

Aus der Abteilung  
Neurodegeneration und Neurorestaurationsforschung  
(ehem. Leiter: Prof. Dr. med. J. B. Schulz)  
im Zentrum Neurologische Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Modulation hippokampaler neuronaler Apoptose und  
Neurogenese durch *Fas apoptotic inhibitory molecule 2* (Faim2)  
im Rahmen der experimentellen Streptokokkenmeningitis**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von  
Kristian Harms  
aus  
Emden

Göttingen 2013

**Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer**

**I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. B. Schulz**

**II. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. A. Spreer**

**Tag der mündlichen Prüfung: 07. Januar 2014**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Neuronaler Zelltod durch Apoptose:	
Klassische Funktionen des Fas (CD95)/FasL (CD95L)-Systems.....	1
1.2 Neurogenese, neuronale Differenzierung und Tumorgenese:	
Alternative Funktionen des Fas (CD95)/FasL (CD95L)-Systems.....	4
1.3 Faim2: Regulation des Fas (CD95)/FasL (CD95L)-Systems.....	7
1.4 Das <i>Streptococcus-pneumoniae</i> -Typ-3-Meningitismodell.....	8
1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	10
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>11</b>
2.1 Material .....	11
2.1.1 Chemikalien und Bioreagenzien.....	11
2.1.2 Verbrauchsmaterial .....	13
2.1.3 Geräte .....	14
2.1.4 Lösungen und Puffer .....	16
2.1.5 Antikörper .....	17
2.1.6 Oligonukleotide.....	18
2.1.7 Versuchstiere.....	18
2.1.8 Computersoftware .....	18
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Erzeugung, Manipulation und Analyse von Versuchstieren .....	19
2.2.1.1 Genehmigung des Tierversuchsvorhabens.....	19
2.2.1.2 Erzeugung der Versuchstiere .....	19
2.2.1.3 Tierhaltung .....	19
2.2.1.4 Infektion der Versuchstiere mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> Typ 3.....	20
2.2.1.5 Tötung und Präparation von Versuchstieren .....	21
2.2.1.6 Klinische Beurteilung der Versuchstiere.....	22
2.2.1.7 Beurteilung der Gedächtnisleistung im Morris-Wasserlabyrinth .....	24
2.2.1.8 Beurteilung der Versuchstiere mit dem „Offenes-Feld“-Test .....	27
2.2.1.9 Beurteilung der Versuchstiere mit dem Rotarod-Test.....	28
2.2.2 Histologische Methoden.....	29

2.2.2.1	Fixation und Herstellung der histologischen Schnitte .....	29
2.2.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	29
2.2.2.3	Darstellung der meningealen Entzündung in der H.E.-Färbung .....	29
2.2.2.4	TUNEL-Färbung und Quantifizierung apoptotischer Zellen.....	30
2.2.2.5	Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen.....	31
2.2.3	Molekularbiologische Methoden .....	32
2.2.3.1	Isolation von genomischer DNS .....	32
2.2.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) mit genomischer DNS.....	33
2.2.3.3	Agarosegelelektrophorese von PCR-Amplifikaten .....	34
2.2.3.4	RNS-Isolation und quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR).....	34
2.2.4	Statistische Methoden.....	37
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>38</b>
3.1	Die akute meningitische Phase .....	38
3.1.1	Bestimmung des Infektionsausmaßes durch Titerbestimmungen und Darstellung meningealer Entzündungsvorgänge .....	38
3.1.2	Bestimmung klinischer Verlaufparameter durch Phänotypanalysen .....	40
3.1.3	Divergente Regulation hippokampaler Fas/CD95- und Faim2-Expression .....	42
3.1.4	Erhöhte hippokampale Zelltodrate in Faim2-defizienten Mäusen .....	43
3.1.5	Beteiligung von Initiations- und Effektorcaspasen am neuronalen Apoptoseprozess ....	43
3.1.6	Genotypunabhängige Sterblichkeit nach unbehandelter SP3-Infektion .....	47
3.2	Die postmeningitische Rekonvaleszenzphase .....	48
3.2.1	Bestimmung klinischer Verlaufparameter durch Phänotypanalysen .....	48
3.2.2	Kontrolltraining als Teilnahmevoraussetzung des Morris-Wasserlabyrinth-Tests.....	51
3.2.3	Genotyp- und behandlungsabhängige Leistung in der Akquisitionsphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests .....	53
3.2.4	Genotyp- und behandlungsabhängige örtliche Präferenzentwicklung im Transfertest der Akquisitionsphase .....	55
3.2.5	Genotyp- und behandlungsabhängige Leistung in der Umlernphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests .....	56
3.2.6	Genotyp- und behandlungsabhängige örtliche Präferenzentwicklung im Transfertest der Umlernphase.....	58
3.2.7	Erhöhte lokomotorische Aktivität und gesteigertes Explorationsverhalten sowie verbesserte Koordinationsfähigkeit und Ausdauer in Faim2-defizienten Versuchstieren nach Infektion.....	59
3.2.8	Erhöhte Neurogenese in Faim2-defizienten Versuchstieren in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase .....	61

3.2.9 Genotypabhängige Sterblichkeit in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase.....	61
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	63
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>
4.1 Der Einfluss von Faim2 in der akuten meningitischen Phase .....	64
4.1.1 Faim2 beeinflusst weder Neuroinflammation noch den klinischen Phänotyp oder das Überleben in der akuten meningitischen Phase .....	64
4.1.2 Neuroinflammation erhöht die hippocampale Fas-Expression und erniedrigt die hippocampale Faim2-Expression in der akuten meningitischen Phase.....	66
4.1.3 Faim2 ist neuroprotektiv in der akuten meningitischen Phase .....	68
4.2 Der Einfluss von Faim2 in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase .....	69
4.2.1 Faim2-Defizienz resultiert in erhöhter hippocampaler Neurogenese und verbesserter Gedächtnisleistung in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase .....	69
4.2.2 Faim2-Defizienz führt zu verbesserter Koordinationsfähigkeit und gesteigertem Explorationsverhalten in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase.....	71
4.2.3 Faim2-Defizienz geht einher mit verringerter klinischer Beeinträchtigung und Sterblichkeit in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase .....	72
4.3 Schlussfolgerungen und Konsequenzen.....	74
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>75</b>
5.1 Deutsche Version.....	75
5.2 Englische Version.....	76
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>77</b>
<b>7. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....</b>	<b>86</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
Ac-DEVD-CHO	N-acetyl-L- $\alpha$ -aspartyl-L- $\alpha$ -glutamyl-N-(2-carboxyl-1-formylethyl)-L-valinamid
AIF	englisch, <i>apoptosis-inducing factor</i>
AKT	englisch, <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i> (synonym PKB = Proteinkinase B)
Al <sub>2</sub> O <sub>12</sub> S <sub>3</sub> x 16H <sub>2</sub> O	Aluminiumsulfat-Hexadecahydrat
ANOVA	englisch, <i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	englisch, <i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AUC	englisch, <i>area under the curve</i> (Fläche unter der Kurve)
Bak	englisch, <i>BCL2-antagonist/killer 1</i>
Bax	englisch, <i>BCL2-associated X protein</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat, 4-Toluidin-Salz
BDNF	englisch, <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
Bid	englisch, <i>BH3 interacting domain death agonist</i>
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2-Deoxyuridin
Btk	englisch, <i>Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C57BL/6	englisch, <i>C57 black 6</i> (Mausinzuchtstamm)
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Natriumcitrat-Dihydrat
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> x H <sub>2</sub> O	Citronensäure-Monohydrat
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Ethylendiamintetraessigsäure di-Natriumsalz-Dihydrat (EDTA)
CA	lateinisch, <i>Cornu ammonis</i> (Ammonshorn)
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Calciumchlorid-Dihydrat
CARD	englisch, <i>caspase recruitment domain</i>
Caspase	englisch, <i>cysteine-dependent aspartate-specific protease</i>
CD	englisch, <i>cluster of differentiation</i> (Unterscheidungsgruppen)
cDNA	englisch, <i>complementary DNA</i> (komplementäre DNS)
c-FLIP	englisch, <i>cellular FLICE-like inhibitory protein</i> (synonym CFLAR = englisch, <i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i> )
CFU	englisch, <i>colony-forming unit</i> (Koloniebildende Einheit, KBE)
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	Ammoniumacetat
(c)IAPs	englisch, <i>(cellular) inhibitor of apoptosis proteins</i>
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter

cm/s	Zentimeter pro Sekunde
CoCl <sub>2</sub>	Cobalt(II)-chlorid
Ct	englisch, <i>cycle threshold</i> (Schwellenwert-Zyklus)
Cy	englisch, <i>cyanine dyes</i> (Cyaninfarbstoffe)
d	englisch, <i>day</i> (Tag)
dR	Delta-Wert des Reportersignals (Fluoreszenzintensität)
DAXX	englisch, <i>death-domain associated protein</i>
DED	englisch, <i>death effector domain</i>
Diablo	englisch, <i>direct IAP-binding protein with low pI</i> (synonym Smac)
DIG	Digoxigenin
DISC	englisch, <i>death-inducing signaling complex</i>
DNase (I)	Desoxyribonuklease (I)
DNS (DNA)	Desoxyribonukleinsäure (englisch, <i>deoxyribonucleic acid</i> , DNA)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	Englisch
EPO	Erythropoetin
EpoR	Erythropoetin-Rezeptor
ERK	englisch, <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	englisch, <i>Fas-associated death domain</i>
Faim1/2/3	englisch, <i>Fas apoptotic inhibitory molecule 1/2/3</i>
FAP-1	englisch, <i>Fas-associated phosphatase-1</i>
f.c.	englisch, <i>final concentration</i> (Endkonzentration)
FCS	englisch, <i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
FLICE	englisch, <i>FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme</i>
Fwd	englisch, <i>forward</i> (Vorwärtsprimer)
g	Gramm
G	englisch, <i>gauge</i> (Maß des Kanülenaußendurchmessers)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
gld	englisch, <i>generalized lymphoproliferative disease</i> (Mutation des Fas-Liganden)
GluR2/GRIA2	englisch, <i>glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2</i>
h	englisch, <i>hour</i> (Stunde)
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
H+L	englisch, <i>heavy and light chains</i> (schwere und leichte Ketten [eines Immunglobulins])
HPLC	englisch, <i>high performance liquid chromatography</i>
HtrA2	englisch, <i>HtrA serine peptidase 2</i> (synonym Omi)
IAPs	englisch, <i>inhibitor of apoptosis proteins</i>

IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal
JAK2	englisch, <i>Janus kinase 2</i>
KBE	Koloniebildende Einheit
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
KU	englisch, <i>Kunitz units</i> (Kunitz-Einheiten)
LFG	englisch, <i>lifeguard</i>
lpr	englisch, <i>lymphoproliferation</i> (Mutation des Fas-Rezeptors)
L x B x H	Länge mal Breite mal Höhe
M	molar
MEZ	mitteleuropäische Zeit
mg	Milligramm
$\text{MgCl}_2$	Magnesiumchlorid
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu\text{l}$	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
M-MLV	englisch, <i>Moloney murine leukemia virus</i>
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	englisch, <i>messenger RNA</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
mTOR	englisch, <i>mechanistic target of rapamycin</i> ( <i>serine/threonine kinase</i> )
MWM	englisch, <i>Morris water maze</i> (Morris-Wasserlabyrinth)
n	Anzahl
N	Äquivalentkonzentration
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NeuN	englisch, <i>Neuronal Nuclei</i>
NGF	englisch, <i>nerve growth factor</i> (Nervenwachstumsfaktor)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMP35	englisch, <i>neural membrane protein 35</i>
ns, n.s.	nicht signifikant
NSZ	neuronale Stammzellen



NT	Neurotrophin
OFT	englisch, <i>open field test</i> („Offenes-Feld“-Test)
p	englisch, <i>probability</i> (Wahrscheinlichkeit)
p35	englisch, <i>cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)</i>
p75 <sup>NTR</sup>	englisch, <i>p75 neurotrophin receptor</i> (synonym NGFR = englisch, <i>nerve growth factor receptor</i> , synonym LNGFR = englisch, <i>low affinity nerve growth factor receptor</i> )
PBS	englisch, <i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	englisch, <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEA-15	englisch, <i>phosphoprotein enriched in astrocytes 15</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	lateinisch, <i>pondus/potentia Hydrogenii</i> (Gewicht/Kraft des Wasserstoffs); negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PKB	Proteinkinase B (synonym AKT = englisch, <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i> )
pp60src	englisch, <i>v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)</i> ; phosphoryliertes 60 kDa Phosphoprotein
PTEN	englisch, <i>phosphatase and tensin homolog</i>
qRT-PCR	englisch, <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> (quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion)
Rev	englisch, <i>reverse</i> (Rückwärtsprimer)
RIP	englisch, <i>receptor interacting protein</i>
RMS	englisch, <i>rostral migratory stream</i> (rostraler migratorischer Strom)
RNase	Ribonuklease
RNS (RNA)	Ribonukleinsäure (englisch, <i>ribonucleic acid</i> , RNA)
rpm	englisch, <i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
S.	Seite
s.c.	lateinisch, <i>subcutis</i> (subkutan)
SDS	englisch, <i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEM	englisch, <i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
SGZ	subgranuläre Zone (des Gyrus dentatus)
SI	französisch, <i>Système international d'unités</i> (Internationales Einheitensystem)
Smac	englisch, <i>second mitochondria-derived activator of caspase</i> (synonym Diablo)
s.o.	siehe oben
SP3	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Typ 3
SVZ	subventrikuläre Zone (der Seitenventrikel)
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

t-Bid	trunkierte Form von BID (englisch, <i>BH3 interacting domain death agonist</i> )
TBS	englisch, <i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	Mischung aus TBS und Tween 20 (Waschpuffer)
TdT	englisch, <i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i> (Desoxyribonukleotidyltransferase, terminale Transferase)
TLR	englisch, <i>Toll-like receptor</i> (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkB	englisch, <i>tropomyosin-receptor-kinase B</i> (synonym NTRK2 = englisch, <i>neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2</i> )
TUNEL	englisch, <i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
UV-Licht	ultraviolettes Licht
x	vielfach
YES	englisch, <i>v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem, Zentralnervensystem
z-VAD-fmk	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon

## Verwendete SI-Einheiten:

Symbol	Präfix	Faktor
n	nano	$10^{-9}$
$\mu$	mikro	$10^{-6}$
m	milli	$10^{-3}$
c	centi	$10^{-2}$
k	kilo	$10^3$

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Unterschiedliche Klassen von Caspasen in Säugetieren .....	3
Abbildung 2: Der intrinsische und extrinsische Apoptose-Signalweg .....	3
Abbildung 3: Unterschiedliche Funktionen und Signalwege des Fas (CD95)/FasL (CD95L)-Systems.....	6
Abbildung 4: Die akute meningitische Phase (A) und postmeningitische Rekonvaleszenzphase (B) in der Übersicht .....	20
Abbildung 5: Titerbestimmung .....	22
Abbildung 6: Die Seiltest-Versuchsanlage .....	23
Abbildung 7: Die Morris-Wasserlabyrinth-Versuchsanlage .....	24
Abbildung 8: Zielplattformen im Morris-Wasserlabyrinth .....	26
Abbildung 9: Die „Offenes-Feld“-Versuchsanlage .....	28
Abbildung 10: Die Rotarod-Versuchsanlage .....	29
Abbildung 11: Genotypisierung von Versuchstieren.....	34
Abbildung 12: Datenerfassung in der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR) .....	36
Abbildung 13: Titerbestimmung in Kleinhirn, Milz, Blut und Darstellung meningealer Entzündung .....	39
Abbildung 14: Phänotypen zur Evaluation des Krankheitsverlaufs (akutes Meningitis-Modell) .....	41
Abbildung 15: Expressionsanalysen hippocampalen Gewebes von Faim2 <sup>+/+</sup> -Versuchstieren .....	42
Abbildung 16: Apoptotischer Zelltod im Gyrus dentatus der Hippokampusformation .....	44
Abbildung 17: Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (TUNEL und NeuN gegenüber aktiver Caspase-8).....	45
Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (TUNEL und NeuN gegenüber aktiver Caspase-3).....	46
Abbildung 19: Überlebensanalyse nach unbehandelter SP3-Infektion .....	47
Abbildung 20: Phänotypen zur Evaluation des Krankheitsverlaufs (postmeningitische Rekonvaleszenzphase) .....	49
Abbildung 21: Analyse basaler Fähigkeiten als Voraussetzung für den Morris-Wasserlabyrinth-Test.....	52
Abbildung 22: Die Akquisitionsphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests (Tag 1 bis Tag 6) .....	54
Abbildung 23: Die Akquisitionsphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests (Transfertest, Tag 7) .....	55
Abbildung 24: Die Umlernphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests (Tag 1 bis Tag 6) .....	57
Abbildung 25: Die Umlernphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests (Transfertest, Tag 7) .....	58
Abbildung 26: Der „Offenes-Feld“- (OFT) und Rotarod-Test.....	60
Abbildung 27: Neurogenese im Gyrus dentatus der Hippokampusformation .....	62
Abbildung 28: Überlebensanalyse nach SP3-Infektion und antibiotischer Behandlung mit Ceftriaxon (postmeningitische Rekonvaleszenzphase) .....	62
Abbildung 29: Faim2-Expression, Neurogenese und Apoptose unter Neuroinflammation (Modell).....	67

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Titerbestimmung .....	22
Tabelle 2: Kriterien des klinischen Punktesystems.....	22
Tabelle 3: Kriterien der Seiltestuntersuchung.....	23
Tabelle 4: Protokoll für das Kontrolltraining (sichtbare Plattform).....	26
Tabelle 5: Protokoll für die Akquisitions- und Umlernphase (unsichtbare Plattform).....	27
Tabelle 6: Punktwertkriterien der meningealen Entzündung .....	30
Tabelle 7: Kohortenalter, Titer und Punktwerte der meningealen Entzündung (Mittelwert $\pm$ SEM)....	39
Tabelle 8: Kohortenalter und Kleinhirn-Titer im Überlebensversuch (Mittelwert $\pm$ SEM) .....	47
Tabelle 9: Stichprobengrößen im zeitlichen Verlauf und Kohortenalter in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase (Mittelwert $\pm$ SEM).....	50

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Neuronaler Zelltod durch Apoptose:

### Klassische Funktionen des Fas (CD95)/FasL (CD95L)-Systems

Apoptose<sup>1</sup> und entwicklungsbedingter programmierter Zelltod<sup>2</sup> stellen neben der Nekrose eine Hauptform des neuronalen Zelltodes dar. So erfolgt im Rahmen der Embryonalentwicklung des Zentralnervensystems (ZNS) eine teilweise Eliminierung neuronaler Vorläuferzellen durch den morphologisch als Apoptose imponierenden programmierten Zelltod (Choi und Benveniste 2004). Neben der Beteiligung an physiologischen Prozessen wie der embryonalen Entwicklung sowie der Regeneration und Proliferation im Rahmen der Gewebe- bzw. Organhomöostase ist die Apoptose spezifischer neuronaler Zellpopulationen ein wichtiger pathophysiologischer Prozess bei nahezu allen ZNS-Erkrankungen. Dies betrifft nicht nur neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. die Alzheimer-, Parkinson- oder Huntington-Erkrankung und die Amyotrophe Lateralsklerose, sondern auch zerebrale Ischämien, Traumata, Neoplasien und Entzündungen (Bredesen et al. 2006; Honig und Rosenberg 2000; Kermer et al. 2004; Ribe et al. 2008).

Morphologisch wurde Apoptose erstmalig von Kerr, Wyllie und Currie charakterisiert und vom nekrotischen Zelltod abgegrenzt. So sind Reduktion des Zellvolumens (Pyknosis), Chromatin-Kondensation und nukleäre Fragmentierung (Karyorrhesis) sowie Abschnürung von Vesikeln mit Bildung von apoptotischen Körperchen und deren anschließender Phagozytose typische Merkmale der Apoptose (Kerr et al. 1972; Kroemer et al. 2009). Charakteristisch ist zudem das Fehlen einer reaktiven Entzündungsreaktion (Voll et al. 1997).

Eine zentrale Rolle bei der biochemischen Ausführung von Apoptose spielt eine Gruppe von Proteasen, die sogenannten Caspasen<sup>3</sup>. Hinsichtlich ihrer putativen Funktion werden drei Gruppen von Caspasen unterschieden: Initiations- und Effektorcaspasen einerseits sowie an Entzündungsprozessen beteiligte Caspasen andererseits (Abbildung 1). Die Initiierung von Apoptosevorgängen kann hierbei über getrennte Signaltransduktionskaskaden erfolgen, über die intrinsische (mitochondriale) und die extrinsische (Todesrezeptor-vermittelte) Kaskade (Abbildung 2). Beide Signalwege beginnen mit der Aktivierung von Initiationscaspasen und konvergieren schließlich in der Rekrutierung von Effektorcaspasen, jeweils mittels proteolytischer Spaltung inaktiver Procaspasen (Schulz et al. 1999). Der intrinsische Signalweg wird über eine Reihe zytotoxischer Stimuli wie beispielsweise oxidativer

---

<sup>1</sup> Griechisch, *ἀπόπτωσης (apoptōsis)*: Der Abfall, der Abwurf, der Niedergang (Andeutung auf das Verwelken und Abfallen der Blätter im Herbst). Der Begriffsvorschlag erfolgte durch James Cormack (Kerr et al. 1972).

<sup>2</sup> Die Terminologie hinsichtlich der unterschiedlichen Manifestationen des Phänomens „Zelltod“ orientiert sich an den Empfehlungen des *Nomenclature Committee on Cell Death 2009 (NCCD)* (Kroemer et al. 2009).

<sup>3</sup> Englisch, *cysteine-dependent aspartate-specific protease*: Cysteinproteasen, welche Peptidbindungen C-terminal von Aspartat spalten.

Stress, alkylierende Substanzen oder ionisierende Strahlung aktiviert und führt über eine Translokation mitochondrialer Moleküle, z.B. des Cytochrom c, Diablo/Smac, HtrA2/Omi oder AIF, in das Zytosol zu einer Aktivierung von Initiations- und Effektorcaspasen (Galluzzi et al. 2009; Kroemer et al. 2007). Cytochrom c bildet dabei zusammen mit Procaspase-9 und Apaf-1 den Apoptosom-Komplex mit nachfolgender Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3 (Li P et al. 1997; Zou et al. 1999; Zou et al. 1997).

Der extrinsische Signalweg wird über die Aktivierung von Todesrezeptoren eingeleitet, deren prominentester Vertreter der zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor-(TNFR)-Superfamilie gehörende Fas-Rezeptor (Fas, CD95, APO-1) ist. Die Aktivierung der Fas-vermittelten Signalkaskade wird über eine spezifische Interaktion zwischen dem Liganden (FasL, CD95L, APO-1L, CD178) und dem Rezeptor (Fas) eingeleitet. Es folgt die Rekrutierung des Adapterproteins FADD (engl., *Fas-associated death domain*), von regulatorischen Proteinen (z.B. DAXX, c-FLIP, RIP) und von Procaspase-8, die Ausbildung des Todessignalkomplexes DISC (engl., *death-inducing signaling complex*) sowie die Aktivierung von Caspase-8 durch autoproteolytische Spaltung und Dimerisierung (Boldin et al. 1996; Boldin et al. 1995; Donepudi et al. 2003; Muzio et al. 1996; Peter und Kramer 2003). Von Fas ausgehende intrazelluläre Signale können auch den mitochondrialen Signalweg über die Spaltung von Bid durch Caspase-8 und nachfolgende, durch die trunkierte Form von Bid (t-Bid) induzierte, Translokation von Cytochrom c in das Zytosol einleiten (Li H et al. 1998; Luo et al. 1998). Caspasen können von cIAPs (engl., *cellular inhibitor of apoptosis proteins*) inhibiert werden, Letztere wiederum von Diablo/Smac und HtrA2/Omi (Ribe et al. 2008).

Sowohl Fas als auch FasL werden im zentralen Nervensystem physiologischerweise exprimiert, wobei die Bedeutung nicht abschließend geklärt ist und klassischerweise mit der Aufrechterhaltung des Immunstatus des ZNS in Verbindung gebracht wurde (Choi und Benveniste 2004). Bei zahlreichen neurologischen Erkrankungen ist diese Expression jedoch deutlich erhöht. Das Spektrum der Erkrankungen reicht dabei von Neuroinflammation (Fassbender et al. 1999) über Trauma (Beer et al. 2000), Ischämie (Martin-Villalba et al. 1999; Northington et al. 2001) und Neurodegeneration, wie z.B. der Alzheimer-Erkrankung (de la Monte et al. 1997; Morishima et al. 2001), bis hin zu Epilepsie (Tan et al. 2001; Tan et al. 2002) und Tumorerkrankungen (Kleber et al. 2008; Tachibana et al. 1995).

Schließlich führt die Unterbrechung des Fas-Signalwegs unter experimentellen pathophysiologischen Bedingungen in vielen Fällen zu einer Abschwächung des Krankheitsbildes im jeweils verwendeten Modell (Reich et al. 2008). Dies zeigt sich beispielsweise in Modellen des Schädel-Hirn- und Rückenmark-Traumas (Beier et al. 2007; Demjen et al. 2004), der Multiplen Sklerose (Sabelko-Downes et al. 1999), der zerebralen Ischämie (Martin-Villalba et al. 2001), der Amyotrophen Lateralsklerose (Locatelli et al. 2007) und der Alzheimer-Erkrankung (Morishima et al. 2001; Su et al. 2003) sowie bei Wachstumsfaktor-Entzug (Raoul et al. 1999; Ugolini et al. 2003).

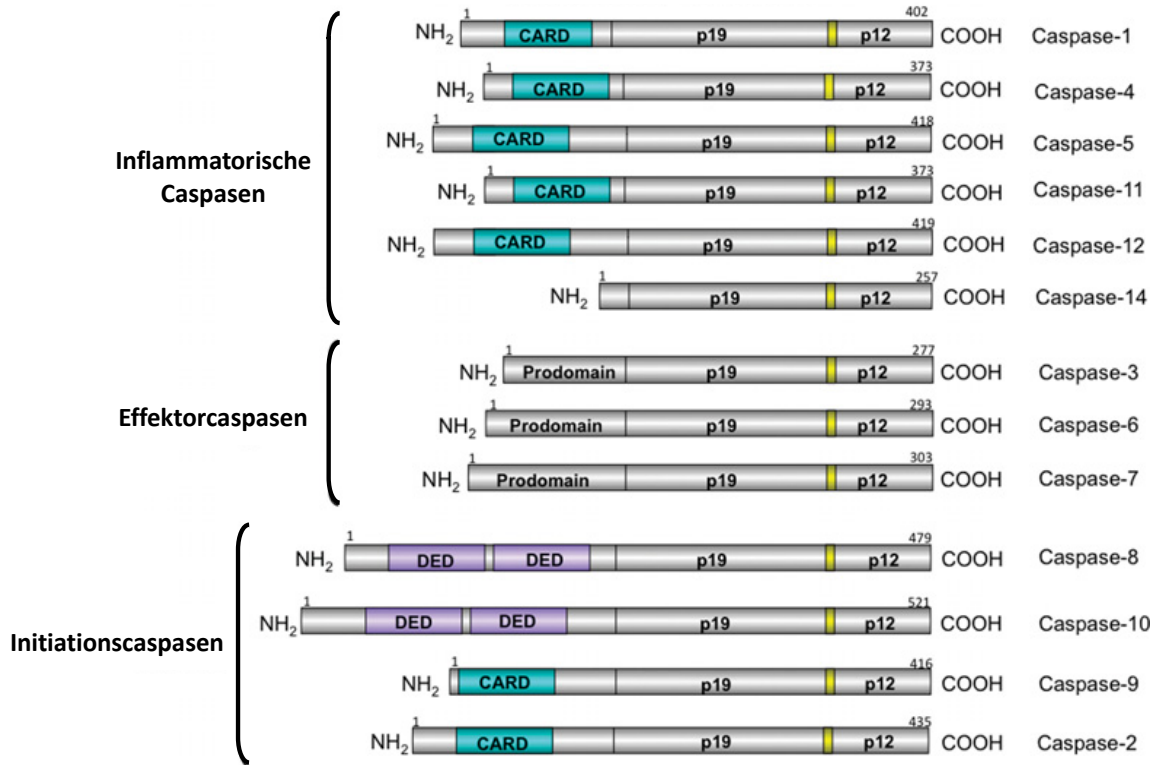


Abbildung 1: Unterschiedliche Klassen von Caspasen in Säugetieren

(Modifiziert nach Ribe et al. 2008, S. 166; Abk.: CARD = caspase recruitment domain, DED = death effector domain.)

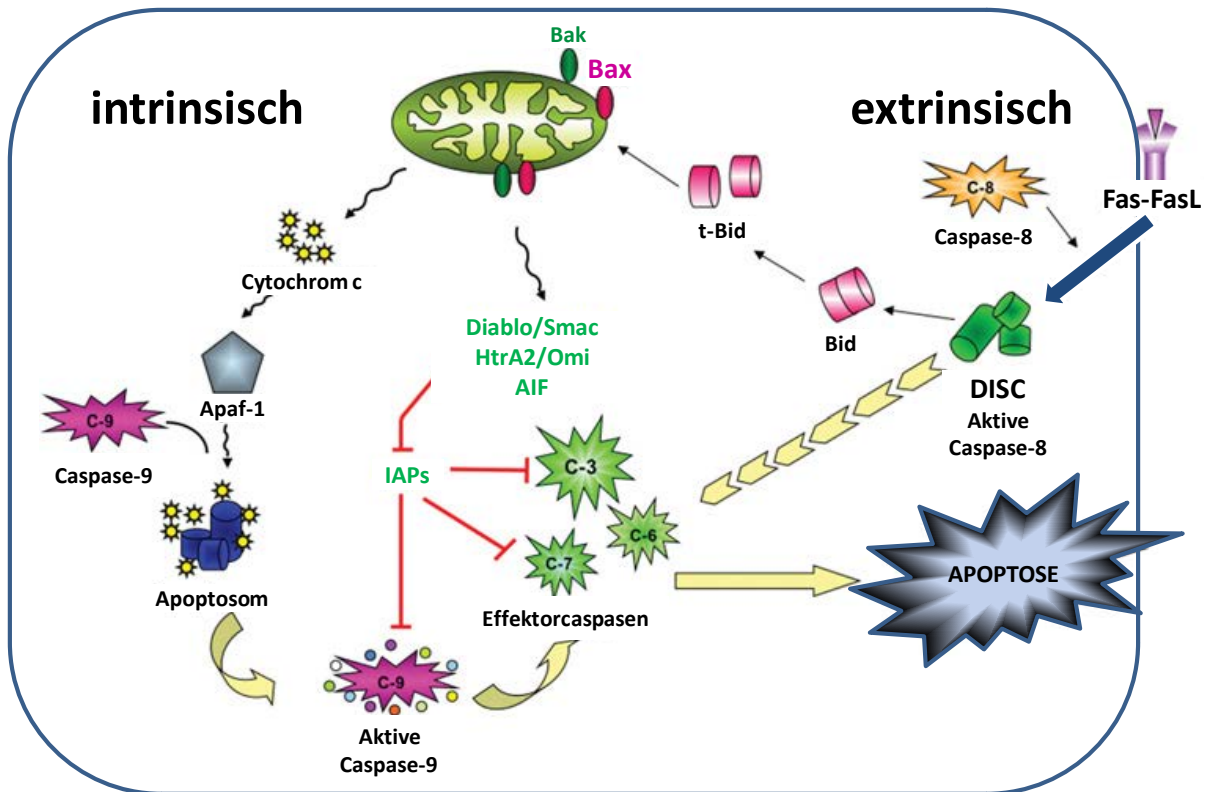


Abbildung 2: Der intrinsische und extrinsische Apoptose-Signalweg

(Modifiziert nach Ribe et al. 2008, S. 167; Abk.: DISC = death-inducing signaling complex, Bid = BH3 interacting domain death agonist, t-Bid = trunkeerte Form von BID, Bak = BCL2-antagonist/killer 1, Bax = BCL2-associated X protein, Diabolo = direct IAP-binding protein with low pI, Smac = second mitochondria-derived activator of caspase, AIF = apoptosis-inducing factor, HtrA2 = HtrA serine peptidase 2 [synonym Omi], Apaf-1 = apoptotic peptidase activating factor 1, IAPs = inhibitor of apoptosis proteins.)

## **1.2 Neurogenese, neuronale Differenzierung und Tumorgenese:**

### **Alternative Funktionen des Fas (CD95)/FasL (CD95L)-Systems**

Lange Zeit wurde angenommen, dass das ausgereifte Säugergehirn nicht die Kapazität für die Erzeugung neuer Neurone besitzt. In den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts gelang Joseph Altman jedoch anhand autoradiographischer Untersuchungen mit <sup>3</sup>H-Thymidin der Nachweis für die Existenz adulter Neurogenese in Säugetieren (Altman 1962; Altman 1963; Altman und Das 1965a; Altman und Das 1965b). Unter Zuhilfenahme des ursprünglich für die Krebstherapie vorgesehenen Thymidin-Analogons 5-Bromo-2-Deoxyuridin (BrdU) als Proliferationsmarker konnte Ende der neunziger Jahre erstmalig auch bei nicht-menschlichen Primaten und beim Menschen das Vorhandensein adulter hippocampaler<sup>4</sup> Neurogenese aufgezeigt werden (Eriksson et al. 1998; Gould et al. 1999b). Zahlreiche Untersuchungen haben zu einem größeren Verständnis der involvierten Prozesse adulter Neurogenese, wie der Proliferation neuronaler Vorläuferzellen, dem Schicksal neu entstandener Neurone, der Differenzierung, Morphogenese und Maturation dieser Zellen sowie ihrer Integration in neuronale Netzwerke, geführt (Zhao et al. 2008). Zudem steht jeder dieser Prozesse unter dem Einfluss der Regulation durch extrinsische und intrinsische Faktoren innerhalb einer spezialisierten Mikroumgebung, der neurogenen Stammzellnische (Suh et al. 2009).

Adulte Neurogenese geht von neuronalen Vorläuferzellen aus und findet unter physiologischen Bedingungen erwiesenermaßen in zwei definierten Regionen (Nischen) des adulten Gehirns statt: in der subventrikulären Zone (SVZ) der Seitenventrikel und in der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus dentatus innerhalb der Hippokampusformation. Proliferierende Neurone der SVZ gelangen über den rostralen migratorischen Strom (RMS) in den Bulbus olfactorius, differenzieren sich zu periglomerulären und granulären Neuronen und werden physiologischerweise mit dem olfaktorischen Gedächtnis in Zusammenhang gebracht (Lois und Alvarez-Buylla 1994; Lois et al. 1996; Nissant und Palotto 2011). Unreife Neurone der SGZ migrieren in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, um dort zu Körnerzellen auszureifen und sich in das lokale neuronale Netzwerk zu integrieren (Cameron et al. 1993; Deng et al. 2010; Gage 2000). Auch wenn ein kausaler Zusammenhang bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, besteht die Assoziation zwischen der Entstehung von neuen hippocampalen Neuronen und Lern- und Gedächtnisvorgängen. In jüngerer Zeit sind dabei spezielle, vom Gyrus dentatus abhängige Funktionen wie die Mustertrennung (engl., *pattern separation*) in den Vordergrund gerückt (Deng et al. 2010; Sahay et al. 2011). Das Neurotrophin BDNF (engl., *brain-derived neurotrophic factor*) wird mit sowohl Neurogenese als auch Lernprozessen in Verbindung gebracht und könnte hierbei als eine verknüpfende dritte Variable agieren (Bekinschtein et al. 2011).

Das Spektrum Neurogenese-regulierender Faktoren ist umfangreich und heterogen (Kempermann 2011). So führen beispielsweise eine angereicherte Umgebung (engl., *enriched environment*), erhöhte

---

<sup>4</sup> Lateinisch, *hippocampus*: Seepferdchen. Zum limbischen System gehörende Struktur im Temporallappen.



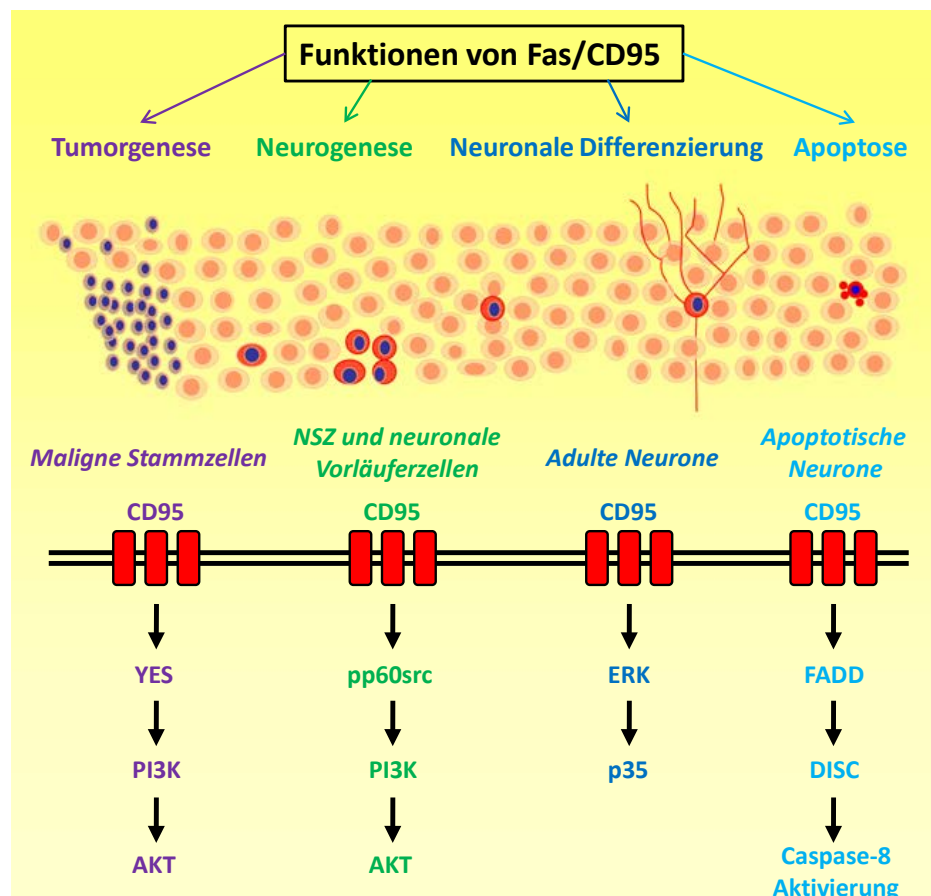
körperliche Aktivität und Hippokampus-abhängiges Lernen zu verstärkter Neurogenese (Gould et al. 1999a; Kempermann et al. 1997; van Praag et al. 1999), wohingegen psychosozialer Stress und Schlafentzug in einer geringeren Neurogenese-Rate resultieren (Gould et al. 1997; Guzman-Marin et al. 2005). Pathologische Bedingungen können mit einer Veränderung des Ausmaßes adulter Neurogenese, wie Erhöhung bei zerebraler Ischämie oder Verringerung bei Depression und Angst, in der SVZ und SGZ assoziiert sein (Cho und Kim 2010; Kempermann 2002; Ohira 2011; Revest et al. 2009). Adulte Neurogenese kann jedoch auch außerhalb der klassischen neurogenen Nischen induziert werden bzw. stattfinden (Emsley et al. 2005; Magavi et al. 2000). Diskutiert werden insbesondere eine reaktive Aktivierung neuronaler Vorläuferzellen als Reaktion auf einen pathologischen Stimulus, wobei eine Rekrutierung vor Ort an der Stelle des Defekts oder eine Migration von Zellen einer neurogenen Nische, insbesondere der SVZ, zum geschädigten Ort denkbar sind (Ohira 2011).

Auch wenn die klassische Funktion des Todesrezeptors Fas/CD95 in Zusammenhang mit der Initiierung von Apoptose und damit eines induzierten Zelltodprogramms gesehen wird (Kapitel 1.1), konnten in den vergangenen Jahren weitere, nicht-apoptotische Funktionen dieses Rezeptorsystems aufgezeigt werden (Abbildung 3). Diese alternativen Todesrezeptor-Signalwege beeinflussen Proliferation und Zelldifferenzierung, Tumorprogression und Angiogenese sowie die Zytokinsekretion und Integrinexpression (Beier und Schulz 2009; Lambert et al. 2003; Reich et al. 2008).

So konnte in kultivierten Hinterwurzel-Spinalganglion-Neuronen mit genetisch induzierter Defizienz des Fas-Rezeptors (Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse) eine altersabhängige und verzögerte Neuritenregeneration nachgewiesen werden (Hikawa et al. 1997). Die Quervernetzung von Fas auf sensiblen kultivierten Neuronen induziert das Wachstum von Neuriten durch Aktivierung des ERK-Signalwegs (engl., *extracellular signal-regulated kinase*) und Hochregulation von p35, einem Mediator des Auswuchses von Neuriten (Desbarats et al. 2003). In embryonalen hippocampalen und kortikalen Neuronen induziert FasL *in vivo* und *in vitro* keine Apoptose. Hier kommt es durch Aktivierung von Fas zu einer Caspase-unabhängigen und Todesdomänen-abhängigen Zunahme der Verzweigung von Neuriten. Eine genetische Defizienz der Fas-Signalkaskade auf Rezeptor- (Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse) oder Ligandenebene (Fas<sup>gld</sup>-Mäuse) führt dagegen zu einer Reduktion der Anzahl dendritischer Verzweigungen (Zuliani et al. 2006). Auch histologisch geht eine Fas-Dysfunktionalität mit einer Atrophie dendritischer Verzweigungen in Pyramidenzellen von Kortex und Hippokampus einher (Šakić et al. 1998). Mithilfe eines Mausmodells für Schädel-Hirn-Trauma konnte *in vivo* gezeigt werden, dass eine Defizienz des Fas-Rezeptors akut (72 Stunden nach Trauma) zu einer Verbesserung sowohl der lokomotorischen als auch der Gedächtnisleistung führt, langfristig (21 Tage nach Trauma) jedoch in eine kognitive Verschlechterung mündet (Beier et al. 2007). Im MPTP-Modell der Parkinson-Erkrankung führt eine hohe intraperitoneale Toxindosis zu Fas-induzierter Apoptose dopaminerger Neurone (Hayley et al. 2004), eine subakute bzw. subkutan verabreichte Toxindosis jedoch zu einer über den Fas-Signalweg vermittelten Neuroprotektion (Landau et al. 2005).

Kürzlich gelang der Nachweis, dass Fas als Aktivator adulter Neurogenese und neuronaler Differenzierung fungieren kann, welche über den pp60-src/PI3K/AKT/mTOR-Signalweg vermittelt wird. Experimentelle Unterdrückung Fas-induzierter Neurogenese im Hippokampus hatte dabei eine Beeinträchtigung räumlichen Lernens unbehandelter Versuchstiere sowie in einem Ischämie-Mausmodell eine geminderte Integration injizierter neuronaler Stammzellen in die Hippokampusformation zur Folge (Corsini et al. 2009).

Der Fas-Signalweg konnte auch mit Prozessen in Verbindung gebracht werden, welche zur Tumorpromotion führen. Die Interaktion von gesundem Hirngewebe mit Tumorzellen des Glioblastoma multiforme erhöht die Expression des Fas-Liganden mit dessen konsekutiver Bindung an den Fas-Rezeptor der Tumorzellen, Aktivierung des Yes/PI3K/AKT-Signalwegs und anschließender Gewebeinvasion durch Rekrutierung von Matrix-Metalloproteinasen (Kleber et al. 2008).



**Abbildung 3: Unterschiedliche Funktionen und Signalwege des Fas (CD95)/FasL (CD95L)-Systems**

(Modifiziert nach Beier und Schulz 2009, S. 129; Abk.: CD = cluster of differentiation, YES = v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1, PI3K = Phosphatidylinositol-3-Kinase, AKT = v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, NSZ = neuronale Stammzellen, pp60src = v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian) / phosphoryliertes 60-kDa-Phosphoprotein, ERK = extracellular signal-regulated kinase, p35 = cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35), FADD = Fas-associated death domain, DISC = death-inducing signaling complex.)

### **1.3 Faim2: Regulation des Fas (CD95)/FasL (CD95L)-Systems**

Es wurde gezeigt, dass das Fas-FasL-System durch proximal-regulatorische Proteine, wie c-FLIP, PEA-15, Btk, FAP-1, IAPs, Faim1 mit einer kurzen und langen Spleißvariante (Faim-S, Faim-L) und Faim3, beeinflusst werden kann (Reich et al. 2008). Ein weiteres Kandidatenprotein ist das zur evolutionär konservierten und Apoptose-regulatorischen Genfamilie *lifeguard* (LFG) gehörende Membranprotein *Fas apoptotic inhibitory molecule 2* (Faim2), synonym *neural membrane protein 35* (NMP35). Es kann als endogener Inhibitor Fas-vermittelte Apoptose in Tumorzellen modulieren und interagiert direkt mit Fas, ohne dabei die Fas-FADD-Interaktion zu beeinträchtigen (Hu et al. 2009; Somia et al. 1999). Dabei wurde Faim2 insbesondere in Lipid-Mikrodomänen der Zellmembran detektiert und eine FasL-induzierte Translokation des Fas-Rezeptors in diese Mikrodomänen mit nachfolgender Rekrutierung von Procaspase-8 beobachtet (Fernández et al. 2007). In zerebellären Körnerzellen und Purkinjezellen ist Faim2 der wesentliche Faktor für die Resistenz dieser Fas-positiven Zellen gegenüber FasL-getriggert Apoptose. Die Regulation der Faim2-Expression erfolgt über den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt/Proteinkinase B-Signalweg (Beier et al. 2005; Fernández et al. 2007; Hurtado de Mendoza et al. 2011). Faim2 wird beinahe exklusiv im ZNS, insbesondere von Körnerzellen im Hippokampus und Kleinhirn, exprimiert, wobei die Expression während der postnatalen Entwicklung deutlich erhöht und neuronal betont ist (Fernández et al. 2007; Schweitzer et al. 1998). Faim2 ist vorwiegend postsynaptisch in den Dendriten lokalisiert und kolokalisiert mit dem Glutamatrezeptor GluR2, so dass eine Beteiligung an der synaptischen Neurotransmission möglich erscheint (Schweitzer et al. 2002). Für Faim2 besteht eine ausgeprägte spezieübergreifende Homologie sowohl auf DNS- als auch auf Proteinebene und evolutionäre Konservierung (Hu et al. 2009; Reich et al. 2008; Reimers et al. 2006).

Da die Modulation Rezeptor-vermittelter neuronaler Apoptose und alternativer Signalwege sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch wichtig zu sein scheint, stellt das neuronenspezifische und antiapoptotische Protein Faim2 ein Kandidatenmolekül mit therapeutisch-neuroprotektivem Potential dar. Um die Rolle von Faim2 während der Embryonalentwicklung und in Krankheitsmodellen weiter zu untersuchen, wurde eine murine Faim2-Nullmutante generiert und initial einem zerebralen Ischämie-Modell unterzogen. Unbehandelt zeigte sich hierbei ein unauffälliger Phänotyp ohne offenkundige Defizite. *In vitro* konnte eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Entzug von Sauerstoff und Glukose in Faim2-defizienter, primärer neuronaler Zellkultur nachgewiesen werden. Auch *in vivo* führte die Abwesenheit von Faim2 nach Ischämie zu erhöhtem Caspase-assoziierten Zelltod, einem größeren Volumen des Schlaganfalls und einer ausgeprägteren neurologischen Beeinträchtigung. Ein lentiviraler Gentransfer von Faim2 konnte dabei diese Vorgänge umkehren (Reich et al. 2011). Von eminenter Bedeutung erscheint vor dem Hintergrund dieser ersten wissenschaftlich publizierten Untersuchungen zur *in-vivo*-Funktion von Faim2 die Klärung der Frage, inwieweit die bisherigen Ergebnisse eines akuten Krankheitsmodells (Ischämie) sich auch auf weitere

Krankheitsmodelle übertragen lassen und welchen Einfluss Faim2 zusätzlich auf langfristige Regenerationsprozesse ausübt.

#### **1.4 Das *Streptococcus-pneumoniae*-Typ-3-Meningitismodell**

Zur Beantwortung der oben genannten Frage wurde ein murines Meningitismodell unter den Bedingungen der Faim2-Defizienz untersucht. Hierbei handelt es sich um ein etabliertes Modell unter Verwendung von *Streptococcus pneumoniae* Typ 3 (*S. pneumoniae*, SP3), welches eine Analyse des Krankheitsverlaufs sowohl in der meningitischen (24 Stunden nach Infektion) als auch, unter antibiotischer Abdeckung mit Ceftriaxon, in der postmeningitischen Phase (7 Wochen nach Infektion) gestattet (Gerber et al. 2001).

Bakterielle Meningitis, ausgelöst durch *S. pneumoniae*, stellt ein Krankheitsbild mit hoher Letalität und Morbidität dar (Thigpen et al. 2011). Auch nach durchgemachter Erkrankung sind bleibende neurologisch-kognitive Beeinträchtigungen häufig und treten bei ungefähr einem Drittel der Betroffenen auf (Hoogman et al. 2007; Nau und Schmidt 2007; Schmidt et al. 2006; van de Beek et al. 2002). Neben traumatisch bedingten Eintrittspforten oder ZNS-nahen lokalen Infektionen führen typischerweise die Kolonisation von Schleimhäuten, Bakteriämie und Überwindung der Blut-Hirn- sowie Blut-Liquor-Schranke zur Infektion des ZNS (Gerber und Nau 2010). Apoptose stellt eine wesentliche Komponente der Hippokampuschädigung im Rahmen einer durch *S. pneumoniae* bedingten bakteriellen Meningitis dar, wobei direkt pathogen das vom Erreger sezernierte Zytolysin Pneumolysin, Wasserstoffperoxid, Stickstoffmonoxid sowie die Pneumokokken-Zellwand mit ihren Bestandteilen wirken. Die Erregererkennung und Initiierung von Entzündungsvorgängen wird dabei insbesondere durch Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR) der Subtypen TLR2 (Lipoteichonsäure und andere Zellwandbestandteile), TLR4 (Lipopolysaccharide, Pneumolysin) und TLR9 (bakterielle DNS) vermittelt (Gerber und Nau 2010; Klein et al. 2008; Marriott und Dockrell 2006; Tauber et al. 2009). Vor allem die im Gyrus dentatus der Hippokampusformation vorkommenden Körnerzellen sind dabei von einer erhöhten Apoptoserate betroffen, was in Zusammenhang mit den bei Überlebenden auftretenden neuropsychologischen Defekten gebracht wird. Im Neokortex, der CA1-4-Region des Hippokampus und anderen Hirnregionen ist dagegen Nekrose die vorherrschende Zelltodform. Vaskulitis kleiner Gefäße, Thrombosen, fokale Ischämien, axonaler Schaden der weißen Substanz und Entstehung eines Hirnödems tragen zur Defekterhöhung bei (Gerber und Nau 2010; Nau et al. 1999; Nau et al. 2004; Zysk et al. 1996). Von *S. pneumoniae*-Meningitis verursachte hippokampale Apoptose betrifft vorwiegend unreife Neurone der subgranulären Zone des Gyrus dentatus (Bifare et al. 2003). Auf Transkriptionsebene werden im Mausmodell der bakteriellen Meningitis Initiations- und Effektorcaspasen im Hirngewebe hochreguliert (von Mering et al. 2001).

Experimentell induzierte Pneumokokken-Meningitis führt bei Mäusen, den hippokampalen Schaden illustrierend, zu einer Beeinträchtigung des räumlichen Lernvermögens (Wellmer et al. 2000). Die bisherige Beschreibung des Einflusses von Neuroinflammation auf Neurogenese ist heterogen. Die proliferative Kapazität hippokampaler neuronaler Vorläuferzellen ist *in vitro* und nach Injektion von Erregerkomponenten eingeschränkt (Hofer et al. 2011; Hoffmann et al. 2007). Im Maus- sowie im Kaninchenmodell der *S. pneumoniae*-Meningitis konnte jedoch eine erhöhte Proliferation neuronaler Vorläuferzellen in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus nachgewiesen werden (Gerber et al. 2003). Auch in postmortalen Analysen beim Menschen zeigt sich eine verstärkte krankheitsbedingte Neurogenese, z.B. bei verstorbenen Patienten, die an bakterieller Meningitis, Schlaganfällen oder Schädel-Hirn-Traumen litten (Gerber et al. 2009). Gleichzeitig ist die hippokampale Expression des mit Neurogenese in Verbindung gebrachten Neurotrophins BDNF und dessen Rezeptor TrkB (engl., *tropomyosin-receptor-kinase B*) im murinen Meningitis-Modell erhöht (Tauber et al. 2005).

Neben antiinfektiösen und antiinflammatorischen therapeutischen Maßnahmen stellt die Modulation apoptotischer Signalwege einen experimentellen Ansatz dar, um neuronalen Schaden während und nach bakterieller Meningitis zu begrenzen (Grandgirard und Leib 2006). Der Breitspektrum-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk führt im Kaninchenmodell der Pneumokokken-Meningitis zu einer Modulation der Wirtsimmunantwort und konsekutiv zur Verminderung hippokampalen neuronalen Zelltodes (Braun et al. 1999). Die spezifischere Inhibition von Caspase-3 mittels Ac-DEVD-CHO führt ebenso zu verminderter hippokampaler Apoptose und zeigt damit die Beteiligung des Apoptose-Signalwegs unabhängig von Entzündungsvorgängen auf (Gianinazzi et al. 2003). Neuronale Apoptose im Hippokampus kann jedoch auch unabhängig von einer Beteiligung von Caspase-3 stattfinden (Mitchell et al. 2004). Das Neurotrophin BDNF schützt sowohl vor Caspase-3-abhängiger hippokampaler Apoptose (*S. pneumoniae*-Meningitismodell) als auch vor kortikaler Nekrose und Caspase-3-unabhängiger hippokampaler Apoptose (Gruppe-B-Streptokokken-Meningitismodell) (Bifrare et al. 2005).

Die Konzentration von Fas und FasL ist im Liquor cerebrospinalis von an bakterieller Meningitis erkrankten Menschen im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht, so dass eine Beteiligung am Krankheitsprozess wahrscheinlich ist (Fassbender et al. 1999; Paul et al. 2004). Im murinen Meningitismodell ist die mRNA-Expression im Hirngewebe von Fas, nicht jedoch von FasL, erhöht. Die akute Entzündungsantwort bei Mäusen mit einer Defizienz des Fas-Rezeptors (Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse) respektive des Fas-Liganden (Fas<sup>gld</sup>-Mäuse) ist jedoch bei bakterieller Meningitis unverändert (Paul et al. 2004). Es müssen daher andere, bisher unbekannt Funktionen des Fas-FasL-Systems bei bakterieller Meningitis angenommen werden. Unklar ist außerdem die Relevanz einer Regulation des Fas-FasL-Systems bei bakterieller Meningitis, welche bisher noch nicht untersucht worden ist.

## **1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Die Untersuchung von klassisch apoptotischen und alternativen, insbesondere regenerativen, Signalkaskaden im ZNS und deren Modulation durch regulatorische Proteine sind von besonderem Interesse für die Aufklärung der Pathophysiologie zahlreicher neurologischer Erkrankungen und der Entwicklung neuer Therapieansätze. Insbesondere die Modulation der Fas-vermittelten Signalwege stellt aufgrund ihrer vielseitigen Auswirkungen im Hinblick auf neuronale Apoptose einerseits und neuroprotektive Effekte andererseits ein vielversprechendes Therapieziel dar. Das bisher wenig untersuchte Protein Faim2 könnte eine Schlüsselrolle bei der Regulation Fas-initiiertes Prozesse einnehmen.

Die vorliegende Arbeit untersucht den bisher unbekanntem Einfluss von Faim2 auf den Krankheitsverlauf der bakteriellen Meningitis in einem etablierten Mausmodell. Für diesen Zweck wurde eine ebenfalls etablierte Faim2-nullmutante Mauslinie herangezogen. Es wurde hierbei zunächst die Akutphase der Meningitis (24 Stunden nach Infektion) untersucht, um unmittelbare Effekte zu Beginn der Erkrankung analysieren zu können. Es sollte der unmittelbare Einfluss von Faim2 auf Neuroinflammation, den klinischen Phänotyp, das Gesamtüberleben und hippocampale neuronale Apoptose im Gyrus dentatus charakterisiert werden. Zusätzlich wurden die Beteiligung von Initiations- und Effektorcaspasen am Apoptoseprozess sowie die Auswirkung von Neuroinflammation auf die hippocampale Expression von Fas und Faim2 untersucht.

In der sich anschließenden postmeningitischen Phase (bis 13 Wochen nach Infektion unter antibiotischer Abdeckung) wurden Langzeiteffekte von Faim2 auf den Krankheitsverlauf untersucht, insbesondere unter dem Blickwinkel regenerativer Prozesse. Neben dem Einfluss von Faim2 auf den klinischen Phänotyp, das Gesamtüberleben und die hippocampale Neurogenese sollte anhand von Verhaltensexperimenten (Morris-Wasserlabyrinth) geklärt werden, ob Faim2 eine regulatorische Funktion auf das räumliche Lernvermögen und damit einhergehend auf hippocampale Funktion ausübt. Anhand zusätzlicher Phänotypenanalysen wurden die Auswirkung von Faim2 auf die lokomotorische Aktivität und das Explorationsverhalten („Offenes-Feld“-Test) sowie auf Ausdauer und Koordinationsfähigkeit (Rotarod-Test) analysiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es somit, sowohl unmittelbare als auch langfristige Funktionen von Faim2 in einem Mausmodell der bakteriellen Meningitis aufzuzeigen, in einen funktionellen Zusammenhang zu stellen und generelle Prinzipien für die Regulation neuronaler Apoptose sowie neuronaler Regeneration und Plastizität durch Faim2 abzuleiten.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 *Chemikalien und Bioreagenzien*

<b>Substanz</b>	<b>Herkunft</b>
ABsolute™ QPCR SYBR® Green ROX Mix	Abgene, Epsom, UK
Agarose („peqGOLD Universal-Agarose“)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Aluminiumsulfat-Hexadecahydrat ( $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$ )	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat-Lösung (5 M; $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ )	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Beladungspuffer („Loading Dye, 6 x Solution“)	Fermentas, Burlington, Ontario, Kanada
Bepanthen (Augen- und Nasensalbe)	Bayer Vital, Leverkusen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Biotherm™ 10x Puffer	GeneCraft / Ares Bioscience GmbH, Köln
Biotherm™ DNS-Polymerase	GeneCraft / Ares Bioscience GmbH, Köln
5-Brom-4-chlor-3-oxindolylphosphat, 4-Toluidin-Salz (BCIP)	Roche Diagnostics, Mannheim
5-Bromo-2-Deoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Buprenorphin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; ~ 99 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Citronensäure-Monohydrat ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; $\geq 99,5$ %)	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonuklease I (DNase I; 3550 KU/mg Protein)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DIG DNS („DIG DNA Labeling Mix, 10 x conc.“)	Roche Diagnostics, Mannheim
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
dNTP Mix 10 mM	Fermentas, Burlington, Ontario, Kanada
Eosin G (gelblich)	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig, 100 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (Rotipuran® $\geq 99,8$ %, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethylendiamintetraessigsäure di-Natriumsalz-Dihydrat (EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Fetales Kälberserum (Gibco®, hitzeinaktiviert)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Flüssigstickstoff	Universitätsmedizin Göttingen
Gene Ruler™ (100 bp DNA Ladder)	Fermentas, Burlington, Ontario, Kanada
Hämalaunlösung (sauer nach Mayer)	Roth, Karlsruhe
Hoechst 33258 (Bisbenzimid)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Immersionöl (für die Mikroskopie)	Merck KGaA, Darmstadt
Inokulum: <i>Streptococcus pneumoniae</i> Typ 3	AG Neuroinfektiologie (Prof. Nau), Zentrum Neurologische Medizin, Universitätsmedizin Göttingen
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe

Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Kernechtrot (für die Mikroskopie)	Merck KGaA, Darmstadt
Ketamin (10 %; 100 mg/ml)	Pharmanovo GmbH, Hannover
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ), 25 mM	Fermentas, Burlington, Ontario, Kanada
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
NaCl-Lösung (0,9 %)	Diaco, Triest, Italien
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat-Dihydrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roche Diagnostics, Mannheim
Oligo(dT) <sub>15</sub> Primer	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Paraformaldehyd (reinst)	Roth, Karlsruhe
2-Propanol (Isopropanol, ROTISOLV® UV/IR-Grade)	Roth, Karlsruhe
Proteinase K, rekombinant	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K, aus <i>Tritirachium album</i> (≥ 30 U/mg)	Roth, Karlsruhe
Reverse Transkriptase („M-MLV Reverse Transcriptase“)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
RNase Inhibitor („RNasin“)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RQ1 DNase Buffer (10x)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
RQ1 RNase Free DNaseI	Promega, Madison, Wisconsin, USA
RT-Puffer („M-MLV Reverse Transcriptase Buffer [5x]“)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Salzsäure (HCl; 6 mol/l; 6 N Lösung)	Roth, Karlsruhe
Stopplösung („Stop Solution“)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Streptavidin, Cy2-konjugiert (Lot: 50640)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA
Terminale Transferase (rekombinant)	Roche Diagnostics, Mannheim
Tris (PUFFERAN® ≥ 99,3 %, Buffer Grade)	Roth, Karlsruhe
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Wasser für Injektionszwecke („Ampuwa“)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Wasser (Rotisol® HPLC Gradient Grade)	Roth, Karlsruhe
Xylazin (2 %; 20 mg/ml)	Riemser Arzneimittel AG, Greifswald – Insel Riems
Xylol (Isomere)	Roth, Karlsruhe
Ziegenserum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich



### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

<b>Material</b>	<b>Herkunft</b>
96-Loch-Platte (Thermo-Fast® Platte, 96-Well)	Abgene, Epsom, UK
ABsolute™ QPCR Seal	Abgene, Epsom, UK
Alleinfuttermittel („Ssniff R/M-H V1534-000“)	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Columbia-Agar (mit 5 % Schafblut)	bioMérieux sa, Marcy l'Etoile, Frankreich
Deckgläser für die Mikroskopie, Größen: 18x18 mm, 24x40 mm, 24x60 mm	Menzel, Braunschweig / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Eindeckmittel (Entellan®)	Merck KGaA, Darmstadt
Eindeckmittel (Shandon Immu-Mount™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Einbettkassetten (Rotilabo®)	Roth, Karlsruhe
Einmalspritze (BD Plastipak™; 1 ml)	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Einmalspritzen (Omnifix®; 5 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Filtrierpapiere	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Injektionskanülen (100 Sterican®; Größen: 18 G, 26 G, 27 G)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Keramik-Kügelchen („Precellys“; 1,4 mm)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Labortücher („KIMTECH Science“)	Kimberly Clark, Dallas, Texas, USA
Latex-Untersuchungshandschuhe (puderfrei), Peha-soft®	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Nitril-Untersuchungshandschuhe (puderfrei), Nitra-Tex® EP	Ansell Limited, Richmond, Australia
Objektträger (Menzel-Gläser Superfrost® Plus)	Menzel, Braunschweig / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PCR-Gefäße (0,2 ml; 8er-Streifen)	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen, Größen: 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (steril; RNase-, DNase-, Pyrogen-, DNA-frei), Größen: 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	nerbe plus, Winsen/Luhe
Reagiergefäße (1,5 ml; 2 ml) mit Deckelverschluss	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße (2 ml) mit Schraubverschluss	Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt
Röhren, Größen: 50 ml, 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpellklingen	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg
Unterlagen (MoliNea® plus L; 40 x 60 cm)	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht
Vollmilch	Einzelhandel vor Ort
Weichholzgranulateinstreu	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest

### 2.1.3 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Herkunft</b>
47600-Maus-Rota-Rod	Ugo Basile, Comerio VA, Italien
Acculab Analysenwaage (Modell: ALC-210.4)	Sartorius, Göttingen
Aufbewahrungsboxen für Reaktionsgefäße	GLW® Storing Systems, Würzburg
Behälter für „Offenes-Feld“-Test (50 x 50 x 30 cm; [L x B x H])	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Elektrophoresesystem (Gelgrößen: 7 x 8 cm, 9 x 11 cm)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Färbegestell	Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt
Färbegläskästen	Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt
Färbetrog (Kunststoff)	Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt
Feuchte Kammer	Kartell spa, Noviglio, Italien
Flockeneisbereiter (Modell: AF-20)	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, Illinois, USA
Gefrierschrank (Modell: HFU 586 Top)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Gefrierschrank (Modell: MDF-U537)	Sanyo Electric Co., Ltd., Moriguchi, Osaka, Japan
Gel-Gießschienen	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gelkämme (1,0 und 1,5 mm; 8, 10, 12, 14 Zähne)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gelträger	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gel-Videodokumentationssystem (Bio-Vision)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gestelle (für Morris-Wasserlabyrinth)	Einzelhandel vor Ort
Gewebehomogenisator (Modell: Precellys 24)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gewebeinfiltrationsautomat (Modell: TP 1020)	Leica Microsystems, Wetzlar
Glaswaren (Gefäße und Flaschen; 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml)	Schott AG, Mainz
Heizplatte (Modell: HI 1220)	Leica Microsystems, Wetzlar
Inkubator (Modell: IS-2)	Incutec GmbH, Mössingen
Kaltlichtquelle (Modell: KL 1500 LCD)	Schott AG, Mainz
Kelle	Einzelhandel vor Ort
Kompaktwaage (Modell: CS200)	Ohaus Corp., Pine Brook, New Jersey, USA
Kühlschränke (Modell: Premium No Frost)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer (Modell: MR 3000)	Heidolph Instruments, Schwabach
Messpipetten (5 ml; 10 ml)	HBG Henneberg-Sander GmbH, Gießen
Messpipetten (25 ml)	Brand, Wertheim
Mess-/Mischzylinder, Größen: 2000 ml, 1000 ml, 500 ml	Brand (Plastibrand®), Wertheim und Kartell spa, Noviglio, Italien
Mikrokühlzentrifuge (Modell: Sigma 1-15 K)	Sartorius, Göttingen
Mikroskop (Modell: Axioskop 2 mot plus)	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop (Modell: DMI6000 B)	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrowelle (Modell: Micromaxx® MM 41580)	Medion AG, Essen

Mikrozentrifuge (Modell: Sigma 1-15)	Vitaris AG, Baar, Schweiz
Paraffinausgießstation	
(Modell: Shandon Histocentre 2)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PCR-Thermozykler	
(Modell: Mastercycler® gradient)	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter (Modell: CG 842)	Schott AG / SI Analytics GmbH, Mainz
Pipetten (mLINE®), Größen: 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Biohit Oyj, Helsinki, Finnland
Pipetten (Pipetman®), Größen: 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, Middleton, Wisconsin, USA
Pipettierhelfer (Modell: accu-jet®)	Brand, Wertheim
Präparatekästen	Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt
Präparationsbesteck	Karl Hammacher GmbH, Solingen
Präzisionswaage (Modell: Kern EW 4200-2NM)	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Real-Time PCR System	
(Modell: Stratagene Mx3000P™)	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Reinstwassersystem (Modell: arium® 611)	Sartorius, Göttingen
Rotationsmikrotom (Modell: Leica RM2245)	Leica Microsystems, Wetzlar
Schwimmbehältnis für Morris-Wasserlabyrinth (Durchmesser: 120 cm; Höhe: 60 cm )	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Spannungsgeräte für Elektrophorese (Modell: PowerPac Basic™)	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Spektrophotometer	
(Modell: NanoDrop® ND-1000)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Standautoklav (vertikal, Modell: 5075 ELV)	Systemec GmbH, Wettenberg
Stangentesteinrichtung	wissenschaftliche Werkstatt vor Ort
Stereomikroskop (Modell: SMZ645)	Nikon Corporation, Tokio, Japan
Stoppuhren (Modell: SKT338N)	Oregon Scientific, Tualatin, Oregon, USA
Thermomixer (Modell: Comfort)	Eppendorf, Hamburg
Tierkäfige für Mäuse (Modell: 1284L)	Tecniplast, Buguggiate, Italien
Tischkühlzentrifuge (Modell: Sigma 6K15)	Sartorius, Göttingen
VideoMot2 (Videoanalysesystem)	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Vorhänge	Dänisches Bettenlager, Handewitt
Mixer (Modell: Vortex Genie 2)	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wärme- und Trockenschrank	
(Modell: Heraeus Function Line T 20)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Wasserbad (Modell: HIR-3)	Kunz Instruments, Nynäshamn, Schweden
Zentrifuge (Modell: 5415D)	Eppendorf, Hamburg
Zielplattformen für Morris-Wasserlabyrinth (Durchmesser: 10 und 14 cm; Höhe: 30 cm)	TSE Systems GmbH, Bad Homburg

### 2.1.4 Lösungen und Puffer

#### **Citratpuffer (0,01 M, pH 6,0)**

Stammlösung A (0,1 M): 21,01 g Citronensäure-Monohydrat ( $C_6H_8O_7 \times H_2O$ ) in 1000 ml Aqua dest. lösen. Lagerung bei 4 °C. Stammlösung B (0,1 M): 29,41 g Natriumcitrat-Dihydrat ( $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ ) in 1000 ml Aqua dest. lösen. Lagerung bei 4 °C.

Gebrauchsverdünnung: 18 ml Stammlösung A und 82 ml Stammlösung B zu 900 ml Aqua dest. hinzugeben; pH 6,0 einstellen.

#### **Eosin-Färbelösung (1%)**

10 g Eosin G (gelblich) in 1000 ml Aqua dest. lösen.

#### **Kernechtrot-Färbelösung**

Kernechtrot	0,1 g
$Al_2O_{12}S_3 \times 16H_2O$ (5 %)	100 ml

Aluminiumsulfat aufkochen, von der Platte nehmen; Kernechtrot hinzufügen; nach dem Erkalten filtrieren.

#### **Lysispuffer (für DNS-Isolation; 500 ml)**

Tris (2 M, pH 8,5)	25 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	5 ml
NaCl (5 M-Lösung)	20 ml
Natriumdodecylsulfat (10 %)	10 ml
Aqua dest.	440 ml

#### **NBT/BCIP Substratpuffer**

Tris	12,11 g
NaCl	5,84 g
$MgCl_2 \times 6H_2O$	10,17 g

Auf 900 ml mit Aqua dest. auffüllen; pH 9,5 mit 6 N HCl einstellen; auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.

#### **Paraformaldehyd (PFA, 4 %)**

80 g Paraformaldehyd zu 1800 ml PBS (1x) geben; 4 ml 4 N NaOH hinzugeben und auf 40 °C erwärmen, bis die Lösung klar wird; Lösung abkühlen lassen und pH 7,4 mit 6 N HCl einstellen; Filtrierung und Lagerung bei -20 °C.

#### **PBS (10x Stammlösung, 2000 ml)**

NaCl	160 g
KCl	4 g
$Na_2HPO_4 \times 7H_2O$	54 g
$KH_2PO_4$	4,8 g

Auf 1900 ml mit Aqua dest. auffüllen; pH 7,4 einstellen; auf 2000 ml mit Aqua dest. auffüllen; zur Herstellung der Gebrauchslösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen und pH neu einstellen (PBS 1x).

**RNS-Puffer (Angabe pro Gewebeprobe)**

RLT-Puffer (aus "RNeasy Mini Kit", Firma Qiagen, Hilden)	600 µl
β-Mercaptoethanol	6 µl

**TAE-Puffer (50x, 1000 ml)**

Tris	242 g
Essigsäure (100 %)	57,1 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml

Auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen; zur Herstellung der Gebrauchslösung 1:50 mit Aqua dest. verdünnen.

**TBS (10x Stammlösung, 2000 ml)**

NaCl	170 g
Tris	121 g

Auf 1900 ml mit Aqua dest. auffüllen; pH 7,5 mit 6 N HCl einstellen; auf 2000 ml mit Aqua dest. auffüllen; zur Herstellung der Gebrauchslösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen und ggf. pH neu einstellen (TBS 1x); zur Herstellung von TBST (1x, 0,1%) Tween 20 1:1000 mit TBS 1x verdünnen und mischen.

### 2.1.5 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Herkunft</b>
Anti-Bromdesoxyuridin (BrdU; BU1/75 [ICR1]), monoklonaler Antikörper (Ratte; Lot: 459561)	Abcam plc, Cambridge, UK
Anti-Caspase-3 (aktiv/gespalten), polyklonaler Antikörper (Kaninchen; Ref: 02/2008, Lot: 21)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-Caspase-8 (aktiv/gespalten), polyklonaler Antikörper (Kaninchen; Lot: AR17-061206-05)	Imgenex, San Diego, Kalifornien, USA
Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragmente (Schaf; Lot: 12930026)	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-Digoxigenin-Rhodamin, Fab Fragmente (Schaf; Lot: 14497600)	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-Kaninchen IgG (H+L), Alexa Fluor® 488, Sekundärantikörper (Ziege; Lot: 45601A)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Anti-Maus IgG (H+L), Alexa Fluor® 555, Sekundärantikörper (Ziege; Lot: 49701A)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
<i>Anti-Neuronal-Nuclei (NeuN)</i> , monoklonaler Antikörper (Maus; Lot: LV1519148)	Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Anti-Ratte IgG (H+L), biotinyliert, Sekundärantikörper (Kaninchen; Lot: R1121)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA

### 2.1.6 Oligonukleotide

Es wurden die folgenden Primer der Firma Metabion (Martinsried) zur Genotypisierung bzw. für Expressionsanalysen verwendet:

#### **Genotypisierung von Versuchstieren: *Faim2*-Wildtyp (*Faim2*<sup>+/+</sup>) sowie *-Nullmutante* (*Faim2*<sup>-/-</sup>)**

Wildtyp: Fwd 5'-GGCACAGACATTGAGCAGAA-3'

Wildtyp: Rev 5'-CGGATGTGCAATCTGATGAC-3'

Nullmutante: Fwd 5'-TGAAAACCACACTGCTCGAA-3'

Nullmutante: Rev 5'-GGGGTCAAGGTACCAGCTCT-3'

#### **Realtime-PCR: *Fas/CD95*-Expression**

Fwd 5'-CTGCGATGAAGAGCATGGTTT-3'

Rev 5'-CCATAGGCGATTTCTGGGAC-3'

#### **Realtime-PCR: *Faim2*-Expression**

Fwd 5'-AGAAGACATCATGACCCAGGG-3'

Rev 5'-CTTTCTGGTCATCCCAGCTG-3'

#### **Realtime-PCR: *GAPDH*-Expression**

Fwd 5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC-3'

Rev 5'-AAGATGGTGATGGGCTTCCCG-3'

### 2.1.7 Versuchstiere

Homozygote *Faim2*-Wildtyp- und Nullmutanten-Mäuse (Wurfgeschwister) (Reich et al. 2011).

### 2.1.8 Computersoftware

<b>Software</b>	<b>Herkunft</b>
Bio-Capt (Version 12.5)	Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich
Endnote X2	Thomson Reuters, New York City, New York, USA
GraphPad Prism (Version 5.00)	GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornien, USA
Leica Application Suite (Version 2.8.1)	Leica Microsystems, Wetzlar
Microsoft Office Word, Excel, Powerpoint 2007	Microsoft, Redmond, Washington, USA
MxPro – Mx3000P (Version 3.00)	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
NanoDrop ND-1000 (Version 3.5.2)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Photoshop CS (Version 8.0.1)	Adobe Systems, San Jose, Kalifornien, USA
Statistica (Version 10)	StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA
Stereo Investigator (Version 7.00)	MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA
TSE VideoMot 2 (Version 5.72)	TSE Systems GmbH, Bad Homburg

## **2.2 Methoden**

### ***2.2.1 Erzeugung, Manipulation und Analyse von Versuchstieren***

#### **2.2.1.1 Genehmigung des Tierversuchsvorhabens**

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen sind vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt worden (Aktenzeichen 33.11.42502-04-050/08). Vom Autor der vorliegenden Arbeit wurde in diesem Zusammenhang zudem das Praktikum und Seminar „Versuchstiere/Tierversuche/Alternativmethoden“ an der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Medizinischen Fakultät an der Universität Göttingen absolviert.

#### **2.2.1.2 Erzeugung der Versuchstiere**

Für die vorliegende Arbeit wurden homozygote Faim2-Wildtyp- und Nullmutanten-Mäuse (Wurfgeschwister) verwendet. Dieses Mausmodell wurde mithilfe eines Cre/LoxP-vermittelten Rekombinationssystems in der Abteilung von Prof. Schulz in Kooperation mit dem hiesigen Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin (Prof. Nave, Abteilung für Neurogenetik) zuvor generiert und beschrieben (Reich et al. 2011). Die Mäuse wurden über mehrere Generationen auf die Linie C57/B6 zurückgekreuzt. Für die Akutphase der Meningitis (ohne Überlebensversuch) wurden Versuchstiere beider Geschlechter, für den Überlebensversuch der akuten meningitischen Phase ausschließlich weibliche und für die postmeningitische Phase ausschließlich männliche Mäuse verwendet. Der Genotyp der Tiere wurde zuvor durch Polymerasekettenreaktion (PCR) auf aus Schwanzspitzenbiopsien gewonnener genomischer DNS jeweils ermittelt.

#### **2.2.1.3 Tierhaltung**

Die Tierhaltung erfolgte artgerecht unter standardisierten Bedingungen und kontrollierter Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit in den Tierställen der Abteilung für Neurodegeneration und Neurorestaurationsforschung (Waldweg 33, 37073 Göttingen). Die Mäuse wurden in Gruppen von 1 bis zu 6 Tieren in Käfigen des Typs 1284L (Tecniplast; 365 x 207 x 140 mm [L x B x H]; Grundfläche 530 cm<sup>2</sup>) gehalten, wobei einmal pro Woche eine Umsetzung erfolgte. Die Haltung erfolgte auf Weichholzgranulateinstreu unter Bereitstellung von Futter (pelletierte Standarddiät; Ssniff R/M-H V1534-000) und Leitungswasser aus Tränkeflaschen *ad libitum*. Die Mäuse wurden auf einen inversen Tag-Nacht-Rhythmus mit Raumbeleuchtung von 21.30h MEZ bis 09.30h MEZ eingestellt. Die Identifikation der einzelnen Tiere erfolgte durch ein Ohrlochmarkierungssystem. Auf an den einzelnen Tierkäfigen außen befestigten Identifikationskarten waren jeweils für alle Tiere Zuchtlinie, Genotyp, Tiernummern, Geschlecht, Geburtsdatum, Tiernummern der Elterntiere und Angaben über die Nutzer und das genehmigte Tierversuchsvorhaben vermerkt.

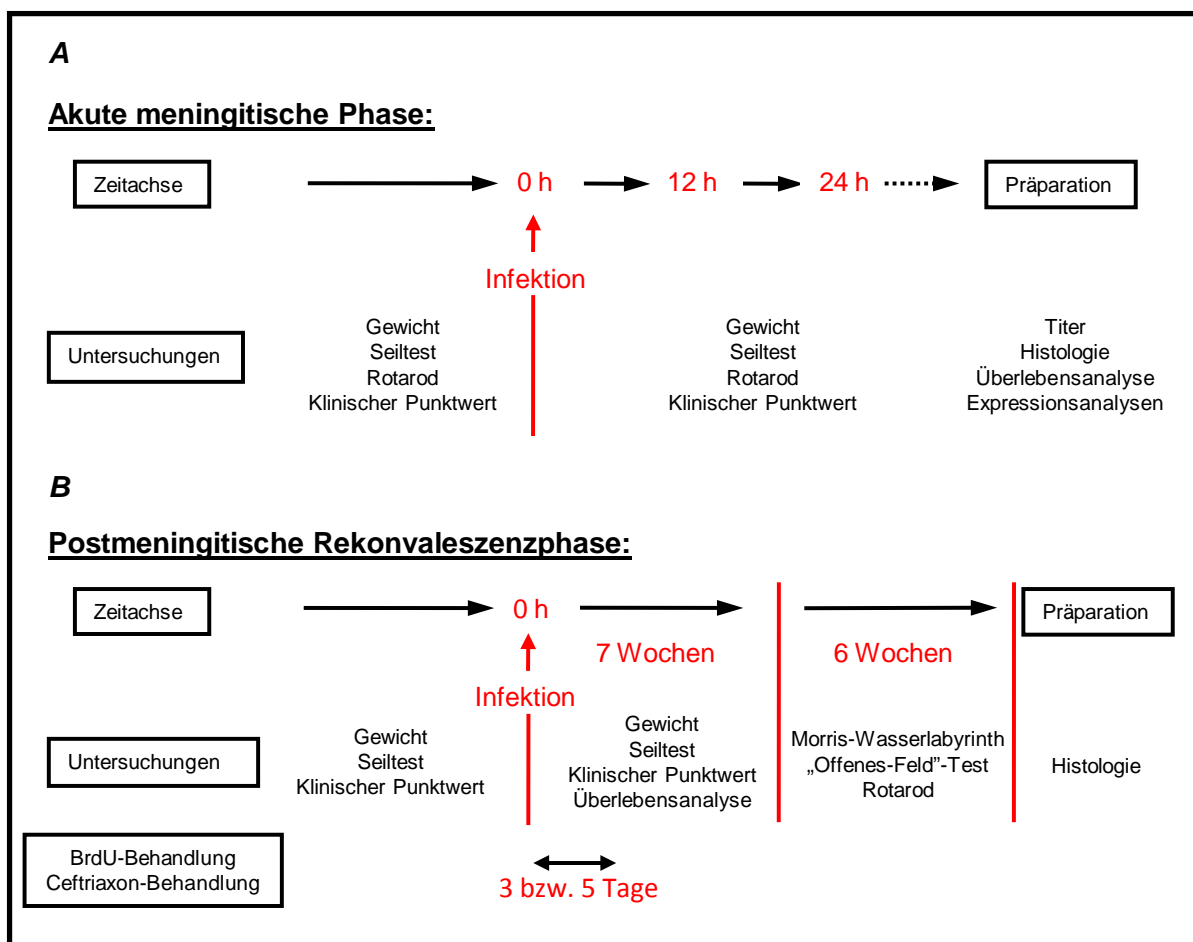
### 2.2.1.4 Infektion der Versuchstiere mit *Streptococcus pneumoniae* Typ 3

Für die vorliegende Arbeit wurde ein bekanntes Meningitis-Mausmodell angewandt (Gerber et al. 2001). Es erfolgten Analysen in der akuten meningitischen Phase sowie in einer postmeningitischen Rekonvaleszenzphase (Abbildung 4). Das für die Infektion verwendete und den *Streptococcus pneumoniae*-Typ-3-Stamm (*S. pneumoniae*, SP3) enthaltende Inokulum wurde zunächst zwecks Bestimmung der Konzentration an koloniebildenden Einheiten (KBE; engl., *colony forming units* [CFU]) pro ml in NaCl-Lösung (0,9 %) 1:1000 verdünnt und anschließend einer weiteren achtfachen Verdünnungsreihe (1:10) unterzogen. Von den acht Verdünnungsstufen wurden jeweils 10 µl auf einer Blutagarplatte aufgetragen, Letztere dann für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend abgelesen (Abbildung 5). Nach Bestimmung der Kolonien-Anzahl pro Verdünnungsstufe konnte dann die KBE-Konzentration pro Milliliter der jeweiligen Verdünnungsstufe nach der Formel

$$\frac{KBE}{ml} = \text{Anzahl der Kolonien} \times \frac{\text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Aufgetragenes Volumen [ml]}}$$

berechnet werden (Tabelle 1).

Vor der intrazerebralen Inokulation wurde zunächst eine Narkotisierung der Mäuse durch eine



**Abbildung 4: Die akute meningitische Phase (A) und postmeningitische Rekonvaleszenzphase (B) in der Übersicht**



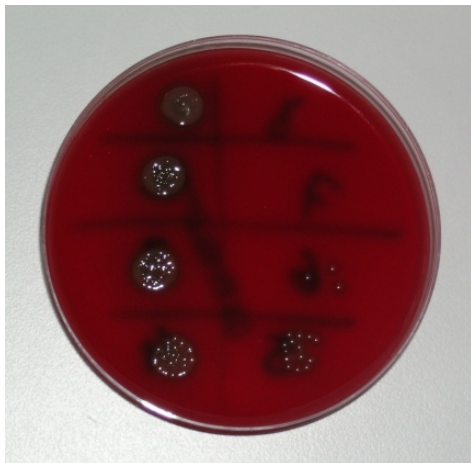
kombinierte intraperitoneale Injektion von Ketamin (100 mg/kg KG i.p.) und Xylazin (20 mg/kg KG i.p.) durchgeführt. Zur Bestimmung einer ausreichenden Narkosetiefe wurde auf erloschene Reflexe nach Einkneifen von Vorderpfoten bzw. Hinterpfoten überprüft. Anschließend erfolgte die intrazerebrale Injektion von 10 µl NaCl-Lösung (0,9 %) mit 10<sup>4</sup> KBE von *S. pneumoniae* über einen direkten Durchstoß durch die Schädeldecke rechts frontoparietal mittels Einsatz einer Spritze (1 ml) mit einer 27G-Nadel unter Verwendung eines Stopps bei 2 mm. Postoperativ wurden die Tiere mit Augensalbe (Bepanthen) und Schmerzmedikation (Buprenorphin; 0,1 mg/kg KG s.c.) versorgt.

Versuchstiere der meningitischen Phase wurden 24 Stunden nach Infektionsbeginn getötet und zwecks Durchführung von Expressions- sowie histologischen Analysen präpariert. Für die postmeningitische Phase vorgesehene Versuchstiere wurden zusätzlich beginnend 17 Stunden nach Infektionsbeginn und anschließend im zwölfstündigen Abstand bis einschließlich zum fünften Tag nach Infektion antibiotisch mit Ceftriaxon (100 mg/kg KG s.c.) sowie vom dritten bis zum fünften Tag zusätzlich zweimal täglich mit 5-Bromo-2-Deoxyuridin (BrdU) (50 mg/kg KG i.p.) behandelt. Zur klinischen Verlaufskontrolle wurde ein klinisches Punktesystem, der Seilttest und der Rotarod-Test verwendet (s. unten) sowie der Gewichtsverlust dokumentiert (Abbildung 4). Der Zeitpunkt dieser Phänotypenanalysen lag jeweils einmalig vor Beginn der Inokulation sowie für die Akutphase jeweils 12 und 24 Stunden nach Inokulation und für die postmeningitische Phase zweimal täglich während der ersten fünf Tage nach der Inokulation und anschließend einmal wöchentlich bis einschließlich zur 7. Woche. Postmeningitisch wurde zudem eine Überlebensanalyse während der ersten 7 Wochen nach der Inokulation sowie weitere Phänotypenanalysen in Form von Morris-Wasserlabyrinth-, „Offenes-Feld“- und Rotarod-Untersuchungen (s. unten) für die darauffolgenden drei Wochen durchgeführt. Die Tiere der Rekonvaleszenzphase wurden anschließend getötet und zwecks histologischer Analysen präpariert. Sämtliche im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Phänotypenanalysen fanden tagsüber und unter Verblindung des immer gleichen Untersuchers statt.

#### **2.2.1.5 Tötung und Präparation von Versuchstieren**

Zur Probenentnahme von Gewebe für histologische und RNS-Analysen sowie für die Titerbestimmung auf *S. pneumoniae* wurden die Versuchstiere mittels zervikaler Dislokation und anschließender Dekapitation getötet. Es folgte die Abpräparation von Kopffell und Schädeldecke und die Entnahme des gesamten Hirns. Für die Titerbestimmung wurden zusätzlich die Milz sowie eine Blutprobe (10 µl) entnommen. Nach Abspülung des Hirns mit NaCl-Lösung (0,9 %) wurden das Kleinhirn sowie die Hemisphären getrennt und anschließend die linke Hemisphäre für histologische Analysen in PFA-Lösung (4 %) für 24 Stunden fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet (s. unten). Das Kleinhirn sowie die Milz wurden zwecks Titerbestimmung jeweils in NaCl-Lösung homogenisiert. Die Blutprobe wurde 1:10 in NaCl-Lösung verdünnt. Es folgte dann eine weitere siebenfache Verdünnung (1:10) der Blutprobe bzw. eine achtfache Verdünnung des Kleinhirn- respektive Milzhomogenisats in NaCl-Lösung und Auftragung von 10 µl sämtlicher acht

Verdünnungen von Blut, Kleinhirn und Milz auf Blutagarplatten, welche für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend abgelesen wurden (Abbildung 5). Die für RNS-Analysen zu gewinnende Hippokampusformation wurde aus der rechten Hemisphäre herauspräpariert, in mit RNS-Puffer und Keramik-Kügelchen vorgefüllte Homogenisatorröhrchen überführt und sofort in einem mit Flüssigstickstoff befüllten Behältnis schockgefroren. Die langfristige Lagerung bis zur weiteren Aufarbeitung erfolgte bei -80 °C.

**A****B**

Feld	Titerberechnung (KBE/ml)	
	Anzahl der Kolonien x	
	Inokulum	Blut, Kleinhirn, Milz
1	$10^6$	$10^3$
2	$10^7$	$10^4$
3	$10^8$	$10^5$
4	$10^9$	$10^6$
5	$10^{10}$	$10^7$
6	$10^{11}$	$10^8$
7	$10^{12}$	$10^9$
8	$10^{13}$	$10^{10}$

#### Abbildung 5 (A) und Tabelle 1 (B): Titerbestimmung

(A) Beispiel einer in acht Verdünnungsabschnitte unterteilten Blutagarplatte, auf welcher jeweils die Anzahl der Kolonien (koloniebildende Einheiten, KBE) abgelesen werden können. Das Feld links oben entspricht der ersten Verdünnungsstufe (= Feld Nr. 1), die weiteren Verdünnungsstufen folgen dem Uhrzeigersinn entgegengesetzt (= Felder 2 bis 8).

(B) Berechnung der Kolonienkonzentration (KBE/ml). Das Inokulum wurde initial 1:1000 und anschließend achtmal weiterverdünnt (1:10). Von diesen acht Verdünnungen sowie von den 8 Verdünnungen (1:10) von Blut, Kleinhirn und Milz wurden jeweils 10 µl auf den einzelnen Feldern der Blutagarplatte aufgetragen.

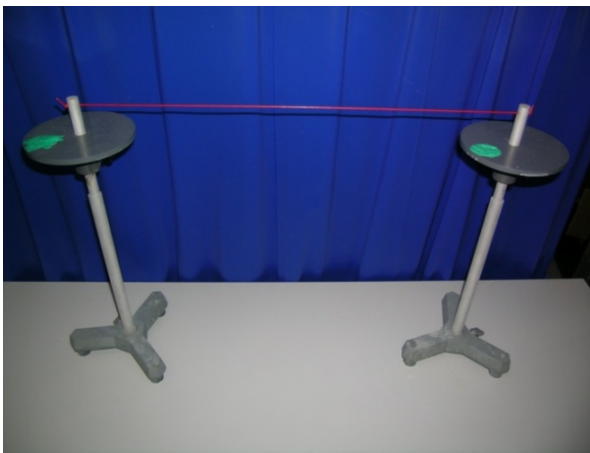
#### 2.2.1.6 Klinische Beurteilung der Versuchstiere

Um den Krankheitsverlauf zu dokumentieren, wurden Phänotypanalysen durchgeführt. Der allgemeine Zustand der Tiere wurde mit einem klinischen Punktesystem beurteilt (Tabelle 2). Jedes Versuchstier wurde in Hinblick auf eine motorische Beeinträchtigung und Lethargie untersucht und anschließend mit einem Punktwert auf einer Skala von 0 (Niveau unbehandelt) bis 4 (verstorben) beurteilt.

Punktwert	Klinischer Phänotyp
0	Gesund, unauffällig (ohne motorische Beeinträchtigung)
1	Geringfügig lethargisch
2	Mäßig lethargisch, jedoch gehfähig
3	Stark lethargisch, unfähig zu gehen
4	verstorben

Tabelle 2: Kriterien des klinischen Punktesystems

Zur Untersuchung der motorischen Leistungsfähigkeit wurde zusätzlich ein Seiltest angewandt (Miquel und Blasco 1978; Wellmer et al. 2000). Die Seiltestanordnung bestand aus zwei separaten Plattformen (Durchmesser: 15 cm; Höhe: 45 cm), welche mit einem straff gespannten Seil (Länge: 60 cm; Höhe: 50 cm; Dicke: 2 mm) miteinander verbunden waren (Abbildung 6). Die Versuchstiere wurden in der Mitte des Seiles mit ihren Vorder- und Hinterpfoten auf dem Seil abgesetzt und in Rückenlage gebracht. Anschließend wurde dokumentiert, ob und in welcher Zeit die Mäuse eine der beiden Plattformen sicher erreichen konnten und das Ergebnis in einen Punktwert (0 bis 20 Punktwerte) umgerechnet (Tabelle 3). Dabei korrelierte ein niedriger Punktwert mit einer besseren Leistung der Versuchstiere. Der Apparat wurde zum Schutz der Tiere ein weich gepolstertes Auffangbehältnis untergestellt.

**A****B**

**Abbildung 6: Die Seiltest-Versuchsanlage**

Plattform wurde erreicht		Plattform wurde nicht erreicht	
Zeit (s)	Punktwert	Zeit (s)	Punktwert
0 bis 5	0	54 bis 60	11
6 bis 12	1	48 bis 53	12
13 bis 18	2	42 bis 47	13
19 bis 24	3	36 bis 41	14
25 bis 30	4	30 bis 35	15
31 bis 36	5	24 bis 29	16
37 bis 42	6	18 bis 23	17
43 bis 48	7	12 bis 17	18
49 bis 54	8	6 bis 11	19
55 bis 60	9	0 bis 5	20
> 60	10		

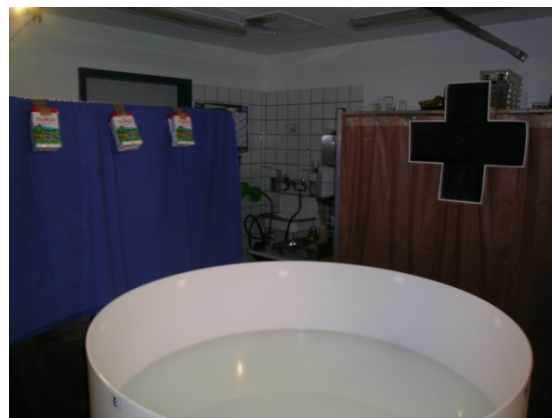
**Tabelle 3: Kriterien der Seiltestuntersuchung**

Der erreichbare Punktwert hängt ab vom grundsätzlichen Erreichen einer Plattform sowie von der dafür benötigten Zeit.

### 2.2.1.7 Beurteilung der Gedächtnisleistung im Morris-Wasserlabyrinth

Die Gedächtnisleistung der Versuchstiere in der postmeningitischen Phase wurde sieben Wochen nach der Inokulation mit *S. pneumoniae* im sogenannten Morris-Wasserlabyrinth (engl., *Morris water maze*, MWM) untersucht. Dieser Test korreliert mit dem räumlichen Lernvermögen, hippokampaler synaptischer Plastizität und NMDA-Rezeptor-Funktion und wurde von Richard Morris erstmalig beschrieben (Morris 1981; Morris 1984). Das Grundprinzip dieses Paradigmas besteht darin, dass die Versuchstiere in ein mit erwärmtem Leitungswasser (20-22 °C) gefüllten Schwimmbecken aus Kunststoff (weiß, Durchmesser: 120 cm, Höhe: 60 cm) gebracht werden und anschließend sich anhand von räumlich fixen Hinweismarkierungen (engl., *cues*) orientierend und von verschiedenen Startpositionen beginnend eine verborgene Plattform (1 cm unterhalb der Wasseroberfläche) auffinden sollen (Abbildung 7).

**A**



**B**



#### Abbildung 7: Die Morris-Wasserlabyrinth-Versuchsanlage

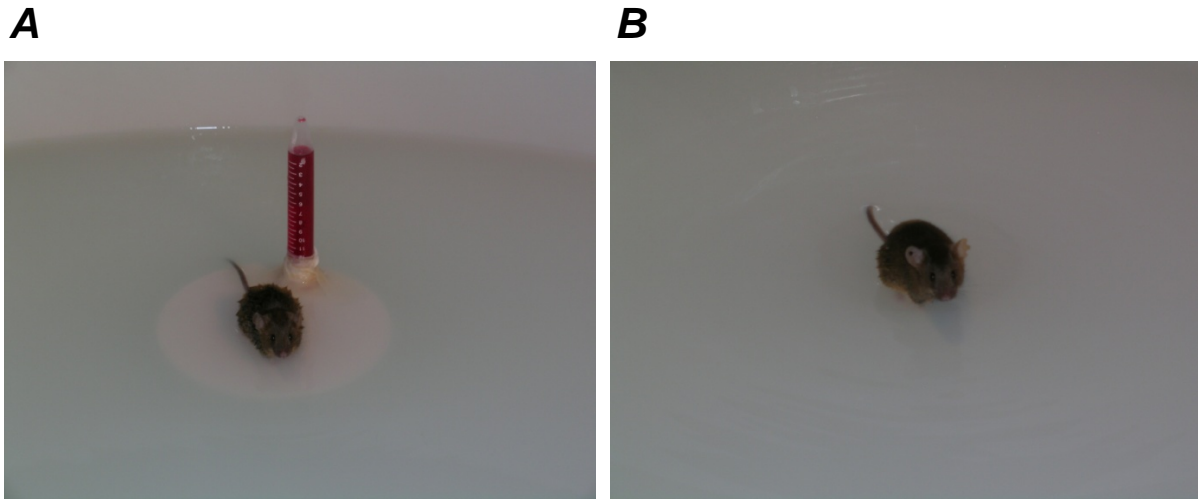
(A) Dargestellt ist eine für das Morris-Wasserlabyrinth vorgesehene Versuchsanlage. Das Schwimmbecken enthält mit Vollmilch eingefärbtes und erwärmtes Leitungswasser. Um das Becken herum sind Gestelle mit verschiedenfarbigen Vorhängen und darauf befestigten Hinweismarkierungen positioniert.

(B) Darstellung der um das Schwimmbecken herum angebrachten Hinweismarkierungen. Die Objekte sind verschiedenfarbig und –förmig. Von links nach rechts: grünes Dreieck, kreisrunde gelbe Objekte, schwarzes Kreuz, mehrfarbiges Viereck.

Das Wasser wurde zuvor mit Vollmilch eingefärbt, so dass die Lokalisation der Zielplattform nicht direkt ersichtlich war, sondern jeweils erinnert werden musste. Definierte Hinweismarkierungen waren um das Schwimmbecken herum an Vorhängen zuvor angebracht worden und wurden im Verlauf des Experiments nicht in ihren Positionen geändert (Abbildung 7 A). Sie waren jeweils durch ein charakteristisches Form- und Farbmuster definiert (Abbildung 7 B). Da alle übrigen im Raum vorhandenen und aus dem Schwimmbecken heraus sichtbaren Gegenstände prinzipiell als Hinweismarkierung fungieren konnten, wurden sie in ihrer ursprünglichen Position bei Versuchsbeginn belassen.

Die Versuchstiere wurden mithilfe einer Kunststoffschachtel am Beckenrand der protokollarisch festgelegten Startposition ins Wasser herabgelassen. Die Messung wurde mit einer Fernbedienung gestartet und endete automatisch entweder beim Betreten der Plattform und einer Verweildauer von mindestens 2 Sekunden oder nach Ablauf von 120 Sekunden. Der Untersucher befand sich bei den einzelnen Messungen hinter den Vorhängen, um selber nicht als potentielle Hinweismarkierung in Erscheinung zu treten. Über eine an der Raumdecke befestigte Videokamera und ein Datenaufzeichnungssystem (VideoMot2, TSE Systems GmbH) wurden die Schwimmbewegungen der Versuchstiere jeder einzelnen Messung registriert und konnten anschließend auf verschiedene Parameter hin (Latenzzeit zum Erreichen der versteckten Plattform, Schwimmgeschwindigkeit in cm/s, prozentualer Aufenthalt pro Quadrant) analysiert werden. Nach Beendigung der jeweiligen Messungen wurde das Versuchstier für 15 Sekunden auf der Plattform belassen (bzw. bei Nichterreichen der Plattform zunächst auf die Plattform gesetzt) und nachfolgend mittels einer Kelle in den Tierkäfig zurückgesetzt. Es wurden, mit Ausnahme der Prüfmessungen am letzten Tag der Akquisitions- bzw. Umlernphase (s.u.), grundsätzlich 4 Messungen pro Tag und Versuchstier durchgeführt und anschließend gemittelt, wobei die gesamte Versuchskohorte im Rahmen eines Messdurchgangs sequentiell getestet wurde.

Das verwendete Versuchsprotokoll orientierte sich an den Empfehlungen von Charles Vorhees und Michael Williams (Vorhees und Williams 2006). Das gesamte Morris-Wasserlabyrinth-Experiment bestand aus drei Abschnitten, einem vorgeschalteten Kontrolltraining mit sichtbarer Plattform (engl., *cued learning*) sowie der Akquisitions- (engl., *spatial acquisition*) und Umlernphase (engl., *spatial reversal*) mit jeweils unsichtbarer Plattform. Das Kontrolltraining bestand aus 4 Messtagen und diente der grundsätzlichen Überprüfung der für eine Teilnahme an dem Versuch notwendigen basalen Fähigkeiten wie intaktes Sehvermögen, Schwimmfähigkeit und Kraft. Hierbei wurde die Zielplattform (Höhe: 30 cm; Durchmesser: 14 cm) mit einer mit roter Flüssigkeit gefüllten Plastikröhre versehen, wodurch die Lokalisation der Plattform von jeder Stelle im Schwimmbecken deutlich erkennbar wurde (Abbildung 8 A). Nicht schwimmfähige Versuchstiere wurden zum Zeitpunkt des Kontrolltrainings aus dieser und allen nachfolgenden Versuchsreihen (Akquisitions- und Umlernphase des MWM, „Offenes-Feld“-Test, Rotarod-Test, Neurogenese-Untersuchungen; s.u.) ausgeschlossen.



**Abbildung 8: Zielplattformen im Morris-Wasserlabyrinth**

(A) Die für das Kontrolltraining vorgesehene Plattform ist mit einer mit roter Flüssigkeit gefüllten Plastikröhre markiert. (B) Die Plattform für die Akquisitions- und Umlernphase ist nicht markiert und kann daher nicht durch direkten Sichtkontakt gefunden werden.

Während der Kontrolltraining-Messungen wurde das Schwimmbecken mit an Gestellen befestigten blauen Vorhängen umhüllt, so dass keine räumlichen Hinweismarkierungen zur Orientierung genutzt werden konnten. Um die Notwendigkeit des Benutzens der roten Markierung zu betonen, wurde sowohl die Startposition als auch die Zielposition der markierten Plattform für jeden Messdurchgang verändert (Tabelle 4). Start- und Zielpositionen wurden hierbei sowie für alle übrigen Abschnitte des MWM-Experiments nach den Himmelsrichtungen bezeichnet.

Tag	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4
1	N-SO	O-NO	S-SW	W-SO
2	S-NO	N-NW	W-NO	O-SO
3	W-NW	S-SO	O-SW	N-SW
4	O-NO	W-NO	N-SW	S-SW

**Tabelle 4: Protokoll für das Kontrolltraining (sichtbare Plattform)**

Es wurden an 4 Tagen Messungen durchgeführt. Angegeben sind jeweils Start- und Zielpositionen, welche nach jeder einzelnen Messung verändert wurden (N=Norden, S=Süden, W=Westen, O=Osten, NW=Nordwesten, SW= Südwesten, SO=Südosten, NO=Nordosten).

Die Akquisitions- und Umlernphase des MWM erstreckte sich jeweils auf sieben Tage und diente der Stimulierung eines räumlichen Lernprozesses und dessen Überprüfung am letzten Tag. Es wurde hierbei eine nicht markierte und kleinere Plattform (Höhe: 30 cm; Durchmesser: 10 cm) verwendet (Abbildung 8 B) sowie die Gestelle mit den Vorhängen einen Meter vom Schwimmbecken entfernt und zusätzlich mit den räumlichen Hinweismarkierungen versehen (Abbildung 7 B). Für beide Lernphasen wurde die Lokalisation der Startposition, nicht jedoch der Zielposition der versteckten Plattform, für jede einzelne Messung nach einem festgelegten Protokoll geändert (Tabelle 5). Zudem

wurden für beide Lernphasen unterschiedliche Zielpositionen der versteckten Plattform verwendet, welche für die Akquisitionsphase im südwestlichen und für die Umlernphase im nordöstlichen Quadranten platziert wurde. Somit sollte die Umlernphase Lernflexibilität nach einer bereits erfolgten Trainingsphase überprüfen.

Tag	Akquisitionsphase (Ziel: SW)				Umlernphase (Ziel: NO)			
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4
1	N	O	SO	NW	S	W	NW	SO
2	SO	N	NW	O	NW	S	SO	W
3	NW	SO	O	N	SO	NW	W	S
4	O	NW	N	SO	W	SO	S	NW
5	N	SO	O	NW	S	NW	W	SO
6	SO	NW	N	O	NW	SO	S	W
7	NO				SW			

**Tabelle 5: Protokoll für die Akquisitions- und Umlernphase (unsichtbare Plattform)**

Es wurden an 7 Tagen Messungen durchgeführt. Angegeben sind jeweils die Startpositionen, welche nach jeder einzelnen Messung verändert wurden. Am 7. Tag fand jeweils der Transfertest statt (s. Text). Abk.: s. Tabelle 4.

Während der ersten 6 Tage wurden regulär 4 Messungen pro Tag und Versuchstier durchgeführt. Am 7. Tag fand jeweils eine einzelne Prüfmessung (Transfertest; engl., *probe trial*) statt, in welcher die Zielplattform entfernt und eine pauschale einminütige Messung durchgeführt wurde. Hierbei wurde der prozentuale Aufenthalt pro Quadrant bestimmt und somit überprüft, ob von den Versuchstieren eine Präferenz für den Zielquadranten mit der versteckten Plattform entwickelt wurde und daher eine räumliche Gedächtniskonsolidierung stattgefunden hat.

### 2.2.1.8 Beurteilung der Versuchstiere mit dem „Offenes-Feld“-Test

Mit der „Offenes-Feld“-Untersuchung (engl., *open field test*, OFT) kann das allgemeine Aktivitätsniveau, lokomotorische Aktivität und Explorationsverhalten untersucht und beurteilt werden. Für diesen Zweck wurden jeweils 4 Versuchstiere in 4 viereckige Behältnisse (50 x 50 x 30 cm; [L x B x H]) gebracht (1 Versuchstier pro Behältnis) und anschließend die Behältnisse mit an Gestellen befestigten gleichfarbigen Vorhängen umhüllt (Abbildung 9). Über eine an der Raumdecke befestigte Videokamera und ein Datenaufzeichnungssystem (VideoMot2, TSE Systems GmbH) wurden die Bewegungen der Versuchstiere während einer einstündigen Messung registriert und konnten anschließend auf verschiedene Parameter hin (Gesamtlaufstrecke, Aufstellbewegungen, Raumverteilung) analysiert werden. Aufstellbewegungen der Versuchstiere, d.h. das Aufrichten auf den Hinterpfoten, wurden mittels eines in die einzelnen Behältnisse implementierten Infrarotsystems registriert. Zur Untersuchung der Raumverteilung wurde der prozentuale Anteil der im Zentrum des Untersuchungsfeldes gemessenen Laufstrecke an der Gesamtstrecke ermittelt.



**A****B**

**Abbildung 9: Die „Offenes-Feld“-Versuchsanlage**

Es wurden vier einstündige Messungen parallel durchgeführt (1 Versuchstier pro Behälter). Die Anlage wurde mit Vorhängen umhüllt.

### 2.2.1.9 Beurteilung der Versuchstiere mit dem Rotarod-Test

Für die Untersuchung der Koordinationsfähigkeit und Ausdauer wurde der Rotarod-Test verwendet (Jones und Roberts 1968). Hierbei wurden die Versuchstiere auf eine sich beschleunigende, rotierende Walze (47600-Maus-Rota-Rod, Ugo Basile) gesetzt und die Zeit gemessen, welche die Versuchstiere durch aktives Mitlaufen auf der Walze verbleiben konnten (Abbildung 10). Es wurde zunächst zweimal ein dreiminütiger Trainingslauf durchgeführt, bei welcher die Rotationsgeschwindigkeit konstant bei 10 Umdrehungen pro Minute (engl., *rounds per minute*, rpm) gehalten wurde und herunterfallende Versuchstiere wieder auf das Laufrad gesetzt wurden. Für den eigentlichen Testlauf wurde eine Beschleunigung von 10 rpm auf 40 rpm innerhalb eines Zeitraums von drei Minuten definiert und nach drei Minuten bei 40 rpm gehalten. Die Messungen wurden auf 3 Minuten für die akute bzw. 10 Minuten für die postmeningitische Phase zeitlich begrenzt und herunterfallenden Versuchstieren für den jeweiligen Testlauf kein erneuter Versuch gestattet. Es wurden insgesamt ein Testlauf in der meningitischen bzw. drei Testläufe in der postmeningitischen Phase durchgeführt und bei Letzterem die jeweiligen auf dem Laufrad verbrachten Zeiten pro Versuchstier gemittelt. Die beiden Trainingsläufe fanden an zwei separaten Tagen und der einzelne bzw. die drei Testläufe an einem weiteren separaten Tag statt. Zwischen den drei Testläufen wurde jeweils eine zweistündige Erholungspause eingeplant.



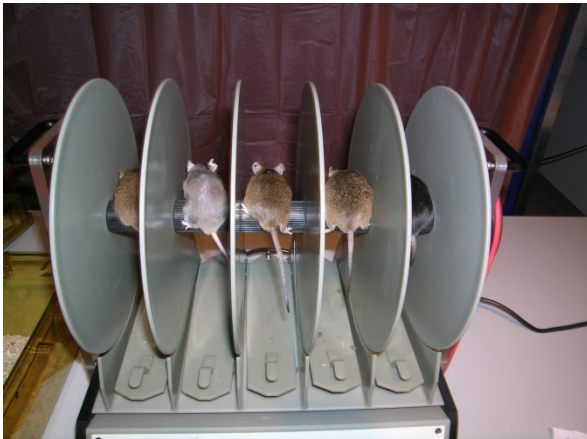
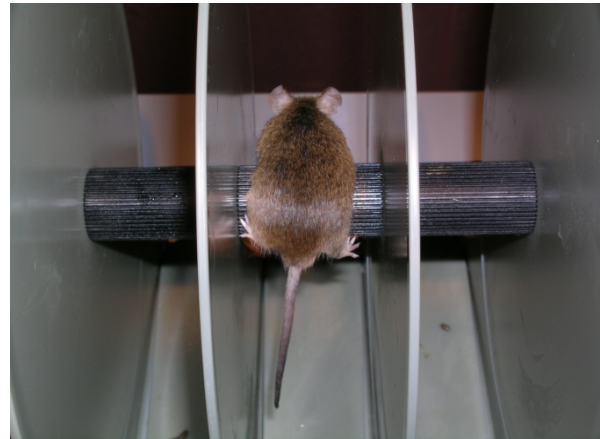
**A****B**

Abbildung 10: Die Rotarod-Versuchsanlage

## 2.2.2 *Histologische Methoden*

### 2.2.2.1 **Fixation und Herstellung der histologischen Schnitte**

Das für die Histologie vorgesehene Hirngewebe (linke Hemisphäre) wurde für 24 Stunden in vierprozentiger Paraformaldehydlösung fixiert, mit Hilfe eines Gewebeeinfiltrationsautomaten paraffiniert und anschließend an einer Paraffinausgießstation in Paraffinblöcke eingegossen. Von den Paraffinblöcken wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, in einem Wasserbad bei 50 °C geglättet, auf Objektträgern aufgezogen und anschließend in einem Ofen oder auf einer Heizplatte bei 37 °C getrocknet.

### 2.2.2.2 **Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) färbt Chromatin in den Zellkernen blau (Hämatoxylin) und das Zytoplasma rot (Eosin). Zunächst erfolgte eine Entparaffinierung der Schnitte, indem Letztere sequentiell dreimal in Xylol für 10 min und anschließend für 3 min zweimal in 100 % und jeweils einmal in 96 %, 70 % sowie 50 % Ethanol und zweimal für 5 min in Aqua dest. rehydriert wurden. Nach jeweils zehnmütiger Färbung in Hämalaunlösung und anschließender fließender Wässerung („Bläuing“) wurden die Schnitte in Eosinlösung (1%) für 5 min gefärbt, anschließend kurz in Aqua dest. gespült und nachfolgend in einer aufsteigenden Reihe (jeweils 4 mal Eintauchen in 50 %, 70 %, 96 % Ethanol; 5 min in 100 % Ethanol; 2 mal 10 min Xylol) dehydriert und mit Entellan eingedeckelt.

### 2.2.2.3 **Darstellung der meningealen Entzündung in der H.E.-Färbung**

Das Ausmaß an meningealer Entzündung wurde anhand H.E.-gefärbter Hirnschnitte mikroskopisch überprüft. Dafür wurde in einem Gesichtsfeld bei 40-facher Vergrößerung die Anzahl der

Granulozyten in 4 Regionen (frontale interhemisphärische Region, hippocampale Fissur, 3 oberflächliche meningeale Regionen über der Konvexität, dritter Ventrikel) bestimmt, das Ergebnis in einen Punktwert von 0 bis 3 umgerechnet und die Einzelwerte addiert (Tabelle 6). Es resultierte ein Gesamtpunktwert von 0 bis 18, wobei ein höherer Wert mit einem größeren Ausmaß an meningealer Entzündung korrelierte.

	keine Granulozyten	< 10 Granulozyten	10-50 Granulozyten	> 50 Granulozyten
frontale interhemisphärische Region	0	1	2	3
hippocampale Fissur	0	1	2	3
1 oberflächliche meningeale Region	0	1	2	3
1 oberflächliche meningeale Region	0	1	2	3
1 oberflächliche meningeale Region	0	1	2	3
dritter Ventrikel	0	1	2	3

**Tabelle 6: Punktwertkriterien der meningealen Entzündung**

#### 2.2.2.4 TUNEL-Färbung und Quantifizierung apoptotischer Zellen

Die TUNEL-Färbung (engl., *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) dient der Darstellung von apoptotischen Zellen, indem die beim Vorgang der Apoptose durch internukleosomale Spaltung entstehenden DNS-Fragmente markiert werden (Gavrieli et al. 1992). Dabei katalysiert das in der Färbung eingesetzte Enzym TdT (engl., *Terminal deoxynucleotidyl transferase*; Desoxyribonukleotidyltransferase, terminale Transferase) die Verknüpfung von Digoxigenin-markierten Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs; DIG-DNS) an 3'Hydroxyl-Enden der entstandenen Einzel- oder Doppelstrang-DNS-Moleküle. Anschließend kann durch Einsatz von gegen Digoxigenin gerichteten und mit Alkalische Phosphatase (Lichtmikroskopie; NBT/BCIP-Entwicklung) oder Rhodamin (Fluoreszenzmikroskopie) gekoppelten Primärantikörpern eine Farbreaktion erzeugt werden.

Zunächst erfolgte eine Entparaffinierung der zu färbenden Schnitte nach der im Kapitel 2.2.2.2 geschilderten Vorgehensweise. Anschließend wurde eine enzymatische Vorbehandlung mit 20 µg/ml (gelöst in TBS/2 mM CaCl<sub>2</sub>) rekombinanter Proteinase K (Roche Diagnostics) für 15 min bei 37 °C durchgeführt. Für Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen vorgesehene Schnitte wurden hitzeinduziert demaskiert (s.u.). Nach zweimaligem Waschen in TBS und Abkühlung für 5 min in eiskaltem TBS zwecks Inaktivierung der Proteinase K wurde auf jeden Schnitt 50 µl Reaktionslösung, bestehend aus 10 µl Reaktionspuffer, 2 µl CoCl<sub>2</sub>, 1 µl DIG-DNS, 0,5 µl TdT und 36,5 µl Aqua dest., aufgetragen, die Schnitte mit einem Deckglas bedeckt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Abschwimmen der Deckgläser und fünfmaligem Waschen in TBS wurden die Schnitte eine halbe Stunde mit Blockierungslösung (10 % FCS in TBS) bei Raumtemperatur inkubiert („Blocken“). Es folgte dann eine eineinhalbstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (Anti-Digoxigenin-

Alkalische Phosphatase [1:250 verdünnt in 10 % FCS in TBS] oder Anti-Digoxigenin-Rhodamin [1:20 verdünnt in 10 % FCS in TBS]) und anschließendem fünfmaligen Waschen. Die für die Lichtmikroskopie vorgesehenen Schnitte wurden dann mit NBT/BCIP (225  $\mu$ l NBT und 175  $\mu$ l BCIP mit 50 ml NBT/BCIP-Substratpuffer gemischt) für ca. 5 min entwickelt, in Aqua dest. gespült, anschließend für ca. 20 min mit Kernechtrot gegengefärbt, mit Leitungswasser gespült und mit Immu-Mount eingedeckelt. Immunfluoreszenzgefärbte Schnitte waren doppelgefärbt (vor der TUNEL-Färbung erste Färbung gegen aktive Caspase-3, aktive Caspase-8, Hoechst 33258, s.u.), wurden mit Aqua dest. gespült und abschließend mit Immu-Mount eingedeckelt.

Als Negativkontrolle wurde bei jedem Färbedurchgang bei ansonsten identischem Protokoll das Enzym TdT weggelassen. Für die Positivkontrolle wurde zum einen ein Schnitt nach der Vorbehandlung mit Proteinase K einer weiteren Inkubation für 15 min mit Desoxyribonuklease I unterzogen, um DNS-Strangbrüche zu induzieren. Zum anderen wurden zur Darstellung von physiologisch vorhandener Apoptose Gewebeschnitte mit humaner Tonsille regulär gefärbt. Zur Quantifizierung des Ausmaßes an Apoptose im akuten Meningitismodell wurden Serienschnitte in der Sagittalebene der linken Hirnhemisphäre angefertigt. Lateral beginnend nach stereotaktischen Koordinaten bei 1,5 mm (Paxinos und Franklin 2001) wurden 6 Schnitte (4  $\mu$ m Dicke) im Abstand von jeweils 20  $\mu$ m gewonnen, nach der TUNEL-Methode gefärbt, die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen im Gyrus dentatus der Hippokampusformation pro  $\text{mm}^2$  (Zelldichte) bestimmt, die 6 Werte pro Versuchstier gemittelt und anschließend die resultierenden Werte pro Kohorte erneut gemittelt.

### **2.2.2.5 Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen**

#### ***Aktive Caspase-3/TUNEL und NeuN und Aktive Caspase-8/TUNEL und NeuN***

Für qualitative Fragestellungen wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit gegen aktive Caspase-3 und aktive Caspase-8 gerichteten Primärantikörpern in Ergänzung zur TUNEL- sowie zur *Anti-Neuronal-Nuclei* (NeuN)-Färbung, einem neuronalen Marker, durchgeführt. Für diesen Zweck wurden Hirnschnitte von Faim2-Nullmutantenmäusen aus dem Meningitis-Akut-Versuch (24 h nach Infektion) verwendet. Es erfolgte zunächst eine Entparaffinierung der Schnitte (vgl. Kapitel 2.2.2.2) mit anschließendem zweimaligen Waschen in Aqua dest. für 5 min. Es wurde dann eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung in der Mikrowelle durchgeführt, indem die Schnitte in mit Citratpuffer (0,01 M, pH 6,0) gefüllten Plastikkuvetten gestellt und anschließend einmal für 5 min und viermal für 10 min bei voller Geräteleistung in der Mikrowelle gekocht wurden. In den Pausen wurde die Plastikkuvette mit Aqua dest. nachgefüllt. Nach einstündigem Abkühlen der Schnitte in einem Eisbad erfolgte ein dreimaliger Waschschrift für 5 min in Aqua dest, ein einmaliges Waschen für 5 min in TBST und eine einstündige Inkubation mit Blockierungslösung (10 % FCS in TBST). Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper aufgetragen (Anti-Caspase-3, aktiv/gespalten [1:200 verdünnt in 10 % FCS in TBST] und Anti-Caspase-8, aktiv/gespalten [1:1000 verdünnt in 10 % FCS in TBST]) und jeweils über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in

TBST wurde der Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen IgG [H+L], Alexa Fluor® 488; 1:200 verdünnt in 10 % FCS in TBST) aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST erfolgte nun die Gegenfärbung nach der TUNEL-Rhodamin-Methode (vgl. Kapitel 2.2.2.4) bzw. NeuN (s.u., Abschnitt *BrdU/NeuN*), eine Kernfärbung mit Hoechst 33258 für 10 min, Spülen in Aqua dest. und anschließend die Eindeckelung mit Immu-Mount. Für Negativkontrollen wurde der Primärantikörper bei ansonsten identischem Protokoll weggelassen. Als Positivkontrolle für aktive Caspase-8 diente die Darstellung von zerebellären Purkinjezellen.

### ***BrdU/NeuN***

Für Neurogenese-Untersuchungen wurden Doppelfärbungen gegen den DNS-Synthese-Marker 5-Bromo-2-Deoxyuridin (BrdU) und NeuN durchgeführt. Für diesen Zweck wurden 4 µm dicke, koronare Serienschnitte nach stereotaktischen Koordinaten beginnend bei Bregma -3,00 mm (Paxinos und Franklin 2001) von Hirnen des chronischen Meningitis-Modells verwendet. Entparaffinierung, hitzeinduzierte Antigendemaskierung, Inkubation in Blockierungslösung, Kernfärbung mit Hoechst 33258, Eindeckelung und die jeweiligen Waschschrte entsprachen der bereits oben geschilderten Vorgehensweise (vgl. Kapitel 2.2.2.2 und 2.2.2.5). Als erster Primärantikörper wurde Anti-Bromdesoxyuridin (1:200 verdünnt in 10 % FCS in TBST) aufgetragen und 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als biotinylierter Sekundärantikörper wurde Anti-Ratte IgG (H+L) und für die Farbentwicklung Cy2-konjugiertes Streptavidin (jeweils 1:200 verdünnt in 10 % FCS in TBST; 60 min Inkubation bei Raumtemperatur) verwendet. Nach Waschen der Schnitte in TBST bei 4°C über Nacht wurde mit dem Primärantikörper gegen NeuN (1:100 verdünnt in 10 % FCS in TBST) 90 min bei Raumtemperatur inkubiert und für die Farbentwicklung ein Sekundärantikörper (Anti-Maus IgG [H+L], Alexa Fluor® 555, 1:200 verdünnt in 10 % FCS in TBST; 120 min Inkubation bei Raumtemperatur) eingesetzt. Für Negativkontrollen wurde der Primärantikörper bei ansonsten identischem Protokoll weggelassen. Hinsichtlich der Quantifizierung des Ausmaßes von BrdU/NeuN-positiven Zellen wurde analog zur TUNEL-Färbung (Kapitel 2.2.2.4) die Zelldichte im Gyrus dentatus pro mm<sup>2</sup> bestimmt (ein Serienschnitt pro Versuchstier) und die Werte pro Kohorte gemittelt.

## **2.2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.3.1 Isolation von genomischer DNS**

Zur Genotypisierung der gezüchteten Mauslinie wurde genomische DNS aus Schwanzspitzenbiopsien gewonnen. Bis zu 5 mm der Biopsie wurden über Nacht bei 56 °C in 500 µl Lysispuffer und 25 µl Proteinase K (aus *Tritirachium album*; 2 mg/ml; Roth) inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 90 °C aufgekocht, um die Proteinase K zu inaktivieren. Es folgte eine Zentrifugation (15 min, 14000 rpm, 10 °C) und zwecks Fällung der DNS das Übertragen des Überstandes (400 µl) in mit Isopropanol (266 µl) gefüllte Reagiergefäße und anschließender guter Mischung. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 10 °C) wurde der Isopropanol-Überstand vorsichtig abpipettiert,

der entstandene DNS-Niederschlag mit Ethanol (70 %, 100  $\mu$ l) gewaschen und wiederum zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, 10 °C). Es folgten das Abpipettieren des Ethanols und die Lufttrocknung des DNS-Niederschlags in einem Heizblock bei 37 °C für 30 min. Anschließend wurde die gewonnene DNS in 50  $\mu$ l DNase-freiem Wasser („Ampuwa“, Fresenius Kabi) zunächst für 30 min bei 37 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur eluiert, spektrophotometrisch (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific) auf ihre Konzentration untersucht und bei 4 °C langfristig gelagert.

### 2.2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) mit genomischer DNS

Die Polymerasekettenreaktion (engl., *polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht die Amplifikation kleinster DNS-Mengen *in vitro* (Saiki et al. 1985). Unter Einsatz einer hitzestabilen DNS-Polymerase und sequenzspezifisch bindenden Oligonukleotiden („Primern“) kann bei einem Temperaturoptimum von 72 °C ein zum denaturierten Matrizenstrang komplementärer DNS-Strang synthetisiert und spezifische DNS-Bereiche auf diese Weise exponentiell amplifiziert werden. Sequentiell findet hierbei zunächst eine Denaturierung der DNS bei 95 °C, das Binden der Primer bei 52 °C (engl., *annealing*; Hybridisierung) und schließlich die DNS-Neusynthese bei 72 °C (Elongation) statt. Zur Genotypisierung der Versuchstiere (für Sequenzen s. Kapitel 2.1.6) wurden für das Faim2-Wildtyp- respektive das Faim2-Nullmutanten-Allel spezifische DNS-Abschnitte amplifiziert (Reich et al. 2011). Der Reaktionsansatz bestand hierbei aus einem Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l pro Probe und folgenden Einzelreagenzien:

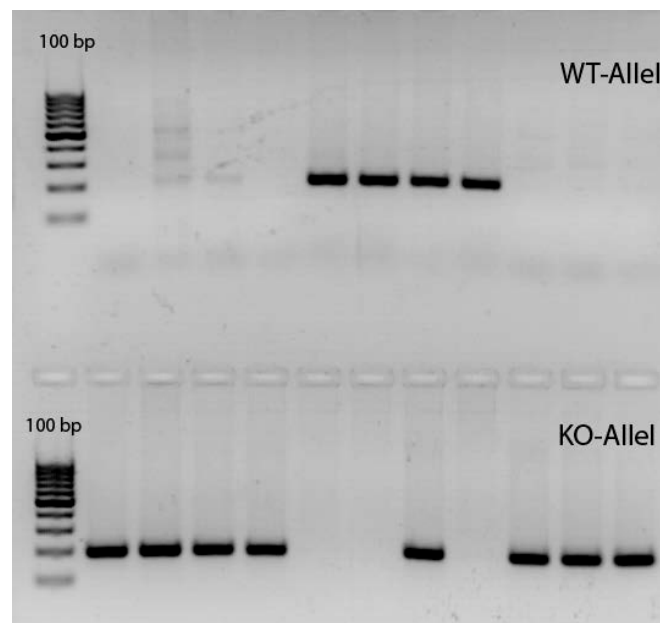
Matrizen-DNS	2 $\mu$ l
10x PCR-Puffer	2,5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ l
Vorwärtsprimer (100 $\mu$ M; Wildtyp bzw. Nullmutante)	1 $\mu$ l
Rückwärtsprimer (100 $\mu$ M; Wildtyp bzw. Nullmutante)	1 $\mu$ l
DNS-Polymerase	0,25 $\mu$ l
Aqua dest. („Ampuwa“, Fresenius Kabi)	16,25 $\mu$ l.

Die DNS-Amplifikation wurde in einem PCR-Thermostyler (Mastercycler® gradient, Eppendorf) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	2,5 min – 95 °C	} 30 Zyklen
Hybridisierung:	30 s – 59 °C	
Elongation:	60 s – 72 °C	
Denaturierung:	30 s – 95 °C	
Finale Elongation:	5 min – 72 °C.	

### 2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese von PCR-Amplifikaten

Mittels Agarosegelelektrophorese können DNS-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Hierbei wird Ethidiumbromid verwendet, welches in die DNS interkaliert und mit UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Es wurden für die Darstellung der Amplifikate 1,5- bis 2-prozentige Agarosegele (in 1x TAE-Puffer) verwendet. Nach Aufkochen der Gele in einer Mikrowelle wurden 12 µl Ethidiumbromid zu 50 ml Agarose hinzugegeben und diese anschließend auf Gelträgern in Gießschienen mit Gelkämmen zur Formung von Taschen gegossen. Die einzelnen DNS-Proben wurden mit Beladungspuffer („6x Loading Dye“, Fermentas) gemischt (5 µl Beladungspuffer zu 25 µl DNS-Amplifikat). Nach Erstarren des Gels und Übertragung in das Elektrophoresesystem wurde dieses mit 1x TAE-Puffer bedeckt und die einzelnen Geltaschen dann mit jeweils 10 µl der DNS/Beladungspuffer-Mischung und zusätzlich eine Geltasche mit 5 µl eines 100-bp-Markers gefüllt. Anschließend wurden die DNS-Fragmente durch Anlegen einer Spannung von 110 V für 20 min aufgetrennt, mit einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und fotografiert (Abbildung 11).



#### Abbildung 11: Genotypisierung von Versuchstieren

Dargestellt sind die durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennten und mittels UV-Licht visualisierten, 200 bp (Basenpaare) großen DNS-Fragmente. Einzelne Banden der oberen bzw. unteren Reihe beschreiben homozygote Wildtyp (WT;  $Faim2^{+/+}$ )-respektive Knockout (KO;  $Faim2^{-/-}$ )-Versuchstiere. Zwei gleichzeitige Banden identifizieren heterozygote ( $Faim2^{+/-}$ ) Versuchstiere.

### 2.2.3.4 RNS-Isolation und quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Für Genexpressionsanalysen von Fas und Faim2 wurden RNS-Transkripte in komplementäre DNS (engl., *complementary DNA*, cDNA) durch reverse Transkription umgeschrieben und Letztere anschließend mit dem interkalierenden Farbstoff „SYBR Green I“ quantifiziert (quantitative Echtzeit-

PCR; engl., *quantitative real time polymerase chain reaction*, qRT-PCR). SYBR Green I bindet an doppelsträngige DNS, was ungefähr in einer um den Faktor 1000 erhöhten Fluoreszenzintensität resultiert. Das Fluoreszenzsignal korreliert somit proportional zur vorhandenen cDNA-Menge.

Zunächst wurde Gesamt-RNS aus hippokampalem Gewebe unter Verwendung des „RNeasy Mini Kits“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert und spektrophotometrisch (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific) die Konzentration bestimmt. Anschließend wurde die isolierte RNS mit „RQ1 RNase Free DNaseI“ (Promega) verdaut und gleichzeitig mittels Zugabe von 20 U eines RNase-Inhibitors („RNasin“; Promega) vor RNase-Aktivität geschützt. Es wurden hierbei für einen Gesamtansatz von 20 µl Volumen 2,5 µl „RQ1 RNase Free DNaseI“, 2 µl „RQ1 DNase Buffer (10x)“ (Promega), 0,5 µl RNase-Inhibitor („RNasin“) und 2,5 µg RNS enthaltendes Volumen verwendet und mit HPLC-Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde zunächst für 30 min bei 37 °C und anschließend nach Zugabe von 1 µl Stopplösung („Stop Solution“, Promega) für weitere 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach Auffüllen des Reaktionsansatzes auf 50 µl mit HPLC-Wasser wurden 35 µl Isopropanol und 5 µl Ammoniumacetat (5 M) hinzugegeben und für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, der RNS-Niederschlag kurz getrocknet und in 15 µl HPLC-Wasser eluiert. Für die Synthese von cDNA wurden 14,7 µl des RNS-Eluats mit 4 µl RT-Puffer (5x, Promega), 0,5 µl dNTPs (10 mM, Fermentas) und 0,4 µl Oligo(dT)<sub>15</sub> Primer (100 µM, Promega) versetzt, für 2 min bei 70 °C inkubiert, auf ein Eisbad überführt, 0,4 µl reverse Transkriptase („M-MLV Reverse Transcriptase“, Promega) hinzugegeben und schließlich für eine Stunde bei 42 °C inkubiert.

Anschließend wurden für den qRT-PCR-Einsatz pro Probe ein Gesamtansatz von 25 µl in einer 96-Loch-Platte (Abgene) hergestellt, bestehend aus 12,5 µl „Absolute™ QPCR SYBR® Green ROX Mix“ (Abgene), jeweils 0,35 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (5 µM; f.c. 70 nM; für Sequenzen s. Kapitel 2.1.6), 9,8 µl HPLC-Wasser und 2 µl der zuvor 1:5 mit HPLC-Wasser verdünnten cDNA. Die Platte wurde mit „Absolute™ QPCR Seal“ (Abgene) versiegelt, für 5 min bei 3000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend die qRT-PCR-Messung in einem Real-Time PCR System (Stratagene Mx3000P™) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Enzymaktivierung:	15 min – 95 °C	} 40 Zyklen
Denaturierung:	15 s – 95 °C	
Hybridisierung:	30 s – 56 °C	
Extension:	30 s – 72 °C	
Schmelzkurve:	1 min – 95 °C	
	30 s – 55 °C	
	30 s – 95 °C.	

Die durch Anlagerung von „SYBR Green I“ an cDNA entstehende Fluoreszenzintensität wurde in Echtzeit registriert, so dass sich die Zyklenzahl in der exponentiellen Phase der PCR bestimmen ließ, bei der die Reporterfluoreszenz erstmalig die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschritten hatte. Dieser sogenannte Ct-Wert (engl., *cycle threshold*; Schwellenwert-Zyklus) ist umgekehrt proportional zur Menge der eingesetzten cDNA (Abbildung 12). Es wurde eine relative Quantifizierung nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode vorgenommen. Hierfür wurde neben dem Zielgen ein sogenanntes Haushaltsgen (engl., *housekeeping gene*) mit vorausgesetzter konstanter Expression (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; GAPDH) mitamplifiziert und die Expression des Zielgens auf das Haushaltsgen mit der Berechnung des sogenannten  $\Delta Ct$ -Wertes normalisiert:

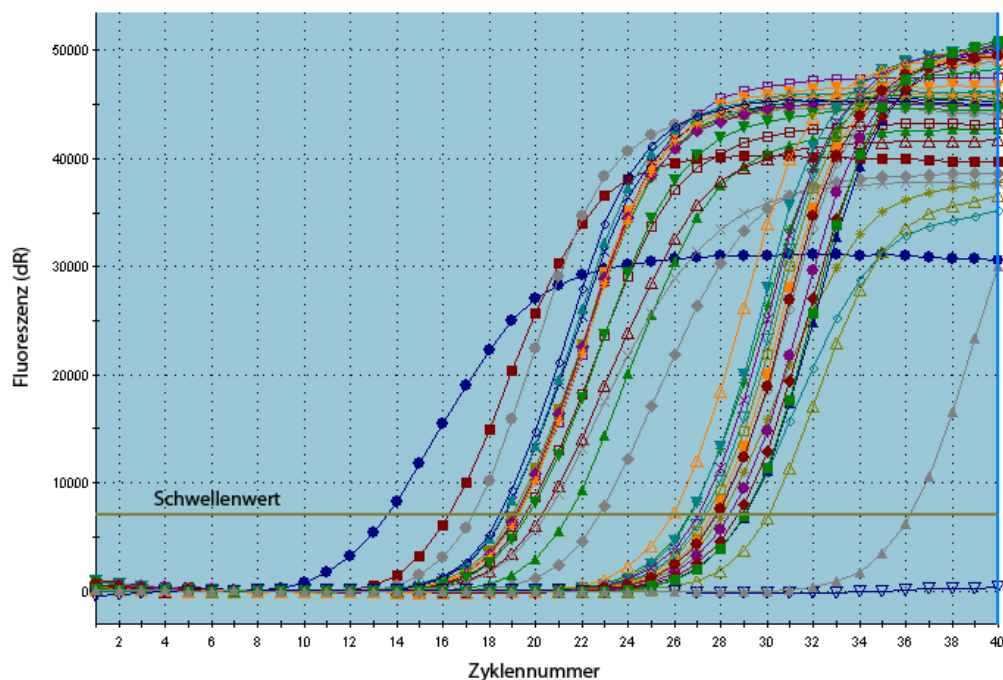
$$\Delta Ct_{\text{Zielgen/Kalibrator}} = Ct_{\text{Zielsequenz}} - Ct_{\text{„Housekeeping“-Gen}}$$

Kontrollgruppen der jeweiligen Experimente (cDNA NaCl-injizierter Versuchstiere) dienten als relative Referenz (Kalibrator), deren Expression als „1“ definiert wurde. Die  $\Delta Ct$ -Werte der Kontrollgruppe wurden gemittelt und anschließend der  $\Delta\Delta Ct$ -Wert für jede einzelne Probe des Zielgens berechnet:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Zielgen}} - \Delta Ct_{\text{Kalibrator}}$$

Anschließend konnte die relative Expression des Zielgens als ein Vielfaches der Expression des Kalibrators berechnet werden:

$$\text{Relative mRNA-Expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$



**Abbildung 12: Datenerfassung in der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR)**

Während der ersten Zyklen bleibt die Fluoreszenzintensität ( $dR = \Delta$  Wert des Reportersignals) unterhalb des detektierbaren Bereichs. Der Ct-Wert beschreibt die Zyklusanzahl, bei der die Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert während der exponentiellen Phase der PCR erstmalig signifikant überschreitet.



#### 2.2.4 Statistische Methoden

Erhobene Daten wurden ggf. mit Excel 2007 weiterbearbeitet, statistisch mit GraphPad Prism (Version 5.00) ausgewertet und als Mittelwert, als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (engl., *standard error of the mean*, SEM) bzw. als Punktwolkendiagramm angegeben. Bei der Analyse von zwei Gruppen wurde der *Student's t-Test* für unverbundene Stichproben (Zweistichproben-t-Test) bzw. für den Vergleich einer Stichprobe gegenüber einem hypothetischen Kontrollmedian der Einstichproben-t-Test angewandt. Bei mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen wurde eine Varianzanalyse durchgeführt, wobei bei einem untersuchten Faktor der *One-way ANOVA* (bzw. bei zwei untersuchten Faktoren der *Two-way ANOVA*) mit einem sich anschließenden *post-hoc*-Test für multiple Vergleiche zum Nachweis von Gruppenunterschiedlichkeiten verwendet wurde (engl., *analysis of variance*; Varianzanalyse). Hierbei kam beim Vergleich einer Kontrollgruppe mit mehreren Behandlungsgruppen im Rahmen einer einfaktoriellen Varianzanalyse der *Dunnett-post-hoc*-Test und nach einer zweifaktoriellen Varianzanalyse bei unverbundenen Stichproben oder nach einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit wiederholten Messungen bei verbundenen Stichproben der *Bonferroni-post-hoc*-Test zur Anwendung. Im Rahmen der Untersuchung der prozentualen Gewichtsveränderung in der postmeningitischen Phase wurde zusätzlich eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Für Überlebensanalysen wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt und mit dem Log-Rang-Test ausgewertet. In den Abbildungen 22 und 24 angegebene p-Werte bei Nicht-Signifikanz wurden mit Statistica (Version 10) berechnet. Das Signifikanzniveau wurde mit  $\alpha = 0,05$  angenommen (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 3. ERGEBNISSE

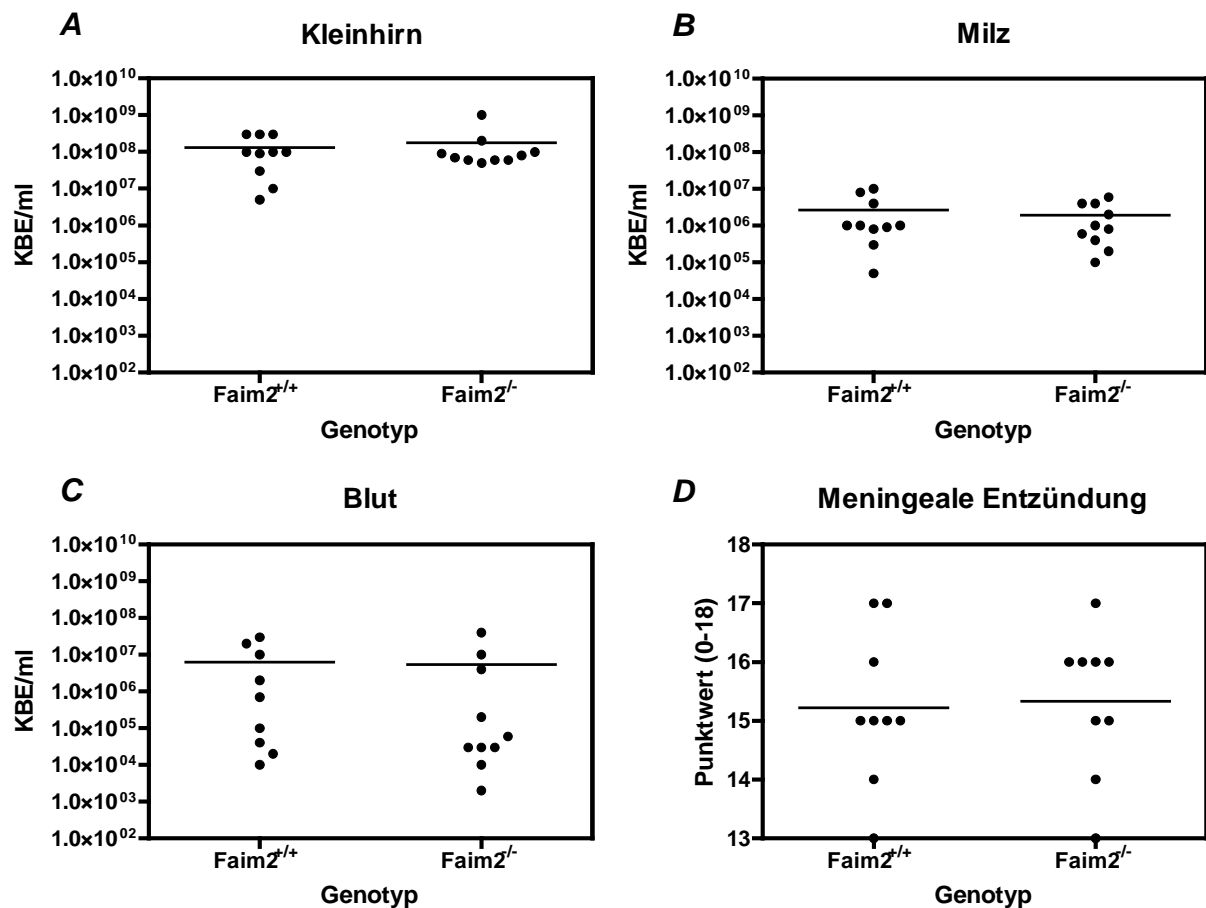
#### 3.1 Die akute meningitische Phase

Zur Beurteilung der Fragestellung, ob die Expression von Faim2 einen unmittelbaren Einfluss in einem Mausmodell der bakteriellen Meningitis ausübt, wurde zunächst eine Analyse der akuten meningitischen Phase (24 h) mit Faim2<sup>+/+</sup>- sowie Faim2<sup>-/-</sup>-Versuchskohorten (jeweils knapp 2,5 Monate alt; Tabelle 7) durchgeführt. Hierbei wurden zur Bestimmung des Infektionsausmaßes Titer auf *S. pneumoniae* Typ 3 in Kleinhirn, Milz und Blut bestimmt sowie der Ausprägungsgrad meningealer Entzündungsvorgänge untersucht. Zur klinischen Verlaufskontrolle diente die Bestimmung des klinischen Phänotyps und des Gewichtsverlustes, die Seiltest- sowie die Rotarod-Untersuchung. Nach Tötung und Präparation der Versuchstiere wurde die hippocampale Expression sowohl von Faim2 als auch von Fas/CD95 nach 20 h Krankheitsdauer untersucht. Zusätzlich wurde an sagittalen Serienschnitten der linkshemisphärischen Hippokampusformation das Ausmaß an apoptotischem Zelltod im Gyrus dentatus mit der TUNEL-Färbung bestimmt. Ergänzend wurden hierbei zur Untersuchung des beteiligten Signalwegs Koloalisationsstudien in Hinblick auf Assoziation von Apoptosevorgängen mit aktiver Caspase-8 und aktiver Caspase-3 durchgeführt. Abschließend wurde ein Überlebensversuch zur Evaluation des spontanen Krankheitsverlaufs ergänzt.

##### ***3.1.1 Bestimmung des Infektionsausmaßes durch Titerbestimmungen und Darstellung meningealer Entzündungsvorgänge***

Um die bakterielle septische Infektion mikrobiologisch nachzuweisen, wurden nach Tötung der Versuchstiere Gewebeproben (Kleinhirn, Milz und Blut) auf ihren *S. pneumoniae*-Titer untersucht (Abbildung 13; Tabelle 7). Hierbei zeigten sich in den Proben beider Faim2-Genotypen (Wildtyp und Nullmutante) erwartungsgemäß hohe Erregertiter ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 13 A-C; Tabelle 1 und 7). Der primären ZNS-Infektion entsprechend waren die Titer in den Kleinhirnproben höher (etwa 10<sup>8</sup>-fach) als in den Milz- respektive Blutproben (etwa 10<sup>6</sup>- bis 10<sup>7</sup>-fach). Histologisch wurde an H.E.-gefärbten Gewebeschnitten zusätzlich der Ausprägungsgrad meningealer granulozytärer Infiltration unter Zuhilfenahme eines Punktesystems bestimmt (Abbildung 13 D; Tabelle 6 und 7). Ein hoher Punktwert korreliert hierbei mit einem hohen Ausprägungsgrad der Entzündungsreaktion. Analog zu den Titerbestimmungen zeigte sich auch hierbei ein deutlicher Infiltrationsnachweis (etwa Punktwert 15) in beiden untersuchten Faim2-Gruppen (Wildtyp und Nullmutante) ohne signifikante Gruppenunterschiede.

Zusammenfassend konnte anhand der Titerbestimmungen und der Analyse meningealer Entzündung ein vergleichbarer und genotypunabhängiger Infektionsgrad im ZNS sowie im übrigen Organismus mikrobiologisch-quantitativ und histologisch nachgewiesen werden.



**Abbildung 13: Titerbestimmung in Kleinhirn, Milz, Blut und Darstellung meningealer Entzündung**

(A-C) Sowohl im Gewebe von  $Faim2^{+/+}$ - als auch  $Faim2^{-/-}$ - Versuchstieren konnten hohe Titer an *S. pneumoniae* (KBE/ml) nachgewiesen werden. Es zeigten sich keine signifikanten Titerunterschiede zwischen den einzelnen Genotyp-Gruppen (horizontaler Balken im Punktwolkendiagramm = Mittelwert;  $n = 10$  für alle Gruppen; *Student's t-Test* für unverbundene Stichproben; ein Wert der Bluttitelbestimmung [C] für die  $Faim2^{+/+}$ -Kohorte liegt außerhalb der Ordinate [ $y = 0$ ] und ist daher nicht dargestellt; KBE = koloniebildende Einheit).

(D) Es zeigte sich eine ausgeprägte meningeale Entzündungsreaktion (hoher Punktwert) sowohl in der  $Faim2^{+/+}$ - als auch in der  $Faim2^{-/-}$ -Kohorte ohne einen signifikanten Gruppenunterschied (horizontaler Balken im Punktwolkendiagramm = Mittelwert;  $n = 9$  für beide Gruppen; *Student's t-Test* für unverbundene Stichproben).

Parameter	Faim2-Genotyp	
	Wildtyp (+/+)	Nullmutante (-/-)
Alter der Kohorten (Tage) bei Präparation	$71,4 \pm 1,75$	$72 \pm 1,86$
Alter der Kohorten (Monate) bei Präparation	$2,4 \pm 0,06$	$2,4 \pm 0,06$
Kleinhirn (KBE/ml)	$1,335 \times 10^8 \pm 3,814 \times 10^7$	$1,770 \times 10^8 \pm 9,246 \times 10^7$
Milz (KBE/ml)	$2,705 \times 10^6 \pm 1,112 \times 10^6$	$1,910 \times 10^6 \pm 647465$
Blut (KBE/ml)	$6,287 \times 10^6 \pm 3,349 \times 10^6$	$5,436 \times 10^6 \pm 3,973 \times 10^6$
Meningeale Entzündung (Punktwert)	$15,22 \pm 0,434$	$15,33 \pm 0,408$

**Tabelle 7: Kohortenalter, Titer und Punktwerte der meningealen Entzündung (Mittelwert  $\pm$  SEM)**

### 3.1.2 Bestimmung klinischer Verlaufparameter durch Phänotypanalysen

Zur Dokumentation des Krankheitsverlaufes wurden die Versuchstierkohorten anhand von Seiltest- und Rotaroduntersuchungen sowie anhand eines klinischen Punktwertes und des Gewichtsverlustes untersucht (Abbildung 14; Kapitel 2.2.1.6 und 2.2.1.9).

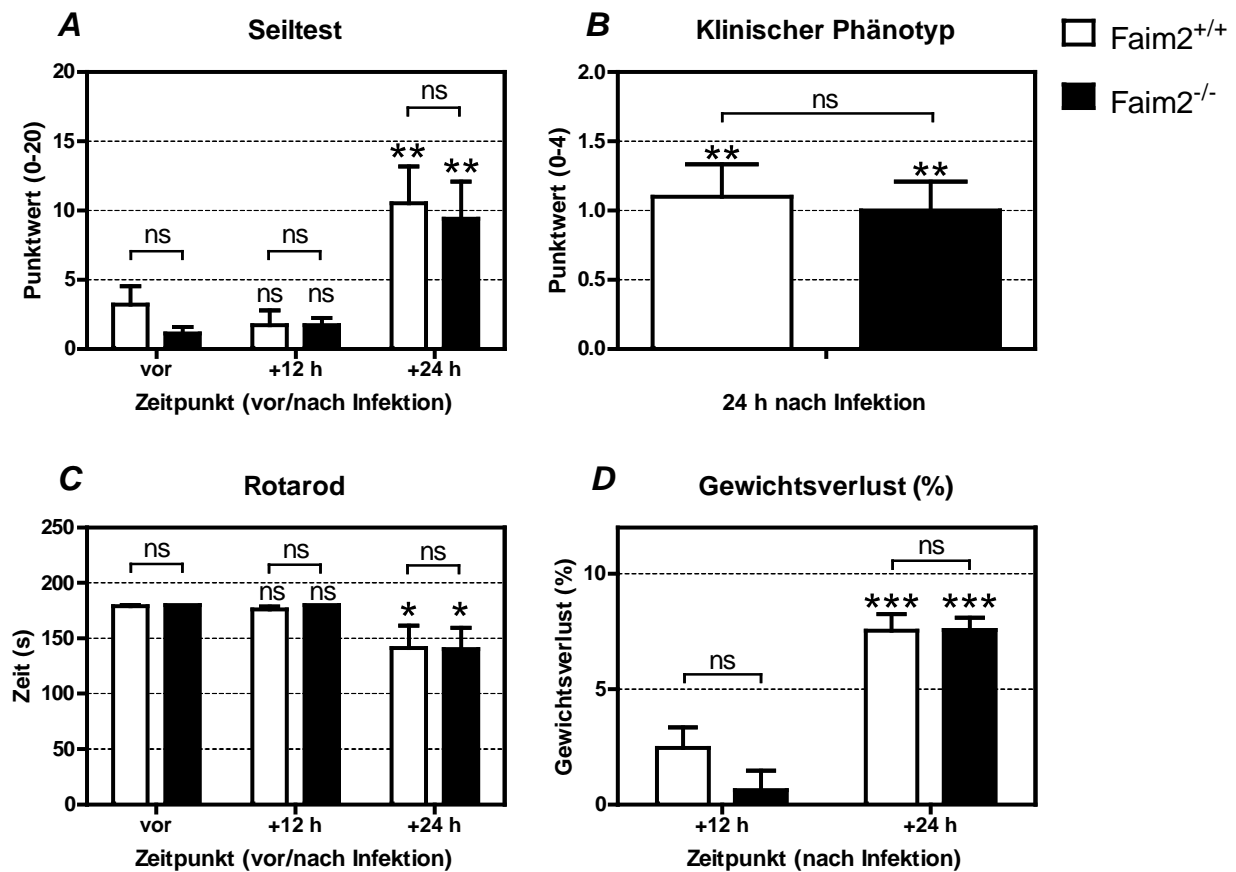
Die Seiltestuntersuchung (Abbildung 14 A) diente der Charakterisierung der motorischen Leistungsfähigkeit anhand eines Punktesystems, wobei ein hoher Punktwert mit einer starken Beeinträchtigung korreliert (Tabelle 3). Hierbei zeigte sich sowohl in der Faim2<sup>+/+</sup>- als auch in der Faim2<sup>-/-</sup>-Versuchstierkohorte eine Leistungsbeeinträchtigung nach 24 h Infektionsdauer ohne Nachweis eines genotypabhängigen Effekts. Zuvor war die Leistung nach 12 h Infektionsdauer noch weitestgehend unbeeinträchtigt gewesen. Die Punktzahl nach 24 h Infektionsdauer war in beiden Gruppen vergleichbar hoch (Mittelwerte: 10,5 für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 9,4 für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte).

Der klinische Phänotyp der Versuchstiere, ebenfalls dokumentiert unter Verwendung eines Punktesystems und der Korrelation von zunehmender Lethargie und motorischer Beeinträchtigung mit höheren Punktwerten (Tabelle 2), zeigte nach 24 h Infektionsdauer eine allgemeine Zustandsverschlechterung an (Abbildung 14 B). Ein signifikanter Gruppenunterschied zwischen der Faim2<sup>+/+</sup>- und der Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte konnte hierbei nicht nachgewiesen werden (Mittelwerte nach 24 h Infektionsdauer: 1,1 für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 1,0 für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte).

Die Rotarod-Untersuchung zeigte Defizite in Hinblick auf Koordinationsfähigkeit und Ausdauer auf, wobei kürzere Laufzeiten eine Verschlechterung anzeigten (Abbildung 14 C). Nach 12 h Infektionsdauer entsprach die gemessene Leistung zunächst noch annähernd der Leistung vor Beginn der Infektion. Leistungseinbußen zeigten sich nach 24 h Infektionsdauer, ebenfalls ohne signifikante genotypabhängige Gruppenunterschiede (Mittelwerte nach 24 h Infektionsdauer: 141,2 s für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 140,1 s für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte).

Der prozentuale Gewichtsverlust wurde, ausgehend von den vor Beginn der Infektion gemessenen Absolutwerten, für die nachfolgenden Zeitpunkte kalkuliert (12 h, 24 h; Abbildung 14 D) und war nach 24 h Infektionsdauer gegenüber dem prozentualen Gewichtsverlust nach 12 h signifikant, jedoch ohne genotypbedingten Gruppenunterschied, erhöht (Mittelwerte nach 24 h Infektionsdauer: 7,5 % für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 7,6 % für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte).

Zusammenfassend konnten anhand der durchgeführten Phänotypanalysen nach 24 h Infektionsdauer Defizite der Versuchstierkohorten in den Bereichen Motorik, allgemeinem klinischen Status, Koordinationsfähigkeit und Ausdauer sowie zusätzlich Lethargie und Gewichtsverlust nachgewiesen werden. Es zeigte sich hierbei keinerlei Abhängigkeit dieser Defizite vom jeweiligen Genotyp.



**Abbildung 14: Phänotypanalysen zur Evaluation des Krankheitsverlaufs (akutes Meningitis-Modell)**

(A) Nach 24 h Infektionsdauer zeigte sich eine genotypunabhängige Beeinträchtigung der motorischen Leistungsfähigkeit der Versuchstiere, illustriert durch einen hohen Punktwert im Seiltest (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n = 10$  für alle Gruppen; *Two-Way ANOVA* mit wiederholten Messungen, gefolgt vom Bonferroni-*post-hoc*-Test; Einfluss der Hauptvariablen: Interaktion Genotyp gegenüber Zeitpunkt nicht signifikant, Genotyp nicht signifikant, Zeitpunkt  $p < 0,0001$ ; \*\* =  $p < 0,01$  bzw. ns = nicht signifikant beim Vergleich vor gegenüber 12 h/24 h nach Infektion, jeweils für die Faim2<sup>+/+</sup>- und Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte [einzelne Säulenmarkierungen], und beim Vergleich Faim2<sup>+/+</sup>- gegenüber Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, jeweils zu den drei Zeitpunkten [verknüpfte Säulenmarkierungen]).

(B) Der allgemeine Zustand der Versuchstiere, evaluiert anhand eines klinischen Punktwertes in Bezug auf motorische Beeinträchtigung und Lethargie (höherer Punktwert entspricht Verschlechterung), zeigte sich nach 24 h Infektionsdauer genotypunabhängig verschlechtert (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n = 10$  für alle Gruppen; *Student's t-Test* für unverbundene Stichproben [ns]; Einstichproben-t-Test gegenüber 0 als Kontrollmedian, entsprechend dem gesunden Ausgangszustand vor der Infektion [\*\*]; \*\* =  $p < 0,01$  bzw. ns = nicht signifikant beim Vergleich vor gegenüber 24 h nach Infektion, jeweils für die Faim2<sup>+/+</sup>- und Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte [einzelne Säulenmarkierungen], und beim Vergleich Faim2<sup>+/+</sup>- gegenüber Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte 24 h nach Infektion [verknüpfte Säulenmarkierungen]).

(C) Koordinationsfähigkeit und Ausdauer wurden mit dem Rotarod-Test untersucht und zeigten sich nach 12 h Infektionsdauer für keine der Versuchstierkohorten signifikant respektive nach 24 h Infektionsdauer für die Wildtyp- und Nullmutantenkohorte genotypunabhängig und signifikant vermindert, entsprechend einer kürzeren auf dem Laufrad verbrachten Zeit (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n = 10$  für alle Gruppen; *Two-Way ANOVA* mit wiederholten Messungen, gefolgt vom Bonferroni-*post-hoc*-Test; Einfluss der Hauptvariablen: Interaktion Genotyp gegenüber Zeitpunkt nicht signifikant, Genotyp nicht signifikant, Zeitpunkt  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$  bzw. ns = nicht signifikant beim Vergleich vor gegenüber 12 h/24 h nach Infektion, jeweils für die Faim2<sup>+/+</sup>- und Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte [einzelne Säulenmarkierungen], und beim Vergleich Faim2<sup>+/+</sup>- gegenüber Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, jeweils zu den drei Zeitpunkten [verknüpfte Säulenmarkierungen]).

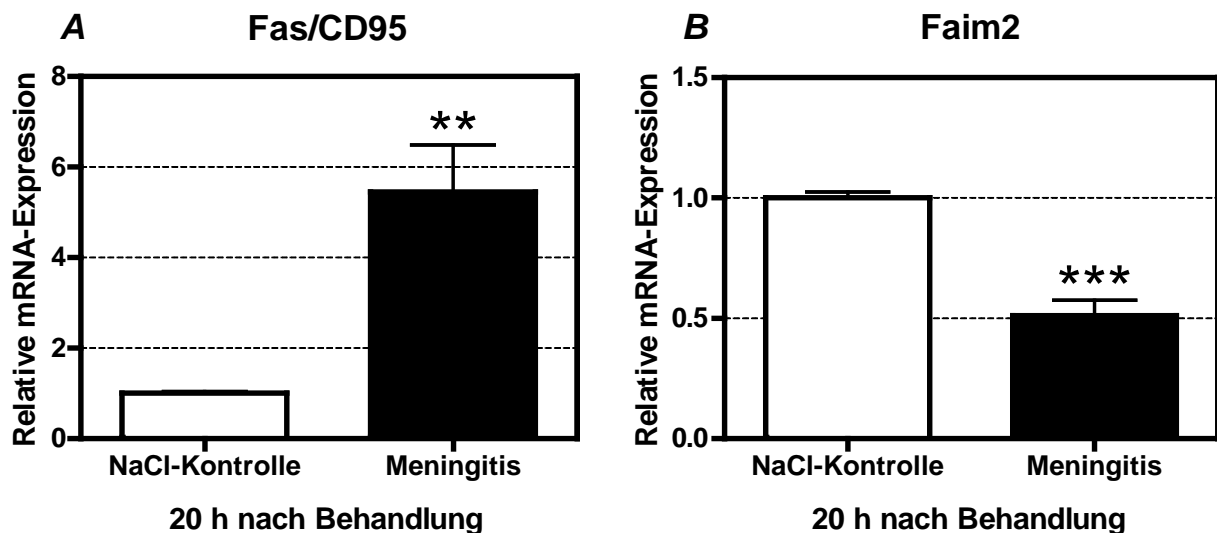
(D) Gewichtsverlust konnte nach 24 h Infektionsdauer in beiden Versuchstierkohorten genotypunabhängig nachgewiesen werden (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n = 10$  für alle Gruppen; *Two-Way ANOVA* mit wiederholten Messungen, gefolgt vom Bonferroni-*post-hoc*-Test; Einfluss der Hauptvariablen: Interaktion Genotyp gegenüber Zeitpunkt nicht signifikant, Genotyp nicht signifikant, Zeitpunkt  $p < 0,0001$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$  bzw. ns = nicht signifikant beim Vergleich 12 h gegenüber 24 h nach Infektion, jeweils für die Faim2<sup>+/+</sup>- und Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte [einzelne Säulenmarkierungen], und beim Vergleich Faim2<sup>+/+</sup>- gegenüber Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, jeweils zu den beiden Zeitpunkten [verknüpfte Säulenmarkierungen]).

### 3.1.3 Divergente Regulation hippocampaler Fas/CD95- und Faim2-Expression

Mittels Durchführung von Genexpressionsanalysen wurde die Regulation sowohl der Expression von Fas/CD95-mRNA als auch Faim2-mRNA in hippocampalem Gewebe von Faim2<sup>+/+</sup>-Versuchstieren nach 20 h Infektionsdauer untersucht (Abbildung 15). Für diesen Zweck wurde RNS isoliert, in komplementäre DNS umgeschrieben und anschließend eine quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Die Expression wurde jeweils auf ein Haushaltsgen (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; GAPDH) normalisiert und als Vielfaches der Fas/CD95- bzw. Faim2-Expression einer Kontrollgruppe (NaCl-injizierte Faim2<sup>+/+</sup>-Versuchstiere) unter Verwendung der 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>-Methode dargestellt (Kapitel 2.2.3.4).

Bei der Untersuchung hippocampaler Fas/CD95-mRNA-Expression zeigte sich eine 5,5-fach erhöhte Expression in der erkrankten Kohorte im Vergleich zu Kontrollen (Abbildung 15 A;  $p = 0,0032$ ). Invers zeigte sich die Expression hippocampaler Faim2-mRNA mit einer im Vergleich zur Kontroll-Kohorte 0,5-fach erniedrigten Expression (Abbildung 15 B;  $p = 0,0001$ ).

Zusammenfassend konnte anhand der Expressionsanalysen eine divergente Regulation hippocampaler Fas/CD95- und Faim2-Expression in der akuten meningitischen Phase nachgewiesen werden.



**Abbildung 15: Expressionsanalysen hippocampalen Gewebes von Faim2<sup>+/+</sup>-Versuchstieren**

(A) Die hippocampale Fas/CD95-mRNA-Expression von 20 h nach Infektionsbeginn präparierten Faim2<sup>+/+</sup>-Versuchstieren wurde relativ im Vergleich zu mit NaCl injizierten Faim2<sup>+/+</sup>-Kontrolltieren gemessen und zeigte sich signifikant erhöht (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n = 6$  für NaCl-Kontroll-Kohorte und  $n = 8$  für Meningitis-Kohorte; *Student's t-Test* für unverbundene Stichproben; \*\* =  $p < 0,01$  beim Vergleich NaCl-Kontroll-Kohorte gegenüber Meningitis-Kohorte; NaCl-Kontroll-Kohorte = als 1 definiert).

(B) Die hippocampale Faim2-mRNA-Expression von 20 h nach Infektionsbeginn präparierten Faim2<sup>+/+</sup>-Versuchstieren wurde relativ im Vergleich zu mit NaCl injizierten Faim2<sup>+/+</sup>-Kontrolltieren gemessen und zeigte sich signifikant erniedrigt (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n = 5$  für NaCl-Kontrolle und  $n = 8$  für Meningitis-Kohorte; *Student's t-Test* für unverbundene Stichproben; \*\*\* =  $p < 0,001$  beim Vergleich NaCl-Kontrolle gegenüber Meningitis-Kohorte; NaCl-Kontroll-Kohorte = als 1 definiert).

### **3.1.4 Erhöhte hippocampale Zelldichte in *Faim2*-defizienten Mäusen**

Das Ausmaß apoptotischer Zellen unter Kontroll- sowie unter Infektionsbedingungen wurde mittels TUNEL-Färbung (Kapitel 2.2.2.4) auf Serienschnitten der linkshemisphärischen Hippokampusformation (Gyrus dentatus) sowohl für die *Faim2*<sup>+/+</sup>- als auch für die *Faim2*<sup>-/-</sup>-Kohorte lichtmikroskopisch quantifiziert und als Zelldichte pro mm<sup>2</sup> des Gyrus dentatus dargestellt (Abbildung 16).

Hierbei zeigte sich unter Kontrollbedingungen (NaCl-Behandlung) kein genotypabhängiger Effekt auf die Dichte TUNEL-positiver hippocampaler Zellen (Mittelwerte 24 h nach NaCl-Injektion: 2,6 Zellen/mm<sup>2</sup> für die *Faim2*<sup>+/+</sup>- bzw. 2,5 Zellen/mm<sup>2</sup> für die *Faim2*<sup>-/-</sup>-Kohorte). Unter Infektionsbedingungen war die Dichte TUNEL-positiver hippocampaler Zellen in der *Faim2*<sup>-/-</sup>-Kohorte signifikant gegenüber der *Faim2*<sup>+/+</sup>-Kohorte erhöht (Mittelwerte nach 24 h Infektionsdauer: 3,8 Zellen/mm<sup>2</sup> für die *Faim2*<sup>+/+</sup>- bzw. 7,6 Zellen/mm<sup>2</sup> für die *Faim2*<sup>-/-</sup>-Kohorte) (Abbildung 16 A).

Zusammenfassend konnte 24 h nach Infektion eine erhöhte Zelldichte in der Hippokampusformation des Gyrus dentatus von *Faim2*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern nachgewiesen werden.

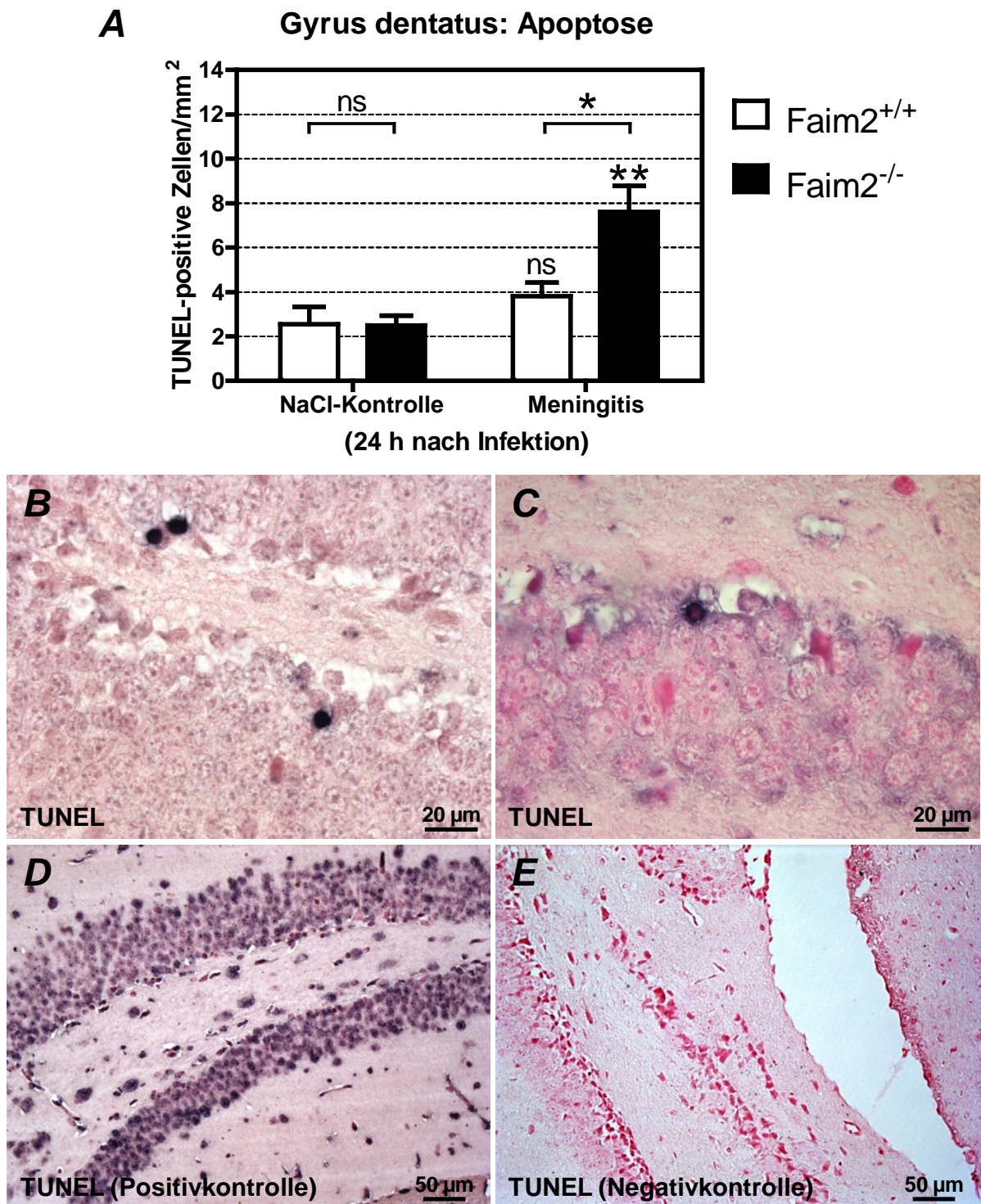
### **3.1.5 Beteiligung von Initiations- und Effektorcaspasen am neuronalen Apoptoseprozess**

Anhand von Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (Kapitel 2.2.2.5) wurde qualitativ nach 24 h Infektionsdauer die Beteiligung extrinsischer Initiations-Signalkaskaden am ablaufenden Apoptoseprozess untersucht (Abbildung 17 und 18).

Für diesen Zweck wurden aktive Caspase-8/TUNEL-Doppelfärbungen auf Serienschnitten der linkshemisphärischen Hippokampusformation (Gyrus dentatus) durchgeführt, mit Demonstration einer entsprechenden Kolokalisation (Abbildung 17 A, C, E). Dass es sich um neuronalen Zelltod handelt, wurde anhand einer Kolokalisation aktiver Caspase-8 mit dem neuronalen Marker NeuN nachgewiesen (Abbildung 17 B, D, F).

Analog hierzu konnte ebenfalls die Beteiligung der aktiven Form der (Effektor-)Caspase-3 mittels entsprechender Doppelfärbungen (aktive Caspase-3/TUNEL) nachgewiesen werden (Abbildung 18 A, C, E). Die im Vergleich zur aktiven Caspase-8 insgesamt weniger häufig darstellbare aktive Caspase-3 war ebenfalls mit NeuN assoziiert (Abbildung 18 B, D, F).

Zusammenfassend konnte anhand der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen eine Beteiligung von sowohl Initiations- als auch Effektorcaspasen am neuronalen Apoptoseprozess in der akuten meningitischen Phase nachgewiesen werden.



### Abbildung 16: Apoptotischer Zelltod im Gyrus dentatus der Hippokampusformation

(A) Nach 24 h Infektionsdauer zeigte sich eine erhöhte Zelldichte TUNEL-positiver hippocampaler Zellen (gemessen im Gyrus dentatus) in der Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte gegenüber der Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte (Mittelwerte  $\pm$  SEM; 6 Serienschritte pro Versuchstiermittelwert; n = 4 für beide NaCl-Kontroll-Kohorten und n = 8 für Meningitis-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte bzw. n = 11 für Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; *Two-Way ANOVA*, gefolgt vom Bonferroni-*post-hoc*-Test; Einfluss der Hauptvariablen: Interaktion Genotyp gegenüber Behandlung nicht signifikant, Genotyp nicht signifikant, Behandlung p < 0,05; \* = p < 0,05 bzw. \*\* = p < 0,01 bzw. ns = nicht signifikant beim Vergleich NaCl-Kontrolle gegenüber Meningitis, jeweils für die Faim2<sup>+/+</sup>- und Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte [einzelne Säulenmarkierungen], und beim Vergleich Faim2<sup>-/-</sup>- gegenüber Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte, jeweils zu den beiden Behandlungskonditionen [verknüpfte Säulenmarkierungen]).

(B, C) TUNEL-positive Zellen (schwarz) im Gyrus dentatus der Hippokampusformation.

(D) Postivkontrollen mit zusätzlicher Inkubation der Serienschritte mit Desoxyribonuklease I und dadurch erzielten DNS-Strangbrüchen und deren zahlreicher Markierung in der TUNEL-Färbung.

(E) Negativkontrollen zeigten bei Fehlen von terminaler Transferase keine Reaktion in der TUNEL-Färbung. (Gegenfärbung [B-E]: Kernechtrot; Abk.: TUNEL = *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*.)



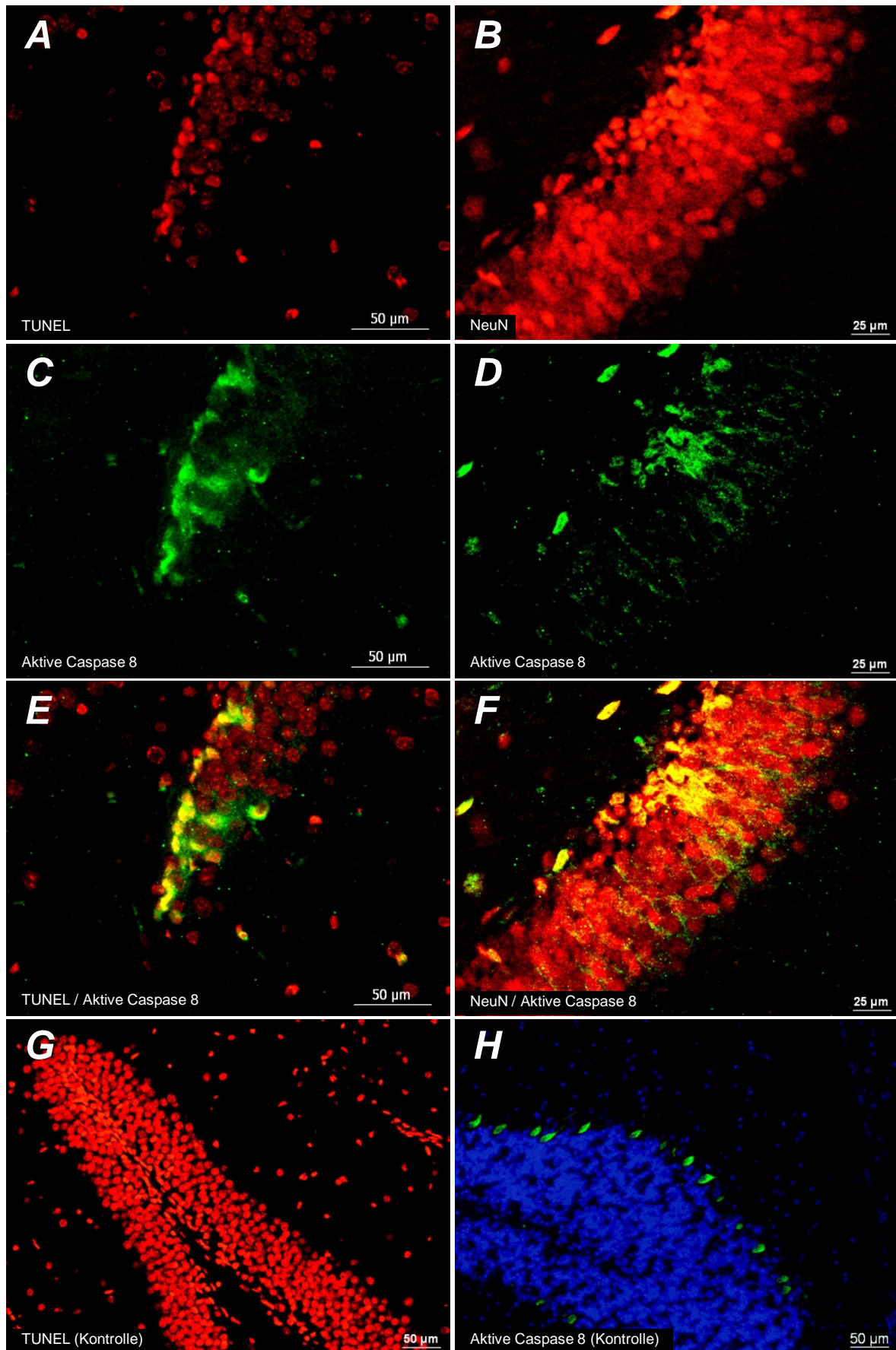
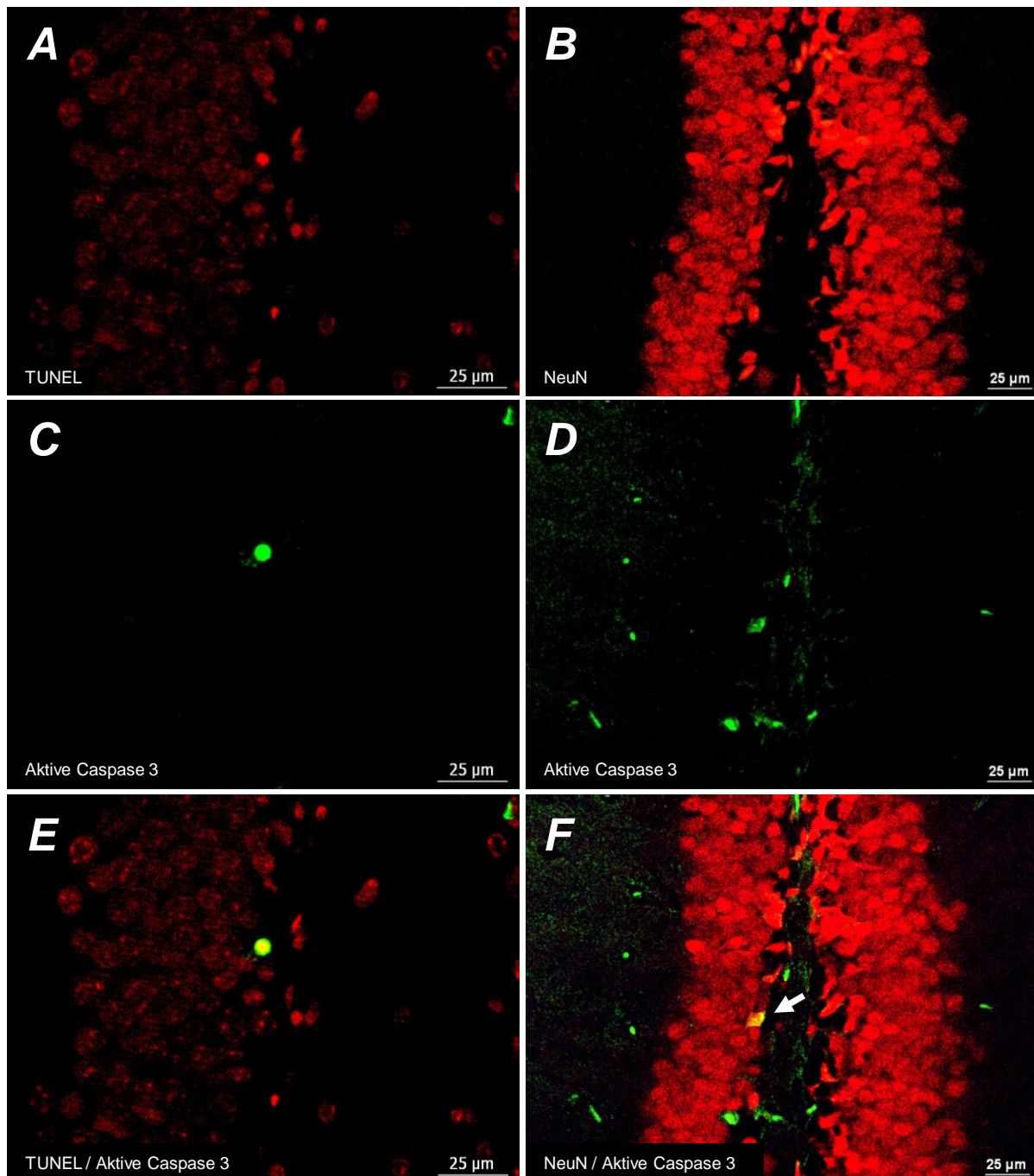


Abbildung 17: (Legende siehe Seite 46)



**Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (TUNEL und NeuN gegenüber aktiver Caspase-3)**

In der Hippokampusformation (Gyrus dentatus) von Faim2<sup>-/-</sup>-Versuchstieren konnten 24 h nach Infektion Kolokalisationen nachgewiesen werden zwischen aktiver Caspase-3 (C, grün) und TUNEL (A, rot) sowie aktiver Caspase-3 (D, grün) und NeuN (B, rot), dargestellt anhand eines gelben Mischsignals (E; F [weißer Pfeil]). Abk.: TUNEL = *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*; NeuN = *Neuronal Nuclei*.

Seite 45:

**Abbildung 17: Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (TUNEL und NeuN gegenüber aktiver Caspase-8)**

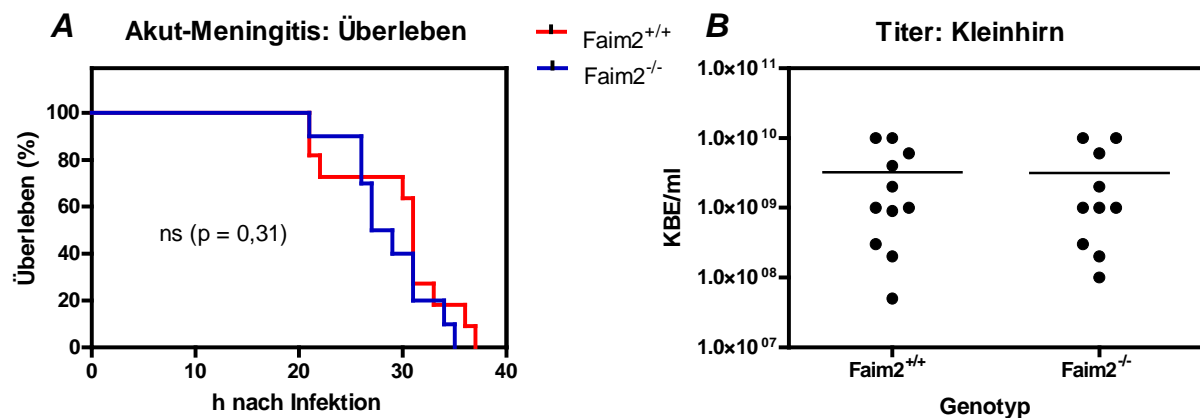
(A-F) In der Hippokampusformation (Gyrus dentatus) von Faim2<sup>-/-</sup>-Versuchstieren konnten 24 h nach Infektion Kolokalisationen nachgewiesen werden zwischen aktiver Caspase-8 (C, grün) und TUNEL (A, rot) sowie aktiver Caspase-8 (D, grün) und NeuN (B, rot), dargestellt anhand eines gelben Mischsignals (E und F). Abk.: TUNEL = *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*; NeuN = *Neuronal Nuclei*.

(G, H) Positivkontrollen für TUNEL (G, rot, DNase-induziert) und aktive Caspase-8 (H, grün, zerebelläre Purkinjezellen).

### 3.1.6 Genotypunabhängige Sterblichkeit nach unbehandelter SP3-Infektion

Mittels Durchführung eines Überlebensversuchs wurde an vier Monate alten Versuchstierkohorten der Einfluss von Faim2 auf die Sterblichkeit nach unbehandelter SP3-Infektion untersucht (Abbildung 19 A; Tabelle 8). Hierbei konnte kein signifikanter genotypbedingter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0,31$  im Log-Rang-Test). Das mediane Überleben betrug für die Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte 31 h und für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte 28 h, wobei das letzte Tier der Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte nach 37 h und das letzte Tier der Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte nach 35 h verstarb. Postmortal zeigten sich keine signifikanten Titerunterschiede hinsichtlich *S. pneumoniae* im Kleinhirn (jeweils etwa 10<sup>9</sup>- bis 10<sup>10</sup>-fach); Abbildung 19 B; Tabelle 8).

Zusammenfassend konnte anhand des Überlebensversuchs kein Einfluss von Faim2 auf die Sterblichkeit festgestellt werden, wobei die Sterblichkeit erwartungsgemäß 100 % betrug.



**Abbildung 19: Überlebensanalyse nach unbehandelter SP3-Infektion**

(A) Es zeigten sich keine vom Faim2-Genotyp abhängigen Überlebensunterschiede (Kaplan-Meier-Kurven;  $n = 11$  für Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte bzw.  $n = 10$  für Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; Log-Rang-Test; ns = nicht signifikant).

(B) Nachweis hoher Titer an *S. pneumoniae* (KBE/ml) sowohl im Kleinhirngewebe von Faim2<sup>+/+</sup>- als auch Faim2<sup>-/-</sup>-Versuchstieren ohne signifikanten Gruppenunterschied (horizontaler Balken im Punktwolkendiagramm = Mittelwert;  $n = 11$  für Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte bzw.  $n = 10$  für Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; *Student's t-Test* für unverbundene Stichproben; KBE = koloniebildende Einheit).

Parameter	Faim2-Genotyp	
	Wildtyp (+/+)	Nullmutante (-/-)
Alter der Kohorten (Tage) bei Präparation	125,1 ± 8,5	123,8 ± 7,94
Alter der Kohorten (Monate) bei Präparation	4,2 ± 0,28	4,1 ± 0,27
Kleinhirn (KBE/ml)	3,223 x 10 <sup>9</sup> ± 1,147 x 10 <sup>9</sup>	3,160 x 10 <sup>9</sup> ± 1,262 x 10 <sup>9</sup>

**Tabelle 8: Kohortenalter und Kleinhirn-Titer im Überlebensversuch (Mittelwert ± SEM)**

## **3.2 Die postmeningitische Rekonvaleszenzphase**

Für Analysen dieser Krankheitsphase wurden über mehrere Wochen Versuchskohorten verwendet, deren Alter bei Versuchsbeginn jeweils knapp 4,5 Monate betrug (Tabelle 9). Nach intrazerebraler SP3-Infektion bzw. NaCl-Kontrollinjektion wurden alle vier Kohorten über fünf Tage antibiotisch mit Ceftriaxon sowie über drei Tage mit dem Proliferationsmarker BrdU behandelt. Analog zum Modell der meningitischen Phase wurden zwecks klinischer Verlaufskontrolle bis zur einschließlich 7. Woche nach Infektion der klinische Phänotyp und Gewichtsverlust bestimmt sowie die Seiltest-Untersuchung durchgeführt. Zur Evaluation des räumlichen Lernvermögens, korrelierend mit hippokampaler synaptischer Plastizität, folgte anschließend die Untersuchung mit dem Morris-Wasserlabyrinth. An zusätzlichen Phänotypanalysen wurden zur Beurteilung lokomotorischer Aktivität und Explorationsverhaltens der „Offenes-Feld“-Test sowie zur Analyse von Koordinationsfähigkeit und Ausdauer der Rotarod-Test durchgeführt. Nach Tötung und Präparation der Versuchstiere erfolgten zwecks Untersuchung von Neurogenese-Vorgängen Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit BrdU und NeuN. Der Krankheitsverlauf nach Infektion wurde anhand einer Überlebensanalyse untersucht und dargestellt.

### ***3.2.1 Bestimmung klinischer Verlaufsparemeter durch Phänotypanalysen***

Zur Dokumentation des Krankheitsverlaufes wurden die Versuchstierkohorten anhand des Gewichtsverlustes (absolut und prozentual) sowie anhand von Seiltestuntersuchungen und eines klinischen Punktwertes untersucht (Abbildung 20; Tabelle 9; Kapitel 2.2.1.6).

Bei der Analyse der prozentualen und absoluten Gewichtsveränderung (Abbildung 20 A und B) ergaben sich Gewichtsverluste in beiden infizierten Versuchstierkohorten. Unter Zuhilfenahme einer linearen Regressionsanalyse zeigte sich hierbei ein im Vergleich zur Faim2<sup>-/-</sup>-Meningitis-Kohorte signifikant stärkerer prozentualer Gewichtsverlust in der Faim2<sup>+/+</sup>-Meningitis-Kohorte ( $p = 0,002$  beim Vergleich der Steigung der Regressionsgeraden). Sowohl in der Seiltestuntersuchung (Abbildung 20 C) als auch bei der Analyse des klinischen Phänotyps (Abbildung 20 D) zeigte sich in der Faim2<sup>+/+</sup>- und der Faim2<sup>-/-</sup>-Meningitis-Kohorte eine Leistungsbeeinträchtigung bzw. klinische Verschlechterung, jeweils illustriert durch hohe Punktwerte. Diese waren insbesondere in der Initialphase des Experiments während der ersten 5 Tage nach Infektion ausgeprägt und näherten sich nach 44 Tagen den Punktwerten der NaCl-Kontroll-Kohorten wieder an. Diese Effekte waren nicht genotypabhängig.

Zusammenfassend konnten in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase anhand der durchgeführten Phänotypanalysen Defizite der infizierten Versuchstierkohorten in den Bereichen ‚Motorik‘ und ‚allgemeiner klinischer Status‘ sowie zusätzlich Lethargie und Gewichtsverlust nachgewiesen werden. Es zeigte sich hierbei für den prozentualen Gewichtsverlust ein genotypabhängiger Effekt mit stärkerer Beeinträchtigung der Faim2<sup>+/+</sup>-Meningitis-Kohorte.



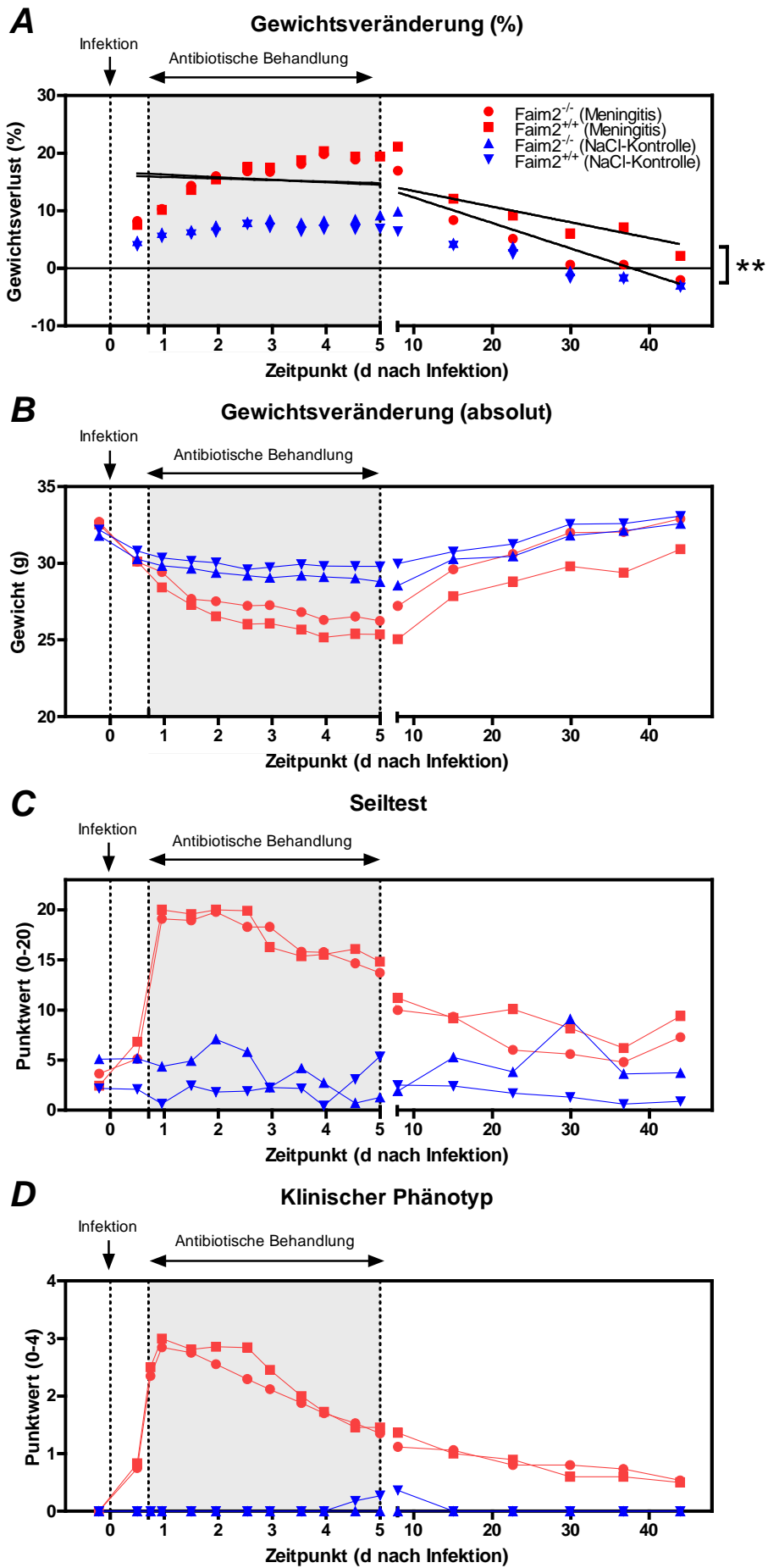


Abbildung 20: (Legende siehe Seite 50)

Stichprobengröße nach	Meningitis-Kohorte		NaCl-Kontroll-Kohorte	
	Faim2 <sup>+/+</sup>	Faim2 <sup>-/-</sup>	Faim2 <sup>+/+</sup>	Faim2 <sup>-/-</sup>
-0,21 Tagen	18	20	11	12
0,5 Tagen	18	20	11	12
0,96 Tagen	16	20	11	12
1,5 Tagen	14	18	11	12
1,96 Tagen	13	17	11	12
2,54 Tagen	11	17	11	12
2,96 Tagen	11	17	10	12
3,54 Tagen	11	17	11	12
3,96 Tagen	11	17	11	12
4,54 Tagen	11	17	11	12
5 Tagen	11	17	11	12
7,96 Tagen	10	16	10	12
15,04 Tagen	10	15	10	12
22,63 Tagen	10	15	10	12
29,92 Tagen	10	15	10	12
36,71 Tagen	10	15	10	12
43,96 Tagen	10	15	10	12
Alter der Kohorten (Tage) bei Versuchsbeginn vor Infektion	131,3 ± 10,24	133,2 ± 11,37	131,6 ± 12,27	133,3 ± 10,83
Alter der Kohorten (Monate) bei Versuchsbeginn vor Infektion	4,4 ± 0,34	4,4 ± 0,38	4,4 ± 0,41	4,4 ± 0,36
Alter der Kohorten (Tage) am 1. Tag der Akquisitionsphase	191,7 ± 12,89	194,7 ± 14,86	187,5 ± 13,12	192,0 ± 9,96
Alter der Kohorten (Monate) am 1. Tag der Akquisitionsphase	6,4 ± 0,43	6,5 ± 0,50	6,3 ± 0,44	6,4 ± 0,33

**Tabelle 9: Stichprobengrößen im zeitlichen Verlauf und Kohortenalter in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase (Mittelwert ± SEM)**

Seite 49:

**Abbildung 20: Phänotypanalysen zur Evaluation des Krankheitsverlaufs (postmeningitische Rekonvaleszenzphase)**

Darstellung von prozentualer (A) und absoluter (B) Gewichtsveränderung, motorischer Leistung im Seilttest (C) sowie klinischem Phänotyp (D) im Verlauf von 44 Tagen. Die prozentuale Gewichtsveränderung (A) der infizierten Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte war stärker ausgeprägt als die prozentuale Gewichtsveränderung der infizierten Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte (Mittelwerte; s. Tabelle 9 für Stichprobengrößen; Geraden in A = lineare Regression der prozentualen Gewichtsveränderung der infizierten Faim2<sup>+/+</sup>- und Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; \*\* = p < 0,01 beim Vergleich der Steigung der Regressionsgeraden).

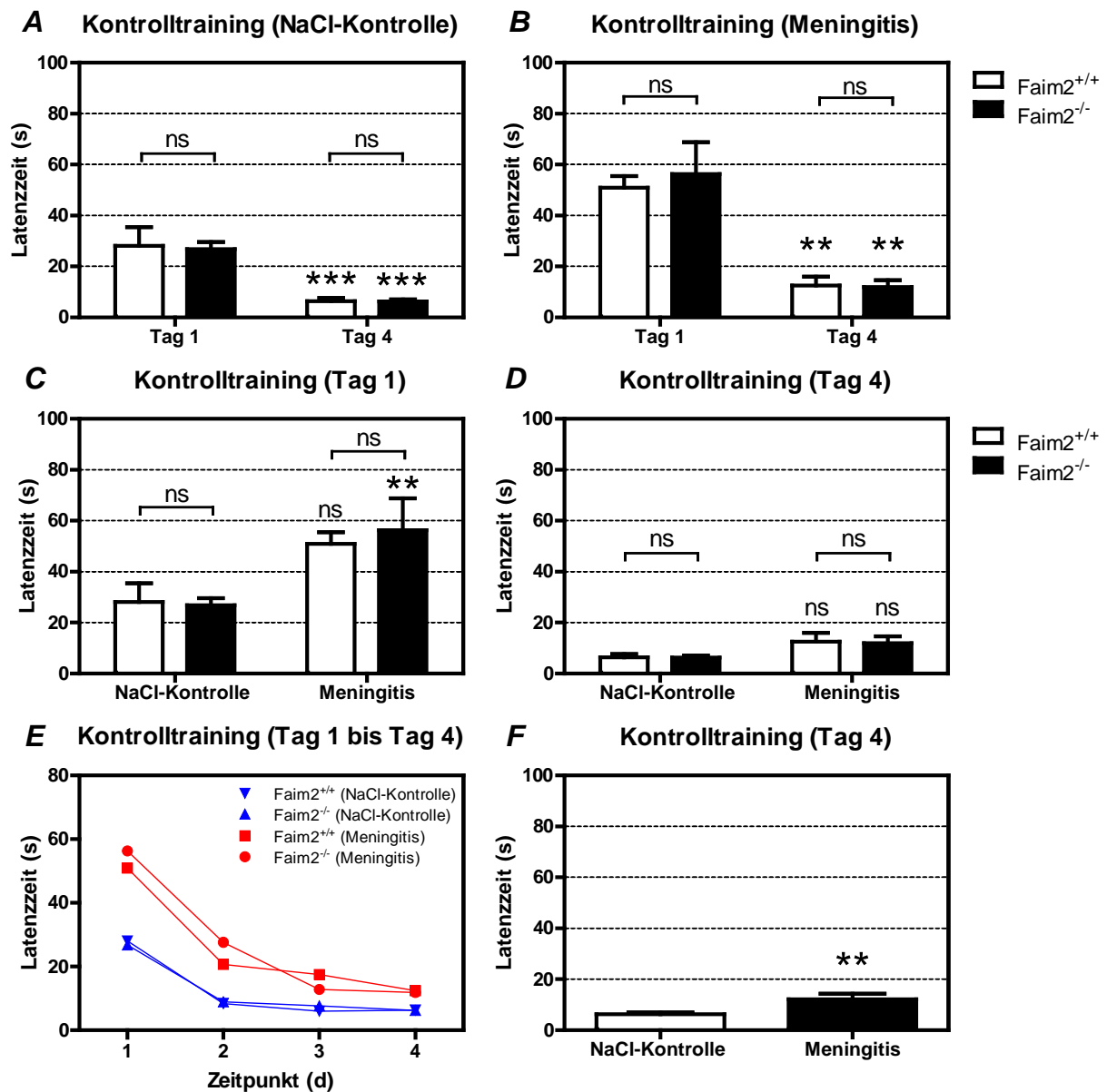
### 3.2.2 *Kontrolltraining als Teilnahmevoraussetzung des Morris-Wasserlabyrinth-Tests*

Das Kontrolltraining wurde der Akquisitions- und Umlernphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests vorgeschaltet, bestand aus 4 Messtagen und diente der grundsätzlichen Überprüfung der für eine Teilnahme an dem Versuch notwendigen basalen Fähigkeiten wie intaktes Sehvermögen, Schwimmfähigkeit und Kraft (Kapitel 2.2.1.7). Erfasst wurden hierbei die Latenzzeit zum Erreichen einer markierten Plattform sowie die durchschnittliche Schwimgeschwindigkeit (Abbildung 21), wobei eine Verkürzung der Latenzzeit nach 4 Tagen Training einen Lerneffekt und damit für den Morris Wasserlabyrinth-Test ausreichend vorhandene Fähigkeiten bescheinigte.

Hierbei konnte für alle untersuchten Kohorten solch ein Lerneffekt nachgewiesen werden. Für die NaCl-Kontroll-Kohorten (Abbildung 21 A) verringerte sich die Latenzzeit vom 1. Messtag (Mittelwerte: 28,1 s für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 26,8 s für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte) signifikant zum 4. Messtag (Mittelwerte: 6,4 s für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 6,2 s für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte). Analog verkürzte sich die Latenzzeit für die Meningitis-Kohorten (Abbildung 21 B) vom 1. Messtag (Mittelwerte: 50,9 s für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 56,3 s für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte) ebenfalls signifikant zum 4. Messtag (Mittelwerte: 12,4 s für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 11,9 s für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte). Signifikante genotypabhängige Gruppenunterschiede konnten hierbei nicht nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Latenzzeiten zwischen den NaCl-Kontroll-Kohorten und den infizierten Kohorten zeigte für den 1. Tag des Kontrolltrainings (Abbildung 21 C) erhöhte Werte der Meningitis-Kohorten. Am 4. Tag des Kontrolltrainings (Abbildung 21 D) zeigte sich ein Angleich der Testleistung der Meningitis-Kohorten zu der Testleistung der NaCl-Kontroll-Kohorten (Faim2<sup>+/+</sup>-Mittelwerte: 6,4 s für die NaCl-Kontroll- und 12,4 s für die Meningitis-Kohorte; Faim2<sup>-/-</sup>-Mittelwerte: 6,2 s für die NaCl-Kontroll- und 11,9 s für die Meningitis-Kohorte). Genotypabhängige Effekte waren jeweils nicht vorhanden. Im Gesamtvergleich unabhängig vom Genotyp war die Testleistung der infizierten Kohorten insgesamt signifikant schlechter als die Testleistung der NaCl-Kontroll-Kohorten am 4. Tag des Kontrolltrainings (Abbildung 21 F).

Zusammenfassend konnten anhand des durchgeführten Kontrolltrainings und der gemessenen Latenzzeit ausreichende und für den Morris-Wasserlabyrinth-Test notwendige Fähigkeiten der Versuchstiere aller Kohorten nachgewiesen werden. Genotypabhängige Effekte zeigten sich hierbei nicht.



**Abbildung 21: Analyse basaler Fähigkeiten als Voraussetzung für den Morris-Wasserlabyrinth-Test**

(A, B) Sowohl Versuchstiere der NaCl-Kontroll-Kohorten (A) als auch der Meningitis-Kohorten (B) zeigten eine nach Durchführung von 4 Tagen Kontrolltraining im Vergleich zum 1. Tag verbesserte und vom Faim2-Genotyp unabhängige Leistung, illustriert durch eine signifikant verkürzte Latenzzeit zum Erreichen der markierten Zielplattform (Mittelwerte  $\pm$  SEM; 4 Messungen pro Versuchstier und Tag;  $n = 10$  für NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und  $n = 13$  für NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte sowie  $n = 6$  für Meningitis-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und  $n = 7$  für Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; *Two-Way ANOVA* mit wiederholten Messungen, gefolgt vom Bonferroni-*post-hoc*-Test; Einfluss der Hauptvariablen: Interaktion Genotyp gegenüber Zeitpunkt nicht signifikant, Genotyp nicht signifikant, Zeitpunkt  $p < 0,0001$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$  bzw. \*\* =  $p < 0,01$  bzw. ns = nicht signifikant beim Vergleich Tag 1 gegenüber Tag 4, jeweils für die Faim2<sup>+/+</sup>- und Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte [einzelne Säulenmarkierungen], und beim Vergleich Faim2<sup>+/+</sup>- gegenüber Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, jeweils zu den beiden Zeitpunkten [verknüpfte Säulenmarkierungen]).

(C, D, F) Zu Beginn des Kontrolltrainings (C) konnten im Vergleich zu den NaCl-Kontrollkohorten erhöhte Latenzzeiten und damit eine schlechtere initiale Testleistung der infizierten Kohorten nachgewiesen werden, welche sich nach 4 Tagen Kontrolltraining (D) jeweils verbessert zeigten. Im Gesamtvergleich (F) unabhängig vom Genotyp zeigte sich eine signifikant schlechtere Testleistung der infizierten Kohorten (Mittelwerte  $\pm$  SEM; 4 Messungen pro Versuchstier und Tag [C, D]; Stichprobengrößen siehe [A, B] sowie  $n = 23$  für NaCl-Kontrolle [F] und  $n = 13$  für Meningitis [F]; *Two-Way ANOVA*, gefolgt vom Bonferroni-*post-hoc*-Test [C, D], bzw. *Student's t-Test* für unverbundene Stichproben [F]; Einfluss der Hauptvariablen: Interaktion Genotyp gegenüber Behandlung nicht signifikant [C, D], Genotyp nicht signifikant [C, D], Behandlung  $p < 0,001$  [C] bzw.  $p < 0,01$  [D]; \*\* =  $p < 0,01$  bzw. ns = nicht signifikant beim Vergleich NaCl-Kontrolle gegenüber Meningitis, jeweils für die Faim2<sup>+/+</sup>- und Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte [C, D] bzw. insgesamt [F] [einzelne Säulenmarkierungen], und beim Vergleich Faim2<sup>+/+</sup>- gegenüber Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, jeweils zu den beiden Behandlungskonditionen [verknüpfte Säulenmarkierungen]).

(E) Darstellung der Latenzzeit im Kontrolltraining über den Gesamtzeitraum von 4 Tagen (Mittelwerte).



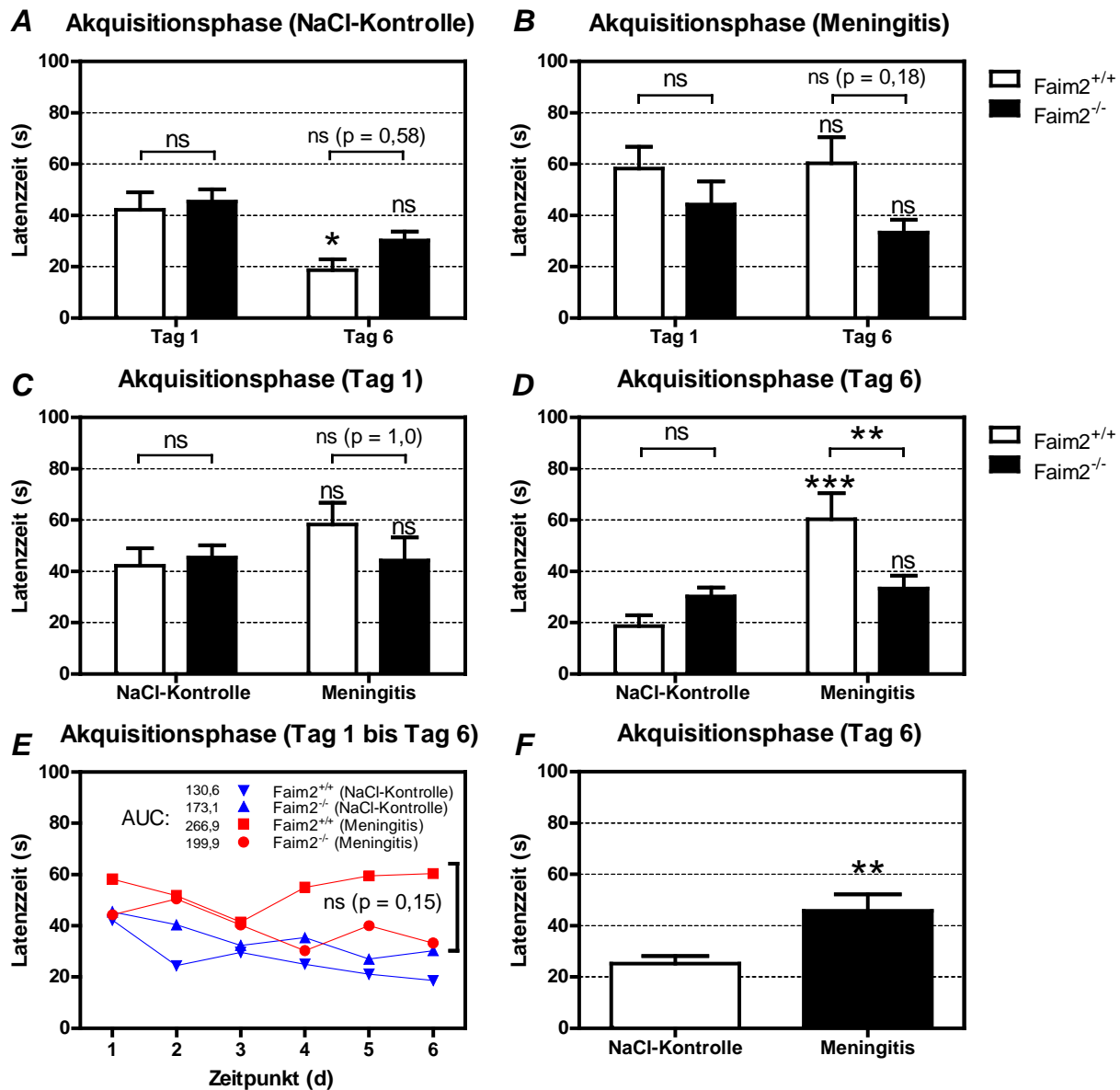
### 3.2.3 Genotyp- und behandlungsabhängige Leistung in der Akquisitionsphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests

Die Akquisitionsphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests folgte dem Kontrolltraining, bestand aus 7 Messtagen und diente der Untersuchung der räumlichen Lernfähigkeiten und des räumlichen Erinnerungsvermögens. Analog zum Kontrolltraining wurde hierbei während der ersten 6 Messtage die Latenzzeit zum Erreichen einer unmarkierten Plattform unter Zuhilfenahme räumlicher Hinweismarkierungen ermittelt (Phase des räumlichen Lernens) (Abbildung 22; Kapitel 2.2.1.7). Am 7. Messtag folgte die Ermittlung der prozentualen Aufenthaltszeit pro Quadrant anhand einer einzelnen Prüfmessung (Transfertest) zur Untersuchung einer örtlichen Präferenzentwicklung der einzelnen Kohorten (Phase der räumlichen Erinnerung) (Kapitel 3.2.4).

Es zeigte sich hierbei für die NaCl-Kontroll-Kohorten ein signifikanter räumlicher Lerneffekt für die Faim2<sup>+/+</sup>-, nicht jedoch für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, im Vergleich der Testleistung des 1. zum 6. Messtages (Abbildung 22 A; Mittelwerte des 1. Messtages: 42,2 s für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 45,4 s für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; Mittelwerte des 6. Messtages: 18,6 s für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 30,3 s für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte). Die analoge Untersuchung der infizierten Kohorten erbrachte für keine Gruppe einen signifikanten räumlichen Lerneffekt nach 6 Messtagen (Abbildung 22 B; Mittelwerte des 1. Messtages: 58,2 s für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 44,3 s für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; Mittelwerte des 6. Messtages: 60,4 s für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 33,3 s für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte).

Der Vergleich der Testleistung zu Beginn der Akquisitionsphase am 1. Messtag (Abbildung 22 C) zwischen den NaCl-Kontroll- und den infizierten Kohorten erbrachte keine signifikanten Gruppenunterschiede. Am 6. Messtag (Abbildung 22 D) zeigten sich genotypabhängige Effekte in Form einer Leistungsverbesserung aller Kohorten mit Ausnahme der infizierten Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte (Faim2<sup>+/+</sup>-Mittelwerte: 18,6 s für die NaCl-Kontroll- und 60,4 s für die Meningitis-Kohorte; Faim2<sup>-/-</sup>-Mittelwerte: 30,3 s für die NaCl-Kontroll- und 33,3 s für die Meningitis-Kohorte). Der Vergleich der Latenzzeit beider infizierter Kohorten über den Gesamtzeitraum von 6 Tagen mittels der Fläche unter der Kurve (engl., *area under the curve*, AUC) ergab zwar keinen signifikanten Unterschied, jedoch den höchsten AUC-Wert (266,9) für die infizierte Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte (Abbildung 22 E;  $p = 0,15$ ). Eine Analyse des Gesamtvergleichs der infizierten Kohorten gegenüber NaCl-Kontrollen unabhängig vom Faim2-Genotyp ergab insgesamt eine schlechtere Testleistung der Meningitis-Kohorten (Abbildung 22 F; Mittelwerte: 25,2 s für die NaCl-Kontroll- und 45,8 s für die Meningitis-Kohorten).

Zusammenfassend konnte anhand der Messung der Latenzzeit in der Akquisitionsphase ein Defizit im Prozess des räumlichen Lernens sowohl für die NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte als auch für die infizierte Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte sowie der Meningitis-Kohorten insgesamt nachgewiesen werden. Die Testleistung war nach 6 Tagen räumlichen Lernens für die NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte am besten und für die infizierte Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte am schlechtesten (Abbildung 22 E).



**Abbildung 22: Die Akquisitionsphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests (Tag 1 bis Tag 6)**

(A, B) Nach Durchführung von 6 Tagen räumlichen Lernens zeigte sich für die NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte, nicht jedoch für die NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, eine im Vergleich zum 1. Tag signifikant verbesserte Testleistung (A). Die Leistung der infizierten Kohorten (B) war nach 6 Tagen Training für beide Faim2-Gruppen nicht signifikant verbessert (Mittelwerte  $\pm$  SEM; 4 Messungen pro Versuchstier und Tag; n = 10 für NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und n = 13 für NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte sowie n = 6 für Meningitis-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und n = 7 für Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; *Two-Way ANOVA* mit wiederholten Messungen, gefolgt vom Bonferroni-*post-hoc*-Test; Einfluss der Hauptvariablen: Interaktion Genotyp gegenüber Zeitpunkt nicht signifikant [A, B], Genotyp nicht signifikant [A] bzw. p < 0,05 [B], Zeitpunkt p < 0,01 [A] bzw. nicht signifikant [B]; \* = p < 0,05 bzw. ns = nicht signifikant beim Vergleich Tag 1 gegenüber Tag 6, jeweils für die Faim2<sup>+/+</sup>- und Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte [einzelne Säulenmarkierungen], und beim Vergleich Faim2<sup>+/+</sup>- gegenüber Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, jeweils zu den beiden Zeitpunkten [verknüpfte Säulenmarkierungen]).

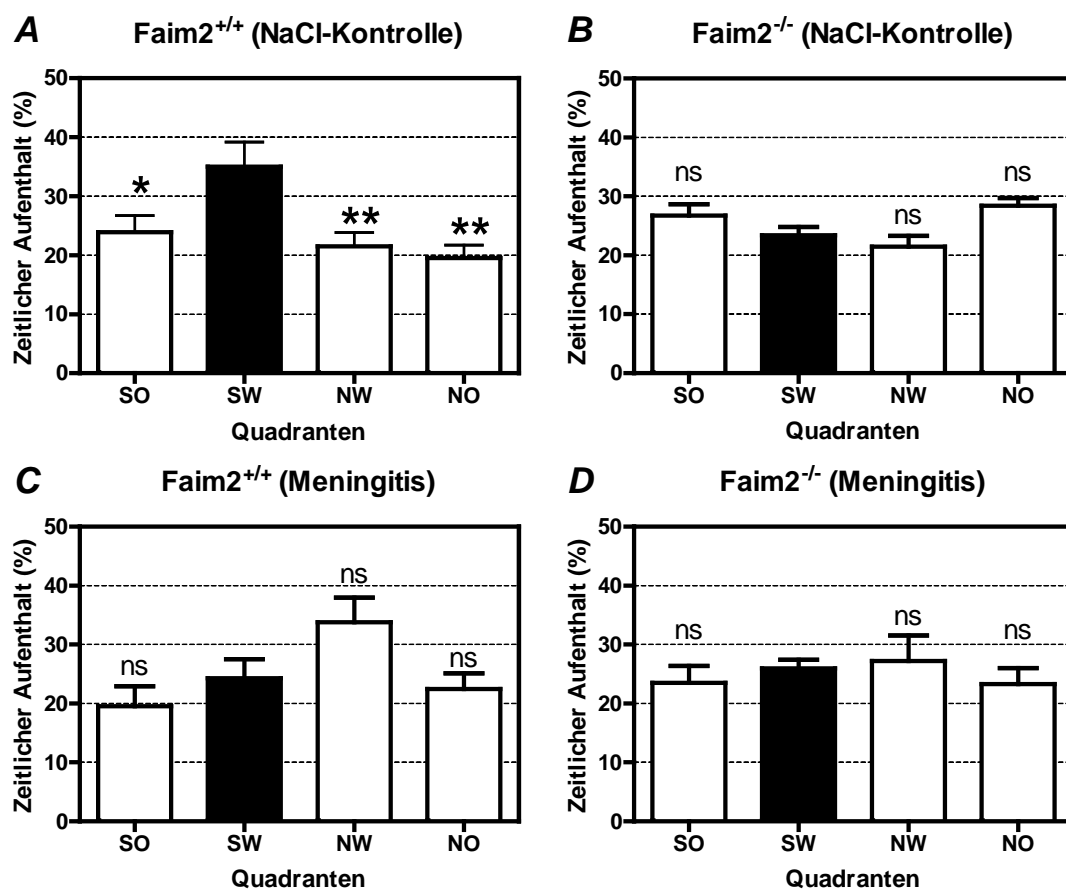
(C, D, F) Die initiale Leistung war zu Beginn der Akquisitionsphase (C) für alle Kohorten auf einem vergleichbaren Niveau. Nach 6 Tagen räumlichen Lernens (D) war die Leistung der infizierten Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte im Vergleich zur NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und zur infizierten Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte jeweils signifikant erhöht und damit schlechter. Im genotypunabhängigen Gesamtvergleich (F) zeigte sich eine schlechtere Leistung der infizierten Kohorten (Mittelwerte  $\pm$  SEM; 4 Messungen pro Versuchstier und Tag [C, D]; Stichprobengrößen siehe [A, B] sowie n = 23 für NaCl-Kontrolle [F] und n = 13 für Meningitis [F]; *Two-Way ANOVA*, gefolgt vom Bonferroni-*post-hoc*-Test [C, D] bzw. *Student's t*-Test für unverbundene Stichproben [F]; Einfluss der Hauptvariablen: Interaktion Genotyp gegenüber Behandlung nicht signifikant [C] bzw. p = 0,001 [D], Genotyp nicht signifikant [C, D], Behandlung nicht signifikant [C] bzw. p < 0,001 [D]; \*\* = p < 0,01 bzw. \*\*\* = p < 0,001 bzw. ns = nicht signifikant beim Vergleich NaCl-Kontrolle gegenüber Meningitis, jeweils für die Faim2<sup>+/+</sup>- und Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte [C, D] bzw. insgesamt [F] [einzelne Säulenmarkierungen], und beim Vergleich Faim2<sup>+/+</sup>- gegenüber Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, jeweils zu den beiden Behandlungskonditionen [verknüpfte Säulenmarkierungen]).

(E) Latenzzeit über den Gesamtzeitraum von 6 Tagen mit Vergleich der AUC der Meningitis-Faim2<sup>+/+</sup>- gegenüber der Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte (Mittelwerte; 4 Messungen pro Versuchstier und Tag; Stichprobengrößen siehe [A, B]; *Two-Way ANOVA*, gefolgt vom Bonferroni-*post-hoc*-Test; ns = nicht signifikant; AUC = area under the curve).

### 3.2.4 Genotyp- und behandlungsabhängige örtliche Präferenzentwicklung im Transfertest der Akquisitionsphase

Die Akquisitionsphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests wurde am 7. Messtag mittels der Bestimmung der prozentualen Aufenthaltszeit pro Quadrant anhand einer einzelnen Prüfmessung (Transfertest) zur Untersuchung einer örtlichen Präferenzentwicklung der einzelnen Kohorten abgeschlossen (Abbildung 23; Kapitel 2.2.1.7). Ein zeitlich hoher prozentualer Aufenthalt im südwestlichen Zielquadranten korrelierte hierbei mit einer ausgeprägteren Präferenzentwicklung und damit einhergehend mit einer stärkeren räumlichen Gedächtniskonsolidierung (räumliche Erinnerung).

Zusammenfassend zeigte sich hierbei für die NaCl-Kontroll-Kohorten eine Präferenzentwicklung für die Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte (Abbildung 23 A), nicht jedoch für die Faim2<sup>-/-</sup>- und die infizierten Kohorten (Abbildung 23 B, C, D). Der prozentuale zeitliche Aufenthalt im Zielquadranten betrug hierbei im Mittel für die NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte 35 % und für die NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte 23,4 % sowie für die infizierten Kohorten 24,3 % (Faim2<sup>+/+</sup>) respektive 26 % (Faim2<sup>-/-</sup>).



**Abbildung 23: Die Akquisitionsphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests (Transfertest, Tag 7)**

Die Messung des prozentualen zeitlichen Aufenthalts pro Quadranten am 7. Tag der Akquisitionsphase ergab den Nachweis einer örtlichen Präferenzentwicklung für die NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>- (A), nicht jedoch für die NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>-/-</sup>- (B) bzw. die infizierten (C, D) Kohorten (Mittelwerte ± SEM; 1 einminütige Messung pro Versuchstier; n = 10 für NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und n = 13 für NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte sowie n = 6 für Meningitis-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und n = 7 für Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; *One-Way ANOVA*, gefolgt vom *Dunnnett-post-hoc-Test*; \* = p < 0,05 bzw. \*\* = p < 0,01 bzw. ns = nicht signifikant beim Vergleich SW-Kontrollquadrant gegenüber SO-, NW- und NO-Quadrant; Abk.: SO=Südosten, SW= Südwesten, NW=Nordwesten, NO=Nordosten).

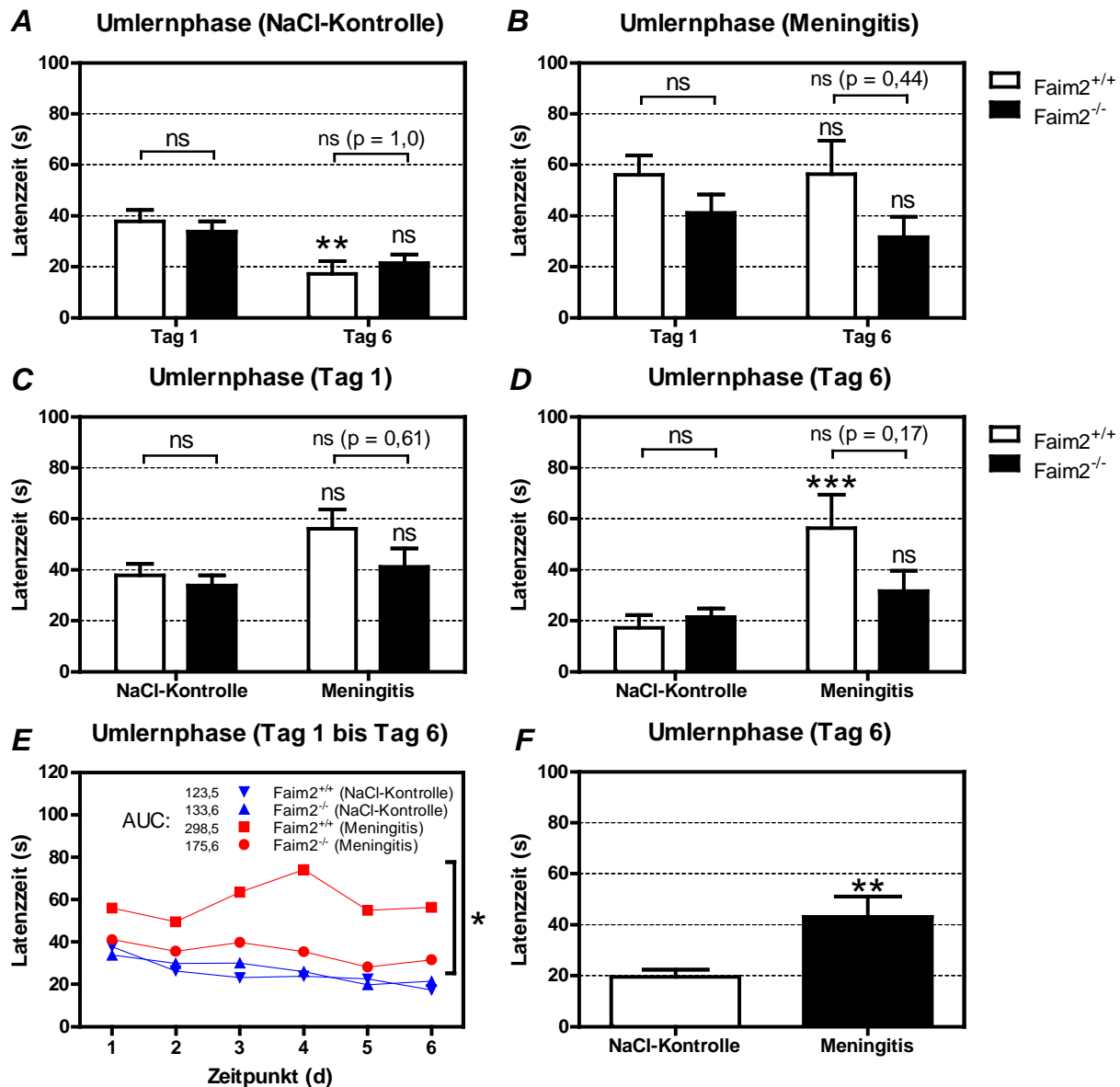
### **3.2.5 Genotyp- und behandlungsabhängige Leistung in der Umlernphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests**

Die Umlernphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests folgte der Akquisitionsphase, bestand ebenfalls aus 7 Messtagen und diente der Untersuchung der Lernflexibilität nach einer bereits erfolgten Trainingsphase. Mit Ausnahme der Zielposition der versteckten Plattform unterschied sich die technische Durchführung hierbei nicht von der Durchführung der Akquisitionsphase (Abbildung 24; Kapitel 2.2.1.7). Ebenfalls folgte am 7. Messtag die Ermittlung der prozentualen Aufenthaltszeit pro Quadrant anhand einer einzelnen Prüfmessung (Transfertest) zur Untersuchung einer örtlichen Präferenzentwicklung der einzelnen Kohorten (Kapitel 3.2.6).

Analog zur Akquisitionsphase zeigte sich hierbei für die NaCl-Kontroll-Kohorten ein signifikanter räumlicher Lerneffekt für die Faim2<sup>+/+</sup>-, nicht jedoch für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, im Vergleich der Testleistung des 1. zum 6. Messtages (Abbildung 24 A; Mittelwerte des 1. Messtages: 37,9 s für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 33,9 s für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; Mittelwerte des 6. Messtages: 17,3 s für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 21,4 s für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte). Ebenso erbrachte die Untersuchung der infizierten Kohorten für keine Gruppe einen signifikanten räumlichen Lerneffekt nach 6 Messtagen (Abbildung 24 B; Mittelwerte des 1. Messtages: 56,1 s für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 41,1 s für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; Mittelwerte des 6. Messtages: 56,4 s für die Faim2<sup>+/+</sup>- und 31,7 s für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte).

Auch konnten beim Vergleich der Testleistung zu Beginn der Umlernphase am 1. Messtag (Abbildung 24 C) zwischen den NaCl-Kontroll- und den infizierten Kohorten keine signifikanten Gruppenunterschiede nachgewiesen werden. Schließlich zeigte sich am 6. Messtag (Abbildung 24 D) wiederum als genotypabhängiger Effekt eine Leistungsverbesserung aller Kohorten mit Ausnahme der infizierten Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte (Faim2<sup>+/+</sup>-Mittelwerte: 17,3 s für die NaCl-Kontroll- und 56,4 s für die Meningitis-Kohorte; Faim2<sup>-/-</sup>-Mittelwerte: 21,4 s für die NaCl-Kontroll- und 31,7 s für die Meningitis-Kohorte). Der Vergleich der Latenzzeit beider infizierter Kohorten über den Gesamtzeitraum von 6 Tagen mittels der AUC ergab für die Umlernphase eine signifikant erhöhte Latenzzeit und damit schlechtere Testleistung für die infizierte Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte (Abbildung 24 E). Ebenfalls ergab eine Analyse des Gesamtvergleichs infizierter gegenüber NaCl-Kontrollen unabhängig vom Faim2-Genotyp erneut eine insgesamt schlechtere Testleistung der Meningitis-Kohorten (Abbildung 24 F; Mittelwerte: 19,6 s für die NaCl-Kontroll- und 43,1 s für die Meningitis-Kohorten).

Zusammenfassend konnten anhand der Umlernphase die vorherigen Ergebnisse der Akquisitionsphase reproduziert werden. Erneut wurden Defizite im Prozess des räumlichen Lernens sowohl für die NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte als auch für die infizierte Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte sowie der Meningitis-Kohorten insgesamt nachgewiesen. Wiederum war die Testleistung nach 6 Tagen räumlichen Lernens für die NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte am besten und für die infizierte Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte am schlechtesten (Abbildung 24 E).



**Abbildung 24: Die Umlernphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests (Tag 1 bis Tag 6)**

(A, B) Nach Durchführung von 6 Tagen räumlichen Lernens zeigte sich für die NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte, nicht jedoch für die NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, eine im Vergleich zum 1. Tag signifikant verbesserte Testleistung (A). Die Leistung der infizierten Kohorten (B) war nach 6 Tagen Training für beide Faim2-Gruppen nicht signifikant verbessert (Mittelwerte  $\pm$  SEM; 4 Messungen pro Versuchstier und Tag;  $n = 10$  für NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und  $n = 13$  für NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte sowie  $n = 6$  für Meningitis-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und  $n = 7$  für Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; *Two-Way ANOVA* mit wiederholten Messungen, gefolgt vom Bonferroni-*post-hoc*-Test; Einfluss der Hauptvariablen: Interaktion Genotyp gegenüber Zeitpunkt nicht signifikant [A, B], Genotyp nicht signifikant [A, B], Zeitpunkt  $p < 0,001$  [A] bzw. nicht signifikant [B]; \*\* =  $p < 0,01$  bzw. ns = nicht signifikant beim Vergleich Tag 1 gegenüber Tag 6, jeweils für die Faim2<sup>+/+</sup>- und Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte [einzelne Säulenmarkierungen], und beim Vergleich Faim2<sup>+/+</sup>- gegenüber Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, jeweils zu den beiden Zeitpunkten [verknüpfte Säulenmarkierungen]).

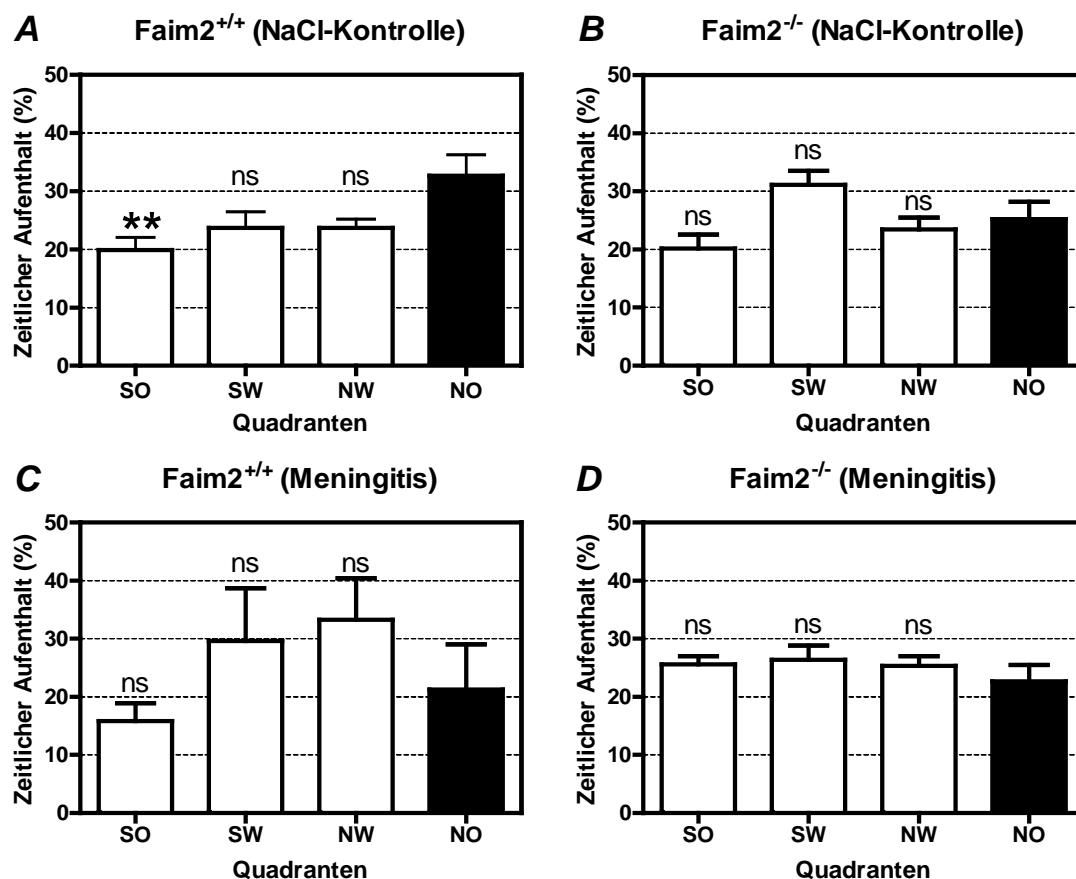
(C, D, F) Die initiale Testleistung war zu Beginn der Umlernphase (C) für alle Kohorten auf einem vergleichbaren Niveau. Nach 6 Tagen räumlichen Lernens (D) war die Testleistung der infizierten Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte im Vergleich zur NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte signifikant erhöht und damit schlechter. Im Gesamtvergleich (F) unabhängig vom Genotyp zeigte sich eine schlechtere Testleistung der infizierten Kohorten (Mittelwerte  $\pm$  SEM; 4 Messungen pro Versuchstier und Tag [C, D]; Stichprobengrößen siehe [A, B] sowie  $n = 23$  für NaCl-Kontrolle [F] und  $n = 13$  für Meningitis [F]; *Two-Way ANOVA*, gefolgt vom Bonferroni-*post-hoc*-Test [C, D] bzw. *Student's t*-Test für unverbundene Stichproben [F]; Einfluss der Hauptvariablen: Interaktion Genotyp gegenüber Behandlung nicht signifikant [C] bzw.  $p < 0,05$  [D], Genotyp nicht signifikant [C, D], Behandlung  $p < 0,05$  [C] bzw.  $p < 0,001$  [D]; \*\* =  $p < 0,01$  bzw. \*\*\* =  $p < 0,001$  bzw. ns = nicht signifikant beim Vergleich NaCl-Kontrolle gegenüber Meningitis, jeweils für die Faim2<sup>+/+</sup>- und Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte [C, D] bzw. insgesamt [F] [einzelne Säulenmarkierungen], und beim Vergleich Faim2<sup>+/+</sup>- gegenüber Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, jeweils zu den beiden Behandlungskonditionen [verknüpfte Säulenmarkierungen]).

(E) Latenzzeit über den Gesamtzeitraum von 6 Tagen mit signifikant erhöhter AUC der Meningitis-Faim2<sup>+/+</sup>- gegenüber der Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte (Mittelwerte; 4 Messungen pro Versuchstier und Tag; Stichprobengrößen siehe [A, B]; *Two-Way ANOVA*, gefolgt vom Bonferroni-*post-hoc*-Test; \* =  $p < 0,05$ ; AUC = area under the curve).

### 3.2.6 Genotyp- und behandlungsabhängige örtliche Präferenzentwicklung im Transfertest der Umlernphase

Auch die Umlernphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests endete am 7. Messtag mittels der Bestimmung der prozentualen Aufenthaltszeit pro Quadrant anhand einer einzelnen Prüfmessung (Transfertest) zur Untersuchung einer örtlichen Präferenzentwicklung der einzelnen Kohorten (Abbildung 25; Kapitel 2.2.1.7).

Analog zur Akquisitionsphase war die örtliche Präferenz für die nicht infizierte Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte (Abbildung 25 A) hierbei, im Gegensatz zu den übrigen Kohorten (Abbildung 25 B-D), am stärksten ausgeprägt. Es zeigte sich innerhalb dieser Kohorte ein signifikanter Unterschied zwischen dem NO-Ziel- und dem SO-Quadranten sowie im Vergleich der Kohorten untereinander der im Mittel höchste prozentuale zeitliche Aufenthalt im Zielquadranten (NaCl-Kontrolle-Mittelwerte: 32,7 % für Faim2<sup>+/+</sup> bzw. 25,2 % für Faim2<sup>-/-</sup>; Meningitis-Mittelwerte: 21,3 % für Faim2<sup>+/+</sup> bzw. 22,6 % für Faim2<sup>-/-</sup>).



**Abbildung 25: Die Umlernphase des Morris-Wasserlabyrinth-Tests (Transfertest, Tag 7)**

Die Messung des prozentualen zeitlichen Aufenthalts pro Quadranten am 7. Tag der Umlernphase ergab eine am deutlichsten ausgeprägte örtliche Präferenzentwicklung für die NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>- (A), weniger jedoch für die NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>-/-</sup>- (B) sowie die infizierten (C, D) Kohorten (Mittelwerte ± SEM; 1 einminütige Messung pro Versuchstier; n = 10 für NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und n = 13 für NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte sowie n = 6 für Meningitis-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und n = 7 für Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; *One-Way ANOVA*, gefolgt vom *Dunnnett-post-hoc*-Test; \*\* = p < 0,01 bzw. ns = nicht signifikant beim Vergleich NO-Kontrollquadrant gegenüber SO-, SW- und NW-Quadrant; Abk.: SO=Südosten, SW= Südwesten, NW=Nordwesten, NO=Nordosten).

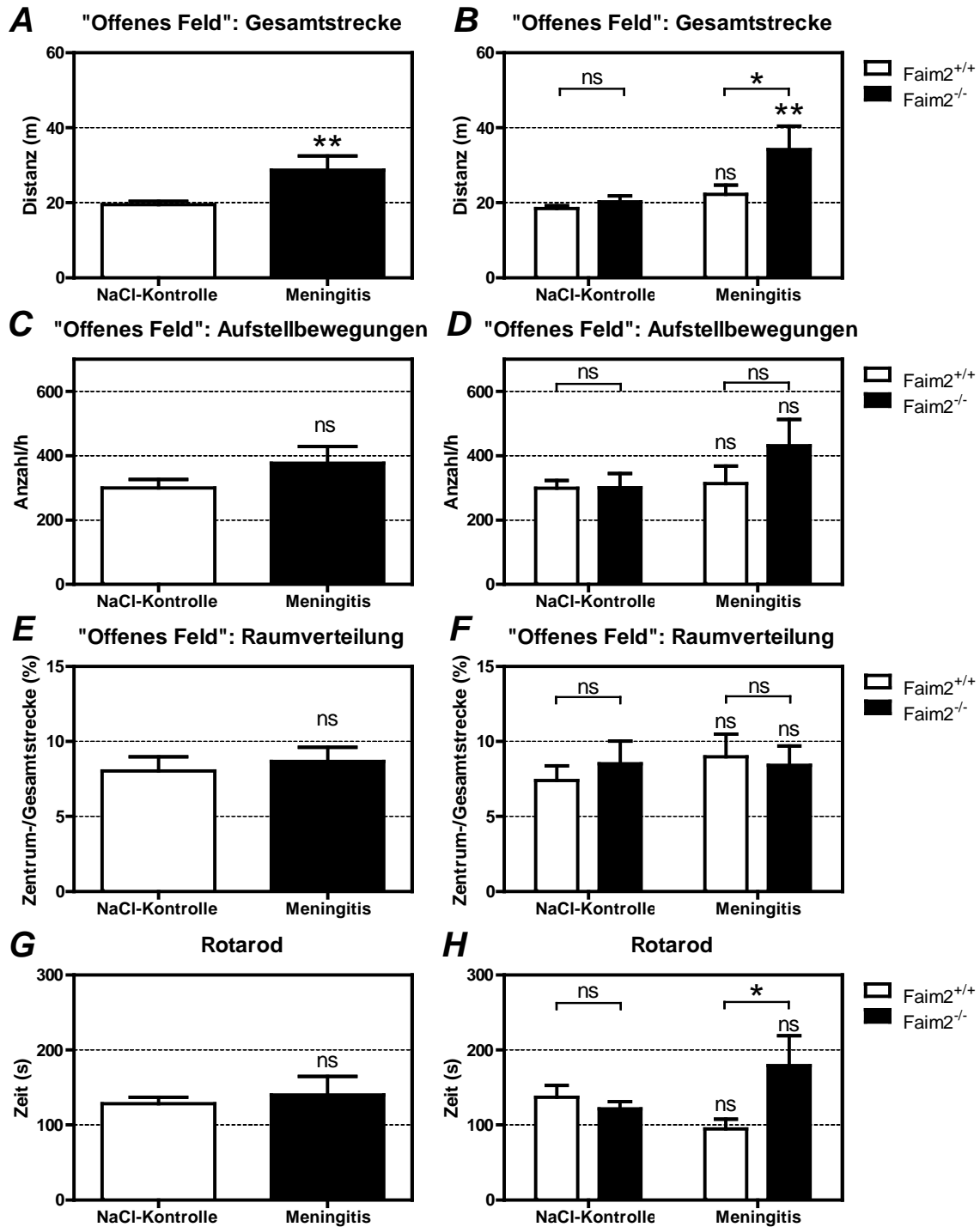
### ***3.2.7 Erhöhte lokomotorische Aktivität und gesteigertes Explorationsverhalten sowie verbesserte Koordinationsfähigkeit und Ausdauer in Faim2-defizienten Versuchstieren nach Infektion***

Nach Abschluß der Morris-Wasserlabyrinth-Untersuchungen dienten zur zusätzlichen Beurteilung lokomotorischer Aktivität und des Explorationsverhaltens der „Offenes-Feld“- (OFT) sowie zur Analyse von Koordinationsfähigkeit und Ausdauer der Rotarod-Test (Abbildung 26; Kapitel 2.2.1.8 und 2.2.1.9).

Hierbei offenbarte die einstündige „Offenes-Feld“-Messung ein insgesamt gesteigertes Aktivitätsniveau der infizierten Kohorten mit einer größeren zurückgelegten Distanz (Abbildung 26 A; Mittelwerte: 19,5 m für die NaCl-Kontroll- und 28,7 m für die Meningitis-Kohorten). Die absolvierte Wegstrecke der Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte war hierbei am deutlichsten ausgeprägt (Abbildung 26 B; Faim2<sup>+/+</sup>-Mittelwerte: 18,5 m für die NaCl-Kontroll- und 22,2 m für die Meningitis-Kohorte; Faim2<sup>-/-</sup>-Mittelwerte: 20,3 m für die NaCl-Kontroll- und 34,2 m für die Meningitis-Kohorte). Hinsichtlich der Aufstellbewegungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, jedoch kamen sie am häufigsten in der Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte vor (Mittelwerte insgesamt [Anzahl pro Stunde]: 299,7 für die NaCl-Kontroll- und 376,8 für die Meningitis-Kohorten [Abbildung 26 C]; Faim2<sup>+/+</sup>-Mittelwerte: 298,3 für die NaCl-Kontroll- und 313,5 für die Meningitis-Kohorte; Faim2<sup>-/-</sup>-Mittelwerte: 300,8 für die NaCl-Kontroll- und 431,0 für die Meningitis-Kohorte [Abbildung 26 D]). Zur Untersuchung der Raumverteilung wurde der prozentuale Anteil der im Zentrum des Untersuchungsfeldes gemessenen Laufstrecke an der Gesamtstrecke ermittelt, wobei sich eine gleichmäßige Verteilung im Kohortenvergleich ergab (Mittelwerte insgesamt: 8 % für die NaCl-Kontroll- und 8,7 % für die Meningitis-Kohorten [Abbildung 26 E]; Faim2<sup>+/+</sup>-Mittelwerte: 7,4 % für die NaCl-Kontroll- und 9 % für die Meningitis-Kohorte; Faim2<sup>-/-</sup>-Mittelwerte: 8,5 % für die NaCl-Kontroll- und 8,4 % für die Meningitis-Kohorte [Abbildung 26 F]).

Die Leistung im Rotarod-Test war im Gesamtvergleich zwischen NaCl-Kontrollen und den infizierten Kohorten ohne Unterschied, im einzelnen Vergleich für die Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte jedoch am besten (Mittelwerte insgesamt: 128,4 s für die NaCl-Kontroll- und 140,2 s für die Meningitis-Kohorten [Abbildung 26 G]; Faim2<sup>+/+</sup>-Mittelwerte: 137,1 s für die NaCl-Kontroll- und 94,7 s für die Meningitis-Kohorte; Faim2<sup>-/-</sup>-Mittelwerte: 121,6 s für die NaCl-Kontroll- und 179,2 für die Meningitis-Kohorte [Abbildung 26 H]).

Zusammenfassend konnten anhand der „Offenes-Feld“- sowie Rotarod-Untersuchungen eine erhöhte lokomotorische Aktivität und ein gesteigertes Explorationsverhalten für die infizierten Kohorten im Allgemeinen bzw. für die infizierte Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte im Speziellen sowie eine erhöhte Koordinationsfähigkeit und Ausdauer ebenfalls für die infizierte Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte nachgewiesen werden.



**Abbildung 26: Der „Offenes-Feld“- (OFT) und Rotarod-Test**

Lokomotorische Aktivität und Explorationsverhalten zeigten sich im OFT für die infizierten Kohorten im Vergleich zu den NaCl-Kontrollen insgesamt erhöht (A), wobei die zurückgelegte Distanz im Einzelnen für die Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte (B) am größten war. Hinsichtlich Aufstellbewegungen waren im OFT zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten nachweisbar, zeigten sich jedoch insgesamt am häufigsten in der Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte (C, D). Die Raumverteilung war im OFT gleichmäßig ausgeprägt (E, F). Auch Koordinationsfähigkeit und Ausdauer waren im Rotarod-Test für die Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte am stärksten ausgeprägt (G, H) (Mittelwerte ± SEM; 1 einstündige Messung [A-F] bzw. 3 Messungen pro Versuchstier [G, H]; n = 10 für NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und n = 13 für NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte sowie n = 6 für Meningitis-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und n = 7 für Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; *Student's t-Test* für unverbundene Stichproben [A, C, E, G] bzw. *Two-Way ANOVA*, gefolgt vom *Bonferroni-post-hoc-Test* [B, D, F, H]; Einfluss der Hauptvariablen: Interaktion Genotyp gegenüber Behandlung nicht signifikant [B, D, F] bzw. p < 0,05 [H], Genotyp p < 0,05 [B] bzw. nicht signifikant [D, F, H], Behandlung p < 0,01 [B] bzw. nicht signifikant [D, F, H]; \* = p < 0,05 bzw. \*\* = p < 0,01 bzw. ns = nicht signifikant beim Vergleich NaCl-Kontrolle gegenüber Meningitis, jeweils für die Faim2<sup>+/+</sup>- und Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte [B, D, F, H] bzw. im Gesamtvergleich [A, C, E, G] [einzelne Säulenmarkierungen], und beim Vergleich Faim2<sup>+/+</sup>- gegenüber Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, jeweils zu den beiden Behandlungskonditionen [verknüpfte Säulenmarkierungen]).



### ***3.2.8 Erhöhte Neurogenese in Faim2-defizienten Versuchstieren in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase***

Im Anschluss an die Verhaltensexperimente erfolgte die Tötung und Präparation der Versuchstiere zwecks Untersuchung von hippokampalen Neurogenese-Vorgängen im Gyrus dentatus mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit dem Proliferationsmarker BrdU und dem neuronalen Marker NeuN (Abbildung 27; Kapitel 2.2.2.5). Hierbei wurde die Dichte an BrdU/NeuN-positiven Zellen im Gyrus dentatus der Hippokampusformation ermittelt.

Hierbei zeigte sich 13 Wochen nach Infektion eine signifikant erhöhte Zelldichte BrdU/NeuN-positiver hippokampaler Neurone in der infizierten Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, verglichen mit der infizierten Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und der NaCl-behandelten Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte. Hinsichtlich der basalen Neurogenese unter NaCl-Kontrollbedingungen konnte kein signifikanter genotypabhängiger Effekt nachgewiesen werden (Mittelwerte nach NaCl-Injektion: 5,8 Zellen/mm<sup>2</sup> für die Faim2<sup>+/+</sup>- bzw. 7,4 Zellen/mm<sup>2</sup> für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; Mittelwerte nach Infektion: 11,3 Zellen/mm<sup>2</sup> für die Faim2<sup>+/+</sup>- bzw. 24,5 Zellen/mm<sup>2</sup> für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte) (Abbildung 27 A).

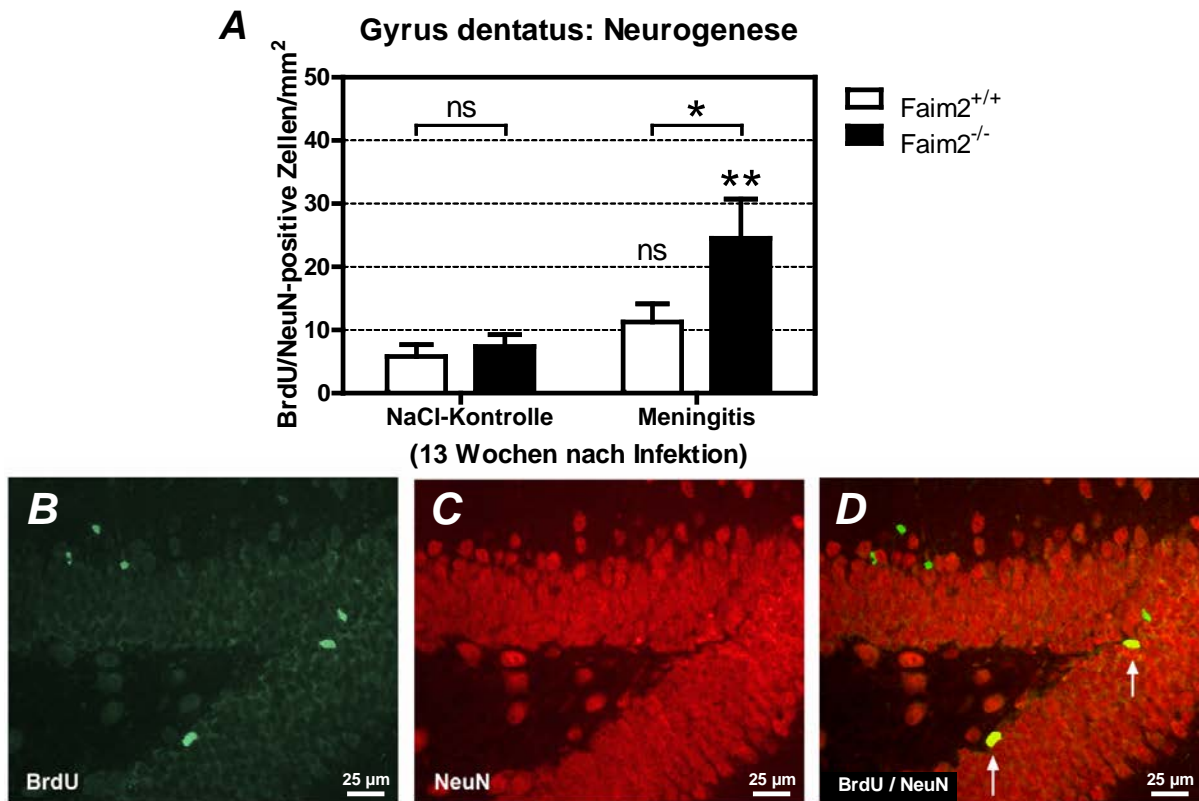
Zusammenfassend konnten anhand der BrdU/NeuN-Doppelfärbungen eine genotypabhängig erhöhte, durch ein Fehlen von Faim2 bedingte, Neurogenese-Rate in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase festgestellt werden.

### ***3.2.9 Genotypabhängige Sterblichkeit in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase***

In Analogie zum Modell der akuten meningitischen Phase (Kapitel 3.1.6) wurde der Einfluss von Faim2 auf die Sterblichkeit anhand einer Überlebensanalyse ebenfalls für das postmeningitische Rekonvaleszenzmodell untersucht. Hierbei wurde der frühe Zeitraum mit der höchsten Letalität während der ersten 6 Tage nach Infektion berücksichtigt (Abbildung 28).

Hierbei zeigte sich für die ersten 6 Versuchstage eine signifikant erhöhte Sterblichkeit der infizierten Faim2<sup>+/+</sup>- gegenüber der infizierten Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte (Abbildung 28) ( $p = 0,041$ ; Überlebensquoten nach 6 Tagen: 52,9 % für die Faim2<sup>+/+</sup>- sowie 85 % für die Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte).

Zusammenfassend konnten anhand der Überlebensanalyse unterschiedliche Sterblichkeitsraten der untersuchten Kohorten im postmeningitischen Rekonvaleszenzmodell festgestellt werden.

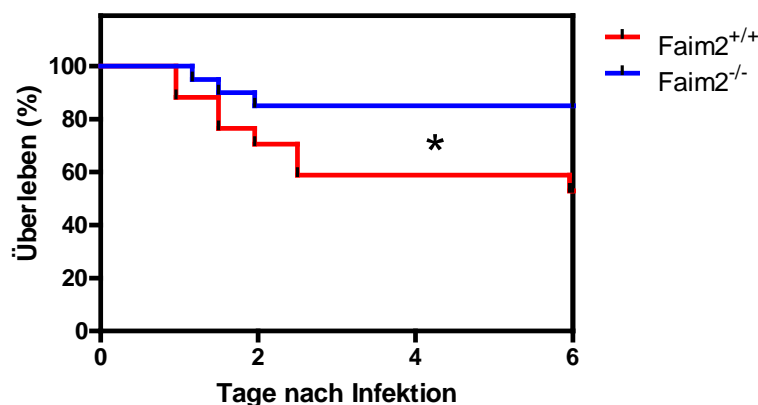


**Abbildung 27: Neurogenese im Gyrus dentatus der Hippokampusformation**

(A) 13 Wochen nach Infektion zeigte sich eine erhöhte Zelldichte BrdU/NeuN-positiver hippocampaler Neurone (gemessen im Gyrus dentatus) in der infizierten Faim2<sup>-/-</sup> gegenüber der infizierten Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte sowie gegenüber der NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte (Mittelwerte ± SEM; 1 Serienschnitt pro Versuchstiermittelwert; n = 10 für NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und n = 12 für NaCl-Kontrolle-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte sowie n = 5 für Meningitis-Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte und n = 7 für Meningitis-Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; *Two-Way ANOVA*, gefolgt vom Bonferroni-*post-hoc*-Test; Einfluss der Hauptvariablen: Interaktion Genotyp gegenüber Behandlung nicht signifikant, Genotyp p < 0,05, Behandlung p < 0,01; \* = p < 0,05 bzw. \*\* = p < 0,01 bzw. ns = nicht signifikant beim Vergleich NaCl-Kontrolle gegenüber Meningitis, jeweils für die Faim2<sup>+/+</sup>- und Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte [einzelne Säulenmarkierungen], und beim Vergleich Faim2<sup>+/+</sup>- gegenüber Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte, jeweils zu den beiden Behandlungskonditionen [verknüpfte Säulenmarkierungen]).

(B, C, D) Nachweis von Kolokalisationen zwischen BrdU (B, grün) und NeuN (C, rot), dargestellt anhand eines gelben Mischsignals (D [weiße Pfeile]). (Abk.: BrdU = 5-Bromo-2-Deoxyuridin, NeuN = *Neuronal Nuclei*.)

**Postmeningitische Rekonvaleszenzphase:  
Überleben (nach 6 Tagen)**



**Abbildung 28: Überlebensanalyse nach SP3-Infektion und antibiotischer Behandlung mit Ceftriaxon (postmeningitische Rekonvaleszenzphase)**

Nach 6 Tagen konnte eine signifikant erhöhte Sterblichkeit der infizierten Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte nachgewiesen werden (Kaplan-Meier-Kurven; n = 17 für Faim2<sup>+/+</sup>-Kohorte bzw. n = 20 für Faim2<sup>-/-</sup>-Kohorte; Log-Rang-Test; \* = p < 0,05).

### **3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der initiale Einfluss von Faim2 auf den Krankheitsverlauf bei Beginn der Erkrankung in einem Akutmodell der bakteriellen Meningitis untersucht (Kapitel 3.1). Hierbei zeigte sich keine Auswirkung von Faim2 auf den Ausprägungsgrad der Neuroinflammation, gemessen anhand von Titerbestimmungen und der histologischen Analyse meningealer Entzündung. Die untersuchten klinischen Verlaufsparemeter zur Beurteilung von Motorik, dem allgemeinen klinischen Status, Koordinationsfähigkeit und Ausdauer sowie Lethargie und Gewichtsverlust offenbarten eine Faim2-unabhängige Beeinträchtigung der Versuchstierkohorten. Auch das Gesamtüberleben war nicht von Faim2 beeinflusst. Hinsichtlich der hippocampalen Expression von Faim2 und Fas zeigte sich eine gegensätzliche Regulation mit einer infektionsbedingten erhöhten Expression von Fas und einer erniedrigten Expression von Faim2. Eine Defizienz von Faim2 führte außerdem zu einem erhöhten apoptotischen Schaden, gemessen im Gyrus dentatus der Hippokampusformation, mit einer Beteiligung von sowohl Initiations- als auch Effektorcaspasen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit, dem Modell der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase unter antibiotischer Behandlung mit Ceftriaxon, wurden Langzeiteffekte von Faim2 auf den Krankheitsverlauf untersucht (Kapitel 3.2). Bei der Untersuchung der klinischen Verlaufsparemeter während der ersten 7 Wochen nach Infektion zeigten sich Defizite der infizierten Versuchstierkohorten in den Bereichen Motorik und allgemeinem klinischen Status sowie zusätzlich Lethargie und Gewichtsverlust. Der prozentuale Gewichtsverlust der infizierten Kohorten war hierbei bei Fehlen von Faim2 geringer ausgeprägt. Faim2-Defizienz war in der ersten Woche nach Infektion außerdem mit einem erhöhten Gesamtüberleben assoziiert. Hippokampale Neurogenese wurde 13 Wochen nach Infektion bestimmt und war hierbei ebenfalls bei Fehlen von Faim2 erhöht. Analog hierzu zeigte sich anhand der Untersuchung des räumlichen Lernvermögens mit dem Morris-Wasserlabyrinth eine bessere Gedächtnisleistung der infizierten Faim2-defizienten Versuchstierkohorte gegenüber der infizierten Wildtyp-Kohorte. Die unbehandelte Faim2-defiziente Kohorte war hinsichtlich der räumlichen Lernfähigkeit ebenfalls beeinträchtigt. Lokomotorische Aktivität und Explorationsverhalten sowie Koordinationsfähigkeit und Ausdauer, untersucht mit dem „Offenes-Feld“- sowie dem Rotarod-Test, zeigten sich nach Infektion unter Faim2-Defizienz erhöht.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Faim2 in Abhängigkeit vom Zeitpunkt sowohl degenerative als auch regenerative Prozesse in einem Mausmodell der bakteriellen Meningitis moduliert und hierbei insbesondere spezifische Hippokampus-abhängige Funktionen beeinflusst. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf einen zusätzlichen Einfluss von Faim2 auf den klinischen Verlauf und Überleben.

## 4. DISKUSSION

### **4.1 Der Einfluss von Faim2 in der akuten meningitischen Phase**

Das mit Fas assoziierte Protein Faim2 ist ein proximaler Inhibitor FasL-induzierter Apoptose (Beier et al. 2005; Fernández et al. 2007; Somia et al. 1999). Das neuroprotektive Potential dieses regulatorischen Proteins konnte vor kurzem anhand einer generierten Nullmutanten-Mauslinie erstmalig auch *in vivo* in einem Mausmodell der zerebralen Ischämie demonstriert werden, wobei das Fehlen von Faim2 zu einem erhöhten neuronal-apoptotischen Schaden, einem größeren Volumen des Schlaganfalls und erhöhter neurologischer Beeinträchtigung im Akutstadium führte (Reich et al. 2011). Bei diesem Akutmodell standen unmittelbare Effekte von Faim2 als Untersuchungsgegenstand im Vordergrund. Es war daher naheliegend zu analysieren, ob Faim2 auch in weiteren Krankheitsmodellen und im Langzeitverlauf imstande ist, unmittelbare protektive Funktionen auszuüben. Es wurde daher zunächst ein Akutmodell der bakteriellen Meningitis verwendet, um diesen Sachverhalt detailliert zu untersuchen.

#### ***4.1.1 Faim2 beeinflusst weder Neuroinflammation noch den klinischen Phänotyp oder das Überleben in der akuten meningitischen Phase***

Anhand von Titerbestimmungen auf den Erreger *S. pneumoniae* Typ 3 konnte der prinzipielle Beweis geliefert werden, dass in den Gewebeproben von Blut, Kleinhirn und Milz ausreichende Konzentrationen des Erregers vorhanden waren und somit die Infektion erfolgreich stattgefunden hatte (Kapitel 3.1.1; Abbildung 13; Tabelle 7). Der Titer war hierbei im Kleinhirn (etwa  $10^8$ -fach) höher als im Blut und der Milz (etwa  $10^6$ - bis  $10^7$ -fach), was als Ausdruck der intrazerebral gesetzten Infektion und, dadurch bedingt, einer lokal erhöhten Erregerkonzentration gedeutet werden kann. Auch histologisch konnte eine meningeale granulozytäre Infiltration entsprechend nachgewiesen werden. Diese Größenordnungen und gewebeabhängigen Unterschiede entsprachen in etwa den Werten aus dem zuvor beschriebenen Meningitis-Mausmodell (Gerber et al. 2001). Somit waren die Ergebnisse und pathologischen Besonderheiten aller nachfolgenden Untersuchungen auch als infektionsbedingt anzusehen.

Es zeigte sich kein Einfluss von Faim2 auf die Höhe des Titers oder den Ausprägungsgrad der granulozytären meningealen Infiltration (Kapitel 3.1.1; Abbildung 13; Tabelle 7). Es konnte zuvor demonstriert werden, dass die akute Entzündungsantwort bei Mäusen mit einer Defizienz des Fas-Rezeptors (Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse) bzw. des Fas-Liganden (Fas<sup>gld</sup>-Mäuse) bei bakterieller Meningitis ebenfalls unverändert ist. Nach Induktion von bakterieller Meningitis war das Ausmaß hinsichtlich der Leukozytenkonzentration im Liquor cerebrospinalis, des intrakraniellen Drucks sowie der Gefäßpermeabilität (Blut-Hirn-Schranke) für Fas<sup>lpr</sup>- und Fas<sup>gld</sup>-Mäuse ohne signifikanten Unterschied. Der prozentuale Anteil apoptotischer neutrophiler Granulozyten zwischen Wildtyp- und Fas<sup>gld</sup>-Mäusen

war ebenfalls unverändert (Paul et al. 2004). Analog hierzu wurde berichtet, dass eine Defizienz von Fas respektive FasL keinen Einfluss auf die Extravasation oder Apoptose von neutrophilen Granulozyten bewirkt (Fecho und Cohen 1998). Es war daher auch nicht zu erwarten, dass ein Fas-Signalweg-modulierendes Protein einen entsprechenden entzündungsmodulierenden Effekt ausüben kann.

Die durchgeführten Phänotypanalysen in Form von Seiltest- und Rotaroduntersuchungen sowie die Bestimmung eines klinischen Punktwertes und Analyse des prozentualen Gewichtsverlustes zeigten den im Verlauf des Akutmodells zunehmenden Schweregrad der Erkrankung auf (Kapitel 3.1.2; Abbildung 14). Die Tatsache, dass sich die Schwere der klinischen Symptomatik erst nach 24 h, jedoch noch nicht nach 12 h herausstellte, ist hierbei nicht überraschend. Aus der ursprünglichen Beschreibung des angewandten Meningitis-Modells ist bekannt, dass sich die Symptome der bakteriellen Meningitis nach der Inokulation der Bakterien in diesem Zeitraum entwickeln. Es kommt in den ersten 12 h nach Infektionsbeginn zunächst zu einem progredienten Einstrom von Granulozyten in das ZNS, wobei eine klinische Beeinträchtigung zu diesem Zeitpunkt noch nicht im Vordergrund steht. Im weiteren Verlauf nimmt schließlich die Bewusstseinstörung zu, welche in der Regel ab 24 h nach Inokulation in einer ausgeprägten Symptomatik kumuliert (Gerber et al. 2001).

Ein Einfluss von Faim2 auf den Schweregrad des klinischen Phänotyps konnte hierbei jedoch weder zu einem bestimmten Zeitpunkt noch für eine definierte Untersuchungsmodalität festgestellt werden (Kapitel 3.1.2; Abbildung 14). Analog hierzu zeigte ein separat durchgeführter Überlebensversuch keinen Einfluss von Faim2 auf die Sterblichkeit im akuten Meningitis-Modell (Kapitel 3.1.6; Abbildung 19). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der zuvor beschriebenen Beobachtung, dass Faim2 den Entzündungsprozess ebenfalls nicht moduliert (s.o.). Insgesamt ist ein proportional-synchroner Ausprägungsgrad von Neuroinflammation, Klinik und Überleben, mit einer zunehmenden Schwere des Krankheitsbildes bei zunehmender Entzündung, zu erwarten. Der klinische Phänotyp von Mäusen mit einer Defizienz des Fas-Rezeptors (Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse) bzw. des Fas-Liganden (Fas<sup>gld</sup>-Mäuse) ist bei bakterieller Meningitis ebenfalls unverändert (Paul et al. 2004).

Der fehlende Einfluss von Faim2 auf den Ausprägungsgrad der akuten Entzündungsantwort, des klinischen Phänotyps und des Überlebens im akuten Meningitis-Modell unterstützt insofern die bisherige Annahme, dass das Fas-FasL-System keinen Einfluss auf Neuroinflammation im Mausmodell der bakteriellen Meningitis ausübt, sondern vermutlich in einem anderen funktionellen Zusammenhang steht. Dieser Verdacht wird durch die Befunde erhärtet, dass die Konzentration von Fas und von FasL im Liquor cerebrospinalis und die mRNA-Expression von Fas im Hirngewebe bei bakterieller Meningitis, trotz fehlender Einflussnahme auf Neuroinflammation, erhöht ist (Fassbender et al. 1999; Paul et al. 2004).

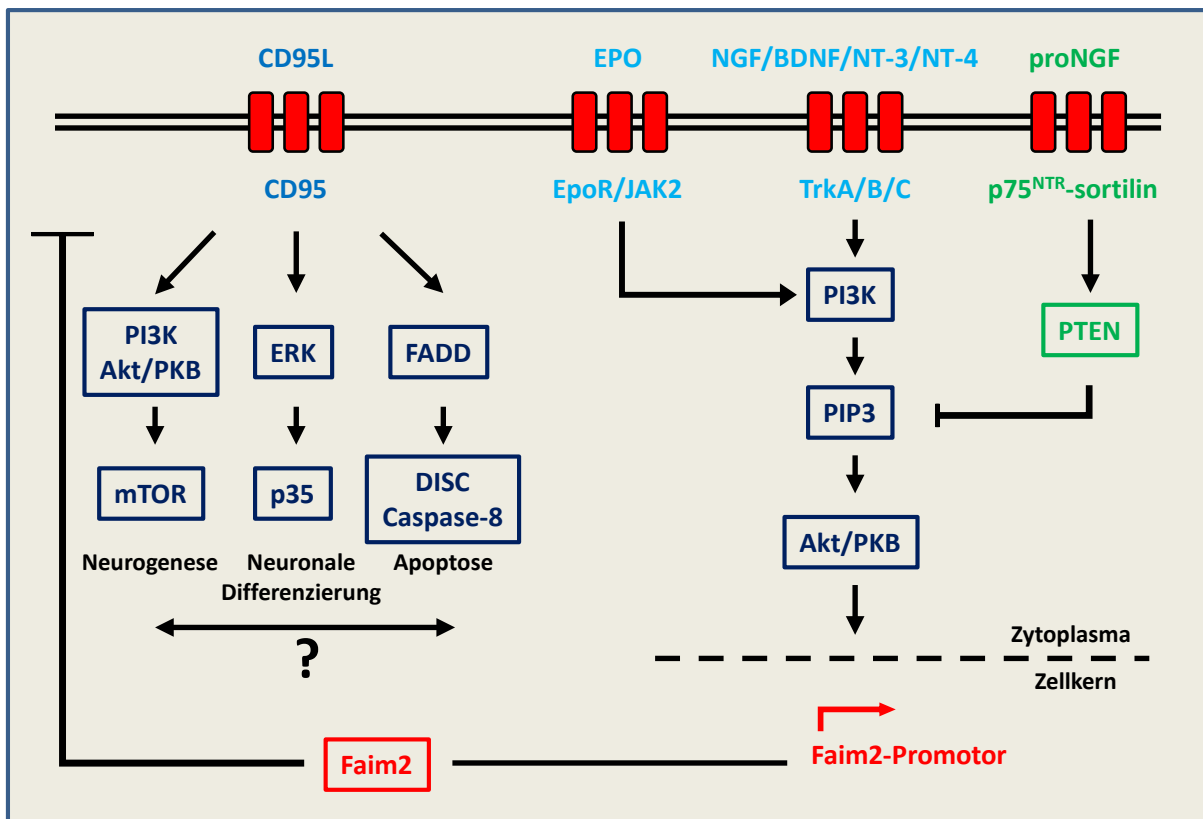
#### ***4.1.2 Neuroinflammation erhöht die hippocampale Fas-Expression und erniedrigt die hippocampale Faim2-Expression in der akuten meningitischen Phase***

Die durchgeführten Expressionsanalysen hinsichtlich hippocampaler Fas- sowie Faim2-Expression zeigten eine inverse Regulation nach 20 h Infektionsdauer mit einer Erhöhung von Fas und simultaner Erniedrigung von Faim2 auf (Kapitel 3.1.3; Abbildung 15). Bereits zuvor konnte demonstriert werden, dass die mRNA-Expression von Fas im Hirngewebe bei bakterieller Meningitis erhöht, die Expression der kurzen und langen Spleißvariante von Faim1 (Faim-S, Faim-L) jedoch gleichzeitig unverändert ist (Paul et al. 2004). Somit ist das nun vorliegende Ergebnis einer gleichzeitigen Erniedrigung der hippocampalen Faim2-Expression der erste Befund einer Beeinflussung dieses Fas-regulatorischen Proteins unter Neuroinflammation im Mausmodell der bakteriellen Meningitis.

Es stellen sich daher die Fragen, ob dieser Regulationsmechanismus einer Erhöhung von Fas und Erniedrigung von Faim2 erstens ein allgemeines Prinzip unter pathologischen Bedingungen darstellt, zweitens, welche Funktion er letztendlich ausübt und drittens, wie diese Regulation auf Signaltransduktionsebene kontrolliert wird. In einem Mausmodell der zerebralen Ischämie konnte ein analoger Mechanismus nachgewiesen werden. So war die Expression von Fas 3 h (akute Phase) und 18 h (postakute Phase) nach Ischämie-Induktion erhöht und die Expression von Faim2 in einem kürzeren Zeitfenster (18 h nach Ischämie; postakute Phase) erniedrigt. 48 h nach Ischämie war das basale Expressionsniveau von sowohl Fas als auch Faim2 wieder erreicht (Reich et al. 2011). Unter physiologischen Bedingungen liegt postnatal eine konstitutiv hohe Expression von Faim2 vor (Schweitzer et al. 1998). Aus funktioneller Sicht könnte somit eine initiale hohe Expression von Faim2 in der akuten Krankheitsphase vor Apoptose schützen, eine spätere Inhibition der Faim2-Expression jedoch in einer Fas-Sensitivierung und damit in der Aktivierung alternativer Todesrezeptor-Signalwege, wie der Induktion von neuroregenerativen Prozessen, münden (Kapitel 1.2). Die Regulation der Faim2-Expression erfolgt über den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt/Proteinkinase B-Signalweg (Beier et al. 2005). Gleichzeitig kann dieser Signalweg von Wachstumsfaktoren wie Erythropoetin (EPO) sowie von den unterschiedlichen Vertretern der Neurotrophin-Familie (NGF, BDNF, NT-3, NT-4) über verschiedene Rezeptorsysteme (EpoR/JAK2, TrkA/B/C) aktiviert werden und damit potentiell zur Expression von Faim2 und dadurch vermittelter Neuroprotektion führen (Kilic et al. 2005; Segal 2003; Sirén et al. 2001; Zheng et al. 2002) (Abbildung 29). So ist beispielsweise die hippocampale Expression von BDNF und dessen Rezeptor TrkB im Mausmodell der bakteriellen Meningitis erhöht (Tauber et al. 2005). Vom klassischen System dieser Neurotrophine einschließlich der ihnen zugeordneten Trk-Rezeptoren, welches typischerweise mit Überleben und Differenzierung in Verbindung gebracht wird, wird die Gruppe der ungespaltenen und potentiell proapoptotischen Vorläufermoleküle der Neurotrophine, die sogenannten Proneurotrophine, abgegrenzt (Ibáñez 2002). So kann beispielsweise proNGF sezerniert werden, an den spezialisierten Rezeptorkomplex p75<sup>NTR</sup>-sortilin binden und auf diese Weise die Aktivierung von PTEN, einen

Inhibitor des PI3K-Akt/PKB-Signalwegs, induzieren. Simultane Aktivierung von p75<sup>NTR</sup> durch proNGF und TrkB durch BDNF löst trotz Phosphorylierung von TrkB Apoptose in kultivierten Neuronen des basalen Vorderhirns aus (Song et al. 2010). Die proapoptotische Aktivierung von PTEN über proNGF kann somit ein möglicher Gegenmechanismus einer neuroprotektiven Aktivierung von Wachstumsfaktor- respektive Neurotrophin-Rezeptoren sein, wobei der Faim2-Promoter ein potentiell integrierendes Ziel dieser Interaktion darstellt (Abbildung 29).

Ob bzw. wie ein Wechsel eines apoptotischen in ein protektives Signal nach Aktivierung von CD95 auf Signaltransduktionsebene stattfinden könnte, ist derzeit unklar. Möglich ist auch, dass es sich hierbei um zwei unabhängige Mechanismen im Rahmen der Neuroplastizität handelt. In Hinblick auf räumliche Lernprozesse sind beispielsweise das simultane Hinzufügen und Entfernen hippocampaler Neurone notwendig und eng miteinander verwoben. So konnte demonstriert werden, dass räumliches Lernen Neurogenese dahingehend moduliert, dass sowohl das Entfernen unreifer hippocampaler Neurone per Apoptose als auch das Überleben differenzierter Neurone sowie die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen dafür erforderlich sind. Experimentelle Inhibition von Apoptose führt dabei zu Gedächtnisdefiziten und beeinträchtigt gleichzeitig die durch Lernen induzierte Proliferation und das Überleben hippocampaler Neurone (Dupret et al. 2007).



**Abbildung 29: Faim2-Expression, Neurogenese und Apoptose unter Neuroinflammation (Modell)**

(Abk.: CD95[L] = cluster of differentiation 95 [ligand], PI3K = Phosphatidylinositol-3-Kinase, AKT = v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 [= PKB = Proteinkinase B], mTOR = mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase), ERK = extracellular signal-regulated kinase, p35 = cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35), FADD = Fas-associated death domain, DISC = death-inducing signaling complex, Epo[R] = Erythropoietin [-Rezeptor], JAK2 = Janus kinase 2, NGF = nerve growth factor, BDNF = brain-derived neurotrophic factor, NT = Neurotrophin, Trk = tropomyosin-receptor-kinase, PIP3 = Phosphatidylinositol-3-Phosphat, p75<sup>NTR</sup> = p75 neurotrophin receptor, PTEN = phosphatase and tensin homolog, Faim2 = Fas apoptotic inhibitory molecule 2.)

### **4.1.3 *Faim2* ist neuroprotektiv in der akuten meningitischen Phase**

Anhand der durchgeführten TUNEL-Färbungen konnte gezeigt werden, dass *Faim2*-Defizienz zu einem erhöhten Ausmaß an neuronal-apoptotischem Zelltod im Gyrus dentatus der Hippokampusformation führt (Kapitel 3.1.4; Abbildung 16). Gleichzeitig konnte demonstriert werden, dass neuronale Apoptose dabei von der Aktivierung von Initiations- und Effektorcaspasen begleitet wird (Kapitel 3.1.5; Abbildung 17 und 18).

Somit konnte einerseits eine neuroprotektive Funktion von *Faim2* im akuten Meningitis-Modell aufgezeigt werden, wie es bereits zuvor für ein murines Modell der zerebralen Ischämie gelungen war (Reich et al. 2011). Andererseits liegt die Vermutung nahe, dass der extrinsische Apoptose-Signalweg (Kapitel 1.1) hierbei moduliert wird, da sowohl Caspase-8 als Initiationscaspase als auch Caspase-3 als Effektorcaspase am Apoptoseprozess beteiligt sind. Unter Berücksichtigung der ebenfalls erhöhten Fas-Expression im Hippokampus unter Infektion (Kapitel 4.1.2) ist somit der Schluss naheliegend, dass *Faim2 in vivo* eine proximal-regulatorische Funktion des Fas-FasL-Signalweges bei bakterieller Meningitis ausübt. Aktive Caspase-8 war im Vergleich zur aktiven Caspase-3 insgesamt häufiger darstellbar (Abbildung 17 und 18), was als Ausdruck der Frühphase der Erkrankung und somit einer zu diesem Zeitpunkt stärkeren Aktivierung proximaler Initiationscaspasen gedeutet werden kann. Auf Transkriptionsebene konnte in diesem Zusammenhang ebenfalls in einem murinen *S. pneumoniae*-Meningitis-Modell gezeigt werden, dass 12 h nach Infektion zunächst die Expression von Initiations- (Caspasen 2 und 8) und inflammatorischen Caspasen (Caspasen 1 und 12), anschließend 24 h nach Infektion die Expression von Caspase-3 als Effektorcaspase erhöht waren (von Mering et al. 2001) (Abbildung 1). Hippokampale Apoptose betraf in erster Linie Zellen der subgranulären Zone im Gyrus dentatus (Abbildung 16), wobei es sich vermutlich unter Berücksichtigung bereits zuvor durchgeführter Untersuchungen um unreife Neurone handelt (Bifrare et al. 2003).

Unter physiologischen Bedingungen (NaCl-Behandlung) fand sich einerseits kein genotypabhängiger Effekt in Hinblick auf hippokampale neuronale Apoptose, andererseits war die Dichte TUNEL-positiver Zellen der Wildtypgruppe auch unter Infektionsbedingungen nur knapp gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 16). In Einklang mit der erhöhten infektionsbedingten Fas-Expression im Hippokampus (Kapitel 4.1.2) kann daher vermutet werden, dass zum einen ein pathophysiologischer Stimulus notwendig erscheint, um den Fas-FasL-Signalweg zu aktivieren, und dass zum anderen eine initial hohe Expression von *Faim2* in der akuten Phase vor neuronaler Apoptose schützen könnte. Die Reduktion der *Faim2*-Expression im Verlauf der Infektion bleibt in der akuten Phase zwar fast ohne Konsequenz, kann sich aber möglicherweise auf Neurogenese und neuronale Differenzierung in einer Rekonvaleszenzphase auswirken (Kapitel 1.2, 4.1.2 und 4.2).



## **4.2 Der Einfluss von Faim2 in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase**

Langfristige Effekte von Faim2 in Krankheitsmodellen wurden bisher *in vivo* noch nicht untersucht. Seit einiger Zeit sammeln sich jedoch die Hinweise auch für neuroprotektive Funktionen des Fas-FasL-Signalweges (Kapitel 1.2), so dass sich die Frage stellt, ob Modulatoren der Fas-Signalkaskade hierbei einen Einfluss ausüben. Beispielsweise konnte vor kurzem unter Verwendung eines Mausmodells für Schädel-Hirn-Trauma gezeigt werden, dass eine Fas-Defizienz langfristig zu kognitiver Verschlechterung führt (Beier et al. 2007). Auch konnte schließlich demonstriert werden, dass Fas ein Aktivator adulter Neurogenese und neuronaler Differenzierung darstellt (Corsini et al. 2009). Es war daher naheliegend, neben der akuten Phase auch eine Rekonvaleszenzphase nach Meningitis heranzuziehen, um die Auswirkung von Faim2 unter dem Blickwinkel regenerativer Prozesse untersuchen zu können.

### ***4.2.1 Faim2-Defizienz resultiert in erhöhter hippocampaler Neurogenese und verbesserter Gedächtnisleistung in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase***

Anhand der durchgeführten Evaluation des räumlichen Lernvermögens unter Verwendung des Morris-Wasserlabyrinths konnte nachgewiesen werden, dass Faim-Defizienz in der postmeningitischen Phase (ab 7 Wochen nach Infektion; Akquisitionsphase) zu einer verbesserten Gedächtnisleistung führt. Im Gegensatz zu infizierten Wildtyp-Tieren konnten Faim2-defiziente Versuchstiere das Leistungsniveau nichtinfizierter Kontrolltiere erreichen (Kapitel 3.2.3; Abbildung 22). Dieses Ergebnis konnte anschließend in einer erneuten Testserie (Umlernphase) reproduziert werden (Kapitel 3.2.5; Abbildung 24). Gleichzeitig konnte unter postmortaler histologischer Analyse derselben Kohorten demonstriert werden, dass Faim2-Defizienz zu einem erhöhten Ausmaß an hippocampaler Neurogenese führt (Kapitel 3.2.8; Abbildung 27).

Hinsichtlich dieser Beeinflussung funktioneller und histologischer Parameter konnte somit erstmals eine regenerative Funktion von Faim2 in einem Krankheitsmodell *in vivo* aufgezeigt werden. Gleichzeitig unterstreichen diese Ergebnisse die funktionelle Komplexität des Fas/CD95-Rezeptorsystems hinsichtlich klassischer (apoptotischer) und alternativer (regenerativer) Funktionen (Kapitel 1.2). Als Regulator dieses Systems beeinflusst Faim2 sowohl degenerative als auch regenerative Funktionen, da Faim2-Defizienz in der akuten meningitischen Krankheitsphase zu erhöhter Apoptose (Kapitel 4.1.3) und in der Rekonvaleszenzphase zu erhöhter Neurogenese sowie verbesserter hippocampaler Funktion führt. Diese Ergebnisse unterstreichen zugleich die Schlussfolgerungen hinsichtlich der Faim2-Expressionsanalysen, dass in der Akutphase eine erhöhte antiapoptotische und in der postmeningitischen Phase eine erniedrigte proregenerative Faim2-Expression biologisch sinnvoll erscheinen (Kapitel 4.1.2). Unklar ist derzeit, ob Faim2 neben der

Funktion als Fas-Inhibitor auch den Wechsel zwischen neuronaler Apoptose, Neurogenese und neuronaler Differenzierung auf Signaltransduktionsebene beeinflusst (Abbildung 29).

Die Beobachtung erhöhter hippocampaler Neurogenese und verbesserter Gedächtnisleistung unter Wegfall des Fas-Inhibitors Faim2 geht einher mit einer Vielzahl von Befunden, welche das Vorhandensein neuronaler Differenzierung und Neurogenese an der Intaktheit des Fas/CD95-Systems koppeln. So führt eine genetisch induzierter Defizienz des Fas-Rezeptors (Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse) zu einer altersabhängigen und verzögerten Neuritregeneration in kultivierten Hinterwurzel-Spinalganglion-Neuronen sowie zu einem erhöhten prozentualen Anteil p75<sup>NTR</sup>-positiver Neurone (Hikawa et al. 1997). Da das Proneurotrophin-p75<sup>NTR</sup>-System über PTEN eine Inhibition des PI3K-Akt/PKB-Signalwegs und damit auch potentiell der Faim2-Expression ermöglicht, ist der Schluss naheliegend, dass bei Fehlen von Fas auf diese Weise Faim2 als Inhibitor von Fas reaktiv herunterreguliert werden kann (Kapitel 4.1.2). Analog führt eine Defizienz des p75<sup>NTR</sup>-Rezeptors zu reduzierter hippocampaler Neurogenese und subtiler Beeinträchtigung räumlichen Lernens (Catts et al. 2008; Colditz et al. 2010). *In vitro* führt die Quervernetzung von Fas über die Aktivierung des ERK-Signalwegs und von p35 zum Wachstum von Neuriten. Zusätzlich zeigt sich *in vivo* nach Verletzung des N. ischiadicus bei Fas-Rezeptor-Defizienz (Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse) eine verzögerte und nach Applikation von Fas-Antikörpern eine beschleunigte funktionelle Verbesserung (Desbarats et al. 2003). Die Aktivierung von Fas in kultivierten unreifen Neuronen induziert *in vivo* und *in vitro* keine Apoptose, sondern führt stattdessen zu einer Caspase-unabhängigen und Todesdomänen-abhängigen Zunahme der Verzweigung von Neuriten. Die Defizienz des Fas-Rezeptors (Fas<sup>lpr</sup>-Mäuse) respektive des Fas-Liganden (Fas<sup>gld</sup>-Mäuse) resultiert dabei in einer reduzierten Anzahl dendritischer Verzweigungen (Zuliani et al. 2006). Fas-Defizienz bewirkt zudem eine Atrophie dendritischer Verzweigungen in Pyramidenzellen von Kortex und Hippokampus (Šakić et al. 1998). *In vivo* führt eine Defizienz des Fas-Rezeptors 72 Stunden nach Schädel-Hirn-Trauma zwar zu einer verbesserten, langfristig (21 Tage nach Trauma) jedoch zu einer verschlechterten kognitiven Leistung (Beier et al. 2007). Adulte Neurogenese und neuronale Differenzierung kann schließlich über die Stimulation von Fas/CD95 und nachfolgender Aktivierung des pp60-src/PI3K/AKT/mTOR-Signalweges induziert werden (Corsini et al. 2009).

Die nichtinfizierte Faim2-Wildtyp-Kohorte erzielte im Vergleich aller Gruppen sowohl in der Akquisitions- als auch in der Umlernphase das jeweils beste Leistungsniveau hinsichtlich des räumlichen Lernvorgangs (Kapitel 3.2.3 und 3.2.5; Abbildung 22 und 24). Auch bezüglich des jeweils durchgeführten Transfertestes zeigte sich für diese Kohorte eine Bevorzugung des richtigen Zielquadranten, nicht jedoch für die übrigen Kohorten (Kapitel 3.2.4 und 3.2.6; Abbildung 23 und 25). Die Entwicklung einer örtlichen Präferenzentwicklung entspricht der Überführung des Gelernten in das Langzeitgedächtnis (Vorhees und Williams 2006). Infolgedessen scheint Faim2 für eine adäquate Gedächtniskonsolidierung unter physiologischen Bedingungen notwendig zu sein, möglicherweise hinsichtlich des Gleichgewichts zwischen apoptotischen und regenerativen Signalen.

#### ***4.2.2 Faim2-Defizienz führt zu verbesserter Koordinationsfähigkeit und gesteigertem Explorationsverhalten in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase***

Im Rotarod-Test zeigte sich eine verbesserte motorische Koordination und Ausdauer bei Faim2-Defizienz nach Infektion, illustriert durch eine beinahe doppelt so lange Laufzeit im Vergleich zur infizierten Faim2-Wildtypkohorte (Kapitel 3.2.7; Abbildung 26 H). Lokomotorische Aktivität und Explorationsverhalten, untersucht im „Offenes-Feld“-Test (OFT), waren unter Faim2-Defizienz bei gleichmäßiger Raumverteilung ebenfalls postmeningitisch gesteigert (Kapitel 3.2.7; Abbildung 26 B und F).

Der Rotarod-Test ist zur Untersuchung von motorischer Koordination, Balance und Ataxie weit verbreitet und erfordert eine intakte zerebelläre Funktion (Karl et al. 2003). Gleichzeitig konnte die neuroprotektive und entwicklungsbiologische Bedeutung von Faim2 in zerebellären Körnerzellen und Purkinjezellen ausführlich demonstriert werden (Beier et al. 2005; Fernández et al. 2007; Hurtado de Mendoza et al. 2011). Unter Berücksichtigung der verbesserten Leistung Faim2-defizienter Versuchstiere im Rotarod-Test erscheint es daher möglich, dass Faim2 in der postmeningitischen Phase auch zerebelläre Apoptose und Regeneration moduliert.

Verhalten im OFT kann neben der Explorationsaktivität grundsätzlich auch durch Emotionalität und Angst beeinflusst werden, wobei die Tendenzen, einerseits eine neue Umgebung zu erkunden und andererseits ein hell beleuchtetes und offenes Areal zu vermeiden, einen natürlichen Konflikt innerhalb von Mäusen widerspiegeln und hierbei anhand der horizontalen (Gesamtstrecke) und vertikalen (Aufstellbewegungen) Aktivität einerseits sowie des Verhältnisses der im Zentrum des Untersuchungsfeldes gemessenen Laufstrecke an der Gesamtstrecke (Raumverteilung) andererseits näher charakterisiert werden können (Karl et al. 2003; Whimbey und Denenberg 1967). Da die Raumverteilung im Vergleich aller Faim2-Kohorten gleichmäßig ausgeprägt war, kann geschlossen werden, dass Emotionalität und Angst als mögliche Einflussfaktoren auf den gemessenen Unterschied im Explorationsverhalten daher keinen wesentlichen Einfluss ausüben (Kapitel 3.2.7; Abbildung 26 B und F). Sowohl körperliche Aktivität als auch Neuroinflammation bei bakterieller Meningitis sind Stimulatoren hippocampaler Neurogenese (Gerber et al. 2003; van Praag et al. 1999). Interessanterweise konnte kürzlich demonstriert werden, dass genetisch induzierte Neurogenese zwar nicht unter basalen Bedingungen, jedoch in Kombination mit zusätzlicher körperlicher Aktivität unter Verwendung von Laufrädern, ebenfalls zu einem verstärkten Explorationsverhalten von Mäusen führt (Sahay et al. 2011). Analog hierzu war in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase das Explorationsverhalten der Faim2-defizienten Kohorten zwar nicht unter Kontrollbedingungen nach NaCl-Injektion, jedoch nach SP3-Infektion gesteigert (Kapitel 3.2.7; Abbildung 26 B). Es kann daher erstens angenommen werden, dass der Gyrus dentatus, und damit verbunden Neurogenese in der SGZ, exploratives Verhalten offensichtlich moduliert und Exploration deshalb zum Teil auch eine Hippokampus-abhängige Funktion darstellt und mit dem

räumlichen Lernprozess interagiert (Saab et al. 2009), zweitens, dass auf quantitativer Ebene ein zusätzlicher Neurogenese-stimulierender Reiz notwendig sein kann, um Unterschiede im Ausmaß der Exploration zu bewirken, und drittens, dass Faim2 eine explorationsmodulierende Funktion ausübt, möglicherweise im Zusammenhang mit einer Regulation hippocampaler Neurogenese (Kapitel 4.2.1).

#### ***4.2.3 Faim2-Defizienz geht einher mit verringerter klinischer Beeinträchtigung und Sterblichkeit in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase***

Die Analyse klinischer Verlaufsparemeter nach Infektion zur Dokumentation des Krankheitsverlaufes erbrachte den Befund, dass Faim2-Defizienz in der postmeningitischen Phase mit einem geringeren prozentualen Gewichtsverlust und damit einer geringeren klinischen Beeinträchtigung einhergeht. Im Gegensatz zu infizierten Wildtyp-Tieren konnten Faim2-defiziente Versuchstiere das Gewicht nichtinfizierter Kontrolltiere erreichen (Kapitel 3.2.1; Abbildung 20). Gleichzeitig konnte anhand einer Überlebensanalyse dargestellt werden, dass Faim2-Defizienz zusätzlich mit einer verringerten Sterblichkeit einhergeht (Kapitel 3.2.9; Abbildung 28). Die Überlebensquote betrug 6 Tage nach Infektion 52,9 % für die Faim2-Wildtypkohorte und entsprach damit in etwa der zu erwartenden Quote für das zuvor beschriebene Meningitis-Mausmodell (Gerber et al. 2001). Die Überlebensquote für die Faim2-defiziente Kohorte war mit 85 % nach 6 Tagen demgegenüber deutlich verbessert. Eine theoretisch vorstellbare Beeinflussung der Morris-Wasserlabyrinth-Ergebnisse aufgrund klinischer Beeinträchtigung kann ausgeschlossen werden, da das Kontrolltraining, welches basale physische Fertigkeiten überprüft, am Ende von Tag 4 keinen genotypabhängigen Effekt aufgezeigt hat (Abbildung 21 D).

Neben der Beeinflussung hippocampaler Neurogenese und Hippokampus-abhängiger Funktionen (Kapitel 4.2.1 und 4.2.2) konnten somit Hinweise auf die zusätzliche Beeinflussung klinischer Parameter durch Faim2 nachgewiesen werden. Ein möglicher Einfluss von Faim2 auf die zweite neurogene Nische, die subventrikuläre Zone (SVZ), war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit und hat daher grundsätzlich spekulativen Charakter. Es stellen sich jedoch die Fragen, ob die Induktion von Neurogenese in der SVZ, im Sinne einer reaktiven Aktivierung neuronaler Vorläuferzellen als Reaktion auf einen pathologischen Stimulus, bei der Beeinflussung dieser klinischen Endpunkte erstens eine Rolle spielen könnte, zweitens, auf welchem Wege eine neuronale Regeneration, als Migration von Zellen dieser neurogenen Nische zum geschädigten Ort oder als Rekrutierung vor Ort an der Stelle des Defekts, möglich erscheint und drittens, ob Neurogenese-Regulation durch Faim2 als entscheidender Mechanismus hierfür prinzipiell in Frage kommt. Die Förderung adulter Neurogenese in der subgranulären (SGZ) und insbesondere der subventrikulären (SVZ) Zone durch pathologische Stimuli, wie z.B. bei zerebraler Ischämie, konnte in zahlreichen tierexperimentellen Studien demonstriert werden (Ohira 2011). Experimentell induzierte zerebrale Ischämie führt im Tiermodell zur Proliferation in der SVZ, zur Migration neuronaler Vorläuferzellen

von der SVZ in das geschädigte Striatum und dortiger weiterer Ausdifferenzierung (Arvidsson et al. 2002; Parent et al. 2002). Neuronale Vorläuferzellen der rostralen SVZ, nicht jedoch des Gyrus dentatus, migrieren im Tiermodell in die ischämische Penumbra des angrenzenden Striatums und, über den rostralen migratorischen und den lateralen kortikalen Strom, in die Penumbra des ischämischen zerebralen Kortex (Jin et al. 2003). Die Produktion neuronaler Vorläuferzellen hält mindestens vier Monate nach experimentell induzierter Ischämie an und geht in diesem Zeitraum mit einer kontinuierlichen physisch-funktionellen Verbesserung einher (Thored et al. 2006). Neben Migration kann auch ortsständige kortikale Neurogenese experimentell induziert werden und findet nach zerebraler Ischämie statt (Jiang W et al. 2001; Magavi et al. 2000). Zahlreiche tierexperimentelle Studien haben zudem gezeigt, dass Neurogenese- und Angiogenese-fördernde Maßnahmen, wie beispielweise der therapeutische Einsatz von Wachstumsfaktoren wie EPO, nach einer Hirnschädigung auch klinische Endpunkte positiv beeinflussen (Xiong et al. 2010). Gleichzeitig können Regenerationsanzeichen magnetresonanztomographisch dargestellt werden, welche dabei mit neurologischer Funktion korrelieren (Chopp et al. 2007; Jiang Q et al. 2006). Interessanterweise führt die Inhibition von Neurogenese mittels Bestrahlung zu einer Exazerbation der nach zerebraler Ischämie bedingten funktionellen Beeinträchtigung (Raber et al. 2004). Schließlich gelang der Nachweis, dass das Proneurotrophin-p75<sup>NTR</sup>-System innerhalb der neurogenen Stammzellnische der SVZ eine hervorgehobene Bedeutung hat. So exprimiert eine kleine Population von Zellen (0,3 %) innerhalb der SVZ von Ratten den p75-Neurotrophinrezeptor (p75<sup>NTR</sup>), wobei diese Population für die Produktion von Neuronen in sowohl neugeborenen als auch adulten Tieren verantwortlich ist. Nur die Abkömmlinge p75<sup>NTR</sup>-positiver Zellen haben hierbei neurogenes Potential, wobei die Behandlung mit den Neurotrophinen BDNF und NGF proliferationssteigernd auf p75<sup>NTR</sup>-positive Zellen wirkt (Young et al. 2007). Maturierte Neurotrophine binden bevorzugt an Trk-Rezeptoren, wohingegen Proneurotrophine mit hoher und maturierte Neurotrophine mit schwacher Affinität mit dem p75<sup>NTR</sup>-sortilin-Rezeptorkomplex interagieren (Segal 2003). Es ist daher vorstellbar, dass auch das Proneurotrophin-p75<sup>NTR</sup>-System über PTEN eine Regulation des PI3K-Akt/PKB-Signalwegs und damit potentiell der Faim2-Expression in der SVZ ermöglicht und auf diese Weise Einfluss auf die Aktivierung klassischer und alternative Todesrezeptor-Signalwege in der SVZ nimmt (Kapitel 4.1.2).

Unter Berücksichtigung dieser Befunde und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erscheint ein direkter und kausaler Zusammenhang zwischen regenerativen Vorgängen, wie Neurogenese und Angiogenese, auf der einen Seite und Verbesserung klinischer Parameter auf der anderen Seite daher in der Zusammenschau als vorstellbar. Demzufolge kommt das modulatorische Protein Faim2 potentiell dafür in Frage, als Regulator von Neurogenese neben kognitiv-explorativen auch klinische Endpunkte zu beeinflussen, sowohl im häufig untersuchten Paradigma der zerebralen Ischämie als auch in Bezug auf Neuroinflammation, Neurotrauma oder weitere Krankheitsmodelle.

### **4.3 Schlussfolgerungen und Konsequenzen**

Das neuroprotektive Potential von Faim2 als proximalen Inhibitor des Fas-FasL-Signalweges konnte kürzlich in einem murinen Modell der zerebralen Ischämie erstmalig *in vivo* nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit gelang die Bestätigung dieses Ergebnisses in einem Akutmodell der bakteriellen Meningitis *in vivo*. Faim2 schützt in der Akutphase der bakteriellen Meningitis vor neuronaler hippocampaler Apoptose, ohne jedoch Neuroinflammation, den klinischen Verlauf oder das Überleben zu beeinflussen. Somit rückt die eminente Bedeutung von Faim2 bezüglich der Modulation von Zelltodmechanismen immer mehr in den Vordergrund. Es sind weitere Untersuchungen in zusätzlichen neurologisch-psychiatrischen Krankheitsmodellen notwendig, um einen möglichen ubiquitären Charakter dieses Phänomens zu bestätigen.

Schließlich konnte erstmalig *in vivo* demonstriert werden, dass eine Defizienz von Faim2 in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase zu erhöhter hippocampaler Neurogenese, verbesserter kognitiver Funktion und gesteigertem Explorationsverhalten führt. Gleichzeitig geht Faim2-Defizienz mit einer verbesserten Koordinationsfähigkeit sowie einer Verbesserung des klinischen Verlaufs einschließlich verringerter Sterblichkeit einher. Somit beeinflusst Faim2 auch Regenerationsprozesse, vermutlich über die Beeinflussung alternativer Funktionen des Fas-FasL-Signalweges. In weiteren Untersuchungen muss geklärt werden, über welche molekularen Schalter der Wechsel zwischen klassisch-apoptotischen und alternativ-regenerativen Signalwegen nach Aktivierung von Fas/CD95 auf Signaltransduktionsebene determiniert wird. Ebenso konnte eine divergente Regulation der hippocampalen Fas- und Faim2-Expression in der Akutphase der bakteriellen Meningitis festgestellt werden, wie es bereits zuvor ebenfalls im Tiermodell der zerebralen Ischämie gelang. Die Konstellation einer Erhöhung von Fas bei gleichzeitiger Erniedrigung von Faim2 kommt daher als generelles pathophysiologisches Prinzip in Betracht, sollte jedoch ebenfalls in Bezug auf andere Krankheitsentitäten weitergehend untersucht werden. Es sollte hierbei auch geklärt werden, welche Gesetzmäßigkeiten zwischen dem Fas-FasL-Signalweg, der PI3K-Akt/PKB-abhängigen Faim2-Expression und weiterer potentiell modulierender Signalwege, wie dem Proneurotrophin-p75<sup>NTR</sup>-System, im Gesamtzusammenhang herrschen. Hippokampale Apoptose, Neurogenese und Funktion standen im Fokus der vorliegenden Arbeit, jedoch lassen insbesondere die klinischen Ergebnisse Rückschlüsse auf die Relevanz von Faim2 auch für die zweite neurogene Hauptnische im Zentralnervensystem, der subventrikulären Zone (SVZ), zu. Demnach besteht Klärungsbedarf hinsichtlich der bisher nicht direkt untersuchten funktionellen Bedeutung von Faim2 für die SVZ.

Faim2 vermittelt sowohl neuroprotektive als auch regenerative Effekte im murinen Tiermodell der bakteriellen Meningitis und stellt ein vielversprechendes pharmakologisches Ziel für die Entwicklung neuer Therapieansätze dar.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

### 5.1 Deutsche Version

*Fas apoptotic inhibitory molecule 2* (Faim2) ist ein Neuronen-spezifisches Membranprotein und als proximaler Inhibitor des Fas-FasL-Signalweges gleichzeitig Mitglied der evolutionär konservierten und Apoptose-regulatorischen Genfamilie *lifeguard* (LFG). Die Relevanz von Faim2 für neurologische Erkrankungen konnte kürzlich in Form eines neuroprotektiven anti-apoptotischen Effekts in einem Tiermodell der fokalen zerebralen Ischämie unter Verwendung einer Faim2-defizienten Nullmutanten-Mauslinie erstmalig *in vivo* nachgewiesen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von Faim2 für den akuten und postmeningitischen Krankheitsverlauf in einem etablierten murinen Tiermodell der bakteriellen Meningitis unter Verwendung von *Streptococcus pneumoniae* Typ 3 (*S. pneumoniae*, SP3) untersucht. Es konnte hierbei demonstriert werden, dass Faim2-Defizienz im Akutmodell der bakteriellen Meningitis zu einer Erhöhung Caspase-assoziiierter Apoptose hippocampaler Neurone führt, ohne dabei Neuroinflammation, den klinischen Verlauf oder das Überleben zu beeinflussen. Neuroinflammation führte dabei in Wildtyp-Tieren zu einer divergenten Regulation der hippocampalen Fas- und Faim2-Expression mit einer Erhöhung von Fas und einer Erniedrigung von Faim2. In der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase nach antibiotischer Behandlung mit Ceftriaxon resultierte das Fehlen von Faim2 jedoch in erhöhter hippocampaler Neurogenese. Als Hinweis auf eine damit verbundene funktionelle Bedeutung ergab sich im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine verbesserte kognitive Gedächtnisleistung Faim2-defizienter Mäuse im Morris-Wasserlabyrinth, einem Testparadigma für Hippokampus-assoziiertes räumliches Lernvermögen, sowie ein gesteigertes Explorationsverhalten. Gleichzeitig war unter Faim2-Defizienz die klinische Beeinträchtigung und Sterblichkeit in der postmeningitischen Rekonvaleszenzphase verringert und die Koordinationsfähigkeit verbessert.

In der Zusammenschau vermittelt Faim2 zeitabhängig sowohl neuroprotektive als auch regenerative Effekte im murinen Tiermodell der bakteriellen Meningitis und stellt daher ein vielversprechendes pharmakologisches Ziel für die Entwicklung neuer Therapieansätze dar.

## **5.2 Englische Version**

*Fas apoptotic inhibitory molecule 2* (Faim2) is a neuron-specific membrane protein and a member of the evolutionary conserved *lifeguard* (LFG) apoptosis regulatory gene family, acting as a proximal inhibitor of the Fas-FasL signaling pathway. Applying a Faim2-deficient null mutant mouse line, its involvement in neurological diseases with neuroprotective anti-apoptotic effects has recently been demonstrated in an *in vivo* model of focal cerebral ischemia. In this study, immediate and sustaining effects of Faim2 were investigated in a well-established mouse model of *Streptococcus pneumoniae* type 3 (SP3) meningitis. Leaving neuroinflammation, clinical course and survival unaltered, lack of Faim2 resulted in an increase of caspase-associated apoptotic cell death of hippocampal neurons during acute bacterial meningitis induced by subarachnoid infection with SP3 in mice. In Faim2 wild-type mice, neuroinflammation induced a divergent regulation of hippocampal Fas and Faim2 expression, revealing an increase of Fas and a decrease of Faim2 during acute bacterial meningitis. However, when mice were rescued by antibiotic treatment with ceftriaxone, Faim2-deficiency led to increased hippocampal neurogenesis several weeks after infection. As a sign for functional significance, this was associated with improved performance of Faim2-deficient mice compared to wild-type littermates in the Morris water maze, a paradigm for hippocampal spatial learning and memory, and increased exploratory behaviour. Additionally, clinical impairment and mortality was reduced and motor coordination improved related to Faim2-deficiency in ceftriaxone-treated cohorts. In summary, Faim2 influenced both neuroprotective and regenerative processes in a time-dependent manner in a mouse model of pneumococcal meningitis. Hence, modulation of Faim2 may offer new therapeutic approaches for improving outcome after bacterial meningitis.



## 6. LITERATURVERZEICHNIS

Altman J (1962): Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135(3509): 1127-8

Altman J (1963): Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec* 145(4): 573-91

Altman J und Das GD (1965a): Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207(5000): 953-6

Altman J und Das GD (1965b): Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124(3): 319-35

Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z und Lindvall O (2002): Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8(9): 963-70

Beer R, Franz G, Schöpf M, Reindl M, Zelger B, Schmutzhard E, Poewe W und Kampfl A (2000): Expression of Fas and Fas ligand after experimental traumatic brain injury in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 20(4): 669-77

Beier CP und Schulz JB (2009): CD95/Fas in the brain – not just a killer. *Cell Stem Cell* 5(2): 128-30

Beier CP, Wischhusen J, Gleichmann M, Gerhardt E, Pekanovic A, Krueger A, Taylor V, Suter U, Krammer PH, Endres M et al. (2005): FasL (CD95L/APO-1L) resistance of neurons mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase B-dependent expression of lifeguard/neuronal membrane protein 35. *J Neurosci* 25(29): 6765-74

Beier CP, Kölbl M, Beier D, Woertgen C, Bogdahn U und Brawanski A (2007): CD95/Fas mediates cognitive improvement after traumatic brain injury. *Cell Res* 17(8): 732-4

Bekinschtein P, Oomen CA, Saksida LM und Bussey TJ (2011): Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable? *Semin Cell Dev Biol* 22(5): 536-42

Bifrare YD, Gianinazzi C, Imboden H, Leib SL und Täuber MG (2003): Bacterial meningitis causes two distinct forms of cellular damage in the hippocampal dentate gyrus in infant rats. *Hippocampus* 13(4): 481-8

Bifrare YD, Kummer J, Joss P, Täuber MG und Leib SL (2005): Brain-derived neurotrophic factor protects against multiple forms of brain injury in bacterial meningitis. *J Infect Dis* 191(1): 40-5

Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH und Wallach D (1995): A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270(14): 7795-8

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV und Wallach D (1996): Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85(6): 803-15

Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL und Tuomanen EI (1999): Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med* 5(3): 298-302

- Bredesen DE, Rao RV und Mehlen P (2006): Cell death in the nervous system. *Nature* 443(7113): 796-802
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS und Gould E (1993): Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56(2): 337-44
- Catts VS, Al-Menhali N, Burne TH, Colditz MJ und Coulson EJ (2008): The p75 neurotrophin receptor regulates hippocampal neurogenesis and related behaviours. *Eur J Neurosci* 28(5): 883-92
- Cho KO und Kim SY (2010): Effects of brain insults and pharmacological manipulations on the adult hippocampal neurogenesis. *Arch Pharm Res* 33(10): 1475-88
- Choi C und Benveniste EN (2004): Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res Brain Res Rev* 44(1): 65-81
- Chopp M, Zhang ZG und Jiang Q (2007): Neurogenesis, angiogenesis, and MRI indices of functional recovery from stroke. *Stroke* 38(2 Suppl): 827-31
- Colditz MJ, Catts VS, Al-menhali N, Osborne GW, Bartlett PF und Coulson EJ (2010): p75 neurotrophin receptor regulates basal and fluoxetine-stimulated hippocampal neurogenesis. *Exp Brain Res* 200(2): 161-7
- Corsini NS, Sancho-Martinez I, Laudenklos S, Glasgow D, Kumar S, Letellier E, Koch P, Teodorczyk M, Kleber S, Klussmann S et al. (2009): The death receptor CD95 activates adult neural stem cells for working memory formation and brain repair. *Cell Stem Cell* 5(2): 178-90
- de la Monte SM, Sohn YK und Wands JR (1997): Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 152(1): 73-83
- Demjen D, Klussmann S, Kleber S, Zuliani C, Stieltjes B, Metzger C, Hirt UA, Walczak H, Falk W, Essig M et al. (2004): Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med* 10(4): 389-95
- Deng W, Aimone JB und Gage FH (2010): New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11(5): 339-50
- Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, Weinstein DE, Palerme JS und Newell MK (2003): Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol* 5(2): 118-25
- Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C und Grütter MG (2003): Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* 11(2): 543-9
- Dupret D, Fabre A, Döbrössy MD, Panatier A, Rodríguez JJ, Lamarque S, Lemaire V, Oliet SH, Piazza PV und Abrous DN (2007): Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol* 5(8): e214
- Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G und Macklis JD (2005): Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* 75(5): 321-41
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA und Gage FH (1998): Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4(11): 1313-7
- Fassbender K, Eschenfelder C und Hennerici M (1999): Fas (APO-1/CD95) in inflammatory CNS diseases: intrathecal release in bacterial meningitis. *J Neuroimmunol* 93(1-2): 122-5

- Fecho K und Cohen PL (1998): Fas ligand (gld)- and Fas (lpr)-deficient mice do not show alterations in the extravasation or apoptosis of inflammatory neutrophils. *J Leukoc Biol* 64(3): 373-83
- Fernández M, Segura MF, Solé C, Colino A, Comella JX und Ceña V (2007): Lifeguard/neuronal membrane protein 35 regulates Fas ligand-mediated apoptosis in neurons via microdomain recruitment. *J Neurochem* 103(1): 190-203
- Gage FH (2000): Mammalian neural stem cells. *Science* 287(5457): 1433-8
- Galluzzi L, Blomgren K und Kroemer G (2009): Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* 10(7): 481-94
- Gavrieli Y, Sherman Y und Ben-Sasson SA (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3): 493-501
- Gerber J und Nau R (2010): Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr Opin Neurol* 23(3): 312-8
- Gerber J, Raivich G, Wellmer A, Noeske C, Kunst T, Werner A, Brück W und Nau R (2001): A mouse model of Streptococcus pneumoniae meningitis mimicking several features of human disease. *Acta Neuropathol* 101(5): 499-508
- Gerber J, Böttcher T, Bering J, Bunkowski S, Brück W, Kuhnt U und Nau R (2003): Increased neurogenesis after experimental Streptococcus pneumoniae meningitis. *J Neurosci Res* 73(4): 441-6
- Gerber J, Tauber SC, Armbrrecht I, Schmidt H, Brück W und Nau R (2009): Increased neuronal proliferation in human bacterial meningitis. *Neurology* 73(13): 1026-32
- Gianinazzi C, Grandgirard D, Imboden H, Egger L, Meli DN, Biffrare YD, Joss PC, Täuber MG, Borner C und Leib SL (2003): Caspase-3 mediates hippocampal apoptosis in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol* 105(5): 499-507
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA und Fuchs E (1997): Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17(7): 2492-8
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A und Shors TJ (1999a): Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2(3): 260-5
- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG und Fuchs E (1999b): Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9): 5263-7
- Grandgirard D und Leib SL (2006): Strategies to prevent neuronal damage in paediatric bacterial meningitis. *Curr Opin Pediatr* 18(2): 112-8
- Guzman-Marin R, Suntsova N, Methippara M, Greiffenstein R, Szymusiak R und McGinty D (2005): Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* 22(8): 2111-6
- Hayley S, Crocker SJ, Smith PD, Shree T, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Mount M, Slack R, Anisman H und Park DS (2004): Regulation of dopaminergic loss by Fas in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 24(8): 2045-53

- Hikawa N, Kiuchi Y, Maruyama T und Takenaka T (1997): Delayed neurite regeneration and its improvement by nerve growth factor (NGF) in dorsal root ganglia from MRL-lpr/lpr mice in vitro. *J Neurol Sci* 149(1): 13-7
- Hofer S, Grandgirard D, Burri D, Fröhlich TK und Leib SL (2011): Bacterial meningitis impairs hippocampal neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 70(10): 890-9
- Hoffmann O, Mahrhofer C, Rueter N, Freyer D, Bert B, Fink H und Weber JR (2007): Pneumococcal cell wall-induced meningitis impairs adult hippocampal neurogenesis. *Infect Immun* 75(9): 4289-97
- Honig LS und Rosenberg RN (2000): Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med* 108(4): 317-30
- Hoogman M, van de Beek D, Weisfelt M, de Gans J und Schmand B (2007): Cognitive outcome in adults after bacterial meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78(10): 1092-6
- Hu L, Smith TF und Goldberger G (2009): LFG: a candidate apoptosis regulatory gene family. *Apoptosis* 14(11): 1255-65
- Hurtado de Mendoza T, Perez-Garcia CG, Kroll TT, Hoong NH, O'Leary DD und Verma IM (2011): Antiapoptotic protein Lifeguard is required for survival and maintenance of Purkinje and granular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(41): 17189-94
- Ibáñez CF (2002): Jekyll-Hyde neurotrophins: the story of proNGF. *Trends Neurosci* 25(6): 284-6
- Jiang Q, Zhang ZG, Ding GL, Silver B, Zhang L, Meng H, Lu M, Pourabdillah-Nejed DS, Wang L, Savant-Bhonsale S et al. (2006): MRI detects white matter reorganization after neural progenitor cell treatment of stroke. *Neuroimage* 32(3): 1080-9
- Jiang W, Gu W, Brännström T, Rosqvist R und Wester P (2001): Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 32(5): 1201-7
- Jin K, Sun Y, Xie L, Peel A, Mao XO, Bateur S und Greenberg DA (2003): Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci* 24(1): 171-89
- Jones BJ und Roberts DJ (1968): A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naive mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 259(2): 211
- Karl T, Pabst R und von Hörsten S (2003): Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp Toxicol Pathol* 55(1): 69-83
- Kempermann G (2002): Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression. *Bipolar Disord* 4(1): 17-33
- Kempermann G (2011): Seven principles in the regulation of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33(6): 1018-24
- Kempermann G, Kuhn HG und Gage FH (1997): More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386(6624): 493-5
- Kermer P, Liman J, Weishaupt JH und Bähr M (2004): Neuronal apoptosis in neurodegenerative diseases: from basic research to clinical application. *Neurodegener Dis* 1(1): 9-19
- Kerr JF, Wyllie AH und Currie AR (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4): 239-57

- Kilic E, Kilic U, Soliz J, Bassetti CL, Gassmann M und Hermann DM (2005): Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. *FASEB J* 19(14): 2026-8
- Kleber S, Sancho-Martinez I, Wiestler B, Beisel A, Gieffers C, Hill O, Thiemann M, Mueller W, Sykora J, Kuhn A et al. (2008): Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma. *Cancer Cell* 13(3): 235-48
- Klein M, Obermaier B, Angele B, Pfister HW, Wagner H, Koedel U und Kirschning CJ (2008): Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Infect Dis* 198(7): 1028-36
- Kroemer G, Galluzzi L und Brenner C (2007): Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87(1): 99-163
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR et al. (2009): Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16(1): 3-11
- Lambert C, Landau AM und Desbarats J (2003): Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis* 8(6): 551-62
- Landau AM, Luk KC, Jones ML, Siegrist-Johnstone R, Young YK, Kouassi E, Rymar VV, Dagher A, Sadikot AF und Desbarats J (2005): Defective Fas expression exacerbates neurotoxicity in a model of Parkinson's disease. *J Exp Med* 202(5): 575-81
- Li H, Zhu H, Xu CJ und Yuan J (1998): Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4): 491-501
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES und Wang X (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4): 479-89
- Locatelli F, Corti S, Papadimitriou D, Fortunato F, Del Bo R, Donadoni C, Nizzardo M, Nardini M, Salani S, Ghezzi S et al. (2007): Fas small interfering RNA reduces motoneuron death in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Ann Neurol* 62(1): 81-92
- Lois C und Alvarez-Buylla A (1994): Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264(5162): 1145-8
- Lois C, García-Verdugo JM und Alvarez-Buylla A (1996): Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271(5251): 978-81
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C und Wang X (1998): Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94(4): 481-90
- Magavi SS, Leavitt BR und Macklis JD (2000): Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405(6789): 951-5
- Marriott HM und Dockrell DH (2006): Streptococcus pneumoniae: the role of apoptosis in host defense and pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 38(11): 1848-54

- Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt R, Vogel J, Schenkel J, Herdegen T und Debatin KM (1999): CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 19(10): 3809-17
- Martin-Villalba A, Hahne M, Kleber S, Vogel J, Falk W, Schenkel J und Krammer PH (2001): Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death Differ* 8(7): 679-86
- Miquel J und Blasco M (1978): A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor. *Exp Gerontol* 13(6): 389-96
- Mitchell L, Smith SH, Braun JS, Herzog KH, Weber JR und Tuomanen EI (2004): Dual phases of apoptosis in pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 190(11): 2039-46
- Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y und Greenberg ME (2001): Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* 21(19): 7551-60
- Morris R (1981): Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv* 12(2): 239-260
- Morris R (1984): Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11(1): 47-60
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R et al. (1996): FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85(6): 817-27
- Nau R und Schmidt H (2007): Long-term neuropsychological deficits after central nervous system infections despite adequate therapy. *J Neurol* 254(Suppl 2): II80-3
- Nau R, Soto A und Brück W (1999): Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 58(3): 265-74
- Nau R, Gerber J, Bunkowski S und Brück W (2004): Axonal injury, a neglected cause of CNS damage in bacterial meningitis. *Neurology* 62(3): 509-11
- Nissant A und Pallotto M (2011): Integration and maturation of newborn neurons in the adult olfactory bulb – from synapses to function. *Eur J Neurosci* 33(6): 1069-77
- Northington FJ, Ferriero DM, Flock DL und Martin LJ (2001): Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 21(6): 1931-8
- Ohira K (2011): Injury-induced neurogenesis in the mammalian forebrain. *Cell Mol Life Sci* 68(10): 1645-56
- Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N und Ferriero DM (2002): Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 52(6): 802-13
- Paul R, Angele B, Sporer B, Pfister HW und Koedel U (2004): Inflammatory response during bacterial meningitis is unchanged in Fas- and Fas ligand-deficient mice. *J Neuroimmunol* 152(1-2): 78-82
- Paxinos G und Franklin KBJ: The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2. Auflage; Academic Press, San Diego 2001

- Peter ME und Krammer PH (2003): The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10(1): 26-35
- Raber J, Fan Y, Matsumori Y, Liu Z, Weinstein PR, Fike JR und Liu J (2004): Irradiation attenuates neurogenesis and exacerbates ischemia-induced deficits. *Ann Neurol* 55(3): 381-9
- Raoul C, Henderson CE und Pettmann B (1999): Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. *J Cell Biol* 147(5): 1049-62
- Reich A, Spering C und Schulz JB (2008): Death receptor Fas (CD95) signaling in the central nervous system: tuning neuroplasticity? *Trends Neurosci* 31(9): 478-86
- Reich A, Spering C, Gertz K, Harms C, Gerhardt E, Kronenberg G, Nave KA, Schwab M, Tauber SC, Drinkut A et al. (2011): Fas/CD95 Regulatory Protein Faim2 Is Neuroprotective after Transient Brain Ischemia. *J Neurosci* 31(1): 225-33
- Reimers K, Choi CY, Mau-Thek E und Vogt PM (2006): Sequence analysis shows that Lifeguard belongs to a new evolutionarily conserved cytoprotective family. *Int J Mol Med* 18(4): 729-34
- Revest JM, Dupret D, Koehl M, Funk-Reiter C, Grosjean N, Piazza PV und Abrous DN (2009): Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry* 14(10): 959-67
- Ribe EM, Serrano-Saiz E, Akpan N und Troy CM (2008): Mechanisms of neuronal death in disease: defining the models and the players. *Biochem J* 415(2): 165-82
- Saab BJ, Georgiou J, Nath A, Lee FJ, Wang M, Michalon A, Liu F, Mansuy IM und Roder JC (2009): NCS-1 in the dentate gyrus promotes exploration, synaptic plasticity, and rapid acquisition of spatial memory. *Neuron* 63(5): 643-56
- Sabelko-Downes KA, Russell JH und Cross AH (1999): Role of Fas–FasL interactions in the pathogenesis and regulation of autoimmune demyelinating disease. *J Neuroimmunol* 100(1-2): 42-52
- Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A und Hen R (2011): Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472(7344): 466-70
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA und Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732): 1350-4
- Šakić B, Szechtman H, Denburg JA, Gorny G, Kolb B und Whishaw IQ (1998): Progressive atrophy of pyramidal neuron dendrites in autoimmune MRL-lpr mice. *J Neuroimmunol* 87(1-2): 162-70
- Schmidt H, Heimann B, Djukic M, Mazurek C, Fels C, Wallesch CW und Nau R (2006): Neuropsychological sequelae of bacterial and viral meningitis. *Brain* 129(Pt 2): 333-45
- Schulz JB, Weller M und Moskowitz MA (1999): Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 45(4): 421-9
- Schweitzer B, Taylor V, Welcher AA, McClelland M und Suter U (1998): Neural membrane protein 35 (NMP35): a novel member of a gene family which is highly expressed in the adult nervous system. *Mol Cell Neurosci* 11(5-6): 260-73
- Schweitzer B, Suter U und Taylor V (2002): Neural membrane protein 35/Lifeguard is localized at postsynaptic sites and in dendrites. *Brain Res Mol Brain Res* 107(1): 47-56

- Segal RA (2003): Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu Rev Neurosci* 26: 299-330
- Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A et al. (2001): Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7): 4044-9
- Somia NV, Schmitt MJ, Vetter DE, Van Antwerp D, Heinemann SF und Verma IM (1999): LFG: an anti-apoptotic gene that provides protection from Fas-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12667-72
- Song W, Volosin M, Cragolini AB, Hempstead BL und Friedman WJ (2010): ProNGF induces PTEN via p75<sup>NTR</sup> to suppress Trk-mediated survival signaling in brain neurons. *J Neurosci* 30(46): 15608-15
- Su JH, Anderson AJ, Cribbs DH, Tu C, Tong L, Kesslack P und Cotman CW (2003): Fas and Fas ligand are associated with neuritic degeneration in the AD brain and participate in beta-amyloid-induced neuronal death. *Neurobiol Dis* 12(3): 182-93
- Suh H, Deng W und Gage FH (2009): Signaling in adult neurogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 253-75
- Tachibana O, Nakazawa H, Lampe J, Watanabe K, Kleihues P und Ohgaki H (1995): Expression of Fas/APO-1 during the progression of astrocytomas. *Cancer Res* 55(23): 5528-30
- Tan Z, Levid J und Schreiber SS (2001): Increased expression of Fas (CD95/APO-1) in adult rat brain after kainate-induced seizures. *Neuroreport* 12(9): 1979-82
- Tan Z, Sankar R, Tu W, Shin D, Liu H, Wasterlain CG und Schreiber SS (2002): Immunohistochemical study of p53-associated proteins in rat brain following lithium-pilocarpine status epilepticus. *Brain Res* 929(1): 129-38
- Tauber SC, Stadelmann C, Spreer A, Brück W, Nau R und Gerber J (2005): Increased expression of BDNF and proliferation of dentate granule cells after bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 64(9): 806-15
- Tauber SC, Ebert S, Weishaupt JH, Reich A, Nau R und Gerber J (2009): Stimulation of Toll-like receptor 9 by chronic intraventricular unmethylated cytosine-guanine DNA infusion causes neuroinflammation and impaired spatial memory. *J Neuropathol Exp Neurol* 68(10): 1116-24
- Thigpen MC, Whitney CG, Messonnier NE, Zell ER, Lynfield R, Hadler JL, Harrison LH, Farley MM, Reingold A, Bennett NM et al. (2011): Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. *N Engl J Med* 364(21): 2016-25
- Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, Ekdahl CT, Kokaia Z und Lindvall O (2006): Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 24(3): 739-47
- Ugolini G, Raoul C, Ferri A, Haenggeli C, Yamamoto Y, Salaün D, Henderson CE, Kato AC, Pettmann B und Hueber AO (2003): Fas/tumor necrosis factor receptor death signaling is required for axotomy-induced death of motoneurons in vivo. *J Neurosci* 23(24): 8526-31
- van de Beek D, Schmand B, de Gans J, Weisfelt M, Vaessen H, Dankert J und Vermeulen M (2002): Cognitive impairment in adults with good recovery after bacterial meningitis. *J Infect Dis* 186(7): 1047-52



- van Praag H, Kempermann G und Gage FH (1999): Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2(3): 266-70
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR und Girkontaite I (1997): Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390(6658): 350-1
- von Mering M, Wellmer A, Michel U, Bunkowski S, Thustochowska A, Brück W, Kuhnt U und Nau R (2001): Transcriptional regulation of caspases in experimental pneumococcal meningitis. *Brain Pathol* 11(3): 282-95
- Vorhees CV und Williams MT (2006): Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1(2): 848-58
- Wellmer A, Noeske C, Gerber J, Munzel U und Nau R (2000): Spatial memory and learning deficits after experimental pneumococcal meningitis in mice. *Neurosci Lett* 296(2-3): 137-40
- Whimbey AE und Denenberg VH (1967): Two independent behavioral dimensions in open-field performance. *J Comp Physiol Psychol* 63(3): 500-4
- Xiong Y, Mahmood A und Chopp M (2010): Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. *Curr Opin Investig Drugs* 11(3): 298-308
- Young KM, Merson TD, Sotthibundhu A, Coulson EJ und Bartlett PF (2007): p75 neurotrophin receptor expression defines a population of BDNF-responsive neurogenic precursor cells. *J Neurosci* 27(19): 5146-55
- Zhao C, Deng W und Gage FH (2008): Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132(4): 645-60
- Zheng WH, Kar S und Quirion R (2002): FKHRL1 and its homologs are new targets of nerve growth factor Trk receptor signaling. *J Neurochem* 80(6): 1049-61
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A und Wang X (1997): Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90(3): 405-13
- Zou H, Li Y, Liu X und Wang X (1999): An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274(17): 11549-56
- Zuliani C, Kleber S, Klusmann S, Wenger T, Kenzelmann M, Schreglmann N, Martinez A, del Rio JA, Soriano E, Vodrazka P et al. (2006): Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death Differ* 13(1): 31-40
- Zysk G, Brück W, Gerber J, Brück Y, Prange HW und Nau R (1996): Anti-inflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(6): 722-8

## 7. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht oder befinden sich im Druck:

### Originalarbeiten:

Reich A, Spering C, Gertz K, Harms C, Gerhardt E, Kronenberg G, Nave KA, Schwab M, Tauber SC, Drinkut A, **Harms K**, Beier CP, Voigt A, Göbbels S, Endres M und Schulz JB (2011): Fas/CD95 Regulatory Protein Faim2 Is Neuroprotective after Transient Brain Ischemia. *J Neurosci* 31(1): 225-33

Tauber SC\*, **Harms K\***, Falkenburger B, Weis J, Sellhaus B, Nau R, Schulz JB und Reich A (2014): Modulation of hippocampal neuroplasticity by Fas/CD95 regulatory protein 2 (Faim2) in the course of bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* (im Druck)

(\* geteilte Erstautorenschaft)

### Posterbeiträge:

Reich A, Spering C, Gertz K, Harms C, Gerhardt E, Kronenberg G, Nave KA, Schwab M, Tauber SC, Drinkut A, **Harms K**, Voigt A, Göbbels S, Endres M und Schulz JB (2010): Fas/CD95 Regulatory Protein Faim2 Is Neuroprotective after Transient Brain Ischemia. *Neurowoche*, P 713, Mannheim, Deutschland, 21. - 25.09.2010.

Reich A, Tauber SC, **Harms K**, Nau R und Schulz JB (2011): Fas/CD95-interacting molecule Faim2 modulates hippocampal cell death, neurogenesis and behavioral regeneration in a mouse model of bacterial meningitis. *84. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie mit Fortbildungsakademie*, P 699, Wiesbaden, Deutschland, 28.09. - 01.10.2011.\*\*

(\*\* hierfür erhalten: Posterpreis 2011 der Deutschen Gesellschaft für Neurologie)

## Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Jörg B. Schulz, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine umfassende Unterstützung und sein Vertrauen.

Herrn Dr. med. Arno Reich danke ich für die Betreuung, Motivation und Hilfe bei der Umsetzung der Arbeit.

Den ehemaligen Kollegen der Abteilung für Neurodegeneration und Neurorestaurationsforschung danke ich für die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre, die zahlreichen fachlichen Diskussionen sowie Hilfestellungen bei methodischen Fragen und Problemen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich insbesondere bei Frau Anette Bennemann, Frau Dr. rer. nat. Ellen Gerhardt, Frau Dr. rer. nat. Simone Gräber, Frau Dr. rer. nat. Anja Drinkut und Frau Dr. rer. nat. Éva Szegő sowie bei meinen Mitdoktoranden Christopher Spering, Johannes Liebenow und Gregor Makosch bedanken. Frau Cathy Ludwig danke ich für Hilfestellungen bei administrativen und organisatorischen Fragen.

Ich danke Frau Stephanie Bunkowski und Frau Priv.-Doz. Dr. med. Simone C. Tauber für die gute Zusammenarbeit mit der Abteilung Neuroinfektiologie und für zahlreiche Hilfestellungen.