

Hirnschädigung bei der Pneumokokkenmeningitis: Trigger, Mechanismen und Protektion

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

Experimentelle Neurologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Herrn

Dr. med. Johann Sebastian Braun

geboren am 05.04.63 in Oettingen/Bayern

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Eingereicht am: 29. Juli 2002

Datum der Habilitation: 25. März 2003

Gutachter: 1. Frau Prof. Dr. B. Spellerberg, Ulm

2. Herr Prof. Dr. A. Fontana, Zürich, Schweiz

1.	Einleitung und kurzer Literaturüberblick.....	5
1.1.	Bakterielle Meningitis	6
1.1.1.	Zytokine	10
1.1.2.	Chemokine.....	11
1.1.3.	Komplement Kaskade.....	12
1.1.4.	Phospholipase A ₂ -Abkömmlinge.....	12
1.1.5.	Reaktive Sauerstoffradikale.....	13
1.1.6.	Reaktive Stickstoffradikale	13
1.1.7.	Exzitatorische Aminosäuren	13
1.1.8.	Matrixmetalloproteasen	14
1.2.	Zelltod durch Apoptose	16
1.2.1.	Kennzeichen der Apoptose	16
1.2.2.	Mechanismen der Apoptose: Caspasen und Mitochondrien.....	18
1.2.3.	Trigger	18
1.2.4.	Bakterien-induzierte Apoptose	18
1.2.5.	Pneumokokken-induzierte Apoptose.....	19
1.3.	Virulenzfaktoren von Pneumokokken	20
1.3.1.	Zellwandbestandteile	20
1.3.2.	Neuraminidase.....	21
1.3.3.	Hyaluronidase.....	21
1.3.4.	IgA Protease.....	21
1.3.5.	Zink-Metalloprotease.....	22
1.3.6.	ABC Transporter	22
1.3.7.	Autolysin (LytA).....	23
1.3.8.	Pneumolysin (Pln)	23
1.3.9.	Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂	23
2.	Eigene Forschungsergebnisse	24
2.1.	Neuroprotektion bei der Pneumokokkenmeningitis	26
2.1.1.	Pneumokokkenmeningitis induziert Zelltod im Hippocampus.....	26
2.1.2.	Neuroprotektion durch Caspase-Inhibition.....	28
2.1.3.	Bedeutung der intrathekalen Entzündung für die neuronale Apoptose	30
2.1.4.	Apoptose <i>in vitro</i> durch infizierten Liquor cerebrospinalis.....	31
2.2.	Mechanismen des Pneumokokken-induzierten Zelltodes	32
2.2.1.	Apoptose-Induktion durch Exposition mit Pneumokokken.....	32
2.2.2.	Pneumokokken induzieren Apoptose ohne Caspasenaktivierung	34
2.2.3.	Pneumokokken schädigen Mitochondrien	36
2.2.4.	Kalzium und reaktive Sauerstoffradikale als Mediatoren	39
2.2.5.	Apoptose-induzierender Faktor (AIF) als Effektorenzym	41
2.3.	Bakterielle Trigger des Zelltodes von Hirnzellen	42
2.3.1.	Identifizierung pro-apoptotischer Pneumokokkenfaktoren.....	42
2.3.2.	Pneumolysin und Hydrogenperoxid H ₂ O ₂	47
2.3.3.	Todesdomäne von Pneumolysin	48
2.3.4.	Mitochondrientoxin Pneumolysin.....	48
2.3.5.	Trigger der Inflammation durch Pneumolysin	50
2.3.6.	Pneumokokkentrigger der Apoptose <i>in vivo</i>	50
3.	Zusammenfassung der eigenen Forschungsergebnisse	53
3.1.	Neuronaler Schaden und dessen Protektion bei der Meningitis	53
3.2.	Mechanismen des Pneumokokken-induzierten Zelltodes.....	53
3.3.	Apoptose-Trigger der Pneumokokken	54
4.	Ausblick	57
5.	Danksagungen	59
6.	Literatur	60

Zusammenstellung ausgewählter Publikationen (chronologisch):

JS Braun, JE Sublett, D Freyer, TJ Mitchell, JL Cleveland, EI Tuomanen, JR Weber **2002**. Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J. Clin. Invest.* 109: 19-27. A 1-9

A Ring, **JS Braun**, J Pohl, V Nizet, W Stremmel, JL Shenep **2002**. Group B streptococcal beta-hemolysin induces mortality and liver injury in experimental sepsis. *J. Infect. Dis.* 185: 1745-1753. B 1-9

JS Braun, R Novak, PM Murray, CM Eischen, SA Susin, G Kroemer, A Halle, JR Weber, EI Tuomanen, JL Cleveland **2001**. Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus. *J. Infect. Dis.* 184: 1300-1309. C 1-10

A Ring, **JS Braun**, V Nizet, W Stremmel, JL Shenep **2000**. Group B streptococcal beta-hemolysin induces nitric oxide production in murine macrophages. *J. Infect. Dis.* 182: 150-157. D 1-8

R Novak, E Charpentier, **JS Braun**, E Tuomanen **2000**. Signal transduction by a death signal peptide: Uncovering the mechanism of bacterial killing by penicillin. *Mol. Cell* 5: 49-57. E 1-9

R Novak, E Charpentier, **JS Braun**, E Park, S Murti, E Tuomanen, R Masure **2000**. Extracellular targeting of choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* by a zinc metalloprotease. *Mol. Microbiol.* 36: 366-376. F 1-11

JS Braun, R Novak, K-H Herzog, SM Bodner, JL Cleveland, EI Tuomanen **1999**. Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat. Med.* 5: 298-302. G 1-5

JS Braun, R Novak, G Gao, PJ Murray, JL Shenep **1999**. Pneumolysin, a protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*, induces NO production from macrophages. *Infect. Immun.* 67: 3750-3756. H 1-7

JS Braun, EI Tuomanen, JL Cleveland **1999**. Neuroprotection by caspase inhibitors. *Expert Opin. Invest. Drugs* 8: 1599-1610. I 1-12

JS Braun, EI Tuomanen **1999**. Molecular mechanisms of brain damage in bacterial meningitis. *Adv. Pediatr. Infect. Dis.* 14: 49-71. J 1-23

R Novak, **JS Braun**, E Charpentier, EI Tuomanen **1998**. Penicillin tolerance genes of *Streptococcus pneumoniae*: the ABC-type manganese permease complex Psa. *Mol. Microbiol.* 29: 1285-1296. K 1-12

JS Braun, S Jander, M Schröter, OW Witte, G Stoll **1996**. Spatiotemporal relationship of apoptotic cell death to lymphomonocytic infiltration in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol.* 92: 255-263. L 1-9

1. Einleitung und kurzer Literaturüberblick

Im ersten Kapitel wird ein kurzer Literaturüberblick über die Thematik gegeben. Im zweiten Kapitel werden die eigenen Forschungsergebnisse zusammengefaßt.

Beide Kapitel beschäftigen sich mit folgenden drei Themenbereichen:

I. Kapitel	II. Kapitel
1. Meningitis	1. Hirnschädigung und Neuroprotektion
2. Apoptose	2. Mechanismen der Apoptose durch <i>S. pneumoniae</i>
3. Pneumokokken	3. Bakterielle Trigger der Apoptose

1.1. Bakterielle Meningitis

Streptococcus pneumoniae ist mittlerweile der häufigste Erreger bakterieller Meningitiden des Menschen (Schuchat et al., 1997). Außerdem sind Pneumokokken die aggressivsten unter den spontan in der Bevölkerung auftretenden (sog. "community acquired") Meningitiserregern. Im Vergleich zu anderen Erregern verursachen Pneumokokken die höchsten Morbiditäts- und Mortalitätsziffern. Dies ist dadurch belegt, daß trotz wirksamer Antibiotikatherapie bis zu 20-30% aller Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis versterben und bis zu 40-50% aller Patienten unter Spätfolgen leiden, wie zum Beispiel kognitiven Einschränkungen, Lern- und Gedächtnisschwierigkeiten, epileptischen Anfällen, Paresen und Hörstörungen (Bohr et al., 1984; Durand et al., 1993; Pfister et al., 1993). Bei der frühkindlichen bakteriellen Meningitis stehen die neuropsychologischen Defizite und Hörstörungen mit 40-50% im Vordergrund und persistieren bis ins Erwachsenenalter, was für die kindliche Entwicklung verheerende Folgen hat (Bohr et al., 1985; Grimwood et al., 2000).

Der frühestmögliche gezielte Einsatz von Antibiotika ist zweifelsohne der Grundbaustein der Therapie. Die Antibiotika-Therapie führt zur Lyse der Bakterien, dadurch zu einer Verstärkung der Entzündung und zu einer möglichen Verschlechterung des klinischen Zustands des Patienten. Infolgedessen können Antibiotika allein nicht die neurologischen Folgeschäden verhindern. Insgesamt hat die rapide Entwicklung hoch effektiver antimikrobieller Therapeutika in den letzten 40 Jahren weder zu einer Reduktion der Mortalität noch zur Verbesserung der Folgeerscheinungen geführt (Durand et al., 1993). Insofern ist als adjuvante Therapie die Entwicklung neuroprotektiver Strategien von höchster Wichtigkeit. Grundlage dafür ist es, die Mechanismen der neuronalen Schädigung bei der Pneumokokkenmeningitis zu verstehen.

Der Einsatz von Corticosteroiden ist bislang die einzige klinisch angewandte adjuvante Therapie der bakteriellen Meningitis. Corticosteroide reduzieren bei der *Haemophilus influenzae* Meningitis sowohl die Zunahme der Entzündungsantwort nach Antibiotikatherapie als auch die bei Kindern besonders relevante Hörstörungen (Lebel et al., 1988; Odio et al., 1991). Bislang konnte allerdings nicht eindeutig gezeigt werden, ob Steroide bei der *Streptococcus pneumoniae* Meningitis zur Reduktion der Mortalität und der sekundären Hirnschäden führen.

Unseres Erachtens ist es dringend erforderlich, neue neuroprotektive Therapieansätze bei der Pneumokokkenmeningitis zu entwickeln, um die fatalen neurologischen Folgeschäden zu vermeiden.

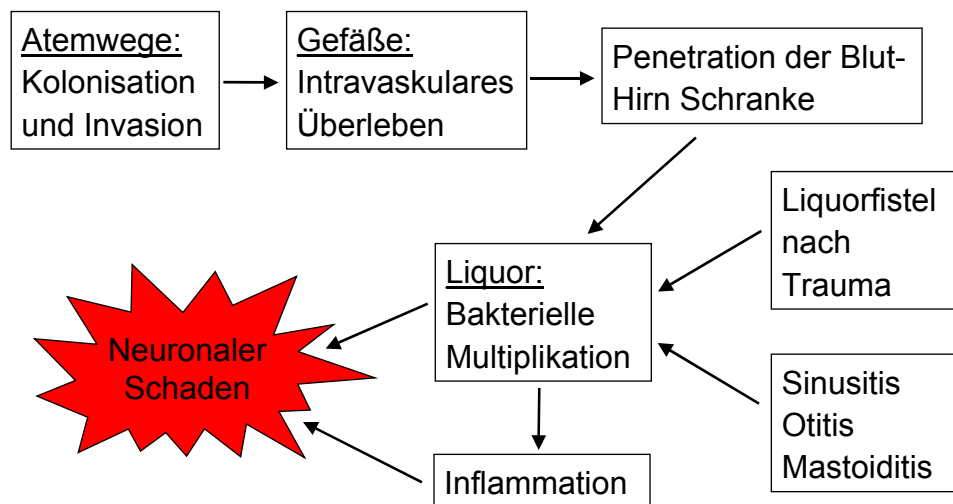


Abbildung 1: Pathogenese der bakteriellen Meningitis.

Initialer Trigger der Entzündung sind die Bakterien. Zu Beginn der Schadenskaskade stehen die Bakterien, welche die Mukosabarriere der Atemwege überwinden, ins Blut gelangen, dessen Abwehrmechanismen überleben und über noch unbekannte Mechanismen in den Liquorraum eindringen (Abbildung 1). Daneben können Bakterien über benachbarte Entzündungsherde, wie zum Beispiel eine Mastoiditis, Sinusitis oder Otitis, oder über eine Schädelfraktur oder eine Liquorfistel in den intrathekalen Raum gelangen. Dort vermehren sich die Bakterien und induzieren eine eitrige Entzündung. Verschiedenste Bakterienbestandteile und -toxine wirken bei der Meningitis im Liquor cerebrospinalis pro-inflammatorisch und verursachen die Invasion von Leukozyten in den Liquorraum und darüber hinaus eine Gliaaktivierung (Täuber et al., 1992; Tunkel and Scheld, 1997). Solche Entzündungsreaktionen werden unter anderem durch Lipopolysaccharide (gram-negative Bakterien), Peptidoglykan und Lipoteichonsäure (gram-positive Bakterien) oder durch prokaryotische DNA (Deng et al., 2001) gesteuert. Neben dieser pro-inflammatorischen Wirkung bakterieller Bestandteile ist die direkte neurotoxische Wirkung von Bakterien und deren Faktoren kaum bekannt. In der Abbildung 2 werden mögliche Wechselwirkungen kurz schematisch zusammengefaßt (J 1-23).

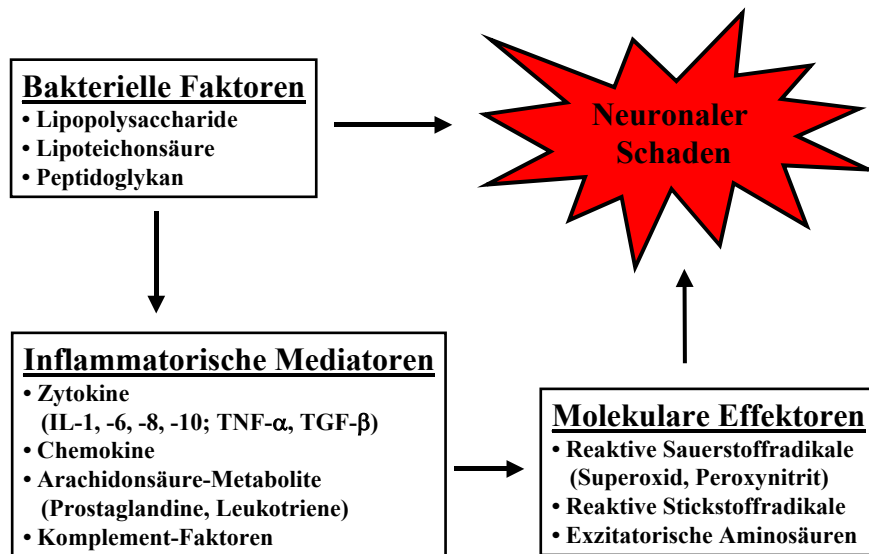


Abbildung 2: Potentielle Trigger des neuronalen Zelltodes bei der bakteriellen Meningitis.

Die Wirkung bakterieller und Wirts-Faktoren bleibt wahrscheinlich nicht auf den Subarachnoidalraum beschränkt. Substanzen, wie zum Beispiel das Markerprotein Meerrettichperoxidase, verbreiten sich - nach Injektion in den Subarachnoidalraum - über paravaskuläre Flüssigkeitswege um Gehirnarterien innerhalb von Minuten im Extrazellulärraum des Gehirns (Rennels et al., 1990). Es ist daher denkbar, daß auch die im Liquorraum produzierten toxischen Faktoren der Bakterien und der Entzündungsantwort durch Diffusion und über paravaskuläre Wege auf das Hirnparenchym übergreifen. Die Schädigung des Hirnparenchyms ist eine wichtige Konsequenz bakterieller Meningitiden und wird wahrscheinlich getriggert durch bakterielle und Wirts-Faktoren sowie durch die von ihnen hervorgerufenen pathophysiologischen Veränderungen.

Bei der bakteriellen Meningitis ist der Subarachnoidalraum mit eitrigem Exsudat angefüllt, welches überwiegend aus Granulozyten besteht. Zur Hirnschädigung und zur Mortalität können unterschiedlichste Mechanismen beitragen: direkte bakterielle Toxine, Entzündungsmediatoren des Wirts und pathophysiologische Veränderungen, wie zum Beispiel der Zusammenbruch der Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke, das Hirnödem, der Hydrozephalus, der erhöhte Hirndruck sowie die Störung der zerebrovaskulären Autoregulation. Diese pathophysiologischen Veränderungen können zu klinischen Komplikationen führen, die eine schlechte Prognose bedingen.

Während die direkten bakteriellen Noxen für das Neuron bei den eitrigen Meningitiden kaum erforscht sind, ist viel bekannt über die für das Neuron potentiell schädlichen Mediatoren der massiven Entzündungsantwort. Letztere seien im Folgenden kurz skizziert (Übersichtsarbeit J 1-23).

1.1.1. Zytokine

Zytokine sind gut untersuchte Entzündungsmediatoren gram-positiver und -negativer Bakterien (Beutler and Cerami, 1987; Dinarello, 1984; Riesenfeld-Orn et al., 1989; Saukkonen et al., 1990). Beispiele einiger Zytokine, welche bei bakteriellen Meningitiden vermehrt nachgewiesen werden, sind die Interleukine IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, Interferon- γ , das Makrophagen Inflammas-Protein (MIP), "transforming growth factor- β " (TGF- β) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) (Diab et al., 1997; van Furth et al., 1996). Zytokine können einerseits von residenten Hirnzellen, wie zum Beispiel der Mikroglia oder Endothelzellen der Kapillaren, andererseits von einwandernden Immunzellen, wie zum Beispiel Monozyten und Granulozyten, produziert werden. Sie tragen zu einem komplexen Netzwerk bei, das zur Stimulierung oder Hemmung von Entzündungsprozessen führt.

TNF- α wird bei der Pneumokokkenmeningitis hauptsächlich von infiltrierenden Monozyten gebildet (Bitsch et al., 1997). Die intrathekale Injektion von TNF- α führt zu einer Entzündungsreaktion mit einer moderaten Liquorleukozytose und einem Dosis-abhängigen Anstieg des regionalen zerebralen Blutflusses (Angstwurm et al., 1998). Interessanterweise potenziert niedrig dosiertes rekombinantes TNF- α dramatisch die Effekte von niedrig dosierten Pneumokokkenzellwänden

(Liquorleukozytose, intrakranieller Druck, Hirnödeme) (Angstwurm et al., 1998) und wirkt synergistisch mit gleichzeitig verabreichtem niedrig dosiertem IL-1- β in der Induktion von Meningitis und Blut-Hirn-Schrankenstörung (Quagliarello et al., 1991).

IL-1-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis korrelieren mit den Folgeschäden der bakteriellen Meningitis. IL-1 ist ein wichtiger Mediator der Entzündungsantwort und der Hirnschädigung bei der bakteriellen Meningitis (Mustafa et al., 1989; Quagliarello et al., 1991).

Inhibierungsexperimente mit systemischer Verabreichung von anti-IL-8-Antikörpern haben gezeigt, daß IL-8 eine wichtige Rolle für den Übertritt von Leukozyten in den Liquorraum besitzt (Dumont et al., 2000).

Dem gegenüber werden bei der bakteriellen Meningitis auch anti-inflammatorische und immunsuppressive Effekte im Inflammationsnetzwerk entfaltet (Lehmann et al., 1995). Beispielsweise inhibiert IL-10 die Produktion von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α sowie die Freisetzung von Sauerstoffradikalen (Bogdan et al., 1991; de Waal-Malefyt et al., 1991). Bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis verringert IL-10 - nur nach systemischer Verabreichung - das Hirnödem, den Hirndruck und die Liquorleukozytose (Koedel et al., 1996).

Ein weiterer wichtiger Vertreter der anti-inflammatorischen Zytokine ist TGF- β . Dieser Faktor wird bei der bakteriellen Meningitis von vielen Zelltypen produziert und hochreguliert. TGF- β deaktiviert Makrophagen, inhibiert die Adhäsion von Granulozyten an Endothelien sowie die Produktion mehrerer Zytokine (Gamble and Vadas, 1988; Tsunawaki et al., 1988). Bei der bakteriellen Meningitis vermindert TGF- β das Hirnödem und den Hirndruck (Pfister et al., 1992).

1.1.2. Chemokine

Chemokine spielen eine wichtige Rolle hinsichtlich der Initiation und Modulation der Entzündung bei der bakteriellen Meningitis (Spanaus et al., 1997). Diese Familie ist unterteilt in C-X-C und C-C Chemokine (je nachdem, ob Cystein-Abschnitte durch eine Aminosäure getrennt sind oder nicht), welche überwiegend chemotaktische Eigenschaften besitzen, und zwar die C-X-C Chemokine auf neutrophile Granulozyten und die C-C Chemokine hauptsächlich auf Monozyten und T-Zellen (Horuk, 1994). Die Konzentration bestimmter Chemokine ist bei der

bakteriellen Meningitis erhöht. Die intrathekale Instillation von Chemokinen verursacht eine Erhöhung der Liquorproteine, Hirnödem und Liquorpleozytose (Seebach et al., 1995).

1.1.3. Komplement Kaskade

Komplementfaktoren - unter physiologischen Bedingungen extrem niedrig im Liquor - werden bei der bakteriellen Meningitis hochreguliert. Die aktivierte Komplementkaskade im Liquor cerebrospinalis agiert an ebenfalls hochregulierten Komplementrezeptoren auf Hirnzellen und mediiert dadurch möglicherweise die Hirnschädigung durch direkte Membranschädigung. Außerdem wirken Komplementfaktoren im Liquor chemotaktisch und tragen zur Liquorpleozytose bei (Ernst et al., 1984).

1.1.4. Phospholipase A₂-Abkömmlinge

Bakterien induzieren in unterschiedlichsten Zelltypen Phospholipase A₂ Aktivität. Aktivierte Phospholipase A₂ hydrolysiert sowohl Arachidonester der Zellmembranphospholipide als auch die langkettigen Fett-Acyl-Gruppen von intrazellulärem Plättchen-Aktivierendem-Faktor (PAF) und produziert somit jeweils Arachidonsäure und PAF (Marcus, 1988; Pinckard et al., 1988). Zwei Enzyme konvertieren Arachidonsäure zu seinen Endprodukten: die Cyclooxygenase produziert Prostaglandine und Thromboxane, die Lipoxygenase produziert Leukotriene.

Diese Lipide entfalten multiple pro-inflammatorische Eigenschaften. Bei der experimentellen bakteriellen Meningitis bewirken Inhibitoren der Lipidperoxidation oder der Cyclooxygenase eine Verminderung von Hirndruck, Hirnödem und Liquorpleozytose (Lorenzl et al., 1995; Tuomanen et al., 1987). PAF ist ein potenter Phospholipid Inflammationsmediator; er wird gebildet von unterschiedlichsten Zellen, wie zum Beispiel von Endothelien, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten. PAF spielt bei unterschiedlichen Modellen der Hirnschädigung eine Rolle (Feuerstein, 1996). Pneumokokkenzellwände (Lipoteichonsäure) und PAF haben eine Phosphorylcholineinheit gemein, wodurch Pneumokokken an den PAF-Rezeptor binden können. Die Inhibition des PAF

Rezeptors bewirkt eine Reduktion der Inflammation bei der Pneumokokkenmeningitis (Cabellos et al., 1992).

1.1.5. Reaktive Sauerstoffradikale

Im Gehirn stellen reaktive Sauerstoffradikale (Superoxid-Radikale, Hydrogenperoxid, Hydroxyl-Radikale, Hypochlorat) potente Auslöser oxidativer Schädigung dar. Abhängig von ihrer Konzentration können sie apoptotischen oder nekrotischen Zelltod auslösen. Hirnzellen sind besonders vulnerabel gegenüber Sauerstoffradikalen wegen der hohen Sauerstoffspannung, dem relativ niedrigen Gehalt an endogenen Antioxidantien, dem relativ hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und den Eisenkonzentrationen im Gehirn (Leib et al., 1996; Pfister et al., 1992). Sauerstoffradikale mediieren neuronalen Schaden bei einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen, wie zum Beispiel neurodegenerativen, ischämischen oder traumatischen Erkrankungen des Zentralnervensystems. Im Verlauf einer bakteriellen Meningitis werden Sauerstoffradikale im Gehirn und Liquor vermehrt produziert und freigesetzt; Antioxidantien reduzieren Hirnödeme, Hirndruck und die Liquorleukozytose (Leib et al., 1996; Pfister et al., 1992).

1.1.6. Reaktive Stickstoffradikale

Die Bedeutung von Nitritoxid (NO) wurde bei unterschiedlichsten bakteriellen Meningitiden gezeigt. Die NO Konzentration kann dabei im Liquor cerebrospinalis bis zu 50-fach ansteigen (Täuber et al., 1997). Inhibitoren der NO Synthese verhindern die pathophysiologischen Veränderungen in der Frühphase der Meningitis (Koedel et al., 1995). Jedoch gibt es Studien, in welchen eine Verschlechterung der zerebralen Hypoperfusion und des neuronalen Schadens durch den iNOS-Inhibitor Aminoguanidine berichtet wird (Täuber et al., 1997). Deshalb ist die Rolle von NO bei der bakteriellen Meningitis noch nicht endgültig geklärt.

1.1.7. Exzitatorische Aminosäuren

Bei unterschiedlichen Gehirnerkrankungen, wie zum Beispiel der zerebralen Ischämie oder Epilepsie, ist der Hirnschaden zum Teil durch exzitatorische Aminosäuren bedingt. Exzitatorische Aminosäuren wirken dabei neurotoxisch durch eine Überstimulation von Glutamatrezeptoren (Choi, 1992). Bei der bakteriellen

Meningitis werden erhöhte Konzentrationen exzitatorischer Aminosäuren (zum Beispiel Glutamat und Aspartat) sowohl im Liquor als auch in der interstitiellen Gehirnflüssigkeit gemessen (Briem et al., 1982; Schott and Meier, 1987). Die neurologischen Folgeschäden korrelieren sogar mit der Menge dieser Neurotransmitter (Spranger et al., 1996). Mögliche Ursachen der Erhöhung der exzitatorischen Aminosäuren bei der bakteriellen Meningitis sind der Zusammenbruch der Blut-Liquor-Schranke (Guerra-Romero et al., 1993), ihre Produktion durch Mikroglia und Monozyten (Spranger et al., 1996), eine verzögerte Clearance sowie eine verstärkte Bindung und beeinträchtigte Detoxifikation (Stringaris et al., 1997). Die selektive Blockade der Rezeptoren exzitatorischer Aminosäuren verringert den neuronalen Schaden bei der bakteriellen Meningitis (Leib et al., 1996).

1.1.8. Matrixmetalloproteasen

Matrixmetalloproteasen bilden eine Familie von über 20 Zink-abhängigen Endopeptidasen, deren Target überwiegend die extrazelluläre Matrix ist. Matrixmetalloproteasen haben eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Funktionen. Sie sind beteiligt bei zahlreichen Prozessen der Ontogenese, bei der Wundheilung, bei der Metastasierung von Tumoren und auch bei entzündlichen Erkrankungen. Bei der bakteriellen Meningitis tragen sie zur Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke (Paul et al., 1998) sowie zur Hirnschädigung bei (Leib et al., 2000). Die Liquorkonzentration von Matrixmetalloproteinasen ist bei bakteriellen Meningitiden massiv erhöht und ihre pharmakologische Inhibition bewirkt Neuroprotektion (Leib et al., 2001; Leib et al., 2000).

Zusammengefaßt läßt sich feststellen, daß die Bakterienabtötung durch Antibiotika nur ein Teil der Meningitistherapie ist. Als Ursache der Hirnschädigung bei der bakteriellen Meningitis kommen prinzipiell sowohl Bakterientoxine als auch die massive Immunantwort des Wirts in Frage (Abbildung 3). Die Herausforderung an die Zukunft ist es, - neben der schnellstmöglichen Elimination der Bakterien - die überschießende eitrige Entzündung zu blockieren sowie Bakterientoxine zu inaktivieren und somit den neuronalen Schaden zu verhindern.

Neuronaler Schaden wird besonders im Frühstadium der bakteriellen Meningitis durch Apoptose vermittelt. Pneumokokken sind - wie im Kapitel II ausführlich dargelegt - potente Trigger neuronaler Apoptose. Im folgenden Abschnitt wird deshalb zur Einführung ein kurzer Überblick über apoptotische Zelltodprozesse geben.

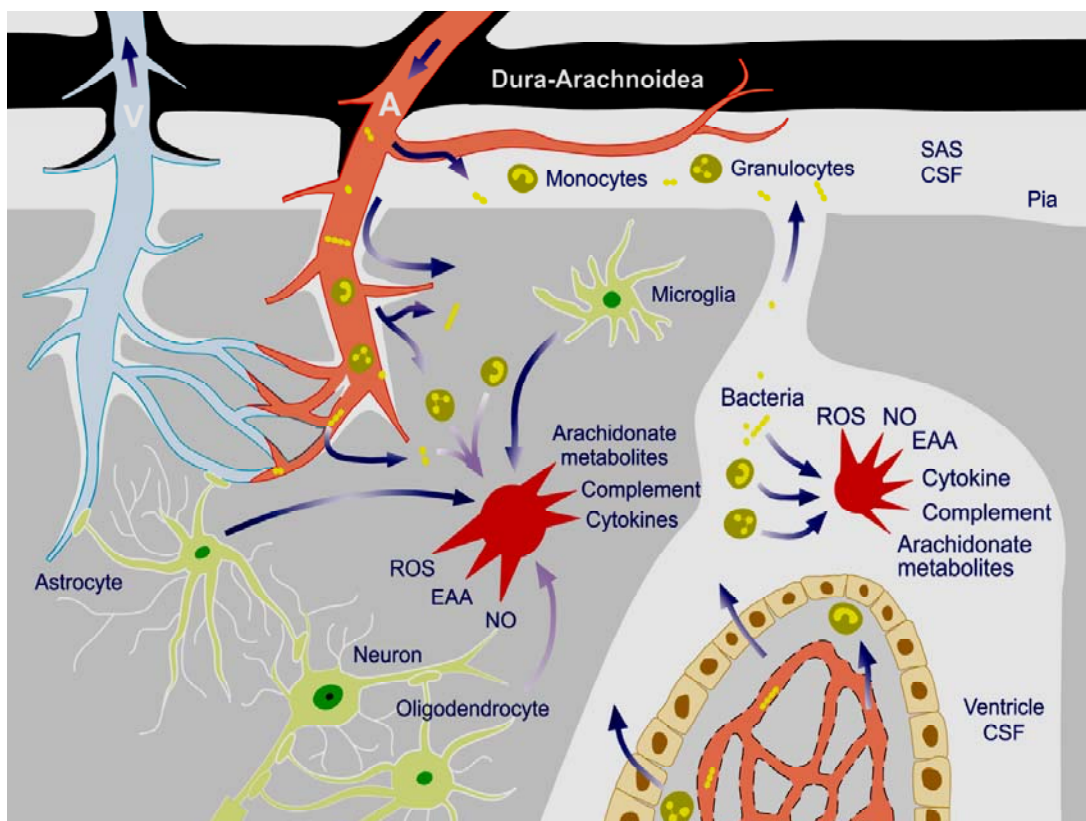


Abbildung 3: Pathophysiologie der bakteriellen Meningitis. Mögliche Invasionswege der Bakterien sind die dünnwandigen Venen der Pia mater oder des Dura-Arachnoidea-Komplexes im Bereich der meningealen Blut-Liquor-Schranke, das Epithel des Plexus choroideus oder die Gehirnkapillaren im Bereich der Blut-Hirn-Schranke. Sobald die Bakterien eine dieser Schranken überwunden haben und sich im Liquorraum vermehren, wird eine massive Entzündungs-Kaskade angestoßen und eine Vielzahl potentiell neurotoxischer Mediatoren vermehrt produziert, wie zum Beispiel ROS (reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffradikale), NO (Nitritoxid), EAA (excitatory amino acids, exzitatorische Aminosäuren), Arachidonsäure, Komplementfaktoren, Zytokine.

1.2. Zelltod durch Apoptose

Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus zur Elimination überflüssiger Zellen während der Entwicklung und für die Physiologie der regelmäßigen Zellerneuerung. Neben diesen physiologischen Funktionen spielt Apoptose eine essentielle Rolle bei der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen des Gehirns, wie zum Beispiel bei der zerebralen Ischämie (L 1-9).

Jegliche Dysregulation des programmierten Zelltodes - sowohl ein Zuviel als auch ein Zuwenig - hat katastrophale Auswirkungen. Zu einem Zuviel von Zelltod kommt es zum Beispiel bei den neurodegenerativen Erkrankungen, zu einem Zuwenig beispielsweise bei Tumor- oder auch Autoimmunerkrankungen. Im Folgenden soll kurz auf die Kennzeichen, Trigger und Mechanismen der Apoptose eingegangen werden.

1.2.1. Kennzeichen der Apoptose

Apoptose ist der aktive, Energie-abhängige Zelltod. Die morphologischen Kriterien der Apoptose sind zytoplasmatische Bläschenbildungen der Zellmembran, eine Verkleinerung und Abrundung von Zelle und Zellkern, die Kondensation von Zytoplasma und Chromatin des Zellkerns sowie letztendlich die Fragmentierung von Zelle und Zellkern. Die dadurch entstandenen, von Zellmembran umhüllten Fragmente, sogenannte "apoptotic bodies" werden von umgebenden Zellen phagozytiert. Dabei wird die Freisetzung potentiell pro-inflammatorisch wirkender Zytoplasma-bestandteile und somit eine Entzündungsreaktion verhindert. Ganz im Gegensatz dazu kommt es bei der Nekrose, dem sog. passiven Zelltod, zu einer frühen Schädigung der Zellmembranintegrität, gefolgt von einem Anschwellen sowohl der Zelle als auch des Zellkerns. Bei der Nekrose werden rasch intrazelluläre Bestandteile freigesetzt und dadurch typischerweise eine Entzündungsreaktion initiiert.

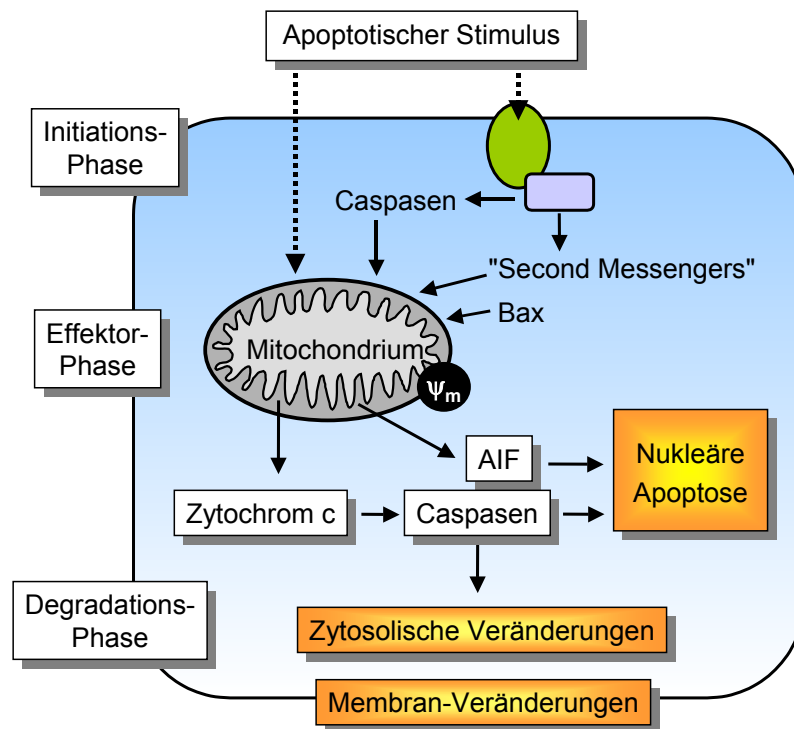


Abbildung 4: Modell der Apoptose modifiziert nach (Brenner and Kroemer, 1999).

1.2.2. Mechanismen der Apoptose: Caspasen und Mitochondrien

Anhand des Modells in Abbildung 4 [modifiziert nach (Brenner and Kroemer, 1999)] sollen die wichtigsten Mechanismen der Apoptose erläutert werden. Prinzipiell werden 3 Phasen unterschieden: die Initiations-, Effektor- und Degradationsphase. In der Initiationsphase binden Apoptosetrigger an sogenannte "Todesrezeptoren". Entweder über Aktivierung bestimmter Rezeptoren, wie zum Beispiel des TNF-Rezeptors, oder durch direkte Mitochondrienschädigung kommt es zur Aktivierung von zelleigenen Proteasen. In der Regel sind das die sogenannten Cystein enthaltende, Asparat-spezifische Proteasen = Caspasen. Sie sind integraler Bestandteil der Ausführung der Apoptose. Sie liegen als inaktive Pro-Caspasen in der Zelle vor und können rasch durch die Abspaltung eines Polypeptids aktiviert werden. Ein klassischer Aktivierungsweg ist die Aktivierung der Pro-Caspase-9 durch von geschädigten Mitochondrien freigesetztes Zytocrom c. Die protektiven Effekte von Caspasen-Inhibitoren sind bei verschiedenen Modellen der Hirnschädigung belegt (Übersichtsarbeit I 1-12). In letzter Zeit werden jedoch auch zunehmend Caspase-unabhängige Apoptosewege beschrieben. In diesen Fällen spielt oft der ebenfalls von den Mitochondrien freigesetzte sogenannte Apoptose-induzierende Faktor (AIF) eine Schlüsselrolle (Susin et al., 1999).

1.2.3. Trigger

Die Liste Apoptose-auslösender Substanzen wächst ständig. Sie beinhaltet beispielsweise TNF- α , Sauerstoffradikale, Bestrahlung, Hyperkaliämie, Glucocorticoide, Glutamat und Chemotherapeutika. Auch ein Entzug von essentiellen Faktoren, wie z. B. Nervenwachstumsfaktor, kann Apoptose verursachen.

1.2.4. Bakterien-induzierte Apoptose

Apoptose ist eine wichtige bakterielle Pathogenitätsstrategie und spielt bei der Vernichtung von Wirtszellen eine essentielle Rolle (Zychlinsky et al., 1992; Zychlinsky and Sansonetti, 1997). Die Liste der Bakterien, welche Apoptose auslösen können, wird zunehmend größer. Als typische Beispiele Apoptose-induzierender Bakterien seien genannt: Shigellen und Salmonellen, *Escherichia coli* und Staphylokokken.

1.2.5. Pneumokokken-induzierte Apoptose

Pneumokokken sind seit längerem bekannt, Zelltod durch Apoptose auszulösen, so z. B. in Thymozyten (Wang et al., 1994), Epithelialzellen (Hakansson et al., 1996), Leukozyten (Bicknell et al., 1994) oder Neuronen (Zysk et al., 1996). Es ist bekannt, daß im Frühstadium der Pneumokokkenmeningitis hippocampale Neurone im Gyrus dentatus durch Apoptose absterben (Zysk et al., 1996) (G 1-5). Es ist jedoch nicht bekannt, welches die Mechanismen bzw. Signaltransduktionswege der durch Pneumokokken ausgelösten neuronalen Apoptose und Hirnschädigung sind. Ebenso unklar sind die Trigger dieser selektiven neuronalen Schädigung. Die Erforschung der Ursachen und Mechanismen der bakteriell-induzierten neuronalen Apoptose ist unerlässliche Voraussetzung für die Entwicklung einer neuroprotektiven Strategie.

Pneumokokken besitzen ein reiches Arsenal von Virulenzfaktoren. Im nächsten Abschnitt möchte ich kurz die wichtigsten dieser Faktoren nennen, welche als potentielle Auslöser neuronaler Apoptose und der Hirnschädigung bei der bakteriellen Meningitis in Frage kommen.

1.3. Virulenzfaktoren von Pneumokokken

Pneumokokken (*Streptococcus pneumoniae*) sind gram-positive, fakultativ aerob lebende Diplokokken. Sie sind transiente fakultative Inhabitanten des humanen Nasopharynx. Etwa 1/3 aller Menschen sind transiente nasopharyngeale Pneumokokkenträger, ohne daß es bei ihnen zu Krankheitserscheinungen kommt. Es wird angenommen, daß der transienten Exposition mit wechselnden Pneumokokken-Serotypen eine wichtige Bedeutung beim Erwerb der natürlichen Immunität zukommt. Näheres ist darüber jedoch nicht bekannt. *S. pneumoniae* ist also meist nur Kommensale und verursacht - gemessen an der hohen Expositions- und Kolonisationsrate - in relativ wenigen Fällen eine invasive Erkrankung. Insofern kann *S. pneumoniae* als eine fitte Mikrobe im Sinne von Joshua Lederberg bezeichnet werden, der einmal sagte: "The death of the host is not the primary marker of the microbe's fitness; it is an accident of collateral damage."

Über noch unklare Mechanismen kann dieses Bakterium durch das Epithel des Tracheobronchialsystems transmigrieren und schwere Infektions-erkrankungen hervorrufen, vor allem Pneumonie, Otitis media, Sepsis und Meningitis.

Streptococcus pneumoniae ist der häufigste und aggressivste Erreger bakterieller Meningitiden des Menschen mit einer hohen Morbitäts- und Mortalitätsziffer (siehe Seite 7). Trotz effektiver Antibiotika haben sich diese Zahlen kaum verbessert. Somit ist die Pneumokokkenmeningitis eine wichtige Modellerkrankung zur Erforschung der Hirnschädigung bei neuroinfektiösen Erkrankungen.

Pneumokokken verfügen über ein großes Arsenal von Pathogenitätsfaktoren, die im Folgenden kurz zusammengefaßt sind (AlonsoDeVelasco et al., 1995; Berry and Paton, 2000; Paton et al., 1997; Tuomanen et al., 1995).

1.3.1. Zellwandbestandteile

Lipoteichonsäure, Peptidoglykan, Choline, Choline-bindende Proteine (Rosenow et al., 1997), LicD (Zhang et al., 1999) und das Pneumokokkenoberflächenprotein A (PspA) (Yother and White, 1994) sind Zellwandbestandteile von Pneumokokken. Zellwände von Pneumokokken sind potente Trigger der Entzündungsantwort des Wirtes (Tuomanen et al., 1985). Viele dieser Zellwandbestandteile sind wichtige

Determinanten der Adhäsion an eukaryote Zellen und oft auch Virulenzfaktoren. So führt beispielsweise die genetische Inaktivierung des PspA-Gens zur Avirulenz im Tierversuch (Briles et al., 1988). Knockout des LicD Gens führt zu verminderter Adhärenz, Kolonisation und Virulenz im Mausversuch (Zhang et al., 1999).

1.3.2. Neuraminidase

Pneumokokken produzieren multiple Neuraminidase Isoenzyme, welche an der bakteriellen Oberfläche lokalisiert sind (Camara et al., 1994). Neuraminidase spaltet die terminale Sialinsäure von Glykolipiden, Glykoproteinen und Oligosacchariden und potenziert damit die Pneumokokken-induzierte Zytotoxizität (Berry et al., 1996). Neuraminidase trägt auch zur Pathogenität von Pneumokokken in Mäusen bei (Lock et al., 1988).

1.3.3. Hyaluronidase

Hyaluronidase ist ein von Pneumokokken produziertes und sezerniertes Enzym, dem eine wichtige Rolle bei der Kolonisation und Invasion zugeschrieben wird (Humphrey, 1944). Sein Substrat, die Hyaluronsäure, ist ein wichtiger Bestandteil von Bindegewebe und extrazellulärer Matrix. Die Rolle der Hyaluronidase beim neuronalen Zelltod ist bislang nicht untersucht. Es wird jedoch vermutet, daß hohe Hyaluronidase-Aktivität eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung einer Meningitis ist.

1.3.4. IgA Protease

IgA Proteasen sind eine heterogene Gruppe von zellwandassoziierten, extrazellulären Endopeptidasen, welche humanes IgA inaktivieren, indem sie dieses Immunglobulin in ein Fab und Fc Fragment spalten. Dies ist eine wichtige Kolonisationsstrategie, da es den Bakterien ermöglicht, die Immunbarriere der Mukosa zu umgehen (Poulsen et al., 1996). Interessanterweise sezernieren die drei Haupterreger bakterieller Meningitiden (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*) eine IgA-Protease, deren Rolle im Nervensystem, insbesondere an der Blut-Hirn-Schranke kaum erforscht ist.

1.3.5. Zink-Metalloprotease

Diese ebenfalls Oberflächen-exprimierte Proteasen haben unterschiedliche pathogenetische Eigenschaften (Vollmer et al., 1996). Sie sind wichtig für die bakterielle Adhäsion, Kolonisation und Lyse (F 1-11).

1.3.6. ABC Transporter

Streptococcus pneumoniae besitzt - wie nahezu alle gram-positiven und -negativen Bakterien - mehrere ABC (sog. "adenosine triphosphate-binding cassette") Transportproteine. Diese Transporter sind essentiell für die Aufnahme und Abgabe verschiedenster Nährstoffe und Stoff-wechselprodukte der Bakterien. Einige dieser ABC-Transporter haben auch eine Bedeutung für die bakterielle Virulenz. So führt die Inaktivierung eines ABC-Eisentransporters (Pit-Gen) zu einer abgeschwächten Virulenz im Maus-Modell der Sepsis und Pneumonie (Brown et al., 2001). Inaktivierung des ABC-Mangan Permease Komplexes Psa führt zu einer Verminderung von Autolyse, Adhäsion und Virulenz (Berry and Paton, 1996; Sampson et al., 1994) (K 1-12).

1.3.7. Autolysin (LytA)

Das LytA-Gen kodiert das Pneumokokken-Autolysin N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase. Autolysin-defiziente Mutanten sind in ihrer Virulenz im Mausexperiment deutlich reduziert (Berry et al., 1989). Bei der experimentellen Pneumonie induziert diese Mutante - im Gegensatz zum Wildtyp - keine Inflammation (Canvin et al., 1995).

1.3.8. Pneumolysin (Pln)

Pneumolysin ist ein multifunktionales Proteintoxin von Pneumokokken. Lokalisiert im bakteriellen Zytosol wird es während der Vermehrung, vor allem aber während der Lyse freigesetzt. Pneumolysin hat unterschiedliche Funktionen, es aktiviert die Komplement-Kaskade, wirkt pro-inflammatorisch und bildet kleine Poren in der eukaryoten Zellmembran (Mitchell and Andrew, 1997). So stimuliert Pneumolysin zum Beispiel die Produktion von TNF- α und IL-1 β in humanen Monozyten (Houldsworth et al., 1994).

1.3.9. Wasserstoffperoxid H₂O₂

Pneumokokken besitzen keine Katalase, produzieren deshalb relativ große Mengen an H₂O₂ (Avery and Morgan, 1924; Pericone et al., 2000) und bewirken dadurch die oxidative Schädigung von Wirtszellen. Die Mutation eines der Schlüsselenzyme für die H₂O₂-Produktion in Pneumokokken, der Pyruvatoxidase, bewirkt eine Reduktion der H₂O₂-Produktion um das 100-fache; solche Mutanten zeigen eine deutlich reduzierte Virulenz im Tierversuch (Spellerberg et al., 1996).

Die oben genannten Pathogenitätsfaktoren der Pneumokokken determinieren deren hohe Pathogenität für das Zentralnervensystem und sind die entscheidenden Trigger der massiven Entzündung. Eigene publizierte Ergebnisse haben gezeigt, daß einige dieser Faktoren essentiell für neuronalen Zelltod *in vitro* und *in vivo* sind. Dies wird im folgenden Kapitel II näher erläutert.

2. Eigene Forschungsergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Trigger und Mechanismen der Hirnschädigung bei der Pneumokokkenmeningitis aufzuklären, um neuroprotektive Therapieansätze zu entwickeln.

Abbildung 5 faßt die Hauptergebnisse schematisch zusammen. Hirnschädigung wurde im Tiermodell der Pneumokokkenmeningitis nachgewiesen. Neuroprotektion konnte sowohl durch Caspase-Inhibition als auch durch Blockade der Entzündung erreicht werden. *In vitro* war die Mitochondrienschädigung ein Schlüsselmechanismus der Pneumokokken-induzierten Neurotoxizität. Die Pneumokokkentoxine Pneumolysin und H₂O₂ erwiesen sich als potente Apoptosetrigger *in vitro*. Blockade dieser Toxine bewirkte eine signifikante Reduktion des neuronalen Schadens nicht nur *in vitro* sondern auch bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis.

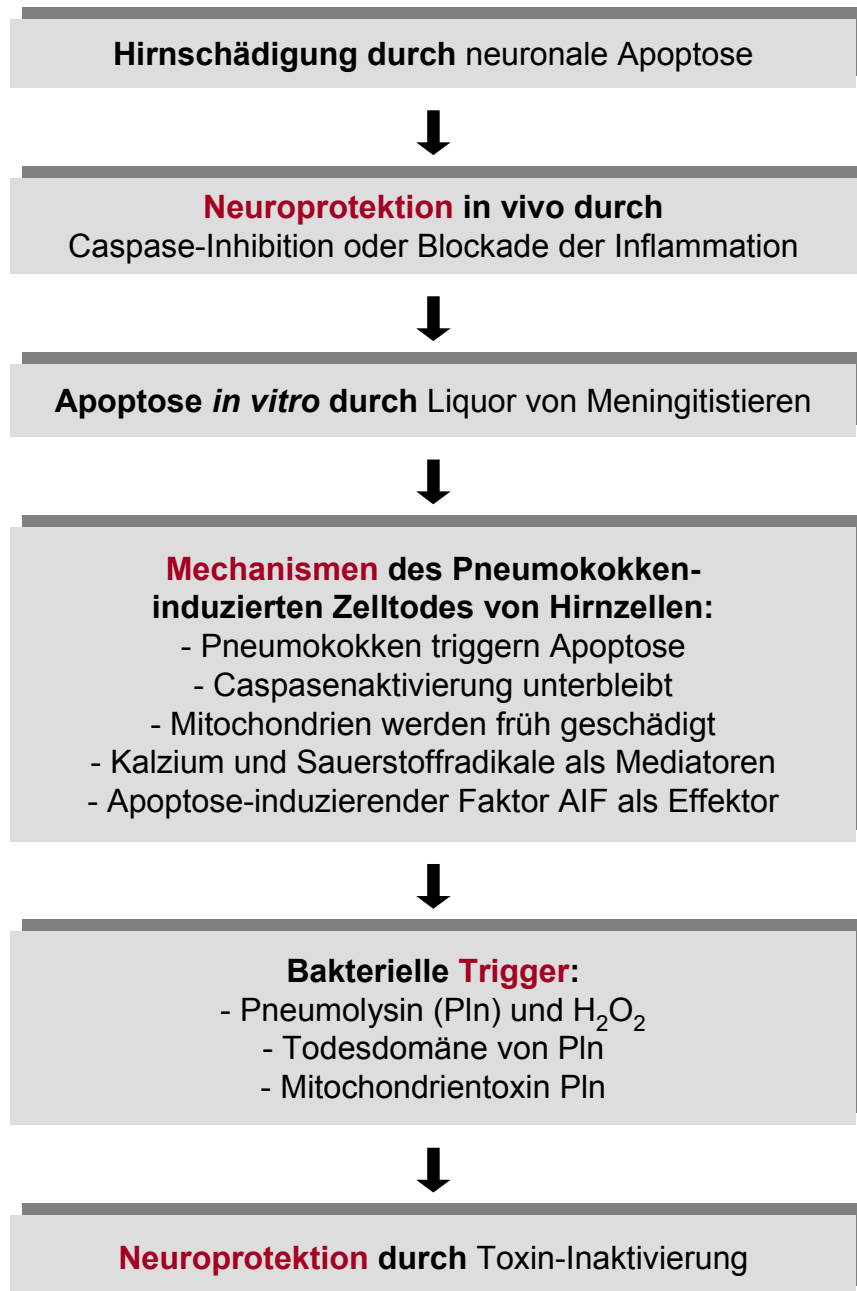


Abbildung 5: Hauptergebnisse.

2.1. Neuroprotektion bei der Pneumokokkenmeningitis

2.1.1. Pneumokokkenmeningitis induziert Zelltod im Hippocampus

Bis zu 50% aller Patienten leiden nach einer überlebten bakteriellen Meningitis unter den Folgen neuronaler Schädigung. Folgeschäden äußern sich zum Beispiel in Lerndefiziten, Hörstörungen, Anfallsleiden und Paresen.

Arbeiten verschiedener Gruppen und eigene Ergebnisse (Leib et al., 1996; Zysk et al., 1996) (G 1-5) haben gezeigt, daß sowohl die Pneumokokken- als auch die Gruppe B Streptokokken-Meningitiden Apoptose von Hippocampusneuronen auslösen. Im Frühstadium der bakteriellen Meningitis kommt es zum neuronalen Zelltod im Hippocampus, später auch im Kortex. Als Trigger der Apoptose bei der Meningitis kommen prinzipiell sowohl die überschießende Entzündungsantwort des Wirts als auch direkte toxische Faktoren der Bakterien in Betracht. Die Apoptose wird bei der Pneumokokkenmeningitis teils durch Caspase-abhängige, teils durch Caspase-unabhängige Mechanismen ausgeführt, was im Folgenden näher erläutert wird (G 1-5; C 1-10).

Bei der Pneumokokkenmeningitis wird die neuronale Apoptose im hippocampalen Gyrus dentatus zu einem wesentlichen Teil durch Caspase-3 vermittelt (G 2-3). Immunhistochemisch konnte mit einem spezifisch gegen die aktivierte Form der Caspase-3 gerichteten Antikörper eine selektive Färbung hippocampaler Neurone bereits 24 Stunden nach Induktion einer Pneumokokkenmeningitis gezeigt werden. Sowohl die Lokalisation als auch das zeitliche Auftreten dieser Caspase-3-positiven Neurone korrelierten mit dem Auftreten apoptotischer Zellen, welche zum Beispiel mittels der Hoechst-Kernfärbung oder der TUNEL (= terminal transferase mediated UTP nick end labeling) - Reaktion sichtbar gemacht wurden (Abbildung 6) (G 2-3).

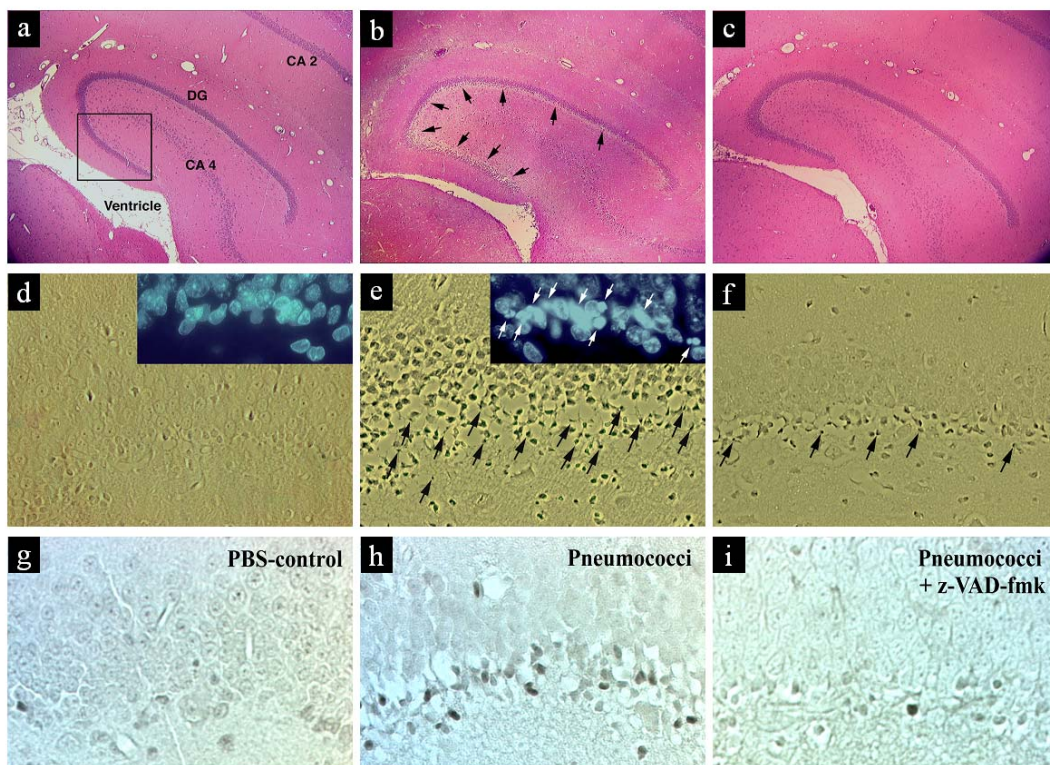


Abbildung 6: Induktion neuronaler Apoptose im Hippocampus und Neuroprotektion durch den Breitspektrum-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk nach 24-stündiger Pneumokokken-Meningitis. Hämatoxylin&Eosin- (a-c) und TUNEL-Färbung (d-f) sowie Immunhistochemie für aktive Caspase-3 (g-i).

2.1.2. Neuroprotektion durch Caspase-Inhibition

Die Aktivierung von Caspase-3 in hippocampalen Neuronen konnte durch die Applikation des Breitspektrum Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk (= N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone) unterdrückt werden. Vielmehr noch, die Therapie mit z-VAD-fmk - aber nicht mit dem inaktiven Kontroll-Inhibitor z-FA-fmk - führte zu einer 50-60%igen Reduktion der neuronalen Apoptose im Vergleich zur unbehandelten Pneumokokkenmeningitis (G 2-3) (Abbildungen 6 und 7).

Dieser neuroprotektive Effekt von z-VAD-fmk war nicht nur kurzfristig vorhanden, beruhte also nicht nur auf einer Verzögerung des Zelltodes, sondern konnte bei Tieren, welche nach 24 Stunden antibiotisch behandelt wurden und somit die Pneumokokkenmeningitis überleben konnten, auch noch nach 6 Tagen festgestellt werden. Dies weist darauf hin, daß durch Inhibition von Caspasen nicht nur eine Verzögerung des Zelltods sondern eine reale Zytoprotektion erreicht wird (G 2-3).

Zusammenfassend läßt sich somit feststellen, daß ein wesentlicher Teil des neuronalen Zelltodes bei der Pneumokokkenmeningitis durch Caspase-abhängige Apoptose vermittelt wird. Wodurch jedoch wird die Apoptose von Hippocampusneuronen bei der Pneumokokkenmeningitis ausgelöst?

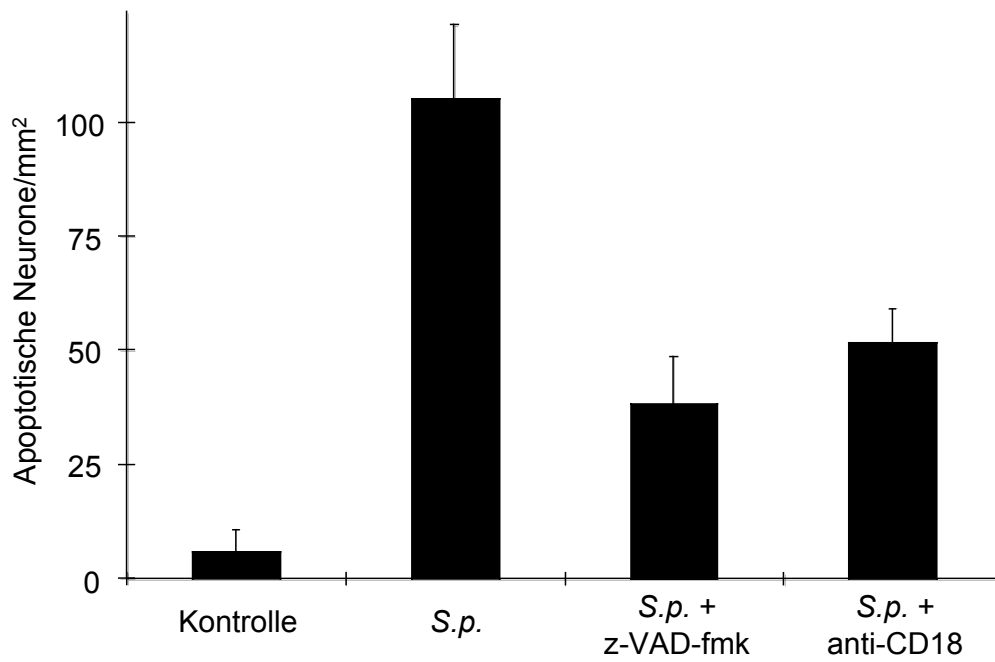


Abbildung 7: Caspasen und die Liquorleukozytose tragen zur neuronalen Apoptose bei. Sowohl der Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk als auch die Hemmung der Liquorleukozytose bewirkten eine massive Reduktion der neuronalen Apoptose im Hippocampus bei der *S. pneumoniae*-Meningitis.

2.1.3. Bedeutung der intrathekalen Entzündung für die neuronale Apoptose

Prinzipiell kommen multiple potentielle Auslöser der neuronalen Apoptose bei der Pneumokokkenmeningitis in Betracht: zum einen die massive Entzündungsantwort des Wirts, zum anderen direkte bakterielle Faktoren. Es ist schwierig, *in vivo* zwischen dem Beitrag der einzelnen Trigger am neuronalen Zelltod zu differenzieren. Neurotoxische inflammatorische Mediatoren des Wirts werden vor allem von den in den Liquorraum eingewanderten Leukozyten freigesetzt.

Ein erster Ansatz war es deshalb, die Liquorleukozytose durch anti-CD18 Antikörper zu blockieren. Die CD18 Familie der Leukozyten-Integrine vermittelt Adhärenz aktivierter Leukozyten an Endothelien und ihre Transmigration. Die intravenöse Applikation von anti-CD18 Antikörpern immobilisiert Leukozyten im vaskulären Kompartiment. Tiere, welche mit anti-CD18 Antikörpern behandelt wurden, hatten 86% weniger Liquor-Leukozyten als Kontroll-Tiere. Diese massive Reduktion der Liquorpleozytose hatte nahezu die gleichen neuroprotektiven Effekte wie z-VAD-fmk: ca 50% aller Neurone überlebten (Abbildung 7) (G 2).

Diese Experimente wiesen darauf hin, daß die zahlreich in den Liquorraum invadierenden Leukozyten und die intrathekale Inflammation wichtige - aber nicht alleinige - Trigger des neuronalen Zelltodes sind. Aus den *in vivo* - Blockierungsexperimenten ergab sich die Hypothese, daß inflammationsunabhängige bakterielle Faktoren ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Außerdem stellte sich die Frage nach den Mechanismen der Bakterien-induzierten Neurotoxizität und ob die Leukozyten-vermittelte Entzündung oder direkte Effekte von Pneumokokken die Caspasenaktivierung verursachen. Um diesen Fragen nachzugehen, verwendeten wir *in vitro* Zelltodassays, da sich damit die Trigger und Signaltransduktionswege im einzelnen identifizieren und differenzieren lassen.

2.1.4. Apoptose *in vitro* durch infizierten Liquor cerebrospinalis

Neuronaler Zelltod ließ sich *in vitro* durch infizierten Liquor cerebrospinalis (gewonnen von Tieren nach 24-stündiger Meningitis) reproduzieren. Entzündlich-infektiöser Liquor induzierte Apoptose in der humanen neuronalen Zelllinie HCN-II, welcher durch z-VAD-fmk (unterschiedliche Konzentrationen) überraschenderweise nicht verhindert werden konnte. Jedoch wirkte z-VAD-fmk deutlich neuroprotektiv, wenn aus dem Liquor vor der Inkubation die Bakterien entfernt wurden (Abbildung 8) (G 3-4).

Dies war ein erster wichtiger Hinweis darauf, daß Pneumokokken in der Lage sind, eine Caspase-unabhängige Apoptose zu initiieren, was durch weiterführende Versuche (siehe unten) untermauert werden konnte.

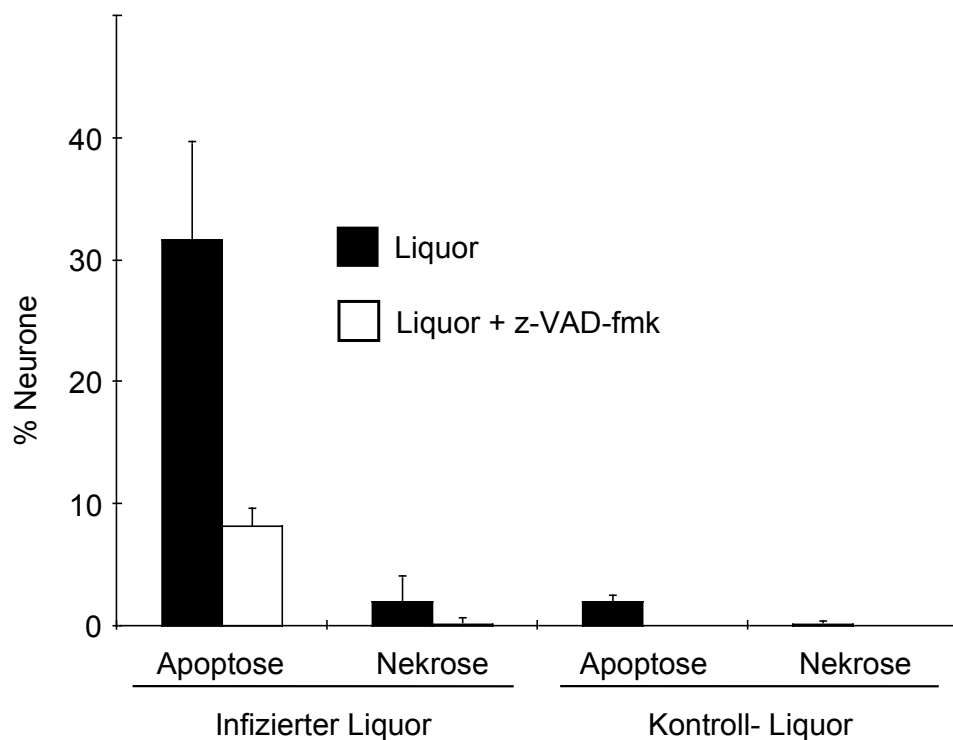


Abbildung 8: Infizierter Liquor cerebrospinalis induziert Apoptose *in vitro*. Der Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk bewirkte eine massive Reduktion dieser Apoptose.

2.2. Mechanismen des Pneumokokken-induzierten Zelltodes

2.2.1. Apoptose-Induktion durch Exposition mit Pneumokokken

Aus den *in vivo* Untersuchungen ergab sich die Hypothese, daß neben der Entzündungsreaktion auch Pneumokokken wesentlich zur Apoptose beitragen. Um dies weiter zu prüfen, wurden *in vitro* (und somit unter Ausschaltung des Einflusses der Leukozytose) Neurone und Mikroglia mit Pneumokokken inkubiert (C 1-10). Sowohl in einer humanen Neuronen- und Mikrogliazelllinie, als auch in primären Neuronen der Ratte und in primären gemischten Maushirnzellen induzierten Pneumokokken apoptotischen Zelltod (Abbildung 9). Pathophysiologisch relevante Konzentrationen von Pneumokokken induzierten nach 6 Stunden sämtliche morphologischen und biochemischen Kriterien der Apoptose (C 2-4). Morphologisch kam es zu einer ausgeprägten Verkleinerung und Kondensierung sowohl des Zellkerns als auch der Zelle insgesamt. Biochemisch kam es zur DNA-Fragmentierung, was durch eine positive TUNEL-Färbung nachgewiesen wurde. Außerdem translozierte Phosphatidylserin rasch von der Innen- an die Außenseite des Lipidbilayers der Zellmembran (C 5), was durch die Annexin V-Färbung gezeigt wurde (Abbildung 9).

Der Beginn der Apoptose war abhängig von der Konzentration der Bakterien und von der Zeit der Inkubation (C 3). 10^7 KBE (Kolonie-bildende Einheiten)/ml führten nach 9 Stunden zum Tod von ca. 80-90% der Zellen. Während Mikrogliazellen nahezu ausschließlich durch Apoptose starben, kam es bei der humanen neuronalen Zelllinie auch zum - allerdings maximal 25% - nekrotischen Zelltod. Bei den primären Neuronen der Ratte betrug der Anteil nekrotischer Zellen maximal 10%.

Hinsichtlich des zeitlichen Ablaufs der Apoptose trat als erstes die Translokation des Phosphatidylserins auf, dann kam es zur Verkleinerung der Zelle, schließlich wurden die Zellen TUNEL-positiv.

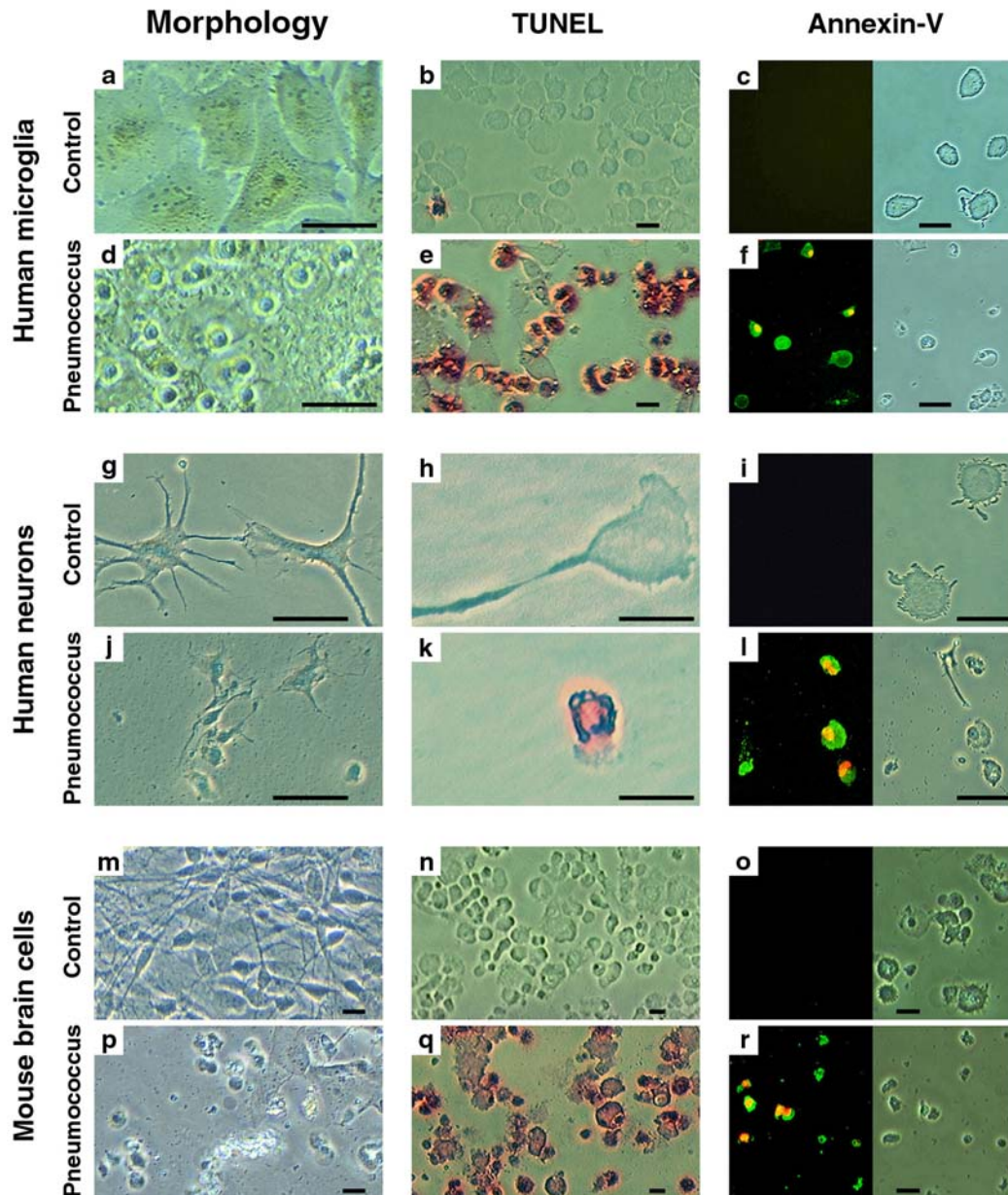


Abbildung 9: Die humane Mikroglia- (a-f) und humane Neuronen-Zelllinie (g-l) sowie Maushirnzellen („mixed brain cells“) (m-r) zeigten nach 6 Stunden Inkubation mit Pneumokokken (10^7 KBE/ml) die typischen Zeichen von Apoptose in der Lichtmikroskopie (d, j, p), im TUNEL- (e, k, q) und Annexin-V-Assay (f, l, r).

2.2.2. Pneumokokken induzieren Apoptose ohne Caspasenaktivierung

Nachdem (Abbildung 9) das pro-apoptotische Potential von Pneumokokken belegt war, folgten Untersuchungen über die Mechanismen des Pneumokokken-induzierten Zelltodes. Aus den Experimenten mit infiziertem Liquor (Seite 33) ergab sich initial die Frage nach der Caspasenaktivierung.

Apoptose wird klassischerweise - jedoch nicht immer - durch Caspasen ausgeführt. Pneumokokken jedoch induzierten *in vitro* Apoptose ohne Aktivierung von Caspasen (C 6) (Abbildung 10). Dies wurde durch verschiedene Methoden nachgewiesen: Western Blot, Caspasen-Aktivitätsbestimmungen und - Inhibitionstests. Als Positivkontrolle wurde Staurosporin verwendet, ein Inhibitor von Proteinkinasen, welcher oft als pharmakologischer Caspase-induzierender Apoptosetrigger verwendet wird.

Im Western-Blot konnte gezeigt werden, daß Staurosporin die Spaltung des Caspase-3-Substrats PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) in das 85 kd Fragment und der inaktiven Procaspasen zu den aktiven Caspasen bewirkt (gezeigt ist Caspase-3). Zelltod-induzierende Konzentrationen von Pneumokokken waren dazu nicht in der Lage (Abbildung 10 a).

Im Caspase-Aktivitätsassay wurde die Spaltung eines jeweils nicht-fluoreszierenden spezifischen Caspase-Substrats zu einem fluoreszierenden Produkt gemessen. Als Positiv-Kontrolle dienten Lysate von Staurosporin-behandelten Zellen. Hiermit konnte Caspasen-Aktivierung nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren Lysate von Pneumokokken-behandelten Neuronen und Mikrogliazellen nicht in der Lage, Substrate der Caspasen 1-10 zu spalten. Unter keiner der verschiedenen getesteten Bedingungen (unterschiedliche Bakterienkonzentrationen und Inkubationszeiten) kam es zur Caspasenaktivierung durch Pneumokokken (Abbildung 10 b).

Caspasen-Inhibitionstests unterstützten die im Western-Blot und in den Caspasen-Aktivitätsmessungen gewonnenen Ergebnisse. Der Breit-spektrum-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk verhinderte die durch Staurosporin, nicht jedoch die durch Pneumokokken induzierte Apoptose (Abbildung 10 c).

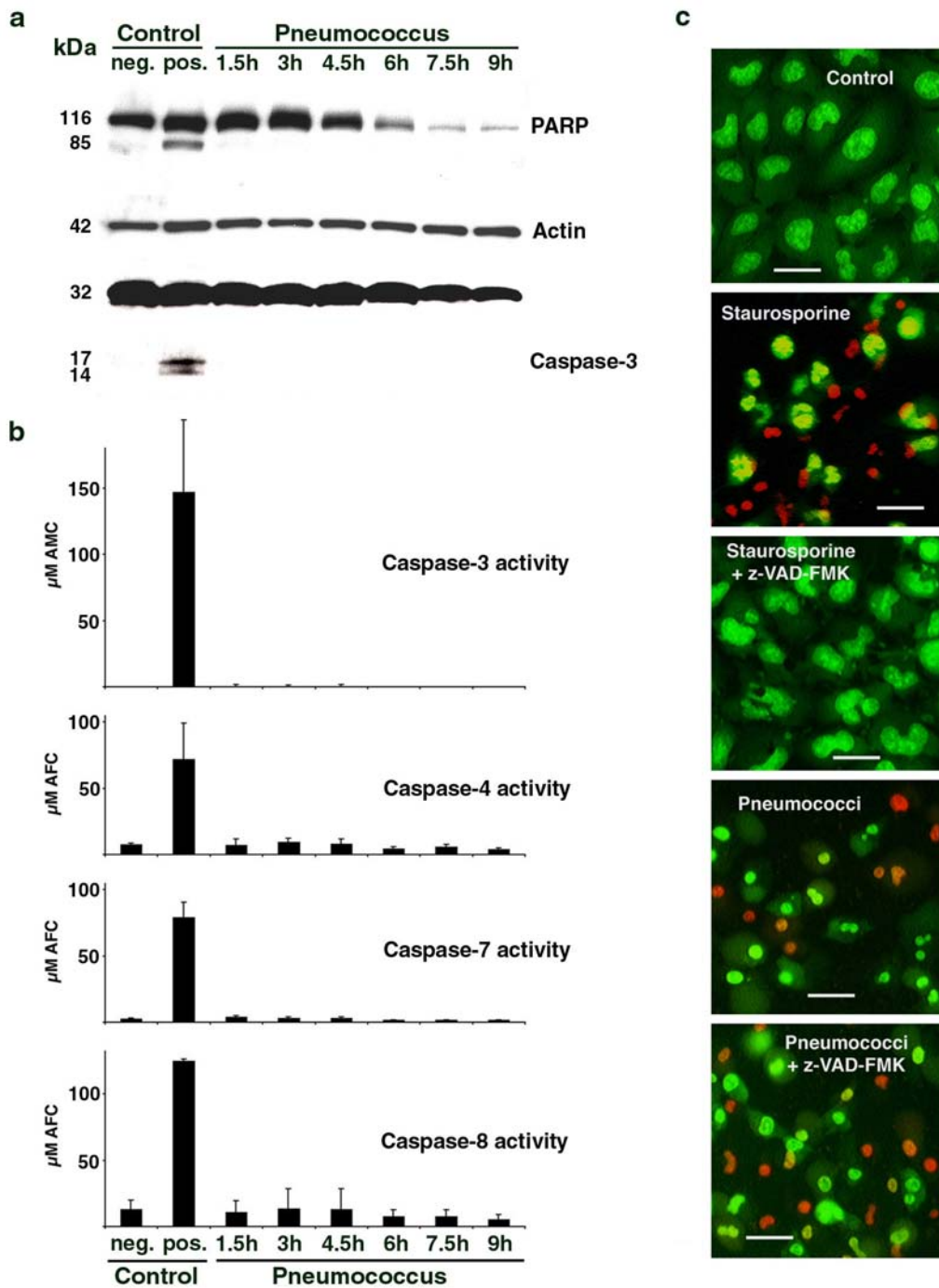


Abbildung 10: Die Pneumokokken-induzierte Apoptose ist Caspase-unabhängig. Im Western Blot (a) zeigten sich keine aktive Caspase-3 und keine Spaltung des Caspase-Substrates PARP. In den Aktivitätsassays (b) bewirkte Staurosporin (Positivkontrolle) - aber nicht *S. pneumoniae* - eine Caspasen-Aktivierung. Der Breitspektrum-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk verhinderte die Staurosporin-, aber nicht die Pneumokokken-induzierte Apoptose (c).

2.2.3. Pneumokokken schädigen Mitochondrien

Direkte Effekte von Pneumokokken induzieren offensichtlich Zelltod ohne Caspasenaktivierung. Somit stellte sich die Frage nach alternativen Zelltodwegen. Mitochondrien nehmen eine erst in den letzten Jahren erkannte essentielle Rolle bei der Apoptose ein. Außerdem kann Apoptose ohne Caspasen-Aktivierung durch Mitochondrienschädigung initiiert werden (Green and Reed, 1998).

Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials ist eine sensitive Methode, die mitochondriale Funktion zu untersuchen. MitroTracker ist ein fluoreszierender Farbstoff, dessen selektive Fluoreszenz ein intaktes mitochondriales Membranpotential anzeigt. Mit diesem Farbstoff konnte gezeigt werden, daß Pneumokokken massiv und sehr früh - bereits nach 45 Minuten, d.h. bevor morphologische Zeichen der Apoptose auftreten - das mitochondriale Membranpotential zerstören (Abbildung 11 a) (C 3 und 7).

Neben der funktionellen Störung zeigte sich ebenfalls sehr früh als Zeichen der Mitochondrienschädigung die Freisetzung pro-apoptotischer mitochondrialer Faktoren ins Zytosol, wie zum Beispiel von Zytochrom c oder AIF (Apoptose-induzierender Faktor). Dies konnte durch Immunfluoreszenz und Western-Blotting belegt werden. Immunzytochemisch zeigte sich bereits nach 1,5 Stunden eine Abnahme der mitochondrialen AIF-Fluoreszenz (Abbildung 11 b) sowohl in Mikroglia als auch in Neuronen. Um die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien zu untersuchen, wurde Zytochrom c mittels Western Blot in zytosolischen und mitochondrialen Zellfraktionen dargestellt. Dabei zeigte sich in Lysaten von Kontroll-Zellen eine deutliche Zytochrom c Bande in der mitochondrialen, jedoch keine in der zytosolischen Fraktion, was auf intakte Mitochondrien hinwies. Nach Behandlung mit Pneumokokken nahm - als Hinweis auf die mitochondriale Schädigung - das mitochondriale Zytocchrom c ab und war in der zytosolischen Fraktion nachweisbar (Abbildung 11 c).

Korrelierend mit der Zerstörung des mitochondrialen Membranpotentials und der Freisetzung von Zytochrom c und AIF aus den Mitochondrien kam es zu ultrastrukturellen Veränderungen der Mitochondrien. In der Transmissions-Elektronenmikroskopie zeigte sich zeitgleich dazu eine massive Schwellung der Mitochondrien (Abbildung 11 d). All diese Veränderungen traten auf bevor es zu den morphologischen Apoptosekriterien des Zellkerns kam.

Freisetzung von Zytochrom c aus Mitochondrien führt in vielen Apoptose-Modellen über die Bildung des sog. Apoptosoms zur Aktivierung von Procaspase-9, dann Procaspase-3 und der Caspase-Kaskade. Obwohl Pneumokokken die Freisetzung von Zytochrom c aus den Mitochondrien verursachen, kommt es in unserem Modell nicht zur Caspasen-Aktivierung. Weiterführende Experimente haben bislang noch keine aktive Protease wie zum Beispiel Calpain nachweisen können. Die sogenannte(n) Effektorprotease(n) der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose ist/sind bislang noch unbekannt.

Im nächsten Abschnitt wird auf mögliche Mediatoren der durch Pneumokokken induzierten frühen Mitochondrienschädigung eingegangen.

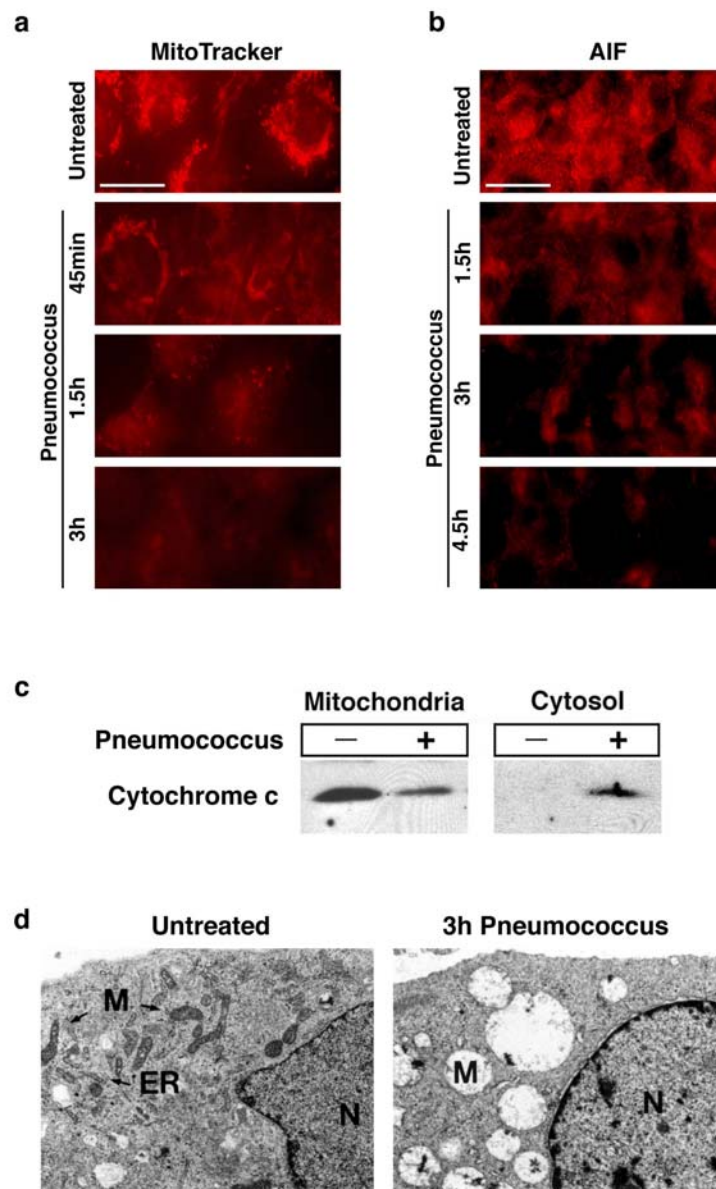


Abbildung 11: Pneumokokken bewirken eine frühe Zerstörung des mitochondrialen Membranpotentials (MitoTracker, a) und der Mitochondrien-Ultrastruktur (Transmissions-Elektronenmikroskopie, d) sowie die Freisetzung der pro-apoptischen mitochondrialen Faktoren AIF (Apoptose-induzierender Faktor) (Immunzytochemie, b) und Zytocrom c (Western Blot, c).

2.2.4. Kalzium und reaktive Sauerstoffradikale als Mediatoren

Influx von Kalzium oder Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Quellen kann Mitochondrien schädigen und ist ein potenter pro-apoptotischer Mediator in verschiedenen Zelltod-Modellen (Crompton, 1999; Lipton and Nicotera, 1998). Um Kalzium zu detektieren, benutzten wir Fluo-4, einen zellpermeablen farblosen Farbstoff, der fluoresziert, sobald er Kalzium bindet (Chambers et al., 1999). Bereits 45 Minuten nach der Exposition mit Pneumokokken konnte mittels Fluo-4 eine deutliche Zunahme von intrazellulärem Kalzium in Neuronen und Mikroglia detektiert werden, welches 3 Stunden lang massiv anstieg (Abbildung 12 b). Dieser Kalzium-Anstieg konnte mit dem zellpermeablen Kalzium-spezifischen Chelator BAPTA-AM (Kruman and Mattson, 1999) sehr gut blockiert werden (A 5-6).

Um zu klären, ob dieser intrazelluläre Kalziumanstieg pro-apoptotisch wirkt oder nur ein passiver Begleiteffekt der Apoptose ist, wurden Neurone oder Mikrogliazellen mit BAPTA-AM behandelt und mit Pneumokokken inkubiert. Im Vergleich zu Kontrollzellen waren BAPTA-AM-behandelte Zellen nach 6 Stunden nahezu resistent gegenüber der Pneumokokken-induzierten Apoptose (Abbildung 12 c). Dies wies auf eine aktive Rolle von Kalzium bei der Apoptose-Induktion hin.

Oxidierende Agentien sind dafür bekannt, Mitochondrien zu schädigen. Wir untersuchten daher, ob Pneumokokken einen Anstieg von intrazellulären Sauerstoffradikalen verursachen. Um Sauerstoffradikale nachzuweisen, benutzten wir den nicht fluoreszierenden Farbstoff Dihydrorhodamin 123 (DHR 123), welcher fluoresziert, sobald er intrazellulär durch Sauerstoffradikale zum kationischen Rhodamin 123 oxidiert wird (Kooy et al., 1994). Bereits nach 45 Minuten Inkubation mit Pneumokokken kam es zu einem deutlichen intrazytoplasmatischen Anstieg der Fluoreszenz auf das Doppelte, welche im Verlauf von 3 Stunden noch weiter zunahm (Abbildung 12 a).

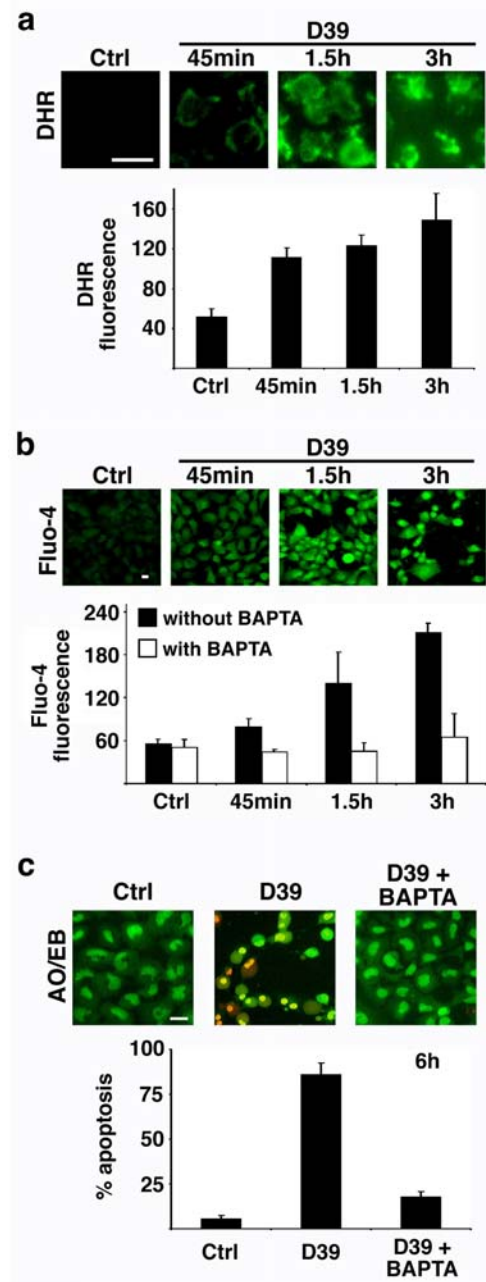


Abbildung 12: Pneumokokken (D39) führen rasch zu einer intrazellulären Zunahme von Sauerstoffradikalen (a) (gemessen mit DHR) und Kalzium (b) (gemessen mit Fluo-4). Der Kalzium-Chelator BAPTA blockierte den intrazellulären Kalzium-Anstieg (b) und die Pneumokokken-induzierte Apoptose (c).

Der intrazelluläre Anstieg von Kalzium und Sauerstoffradikalen geht den morphologischen Kriterien des apoptotischen Zelltodes voraus. Kalzium und Sauerstoffradikale sind wichtige intrazelluläre Mediatoren der Pneumokokken-induzierten Apoptose von Hirnzellen.

Die Pneumokokken-induzierte Apoptose kann also als eine durch Kalzium- und Sauerstoffradikale-vermittelte, Caspasen-unabhängige sog. Mitochondrioptose charakterisiert werden.

2.2.5. Apoptose-induzierender Faktor (AIF) als Effektorenzym

Bei der Suche nach Effektoren erwies sich der Apoptose-induzierende Faktor AIF als idealer Kandidat, da er Caspase-unabhängig Apoptose ausführen kann (Susin et al., 1999). Die Charakteristika der Pneumokokken-induzierten Apoptose erinnerten außerdem an Aspekte der AIF-vermittelten Apoptose, wie zum Beispiel die Chromatinkondensierung ohne ausgeprägte Fragmentierung.

Wie bereits erwähnt, bewirken Pneumokokken eine rasche Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien (Abbildung 11). Um festzustellen, ob dies nur ein passiver Begleiteffekt oder notwendig für die Pneumokokken-induzierte Apoptose ist, wurden Mikrogliazellen neutralisierende anti-AIF-Antikörper (Serum als Negativkontrolle) intrazytoplasmatisch injiziert und anschließend Pneumokokken exponiert. Dabei zeigte sich, daß die Apoptose in AIF-injizierten Zellen nach 4 Stunden 3-4-fach reduziert war (C 3 und 8). Weitere Belege der Rolle von AIF war der Nachweis von hypodiploiden Zellkernen mittels Durchflußzytometrie und der DNA-Fragmentierung in ca. 50 Kilobasen große Fragmente (C 8) - beides Kennzeichen der AIF-induzierten Apoptose.

In Abwesenheit der Entzündungsreaktion des Wirts wird also *in vitro* die Pneumokokken-induzierte Apoptose von der Endonuklease AIF und nicht von Caspasen ausgeführt.

Zusammenfassend verursacht *in vivo* die massive Leukozytose ca. 50% und die Caspasen-Aktivierung ca. 60% des neuronalen Zelltodes, während *in vitro* der intrazelluläre Anstieg von Kalzium und Sauerstoffradikalen, die Mitochondrienschädigung und AIF-Freisetzung den Zelltod vermitteln. Direkte

Effekte der Pneumokokken verursachen *in vitro* bei Abwesenheit der Leukozytose die Caspase-unabhängige, aber AIF-abhängige Komponente des Zelltodes. Unsere derzeitige Arbeitshypothese lautet, daß *in vivo* die massive Leukozytose die Caspasen-Aktivierung verursacht, während bakterielle Faktoren für den nicht durch Caspase-Inhibition verhinderbaren neuronalen Zelltod verantwortlich sind.

Im folgenden Abschnitt werden deshalb die bakteriellen Trigger der Apoptose und ihre Bedeutung *in vivo* näher untersucht.

2.3. Bakterielle Trigger des Zelltodes von Hirnzellen

2.3.1. Identifizierung pro-apoptotischer Pneumokokkenfaktoren

Die Bedeutung direkter bakterieller Faktoren konnte *in vitro* und *in vivo* eindeutig belegt werden, was in den folgenden Abschnitten gezeigt wird. *In vitro* wurden in Neuronen und Mikroglia bakterielle Auslöser der Apoptose identifiziert, welche sich auch *in vivo* bestätigten.

Die pathophysiologische Bedeutung mehrerer Pneumokokkenfaktoren ist gut erforscht (J 1-23). Am Beispiel der Pneumokokkenpneumonie ist die Rolle einiger Pneumokokkenfaktoren hinsichtlich Auslösung und Progression der Erkrankung bekannt. Es ist jedoch kaum bekannt, welche bakteriellen Faktoren für die Neurotoxizität bei der Pneumokokkenmeningitis verantwortlich sind. Für diese Analyse wurde die Apoptose-induzierende Aktivität einzelner Pathogenitätsfaktoren und Pneumokokkenmutanten mit definierten Defekten in spezifischen Pathogenitätsfaktoren untersucht.

Als erstes stellten wir uns die Frage, ob die bakteriellen Trigger der Apoptose sezerniert werden oder mit der Zelle, Zellwand oder Zelloberfläche der Pneumokokken assoziiert sind. Dabei testeten wir hitze-inaktivierte Pneumokokken und Zellwandpräparationen von Pneumokokken. Beides sind bestens bekannte, äußerst potente pro-inflammatorische Trigger. Weder hitze-inaktivierte Pneumokokken noch aufgereinigte Fragmente von Pneumokokkenzellwänden waren in der Lage - nach 12 Stunden Exposition - Apoptose auszulösen. Es gab auch keine

Unterschiede in der pro-apoptotischen Aktivität bekapselter und unbekapselter Pneumokokken. Daher schien die pro-apoptotische Aktivität von Pneumokokken durch sezernierte, hitzelabile Faktoren bedingt zu sein. Diese Hypothese wurde dadurch unterstützt, daß bakterielle Kulturüberstände in der Abwesenheit von Pneumokokken (Konzentrations- und Zeit-abhängig) rasch Apoptose auslösten (A 3).

Der/die pro-apoptotischen Pneumokokkenfaktor/en wurden folgendermaßen identifiziert (A 2-3): Pneumokokkenmutanten mit Defekten in spezifischen Virulenzfaktoren wurden im Vergleich mit Wildtyp-Pneumokokken auf eine Abnahme ihrer pro-apoptotischen Aktivität hin untersucht. Folgende Bakterienstämme und -mutanten wurden getestet: D39 Serotyp 2 bekapselte Pneumokokken, sein unbekapseltes Derivat R6 (Rockefeller Universität, New York, USA), die Pneumolysin-negative Mutante *plnA*⁻ (von Dr. D. Briles, University of Alabama, Birmingham, AL) (Berry et al., 1989), die Pyruvat Oxidase Mutante *spxB*⁻ defizient in der H₂O₂-Produktion (Spellerberg et al., 1996), die *plnA*⁻/*spxB*⁻ Doppelmutante (A 2), die Cholin-bindendes-Protein-A Mutante *cbpA*⁻ defizient in der Adhäsion (Rosenow et al., 1997), die Kompetenz- und DNA-Transformations-defiziente Mutante *comA*⁻ (Cheng et al., 1997), die IgA1 Protease Mutante *igaA*⁻ (Wani et al., 1996), die Mutante *zmpB*⁻ defizient in der Zink Metalloprotease (F 1-11), Mutanten mit Defekten im Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystem VncR/S (E 1-9) oder dem ABC-Transporter PsaA (K 1-12), und *lytA*⁻ (Tomasz et al., 1970) mit einem Defekt im Autolysin-Gen.

Das Ergebnis zahlreicher Zytotoxizitäts-Experimente war, daß all diese Mutanten das gleiche Potential für die Induktion von Apoptose hatten. Die Inaktivierung jeweils eines dieser bakteriellen Faktoren verhinderte nicht die Pneumokokken-induzierte Apoptose. Daraus leitete sich die Hypothese ab, daß es mehrere sezernierte Pneumokokkenfaktoren gibt, welche sich in ihrer Apoptose-induzierenden Eigenschaft ersetzen können. Ziel der folgenden Experimente war es demzufolge, mehrere potentielle Toxizitätsfaktoren zu inaktivieren (A 2-3).

Zunächst wurde Hydrogenperoxid, H₂O₂, in Überständen von Pneumokokkenkulturen durch das Antioxidans N-Acetyl Cystein (NAC) oder durch Katalase geblockt. H₂O₂ ist ein wichtiges Pneumokokkentoxin und zugleich ein wohl bekannter Apoptose-Induktor. Außerdem evaluierten wir die Apoptose-

Induktion durch *spxB*⁻, einer Pneumokokkenmutante mit einem Defekt in der H₂O₂-Produktion.

Weder durch die pharmakologische noch durch die genetische Inaktivierung von H₂O₂ konnte die Apoptoserate vermindert werden (Abbildung 13). In weiterführenden Experimenten wurde nun gleichzeitig H₂O₂ und jeweils ein weiteres Pneumokokkentoxin inaktiviert, indem wir Neurone und Mikroglia in der Gegenwart von NAC mit den oben genannten Mutanten inkubierten. Hierbei zeigte sich eine Abnahme nur bei einer einzigen Mutante, der Pneumolysin-negativen Mutante *plnA*⁻: Die Inkubation von Hirnzellen mit *plnA*⁻ in der Gegenwart von NAC (d.h. Pneumolysin und H₂O₂ inaktiviert) bewirkte eine massive Reduktion der Apoptose (Abbildung 13). Im Gegensatz dazu führte die Exposition von Neuronen oder Mikroglia mit *plnA*⁻ allein (d.h. nur Pneumolysin inaktiviert) oder mit Wildtyp-Pneumokokken und NAC (d.h. nur H₂O₂ inaktiviert) zur selben Apoptoserate wie die Wildtyp-Pneumokokken.

D.h. die Ausschaltung eines Toxins (Pneumolysin oder H₂O₂) bewirkt keine Reduktion des Zelltodes; es müssen beide Pneumokokkentoxine - Pneumolysin und H₂O₂ - gleichzeitig inaktiviert werden, um eine signifikante Zytoprotektion zu erreichen (A 3-4). Sowohl die Rate der Apoptose als auch das Ausmaß der Mitochondrienschädigung in der Elektronenmikroskopie war bei der Inkubation mit *plnA*⁻ in der Gegenwart von NAC (d.h. Pneumolysin und H₂O₂ inaktiviert) deutlich reduziert (Abbildung 14). Daraufhin wurde die Doppelmutante *plnA*⁻/*spxB*⁻ mit defekter Pneumolysin- und H₂O₂-Produktion hergestellt. Diese Mutante zeigte auch - wie erwartet - eine deutlich reduzierte pro-apoptotische Aktivität (Abbildung 13).

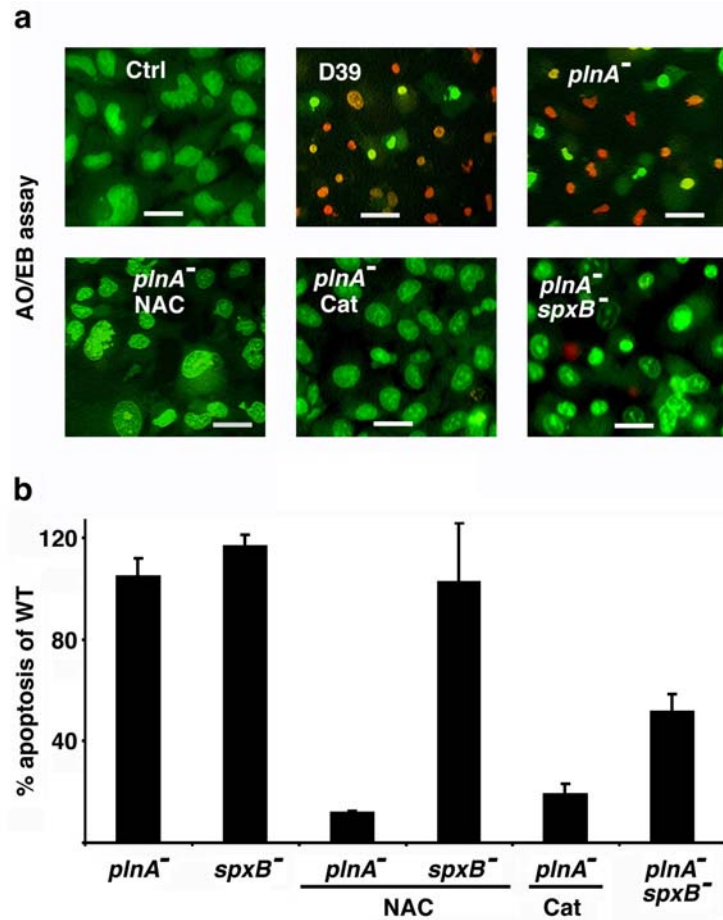


Abbildung 13: Zwei Pneumokokkentoxine (Pneumolysin und H₂O₂) sind die Haupttrigger der Pneumokokken-induzierten Apoptose *in vitro*. Im Vergleich zum Wildtyp *S. pneumoniae* D39 zeigten die Pneumolysin-H₂O₂-Doppelmutante (*plnA*⁻/*spxB*⁻) oder die Pneumolysin-Mutante (*plnA*⁻) in der Gegenwart von Antioxidantien (NAC = N-Acetyl Cystein oder Cat = Katalase) im Acridin Orange (AO) / Ethidium Bromid (EB) Assay eine deutliche Reduktion der Apoptose-Rate.

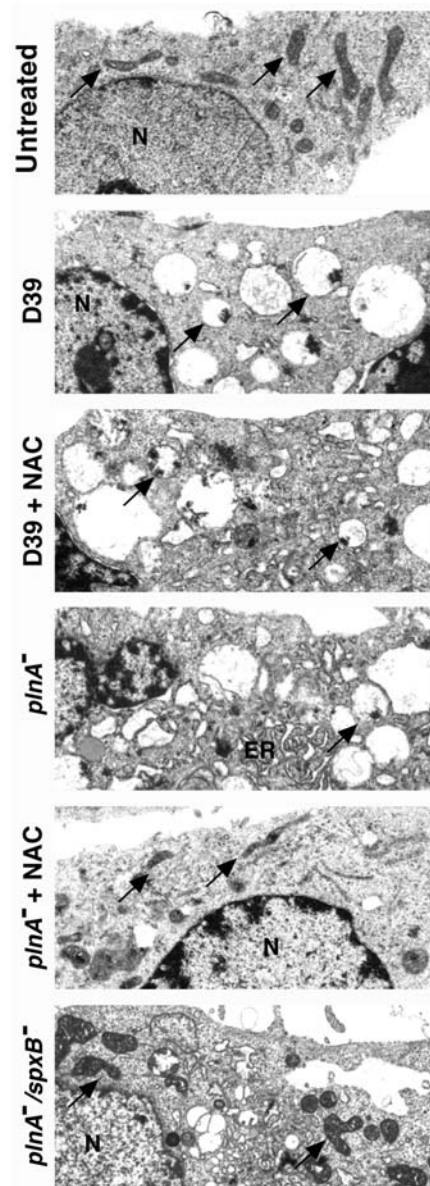


Abbildung 14: Zwei Pneumokokkentoxine sind die Haupttrigger der Pneumokokken-induzierten Mitochondrienschädigung. Im Vergleich zum Wildtyp D39 verursachten die Pneumolysin-H₂O₂-Doppelmutante *plnA*⁻/*spxB*⁻ oder die Pneumolysin-Mutante *plnA*⁻ in der Gegenwart des Antioxidans N-Acetyl Cystein (NAC) eine im Transmissions-Elektronenmikroskop erkennbare, deutlich geringere Mitochondrienschädigung (Pfeile).

2.3.2. Pneumolysin und Hydrogenperoxid H₂O₂

Um positiv zu bestätigen, daß Pneumolysin oder H₂O₂ allein als Apoptose-Trigger ausreichen und sich gegenseitig ersetzen können, wurden Neurone und Mikroglia mit rekombinant hergestelltem Pneumolysin (0,1 - 10 µg/ml) (H 2) oder mit H₂O₂ (2 - 2000 µM) inkubiert, wobei die *in vivo* vorkommenden Konzentrationen dieser Toxine innerhalb der in den Versuchen verwendeten Konzentrationsbereiche lagen. Zelltod wurde gemessen mit dem AO/EB-Assay (Abbildung 15), dem LDH-Assay, mit TUNEL, Annexin-V, Licht- und Elektronenmikroskopie. Kinetik und Morphologie der durch diese Toxine induzierten Apoptose entsprachen der von lebenden Pneumokokken (A 5).

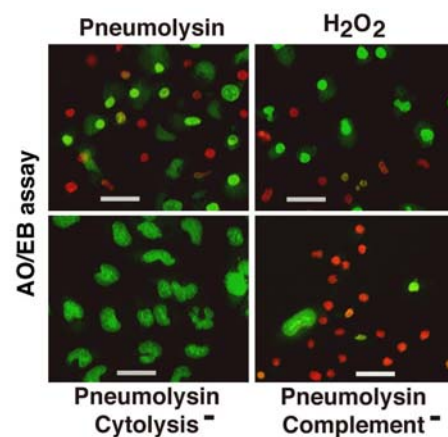


Abbildung 15: Pneumolysin und H₂O₂ induzierten Apoptose in Mikroglia (gezeigt ist der AO/EB-Assay) und Neuronen. Die Komplement-defiziente Pneumolysin-Mutante zeigte keine Reduktion in ihrer Apoptose-induzierenden Aktivität, während die Zytolyse-defiziente Pneumolysin-Mutante nicht mehr in der Lage war, Apoptose oder Zelltod überhaupt auszulösen.

2.3.3. Todesdomäne von Pneumolysin

Pneumolysin ist ein gut charakterisiertes Pneumokokkentoxin mit mehreren Aktivitäten (Mitchell and Andrew, 1997), welche unter anderem Komplement-Aktivierung, pro-inflammatorische Eigenschaften und die Bildung von Poren umfassen. Mit Pneumolysin-Mutanten wollten wir die Frage klären, ob die sog. Todesdomäne von Pneumolysin mit einer seiner bekannten Aktivitäten assoziiert ist, oder ob es sich um eine neue unbekannte Aktivitätsdomäne handelt. Dazu wurde die pro-apoptotische Aktivität von Wildtyp-Pneumolysin mit der von Pneumolysin-Mutanten verglichen, welche spezifische Defizienzen in ihrer Komplement-aktivierenden oder Poren-bildenden Eigenschaft aufwiesen. Dabei zeigte sich, daß Pneumolysin-Mutanten mit einem Defekt in der Poren-bildenden Aktivität keine Apoptose auslösten. Im Gegensatz dazu induzierten jedoch Pneumolysin-Mutanten mit einem Defekt in der Komplement-Aktivierung genau so potent Apoptose wie das Wildtyp-Pneumolysin (Abbildung 15). Dies wies darauf hin, daß die Poren-bildende Aktivität von Pneumolysin für die Induktion der Apoptose notwendig ist (A 5).

2.3.4. Mitochondrientoxin Pneumolysin

Pneumolysin ist also eine wesentliche Determinante der Pneumokokken-induzierten Apoptose. Somit stellte sich nun die Frage, ob Pneumolysin ebenfalls für die durch Pneumokokken ausgelöste frühe Mitochondrienschädigung verantwortlich ist.

Pneumolysin verursacht einen frühen Anstieg von intrazellulärem Kalzium (Abbildung 16). Um zu untersuchen, ob Pneumolysin auch die frühe Mitochondrienschädigung mit subsequenter Freisetzung pro-apoptotischer mitochondrialer Faktoren verursacht, wurden Neurone und Mikroglia diesem Toxin exponiert. Lebende Pneumokokken, Kulturüberstände von Pneumokokken und ebenso Pneumolysin induzierten rasch eine Schädigung von Mitochondrien mit immunzytochemisch und im Western Blot nachgewiesener Freisetzung von Zytocrom c und AIF (Abbildung 16).

Die Pneumolysin-Punktmutante mit defekter Komplement-Aktivierung war ebenso wie Wildtyp-Pneumolysin in der Lage, AIF aus Mitochondrien freizusetzen. Die Pneumolysin-Mutante mit defekter Porenbildung war dazu nicht in der Lage, was somit ihre fehlende pro-apoptotische Aktivität erklärt.

Weiterhin gelang es, die Pneumolysin-induzierte AIF-Freisetzung durch BAPTA-AM zu verhindern, was darauf hinwies, daß die Pneumolysin-induzierte AIF-Freisetzung und Apoptose durch Kalzium mediiert werden (Abbildung 16) (A 6).

Somit spiegelt Pneumolysin die Schlüsselmechanismen der Pneumokokken-induzierten Zytotoxizität wider.

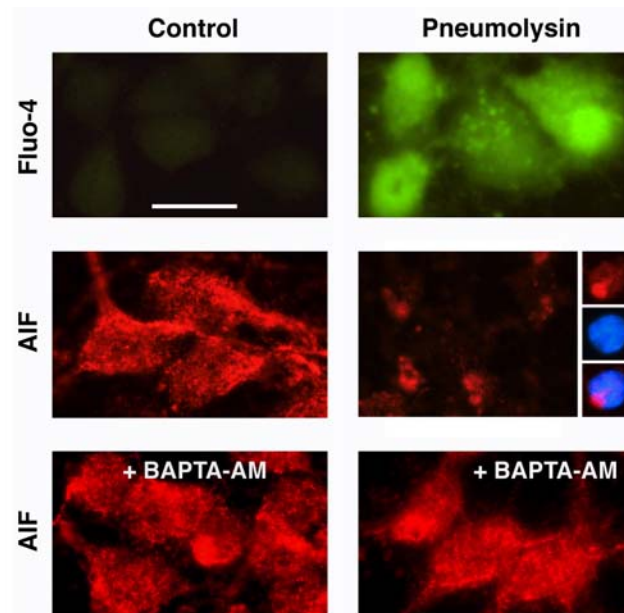


Abbildung 16: Pneumolysin induzierte einen Anstieg des intraneuronalen Kalziums (grün, gemessen mit Fluo-4) sowie die Freisetzung und mitochondrio-nukleäre Translokation von AIF (rot, Immunzytochemie, Zellkerne blau). Der Kalzium-Chelator BAPTA-AM verhinderte dies sehr effektiv.

2.3.5. Trigger der Inflammation durch Pneumolysin

Pneumolysin ist nicht nur ein Zytotoxin, es wirkt auch pro-inflammatorisch. So stimuliert Pneumolysin beispielsweise die Produktion von TNF- α und IL-1 β in Makrophagen (Houldsworth et al., 1994).

Pneumolysin spielt eine wichtige Rolle bei der NO-Produktion: Die Pneumolysin-defiziente Pneumokokkenmutante ist nicht mehr in der Lage NO in Makrophagen zu induzieren, während das aufgereinigte Pneumolysin ein potenter NO-Induktor ist (H 1-7). Der IFN- γ -Rezeptor war essentiell für die Pneumolysin-induzierte NO-Produktion. In Makrophagen ohne diesen Rezeptor oder den Interferon-Regulations-Faktor 1 (IRF-1) - einen für die iNOS Expression wichtigen Transkriptionsfaktor - konnte Pneumolysin keine NO-Produktion mehr induzieren (H 5). Auch Hämolysine anderer Bakterien sind in der Lage NO in Makrophagen zu induzieren (D 1-8).

Außerdem konnten gezeigt werden, daß durch Pneumolysin neben TNF- α auch IL-6 und COX-2 - ein wichtiges Enzym der Prostaglandin-Synthese - induziert wird (H 5-6).

Zusammengefaßt wirkt Pneumolysin nicht nur direkt toxisch auf Neurone; es trägt wahrscheinlich durch seine potenten pro-inflammatorischen Effekte zusätzlich indirekt zur neuronalen Schädigung bei.

2.3.6. Pneumokokkentrigger der Apoptose *in vivo*

Schließlich stellte sich die Frage nach der *in vivo*-Relevanz: Spielen die *in vitro* identifizierten pro-apoptischen bakteriellen Trigger eine Rolle bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis?

Die intrazisternale Inokulation von 10^4 Kolonie-bildenden Einheiten Pneumokokken löste konstant eine Meningitis aus mit einer bereits nach 24 Stunden nachweisbaren massiven Entzündungsreaktion im Liquor cerebrospinalis und Apoptose von hippocampalen Neuronen.

Wurde die Meningitis durch die H₂O₂-defiziente Mutante *spxB*⁻ oder durch die Pneumolysin-defiziente Mutante *plnA*⁻ ausgelöst, war die hippocampale Apoptose nicht bzw. nur diskret vermindert. Die Behandlung von *plnA*⁻-infizierten Tieren mit NAC oder Katalase bewirkte jedoch - wie *in vitro* - eine massive Reduktion der Apoptoserate um ca. 70% (A 6-7). In all unseren Experimenten konnte durch die gleichzeitige Blockade von Pneumolysin und H₂O₂ (welches sowohl vom Wirt als auch von Pneumokokken produziert wird) die beste Neuroprotektion erzielt werden (Abbildung 17 a). Durch die Doppelmutante *plnA*⁻/*spxB*⁻ (defizient in der Produktion von Pneumolysin und H₂O₂) konnte im Vergleich zum Wildtyp D39 ebenfalls eine deutliche Neuroprotektion erreicht werden. Diese war jedoch nicht so effektiv wie im Falle der Infektion mit *plnA*⁻ und Therapie mit NAC, was darauf hinweist, daß auch das vom Wirt produzierte und durch NAC blockierte H₂O₂ zur Apoptose hippocampaler Neurone beiträgt.

Pneumolysin wird am ehesten durch Diffusion und den sogenannten paravaskulären Flüssigkeitstransport von den Seitenventrikeln zu den hippocampalen Neuronen transportiert (Rennels et al., 1990) und entfaltet dort seine pro-apoptotische Wirkung. Es konnte gezeigt werden, daß Pneumolysin direkt mit hippocampalen apoptotischen Neuronen in Kontakt kommt. In der Immunhistochemie konnten diese Neurone selektiv mit einem Antikörper gegen Pneumolysin angefärbt werden (Abbildung 17 b).

Diese *in vivo* Experimente belegten somit, daß neuronale Apoptose im Hippocampus nicht nur durch die Liquorleukozytose und inflammatorische Mediatoren, sondern auch zu einem wesentlichen Anteil durch direkte bakterielle Toxine bedingt ist. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß bakterielle Faktoren als direkte Zytotoxine wirken (Beispiel Pneumolysin), indirekt über die Induktion einer Entzündung neurotoxisch wirken (Beispiel Zellwandbestandteile oder auch Pneumolysin) oder selbst Bestandteilen der Entzündungsantwort des Wirtes entsprechen (H₂O₂) können.

Die pro-apoptotische Aktivität von Pneumolysin ist auch auf andere Hämolyse und andere Krankheitsmodelle übertragbar. So konnte gezeigt werden, daß das Hämolyse von Gruppe B Streptokokken Apoptose von Hepatozyten bei der experimentellen Sepsis triggert (B 1-9).

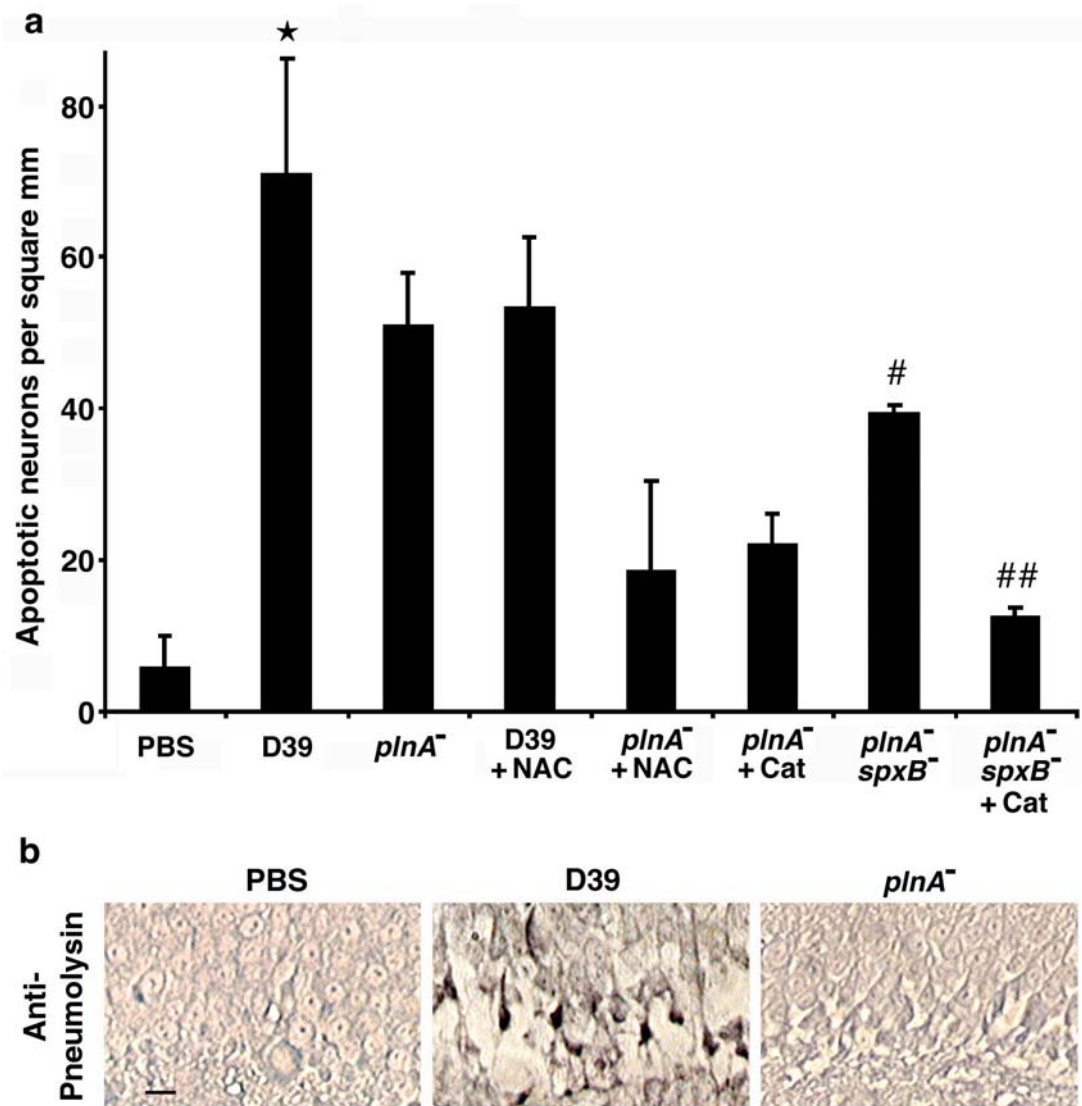


Abbildung 17: Zwei Pneumokokkentoxine sind die Haupttrigger der Pneumokokken-induzierten neuronalen Apoptose *in vivo*. Im Vergleich zum Wildtyp *S. pneumoniae* verursachen die Pneumolysin-H₂O₂-Doppelmutante (*plnA*⁻/*spxB*⁻) und die Pneumolysin-Mutante (*plnA*⁻) in der Gegenwart von Antioxidantien (NAC = N-Acetyl Cystein oder Cat = Katalase) einen deutlich geringeren neuronalen Schaden (a). Immunhistochemische Färbung mit einem anti-Pneumolysin-Antikörper detektierte an Hippocampusneurone gebundenes Pneumolysin (b).

3. Zusammenfassung der eigenen Forschungsergebnisse

3.1. Neuronaler Schaden und dessen Protektion bei der Meningitis

In einem *in vivo* Model der Pneumokokkenmeningitis konnte neuronale Apoptose im Hippocampus nachgewiesen werden, welche zu einem wesentlichen Teil durch Caspase-3 vermittelt wurde. Das Absterben der Hippocampusneurone wurde sowohl durch einen Breitspektrum-Caspase-Inhibitor als auch durch Hemmung der intrathekalen Entzündung langfristig und signifikant reduziert. Jedoch konnte durch beide Therapiestrategien jeweils nur eine ca. 50%ige Neuroprotektion erreicht werden, was als ein erster wichtiger Hinweis auf Caspase- und Entzündungs-unabhängige Zelltodmechanismen und -trigger bei der Pneumokokkenmeningitis interpretiert wurde. Deshalb wurden die Mechanismen und Trigger des durch direkte Effekte des Erregers induzierten Zelltodes im Zellkulturmodell weiter untersucht. Voraussetzung dafür war, daß die *in vivo* beobachtete neuronale Apoptose *in vitro* nachvollzogen werden konnte und zwar sowohl durch infizierten Liquor als auch durch lebende Pneumokokken (G 1-5).

3.2. Mechanismen des Pneumokokken-induzierten Zelltodes

Weiterführende Untersuchungen bewiesen eine essentielle Rolle bakterieller Faktoren für die neuronale Apoptose sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Lebende Pneumokokken induzierten Apoptose *in vitro*. Im Gegensatz zu den *in vivo* Experimenten unterbleibt jedoch *in vitro* - bei Abwesenheit von Entzündungszellen - jegliche Caspasenaktivierung. Vielmehr kommt es *in vitro* durch direkte bakterielle Faktoren zu einer sehr frühen Mitochondrienschädigung vermittelt durch einen raschen intrazellulären Anstieg von Kalzium und reaktiven Sauerstoffradikalen. Geschädigte Mitochondrien setzen den Apoptose-induzierenden Faktor AIF frei, welcher nach nukleärer Translokation zur Apoptose führt.

Die Pneumokokken-induzierte Apoptose war durch intrazytoplasmatische Injektion von anti-AIF Antikörpern blockierbar. Diese Resultate wiesen auf eine essentielle Rolle der Mitochondrienschädigung und AIF-Freisetzung bei der Pneumokokken-induzierten Apoptose hin (C 1-10).

3.3. Apoptose-Trigger der Pneumokokken

Ursachen neuronaler Schädigung bei der Pneumokokkenmeningitis sind nicht nur die überschießende Entzündungsantwort des Wirts sondern auch bakterielle Faktoren der Pneumokokken. Zwei Schlüsseltoxine als hauptsächliche Trigger neuronaler Apoptose konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* identifiziert werden: Pneumolysin und H₂O₂ (Abbildung 18 und 19). Pneumolysin verursachte einen raschen Anstieg von intrazellulärem Kalzium, eine rasche Zerstörung von Mitochondrien und eine damit einhergehende Freisetzung und mitochondrienukleäre Translokation von AIF (A 1-9). Pneumolysin spiegelt somit die Schlüsselmechanismen der Pneumokokken-induzierten Apoptose wider.

In den Abbildungen 18 und 19 ist unser bisher erarbeitetes Modell der Pneumokokken-induzierten neuronalen Schädigung kurz zusammengefaßt.

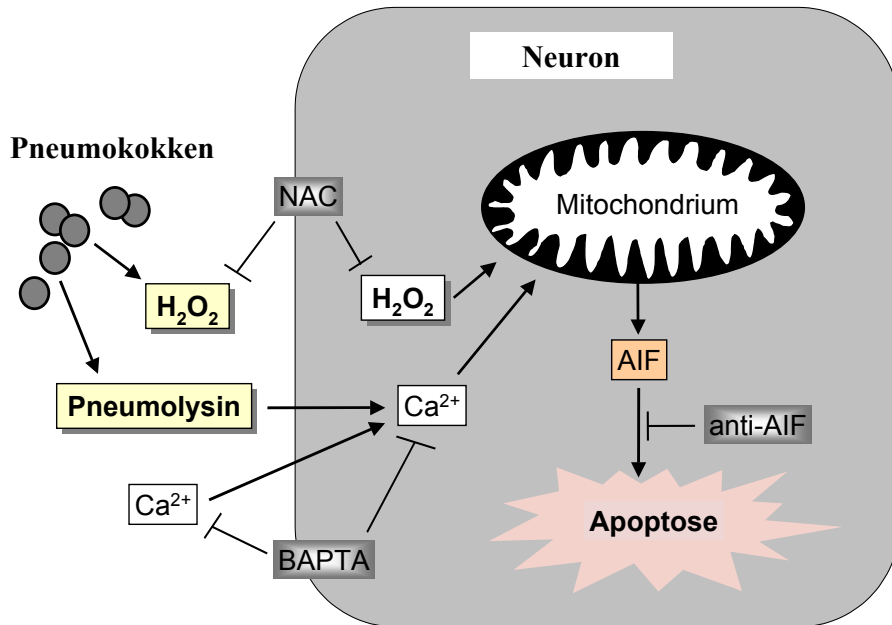


Abbildung 18: Zwei bakterielle Toxine als Haupttrigger der Pneumokokken-induzierten Apoptose *in vitro*. Von Pneumokokken produziertes H_2O_2 kann direkt über die neuronale Zellmembran diffundieren und Mitochondrien schädigen. Pneumolysin führt über seine Poren-bildende Aktivität zum Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} und ebenfalls zu einer Mitochondrienschädigung. Pneumokokken verursachen somit die Schädigung von Mitochondrien mit konsekutiver Freisetzung und mitochondrio-nukleärer Translokation von mitochondrialem Apoptose-induzierendem Faktor AIF und eine AIF-abhängige Apoptose.

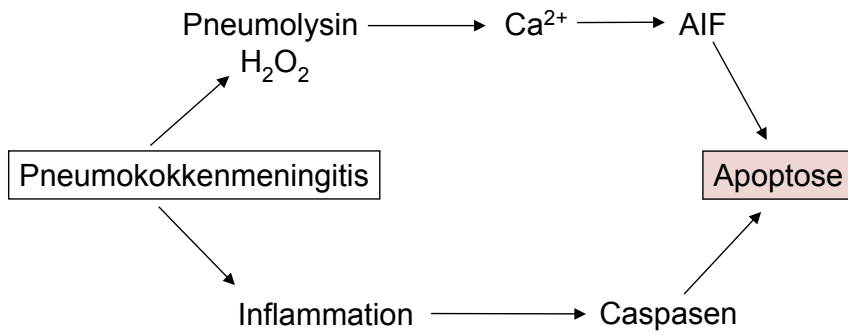


Abbildung 19: *In vivo* kommt es bei der Pneumokokkenmeningitis zu einer Caspasen-abhängigen Apoptose, welche *in vitro* bei Abwesenheit von Entzündungszellen unterbleibt. Vielmehr kommt es *in vitro* zu einer AIF-abhängigen Apoptose.

4. Ausblick

Ziel der Untersuchung der bakteriellen Trigger, Signaltransduktionwege und Mechanismen des Pneumokokken-induzierten Zelltodes ist es, effiziente Möglichkeiten der Neuroprotektion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu finden. Mittels bakterieller Knockout-Mutanten und einzelner bakterieller Toxine konnten - wie oben ausgeführt - zwei bakterielle Trigger neuronaler Apoptose identifiziert werden. Die Rolle der Mitochondrienschädigung, Caspasenaktivierung und AIF-Translokation wurden erläutert. Diese Ergebnisse könnten sogenannte Targets zukünftiger neuroprotektiver Therapieansätze bei der bakteriellen Meningitis darstellen.

Die Bedeutung vieler *in vitro* durch direkte bakterielle Effekte und Toxine, wie beispielsweise Pneumolysin, ausgelösten Signaltransduktionswege sind *in vivo* noch nicht erforscht. Es ist geplant, die Mitochondrienschädigung und die AIF-Freisetzung auch im Tierversuch zu untersuchen. Ebenso sollen - auch mit Hilfe von Knockoutmäusen - die Mechanismen der neuronalen Schädigung weiter aufgeklärt werden.

Nach der kompletten Sequenzierung des Genoms der Serotypen 2 (Hoskins et al., 2001) und 4 (Tettelin et al., 2001) Isolate von *Streptococcus pneumoniae* im Jahr 2001 sind neue Impulse für die Entdeckung der Mechanismen der Antibiotika-Resistenz sowie der Identifizierung noch unbekannter Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren zu erwarten. Der erfolgversprechendste Ansatz ist natürlich die Verhinderung der Pneumokokkenmeningitis durch eine effektive Vakzinierung. Die Entschlüsselung des Genoms der Pneumokokken läßt die Entwicklung eines effektiven Impfstoffs erhoffen.

Es sind bereits mehrere experimentelle neuroprotektive Therapieansätze bei bakteriellen Meningitiden publiziert. Keiner ist bislang über das tierexperimentelle Stadium hinaus gekommen. Diese Therapieansätze betreffen meist die Inhibition bzw. Inaktivierung von inflammatorischen Faktoren und Signaltransduktionswegen des Wirts, wie zum Beispiel die Blockade der Leukozyteninvasion durch anti-CD 18 (Tuomanen et al., 1989) oder anti-ICAM-1 Antikörper (Weber et al., 1995), Fucoidin (Angstwurm et al., 1995), Heparin (Weber et al., 1997) oder durch Hypothermie (Angstwurm et al., 2000), die Zytokin-Neutralisation (Bogdan et al.,

1997), die Inhibition von Endothelin (Pfister et al., 2000), die Inhibition von Matrixmetalloproteasen (Leib et al., 2000), die Inaktivierung von Radikalen (Koedel and Pfister, 1997), Glutamat-Antagonismus (Leib et al., 1996) und die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Koedel et al., 2000) (siehe auch Einleitung oben). Eine der zukünftigen Herausforderungen wird es sein, die sog. Schlüsselinduktoren des neuronalen Zelltodes zu identifizieren und festzustellen, durch welche Kombinationstherapie maximale Neuroprotektion erzielt werden kann. Erste Ergebnisse von experimentellen Kombinationstherapien sind bereits publiziert, zum Beispiel die gemeinsame Inhibition von Matrixmetalloproteasen und dem sog. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) "converting enzyme" (TACE) im Neugeborenen-Ratten-Modell der Pneumokokkenmeningitis (Leib et al., 2001).

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß der Blockade bakterieller Toxine eine zumindest ebenso wichtige neuroprotektive Rolle zukommt. Fernziel ist es, durch die Kombination verschiedener Therapieansätze den neuronalen Zelltod bei der bakteriellen Meningitis völlig zu blockieren. Die gemeinsame Inaktivierung/Blockierung bakterieller Toxine und der überschießenden Immunantwort dürfte schon deshalb eine erfolgversprechende adjuvante Therapiekombination sein, da sie in den Beginn der Schadenskaskade eingreift. Ein anderer aus den obigen Ergebnissen resultierender Ansatz könnte folgende Kombinationstherapie sein: Blockierung bakterieller Toxine + Inhibition von Caspasen + Mitochondrienprotektion. In Zukunft dürfte der Toxinnachweis im Liquor cerebrospinalis an Bedeutung gewinnen, da dadurch einerseits die Diagnostik beschleunigt und andererseits wichtige Ansätze für die Therapie gewonnen werden können.

5. Danksagungen

Diese Habilitationsschrift konnte nur durch die Mithilfe der Koautoren der genannten Publikationen und Kollaborationspartner entstehen. Ihnen sei an erster Stelle gedankt für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Professor Wolfgang Zenker, emeritierter Direktor des Anatomischen Institutes der Universität Zürich, Schweiz, - mein Doktorvater und Mentor - war der entscheidende Impuls für meinen Weg in die Forschung. Bei ihm erlernte ich die Basis meines wissenschaftlichen Arbeitens, die Neuro(immun)histologie, immun- und enzymhistochemische Techniken, die Welt der Ultrastruktur durch Transmissions- und Elektronenmikroskopie.

Professor Elaine Tuomanen war die Betreuerin meines "post-doc"-Forschungsaufenthalts in den USA. Ihr danke ich für die herzliche Aufnahme und 3-jährige Unterstützung zuerst in New York, dann in Memphis. In ihrem Labor habe ich mir unter anderem die Mikrobiologie von *S. pneumoniae*, Apoptose-Assays sowie *in vivo* und *in vitro* Techniken aneignen können. Elaine hatte ständig ein offenes Ohr für meine Fragen und gab mir die Freiheit, meine eigene Forschung durchzuführen.

Professor Jörg Weber danke ich, mich nach meinem "post-doc" nach Berlin geholt zu haben. Den Professoren Jörg Weber, Ulrich Dirnagl und Karl-Max Einhäupl sei dafür gedankt, daß ich im Labor für Experimentelle Neurologie der Charité exzellente Voraussetzungen fand, meine Experimente ununterbrochen weiterzuführen. Hier kann ich mein Ideal - als Kliniker forschen und als Forscher klinisch zu arbeiten - verwirklichen.

Danken möchte ich nicht zuletzt den Mitarbeitern im Labor für Experimentelle Neurologie, Dr. Dorette Freyer, Annett Halle, Daniela Bermpohl, Miriam Schickhaus, Christian Schwarzbach, Renate Gusinda und allen anderen, die mir geholfen haben.

Meine Forschungen wurden bzw. werden finanziert von der Hartmann-Müller-Stiftung der Universität Zürich, Schweiz, der Meningitis Research Foundation, England, und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 507 der Humboldt Universität Berlin).

6. Literatur

- AlonsoDeVelasco, E., Verheul, A. F. M., Verhoef, J., and Snippe, H. (1995). Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbial. Rev.* 59, 591-603.
- Angstwurm, K., Freyer, D., Dirnagl, U., Hanisch, U. K., Schumann, R. R., Einhüpl, K. M., and Weber, J. R. (1998). Tumour necrosis factor alpha induces only minor inflammatory changes in the central nervous system, but augments experimental meningitis. *Neuroscience* 86, 627-634.
- Angstwurm, K., Reuss, S., Freyer, D., Arnold, G., Dirnagl, U., Schumann, R. R., and Weber, J. R. (2000). Induced hypothermia in experimental pneumococcal meningitis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 834-838.
- Angstwurm, K., Weber, J. R., Segert, A., Burger, W., Weih, M., Freyer, D., Einhüpl, K. M., and Dirnagl, U. (1995). Fucoidin, a polysaccharide inhibiting leukocyte rolling, attenuates inflammatory responses in experimental pneumococcal meningitis in rats. *Neurosci. Lett.* 191, 1-4.
- Avery, O. T., and Morgan, H. J. (1924). The occurrence of peroxide in cultures of pneumococcus. *J. Exp. Med.* 39, 275-288.
- Berry, A. M., Lock, R. A., Hansman, D., and Paton, J. C. (1989). Contribution of autolysin to virulence of Streptococcus pneumoniae. *Infect. Immun.* 57, 2324-2330.
- Berry, A. M., Lock, R. A., and Paton, J. C. (1996). Cloning and characterization of nanB, a second Streptococcus pneumoniae neuraminidase gene, and purification of the NanB enzyme from recombinant Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 178, 4854-4860.
- Berry, A. M., and Paton, J. C. (2000). Additive attenuation of virulence of Streptococcus pneumoniae by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect. Immun.* 68, 133-140.
- Berry, A. M., and Paton, J. C. (1996). Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of Streptococcus pneumoniae. *Infect. Immun.* 64, 5255-5262.
- Berry, A. M., Yother, J., Briles, D. E., Hansman, D., and Paton, J. C. (1989). Reduced

- virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 57, 2037-2042.
- Beutler, B., and Cerami, A. (1987). Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N. Engl. J. Med.* 316, 379-385.
- Bicknell, S., van, E. S., Hayashi, S., Hards, J., English, D., and Hogg, J. C. (1994). A non-radioisotopic method for tracing neutrophils in vivo using 5'-bromo-2'-deoxyuridine. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10, 16-23.
- Bitsch, A., Trostdorf, F., Bruck, W., Schmidt, H., Fischer, F. R., and Nau, R. (1997). Central nervous system TNF α -mRNA expression during rabbit experimental pneumococcal meningitis. *Neurosci. Lett.* 237, 105-108.
- Bogdan, C., Vodovotz, Y., and Nathan, C. (1991). Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.* 174, 1549-1555.
- Bogdan, I., Leib, S. L., Bergeron, M., Chow, L., and Täuber, M. G. (1997). Tumor necrosis factor- α contributes to apoptosis in hippocampal neurons during experimental group B streptococcal meningitis. *J. Infect. Dis.* 176, 693-697.
- Bohr, V., Paulson, O. B., and Rasmussen, N. (1984). Pneumococcal meningitis. Late neurologic sequelae and features of prognostic impact. *Arch. Neurol.* 41, 1045-1049.
- Bohr, V., Rasmussen, N., Hansen, B., Gade, A., Kjersem, H., Johnsen, N., and Paulson, O. (1985). Pneumococcal meningitis: an evaluation of prognostic factors in 164 cases based on mortality and on a study of lasting sequelae. *J. Infect.* 10, 143-157.
- Brenner, C., and Kroemer, G. (1999). The mitochondrion: decisive for cell death control? In: *Signalling pathways in apoptosis.*, D. Watters and M. Lavin, eds. (Amsterdam: Harwood Academic Publishers), pp. 207-226.
- Briem, H., Hultman, E. H., Kalin, M. E., and Lundbergh, P. R. (1982). Increased total concentration of amino acids in the cerebrospinal fluid of patients with purulent meningitis. *J. Infect. Dis.* 145, 346-350.
- Briles, D. E., Yother, J., and McDaniel, L. S. (1988). Role of pneumococcal surface protein A in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev. Infect. Dis.* 10 Suppl. 2, S372-374.
- Brown, J. S., Gilliland, S. M., and Holden, D. W. (2001). A *Streptococcus pneumoniae*

- pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol. Microbiol.* 40, 572-585.
- Cabellos, C., MacIntyre, D. E., Forrest, M., Burroughs, M., Prasad, S., and Tuomanen, E. (1992). Differing roles for platelet-activating factor during inflammation of the lung and subarachnoid space. The special case of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Invest.* 90, 612-618.
- Camara, M., Boulnois, G. J., Andrew, P. W., and Mitchell, T. J. (1994). A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect. Immun.* 62, 3688-3695.
- Canvin, J. R., Marvin, A. P., Sivakumaran, M., Paton, J. C., Boulnois, G. J., Andrew, P. W., and Mitchell, T. J. (1995). The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J. Infect. Dis.* 172, 119-123.
- Chambers, J., Ames, R. S., Bergsma, D., Muir, A., Fitzgerald, L. R., Hervieu, G., Dytko, G. M., Foley, J. J., Martin, J., Liu, W. S., Park, J., Ellis, C., Ganguly, S., Konchar, S., Cluderay, J., Leslie, R., Wilson, S., and Sarau, H. M. (1999). Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1. *Nature* 400, 261-265.
- Cheng, Q., Campbell, E. A., Naughton, A. M., Johnson, S., and Masure, H. R. (1997). The *com* locus controls genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 23, 683-692.
- Choi, D. W. (1992). Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23, 1261-1276.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341 (Pt 2), 233-249.
- de Waal-Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., and de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174, 1209-1220.
- Deng, G. M., Liu, Z. Q., and Tarkowski, A. (2001). Intracisternally localized bacterial DNA containing CpG motifs induces meningitis. *J. Immunol.* 167, 4616-4626.
- Diab, A., Zhu, J., Lindquist, L., Wretling, B., Bakhiet, M., and Link, H. (1997). *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* induce different intracerebral mRNA cytokine patterns during the course of experimental bacterial

- meningitis. *Clin. Exp. Immunol.* 109, 233-241.
- Dinareello, C. A. (1984). Interleukin-1. *Rev. Infect. Dis.* 6, 51-95.
- Dumont, R. A., Car, B. D., Voitenok, N. N., Junker, U., Moser, B., Zak, O., and O'Reilly, T. (2000). Systemic neutralization of interleukin-8 markedly reduces neutrophilic pleocytosis during experimental lipopolysaccharide-induced meningitis in rabbits. *Infect. Immun.* 68, 5756-5763.
- Durand, M. L., Calderwood, S. B., Weber, D. J., Miller, S. I., Southwick, F. S., Caviness, V. S. J., and Swartz, M. N. (1993). Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N. Engl. J. Med.* 328, 21-28.
- Ernst, J. D., Hartiala, K. T., Goldstein, I. M., and Sande, M. A. (1984). Complement (C5)-derived chemotactic activity accounts for accumulation of polymorphonuclear leukocytes in cerebrospinal fluid of rabbits with pneumococcal meningitis. *Infect. Immun.* 46, 81-86.
- Feuerstein, G. Z. (1996). Platelet-activating factor: a case for its role in CNS function and brain injury. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 14, 109-114.
- Gamble, J. R., and Vadas, M. A. (1988). Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor-beta. *Science* 242, 97-99.
- Green, D. R., and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Grimwood, K., Anderson, P., Anderson, V., Tan, L., and Nolan, T. (2000). Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. *Arch. Dis. Child* 83, 111-116.
- Guerra-Romero, L., Tureen, J. H., Fournier, M. A., Makrides, V., and Täuber, M. G. (1993). Amino acids in cerebrospinal and brain interstitial fluid in experimental pneumococcal meningitis. *Pediatr. Res.* 33, 510-513.
- Hakansson, A., Carlstedt, I., Davies, J., Mossberg, A. K., Sabharwal, H., and Svanborg, C. (1996). Aspects on the interaction of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* with human respiratory tract mucosa. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, S187-S191.
- Horuk, R. (1994). Molecular properties of the chemokine receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 159-165.
- Hoskins, J., Alborn, W. E. J., Arnold, J., Blaszcak, L. C., Burgett, S., DeHoff, B. S.,

- Estrem, S. T., Fritz, L., Fu, D.-J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J. S., Khoja, H., Kraft, A. R., Lagace, R. E., LeBlanc, D. J., Lee, L. N., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S. M., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C. W., Nicas, T. I., Norris, F. H., O'Gara, M., Peery, R. B., Robertson, G. T., Rockey, P., Sun, P.-M., Winkler, M. E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, C. A., Baltz, R. H., Jaskunas, S. R., Rosteck, P. R. J., Skatrud, P. L., and Glass, J. I. (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* 183, 5709-5717.
- Houldsworth, S., Andrew, P. W., and Mitchell, T. J. (1994). Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* 62, 1501-1503.
- Humphrey, J. H. (1944). Hyaluronidase production by pneumococci. *J. Pathol. Bacteriol.* 56, 273-275.
- Koedel, U., Bayerlein, I., Paul, R., Sporer, B., and Pfister, H. W. (2000). Pharmacologic interference with NF-kB activation attenuates central nervous system complications in experimental pneumococcal meningitis. *J. Infect. Dis.* 182, 1437-1445.
- Koedel, U., Bernatowicz, A., Frei, K., Fontana, A., and Pfister, H. W. (1996). Systemically (but not intrathecally) administered IL-10 attenuates pathophysiologic alterations in experimental pneumococcal meningitis. *J. Immunol.* 157, 5185-5191.
- Koedel, U., Bernatowicz, A., Paul, R., Frei, K., Fontana, A., and Pfister, H. W. (1995). Experimental pneumococcal meningitis: cerebrovascular alterations, brain edema, and meningeal inflammation are linked to the production of nitric oxide. *Ann. Neurol.* 37, 313-323.
- Koedel, U., and Pfister, H. W. (1997). Protective effect of the antioxidant N-acetyl-L-cysteine in pneumococcal meningitis in the rat. *Neurosci. Lett.* 225, 33-36.
- Kooy, N. W., Royall, J. A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S. (1994). Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* 16, 149-156.
- Kruman, I. I., and Mattson, M. P. (1999). Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J. Neurochem.* 72, 529-540.
- Lebel, M. H., Freij, B. J., Syrogiannopoulos, G. A., Chrane, D. F., Hoyt, M. J., Stewart, S. M., Kennard, B. D., Olsen, K. D., and McCracken, G. H. J. (1988). Dexamethasone therapy for bacterial meningitis. Results of two double-blind, placebo-controlled

- trials. *N. Engl. J. Med.* 319, 964-971.
- Lehmann, A. K., Halstensen, A., Sornes, S., Rokke, O., and Waage, A. (1995). High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. *Infect. Immun.* 63, 2109-2112.
- Leib, S. L., Clements, J. M., Lindberg, R. L. P., Heimgartner, C., Loeffler, J. M., Pfister, L.-A., Täuber, M. G., and Leppert, D. (2001). Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis. *Brain* 124, 1734-1742.
- Leib, S. L., Kim, Y. S., Chow, L. L., Sheldon, R. A., and Täuber, 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.* 98, 2632-2639.
- Leib, S. L., Kim, Y. S., Ferriero, D. M., and Täuber, M. G. (1996). Neuroprotective effect of excitatory amino acid antagonist kynurenic acid in experimental bacterial meningitis. *J. Infect. Dis.* 173, 166-171.
- Leib, S. L., Leppert, D., Clements, J., and Täuber, M. G. (2000). Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infect. Immun.* 68, 615-620.
- Lipton, S. A., and Nicotera, P. (1998). Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. *Cell Calcium* 23, 165-171.
- Lock, R. A., Paton, J. C., and Hansman, D. (1988). Purification and immunological characterization of neuraminidase produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Pathog.* 4, 33-43.
- Lorenzl, S., Koedel, U., Frei, K., Bernatowicz, A., Fontana, A., and Pfister, H. W. (1995). Protective effect of a 21-aminosteroid during experimental pneumococcal meningitis. *J. Infect. Dis.* 172, 113-118.
- Marcus, A. J. (1988). Eicosanoids: transcellular metabolism. In: *Inflammation: basic principles and clinical correlates.*, J. I. Gallin, I. M. Goldstein and R. Snyderman, eds. (New York: Raven Press), pp. 129-137.
- Mitchell, T. J., and Andrew, P. W. (1997). Biological properties of pneumolysin. *Microb. Drug Resist.* 3, 19-26.

- Mustafa, M. M., Lebel, M. H., Ramilo, O., Olsen, K. D., Reisch, J. S., Beutler, B., and McCracken Jr, G. H. (1989). Correlation of interleukin-1 beta and cachectin concentrations in cerebrospinal fluid and outcome from bacterial meningitis. *J. Pediatr.* 115, 208-213.
- Odio, C. M., Faingezicht, I., Paris, M., Nassar, M., Baltodano, A., Rogers, J., Saez-Llorens, X., Olsen, K. D., and McCracken, G. H. J. (1991). The beneficial effects of early dexamethasone administration in infants and children with bacterial meningitis. *N. Engl. J. Med.* 325, 1654-1655.
- Paton, J. C., Berry, A. M., and Lock, R. A. (1997). Molecular analysis of putative pneumococcal virulence proteins. *Microb. Drug Resist.* 3, 1-10.
- Paul, R., Lorenzl, S., Koedel, U., Sporer, B., Vogel, U., Frosch, M., and Pfister, H. W. (1998). Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis. *Ann. Neurol.* 44, 592-600.
- Pericone, C. D., Overweg, K., Hermans, P. W. M., and Weiser, J. N. (2000). Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect. Immun.* 68, 3990-3997.
- Pfister, H. W., Feiden, W., and Einhüpl, K. M. (1993). Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. Results of a prospective clinical study. *Arch. Neurol.* 50, 575-581.
- Pfister, H. W., Frei, K., Otnad, B., Koedel, U., Tomasz, A., and Fontana, A. (1992). Transforming growth factor beta 2 inhibits cerebrovascular changes and brain edema formation in the tumor necrosis factor alpha-independent early phase of experimental pneumococcal meningitis. *J. Exp. Med.* 176, 265-268.
- Pfister, H. W., Koedel, U., Lorenzl, S., and Tomasz, A. (1992). Antioxidants attenuate microvascular changes in the early phase of experimental pneumococcal meningitis in rats. *Stroke* 23, 1798-1804.
- Pfister, L. A., Tureen, J. H., Shaw, S., Christen, S., Ferriero, D. M., Täuber, M. G., and Leib, S. L. (2000). Endothelin inhibition improves cerebral blood flow and is neuroprotective in pneumococcal meningitis. *Ann. Neurol.* 47, 329-335.
- Pinckard, R. N., Ludwig, J. C., and McManus, L. M. (1988). Platelet-activating factors. In: *Inflammation: basic principles and clinical correlates.*, J. I. Gallin, I. M. Goldstein and R. Snyderman, eds. (New York: Raven Press), pp. 139-167.

- Poulsen, K., Reinholdt, J., and Kilian, M. (1996). Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* immunoglobulin A1 protease gene (*iga*) and its translation product. *Infect. Immun.* 64, 3957-3966.
- Quagliarello, V. J., Wispelwey, B., Long, W. J. J., and Scheld, W. M. (1991). Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J. Clin. Invest.* 87, 1360-1366.
- Rennels, M. L., Blaumanis, O. R., and Grady, P. A. (1990). Rapid solute transport throughout the brain via paravascular fluid pathways. *Adv. Neurol.* 52, 431-439.
- Riesenfeld-Orn, I., Wolpe, S., Garcia-Bustos, J. F., Hoffmann, M. K., and Tuomanen, E. (1989). Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components. *Infect. Immun.* 57, 1890-1893.
- Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J. N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A., and Masure, H. R. (1997). Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 25, 819-825.
- Sampson, J. S., O'Connor, S. P., Stinson, A. R., Tharpe, J. A., and Russell, H. (1994). Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported *Streptococcus* sp. adhesins. *Infect. Immun.* 62, 319-324.
- Saukkonen, K., Sande, S., Cioffe, C., Wolpe, S., Sherry, B., Cerami, A., and Tuomanen, E. (1990). The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J. Exp. Med.* 171, 439-448.
- Schott, K. J., and Meier, D. (1987). Free amino acid pattern of cerebrospinal fluid in meningeal pathology. *Acta Neurol. Scand.* 75, 304-309.
- Schuchat, A., Robinson, K., Wenger, J. D., Harrison, L. H., Farley, M., Reingold, A. L., Lefkowitz, L., and Perkins, B. A. (1997). Bacterial meningitis in the United States in 1995. *N. Engl. J. Med.* 337, 970-976.
- Seebach, J., Bartholdi, D., Frei, K., Spanaus, K. S., Ferrero, E., Widmer, U., Isenmann, S., Strieter, R. M., Schwab, M., Pfister, H. W., and Fontana, A. (1995). Experimental *Listeria* meningoencephalitis. Macrophage inflammatory protein-1 α and -2 are produced intrathecally and mediate chemotactic activity in cerebrospinal fluid of

- infected mice. *J. Immunol.* 155, 4367-4375.
- Spanaus, K. S., Nadal, D., Pfister, H. W., Seebach, J., Widmer, U., Frei, K., Gloor, S., and Fontana, A. (1997). C-X-C and C-C chemokines are expressed in the cerebrospinal fluid in bacterial meningitis and mediate chemotactic activity on peripheral blood-derived polymorphonuclear and mononuclear cells in vitro. *J. Immunol.* 158, 1956-1964.
- Spellerberg, B., Cundell, D. R., Sandros, J., Pearce, B. J., Idäpään-Heikkilä, I., Rosenow, C., and Masure, H. R. (1996). Pyruvate oxidase as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 19, 803-813.
- Spranger, M., Krempien, S., Schwab, S., Maiwald, M., Bruno, K., and Hacke, W. (1996). Excess glutamate in the cerebrospinal fluid in bacterial meningitis. *J. Neurol. Sci.* 143, 126-131.
- Spranger, M., Schwab, S., Krempien, S., Winterholler, M., Steiner, T., and Hacke, W. (1996). Excess glutamate levels in the cerebrospinal fluid predict clinical outcome of bacterial meningitis. *Arch. Neurol.* 53, 992-996.
- Stringaris, A. K., Bruck, W., Tumani, H., Schmidt, H., and Nau, R. (1997). Increased glutamine synthetase immunoreactivity in experimental pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol.* 93, 215-218.
- 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., and Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Täuber, M. G., Kim, Y. S., and Leib, S. L. (1997). Neuronal injury in meningitis. In: *In defense of the brain: current concepts in the immunopathogenesis and clinical aspects of CNS infections.*, P. K. Peterson and J. S. Remington, eds. (Malden, MA: Blackwell Science), pp. 125-143.
- Täuber, M. G., Sachdeva, M., Kennedy, S. L., Loetscher, H., and Lesslauer, W. (1992). Toxicity in neuronal cells caused by cerebrospinal fluid from pneumococcal and gram-negative meningitis. *J. Infect. Dis.* 166, 1045-1050.
- Tettelin, H., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Read, T. D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R. T., Haft, D. H., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Gwinn, M., Kolonay, J.

- F., Nelson, W. C., Peterson, J. D., Umayam, L. A., White, O., Salzberg, S. L., Lewis, M. R., Radune, D., Holtzapfle, E., Khouri, H., Wolf, A. M., Utterback, T. R., Hansen, C. L., McDonald, L. A., Feldblyum, T. V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E. K., Holt, I. E., Loftus, B. J., Yang, F., Smith, H. O., Venter, J. C., Dougherty, B. A., Morrison, D. A., Hollingshead, S. K., and Fraser, C. M. (2001). Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293, 498-506.
- Tomasz, A., Albino, A., and Zanati, E. (1970). Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature* 227, 138-140.
- Tsunawaki, S., Sporn, M., Ding, A., and Nathan, C. (1988). Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 334, 260-262.
- Tunkel, A. R., and Scheld, W. M. (1997). Pathogenesis and pathophysiology of bacterial infections. In: *Infections of the central nervous system.*, W. M. Scheld, R. J. Whitley and D. T. Durack, eds. (Philadelphia, New York: Lippincott-Raven), pp. 297-312.
- Tuomanen, E., Hengstler, B., Rich, R., Bray, M. A., Zak, O., and Tomasz, A. (1987). Nonsteroidal anti-inflammatory agents in the therapy for experimental pneumococcal meningitis. *J. Infect. Dis.* 155, 985-990.
- Tuomanen, E., Tomasz, A., Hengstler, B., and Zak, O. (1985). The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis. *J. Infect. Dis.* 151, 535-540.
- Tuomanen, E. I., Austrian, R., and Masure, H. R. (1995). Pathogenesis of pneumococcal infection. *N. Engl. J. Med.* 332, 1280-1284.
- Tuomanen, E. I., Saukkonen, K., Sande, S., Cioffe, C., and Wright, S. D. (1989). Reduction of inflammation, tissue damage, and mortality in bacterial meningitis in rabbits treated with monoclonal antibodies against adhesion-promoting receptors of leukocytes. *J. Exp. Med.* 170, 959-969.
- van Furth, A. M., Roord, J. J., and van Furth, R. (1996). Roles of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathophysiology of bacterial meningitis and effect of adjunctive therapy. *Infect. Immun.* 64, 4883-4890.
- Vollmer, P., Walev, I., Rose-John, S., and Bhakdi, S. (1996). Novel pathogenic mechanism of microbial metalloproteinases: liberation of membrane-anchored molecules in biologically active form exemplified by studies with the human interleukin-6

- receptor. *Infect. Immun.* 64, 3646-3651.
- Wang, S. D., Huang, K. J., Lin, Y. S., and Lei, H. Y. (1994). Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J. Immunol.* 152, 5014-5021.
- Wani, J. H., Gilbert, J. V., Plaut, A. G., and Weiser, J. N. (1996). Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 64, 3967-3974.
- Weber, J. R., Angstwurm, K., Burger, W., Einhüpl, K. M., and Dirnagl, U. (1995). Anti ICAM-1 (CD54) monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis. *J. Neuroimmunol.* 63, 63-68.
- Weber, J. R., Angstwurm, K., Rosenkranz, T., Lindauer, U., Freyer, D., Burger, W., Busch, C., Einhüpl, K. M., and Dirnagl, U. (1997). Heparin inhibits leukocyte rolling in pial vessels and attenuates inflammatory changes in a rat model of experimental bacterial meningitis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 1221-1229.
- Yother, J., and White, J. M. (1994). Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. *J. Bacteriol.* 176, 2976-2985.
- Zhang, J.-R., Idanpaan-Heikkila, I., Fischer, W., and Tuomanen, E. I. (1999). Pneumococcal licD2 gene is involved in phosphorylcholine metabolism. *Mol. Microbiol.* 31, 1477-1488.
- Zychlinsky, A., Prevost, M. C., and Sansonetti, P. J. (1992). *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 358, 167-169.
- Zychlinsky, A., and Sansonetti, P. (1997). Apoptosis in bacterial pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 100, 493-496.
- Zysk, G., Bruck, W., Gerber, J., Bruck, Y., Prange, H. W., and Nau, R. (1996). Anti-inflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 722-728.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- der Bewerberin oder dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

Berlin, 20.07.2002