hat.

4.2 DER EINFLUSS BAKTERIELLER TOXINE AUF DEN KLINISCHEN VERLAUF DER MENINGITIS

Zur klinischen Untersuchung wurde ein gut etablierter Score verwendet bei dem das Umdrehen aus der Rücken- in die Bauchlage beurteilt wurde [40,44,138,139]. Dabei

wurden auf einer Skala Punkte von null bis fünf vergeben. Kriterien waren die Dauer des Umdrehens und die allgemeine motorische Aktivität der Tiere bei der Untersuchung. Dieser Score wird auch in anderen Modellen verwendet und erlaubt eine gute Beurteilung des klinischen Zustandes, da andere Funktionstest wie z.B. der Morris-Watermaze- oder der Tight-Rope-Test [152] aufgrund der entwicklungsbedingt eingeschränkten motorischen und kognitiven Fähigkeiten der Versuchstiere nicht durchführbar sind. Es zeigte sich eine Reduktion des Allgemeinzustandes bei Verwendung der Wildtyp-Stämme (*D39*, *COH-1*) verglichen mit den Kontrolltieren. Wurde die Meningitis durch die Toxin-defizienten Mutanten induziert, zeigte sich gegenüber der Wildtyp-Meningitis ein besserer, verglichen mit den Kontrolltieren jedoch reduzierter klinischer Score. Das Fehlen der Toxine führt zu einer weniger schwer verlaufenden Erkrankung. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bakterielle Toxine einen Einfluss auf den Verlauf der Meningitis haben und werden durch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen gestützt, bei denen es bei Verwendung der Pneumolysin-defizienten Mutante zu einem weniger schweren Krankheitsverlauf kam [142]. In einer anderen Studie zeigte sich eine Verlängerung der Überlebenszeit nach Immunisierung von Mäusen mit einem Pneumolysin-Antikörper verglichen mit den Kontrolltieren. Auch dieses Ergebnis unterstützt die Bedeutung von Pneumolysin in der Pathogenese der Erkrankung [153].

4.3 DER EINFLUSS BAKTERIELLER TOXINE AUF DAS AUSMASS DES NEURONALEN SCHADENS WÄHREND DER BAKTERIELLEN MENINGITIS

D39 und *COH-1* induzieren neuronale Apoptose im Bereich des Kortex und des Gyrus dentatus. Der Schaden im Bereich des Gyrus dentatus erreichte etwa das zehnfache Ausmaß des kortikalen Schadens. Bei Verwendung der Toxin-defizienten Mutanten (*plnA⁻*, *spxB⁻*, *plnA⁻/spxB⁻* und *COH-1cyIEΔcat*) kam es sowohl im Kortex, als auch im Gyrus dentatus zu einer signifikanten Reduktion des Schadens.

In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen der Pneumokokken-induzierten Meningitis zum apoptotischen Zelltod von Neuronen des Gyrus dentatus kommt [15,17]. In humanem Autopsiegewebe gelang der Nachweis neuronaler Apoptose im Gyrus dentatus [14]. In MRT-Untersuchungen von Meningitis-Patienten fand sich eine deutliche, möglicherweise durch Neuronenverlust bedingte,

Atrophie des Gyrus dentatus [43]. Dieser Teil des Hippokampus spielt eine wichtige Rolle in Prozessen des Gedächtnisses und des Lernens [154]. Das könnte erklären, warum die Patienten nach einer Meningitis so häufig unter Lerndefiziten und Störungen des Kurzzeitgedächtnisses leiden.

Die Tatsache, dass in unserem Modell die Verbesserung des klinischen Zustandes mit einer Abnahme des neuronalen Schadens im Hippokampus und Kortex assoziiert ist, lässt sich mit diesen Beobachtungen in Verbindung bringen. Es ist durchaus denkbar, dass die Reduktion des neuronalen Schadens auch zu einer geringeren Ausprägung neuro-psychologischer Defizite führt. Diese in einem neonatalen Ratten-Modell zu verifizieren, ist jedoch schwierig. Zum Einen ist es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen, das Überleben der mit den Wildtypen behandelten Tiere ausreichend zu verlängern, um motorische und kognitive Funktionstests durchzuführen, zum Anderen existieren bisher keine Tests, um die kognitiven Fähigkeiten sieben Tage alter Ratten hinreichend zu beurteilen. In Versuchen mit adulten Mäusen konnte gezeigt werden, dass bei Ausdehnung des neuronalen Schadens das Lernen im Water-Maze-Modell deutlich reduziert ist [142]. Der Neuronenverlust korreliert also mit einer Störung kognitiver Fähigkeiten.

Der bessere klinische Zustand und die Reduktion des neuronalen Schadens bei Verwendung der Toxin-defizienten Mutanten in unserem Modell können im Zusammenhang gesehen werden: eine Reduktion des neuronalen Schadens führt zu einer Verbesserung des klinischen Zustandes.

Warum es insbesondere zur Neuronenschädigung im Bereich des Gyrus dentatus kommt, ist derzeit noch nicht ganz klar. Es wird ein Zusammenhang zwischen der räumlichen Nähe der Liquor-gefüllten Seitenventrikel zum Gyrus dentatus und einem direkt toxischen Effekt der Bakterien auf die Neurone diskutiert [17]. Im Liquorraum kommt es nach Eintritt der Bakterien zu deren Vermehrung und dann nach Beginn der Antibiotika- und/oder Autolysin-induzierten Bakterienlyse zur Freisetzung verschiedener bakterieller Faktoren, insbesondere bakterieller Toxine wie Pneumolysin oder beta-Hämolysin.

Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass Neurone unterschiedlicher Hirnregionen sich hinsichtlich ihrer Vulnerabilität gegenüber schädigenden Noxen wie Trauma oder Hypoxie [155,156,157] unterscheiden. Eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber bakteriellen Toxinen ist ebenfalls denkbar, da an anderen juvenilen und adulten Meningitismodellen bereits gezeigt werden konnte, dass es insbesondere Neurone des

Gyrus dentatus sind, die im Verlauf der Erkrankung durch apoptotischen Zelltod absterben. Im Bereich des Kortex hingegen findet sich in diesen Studien überwiegend nekrotischer Zelltod. [24,40,138,158,159].

4.4 DIE ROLLE BAKTERIELLER TOXINE IN DER PATHOGENESE DES NEURONALEN SCHADENS

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Meningitis durch den Pneumokokken-Wildtyp *D39* und verschiedene Toxin-defiziente Mutanten (*plnA*⁻, *spxB*⁻, *plnA*⁻/*spxB*⁻) sowie einen Serotyp-III-GBS (*COH-1*) und dessen Hämolysin-defiziente Mutante induziert. Auf diese Weise konnte der Einfluss der Toxine auf das Ausmaß des neuronalen Schadens untersucht werden.

Im Falle der Pneumokokken-Meningitis führt bereits das Fehlen eines Toxins zu einer signifikanten Reduktion des Schadens im Kortex. Bei Verwendung der Pneumolysin-defizienten Mutante (*plnA*⁻) kam es zu einer Reduktion des Schadens um 40 Prozent, beim Fehlen von Wasserstoffperoxid (*spxB*⁻) reduzierte sich der Schaden um etwa 50 Prozent, fehlten beide Toxine (*plnA*⁻/*spxB*⁻) fand sich eine Verminderung des Schadens um ca. 70 Prozent verglichen mit dem Wildtyp. Verglichen mit den Kontrolltieren zeigte sich kein Unterschied im Ausmaß des Schadens, wenn die Meningitis durch die Doppelmutante induziert wurde. Beim Fehlen beider Toxine ist also das Ausmaß des Schadens auf ein Minimum reduziert.

Im Bereich des Gyrus dentatus zeigte sich bei Verwendung der Einzel-Mutanten eine Reduktion des Schadens um 45 (*plnA*⁻) bzw. 77 Prozent (*spxB*⁻). Das gleichzeitige Fehlen beider Faktoren (*plnA*⁻/*spxB*⁻) führte zu einer Reduktion des Schadens um etwa 65 Prozent. Diese Daten sind vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Hier zeigte sich in einem Kaninchen-Meningitismodell eine signifikante Reduktion der neuronalen Apoptose im Gyrus dentatus bei Verwendung der Toxin-defizienten Mutanten [39]. Bei Verwendung der GBS zeigte sich ein ähnlicher Effekt. Hier ergab sich bei Verwendung der *COH-1* Mutante eine Reduktion der kortikalen Neuronen-Degeneration um etwa 50 Prozent, beim Vergleich der Apoptoserate im Gyrus dentatus fand sich eine Reduktion des Schadens um etwa 47 Prozent. Die zu neuronaler Apoptose führenden Mechanismen sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Es konnte bisher in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Bakterien selbst in der Lage sind, Apoptose zu induzieren [39,130]. Die Pneumokokken-Toxine

Wasserstoffperoxid und Pneumolysin spielen dabei in der Pathogenese eine entscheidende Rolle. In einem Kaninchenmodell konnte gezeigt werden, dass es bei Verwendung der Pneumolysin-defizienten Mutante zu einer Reduktion des neuronalen Schadens im Gyrus dentatus verglichen mit der *D39*-Gruppe kommt. Bei Verwendung der Doppelmutante zeigte sich eine weitere Reduktion des Schadens [39]. Diese Daten lassen darauf schließen, dass auch Wasserstoffperoxid ein wichtiger Trigger neuronaler Apoptose ist. Es wird in großen Mengen von *S. pneumoniae* [160], gebildet.. Pneumokokken produzieren wie alle Streptokokken - keine Katalase und können somit größere Mengen Wasserstoffperoxid produzieren, welches nach deren Lyse freigesetzt wird [161,162]. Auch GBS besitzen keine Katalase, die von ihnen produzierte Wasserstoffperoxidmenge ist jedoch deutlich geringer als die anderer Streptokokkenspezies[163]. In welchem Ausmaß der in dieser Arbeit verwendete Serotyp III (*COH-1*) Wasserstoffperoxid produzieren kann ist nicht geklärt. Eine im Vergleich zu *D39* geringere H₂O₂-Produktion könnte jedoch die Erklärung für das geringere Ausmaß der neuronalen Schädigung bei Verwendung der *COH-1*-Wildtypbakterien sein. Wasserstoffperoxid kann leicht in eukaryote Zellen diffundieren und dort durch die Bildung freier Sauerstoffradikale zu Membranschädigung der Mitochondrien [160,164] und damit verbunden zu einer Störung der ATP-Produktion und Apoptose führen [39]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Wasserstoffperoxid in der Lage ist, in Neuronen eine durch den Einstrom von extrazellulärem Kalzium getriggerte, Caspasen-unabhängige Form der Apoptose zu induzieren. Dabei kommt es zur Freisetzung von Apoptose-induzierendem Faktor ins Zytosol [165,166,167].

Pneumolysin induziert die Ausbildung transmembranärer Poren [105,106,168] mit nachfolgendem Kalzium-Einstrom. Nach dem Influx von Kalzium kommt es zu Störungen im Membranpotential der Mitochondrien und zur Translokation von AIF aus den Mitochondrien ins Zytosol. Auch Pneumolysin ist also in der Lage, Apoptose ohne die Aktivierung von Caspasen zu induzieren [39]. In *in-vitro*-Untersuchungen führte die Blockade beider Pneumokokken-Toxine zu einer Reduktion des mitochondrialen Schadens und der Apoptose [39]. Diese Daten sprechen für eine Schlüsselrolle der Toxine bei der Entstehung des neuronalen Schadens im Rahmen der experimentellen Meningitis. Es ist gut untersucht, dass auch andere Poren-formende Toxine Apoptose in verschiedenen Zellen induzieren können [169,170,171].

GBS induzieren Apoptose in Makrophagen ohne die Aktivierung von Caspase 1, 3 und 9 [78,172]. Die Rolle von *beta*-Hämolyysin als Apoptose-induzierender Faktor ist bisher

noch nicht ausreichend aufgeklärt. Für eine Abhängigkeit dieser Apoptose vom Vorhandensein von intrazellulärem Kalzium spricht die Tatsache, dass es nach Bindung des Kalziums an Chelatoren - und damit dessen Inaktivierung - zu einer Reduktion der Apoptose kam [172]. Ob es auch zu einer Freisetzung von AIF kommt, ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Da Kalzium eine zentrale Rolle in der Kaskade der AIF-Freisetzung aus den Mitochondrien [173] spielt, ist das durchaus denkbar. Es gibt *in-vitro* Untersuchung in einer murinen Makrophagen-Zelllinie die mit β -Hämolysin-produzierenden und -defizienten GBS-Stämmen inkubiert wurden, aus der sich Hinweise darauf ergeben, dass nicht β -Hämolysin allein, sondern ein zusätzlicher Glukose-abhängiger Faktor an der Induktion der Apoptose beteiligt zu sein scheint, die Identifikation dieses Faktor steht allerdings bisher noch aus [73]. In dieser zitierten Studie wurde des Weiteren kein Unterschied in der Mortalität der Makrophagen bei Verwendung der verschiedenen Bakterien gefunden, dies könnte jedoch damit erklärt werden, dass es bei der Verwendung lebender Bakterien in einer Zellkultur durch die Bakterien zum Verbrauch von im Medium enthaltenen, für die Zellen lebenswichtigen Substanzen kommt, und somit das Überleben der Zellen reduziert sein könnte. Um diesen möglicherweise vorhandenen Effekt zu umgehend erscheint die Verwendung von gereinigtem Hämolysinextrakt sinnvoll.

Möglicherweise ist es ein generelles Prinzip Poren-formender Toxine, Apoptose-ähnlichen Zelltod ohne Caspase-Aktivierung zu induzieren.

In dem oben beschriebenen Kaninchenmodell [39] kam es nach genetischer Ausschaltung beider Toxine jedoch nur zu einer Reduktion des Schadens um etwa 50 Prozent. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass bei der Entstehung neuronaler Apoptose noch andere Faktoren beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass auch die durch die Erreger induzierte Aktivierung des Immunsystems, die Einwanderung neutrophiler Granulozyten und die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF-alpha zu neuronaler Apoptose führt. Im Rahmen dieser Kaskade kommt es zu klassischer Apoptose durch Caspase-3-Aktivierung. *S. pneumoniae* ist also in der Lage, neuronalen, apoptotischen Zelltod über zwei verschiedene Pathomechanismen zu induzieren [131].

4.5 DER EINFLUSS DES ALTERS AUF DIE AUSPRÄGUNG DES NEURONALEN SCHADENS

Da es in anderen Studien bei Verwendung älterer Ratten hauptsächlich zu Apoptose im Gyrus dentatus kommt, in unserem neonatalen Modell jedoch auch eine große Zahl apoptotischer Neurone im Kortex zu finden war, lag die Vermutung nah, dass auch das Alter der Versuchstiere und somit der Reifungsgrad der Gehirne eine Rolle in der Entstehung neuronaler Apoptose spielt. Um den Einfluss des Alters zu untersuchen, wurden sieben (PND 7) und elf (PND11) Tage alte Ratten verwendet und durch intrazisternale Injektion von *D39* eine Meningitis induziert. Der Reifungsgrad der Tierhirne entspricht am siebten Lebenstag dem frühgeborener Kinder zu Beginn des letzten Trimenon der Schwangerschaft. Diese Altersgruppe macht auch das Patientenkollektiv für eine early-onset-Sepsis mit Meningitis aus.

Apoptose ist im unreifen Gehirn die vorwiegende Form des Zelltodes [174]. In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Vulnerabilität gegenüber schädigenden Noxen wie Hypoxie oder Trauma im immaturren Rattengehirn innerhalb der ersten Lebenswoche am höchsten ist [175,176,177]. Dieser Zeitraum entspricht der Periode des so genannten „brain growth spurt“, der Phase des schnellen Hirnwachstums, das beim Menschen im letzten Trimenon der Schwangerschaft beginnt und die ersten Lebensjahre andauert [140]. Das vorliegende Modell eignet sich gut zur Untersuchung der altersabhängigen Schädigung, da Tiere unterschiedlichen Alters untersucht und verglichen werden konnten.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Reifungsgrad der Gehirne und der Empfindlichkeit der Neurone gegenüber Pneumokokken gibt. Auch bei den elf Tage alten Tieren zeigte sich ein signifikanter apoptotischer Schaden im Kortex und Gyrus dentatus verglichen mit der Kontrollgruppe. Es fand sich jedoch eine signifikante Reduktion des kortikalen Schadens bei Verwendung elf Tage alter Ratten verglichen mit Tieren am siebten postnatalen Tag. Beim Vergleich der hippokampalen Neurodegeneration (Gyrus dentatus) fand sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Altersgruppen. Kortikale Neurone scheinen also im frühen Reifungsstadium vulnerabler gegenüber schädigenden Noxen zu sein als zu einem späteren Zeitpunkt (PND 11) der Hirnentwicklung. Im Laufe der Entwicklung kommt es auch zu einer Reifung der Blut-Hirn-Schranke. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass mit steigendem Lebensalter der Tiere die Permeabilität der BHS abnimmt. Die Zunahme der Barrierefunktion und der somit erschwerte Übertritt der Bakterien und ihrer Toxine ist

eine weitere mögliche Erklärung für die Abnahme des kortikalen Schadens mit steigendem Lebensalter.

4.6 AUSBLICK

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die bakteriellen Toxine Pneumolysin, beta-Hämolysin und Wasserstoffperoxid wesentlich an der Genese neuronaler Apoptose im neonatalen Meningitismodell beteiligt sind. Da das Ausmaß des neuronalen Schadens eng mit dem klinischen Zustand korreliert, kommt der weiteren Erforschung dieser Toxin-induzierten Neuronenschädigung eine große Bedeutung zu. Zum derzeitigen Stand der Forschung scheint klar zu sein, dass die Pneumokokken-induzierte Apoptose sowohl durch die Aktivierung von Caspasen als auch Caspase-unabhängig durch die Freisetzung von AIF stattfindet. Dabei scheinen Bestandteile der Kapsel und Zellwand eher Caspase-abhängig Apoptose zu induzieren, während bei der Pneumolysin- und Wasserstoffperoxid-induzierten Apoptose keine Aktivierung dieser Proteasen nachweisbar ist. Es gibt bereits erste Anzeichen dafür, dass auch das GBS-Toxin beta-Hämolysin Caspase-unabhängige Apoptose induzieren kann. Der weiteren Untersuchung dieser Mechanismen kommt in Zukunft große Bedeutung zu. Es erscheint sinnvoll, die isolierte Rolle des beta-Hämolysin in der Kaskade des programmierten Zelltodes in einem *in-vitro* Modell zu untersuchen. Aufgrund zunehmender Antibiotika-Resistenzen ist davon auszugehen, dass in Zukunft bakterielle Erreger länger im Organismus überleben werden und somit auch die Konzentration bakterieller Toxine im Liquor erhöht sein wird. Die Anwendung Toxin-spezifischer Antikörper als neue adjuvante Therapieoption erscheint möglich und sinnvoll. Des weiteren sollte die Frage näher untersucht werden ob auch andere Porenformende Toxine wie zum Beispiel das von *Listeria monocytogenes* produzierte Listerolysin O oder das Toxin von *Neisseria meningitis* über ähnliche Mechanismen programmierten Zelltod induzieren können. Auch der weiteren Erforschung AIF-induzierter Mechanismen kommt große Bedeutung zu. Das bessere Verständnis der intrazellulären Kaskaden, z.B. die Regulation der Translokation von AIF und die Interaktion mit anderen intrazellulären Faktoren wird dazu beitragen, die während einer Inflammation ablaufenden Mechanismen der Zellschädigung besser zu verstehen und

neben der direkten Blockade bakterieller Toxine durch spezifische Antikörper weitere Therapieoptionen eröffnen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Eine bakterielle Meningitis im Neugeborenenalter kann besonders folgeschwer für die weitere Entwicklung des Patienten sein. Während einer bakteriellen Meningitis kommt es zum permanenten Verlust von Neuronen, besonders im Kortex und Gyrus dentatus. Dieser Neuronenuntergang könnte die Erklärung für die verschiedenen neurologischen Defizite sein, unter denen Patienten nach einer Meningitis leiden. Die genauen Mechanismen dieser Neuronenschädigung sind bisher noch nicht vollständig geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Poren-formenden Toxine Pneumolysin und beta-Hämolysin in der Pathogenese der neuronalen Schädigung zu untersuchen. Dazu wurde ein Meningitismodell in der neonatalen Ratte etabliert. Die Entzündung wurde durch intrazisternale Injektion von einem Pneumokokken- und einem GBS-Stamm sowie entsprechender Toxin-defizienter Mutanten in sieben Tage alten Ratten induziert.

Der Nachweis der Meningitis erfolgte durch Bestimmung der Leukozytenzahl und des Bakterienwachstums im Liquor. Mittels eines klinischen Scores erfolgte die Untersuchung und Beurteilung des Allgemeinzustandes der Tiere. Mit Hilfe der Hämatoxylin-/Eosin- und der TUNEL-Methode erfolgte die Detektion neuronaler Schädigung im Kortex und im Hippokampus. Typische Eigenschaften des programmierten Zelltodes wie Zellschrumpfung und Kernkondensation und DNA-Doppelstrangbrüche konnten auf diese Weise dargestellt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass alle verwendeten Pneumokokken- und GBS-Stämme in der Lage waren, in unserem Modell eine Meningitis zu induzieren. Dabei zeigten sich keine Veränderung der Pleozytose und kein signifikanter Unterschied in der Bakterienzahl im Liquor zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.

Bei der klinischen Untersuchung zeigten sich hingegen signifikante Unterschiede zwischen den mit Wildtyp-Stämmen und den mit Bakterien-Mutanten infizierten Tieren. Sowohl die Abwesenheit von Pneumolysin bei der Pneumokokken-, als auch von Hämolysin bei der GBS-Meningitis, führten zu einer signifikanten Verbesserung des klinischen Zustandes.

Die Verwendung der Toxin-defizienten Mutanten von *S. pneumoniae* und *S. agalactiae* (*plnA⁻*; *spxB⁻*; *plnA⁻/spxB⁻* und *COH-1cylEΔcat*) führte zu einer Reduktion der kortikalen und hippokampalen Apoptoserate verglichen mit den Wildtypgruppen. Diese Daten

stehen in engem Zusammenhang mit dem klinischen Score: ein geringerer Neuronenverlust ging mit einer Verbesserung des klinischen Zustandes einher.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind von besonderer klinischer Relevanz, da diese Toxine sowohl von lebenden Bakterien, als auch bei der durch Antibiotika induzierten Bakterienlyse freigesetzt werden. Ein wichtiger Aspekt ist auch, dass durch die zunehmende Resistenzentwicklung in Zukunft von einer längeren Persistenz lebender Bakterien im Gehirn ausgegangen werden muss. Dies könnte zu einer vermehrten Freisetzung der bakteriellen Neurotoxine führen.

Perspektivisch sind die molekularen Mechanismen des Zelltodes durch Poren-bildende Toxine zu klären sowie weitere bakterielle Toxine als Neurotoxine zu identifizieren. Die rasche Verfügbarkeit molekularer Techniken zur Erregeridentifikation könnte spezifische Interventionen z.B. mit Antikörpern gegen solche Neurotoxine ermöglichen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Schuchat, A.; Robinson, K.; Wenger, J. D.; Harrison, L. H.; Farley, M.; Reingold, A. L.; Lefkowitz, L. und Perkins, B. A. (1997): Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team, N Engl J Med (Band 337), Nr. 14, Seite 970-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9395430
- [2] Pong, A. und Bradley, J. S. (1999): Bacterial meningitis and the newborn infant, Infect Dis Clin North Am (Band 13), Nr. 3, Seite 711-33, viii. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10470563
- [3] Bale, J. F., Jr. und Murph, J. R. (1997): Infections of the central nervous system in the newborn, Clin Perinatol (Band 24), Nr. 4, Seite 787-806. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9395863
- [4] Dawson, K. G.; Emerson, J. C. und Burns, J. L. (1999): Fifteen years of experience with bacterial meningitis, Pediatr Infect Dis J (Band 18), Nr. 9, Seite 816-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10493344
- [5] Synnott, M. B.; Morse, D. L. und Hall, S. M. (1994): Neonatal meningitis in England and Wales: a review of routine national data, Arch Dis Child (Band 71), Nr. 2, Seite F75-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7979482
- [6] Harvey, D.; Holt, D. E. und Bedford, H. (1999): Bacterial meningitis in the newborn: a prospective study of mortality and morbidity, Semin Perinatol (Band 23), Nr. 3, Seite 218-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10405191
- [7] Wright, J. P. und Ford, H. L. (1995): Bacterial meningitis in developing countries, Trop Doct (Band 25), Nr. 1, Seite 5-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7886841
- [8] Klein, J. O. (2000): Bacterial sepsis and meningitis, Remington, J. S. und Klein, J. O., Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant Seite 943-998, WB Saunders, Philadelphia.
- [9] Weisman, L. E.; Stoll, B. J.; Cruess, D. F.; Hall, R. T.; Merenstein, G. B.; Hemming, V. G. und Fischer, G. W. (1992): Early-onset group B streptococcal sepsis: a current assessment, J Pediatr (Band 121), Nr. 3, Seite 428-33. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1517922

- [10] de Louvois, J.; Blackbourn, J.; Hurley, R. und Harvey, D. (1991): Infantile meningitis in England and Wales: a two year study, Arch Dis Child (Band 66), Nr. 5, Seite 603-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2039250
- [11] Klinger, G.; Chin, C. N.; Beyene, J. und Perlman, M. (2000): Predicting the outcome of neonatal bacterial meningitis, Pediatrics (Band 106), Nr. 3, Seite 477-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10969090
- [12] Quagliarello, V. und Scheld, W. M. (1992): Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress, N Engl J Med (Band 327), Nr. 12, Seite 864-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1508247
- [13] Bohr, V.; Paulson, O. B. und Rasmussen, N. (1984): Pneumococcal meningitis. Late neurologic sequelae and features of prognostic impact, Arch Neurol (Band 41), Nr. 10, Seite 1045-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6477211
- [14] Nau, R.; Soto, A. und Bruck, W. (1999): Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis, J Neuropathol Exp Neurol (Band 58), Nr. 3, Seite 265-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10197818
- [15] Zysk, G.; Bruck, W.; Gerber, J.; Bruck, Y.; Prange, H. W. und Nau, R. (1996): Anti-inflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis, J Neuropathol Exp Neurol (Band 55), Nr. 6, Seite 722-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8642398
- [16] Braun, J. S.; Tuomanen, E. I. und Cleveland, J. L. (1999): Neuroprotection by caspase inhibitors, Expert Opin Investig Drugs (Band 8), Nr. 10, Seite 1599-1610. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11139813
- [17] Braun, J. S.; Novak, R.; Herzog, K. H.; Bodner, S. M.; Cleveland, J. L. und Tuomanen, E. I. (1999): Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis, Nat Med (Band 5), Nr. 3, Seite 298-302. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10086385
- [18] Saez-Llorens, X. und McCracken, G. H., Jr. (1990): Bacterial meningitis in neonates and children, Infect Dis Clin North Am (Band 4), Nr. 4, Seite 623-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2277192

- [19] Polin, R. A. und Harris, M. C. (2001): Neonatal bacterial meningitis, *Semin Neonatol* (Band 6), Nr. 2, Seite 157-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11483021
- [20] Klein, J. O. (1981): The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children, *Rev Infect Dis* (Band 3), Nr. 2, Seite 246-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7020043
- [21] Musher, D. M. (1992): Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment, *Clin Infect Dis* (Band 14), Nr. 4, Seite 801-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1576274
- [22] Marrie, T. J. (1994): New aspects of old pathogens of pneumonia, *Med Clin North Am* (Band 78), Nr. 5, Seite 987-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8078378
- [23] Bruyn, G. A. und van Furth, R. (1991): Pneumococcal polysaccharide vaccines: indications, efficacy and recommendations, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (Band 10), Nr. 11, Seite 897-910. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1794358
- [24] Leib, S. L. und Tauber, M. G. (1999): Pathogenesis of bacterial meningitis, *Infect Dis Clin North Am* (Band 13), Nr. 3, Seite 527-48, v-vi. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10470554
- [25] de Louvois, J. (1994): Acute bacterial meningitis in the newborn, *J Antimicrob Chemother* (Band 34 Suppl A), Seite 61-73. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7844075
- [26] Stephens, D. S. und Farley, M. M. (1991): Pathogenic events during infection of the human nasopharynx with *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*, *Rev Infect Dis* (Band 13), Nr. 1, Seite 22-33. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1901998
- [27] Roos, K. L. (1997), Scheld, W. M., *Infections of the Central Nervous System*, 2nd. Auflage, Seite 335-402, Lippincott-Raven.
- [28] Stuert, K.; Schmidt, H.; Eiffert, H.; Schwartz, P.; Mader, M. und Nau, R. (1998): Differential release of lipoteichoic and teichoic acids from *Streptococcus pneumoniae* as a result of exposure to beta-lactam antibiotics, rifamycins, trovafloxacin, and quinupristin-dalfopristin, *Antimicrob Agents Chemother* (Band 42), Nr. 2, Seite 277-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9527772
- [29] Stuert, K.; Schmidt, H.; Trostdorf, F.; Eiffert, H.; Mader, M. und Nau, R. (1999): Lower lipoteichoic and teichoic acid CSF concentrations during treatment of pneumococcal meningitis with non-bacteriolytic

- antibiotics than with ceftriaxone, Scand J Infect Dis (Band 31), Nr. 4, Seite 367-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10528875
- [30] Movat, H. Z. und Cybulsky, M. I. (1987): Neutrophil emigration and microvascular injury. Role of chemotaxins, endotoxin, interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha, Pathol Immunopathol Res (Band 6), Nr. 3, Seite 153-76. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3321021
- [31] Tauber, M. G. und Moser, B. (1999): Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications, Clin Infect Dis (Band 28), Nr. 1, Seite 1-11; quiz 12. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10028061
- [32] Cserr, H. F. (1971): Physiology of the choroid plexus, Physiol Rev (Band 51), Nr. 2, Seite 273-311. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4930496
- [33] Niemoller, U. M. und Tauber, M. G. (1989): Brain edema and increased intracranial pressure in the pathophysiology of bacterial meningitis, Eur J Clin Microbiol Infect Dis (Band 8), Nr. 2, Seite 109-17. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2498090
- [34] Nau, R. und Bruck, W. (2002): Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy, Trends Neurosci (Band 25), Nr. 1, Seite 38-45. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11801337
- [35] Chang, C. J.; Chang, W. N.; Huang, L. T.; Chang, Y. C.; Huang, S. C.; Hung, P. L.; Ho, H. H.; Chang, C. S.; Wang, K. W.; Cheng, B. C.; Lui, C. C.; Chang, H. W. und Lu, C. H. (2003): Cerebral infarction in perinatal and childhood bacterial meningitis, Qjm (Band 96), Nr. 10, Seite 755-62. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14500862
- [36] Ment, L. R.; Ehrenkranz, R. A. und Duncan, C. C. (1986): Bacterial meningitis as an etiology of perinatal cerebral infarction, Pediatr Neurol (Band 2), Nr. 5, Seite 276-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3508700
- [37] Snyder, R. D.; Stovring, J.; Cushing, A. H.; Davis, L. E. und Hardy, T. L. (1981): Cerebral infarction in childhood bacterial meningitis, J Neurol Neurosurg Psychiatry (Band 44), Nr. 7, Seite 581-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7026737

- [38] Raju, V. S.; Rao, M. N. und Rao, V. S. (1995): Cranial sonography in pyogenic meningitis in neonates and infants, *J Trop Pediatr* (Band 41), Nr. 2, Seite 68-73. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7776399
- [39] Braun, J. S.; Sublett, J. E.; Freyer, D.; Mitchell, T. J.; Cleveland, J. L.; Tuomanen, E. I. und Weber, J. R. (2002): Pneumococcal pneumolysin and H(2)O(2) mediate brain cell apoptosis during meningitis, *J Clin Invest* (Band 109), Nr. 1, Seite 19-27. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11781347
- [40] Leib, S. L.; Kim, Y. S.; Chow, L. L.; Sheldon, R. A. und Tauber, M. G. (1996): Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci, *J Clin Invest* (Band 98), Nr. 11, Seite 2632-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8958228
- [41] Martin, L. J.; Al-Abdulla, N. A.; Brambrink, A. M.; Kirsch, J. R.; Sieber, F. E. und Portera-Cailliau, C. (1998): Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis, *Brain Res Bull* (Band 46), Nr. 4, Seite 281-309. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9671259
- [42] Mishkin, M.; Vargha-Khadem, F. und Gadian, D. G. (1998): Amnesia and the organization of the hippocampal system, *Hippocampus* (Band 8), Nr. 3, Seite 212-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9662136
- [43] Free, S. L.; Li, L. M.; Fish, D. R.; Shorvon, S. D. und Stevens, J. M. (1996): Bilateral hippocampal volume loss in patients with a history of encephalitis or meningitis, *Epilepsia* (Band 37), Nr. 4, Seite 400-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8603647
- [44] Loeffler, J. M.; Ringer, R.; Hablutzel, M.; Tauber, M. G. und Leib, S. L. (2001): The free radical scavenger alpha-phenyl-tert-butyl nitron aggravates hippocampal apoptosis and learning deficits in experimental pneumococcal meningitis, *J Infect Dis* (Band 183), Nr. 2, Seite 247-252. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11110643
- [45] Farley, M. M.; Harvey, R. C.; Stull, T.; Smith, J. D.; Schuchat, A.; Wenger, J. D. und Stephens, D. S. (1993): A population-based assessment of invasive disease due to group B *Streptococcus* in nonpregnant adults, *N Engl J Med* (Band 328), Nr. 25, Seite 1807-11. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8502269

- [46] Jackson, L. A.; Hilsdon, R.; Farley, M. M.; Harrison, L. H.; Reingold, A. L.; Plikaytis, B. D.; Wenger, J. D. und Schuchat, A. (1995): Risk factors for group B streptococcal disease in adults, *Ann Intern Med* (Band 123), Nr. 6, Seite 415-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7639440
- [47] Davies, H. D.; Adair, C.; McGeer, A.; Ma, D.; Robertson, S.; Mucenski, M.; Kowalsky, L.; Tyrell, G. und Baker, C. J. (2001): Antibodies to capsular polysaccharides of group B Streptococcus in pregnant Canadian women: relationship to colonization status and infection in the neonate, *J Infect Dis* (Band 184), Nr. 3, Seite 285-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11443553
- [48] Hansen, S. M.; Uldbjerg, N.; Kilian, M. und Sorensen, U. B. (2004): Dynamics of Streptococcus agalactiae colonization in women during and after pregnancy and in their infants, *J Clin Microbiol* (Band 42), Nr. 1, Seite 83-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14715736
- [49] Brimil, N.; Barthell, E.; Heindrichs, U.; Kuhn, M.; Luttkicken, R. und Spellerberg, B. (2006): Epidemiology of Streptococcus agalactiae colonization in Germany, *Int J Med Microbiol* (Band 296), Nr. 1, Seite 39-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16361113
- [50] Regan, J. A.; Klebanoff, M. A.; Nugent, R. P.; Eschenbach, D. A.; Blackwelder, W. C.; Lou, Y.; Gibbs, R. S.; Rettig, P. J.; Martin, D. H. und Edelman, R. (1996): Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. VIP Study Group, *Am J Obstet Gynecol* (Band 174), Nr. 4, Seite 1354-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8623869
- [51] Schuchat, A. (1999): Group B streptococcus, *Lancet* (Band 353), Nr. 9146, Seite 51-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10023965
- [52] Heath, P. T.; Balfour, G.; Weisner, A. M.; Efstratiou, A.; Lamagni, T. L.; Tighe, H.; O'Connell, L. A.; Cafferkey, M.; Verlander, N. Q.; Nicoll, A. und McCartney, A. C. (2004): Group B streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days, *Lancet* (Band 363), Nr. 9405, Seite 292-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14751704
- [53] Trijbels-Smeulders, M.; Gerards, L. J.; M, P. C.; de Jong, P.; van Lingen, R. A.; Adriaanse, A. H.; de Jonge, G. A. und Kollee, L. A. (2002): Epidemiology of neonatal group B streptococcal disease in The Netherlands 1997-98, *Paediatr Perinat Epidemiol* (Band 16), Nr. 4, Seite 334-41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12445150

- [54] Fluegge, K.; Siedler, A.; Heinrich, B.; Schulte-Moenting, J.; Moennig, M. J.; Bartels, D. B.; Dammann, O.; von Kries, R. und Berner, R. (2006): Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany, *Pediatrics* (Band 117), Nr. 6, Seite e1139-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16682492
- [55] Weiser, J. N. und Rubens, C. E. (1987): Transposon mutagenesis of group B streptococcus beta-hemolysin biosynthesis, *Infect Immun* (Band 55), Nr. 9, Seite 2314-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3040595
- [56] Lin, F. Y.; Clemens, J. D.; Azimi, P. H.; Regan, J. A.; Weisman, L. E.; Philips, J. B., 3rd; Rhoads, G. G.; Clark, P.; Brenner, R. A. und Ferrieri, P. (1998): Capsular polysaccharide types of group B streptococcal isolates from neonates with early-onset systemic infection, *J Infect Dis* (Band 177), Nr. 3, Seite 790-2. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9498466
- [57] Wilkinson, H. W. (1978): Analysis of group B streptococcal types associated with disease in human infants and adults, *J Clin Microbiol* (Band 7), Nr. 2, Seite 176-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=344337
- [58] Rubens, C. E.; Wessels, M. R.; Heggen, L. M. und Kasper, D. L. (1987): Transposon mutagenesis of type III group B Streptococcus: correlation of capsule expression with virulence, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 84), Nr. 20, Seite 7208-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2823254
- [59] Vallejo, J. G.; Baker, C. J. und Edwards, M. S. (1996): Roles of the bacterial cell wall and capsule in induction of tumor necrosis factor alpha by type III group B streptococci, *Infect Immun* (Band 64), Nr. 12, Seite 5042-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8945544
- [60] Nizet, V.; Gibson, R. L.; Chi, E. Y.; Framson, P. E.; Hulse, M. und Rubens, C. E. (1996): Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells, *Infect Immun* (Band 64), Nr. 9, Seite 3818-26. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8751934
- [61] Gibson, R. L.; Lee, M. K.; Soderland, C.; Chi, E. Y. und Rubens, C. E. (1993): Group B streptococci invade endothelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion, *Infect Immun* (Band 61), Nr. 2, Seite 478-85. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8423076
- [62] Pritchard, D. G.; Lin, B.; Willingham, T. R. und Baker, J. R. (1994): Characterization of the group B streptococcal hyaluronate lyase, *Arch*

- Biochem Biophys (Band 315), Nr. 2, Seite 431-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7986088
- [63] Lang, S. und Palmer, M. (2003): Characterization of Streptococcus agalactiae CAMP factor as a pore-forming toxin, J Biol Chem (Band 278), Nr. 40, Seite 38167-73. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12835325
- [64] Facklam, R. R.; Padula, J. F.; Thacker, L. G.; Wortham, E. C. und Sconyers, B. J. (1974): Presumptive identification of group A, B, and D streptococci, Appl Microbiol (Band 27), Seite 107-13.
- [65] Facklam, R. R.; Padula, J. F.; Wortham, E. C.; Cooksey, R. C. und Rountree, H. A. (1979): Presumptive identification of group A, B, and D streptococci on agar plate media, J Clin Microbiol (Band 9), Nr. 6, Seite 665-72. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=387814
- [66] Spellerberg, B.; Pohl, B.; Haase, G.; Martin, S.; Weber-Heynemann, J. und Luticken, R. (1999): Identification of genetic determinants for the hemolytic activity of Streptococcus agalactiae by ISS1 transposition, J Bacteriol (Band 181), Nr. 10, Seite 3212-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10322024
- [67] Gottschalk, B.; Broker, G.; Kuhn, M.; Aymanns, S.; Gleich-Theurer, U. und Spellerberg, B. (2006): Transport of multidrug resistance substrates by the Streptococcus agalactiae hemolysin transporter, J Bacteriol (Band 188), Nr. 16, Seite 5984-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16885467
- [68] Nizet, V.; Gibson, R. L. und Rubens, C. E. (1997): The role of group B streptococci beta-hemolysin expression in newborn lung injury, Adv Exp Med Biol (Band 418), Seite 627-30. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9331730
- [69] Puliti, M.; Nizet, V.; von Hunolstein, C.; Bistoni, F.; Mosci, P.; Orefici, G. und Tissi, L. (2000): Severity of group B streptococcal arthritis is correlated with beta-hemolysin expression, J Infect Dis (Band 182), Nr. 3, Seite 824-32. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10950777
- [70] Nizet, V. und Rubens, C. E. (2000): Pathogenic mechanisms and virulence factors of group B streptococci, Fischetti, V. A.; Novick, R. P.; Ferretti, J. J.; Portnoy, D. A. und Rood, J. I., The gram-positive pathogens Seite 123-36, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- [71] Nizet, V.; Ferrieri, P. und Rubens, C. E. (2000): Molecular pathogenesis of group B streptococcal disease in newborns, Stevens, D. L. und Kaplan, E. L., Streptococcal infections: clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis Seite 181-221, Oxford University Press, New York.

- [72] Gibson, R. L.; Nizet, V. und Rubens, C. E. (1999): Group B streptococcal beta-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells, *Pediatr Res* (Band 45), Nr. 5 Pt 1, Seite 626-34. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10231855
- [73] Nizet, V.; Kim, K. S.; Stins, M.; Jonas, M.; Chi, E. Y.; Nguyen, D. und Rubens, C. E. (1997): Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci, *Infect Immun* (Band 65), Nr. 12, Seite 5074-81. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9393798
- [74] Ring, A.; Braun, J. S.; Nizet, V.; Stremmel, W. und Shenep, J. L. (2000): Group B streptococcal beta-hemolysin induces nitric oxide production in murine macrophages, *J Infect Dis* (Band 182), Nr. 1, Seite 150-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10882592
- [75] Doran, K. S.; Chang, J. C.; Benoit, V. M.; Eckmann, L. und Nizet, V. (2002): Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8, *J Infect Dis* (Band 185), Nr. 2, Seite 196-203. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11807693
- [76] Doran, K. S.; Liu, G. Y. und Nizet, V. (2003): Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis, *J Clin Invest* (Band 112), Nr. 5, Seite 736-44. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12952922
- [77] Liu, G. Y.; Doran, K. S.; Lawrence, T.; Turkson, N.; Puliti, M.; Tissi, L. und Nizet, V. (2004): Sword and shield: linked group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 101), Nr. 40, Seite 14491-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15381763
- [78] Liu, G. Y. und Nizet, V. (2004): Extracellular virulence factors of group B Streptococci, *Front Biosci* (Band 9), Seite 1794-802. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14977587
- [79] Marchlewicz, B. A. und Duncan, J. L. (1981): Lysis of erythrocytes by a hemolysin produced by a group B Streptococcus sp, *Infect Immun* (Band 34), Nr. 3, Seite 787-94. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7037641

- [80] Wilkinson, H. W. (1977): Nontypable group B streptococci isolated from human sources, *J Clin Microbiol* (Band 6), Nr. 2, Seite 183-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=408376
- [81] Tapsall, J. W. und Phillips, E. A. (1991): The hemolytic and cytolytic activity of group B streptococcal hemolysin and its possible role in early onset group B streptococcal disease, *Pathology* (Band 23), Nr. 2, Seite 139-44. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1745564
- [82] Brown, E. J.; Hosea, S. W. und Frank, M. M. (1983): The role of antibody and complement in the reticuloendothelial clearance of pneumococci from the bloodstream, *Rev Infect Dis* (Band 5 Suppl 4), Seite S797-805. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6356294
- [83] Brown, E. J.; Joiner, K. A.; Cole, R. M. und Berger, M. (1983): Localization of complement component 3 on *Streptococcus pneumoniae*: anti-capsular antibody causes complement deposition on the pneumococcal capsule, *Infect Immun* (Band 39), Nr. 1, Seite 403-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6822421
- [84] Winkelstein, J. A. (1984): Complement and the host's defense against the pneumococcus, *Crit Rev Microbiol* (Band 11), Nr. 3, Seite 187-208. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6391822
- [85] Kalin, M. (1998): Pneumococcal serotypes and their clinical relevance, *Thorax* (Band 53), Nr. 3, Seite 159-62. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9659348
- [86] Reinert, R. R. und Kühnemund, O. (1999): Neue Daten zu Pneumokokken-Infektionen, *Immunologie & Impfen* (Band 2), Nr. 3, Seite 122-127.
- [87] Walker, J. A.; Allen, R. L.; Falmagne, P.; Johnson, M. K. und Boulnois, G. J. (1987): Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*, *Infect Immun* (Band 55), Nr. 5, Seite 1184-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3552992
- [88] Nizet, V. (2002): Streptococcal beta-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis, *Trends Microbiol* (Band 10), Nr. 12, Seite 575-80. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12564994
- [89] Johnson, M. K.; Boese-Marrazzo, D. und Pierce, W. A., Jr. (1981): Effects of pneumolysin on human polymorphonuclear leukocytes and

- platelets, *Infect Immun* (Band 34), Nr. 1, Seite 171-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7298179
- [90] Gilbert, R. J.; Rossjohn, J.; Parker, M. W.; Tweten, R. K.; Morgan, P. J.; Mitchell, T. J.; Errington, N.; Rowe, A. J.; Andrew, P. W. und Byron, O. (1998): Self-interaction of pneumolysin, the pore-forming protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*, *J Mol Biol* (Band 284), Nr. 4, Seite 1223-37. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9837740
- [91] Saunders, F. K.; Mitchell, T. J.; Walker, J. A.; Andrew, P. W. und Boulnois, G. J. (1989): Pneumolysin, the thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*, does not require a thiol group for in vitro activity, *Infect Immun* (Band 57), Nr. 8, Seite 2547-52. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2744861
- [92] Shumway, C. N. und Pollock, D. (1965): The Effect of a Pneumococcal Product Upon Rabbit Erythrocytes in Vitro and in Vivo, *J Lab Clin Med* (Band 65), Seite 432-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14261324
- [93] Novak, R.; Charpentier, E.; Braun, J. S. und Tuomanen, E. (2000): Signal transduction by a death signal peptide: uncovering the mechanism of bacterial killing by penicillin, *Mol Cell* (Band 5), Nr. 1, Seite 49-57. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10678168
- [94] Tomasz, A.; Albino, A. und Zanati, E. (1970): Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system, *Nature* (Band 227), Nr. 5254, Seite 138-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4393335
- [95] Rossjohn, J.; Gilbert, R. J.; Crane, D.; Morgan, P. J.; Mitchell, T. J.; Rowe, A. J.; Andrew, P. W.; Paton, J. C.; Tweten, R. K. und Parker, M. W. (1998): The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*, *J Mol Biol* (Band 284), Nr. 2, Seite 449-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9813129
- [96] Mitchell, T. J.; Andrew, P. W.; Saunders, F. K.; Smith, A. N. und Boulnois, G. J. (1991): Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein, *Mol Microbiol* (Band 5), Nr. 8, Seite 1883-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1766369
- [97] Paton, J. C.; Rowan-Kelly, B. und Ferrante, A. (1984): Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin, *Infect Immun* (Band 43), Nr. 3, Seite 1085-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6698602

- [98] Hill, J.; Andrew, P. W. und Mitchell, T. J. (1994): Amino acids in pneumolysin important for hemolytic activity identified by random mutagenesis, *Infect Immun* (Band 62), Nr. 2, Seite 757-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8300240
- [99] Feldman, C.; Munro, N. C.; Jeffery, P. K.; Mitchell, T. J.; Andrew, P. W.; Boulnois, G. J.; Guerreiro, D.; Rohde, J. A.; Todd, H. C.; Cole, P. J. und et al. (1991): Pneumolysin induces the salient histologic features of pneumococcal infection in the rat lung in vivo, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 5), Nr. 5, Seite 416-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1834101
- [100] Berry, A. M.; Yother, J.; Briles, D. E.; Hansman, D. und Paton, J. C. (1989): Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*, *Infect Immun* (Band 57), Nr. 7, Seite 2037-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2731982
- [101] Paton, J. C. und Ferrante, A. (1983): Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin, *Infect Immun* (Band 41), Nr. 3, Seite 1212-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6885160
- [102] Feldman, C.; Mitchell, T. J.; Andrew, P. W.; Boulnois, G. J.; Read, R. C.; Todd, H. C.; Cole, P. J. und Wilson, R. (1990): The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro, *Microb Pathog* (Band 9), Nr. 4, Seite 275-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2097494
- [103] Afzelius, B. A. (1979): The immotile-cilia syndrome and other ciliary diseases, *Int Rev Exp Pathol* (Band 19), Seite 1-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=156703
- [104] Houldsworth, S.; Andrew, P. W. und Mitchell, T. J. (1994): Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes, *Infect Immun* (Band 62), Nr. 4, Seite 1501-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8132361
- [105] Gilbert, R. J.; Jimenez, J. L.; Chen, S.; Andrew, P. W. und Saibil, H. R. (2000): Structural basis of pore formation by cholesterol-binding toxins, *Int J Med Microbiol* (Band 290), Nr. 4-5, Seite 389-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11111916
- [106] Gilbert, R. J. (2002): Pore-forming toxins, *Cell Mol Life Sci* (Band 59), Nr. 5, Seite 832-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12088283

- [107] Watson, K. C.; Rose, T. P. und Kerr, E. J. (1972): Some factors influencing the effect of cholesterol on streptolysin O activity, *J Clin Pathol* (Band 25), Nr. 10, Seite 885-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4646300
- [108] Andrew, P. W.; Mitchell, T. J. und Morgan, P. J. (1997): Relationship of structure to function in pneumolysin, *Microb Drug Resist* (Band 3), Nr. 1, Seite 11-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9109092
- [109] Palmer, M. (2001): The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolytins, *Toxicon* (Band 39), Nr. 11, Seite 1681-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11595631
- [110] Kerr, J. F.; Wyllie, A. H. und Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* (Band 26), Nr. 4, Seite 239-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4561027
- [111] Renehan, A. G.; Bach, S. P. und Potten, C. S. (2001): The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine, *Can J Gastroenterol* (Band 15), Nr. 3, Seite 166-76. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11264570
- [112] Hotchkiss, R. S. und Karl, I. E. (2003): The pathophysiology and treatment of sepsis, *N Engl J Med* (Band 348), Nr. 2, Seite 138-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12519925
- [113] Wyllie, A. H. (1997): Apoptosis: an overview, *Br Med Bull* (Band 53), Nr. 3, Seite 451-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9374030
- [114] Leist, M. und Jaattela, M. (2001): Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 2), Nr. 8, Seite 589-98. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11483992
- [115] Haslett, C. (1992): Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes, *Clin Sci (Lond)* (Band 83), Nr. 6, Seite 639-48. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1336433
- [116] Earnshaw, W. C.; Martins, L. M. und Kaufmann, S. H. (1999): Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, *Annu Rev Biochem* (Band 68), Seite 383-424. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10872455

- [117] Nicholson, D. W. (2000): From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents, *Nature* (Band 407), Nr. 6805, Seite 810-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11048733
- [118] Nicholson, D. W. (1999): Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death, *Cell Death Differ* (Band 6), Nr. 11, Seite 1028-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10578171
- [119] Cerretti, D. P.; Kozlosky, C. J.; Mosley, B.; Nelson, N.; Van Ness, K.; Greenstreet, T. A.; March, C. J.; Kronheim, S. R.; Druck, T.; Cannizzaro, L. A. und et al. (1992): Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme, *Science* (Band 256), Nr. 5053, Seite 97-100. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1373520
- [120] Thornberry, N. A.; Bull, H. G.; Calaycay, J. R.; Chapman, K. T.; Howard, A. D.; Kostura, M. J.; Miller, D. K.; Molineaux, S. M.; Weidner, J. R.; Aunins, J. und et al. (1992): A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes, *Nature* (Band 356), Nr. 6372, Seite 768-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1574116
- [121] Kamada, S.; Kusano, H.; Fujita, H.; Ohtsu, M.; Koya, R. C.; Kuzumaki, N. und Tsujimoto, Y. (1998): A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: cloning of the antiapoptotic gene gelsolin, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 15, Seite 8532-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9671712
- [122] Martin, S. J.; Finucane, D. M.; Amarante-Mendes, G. P.; O'Brien, G. A. und Green, D. R. (1996): Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity, *J Biol Chem* (Band 271), Nr. 46, Seite 28753-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8910516
- [123] Mashima, T.; Naito, M.; Noguchi, K.; Miller, D. K.; Nicholson, D. W. und Tsuruo, T. (1997): Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis, *Oncogene* (Band 14), Nr. 9, Seite 1007-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9070648
- [124] Daugas, E.; Nochy, D.; Ravagnan, L.; Loeffler, M.; Susin, S. A.; Zamzami, N. und Kroemer, G. (2000): Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis, *FEBS Lett* (Band 476), Nr. 3, Seite 118-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10913597

- [125] Loeffler, M.; Daugas, E.; Susin, S. A.; Zamzami, N.; Metivier, D.; Nieminen, A. L.; Brothers, G.; Penninger, J. M. und Kroemer, G. (2001): Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor, *Faseb J* (Band 15), Nr. 3, Seite 758-67. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11259394
- [126] Roy, S. und Nicholson, D. W. (2000): Cross-talk in cell death signaling, *J Exp Med* (Band 192), Nr. 8, Seite F21-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11034612
- [127] Siegel, R. M.; Frederiksen, J. K.; Zacharias, D. A.; Chan, F. K.; Johnson, M.; Lynch, D.; Tsien, R. Y. und Lenardo, M. J. (2000): Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations, *Science* (Band 288), Nr. 5475, Seite 2354-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10875918
- [128] Hotchkiss, R. S.; Tinsley, K. W.; Swanson, P. E. und Karl, I. E. (2002): Endothelial cell apoptosis in sepsis, *Crit Care Med* (Band 30), Nr. 5 Suppl, Seite S225-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12004240
- [129] Green, D. R. (2000): Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors, *Cell* (Band 102), Nr. 1, Seite 1-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10929706
- [130] Braun, J. S.; Novak, R.; Murray, P. J.; Eischen, C. M.; Susin, S. A.; Kroemer, G.; Halle, A.; Weber, J. R.; Tuomanen, E. I. und Cleveland, J. L. (2001): Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus, *J Infect Dis* (Band 184), Nr. 10, Seite 1300-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11679919
- [131] Mitchell, L.; Smith, S. H.; Braun, J. S.; Herzog, K. H.; Weber, J. R. und Tuomanen, E. I. (2004): Dual phases of apoptosis in pneumococcal meningitis, *J Infect Dis* (Band 190), Nr. 11, Seite 2039-46. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15529270
- [132] Colino, J. und Snapper, C. M. (2003): Two distinct mechanisms for induction of dendritic cell apoptosis in response to intact *Streptococcus pneumoniae*, *J Immunol* (Band 171), Nr. 5, Seite 2354-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12928382
- [133] Stringaris, A. K.; Geisenhainer, J.; Bergmann, F.; Balshusemann, C.; Lee, U.; Zysk, G.; Mitchell, T. J.; Keller, B. U.; Kuhnt, U.; Gerber, J.; Spreer, A.; Bahr, M.; Michel, U. und Nau, R. (2002): Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein

- kinase, Neurobiol Dis (Band 11), Nr. 3, Seite 355-68. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12586546
- [134] Lorenzo, H. K.; Susin, S. A.; Penninger, J. und Kroemer, G. (1999): Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death, Cell Death Differ (Band 6), Nr. 6, Seite 516-24. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10381654
- [135] Leist, M. und Nicotera, P. (1997): The shape of cell death, Biochem Biophys Res Commun (Band 236), Nr. 1, Seite 1-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9223415
- [136] Hansen, T. M. und Nagley, P. (2003): AIF: a multifunctional cog in the life and death machine, Sci STKE (Band 2003), Nr. 193, Seite PE31. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12888619
- [137] Wang, X.; Yang, C.; Chai, J.; Shi, Y. und Xue, D. (2002): Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in Caenorhabditis elegans, Science (Band 298), Nr. 5598, Seite 1587-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12446902
- [138] Leib, S. L.; Heimgartner, C.; Bifare, Y. D.; Loeffler, J. M. und Tauber, M. G. (2003): Dexamethasone aggravates hippocampal apoptosis and learning deficiency in pneumococcal meningitis in infant rats, Pediatr Res (Band 54), Nr. 3, Seite 353-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12788989
- [139] Leib, S. L.; Kim, Y. S.; Ferriero, D. M. und Tauber, M. G. (1996): Neuroprotective effect of excitatory amino acid antagonist kynurenic acid in experimental bacterial meningitis, J Infect Dis (Band 173), Nr. 1, Seite 166-71. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8537654
- [140] Dobbing, J. und Sands, J. (1979): Comparative aspects of the brain growth spurt, Early Hum Dev (Band 3), Nr. 1, Seite 79-83. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=118862
- [141] Friedland, I. R.; Paris, M. M.; Hickey, S.; Shelton, S.; Olsen, K.; Paton, J. C. und McCracken, G. H. (1995): The limited role of pneumolysin in the pathogenesis of pneumococcal meningitis, J Infect Dis (Band 172), Nr. 3, Seite 805-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7658074

- [142] Wellmer, A.; Zysk, G.; Gerber, J.; Kunst, T.; Von Mering, M.; Bunkowski, S.; Eiffert, H. und Nau, R. (2002): Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of *Streptococcus pneumoniae* in murine meningitis, *Infect Immun* (Band 70), Nr. 11, Seite 6504-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12379738
- [143] Spellerberg, B.; Cundell, D. R.; Sandros, J.; Pearce, B. J.; Idanpaan-Heikkila, I.; Rosenow, C. und Masure, H. R. (1996): Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*, *Mol Microbiol* (Band 19), Nr. 4, Seite 803-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8820650
- [144] Orihuela, C. J.; Gao, G.; Francis, K. P.; Yu, J. und Tuomanen, E. I. (2004): Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis, *J Infect Dis* (Band 190), Nr. 9, Seite 1661-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15478073
- [145] Pritzlaff, C. A.; Chang, J. C.; Kuo, S. P.; Tamura, G. S.; Rubens, C. E. und Nizet, V. (2001): Genetic basis for the beta-haemolytic/cytolytic activity of group B *Streptococcus*, *Mol Microbiol* (Band 39), Nr. 2, Seite 236-47. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11136446
- [146] Somogyi, P. und Takagi, H. (1982): A note on the use of picric acid-paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry, *Neuroscience* (Band 7), Nr. 7, Seite 1779-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6181433
- [147] Victorov, I. V.; Prass, K. und Dirnagl, U. (2000): Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin, *Brain Res Brain Res Protoc* (Band 5), Nr. 2, Seite 135-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10775832
- [148] Gavrieli, Y.; Sherman, Y. und Ben-Sasson, S. A. (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J Cell Biol* (Band 119), Nr. 3, Seite 493-501. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1400587
- [149] Nandoskar, M.; Ferrante, A.; Bates, E. J.; Hurst, N. und Paton, J. C. (1986): Inhibition of human monocyte respiratory burst, degranulation, phospholipid methylation and bactericidal activity by pneumolysin, *Immunology* (Band 59), Nr. 4, Seite 515-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3804376

- [150] Stahel, P. F. und Barnum, S. R. (1997): Bacterial meningitis: complement gene expression in the central nervous system, *Immunopharmacology* (Band 38), Nr. 1-2, Seite 65-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9476116
- [151] Koedel, U.; Scheld, W. M. und Pfister, H. W. (2002): Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis, *Lancet Infect Dis* (Band 2), Nr. 12, Seite 721-36. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12467688
- [152] Miquel, J. und Blasco, M. (1978): A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor, *Exp Gerontol* (Band 13), Nr. 6, Seite 389-96. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=738379
- [153] Paton, J. C.; Lock, R. A. und Hansman, D. J. (1983): Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae*, *Infect Immun* (Band 40), Nr. 2, Seite 548-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6840851
- [154] Jarrard, L. E. und Elmes, D. G. (1982): Role of retroactive interference in the spatial memory of normal rats and rats with hippocampal lesions, *J Comp Physiol Psychol* (Band 96), Nr. 5, Seite 699-711. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7142482
- [155] Garcia, E.; Llull, D.; Munoz, R.; Mollerach, M. und Lopez, R. (2000): Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae*, *Res Microbiol* (Band 151), Nr. 6, Seite 429-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10961455
- [156] Hirst, R. A.; Sikand, K. S.; Rutman, A.; Mitchell, T. J.; Andrew, P. W. und O'Callaghan, C. (2000): Relative roles of pneumolysin and hydrogen peroxide from *Streptococcus pneumoniae* in inhibition of ependymal ciliary beat frequency, *Infect Immun* (Band 68), Nr. 3, Seite 1557-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10678974
- [157] Zysk, G.; Schneider-Wald, B. K.; Hwang, J. H.; Bejo, L.; Kim, K. S.; Mitchell, T. J.; Hakenbeck, R. und Heinz, H. P. (2001): Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Infect Immun* (Band 69), Nr. 2, Seite 845-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11159977
- [158] Gianinazzi, C.; Grandgirard, D.; Imboden, H.; Egger, L.; Meli, D. N.; Bifrare, Y. D.; Joss, P. C.; Tauber, M. G.; Borner, C. und Leib, S. L. (2003): Caspase-3 mediates hippocampal apoptosis in pneumococcal

- meningitis, *Acta Neuropathol (Berl)* (Band 105), Nr. 5, Seite 499-507.
URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12677451
- [159] Meli, D. N.; Christen, S.; Leib, S. L. und Tauber, M. G. (2002): Current concepts in the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Curr Opin Infect Dis* (Band 15), Nr. 3, Seite 253-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12015459
- [160] Duane, P. G.; Rubins, J. B.; Weisel, H. R. und Janoff, E. N. (1993): Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells, *Infect Immun* (Band 61), Nr. 10, Seite 4392-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8406830
- [161] Avery, O. T. und Morgan, H. J. (1924): The occurrence of peroxide in cultures of pneumococcus, *J Exp Med* (Band 39), Seite 275-288.
- [162] Pericone, C. D.; Overweg, K.; Hermans, P. W. und Weiser, J. N. (2000): Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract, *Infect Immun* (Band 68), Nr. 7, Seite 3990-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10858213
- [163] Bolm, M.; Jansen, W. T.; Schnabel, R. und Chhatwal, G. S. (2004): Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans*: a common feature of different streptococcal species, *Infect Immun* (Band 72), Nr. 2, Seite 1192-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14742574
- [164] Cochrane, C. G. (1991): Cellular injury by oxidants, *Am J Med* (Band 91), Nr. 3C, Seite 23S-30S. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1928208
- [165] Fonfria, E.; Dare, E.; Benelli, M.; Sunol, C. und Ceccatelli, S. (2002): Translocation of apoptosis-inducing factor in cerebellar granule cells exposed to neurotoxic agents inducing oxidative stress, *Eur J Neurosci* (Band 16), Nr. 10, Seite 2013-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12453066
- [166] Yang, X.; Yang, S.; Zhang, J.; Xue, L. und Hu, Z. (2002): Role of Caspase 3 in neuronal apoptosis after acute brain injury, *Chin J Traumatol* (Band 5), Nr. 4, Seite 250-3. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12162906
- [167] Zhang, X.; Chen, J.; Graham, S. H.; Du, L.; Kochanek, P. M.; Draviam, R.; Guo, F.; Nathaniel, P. D.; Szabo, C.; Watkins, S. C. und Clark, R. S. (2002): Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite, *J Neurochem* (Band

- 82), Nr. 1, Seite 181-91. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12091479
- [168] Gilbert, R. J.; Jimenez, J. L.; Chen, S.; Tickle, I. J.; Rossjohn, J.; Parker, M.; Andrew, P. W. und Saibil, H. R. (1999): Two structural transitions in membrane pore formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of *Streptococcus pneumoniae*, *Cell* (Band 97), Nr. 5, Seite 647-55. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10367893
- [169] Guzman, C. A.; Domann, E.; Rohde, M.; Bruder, D.; Darji, A.; Weiss, S.; Wehland, J.; Chakraborty, T. und Timmis, K. N. (1996): Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*, *Mol Microbiol* (Band 20), Nr. 1, Seite 119-26. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8861210
- [170] Jonas, D.; Schultheis, B.; Klas, C.; Krammer, P. H. und Bhakdi, S. (1993): Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes, *Infect Immun* (Band 61), Nr. 5, Seite 1715-21. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8478059
- [171] Jonas, D.; Walev, I.; Berger, T.; Liebetrau, M.; Palmer, M. und Bhakdi, S. (1994): Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation, *Infect Immun* (Band 62), Nr. 4, Seite 1304-12. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8132337
- [172] Fettucciari, K.; Rosati, E.; Scaringi, L.; Cornacchione, P.; Migliorati, G.; Sabatini, R.; Fettriconi, I.; Rossi, R. und Marconi, P. (2000): Group B *Streptococcus* induces apoptosis in macrophages, *J Immunol* (Band 165), Nr. 7, Seite 3923-33. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11034400
- [173] Susin, S. A.; Lorenzo, H. K.; Zamzami, N.; Marzo, I.; Snow, B. E.; Brothers, G. M.; Mangion, J.; Jacotot, E.; Costantini, P.; Loeffler, M.; Larochette, N.; Goodlett, D. R.; Aebersold, R.; Siderovski, D. P.; Penninger, J. M. und Kroemer, G. (1999): Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature* (Band 397), Nr. 6718, Seite 441-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9989411
- [174] Taylor, D. L.; Edwards, A. D. und Mehmet, H. (1999): Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury, *Brain Pathol* (Band 9), Nr. 1, Seite 93-117. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9989454
- [175] Felderhoff-Mueser, U. und Ikonomidou, C. (2000): Mechanisms of neurodegeneration after paediatric brain injury, *Curr Opin Neurol*

- (Band 13), Nr. 2, Seite 141-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10987570
- [176] Felderhoff-Mueser, U.; Sifringer, M.; Pesditschek, S.; Kuckuck, H.; Moysich, A.; Bittigau, P. und Ikonomidou, C. (2002): Pathways leading to apoptotic neurodegeneration following trauma to the developing rat brain, *Neurobiol Dis* (Band 11), Nr. 2, Seite 231-45. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12505417
- [177] Dzierko, M.; Felderhoff-Mueser, U.; Sifringer, M.; Krutz, B.; Bittigau, P.; Thor, F.; Heumann, R.; Buhner, C.; Ikonomidou, C. und Hansen, H. H. (2004): Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity, *Neurobiol Dis* (Band 15), Nr. 2, Seite 177-87. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15006687

7 LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb	Abbildung
AIF	Apoptosis inducing factor
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
AIS	Ammnioninfektionssyndrom
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
beta-H/Z	Beta Hämolyisin/Zytolysin
bp	Basenpaare
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bzw	beziehungsweise
CAD	Caspase abhängige Deoxyribonuklease
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
CrP	C-reaktives Protein
Cyt c	Cytochrom c
C+Y	Casein plus Yeast
DAB	3,3 Diaminobenzidin
D39	S.pneumoniae Wildtyp
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FAD	FAS assoziierte Todesdomäne
GBS	Streptokokken der Gruppe B
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HCL	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
ICE	Interleucin-1 β converting enzyme
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase
kbp	Kilobasenpaare
KBE/ml	Kolonie-bildende Einheiten pro Milliliter

Abkürzungsverzeichnis

Ko	Kontrolle
min	Minuten
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NO	Stickstoffmonoxid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
OD	Optische Dichte
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PND	Postnataler Tag
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SERM	Standardfehler der Mittelwerte
SD	Standardabweichung
SSW	Schwangerschaftswoche
TdT	Terminale Desoxynukleotid Transferase
TH-Medium	Todd-Hewit-Medium
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TUNEL	TdT mediated dUTP Nick End Labeling
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Widltyp
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
zVAD-fmk	z-VAL-ALA-ASP (OME)-Fluoromethylketon

9 ERKLÄRUNG

“Ich, Anja Reiß, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Bakterielle Toxine sind wesentliche Mediatoren neuronaler Apoptose im neonatalen Meningitis- Modell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 08.07.2006

Anja Reiß

10 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. J.R Weber, meinem Doktorvater, für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu forschen und die Ergebnisse auf Fachkongressen zu präsentieren.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. J.S.Braun, meinem Ko-Doktorvater und Mitbetreuer, für die vielen fruchtbaren und kritischen Diskussionen, sowie die Hilfestellung bei der technischen Durchführung und Auswertung der Experimente bedanken.

Ebenso danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Abteilung für experimentelle Neurologie die mich jederzeit tatkräftig unterstützt haben, besonders Dr. Dorette Freyer und Renate Guisinda.

Vielen Dank an Dr. Danilea Bempohl und Dr. Annette Halle für die vielzähligen Anregungen und die freundschaftliche Unterstützung.

Ich danke den wissenschaftlichen Kooperationspartnern Frau Prof. Elaine Tuomanen vom Department of Infectious Diseases, St. Jude Children`s Research Hospital, Memphis, USA für die Überlassung der Pneumokokkenstämme und Herrn Prof. Victor Nizet, UCSD, San Diego, USA für die Bereitstellung der GBS-Stämme.

Dank gilt auch Frau PD Ursula Felderhoff aus der Klinik für Neonatologie CVK Berlin für die fachliche und moralische Unterstützung.

Stephan, danke für die liebevolle Unterstützung und den letzten Schliff.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern.