

Aus der Abteilung Neurologie  
(Prof. Dr. med. M. Bähr)  
Im Zentrum Neurologische Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Über die Auswirkungen systemischer bakterieller Begleitinfektionen bei  
Amyotropher Lateralsklerose

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Wolf-Dieter Zech  
aus  
Lauchhammer

Göttingen, 2007

**Dekan:** Prof. Dr. med. C. Frömmel

**I. Berichterstatter:** Prof. Dr. med. R. Nau

**II. Berichterstatter/in:**

**III. Berichterstatter/in:**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Amyotrophe Lateralsklerose .....	1
1.2. ALS-Modelle in Tier und Zellkultur .....	3
1.3. ALS und systemische bakterielle Begleitinfektionen .....	3
1.4. Gegenstand und Zielsetzung der Arbeit .....	7
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>9</b>
2.1. Material.....	9
2.1.1. Geräte .....	9
2.1.2. Verbrauchs- und spezielles Material.....	10
2.1.3. Chemikalien und Reagenzien.....	11
2.1.4. Medien und Puffer .....	13
2.1.5. Antikörper und Kits .....	13
2.2. Zellkultur.....	14
2.2.1. SOD-WT-SH-SY5Y- und SOD-G93A-SH-SY5Y-Zellen.....	14
2.2.1.1. Kultivierung .....	14
2.2.1.2. Trypsinisierung.....	14
2.2.1.3. Passagierung .....	15
2.2.1.4. Auszählung .....	15
2.2.1.5. Ausplattierung .....	15
2.2.1.6. WST-1-Zellvitalitätstest .....	16
2.2.1.7. Fixation .....	16
2.2.1.8. Einfrieren / Auftauen .....	17
2.2.2. Experimente mit Pneumolysin .....	17
2.2.2.1. Pneumolysin .....	17
2.2.2.2. Pneumolysin-Behandlung von G93A- und WT-Zellen.....	18
2.2.2.3. Pneumolysin / Diethyldithiocarbamat-Behandlung.....	18
2.2.2.4. Pneumolysin / N-Acetylcystein-Behandlung.....	18
2.2.3. Co-Kultur aus WT- oder G93A-Zellen und Makrophagen.....	19
2.2.3.1. Monozyten- / Makrophagen-Präparation.....	19
2.2.3.2. Makrophagenernte .....	20
2.2.3.3. Ansatz der Co-Kultur.....	21

2.2.3.4. Co-Kultur mit N-Acetylcystein .....	21
2.2.3.5. Neuronenspezifische Enolase-Messung.....	21
2.3. Calciummessungen mittels Fura-2-Calcium-Video-Imaging .....	22
2.3.1. Prinzip .....	22
2.3.2. Fura-2.....	22
2.3.3. Aufbau der Messapparatur .....	23
2.3.4. Präparation der Zellen für das Calcium-Video-Imaging .....	24
2.4. Tierversuche.....	25
2.4.1. G93A-transgene Mäuse .....	25
2.4.2. Streptococcus pneumoniae .....	25
2.4.3. Infektion mit Streptococcus pneumoniae.....	25
2.4.4. Bestimmung der Inokulumkonzentration .....	26
2.4.5. Antibiose mit Ceftriaxon.....	26
2.4.6. Klinisch-neurologischer Score .....	27
2.4.7. Seiltest.....	27
2.4.8. Rotarod.....	28
2.4.9. Präparation des Mausgehirns.....	28
2.4.10. Präparation des Mause Rückenmarks .....	29
2.4.11. Herstellung von Paraffin-Schnittpräparaten.....	29
2.5. Histochemie und Immunhistochemie.....	30
2.5.1. Hämalaun-Färbung.....	30
2.5.2. In-situ-Tailing .....	30
2.5.3. Lichtgrün / CD68-Doppelfärbung .....	31
2.5.4. Isolectin-B4-Färbung .....	31
2.6. Auszählung aktivierter Mikrogliazellen .....	32
2.7. Auszählung der Apoptosen in In-situ-Tailing-Präparaten .....	33
2.8. Statistik.....	33
<b>3. Experimente und Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
3.1. Empfindlichkeit von G93A- und WT-Zellen gegenüber Pneumolysin .....	34
3.2. Calciumkonzentrationen in G93A- und WT-Zellen nach Pneumolysin .....	38
3.3. Einfluss von Diethyldithiocarbamat auf die Wirkung von Pneumolysin .....	41
3.4. Einfluss von N-Acetylcystein auf die Wirkung von Pneumolysin .....	43
3.5. Empfindlichkeit von WT- und G93A-Zellen in Co-Kultur mit Makrophagen ....	45

3.5.1. Co-Kultur mit N-Acetylcystein .....	50
3.6. Infektion von G93A-transgenen Mäusen mit Streptococcus pneumoniae .....	52
3.6.1. Krankheitsverlauf / klinischer Score.....	52
3.6.2. Krankheitsverlauf / Seilttest .....	53
3.6.3. Krankheitsverlauf / Rotarod .....	54
3.6.4. Mikrogliazellenaktivierung .....	56
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>58</b>
4.1. Erhöhte Empfindlichkeit von G93A-Zellen gegenüber Pneumolysin.....	59
4.1.1. Erhöhte Calciumkonzentrationen nach Pneumolysin in G93A-Zellen.....	62
4.1.2. Einfluss von Diethyldithiocarbamat auf die Empfindlichkeit gegenüber Pneumolysin .....	65
4.1.3. Einfluss von N-Acetylcystein auf die Empfindlichkeit gegenüber Pneumolysin .....	67
4.2. Vermehrte Empfindlichkeit von G93A-Zellen gegenüber TLR-stimulierten Makrophagen .....	70
4.2.1. Fehlende neuroprotektive Wirkung von N-Acetylcystein im Co- Kulturmodell .....	72
4.3. Fehlende Auswirkung systemischer Infektionen in ALS-Mäusen.....	74
4.4. Schlussfolgerungen.....	78
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>80</b>
<b>6. Literatur.....</b>	<b>82</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
Aqua (bi-)dest	einfach und zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Flächeninhalt unter der Kurve (area under curve)
BCIP	Bromochloroindolyl-Phosphat
°C	Grad Celsius
c	Zenti-
Ca	Calcium
CPG	unmethylierte Cytosin-Guanin-Dinukleotide
d	Durchmesser; Tag
DAB	Diaminobenzidin
DETC	Diethyldithiocarbamat
D-MEM	Dulbecco`s Modified Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTBS	Desoxyribonukleotidtriphosphat
D-PBS	destillierte phosphatgepufferte Kochsalzlösung
FCS	fötales Kälberserum
F/F0	Fluoreszenz-Ratio-Einheiten
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> ); Gramm
G93A-Zellen	SOD-G93A-SH-SY5Y-Zellen
GLT1	Glutamattransporter
h	Stunde
IL	Interleukin
KbE	Kolonienbildende Einheit
λ	Wellenlänge
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
μ	Mikro-
m	Meter; Milli-
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
mol	Mol

MS	Multiple Sklerose
mSOD-1	mutierte Superoxid-Dismutase
n	Nano-
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NO	Stickstoffmonoxid
NSE	neuronenspezifische Enolase
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
Pam3Cys	N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]- [R]-cystein
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLY	Pneumolysin
PMBC	Periphere mononukleäre Blutzellen
P/S	Penicillin/Streptomycin
R	Ratio
ROS	reaktive oxygene Spezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Sekunde
SOD-1	Cu/Zn-Superoxid-Dismutase
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
t	Zeit
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
vs.	versus
WST-1	Tetrazoliumsalz
WT	Wildtyp
WT-Zellen	SOD-WT-SH-SY5Y-Zellen
ZNS	zentrales Nervensystem
%	Prozent

## 1. Einleitung

### 1.1. Amyotrophe Lateralsklerose

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine langsam fortschreitende neurodegenerative Erkrankung bisher noch nicht vollständig geklärter Genese. Sie ist die häufigste Motoneuronenerkrankung des Erwachsenenalters (Rowland 1994). Die Inzidenz der ALS ist in ihrer geographischen und ethnischen Verteilung weitgehend konstant und lässt zwischen westlichen Industrienationen und Entwicklungsländern keinen wesentlichen Unterschied erkennen (Mulder und Kurland 1987). Das neurodegenerative Geschehen betrifft ausschließlich Motoneurone. Entsprechend ihrer Lokalisation im Zentralen Nervensystem können kortikale, bulbäre und spinale Motoneurone betroffen sein. Die Verteilung des neurodegenerativen Geschehens ist von Patient zu Patient variabel und zeigt sich klinisch, je nach Lokalisation des Neuronenunterganges, in einer stark variierenden Symptomatik. Zeichen für einen Untergang des ersten Motoneurons können unter anderem gesteigerte Sehnenreflexe, Kloni sowie positive Pyramidenbahnzeichen sein. Bei einer Schädigung des zweiten Motoneurons können weder Sehnenreflexe noch Kloni gefunden werden, es treten keine Pyramidenbahnzeichen auf. Gemeinsames Merkmal aller Lokalisationsformen der Neurodegeneration ist schließlich die irreversible Lähmung der von den betroffenen Motoneuronen direkt oder indirekt innervierten Muskulatur. Dies äußert sich klinisch vor allem in einer zunehmenden Muskelschwäche, die bis zur völligen Bewegungslosigkeit führen kann. Hinzu kommen, je nach Verlauf, langsam progrediente Schluckstörungen und eine Lähmung der Atemmuskulatur (Rowland und Shneider 2001). Der Verlauf der Krankheit ist immer tödlich, in den meisten Fällen binnen weniger als 5 Jahren. Todesursächlich ist in der Mehrzahl der Fälle respiratorisches Versagen (Kilic et al. 2004).

In 90 – 95 % der Fälle tritt die Erkrankung sporadisch, ohne fassbare genetische Komponente auf. Die verbleibenden 5 – 10 % treten familiär mit einem zumeist dominanten Erbgang auf. Sie unterscheiden sich von den weitaus häufigeren sporadischen Formen weder in klinischer noch neuropathologischer Hinsicht. In 15 – 20 % der familiären Fälle findet sich eine Mutation im Gen, das für die Cu/Zn-Superoxid-Dismutase (SOD-1) kodiert (Brown 1995). SOD-1 ist ein ubiquitäres

zytoplasmatisches Enzym, welches die Konversion des freien Sauerstoffradikals  $O_2^-$ , zu Wasserstoffperoxid katalysiert. Wasserstoffperoxid wiederum wird durch das Enzym Glutathionperoxidase zu Wasser neutralisiert. Die Superoxid-Dismutase spielt damit eine wichtige Rolle bei der Neutralisierung freier toxischer Radikale (Maier und Chan 2002). Bis jetzt sind mehr als 100 ALS-assoziierte SOD-1-Mutationen bekannt (Carri et al. 2006). Die bisher am häufigsten untersuchte Mutation ist die G93A-Mutation. Dabei handelt es sich um eine Punktmutation, durch die an Position 93 im SOD-1-Enzym die Aminosäure Glycin durch Alanin ersetzt ist. Patienten, die Träger dieser Mutation sind, entwickeln ein zur sporadischen Form identisches Krankheitsbild (Carri et al. 1997). Es wird die Hypothese vertreten, dass das SOD-1-Enzym durch die verschiedenen Mutationen eine oder mehrere neue toxische Eigenschaften erhält, die unabhängig von der enzymatischen SOD-1-Aktivität zum Neuronentod führen können. Dies beinhaltet Veränderungen der Faltstruktur des SOD-1-Proteins, welche wiederum zu Veränderungen der SOD-1-Substratspezifität und zu einer Freisetzung des enzymgebundenen Kupfers führen können. Beide Vorgänge leisten schädlichen oxidativen Prozessen Vorschub und erhöhen den oxidativen Stress in der Zelle. Dieser wird sowohl für die familiäre als auch die sporadische ALS als eine Hauptursache des Unterganges von Neuronen diskutiert (Watanabe et al. 1997; Barnham et al. 2004; Nikolic-Kokic et al. 2006). Weitere häufig diskutierte Pathomechanismen sind die Bildung toxischer SOD-1-Aggregate, schädigende gliale Einflüsse, die Induktion proapoptotischer Vorgänge, sowie eine Exzitotoxizität von Glutamat (Okado-Matsumoto und Fridovich 2002; Przedborski 2004; Rao und Weiss 2004). Dieser exzitatorische Neurotransmitter kann, wenn er in zu hohen Konzentrationen im Extrazellulärraum vorliegt, toxisch auf Neurone wirken (Kwak und Weiss 2006). So wurden in mehreren Studien erhöhte Glutamatkonzentrationen im Liquor von ALS-Patienten nachgewiesen (Rothstein et al. 1991).

Bis jetzt ist der Glutamat-Antagonist Riluzol das einzige für die ALS-Therapie zugelassene, aber dennoch nur gering wirksame Medikament. Es verlängert das Überleben von ALS-Patienten nur um durchschnittlich 3 Monate und führt nicht zu einer wesentlichen Verbesserung von Muskelkraft und Lebensqualität (Carri et al. 2006).

## 1.2. ALS-Modelle in Tier und Zellkultur

Einen wesentlichen Beitrag zur Erforschung der Krankheit stellte zu Beginn der 1990-er Jahre die Entwicklung von transgenen ALS-Mausmodellen dar. Dabei wurden Mäusen gentechnisch humane ALS-assoziierte Mutationen, wie z.B. die G93A-Mutation, am SOD-1-Gen beigebracht (Gurney et al. 1994). Mäuse mit einer solchen mutierten Superoxid-Dismutase (mSOD-1-Mäuse) entwickeln klinisch und neuropathologisch ein der menschlichen Erkrankung nahezu identisches Bild. Als einziger Unterschied zum Menschen finden sich bei mSOD-1-Mäusen keine kortikalen, sondern ausschließlich spinal lokalisierte Neuronenuntergänge (Ripps et al. 1995).

Mit Hilfe von humanen Neuroblastom-Zellen der Linie SH-SY5Y gelang es Ende der 1990er Jahre, ein nützliches In-vitro-Modell für die ALS zu etablieren. In diesem Modell wurde SH-SY5Y-Zellen gentechnisch, durch Transfektion, die humane G93A-Mutation oder das humane SOD-1-Wildtyp-Gen beigebracht. Dadurch konnten weitere wichtige ALS-assoziierte Pathomechanismen, wie Störungen der intrazellulären Calciumhomöostase und mitochondriale Dysfunktionen, identifiziert werden (Carri et al. 1997).

Darüber hinaus sind die beschriebenen ALS-Modelle ein wichtiges Hilfsmittel bei der Suche nach neuen Therapien. So konnte beispielsweise am G93A-Mausmodell gezeigt werden, dass die antioxidative Substanz N-Acetylcystein (NAC) den Ausbruch der Krankheit verzögerte und das Überleben der ALS-Mäuse verlängerte (Andreassen et al. 2000).

## 1.3. ALS und systemische bakterielle Begleitinfektionen

Sehr häufig treten bei ALS-Patienten aufgrund der eingeschränkten Atemmechanik Infekte des Respirationstrakts wie z.B. Bronchitiden und Pneumonien auf (Gelanis 2001). Das häufigste respiratorische Pathogen und gleichzeitig der häufigste Pneumonieerreger beim Erwachsenen ist das gram-positive Bakterium *Streptococcus pneumoniae*. Bei schweren Infektionsverläufen ist es möglich, dass Bakterien wie *S. pneumoniae* nicht ausschließlich auf den lokalen Infektionsherd wie z.B. die Lunge beschränkt bleiben, sondern darüber hinaus auch in den Blutkreislauf

übertreten. Dieser Zustand wird als Bakteriämie bezeichnet. Persistieren und vermehren sich die Bakterien im Blut, werden sie und ihre Bestandteile auf diese Weise im gesamten Organismus und dessen Kompartimenten verteilt. Eine solche bakterielle Allgemeininfektion wird auch als systemische Infektion bezeichnet. Unspezifische frühe Zeichen einer solchen Infektion können zunächst Fieber und allgemeine Schwäche sein. Bleibt eine systemische Infektion unbehandelt, kann dies sehr schnell zu potentiell lebensbedrohlichen Komplikationen führen. Dazu zählen vor allem die Sepsis und bei einem Durchbrechen der Blut-Hirn-Schranke die Meningitis (Shahin und Lerner 2002; Spreer et al. 2004; Bouza et al. 2005).

In der Klinik kann bei ALS Patienten mit einer Begleitinfektion, wie z.B. einer Pneumonie, eine nicht selten irreversible Verschlechterung der ALS-typischen Symptome beobachtet werden. Auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer und dem Morbus Parkinson können Infektionen die Folgen der Erkrankung verschlimmern oder das Risiko für das Auftreten der Krankheit erhöhen (Perry et al. 2003). Eine Studie an monozygoten und heterozygoten Zwillingen, bei denen ein Zwilling eine schwere Infektion durchgemacht hatte und einen Morbus Alzheimer entwickelte, ergab, dass Menschen, die keine schweren Infektionen durchgemacht hatten, eine Demenz später entwickelten und darüber hinaus länger lebten (Nee und Lipka 1999).

Warum beispielsweise eine Pneumonie bei ALS-Patienten zu einer Symptomverschlechterung führen kann, während ansonsten gesunde Menschen mit einer Pneumonie keine neurologischen Defizite entwickeln, ist bisher nicht genau geklärt. Es liegt die Vermutung nahe, dass Neurone von ALS-Patienten vulnerabler auf Vorgänge reagieren, die durch bakterielle Allgemeininfektionen in Gang gesetzt werden. Bei einer manifesten bakteriellen Infektion wird in der Regel eine antibiotische Therapie durchgeführt, um eine Exazerbation der Infektion zu verhindern. Dadurch werden Erregerbestandteile systemisch freigesetzt, welche direkt oder indirekt neurotoxisch wirken können. Dabei bewirken insbesondere Antibiotika wie zum Beispiel Cephalosporine, die ihren Wirkmechanismus über eine Zerstörung der Zellwand des Bakteriums entfalten, eine quantitativ sehr viel höhere Freisetzung von Bakterienbestandteilen als z.B. Antibiotika, welche die Proteinbiosynthese inhibieren (Nau und Eiffert 2002).

Bei einer systemischen Infektion mit *S. pneumoniae* kommt es spontan oder durch die antibiotisch induzierte Zerstörung des Erregers unter anderem zur Freisetzung

des Proteins Pneumolysin (PLY). Dabei handelt es sich um ein Toxin, das in der Lage ist, die Epithelzellen der Blut-Hirn-Schranke und die Zellen des zentralen Nervensystems zu schädigen. Pneumolysin entfaltet seine toxische Wirkung über die Induktion eines massiven zytosolischen Calciumeinstroms. Darüber hinaus kann Pneumolysin aber auch indirekt, über eine Stimulation von Zellen des angeborenen Immunsystems, zum Neuronentod führen (Braun et al. 2002; Stringaris et al. 2002; Hirst et al. 2004). Bestimmte Bestandteile anderer Bakterien können, ebenso wie Pneumolysin, proinflammatorisch als Stimulatoren des körpereigenen Immunsystems fungieren (Nau und Eiffert 2002). Zielzellen einer solchen Stimulation sind unter anderem die als Mikrogliazellen bezeichneten residenten Makrophagen des Zentralen Nervensystems. Sie gehören ebenso wie ortsständige Makrophagen in anderen Geweben und zirkulierenden Monozyten im Blut zum mononukleären Phagozytensystem. Ihre Aufgabe besteht im Schutz des ZNS-Gewebes vor eindringenden Mikroorganismen und in der Beseitigung von untergegangenen neuronalem Gewebe (Kreutzberg 1996). Zwar werden den Mikrogliazellen auch neuroprotektive Funktionen zugesprochen, jedoch können sie, wenn sie aktiviert werden, z.B. durch die Freisetzung von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Stickstoffmonoxid (NO), Neurone töten (Fordyce et al. 2005; Lotz et al. 2005). Eine solche Aktivierung erfolgt u.a. über sogenannte Toll-like Rezeptoren (TLR), die sich in der Mikrogliazellmembran befinden und von denen inzwischen mehr als 10 unterschiedliche Rezeptor-Typen bekannt sind. Am Beispiel von Maus-Mikrogliazellen und Maus-Makrophagen konnte gezeigt werden, dass die Toll-like Rezeptoren dieser Zellen durch Bakterienbestandteile aktiviert werden (Kaisho und Akira 2006). Als bakterielle TLR-Agonisten fungierten dabei unter anderem das Lipopeptid Pam3Cys (Ligand von TLR-2), die Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien (TLR-4) und das Oligonukleotid CpG (TLR-9). Pneumolysin wirkte in geringen sublytischen Konzentrationen TLR-4-agonistisch (Ebert et al. 2005; Srivastava et al. 2005). Die Toll-like Rezeptoren nehmen damit eine Schlüsselrolle bei der potentiell schädigenden Wirkung von freigesetzten Bakterienbestandteilen während einer Begleitinfektion ein.

Das neurodegenerative Geschehen bei der ALS ist schon unabhängig von einer möglichen Begleitinfektion eng mit einer deutlich entzündlichen Reaktion im Nervengewebe verknüpft und wird durch zusätzliche proinflammatorische Stimuli wie Bakterienbestandteile vermutlich exazerbiert (Turner et al. 2004; Lotz et al. 2005).

Als Hinweis auf entzündliche Prozesse konnten in Rückenmark und Liquor von ALS-Patienten erhöhte Konzentrationen der Entzündungsmediatoren Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 1beta (IL-1 $\beta$ ) gefunden werden (Sekizawa et al. 1998; Li et al. 2000). Sowohl bei ALS-Patienten als auch im mSOD-1-Mausmodell findet sich eine deutliche Hochregulation der Cyclooxygenase 2, eines der Hauptenzyme des Entzündungsstoffwechsels. Das Hauptprodukt dieses Enzyms ist Prostaglandin E<sub>2</sub>, welches in erhöhten Gewebs-Konzentrationen bei ALS-Patienten auftritt (Almer et al. 2001). Daneben sind, als weiterer Hinweis auf entzündliche Prozesse, die Mikrogliazellen im Nervengewebe von ALS-Patienten bereits im Zustand ohne systemische Infektion vermehrt aktiviert. Es wird die Hypothese vertreten, dass diese Aktivierung durch Neuronenbestandteile, die bei chronisch rezidivierenden Neuronenuntergängen vermehrt freigesetzt werden, ermöglicht wird. So konnte an Hand von Primärkulturen der Maus gezeigt werden, dass deren Mikrogliazellen durch das neuronale Membranprotein Amyloid- $\beta$  aktiviert wurden. Durch kombinierte Mikrogliazellstimulation mit Amyloid- $\beta$  und den bakteriellen TLR-Agonisten LPS und Pam3Cys zeigte sich in vitro eine stärkere Mikrogliazellaktivierung als durch die alleinige Behandlung mit einer dieser 3 Substanzen (Lotz et al. 2005). Diese Beobachtung verweist auf eine vermutlich additive Wirkung von endogenen und exogenen Stimuli auf die Mikrogliazellen. So reagieren bereits aktivierte Mikrogliazellen im Nervengewebe von ALS-Patienten bei einer systemischen Infektion wahrscheinlich sehr viel empfindlicher auf Erregerbestandteile als nicht aktivierte Mikrogliazellen im Gewebe von ansonsten gesunden Menschen. In der Folge könnte es bei ALS-Patienten zu einer stärkeren Mikroglia-induzierten neuronalen Schädigung kommen. Dieses Konzept erscheint insbesondere dann von Bedeutung, wenn die Neurone von ALS-Patienten per se empfindlicher auf den Angriff von Bakterientoxinen und aktivierter Mikrogliazellen reagieren würden.

#### 1.4. Gegenstand und Zielsetzung der Arbeit

Bakterielle Begleitinfektionen, wie z.B. Pneumonien, können das neurodegenerative Geschehen in der Amyotrophen Lateralsklerose verschlechtern, verursachen aber, bei erfolgreicher antibiotischer Behandlung, bei ansonsten gesunden Menschen keine neurologischen Defizite (Perry et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Mechanismen diesem Phänomen zugrunde liegen. Es sollte dabei sowohl auf das SH-SY5Y-G93A- / WT-Zellmodell als auch auf das G93A-Mausmodell der ALS zurückgegriffen werden.

Mit Hilfe des Zellmodells sollte geklärt werden, ob SOD-1-G93A-mutante Zellen per se vulnerabler auf ein bakterielles Toxin reagieren als Zellen, die Träger des SOD-1-Wildtyp-Enzyms sind. Dafür sollten die Zellen mit dem von *S. pneumoniae* gebildeten Toxin Pneumolysin behandelt werden.

Da Pneumolysin seine toxische Wirkung über einen massiven Calciumeinstrom in das Zytosol entfaltet, erschien darüber hinaus die Fragestellung relevant, ob Wildtyp-Zellen in anderer Weise auf den Calciumeinstrom reagieren als die mutanten G93A-Zellen (Stringaris et al. 2002). Es sollte daher mittels des Verfahrens des Fura-2-Calcium-Video-Imaging das Verhalten des zytosolischen Calciums nach Pneumolysinapplikation in beiden Zelllinien untersucht werden.

Um den Einfluss der mutierten SOD auf die Wirkung des Toxins zu charakterisieren, sollte das Enzym mit dem SOD-Inhibitor Diethyldithiocarbamat (DETC) gehemmt werden (Bredesen et al. 1996; Azzouz et al. 2000). Weil die antioxidative Substanz N-Acetylcystein in ALS-Tiermodellen und ALS-Zellkulturmodellen bereits protektive Wirkungen entfaltet hatte, sollte untersucht werden, ob entsprechende Effekte auch gegenüber Pneumolysin erzielt werden können (Andreassen et al. 2000; Beretta et al. 2003).

Neben den Auswirkungen einer direkten Zytotoxizität wird auch die Stimulation der Mikrogliazellen durch Bakterienbestandteile als indirekter neurotoxischer Mechanismus diskutiert. Um dies zu untersuchen, sollte ein Co-Kulturmodell aus SH-SY5Y-G93A- oder SH-SY5Y-WT-Zellen und humanen Makrophagen, die den Mikrogliazellen funktionell ähnlich sind und Toll-like Rezeptoren exprimieren, etabliert werden (Rock et al. 2004; Medvedev et al. 2006). Ziel dieses Modells war die Klärung der Frage, ob G93A-mutante Zellen empfindlicher auf die Umgebung TLR-aktivierter Makrophagen reagieren als Wildtyp-Zellen.

Schließlich sollte am G93A-Mausmodell in vivo untersucht werden, ob der Krankheitsverlauf der ALS bei G93A-transgenen Mäusen durch systemische Infektionen mit starker Bakterienbestandteilfreisetzung und den vermuteten Wirkungen von direkter und indirekter Neurotoxizität ungünstig beeinflusst werden kann. Dafür sollten die Mäuse vor Beginn und während der Entwicklung des ALS-typischen Phänotyps intraperitoneale Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* erhalten und anschließend jeweils mit Ceftriaxon antibiotisch behandelt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Charge-Coupled-Device-Kamera	Till Photonics (Martinsried, D)
Elisa-Reader	Tecan (Crailsheim, D)
Inkubator	Heraeus (Hannover, D)
Invert-Fluoreszenzmikroskop	Zeiss (Göttingen, D)
LIAISON <sup>®</sup> -Analyzer	DiaSorin (Saluggia, Italien)
Mikrowelle	Panasonic (Hamburg, D)
Monochromator	Till Photonics (Martinsried, D)
Neubauer-Zählkammer	Schütt (Göttingen, D)
peristaltische Pumpe	Watson (Falmouth, England,UK)
Pipettierhilfe	Eppendorf (Hamburg, D)
Rotarod	TSE-Systems (Bad Homburg, D)
Schlauch-Pumpe	Roth (Karlsruhe, D)
Schlittenmikrotom	Leica (Nussloch, D)
Sterilbank-Laminair <sup>®</sup>	Heraeus (Hannover, D)
Stoppuhr	Casio (London, England, UK)
Wasserbad	GFL (Burgwedel, D)
Zentrifuge	Jouan (St-Herblain, Frankreich)

## 2.1.2. Verbrauchs- und spezielles Material

24- und 96-Loch-Gewebekulturplatten	Sarstedt (Newton, USA)
Blut-Agar-Platten	Falcon (Heidelberg, D)
Kryoröhrchen / Kryoboxen	Greiner (Frickenhausen, D)
Einbettkassetten	Roth (Karlsruhe, D)
Eppendorfcups	Eppendorf (Hamburg, D)
Gewebekulturflaschen	Sarstedt (Newton, USA)
Glaspipetten	Brandt (Wertheim, D)
Glasplättchen	Menzel (Braunschweig, D)
Gießschälchen	Leica (Nussloch, D)
Kanülen	Braun (Melsungen, D)
Knopfsonde	Rettberg (Göttingen, D)
Objektträger	Menzel (Braunschweig, D)
Petrischalen	Falcon (Heidelberg, D)
Pinsel	Wiederholdt (Göttingen, D)
Pinzetten	Rettberg (Göttingen, D)
Röhrchen	Falcon (Heidelberg, D)
Scheren	Rettberg (Göttingen, D)
Skalpell	Rettberg (Göttingen, D)
Spritzen	Braun (Melsungen, D)
Zellschaber	Sarstedt (Newton, USA)

## 2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Aqua bidest	Merck (Darmstadt, D)
Aqua dest	Merck (Darmstadt, D)
Avidin	Vektor (Burlingame, Kanada)
Biotin	Vektor (Burlingame, Kanada)
Bromochloroindolyl-Phosphat	Roche (Mannheim, D)
Ceftriaxon	Roche (Mannheim, D)
Citronensäure-Monohydrat	Merck (Darmstadt, D)
DePeX	Serva (Heidelberg, D)
Diaminobenzidin	Roche (Mannheim, D)
Diethyldithiocarbamat	Sigma (Deisenhofen, D)
Dimethylformamid	Sigma (Deisenhofen, D)
Dimethylsulfoxid	Sigma (Deisenhofen, D)
D-MEM	Gibco (Paysley, Scotland, UK)
D-PBS	Gibco (Paysley, Scotland, UK)
Ethanol	Merck (Darmstadt, D)
F12 (HAM)	Gibco (Paysley, Scotland, UK)
Ficoll Paque	Amersham (Freiburg, D)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt, D)
fötales Kälberserum	Gibco (Paysley, Scotland, UK)
Fura-2	Molecular Probes (Eugene, USA)

---

Geneticin F-480	Gibco (Paysley, Scotland, UK)
Hämalaun	Merck (Darmstadt, D)
Immu Mount	Thermo (Pittsburgh, USA)
Isolectin-B4	Sigma (Deisenhofen, D)
Kernechtrot	Merck (Darmstadt, D)
Lichtgrün	Chroma (Stuttgart, D)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt, D)
N-Acetylcystein	Sigma (Deisenhofen, D)
Natriumchlorid	Roche (Mannheim, D)
Nitroblau-Tetrazolium	Roche (Mannheim, D)
PBS / TBS	Biochrom (Berlin, D)
Pam3Cys	EMC Microcollections (Tübingen, D)
Paraffin (Paraplast)	Kendall (Mansfield, USA)
Penicillin / Streptomycin	Sigma (Deisenhofen, D)
RPMI 1640 (mit Glutamin)	Gibco (Paysley, Scotland, UK)
Tetrazoliumsalz	Roche (Mannheim, D)
Triton X-100	Sigma (Deisenhofen, D)
Trypsin	Sigma (Deisenhofen, D)
Trypanblau-Lösung	Sigma (Deisenhofen, D)
Wasserstoffperoxid	Merck (Darmstadt, D)
Xylol	Merck (Darmstadt, D)

## 2.1.4. Medien und Puffer

RPMI-Medium:	D-MEM-Medium:	WST-1-Medium:
89% RPMI	42% D-MEM	91% D-MEM
10% FCS	42% HAM F-12	9% WST-1
1% P/S	15% FCS	
	1% P/S	

Citratpuffer: 10 mmol Citronensäure-Monohydrat in Aqua dest, auf pH=6 eingestellt

PBS-Puffer: 9,55 g PBS in 1 Liter Aqua dest

TBS-Puffer: 50 mmol Tris und 150 mmol NaCl in Aqua dest, auf pH=7,5 eingestellt

NPT/BCIP-Pufferlösung: 100 mmol Tris, 100 mmol NaCl, 50 mmol MgCl<sub>2</sub> in Aqua dest auf pH=9 eingestellt; in 100 ml dieser Lösung je 450 µl BCIP und 350 µl NBT

## 2.1.5. Antikörper und Kits

Anti-Maus Ig-Antikörper (Schaf)	Amersham (Freiburg, D)
Digoxin DNA Labeling Mix Kit	Roche (Mannheim, D)
Monoklonal Maus Anti-Human CD68 (Makrophagen Klon KP1)	DAKO (Glostrup, Dänemark)
NSE LIAISON <sup>®</sup> KIT	DIASORIN (Saluggia, Italien)
Tailing Mix	Roche (Mannheim, D)
Vectastatin ABC (Avidin/Biotin-Komplex)	Vector (Burlingame, Kanada)

## 2.2. Zellkultur

### 2.2.1. SOD-WT-SH-SY5Y- und SOD-G93A-SH-SY5Y-Zellen

Beide Zelllinien waren ein Geschenk von Frau Professor Maria Theresa Carri (Universität Tor Vergata Rom, Italien). Bei SH-SY5Y Zellen handelt es sich um einen stabilen Subklon der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH, die 1970 aus dem Tumor einer 4-jährigen Patientin gewonnen wurde (Biedler et al. 1973). Die in der Arbeit verwendeten speziellen SH-SY5Y-Zellen überexprimieren entweder eine gentechnisch beigebrachte humane Wildtyp-Cu/Zink-Superoxid-Dismutase oder deren humane G93A-Mutante, die in Fällen familiärer ALS gefunden werden kann (Carri et al. 1997).

#### 2.2.1.1. Kultivierung

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen erfolgte in D-Mem-Medium in Gewebekulturflaschen (75 cm<sup>3</sup>). Die Flaschen wurden in einem Zell-Inkubator mit angefeuchteter Luft (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gelagert. Um die Stabilität der transfizierten Gene bei der Zellteilung zu gewährleisten, wurde den Medien Geneticin F-480 (200 µg/ml) zugesetzt. Dabei handelt es sich um ein Aminoglycosid-Antibiotikum, das eukaryontische Zellen durch die Hemmung der Proteinbiosynthese tötet. Die verwendeten WT- und G93A-Zellen trugen neben den transfizierten SOD-Genen ebenfalls ein Resistenzgen, welches sie selektiv gegen Geneticin unempfindlich machte. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Das Geneticin wurde 2 Tage vor Beginn der Experimente aus dem Medium entfernt.

#### 2.2.1.2. Trypsinisierung

Um die am Boden der Gewebekulturflaschen haftenden Zellen für Experimente zu verwenden, mussten sie vom Boden gelöst werden. Dieses erfolgte mit Hilfe des proteolytischen Enzyms Trypsin. Dazu wurde das Medium aus der Kulturflasche entfernt und anschließend 5 ml Trypsin direkt auf die Zellschicht am Boden gegeben.

Nach einigen Minuten hatten sich die Zellen vollständig vom Boden gelöst. Um einen Schaden der Zellen durch enzymatische Andauung zu verhindern, wurde das Trypsin unmittelbar nach Ablösung der Zellen durch Zugabe von 20 ml D-Mem-Medium geblockt. Die sich in Suspension befindenden Zellen wurden aus der Gewebekulturflasche abgenommen und zur weiteren Verwendung in ein 50-ml-Röhrchen überführt.

#### 2.2.1.3. Passagierung

Sobald die Zellen mikroskopisch vollständig konfluent waren, wurden sie in neue Gewebekulturflaschen passagiert. Dazu erfolgte die Trypsinisierung und anschließend eine Zentrifugation (1000 x g, 10 min, 4°C). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 48 ml Zellmedium resuspendiert. Jeweils 12 ml dieser Suspension wurden auf vier neue Gewebekulturflaschen verteilt.

#### 2.2.1.4. Auszählung

Für die Bestimmung der Zellzahl in einer Suspension wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Es wurden 10 µl der Suspension mit einer Pipette abgenommen und mit 90 µl Trypanblau-Lösung (unverdünnte Herstellerlösung) vermischt. Jeweils 10 µl dieser Mischung wurden pro Zählfeld in die Neubauer-Zählkammer überführt und die Zellzahl in allen 8 Großkammern bestimmt. Aus dem Mittelwert der vitalen (nicht blau gefärbten) Zellen ergab sich die Zellzahl pro ml durch Multiplikation mit dem Faktor  $1 \times 10^4$ .

#### 2.2.1.5. Ausplattierung

Für die experimentelle Verwendung der Zellen wurden diese in 24-Loch- oder 96-Loch-Gewebekulturplatten ausgesät. Dazu wurden die sich in Gewebekulturflaschen befindenden Zellen zunächst trypsinisiert, zentrifugiert und anschließend wieder

resuspendiert. Daraufhin erfolgte die Auszählung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer und die Verdünnung der Zellsuspension auf die gewünschte Zellkonzentration. Die Suspension wurde anschließend in die Löcher der Gewebekulturplatten pipettiert. Zellen, die später für Färbungen fixiert werden sollten oder für das Fura-2-Calcium-Video-Imaging aus der Gewebekulturplatte in die entsprechende Messapparatur überführt werden mussten, wurden auf Glasplättchen ( $d = 13 \text{ mm}$ ) ausgesät. Die Glasplättchen wurden mit einer Pinzette in die Löcher von 24-Loch-Gewebekulturplatten gelegt.

#### 2.2.1.6. WST-1-Zellvitalitätstest

Dieser Test beruht auf dem Umsatz von WST-1 (Tetrazoliumsalz) zu Formazan. Der Umsatz erfolgt nur in den Mitochondrien vitaler Zellen (avitale Zellen setzen kein WST-1 um) durch das Enzym Succinatdehydrogenase. Formazan wurde im Elisa-Reader photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt. Dabei war die Extinktion umso größer, je mehr vitale Zellen, bzw. je mehr Formazan, vorhanden waren. Die Tests erfolgten an Zellen, die in 96-Loch-Gewebekulturplatten kultiviert worden waren. Dafür wurde das Zellkulturmedium abgenommen, 100  $\mu\text{l}$  WST-1-Medium (siehe 2.1.4) pro Loch hinzugegeben und die Zellen für 2 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Messung im Elisa-Reader.

#### 2.2.1.7. Fixation

Zur histologischen Verarbeitung wurden auf Glasplättchen ausgesäte Zellen in Formaldehyd (4% in PBS) im Loch der Gewebekulturplatte fixiert. Dazu wurde das Medium komplett abgenommen und die Zellen für 30 min mit Formaldehyd bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abnahme des Formaldehyds wurde PBS zugegeben und die Gewebekulturplatte bei 4°C gelagert. Die Glasplättchen konnten zur weiteren Verarbeitung mit einer Pinzette aus dem Loch der Platte entnommen werden.

#### 2.2.1.8. Einfrieren / Auftauen

Um die SH-SY5Y-Zellen über einen längeren Zeitraum erhalten zu können, wurden sie in flüssigem Stickstoff bei  $-180^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Dazu wurden die Zellen nach Trypsinisierung und Zentrifugation in FCS mit anteilig 10% Dimethylsulfoxid resuspendiert und anschließend in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in Kryoboxen zunächst für 24 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Danach erfolgte die Umlagerung in  $-80^{\circ}\text{C}$  für weitere 24 h und schließlich die endgültige Lagerung in einem Stickstofftank. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen ins Wasserbad ( $37^{\circ}\text{C}$ ) gestellt und die Zellsuspension, sobald sie aufgetaut war, in Gewebekulturflaschen mit 12 ml Medium überführt.

#### 2.2.2. Experimente mit Pneumolysin

G93A-Zellen und WT-Zellen in Monokultur wurden mit dem bakteriellen Toxin Pneumolysin behandelt. Daneben wurden Experimente mit Pneumolysin unter Zusatz von Diethyldithiocarbamat oder N-Acetylcystein durchgeführt. Zur Erfassung der Zellvitalität nach der Behandlung mit dem Toxin wurde der WST-1-Zellvitalitätstest durchgeführt.

##### 2.2.2.1. Pneumolysin

Das in der Arbeit verwendete Pneumolysin war ein Geschenk von Professor T.J. Mitchell (Universität Glasgow, Schottland). Es wurde aus dem rekombinanten E.coli-Stamm JM109 durch Ionenaustauch-Chromatographie gewonnen. Die Reinheit des Toxins wurde mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und anschließender Coomassie-Blau-Färbung mit solitärer Anfärbung der 52-Kilo-Dalton-Bande bestimmt (Paton et al. 1993).

#### 2.2.2.2. Pneumolysin-Behandlung von G93A- und WT-Zellen

Es wurden zunächst G93A- und WT-Zellen in einer Konzentration von  $3 \times 10^4$  Zellen pro Loch in 96-Loch-Gewebekulturplatten ausgesät (pro Loch 150  $\mu$ l der Zellsuspension) und für 24 h inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Anschließend erfolgte die Abnahme des Mediums und die Zugabe von 150  $\mu$ l frischem Medium, das PLY (0,5  $\mu$ g/ml) enthielt. Bei Kontrollen wurde ebenfalls ein Mediumwechsel ohne den Zusatz von PLY durchgeführt. Die Zellen wurden nun für 3 h inkubiert. Danach wurde das Medium komplett abgenommen und die Zellen für die Vitalitätsbestimmung anschließend für 2 h in WST-1-Medium inkubiert.

#### 2.2.2.3. Pneumolysin / Diethyldithiocarbamat-Behandlung

G93A-Zellen und WT-Zellen wurden jeweils 24 h oder 72 h vor Pneumolysingabe in RPMI-Medium, das DETC (10  $\mu$ g/ml) enthielt, inkubiert. Anschließend wurden die in 2.2.2.2. beschriebenen Schritte durchgeführt. Bei den 24-h-Versuchen erfolgte die Zugabe des DETC erstmals mit dem Ausplattieren der Zellen. Bei den 72-h-Versuchen wurden die Zellen in Gewebekulturflaschen zunächst für 48 h in RPMI-Medium mit DETC inkubiert und anschließend in RPMI-Medium mit DETC ausplattiert. Das RPMI-Medium mit PLY enthielt DETC. Das WST-1-Medium war DETC-frei. Bei allen Versuchen wurden als Kontrollen ebenfalls nicht mit DETC behandelte Zellen ausplattiert und wie in 2.2.2.2. behandelt.

#### 2.2.2.4. Pneumolysin / N-Acetylcystein-Behandlung

WT-Zellen und G93A-Zellen wurden vor der PLY-Behandlung 24 h oder 72 h in RPMI-Medium, welches NAC (1 mmol) enthielt, inkubiert. Danach erfolgten die in 2.2.2.2. beschriebenen Schritte der PLY-Behandlung. Bei den 24-h-Versuchen erfolgte die Zugabe von NAC erstmals mit dem Ausplattieren der Zellen. Bei den 72-h-Versuchen wurden die Zellen in Gewebekulturflaschen zunächst für 48 h in RPMI-Medium mit NAC inkubiert und anschließend in RPMI-Medium mit NAC ausplattiert. Das Medium mit PLY enthielt 1 mmol NAC. Das WST-1-Medium war ohne NAC. Bei

allen Versuchen wurden als Kontrolle ebenfalls nicht mit NAC behandelte Zellen ausplattiert und wie in 2.2.2.2. behandelt.

### 2.2.3. Co-Kultur aus WT- oder G93A-Zellen und Makrophagen

G93A- oder WT-Zellen wurden in Co-Kultur mit Makrophagen gebracht und mit dem bakteriellen Bestandteil Pam3Cys inkubiert. Die Makrophagen wurden aus menschlichem Blut präpariert. Sie mussten sich zunächst aus präparierten Monozyten differenzieren. Zur Erfassung des Zellschadens in der Co-Kultur wurde die neuronenspezifische Enolase (NSE) gemessen.

#### 2.2.3.1. Monozyten- / Makrophagen-Präparation

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von primären humanen Monozyten wurden frische buffy coats aus dem Blut gesunder Spender der Abteilung für Transfusionsmedizin im Klinikum der Georg-August-Universität Göttingen verwendet. Buffy coats entstehen bei der Herstellung von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten. Sie enthalten neben den peripheren mononukleären Blutzellen (PMBC) als Verunreinigungen auch Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Die Gewinnung der PMBC-Fraktion, die sich aus Monozyten und Lymphozyten zusammensetzt, erfolgte nach der Ficoll-Hypaque-Methode (Boyum 1984). Ficoll ist eine Lösung eines Polysaccharid-ähnlichen Makromoleküls mit einer Dichte von 1077 g/ml. Dadurch können mittels einer Dichtegradientenzentrifugation Monozyten und Lymphozyten an einer Ficoll-Interphase konzentriert werden, während Erythrozyten und Granulozyten sich nach unten absetzen. Zur Trennung der Monozyten von den Lymphozyten wird die Fähigkeit der Monozyten zur Adhärenz an den Polyesteroberflächen von Petrischalen genutzt. Während die Monozyten am Boden von Petrischalen haften und sich innerhalb von 10 bis 14 Tagen zu Makrophagen differenzieren, verbleiben die Lymphozyten frei schwimmend als Überstand im Medium und können beim Mediumwechsel mit abgenommen werden. Im Folgenden werden die einzelnen Versuchsschritte der Ficoll-Hypaque-Methode beschrieben:

Zunächst wurden 15 ml Ficoll in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit 30 ml buffy coat langsam überschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 2000 rpm mit vollständig ausgeschalteter Bremse. Die entstandene Ficoll-Interphase wurde abgenommen, in ein neues 50-ml-Röhrchen überführt und 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das verbleibende Pellet in 10 ml D-PBS resuspendiert und anschließend für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Es wurde erneut der Überstand abgenommen und das verbleibende Pellet in RPMI-Zellkulturmedium resuspendiert. Je 6 ml RPMI-Medium wurden daraufhin in Petrischalen (Fläche = 53 cm<sup>2</sup>) vorgelegt und jeweils 1 ml der mononukleären Zellsuspension hinzugegeben. Zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen in der Petrischale wurde diese mehrmals horizontal geschwenkt. Daraufhin wurden die Zellen für 2 h inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Während die Monozyten in dieser Zeit absanken und am Boden adhärirten, verblieben die Lymphozyten schwimmend im Überstand. Nach Ablauf von 2 h erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem ein Großteil der Lymphozyten bereits mit abgenommen wurde. Die Monozyten wurden nun für 10 bis 14 Tage in RPMI-Medium bei angefeuchteter Atmosphäre inkubiert. In diesem Zeitraum erfolgte die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel durch Absaugen des Mediums mit einer sterilen Glaspipette in ein Auffanggefäß, das über einen Gummischlauch mit einer Pumpe verbunden war.

#### 2.2.3.2. Makrophagenernte

Nach 10 bis 14 Tagen Inkubationszeit wurden die Makrophagen geerntet. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen in der Petrischale mit PBS zur Entfernung restlicher Lymphozyten gewaschen. Nach Abnahme des PBS und Zugabe von 1 ml RPMI-Medium pro Petrischale, wurden die Makrophagen mit einem Zellschaber vorsichtig vom Boden der Petrischale gelöst. Es wurden weitere 4 ml Medium in die Petrischale gegeben und die sich damit in Suspension befindenden Makrophagen in ein 50-ml-Röhrchen überführt. Die Suspension wurde für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert und das Makrophagen-Pellet anschließend in 5 ml Medium resuspendiert. Die Makrophagen konnten anschließend in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und auf die gewünschte Konzentration verdünnt werden.

#### 2.2.3.3. Ansatz der Co-Kultur

Es wurden zunächst 500 µl WT-Zellen oder G93A-Zellen in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml in eine 24-Loch-Gewebekulturplatte ausplattiert. Anschließend erfolgte für 24 h eine Inkubation in RPMI-Medium (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Daraufhin wurde das Medium abgenommen und pro Loch 300 µl frisch geerntete Makrophagen in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml auf die SH-SY5Y-Zellen gegeben. In einer folgenden 3-stündigen Inkubation sanken die Makrophagen im Medium ab und adhärten am Boden der Neuroblastomzellkultur. Nach Ablauf der Inkubation wurde das Medium abgenommen und durch 500 µl frisches Medium, welches wahlweise Pam3Cys (10 µg/ml) enthielt, ersetzt. Die Co-Kulturen wurden nun für 24 h oder 72 h inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Danach wurden die Überstände abgenommen, in Eppendorf-Cups überführt und bei -20°C eingefroren. In jeder Versuchsgruppe wurden außerdem Zelllysen mit Triton X-100 (0,9% in PBS) zur Bestimmung der maximalen NSE-Konzentration in einer Co-Kultur durchgeführt.

#### 2.2.3.4. Co-Kultur mit N-Acetylcystein

Als zusätzliches Experiment wurde im Co-Kulturmodell RPMI-Medium mit NAC in einer Konzentration von 1 mmol verwendet. In diesem Medium wurden WT- und G93A-Zellen in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml suspensiert und dann die in 2.2.3.3. beschriebenen Schritte durchgeführt.

#### 2.2.3.5. Neuronenspezifische Enolase-Messung

NSE, ein Enzym des Zuckerstoffwechsels, wurde aus dem Überstand von humanen Makrophagen und G93A- oder WT-Neuroblastomzellen in Co-Kultur mittels zweiseitigem immunluminometrischen Assay (Sandwichtest) bestimmt. Die Messungen erfolgten im vollautomatischen LIAISON<sup>®</sup>-Analyser unter Verwendung des NSE LIAISON<sup>®</sup> KIT.

### 2.3. Calciummessungen mittels Fura-2-Calcium-Video-Imaging

Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Manoj Kumar Jaiswal aus der Abteilung Physiologie der Universität Göttingen durchgeführt.

#### 2.3.1. Prinzip

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen, die nach Anregung von Licht bestimmter Wellenlängen, die im Absorptionsspektrum des Farbstoffes liegen, Licht niedrigerer Energie emittieren. Sind solche Fluoreszenzstoffe membrangängig, können sie in lebende Zellen eindringen und dort dargestellt werden. Einige Farbstoffe ändern ihre Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit intrazellulärer Parameter wie zum Beispiel der Calciumkonzentration oder des pH-Wertes. Durch die Messung der Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes können Aussagen über diese Parameter in lebenden Zellen getroffen werden.

#### 2.3.2. Fura-2

Zur fluoreszenzmikroskopischen Messung des zytosolischen Calciums in WT- und G93A-Zellen vor und nach Behandlung mit Pneumolysin wurde der Farbstoff Fura-2 eingesetzt. Dieser Farbstoff liegt zunächst als Acyetoxy-methylester vor. In dieser Form ist Fura-2 lipophil und damit membrangängig. Bei der Inkubation mit Zellen diffundiert der Farbstoff durch die Zellmembran und wird intrazellulär durch unspezifische Esterasen gespalten. Dadurch entsteht eine hydrophile Form des Farbstoffes die nicht mehr membrangängig ist und sich im Zytosol der Zelle anreichert. Fura-2 bindet als selektiver Calciumchelator das zytosolische Calcium. Die Dissoziationskonstante des Calcium / Fura-2-Komplexes liegt mit 224 nmol im Bereich der physiologischen intrazellulären Calciumkonzentration und ist vom pH-Wert weitestgehend unabhängig. Das Absorptionsspektrum von calciumfreiem Fura-2 hat ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 363$  nm. Durch die Bindung von Calcium an Fura-2 verschiebt sich dieses Spektrum zu einem Absorptionsmaximum von  $\lambda = 335$  nm. In beiden Fällen wird von Fura-2 Licht einer Wellenlänge von  $\lambda = 510$  nm

emittiert. Die Intensität der Emission ist von der Calciumkonzentration abhängig. Durch Anregung von Fura-2 mit verschiedenen Wellenlängen und Bildung des Verhältnisses der gemessenen Emissionsintensitäten (Ratio) erhält man ein direktes Maß für das zytosolische Calcium, das von potentiellen Störfaktoren wie Hintergrundintensität und Zelldicke weitgehend unabhängig ist. Die Ratio (R) als Maß für die zytosolische Calciumkonzentration ist unabhängig von der unterschiedlichen Farbstoffbeladung der jeweiligen Zelle. In den durchgeführten Experimenten wurden zur Ermittlung der Ratio Wellenlängen gewählt, bei denen der Unterschied in den Absorptionsspektren zwischen calciumbeladenem und calciumfreiem Fura-2 möglichst groß ist. Für calciumbeladenes Fura-2 war dies bei  $\lambda = 340$  nm, für calciumfreies Fura-2 bei  $\lambda = 380$  nm der Fall. Es wurde in kurzer zeitlicher Abfolge mit  $\lambda = 340$  nm und  $\lambda = 380$  nm angeregt und aus den erhaltenen Emissionsintensitäten das Verhältnis  $R_{340/380}$  gebildet. Aus diesem Verhältnis ließ sich unter Einsatz der Formel von Grynkiewicz mit der Fluoreszenz-Ratio ein direktes Maß der zytosolischen Calciumkonzentration bestimmen (Tsien et al. 1982; Grynkiewicz et al. 1985; Ladewig und Keller 2000).

### 2.3.3. Aufbau der Messapparatur

Für die Calciummessungen stand ein Invert-Fluoreszenzmikroskop zur Verfügung. Es wurde ein Objektiv mit 40-facher Vergrößerung eingesetzt. Die Lichtquelle für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen bestand aus einem Monochromator. Mit diesem Gerät, das von einem Personal Computer angesteuert wurde, konnte Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm erzeugt werden. Das Licht wurde über einen  $45^\circ$  zum Strahlengang gerichteten dichroischen Spiegel auf die Zellen gelenkt. Der Spiegel war so gewählt, dass Licht der Anregungswellenlängen reflektiert wurde, während Licht der Emissionswellenlänge (510 nm) passieren konnte. Das Fluoreszenzbild wurde von einer Charge-Coupled-Device-Kamera erfasst. Die Kamera leitete die Bilder an einen Personal Computer weiter, auf dem sie online mit der Till Vision Software (Till Photonics, Martinsried, D) ausgewertet wurden. Die Software erlaubte eine separate Auswertung für jede einzelne Zelle. Weitere Auswertungen wurden offline mit der IGOR Software (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) vorgenommen. Die Fläche unter der Kurve (AUC) von Calciumkonzentration-

versus-Zeit-Kurven wurde unter Verwendung der Baseline 0 mit der Formel  $\ln[Ca]_i \cdot t = \int_{t_1}^{t_2} [Ca]_i \cdot dt$  errechnet ( $\ln$ =Fluoreszenzintensität unter der Zeit-Konzentrations-Kurve;  $[Ca]_i$ =zytosolisches Calcium;  $t$ =Zeit). Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Origin Software (Originlab, Northampton, USA). Die Ermittlung der maximalen zytosolischen Calciumkonzentration für einzelne Zellen erfolgte ebenfalls mit der Origin Software durch manuelle, mausgesteuerte Erfassung des höchsten Calciumkonzentrations-Peak der Calciumkonzentration-versus-Zeit-Kurve jeweils einer Zelle.

#### 2.3.4. Präparation der Zellen für das Calcium-Video-Imaging

WT- und G93A-Zellen wurden auf Glasplättchen in 24-Loch-Gewebekulturplatten ausgesät und für 2 Tage in RPMI-Medium inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Anschließend erfolgte im Loch der Gewebekulturplatte die Inkubation mit 10 µM Fura-2 für 30 min bei 37°C. Das RPMI-Medium enthielt eine Calciumkonzentration von 0,846 mmol (Herstellerangaben). Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen 30 min in RPMI-Medium gewaschen. Für die Messungen wurde das Glasplättchen, auf dem die Zellen hafteten, in eine Plexiglaskammer (d = 15 mm) unter das Objektiv des Mikroskops gelegt und für 20 min mit RPMI-Medium, das Pneumolysin (0,5 µg/ml) enthielt, behandelt. Die Kammer fasste ca. 250 µl Medium, welches durch die Kammer zirkulierte. Dafür war die Kammer an zwei Gummischläuche und eine peristaltische Pumpe mit Absaugvorrichtung angeschlossen. Auf diese Weise wurde in der Kammer ein konstanter Flüssigkeitsspiegel trotz eines kontinuierlichen Flüssigkeitswechsel gewährleistet.

## 2.4. Tierversuche

### 2.4.1. G93A-transgene Mäuse

Die verwendeten G93A-transgenen Mäuse hatten den genetischen Hintergrund C57B6-SJL und trugen das mutierte humane G93A-Gen, das ursprünglich gentechnisch beigebracht wurde, zusätzlich in ihrem Genom. Alle Tiere wurden aus der Zucht der Tierexperimentellen Abteilung des Klinikums der Georg-August-Universität Göttingen bezogen. Für die Versuche wurden ausschließlich weibliche Mäuse verwendet. G93A-Mäuse erkrankten typischerweise im Alter von ca. 3 bis 4 Monaten und versterben mit ca. 5 bis 6 Monaten an den Folgen der Erkrankung. Um das Leiden der Tiere nicht unnötig zu verlängern, wurden sie bei einem Gewichtsverlust von mehr als 15% ihres gesunden Maximalgewichts oder der Unfähigkeit, sich innerhalb von 30 Sekunden aus der Seitenlage selbstständig aufzurichten, getötet. Die Tötung erfolgte unter Ätherbetäubung durch Genickbruch. Alle Mäuse wurden in Käfigen bei Raumtemperatur in einem 12 Stunden Licht- und 12 Stunden Dunkelzyklus gehalten. Es bestand jederzeit Zugang zu Wasser und Nahrung.

### 2.4.2. *Streptococcus pneumoniae*

Für die intraperitonealen Infektionen der Tiere wurde der Typ-3 Stamm von *Streptococcus pneumoniae* verwendet, der ursprünglich bei einem Menschen mit Meningitis isoliert wurde. Der Stamm war ein Geschenk von Professor M. Täuber, Universität Bern, Schweiz. Die Bakterien waren bei -80°C eingefroren und wurden für die Versuche bei Raumtemperatur aufgetaut.

### 2.4.3. Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*

Im Alter von 2 Monaten erhielten die Mäuse erstmals eine intraperitoneale Infektion mit *S. pneumoniae* in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^5$  Keimen / ml. Eine mit dieser Keimkonzentration infizierte, aber nicht antibiotisch behandelte G93A-Kontrollmaus, verstarb innerhalb von 48 h. Für die erzielte Keimkonzentration wurde das Inokulum

in 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt. Diese Keimlösung wurde in 2 ml Spritzen (Kanüle 0,4 x 12 mm) aufgezogen, die Maus oberhalb der Harnblase in der Medianlinie punktiert und 500 µl Inokulum intraperitoneal injiziert. Einer Vergleichsgruppe von Mäusen, die keine Infektion erhielt, wurden 500 µl Natriumchlorid-Lösung (0,9%) injiziert. Im Abstand von jeweils 30 Tagen erfolgten in der Infektionsgruppe noch drei weitere Infektionen, so dass insgesamt 4 intraperitoneale Infektionen vorgenommen wurden.

#### 2.4.4. Bestimmung der Inokulumkonzentration

Die Bestimmung der Keimkonzentration des Inokulums erfolgte mit Hilfe einer Verdünnungsreihe. Dafür wurden in 8 Eppendorfcups je 450 µl Natriumchlorid (9%) vorgelegt. 50 µl des Inokulums wurden in den ersten Cup pipettiert und aus dieser Lösung wiederum 50 µl in den zweiten Cup überführt. Diese Verdünnungsschritte wiederholten sich bis zum achten Cup. Je 10 µl aus jeder Verdünnungsstufe wurden auf eine Blut-Agarplatte gegeben und 24 h bei 37°C inkubiert. Zur Ermittlung der Inokulumkonzentration (KbE / ml) wurde die Kolonie-Anzahl in der Verdünnungsstufe mit den wenigsten Kolonien mit dem Faktor 100 und der Zehnerpotenz der entsprechenden Verdünnungsstufe multipliziert.

#### 2.4.5. Antibiose mit Ceftriaxon

Nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* erfolgte die antibiotische Behandlung mit Ceftriaxon (10 mg/ml) über 72 h. Die erste antibiotische Behandlung wurde 12 Stunden nach der Infektion durchgeführt. In einem Rhythmus von 12 Stunden erfolgten konsekutiv 5 weitere Antibiosen. Das Antibiotikum wurde subkutan, im Bereich des Nackens, mit einer 2 ml Spritze (Kanüle 0,4 x 12 mm) appliziert. Die Volumina des verabreichten Antibiotikums richteten sich nach dem Gewicht der Mäuse. Das zehnfache Gewicht einer Maus in Gramm wurde als das zu injizierende Volumen in Mikrolitern (entsprechend 100 mg / Kg) bestimmt. Es wurden auch die nicht infizierten, aber mit NaCl intraperitoneal injizierten Mäuse, antibiotisch behandelt.

#### 2.4.6. Klinisch-neurologischer Score

Bei nicht erkrankten Tieren erfolgte dreimal pro Woche und bei erkrankten Tieren täglich, eine Beurteilung des klinisch-neurologischen Status. Dafür wurde auf einen klinischen Score, der im Folgenden aufgeführt ist, zurückgegriffen:

- Score 0: kein pathologischer Befund
- Score 1: abnormaler Schwanzreflex oder Tremor in mindestens einer Extremität oder asymmetrisches Gangbild
- Score 2: leichte Parese in mindestens einer Extremität
- Score 3: hochgradige Parese in mindestens einer Extremität
- Score 4: selbstständiges Aufrichten aus der Seitenlage innerhalb von 30 Sekunden nicht mehr möglich.

#### 2.4.7. Seiltest

Zur Beurteilung von Kraft und motorischen Fähigkeiten der Mäuse wurde der Seiltest verwandt. Dabei war ein 60 cm langes, dünnes Seil zwischen zwei Plattformen an Masten gespannt. Plattformen und Seil befanden sich in 30 cm Höhe über dem Boden. Für den eigentlichen Test wurden die Mäuse mit den Vorderpfoten an die Mitte des Seils gesetzt. Gesunde Mäuse versuchten nach vorherigem Training mit Hilfe aller Pfoten und des Schwanzes, den sie um das Seil rollten, eine Plattform an einem der Seilenden zu erreichen. Kranke Mäuse zeigten Defizite im Einsatz von Extremitäten oder Schwanz sowie in der zum Erreichen des Ziels benötigten Zeit. Der Einsatz von Pfoten und Schwanz sowie die Zeit (gemessen mit einer Stoppuhr), innerhalb welcher die G93A-transgenen Mäuse das Ziel erreichten, wurden mit Hilfe des Wellmer-Scores ausgewertet (Wellmer et al. 2000). Die Parameter dieses Scores werden im Folgenden beschrieben:

Mäuse die ein Seilende in weniger als 6 Sekunden erreichten, bekamen den Score 0. Für alle weiteren 6 Sekunden wurde ein zusätzlicher Scorepunkt addiert. Tiere, die mehr als 60 Sekunden am Seil hingen ohne herunterzufallen, das Ziel jedoch nicht erreichten, bekamen den Score 11. Fielen Mäuse vor Ablauf von 60 Sekunden vom Seil, wurde für alle 6 Sekunden (absteigend von 60 Sekunden) jeweils ein

Scorepunkt zum Score 11 addiert, so dass ein Maximalscore von 20 erreicht werden konnte.

#### 2.4.8. Rotarod

Als weiterer Test für die motorischen Fähigkeiten und die Kraftausdauer der Mäuse wurde das Rotarod verwendet. Die Mäuse wurden auf eine sich mit 12 Umdrehungen pro Minute rotierende Rolle gesetzt. Um nicht herunterzufallen, mussten sich die Tiere entgegen der Drehrichtung der Rolle bewegen, was ihnen vorher über einen Zeitraum von 1 bis 2 Wochen antrainiert wurde. Fielen die Tiere von der Rolle, wurde dies vom Gerät vermerkt und die Zeit aufgezeichnet, in welcher sich die Tiere auf der Rolle halten konnten. Der Test wurde ab einem Mausalter von 1,5 Monaten zweimal pro Woche durchgeführt. Pro Versuchstag wurde jede Maus dreimal in einem Abstand von 30 min getestet und die Rotarod-Leistung mit der jeweils besten Zeit gewertet. Hatten Mäuse in einem Durchgang, ohne herunterzufallen, mehr als 300 Sekunden auf der Rolle getreten, wurden sie wieder heruntergesetzt und mit Maximalzeit (300 s) bewertet.

#### 2.4.9. Präparation des Mausgehirns

Zunächst wurde der Kopf der Maus mit einer Schere abgetrennt und die Kopfhaut in der Medianlinie zur Freilegung des knöchernen Schädels aufgeschnitten. Vom Foramen magnum ausgehend wurde der Schädel in der Medianlinie bis zur hinteren Schädelnaht aufgeschnitten. Mit Hilfe eines Skalpells wurden die oberen Schädelanteile seitlich weggebrochen und das Gehirn freigelegt. Nach der Abtrennung des Bulbus olfactorius mit dem Skalpell wurde das Gehirn mit einer Knopfsonde angehoben um die Hirnnerven durchtrennen zu können. Das Gehirn konnte jetzt mit einer Pinzette aus der Schädelgrube gehoben werden. Zur Fixierung wurde das Gehirn für eine Woche in 4 % Formaldehyd eingelegt. Anschließend wurde es in eine Einbettkassette gelegt und für 24 h in PBS belassen.

#### 2.4.10. Präparation des Mause Rückenmarks

Zunächst wurde die knöcherne Wirbelsäule in toto entnommen. Das Rückenmark wurde nicht sofort entnommen, sondern noch in der Wirbelsäule befindlich für eine Woche in 4% Formaldehyd fixiert. Für die eigentliche Präparation des Rückenmarks wurde, beginnend mit dem ersten Halswirbel, eine spitze Schere seitlich in den Wirbelkanal neben dem Rückenmark eingeführt. Diese Technik ermöglichte auf beiden Seiten eine Durchtrennung der Wirbelbögen jedes einzelnen Wirbels. Dadurch war die Entfernung der dorsalen Wirbelsegmente zur Freilegung des Rückenmarks möglich. Dieses wurde anschließend mit einer Pinzette von kranial nach kaudal aus dem nach dorsal offenen Wirbelkanal gezogen. Damit das Rückenmark später in einen Paraffinblock eingebettet werden konnte, wurde es mit einem Skalpell in 3 mm lange Stücke geschnitten. Die Stücke wurden später in einem Gießschälchen aufgestellt. Zuvor wurden sie in Einbettkassetten gelegt und 24 h in PBS belassen.

#### 2.4.11. Herstellung von Paraffin-Schnittpräparaten

Um aus in Formaldehyd eingelegtem Nervengewebe dünne und gleichmäßige Schnitte für mikroskopische Präparate herstellen zu können, wurde das Gewebe in heißes Paraffinwachs getränkt, das bei Abkühlung erstarrte. Da Paraffin nicht wasserlöslich ist, wurde das Gewebe zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurde der Alkohol durch das Intermedium Xylol entfernt und folgend das Xylol durch heißes Paraffinwachs ersetzt. Die von Paraffin durchtränkten Gewebestücke wurden in ein Gießschälchen gelegt, mit heißem Paraffin überschichtet und zu einem Paraffinblock verarbeitet. Nach Erkalten des Paraffins wurde der Block aus der Gießform geschlagen. Zum Anfertigen von Paraffinschnitten wurde ein Schlittenmikrotom verwendet. Der Block wurde bis unmittelbar unter die Schnittebene des beweglichen Messers eingespannt und die Schneide gegen den Block geführt. Dabei schob sich der Schnitt von 1 bis 2 Mikrometer Dicke auf das Messer des Schlittenmikrotoms. Von dort wurde er mit einem angefeuchteten Pinsel abgehoben und in ein Wasserbad übertragen. Hierdurch wurde der Schnitt gestreckt und von Falten befreit. Abschließend wurden die Schnitte auf saubere und fettfreie Objektträger aufgezogen.

## 2.5. Histochemie und Immunhistochemie

### 2.5.1. Hämalaun-Färbung

Auf Glasplättchen fixierte Zellen wurden in Aqua dest gewaschen und für 3 min mit Hämalaun (unverdünnte Herstellerlösung) bedeckt. Nach Abnahme der Hämalaunlösung wurden die Zellen fünfmal in Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurde das Glasplättchen unter der Verwendung von Immu Mount auf einem Objektträger eingedeckelt.

### 2.5.2. In-situ-Tailing

Bei der Methode des In-situ-Tailing handelt es sich um ein Verfahren, mit dem die DNA-Doppelstrangbrüche apoptotischer Zellen sichtbar gemacht werden können. Das Enzym Terminale Transferase katalysiert die Verknüpfung von Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP) mit 3'Hydroxylenden von Einzel- oder Doppelstrang-DNA-Molekülen unter Freisetzung von anorganischem Phosphat. Ein Teil des dNTP ist mit dem Steroidhaptan Digoxigenin markiert. Mit Hilfe eines mit alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-Digoxigenin-Antikörpers, der in einem späteren Schritt mit einem Farbsubstrat reagiert, können so bei apoptotischem Zelluntergang entstehende DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden.

Auf Glasplättchen fixierte Zellen wurden 30 min in Triton X-100 (0,1% in TBS) permeabilisiert und dreimal in TBS gewaschen. Je Glasplättchen wurden 50 µl einer Lösung, bestehend aus 36,5 µl Aqua dest, 12,5 µl Tailing Mix und 1 µl Digoxin DNA Labeling Mix gegeben und für eine Stunde bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Die Zellen wurden fünfmal in TBS gewaschen und für 30 min zum Blocken in FCS-Lösung (10% in TBS) inkubiert. Daraufhin wurde der Anti-Digoxigenin-Antikörper (1:250 in TBS verdünnt) aufgetragen, 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und die Zellen anschließend fünfmal in TBS gewaschen. Durch Inkubation in NBT/BCIP-Pufferlösung wurden die Zellen für ca. 5 min entwickelt, bis eine Farbreaktion eingetreten war. Abschließend erfolgte für 10 min eine Gegenfärbung mit dem Farbstoff Kernechtrot (unverdünnte Herstellerlösung), die Spülung in

Leitungswasser und das Eindeckeln der Glasplättchen mit Immu Mount auf Objektträgern.

### 2.5.3. Lichtgrün / CD68-Doppelfärbung

Bei dieser Doppelfärbung wurden die SH-SY5Y Zellen mit dem Farbstoff Lichtgrün und die Makrophagen mit Hilfe der CD68-Färbung dargestellt. Die CD68-Färbung beruht auf der sogenannten labeled Avidin-Biotin-Methode. Es wurde das lysosomale CD68-Antigen, das in Makrophagen exprimiert wird, mit einem spezifischen Primärantikörper markiert. Dieser Antikörper wurde wiederum von einem biotinylierten Sekundärantikörper gebunden, der mit seinem Biotinrest einen Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex band. Durch Zugabe eines Chromogens wurde die Peroxidase infolge einer enzymatischen Spaltungsreaktion sichtbar gemacht.

Auf Glasplättchen fixierte Zellen wurden 30 min in Triton X-100 (0,1% in PBS) permeabilisiert und anschließend dreimal in PBS gewaschen. Für 90 min erfolgte die Inkubation mit einem monoklonalen Maus Anti-Human CD68 Antikörper (1:50 in PBS verdünnt). Die Zellen wurden dreimal in PBS gewaschen und für 45 min mit einem monoklonalen biotinyliertem Anti-Maus Antikörper (1:200 in PBS) aus dem Schaf bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Avidin-Biotin-Komplex aufgetragen und die Zellen für 45 min bei Raumtemperatur darin belassen. Nach der Entwicklung mit dem Chromogen DAB für ca. 5 min wurde mit Aqua dest gespült und 1 min in Lichtgrün (unverdünnte Herstellerlösung) gefärbt. Die Zellen wurden erneut mit Aqua dest gespült, für jeweils 1 min in eine aufsteigende Alkoholreihe gestellt, und schließlich zweimal 5 min mit Xylol behandelt. Abschließend erfolgte die Eindeckelung der Glasplättchen auf Objektträgern mit DePeX.

### 2.5.4. Isolectin-B4-Färbung

Mikrogliazellen in Paraffinschnitten aus ZNS-Gewebe der Mäuse wurden mit Isolectin-B4, einem pflanzlichen Zellmembranprotein, angefärbt. Das Isolectin-B4 war mit Biotinmolekülen konjugiert und konnte wie ein biotinylierter Sekundärantikörper

(siehe 2.5.3.) weiterentwickelt werden. Dafür mussten die Schnitte zunächst entparaffiniert werden. Sie wurden für 30 min in Xylol und anschließend für je 3-5 min in eine absteigende Alkoholreihe gestellt. Der Alkohol wurde durch Spülen in Aqua dest entfernt und die Schnitte zur Antigendemaskierung anschließend fünfmal 3 min in Citratpuffer bei 800 Watt in der Mikrowelle gekocht. Damit die Schnitte nicht austrockneten, wurde nach jedem Kochschritt abwechselnd Citratpuffer (0,1 molar) oder Aqua bidest nachgefüllt. Nach erneutem Spülen in Aqua dest wurden die Schnitte für 10 min in Wasserstoffperoxid-Lösung (3% in PBS) gestellt und folgend dreimal in PBS gewaschen. Jeder Schnitt wurde daraufhin mit 100 µl FCS-Lösung (10% in PBS) bedeckt und für 30 min in der feuchten Kammer inkubiert. Nach Zugabe von je 100 µl Isolectin-B4-Lösung (5 µg/ml in PBS) wurden die Schnitte für 90 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert und anschließend dreimal in PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl Avidin-Biotin-Lösung (je 1:100 in PBS) pro Schnitt und Inkubation für 60 min in der feuchten Kammer, wurde jeder Schnitt erneut dreimal in PBS gewaschen. Durch Inkubation in DAB wurden die Schnitte für ca. 5 min entwickelt, bis eine Farbreaktion eingetreten war. Abschließend wurden die Schnitte in Aqua dest gespült, für 20 Sekunden in Hämalaun getaucht und nach erneutem Waschen in Aqua dest mit Immu Mount auf Objektträgern eingedeckelt.

## 2.6. Auszählung aktivierter Mikrogliazellen

Für jede Maus beider Versuchsgruppen wurden jeweils 6 Isolectin-B4-Schnittpräparate des Rückenmarks ausgezählt. Um jeweils in der gleichen Segmenthöhe des Rückenmarks zu zählen, wurde sich an der mikroskopisch gut zu erkennenden Intumescencia cervicalis orientiert. Die Auszählung der Präparate erfolgte blind, ohne Kenntnis der Versuchsgruppe. Es wurden alle aktivierten Mikrogliazellen eines Rückenmark-Schnittpräparates gezählt.

## 2.7. Auszählung der Apoptosen in In-situ-Tailing-Präparaten

WT- und G93A-Zellen wurden 3 h mit PLY (0,5 µg/ml) behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert (4% Formaldehyd) und die Apoptosen durch In-situ-Tailing sichtbar gemacht (siehe 2.5.2). Das In-situ-Tailing erfolgte auch an nicht mit PLY behandelten Kontrollen. Pro Versuchsgruppe wurden je 6 Präparate bzw. Glasplättchen, auf denen Zellen hafteten (Siehe 2.2.1.5.), ausgezählt. In jedem Präparat wurden alle nicht apoptotischen und alle apoptotischen Zellen gezählt. Die Zahl der Apoptosen wurde ins prozentuale Verhältnis zur Zahl der übrigen Zellen des gleichen Präparates gesetzt. Die Auszählung erfolgte für jedes Präparat unter Unkenntnis der Versuchsgruppe.

## 2.8. Statistik

Statistische Analysen und graphische Darstellungen wurden mit Hilfe der Graph Pad Prism Software (SanDiego, USA) und der Origin Software (Northampton, USA) erstellt. Die Ergebnisse sind entweder als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung oder Mediane mit Minimum und Maximum angegeben. Zum Vergleich der Mittelwerte mehrerer Gruppen wurde eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) mit der Korrektur nach Bonferroni verwendet. Für den Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen wurde der t-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Die Mediane wurden mittels des U-Tests von Mann-Whitney miteinander verglichen. Für Werte, welche als Prozent zur Kontrolle dargestellt sind, wurde zur Berechnung der Standardabweichung das Gesetz der Fortpflanzung berücksichtigt. Gruppen, die sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von  $< 5\%$  unterschieden, wurden als statistisch signifikant different angenommen. Die Signifikanzniveaus wurden bei den einzelnen Experimenten entsprechend dargestellt (p<0,001: \*\*\*; p<0,01: \*\*; p<0,05: \*).

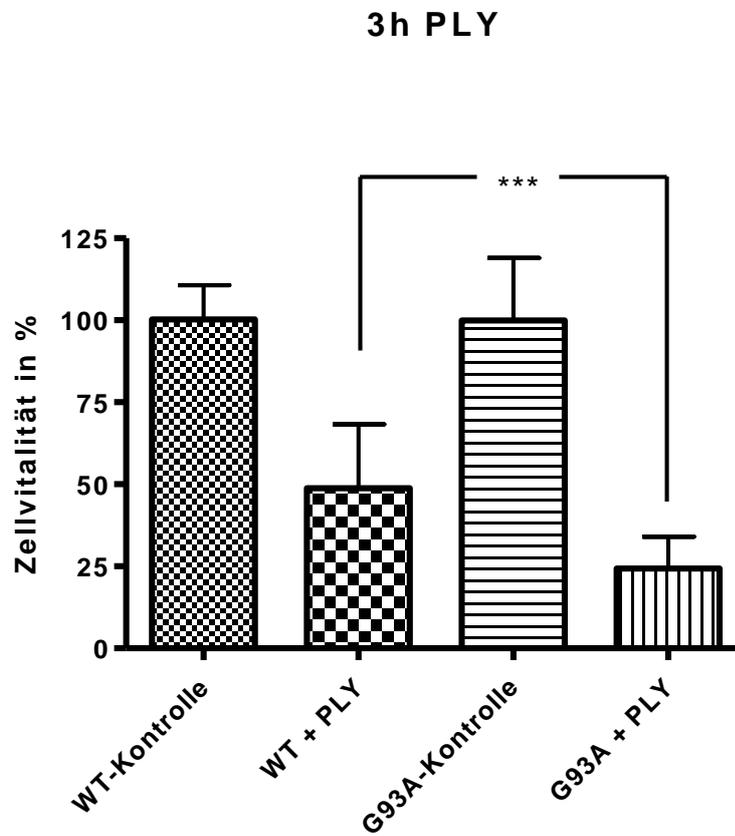
### 3. Experimente und Ergebnisse

#### 3.1. Empfindlichkeit von G93A- und WT-Zellen gegenüber Pneumolysin

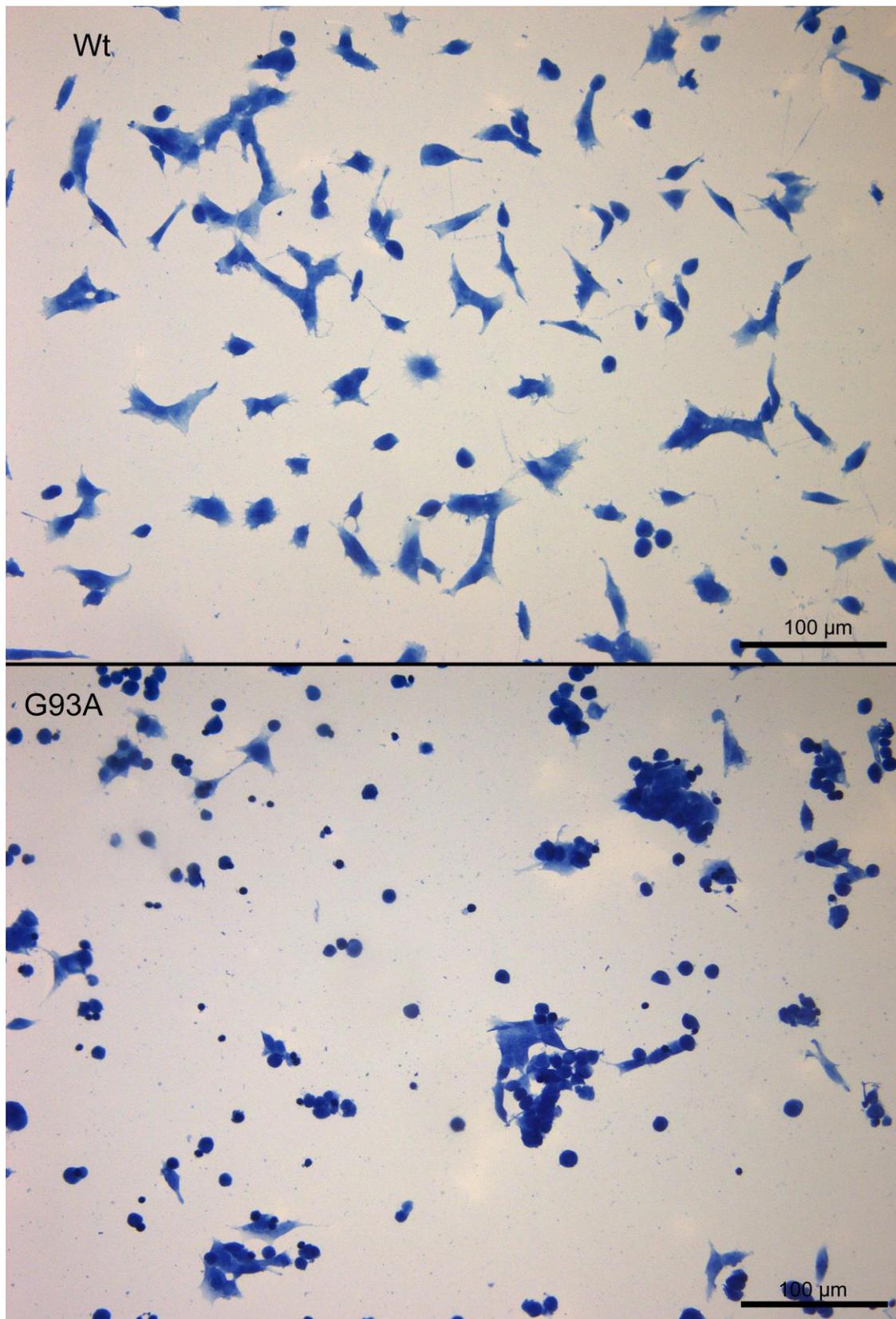
G93A- und WT-Zellen wurden über 3 h mit PLY (0,5 µg/ml) behandelt. Zur Quantifizierung des verbleibenden Anteils vitaler Zellen nach der Inkubation mit dem Toxin wurde an allen Zellen der WST-1-Zellvitalitätstest durchgeführt. Die Extinktionswerte von unbehandelten G93A- und WT-Gruppen wurden als 100% Zellvitalität angenommen und die entsprechenden Extinktionswerte von mit PLY behandelten G93A- und WT-Gruppen dazu ins prozentuale Verhältnis gesetzt.

Nach 3-stündiger Behandlung mit PLY war der Anteil verbliebener vitaler G93A-Zellen bzw. deren mitochondriale Aktivität signifikant niedriger als die der WT-Zellen ( $24,31 \pm 9,62\%$  G93A vs.  $48,81 \pm 19,54\%$  WT) (siehe Abb.1). Diese Feststellung konnte auch zellmorphologisch, anhand von Hämalaun-Färbungen der mit PLY behandelten G93A- und WT-Zellen, bestätigt werden. Im Verlauf der 3-stündigen PLY-Behandlung hatte sich eine Vielzahl von Zellen vom Boden der Gewebekulturplatte gelöst. Die Hämalaun-Färbungen der am Boden verbliebenen Zellen zeigten bei mit PLY behandelten G93A-Gruppen eine sichtbar höhere Abnahme der Zelldichte als bei entsprechenden WT-Zellen (siehe Abb.2). Darüber hinaus waren in allen mit PLY behandelten Gruppen Veränderungen der Zellmorphologie zu beobachten. Die Zellen verloren die für SH-SY5Y-Zellen typische spindel- bis polygonale Form, indem sie sich kleiner und runder darstellten. In den mit PLY behandelten WT-Zellkulturen konnten nur wenige dieser runden Zellen beobachtet werden. Dagegen zeigten sie sich in den mit PLY behandelten G93A-Zellkulturen in der Mehrzahl (siehe Abb.2).

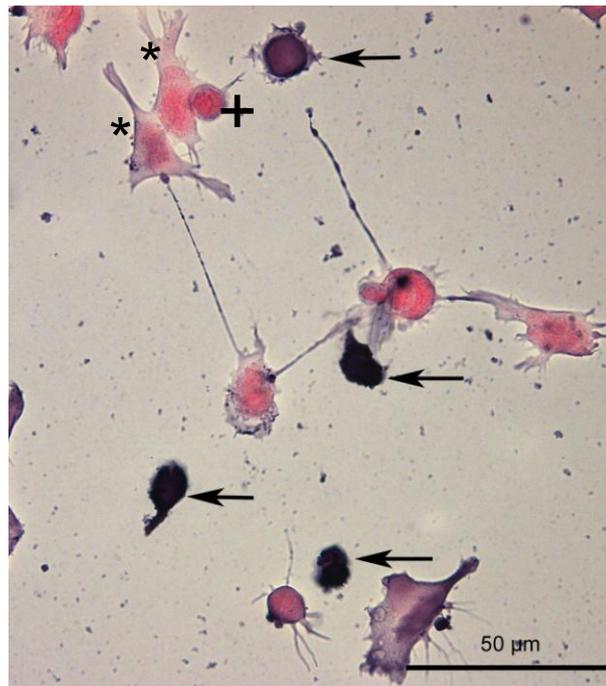
Das für den Nachweis von Apoptosen durchgeführte In-situ-Tailing konnte die geschrumpften runden Zellen als apoptotisch identifizieren. Nur vereinzelt fanden sich geschrumpfte Zellen die nicht apoptotisch waren (siehe Abb.3). Nach der Behandlung mit PLY fanden sich nach Auszählung unter G93A-Zellen signifikant mehr Apoptosen als unter WT-Zellen ( $31,42 \pm 5,51\%$  G93A vs.  $15,27 \pm 6,20\%$  WT  $p < 0,001$ ) (siehe Abb.4).



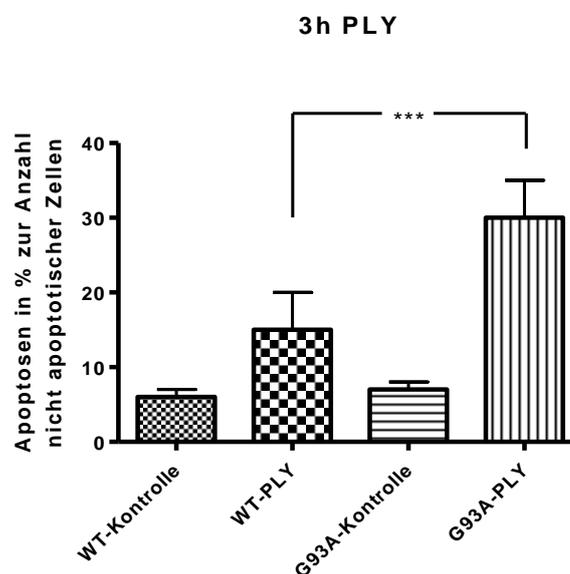
**Abb.1** Im WST-1-Test ermittelte mitochondriale Aktivität bzw. Zellvitalität von unbehandelten und 3 h mit PLY (0,5 µg/ml) behandelten WT- und G93A-Zellen. Die gegebenen Daten sind die prozentualen Anteile der mitochondrialen Aktivität mit PLY behandelter Zellen zur mitochondrialen Aktivität von unbehandelten G93A-Kontrollgruppen und WT-Kontrollgruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von jeweils 36 Einzelbeobachtungen. G93A-Zellen reagierten signifikant empfindlicher auf PLY als WT-Zellen ( $p < 0,001$ ).



**Abb.2** Hämalaun-Färbung von WT- und G93A-Zellen die 3 h mit PLY (0,5 µg/ml) behandelt wurden. Man beachte die verminderte Zelldichte und vermehrte Clusterung der G93A-Zellen im unteren Bildabschnitt.



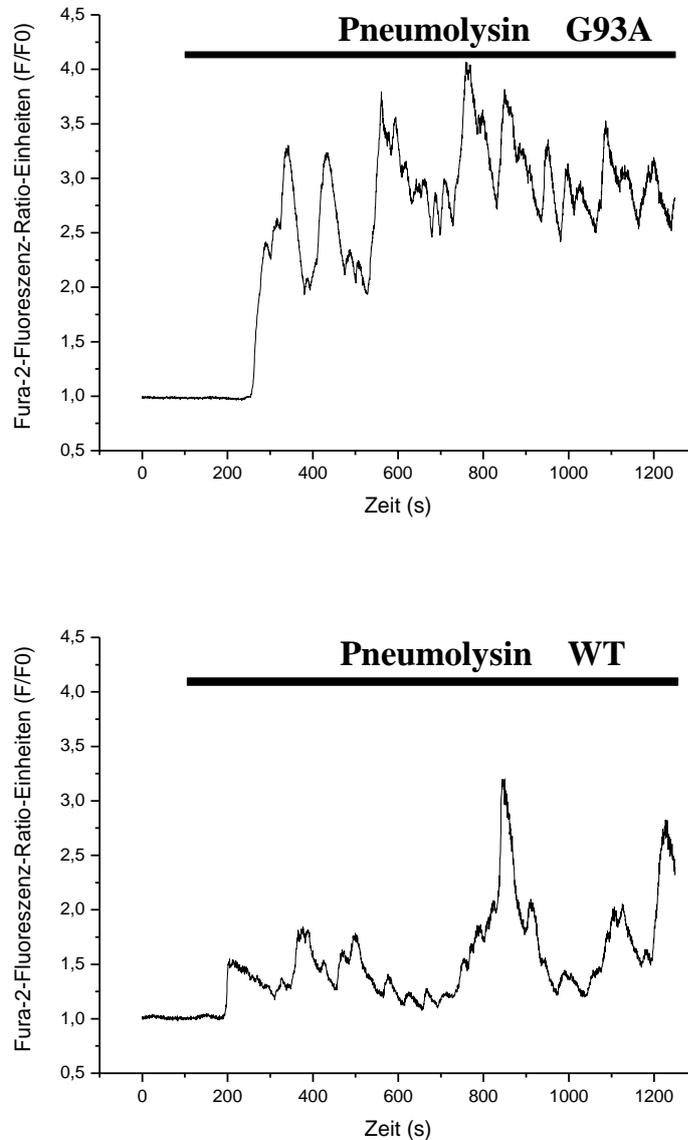
**Abb.3** Nach 3-stündiger PLY-Behandlung (0,5 µg/ml) durch In-situ-Tailing dargestellte apoptotische G93A-Zellen (Pfeile). Dazwischen befinden sich noch vitale Zellen mit der für SH-SY5Y-Zellen typischen spindelförmigen Gestalt (+). Daneben findet sich eine helle geschrunpfte runde Zelle (\*), deren Genom keine apoptotischen DNA-Doppelstrangbrüche aufweist und somit nicht apoptotisch ist.



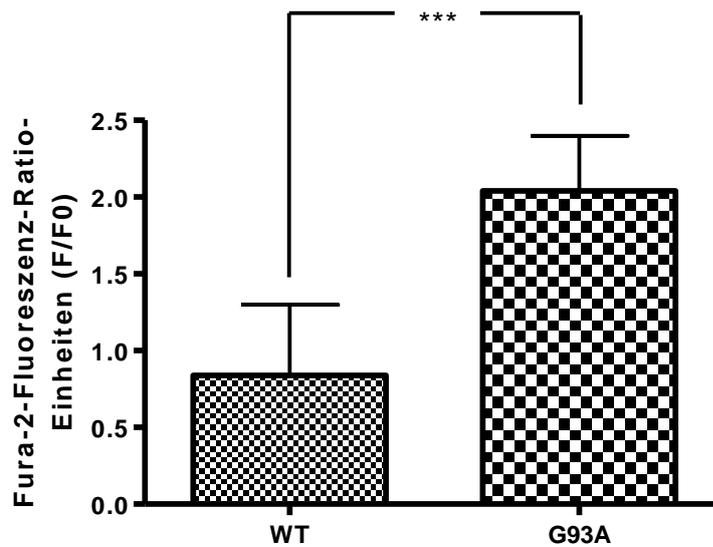
**Abb.4** Vergleich des Verhältnisses von apoptotischen WT- oder G93A-Zellen nach Behandlung mit PLY (0,5 µg/ml, 3 h) und In-situ-Tailing. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Apoptosen zur Zahl der übrigen Zellen in mit PLY behandelten Gruppen und unbehandelten Kontrollen. Es handelt sich um die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von jeweils 6 Präparaten pro Gruppe (siehe 2.7.). Unter G93A-Zellen fanden sich nach PLY signifikant mehr Apoptosen als unter WT-Zellen ( $p < 0,001$ ).

### 3.2. Calciumkonzentrationen in G93A- und WT-Zellen nach Pneumolysin

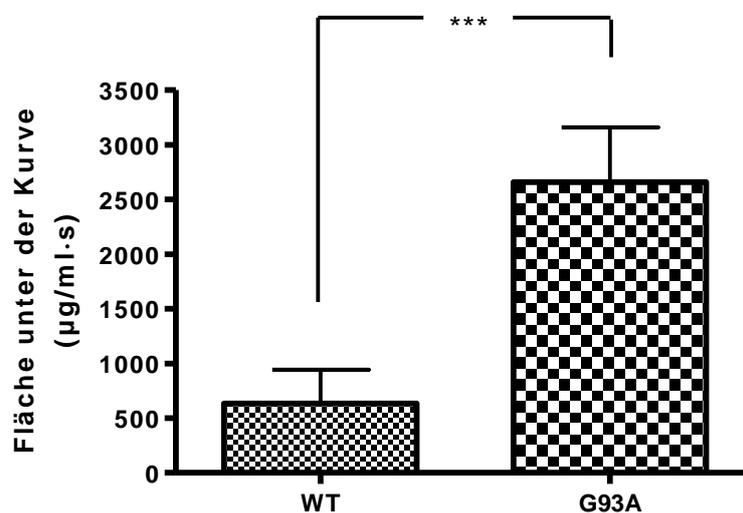
G93A- oder WT-Zellen wurden über den Zeitraum von 20 min mit PLY (0,5 µg/ml) behandelt. Vor und während der PLY-Behandlung wurden Veränderungen der zytosolischen Calciumkonzentration in einzelnen G93A- und WT-Zellen mit Hilfe des Fura-2-Calcium-Video-Imaging erfasst. Bei beiden Zelllinien konnten im Status vor der PLY-Gabe gleiche zytosolische Calciumkonzentrationen (1,0 Ratio-Einheiten) gemessen werden (siehe Abb.5). Kurz nach der PLY-Gabe kam es sowohl in G93A- als auch in WT-Zellen zu einem initialen Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration. Dabei war der Anstieg der Calciumkonzentration in G93A-Zellen immer höher als in WT-Zellen. Es konnten für die G93A-Zellen signifikant höhere Maximalwerte der zytosolischen Calciumkonzentration im Verlauf der PLY-Behandlung ermittelt werden ( $3,14 \pm 0,39$  F/F0 G93A vs.  $1,86 \pm 0,45$  F/F0 WT  $p < 0,001$ ) (siehe Abb.6). Im weiteren zeitlichen Verlauf der PLY-Behandlung fand sich in beiden Zelllinien nach dem initialen Calciumeinstrom ein Abfall und kurz darauf wieder ein Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration. Diese sich in Oszillationen darstellenden Schwankungen der zytosolischen Calciumkonzentration konnten über den gesamten Zeitraum der PLY-Behandlung beobachtet werden (siehe Abb.5). Der Schwankungsbereich der zytosolischen Calciumkonzentrationen von G93A-Zellen (zwischen 2,0 und 4,0 F/F0) bewegte sich auf einem höheren Niveau als der von WT-Zellen (zwischen 1,5 und 3,5 F/F0). Zur Darstellung der unterschiedlichen Calciumkonzentrations-Niveaus über die Dauer der PLY-Behandlung wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) der Calcium-versus-Zeit-Kurven der G93A- und WT-Zellen ermittelt (siehe Abb.7). Dabei zeigte sich, dass die AUC von G93A-Zellen die AUC der WT-Zellen signifikant überstieg ( $2657,85 \pm 502,33$  µg/ml's G93A vs.  $634,01 \pm 309,06$  µg/ml's WT  $p < 0,001$ ). G93A-Zellen hatten somit über die Dauer der PLY-Behandlung eine signifikant höhere zytosolische Calciumbelastung zu bewältigen als WT-Zellen.



**Abb.5** Verhalten der zytosolischen Calciumkonzentration (dargestellt als Fura-2-Fluoreszenz-Ratio-Einheiten) bei Behandlung mit Pneumolysin (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) über den Zeitraum von 20 min. Dargestellt ist das Fura-2-Calcium-Video-Imaging jeweils einer repräsentativen G93A- und WT-Zelle.



**Abb.6** Vergleich der maximal erreichten Calciumkonzentrationen (bestimmt als Fura-2-Fluoreszenz-Ratio-Einheiten) in WT- und G93A-Zellen, welche 20 min mit PLY (0,5µg/ml) behandelt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von jeweils 25 Zellen ( $p < 0,001$ ).

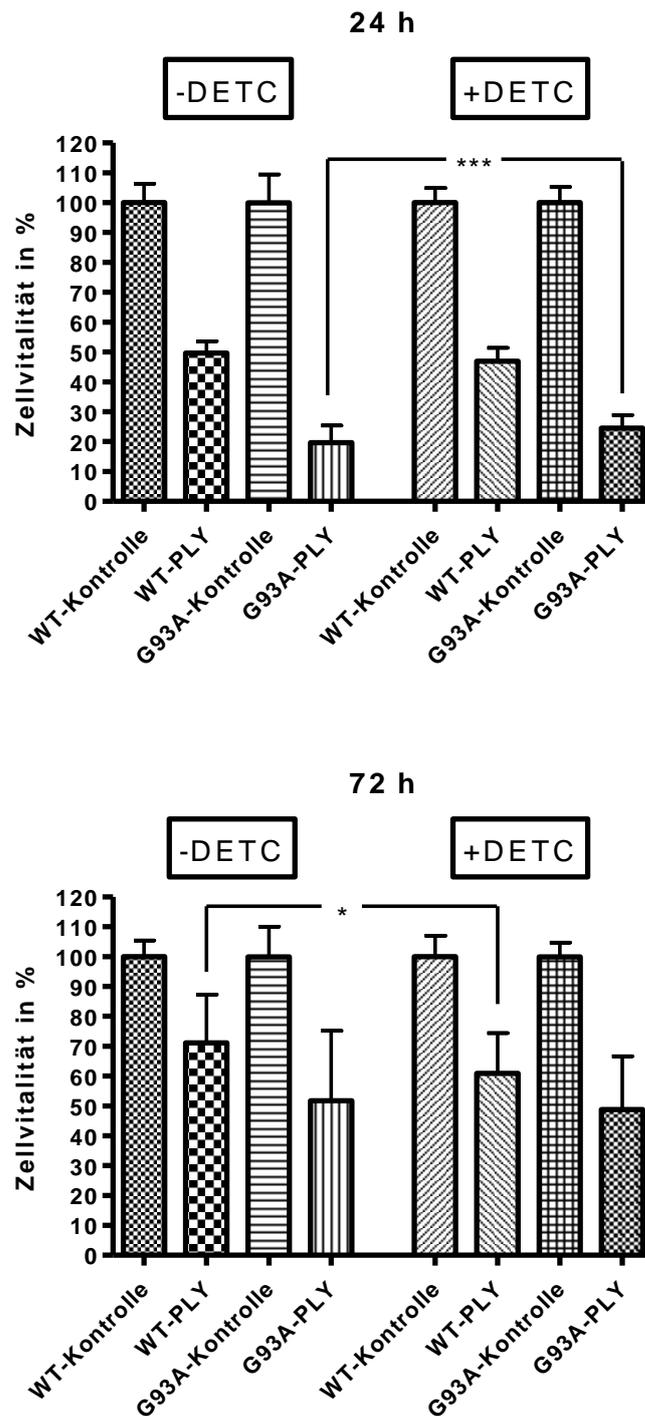


**Abb.7** Vergleich der Flächen unter der Kurve der Calciumkonzentration-versus-Zeit-Kurven von WT- und G93A-Zellen, die 20 min mit PLY (0,5 µg/ml) behandelt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von jeweils 25 Zellen ( $p < 0,001$ ).

### 3.3. Einfluss von Diethyldithiocarbamat auf die Wirkung von Pneumolysin

Die SOD-Enzyme von G93A-Zellen und WT-Zellen wurden unspezifisch mit DETC gehemmt. Um eine möglichst vollständige SOD-Hemmung vor der PLY-Behandlung zu erreichen, wurden die Zellen vor der Aussaat zunächst für 24 h oder 72 h mit DETC (10  $\mu\text{mol}$ ) inkubiert. Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde nach einer 3-stündigen PLY-Behandlung an allen Gruppen der WST-1-Zellvitalitätstest durchgeführt. Die Extinktionswerte von nicht mit PLY behandelten Kontrollgruppen wurden als 100% Zellvitalität angenommen. Die Extinktionswerte der mit PLY behandelten Gruppen wurden dazu ins prozentuale Verhältnis gesetzt.

Bei WT-Zellen, welche 24 h mit DETC behandelt wurden, konnten im Vergleich zu nicht mit DETC behandelten WT-Zellen im WST-1-Test keine Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber PLY gemessen werden ( $49,7 \pm 3,98\%$  WT vs.  $48,77 \pm 4,07\%$  WT-DETC  $p > 0,05$ ) (siehe Abb.8). Demgegenüber zeigte sich, dass mit DETC behandelte G93A-Zellen weniger empfindlich auf PLY reagierten als unbehandelte G93A-Zellen ( $19,65 \pm 5,81\%$  G93A vs.  $24,54 \pm 4,38\%$  G93A-DETC  $p < 0,001$ ). Dieser Effekt konnte nach 72 h DETC-Behandlung nicht mehr beobachtet werden (siehe Abb.8). Es zeigte sich hier eine verminderte Zellvitalität von mit DETC behandelten G93A-Zellen gegenüber nicht mit DETC behandelten G93A-Zellen. Diese war statistisch jedoch nicht signifikant ( $51,74 \pm 23,52\%$  G93A vs.  $48,83 \pm 17,86\%$  G93A-DETC  $p > 0,05$ ). WT-Zellen, welche 72 h mit DETC behandelt wurden, waren signifikant empfindlicher gegenüber PLY als nicht mit DETC behandelte WT-Zellen ( $71,16 \pm 16,15\%$  WT vs.  $60,94 \pm 13,51\%$  WT-DETC  $p < 0,05$ ).

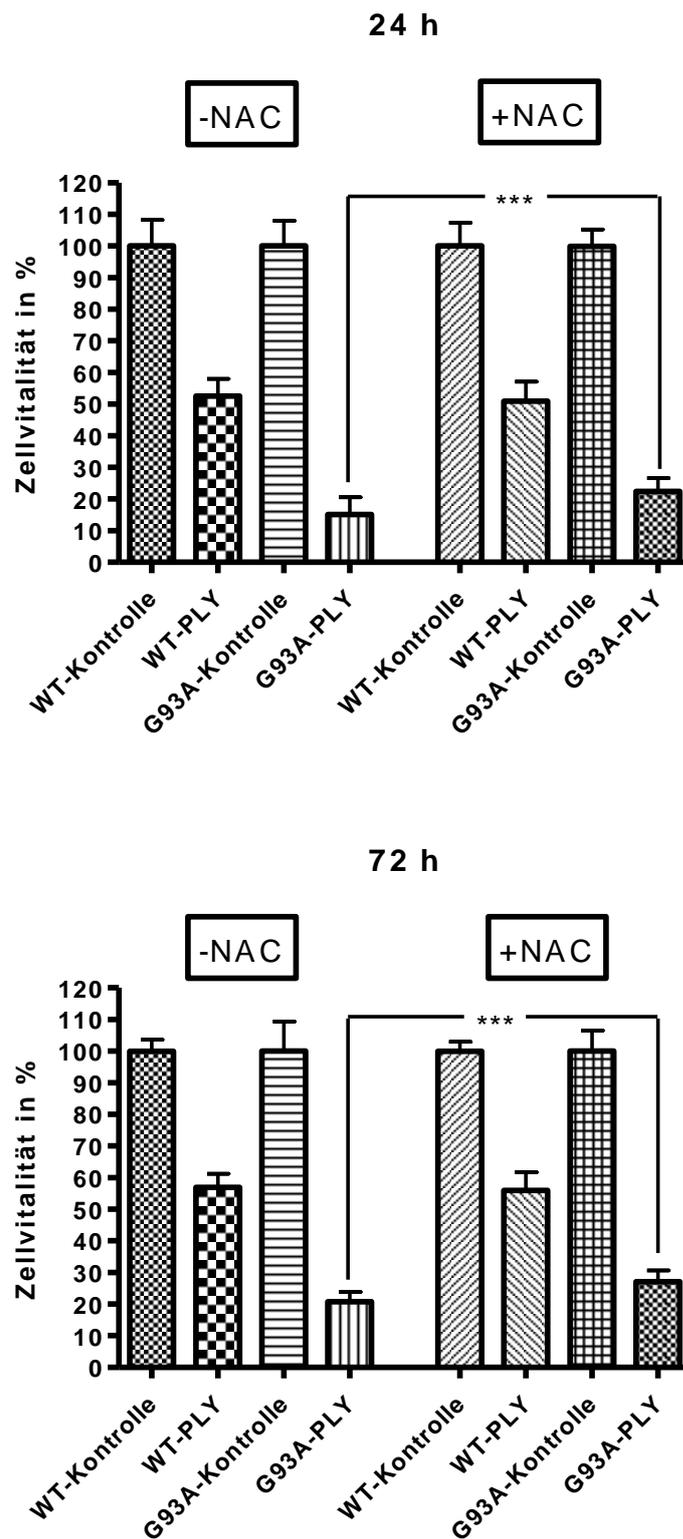


**Abb.8** Im WST-1-Test gemessene Zellvitalität bzw. mitochondriale Aktivität von G93A- und WT-Zellen, welche über 24 h oder 72 h mit DETC (10  $\mu$ mol) inkubiert und anschließend für 3 h mit PLY (0,5  $\mu$ g/ml) behandelt wurden. Die gegebenen Daten sind die prozentualen Anteile der mitochondrialen Aktivität mit PLY behandelter Zellen zur mitochondrialen Aktivität un behandelter WT- und G93A-Kontrollgruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von jeweils 36 Einzelbeobachtungen.

### 3.4. Einfluss von N-Acetylcystein auf die Wirkung von Pneumolysin

G93A- oder WT-Zellen wurden mit NAC und PLY behandelt. Um einen potentiell möglichst großen Effekt zu erzielen, wurden die Zellen vor der 3-stündigen PLY-Behandlung (0,5 µg/ml) zunächst für 24 h oder 72 h mit NAC (1 mmol) inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation mit oder ohne PLY wurde bei allen Gruppen die Zellvitalität mit dem WST-1-Test erfasst. Die Extinktionswerte von nicht mit PLY behandelten Kontrollen wurden als 100% Zellvitalität angenommen und die Werte der entsprechenden mit PLY behandelten Gruppen dazu ins prozentuale Verhältnis gesetzt.

Nach 3-stündiger Behandlung mit PLY war bei G93A-Zellen, die vorher über 24 h mit NAC inkubiert wurden, eine höhere Zellvitalität messbar als bei nicht mit NAC behandelten G93A-Zellen ( $15,13 \pm 5,38\%$  G93A vs.  $22,49 \pm 4,11\%$  G93A-NAC  $p < 0,001$ ) (siehe Abb.9). Ein entsprechender Effekt konnte bei den WT-Zellen nicht beobachtet werden. Die mit NAC behandelten WT-Zellen zeigten eine gegenüber nicht mit NAC behandelten WT-Zellen leicht verminderte Zellvitalität. Diese war statistisch jedoch nicht signifikant ( $52,56 \pm 5,52\%$  WT vs.  $47,14 \pm 6,21\%$  WT-NAC  $p > 0,05$ ). Bei den Zellen welche 72 h vor der PLY-Behandlung mit NAC inkubiert worden waren, konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden wie bei den Zellen die 24 h mit NAC inkubiert wurden (siehe Abb.9). Auch hier zeigte sich, dass G93A-Zellen, welche 72 h mit NAC inkubiert worden waren, nach der PLY-Behandlung eine höhere Vitalität aufwiesen als G93A-Zellen die vorher nicht mit NAC behandelt wurden ( $20,77 \pm 3,13\%$  G93A vs.  $27,15 \pm 3,46\%$  G93A-NAC  $p < 0,001$ ). Zwischen WT-Zellen die vorher 72 h mit NAC inkubiert wurden und nicht mit NAC inkubierten WT-Zellen konnte nach der 3-stündigen PLY-Behandlung kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $56,98 \pm 4,27\%$  WT vs.  $54,49 \pm 6,62\%$  WT-NAC  $p > 0,05$ ).



**Abb.9** Im WST-1-Test gemessene Zellvitalität bzw. mitochondriale Aktivität von G93A- und WT-Zellen, die entweder für 24 h oder 72 h mit NAC (1 mmol) inkubiert und anschließend für 3 h mit PLY (0,5 µg/ml) behandelt wurden. Die gegebenen Daten sind die prozentualen Anteile der mitochondrialen Aktivität mit PLY behandelter Zellen zur mitochondrialen Aktivität unbehandelter WT- und G93A-Kontrollgruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von jeweils 36 Einzelbeobachtungen.

### 3.5. Empfindlichkeit von WT- und G93A-Zellen in Co-Kultur mit Makrophagen

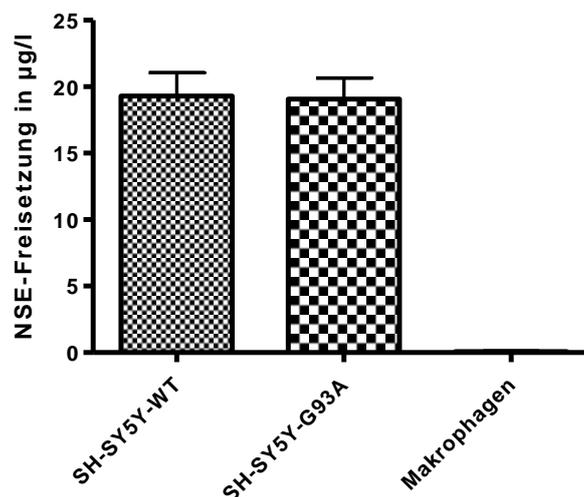
WT- oder G93A-Zellen wurden in Co-Kultur mit humanen Makrophagen gebracht und für 24 h oder 72 h mit dem TLR-2 Agonist Pam3Cys (10 µg/ml) inkubiert. Zur Quantifizierung des Zellschadens in mit Pam3Cys stimulierten sowie unstimulierten Co-Kulturen wurde nach jeweils 24 h und 72 h die neuronenspezifische Enolase aus dem Co-Kultur-Überstand gemessen. Vorversuche, bei denen die in der Co-Kultur verwendeten Zellen mit Triton X-100 lysiert wurden zeigten, dass NSE von allen SH-SY5Y-Zellen, nicht jedoch von Makrophagen, freigesetzt wurde (siehe Abb.10a). Bei allen Versuchen wurde jeweils eine Co-Kultur mit Triton lysiert und der gemessene NSE-Wert als maximal mögliche NSE-Freisetzung angenommen. Die NSE-Werte von nicht lysierten Co-Kulturen der entsprechenden Gruppe wurden dazu ins prozentuale Verhältnis gesetzt.

Bei WT- oder G93A-Zellen, welche über 24 h in Co-Kultur mit humanen Makrophagen belassen wurden, konnte bereits ohne die Stimulation mit Pam3Cys eine geringe NSE-Freisetzung beobachtet werden (siehe Abb.10b). Es konnte in der Stärke der NSE-Freisetzung zwischen unstimulierten G93A-Co-Kulturen und entsprechenden unstimulierten WT-Co-Kulturen kein statistisch signifikanter Unterschied gemessen werden ( $3,75 \pm 0,46\%$  WT vs.  $4,06 \pm 0,28\%$  G93A  $p > 0,05$ ). Durch die Gabe von Pam3Cys über 24 h konnte die NSE-Freisetzung in allen Co-Kulturen deutlich gesteigert werden. Entsprechende Beobachtungen konnten sowohl bei G93A-Co-Kulturen als auch bei WT-Co-Kulturen gemacht werden. Dabei war die NSE-Freisetzung in den mit Pam3Cys stimulierten G93A-Co-Kulturen signifikant höher als in den mit Pam3Cys stimulierten WT-Co-Kulturen ( $6,61 \pm 0,74\%$  WT vs.  $11,66 \pm 0,89\%$  G93A  $p < 0,001$ ). Ähnliche Beobachtungen konnten bei G93A- oder WT-Zellen gemacht werden, die 72 h mit den Makrophagen in Co-Kultur belassen wurden (siehe Abb.10b). Auch hier konnte bei nicht mit Pam3Cys stimulierten G93A- oder WT-Co-Kulturen die Freisetzung von NSE gemessen werden. Diese NSE-Werte waren sowohl bei G93A-Co-Kulturen als auch bei WT-Co-Kulturen höher als die entsprechenden 24-h-Werte. Nach 72 h konnte zwischen beiden nicht mit Pam3Cys stimulierten Co-Kultur-Typen wiederum kein statistisch signifikanter Unterschied gemessen werden ( $12,17 \pm 2,27\%$  WT vs.  $12,38 \pm 1,75\%$  G93A  $p > 0,05$ ). Demgegenüber war nach der Stimulation mit Pam3Cys (10 µg/ml) über 72 h zwischen G93A-Zellen und WT-Zellen in Co-Kultur wiederum ein signifikanter

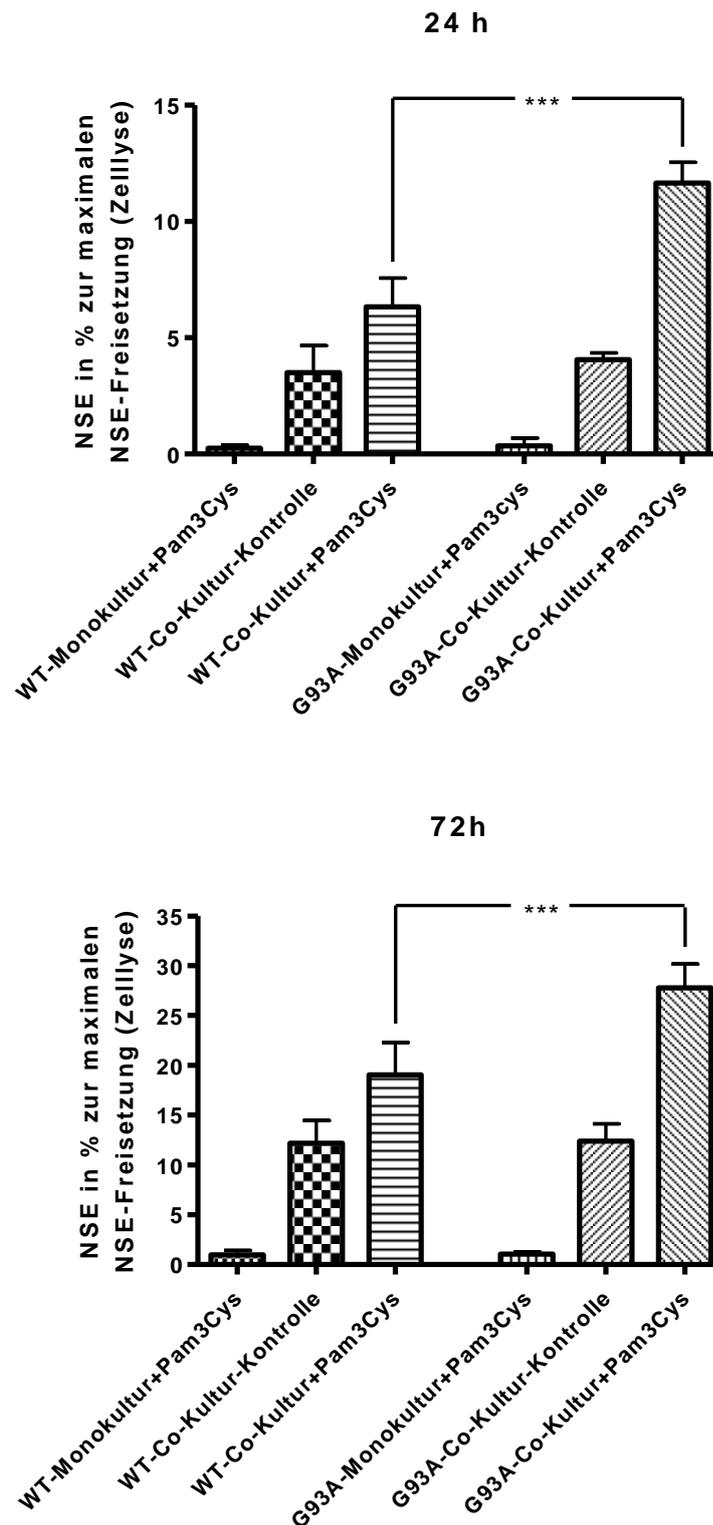
Unterschied in der Höhe der NSE-Freisetzung messbar ( $19,04 \pm 3,27\%$  WT vs.  $27,78 \pm 2,38\%$  G93A  $p > 0,001$ ) (siehe Abb.10b).

Die Ergebnisse der NSE-Messungen konnten durch Lichtgrün / CD68-Färbungen von WT- und G93A-Co-Kulturen bestätigt werden. Nach 72-stündiger Stimulation mit Pam3Cys waren in WT-Co-Kulturen noch deutlich sichtbar mehr am Boden haftende SH-SY5Y-Zellen verblieben als in G93A-Co-Kulturen (siehe Abb.11). Es hatte sich durch die Stimulation mit Pam3Cys eine größere Zahl von G93A-Zellen vom Boden gelöst als im Vergleich WT-Zellen. Gelöst hatten sich vor allem SH-SY5Y-Zellen, die sich in unmittelbarer Nähe zu den Makrophagen befanden. Dadurch kam es im direkten Umfeld der aktivierten Makrophagen zur Bildung von zellfreien Arealen. Diese Areale waren in mit Pam3Cys stimulierten G93A-Co-Kulturen deutlich sichtbar größer als in mit Pam3Cys stimulierten WT-Co-Kulturen (siehe Abb.11).

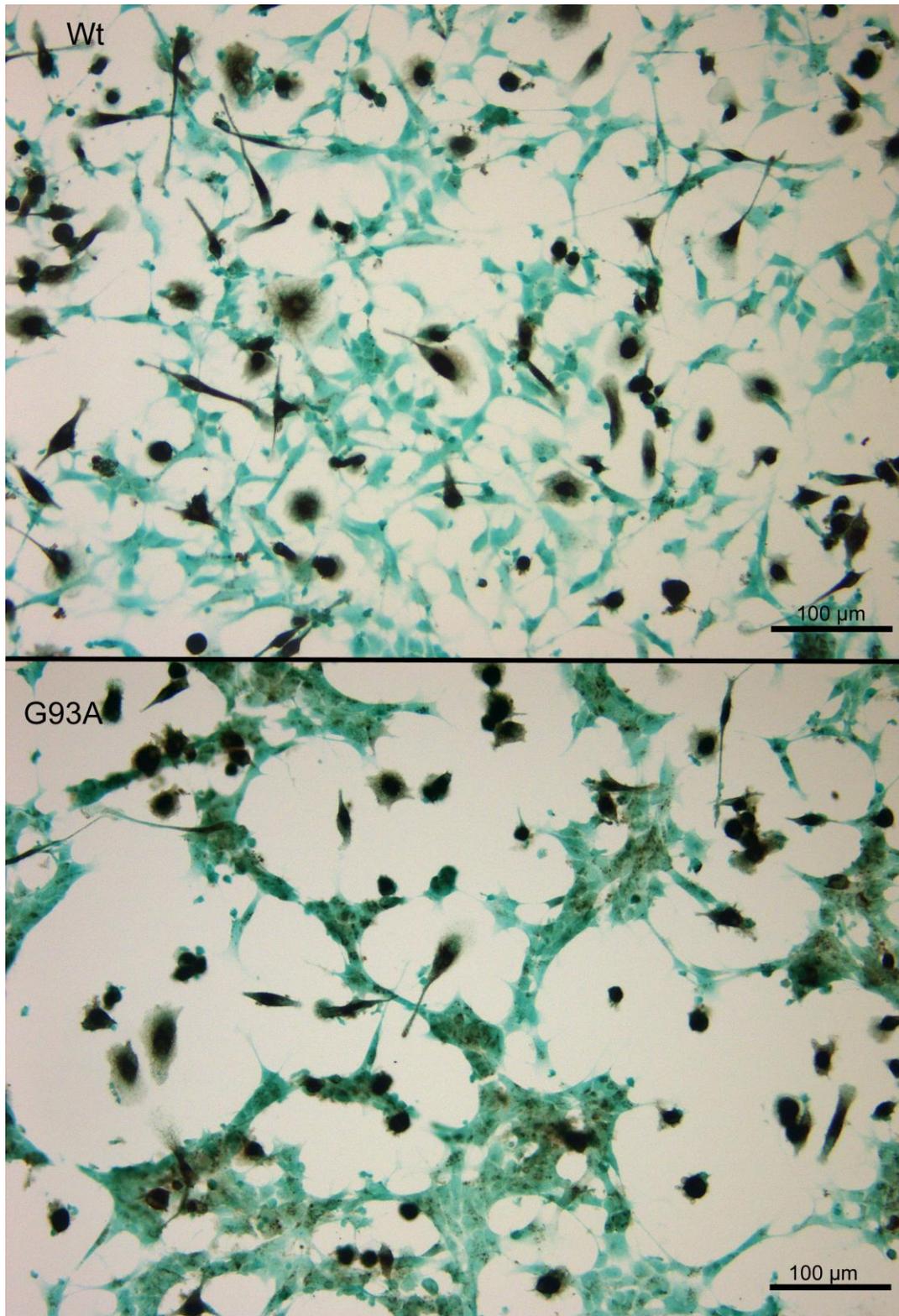
Weiterhin wurden In-situ-Tailings an Pam3Cys-stimulierten G93A- und WT-Co-Kulturen durchgeführt. Es wurde beobachtet, dass Makrophagen die in direkten Kontakt mit anderen Zellen traten, bei diesen eine Apoptose induzieren konnten (siehe Abb.12). Die Makrophagen waren außerdem in der Lage, apoptotische Zellkörper zu phagozytieren (siehe Abb.12a).



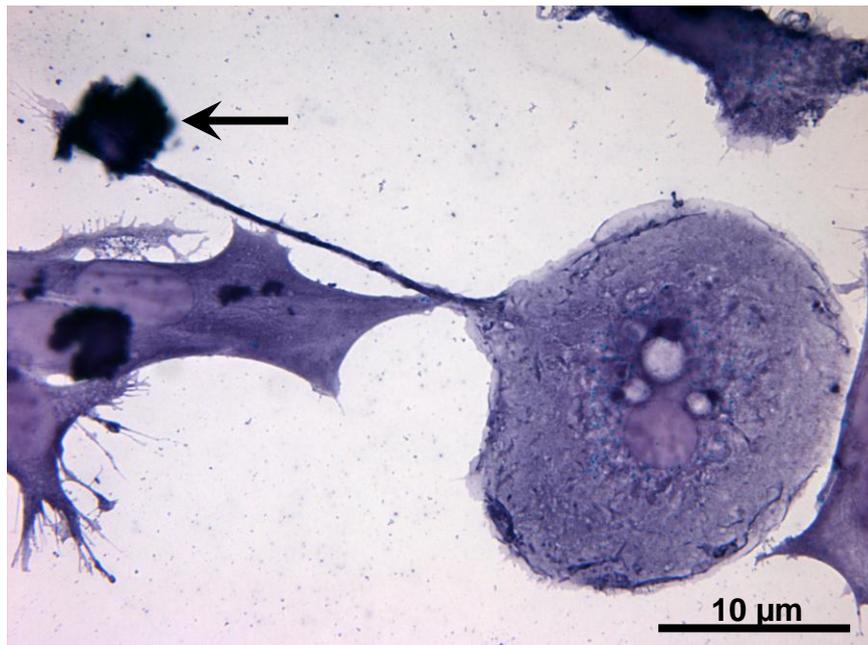
**Abb.10a** Vergleich der NSE-Freisetzung von WT- und G93A-Zellen sowie humanen Makrophagen. In jeder Gruppe wurden Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät, für 24 h inkubiert und anschließend mit Triton zur Zellyse behandelt. WT- und G93A-Zellen setzten annähernd gleich viel, Makrophagen hingegen keine NSE frei.



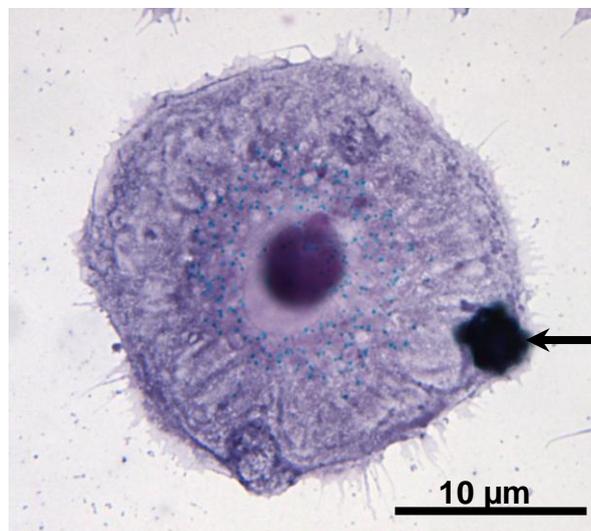
**Abb.10b** NSE-Freisetzung in Co-Kulturen aus humanen Makrophagen und WT- oder G93A-Zellen, die entweder für 24 h oder 72 h mit Pam3Cys stimuliert wurden. Daneben ist die NSE-Freisetzung in WT- und G93A-Monokulturen, die 24 h oder 72 h mit Pam3Cys inkubiert wurden, dargestellt. Gezeigt sind die prozentualen Anteile zu durch Zellysen ermittelten maximalen Werten der NSE-Freisetzung. Es handelt sich um die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von jeweils 20 Einzelbeobachtungen.



**Abb.11** CD68/Lichtgrün-Doppelfärbung von Co-Kulturen aus humanen Makrophagen (schwarz) und WT- oder G93A-Zellen (grün), die über 72 h mit Pam3Cys stimuliert wurden. Man beachte die Abnahme der Zelldichte sowie die Clusterung der G93A-Zellen im unteren Bild. Weite G93A-zellfreie Areale finden sich hier vor allem im direkten Umfeld der Makrophagen.



**Abb.12** Durch In-situ-Tailing dargestellte apoptotische Zelle (Pfeil), die von einer Makrophage angegriffen wurde. Der Makrophage befand sich in Co-Kultur mit G93A-Zellen und wurde über 72 h mit Pam3Cys (10 µg/ml) stimuliert.

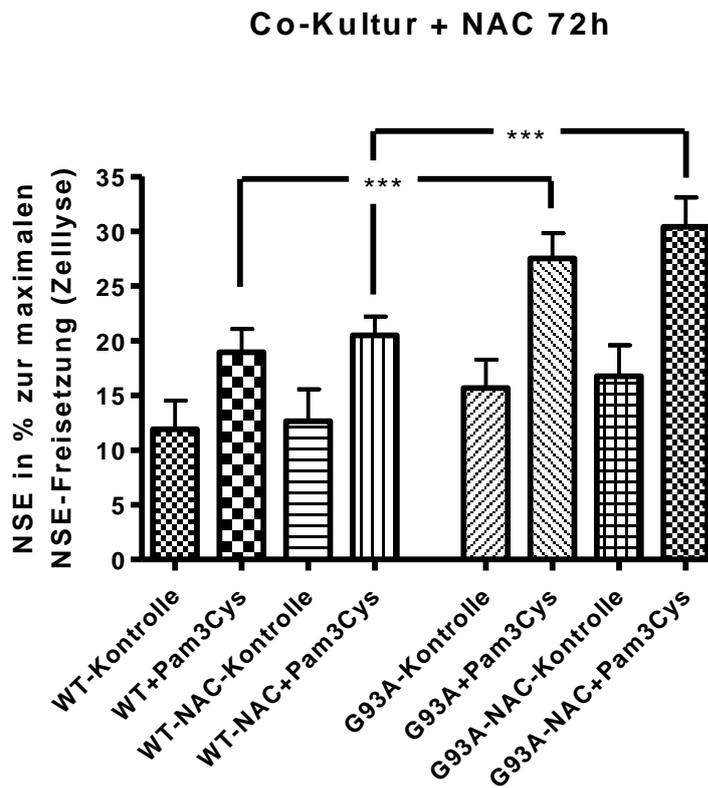


**Abb.12a** Ein Makrophage der gleichen Co-Kultur, der bereits eine apoptotische Zelle (Pfeil) phagozytiert hat.

### 3.5.1. Co-Kultur mit N-Acetylcystein

WT- oder G93A-Zellen wurden in Co-Kultur mit humanen Makrophagen gebracht und für 72 h entweder mit Pam3Cys (10 µg/ml) allein, oder in Kombination mit NAC (1 mmol) inkubiert. Bei allen Versuchsgruppen wurde jeweils eine Co-Kultur mit Triton (0,9% in PBS) lysiert und der gemessene NSE-Wert als maximal mögliche NSE-Freisetzung angenommen. Die NSE-Werte von nicht lysierten Co-Kulturen der entsprechenden Gruppe wurden dazu ins prozentuale Verhältnis gesetzt.

Wie bereits in den unter 3.5. beschriebenen Experimenten konnte wiederum eine NSE-Freisetzung in den nicht mit Pam3Cys stimulierten WT- und G93A-Co-Kulturen gemessen werden (siehe Abb.13). Durch die zusätzliche Gabe von NAC wurde die NSE-Freisetzung weder in nicht mit Pam3Cys inkubierten WT-Co-Kulturen ( $11,91 \pm 2,63\%$  WT-Kontrolle vs.  $12,65 \pm 2,89\%$  WT-Kontrolle-NAC  $p > 0,05$ ) noch G93A-Co-Kulturen ( $15,86 \pm 2,59\%$  G93A-Kontrolle vs.  $16,76 \pm 2,82\%$  G93A-Kontrolle-NAC  $p > 0,05$ ) signifikant verändert. Auch in den mit Pam3Cys stimulierten Co-Kulturen konnte NAC weder für die WT-Gruppen ( $18,95 \pm 2,13\%$  WT-Pam3Cys vs.  $20,50 \pm 1,79\%$  WT-Pam3Cys+NAC  $p > 0,05$ ) noch für die G93A-Gruppen ( $27,52 \pm 2,30\%$  G93A-Pam3Cys vs.  $27,80 \pm 2,75\%$  G93A-Pam3Cys+NAC  $p > 0,05$ ) eine signifikante Veränderung der NSE-Freisetzung bewirken. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich trotz eines fehlenden Effektes von NAC in den einzelnen Gruppen per se wiederum zwischen WT-Co-Kulturen und G93A-Co-Kulturen (siehe Abb.13). Wie bereits in 3.5. gezeigt, reagierten G93A-Zellen auf die Stimulation mit Pam3Cys mit einer signifikant höheren NSE-Freisetzung als WT-Zellen.



**Abb.13** NSE-Freisetzung in Co-Kulturen aus humanen Makrophagen und WT- oder G93A-Zellen, welche für 72 h mit NAC (1 mmol) und Pam3Cys (10 µg/ml) inkubiert wurden. Gezeigt sind die prozentualen Anteile zu den durch Zellysen ermittelten, maximalen Werten der NSE-Freisetzung. Es handelt sich um die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von jeweils 20 Einzelbeobachtungen.

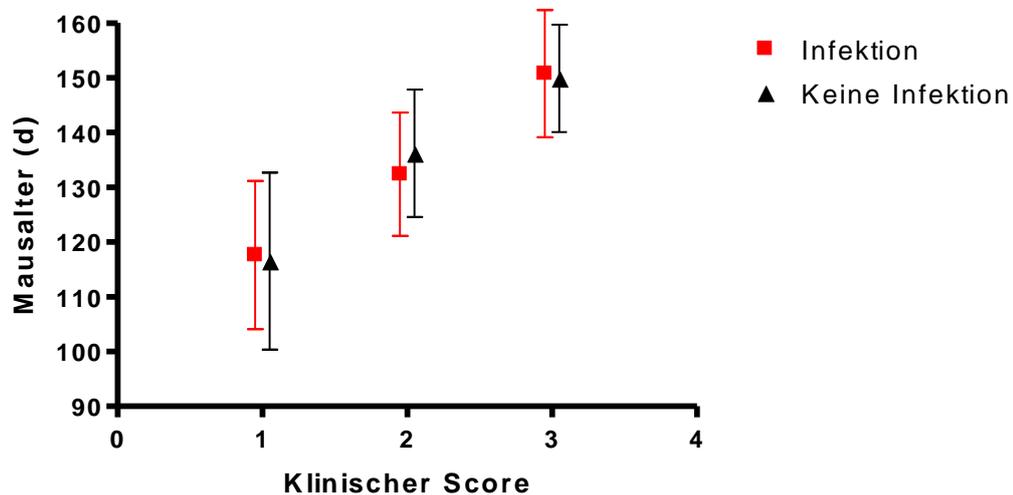
### 3.6. Infektion von G93A-transgenen Mäusen mit *Streptococcus pneumoniae*

Mit Hilfe von klinischem Score, Seilttest und Rotarod wurde der Krankheitsverlauf von insgesamt viermal mit *S. pneumoniae* infizierten sowie nicht infizierten G93A-Mäusen verglichen. Nach der Tötung der Mäuse wurden die aktivierten Mikrogliazellen in Gehirn und Rückenmark ausgezählt.

#### 3.6.1. Krankheitsverlauf / klinischer Score

Der Erkrankungsbeginn von G93A-transgenen Mäusen, die entweder Infektionen mit *S. pneumoniae* oder Infektionen mit 0,9 % NaCl und anschließend eine antibiotische Behandlung mit Ceftriaxon erhielten, konnte am frühesten mit dem klinischen Score eruiert werden. Typischerweise zeigte sich sowohl bei allen infizierten als auch bei allen nicht infizierten G93A-Mäusen der NaCl-Kontrollgruppe als erstes Zeichen der Erkrankung ein abnormer Schwanzreflex (Score 1). Die Tiere spreizten hier beim Hochheben am Schwanz nicht mehr, wie in gesundem Zustand, die Hinterläufe vom Körper. Hinsichtlich des Erkrankungsbeginns, gemessen am Alter der Tiere, konnte zwischen den mit *S. pneumoniae* infizierten Mäusen und der nicht infizierten Vergleichsgruppe kein Unterschied festgestellt werden ( $117,6 \pm 13,54$  d Infektion vs.  $116,5 \pm 20,16$  d keine Infektion  $p > 0,05$ ) (siehe Abb.14). Ca. 2,5 Wochen nach dem Auftreten des abnormen Schwanzreflexes konnte bei allen Tieren ein dezentes Hinken beim Laufen bzw. eine leichte Parese der Hinterläufe (Score 2) beobachtet werden. Auch hier wurde bezüglich des Alters der Tiere kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt ( $132,38 \pm 11,26$  d Infektion vs.  $136,19 \pm 10,62$  d keine Infektion  $p > 0,05$ ). Im Verlauf von 2 weiteren Wochen hatten sich die Paresen der Tiere so hochgradig verstärkt, dass ein deutliches Hinken bzw. das Nachziehen mindestens einer Extremität beobachtet wurde (Score 3). Wiederum konnte ein Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten G93A-Mäusen nicht festgestellt werden ( $150,75 \pm 11,60$  d Infektion vs.  $149,88 \pm 9,79$  d keine Infektion  $p > 0,05$ ). Hatten die Mäuse den Score 3 erreicht, so unterschritten alle im Verlauf der folgenden Woche mehr als 15% ihres ursprünglichen Maximalgewichts und wurden gemäß der Versuchskriterien getötet. Trotz eines bereits deutlich eingeschränkten Gesundheitszustands konnten sich alle Mäuse bei Erreichen der Tötungskriterien

noch selbstständig aus der Seitenlage aufrichten, so dass keine Maus beider Gruppen den klinischen Score 4 erreichte.

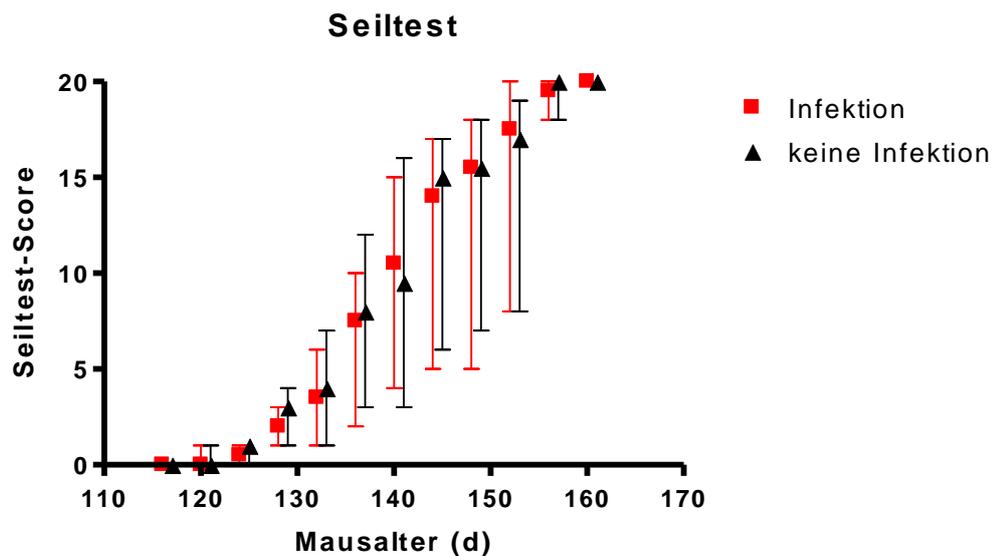


**Abb.14** Vergleich des Mausalters von mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten und nicht infizierten G93A-transgenen Tieren bei Erreichen der klinisch-neurologischen Score-Parameter. Die infizierten Tiere hatten einmal monatlich, beginnend mit 60 Tagen, eine Infektion erhalten. Es wurden insgesamt 4 Infektionen im Abstand von 1 Monat vorgenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von jeweils 8 Tieren. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede bei Erreichen der einzelnen Scores (jeweils  $p > 0,05$ ). (Zur besseren Übersicht sind die Symbole leicht gegeneinander versetzt dargestellt.)

### 3.6.2. Krankheitsverlauf / Seilttest

Alle Mäuse beider Gruppen erreichten in gesundem Zustand in höchstens 6 Sekunden ein Ende des Seils (bzw. eine Plattform) am Testaufbau. Damit konnten alle Tiere zu Beginn der Experimente mit dem Seilttest-Score 0 bewertet werden. Der Seilttest-Score 1, bei welchem die Tiere mehr als 6 Sekunden für das Erreichen des Ziels benötigten, wurde als Krankheitsbeginn gewertet. Als Endpunkt der Seilttest-Experimente galt das Erreichen des Seilttest-Score 20, bei dem die Mäuse in weniger als 6 Sekunden vom Seil fielen. Sowohl Score 1 als auch Score 20 wurde von allen Tieren beider Gruppen erreicht. Im Alter von 116 Tagen war noch keine Maus erkrankt, mit 160 d hatten bereits alle Mäuse beider Gruppen den Score 20 erreicht.

Im dazwischen liegenden Zeitraum wurden in gleichen Abständen insgesamt 10 Tests vorgenommen. Es konnte dabei zu keinem dieser Testzeitpunkte ein signifikanter Unterschied der Seiltest-Scores ( $p > 0,05$ ) zwischen den Gruppen gefunden werden (siehe Abb.15). Beginn, Verlauf und Finalstadium der Erkrankung stellten sich somit in beiden Gruppen als nicht signifikant unterschiedlich dar.

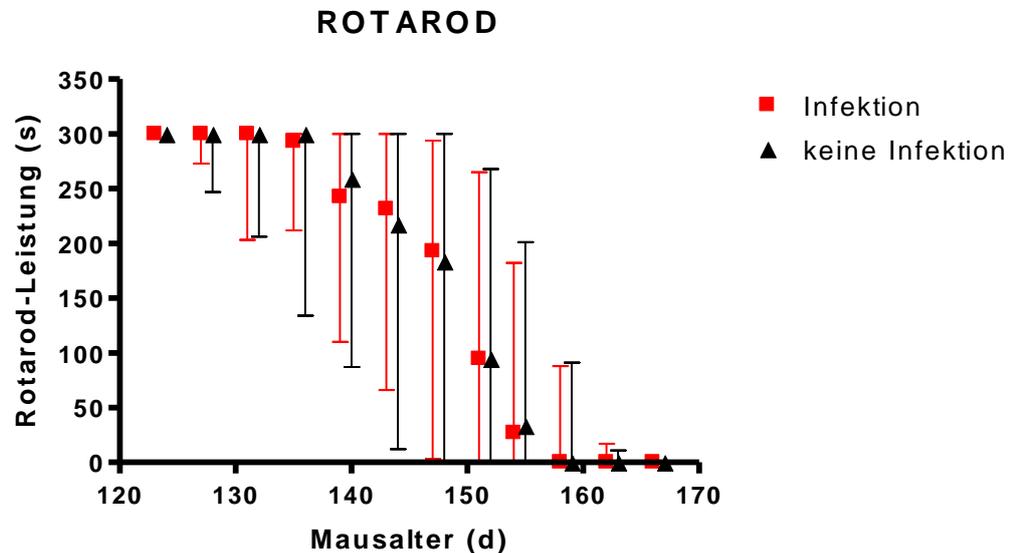


**Abb.15** Vergleich der im Seiltest erbrachten Leistung von jeweils 8 mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten und nicht infizierten G93A-transgenen Mäusen. Dargestellt sind die Mediane (mit Minimum und Maximum) der Seiltest-Scores zu 12 verschiedenen Test-Zeitpunkten. Es bestand zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (jeweils  $p > 0,05$ ). (Zur besseren Übersicht sind die Symbole leicht gegeneinander versetzt dargestellt.)

### 3.6.3. Krankheitsverlauf / Rotarod

Im Rotarod-Test zeigten sich erste Zeichen der ALS vergleichsmäßig spät. Konnte der Erkrankungsbeginn anhand des klinischen Scores bereits in der letzten Woche des 4. Lebensmonats der Tiere erkannt werden (siehe 3.6.1.), wurden zu diesem Zeitpunkt im Rotarod-Test bei keiner Gruppe auffällige Messungen ( $< 300$ s Rotarod-Leistung) beobachtet. Alle Mäuse beider Versuchsgruppen schafften es mit 124 Tagen Lebensalter noch mehr als 300 s bei jeweils 3 Durchgängen auf dem Rotarod zu treten (siehe Abb.16). Dies entsprach somit, trotz des zu diesem Zeitpunkt im

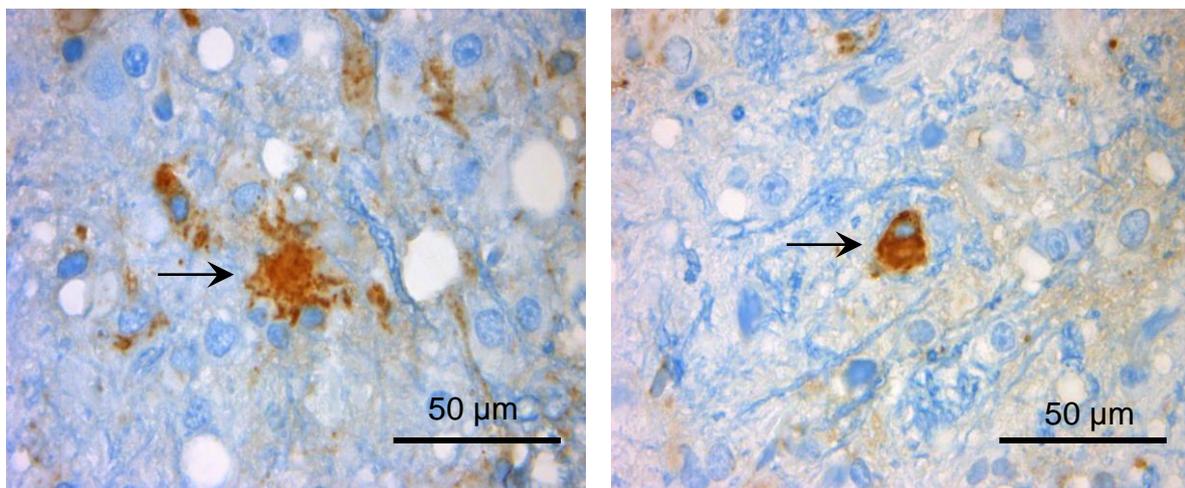
klinischen Score bereits festgestellten Krankheitsbeginns, einer Rotarod-Leistung welche die Tiere auch im vollkommen gesunden Zustand erbrachten. Im Verlauf der Rotarod-Experimente wurden alle G93A-transgenen Tiere auffällig (<300s Rotarod-Leistung). Die Rotarod-Leistung einmal auffälliger Tiere nahm im weiteren zeitlichen Verlauf in beiden Versuchsgruppen wöchentlich kontinuierlich ab. Im finalen Krankheitsstadium konnten sich die Mäuse beider Gruppen nicht mehr auf der Rolle halten und fielen nach dem Heraufsetzen sofort hinunter, was mit 0 s Rotarod-Leistung bewertet wurde. Dieser Zustand wurde von allen Mäusen beider Gruppen erreicht. Im entscheidenden Zeitraum zwischen 120 Tagen und 170 Tagen Lebensalter wurden alle Mäuse insgesamt zwölfmal getestet. Es konnte dabei zu keinem Test-Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen der Rotarod-Leistung von infizierten und nicht infizierten G93A-Mäusen gefunden werden ( $p>0,05$ ) (siehe Abb.16). Ebenso wie bereits im klinischen Score und im Seilttest, stellte sich der Verlauf der Erkrankung in beiden Gruppen als nicht signifikant unterschiedlich dar.



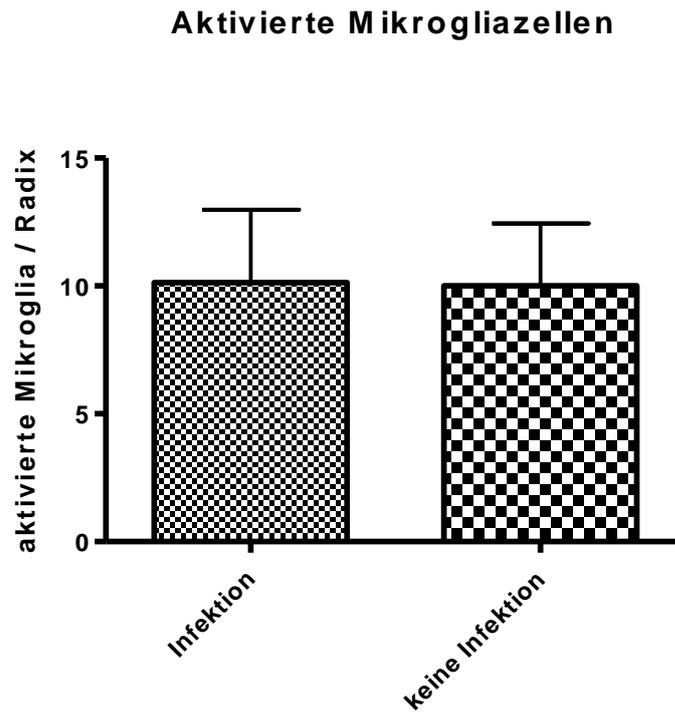
**Abb.16** Vergleich der Rotarod-Leistung von jeweils 8 mit *S. pneumoniae* infizierten und nicht infizierten G93A-transgenen Mäusen. Dargestellt sind die Mediane (mit Minimum und Maximum) der Rotarod-Leistung zu jeweils 12 verschiedenen Test-Zeitpunkten. Es fand sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (jeweils  $p>0,05$ ). (Zur besseren Übersicht sind die Symbole leicht gegeneinander versetzt dargestellt.)

### 3.6.4. Mikrogliazellenaktivierung

Aktiviert Mikrogliazellen im Rückenmark von mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten und mit Ceftriaxon antibiotisch behandelten, sowie nicht infizierten, aber antibiotisch behandelten G93A-transgenen Mäusen, wurden mit Hilfe der Isolectin-B4-Färbung in Rückenmark-Paraffinschnitten dargestellt und ausgezählt. Mikrogliazellen welche aktiviert waren, stellten sich in der Isolectin-B4-Färbung als braune Zellen dar, die im Vergleich zu den ramifizierten nicht aktivierten Mikrogliazellen runde Zellkörper aufwiesen (siehe Abb.17). In den Rückenmarksschnitten aller G93A-transgenen Mäuse beider Versuchsgruppen färbten sich aktivierte Mikrogliazellen an. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der aktivierten Mikrogliazellen in infizierten und nicht infizierten G93A-transgenen Mäusen gefunden werden ( $10,13 \pm 2,85$  Infektion vs.  $10,00 \pm 2,45$  keine Infektion  $p > 0,05$ ) (siehe Abb.18). In mit Isolectin-B4 gefärbten Großhirn-Schnitten von infizierten und nicht infizierten G93A-transgenen Mäusen, hatten sich weder aktivierte noch inaktivierte Mikrogliazellen angefärbt.



**Abb.17** Isolectin-B4-Färbung einer Mikrogliazelle (Pfeil) im inaktivierten (linkes Bild) sowie im aktivierten (rechtes Bild) Zustand im Rückenmark einer viermal mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten G93A-transgenen Maus.



**Abb.18** Vergleich der Anzahl aktivierter Mikrogliazellen in Isolectin-B4-Rückenmarksschnitten aus dem Radixbereich der Intumescentia cervicalis von mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten und nicht infizierten G93A-transgenen Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Es wurden für jedes der 8 Tiere beider Gruppen 6 Schnitte ausgezählt ( $p > 0,05$ ).

#### 4. Diskussion

Bakterielle Allgemeininfektionen können die Symptome der Amyotrophen Lateralsklerose und anderer neurodegenerativer Erkrankungen oft drastisch verschlechtern und den Krankheitsverlauf damit deutlich beschleunigen (Perry et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden Mechanismen zur Klärung dieses vom Kliniker beobachteten Phänomens untersucht.

In der Literatur ist beschrieben, dass Bakterienbestandteile, die während bakterieller Allgemeininfektionen freigesetzt werden, direkt oder indirekt neurotoxisch wirken können (Nau und Eiffert 2002; Perry et al. 2003). Die vorliegende Arbeit befasst sich im ersten Teil mit der Frage, ob Neurone von ALS-Patienten per se empfindlicher auf jene neurotoxischen Mechanismen reagieren als die Neurone von gesunden Menschen. Dies könnte erklären, warum bakterielle Allgemeininfektionen die ALS exazerbieren, bei ansonsten gesunden Menschen aber keine neurologischen Symptome verursachen. Zur Klärung dieser Frage wurde zunächst ein In-vitro-Modell verwendet. Neuronenähnliche SH-SY5Y-Neuroblastomzellen, welche die ALS-typische G93A-Mutation der SOD oder eine WT-SOD als Kontrolle trugen, wurden sowohl mit dem Bakterientoxin Pneumolysin behandelt als auch dem Angriff TLR-2-stimulierter humaner Makrophagen ausgesetzt. Damit wurde die Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber direkten bzw. indirekten neurotoxischen Mechanismen, die durch Bakterienbestandteile induziert wurden, überprüft.

Bislang existierte kein In-vivo-Modell, welches die Auswirkungen einer systemischen bakteriellen Infektion auf den Krankheitsverlauf der Amyotrophen Lateralsklerose beschreibt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher ein Modell, bestehend aus G93A-transgenen Mäusen die systemische bakterielle Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* und anschließend eine antibiotische Therapie mit Ceftriaxon erhielten, etabliert.

Im Folgenden soll näher auf die in der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Empfindlichkeit von G93A- und WT-SH-SY5Y-Zellen gegenüber Pneumolysin und TLR-stimulierten humanen Makrophagen, sowie die Auswirkungen von systemischen Begleitinfektionen auf den Krankheitsverlauf G93A-transgener ALS-Mäuse, eingegangen werden.

#### 4.1. Erhöhte Empfindlichkeit von G93A-Zellen gegenüber Pneumolysin

Anhand der in 3.1. beschriebenen Experimente konnte gezeigt werden, dass Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y, welche die für die ALS typische SOD-G93A-Mutation tragen, empfindlicher auf Pneumolysin reagierten als SH-SY5Y-WT-Zellen. Diese Beobachtung verbindet die ALS-typische G93A-Mutation mit einer erhöhten Empfindlichkeit der betroffenen Zellen gegenüber einem bakteriellen Toxin. Dies führt zu dem Schluss, dass G93A-mutante Neuronen von Patienten mit familiärer ALS ebenfalls empfindlicher auf Pneumolysin oder andere bakterielle Toxine reagieren könnten. ALS-Patienten erleiden häufig Infekte des Respirationstraktes. Das häufigste respiratorische Pathogen und gleichzeitig auch der häufigste Pneumonieerreger beim Erwachsenen ist *Streptococcus pneumoniae*. Pneumolysin, das von allen *Streptococcus pneumoniae*-Stämmen gebildet wird, ist der wichtigste Virulenzfaktor dieses Bakteriums (Gelanis 2001; Nau und Brück 2002; Hirst et al. 2004). Bei Pneumolysin handelt es sich um ein zytosolisches Protein, das spontan oder durch eine antibiotische Therapie aus dem Bakterium freigesetzt werden kann. Die Toxizität beruht auf der Bildung von Poren in der Membran eukaryontischer Zellen. Das Toxin bindet an das Cholesterin in der Lipidschicht der Zellmembran, oligomerisiert zu ringförmigen Strukturen und bildet schließlich Poren in der Doppellipidschicht der Membran mit einem Durchmesser von ca. 20-50 nm (Gilbert et al. 1999; Bonev et al. 2001). Durch die Bildung dieser Poren kommt es zu einem starken, von extrazellulär nach intrazellulär verlaufendem Calciumstrom in die Zelle. Die Quantität des eingeströmten Calciums bewegt sich im mikromolaren Bereich. Als Folge des Calciumeinstroms steigt die zytosolische Calciumkonzentration in der Zelle stark an. Dieser Anstieg resultiert ausschließlich aus dem Einstrom von extrazellulärem Calcium und nicht aus der Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern wie zum Beispiel den Mitochondrien oder dem endoplasmatischen Retikulum. Ebenso erfolgt der Calciumeinstrom allein durch die von Pneumolysin gebildete Calciumpore und nicht durch spannungsabhängige Calciumkanäle, die sich physiologischerweise in der Zellmembran befinden (Stringaris et al. 2002). Die erhöhte Calciumbelastung in der Zelle führt schließlich zu einer vermehrten Aktivierung der p38-mitogen-aktivierten-Protein-Kinase. Diese Kinase ist vermutlich durch die Induktion von NO mit für die degenerativen Prozesse in G93A-Zellen verantwortlich (Tortarolo et al. 2003). Daneben kommt es zur Öffnung

von spannungsabhängigen mitochondrialen Poren („mitochondrial permeability transition pores“) mit konsekutiver Kaspasenaktivierung. Dies aktiviert Reaktionswege, welche in die Apoptose führen (Brustovetsky et al. 2003). Der apoptotische Zelltod durch Pneumolysin ist hauptsächlich bei niedrigen Pneumolysinkonzentrationen beschrieben, jedoch nicht obligat. Zellen, die Pneumolysin in höheren Konzentrationen ausgesetzt sind, können ebenfalls als Folge einer toxininduzierten Lyse untergehen (Stringaris et al. 2002; Hirst et al. 2004). Anhand des zur Apoptosedetektion durchgeführten In-situ-Tailings konnte dementsprechend in dieser Arbeit festgestellt werden, dass nicht alle mit Pneumolysin behandelten G93A- und WT-Zellen apoptotisch waren. Jedoch fand sich nach Pneumolysin-Behandlung eine höhere Anzahl von Apoptosen unter den G93A-Zellen als unter den WT-Zellen. Diese Beobachtung bestätigt die im WST-1-Test gemessene höhere Empfindlichkeit der G93A-Zellen gegenüber Pneumolysin, vermutlich durch die vermehrte Aktivierung der spannungsabhängigen mitochondrialen Poren durch höhere zytosolische Calciumkonzentrationen (siehe 4.1.1.).

Das in der Arbeit verwendete Modell aus mit Pneumolysin behandelten WT- und G93A-Zellen simulierte den direkten Angriff eines Bakterientoxins auf neuronale Zellen. Damit es in vivo zu dieser Situation kommt, muss das Toxin sich während einer bakteriellen Allgemeininfektion durch *Streptococcus pneumoniae* systemisch mit dem Blut verteilen und die physiologische Grenze der Blut-Hirn-Schranke überwinden. Auf diese Weise kann Pneumolysin ins ZNS gelangen und entsprechend dem in der Arbeit verwendeten Modell an Neuronen angreifen (Perry et al. 2003; Hirst et al. 2004). Eine frühere In-vitro-Arbeit von Zysk et al. hatte gezeigt, dass Pneumolysin in der Lage ist die Zellen der Blut-Hirn-Schranke zu zerstören (Zysk et al. 2000). Bislang existieren keine In-vivo-Daten welche die Pneumolysinkonzentration im Blut bei einer bakteriämischen Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* quantifizieren. Es lässt sich daher nicht mit Sicherheit festlegen in welcher Konzentration Pneumolysin in vivo im Blut mindestens vorliegen muss, um einen ZNS-Schaden im Sinne des verwendeten Modells zu induzieren. Stringaris et al. konnten in vitro zeigen, dass bei hohen Pneumolysinkonzentrationen in kurzer Zeit die Mehrzahl der Zellen getötet wurden (Stringaris et al. 2002). Um valide Messungen durchführen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit daher eine relativ geringe Pneumolysinkonzentration von 0,5 µg/ml verwendet. Diese

Konzentration zeigte sich im verwendeten Zellmodell als geeignet, um einen signifikanten Unterschied in der Empfindlichkeit zwischen WT- und G93A-Zellen nachzuweisen. Deutlich niedrigere Pneumolysinkonzentrationen von bis zu 0,18 µg/ml konnten bisher im Liquor von Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis gemessen werden (Spreer et al. 2003). Dies verweist darauf, dass in vivo möglicherweise niedrigere Pneumolysinkonzentrationen als 0,5 µg/ml im Plasma ausreichen, um einen biologisch wirksamen Übertritt von Pneumolysin ins Hirnparenchym zu gewährleisten. Jedoch muss beachtet werden, dass Pneumolysin wahrscheinlich sehr schnell an das Cholesterin in den Membranen der in Liquor und Blut vorhandenen Zellen bzw. Endothelien bindet (Hirst et al. 2004). Es kann daher spekuliert werden, dass tatsächlich eine höhere als die bisher von Spreer et al. gemessene Pneumolysinkonzentration in Blut und Liquor nötig ist, um eine biologische Wirksamkeit zu entfalten.

Da G93A-Zellen empfindlicher auf Pneumolysin reagieren als gesunde WT-Zellen liegt die Vermutung nahe, dass bei ALS-Patienten geringere Plasmakonzentrationen von Pneumolysin ausreichen um einen Neuronenschaden zu induzieren. Gegen diese Vermutung spricht zunächst, dass sowohl bei Gesunden als auch ALS-kranken vermutlich die gleiche Pneumolysinkonzentration im Blut notwendig ist um überhaupt die Blut-Hirn-Schranke zu durchbrechen. Eine Plasmakonzentration von Pneumolysin die zu gering ist um die Blut-Hirn-Schranke biologisch wirksam zu durchbrechen, würde daher vermutlich weder das ZNS des ALS-kranken noch des Gesunden schädigen, da kein Pneumolysin in das ZNS übertritt. Dennoch gelangt vermutlich auch bei einer relativ geringen Plasmakonzentration von Pneumolysin ein Teil des Toxins ins ZNS. Als förderlich für diesen Vorgang erweisen sich hierbei wahrscheinlich die sogenannten „circumventrikulären Organe“. Dabei handelt es sich um Hirnareale, die von Blutgefäßen mit einem fenestrierten Endothel versorgt werden. Die Blut-Hirn-Schranke ist in diesen Gebieten weniger dicht und ermöglicht es Molekülen wie Pneumolysin frei ins Hirngewebe überzutreten, ohne vorher an den vaskulären Endothelzellen anzugreifen (Perry et al. 2003). Eine bakteriämische Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*, bei der ein relativ geringer Teil des Bakterientoxins ins ZNS übertritt, kann daher vermutlich bereits die gegenüber Pneumolysin empfindlicheren Neurone von ALS-Patienten schädigen, während beim ansonsten Gesunden, mit nicht vorgeschädigten Neuronen, keine neurologischen Symptome zu beobachten sind.

#### 4.1.1. Erhöhte Calciumkonzentrationen nach Pneumolysin in G93A-Zellen

Nachdem in den ersten Experimenten festgestellt wurde, dass SOD-G93A-SH-SY5Y-Zellen empfindlicher auf Pneumolysin reagierten als SOD-WT-SH-SY5Y-Zellen, lag die Vermutung nahe, dass die G93A-Zellen in anderer Weise auf den durch Pneumolysin verursachten Calciumeinstrom reagierten als WT-Zellen. Mit Hilfe der Experimente welche sich auf das Fura-2-Calcium-Video-Imaging stützten konnte gezeigt werden, dass bei G93A-Zellen über die Dauer der Pneumolysin-Behandlung höhere zytosolische Calciumkonzentrationen zu messen waren als bei WT-Zellen. Offensichtlich war die Fähigkeit der G93A-Zellen die Calciumkonzentration des Zytosols im Sinne der Calciumhomöostase möglichst gering zu halten eingeschränkt. Hierin liegt vermutlich der Schlüssel für die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Pneumolysin. Erhöhte zytosolische Calciumkonzentrationen können über die Aktivierung der „mitochondrial permeability transition pores“ zu Apoptose und Nekrose führen (siehe 4.1.). Außerdem kann es zu einer vermehrten zellschädigenden Aktivierung von Proteasen, Lipasen und Endonukleasen kommen (Menzies et al. 2002; Armstrong 2006; Chinopoulos und Adam-Vizi 2006). Die gesunde bzw. SOD-WT-Zelle verfügt normalerweise über eine Reihe von Mechanismen die sie dazu befähigt, die zytosolische Calciumkonzentration auf einem möglichst physiologischen Niveau zu stabilisieren und den durch Calcium verursachten Schaden hierdurch gering zu halten. Zu diesen Mechanismen zählen die Aufnahme von zytosolischem Calcium in intrazelluläre Speicher, die Bindung von Calcium an zytosolische Proteine und schließlich der Abtransport des zytosolischen Calciums in den Extrazellulärraum (von Lewinski und Keller 2005). Die in den Experimenten beobachtete eingeschränkte Fähigkeit der G93A-Zellen die zytosolische Calciumkonzentration nach Pneumolysinexposition niedrig zu halten weist darauf hin, dass bei diesen Zellen zumindest einer oder möglicherweise sogar mehrere Mechanismen der zytosolischen Calciumregulation gestört sind. Eine zentrale Rolle spielen hierbei vermutlich mitochondriale Fehlfunktionen der G93A-Zellen. Die Mitochondrien fungieren neben dem endoplasmatischen Retikulum physiologischerweise als Calciumspeicher und sind in der Lage, plötzlich steigenden zytosolischen Calciumkonzentrationen durch eine rasche Aufnahme von Calcium ins Mitochondrium entgegen zu wirken (Menzies et al. 2002). Untersuchungen an den Neuronen G93A-transgener Mäuse hatten gezeigt, dass die Mitochondrien der G93A-Zellen Störungen im energiegewinnenden Prozess der oxidativen

Phosphorylierung aufwiesen. Hieraus resultierte eine gestörte mitochondriale Calciumaufnahme mit erhöhten zytosolischen Calciumkonzentrationen und einer erhöhten Zellempfindlichkeit (Damiano et al. 2006). An den in der vorliegenden Arbeit verwendeten G93A-SH-SY5Y-Zellen konnten von Carri et al. ebenfalls verringerte mitochondriale Membranpotentiale, die auf eine Störung der mitochondrialen Funktion hinwiesen, gemessen werden (Carri et al. 1997). Daneben sind mitochondriale Fehlfunktionen in G93A-Zellen vermutlich auch indirekt für einen verminderten Abtransport von Calcium in den Extrazellulärraum und die gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Pneumolysin verantwortlich. Die Hauptaufgabe der Mitochondrien besteht physiologischerweise in der Produktion von Energie für die Zelle in Form von ATP. In den Mitochondrien von Neuronen G93A-transgener Mäuse konnten signifikant reduzierte Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette nachgewiesen werden. Dies wiederum resultierte in einer verminderten Produktion von ATP (Mattiuzzi et al. 2002). Die gleiche Beobachtung konnte von Beretta et al. an den in der vorliegenden Arbeit verwendeten G93A-SH-SY5Y-Zellen gemacht werden. Im Vergleich zu WT-Zellen produzieren G93A-Zellen circa 30% weniger ATP (Beretta et al. 2003). Neuronale Zellen verfügen normalerweise über eine Reihe von ATP-abhängigen Ionentransportern. Dazu gehört unter anderem eine ATP-abhängige Calciumpumpe, welche intrazelluläres zytosolisches Calcium unter Energieverbrauch in den Extrazellulärraum transportiert. Sinkende ATP-Konzentrationen aufgrund gestörter mitochondrialer Funktionen können zu einer Depolarisation des Neurons führen, da Ionen, wie z.B. Natrium, nicht über ATP-abhängige Pumpen nach extrazellulär transportiert werden können. Die vermehrte Ansammlung von Natrium im Zytosol führt zu einer verminderten Aktivität von ATP-unabhängigen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$ -Transportern in der Zellmembran. Das Neuron muss dann vermehrt auf die ATP-abhängigen Calciumpumpen zurückgreifen um rasch eingeströmtes Calcium zu entfernen, was aufgrund von fehlendem ATP jedoch nicht möglich ist (Menzies et al. 2002). Ein starker Calciumeinstrom durch Pneumolysin könnte folglich von G93A-Zellen mit mitochondrialen Schädigungen und ATP-Defizit weniger gut bewältigt werden.

Des Weiteren bestehen auch Hinweise darauf, dass die Calciumregulation in den verwendeten G93A-SH-SY5Y-Zellen aufgrund einer verminderten Expression calciumbindender Proteine gestört ist. Dies könnte mitursächlich für die gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Pneumolysin sein. Proteine, die Calcium regulieren, sind

unter anderem Parvalbumin, Calmodulin und Calbindin-D<sub>28K</sub>. Diese zytosolischen Moleküle sind in der Lage eingeströmtes Calcium zu binden und dadurch die zytosolische Calciumkonzentration zu regulieren. Bisherige Untersuchungen konnten zeigen, dass sich in den von Degeneration betroffenen spinalen Motoneuronen G93A-transgener Mäuse nur relativ geringe Parvalbumin- und Calbindin-D<sub>28K</sub>-Konzentrationen fanden. Kreuzungen aus G93A-transgenen Mäusen und transgenen Mäusen die Parvalbumin überexprimierten brachten jedoch Tiere hervor, welche zwar an ALS erkrankten, jedoch einen deutlich verzögerten Erkrankungsbeginn und ein verlängertes Überleben aufwiesen (Beers et al. 2001). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Zellen die Träger der G93A-Mutation sind vermutlich auch in vermindertem Maße calciumbindende Proteine, wie zum Beispiel Parvalbumin und Calbindin-D<sub>28K</sub>, exprimieren. Interessanterweise konnten verminderte Parvalbumin- und Calbindin-D<sub>28K</sub>-Konzentrationen auch in den Neuronen von an sporadischer ALS verstorbenen Patienten nachgewiesen werden (Alexianu et al. 1994). Die verminderte Expression von calciumbindenden Proteinen scheint demnach ein gemeinsames Charakteristikum in der Pathologie von familiärer und spontaner ALS darzustellen. Vor diesem Hintergrund ist es wahrscheinlich das G93A-SH-SY5Y-Zellen ebenfalls in vermindertem Maße calciumbindende Proteine exprimieren und dadurch anfälliger gegenüber einem Calciumeinstrom durch Pneumolysin werden. Bisher existieren keine Quantifizierungen von Parvalbumin, Calmodulin und Calbindin-D<sub>28K</sub> in G93A-SH-SY5Y-Zellen. Ferri et al. konnten jedoch bereits nachweisen, dass in diesen Zellen das calciumregulierende Protein Calcineurin in vermindertem Maße exprimiert wird. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung einer gestörten Calciumregulation durch verminderte oder fehlerhafte Expression von calciumregulierenden Proteinen in diesen Zellen (Ferri et al. 2001).

#### 4.1.2. Einfluss von Diethyldithiocarbamat auf die Empfindlichkeit gegenüber Pneumolysin

Der wesentliche zellbiologische Unterschied der in der Arbeit verwendeten G93A-SH-SY5Y- und WT-SH-SY5Y-Zellen lag in der Expression der beiden jeweils verschiedenen SOD-1-Moleküle. Um den Einfluss von physiologischer WT- und mutanter G93A-Superoxid-Dismutase auf die Pneumolysinempfindlichkeit der entsprechenden SH-SY5Y-Zellen zu charakterisieren, wurde die SOD beider Zelllinien mit Diethyldithiocarbamat (DETC) gehemmt. Vorhergehende Arbeiten hatten gezeigt, dass das Überleben G93A-transgener Neurone durch kurzfristige DETC-Behandlung verbessert wurde, während das Überleben von WT-Neuronen nicht beeinflusst wurde (Bredesen et al. 1996; Azzouz et al. 2000). Anhand dieser Ergebnisse wäre zu erwarten gewesen, dass die Empfindlichkeit der G93A-transgenen SH-SY5Y-Zellen gegenüber Pneumolysin nach 24 h und 72 h DETC-Behandlung vermutlich aufgrund einer erhöhten Zellresistenz abnimmt, während die Empfindlichkeit von WT-Zellen nicht oder nur unwesentlich beeinflusst würde. Erwartungsgemäß konnte dieses Ergebnis nach 24 h DETC-Behandlung beobachtet werden. Überraschenderweise zeigte sich jedoch nach nur 72 h, dass die Empfindlichkeit von mit DETC behandelten WT-Zellen gegenüber Pneumolysin zunahm, während der bei G93A-Zellen nach 24 h DETC-Behandlung beobachtete protektive Effekt wieder aufgehoben wurde. Es schien, dass der Mechanismus durch welchen G93A-mutante Zellen nach DETC initial resistenter gegenüber Pneumolysin wurden, sich nach relativ kurzer Zeit wieder selbst limitierte. Dieser Prozess schien dabei auch die WT-Zellen zu beeinflussen.

DETC inhibiert als Kupferchelator das SOD-Molekül, indem es das Kupferatom im aktiven Zentrum des Enzyms bindet (Nikolic-Kokic et al. 2006). Daneben ist DETC in der Lage freies Kupfer in der Zelle zu binden und darüber hinaus auch die weitere Synthese von mutierter SOD-1 zu inhibieren (Azzouz et al. 2000). Als hauptursächlich für den Untergang SOD-1-mutierter Neurone gelten die mutationsbedingte verstärkte Exposition des Kupferatoms im aktiven Zentrum des Enzyms, die Freisetzung von Kupfer ins Zytosol und die Ablagerung von toxischen SOD-Aggregaten. DETC inhibierte damit wahrscheinlich jene Mechanismen, über welche die mutierte SOD ihre Toxizität entfaltet. Die gesunde SOD-1 hat normalerweise die Aufgabe die kupfergebundene Konversion des toxischen

Superoxidradikals zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff zu katalysieren. Es wird vermutet, dass das mutierte SOD-1-Enzym sich in seiner Faltstruktur ändert. Hierdurch verändert sich die Substratspezifität des Enzyms und es wird schädlichen kupfermedierten oxidativen Prozessen Vorschub geleistet. Die Folge ist eine vermehrte Produktion so genannter reaktiver oxygenener Spezies (ROS). Dazu zählen unter anderem das kupfergebundene toxische Hydroxylradikal sowie ein toxisches Kohlenmonoxidradikal. Darüber hinaus führt die Veränderung der Faltstruktur auch zu einer erhöhten Instabilität des SOD-1-Moleküls. Damit verbunden sind ein erhöhtes Proteolyserisiko sowie die vermehrte Freisetzung von Kupfer ins Zytoplasma. Freies Kupfer wiederum kann zytotoxisch wirken. Durch die Aggregation und Ablagerung von mutierter SOD, insbesondere in den Mitochondrien, können weitere Neuronenschäden induziert werden (Deng et al. 1993; Beretta et al. 2003; Branco et al. 2006). Eine durch DETC vermittelte Verminderung der Zellschädigung über die Inhibition der oben beschriebenen toxischen SOD-1-Mechanismen kann dabei vermutlich erklären, warum mit DETC behandelte G93A-Zellen initial resistenter gegenüber Pneumolysin wurden. Es kann spekuliert werden, dass Zellen durch geringeren oxidativen Stress und verminderte Ablagerung toxischer Stoffe über vermehrte Ressourcen verfügen, um einen durch Pneumolysin induzierten Calciumeinstrom zu bewältigen. Dabei spielt vermutlich insbesondere eine, durch DETC vermittelte, verbesserte strukturelle Integrität der Mitochondrien eine entscheidende Rolle. Mitochondrien sind in der Lage die zytosolische Calciumkonzentration durch Aufnahme von Calcium zu vermindern. Aufgrund der bei SOD-1-Mutationen auftretenden vermehrten Produktion von ROS werden die Mitochondrien geschädigt und können ihrer Aufgabe als Calciumpuffer nicht mehr nachkommen (Carri et al. 1997; Mattiazzi et al. 2002). Die Verminderung von ROS durch die DETC-Hemmung der G93A-SOD stellt vermutlich die mitochondriale Funktion, zumindest teilweise, wieder her und lässt die Zellen damit resistenter gegenüber Pneumolysin bzw. einem starken Calciumeinstrom werden. Fraglich bleibt jedoch warum es bereits nach 72-stündiger DETC-Behandlung zu einer Umkehr bzw. Aufhebung des protektiven Effekts gegenüber Pneumolysin kam. Rothstein et al. konnten zeigen, dass Neurone organotypischer Kulturen deren SOD chronisch mit DETC in geringen Konzentrationen inhibiert wurde, vermehrt geschädigt wurden. Diese Schädigungen traten jedoch erst nach ca. 4 Wochen DETC-Behandlung auf (Rothstein et al. 1994). Es kann daher vermutet werden, dass durch die Behandlung

mit DETC über 72 h kein signifikanter Schaden an den SH-SY5Y-Zellen entstanden war. Dennoch zeigten überraschenderweise die WT-Zellen eine vermehrte Empfindlichkeit gegenüber Pneumolysin. Ausgehend von der mittlerweile anerkannten „Gain of Function“-Theorie zur SOD-1-Mutation war dies nicht zu erwarten gewesen. Die Theorie besagt, dass Zellschädigungen bei SOD-Mutationen nicht durch Veränderungen der Enzymaktivität sondern durch Veränderungen der Substratspezifität verursacht werden (Chiba et al. 2006). Experimente an SOD-Knockout-Mäusen hatten gezeigt, dass das Überleben der Tiere durch die ausgeschaltete SOD nicht beeinflusst wurde (Reaume et al. 1996). Bei einer Hemmung der WT-SOD, und somit einem Ausschalten der Enzymaktivität, dürfte die WT-Zelle demnach nicht geschädigt sein und noch über die gleichen Ressourcen der Pneumolysinresistenz wie nach 24 h verfügen. Als wichtiger Punkt erscheint hierbei jedoch, dass eine Hemmung der SOD auch zu einer vermehrten Ansammlung des Superoxidradikals führt, das von einer suffizienten SOD physiologischerweise neutralisiert wird. Das Superoxidradikal wiederum ist potentiell zellschädigend (Raha und Robinson 2000; Branco et al. 2006). Es kann daher vermutet werden, dass die 72-stündige DETC-Hemmung des SOD-Enzyms zu einer vermehrten Ansammlung des Superoxidradikals und folgender leichter zellulärer Schädigung führte. Diese Schädigung könnte ausreichend gewesen sein, um WT-Zellen und G93A-Zellen empfindlicher gegenüber Pneumolysin werden zu lassen. Der protektive Effekt den DETC über 24 h in G93A-Zellen gegenüber Pneumolysin verursachte, könnte demnach durch vermehrte Ansammlung des Superoxidradikals über 72 h wieder aufgehoben worden sein.

#### 4.1.3. Einfluss von N-Acetylcystein auf die Empfindlichkeit gegenüber Pneumolysin

Für die antioxidativ wirkende Substanz N-Acetylcystein konnte bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass sie das Überleben G93A-transgener Mäuse verlängerte und die mitochondriale Schädigung in G93A-transfizierten SH-SY5Y-Zellen reversibel beeinflusste (Andreassen et al. 2000; Beretta et al. 2003). Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob N-Acetylcystein entsprechende protektive Effekte auch gegenüber Pneumolysin erzielen konnte. Es konnte nachgewiesen werden, dass G93A-SH-SY5Y-Zellen durch die Gabe von N-

Acetylcystein über 24 und 72 h zwar nur in geringem, jedoch statistisch signifikantem Maße, resistenter gegenüber Pneumolysin wurden. Die Resistenz von WT-SH-SY5Y-Zellen gegenüber Pneumolysin durch N-Acetylcystein blieb hingegen unbeeinflusst. N-Acetylcystein ist ein in der Klinik relativ häufig verwendetes Medikament, das unter anderem als Mukolytikum, z.B. bei AIDS und zystischer Fibrose, sowie als Antidot bei Paracetamolintoxikation eingesetzt wird (Andreassen et al. 2000). Der wesentliche Effekt von N-Acetylcystein besteht in der Induktion einer vermehrten zellulären Glutathionsynthese durch zusätzliche Bereitstellung des Glutathionvorläufers Cystein. Glutathion ist in der Zelle eine wichtige Ressource zur Eliminierung von bei SOD-1-Mutationen vermehrt gebildeten toxischen reaktiven oxygenen Spezies (ROS). Dabei fungiert Glutathion als Substrat des Enzyms Glutathionperoxidase. Dieses Enzym metabolisiert Glutathion in einer Reaktion mit Wasserstoffperoxid. Hierdurch verringert sich der Anteil des potentiell reagiblen Wasserstoffperoxids in der Zelle, was in einer verminderten Bildung von ROS resultiert. Daneben ist Glutathion in der Lage Metalle wie zum Beispiel Kupfer zu komplexieren. Freies Kupfer, das von der mutierten SOD-1 in vermehrtem Maße freigesetzt wird, interagiert unter anderem mit Wasserstoffperoxid und katalysiert dadurch die Bildung toxischer Hydroxylradikale. Durch die Bindung von Glutathion an zytosolisches Kupfer wird die Bildung dieser toxischen Radikale reduziert. Somit reduziert N-Acetylcystein insgesamt die schädigende Wirkung toxischer Radikale, die in G93A-Zellen vermehrt gebildet werden (Freedman et al. 1989; Andreassen et al. 2000; Olivieri et al. 2001). Vermutlich ist dieser Mechanismus auch für die leicht verringerte Empfindlichkeit von mit N-Acetylcystein behandelten G93A-transfizierten-Zellen gegenüber Pneumolysin verantwortlich. Beretta et al. konnten nachweisen, dass sich in G93A-transfizierten-SH-SY5Y-Zellen durch die Gabe von N-Acetylcystein die Produktion von ROS signifikant verringerte. Gleichzeitig wurden mitochondriale Dysfunktionen der G93A-transfizierten Zellen reversibel beeinflusst. Dieser Effekt wurde durch eine Wiederherstellung der mitochondrialen enzymatischen Funktionen erzeugt. Bemerkenswerterweise konnte N-Acetylcystein in SH-SY5Y-WT-Zellen sowohl die ROS-Produktion nicht beeinflussen als auch die mitochondrialen Funktionen nicht verbessern. Diese Beobachtung ließ die vermehrte Produktion von ROS in G93A-SH-SY5Y-Zellen als mit hauptursächlich für deren mitochondrialen Dysfunktionen, wie zum Beispiel die verringerte Aktivität der Cytochrom c Oxidase, erscheinen (Beretta et al. 2003). In Übereinstimmung mit

diesen Ergebnissen konnte in der vorliegenden Arbeit eine leichte Protektion gegenüber Pneumolysin durch N-Acetylcystein nur in G93A-Zellen, nicht jedoch in WT-Zellen, beobachtet werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass es in den G93A-Zellen durch die N-Acetylcystein-Behandlung, wahrscheinlich ähnlich wie durch eine DETC-Behandlung (siehe 4.1.2), über den Mechanismus der verringerten Bildung von ROS zu einer zumindest teilweisen Wiederherstellung der mitochondrialen Funktionen kam. In der Folge konnten die Mitochondrien der G93A-Zellen vermutlich adäquater auf den durch Pneumolysin verursachten zytosolischen Calciumeinstrom reagieren und durch mitochondriale Calciumaufnahme, die in G93A-Zellen vermutlich gestört ist, die zytosolische Calciumkonzentration suffizienter regulieren (Mattiuzzi et al. 2002). Dementsprechend konnte bei WT-Zellen, deren ROS-Produktion und mitochondriale Funktion nicht gestört sind, in den Experimenten kein schützender Effekt von N-Acetylcystein gegenüber Pneumolysin erzielt werden. Anhand dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass N-Acetylcystein die zellulären Mechanismen der Pneumolysinresistenz nicht verstärkt sondern tendenziell lediglich wiederherstellt. Ebenso scheint der Grad der Protektion durch N-Acetylcystein nur bis zu einem bestimmten Punkt steigerbar, da durch die längere Inkubation mit NAC über 72 h, im Vergleich zu 24 h, kein stärkerer protektiver Effekt gegenüber Pneumolysin erzielt werden konnte. Obwohl Beretta et al. durch die Behandlung mit N-Acetylcystein in der Konzentration von 1 mmol in G93A-Zellen eine annähernd vollständige Regeneration der mitochondrialen Funktionen im WST-1-Test beobachteten, konnte in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten durch Behandlung der Zellen mit 1 mmol N-Acetylcystein die Pneumolysinresistenz der G93A-Zellen nicht auf das Niveau der WT-Zellen angehoben werden. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme der Existenz vermutlich mehrerer Ursachen für die gesteigerte Empfindlichkeit von G93A-Zellen gegenüber Pneumolysin. Da trotz der anzunehmenden Regeneration der mitochondrialen Funktion durch N-Acetylcystein G93A-Zellen noch immer signifikant empfindlicher gegenüber Pneumolysin waren als WT-Zellen, scheint die mitochondriale Calciumaufnahme vermutlich nicht der einzige vorhandene und gestörte Mechanismus zu sein, durch welchen die Zelle einen pneumolysininduzierten zytosolischen Calciumeinstrom bewältigt. In Betracht kommen weiterhin eine verminderte Expression calciumbindender Proteine sowie ein verminderter Abtransport von Calcium in den Extrazellulärraum (siehe 4.1.1.).

#### 4.2. Vermehrte Empfindlichkeit von G93A-Zellen gegenüber TLR-stimulierten Makrophagen

Bakterienbestandteile die während systemischer Infektionen freigesetzt werden, können vermutlich nicht nur direkt sondern auch indirekt über die Aktivierung von Mikrogliazellen zum Neuronentod führen (Perry et al. 2003). Nguyen et al. hatten gezeigt, dass es bei SOD-transgenen Mäusen welche systemische intraperitoneale Infektionen mit dem Bakterienwandbestandteil LPS erhielten, zu einer Beschleunigung der ALS-typischen Neurodegeneration kam. Dabei war auch gleichzeitig eine vermehrte Aktivierung von Mikrogliazellen über den TLR-2 nachzuweisen. Das Ausmaß der Neurodegeneration korrelierte mit dem Grad der Mikrogliaaktivierung. Dies ließ eine Verbindung zwischen dem Bakterienbestandteil der anscheinend Mikrogliazellen aktivierte und dem beschleunigten Neuronentod vermuten (Nguyen et al. 2004). Im in der vorliegenden Arbeit verwendeten Co-Kulturmodell konnte weiterführend eine, im Vergleich zu SOD-WT-Zellen, gesteigerte Empfindlichkeit von SOD-G93A-Zellen gegenüber dem Angriff von Makrophagen, die durch das Lipopeptid Pam3Cys aktiviert wurden, gezeigt werden. Damit bestätigte sich *in vitro* zum einen, dass ein Bakterienbestandteil immunkompetente Zellen aktivieren und hierdurch zum Schaden oder Tod von ALS-typischen neuronalen Zellen führen kann. Zum anderen könnte die gesteigerte Empfindlichkeit der ALS-typischen G93A-Zellen gegenüber den TLR-aktivierten immunkompetenten Zellen, neben der direkten Toxizität von Bakterienbestandteilen, eine Erklärung für den häufig beobachteten rascheren Krankheitsverlauf der ALS während bakterieller Allgemeininfektionen liefern. Derartige bakterielle Infektionen können zur systemischen Freisetzung verschiedener Erregerbestandteile führen, welche über Rezeptoren der TLR-Familie Mikrogliazellen aktivieren (Lee und Lee 2002; Konat et al. 2006). Das verwendete Co-Kulturmodell simulierte den Angriff TLR-aktivierter Mikrogliazellen auf ALS-Neurone. Da es sich bei SH-SY5Y-Zellen um humanes Zellmaterial handelte, hätten die entsprechenden TLR-aktivierten Immunzellen idealerweise auch vom Menschen stammen sollen. Bisherige Modelle hatten entweder nur auf Tierzellen oder tumoröse Zellen des mononukleären Phagozytensystems zurückgegriffen um Mikrogliazellaktivierungen zu simulieren (Ebert et al. 2005; Messmer und Reynolds 2005). Optimal wären demnach primäre humane Mikrogliazellen gewesen. Weil jedoch vom lebenden Menschen in der Regel keine primären Mikrogliazellen aus dem ZNS erhältlich sind, wurde für die

Experimente der vorliegenden Arbeit auf humane Makrophagen, die sich aus Blutmonozyten differenziert hatten, zurückgegriffen. Periphere Makrophagen, die wie Mikrogliazellen dem mononukleären Phagozytensystem entstammen, sind den ZNS-residenten Mikrogliazellen, die ursprünglich einmal als Makrophagen in das ZNS einwanderten, strukturell und funktionell ähnlich (Medvedev et al. 2006). Andersson et al. hatten gezeigt, dass humane Makrophagen welche sich aus Blutmonozyten differenziert hatten, sowohl TLR-2 exprimieren als auch durch den TLR-2 Agonist Pam3Cys aktiviert wurden. Durch die aktivierende Stimulation mit dem Lipopeptid Pam3Cys kam es unter anderem zur Freisetzung der potentiell neurotoxischen Zytokine Interleukin 6 und TNF- $\alpha$  (Andersson et al. 2004). Im Co-Kulturmodell der vorliegenden Arbeit konnte Pam3Cys, vermutlich über TLR-2 Stimulation der Makrophagen mit entsprechender Zytokinfreisetzung, einen Schaden sowohl an WT- als auch G93A-Zellen induzieren. Bemerkenswerterweise zeigte sich auch in den nicht mit Pam3Cys stimulierten Co-Kulturen ein zwar geringerer jedoch, über 72 h zunehmender Zellschaden. Vermutlich konnten also auch SH-SY5Y-Zellen bzw. deren Bestandteile allein zu einer Aktivierung der Makrophagen führen. Aktivierte Mikrogliazellen, die aktivierten Makrophagen ähnlich sind, finden sich bereits ohne eine Begleitinfektion in vermehrtem Ausmaß im Gewebe von ALS-Patienten. Es wird die Hypothese vertreten, dass durch die rezidivierenden Neuronenuntergänge in neurodegenerativen Erkrankungen wie der ALS Neuronenbestandteile chronisch freigesetzt werden. Hierdurch werden vermutlich auch die Mikrogliazellen vermehrt aktiviert (Combrinck et al. 2002). So konnten Lotz et al. an Primärkulturen der Maus nachweisen, dass Mikrogliazellen durch die kombinierte Stimulation mit Pam3Cys und dem neuronalen Membranbestandteil Amyloid- $\beta$  mehr TNF- $\alpha$  und NO freisetzen als durch die alleinige Behandlung mit einer dieser Substanzen. Diese Ergebnisse führten zu der Erkenntnis, dass die bereits voraktivierten Mikrogliazellen von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen sensitiver auf bakterielle Bestandteile reagieren die während systemischer bakterieller Allgemeininfektionen freigesetzt werden und mit dem ZNS kommunizieren (Lotz et al. 2005). Die Mikrogliazellen eines ALS-Patienten verursachen demnach wahrscheinlich infolge einer bakteriellen Begleitinfektion, z.B. durch die vermehrte Freisetzung von TNF- $\alpha$  und NO, eine stärkere neuronale Schädigung als die Mikrogliazellen ansonsten gesunder Menschen. Die aus der humanen Co-Kultur der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse weisen nun darauf hin, dass die Neurone von ALS-

Patienten zusätzlich empfindlicher auf den Angriff der vermehrt aktivierten Mikrogliazellen reagieren als die Neurone von gesunden Menschen. Das gleichzeitige Auftreten der vermehrten Mikrogliazellaktivierung durch bakterielle Bestandteile sowie die erhöhte Empfindlichkeit der vom Mikrogliazellangriff betroffenen ALS-Neurone könnte mit erklären, warum bakterielle Begleitinfektionen bei ansonsten gesunden Menschen keine neurologischen Symptome hervorrufen, bei ALS-Patienten aber zu einer Verschlimmerung des Krankheitsbildes führen.

#### 4.2.1. Fehlende neuroprotektive Wirkung von N-Acetylcystein im Co-Kulturmodell

N-Acetylcystein hatte SH-SY5Y-G93A-Zellen in Monokultur in geringem Maße resistenter gegenüber Pneumolysin werden lassen (siehe 3.3.). In den Co-Kulturen aus TLR-aktivierten Makrophagen und SH-SY5Y-Zellen konnte N-Acetylcystein jedoch keinen protektiven Effekt erzeugen. An murinen In-vitro-Modellen vorhergehender Arbeiten hatte die Stimulation von Mikrogliazellen durch TLR-Agonisten wie Pam3Cys oder CpG zum Neuronentod durch vermehrte Freisetzung von TNF- $\alpha$  und NO geführt. Die im vorliegenden Co-Kulturmodell aus Blutmonozyten gewonnenen Makrophagen hatten in früheren Arbeiten nach TLR-Stimulation auf die gleiche Weise reagiert (Andersson et al. 2004; Iliev et al. 2004; Ebert et al. 2005). Anhand dieser Ergebnisse konnte vermutet werden, dass der in den mit Pam3Cys stimulierten Co-Kulturen der vorliegenden Arbeit entstandene Zellschaden ebenfalls hauptsächlich durch TNF- $\alpha$  und NO verursacht wurde. N-Acetylcystein ist potentiell in der Lage die Wirkungen von TNF- $\alpha$  und NO zu blockieren. Zum einen inhibiert N-Acetylcystein das Enzym NO-Synthase und vermindert damit die NO-Bildung (Shao et al. 2006). Zum anderen reduziert N-Acetylcystein die Bildung von toxischen reaktiven oxygenen Spezies, die nach neueren Erkenntnissen durch TNF- $\alpha$  vermehrt gebildet werden (Olivieri et al. 2001; Shen und Pervaiz 2006). Es war daher anzunehmen, dass es in Co-Kulturen welche mit N-Acetylcystein behandelt wurden, zu einer Verminderung des Zellschadens kommen würde. Dieses konnte jedoch nicht nachgewiesen werden und lässt den Schluss zu, dass möglicherweise andere Substanzen als TNF- $\alpha$  und NO oder z.B. zelluläre Mechanismen der Phagozytose hauptursächlich für den gemessenen Zellschaden in den Co-Kulturen waren. Eine

Phagozytoseaktivität der Makrophagen konnte entsprechend in den Co-Kulturen beobachtet werden (siehe 3.5. und Abb.12a).

Daneben kommt möglicherweise auch noch ein anderer, bisher unbekannter Mechanismus für die fehlende protektive Wirkung von N-Acetylcystein in den Co-Kulturen in Betracht. Interessanterweise zeigte sich in allen mit N-Acetylcystein behandelten Co-Kulturen ein zwar statistisch nicht signifikanter, jedoch konsistent zu reproduzierender größerer Zellschaden als in den entsprechenden nicht mit N-Acetylcystein behandelten Gruppen. Diese Beobachtung scheint unerklärlich, da N-Acetylcystein, das in der verwendeten Konzentration von 1 mmol praktisch untoxisch ist, entweder keine oder allenfalls eine protektive Wirkung entfaltet (Andreassen et al. 2000). Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte die von Bock et al. bereits vor über 20 Jahren gemachte Beobachtung einer negativen Wechselwirkung von Aminoglykosiden und N-Acetylcystein liefern. Bock et al. hatten N-Acetylcystein mit dem Ziel eingesetzt, die Ototoxizität des Aminoglykosids Kanamycin zu verringern. Überraschenderweise verstärkte N-Acetylcystein jedoch aus bisher ungeklärter Ursache die Ototoxizität (Bock et al. 1983). Bei dem zur Selektion der transfizierten WT- und G93A-SH-SY5Y-Zellen eingesetzten Geneticin, das bei der Kultivierung der Zellen dem Zellmedium zugesetzt wurde, handelt es sich ebenfalls um ein Aminoglykosid (siehe 2.2.1.1.). Zwar wurde das geneticinhaltige Medium 2 Tage vor Beginn der Experimente durch geneticinfreies Medium ersetzt, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein geringer Anteil von Geneticin am Boden der Kulturgefäße bzw. intrazellulär verblieb. Es könnte somit auch eine negative Wechselwirkung von Geneticin und N-Acetylcystein ursächlich für die fehlende Neuroprotektion sein. Vor diesem Hintergrund muss auch beachtet werden, dass eine Wechselwirkung zwischen Geneticin und N-Acetylcystein möglicherweise auch die Experimente mit PLY und N-Acetylcystein ungünstig beeinflusst hat (siehe 4.1.3.). Der überraschend geringe protektive Effekt von N-Acetylcystein gegenüber PLY, welcher anhand der Ergebnisse von Beretta et al. höher erwartet wurde, könnte ebenfalls auf die oben beschriebene negative Wechselwirkung zurückzuführen sein (Beretta et al. 2003).

#### 4.3. Fehlende Auswirkung systemischer Infektionen in ALS-Mäusen

Nachdem SOD-G93A-Zellen *in vitro* empfindlicher als SOD-WT-Zellen auf den Angriff von Pneumolysin und TLR-aktivierten Makrophagen reagiert hatten, wurden die dort evidenten Auswirkungen der Neurotoxizität bakterieller Bestandteile weiterführend *in vivo* am G93A-Mausmodell untersucht. G93A-transgene ALS-Mäuse, die systemische Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* erhielten, wurden antibiotisch mit dem Cephalosporin Ceftriaxon behandelt. Cephalosporine zerstören die bakterielle Zellwand und führen damit zu einer stärkeren Keimbestandteilverfreisetzung als z.B. Antibiotika, die die Proteinbiosynthese inhibieren (Nau und Eiffert 2002). Ceftriaxon wurde gewählt, um eine sichere antibakterielle Wirkung bei einer den Mäusen zumutbaren Injektionsfrequenz zu erzielen. Daneben sollte eine möglichst hohe Quantität an bakteriellen Bestandteilen freigesetzt werden. Ceftriaxon ist ein in der Klinik häufig verwendetes Antibiotikum, das unter anderem bei Pneumonien und Meningitiden durch *S. pneumoniae* verabreicht wird (Nathan et al. 2005; Tamm et al. 2007). Frühere Arbeiten am G93A-Mausmodell sowie an einem murinen Prionenmodell hatten bereits gezeigt, dass die solitäre systemische Applikation des bakteriellen Zellwandbestandteils LPS zu einer Progredienz des neurodegenerativen Prozesses der Krankheitsbilder geführt hatte. Damit konnte *in vivo* nachgewiesen werden, dass ein bakterieller Bestandteil, der zunächst peripher zirkulierte, mit dem ZNS kommunizieren und dort einen Schaden verursachen kann (Combrinck et al. 2002; Nguyen et al. 2004). Diese Modelle simulierten jedoch nicht die spontane physiologische oder antibiotisch induzierte Freisetzung von bakteriellen Komponenten aus dem Bakterium. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit weiterführend G93A-transgene Mäuse mit einem Bakterium infiziert und anschließend antibiotisch behandelt. Angesichts der Ergebnisse der Arbeit von Nguyen et al., in der die systemische LPS-Gabe zur Progredienz der ALS geführt hatte, wurde erwartet, dass es in den mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten Mäusen durch Gabe von Ceftriaxon zu einer Freisetzung von bakteriellen Bestandteilen, wie z.B. Pneumolysin, kommt. In der Folge wurde auch hier auf eine beschleunigte Neurodegeneration mit rascherer Progredienz der ALS spekuliert. Überraschenderweise zeigte sich jedoch anhand der durchgeführten Tests, dass der Krankheitsverlauf der mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten Mäuse sich nicht von dem nicht infizierter G93A-transgener Tiere unterschied.

Bislang wurde die systemische Applikation von *Streptococcus pneumoniae* mit anschließender Antibiotikabehandlung nur an einem murinen Multiple Sklerose-Modell verwandt. Hier hatte die einmalige Infektion mit einem vergleichbaren Inokulum zu einer Verschlimmerung der Krankheit geführt (Herrmann et al. 2006). Es war daher im Vorfeld zu vermuten, dass ähnliche Mechanismen welche die Multiple Sklerose verschlimmert hatten, auch die ALS beschleunigen würde. Das ZNS-Gewebe der in dieser Arbeit verwendeten ALS-Mäuse glich in vieler Hinsicht dem von Multiple Sklerose-Mäusen (MS-Mäusen). Bei beiden Erkrankungen finden sich entzündliche ZNS-Prozesse mit aktivierten Mikrogliazellen. Diese exprimieren unter anderem TLR-2 und TLR-4 und können, wenn sie durch bakterielle Bestandteile über diese Rezeptoren aktiviert werden, Neuronen töten (Rowland und Shneider 2001; Perry et al. 2003; Ebert et al. 2005). Herrmann et al. hatten die Hypothese aufgestellt, dass die verstärkte Erkrankung der infizierten MS-Mäuse auf die vermehrte Aktivierung von Mikrogliazellen im ZNS zurückzuführen war, welche durch systemisch zirkulierende bakterielle Bestandteile und Zytokine induziert wurde (Herrmann et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit ließ sich bereits *in vitro* eine erhöhte Empfindlichkeit ALS-typischer Zellen gegenüber dem Angriff mikrogliazellähnlicher Makrophagen, die mit einem bakteriellen Bestandteil stimuliert wurden, nachweisen. Verschiedene Bestandteile der Zellwand von *Streptococcus pneumoniae* wie z.B. Teichon- und Lipoteichonsäuren sind Liganden des TLR-2, das Protein Pneumolysin Ligand von TLR-4. Sowohl periphere Makrophagen als auch die ZNS-residenten Mikrogliazellen exprimieren TLR-2 und TLR-4 und können durch die Bindung entsprechender bakterieller Bestandteile an die TLR aktiviert werden (Ebert et al. 2005; Draper et al. 2006; Gille et al. 2007). Die Aktivierung von peripheren Gewebsmakrophagen und dendritischen Zellen führte im Modell von Herrmann et al. zur Produktion einer Vielzahl von Zytokinen und anderen proinflammatorischen Mediatoren wie z.B. IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ . Diese peripher zirkulierenden Substanzen können das ZNS schädigen, obwohl sie die Blut-Hirn-Schranke primär nicht penetrieren können. Ein Übertritt ins ZNS kann jedoch an Hirnarealen mit einer weniger dichten Blut-Hirn-Schranke wie den „circumventrikulären Organen“ erfolgen. Auch bakterielle Bestandteile können in diesen Arealen vermutlich frei ins ZNS penetrieren und dort Mikrogliazellen aktivieren. Daneben können Endothelzellen und perivaskuläre Makrophagen des ZNS durch zirkulierende Bakterienbestandteile und Zytokine

aktiviert werden. Die hierdurch freigesetzten Zytokine können umliegende Neuronen durch die Aktivierung benachbarter Mikrogliazellen schädigen (Perry et al. 2003). Herrmann et al. hatten gezeigt, dass in ihrem Modell die Migration von Leukozyten in das ZNS der MS-Mäuse postinfektiös nur sehr gering war, sich jedoch in der systemischen Zirkulation erhöhte Konzentrationen von IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie aktivierte dendritische Zellen fanden. Interessanterweise hatte aber die Infektion TLR-2-defizienter MS-Mäuse nicht diese Effekte. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die durch bakterielle Bestandteile generierte Aktivierung TLR-exprimierender Zellen mit folgender Zytokinfreisetzung eine entscheidende Rolle im verstärkten Krankheitsverlauf bei der MS spielte (Herrmann et al. 2006). Dennoch schienen diese Mechanismen, die auch für das Modell der vorliegenden Arbeit vermutet wurden, hier nicht gegriffen zu haben. Eine Erklärung hierfür könnte der Vergleich der aktivierten Mikrogliazellen im postmortal entnommenen ZNS-Gewebe der Mäuse geben. Die Untersuchung der Gewebe infizierter und nicht infizierter ALS-Mäuse ergab, dass die Quantität der aktivierten Mikroglia in beiden Gruppen gleich war. Nguyen et al. hatten nachgewiesen, dass bereits die solitäre systemische Applikation von LPS zu einer vermehrten Mikrogliazellaktivierung im ZNS der Mäuse geführt hatte. Es wäre daher zu erwarten gewesen, dass sich in der infizierten Gruppe durch die Freisetzung mehrerer Erregerbestandteile über die oben beschriebenen Mechanismen auch vermehrt aktivierte Mikrogliazellen hätten finden lassen müssen, dieses war jedoch nicht der Fall. Da bereits nachgewiesen worden war, dass sowohl systemisch appliziertes LPS in vivo allein als auch systemisch applizierte *Streptococci pneumoniae* das ZNS affizieren, kann vermutet werden, dass die Quantität der systemisch zirkulierenden Erregerbestandteile im in dieser Arbeit verwendeten Modell nicht hoch genug war (Nguyen et al. 2004; Herrmann et al. 2006). Zu beachten ist, dass die von Nguyen et al. verwendete LPS-Konzentration extrem hoch war bzw. bereits im subletalen Bereich lag (Wysocka et al. 1995; Nguyen et al. 2004). Die in dieser Arbeit vorgenommenen Infektionen (Keimkonzentration:  $2,5 \times 10^5$  / ml) waren zwar per se hoch genug um unbehandelt letal zu wirken, stellten sich jedoch, mit Ceftriaxon behandelt, klinisch als milde dar. Dennoch hatte die gleiche Keimkonzentration von  $2,5 \times 10^5$  / ml im MS-Modell von Herrmann et al. einen krankheitsverschlimmernden Effekt gezeigt. Es kann spekuliert werden, dass bei der Multiplen Sklerose eine milde Infektion ausreicht, die Krankheit zu verschlimmern, da sich im ZNS von MS-kranken per se eine sehr viel stärkere

Entzündung finden lässt als bei ALS-kranken. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verweisen darauf, dass bei der ALS vermutlich sehr starke infektiöse Stimuli notwendig sind, um einen entsprechenden Effekt zu erzielen. Auf höhere Keimkonzentrationen war in der vorliegenden Arbeit im Vorfeld verzichtet worden, da diese klinisch, trotz der Gabe von Antibiotika, schwieriger zu kontrollieren sind. Sie können sich leicht in einer für das Modell unerwünschten Sepsis oder Meningitis manifestieren. Zur endgültigen Klärung dieses Aspekts sollten daher weitere Untersuchungen mit einer höheren Keimkonzentration und potentiell größerer Keimbestandteilfreisetzung durchgeführt werden.

Daneben könnte auch ein möglicherweise neuroprotektiver Effekt von Ceftriaxon die fehlende Auswirkung der systemischen Infektionen erklären. Nach neueren Erkenntnissen scheinen Beta-Lactam-Antibiotika wie Ceftriaxon einen positiven Einfluss auf verschiedene neurologische Erkrankungen wie z.B. die Amyotrophe Lateralsklerose, Hirntumoren und Epilepsie zu haben. Diesen Erkrankungen ist eine Dysfunktion des astrozytären Glutamattransporters (GLT1) gemein. Der Transporter hat die physiologische Funktion, Glutamat aus dem synaptischen Spalt zu entfernen. Hiermit wird einer exzessiven Stimulation des Neurons durch Glutamat vorgebeugt. Eine Dysfunktion des Transporters führt zu toxischen Glutamatkonzentrationen im Extrazellulärraum (Rothstein et al. 2005). Riluzol, das zur Therapie der ALS eingesetzt wird, wirkt über eine vermehrte Expression des GLT1-Transporters sowie über eine Erhöhung der Transporter-Aktivität. Damit verringert dieses Medikament die Exzitotoxizität von Glutamat, was klinisch in einer leichten Verbesserung von Muskelkraft und Überleben in der ALS resultiert (Miller et al. 2003). Ceftriaxon scheint den gleichen Effekt zu besitzen. An einem murinen Modell der ALS konnte gezeigt werden, dass das Antibiotikum den Untergang von Neuronen und den Verlust von Muskelkraft verzögerte und das Überleben der ALS-Mäuse verlängerte (Rothstein et al. 2005). Daneben diskutieren Ji et al. einen neuroprotektiven Effekt von Ceftriaxon durch die Bindung von freiem Kupfer. Dieses kann toxisch wirken und wird bei der ALS vermehrt intrazellulär gefunden. Vermutlich stammt das Kupfer aus dem aktiven Zentrum der fehlerhaften SOD (siehe 4.1.2.) (Ji et al. 2005). Es kann spekuliert werden, dass Ceftriaxon in den In-vivo-Experimenten der vorliegenden Arbeit zu einer erhöhten Resistenz der Mausneurone führte, entweder durch einen oder möglicherweise beide der oben beschriebenen Mechanismen. Eine Verringerung der direkten toxischen Wirkung von bakteriellen Bestandteilen durch

eine wahrscheinlich erhöhte Resistenz von Neuronen konnte in der vorliegenden Arbeit bereits *in vitro* gezeigt werden (siehe 4.1.2. und 4.1.3.). Es erscheint daher möglich, dass die mit *S. pneumoniae* infizierten und mit Ceftriaxon behandelten ALS-Mäuse ebenso weniger empfindlich auf die Wirkungen bakterieller Bestandteile, die während der systemischen Infektion vermutlich freigesetzt wurden, reagierten. Zwar hatte Ceftriaxon im MS-Modell von Herrmann et al. (2006) offensichtlich keinen neuroprotektiven Effekt, jedoch ist in der Literatur keine positive Wirkung von Ceftriaxon auf die Multiple Sklerose, die überwiegend von einer entzündlichen und nicht wie die ALS von einer neurodegenerativen Komponente bestimmt wird, beschrieben. Weitere Experimente mit einem sicher nicht neuroprotektiven Antibiotikum sollten daher zeigen können, ob die fehlende Auswirkung der systemischen Infektionen in diesem Modell tatsächlich auf die oben beschriebenen Wirkungen von Ceftriaxon zurückgeführt werden können.

#### 4.4. Schlussfolgerungen

Kernpunkt der Arbeit war die G93A-Mutation. Zwar findet sich diese Mutation unter dem ALS-Patientenkollektiv, das zu 90% an der sporadischen Krankheitsform leidet, relativ selten. Jedoch ist es wahrscheinlich das sporadische und familiäre Form der ALS sich pathogenetisch zumindest ähneln und schließlich in dieselben finalen Pathomechanismen münden. Dieses Konzept wird vor allem durch die Tatsache unterstützt, dass sporadische und familiäre ALS-Formen klinisch nicht voneinander zu unterscheiden sind (von Lewinski und Keller 2005). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse aus den Experimenten mit der G93A-Mutation können daher vermutlich auch auf die sporadische Form der ALS übertragen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *In-vitro*-Experimente verweisen auf eine gesteigerte Empfindlichkeit ALS-typischer neuronaler Zellen gegenüber direkten und indirekten toxischen Wirkungen bakterieller Bestandteile. Die Hypothese der Exazerbation der ALS durch bakterielle Bestandteile während einer Begleitinfektion beruht zum einen darauf, dass die Bestandteile, wie in den durchgeführten *In-vitro*-Experimenten, die Neurone des ZNS schädigen. Zum anderen müssen die Bestandteile aber vorher durch systemische Verteilung ins ZNS gelangen. Eine Schädigung des ZNS konnte *in vivo*, an ALS-Mäusen mit einer milden systemischen

Infektion, nicht nachgewiesen werden. Leichte bis mäßige Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* scheinen demnach die experimentelle ALS in vivo nicht zu verschlimmern. Demgegenüber scheinen sehr starke Stimuli, wie z.B. sehr hohe systemische LPS-Dosen, zu einer Verschlimmerung zu führen (Nguyen et al. 2004). Sollte eine Verschlimmerung der Krankheit daher, wie vermutet, mit höheren als den bisher verwendeten Keimkonzentrationen am ALS-Mausmodell erbracht werden können, würde dies das klinische Vorgehen bei Infektionen während neurodegenerativer Erkrankungen wie der ALS maßgeblich beeinflussen. Das therapeutische Vorgehen müsste sich dann vor allem daran orientieren, die Freisetzung bakterieller Bestandteile während einer Begleitinfektion möglichst gering zu halten. Dies beinhaltet z.B. die Verwendung von Antibiotika, welche nicht die Bakterienzellwand zerstören, sondern z.B. die Proteinbiosynthese inhibieren. Weitere Experimente sollten außerdem mit einem anderen Antibiotikum als Ceftriaxon durchgeführt werden. Sollte festgestellt werden können, dass Ceftriaxon im Modell dieser Arbeit tatsächlich neuroprotektiv gewirkt hat, könnten ALS-Patienten mit einer Begleitinfektion von der Gabe von Ceftriaxon, trotz einer vermutlich relativ hohen Erregerbestandteilverfreisetzung, profitieren. Daneben könnten nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ALS-Patienten mit einer bakteriellen Begleitinfektion von der Gabe antioxidativer Substanzen wie z.B. N-Acetylcystein in moderatem Umfang profitieren.

## 5. Zusammenfassung

Im klinischen Alltag können sich die Symptome der Amyotrophen Lateralsklerose und anderer neurodegenerativer Erkrankungen durch systemische bakterielle Begleitinfektionen irreversibel verschlechtern. Vermutlich sind bakterielle Bestandteile, die spontan oder durch eine antibiotische Behandlung freigesetzt werden, hierfür verantwortlich. Es wird die Hypothese vertreten, dass die bakteriellen Bestandteile direkt als Toxine und indirekt über die Bindung an Toll-like Rezeptoren und die Aktivierung von Mikrogliazellen Neurone schädigen. Neurone von ALS-Patienten reagieren dabei vermutlich insbesondere empfindlich auf jene neurotoxischen Mechanismen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass neuronenähnliche Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y, welche die für die familiäre ALS typische SOD-G93A-Mutation trugen, signifikant empfindlicher auf das von *Streptococcus pneumoniae* freigesetzte toxische Protein Pneumolysin reagierten als SOD-WT-Zellen.

Mittels des Fura-2-Calcium-Video-Imaging konnte festgestellt werden, dass die gesteigerte Empfindlichkeit der G93A-Zellen gegenüber Pneumolysin vermutlich auf die verminderte Fähigkeit dieser Zellen, einen durch Pneumolysin induzierten Calciumeinstrom zu bewältigen, zurückzuführen ist.

Die erhöhte Empfindlichkeit der G93A-Zellen konnte durch die Gabe der antioxidativ wirkenden Substanz N-Acetylcystein geringgradig vermindert werden. Eine Hemmung der SOD beider Zelllinien durch den SOD-Inhibitor Diethyldithiocarbamat führte kurzfristig ebenfalls zu einer verminderten Empfindlichkeit der G93A-Zellen gegenüber Pneumolysin, die mittelfristig jedoch wieder aufgehoben wurde.

G93A-Zellen reagierten weiterhin signifikant empfindlicher auf den Angriff humaner, mikrogliazellähnlicher Makrophagen, die durch das bakterielle Lipopeptid Pam3Cys über den TLR-2 stimuliert wurden. N-Acetylcystein konnte in diesem Co-Kulturmodell keine protektiven Effekte auf G93A-Zellen entfalten.

Die in vitro evidenten Mechanismen direkter und indirekter Neurotoxizität bakterieller Bestandteile hatten in vivo, an einem Mausmodell der ALS, überraschenderweise

keinen Effekt. Der Krankheitsverlauf G93A-transgener Mäuse, die systemische Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* und Antibiosen mit Ceftriaxon erhielten, zeigte keinen Unterschied zum Krankheitsverlauf nicht infizierter Tiere. Da die Anzahl der aktivierten Mikrogliazellen in beiden Gruppen gleich groß war, kann vermutet werden, dass die verwendete Keimkonzentration zu niedrig war, um den erwarteten beschleunigten Krankheitsverlauf unter den infizierten Tieren zu provozieren. Daneben hat möglicherweise auch ein neuroprotektiver Effekt von Ceftriaxon eine Verschlimmerung der ALS bei den infizierten Tieren verhindert.

Die In-vitro-Daten der Arbeit verweisen auf eine gesteigerte Empfindlichkeit von ALS-typischen G93A-Zellen gegenüber toxischen bakteriellen Bestandteilen und aktivierten Mikrogliazellen, welche durch Bakterienbestandteile aktiviert wurden. Dies könnte erklären, warum sich die ALS während bakterieller Begleitinfektionen verschlimmert. Sollten sich die In-vitro-Daten auch in vivo durch weiterführende Experimente mit höheren Keimkonzentrationen und einem anderen, sicher nicht neuroprotektiven Antibiotikum bestätigen, sollte dies klinisch vor allem in der frühzeitigen Behandlung bakterieller Infektionen resultieren. Daneben sollten zur Behandlung gegebenenfalls Antibiotika, die zu einer möglichst geringen Keimbestandteilfreisetzung führen, verwendet werden.

## 6. Literatur

Alexianu ME, Ho BK, Mohamed AH, La Bella V, Smith RG, Appel SH (1994): The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 36, 846-858

Almer G, Guegan C, Teismann P, Naini A, Rosoklija G, Hays AP, Chen C, Przedborski S (2001): Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 49, 176-185

Andersson AC, Seppälä U, Rudin A (2004): Activation of human neonatal monocyte-derived dendritic cells by lipopolysaccharide downregulates birch allergen-induced Th2 differentiation. *Eur. J. Immunol.* 34, 3516-3524

Andreassen OA, Dedeoglu A, Klivenyi P, Beal MF, Bush AI (2000): N-acetyl-L-cysteine improves survival and preserves motor performance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 11, 2491-2493

Armstrong JS (2006): The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion* 6, 225-234

Azzouz M, Poindron P, Guettier S, Leclerc N, Andres C, Warter JM, Borg J (2000): Prevention of mutant SOD1 motoneuron degeneration by copper chelators in vitro. *J. Neurobiol.* 42, 49-55

Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004): Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 205-214

Beers DR, Ho BK, Siklos L, Alexianu ME, Mosier DR, Mohamed AH, Otsuka Y, Kozovska ME, McAlhany RE, Smith RG (2001): Parvalbumin overexpression alters immune-mediated increases in intracellular calcium, and delays disease onset in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 79, 499-509

Beretta S, Sala G, Mattavelli L, Ceresa C, Casciati A, Ferri A, Carri MT, Ferrarese C (2003): Mitochondrial dysfunction due to mutant copper/zinc superoxide dismutase

associated with amyotrophic lateral sclerosis is reversed by N-acetylcysteine. *Neurobiol. Dis.* 13, 213-221

Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973): Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 33, 2643-2652

Bock GR, Yates GK, Miller JJ, Moorjani P (1983): Effects of N-acetylcysteine on kanamycin ototoxicity in the guinea pig. *Hear. Res.* 9, 255-262

Bonev BB, Gilbert RJ, Andrew PW, Byron O, Watts A (2001): Structural analysis of the protein/lipid complexes associated with pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *J. Biol. Chem.* 276, 5714-5719

Bouza E, Pintado V, Rivera S, Blazquez R, Munoz P, Cercenado E, Loza E, Rodriguez-Creixems M, Moreno S (2005): Nosocomial bloodstream infections caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 919-924

Boyum A (1984): Separation of lymphocytes, granulocytes, and monocytes from human blood using iodinated density gradient media. *Methods Enzymol.* 108, 88-102

Branco RJ, Fernandes PA, Ramos MJ (2006): Molecular dynamics simulations of the enzyme Cu, Zn superoxide dismutase. *J. Phys. Chem. B.* 110, 16754-16762

Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR (2002): Pneumococcal pneumolysin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J. Clin. Invest.* 109, 19-27

Bredesen DE, Wiedau-Pazos M, Goto JJ, Rabizadeh S, Roe JA, Gralla EB, Ellerby LM, Valentine JS (1996): Cell death mechanisms in ALS. *Neurology* 47, 36-39

Brown RH (1995): Amyotrophic lateral sclerosis: recent insights from genetics and transgenic mice. *Cell* 80, 687-692

Brustovetsky N, Brustovetsky T, Purl KJ, Capano M, Crompton M, Dubinsky JM (2003): Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition. *J. Neurosci.* 23, 4858-4867

Carri MT, Ferri A, Battistoni A, Famhy L, Gabbianelli R, Poccia F, Rotilio G (1997): Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Lett.* 414, 365-368

Carri MT, Grignaschi G, Bendotti C (2006): Targets in ALS: designing multidrug therapies. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 267-273

Chiba Y, Sutoh Y, Nishida Y (2006): Detection of structural change of superoxide dismutase in solution. *Z. Naturforsch. [C]* 61, 273-277

Chinopoulos C, Adam-Vizi V (2006): Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *FEBS J.* 273, 433-450

Combrinck MI, Perry VH, Cunningham C (2002): Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in a pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience* 112, 7-11

Damiano M, Starkov AA, Petri S, Kipiani K, Kiaei M, Mattiazzi M, Flint Beal M, Manfredi G (2006): Neural mitochondrial Ca<sup>2+</sup> capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J. Neurochem.* 96, 1349-1361

Deng HX, Hentati A, Tainer JA (1993): Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science* 261, 1047-1051

Draper DW, Bethea HN, He YW (2006): Toll-like receptor 2-dependent and – independent activation of macrophages by group B streptococci. *Immunol. Lett.* 102, 202-214

Ebert S, Gerber J, Bader S, Muhlhauser F, Brechtel K, Mitchell TJ, Nau R (2005): Dose-dependent activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination. *J. Neuroimmunol.* 159, 87-96

- Ferri A, Gabbianelli R, Casciati A, Celsi F, Rotilio G, Carri MT (2001): Oxidative inactivation of calcineurin by Cu/Zn superoxide dismutase G93A, a mutant typical of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 79, 531-538
- Fordyce C, Jagasia R, Zhu X, Schlichter LC (2005): Microglia Kv1.3 channels contribute to their ability to kill neurons. *J. Neurosci.* 25, 7139-7149
- Freedman JH, Ciriolo MR, Peisach J (1989): The Role of Glutathion in Copper Metabolism and Toxicity. *J. Biol. Chem.* 264, 5598-5605
- Gelanis DF (2001): Respiratory Failure or Impairment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Treat. Options Neurol.* 3, 133-138
- Gilbert RJ, Jimenez JL, Chen S, Tickle IJ, Rossjohn J, Parker M, Andrew PW, Saibil HR (1999): Two structural transitions in membran pore formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Cell* 97, 647-655
- Gille C, Spring B, Bernhard W, Gebhard C, Basile D, Lauber K, Poets CF, Orlikowsky TW (2007): Differential effect of surfactant and its saturated phosphatidylcholines on human blood macrophages. *J. Lipid Res.* 48, 307-317
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985): A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliando J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX (1994): Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772-1775
- Herrmann I, Kellert M, Schmidt H, Mildner A, Hanisch UK, Brück W, Prinz M, Nau R (2006): *Streptococcus pneumoniae* infection aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis via toll-like receptor 2. *Infect. Immun.* 78, 4841-4848
- Hirst RA, Kadioglu A, O'Callaghan C, Andrew PW (2004): The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin. Exp. Immunol.* 138, 195-201
- Iliev AI, Stringaris AK, Nau R, Neumann H (2004): Neuronal injury mediated via stimulation of microglial toll-like receptor 9 (TLR9). *FASEB J.* 18, 412-424

Ji HF, Shen L, Zhang HY (2005): Beta-lactam antibiotics are multipotent agents to combat neurological diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 661-663

Kaisho T, Akira S (2006): Toll-like receptor function and signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 979-987

Kilic E, Weishaupt JH, Kilic U, Rohde G, Yulug B, Peters K, Hermann DM, Baehr M (2004): The superoxide dismutase1 (SOD1) G93A mutation does not promote neuronal injury after focal brain ischemia and optic nerve transection in mice. *Neuroscience* 128, 359-364

Konat GW, Kielian T, Marriott I (2006): The role of Toll-like receptors in CNS response to microbial challenge. *J. Neurochem.* 99, 1-12

Kreutzberg GW (1996): Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312-318

Kwak S, Weiss JH (2006): Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 281-287

Ladewig T, Keller BU (2000): Simultaneous patch-clamp recording and calcium imaging in a rhythmically active neuronal network in the brainstem slice preparation from mouse. *Pflügers Arch.* 440, 322-332

Lee SJ, Lee S (2002): Toll-like receptors and inflammation in the CNS. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 1, 181-191

Li M, Ona VO, Guegan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olszewski AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S (2000): Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 288, 335-339

Lotz M, Ebert S, Esselmann H, Iliev AI, Prinz M, Wiazewicz N, Wiltfang J, Gerber J, Nau R (2005): Amyloid beta peptide 1-40 enhances the action of Toll-like receptor-2 and -4 agonists but antagonizes Toll-like receptor-9-induced inflammation in primary mouse microglial cell cultures. *J. Neurochem.* 94, 289-298

Maier CM, Chan PH (2002): Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 8, 323-334

Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Flint Beal M, Manfredi G (2002): Mutated human SOD1 causes dysfunction in oxidative phosphorylation in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 277, 29626-29633

Medvedev AE, Sabroe I, Hasday JD, Vogel SN (2006): Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease. *J. Endotoxin Res.* 12, 133-150

Menzies FM, Ince PG, Shaw PJ (2002): Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem. Int.* 40, 543-551

Messmer K, Reynolds GP (2005): An in vitro model of inflammatory neurodegeneration and its neuroprotection. *Neurosci. Lett.* 388, 39-44

Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH (2003): Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) / motor neuron disease (MND). *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 4, 191-206

Mulder DW, Kurland LT (1987): Motor neuron disease: epidemiologic studies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 209, 325-332

Nathan N, Borel T, Djibo A, Evans D, Djibo S, Corty JF, Guillermin M, Alberti KP, Pinoges L, Guerin PJ (2005): Ceftriaxone as effective as long-acting chloramphenicol in short-course treatment of meningococcal meningitis during epidemics: a randomised non-inferiority study. *Lancet* 366, 308-313

Nau R, Brück W (2002): Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci.* 25, 38-45

Nau R, Eiffert H (2002): Modulation of release of proinflammatory compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 95-110

Nee LE, Lippa CF (1999): Alzheimer's disease in 22 twin pairs--13-year follow-up: hormonal, infectious and traumatic factors. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 10, 148-151

Nguyen MD, Aigle T, Gowing G, Julien JP, Rivest S (2004): Exacerbation of motor neuron disease by chronic stimulation of innate immunity in a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 24, 1340-1349

Nikolic-Kokic A, Stevic Z, Blagojevic D, Davidovic B, Jones DR, Spasic MB (2006): Alterations in anti-oxidative defence enzymes in erythrocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis (SALS) and familial ALS patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44, 589-593

Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2002): Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 9010-9014

Olivieri G, Baysang G, Meier F, Muller-Spahn F, Stahelin HB, Brockhaus M, Brack C (2001): N-acetyl-L-cysteine protects SHSY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress and cell cytotoxicity: effects on beta-amyloid secretion and tau phosphorylation. *J. Neurochem.* 76, 224-233

Paton JC, Andrew PW, Boulnois GJ, Mitchell TJ (1993): Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 89-115

Perry VH, Newman TA, Cunningham C (2003): The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 103-112

Przedborski S (2004): Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis: a mechanism of pathogenetic and therapeutic importance. *Neurologist* 10, 1-7

Raha S, Robinson BH (2000): Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* 25, 502-508

Rao SD, Weiss JH (2004): Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS-pathogenesis. *Trends Neurosci.* 27, 17-23

Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH (1996): Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 13, 43-47

Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW (1995): Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 689-693

Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK (2004): Role of microglia in central nervous system infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 942-964

Rothstein JD, Kuncl R, Chaudhry V, Clawson L, Cornblath DR, Coyle JT, Drachman DB (1991): Excitatory amino acids in amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Ann. Neurol.* 30, 224-225

Rothstein JD, Bristol LA, Hosler B, Brown RH, Kuncl RW (1994): Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 4155-4159

Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S (2005): Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433, 73-77

Rowland LP (1994): Amyotrophic lateral sclerosis: theories and therapies. *Ann. Neurol.* 35, 129-130

Rowland LP, Shneider NA (2001): Amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 344, 1688-1700

Sekizawa T, Openshaw H, Ohbo K, Sugamura K, Itoyama Y, Niland JC (1998): Cerebrospinal fluid interleukin 6 in amyotrophic lateral sclerosis: immunological parameter and comparison with inflammatory and non-inflammatory central nervous system diseases. *J. Neurol. Sci.* 154, 194-199

Shahin GS, Lerner SA (2002): Rare presentation of *Streptococcus pneumoniae* pneumonia with bacteremia and multiple subcutaneous abscesses. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 611-612

Shao ZH, Hsu CW, Chang WT, Waypa GB, Li J, Li D, Li CQ, Anderson T, Qin Y, Hoek TL (2006): Cytotoxicity induced by grape seed proanthocyanidins: role of nitric oxide. *Cell. Biol. Toxicol.* 22, 149-158

Shen HM, Pervaiz S (2006): TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *FASEB J.* 20, 1589-1598

Spreer A, Kerstan H, Böttcher T, Gerber J, Siemer A, Zysk G, Mitchell TJ, Eiffert H, Nau R (2003): Reduced release of *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo after treatment with nonbacteriolytic Antibiotics in comparison to ceftriaxon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2649-2654

Spreer A, Lis A, Gerber J, Reinert RR, Eiffert H, Nau R (2004): Differences in clinical manifestation of *Streptococcus pneumoniae* infection are not correlated with in vitro production and release of the virulence factors pneumolysin and lipoteichoic and teichoic acids. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3342-3345

Srivastava A, Henneke P, Visintin A, Morse SC, Martin V, Watkins C, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT, Malley R (2005): The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. *Infect. Immun.* 73, 6479-6487

Stringaris AK, Geisenhainer J, Bergmann F, Balshusemann C, Lee U, Zysk G, Mitchell TJ, Keller BU, Kuhnt U, Gerber J (2002): Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiol. Dis.* 11, 355-368

Tamm M, Todisco T, Feldmann C, Garbino J, Blasi F, Hogan P, de Carariis PJ, Hoepelman IM (2007): Clinical and bacteriological outcomes in hospitalised patients with community-acquired pneumonia treated with azithromycin plus ceftriaxone, or ceftriaxone plus clarithromycin or erythromycin: a prospective, randomised, multicentre study. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 162-171

Tortarolo M, Veglianese P, Calvaresi N, Botturi A, Rossi C, Giorgini A, Migheli A, Bendotti C (2003): Persistent activation of p38 mitogen-activated protein kinase in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis correlates with disease progression. *Mol. Cell. Neurosci.* 23, 180-192

Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ (1982): Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new intracellularly trapped fluorescence indicator. *J. Cell. Biol.* 94, 325-334

Turner MR, Cagnin, A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB (2004): Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol. Dis.* 15, 601-609

Von Lewinski F, Keller BU (2005): Ca<sup>2+</sup>, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. *Trends Neurosci.* 28, 494-500

Watanabe Y, Kono Y, Nanba E, Ohama E, Nakashima K (1997): Instability of expressed Cu/Zn superoxide dismutase with 2 bp deletion found in familial amyotrophic lateral sclerosis. *FEBS Lett.* 400, 108-112

Wellmer A, Noeske C, Gerber J, Munzel U, Nau R (2000): Spatial memory and learning deficits after experimental pneumococcal meningitis in mice. *Neurosci. Lett.* 296, 137-140

Wysocka M, Kubin M, Vieira LQ, Ozmen L, Garotta G, Scott P, Trinchieri G (1995): Interleukin-12 is required for interferon-gamma production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. *Eur. J. Immunol.* 25, 672-676

Zysk G, Schneider-Wald BK, Hwang JH, Bejo L, Kim KS, Mitchell TJ, Hakenbeck R, Heinz HP (2000): Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 69, 845-852

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Roland Nau für die Überlassung des Themas, die stets freundliche und kreative Unterstützung sowie die Möglichkeit zum selbstständigen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Keller danke ich für die Möglichkeit der Durchführung des Calcium-Imaging in Zusammenarbeit mit seiner Gruppe sowie für seine hilfreichen Ideen. Insbesondere geht mein Dank an seine beiden wissenschaftlichen Mitarbeiter Herrn Manoj Kumar Jaiswal und Herrn Saju Balakrishnan, ohne die die Messungen nicht möglich gewesen wären.

Frau Prof. Dr. Maria Theresa Carri danke ich für die Überlassung der transfizierten SH-SY5Y-Zellen, die einen wesentlichen Teil meiner Arbeit darstellten.

Herrn Prof. Dr. Timothy Mitchell danke ich für die Überlassung des Pneumolysins.

Ganz besonders möchte ich meinen Betreuern Frau Dr. Miriam Goos, Frau Dr. Sandra Ebert und Herrn Dr. Joachim Gerber danken, die mich immer freundlich und kompetent unterstützt haben.

Frau Stefanie Bunkowski danke ich für ihre stets tatkräftige und freundliche Hilfe bei allen Fragen der Immunhistochemie.

Daneben möchte ich mich bei Frau Dr. Sabine Siemes bedanken, bei der ich die Technik der Makrophagen-Präparation erlernte.

Des Weiteren geht mein Dank an meine Mit-Doktoranden Nicole Wiazewicz, Lena Rollwagen, Moritz Zeretzke, Daniel Baake und Markus Kellert für ihre stets kollegiale, freundliche Unterstützung und Mithilfe.

Meiner Schwester Julia danke ich für die Korrektur der Arbeit.

Mein Dank gilt ferner allen, die in irgendeiner Form zu dieser Arbeit beigetragen haben und bisher noch nicht erwähnt wurden.

## **Lebenslauf**

Ich wurde am 18.05.1979 in Lauchhammer geboren. Von 1985 bis 1991 besuchte ich zunächst 2 Jahre die Grundschule in Lübben und anschließend die Grundschule in Neubrandenburg. Seit 1991 besuchte ich das Paul-Gerhardt-Gymnasium in Lübben. Hier machte ich am 26.06.1998 mein Abitur. Von Juli 1998 bis April 1999 leistete ich meinen Grundwehrdienst beim 4. Panzerartilleriebataillon 415 in Eggesin ab. Im Oktober 1999 immatrikulierte ich mich an der Georg-August-Universität Göttingen für das Fach Rechtswissenschaft. 2001 wechselte ich zum Fach Medizin. Die ärztliche Vorprüfung legte ich im März 2003 ab. Mit den Arbeiten zur vorliegenden Dissertation begann ich im Oktober 2004.