

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Untersuchungen zur funktionellen Relevanz der sauren
Sphingomyelinase in der Infektionspathogenese von
Neisseria meningitidis

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Alexander Simonis

aus Much

Würzburg, Januar 2016



Referentin: Prof. Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Schneider-Schaulies

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2017

Der Promovend ist Arzt

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VII
III	Abkürzungsverzeichnis	XII
1	Einleitung	1
1.1	<i>Neisseria meningitidis</i>	1
1.1.1	Epidemiologie, klinisches Erscheinungsbild und Pathogenese	1
1.1.2	Klassifikation von <i>N. meningitidis</i>	3
1.1.3	Virulenzfaktoren von <i>N. meningitidis</i>	4
1.1.4	Pathogen-Wirt-Interaktionen	7
1.2	Saure Sphingomyelinase und Ceramide	11
1.2.1	Das Konzept der Zellmembran	11
1.2.2	Ceramide: Aufbau, Metabolismus und Funktion	13
1.2.3	Die Enzymgruppe der Sphingomyelinasen	17
1.2.4	Die Bedeutung von Ceramid-reichen Plattformen bei Infektionen	19
1.3	Zielsetzung der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Software	23
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	23
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	24
2.1.5	Lösungen und Puffer	27

2.1.6	Kits	30
2.1.7	Antikörper und Farbstoffe	30
2.1.8	Enzyme, Peptide und Inhibitoren	33
2.1.9	Primer und siRNA	33
2.1.10	Plasmide	34
2.1.11	Zellkultur	35
2.1.12	Bakterien	36
2.2	Zellbiologische Methoden	38
2.2.1	Zellkultur	38
2.2.2	Infektion von Zellen	40
2.2.3	Gentamicin-Protektionsassay	40
2.2.4	Enzymaktivitätsmessung der sauren Sphingomyelinase	41
2.2.5	Massenspektrometrische Quantifizierung von Lipiden	45
2.2.6	Durchflusszytometrische Messungen	45
2.2.7	Erstellung von fluoreszenzmikroskopischen Präparaten	46
2.2.8	Dichtegradientenzentrifugation	48
2.2.9	Transfektion von Zellen mit siRNA	50
2.2.10	Stabile Transfektion von HBMEC mit shRNA	50
2.3	Molekularbiologische Methoden	52
2.3.1	Isolierung von genomischer DNA	52
2.3.2	Isolierung von RNA	53
2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	53

2.3.4	Polymerase-Kettenreaktion	54
2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese	55
2.3.6	Extraktion von Nukleinsäuren aus einem Agarosegel	56
2.3.7	Aufreinigung von Nukleinsäuren	57
2.3.8	Umschrieb von RNA in cDNA	57
2.3.9	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	58
2.3.10	Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	59
2.3.11	Isolierung von Plasmiden	61
2.3.12	Restriktionsverdau	62
2.3.13	Ligation	63
2.3.14	Transformation	64
2.3.15	Sequenzierung	64
2.3.16	Induktion der Proteinexpression	64
2.3.17	Herstellung von Proben zur Analyse der Proteinexpression	65
2.3.18	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	65
2.3.19	Coomassie-Färbung	66
2.3.20	Proteinnachweis mittels Western Blot	67
2.3.21	Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure	68
2.4	Bakteriologische Methoden	68
2.4.1	Bakterienkultur	68
2.4.2	Colony Blot	69
2.5	Statistische Auswertung	69

3	Ergebnisse	70
3.1	Die Aktivität der sauren Sphingomyelinase hat einen Einfluss auf die Invasivität von <i>Neisseria meningitidis</i> .	70
3.1.1	Einfluss der pharmakologische Inhibition der sauren Sphingomyelinase auf die Invasivität von <i>N. meningitidis</i>	70
3.1.2	Posttranskriptionelles Gen-Silencing der sauren Sphingomyelinase	73
3.1.3	Analyse von Zellen mit einem genetisch bedingten Defekt der sauren Sphingomyelinase	74
3.2	Die Infektion mit <i>N. meningitidis</i> führt zu einer Aktivierung der sauren Sphingomyelinase und zur Bildung Ceramid-reicher Plattformen an der Zelloberfläche.	76
3.2.1	Messung der ASM-Aktivität während der Infektion mit <i>N. meningitidis</i>	76
3.2.2	Akkumulation der ASM und Ceramide auf der Zelloberfläche von HBMEC während der Infektion mit <i>N. meningitidis</i>	76
3.3	Die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase erfolgt über die Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C.	82
3.3.1	Inhibition der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C	82
3.3.2	Akkumulation der ASM und Ceramide auf der Zelloberfläche von HBMEC während der Infektion mit <i>N. meningitidis</i>	84

3.4	Die Bildung von Ceramid-reichen Domänen führt zu einer Akkumulation von <i>cortical plaques</i>-assoziierten Proteinen.	86
3.4.1	Akkumulation des ErbB2-Rezeptors in Ceramid-reichen Membranregionen	86
3.4.2	Akkumulation des CD44-Rezeptors in Ceramid-reichen Membranregionen	89
3.4.3	Kolokalisation von phosphorylierten Proteinen der Ezrin-Familie mit Ceramid-reichen Membrandomänen	91
3.4.4	Phosphorylierte ERM-Proteine sind mit CD44 und Aktin assoziiert.	93
3.4.5	Die Infektion von HBMEC mit <i>N. meningitidis</i> führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERM-Proteinen.	95
3.4.6	Der ErbB2-Rezeptor und die Proteinkinase C sind bei der verstärkten Phosphorylierung von ERM-Proteinen beteiligt.	97
3.5	Ceramide sind in die Regulation der ERM-CD44 Interaktion involviert.	98
3.5.1	Der Einfluss der Infektion von <i>N. meningitidis</i> auf die ERM-CD44 Interaktion	98
3.6	Verschiedene <i>N. meningitidis</i> Isolate unterscheiden sich in der Aktivierung des ASM/Ceramid-Systems.	101
3.6.1	Der Einfluss der ASM-Aktivität auf die Invasion verschiedener <i>N. meningitidis</i> Isolate in HBMEC	101
3.6.2	Vergleich verschiedener <i>N. meningitidis</i> Isolate in ihrer Fähigkeit zur	

	Ceramid-Induktion und Enzymaktivierung	104
3.6.3	Untersuchung der Expression verschiedener Virulenzfaktoren	108
3.6.4	Analyse der Opc-Expression des Isolates DE6894	109
3.7	Das Außenmembranprotein Opc spielt eine maßgebliche Rolle bei der Aktivierung des ASM/Ceramid-Systems.	111
3.7.1	Infektion von HBMEC mit Opc-defizienten, isogenen Mutanten des Isolates MC58	111
3.7.2	Herstellung eines rekombinant Opc-exprimierenden <i>E. coli</i>	112
3.7.3	Analyse des Einflusses eines rekombinanten Opc auf die Invasivität und Aktivierung des ASM/Ceramid-Systems bei der Infektion von HBMEC mit <i>E. coli</i>	115
4	Diskussion	117
4.1	Einfluss der ASM und von Ceramide auf die Invasion von <i>N. meningitidis</i> in Gehirndothelzellen	117
4.2	Unterschiede zwischen verschiedenen Isolaten und die klinische Relevanz eines durch die saure Sphingomyelinase vermittelten zellulären Aufnahmemechanismus von <i>N. meningitidis</i>	126
4.3	Ausblick	129
5	Zusammenfassung	131
6	Anhang	133
7	Literaturverzeichnis	141

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Schematischer Aufbau von <i>N. meningitidis</i>	6
Abb. 1.2	Interaktion von <i>N. meningitidis</i> mit Endothelzellen	10
Abb. 1.3	Schematischer Aufbau einer Lipiddoppelschicht von eukaryotischen Zellen	13
Abb. 1.4	Ceramid-Metabolismus	16
Abb. 2.1	Versuchsprinzip des Sphingomyelinase Fluorometric Assay Kit von Cayman Chemical	42
Abb. 2.2	Berechnung der relativen Fluoreszenz pro μM	44
Abb. 2.3	Aufbau Dichtegradient	49
Abb. 2.4	ASM-shRNA exprimierender F6GW-Vektor	51
Abb. 2.5	Reaktionszyklen PCR	55
Abb. 2.6	Ausschnitt der Gensequenz des ASM Gens mit Darstellung der verwendeten Primer für die Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion	61
Abb. 3.1.1	Einfluss verschiedener Amitriptylin-Konzentrationen auf die Invasivität von <i>Nm</i> und die Enzymaktivität der sauren Sphingomyelinase	71
Abb. 3.1.2	Invasionskinetik des Isolates <i>Nm</i> MC58 unter Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Amitriptylin	72

Abb. 3.1.3	Ergebnisse der RNA-Interferenz Versuche	74
Abb. 3.2.1	Vergleich der Wildtyp-Fibroblasten (WT) mit Fibroblasten mit einem Enzymdefekt der ASM (NPDA)	75
Abb. 3.2.2	qRT-PCR-Analyse der ASM-Transskription in HBMEC während der Infektion mit <i>N. meningitidis</i>	77
Abb. 3.2.3	Western Blot von uninfizierten Kontrollzellen und MC58-infizierten HBMEC	78
Abb. 3.2.4	Analyse der Zelloberfläche von HMBECs während der Infektion	80
Abb. 3.2.5	Darstellung von Ceramid-reichen Domäne auf der Zelloberfläche	81
Abb. 3.3.1	Inhibition der Phosphatidycholin-spezifischen Phospholipase C	83
Abb. 3.3.2	Inhibition der Interaktion zwischen <i>Nm</i> MC58 und zellmembrangebundenen Heparansulfat-Proteoglykanen	85
Abb. 3.4.1	Kolokalisation des ErbB2-Rezeptors in Ceramid-reichen Membrandomänen	87
Abb. 3.4.2	Quantifizierung des ErbB2-Rezeptors an der Zelloberfläche während der Infektion	88
Abb. 3.4.3	Kolokalisation von CD44 in Ceramid-reichen Membrandomänen	90
Abb. 3.4.4	Charakterisierung von shASM HBMEC	91

Abb. 3.4.5	Kolokalisation von phosphorylierten ERM-Proteinen mit Ceramid-reichen Membrandomänen	92
Abb. 3.4.6	Kolokalisation von phosphorylierten ERM-Proteinen mit CD44 und Aktin	94
Abb. 3.4.7	Phosphorylierung von ERM-Proteinen und deren Einfluss auf die Invasivität von <i>N. meningitidis</i>	96
Abb. 3.4.8	Einfluss der ErbB2- und PKC-Inhibition auf die Phosphorylierung von ERM Proteinen	97
Abb. 3.5.1	Einfluss der Infektion von <i>N. meningitidis</i> auf die <i>lipid raft</i> Fraktion und die Kolokalisation von phosphorylierten ERM Proteinen und CD44	100
Abb. 3.6.1	Übersicht über die getesteten <i>N. meningitidis</i> -Isolate	101
Abb. 3.6.2	Invasivität verschiedener <i>N. meningitis</i> Isolate im Vergleich mit dem SgB-Isolat MC58	102
Abb. 3.6.3	Einfluss von Amitriptylin auf die Invasivität verschiedener <i>N. meningitis</i> -Isolate	103
Abb. 3.6.4	Aktivität der sauren Sphingomyelinase in HBMEC bei der Infektion mit verschiedenen SgC-Isolaten	104
Abb. 3.6.5	Vergleich des Ceramid-Anteils an der Zelloberfläche bei der Infektion von HBMEC mit verschiedenen <i>N. meningitidis</i> Isolaten	106
Abb. 3.6.6	Darstellung Ceramid-reicher Membrandomänen bei der	107

	Infektion mit verschiedenen <i>N. meningitidis</i> Isolaten	
Abb. 3.6.7	Expression verschiedener Virulenzfaktoren der getesteten <i>N. meningitidis</i> Isolate	109
Abb. 3.6.8	Poly-Cytidin-Länge der Isolate MC58 und DE6894	110
Abb. 3.7.1	Einfluss des Opc-Proteins auf das ASM/Ceramidsystem	112
Abb. 3.7.2	Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen <i>NcoI</i> und <i>XhoI</i> im <i>opc</i> -Gen	113
Abb. 3.7.3	Verwendeter pET 28a(+)-Vektor mit integriertem <i>opcA</i> -Gen	113
Abb. 3.7.4	Übersicht zur Herstellung eines Opc-exprimierenden <i>E. coli</i>	114
Abb. 3.7.5	Einfluss eines rekombinant exprimiertes Opc-Proteins auf die Invasivität von <i>E. coli</i>	115
Abb. 3.7.6	Einfluss eines rekombinant exprimiertes Opc-Proteins auf die Ceramidbildung und ASM-Aktivität	116
Abb. 4.1	Hypothetisches Modell einer Ceramid-induzierten Regulation der CD44-ERM-Interaktion	125
Abb. 5.1	Infektionsmodell einer durch die sauren Sphingomyelinase vermittelten Invasion von <i>N. meningitidis</i> in humane Gehirndothelzellen	132

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Geräte	21
Tab. 2	Software	23
Tab. 3	Verbrauchsmaterialien	23
Tab. 4	Chemikalien und Reagenzien	24
Tab. 5	Lösungen und Puffer	27
Tab. 6	Kits	30
Tab. 7	Primärantikörper	30
Tab. 8	Sekundärantikörper	32
Tab. 9	Fluoreszenz-Farbstoffe	32
Tab. 10	Enzyme und Peptide und Inhibitoren	33
Tab. 11	Primer	33
Tab. 12	siRNA	33
Tab. 13	Plasmide	34
Tab. 14	Zelllinien	35
Tab. 15	Zellkulturmedien	35
Tab. 16	<i>N. meningitidis</i> WT Isolate	36
Tab. 17	<i>N. meningitidis</i> Mutanten	36
Tab. 18	<i>E. coli</i> Stämme	37
Tab. 19	Nährmedien Bakterien	37
Tab. 20	Dichtegradient	49
Tab. 21	Ansatz PCR	55
Tab. 22	Agarosekonzentrationen	56
Tab. 23	Ansatz Verdau	62
Tab. 24	Ansatz Ligation	63
Tab. 25	Ansatz Acrylamidgele	66

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
dest.	destilliert
ASM	Saure Sphingomyelinase
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)acetamid
bSM	bakterielle Sphingomyelinase
CC	<i>clonal complex</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CEACAM	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule</i>
CFU	<i>colony forming units</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
D	Deutschland
DAG	1,2-Diacylglycerine
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol

DIC	<i>differential interference contrast</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DRM	<i>detergent-resistant membranes</i>
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENPP	Ectonukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase
Erb	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FC	<i>flow cytometry</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>

FERM	<i>Four-point-one</i> -Protein, Ezrin, Radixin, Moesin
FIASMA	„funktionelle Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase“
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
gDNA	genomische DNA
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GI	Gastrointestinal
HBMEC	<i>human brain microvascular endothelial cells</i>
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglycane
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunoglobulin
IHM	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg
IMD	<i>invasive meningococcal disease</i>
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
Kb	Kilo-Basenpaare
KF	Korrigierte Fluoreszenz

LB	<i>lysogeny broth</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MLST	<i>multilocus sequence typing</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NadA	<i>neisserial adhesin A</i>
<i>N.</i>	<i>Neisseria</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
<i>Nm</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
NPDA	<i>Niemann-Pick-disease Type A</i>
NSM	Neutrale Sphingomyelinase
NTI	Nasopharyngeales Trägerisolat
OD	<i>optical density</i>
Opa	<i>opacity proteins</i>
PAA	<i>poly acrylic acid</i>
PAF	Paraformaldehyd
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate buffered saline + tween20</i>

PC-PLC	Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pERM	phosphoryliertes Ezrin, Radixin, Moesin
p.i.	<i>post infectionem</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4 5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PTGS	Posttranskriptionales <i>Gene Silencing</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse Transkriptase
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Sg	Serogruppe
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>

SM	Sphingomyelin
SMPD	Sphingomyelin Phosphodiesterase
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
ST	<i>sequence type</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAT	<i>trans-activator of transcription</i>
TCA	2,4,6-Trichloranisol
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UK	<i>United Kingdom</i>
USA	<i>The United States of America</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
VE	vollentsalzt
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 *Neisseria meningitidis*

1.1.1 Epidemiologie, klinisches Erscheinungsbild und Pathogenese

Im Jahre 1887 gelang dem österreichischen Pathologen Anton Wechselbaum die Isolierung von gram-negativen Diplokokken aus einer Liquor-Probe eines an einer Meningitis erkrankten Patienten [1]. Es erfolgte die Einteilung dieser neu beschriebenen Art von Bakterien in die Gattung *Neisseria*, welche zur Klasse der Betaproteobacteria gehören und die Benennung in *Neisseria meningitidis*, auch bekannt als Meningokokken [2]. Den einzigen bekannten Wirt dieser fakultativ anaerob wachsenden Art stellt der Mensch dar. *N. meningitidis* besiedelt als Kommensale den menschlichen Nasopharynx, ohne dabei dem Wirt zu schaden. Um in dieser Nische zu überleben, benötigen Meningokokken verschiedene Eigenschaften, die eine dauerhafte Etablierung ermöglichen. Zu dieser Adaption an die mukosale Oberfläche zählen neben einer dauerhaften Adhärenz auch der Schutz gegen die humane Immunantwort und die Versorgung mit Nährstoffen [3]. Die Kolonisationsrate in der menschlichen Bevölkerung variiert dabei und ist abhängig von Alter, geographischer Region und sozialem Umfeld [4]. Die durchschnittliche Kolonisationsrate in der Bevölkerung wird mit 5–10% angegeben, wobei die höchste Prävalenz bei Jugendlichen bzw. jungen Erwachsenen festgestellt werden kann [5; 6]. Eine besonders hohe Trägerprävalenz in dieser Gruppe weisen dabei Personen auf, die auf engem Raum zusammenleben [7]. So wurden schon 1917 Ausbrüche unter Militärrekruten beschrieben [8]. Eine Übertragung erfolgt dabei meistens über eine Tröpfcheninfektion mit einer anschließenden Inkubationszeit von 1–14 Tagen [9]. Kommt es zu einem Übertritt von *N. meningitidis* über die mukosale Barriere, kann es zum Auftreten einer invasiven Meningokokken-Erkrankung kommen. Die Mechanismen, die dazu führen, dass es innerhalb der Spezies neben unschädlichen Kommensale auch pathogene Isolate, welche eine invasive, potentiell letale Erkrankung auslösen können, vorkommen, sind dabei vielfältig. Zum einen spielt die Virulenz eines *N. meningitidis*-Stammes eine wichtige Rolle, die abhängig von der Expression verschiedener Faktoren wie z.B.

Kapselpolysaccharide, Oberflächenadhäsine und Endotoxinen ist [3]. Zum anderen sind wirtsspezifische Faktoren von Bedeutung. So können eine geschwächte Immunabwehr bzw. Immundefekte wie Komplementdefekte, ein vorrangigere respiratorischer Infekt oder auch Tabakkonsum das Risiko einer invasiven Meningokokken-Erkrankung erhöhen [10; 11; 12]. Neben einem sporadischen Auftreten von Krankheitsfällen kann es auch zu einer epidemischen Verbreitung kommen. Regelmäßige und schwerwiegende Epidemien treten dabei v.a. im sogenannten Meningitis-Gürtel auf, welcher in erster Linie das Gebiet der afrikanischen Sahelzone betrifft [13; 14; 15]. Meningokokken stellen eine der wesentlichen Ursachen für eine bakterielle Meningitis weltweit dar mit mehr als 500.000 Erkrankungen pro Jahr [16]. Die Inzidenz der invasiven Meningokokken-Erkrankung ist in Industrienationen deutlich niedriger und nimmt auch aufgrund der Einführung von Impfstoffen weiterhin ab. Für die USA lag beispielsweise die durchschnittliche Erkrankungshäufigkeit im Jahr 2007 bei 0,53/100.000 Einwohner [17]. Im Jahr 2014 wurden dem Robert-Koch-Institut deutschlandweit 275 invasive Meningokokken-Erkrankungen gemeldet. Dies ist damit die niedrigste erfasste Fallzahl seit Inkrafttreten der Meldepflicht [18]. Nichtsdestotrotz stellt die invasive Meningokokken-Erkrankung aufgrund ihres möglichen fulminanten Verlaufes und der hohen Komplikationsrate auch in den Industrieländern ein relevantes Krankheitsbild dar. Unbehandelt erreicht sie eine Letalität von ca. 80%, welche durch eine adäquate Therapie auf ca. 10% gesenkt werden kann [19]. 10–20% der Patienten, die eine Infektion überleben, behalten eine dauerhafte schwere Schädigung, welche sich z.B. in Taubheit, mentaler Retardierung oder dem Verlust von Extremitäten äußert [20; 21]. Die Morbiditäts- und Mortalitätsrate ist abhängig von ihrer klinischen Erscheinungsform. Aufgrund der ZNS-Affinität des Erregers kann es vorrangig zu Symptomen einer bakteriellen Meningitis kommen. Dabei kommt es zu einer Infektion der Hirnhäute, welche das ZNS umgeben. Typische Symptome einer bakteriellen Meningitis sind dabei Kopfschmerzen, Fieber, Nackensteifigkeit und Photophobie [22]. Weiterhin treten speziell bei einer Meningokokken-Meningitis Petechien auf [23]. Wie bei vielen gram-negativen Erregern kann sich auch eine Meningokokken-Infektion in Form einer Sepsis äußern und in eine disseminierte intravasale Koagulopathie münden [24]. Eine

besonders schwere Verlaufsform mit einer extrem hohen Mortalität stellt dabei das Waterhouse-Friderichsen-Syndrom dar [25]. Bei dieser Sonderform der disseminierten intravasalen Koagulopathie kommt es infektionsbedingt zu Hämorrhagien der Nebennieren, die über einen akuten Cortisolmangel zu einer Verschlechterung des septischen Krankheitsbildes führen [26]. Weitere Erscheinungsformen einer Meningokokken-Infektion stellen Pneumonie, Pharyngitis, Myokarditis und Arthritis dar, die selten isoliert, sondern meist im Rahmen einer disseminierten Infektion auftreten [27; 28; 29]. Die Diagnose einer invasiven Meningokokken-Erkrankung erfolgt klinisch bzw. durch den direkten Erregernachweis. Sie erfordert eine sofortige antibiotische Therapie sowie ggf. eine supportive intensivmedizinische Behandlung, um Morbidität und Mortalität effektiv zu senken [21].

1.1.2 Klassifikation von *N. meningitidis*

Die Klassifizierung von *N. meningitidis* erfolgt traditionell nach ihrem immunologischen Profil, welches durch eine unterschiedliche Struktur ihrer Polysaccharidkapsel determiniert wird [30]. Man unterscheidet dabei 13 Serogruppen: A, B, C, E-29, H, I, K, L, W-135, X, Y, Z, und Z' (29E) [31]. Die meisten invasiven Meningokokken-Isolate lassen sich den serologischen Gruppen A, B, C, W-135 und Y zuordnen und nehmen daher eine herausragende Rolle ein. Die verschiedenen Serogruppen unterscheiden sich in ihrer geographischen Verbreitung und ihrem klinischen Erscheinungsbild. So treten Stämme der Serogruppe A und W-135 hauptsächlich epidemisch in Afrika auf, während die Serogruppen B und C für die meisten sporadischen bzw. endemisch auftretenden Erkrankungen in Europa und Nordamerika verantwortlich sind [20; 32; 33]. Da die Polysaccharidkapsel einen wichtigen Virulenzfaktor für *N. meningitidis* darstellt, bietet sie auch Angriffsflächen für die körpereigene Abwehr sowie die Möglichkeit, Impfstoffe zu entwickeln durch Verwendung verschiedener Kapsel-Antigene [34]. Neben einer Einteilung in Serogruppen kann mit Hilfe von molekularbiologischer Methoden eine noch genauere Klassifizierung gelingen und somit der hohen genetischen Variabilität der Meningokokken-Isolate untereinander gerecht werden. Goldstandard hierfür ist momentan

die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) Methode. Bei dieser Methode erfolgt die Einteilung von Stämmen in verschiedene Sequenztypen (ST) anhand ihrer genetischen Variation in sieben Haushaltsgenen [35]. Dieses Verfahren erlaubt eine Serogruppenübergreifende, genauere Zuordnung in klonale Komplexe und ermöglicht eine bessere Charakterisierung als die immunologische Einteilung nach Serogruppen. Die Einteilung anhand dieses Verfahrens hat nicht nur epidemiologischen Charakter, sondern erlaubt auch Aussagen über die Pathogenität verschiedener klonaler Komplexe. So konnten klonale Komplexe mit einer besonders hohen Virulenz identifiziert werden, sogenannte hyperinvasive Isolate, wie das Isolat MC58 (ST-32), die in der Lage sind, wegen ihrer schnellen Verbreitung innerhalb der Bevölkerung, Epidemien auszulösen [36; 37; 38]. Neben der Virulenz, kann auch die klinische Erscheinungsform bei der Infektion mit Isolaten verschiedener klonaler Komplexe variieren. Während Isolate des ST-32 Komplex überwiegende eine Meningitis verursachen, wurde interessanterweise von Ausbrüchen berichtet, verursacht durch Isolate des klonalen Komplexes ST-11, die vorwiegend eine schwere Sepsis, jedoch seltener eine Meningitis verursacht hatten [39; 40; 41; 42].

1.1.3 Virulenzfaktoren von *N. meningitidis*

Die Möglichkeit, den menschlichen Nasopharynx dauerhaft zu kolonisieren, bzw. die Fähigkeit, eine invasive Meningokokken-Erkrankung auszulösen, wird durch verschiedene Virulenzfaktoren vermittelt. Einen der wichtigsten Faktoren stellt dabei die Polysaccharidkapsel dar. Während sie bei der Kolonisation der Atemwege meistens durch verschiedene genetische Mechanismen herunterreguliert ist, kann sie bei den meisten invasiven Isolaten nachgewiesen werden [43; 44]. Sie bietet einen wichtigen Schutz gegen äußere Umweltfaktoren, die eine aerogene Übertragung ermöglicht und bietet Schutz vor Phagozytose und komplementvermittelter Lyse im Blut [45; 46]. Je nach Serogruppe unterscheidet sich der Kapselaufbau. So besteht er bei der Serogruppe A und X hauptsächlich aus *N*-Acetyl-D-Mannosamine-6-Phosphat und *N*-Acetylglucosamin-1-Phosphat, während er sich bei den Serogruppen B, C, W-135 und Y hauptsächlich aus verschiedenen Derivaten der *N*-Acetylneuraminsäure zusammensetzt [47]. Wie alle gram-

negativen Bakterien folgt auch *N. meningitidis* einem charakteristischen Aufbau (s. Abb. 1.1). Die äußerste Hülle, sofern keine Polysaccharidkapsel ausgebildet ist, stellt dabei die äußere Membran dar. Es folgt eine Peptidoglykanschicht, welche sich im periplasmatischen Raum befindet und eine innere Membran, die das Zytoplasma umschließt. Die äußere Membran besteht aus Phospholipiden mit verankerten Lipopolysacchariden, die aus dem O-Antigen, einer Kernregion und dem Lipid A bestehen [48]. Neben der Vermittlung von Adhärenz, fungieren die Lipopolysaccharide als Endotoxin und können die Aktivierung des Immunsystems induzieren [49; 50]. In bzw. an der äußeren Membran befinden sich neben den Lipopolysacchariden auch noch weitere Virulenzfaktoren, die eine wichtige Rolle in der Meningokokken-Pathogenese, wie z.B. der Adhärenz, einnehmen. Sie werden in sogenannte *major*- und *minor*-Adhäsine unterteilt [47]. Zu den *major*-Adhäsinen gehört u.a. der Pilus. Dieser besteht aus verschiedenen Proteinen, den sogenannten Pil-Proteinen. Dazu gehören neben dem Haupt-Pilin PilE weitere Untereinheiten wie Pil-C, Pil-V und Pil-X [51; 52]. Die Funktionen des Pilus sind vielfältig. Aufgrund seiner Länge überragt er die Kapsel und vermittelt die Adhärenz an Wirtszellen [53]. Seine Dynamik erzeugt Bewegungen und wird auch die auch als *twitching motility* bezeichnet. Diese spielt eine Rolle bei der Durchdringung der mukosalen Barriere und der Ausbildung von Mikrokolonien [54]. Weiterhin kann Pilus-vermittelt die Aufnahme von Fremd-DNA erfolgen [55]. Neben dem Pilus werden auch die sogenannten *opacity*-Proteine zu den Haupt-Adhäsinen gezählt. Die *opacity*-Proteine verdanken ihren Namen der Eigenschaft, Kolonien, die diese Proteine exprimieren, trüb erscheinen zu lassen [47]. *N. meningitidis* kann zwei Typen von *opacity*-Proteinen exprimieren, Opa und Opc. Neben *N. meningitidis* ist auch *N. gonorrhoeae* in der Lage, Opa-Proteine zu bilden, jedoch nicht fähig ein funktionsfähiges Opc-Protein zu exprimieren [56]. Die *opacity*-Proteine bilden mit acht Transmembrandomänen bei den Opa-Proteinen und zehn Transmembrandomänen bei dem Opc-Protein eine Tunnelstruktur in der äußeren Membran [57]. Die Variabilität unter den *opacity*-Proteinen bzw. die Interaktion mit dem Wirt wird über 4 bzw. 5 extrazelluläre Schleifen erreicht [58; 59]. Während Opa-Proteine eine höhere Diversität in ihrer Struktur aufweisen und von mehreren Genen determiniert

werden, unterliegt die Expression von Opc der Kodierung von nur einem Gen [56; 57]. Die Expression des *opc*-Gens unterliegt dabei einem transkriptionalen Regulationsmechanismus, der in Abhängigkeit von einer variablen Anzahl an Cytidin-Nukleotiden vor dem *opc*-Gen gesteuert wird. Eine Anzahl von 12 oder 13 Cytidin-Nukleotiden führt zu einer suffizienten Expression des *opc*-Gens. Die Expression variiert bei einer Anzahl von 11 oder 14 Cytidin-Nukleotide und erfolgt nicht mehr bei einer niedrigeren oder höheren Anzahl an Cytidin-Nukleotiden [60]. Weiterhin besitzen nicht alle *N.meningitidis* Isolate ein *opc*-Gen. So fehlt dieses beispielsweise bei den Isolaten des ST-11 Komplexes, welche v.a. eine Sepsis und weniger eine Meningitis verursachen [41; 42].

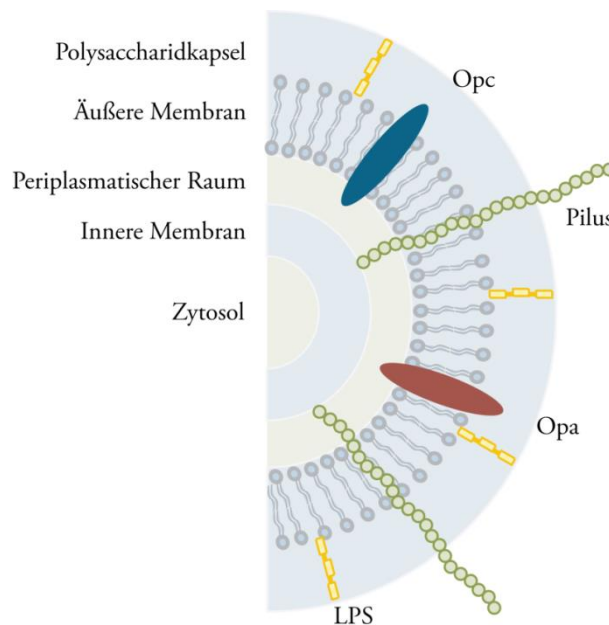


Abb. 1.1 Schematischer Aufbau von *N. meningitidis*

Dargestellt wird der typische Aufbau von gram-negativen Bakterien mit Darstellung verschiedener Virulenzfaktoren von *N. meningitidis*.

Neben diesen *major*-Adhäsinen gibt es eine Reihe weiterer, sogenannter *minor*-Adhäsine, deren Rolle in der Meningokokken-Pathogenese zum Teil bisher unbekannt ist. Zu diesen Adhäsinen gehören u.a. das *Neisserial adhesin A* (NadA), das *Neisseria hia homologue A protein* (nhhA) oder das *Adhesion penetration protein* (App) [61; 62; 63]. Schutz und Adhärenz sind ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Meningokokken-Infektion, jedoch werden Virulenz und Persistenz nicht nur durch diese zwei Faktoren vermittelt,

sondern der Erreger muss auch in der Lage sein, sich mit Nährstoffen zu versorgen. Zu diesen metabolischen Aspekten gehört beispielsweise die essentielle Versorgung mit Eisen, welche *N. meningitidis* mittels speziellen Mechanismen bewerkstelligt [64; 65]. Alle diese Eigenschaften erlauben eine optimale Anpassung an den menschlichen Organismus und ermöglichen der Art, in ihrer ökologischen Nische dauerhaft zu überleben.

1.1.4 Pathogen-Wirt-Interaktionen

In der Meningokokken-Pathogenese kommt es zu einer Reihe von Interaktionen zwischen bakteriellen und humanen Strukturen, welche die Grundlage einer Infektion bilden. Den Beginn einer Kolonisation bzw. einer invasiven Meningokokken-Erkrankung stellt die Übertragung des Erregers dar. Bei der aerogenen Übertragung von *N. meningitidis* bietet die Polysaccharidkapsel zwar Schutz vor Umweltfaktoren, verdeckt andererseits aufgrund ihres Ausmaßes und ihrer negativen Ladung auch Adhäsine und führt zu deren Ineffektivität [66; 67]. Eine Ausnahme bilden dabei die Pili. Sie überragen die Kapsel und können eine erste Bindung des Bakteriums an nicht-zilientragende Epithelzellen des Nasopharynx etablieren [53; 68]. Der humane Interaktionspartner dieser Pilus-vermittelten Adhärenz ist noch nicht abschließend identifiziert. Die Rolle von CD46 wird dabei sehr kontrovers diskutiert und ist z.T. schon widerlegt worden [69; 70; 71]. Neuere Arbeiten konnten jedoch eine Interaktion zwischen Pili und dem Glykoprotein CD147 zeigen [72]. Nachdem eine Bindung an Epithelzellen erfolgt ist, können Meningokokken über verschiedene Mechanismen die Expression ihrer Polysaccharidkapsel herunterregulieren [43; 44]. Dies ermöglicht die Bindung von weiteren Adhäsinen, die zuvor durch die Kapsel verdeckt wurden. Opa Proteine sind beispielsweise in der Lage an zellmembranständige CEA (Carcinoembryonales Antigen)-Proteine, wie z.B. CEACAM-1 zu binden [58]. Die Expression von CEACAM-Proteinen wird u.a. nach einem respiratorischen Infekt in den Epithelzellen hochreguliert. Die dadurch bedingte verstärkte CEACAM-Opa-Interaktion ist eine Ursache für das vermehrte Auftreten von invasiven Meningokokken-Erkrankungen nach einem respiratorischen Infekt [58]. Weiterhin konnte sowohl für Opa-Proteine als auch für das Opc-Protein eine Bindung an membranständige Heparansulfat-Proteoglykane

gezeigt werden [73; 74]. Die Heparansulfat-Proteoglykane sind Glykoproteine der extrazellulären Matrix und Zellmembran und fungieren unter anderem als Rezeptor und Korezeptor [75]. Vermittelt durch die verschiedenen Virulenzfaktoren, erfolgt die Transzytose durch die Epithelbarriere und das Eindringen des Erregers in den Blutkreislauf. Die zuvor herunterregulierte Kapsel muss nun wieder ausgebildet werden, um einen Schutz vor dem Immunsystem zu gewährleisten [46]. Neben dem Schutz, den die Polysaccharidkapsel gegen die humane Immunantwort bietet, besitzt *N. meningitidis* noch weitere Schutzmechanismen. Beispielsweise ist der bakterielle Kapselbaustein *N*-Acetylneuraminsäure auch Bestandteil der Glykokalyx von humanen Zellen und ermöglicht dem Erreger durch molekulare Mimikry der Immunantwort zu entgehen [76]. Besonders ausgeprägt ist diese strukturelle Ähnlichkeit bei der Serogruppe B, sodass aufgrund dieser Similarität keine Entwicklung eines Impfstoffes anhand von Kapselantigenen, wie es bei anderen Serogruppen der Fall war, möglich war [77]. Durch eine disseminierte Ausbreitung der Bakterien im Körper sowie die Freisetzung von Endotoxinen kann die Infektion zu einem septischen Krankheitsbild führen [78]. Für die Ausbildung einer Meningitis, d.h. der Infektion der Hirnhäute, muss der Erreger die Blut-Liquor-Schranke überwinden. Das morphologische Korrelat der Blut-Liquor bzw. Blut-Hirn-Schranke, die das ZNS umgibt, stellen dabei spezialisierte Endothelzellen dar, welche durch ihre Zell-Zell-Verbindungen die Permeabilität zwischen den zwei Kompartimenten herabsetzen [79; 80; 81]. Die Blut-Hirn-Schranke dient dabei mit ihrer hohen parazellulären Undurchlässigkeit der Aufrechterhaltung eines konstanten Milieus im ZNS sowie einem Schutz dieses vor im Blut befindliche Noxen [82]. Durch die Bindung des bakteriellen Opc-Proteins an Proteine der extrazellulären Matrix, wie Vitronektin und Fibronektin, kann eine Bindung an die Oberfläche der Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke erfolgen. Dabei bilden diese Proteine eine Brücke zwischen dem Erreger und zellmembran-assoziierten Integrinen wie $\alpha V\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ [83; 84]. Die Bindung des Erregers an die Zelle führt zur Induktion einer starken Signaltransduktion, vermittelt über Tyrosinkinase. Diese Interaktion führt zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts, welche letztlich in einer Aufnahme des Erregers mündet [85]. Die Signaltransduktion umfasst dabei neben

nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie die Src-Proteinfamilie oder die *focal adhesion kinase* (FAK), auch die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen [86; 87]. Es konnte gezeigt werden, dass die Infektion von Gehirndothelzellen mit *N. meningitidis* eine Aktivierung von epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren auslöst und diese Aktivierung an der Aufnahme von Meningokokken in die Zelle beteiligt ist [87]. Die Gruppe der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren wird auch als Erb-Familie bezeichnet und umfasst dabei die vier eng verwandten Rezeptor-Tyrosinkinasen EGFR1/HER1 (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) und HER4 (ErbB-4). Die Aktivierung dieser Rezeptorfamilie erfolgt durch die Dimerisierung zweier Rezeptoren in der Zellmembran, welche bei einer extrazellulären Ligandenbindung eintritt. Die Dimerisierung bedingt eine Autophosphorylierung, die über die intrazelluläre Kinasedomäne der Rezeptoren zu einer Phosphorylierung weiterer Signalmoleküle führt. Die Dimerisierung kann dabei als Homodimerisierung, d.h. zwischen zwei Rezeptoren derselben Subfamilie erfolgen oder als Heterodimerisierung, d.h. zwischen verschiedenen Rezeptorsubtypen [88].

Nachdem sich die Meningokokken erfolgreich an die Zelloberfläche gebunden haben, bilden sie durch ihre Vermehrung sogenannte Mikrokolonien. Unterhalb dieser Mikrokolonien konnte sowohl für Epithel- als auch Endothelzellen die Formierung sogenannter *cortical plaques* beobachtet werden [89; 90]. Diese sind Mikrodomänen mit einer erhöhten Dichte an Rezeptoren wie ErbB2 und CD44, sowie verschiedenen intrazellulären Proteinen, welche Mikrovilli-artige Zellausstülpungen induzieren. In diesen kommt es u.a. zu einer Akkumulation von Ezrin und Moesin (s. Abb. 1.2). Diese beiden Proteine gehören zur ERM-Proteinfamilie (Ezrin/Radixin/Moesin) und sind in der Lage, eine Vernetzung zwischen Zellmembran und Zytoskelett herzustellen, indem ihr N-Terminus verschiedene, in der Zellmembran verankerte Proteine binden kann und ihr C-Terminus mit Aktin interagiert [91; 92]. Ein wichtiger Schritt in der Aktivierung bzw. in der Stabilisierung des aktiven Zustandes von ERM-Proteinen stellt die Phosphorylierung konservierter Threonin-Reste innerhalb der C-terminalen Domäne wie z.B. Ezrin Thr567, Radixin Thr 564 und Moesin Thr558 dar [93]. Dieses Zusammenspiel zwischen Zellmembran und Zytoskelett ermöglicht die Ausbildung dieser zellulären Ausläufer.

Neben den ERM-Proteinen befinden sich innerhalb der *cortical plaques* vermehrt das Membranprotein CD44, ein Bindungspartner der ERM Proteine, sowie ICAM-1 [89]. Mitbeteiligt an der Formierung der *cortical plaques* sind u.a. verschiedene Rho-GTPasen, die zur Familie der Ras-Proteine gehören und kleine G-Proteine darstellen, welche auch bei der Dynamik des Zytoskeletts eine wichtige Rolle spielen [90]. Zudem lassen sich unterhalb der Mikrokolonien eine Akkumulation von ErbB-2 Rezeptoren finden, die über eine Pilus-abhängige Interaktion aktiviert werden können [94]. Letztlich führen alle diese molekularen Vorgänge zu einer Konformationsänderung des Zytoskeletts, an deren Ende die Aufnahme des Erregers steht. Gelingt *N. meningitidis* die Transzytose, d.h. der rezeptorabhängige Transport durch die Zelle hindurch und damit die Überwindung der Blut-Hirnschranke, kann eine Vermehrung im Liquorraum in eine Entzündung der Meningen münden.

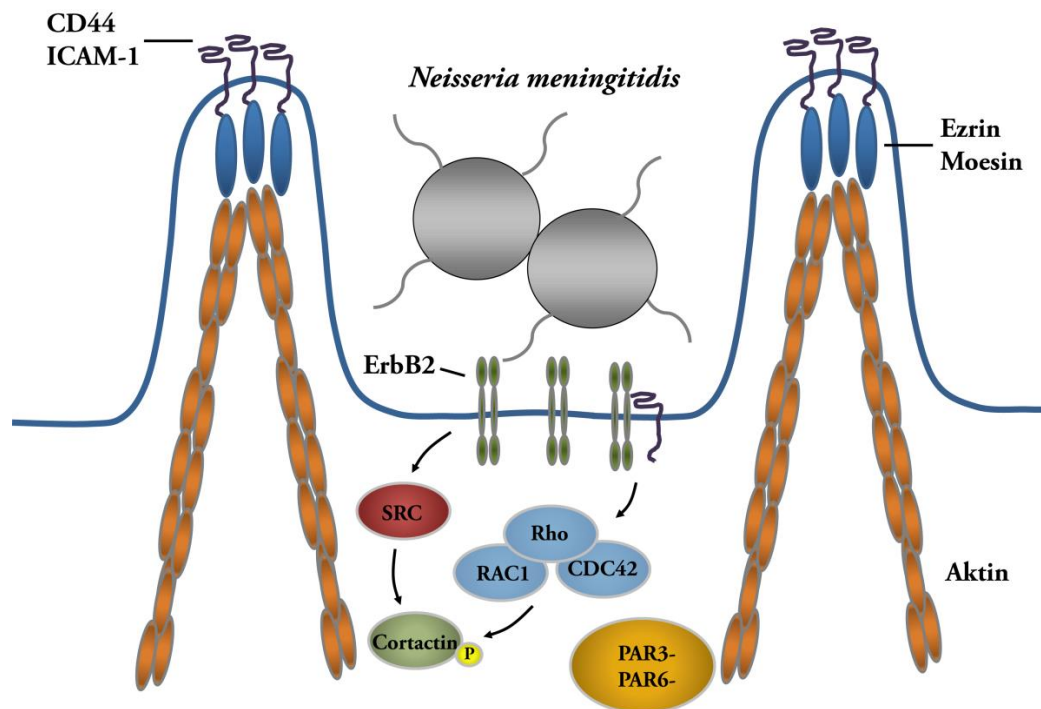


Abb. 1.2 Interaktion von *N. meningitidis* mit Endothelzellen

Die Adhärenz von Mikrokolonien auf der Zelloberfläche führt zur Bildung sogenannter *cortical plaques*. Dabei sind verschiedene Struktur- und Signalproteine beteiligt, darunter die ERM-Proteine Ezrin und Moesin, die über eine Bindung von Aktin und CD44 eine Verbindung zwischen Zellmembran und Zytoskelett bilden und damit eine wichtige Rolle bei der Veränderung der Zellmorphologie spielen.

1.2 Saure Sphingomyelinase und Ceramide

1.2.1 Das Konzept der Zellmembran

Die zellulären Bindungspartner der Virulenzfaktoren von *N. meningitidis* sind Bestandteil der Zellmembran, welche somit die erste Kontaktstelle zwischen Erreger und menschlicher Zelle darstellt. Die Zell- oder auch Plasmamembran umgibt die Zelle und ermöglicht durch ihre Kompartimentierung zwischen zellulären Bestandteilen und äußerer Umgebung das Entstehen und Überleben einer Zelle. Weiterhin spielt sie eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen. Sie bildet mit ihren Bestandteilen die Schnittstelle zwischen äußerer Umwelt und dem Zellinneren und ist so bei vielfältigen Interaktionen der Zelle mit der Umwelt, darunter dem Stoffaustausch, der Signaltransduktion oder der Zellmotilität, beteiligt [95]. Die Zellmembran ist dabei kein statisches, homogenes Gebilde, sondern unterliegt verschiedenen Variabilitäten. Das klassische Flüssig-Mosaik-Modell, 1972 von Singer und Nicholson entworfen, beschreibt die Bildung einer Doppellipidschicht, in der sich integrale bzw. verankerte Membranproteine horizontal bewegen können, was auch als laterale Diffusion bezeichnet wird [96]. Interessanterweise machen dabei die Membranproteine einen Großteil der Membran aus, mit je nach Zelltyp dem 1,5–4 fachen des Gewichts der Proteine im Vergleich zu dem Lipidanteil [96]. Eine Lipiddoppelschicht wird durch amphiphile Lipide gebildet. Amphiphile Lipide weisen die Eigenschaft auf, sowohl einen hydrophilen als auch einen lipophilen Anteil zu besitzen. Die hydrophile Kopfgruppe wendet sich dabei dem wässrigen Medium zu, während sich die lipophilen Kohlenstoffketten zueinander anordnen [97]. Die Verteilung der verschiedenen Lipide ist in der Zellmembran dabei nicht symmetrisch, d.h., die Lipidzusammensetzung der intra- und extrazellulären Seite kann sich unterscheiden [98]. Die Zellmembran ist daher kein homogener Bilayer, sondern geprägt durch Unterschiede in der Struktur und Zusammensetzung der verschiedenen Lipide und Proteine. Diese unterschiedlichen Membrandomänen erlauben u.a. verschiedene Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen [99; 100]. Alleine die Anzahl der verschiedenen Lipide, deren Zusammensetzung einen wesentlichen Einfluss auf die Fluidität und Struktur der Membran hat, geht in die Hunderte, lässt sich aber auf einige Hauptgruppen

reduzieren [101; 102]. Eine Hauptgruppe stellen die Phospholipide dar. Sie lassen sich weiter in Phosphoglyceride und Sphingolipide unterteilen. Während sich die Phosphoglyceride vom Glycerin ableiten, dient als Grundgerüst bei den Sphingolipiden der einfach ungesättigte Aminoalkohol Sphingosin (s. Abb. 1.3). Die Sphingolipide können weiter in die Gruppen der Ceramide, Sphingomyeline und Glycosphingolipide eingeteilt werden, die ihrerseits noch in weitere Klassen der Sphingolipide unterteilt werden können. So lassen sich z.B. die Glycosphingolipide weiter in Cerebroside und Ganglioside unterteilen [102]. Unter den Phosphoglyceriden finden sich am häufigsten Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin [102]. Meistens treten Lipide mit einer Kettenlänge von 16–18 Kohlenstoffatomen auf, die *cis*-konfiguriert sind. Neben den Phospholipiden stellen die Sterine wie Cholesterol eine weitere wichtige Hauptgruppe. Cholesterol spielt eine besondere Rolle bei der Ausbildung von sogenannten *lipid rafts*. Diese sind Mikrodomänen innerhalb der Zellmembran, die eine höhere Dichte als die restliche Zellmembran aufweisen und sozusagen in der Membran schwimmen, daher auch die Bezeichnung als *lipid raft* [103]. Zu ihrer Entdeckung trug die Eigenschaft bei, dass sie im Gegensatz zu der restlichen Membran bei niedrigen Temperaturen nicht durch Detergenzien aufgelöst werden können. Sie werden daher auch als *detergent-resistant membranes* (DRM) bezeichnet [104]. In den *lipid rafts* findet sich im Vergleich zur restlichen Membran vermehrt Cholesterol sowie Sphingolipide und eine reduzierte Menge an Phosphoglyceriden. Die chemische Struktur von Cholesterol und Sphingolipiden, wie z.B. dem Sphingomyelin, erlaubt eine nähere Zusammenlagerung dieser Moleküle und führt lokal zur Ausbildung einer höheren Dichte im Vergleich zur restlichen Membran [105]. Neben dieser spezifischen Lipidzusammensetzung finden sich auch charakteristische Proteine in den *lipid rafts* wie Flotillin oder Caveolin [106]. Die Ausbildung von *lipid rafts* hat einen Einfluss auf verschiedene zelluläre Vorgänge, wie die Signaltransduktion, die Membranfluidität, den Transport von Membranproteinen oder die Infektions-Pathogenese verschiedener humanpathogener Erreger [107]. *Lipid rafts* ermöglichen u.a. die Kompartimentierung von Membranproteinen, wie z.B. Rezeptoren und können so zu deren Aktivierung beitragen oder aber vor deren Abbau schützen [108;

109; 110]. Wichtig ist anzumerken, dass die *lipid-raft*-Hypothese bis heute umstritten ist und verschiedene Kontroversen bezüglich ihrer Existenz, ihres Aufbaus und ihrer Funktion existieren [111].

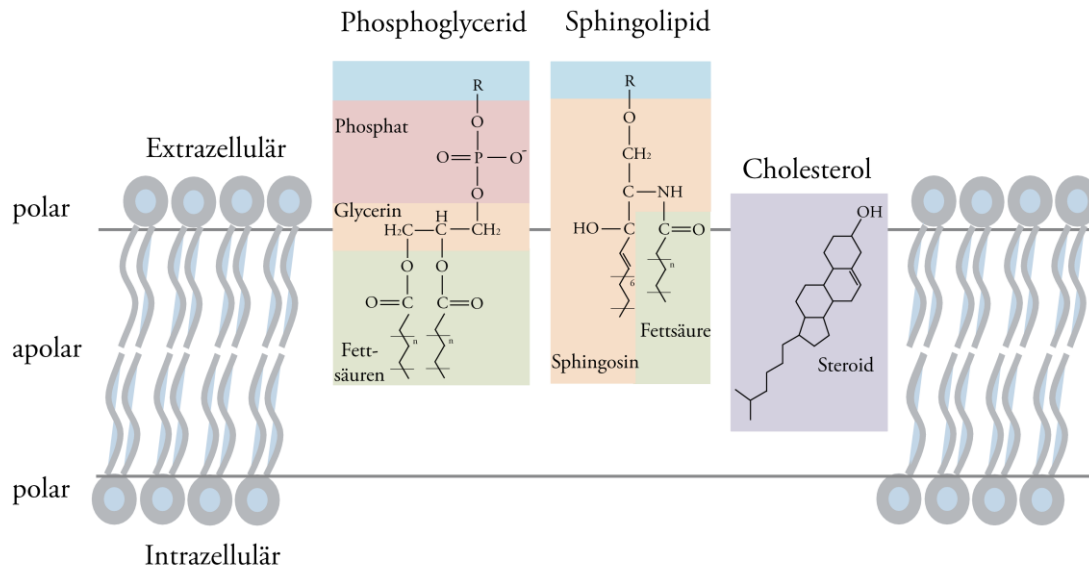


Abb. 1.3 Schematischer Aufbau einer Lipiddoppelschicht von eukaryotischen Zellen

Während sich die polaren, hydrophilen Kopfgruppen in Richtung des wässrigen Umgebungsmilieus orientieren, wenden sich die unpolen Kohlenstoffketten zueinander. Die Selbst-Aggregation und Aufrechterhaltung der Doppelschicht erfolgt dabei durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den Molekülen. Die Ausbildung der Membran kommt v.a. durch amphiphile Lipide aus der Gruppe der Phospholipide und Sphingolipide sowie durch den polyzyklischen Alkohol Cholesterin zustande.

1.2.2 Ceramide: Aufbau, Metabolismus und Funktion

Neben den Cholesterin-reichen *lipid rafts* sind auch Ceramide in der Lage, sich zu formieren und sogenannte Ceramid-reiche Plattformen auszubilden. Die Ceramide besitzen die einfachste chemische Struktur der Sphingolipide und bestehen aus einem Sphingosin, welches über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verbunden ist. Die Länge der Fettsäure kann dabei variieren, weist jedoch typischerweise eine Länge von 16–20 Kohlenstoffatomen auf [112; 113]. Die Synthese der Ceramide kann über drei verschiedene Wege erfolgen: Erstens durch die enzymatische Hydrolyse von Sphingomyelin, dem häufigsten

Sphingolipid der Zellmembran. Dies erfolgt durch die Enzymgruppe der Sphingomyelinasen [114]. Auf diesen Syntheseweg wird in Kapitel 1.2.3. genauer eingegangen. Zweitens ist auch die Bildung von Ceramiden *de novo* d.h. durch die Neusynthese im endoplasmatischen Retikulum möglich. Die Bildung von Ceramiden beginnt dabei mit der Verbindung von Serin und Palmitoyl-CoA durch die Palmitoyltransferase. Das so entstandene 3-Ketodihydrosphingosin wird in weiteren Schritten zu Dihydrosphingosin reduziert und anschließend der Ceramid-Vorläufer Dihydroceramid durch die Ceramid-Synthasen gebildet. Im letzten Schritt erfolgt die Umwandlung von Dihydroceramiden durch die Dihydroceramid-Desaturase zu den Ceramiden [113; 115]. Die so entstandenen Ceramide werden u.a. zum Golgi-Apparat transportiert und dienen dort als Baustein für die Synthese weiterer Sphingolipide [115]. Neben der enzymatischen Synthese durch Sphingomyelinasen und der *de novo* Synthese existiert noch ein dritter Syntheseweg, der sogenannte *salvage pathway* [116]. Bei diesem Syntheseweg werden die Abbauprodukte des Sphingolipid-Katabolismus, wie z.B. das Sphingosin, wiederverwertet. Die Synthese von Sphingolipiden aus ihren Abbauprodukten macht dabei einen großen Teil des Sphingolipid-Stoffwechsels aus [116]. Die unterschiedlichen Synthesewege der Ceramide können durch unterschiedliche Signale aktiviert werden. So steht die Aktivierung der *de novo* Synthese v.a. im Zusammenhang mit der Induktion durch Chemotherapeutika, Cannabinoide und Hitze-bedingten Stress [117; 118; 119]. Die enzymatische Synthese wird dagegen bei verschiedenen Infektionen, oxidativem Stress, durch TNF- α oder durch den Fas-Liganden aktiviert [120; 121; 122; 123; 124]. Die entstandenen Ceramide stellen einen zentralen Baustein im Sphingolipid-Metabolismus dar und können durch verschiedene Enzyme, wie z.B. die Sphingomyelin-Synthase zu Sphingomyelin oder die Glucosylceramid-Synthase zu dem Glykosphingolipid Glykosylceramid, weiter modifiziert werden. Der Abbau erfolgt u.a. über Ceramidasen, die Ceramide in Sphingosin und Fettsäuren spalten [113]. Das entstandene Sphingosin kann über den *salvage pathway* wieder in die Sphingolipid-Synthese einfließen oder weiter enzymatisch modifiziert werden. So kann mit Hilfe der Sphingosin-Kinase die Bildung von Sphingosin-1-Phosphat erfolgen, das in Form von Signalmolekülen bei vielen

physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen, wie bei der Regulierung des Immunsystems oder der Karzinogenese verschiedener Tumoren, beteiligt ist [125]. Auch Ceramide, z.B. Ceramide-1-Phosphat, können ebenso wie manch andere Lipide als Signalmoleküle fungieren. Sie interagieren dabei mit einer Reihe von Proteinen und sind an zellulären Vorgängen wie der Apoptose und der Zellalterung beteiligt [126; 127]. Eine wichtige Eigenschaft besonders im Hinblick auf ihren Einfluss in der Pathogenese verschiedener Infektionskrankheiten ist die oben genannte Fähigkeit der Ceramide, sich zu Membranplattformen zusammenzulagern. Dabei können, wie erwähnt, verschiedene Reize zu einer vermehrten Bildung von Ceramiden führen. Die Ceramide tendieren dazu aufgrund ihrer chemischen Eigenschaft sich eng zusammen zu lagern und Mikrodomänen zu bilden. Diese Mikrodomänen können dann zu größeren Strukturen, sogenannten Membranplattformen, fusionieren [128; 129; 130]. Innerhalb dieser Ceramid-reichen Plattformen können verschiedene Rezeptoren akkumulieren, was vermutlich durch die Transmembrandomäne dieser determiniert wird. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch unbekannt [130]. Die Zusammenlagerung von Rezeptoren innerhalb von Ceramid-reichen Plattformen kann zu ihrer Aktivierung bzw. zur Verstärkung ihres Signals beitragen. Dies konnte beispielsweise für den Fas-Rezeptor CD95 gezeigt werden [131].

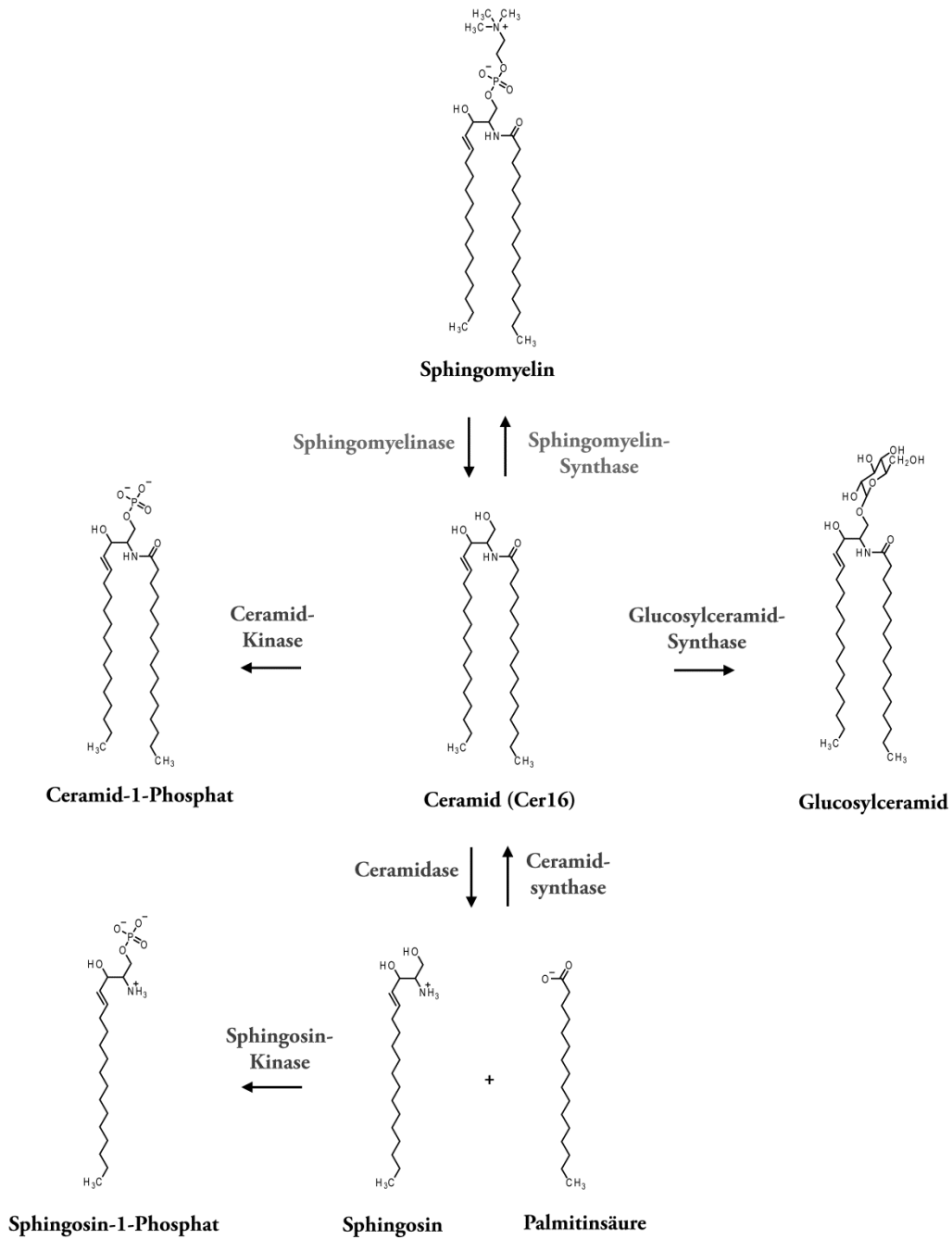


Abb. 1.4 Ceramid-Metabolismus

Neben der Neusynthese im endoplasmatischen Retikulum und der Bildung aus Sphingolipid-Abbauprodukten können Ceramide durch die Hydrolyse von Sphingomyelin durch die Sphingomyelinasen enzymatisch gebildet werden. Das entstandene Ceramid kann anschließend durch die Ceramidase abgebaut werden oder durch andere Enzyme weiter modifiziert werden.

1.2.3 Die Enzymgruppe der Sphingomyelinasen

Die Gruppe der Sphingomyelinasen umfasst verschiedene Enzyme, die in der Lage sind, die Phosphorsäureester-Bindung des Sphingomyelins zu hydrolysieren. Sphingomyelinasen werden daher auch als Sphingomyelin-Phosphodiesterasen bezeichnet. Bei dieser enzymatischen Reaktion entsteht neben Ceramid Cholinphosphat [114]. Die Sphingomyelinasen weisen untereinander verschiedene chemische Eigenschaften auf und werden klassischerweise nach ihrem pH-Optimum in saure, neutrale und alkalische Sphingomyelinasen unterteilt. Zum Teil erfolgt eine weitere Differenzierung in verschiedene Enzymformen innerhalb dieser Gruppen [132; 133]. Neben diesen humanen Formen existiert noch eine Sonderform, die bakterielle Sphingomyelinase, die z.B. von *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* oder *Staphylococcus aureus* exprimiert werden [134; 135; 136]. Die alkalische Sphingomyelinase wird auch als ENPP7 bezeichnet, da sie strukturelle Ähnlichkeiten zu der Familie der Ectonukleotid-Pyrophosphatase /Phosphodiesterase (ENPP) aufweist [137]. Die ENPP7 besitzt ein pH-Optimum von 9 und wird nur in Organen des gastrointestinalen Traktes, v.a. im Jejunum sowie in der Leber exprimiert [138]. Aufgabe ist u.a. die Digestion der durch die Nahrung aufgenommenen Sphingomyeline [139]. Weiterhin scheint die alkalische Sphingomyelinase bei der Karzinogenese und bei chronisch entzündlichen Erkrankungen des unteren GI-Traktes eine Rolle zu spielen [140; 141]. Die neutrale Sphingomyelinase, die ihre höchste Aktivität bei einem pH-Wert von 7,4 aufweist, lässt sich weiter in eine Magnesium-abhängige und in eine Magnesium-unabhängige neutrale Sphingomyelinase unterteilen [114]. Die neutrale Sphingomyelinase kann durch verschiedene Faktoren, wie z.B. TNF- α , stimuliert werden [142]. Auch konnte eine Beteiligung der neutralen Sphingomyelinase bei der Infektion-Pathogenese bei *N. gonorrhoeae* gezeigt werden [143]. Die saure Sphingomyelinase stellt die zuerst entdeckte Sphingomyelinase dar und besitzt ein pH-Optimum um einen pH-Wert von 5 [144]. Sie wird über das SMPD1-Gen kodiert und befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 [133]. Durch posttranslationale Modifikation des durch das SMPD1-Gen kodierten Proteins entstehen zwei unterschiedliche Formen der sauren Sphingomyelinase, eine sekretorische und eine

lysosomale Form. Während die letztere u.a. durch die Verschmelzung der Lysosomen mit der Zellmembran an die extrazelluläre Seite der Membran gebracht werden und dort durch die Hydrolyse von Sphingomyelin, Ceramide in der Zellmembran erzeugen kann, wird die sekretorische saure Sphingomyelinase durch Exozytose in die Umgebung abgegeben [133]. Die Differenzierung der beiden Formen erfolgt durch eine unterschiedliche Modifikation mit verschiedenen chemischen Gruppen. Beispielsweise führt die Phosphorylierung mit Mannose-6-Phosphat, einem Erkennungsmarker für lysosomale Enzyme, zu einer Adressierung für Lysosome und damit zur Bildung einer lysosomalen sauren Sphingomyelinase [133; 145]. Mutationen im SMPD1-Gen können zum Auftreten der Niemann-Pick-Krankheit A und B führen, die zu den Sphingolipidosen gehört und eine autosomal-rezessive lysosomale Speicherkrankheit darstellt. Da der Abbau von Sphingomyeline durch die saure Sphingomyelinase in den Lysosomen fehlt, kommt es zu einer Akkumulation derer v.a. in Leber, Lunge, Milz, Gehirn und Knochenmark mit einer daraus resultierenden Auftreten einer Organomegalie sowie Organdysfunktionen. Ein völliger Funktionsverlust durch eine *missense*-Mutation, wie er beim Typ A, der klassischen, infantilen Form vorliegt, führt zum Tod im frühen Kindesalter [146; 147; 148]. Verschiedene Faktoren haben einen Einfluss auf die Aktivität der sauren Sphingomyelinase. Neben chemischen Faktoren wie pH-Wert und Kationen sind auch Lipide und Proteine an der Regulation der Enzymaktivität beteiligt [149]. Einen wichtigen Faktor für die Aktivität und damit für die Ceramid-Produktion in der Zellmembran scheint neben der spezifischen Aktivierung der sauren Sphingomyelinase die Translokation des Enzyms zur äußeren Seite der Zellmembran darzustellen, bei dem das Enzym in direkte Nähe zu seinem Substrat gelangt [131; 150]. Der Einfluss der sauren Sphingomyelinase auf biologische Vorgänge ist dabei vielfältig und unterschiedlich zwischen den beiden oben genannten Formen. Die sekretorische saure Sphingomyelinase, die durch die endokrine Sekretion u.a. ins Blut abgegeben wird, ist an verschiedenen Vorgängen beteiligt. So interagiert sie beispielsweise mit LDL und ist an der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, wie z.B. der Atherosklerose beteiligt [133]. Die lysosomale saure Sphingomyelinase nimmt dagegen eine wichtige Rolle bei der Reaktion der Zelle auf verschiedene Stresssignale und der Regulation

des programmierten Zelltodes, der Apoptose, ein. Verschiedene endogene Stimuli, wie z.B. der FAS-Ligand, TNF- α oder eine Ischämie, als auch exogene Faktoren wie Lipopolysaccharide, UV-Strahlung oder Chemotherapeutika nehmen dabei Einfluss auf die Aktivität und damit die Ceramid-Produktion der sauren Sphingomyelinasen und induzieren somit eine zelluläre Stressantwort [151; 152; 153; 154; 155; 120].

1.2.4 Die Bedeutung von Ceramid-reichen Plattformen bei Infektionen

Die lysosomale saure Sphingomyelinase ist auch bei der Infektions-Pathogenese verschiedener humanpathogener Bakterien und Viren beteiligt, darunter u.a. *Pseudomonas aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*, Rhinoviren und Masernviren [156; 121; 157; 158]. Eine Infektion führt dabei zu einer Translokation der sauren Sphingomyelinase an die extrazelluläre Seite der Zellmembran mit einer nachfolgenden Ceramid-Produktion und der Ausbildung von Ceramid-reichen Plattformen. Deren Funktion bzw. deren Auswirkung unterscheidet sich dabei je nach den Erregern. Für *N. gonorrhoeae* konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase und die Ausbildung von Ceramid-reichen Plattformen zu einer erhöhten Invasivität des Erregers führt, die möglicherweise durch die Akkumulation von CEACAM-Rezeptoren, einem Interaktionspartner der bakteriellen Opa-Proteine, innerhalb der Ceramid-reichen Plattformen bedingt ist [121; 159]. Bei *Pseudomonas aeruginosa* führt die Formation von Ceramid-reichen Plattformen einerseits auch zu einer erhöhten Invasivität des Erregers, andererseits wird gleichzeitig durch die Akkumulation und Aktivierung von CD95 innerhalb der Ceramid-reichen Plattformen eine für den Wirt protektive Apoptose-Antwort induziert [160; 161].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Für verschiedene humanpathogene Erreger konnte gezeigt werden, dass die saure Sphingomyelinase an der jeweiligen Infektions-Pathogenese beteiligt ist. Erste Vorversuche dieser Arbeit machten bereits deutlich, dass die Inhibition der sauren Sphingomyelinase in menschlichen Gehirndothelzellen zu einer geringeren intrazellulären Aufnahme von Meningokokken führte. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der sauren Sphingomyelinase (ASM) bei der Infektion mit *N. meningitidis* aufzuarbeiten und zu überprüfen. Vorrangig sollte dabei der Einfluss der Infektion auf menschliche Gehirndothelzellen geklärt werden. Neben der Analyse der Enzymaktivität und der Messung bzw. der Visualisierung der Ceramid-Produktion sollten dabei Mechanismen der Aktivierung der ASM aufgedeckt werden und der Einfluss der sauren Sphingomyelinase bzw. der Ceramide auf die zellulären Veränderungen, die besonders im Zusammenhang mit der Meningokokken-Pathogenese stehen, untersucht werden. Neben dieser zellbiologischen Zielsetzung stellte die Analyse von bakteriellen Faktoren, die möglicherweise bei diesem Infektionsmodell beteiligt sind, einen weiteren Schwerpunkt dar. Dabei sollten nicht nur einzelne Virulenzfaktoren untersucht werden, sondern auch verschiedene Isolate, die zu unterschiedlichen hyperinvasiven klonalen Komplexen gehören, auf ihren Einfluss auf die Aktivierung der ASM hin getestet und verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Brutschrank	B5060	Heraeus
	B6200	Heraeus
	Nu-5510E	Nuaire
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Bioscience
Echtzeit-Thermozykler	Step-One	Applied Biosystems
Elektrophoresekammer	Compact M	Biometra
	G42	Biometra
Flüssigstickstofftanksystem	38K	Taylor-Wharton
Gasbrenner	Flammy S	Schütt biotec
Gefrierschrank	GS 5203	Liebherr
Geldokumentationssystem	Universal Hood III	Bio-Rad Lab.
Heizblock	2099-DA	Liebisch
Kolonienzähler	Protocol SR	Synbiosis
Kühlschrank	FKS 5000	Liebherr
Magnetrührer	MR Hei-Standard	Heidolph
Mikroplatten-Photometer	Infinite F200 pro	Tecan
Mikroskop	AxioCam ICc 1	Zeiss
	Axio Imager Z1	Zeiss
	BZ9000	Keyence
	SP5	Leica
	Wilovert	Will Wetzlar
Netzgerät	P25	Biometra
pH-Meter	Lab850	Schütt

Photometer	CO8000	Biochrom
	Infinite 200	Tecan
Pipetten	Reference	Eppendorf
	Research	Eppendorf
Pipettierhilfe	Accu-jet pro	Brand
Schüttel-Inkubator	Duomax 1030	Heidolph
	Phero-Shaker	Biotec-Fischer
	TS1	Biometra
	VF1	IKA
Sicherheitswerkbank	HS18	Heraeus
	Nu-437-400E	Nuaire
	Safe 2020	Thermo Scientific
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	VWR International
Thermozykler	T3000	Biometra
Vakuumpumpe	4000 SZ	Ilmvac
Waage	770	Kern
	PT120	Sartorius
Wasserbad	WB22	Memmert
Western-Blot Kammer	Mini-Protean	Bio-Rad Lab.
Zählkammer	Neubauer improved	Paul Marienfeld
Zellaufschluss	Dounce tissue grinder	Sigma
	Q1375 Sonicator	QSonica
Zentrifuge	CT15RE	Hitachi
	EBA 12	Andreas Hettich
	Megafuge 1.0	Heraeus
	Megafuge 1.0R	Heraeus
	SC110 A	Savant

Tab. 1

2.1.2 Software

Anwendung	Produktname	Hersteller
Bildbearbeitung	Image J	Wayne Rasband
	Illustrator CS2	Adobe
Datenauswertung	Excel 2010	Microsoft
Durchflusszytometrie	CellQuest	BD
Mikroskopie	LAS AF Lite	Leica
Sequenz-Analysen	Lasergene 12	DNASTAR
Textverarbeitung	Word 2010	Microsoft

Tab. 2

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Agarplatten	Columb. A.+ 5% Schafsbl.	bioMérieux
Deckgläser	12 mm rund	A. Hartenstein
Filter	Sterilfilter Filtropur S 0.2	Sarstedt AG
Laborflaschen	Simax 100–1000 ml	Hartenstein
Membranen	Amersham Protran 0,2 µm	GE Healthcare
	Blottingpapier (1,3 mm)	A. Hartenstein
	Whatman Cellulose	GE Healthcare
	Whatman Protran BA85	GE Healthcare
Mikrotiterplatten	96-well Nunc black	Thermo Scientific
Objektträger	76 × 26 × 1 mm	Paul Marienfeld
Pipetten	Pasteurpipette	Brand
	Serolog. Pipetten (5–25 ml)	Sarstedt
Pipettenspitze	20–1000 µl	Sarstedt AG

Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes (0,5–2 ml)	Eppendorf
	PP Röhrchen 15 und 50 ml	Greiner Bio-One
	Flow Cytometry Tube 5 ml	Sarstedt
Skalpell	Einwegskalpell Nr.10	Dahle
Spritzen	HSW Norm-Ject 20 ml	Henke Sass
Wattestäbchen	15 cm	Heinz Herenz
Zellkulturflaschen	T-25, T-75, T-175	Sarstedt
Zellkulturplatten	TC-6, 24, 96-well	Sarstedt
Zellkulturschalen	150 mm	Sarstedt
Zellschaber	25 cm	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen	Ultra-Clear 13,2 ml	Beckmann-Coulter
	15 ml und 50 ml	Greiner

Tab. 3

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol	Roth
Agarose	Roth
Albumin Fraktion V	AppliChem
Ampicilin	Roth
Ammoniumpersulfat	Carl Roth
Aqua dest.	Braun
BCIP/NBT	Abcam
Blue Protein Standard	New Engl. BioLabs
Bromphenolblau	Merck
CaCl ₂	Merck
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva

DMEM	Life Technologies
DMSO	Roth
DNase-freies Wasser	Macherey-Nagel
dNTP	New Engl. BioLabs
DTT	Applichem
ECL Substrat	BioRad Lab.
EDTA	AppliChem
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Merck
FACS Clean, Flow, Rinse	BD Biosciences
FCS	Life Technologies
Fluoprep	bioMérieux
Gelatine	Sigma-Aldrich
Gentamicin	Merck
Glukose	Merck
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
HCl	Roth
Iodixanol	Sigma
IPTG	Roth
Isopropanol	Roth
Kanamycinsulfat	Sigma
KCl	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
LB-Broth Base	Life Technologies
L-Glutamin	Life Technologies
Magermilch	AppliChem

MES	Roth
Methanol	Roth
Mercaptoethanol	Sigma
MgCl ₂	Sigma
NaCl	Roth
NaHCO ₃	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaOH	Roth
Natriumazid	Merck
Natrium-Pyruvat	Life Technologies
Nicht-essentielle Aminosäuren	GE Healthcare
Nu-Serum IV	Life Technologies
Paraformaldehyd	Roth
PBS	Life Technologies
Perm Buffer III	BD Bioscience
Polyacrylamid	Roth
Polyvitex	bioMérieux
Proteose Pepton	BD Bioscience
RPMI-1640	Life Technologies
Saponin	Serva
SDS	Roth
SL DNA Ladder	Eurogentec
Stärke	Sigma
Power SYBR Green	Life Technologies
TEMED	Roth
Tris	Roth
Triton X-100	Roth
Tween20	Merck

Tab. 4

2.1.5 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Bestandteile
APS 16%	16% APS (w/v) in Aqua dest.
Blocking Puffer	1% FCS (v/v), 2% BSA (w/v) in PBS
Coomassie Entfärber	500 ml Methanol, 100 ml 96% Essigsäure, 400 ml VE-Wasser
Coomassie Lösung	250 mg Coomassie, 100 ml Methanol, 20 ml 96% Essigsäure, 80 ml VE-Wasser
Detergent Puffer	MBS, 1% Triton (v/v)/1 mM DTT/1:100 P-8340
Einfriermedium	50% RPMI 1640 (v/v), 30% FCS (v/v), 20% DMSO (v/v)
FACS Puffer	5% FCS (v/v), 0,1% Natriumazid (w/v) in PBS gelöst
Gelatine 0,2%	0,2% Gelatine (w/v) in VE-Wasser bei 50 °C gelöst; autoklaviert
Glycin-HCl 100 nM	0,7507 g ad 100 ml VE-Wasser, pH 3,0 mit 10% HCl eingestellt
LB-Bouillon	2% LB-Bouillon (w/v) in VE-Wasser; autoklaviert
Magermilch 5%	5% Magermilch (w/v) in PBS gelöst

MBS	25 mM 2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonatsäure (MES), 150 mM NaCl Für 250 ml: 1,22 g MES, 2,19 g NaCl ad 250 ml Aqua, pH 6,0 eingestellt
MgCl ₂ 2 M	20,3 g MgCl ₂ ad 50 ml VE-Wasser; sterilfiltriert
NaHCO ₃ 8,4%	8,4 g NaHCO ₃ , ad 100 ml VE-Wasser; sterilfiltriert
NBT/BCIP Lösung	9 ml 0,1 M Tris-HCl pH 9,6, 20 µl MgCl ₂ , 10 mg NBT, 5 mg BCIP
Paraformaldehyd 3,7%	1,85 g Paraformaldehyd ad 50 ml VE-Wasser, erwärmt auf 60 °C, tropfenweise 1 M NaOH zugeben bis Lösung klar war; sterilfiltriert
PBS:	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g Na ₂ HPO ₄ , 0,27 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml VE-Wasser, pH 7,4 eingestellt; autoklaviert.
PBST:	0,05% Tween20 (v/v) in PBS
PPM	7,5 g Proteose Pepton, 2,5 g NaCl, 0,25 g Stärke, 10 ml Stammlösung ad 500 ml VE-Wasser und pH 7,2 eingestellt
PPM +	25 ml PPM, 250 µl Polyvitex, 125 µl NaHCO ₃ , 125 µl MgCl ₂

SDS 20%:	20% SDS (w/v) in VE-Wasser gelöst
SDS (10×):	144 g Glycin, 30 g Tris, 10 g SDS, ad 1000 ml VE-Wasser, pH 8,3 eingestellt
SDS (2×)-Lösung	14 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 11,2 ml Glycerin, 11,2 ml 20% SDS, 9,8 ml Aqua dest., 3,43 ml Mercaptoethanol, Bromphenolblau
Stammlösung	200 g KH_2PO_4 , 50 g K_2HPO_4 ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,3; autoklaviert
TAE (50×):	242 g Tris, 37,2 g EDTA, 59,5 ml Essigsäure 96%, ad 1000 ml VE-Wasser
Tris-HCl 0,1 M	1,211 g Tris ad 100 ml VE-Wasser, pH 8,0 bzw. 9,6 mit 37% HCl eingestellt
Tris-HCl 0,5 M	6,057 g Tris ad 100 ml VE-Wasser, pH 6,8 mit 37% HCl eingestellt
Tris-HCl 1,5 M	18,171 g Tris ad 100 ml VE-Wasser, pH 8,8 mit 37% HCl eingestellt
Triton 0,1%	0,1% Triton X-100 (v/v) in PBS
Western Blot-Puffer	14,4 g Glycin, 3 g Tris, 20% Methanol (v/v), ad 1000 ml VE-Wasser

Tab. 5

2.1.6 Kits

Bezeichnung	Hersteller
DNA Mini Kit	Qiagen
Gel Extraction Kit	Qiagen
Plasmid Midi Kit	Qiagen
Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Reverse Transcription Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Sphingomyelinase Assay Kit	Cayman

Tab. 6

2.1.7 Antikörper und Farbstoffe

Primärantikörper	Spezies	Verwendung	Hersteller
Aktin	Maus IgG	IF: 1:100 (2 µg/ml) WB: 1:1000 (0,2 µg/ml)	Santa Cruz
ASM	Maus IgG	IF: 1:100 (10 µg/ml) FC: 1:100 (10 µg/ml) WB: 1:1000 (1 µg/ml)	Abcam
	Kaninchen IgG	IF: 1:100 (2 µg/ml) WB: 1:1000 (0,2 µg/ml)	Santa Cruz
β-Aktin	Kaninchen IgG	WB: 1:1000	Cell Signaling
Ceramide	Maus IgM	IF: 1:50 (4 µg/ml)	Enzo LS

Ceramide	Maus IgM	FC: 1:30 (6 µg/ml)	Enzo LS
CD44	Maus IgG	IF: 1:100 (10 µg/ml) FC: 1:250 (5 µg/ml)	Abcam
ErbB2	Kaninchen IgG	IF: 1:150 WB: 1:1000	Cell Signaling
ERM	Kaninchen	WB: 1:1000	Cell Signaling
Flotillin-1	Kaninchen	WB: 1:1000	Cell Signaling
NadA	Kaninchen	WB: 1:2000	IHM
NarE	Kaninchen	WB: 1:500	IHM
Opa	Maus	WB: 1:1000	IHM
Opc	Maus	WB: 1:1000	IHM
Phospho-ERM	Kaninchen	WB: 1:1000 IF: 1:200 FC: 1:100	Cell Signaling

Tab. 7

Sekundärantikörper	Spezifität	Verwendung	Hersteller
Alexa Fluor 350	Maus IgM spez.	IF: 14 µg/ml	Life Tech.
Alexa Fluor 488	Maus IgM spez.	IF: 14 µg/ml	Life Tech.
	Kaninchen IgG	IF: 14 µg/ml	Life Tech.
Alexa Fluor 546	Kaninchen IgG	IF: 14 µg/ml IF: 8 µg/ml	Life Tech.
Cy3	Maus IgG (H+L)	FC: 5 µg/ml IF: 10 µg/ml	Jackson IR
Cy5	Maus IgG (H+L)	FC: 5 µg/ml	Jackson IR
	Kaninchen IgG	IF: 10 µg/ml	Jackson IR

Tab. 8

Fluoreszenz-Farbstoffe	Verwendung	Hersteller
Alexa Fluor 488/546 Phalloidin	IF: 1:150	Invitrogen
DAPI	IF: 0,1 µg/ml	Invitrogen
Streptavidin-FITC	IF: 5 µg/ml	Biolegend

Tab. 9

2.1.8 Enzyme, Peptide und Inhibitoren

Bezeichnung	Hersteller
Amitriptylin	Sigma
D609	Tocris
EKB-569	Sigma
Epidermaler Wachstumsfaktor	Life Technologies
Heparin	Sigma
Heparinase III (<i>Flavobacterium h.</i>)	Sigma
<i>NcoI</i>	New England Biolabs
P-8340	Sigma
PKC-Inhibitor	Sigma
Proteinase K	Invitrogen
Ribonuklease	Life Technologies
RNAse Out	Life Technologies
<i>shrimp-alkaline</i> -Phosphatase	Sigma
Sphingomyelinase (<i>Bacillus cereus</i>)	Sigma
Super Script II reverse transcriptase	Life Technologies
<i>Taq</i> -Polymerase (MS0267S)	New England Biolabs
<i>Taq</i> -Polymerase high fidelity	Life Technologies
Trypsin	Life Technologies
<i>XhoI</i>	New England Biolabs

Tab. 10

2.1.9 Primer und siRNA

Primer	Sequenz	Temp.
β -Actin <i>sense</i>	5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'	57 °C
β -Actin <i>antisense</i>	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	57 °C

ASM <i>sense</i>	5'-TGGCTCTATGAAGCGATGGC-3'	57 °C
ASM <i>antisense</i>	5'-TTGAGAGAGATGAGGCCGAGAC-3'	63 °C
OpcA <i>sense</i>	5'-CGGATCCATGGGCAAAAAACAGTTTTTAC-3'	79 °C
OpcA <i>antisense</i>	5'-CCGCTCGAGTCAGAATTTTATGCCGACGCG-3'	93 °C
T7-Promotor	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	51 °C
T7-Terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	53 °C

Tab. 11

Die Primer wurden in Aqua dest. zu einer Endkonzentration von 100 µM gelöst. Die Annealingtemperatur wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Annealing Temperatur} = [4\text{ °C} \times (nG + nC) + 2\text{ °C} \times (nA + nT)] - 5\text{ °C}$$

siRNA	Sequenz	Hersteller
ASM <i>sense</i>	5'-GGUACAUCGCAUAGUGCC[dT][dT]-3'	Sigma
ASM <i>antisense</i>	5'-GGCACUAUGCGAUGUAACC[dT][dT]-3'	Sigma
Kontroll-siRNA	<i>scrambled non-targeting</i> siRNA (Santa Cruz)	Santa Cruz

Tab. 12

2.1.10 Plasmide

Plasmid	Hersteller
pET28a	Novagen

Tab. 13

2.1.11 Zellkultur

Zelllinie	Herkunft/Eigenschaft
HBMEC	Mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem menschlichen Kortex isoliert und mittels Simian Virus 40 large T-Antigen immortalisiert. Zur Verfügung gestellt von Prof. K.S. Kim, Baltimore, USA [162].
shASM HBMEC	HBMEC mit verringerter ASM Aktivität. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. J. Schneider-Schaulies, Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg.
NPDA-Fibroblasten	ASM-defiziente Fibroblasten. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. E. Gulbins, Institut für Molekularbiologie, Essen [121].
WT-Fibroblasten	Fibroblasten mit einer physiologischen ASM Aktivität. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. E. Gulbins, Institut für Molekularbiologie, Essen.

Tab. 14

Zelllinie	Zellkulturmedium	Konzentration
HBMEC	RPMI 1640 mit	
	FCS	10%
	Nu-Serum IV	10%
	Nicht-essentielle Aminosäuren	1%
	Natrium-Pyruvat	1 mM
	L-Glutamin	2 mM
	Heparin	5 U/ml
	Endothelialer Wachstumsfaktor	30 µg/ml

NPDA-Fibroblasten	DMEM mit	
	FCS	10%
	Nicht-essentielle Aminosäuren	1%

Tab. 15

2.1.12 Bakterien

<i>Nm</i> WT	Sg	CC	ST	Ursprung	Referenz
MC58	B	32	74	IMD, UK 1983	[163]
DE6894	B	32	32	IMD, D 2000	[164]
DE7901	B	18	18	IMD, D 2002	[165]
Alpha 4	B	18	19	NTI, D 1999	[38]
WUE2121	C	11	11	IMD, D 1997	[166]
FAM18	C	11	11	IMD, USA 1980	[167]
DE7017	C	11	11	IMD, D 2000	[165]
DE6904	C	8	8	IMD, D 2002	[165]

Tab. 16

Sg = Serogruppe, CC = Klonaler Komplex, ST = Sequenz-Typ, IMD = Invasive Meningokokkenerkrankung, NTI = Nasopharyngeales Trägerisolat.

<i>Nm</i> Mutanten	Genausschaltung	Referenz
MC58 <i>siaD</i>	Polysialyltransferase-Gen	[83]
MC58 <i>siaD</i> , <i>opc</i>	Polysialyltransferase-Gen, <i>opc</i> -Gen	[83]
MC58 <i>opc</i>	<i>opc</i> -Gen	[83]
MC58 Opa	Keine Opa-Expression	IHM

MC58 <i>narE</i>	<i>narE</i> -Gen	IHM
MC58 <i>farR</i>	Transskriptionsrepressor des <i>nadA</i> -Gens	[168]

Tab. 17

<i>E. coli</i>	Phänotyp	Referenz
BL21	WT	[169]
BL21 Opc	Opc exprimierender <i>E. coli</i>	[170]

Tab. 18

Spezies	Nährmedium
<i>N. meningitidis</i>	Flüssig: PPM
	Fest: Columbia Agar + 5% Schafblut
<i>E. coli</i>	Flüssig: LB-Bouillion
	Fest: LB-Agar
	LB-Agar mit Kanamycin
	GC-Agar

Tab. 19

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die verschiedenen Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 25 cm², 75 cm² oder 175 cm² zu einem Monolayer kultiviert. Um eine Adhärenz der Zellen an der Plastikoberfläche zu gewährleisten, wurden die Flaschen mit einer Gelatineschicht überzogen. Dazu wurde 1 ml einer 0,2% Gelatine-Lösung in die Flasche gegeben, die Flüssigkeit gleichmäßig auf dem Boden verteilt und anschließend der Flaschenboden unter leichten Schwenkbewegungen über einer Gasbrennerflamme erhitzt. Die Gelatine, ein Hydrokolloid, das überwiegend aus Kollagen besteht, ermöglichte eine Adhäsion der Zellen an dem Flaschenboden [171]. Nach Entfernung der restlichen Gelatine-Lösung konnte nun Zellkulturmedium in die Flasche gegeben werden und die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C mit einem zusätzlichen Gasatmosphärenanteil von 5% (v/v) CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von über 95% inkubiert. Bevor eine vollständige Konfluenz der Zellen erreicht wurde, mussten diese passagiert werden. Dazu wurde das alte Medium entnommen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 1 ml Trypsin, eine Serinprotease, die extrazelluläre Proteine spaltet, wurde auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von ca. 1 min bei 37 °C wurden die Zellen durch leichtes Kklopfen mit der Hand an der Zellkulturflasche gelöst. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch Zugabe von 5 ml Zellkultur-Medium, welches u.a. α -1-Antitrypsin beinhaltet [172]. Für die weitere Kultivierung wurden je nach Bedarf ca. 1/5 der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche mit Zellkulturmedium überführt und weiter inkubiert. Für die Experimente wurden Zellen bis zur 23. Passage kultiviert, da bis zu dieser Passage eine konstante Verdopplungszeit gezeigt werden konnte und sich die Oberflächenproteine/Rezeptoren in ihrer Expression nicht verändern. Alle offenen Arbeiten an den Zellen wurden zum Kontaminationsschutz in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt.

Um eine Vergleichbarkeit der Versuche zu gewährleisten, musste für jedes Experiment eine definierte Zellzahl ausgesät werden. Dazu wurden die Zellen von der Zellkulturflasche

mittels Trypsin gelöst, mit 5 ml Zellkulturmedium in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und 5 min mit $340 \times g$ in einer Zentrifuge pelletiert. Je nach Größe des Zellpellets wurden die Zellen mit 3–5 ml Zellkulturmedium resuspendiert, bis eine homogene Zellsuspension entstand. 10 μ l dieser Zellsuspension wurden mit 90 μ l Trypanblau in einem Reaktionsgefäß einer 96-well Mikrotiterplatte gemischt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der tote Zellen bzw. solche mit einer defekten Zellmembran dunkelblau, Zellen mit einer intakten Zellmembran jedoch nicht färbt. In eine Zählkammer wurden 10 μ l der gefärbten Zellsuspension pipettiert und unter einem Lichtmikroskop mit 20-facher Vergrößerung ausgezählt. Dazu diente eine Neubauer-Zählkammer mit einer Kammerhöhe von 0,1 mm und 9 Großquadraten von je 1 mm². Zur Bestimmung der Zellzahl pro ml wurde die Anzahl der Zellen von 4 Großquadraten gemittelt und mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Gezählte Zellen}}{4} \times \frac{10^4}{\text{ml}} \times 10$$

Bei einer mittleren Verdopplungszeit der Zellen von ca. 24 h wurden für eine 24-well Zellkulturplatte 5×10^4 bzw. $7,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät und für 3 bzw. 2 Tage inkubiert. 6-well Zellkulturplatten wurden mit $2,5 \times 10^5$ Zellen in 2 ml Medium ausgesät und für 3 Tage inkubiert. Bei der Analyse von Proteinphosphorylierungen wurde das HBMEC-Medium, welches u.a. Wachstumsfaktoren enthält, 24 h vor dem Versuch durch reines RPMI ersetzt.

Für die Kryokonservierung von Zellen wurden 2×10^5 Zellen in 1 ml eines speziellen Dimethylsulfoxid-haltigen Mediums aufgenommen und bei -80°C gelagert. Für die erneute Verwendung wurden die Zellen zügig auf 37°C erwärmt und in eine Zellkulturflasche mit dem passenden Zellkulturmedium gegeben. Nach 24 h erfolgte der Austausch des Zellkulturmediums und die Waschung mit PBS, um das restliche Dimethylsulfoxid zu entfernen.

2.2.2 Infektion von Zellen

Für die Infektion von Zellen mit Bakterien wurden am Vortag Bakterienstämme auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Am Versuchstag wurden mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens Kolonien entnommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml PPM+ überführt. Anschließend erfolgte die Inkubation auf einem Schüttler mit 200 rpm bei 37 °C. Mit Hilfe eines Photometers wurde nach 1,5 h die Veränderung der optischen Dichte gemessen und daraus die Bakterienanzahl/ml bestimmt. Die für eine Infektion benötigte Anzahl an Bakterien wird vor den Versuchen festgelegt und als MOI (*multiplicity of infection*) angegeben. Die MOI beschreibt dabei das Verhältnis der Anzahl von Bakterien zu Zellen. Die Zellzahl wurde aus der Anzahl der ausgesäten Zellen bei einer Verdopplungszeit von 24 h extrapoliert. Für die Infektion wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen wurden mit einer definierten MOI in steril-filtrierte Zellkulturmedium mit einem Anteil von 10% hitzeinaktivierten Humanserum infiziert. Die Inaktivierung wurde zuvor durch die zehnminütige Erhitzung des Serums auf 56 °C sichergestellt. Die Infektion der Zellen erfolgte für einen definierten Zeitraum in einem Inkubator mit CO₂-angereicherter Atmosphäre. Schließlich wurde das Infektionsmedium abgenommen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für weitere Experimente verwendet. Alle durchgeführten Arbeiten erfolgten unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II, um sowohl eine Kontamination der Proben als auch Gefährdung durch humanpathogene Erreger zu vermeiden.

2.2.3 Gentamicin-Protektionsassay

Mit Hilfe des Gentamicin-Protektionsassays lässt sich die Anzahl der adhärenenten und der invasiven Bakterien bei der Infektion eines Zell-Monolayer bestimmen. Für die Infektionsversuche wurden 72 h zuvor 5×10^4 Zellen/ml auf Gelatine beschichteten 24-*well* Zellkulturplatten ausgesät und zu einem konfluenten Zellrasen mit einer Zellzahl von ca. 4×10^5 Zellen pro *well* inkubiert. Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 in steril-filtrierte Zellkulturmedium mit einem Anteil von 10% hitzeinaktiviertem Humanserum infiziert. Nach definierten Zeitpunkten wurde der Überstand von 1 ml abgenommen und

in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben. Es folgte eine geometrische Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} und 10^{-5} von der jeweils 100 μ l auf Agar-Platten ausplattiert wurden. Die ermittelte Anzahl der Bakterien entsprach der Anzahl der frei in dem Infektionsmedium befindlichen Bakterien. Dieser Anteil wird auch als Überstand bezeichnet. Um die Anzahl der an den Zellen adhärenen Bakterien zu bestimmen, wurden die Zellen mit Zellkulturmedium gewaschen und mit 300 μ l einer 1% Saponinlösung, einem Detergens, welches die Zellen lysiert, für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt, eine Verdünnungsreihe bis 10^{-5} erstellt und je 100 μ l der letzten beiden Verdünnungen wurden ausplattiert. Zur Bestimmung der invasiven, d.h. intrazellulären Bakterien wurde, nachdem der Überstand verworfen und die Zellen mit Zellkulturmedium gewaschen worden waren, 1 ml Zellkulturmedium mit 200 μ g/ml Gentamicin, einem nicht zellmembranpermeablen, bakteriziden Aminoglykosid-Antibiotikum, auf die Zellen gegeben und für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach waren alle extrazellulären Bakterien abgetötet und es wurde weiter wie bei der Bestimmung der adhärenen Bakterien vorgegangen, jedoch nur eine Verdünnungsreihe bis 10^{-3} angelegt. Aus allen Verdünnungen wurden jeweils 100 μ l auf die Agar-Platten ausplattiert und diese über Nacht mit 37 °C bei einem Gasatmosphärenanteil von 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die koloniebildende Einheiten (*colony forming units* = CFU) mit einem Kolonien-Zähler bestimmt und auf die ursprüngliche Bakterienanzahl in Relation gesetzt.

2.2.4 Enzymaktivitätsmessung der sauren Sphingomyelinase

Die Enzymaktivität der sauren Sphingomyelinase wurde mit dem *Sphingomyelinase Fluorometric Assay Kit* von Cayman Chemical gemessen. Die enzymatische Spaltung von Sphingomyelin durch die in der Probe enthaltenden Sphingomyelinasen wird bei diesem Kit fluoreszenzbasiert gemessen. Um zwischen neutraler und saurer Sphingomyelinase zu differenzieren, erfolgte die Messung im pH-Optimum der sauren Sphingomyelinase. Das Prinzip dieses Versuchs beruht auf der Hydrolyse mit anschließender Reduktion von Phosphorylcholin, welches neben den Ceramiden durch den Abbau von Sphingomyelin

durch Sphingomyelinasen gebildet wird. Zum Nachweis der Redoxreaktionen wurde im letzten Reaktionsschritt Resazurin, ein blauer Redox-Farbstoff, zum fluoreszierenden Resorufin reduziert, welches ein Exzitationsmaximum bei 530 nm und ein Emissionsmaximum bei 590 nm besitzt. Je mehr Sphingomyelin gespalten wird, desto stärker ist das fluoreszierende Signal, welches mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Photometer gemessen wurde.

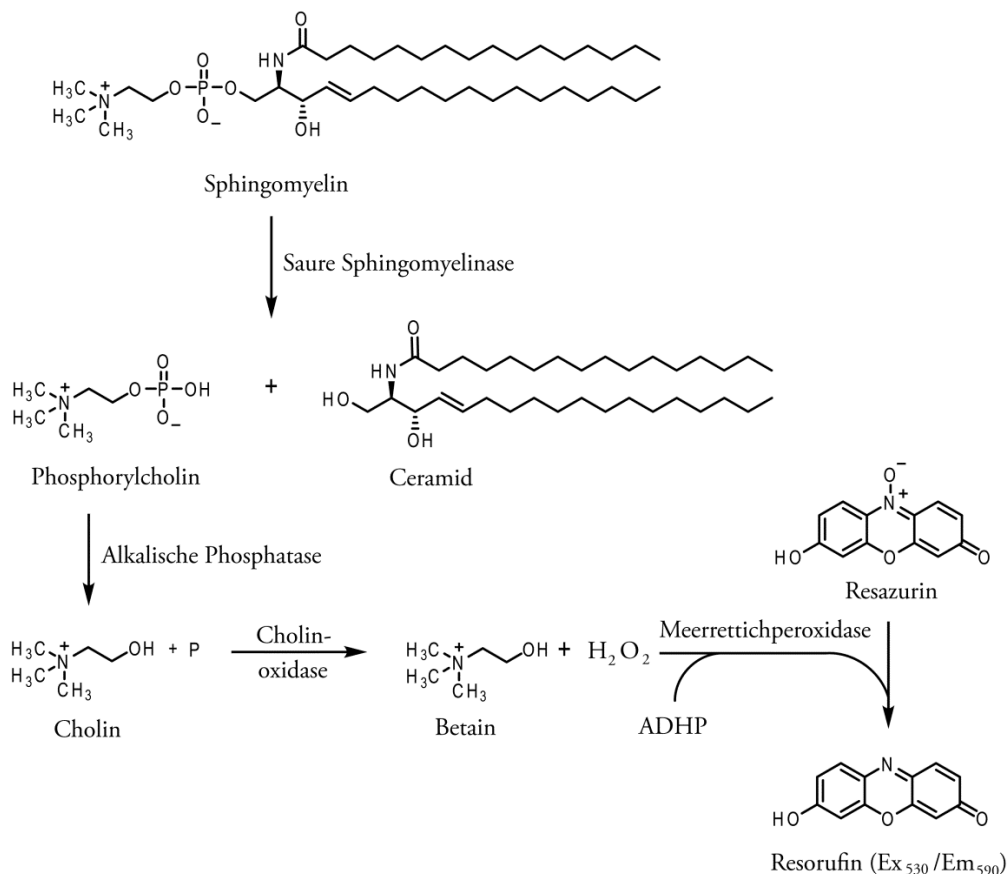


Abb. 2.1 Versuchsprinzip des *Sphingomyelinase Fluorometric Assay Kit* von Cayman Chemical

Zu den präparierten Proben wird eine definierte Menge Sphingomyelin hinzugegeben. Dieses wird durch die in der Probe befindliche saure Sphingomyelinase zu Ceramiden und Phosphorylcholin hydrolysiert. Im nächsten Schritt wird Phosphorylcholin durch eine zugegebene alkalische Phosphatase hydrolysiert und das entstandene Cholin durch die Cholinoxidase reduziert. Der Nachweis dieses Reaktionsweges erfolgt schließlich über die Reduktion von Resazurin zu dem Fluoreszenzfarbstoff Resorufin.

Für die Erstellung der Proben wurden drei Tage vor dem Versuchsbeginn $2,5 \times 10^5$ Zellen pro *well* in einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät und bis zu einer Zellzahl von ca. 2×10^6 Zellen pro *well* kultiviert. Am Versuchstag wurden die Zellen mit einer MOI von 10 im Zellkulturmedium mit 10% hitzeinaktiviertem humanem Serum infiziert. Nach definierten Zeitpunkten wurde das Infektions-Medium entfernt und der Zellrasen zweimalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 500 μ l PBS auf die Zellen gegeben und diese wurden mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst. Für jeden Zeitpunkt wurden Zellen aus zwei *wells* entnommen, sodass jede Probe ca. 4×10^6 Zellen beinhaltete. Die abgelösten Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit $800 \times g$ für 10 min bei $4^\circ C$ in einer Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in *SMase Acid Solution* mit einer Temperatur von $4^\circ C$ resuspendiert. Die *SMase Acid Solution* enthält 50 mM Natriumacetat mit einem pH-Wert von 5. Der saure pH-Wert sorgt für ein pH-Optimum der sauren Sphingomyelinase. Nachdem das Zellpellet resuspendiert worden war, wurden die Zellen lysiert. Dies erfolgte mit 20 Ultraschallimpulsen mit einer Länge von 1 s. Die Zellysate wurden mit $20000 \times g$ erneut für 10 min bei $4^\circ C$ in einer Zentrifuge pelletiert. Danach wurde der Überstand entnommen und das Pellet in 100 μ l *SMase Acid Solution* aufgenommen. Die Proben wurden bis zur Messung bei $-80^\circ C$ gelagert. Die Enzymreaktionen und Messungen erfolgten in einer schwarzen 96-*well*-Zellkulturplatte mit einem flachen Boden. Bestimmt wurde die Fluoreszenzintensität der Versuchsproben, der Hintergrundfluoreszenz, sowie von Standardproben zur Analyse der Enzymaktivität. Für die zur Enzymaktivitätsbestimmung nötigen Standardproben, wurden Lösungen mit aufsteigender Phosphorylcholin-Konzentration (0, 5, 10, 20, 30, 40 und 50 μ M) in *SMase Acid Solution* erstellt. Für die Versuchsproben, die Hintergrundfluoreszenz der Proben und die Standardproben wurden jeweils 10 μ l pro *well* hinzugegeben. Zum Start der Reaktion wurden zu den Versuchsproben und Standardproben jeweils 20 μ l Sphingomyelin Substrat hinzugefügt. Um die Hintergrundfluoreszenz zu bestimmen, wurde statt Sphingomyelin Substrat 20 μ l *SMase Acid Solution* hinzugefügt. Die Proben wurden für 30 min bei $37^\circ C$ inkubiert. Danach wurden zu jeder Probe 100 μ l einer Entwicklerlösung hinzugefügt und

die Proben für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Entwicklerlösung wurde 10 min vorher, wie vom Hersteller vorgegeben, zubereitet und enthielt u.a. eine alkalische Phosphatase, eine Meerrettichperoxidase, eine Cholinoxidase und ADHP. Die Proben wurden mit einem Mikrotiterplatten-Photometer mit einer Exzitationswellenlänge von 535 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm gemessen.

Zur Berechnung der Aktivität der sauren Sphingomyelinase wurde als erstes die jeweilige Hintergrundfluoreszenz der einzelnen Proben abgezogen, um die korrigierte Fluoreszenz (KF) zu erhalten. Bei den Standardproben entsprach die Hintergrundfluoreszenz derjenigen Standardprobe ohne Phosphorylcholin. Mit Hilfe der Standardproben wurde eine Standard-Kurve erstellt. Aufgetragen wurde dazu die gemessene korrigierte Fluoreszenz der Standardproben gegen ihre Phosphorylcholin-Konzentration. Durch eine Ausgleichsgerade erhielt man die Steigung, die der relativen Fluoreszenz pro μM entsprach. Mit der Steigung der Ausgleichsgeraden und der korrigierten Fluoreszenz ließ sich die Enzymaktivität der Probe in $\text{nmol}/\text{min}/\text{ml}$ bestimmen. Einem *unit* entsprach dabei die Menge an Enzym, die in 1 min bei 37 °C 1 nmol Phosphorylcholin bildete. Durch die Aufnahme des Zellpellets in 100 μl *SMase Acid Solution* bei der Erstellung der Proben musste ein Korrekturfaktor von 10 mit einberechnet werden. \ddot{u}

$$\text{Aktivität (nmol/min/ml)} = \frac{KF / 30\text{min}}{m \left(\frac{KF}{\mu\text{M}} \right)} \times \text{Verdünnung der Messprobe} (\times 10)$$

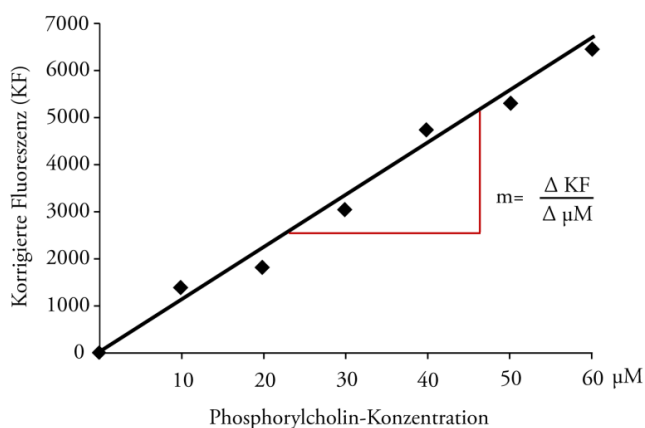


Abb. 2.2 Berechnung der relativen Fluoreszenz pro μM

2.2.5 Massenspektrometrische Quantifizierung von Lipiden

Für eine massenspektrometrische Analyse von Lipiden wurde das Zellkulturmedium bzw. Infektions-Medium abgenommen, die Zellen wurden zweimalig mit PBS gewaschen und mit Hilfe von Trypsin abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 3 min mit $150 \times g$ pelletiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS und schließlich die Aufnahme der Pellets in 500 μ l Methanol mit einer Temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Lagerung der Proben erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die massenspektrometrischen Messungen wurden in Kooperation mit Dr. Lukasz Japtok und Prof. Dr. Burkhard Kleuser, Institut für Ernährungswissenschaft, Universität Potsdam durchgeführt.

2.2.6 Durchflusszytometrische Messungen

Bei der Durchflusszytometrie werden verschiedene optische Signale gemessen, wenn einzelne Zellen durch einen Laserstrahl wandern. Neben der Streuung des Lichtes, welche einen Rückschluss auf die Morphologie der Zelle zulässt, können auch Fluoreszenzsignale detektiert werden. Durch Messung einer großen Zellzahl kann auf die Eigenschaften der gesamten Zellpopulation zurückgeschlossen werden. Enthält das Gerät neben den optischen Messvorrichtungen noch einen elektrostatischen Sortiermechanismus für verschiedene Zellpopulationen, spricht man auch von einem FACS-Gerät (*fluorescence activated cell sorting*) [173; 174]. Für die Versuche wurden die Zellen wie beschrieben 72 h zuvor mit einer Zellzahl von 5×10^4 /ml in einer 24-well Zellkulturplatte ausgesät und am Versuchstag an definierten Zeitpunkten mit einer MOI von 10 infiziert. Für die Probengewinnung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 100 μ l Trypsin sowie durch leichtes Klopfen mit der Hand von dem Boden der Zellkulturplatte gelöst. Anschließend wurde 1 ml Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben, die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 3 min mit $150 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 1 ml FACS-Puffer (5% FCS (v/v), 0,1% Natriumazid (w/v) in PBS) resuspendiert. Um den Metabolismus der Zelle zu inhibieren und somit energieabhängige Veränderungen der Zelloberfläche zu minimieren, wurde für alle weiteren Schritte auf Eis gearbeitet. Zusätzlich beinhaltet der FACS-Puffer

Natriumazid, das den Elektronen-Transport der Atmungskette blockiert und damit den ATP-Gehalt der Zelle senkt. Nachdem das Pellet im FACS-Puffer resuspendiert und für 2 min mit $560 \times g$ bei 4°C zentrifugiert worden war, wurde der Überstand verworfen, das Pellet in $100 \mu\text{l}$ FACS-Puffer mit einem Primär-Antikörper resuspendiert und für 1,5 h auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen mit FACS-Puffer, Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in $300 \mu\text{l}$ FACS-Puffer mit einem Cy5-gekoppelten sekundären Antikörper resuspendiert und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Durch Bindung des Fluorochrom-markierten Antikörpers an den primären Antikörper kann indirekt die Zielstruktur an der Zelloberfläche durch die Anregung des Fluorochromes detektiert werden. Nach dreimaligem Waschen der Probe mit je 1 ml FACS-Puffer wurde das Zellpellet zuletzt in $500 \mu\text{l}$ FACS-Puffer gelöst und die Probe gemessen. Diese erfolgte mit einem FACSCalibur-Gerät unter Verwendung der CellQuest Pro Software (Version 5.2). Die Detektion von Fluoreszenzsignalen erfolgte durch die Anregung mit einem Laser mit der Wellenlänge von 635nm und einem FL4-H-Detektor mit einem Filter von $653\text{--}669\text{ nm}$. Für jede Messprobe wurden Daten von 10.000 Zellen erhoben. Für die Messungen von intrazellulären Strukturen wurde statt FACS-Puffer bei allen Schritten, nach einem anfänglichen Fixationsschritt mit 1% PAF für 10 min und einer milden Permeabilisierung der Zellmembran mit Triton X-100, ein *Permeabilization-Buffer* (BD *Phosflow Perm Buffer*) verwendet.

2.2.7 Erstellung von fluoreszenzmikroskopischen Präparaten

Die Zellen wurden zwei Tage vor dem Versuchsbeginn auf sterile runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 10 mm in *24-well*-Zellkulturplatten ausgesät. Zu ihrer Färbung wurden Meningokokken für 60 min in PPM+ kultiviert und anschließend für 5 min und $2000 \times g$ zu einem Pellet zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde dann in 1 ml FITC-PBS ($1\mu\text{g}$ Fluoresceinisothiocyanat in 1 ml PBS) resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur leicht schüttelnd inkubiert. Fluoresceinisothiocyanat ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 485 nm und einem Emissionsmaximum von 514 nm . Nach 15 min wurde das restliche FITC-PBS durch

Zentrifugation (5 min; $2000 \times g$) und einem Waschschrift mit PBS entfernt. Anschließend wurden die markierten Bakterien im Zellkulturmedium mit 10% hitzeinaktiviertem humanem Serum gelöst und die Zellen mit einer MOI von 30 infiziert. Alternativ wurden GFP-exprimierende Isolate verwendet oder bakterielle Oberflächenstrukturen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern dargestellt. Nach 2 h wurde der Überstand entfernt, die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und 15 min mit einer 3,7% Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern an proteinbindende Oberflächen zu reduzieren, wurden freie Bindungsstellen für 30 min mit einer Blockierungslösung abgesättigt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem primären Antikörper in einer Blockierungslösung für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 0,05% Tween20 in PBS wurden die Zellen mit einem Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörper in einer Blockierungslösung für weitere 45 min inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Für die Darstellung von zusätzlichen Strukturen wurden die Zellen mit einem weiteren primären Antikörper inkubiert. Der zweite Primär-Antikörper muss dabei eine andere Ig-Spezifität als der erste aufweisen und mit Hilfe eines passenden Sekundär-Antiköpers markiert werden. Voraussetzung ist neben der Verwendung von verschiedenen Antikörper-Klassen die Verwendung von Fluorochromen mit einem unterschiedlichen Emissionsspektrum ohne eine Überlappung ihrer Spektren untereinander. Zur Färbung der Zellkerne wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (1:50.000 in PBS) verwendet, welches in die DNA interkaliert und dann ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 358 nm und ein Emissionsmaximum von 461 nm besitzt. Nach Färbung der Zellen wurden die Proben zweimal mit PBS gewaschen und einmal mit Aqua dest.. Zuletzt wurden die Glasplättchen entnommen, getrocknet und auf einem Objektträger mit Fluoprep-Medium eingedeckelt, um die Proben zu konservieren. Die fertigen Präparate wurden mit einem Keyence BZ9000, einem invertierten Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop von Zeiss oder einem konfokalen Leica SP5 Mikroskop mikroskopiert und fotografiert.

2.2.8 Dichtegradientenzentrifugation

Mit der Dichtegradientenzentrifugation können Zellbestandteile in ihrer Dichte aufgetrennt werden. Dabei erfolgt die Zentrifugation der Proben in einem Lösungsmittel, mit einem Konzentrationsgefälle und einer hohen Winkelgeschwindigkeit des Rotors. Als Lösungsmittel wurde das Röntgenkontrastmittel Iodixanol (OptiPrep) verwendet. Für die Auftrennung der Zellbestandteile wurde ein diskontinuierlicher Gradient aufgebaut. Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation können auch *lipid rafts* isoliert werden. Diese bleiben im Gegensatz zum Rest der Zellmembran in Gegenwart eines milden Detergenz stabil, daher auch die Bezeichnung als *detergent-resistant membranes* (DRM) [107]. Durch die Zugabe von Tensiden können *lipid rafts* von den restlichen Membranbestandteilen unterschieden und isoliert werden [175]. Dafür wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen in 25 ml Zellkulturmedium auf 150 mm Zellkulturschalen drei Tage vor dem Versuch ausgesät. Für jeden Messpunkt wurden zwei 150 mm Zellkulturschalen kultiviert. Einen Tag vor dem Versuch wurde das HBMEC-Medium durch reines RPMI-Medium ersetzt. Zur Gewinnung der Proben wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Um möglichst viel des PBS anschließend zu entfernen, wurden die Zellkulturplatten für 20 s zum Abtropfen schräg gestellt und das restliche PBS wurde entfernt. Anschließend wurden auf jede Zellkulturplatte 900 μ l PBS hinzugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber gelöst. Die Zellsuspensionen der Proben wurden jeweils in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und für 5 min und $560 \times g$ bei 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt, das Pellet im eiskalten *Detergent*-Puffer gelöst worden war, folgte anschließend eine Inkubation für 20 min auf Eis. Danach wurden die Proben mit 20 Schlägen eines *Dounce tissue grinder* homogenisiert. Für die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte der Gradientenaufbau (s. Abb. 2.2) in einem 14×89 mm *Ultra-clear* Zentrifugenröhrchen. Für die unterste Schicht wurden 840 μ l der Probe mit 1,16 ml OptiPrep 60% (w/v) vermischt und auf den Boden des Zentrifugenröhrchens gegeben. Danach erfolgte der diskontinuierliche Aufbau des Dichtegradienten durch vorsichtige Zugabe von jeweils 2 ml einer 30%, 25% und 20% OptiPrep-Lösung. Als letzte Schicht wurde 1 ml *Detergent*-Puffer hinzugegeben. Verwendet

wurde dafür Optiprep 60% (w/v), welches zu Konzentrationen von 20%, 25% und 30% mit *Detergent*-Puffer verdünnt wurde (s. Tab. 20). Zu beachten war, dass mit den Proben auf Eis gearbeitet werden musste und die Lösungen gekühlt verwendet werden mussten. Die Proben wurden in einem SW41 Ti Schwenkrotor bei $160.000 \times g$ für 4 h bei 4°C zentrifugiert. Danach erfolgte die vorsichtige Separierung in neun Fraktionen mit je 1 ml, welche zu weiteren Analysen verwendet wurden. Die Fraktion zwei, welche sich am Übergang zwischen 0% und 20% befand, beinhaltet dabei die *lipid rafts*. Für die Analyse von Proteinen erfolgte anschließend eine TCA-Proteinfällung. Für die Analyse von Lipiden wurden die Proben mit Methanol in einem Verhältnis 1:1 gemischt und bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -80°C gelagert.

Optiprep (%)	Optiprep (ml)	Detergent-Puffer	Probe (ml)
35	1,16	-	0,84
30	1	1	-
25	0,84	1,16	-
20	0,7	1,3	-
0	0	1	-

Tab. 20

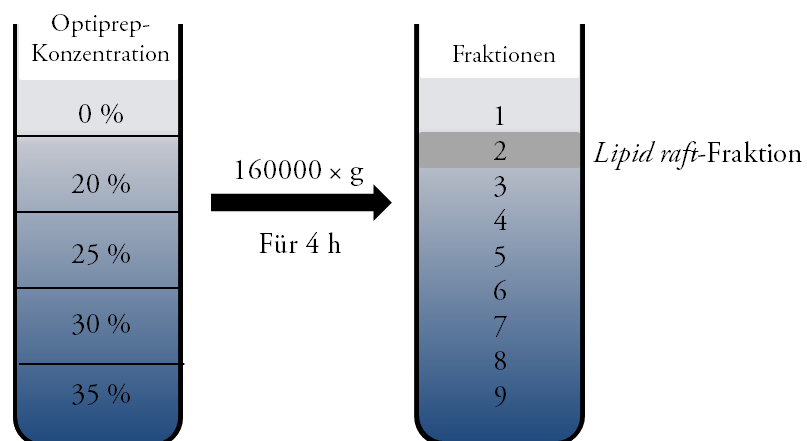


Abb. 2.3 Aufbau Dichtegradient

Durch vorsichtige Aufschichtung von Lösungen mit einer absteigenden Dichte wird ein Dichtegradient aufgebaut. Durch die Zentrifugation kommt es zu einer Auftrennung der zellulären Bestandteile.

2.2.9 Transfektion von Zellen mit siRNA

Mit Hilfe von RNA-Interferenz lassen sich gezielt Gene in Zellen abschalten. Dieser Vorgang, auch Posttranskriptionales *Gene Silencing* (PTGS) genannt, erfolgt durch doppelsträngige RNA (dsRNA), die, nachdem sie in die Zelle gelangt ist, durch einen Enzymkomplex (Dicer) in 21–23 Basenpaar lange doppelsträngige RNA-Fragmente (*small interfering RNA*; siRNA) zerlegt wird. Diese RNA Fragmente bilden mit einem weiteren Enzym den Risc-Komplex (*RNA induced silencing complex*), der komplementäre mRNA (*messenger RNA*) zerschneidet. Die mRNA-Fragmente werden schnell abgebaut und die Expression des Gens ist damit unterbunden [176]. SiRNAs lassen sich synthetisch herstellen und mit verschiedenen Methoden in die Zellen einbringen (Transfektion). Für die Transfektion von Zellen mit siRNA wurden in eine 24-well-Zellkulturplatte 5×10^4 Zellen/ml ausgesät. Am nächsten Tag wurde ein Transfektionsansatz mit 100 nM siRNA mit 3 μ l *HiPerfect Transfection* Lösung in 100 μ l Zellkulturmedium pro well vorbereitet. Der Transfektions-Ansatz wurde durchmischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Transfektion wurde das alte Zellkulturmedium abgenommen, durch 500 μ l frisches Zellkulturmedium ersetzt und der komplette Transfektions-Ansatz tropfenweise auf die Zellen hinzugefügt. Danach wurden die Zellen für weitere 72 h inkubiert. Der Erfolg der Transfektion wurde danach mit einer reversen Transkriptase PCR überprüft.

2.2.10 Stabile Transfektion von HBMEC mit shRNA

Neben HBMEC mit einer normalen ASM-Aktivität wurden auch HBMEC verwendet, bei denen das ASM-Gen mit Hilfe von *small hairpin RNA* (shRNA) stillgelegt wurde. Die Erstellung dieser Zellpopulation erfolgte in Kooperation mit Prof. Jürgen Schneider-Schaulies vom Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg. Der Mechanismus der ASM-Genstilllegung wurde dabei mit Hilfe der RNA-Interferenz vorgenommen, bei der es durch spezifische RNA-Moleküle zu einem Abbau von spezifischer mRNA kommt [176]. Es erfolgte die Transfektion der HBMEC mit Hilfe eines lentiviralen Vektors welcher sowohl die Expression der spezifischen ASM-shRNA ermöglichte als auch die

anschließende Selektion erfolgreich transfizierter Zellen. Letzteres erfolgte durch die Integration eines fluoreszierenden Proteins in das Plasmid.

F6GW

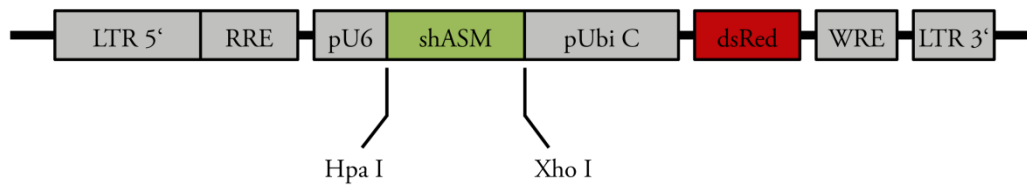


Abb. 2.4 ASM-shRNA exprimierender F6GW-Vektor

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung von genomischer DNA erfolgte mit dem *DNA Mini Kit* von Qiagen. Für die Isolierung von chromosomaler DNA aus *N. meningitidis* wurde am Vortag eine Übernachtskultur angelegt, am Versuchstag wurden einige Kolonien mit einem sterilen Wattestäbchen entnommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 1,25 ml PBS übergeführt. Von dieser Suspension wurde eine 1:100 Verdünnung mit PBS angefertigt, um bei einer anschließenden photometrischen Messung eine OD (*optical density*) bei 600 nm von ca. 2,0 zu erreichen. Diese entspricht für *N. meningitidis* einer ungefähren Bakterienanzahl von 2×10^9 /ml. Anschließend wurden 1 ml dieser Suspension in einem 2 ml Reaktionsgefäß für 5 min mit $3000 \times g$ abzentrifugiert. Um die enthaltenen Proteine abzubauen und die Nukleinsäuren freizusetzen, wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 180 μ l ATL-Puffer und 20 μ l Proteinase K resuspendiert und für weitere 2–3 h unter mehrmaligem Durchmischen bei 56 °C inkubiert. Nachdem der Ansatz klar geworden war, wurden 20 μ l Ribonuklease zugegeben, um die enthaltene Ribonukleinsäure abzubauen. Dazu wurde der Ansatz mehrfach durchmischt und abschließend kurz abzentrifugiert. Zur Ausfällung der enthaltenen DNA wurden 200 μ l AL-Puffer hinzugegeben und der Ansatz wurde für 10 min bei 70 °C inkubiert. Um die ausgefallene DNA zu isolieren, wurde die Probe durch kurzes Zentrifugieren pelletiert und in 200 μ l Ethanol gelöst. Der Überstand wurde auf eine DNA-bindende *QIamp*-Säule gegeben und für 1 min mit $6000 \times g$ zentrifugiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit 500 μ l AW1-Puffer mit $6000 \times g$ für 1 min und 500 μ l AW2-Puffer mit $1500 \times g$ für 3 min. Um die in der Säule gebundene DNA zu isolieren, wurde die Säule trocken zentrifugiert, auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und die DNA mit 200 μ l AE-Puffer gelöst. Dazu wurde der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 min mit $6000 \times g$ zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß übergeführt, der DNA-Gehalt der Lösung mit Hilfe eines Spektralphotometers gemessen und bei -20 °C gelagert. Die Isolierung von eukaryotischer DNA erfolgte nach demselben Prinzip aus einer Zellsuspension.

2.3.2 Isolierung von RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen wurde das *RNeasy Mini Kit* von Qiagen verwendet. Zunächst wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Um sie von der Oberfläche zu lösen, wurden 200 μl Trypsin auf die Zellen gegeben und der Ansatz 1 min bei 37 °C weiter inkubiert. Mittels 600 μl Zellkulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert, die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übergeführt und anschließend 5 min bei 300 \times g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 350 μl RLT-Puffer auf die Zellen gegeben und vermischt. Um die Zellsuspension zu homogenisieren, wurde das Lysat auf eine *QIAshredder spin column* gegeben und 2 min bei 15000 \times g zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und 350 μl 70% (v/v) Ethanol auf den Durchfluss gegeben und mehrmals resuspendiert. Diese Lösung wurde dann auf eine *RNeasy mini column* gegeben und 15 s bei 9000 \times g zentrifugiert. Die RNA bindet sich dabei reversibel an das Material in der Säule. Es folgten mehrere Waschschriffe durch Zugabe von verschiedenen Puffern auf die Säule, mit zuerst einmalig 700 μl RW-1 Puffer, danach zweimalig mit 500 μl RPE-Puffer und jeweiliger anschließender Zentrifugation für 15 s mit 9000 \times g. Daraufhin wurde die Säule für 1 min trocken zentrifugiert. Um die RNA zu lösen, wurden 30 μl RNase freies Wasser auf die Zellen gegeben, die Proben 1 min bei 9000 \times g zentrifugiert und anschließend bei -80 °C gelagert. Bei Arbeiten mit RNA wurde möglichst steril gearbeitet und RNase-freies Wasser und Lösungen verwendet, um einen RNA Abbau durch Ribonukleasen (RNasen), welche ubiquitär vorkommen, zu vermeiden.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäuren-Konzentration einer wässrigen Lösung erfolgte mit einem Spektralphotometer. Dabei wird die Nukleinsäuren-Konzentration über die Extinktion, d.h. die Abschwächung eines Lichtstrahles beim Durchtritt durch das Probenmedium, bei 260 nm mit Hilfe des Lambert-Beersches-Gesetzes ermittelt. Anhand verschiedener Multiplikationsfaktoren kann zwischen dsDNA, ssDNA und RNA

differenziert werden. Um eine Aussage über die Reinheit der Probe zu erhalten, konnte die Proteinkontamination mit Hilfe des Quotienten von Extinktion der Probe bei 260 nm zu Extinktion bei 280 nm abgeschätzt werden. Ein Quotient zwischen 1,8–2,0 wies dabei auf eine weitgehend proteinfreie Probe hin.

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt eine *in-vitro* DNA-Replikation dar, mit deren Hilfe spezifische DNA-Abschnitte vervielfacht werden können. Die Amplifikation erfolgt durch Anlagerung synthetisch hergestellter, komplementärer Oligodesoxyribonukleotide, den sogenannte Primern, welche den zu vervielfältigenden DNA Abschnitt jeweils am gegenüberliegenden Einzelstrang flankieren und die anschließende Replikation durch thermostabile DNA-Polymerasen ermöglichen [177]. Die PCR umfasst zwischen 30–40 Reaktionszyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Phasen besteht. In der Denaturierungsphase werden die DNA-Doppelhelices bei 95 °C in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Die anschließende *Annealing*-Phase dient der Anlagerung der Primer an ihre komplementären Abschnitte der Einzelstränge. Die *Annealing*-Temperatur hängt von der Basenzusammensetzung und der Länge der Primer ab und wurde anhand der Schmelztemperatur (T_m) mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T) - 5^\circ\text{C}$$

In der letzten Phase, auch Elongation genannt, erfolgt die DNA-Synthese, beginnend an dem freien 3'-OH Endes der Primer, mit Hilfe der DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase), deren Temperaturoptimum bei ca. 72 °C liegt. Idealerweise wird in jedem Zyklus (n) die spezifische DNA Sequenz dupliziert, sodass sich eine Anzahl von 2^n Kopien ergibt. Neben der *Taq*-Polymerase und den Primern benötigt man weiterhin Desoxyribonukleosidtriphosphate als Substrat und eine Pufferlösung. So ergab sich für die Versuche folgender Ansatz und Reaktionsablauf:

Ansatz	Menge
DNA (Matrize)	100 ng
Primer (<i>sense</i>)	1 μ l (1:10)
Primer (<i>antisense</i>)	1 μ l (1:10)
dNTPs	2 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 μ l
Puffer	3 μ l
Aqua dest.	ad 20 μ l

Tab. 21

	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	← 30–40 ×
Annealing	x °C	60 s	
Elongation	72 °C	60 s	
	72 °C	10 min	

Abb. 2.5 Reaktionszyklen PCR

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren, welche eine negative Ladung besitzen, mit Hilfe eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Agarosepolymere vernetzen sich untereinander und bilden feine Poren, je höher die Agarosekonzentration des Gels ist, desto engmaschiger ist die Vernetzung der Agarosepolymere untereinander. Mit unterschiedlichen Konzentrationen lassen sich verschiedene DNA-Fragmentlängenbereiche auftrennen, da die Wandergeschwindigkeit der verschiedenen Fragmente von ihrer Größe und der Porengröße des Gels abhängt (s. Tab. 22). Um ein 1% (w/v) Agarosegel zu gießen, wurden 1,5 g Agarose mit 150 ml TAE-Puffer in einen Erlenmeyerkolben gegeben und unter mehrmaligem Schwenken in

einem Mikrowellengerät erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Diese wurde anschließend in eine Form gegossen und ein Kamm in das noch flüssige Gel eingesetzt, um Laufaschen für die Proben zu bilden. Als das Gel ausgehärtet war, wurde es in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Um die Proben elektrophoretisch aufzutrennen, wurden jeweils 5 µl der Probe mit 2 µl Agarosepuffer versetzt und anschließend wurde der Ansatz in eine Laufasche pipettiert. Der Agarosepuffer erhöhte die Dichte der Probe, dies erleichterte die Befüllung der Laufaschen, zudem enthielt er einen Farbstoff, der die Lauffront der Probe markierte. Die Auftrennung erfolgte über die $\frac{1}{2}$ – $\frac{3}{4}$ Länge der Lauffläche bei 180–200 V. Anschließend wurde das Agarosegel für 15 min in eine Ethidiumbromid-Lösung gegeben. Ethidiumbromid ist ein Phenanthridin-Farbstoff, der in Nukleinsäuren interkaliert und dabei die Intensität seiner Fluoreszenz-Emission stark erhöht. Mit Hilfe von UV-Licht wurden die aufgetrennten DNA-Banden dargestellt und fotografiert.

Agarosekonzentration (%)	Fragmentlänge (kb)
0,5	1–30
1	0,5–7
1,5	0,2–3
2	0,1–2

Tab. 22

2.3.6 Extraktion von Nukleinsäuren aus einem Agarosegel

Die Gelextraktion ermöglicht die gezielte Isolierung von einzelnen Nukleinsäure-Banden aus einem Agarosegel und damit die Isolierung spezifischer DNA Fragmente. In der vorliegenden Arbeit wurde das *Gel Extraction Kit* von Qiagen verwendet. Dabei wurde zuerst die benötigte Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten, das Gelfragment gewogen und anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß übergeführt. Zu der Probe wurde nun das dreifache Volumen an QG-Puffer hinzugeben und der Ansatz für 10 min auf 50 °C erhitzt, um die DNA aus dem Gel herauszulösen. Um

die DNA anschließend auszufällen, wurde Isopropanol mit dem Volumen des Gelfragments hinzugeben. Die Lösung wurde auf eine *Qiaquick*-Säule gegeben und für 1 min mit $15000 \times g$ zentrifugiert, um die DNA von den restlichen Gelbestandteilen zu trennen. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit $750 \mu\text{l}$ PE-Puffer, einem hochprozentigen Alkohol, sowie ein Zentrifugationsschritt zum Trocknen. Um die an der Säule gebundene DNA zu lösen, wurden $30 \mu\text{l}$ Aqua dest. auf die Säulenmitte gegeben, der Ansatz wurde 3 min inkubiert und für 1 min mit $15000 \times g$ zentrifugiert. Die DNA-Konzentration der Probe wurde anschließend spektralphotometrisch bestimmt.

2.3.7 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Die Aufreinigung von Nukleinsäuren erfolgte mit dem *PCR Purification Kit* von Qiagen. Bei dieser Methode wird die in der Probe enthaltene Nukleinsäure an eine Silikamembran gebunden und durch mehrere Waschschriffe von weiteren Bestandteilen, wie z.B. Proteinen getrennt. Alle Zentrifugationsschritte wurden mit $15000 \times g$ für 1 min durchgeführt. Zuerst wurde das fünffache Volumen an PB-Puffer zu der Probe gegeben und vermischt. Anschließend wurde der Ansatz auf eine Säule gegeben und zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit $750 \mu\text{l}$ PE-Puffer und ein weiterer Zentrifugationsschritt zum Trocknen. Als nächstes wurde die Säule in ein sauberes Reaktionsgefäß gesetzt, $30 \mu\text{l}$ Aqua dest. wurden auf die Säulenmitte gegeben, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert, um die Nukleinsäuren von der Silikat-Membran zu lösen. Die Konzentration der Nukleinsäuren in der Probe wurde anschließend spektralphotometrisch bestimmt. Bei zu niedriger Konzentration wurde diese mittels einer Vakuumzentrifuge erhöht.

2.3.8 Umschrieb von RNA in cDNA

Der Umschrieb von RNA in cDNA (*complementary DNA*) erfolgte mit der *Super Script II Reverse Transcriptase* von Invitrogen, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reversen

Transkriptase). Dieses Verfahren ermöglicht die Analyse der mRNA mit Hilfe der erstellten cDNA. Für den Umschrieb wurde 1 µg RNA (s. Kap. 2.3.2) in 20 µl RNase freiem Wasser aufgenommen, 2,5 µg Nona-Primer hinzugegeben und der Ansatz wurde für 5 min bei 70 °C inkubiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen. Nach 5 min wurde der Ansatz kurz auf Eis gestellt, damit die Primer hybridisieren konnten. Die Primer sind meist zufällige Hexamer-Primer oder Oligo-dT-Primer, die an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden und eine komplette Synthese, beginnend vom 3' Ende, ermöglichen. Nebenher wurde eine Enzymansatz angesetzt, bestehend aus je 10 mM dNTP's (dATP, dGTP, dCTP und dTTP), 0,1 M DTT, 8 µl *First-Strand* Puffer, 5,5 µl RNase freiem Wasser, 1 µl *RNase Out* und 1 µl *SuperScript II*. Der Enzymansatz wurde auf die RNA Lösung gegeben, durchmischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Umschrieb erfolgte bei 42 °C für 2 h mit einer modifizierten MMLV- (*moloney murine leukemia virus*) reversen Transkriptase mit einer reduzierten RNase-H-Aktivität. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 42 °C und ermöglicht Transskripte bis 12,3 kb. Zur Inaktivierung der Enzyme wurde die Probe nach dem Umschrieb für 15 min auf 70 °C erhitzt. Als die Probe abgekühlt war, wurden 2 µl RNase zum Verdau der nicht umgeschriebenen RNA hinzugefügt und der Ansatz wurde für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die gewonnene cDNA wurde anschließend mit einem *PCR-Purification Kit* (s. Kap. 2.3.7) aufgereinigt und ihre Konzentration gemessen (s. Kap. 2.3.3).

2.3.9 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der RT-PCR werden zwei molekularbiologische Methoden kombiniert, um RNA nachzuweisen. Erfolgt der Nachweis von spezifischer mRNA, kann damit die Genexpression analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die RT-PCR zum Nachweis von posttranskriptionellem *Gene-Silencing* der mit siRNA transfizierten Zellen genutzt (s. Kap. 2.2.9). Zuerst erfolgte ein Umschrieb von RNA in cDNA durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (s. Kap. 2.3.8). Danach wurden mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion spezifische cDNA Abschnitte amplifiziert (s. Kap. 2.3.4) und

weiter analysiert (s. Kap. 2.3.5). Auch wenn die mRNA nur 2% der Gesamt-RNA ausmacht, muss keine mRNA-selektive cDNA-Synthese durchgeführt werden, da die Polymerase-Kettenreaktion sehr sensitiv ist und geringe cDNA Mengen für eine Amplifikation ausreichen.

2.3.10 *Real-Time*-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Eine *Real-Time*-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion wird zur Quantifizierung von Nucleinsäuren verwendet. Dient cDNA als Matrize (s. Kap. 2.3.8), lässt sich damit die Menge der exprimierten mRNA analysieren und damit eine Aussage über die Transkription treffen. Das Prinzip der qRT-PCR beruht auf einer herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (s. Kap. 2.3.4) unter Verwendung eines DNA-Farbstoffes. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die amplifizierte DNA und es kommt dadurch zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Die Menge der amplifizierten DNA korreliert mit der Fluoreszenzstärke, welche nach jedem Zyklus mit einem CCD-Sensor erfasst wird. Wird als Matrize cDNA verwendet, lässt die Quantifizierung keinen direkten Rückschluss auf die exprimierte mRNA in den Proben zu, da die cDNA-Menge gemessen wird, welche von der stark schwankenden Effizienz der reversen Transkription abhängt. Um dennoch eine Aussage über die exprimierte mRNA treffen zu können, wird ein Referenz-Gen mitgemessen, das als Standard dient und eine relative Quantifizierung erlaubt. Als Referenzgen dienen Haushalts-Gene (*housekeeping genes*), welche konstitutiv d.h. unabhängig von äußeren Einflüssen exprimiert werden. Da diese Haushalts-Gene nicht bzw. kaum reguliert werden, kann damit die Veränderung der Transkription von anderen Genen durch äußeren Einflüsse untersucht werden, indem man die Änderung in Relation zu derjenigen der Haushaltsgenen setzt. In dieser Arbeit diente das Strukturprotein β -Actin als Standard. Zur Bestimmung der mRNA Menge einzelner Proben wurde zuerst die mRNA in cDNA umgeschrieben (s. Kap. 2.3.8) und für die qRT-PCR je 1 ng/ μ l cDNA eingesetzt. Als Primer-Matrize dienten Sequenzen, welche jeweils in einer Exon-Region (*expressed region*) binden und ein Intron (*intervening regions*) flankieren, d.h. einen nicht

kodierenden Abschnitt der DNA (s. Abb. 2.5). Bei der Transkription wird zuerst eine Präkursor-mRNA (prä-mRNA) gebildet, die sowohl Exons als auch Introns beinhaltet. Die Introns werden im nächsten Schritt, dem Spleißen, entfernt und die Exons miteinander verknüpft. Letztere bildet nach weiteren Modifizierungen die reife mRNA, welche als Vorlage für die Proteinsynthese dient. Durch die Auswahl von Primern, welche eine Intron-Region flankieren, lässt sich zwischen genomischer DNA (gDNA) und komplementärer DNA (cDNA) unterscheiden. Die cDNA besteht aus umgeschriebener mRNA und somit nur aus Exons. Die genomische DNA hingegen beinhaltet noch die Introns und weist damit eine wesentlich längere Basenpaarlänge auf. Für die Analyse der Transkription ist nur die cDNA von Interesse. Zu Beginn wurde die Annealing-Temperatur der Primer mit 57 °C bestimmt (s. Kap. 2.3.4) und ihre Eignung und Effizienz getestet (s. Anhang, Abb. 6.4). Dafür wurden Verdünnungsreihen mit einer aus HBMEC hergestellten cDNA-Probe erstellt und gemessen. Verwendet wurden cDNA-Konzentrationen von 10 ng bis 0,02 ng (s. Abb. 3.2.2 A). Die Effizienz ($E=10^{-1/m}$) wurde aus der Steigung (m) der Ausgleichsgeraden von gemessenen Ct-Werten in Abhängigkeit von eingesetzten cDNA-Mengen errechnet. Der Ct-Wert (*cycle threshold*) beschreibt dabei den Schwellenwert, ab dem eine exponentielle Steigerung der detektierten Fluoreszenz eintritt. Für die ASM-Primer ergab sich eine Effizienz von 91,27%. für die β -Aktin Primer von 105,25%. Für jede Probe wurde jeweils 900 nM Primer hinzugefügt. Neben 2 μ l cDNA (2 ng/ μ l) und insgesamt 1,8 μ l Primer (je 900 nM gelöst in 0,9 μ l Aqua dest.) wurden zu jeder Probe 6,2 μ l Aqua dest. und 10 μ l eines *SYBR Green Mastermix* zugegeben, sodass ein Endvolumen von 20 μ l erreicht wurde. Der Mastermix enthielt u.a. den Cyanin-Farbstoff *SYBR Green*, dNTPs und die DNA-Polymerase. Die Messung erfolgte in einer transparenten 96-well-Mikrotiterplatte mit flachen Boden in einem *StepOnePlus Real time PCR System*. Nach einer Denaturierungsphase von 10 min bei 95 °C folgten 40 Zyklen mit jeweils 60 s bei 57 °C und 15 s bei 95 °C.

ASM *sense*: 5'-TGGCTCTATGAAGCGATGGC-3'

ASM *antisense*: 5'-TTGAGAGAGATGAGGCGGAGAC-3'

Ausschnitt Gensequenz *Homo sapiens* Chr. 11

SMPD1-Gen

```

Exon      GCTGTGGGTA ACCATGAAAG CACACCTGTC AATAGCTTCC CTCCCCCCTT
          CATTGAGGGC AACCACTCCT CCCGCTGGCT CTATGAAGCG ATGGCCAAGG
          CTTGGGAGCC CTGGGTGCCT GCCGAAGCCC TGCGCACCCCT CAGGTACTTA
          TCGTCCCGTG AAACCCAGGA AGGGAAAAGA AAGGTGAATG AAAGTGAAGG
          GAGAAGGGAA CCTGGGGCAT TGTCTCTGAT TGCTCTAGCA TGAGTCCTTA
          GTGCTCTTCA TTTGGCTCCC CTAATCTGAC TCCTCCTTCC CTTTCTACTG
          TTTTGCCGCA CCAGGCTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTAGT TTAGTTTTTG
          TAGAGACAAG ATCTTGCTAT GTTGCCAGG CTGGTCTCAA ACACCTAACC
          TCAAGCAATC CTCCCACCTC GGCTCCCAA AATGCTGGGA CCACAGGCAT
          CAGCTACTGC TCCTGGCCCT CCCTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
          TTGAGATGGA ATCTTGCTCT GTTGCCAGG CTGGAGTGCA GTGGCACCAT
          CTCAGCTCAC TACAGCCTCC ACCTCCTGGG TTCAAGCAAT TCTGCCTCAG
          CCTCCCAAGT ACCTGGGACT ACAGGTGCAC GCCACCACAC CCAGCTAATT
Intron    TTTGTATTTT TAGTAGAGAT GGGGTTTTCAC CATGTTGGCC AAGATGGTCT
          TGATCTCCTG ACCTCATGAT CTGCCACCT CGGCCTCCCA AAGTGCTGGG
          ATTACAGGCA TGAACCACTG CACCCAGCTT TCCAGCCCTC CTTTCTACT
          CTTATCTCCA GCCACCCTCC TTCAAAGGTC TGGCAGCATA ACCTCTCTAT
          GCCCAGCTG TGTCTTGCT CATGTTGGCC CTCTGGAAT GATTCCCCC
          TTTTTTTTAA GTGCTCCAGT TTTTCCCACC TTATCCATCC CATGTCATCT
          TCCCTCTGTG TGGTCCTTGC TTCCATTCT AGCTAACTCT TATCCCTCCC
          CCATACTCCT GGAGCCCTCT GCCCTCAGAG TCTTTTGTGT CACACAGACC
          CAATAATTAG AACTGTTTGG TCTCTGGCTA GACTGTGAGC TCCTTGCAGG
          TGGGGAAGAT GTCATGTATG CTTTTACCCT CCACCCAAAT GCCCAGCACA
          GGAGGACCAG GATTGGAACA AGTGTGACC TCTCATGTTT ACTTTGTTTC
          AGAATTGGGG GGTCTATGC TCTTTCCCA TACCCCGTGC TCCGCCTCAT
          CTCTCTCAAT ATGAATTTT GTTCCCGTGA GAACTTCTGG CTCTTGATCA
Exon      ACTCCACGGA TCCCGCAGGA CAGCTCCAGT GGCTGGTGGG GGAGCTTCAG
          GCTGCTGAGG ATCGAGGAGA CAAAGTGAGG GCCAGTAGTG GGAACACGGT
          GGTGCTGGGG GACAAGCAGG CTCTGTTGA GCTGGAGCAC CTCTGGGCAC

```

Abb. 2.6 Ausschnitt der Gensequenz des ASM Gens mit Darstellung der verwendeten Primer für die *Real-Time*-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion

Die Fragmentlänge beträgt durch die Primerauswahl (Primerbindungsstellen unterstrichen) bei der genomische DNA 1420 bp und bei der cDNA nur 125 bp.

2.3.11 Isolierung von Plasmiden

Je nach benötigter Plasmid-Menge wurde entweder eine Mini- oder eine Midi-Präparation mit einem Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Das grundlegende Prinzip der Präparation ist dabei eine alkalischen Zellyse gefolgt von einer membranvermittelte DNA-Aufreinigung. Für die Mini-Präparation wurde eine Übernachtskultur in 4 ml LB-Bouillon mit Antibiotikazusatz bei entsprechender Resistenzkassette der Plasmid-tragenden *E. coli* angesetzt und bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. 2 ml dieser Kultur wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß übergeführt und wie bei allen folgenden Zentrifugationsschritten mit 15000 × g für 1 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 250 µl P1-Puffer resuspendiert, 250 µl P2-Puffer wurden hinzugegeben und der Ansatz wurde durch leichtes Schwenken vermischt. Danach wurden 350 µl P3-Puffer zugegeben und der Ansatz wurde

ebenfalls leicht vermischt. Nachdem der Ansatz für 10 min zentrifugiert worden war, wurde der Überstand auf eine Minipräp-Säule gegeben und für 1 min zentrifugiert. Es folgte ein Reinigungsschritt mit 750 µl PE-Puffer und ein Zentrifugationsschritt zum Trocknen. Um die Plasmide aus der Säulenmembran zu lösen, wurden 40 µl Aqua dest. auf die Säule pipettiert, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 min zentrifugiert. Um größere Plasmidmengen zu isolieren, wurde eine Midi-Präparation durchgeführt. Dabei wurde eine Übernachtskultur in 100 ml LB-Bouillon angelegt und diese am nächsten Tag für 10 min bei 3500 × g und 4 °C abzentrifugiert. Es folgten wie bei der Mini-Präparation die Zugabe von Pufferlösungen, wie vom Hersteller angegeben und die reversible Bindung der Plasmide an einer *Qiagen-tip 100* Säule. Nach mehreren Waschschritten folgte die Lösung mittels 5 ml QF-Puffer, den man in ein mit 3,5 ml Isopropanol gefüllten 50 ml Reaktionsgefäß laufen ließ. Als der Puffer durchgelaufen war, wurde der Ansatz auf vier 2 ml Reaktionsgefäße verteilt und für 30 min bei 4 °C mit 15000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf jedes Pellet wurden 400 µl 70% (v/v) Ethanol gegeben, ohne dabei die Pellets zu resuspendieren. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C für 10 min mit 15000 × g und eine Entfernung des Überstandes. Jedes Pellet wurde anschließend getrocknet, dann in 50 µl Aqua dest. resuspendiert und die Ansätze wurden in ein gemeinsames Reaktionsgefäß überführt.

2.3.12 Restriktionsverdau

Eingesetzt wurden Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs. Für den Restriktionsverdau wurde folgender Ansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert:

Verdau	Bestandteile	Menge
DNA/Vektor	DNA / Plasmid	400 ng / 1 µg
	Puffer	2 µl
	Restriktionsendonuklease I	1 µl
	Restriktionsendonuklease II	1 µl

Aqua dest. (ad)	20 µl
SAP (nur Vektor)	1 µl

Tab. 23

Um zu verhindern, dass die Enden des Vektors sich bei der Ligation wieder miteinander verbinden, wurden die freien 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung des Vektors erfolgte dabei mit einer Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*). Dazu wurde nach dem Verdau, der Ansatz des Vektors zunächst für 15 min auf 65 °C erwärmt, anschließend 1 µl SAP hinzugeben und der Ansatz für weitere 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte für 15 min bei 65 °C. Die Ligation des Vektors mit der DNA-Matrize bleibt dagegen unbeeinträchtigt, da diese die für die Ligation benötigten Phosphatreste noch besitzt.

2.3.13 Ligation

Bei der Ligation werden die Nukleinsäurefragmente mit Hilfe einer Ligase miteinander verbunden. Dabei bildet die Ligase unter ATP-Verbrauch eine Phosphodiesterbindung zwischen einem 3'-Hydroxy-Ende und einem 5'-Phosphat-Ende aus. Um die DNA-Matrize in den Vektor zu integrieren, wurde folgender Ansatz gewählt und über Nacht bei 16 °C inkubiert:

Ligation	Bestandteile	Menge
DNA/Vektor	DNA / Plasmid	100 ng / 50 ng
	T4 DNA Ligase	2 µl
	T4 DNA Ligase Puffer	1 µl
	Aqua dest. (ad)	20 µl

Tab. 24

2.3.14 Transformation

Die Transformation beschreibt die Aufnahme von DNA in eine Wirtszelle und wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um den bei der Ligation erzeugten Vektor in eine Wirtszelle einzufügen. Die Fähigkeit, fremde DNA aufzunehmen, wird als Kompetenz bezeichnet. Dazu wurden kompetente *E. coli* Stämme auf Eis aufgetaut und 1 µl bzw. 10 µl des Ligationsansatzes auf 100 µl einer Lösung mit kompetenten Bakterien gegeben. Dieser Ansatz wurde 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 s mit 42 °C in einem Heizblock und ein erneutes Abkühlen auf Eis für 5 min. Danach wurden zu jedem Ansatz 250 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Ansätze für 1 h bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden bei vorhandener Kanamycin-Resistenzkassette des eingebrachten Vektors, jeweils 100 µl der Ansätze auf kanamycinhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.15 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte über das DNA Labor des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg. Für die Sequenzierung wurden jeweils 50 ng DNA eingesetzt.

2.3.16 Induktion der Proteinexpression

Nach der fehlerfreien Integration der DNA-Matrize in den Vektor und der erfolgreichen Transformation eines kompetenten Bakterienstamms, lässt sich mit Hilfe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) die Proteinexpression induzieren. Durch die Inhibition des Lac-Repressors, wirkt IPTG als künstlicher Induktor des Lactose-Operons in *E. coli*. Zur Proteinexpression rekombinanter Proteine wurden positive Klone in 50 ml LB-Bouillon in Gegenwart von 1 mM IPTG bei 37 °C auf einem Schüttler aufgezogen.

2.3.17 Herstellung von Proben zur Analyse der Proteinexpression

Zur Analyse der Proteinexpression von Zellen wurden zuerst Lysate gewonnen, um anschließend die enthaltenen Proteine elektrophoretisch aufzutrennen und direkt durch Färbung oder indirekt durch einen immunologischen Nachweis darzustellen und somit spezifische Proteine zu quantifizieren. Für eukaryotische Zelllysate wurden 5×10^4 Zellen/ml in *24-well* Zellkulturplatten drei Tage zuvor ausgesät und am Versuchstag mit Bakterien mit einer MOI von 10 für einen definierten Zeitraum infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 75 μ l einer 2 \times SDS (Natriumdodecylsulfat)-Lösung lysiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übergeführt. Natriumdodecylsulfat ist ein anionisches Detergens, welches u.a. nicht-kovalente intramolekulare Bindungen unterbricht und so die Ausbildung von Tertiär- bzw. Quartärstrukturen von Proteinen verhindert. Zudem verleiht es dem SDS-Proteinkomplex durch seine anionische Kopfgruppe eine hohe negative Gesamtladung. Zuletzt wurden die Proben für 10 min auf 95 °C erhitzt, um die Proteine endgültig zu denaturieren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Für Bakterienlysate wurden Bakterien in flüssigen Nährmedien kultiviert und durch Messung der optischen Dichte wurden die Bakterienanzahl/ml bestimmt. Aus der Bakteriensuspension wurde eine Menge von 6×10^8 Bakterien in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 5 min bei 1400 \times g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 \times SDS-Lösung aufgenommen und für 10 min auf 95 °C erhitzt.

2.3.18 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Um die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Für die Experimente wurde ein SDS-Gel mit einem Acrylamidgehalt von 7,5% benutzt. Zur Herstellung eines Gels wurde zuerst das Trenngel (s. Tab. 26) zwischen zwei mit Kunststoffdichtungen verschlossenen Glasplatten pipettiert, mit 70% (v/v) Ethanol bedeckt, damit es für 30 min polymerisieren konnte. Nach der Entfernung des Ethanols wurde eine 2,5 cm hohe Sammelgelschicht (s. Tab. 26) zwischen die Glasplatten oberhalb des Trenngels pipettiert und ein Kamm

eingeführt, sodass Taschen für die Proben entstanden. Nachdem das Gel für weitere 15 min hatte polymerisieren können, wurden der Kamm und die Kunststoffdichtung entfernt und die Glasplatten in eine Elektrophorese-Kammer eingespannt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mit 140 V in einer Elektrophorese-Kammer in Gegenwart eines SDS-Laufpuffers. In jede Tasche wurden 18 µl der Proben aufgetragen sowie in die erste Tasche 5 µl eines Protein-Größenmarkers zur Bestimmung des Molekulargewichtes einzelner Banden. Kurz bevor die Proteinfront auslief, wurde die Elektrophorese angehalten und das Gel entnommen. Die Proteinfraction im Gel wurde anschließend durch einer Coomassie-Färbung dargestellt oder spezifische Proteine wurden mit Hilfe eines Immunoblots detektiert.

Bestandteile	Trenngel	Sammelgel
Aqua dest.	4,4 ml	3 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	1,25 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	-
30% PAA	2,5 ml	0,7 ml
20% SDS	50 µl	25 µl
16% APS	60 µl	30 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Tab. 25

2.3.19 Coomassie-Färbung

Coomassie-Brilliant-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der Proteine unspezifisch anfärbt und damit alle aufgetrennten Proteinfractionen darstellt. Für die Färbung wurde das Sammelgel vom Trenngel entfernt bevor letzteres für 30 min in einer Coomassie-Lösung gefärbt wurde. Danach wurde das Gel entnommen und in einer Coomassie-Entfärber-Lösung auf einem Schüttler entfärbt bis die einzelnen Proteinbanden gut voneinander zu unterscheiden waren.

2.3.20 Proteinnachweis mittels Western Blot

Beim Western Blot, auch Immunblot genannt, werden die aufgetrennten Proteine eines Gels mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und können mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden. Mit dieser Methode können Proteinbanden im Unterschied zur Coomassie-Färbung spezifisch dargestellt und quantifiziert werden. Dafür wurde zuerst das Sammelgel vom Trenngel getrennt und das Trenngel auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt. Anschließend wurden beides mit in Western Blot Puffer getränkten Filterpapieren und Schwämmen flankiert und in die Western Blot Kammer eingespannt, die mit Western Blot Puffer und einem Kühllakku gefüllt wurde und die Proteine für 1 h mit 350 mA auf die Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Proteine wandern dabei aus dem Gel Richtung Anode und werden durch die folgende Nitrocellulose-Membran gebunden. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren, wurde die Nitrocellulose-Membran anschließend für 1 h in 5% Magermilch-Lösung auf einen Schüttler gelegt. Zur Immundetektion einzelner Proteine wurde die Nitrocellulose-Membran mit Primärantikörpern in 5% Magermilch-Lösung über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert, damit sich die Primärantikörper spezifisch an das Zielprotein binden können. Am nächsten Tag wurde die Nitrocellulose-Membran dreimal für 10 min mit PBST gewaschen und für eine Stunde mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten-Sekundärantikörper, der die Primärantikörper bindet, inkubiert. Nach Entfernung der überschüssigen Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBST wurden die Proteinbanden mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion dargestellt. Dies erfolgte durch Zugabe von 1 ml ECL-Lösung auf die Nitrocellulose-Membran. Bei dieser Reaktion wird Luminol durch die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase katalysiert. Dabei werden Photonen freigesetzt, die durch Belichtung eines fotografischen Films bzw. mit Hilfe eines Bildsensors nachgewiesen werden können. Durch die spezifischen Antikörperbindungen und die anschließende Antikörper-gekoppelte Reaktion ließen sich Proteinbanden spezifisch nachweisen sowie die Proteinmengen der Proben auf Grund der Belichtungsstärke miteinander vergleichen.

2.3.21 Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure

Bei der Proteinfällung können Proteine durch die Beeinflussung ihres Löslichkeitsverhaltens isoliert bzw. ihre Konzentration kann in einer Lösung erhöht werden. Für die Fällung wurden eiskalte 100% Trichloressigsäure in einem Verhältnis 1:4 zu der Probe gegeben, die anschließend für 30 min auf Eis inkubiert wurde, um eine ausreichende Fällung zu gewährleisten. Dann folgte ein Zentrifugationsschritt mit $9000 \times g$ für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nachdem der Überstand entfernt worden war, erfolgten eine zweifache Waschung mit $500\ \mu\text{l}$ eiskaltem Aceton und die jeweilige Zentrifugation mit $9000 \times g$ für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, um die restliche Trichloressigsäure zu entfernen. Nachdem das überständige Aceton beseitigt war, erfolgte die Trocknung des Pellet bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und dessen Aufnahme in SDS-Puffer. Anschließend wurden die Proben für 10 min auf $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt.

2.4 Bakteriologische Methoden

2.4.1 Bakterienkultur

In der vorliegende Arbeit wurden zwei Arten von Bakterien verwendet, zum einem *N. meningitidis*, gram-negative Kokken, zum anderen *E. coli*, gram-negative Stäbchenbakterien, die zur Familie der Enterobakterien gehören. Die Lagerung der verschiedenen Bakterienstämme erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Für die Anzucht von *N. meningitidis* wurde eine kleine Fraktion aus der gefrorenen Probe entnommen und auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Anschließend folgte eine Inkubation der Blutagarplatte über Nacht in einem Inkubator bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Für Flüssigkulturen wurden dann einige gewachsene Kolonien mit einem sterilen Wattestäbchen entfernt und in ein mit PPM gefülltes Reaktionsgefäß übergeführt. Die Inkubation fand anschließend bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einem Bakterenschüttler statt. Die Anzucht von *E. coli* erfolgte auf Agarplatten in einem Inkubator bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ohne CO_2 Zusatz. Alle Arbeiten mit humanpathogenen Erregern wurden stets unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt.

2.4.2 Colony Blot

Mit Hilfe des Colony Blots kann die Proteinexpression von Kolonien auf einer Agarplatte untersucht werden. Dazu wurde eine Nitrozellulosemembran kurz auf eine mit Kolonien bewachsene Agarplatte gelegt und abgezogen. Die Kolonien blieben dabei an der Membran, die für 1 h an der Luft getrocknet wurde, haften. Nachdem die Membran mit 2% Magermilch blockiert wurde, folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, gelöst in 2% Magermilch, über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgeschüttet und die Membran dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Nach der Zugabe eines sekundären Antikörpers, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt war, wurde sie für 1 h in PBST/1% BSA inkubiert. Zur Entfernung der ungebundenen sekundären Antikörper wurde die Membran nach 1 h wieder dreimal mit PBST für je 10 min gewaschen. Anschließend folgte ein Inkubationsschritt mit 0,1 M Tris-HCl pH 9,6 für 10 min. Um an die Membran gebundene Proteine nachzuweisen, wurde im letzten Schritt eine Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (NBT/BCIP)-Lösung hinzugegeben. Diese dient zum Nachweis der alkalischen Phosphatase, welche indirekt sowohl über den sekundären als auch den primären Antikörper an das Zielprotein gebunden ist. Eine Farbumschlag auf der Membran bedeutet einen Proteinnachweis. Um die Reaktion zu unterbrechen, wurde nach ausreichender Färbung die Nitrozellulosemembran mit Aqua dest. gewaschen und getrocknet.

2.5 Statistische Auswertung

Alle dargestellten Messwerte und Ergebnisse wurden, sofern nicht anders angegeben, in drei unabhängigen Versuchen in doppelter Ausführung durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel. Statistische Unterschiede zwischen verschiedenen Messpunkten wurden mittels t-Test für ungepaarte Stichproben errechnet. Ein Signifikanzwert (p-Wert) <0,05 (*) wurde dabei als signifikant, p<0,01(**) als sehr signifikant und ein p<0,001 (***) als hochsignifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Die Aktivität der sauren Sphingomyelinase hat einen Einfluss auf die Invasivität von *Neisseria meningitidis*.

Um einen möglichen Einfluss der sauren Sphingomyelinase (ASM) und ihrer katalytischen Funktion auf die Pathogenese der Meningokokken-Infektion zu prüfen, wurde zuerst die Bedeutung der Enzymaktivität für die Invasivität von Meningokokken in Zellen untersucht. Die Inhibition der Enzymaktivität erfolgte auf drei unterschiedlichen Wegen: 1.) Pharmakologisch, 2.) mittels RNA-Interferenz sowie 3.) durch die Verwendung einer Zelllinie mit einem genetisch bedingten Enzymdefekt. Der Einfluss auf die Invasivität wurde mit Hilfe von Gentamicin-Protektionsassays überprüft.

3.1.1 Einfluss der pharmakologische Inhibition der sauren Sphingomyelinase auf die Invasivität von *N. meningitidis*

Um zu untersuchen, ob die ASM einen Einfluss auf die Bindung bzw. Invasion von Meningokokken in HBMEC hat, wurden diese in An- bzw. Abwesenheit des ASM-Inhibitors Amitriptylin bestimmt. Für die Infektionsversuche wurde mit dem humanpathogenen Isolat *Nm* MC58 bzw. dessen isogener kapseldefizienter Mutante MC58 *siaD* gearbeitet, welche aufgrund der fehlenden Kapsel besonders invasiv ist. Zu Beginn wurden verschiedene Konzentrationen des Inhibitors getestet. Hierzu wurden HBMEC mit dem Isolat MC58 *siaD* für vier Stunden mit einer MOI von 10 infiziert. Die Bestimmung der adhärennten und intrazellulären Bakterien erfolgte mittels Gentamicin-Protektionsassays (s. Kap. 2.2.3). Es zeigte sich, dass mit zunehmender Amitriptylin-Konzentration eine signifikante und dosisabhängige Abnahme der Invasion von Meningokokken in HBMEC erzielt werden konnte. Die Adhärenz von Bakterien an den Zellen wurde durch Amitriptylin nicht beeinflusst (s. Abb. 3.1.1 A). Ab 7,5 µM Amitriptylin konnte eine signifikante Reduktion der invasiven Bakterien erreicht werden. Zur Kontrolle wurde die Enzymaktivität der ASM unter Zugabe von Amitriptylin gemessen (s. Kap. 2.2.4). Auch hier zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der

Aktivität. (s. Abb. 3.1.1 B). Mit höheren Konzentrationen konnte zwar die Aktivität weiter reduziert werden, jedoch zeigten diese eine bakterizide Wirkung. Neben dem dosisabhängigen Einfluss von Amitriptylin auf die ASM-Aktivität und die Invasivität, erfolgte anschließend die Untersuchung des Einflusses von Amitriptylin zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion. Dazu wurde jeweils 10 μM Amitriptylin eingesetzt und nach 2, 4, 6 und 8 h die adhärennten und intrazellulären Bakterien mit Hilfe eines Gentamicin-Protektionsassays bestimmt. Die Behandlung von HBMEC mit Amitriptylin für 1 h vor der Infektion bewirkte eine signifikante Reduktion der Invasion für alle gemessenen Zeitpunkte (s. Abb. 3.1.2 A). Die bakterielle Adhärenz wurde nicht beeinflusst (s. Abb. 3.1.2 A).

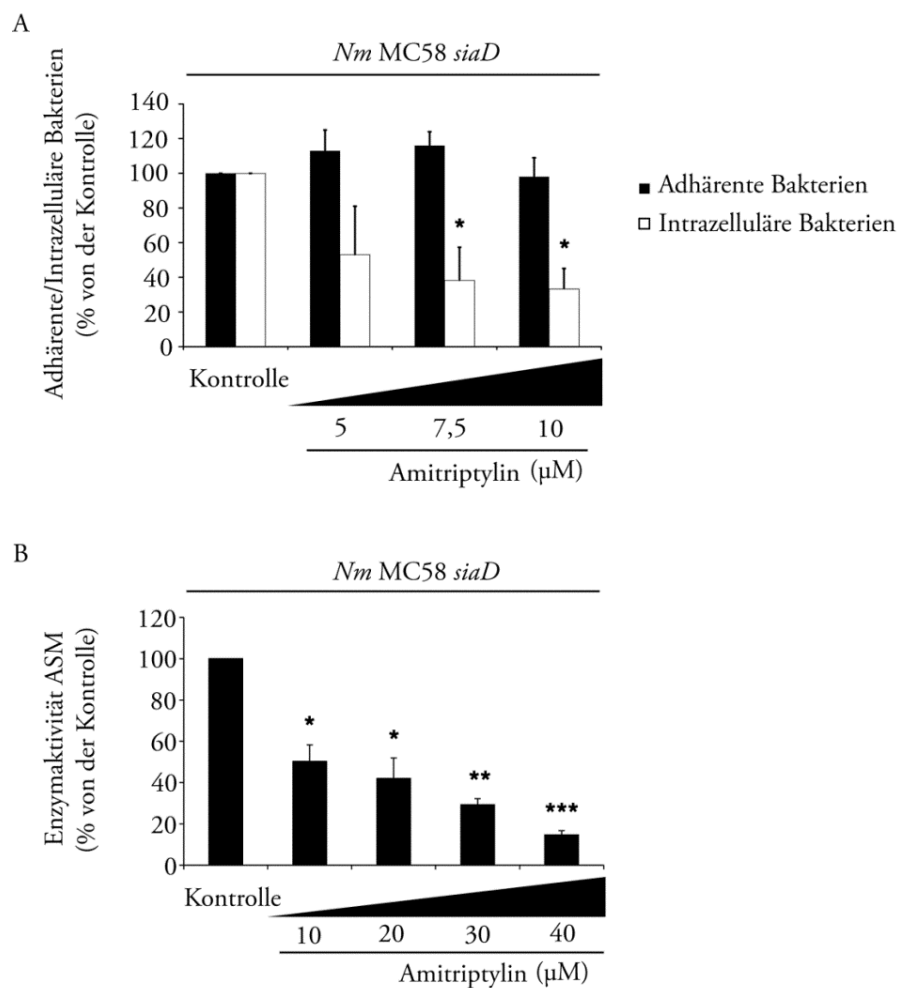


Abb. 3.1.1 Einfluss verschiedener Amitriptylin-Konzentrationen auf die Invasivität von *Nm* und die Enzymaktivität der sauren Sphingomyelinase

HBMEC wurden für 4 h mit dem unbekapselten Isolat *Nm MC58 siaD* mit einer MOI von 10 infiziert. Die Anzahl der adhärenen und internalisierten Bakterien wurde durch einen Gentamicin-Protektionsassay bestimmt (A). Adhärenente Bakterien (schwarze Balken) und invasive Bakterien (weiße Balken) wurden 4 h p.i. bestimmt. Gezeigt ist der Einfluss verschiedener Amitriptylin-Konzentrationen im Verhältnis zu unbehandelten HBMEC. Weiterhin wurde die ASM-Aktivität (B) aus HBMEC Zellysate bestimmt. Die Graphiken zeigen die Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen * $p < 0.05$. Die Bestimmung jedes Messwertes erfolgte bei jedem Versuch mindestens in zweifacher Ausführung.

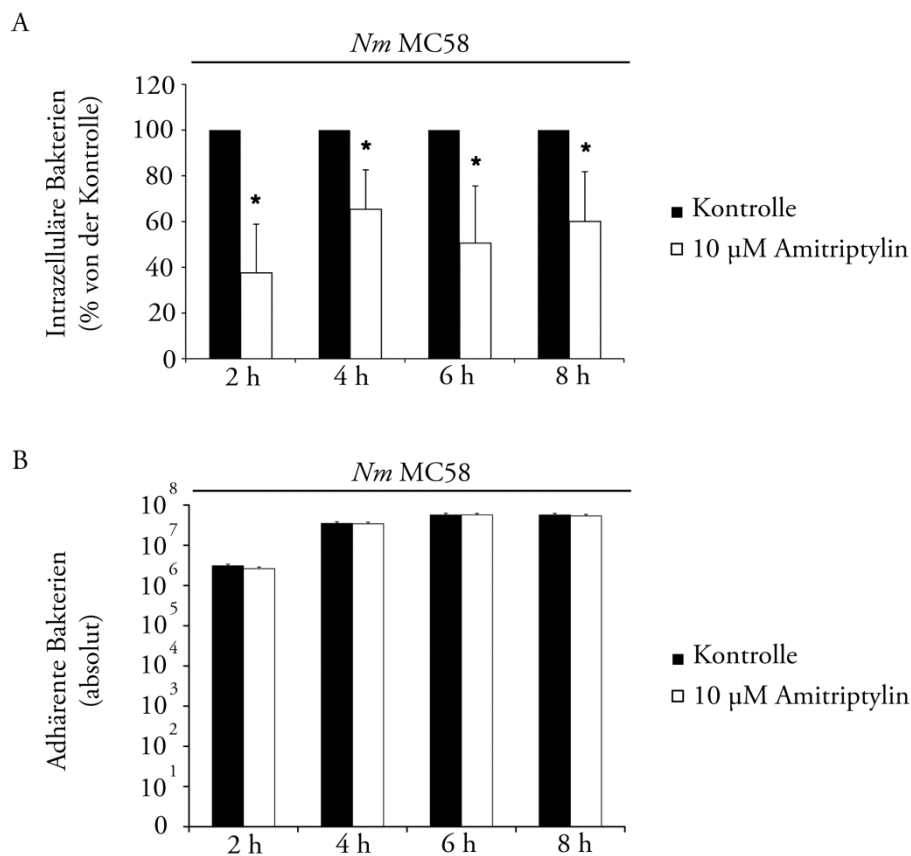


Abb. 3.1.2 Invasionskinetik des Isolates *Nm MC58* unter Zugabe von 10 µM Amitriptylin

Internalisierte (A) und adhärenente (B) Bakterien wurden bei mit 10 µM Amitriptylin vorbehandelten (weiße Balken) und unbehandelten HBMEC (Kontrolle, schwarzer Balken) bestimmt. Die Infektion erfolgte mit dem Wildtypstamm *Nm MC58* zu den dargestellten Zeitpunkten. Gezeigt ist der Einfluss von Amitriptylin auf die Invasivität zu verschiedenen Zeitpunkten im Verhältnis zu ebenfalls infizierten jedoch unbehandelten HBMEC (A), sowie die absolute Anzahl von adhärenenten Bakterien zu verschiedenen Zeitpunkten (B). Die Bestimmung der invasiven und adhärenenten Bakterien erfolgte in dreifacher Ausfertigung in drei unabhängigen Versuchen * $p < 0.05$.

3.1.2 Posttranskriptionelles Gen-Silencing der sauren Sphingomyelinase

Zur Verifizierung erfolgte eine gezielte Ausschaltung der ASM Proteinbiosynthese mittels RNA-Interferenz, um einen Einfluss der ASM in der Pathogenese zu verifizieren. Dazu wurden HBMEC 72 h vor der Infektion mit 100 nM ASM-spezifischer siRNA transfiziert (s. Kap. 2.2.9). Als Kontrolle wurden zusätzlich Zellen mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 72 h erfolgte die Infektion mit dem Isolat MC58 mit einer MOI von 10 für 4 h. Die Bestimmung der intrazellulären Bakterien wurde mit Hilfe von Gentamicin-Protektionsassays vorgenommen (s. Kap. 2.2.3). Die Transfektion von HBMEC mit 100 nM ASM siRNA führte zu einer signifikanten Reduktion der bakteriellen Aufnahme in die Zelle. Im Vergleich zwischen den nicht transfizierten Kontrollzellen um 57,3% und um 50,7% im Vergleich zu den, mit einer Kontroll-siRNA, transfizierten Zellen (s. Abb. 3.1.3 A). Die Adhärenz wurde durch den Gen-Knockdown nicht beeinflusst. (s. Anhang, Abb. 6.3) Die Kontrolle der Gen-Ausschaltung erfolgte mit einer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) (s. Kap. 2.2.9), bei der spezifische mRNA-Abschnitte indirekt quantifiziert werden konnten. Bei den mit 100 nM ASM-siRNA transfizierten Zellen erkannte man eine deutliche Verringerung der amplifizierten ASM-cDNA (s. Abb. 3.1.3 B). Dies zeigte einen durch RNA-Interferenz induzierten Abbau der ASM-mRNA. Die Expression des Haushaltsgen β -Aktin war unbeeinflusst, sodass eine verringerte Menge Gesamt-mRNA der Proben als Ursache für die Verringerung der ASM-spezifischen Sequenz ausgeschlossen werden konnte.

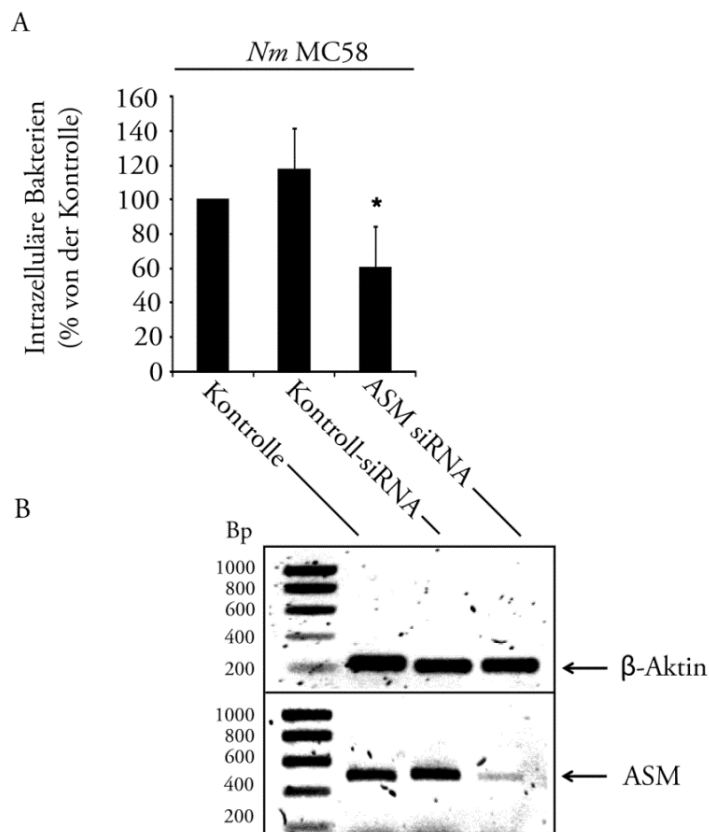


Abb. 3.1.3 Ergebnisse der RNA-Interferenz Versuche

Die Anzahl intrazelluläre Bakterien wurden bestimmt in nicht-transfizierten HBMEC (Kontrolle), sowie in HBMEC, welche 72 h vor der Infektion mit dem SgB Stamm MC58 mit unspezifischer (Kontroll-siRNA) bzw. ASM-spezifischer siRNA transfiziert wurden. Gezeigt wird die Anzahl intrazellulärer Bakterien in transfizierten Zellen im Verhältnis zu nicht-transfizierten HBMEC aus drei unabhängigen Versuchen * $p < 0,05$ (A). Exemplarisch ist die Kontrolle der Transfektion durch die Quantifizierung der RNA mittels RT-PCR gezeigt. Die Amplifikation von β -Aktin diente als Kontrolle (B).

3.1.3 Analyse von Zellen mit einem genetisch bedingten Defekt der sauren Sphingomyelinase

In den ersten Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der ASM in HBMEC eine signifikante Reduktion der bakteriellen Invasion bewirkte. Die Behandlung mit Amitriptylin und siRNA bewirkt jedoch nur eine partielle Inhibition der ASM. Um einen völligen Funktionsverlust der ASM zu erzielen, wurden Zellen mit einem genetisch bedingten Enzymdefekt der ASM analysiert. Dazu wurden Fibroblasten von Patienten mit

einer Niemann-Pick-Krankheit Typ A (NPDA) verwendet. Die Niemann-Pick-Krankheit gehört zu den Sphingolipidosen und ist eine lysosomale Speicherkrankheit, welche durch eine Mutation im SMPD-1 Gen verursacht wird [133]. Am Anfang der Versuchsreihe wurden die NPDA-Fibroblasten hinsichtlich ihrer ASM-Aktivität charakterisiert. Als Kontrolle diente eine Fibroblasten-Zelllinie mit einer intakten Enzymfunktion. Zuerst wurde die Enzymaktivität der beiden Fibroblasten-Populationen miteinander verglichen, um den Defekt der ASM zu bestätigen (s. Abb. 3.1.4 A). Nach der Charakterisierung der Fibroblasten wurde der Einfluss ihres Enzymdefekts auf die bakterielle Aufnahme mittels Gentamicin-Protektionsassays (s. Kap. 2.2.3) untersucht. Es zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion der bakteriellen Invasion in die NPDA-Fibroblasten im Vergleich zu den Wildtyp-Fibroblasten (s. Abb. 3.1.4 B). Nach 2 h Infektion war eine Verminderung der Invasion auf 16,2% und nach 4 h auf 37,0% zu verzeichnen im Vergleich mit den Fibroblasten mit einem intakten ASM-Gen. Ein Unterschied in der bakteriellen Adhärenz ließ sich zwischen den beiden Fibroblastenpopulationen nicht feststellen (s. Anhang, Abb. 6.3).

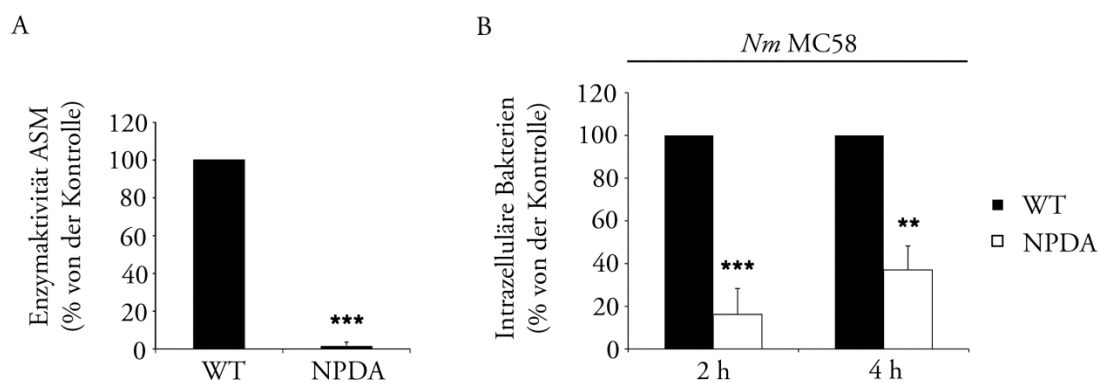


Abb. 3.1.4 Vergleich der Wildtyp-Fibroblasten (WT) mit Fibroblasten mit einem Enzymdefekt der ASM (NPDA)

Gemessen wurde die ASM-Aktivität von NPDA-Fibroblasten im Verhältnis zu Wildtyp-Fibroblasten in drei unabhängigen Versuchen *** $p < 0,001$ (A). Wildtyp-Fibroblasten (schwarz) und ASM-defiziente Fibroblasten (weiß) wurden mit dem SgB Isolat MC58 infiziert und die intrazellulären Bakterien 2 h bzw. 4 h p.i. mittels Gentamicin-Protektionsassay bestimmt. ** $p < 0,01$.

3.2 Die Infektion mit *N. meningitidis* führt zu einer Aktivierung der sauren Sphingomyelinase und zur Bildung Ceramid-reicher Plattformen an der Zelloberfläche.

Nachdem in den vorausgegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass ein Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität der ASM und der Fähigkeit von Meningokokken in die Wirtszelle einzudringen besteht, wurde als nächster Schritt untersucht, wie sich die Enzymaktivität während der Infektion verändert und inwieweit eine Infektion mit *N. meningitidis* die Zusammensetzung der Zellmembran modulieren kann.

3.2.1 Messung der ASM-Aktivität während der Infektion mit *N. meningitidis*

Zur Bestimmung der ASM-Aktivität wurden HBMEC mit dem SgB-Isolat MC58 mit einer MOI von 10 für definierte Zeitintervalle infiziert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte HBMEC. Anschließend wurden die Messproben erstellt und die Enzymaktivität bestimmt. (s. Kap. 2.2.4). Die Infektion mit Meningokokken führte zu einer signifikanten Steigerung des Substratumsatzes der ASM in HBMEC. Die Aktivität erreichte nach 2 h ihr Maximum mit einer Steigerung um 172,5% im Vergleich mit den nicht-infizierten Kontrollzellen (s. Abb. 3.2.1).

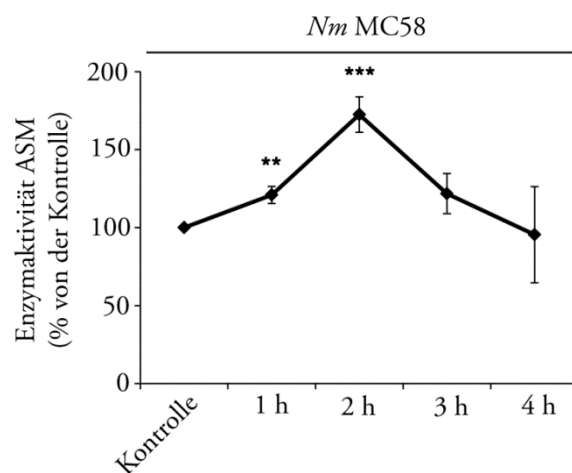


Abb. 3.2.1 Enzymaktivitätsmessung der ASM während der Infektion

HBMEC wurden mit dem SgB-Isolat MC58 für definierte Zeitintervalle infiziert. Die Graphik zeigt Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Um auszuschließen, dass die vermehrte Aktivität auf eine gesteigerte Expression der ASM unter Infektion zurückzuführen ist, wurde dies sowohl auf Transkriptionsebene mittels quantitativer Reverse-Transkriptase PCR (s. Kap. 2.3.10) als auch auf Expressionsebene mittels Western Blot (s. Kap. 2.3.20) untersucht. Für die qRT-PCR wurde zunächst wie im Material und Methodenteil dargestellt die Primereffizienzen ermittelt (s. Kap. 2.3.10). Am Versuchstag wurden die Zellen mit einer MOI von 10 mit dem SgB-Isolat MC58 zu definierten Zeitpunkten infiziert. Es konnte keine signifikante Änderung der Transkription des ASM-Gens während der Infektion festgestellt werden (s. Abb. 3.2.2 B und C).

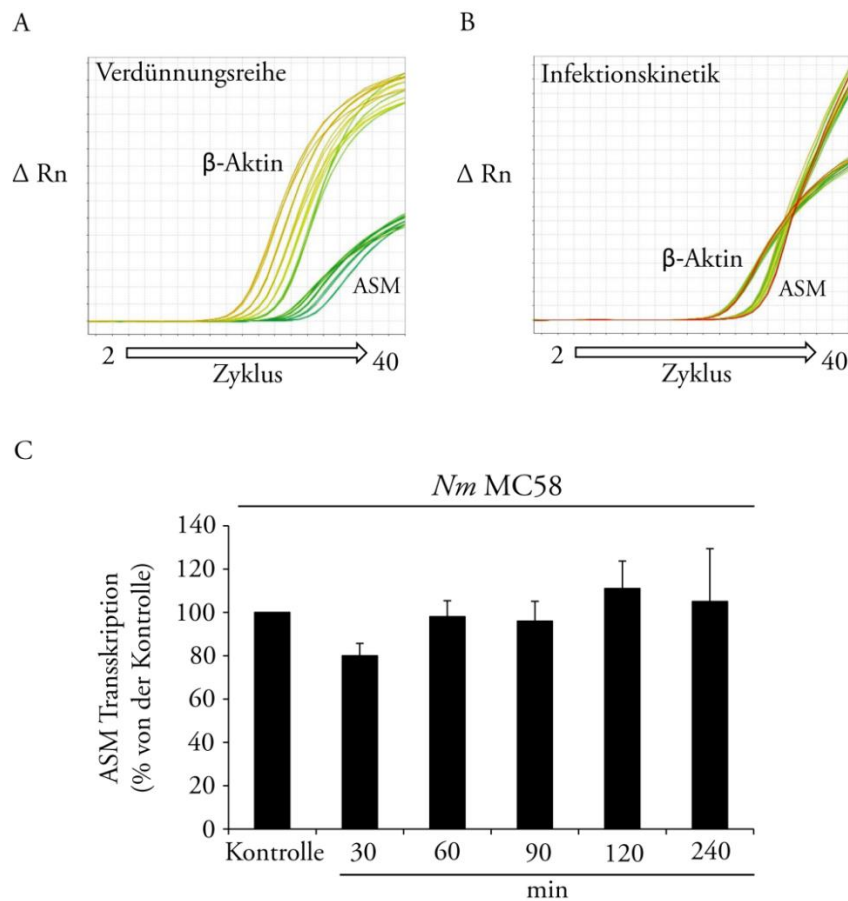


Abb. 3.2.2 qRT-PCR-Analyse der ASM-Transkription in HBMEC während der Infektion mit *N. meningitidis*

Nachdem HBMEC für definierte Zeitintervalle mit dem Isolat *Nm* MC58 infiziert wurden, erfolgte die Messung der ASM-Transkription mittels qRT-PCR. Dargestellt ist die relative ASM-Genexpression von infizierten Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten HBMEC (C).

Neben der Überprüfung der Transskription erfolgte auch die Quantifizierung der ASM-Menge mittels Immunoblot (s. Abb. 3.2.3). Dazu wurden die HBMECs mit einer MOI von 10 ebenfalls zu definierten Zeitpunkten infiziert, anschließend Zelllysate hergestellt und die ASM-Expression mittels Immunoblot gemessen. Auch hier konnte keine signifikante Änderung der ASM-Expression während der Infektion festgestellt werden. Um eine Detektion von Unterschieden der ASM-Expression aufgrund einer schwankenden Zellzahl auszuschließen, erfolgte ein Abgleich der Proben mit β -Aktin.

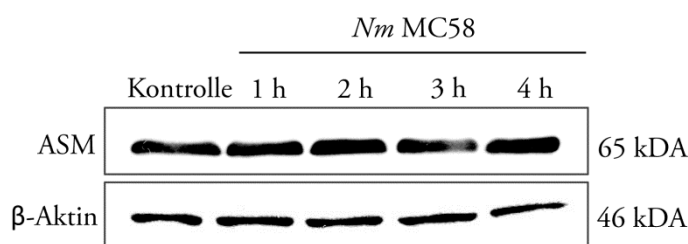


Abb. 3.2.3 Western Blot von uninfizierten Kontrollzellen und MC58-infizierten HBMEC

Dargestellt sind repräsentative Blots aus drei unabhängigen Versuchen zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h, 3 h und 4 h. Detektiert wurde ASM, als Ladekontrolle ist der entsprechende Blot für β -Aktin gezeigt.

3.2.2 Akkumulation der ASM und Ceramide auf der Zelloberfläche von HBMEC während der Infektion mit *N. meningitidis*

Ein wesentlicher Schritt in der Aktivierung der ASM ist die Translokation an die Zelloberfläche. Daher erfolgten als Nächstes die Analyse der Veränderung der ASM-Menge auf der Zelloberfläche während der Infektion, sowie die Veränderung des ASM-Produktes, dem Ceramid. Um zu überprüfen, ob die Infektion von HBMEC mit *N. meningitidis* zu einer Akkumulation der ASM auf der Zelloberfläche führt, wurden HBMEC für 1 h, 2 h, 3 h und 4 h mit dem *Nm*-Isolat MC58 inkubiert und die ASM für die durchflusszytometrische Analyse mit einem ASM-spezifischen Antikörper angefärbt (s. Kap. 2.2.6). Wie in Abb. 3.2.4 dargestellt ist, führte die Infektion von HBMEC mit dem SgB-Isolat MC58 zu einem schnellen und hoch signifikanten Anstieg der

Zellmembran-assoziierten ASM (s. Abb. 3.2.4 A/B). Das Signal erreichte, wie schon bei der Messung der ASM-Aktivität, nach 2 h ein Maximum mit einer Steigerung auf 299%. Der anschließende Abfall lag nach 4 h mit 86% im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollzellen leicht unter dem des Ausgangswertes. Ähnliches konnte, mit einem Maximum von 213% nach 2 h und einem abschließenden Abfall, bei der Messung der Ceramide beobachtet werden (s. Abb. 3.2.4 A/C). Der Anstieg der Ceramidmenge während der Infektion, ließ sich durch die Zugabe von 10 μ M Amitriptylin erfolgreich unterbinden (s. Abb. 3.2.4 D).

Neben der Quantifizierung der ASM und Ceramid Menge auf der Zelloberfläche während der Infektion erfolgte die Darstellung von zellmembran-assoziierten ASM und Ceramiden mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie (s. Kap. 2.2.7). Für die Infektion wurde das SgB-Isolat MC58 verwendet bzw. eine GFP-exprimierende Mutante. HBMEC wurden mit einer MOI von 30 für 2 h infiziert. In den Kontrollzellen zeigte sich eine diffuse Verteilung der ASM und Ceramide auf der Zelloberfläche. Unter Infektion hingegen zeigte sich die Ausbildung von Ceramid-reichen Regionen auf der Zelloberfläche. Diese wurden in der Nähe von zell-adhärenenten Bakterien beobachtet (s. Abb. 3.2.5 A). Desweiteren kolokalisierten Ceramide und ASM auf der Zelloberfläche (s. Abb. 3.2.5 B).

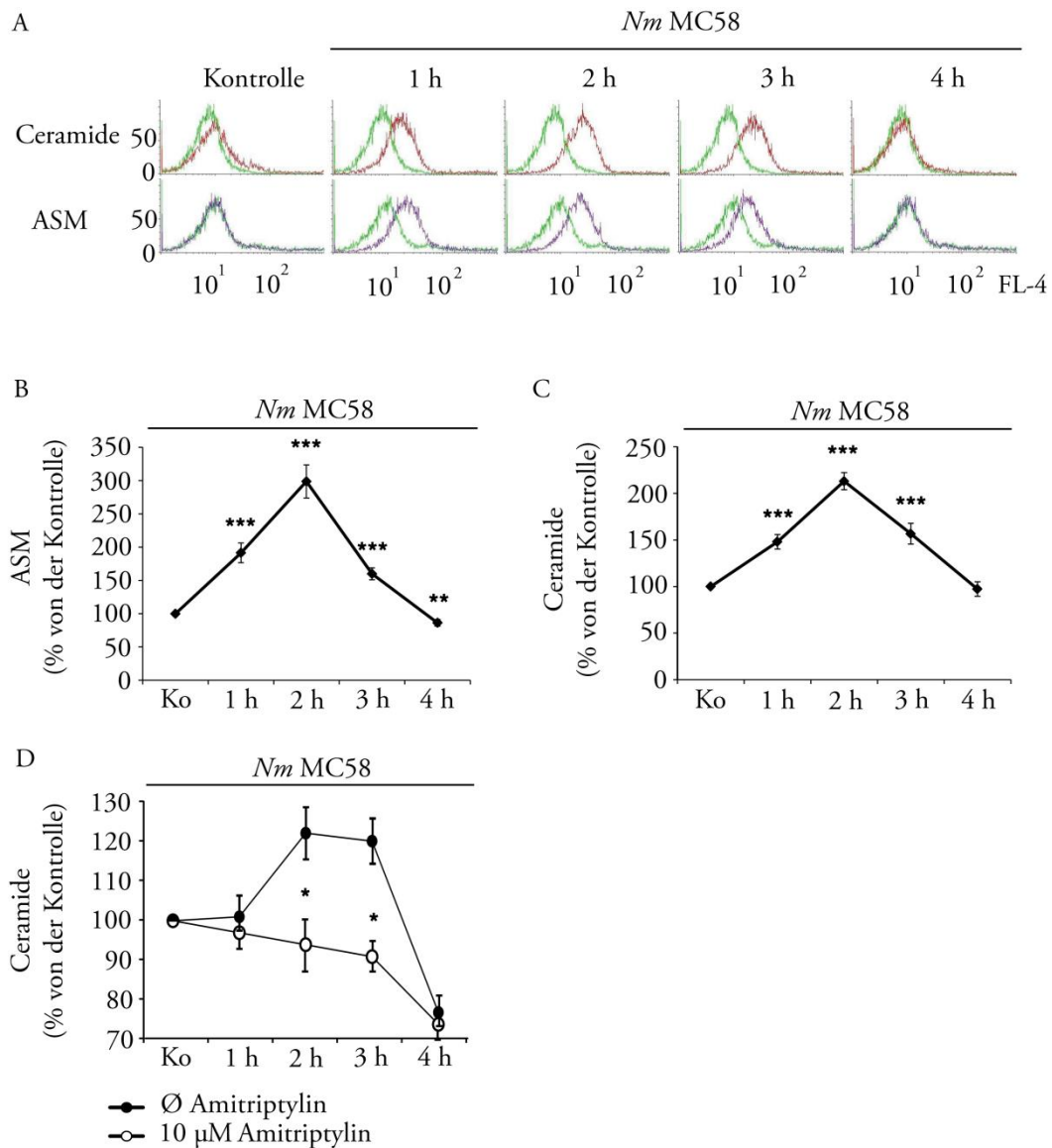


Abb. 3.2.4 Analyse der Zelloberfläche von HBMECs während der Infektion

Detektiert wurden ASM und Ceramide auf der Zelloberfläche von HBMECs. Gezeigt wird eine exemplarische Versuchsreihe mit Messungen des Ceramid- (rot) und ASM- (violett) Anteils während der Infektion, im Vergleich mit einer Isotypen-Kontrolle (grün). Bei dieser kommt es zu keiner Bindung an ein spezifisches Antigen und der gemessene Wert entspricht der Hintergrundaktivität der Probe. Für die Versuche wurden 4×10^5 Zellen pro *well* zu einem konfluenten Zellrasen kultiviert. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 10 für 1, 2, 3 und 4 h in mit 10% Humanserum supplementiertem RPMI-Zellkulturmedium. Kontrollzellen wurden nur mit 10% Humanserum supplementiertem RPMI-Zellkulturmedium inkubiert. Gezeigt wird neben einem exemplarischen Versuch (A), der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen (B-E). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

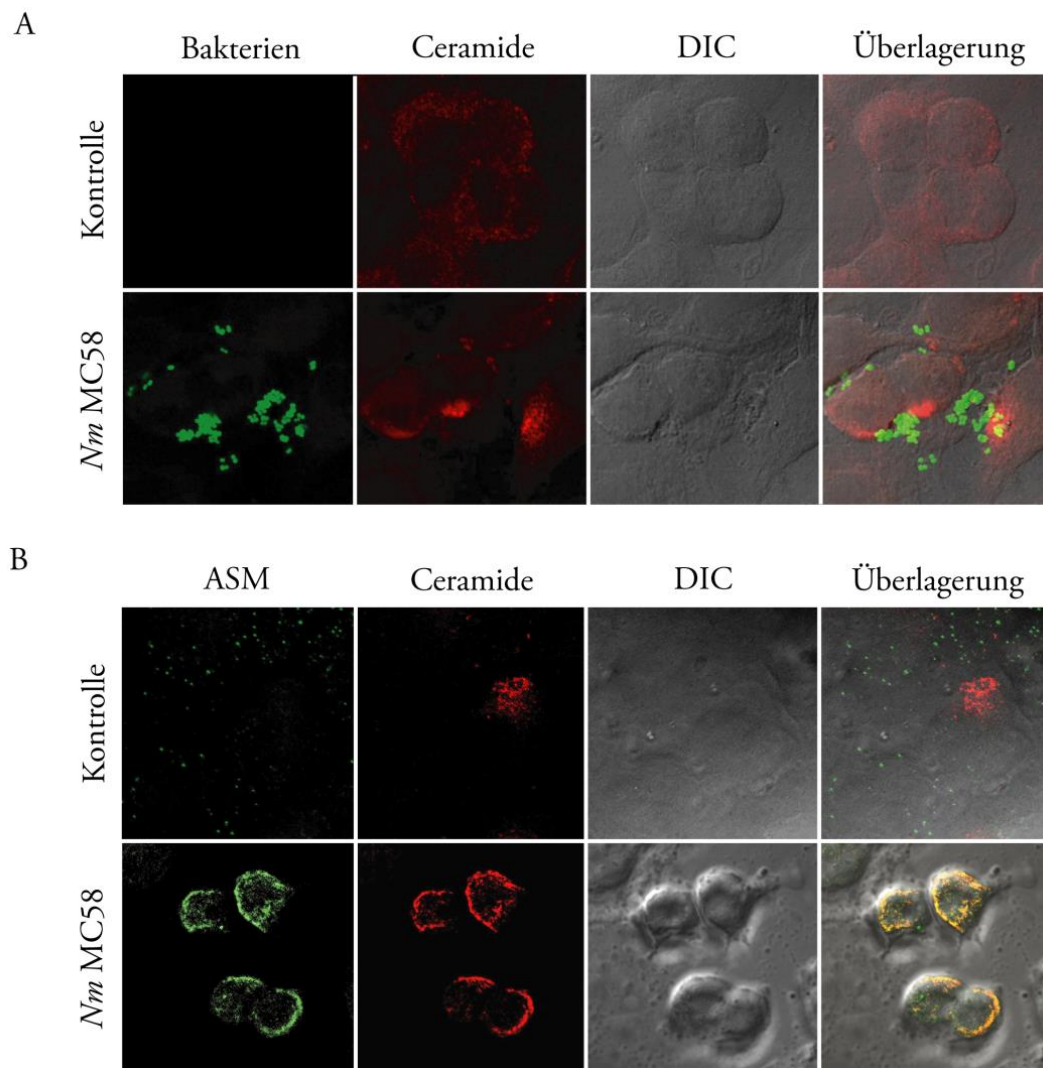


Abb. 3.2.5 Darstellung von Ceramid-reichen Domäne auf der Zelloberfläche

HBMEC wurden für 2 h mit dem SgB-Isolat MC58 infiziert (untere Reihe). Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen (obere Reihe). Die Zellen wurden nicht permeabilisiert und Ceramide (rot) an der Zelloberfläche mit einem primären Antikörper und einem sekundären Cy3-gekoppelten Antikörper dargestellt. Für die Darstellung der Bakterien (grün) wurde ein GFP-exprimierendes Isolat verwendet (A). Gezeigt wird weiterhin die Kolokalisation von ASM und Ceramiden an der Zelloberfläche während der Infektion (B). Die Darstellung der ASM (grün) erfolgte mit einem spezifischen Primäntikörper und einem Cy5-gekoppelten sekundären Antikörper. Die gezeigten Fluoreszenzaufnahmen sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Versuche.

3.3 Die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase erfolgt über die Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C.

Eine Studie von Grassmé et al. (1997) zur Aktivierung und Translokation der ASM in Epithelzellen und Fibroblasten bei der Infektion mit *N. gonorrhoeae* konnte zeigen, dass diese Aktivierung über die Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (PC-PLC) erfolgt. Um diesen Mechanismus auch bei der Infektion mit *N. meningitidis* zu überprüfen, erfolgte die Untersuchung des Einflusses der PC-PLC bei der Infektion von HBMEC mit Meningokokken.

3.3.1 Inhibition der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C

Die Inhibition der PC-PLC erfolgte mit dem Inhibitor D609 [178]. Die PC-PLC, welche an verschiedenen Signalwegen beteiligt ist, hydrolysiert Phosphatidylcholin zu Phosphocholin und 1,2-Diacylglycerol (DAG) [179]. Für die Inhibition der PC-PLC wurden die Zellen mit 100 μ M D609 für 1 h vor und während der Infektion inkubiert. Verwendet wurde das *Nm*-Isolat MC58 mit einer MOI von 10. Zellen, die nur mit dem Zellkulturmedium ohne Inhibitor inkubiert wurden, dienten als Kontrolle. Nach 2 h p.i. wurden die intrazellulären Bakterien, die ASM Aktivität sowie mittels Durchflusszytometrie der ASM- und Ceramidanteil auf der Zelloberfläche bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Invasivität auf 15,83% in Gegenwart des Inhibitors im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollzellen (s. Abb. 3.3.1 A). Desweiteren führte eine Reduktion der PC-PLC-Aktivität nicht nur zu einer Verringerung der ASM-Aktivierung um ca. 30% (s. Abb. 3.3.1 B), sondern auch zu einem hochsignifikant verringerten ASM- und Ceramidanteil an der Zelloberfläche (s. Abb. 3.3.1 C/D). Passend zu den bisherigen Ergebnissen konnte 2 h p.i. neben einer Steigerung der ASM-Aktivität auch eine Steigerung der PC-PLC-Aktivität gezeigt werden (s. Anhang, Abb. 6.5 A). Neben der PC-PLC existieren jedoch eine Reihe weiterer Phospholipasen, welche ebenfalls eine Rolle spielen könnten. Um auszuschließen, dass die Phospholipase D bzw. Phospholipase A₂ einen Einfluss auf die ASM Aktivierung nehmen, wurden HBMEC erneut infiziert und die

jeweilige Phospholipase gezielt inhibiert. Die Inhibition der PLD und PLA₂ veränderten die ASM-Aktivität und den Ceramidanteil an der Zelloberfläche nicht signifikant (s. Anhang, Abb. 6.5 B/C).

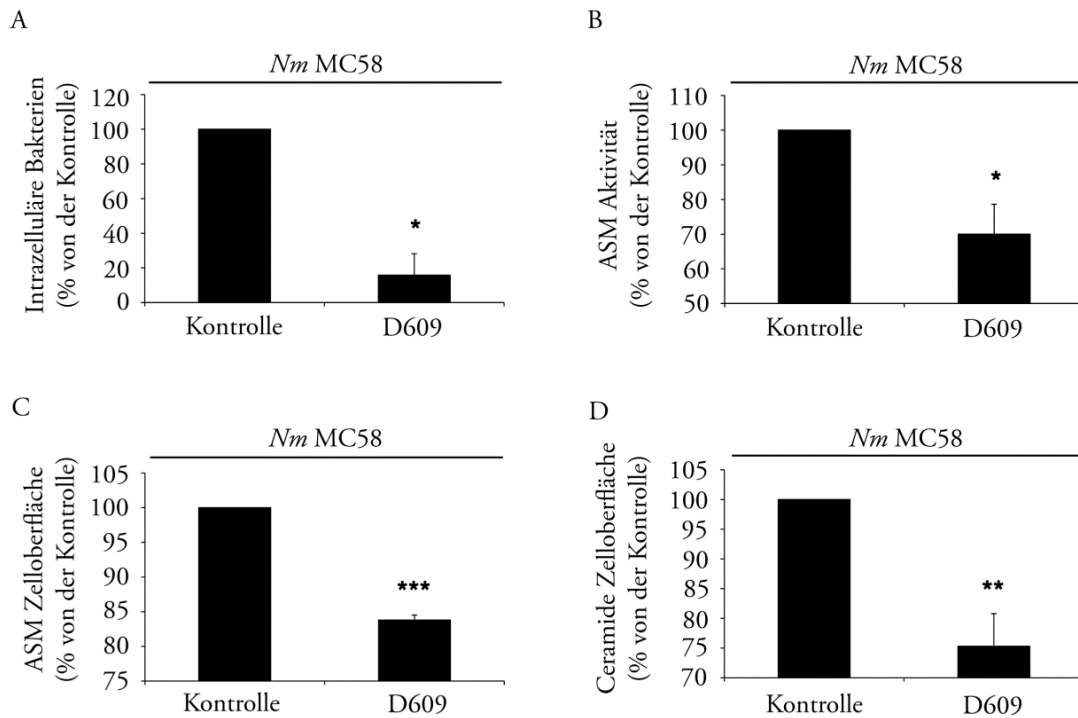


Abb. 3.3.1 Inhibition der Phosphatidycholin-spezifischen Phospholipase C

HBMEC wurden 30 min vor der Infektion mit dem PC-PLC-Inhibitor D609 behandelt. Zur Inhibition der PC-PLC wurden 100 μ M des Inhibitors D609 verwendet. Als Kontrolle dienten unbehandelte HBMEC. Intrazelluläre Bakterien (A), ASM-Aktivität (B), sowie ASM- (C) und Ceramidmenge (D) an der Zelloberfläche wurden gemessen und ins Verhältnis zu den Kontrollzellen gesetzt. Die Graphiken zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.3.2 Einfluss der Heparansulfat-Proteoglykane bei der Aktivierung der sauren Sphingomyelinase

Die Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) sind ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix und bewirken eine Stabilisierung von Geweben. Zudem können sie, gebunden an die Zelloberfläche, als Rezeptor bzw. Korezeptor dienen [75]. Es konnte gezeigt werden, dass es an Epithelien zu einer Interaktion zwischen *N. meningitidis* und HSPGs kommt [74]. Zudem konnte für *N. gonorrhoeae* eine HSPG-abhängige Aktivierung der PC-PLC festgestellt werden [121]. Um eine mögliche Beteiligung der HSPG bei der ASM-Aktivierung in HBMEC durch Meningokokken zu überprüfen, erfolgte die Inhibition der Interaktion mit Heparin bzw. Heparinase III. Das Heparin blockiert dabei die Interaktion zwischen *N. meningitidis* und den HSPGs. Das Enzym Heparinase III wiederum spaltet Heparansulfat und führt zu einer Inhibition der HSPG-vermittelten Interaktionen. Für die Versuche mit der Heparinase III wurden 75 und 150 mU eingesetzt. Für den Verdau der Kohlenhydratgruppen der HSPGs wurde die Heparinase 2 h vor der Infektion zu den Zellen gegeben. Als erstes wurden Gentamicin-Protektionsassays (s. Kap. 2.2.3) durchgeführt, um einen Einfluss der *Nm*-HSPG-Interaktion in dem Invasionsprozess von Meningokokken in HBMEC zu prüfen. Verwendet wurde das Isolat *Nm* MC58 mit einer MOI von 10. Intrazelluläre und adhärente Bakterien wurden 4 h p.i. bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der invasiven Bakterien im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (s. Abb. 3.3.2 A). Die Adhärenz wurde durch die Spaltung der HSPGs zwar reduziert, diese Reduktion war jedoch nicht signifikant. Da gezeigt werden konnte, dass die Interaktion zwischen *Nm* und HSPGs eine wichtige Rolle im Invasionsmechanismus von Meningokokken in HBMEC spielte, wurde als nächstes die ASM-Aktivität bestimmt. Auch hier ergab sich, dass die Inhibition der HSPGs zu einer signifikanten Verringerung der ASM-Aktivität führte (s. Abb. 3.3.2 B). Für die Messung der ASM-Aktivität wurden HBMEC mit einer MOI von 10 mit dem Isolat MC58 infiziert und nach 2 h die Enzymaktivität bestimmt. Diese Daten konnten durch die Inhibition der Interaktion zwischen Pathogen und Wirtszelle mit Heparin bestätigt werden. Heparin wurde in drei verschiedenen Konzentrationen 30 min vor der Infektion hinzugegeben. Es

zeigte sich eine signifikante Reduktion der Invasivität ab einer Zugabe von 50 μg Heparin (s. Abb. 3.3.2 C). Auch die ASM-Aktivität konnte durch die Zugabe von Heparin supprimiert werden (s. Abb. 3.3.2 D).

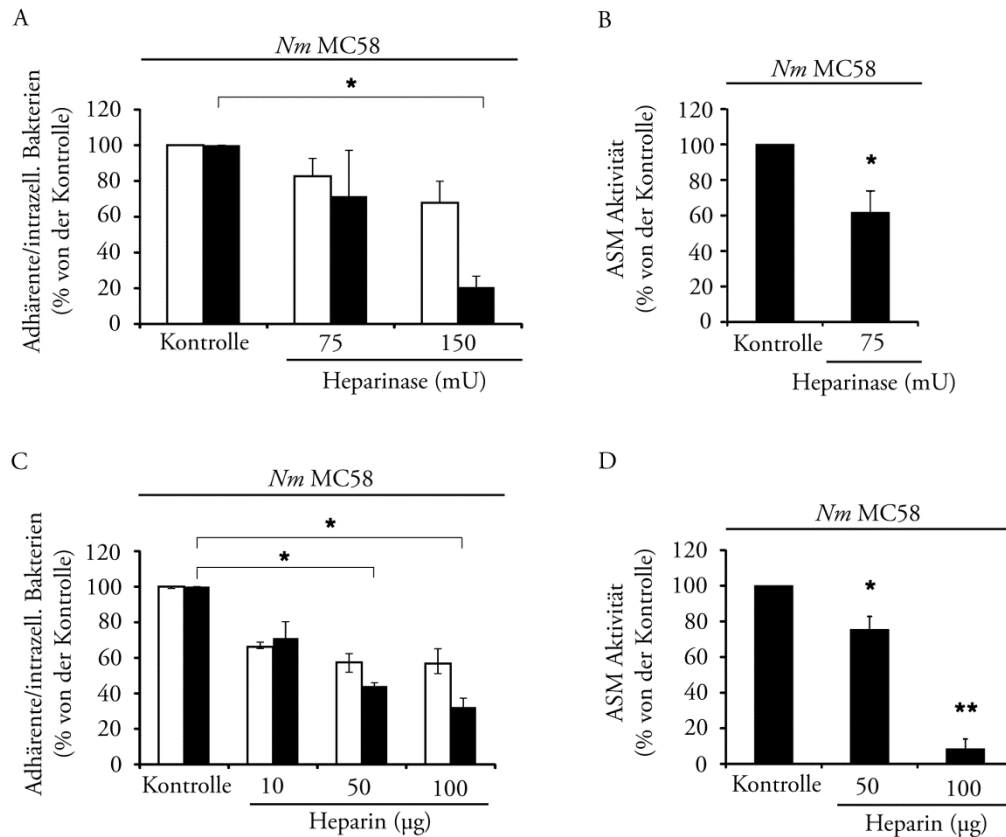


Abb. 3.3.2 Inhibition der Interaktion zwischen *Nm* MC58 und zell-membrangebundenen Heparansulfat-Proteoglykanen

HBMEC wurden vor der Infektion mit dem SgB-Isolat MC58 mit 75 bzw. 150 mU Heparinase vorbehandelt. Unbehandelte HBMEC dienten als Kontrolle und wurden zuvor nur mit Zellkulturmedium inkubiert. Analysiert wurde der Einfluss auf die Adhärenz (weiße Balken) und Invasivität (schwarze Balken) mittels Gentamicin-Protektionsassays. Aus gewonnenen Zellysate wurde weiterhin die ASM-Aktivität gemessen (B). Neben der Heparinase III wurde auch Heparin zur Inhibition der Interaktion verwendet und die Invasivität (schwarze Balken) und Adhärenz (weiße Balken) (C), sowie die ASM-Aktivität (D) gemessen. Eingesetzt wurden verschiedene Mengen Heparin (10-100 μg), welches 30 min vor der Infektion hinzugegeben wurde. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.4 Die Bildung von Ceramid-reichen Domänen führt zu einer Akkumulation von *cortical plaques*-assoziierten Proteinen.

Eine zentrale Rolle bei der Aufnahme von Meningokokken in die Wirtszelle stellt die Ausbildung von *cortical plaques* dar. Sie stellen eine Verbindung zwischen der Zelloberfläche und dem Zytoskelett her und können durch eine lokale Veränderung der Zellmorphologie eine Aufnahme von Bakterien in die Zelle begünstigen [90]. Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen ASM bzw. Ceramid-reichen Plattformen und die Formation von *cortical plaques* besteht, wurden verschiedene Strukturen der *cortical plaques* in Hinblick auf ihrer Funktion und einer möglichen Assoziation mit Ceramid-reichen Plattformen untersucht.

3.4.1 Akkumulation des ErbB2-Rezeptors in Ceramid-reichen Membranregionen

Es gibt einige zellmembranständige Rezeptoren, wie z.B. CD40, CD95 oder CD150 [131; 180; 158], für die eine Akkumulation in Ceramid-reichen Plattformen beschrieben werden. Auf der Suche nach weiteren Strukturen, die mit den Ceramid-reichen Membranplattformen assoziiert sind, wurde der Fokus zuerst auf membranständige Rezeptoren gelegt, die eine bakterielle Aufnahme begünstigen können. Einer dieser Rezeptoren ist der ErbB2-Rezeptor. Dieser ist u.a. auch bei der Ausbildung von *cortical plaques* beteiligt. [94]. Um eine mögliche Assoziation nachzuweisen, wurden zuerst immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt (s. Kap. 2.2.7). Zur Kontrolle wurde bei einem Teil der ausgesäten Zellen die ASM-Aktivität mittels ASM-siRNA reduziert (s. Kap. 2.2.9). Bei den nicht-transfizierten Zellen hatten sich Ceramid-reiche Plattformen in der Nähe von zelladhärenten Bakterien gebildet. In diesen Ceramid-reichen Regionen konnte eine Kolokalisation mit dem ErbB2-Rezeptor festgestellt werden. In den nicht-infizierten Kontroll-Zellen kam es zu keiner vermehrten Ceramidbildung und zu keiner Kolokalisation des ErbB2-Rezeptors. Auch in den mit ASM-siRNA transfizierten Zellen konnte sowohl in den nicht- als auch in den infizierten Zellen keine Ceramid-Akkumulation und Kolokalisation des ErbB2-Rezeptors festgestellt werden (s. Abb. 3.4.1).

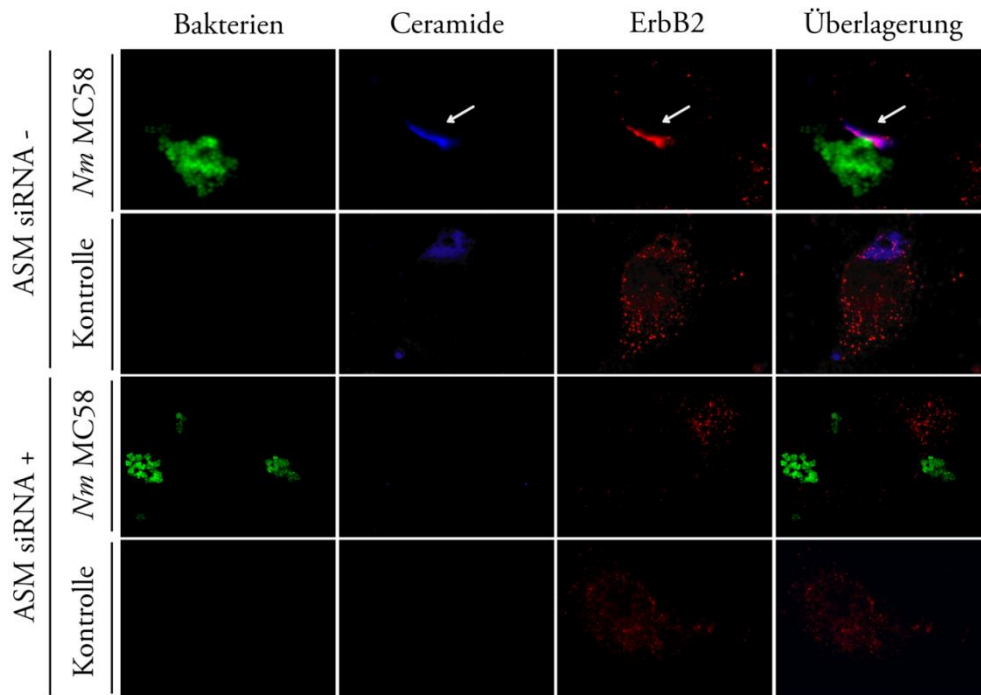


Abb. 3.4.1 Kolokalisation des ErbB2-Rezeptors in Ceramid-reichen Membrandomänen

HBMEC wurden auf Glasplättchen ausgesät und zur Kontrolle bei einem Teil der ausgesäten Zellen die ASM-Aktivität mittels ASM-siRNA reduziert. Am Versuchstag wurden die Zellen mit einer MOI von 30 mit einem GFP-exprimierenden MC58-Isolat (grün) infiziert und von ihnen nach 2 h p.i. Präparate angefertigt (s. Kap. 2.2.7). Es erfolgte keine Permeabilisierung der Zellmembran, sodass nur Antigene an der Zelloberfläche detektiert wurden. Die Darstellung der Ceramide (blau) erfolgte mit einem monoklonalen IgM-Maus-Antikörper sowie einem Maus-spezifischen (μ -Ketten) sekundären Alexa350-Antikörper. Für den ErbB2-Rezeptor (rot) wurde ein IgG2a-Kaninchen Antikörper verwendet und ein Kaninchen-spezifischer Cy3-gekoppelter Antikörper. Bei nicht-transfizierten HBMEC zeigt sich eine deutliche Kolokalisation von Ceramiden und ErbB2-Rezeptoren (weißer Pfeil) in der Nähe von zelladhärenten Bakterien.

Zur weiteren Analyse des ErbB2-Rezeptors wurde die Veränderung des ErbB2-Anteils an der Zelloberfläche während der Infektion mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Dafür wurden HBMEC für 1, 2, 3 und 4 h mit einer MOI von 10 mit dem Isolat *Nm* MC58 infiziert. Es erfolgte keine Permeabilisierung der Zellen. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen. Es zeigte sich, dass sich bei ihnen nur eine geringe Menge ErbB2-Rezeptoren an der Zelloberfläche befand (s. Abb. 3.4.2 A). Während der Infektion kam es

an der Oberfläche zu einer Akkumulation des ErbB2-Rezeptors, dessen maximale Detektion zwischen 2 und 3 h p.i lag und sich auf mehr als 400% im Vergleich mit den Kontroll-Zellen steigerte, bevor der abschließende Abfall einsetzte (s. Abb. 3.4.1 A/B). Eine potentiell vermehrte Bildung des ErbB2-Rezeptors während der Infektion wurde mit Hilfe von Western Blot-Analysen von Zelllysaten überprüft und ausgeschlossen (s. Abb. 3.4.1C).

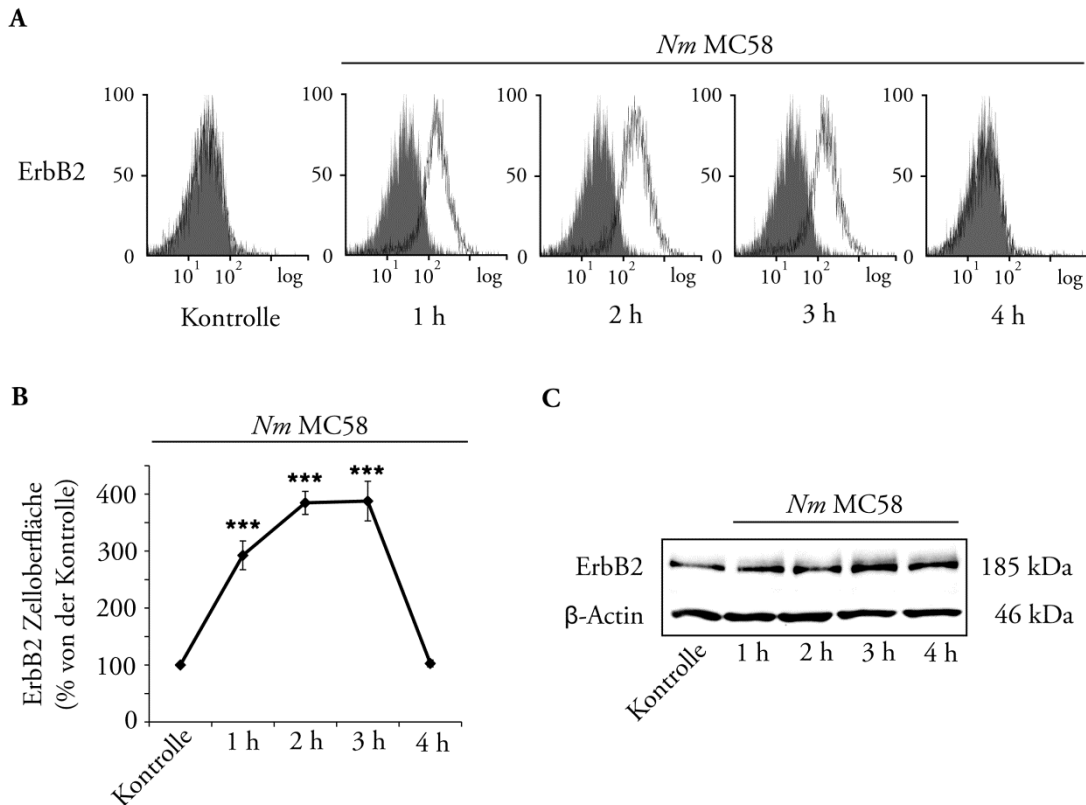


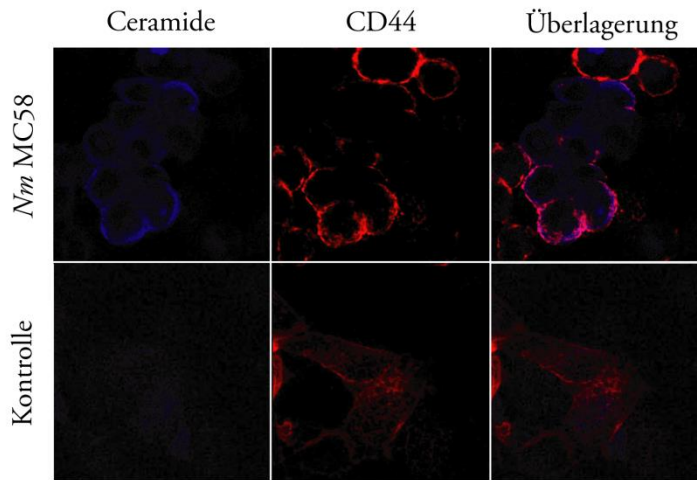
Abb. 3.4.2 Quantifizierung des ErbB2-Rezeptors an der Zelloberfläche während der Infektion

HBMEC wurden mit dem SgB-Isolat MC58 mit einer MOI von 10 zu definierten Zeitpunkten infiziert. Die indirekte Markierung des ErbB2-Rezeptors erfolgte mit einem spezifischen Primärantikörper und einem Cy5-gekoppelten sekundären Antikörper. Gezeigt ist ein exemplarisches Versuchs einer durchflusszytometrischen Messung der Veränderung der ErbB2-Menge (offenes Histogramm) an der Zelloberfläche während der Infektion, sowie einer Isotypenkontrolle (gefülltes Histogramm) zum Ausschluss unspezifischer Bindungen (A). Weiterhin gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen Infektionsversuchen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. *** $p < 0,001$ (B). Die Analyse der gesamten ErbB2-Proteinmenge wurde mit Hilfe von Western Blot-Analysen durchgeführt. Der Abgleich der Gesamtproteinmenge erfolgte mit der Messung der β -Aktin-Menge der Proben (C).

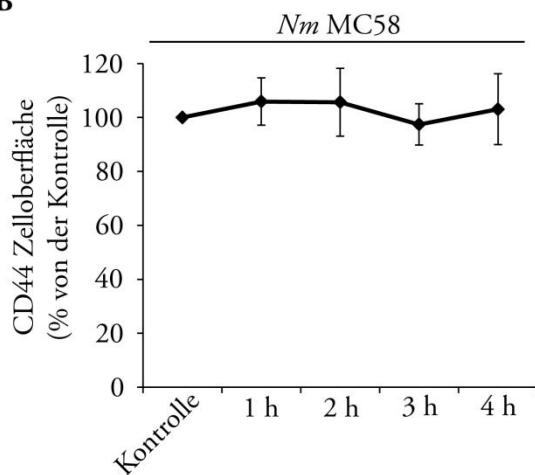
3.4.2 Akkumulation des CD44-Rezeptors in Ceramid-reichen Membranregionen

Ein weiterer Rezeptor, welcher Bestandteil der *cortical plaques* ist, ist das Glykoprotein CD44. Es spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen, wie z.B. der Zelladhäsion, Migration und Proliferation [181]. CD44 interagiert als Zelloberflächenprotein mit seiner extrazellulären Seite u.a. mit Hyaluron oder Kollagen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass es zur Interaktion bzw. Bindung zwischen CD44 und dem ErbB2-Rezeptor über Disulfidbrücken an der Zelloberfläche kommt [181; 182]. Um zu überprüfen, ob CD44 mit Ceramiden an der Zelloberfläche kolokalisiert, erfolgte eine Analyse mittels konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen, welche nur mit RPMI supplementiert mit Humanserum für 2 h inkubiert wurden. Bei den infizierten Zellen zeigte sich nach 2 h eine deutliche Kolokalisation von CD44 und Ceramiden an der Zelloberfläche, welche im diesem Umfang nicht bei den Kontrollzellen festgestellt werden konnte (s. Abb. 3.4.3 A). Der CD44-Anteil an der Zelloberfläche blieb während der Infektion unverändert (s. Abb. 3.4.3 B/C). Zur Messung des CD44-Anteils, wurden Zellen mit einer MOI von 10 mit dem *Nm* SgB-Isolat MC58 an definierten Zeitpunkten infiziert und anschließend CD44 mit Hilfe von Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch quantifiziert.

A



B



C

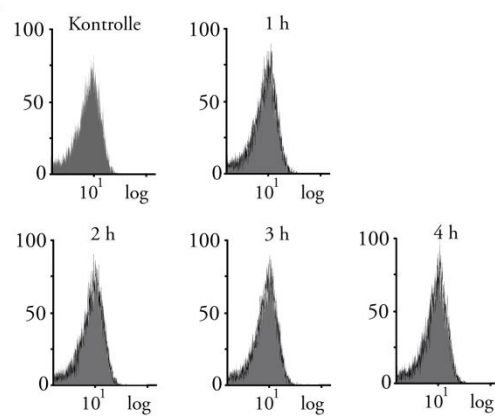


Abb. 3.4.3 Kolokalisation von CD44 in Ceramid-reichen Membrandomänen

Nachdem Zellen auf Glasplättchen ausgesät worden waren, erfolgte die Infektion für 2 h mit dem Isolat *Nm* MC58 am Versuchstag mit einer MOI von 30. Die Zellen wurden nicht permeabilisiert, sodass nur Antigene, welche sich an der Zelloberfläche befanden, detektiert wurden. Als erstes wurde CD44 (rot) mit Hilfe eines monoklonalen IgG-Maus-Antikörpers markiert und mit einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper dargestellt. Die Detektion der Ceramide (blau) erfolgte anschließend mit einem monoklonalen IgM-Maus-Antikörper und einem IgM- (μ -Ketten) spezifischen sekundären Alexa350-Antikörper (A). Neben der Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgte die Quantifizierung von CD44 an der Oberfläche mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Gezeigt werden neben der Auswertung der Versuchsreihen (B) die Histogramme eines exemplarischen Versuches (C). Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen (gefüllte Histogramme). Gemessen wurde die Veränderung der CD44-Menge zu definierten Zeitpunkten während der Infektion (offene Histogramme).

3.4.3 Kolokalisation von phosphorylierten Proteinen der Ezrin-Familie mit Ceramid-reichen Membrandomänen

Sowohl CD44 als auch die Proteine der Ezrin-Familie werden über Phosphorylierung reguliert [183]. Daher wurde zuerst überprüft, ob phosphoryliertes Ezrin, Radixin und Moesin (ERM) unterhalb von Ceramid-reichen Membranplattformen akkumulieren. Neben HBMEC mit einer normalen ASM-Aktivität wurden auch HBMEC verwendet, bei denen das ASM-Gen mit Hilfe von *small hairpin* RNA (shRNA) stillgelegt wurde. Die Erstellung dieser Zellpopulation erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies vom Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg (s. Kap. 2.2.10). Die erfolgreich transfizierten Zellen zeigten eine deutlich verringerte ASM-Expression, ASM-Enzymaktivität und Ceramidproduktion (s. Abb. 3.4.4).

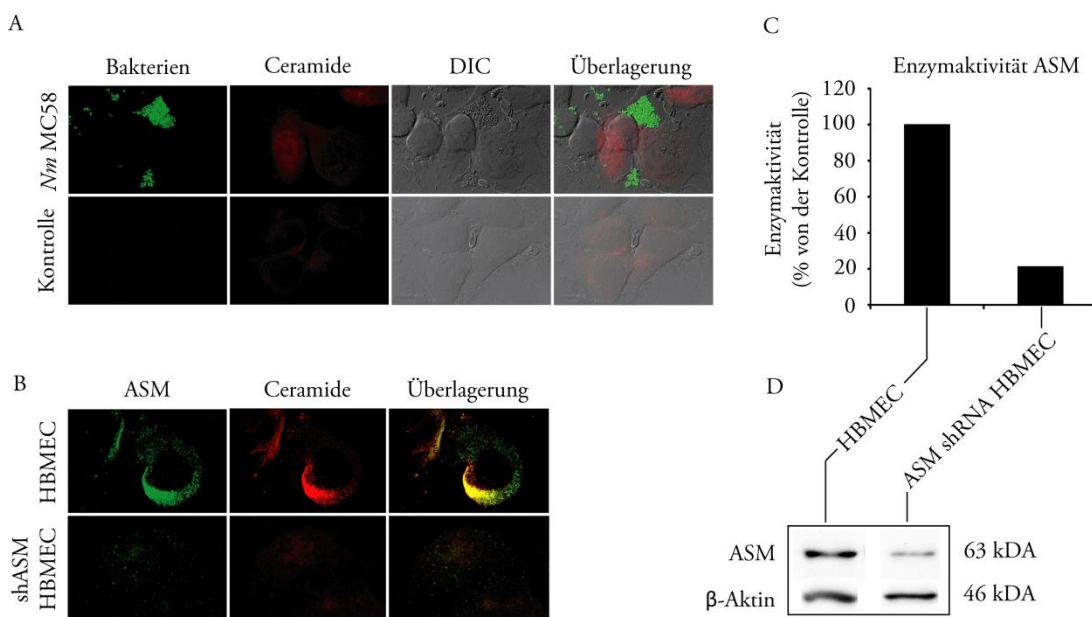


Abb. 3.4.4 Charakterisierung von shASM HBMEC

Für immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden shASM HBMEC auf Glasplättchen ausgesät und infiziert bzw. nur mit Zellkulturmedium inkubiert (Kontrolle). Für die Darstellung von Bakterien (grün) wurde ein GFP-exprimierendes MC58-Isolat benutzt. Die Färbung von Ceramiden (rot) erfolgte mittels spezifischen Primärantikörper und Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (A). Die Markierung von ASM und Ceramiden für Kolokalisationsanalysen erfolgte wie zuvor beschrieben (B). Neben der Visualisierung der ASM und Ceramide erfolgte die Analyse der Enzymaktivität der ASM (C) und der ASM-Menge mittels Western Blot (D). Als Kontrolle dienten WT HBMEC. Gezeigt ist jeweils ein exemplarischer Versuch.

Nachdem in den shASM-HBMEC eine geringere ASM-Aktivität nachgewiesen werden konnte, erfolgte die Analyse der Kolokalisation von Ceramiden und phosphorylierten ERM mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (s. Kap. 2.2.7). Bei den HBMEC mit einer normalen ASM-Aktivität konnte während der Infektion eine Ausbildung Ceramid-reicher Membrandomänen beobachtet werden, unterhalb derer es zur Akkumulation von phosphorylierten-ERM Proteinen kam (s. Abb. 3.4.5). Bei den nicht-infizierten Kontrollzellen kam es zu keiner Akkumulation von Ceramiden und auch zu keiner Ansammlung von phosphorylierten ERM-Proteinen unterhalb der Zellmembran. Dies konnte auch bei den transfizierten HBMEC mit einer reduzierten ASM-Aktivität beobachtet werden. Es kam bei den infizierten sowie bei den nicht-infizierten Zellen zu keiner Formation von Ceramid-reichen Plattformen und zu keiner Akkumulation von phosphorylierten ERM-Proteinen unterhalb der Zellmembran.

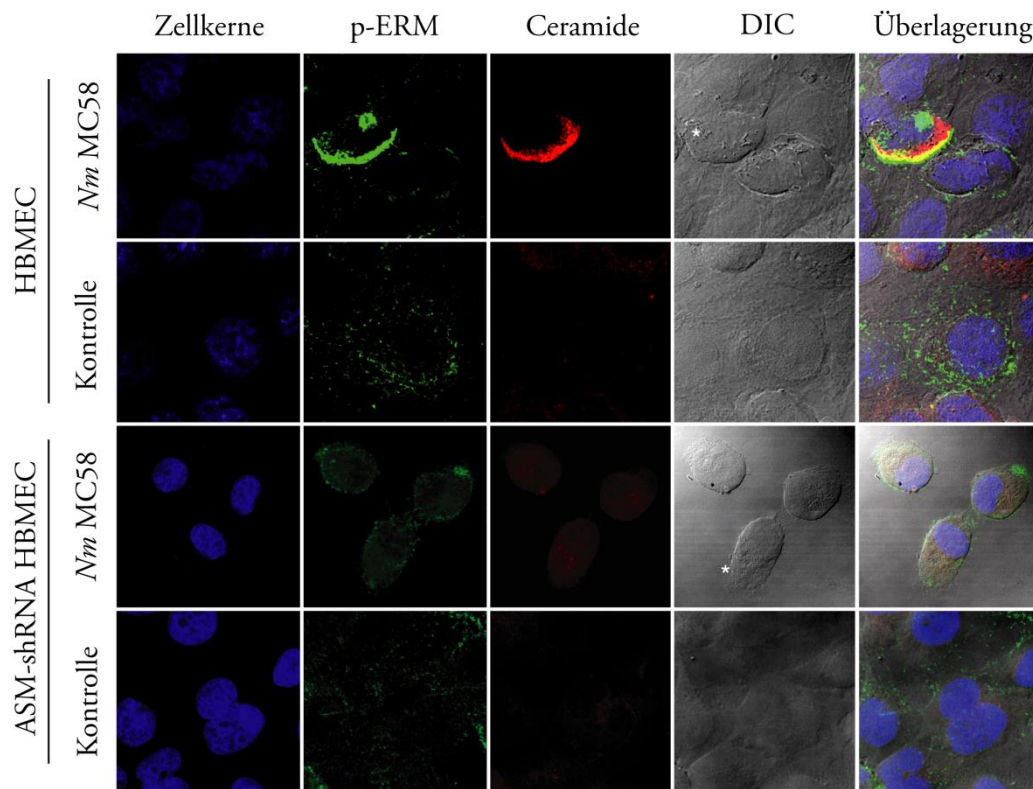


Abb. 3.4.5 Kolokalisation von phosphorylierten ERM-Proteinen mit Ceramid-reichen Membrandomänen

HBMEC und shASM HBMEC wurden mit einer MOI von 10 für 2 h mit dem SgB-Isolat MC58 infiziert.

Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen. Nachdem die Zellen fixiert worden waren, erfolgte die milde Permeabilisierung der Zellmembran, um die intrazellulären ERM-Proteine detektieren zu können. Die Ceramidfärbung (rot) wurde mit Hilfe eines monoklonalen Maus-Antikörpers und eines Cy3-gekoppelten sekundären Antikörpers durchgeführt. Für die phosphorylierten ERM-Proteine (grün) wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper verwendet, welcher phosphoryliertes Ezrin (Thr567), Radixin (Thr 664) und Moesin (Thr558) bindet. Als sekundärer Antikörper wurde ein Kaninchen-spezifischer Alexa488-gekoppelter Antikörper benutzt. Zusätzlich wurden die Nukleinsäuren (blau) mit dem interkalierenden Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Im Differentialinterferenzkontrast (DIC) sind neben der Zellmorphologie, zelladhärenten Bakterien (*) dargestellt. Die gezeigten Aufnahmen sind repräsentativ für drei unabhängig von einander durchgeführte Versuche.

3.4.4 Phosphorylierte ERM-Proteine sind mit CD44 und Aktin assoziiert.

Die Assoziation von ERM-Proteinen mit CD44 und Aktin wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Dazu wurden Zellen infiziert und die phosphorylierten ERM-Proteine mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper und einem sekundären Alexa488-gekoppelten Antikörper gefärbt. Die Darstellung von CD44 erfolgte wie in vorausgegangenen Versuchen mit einem monoklonalen Maus-Antikörper und Cy3. Die Färbung von Aktin erfolgte mit Phalloidin 546, welches irreversibel an F-Aktin bindet. Es zeigte sich bei den infizierten Zellen eine Akkumulation von phosphorylierten ERM-Proteinen, welche mit CD44 und Aktin kolokalisierten (s. Abb. 3.4.6). Bei den nicht-infizierten Kontroll-Zellen konnte eine solche Akkumulation von ERM-Proteinen nicht beobachtet werden.

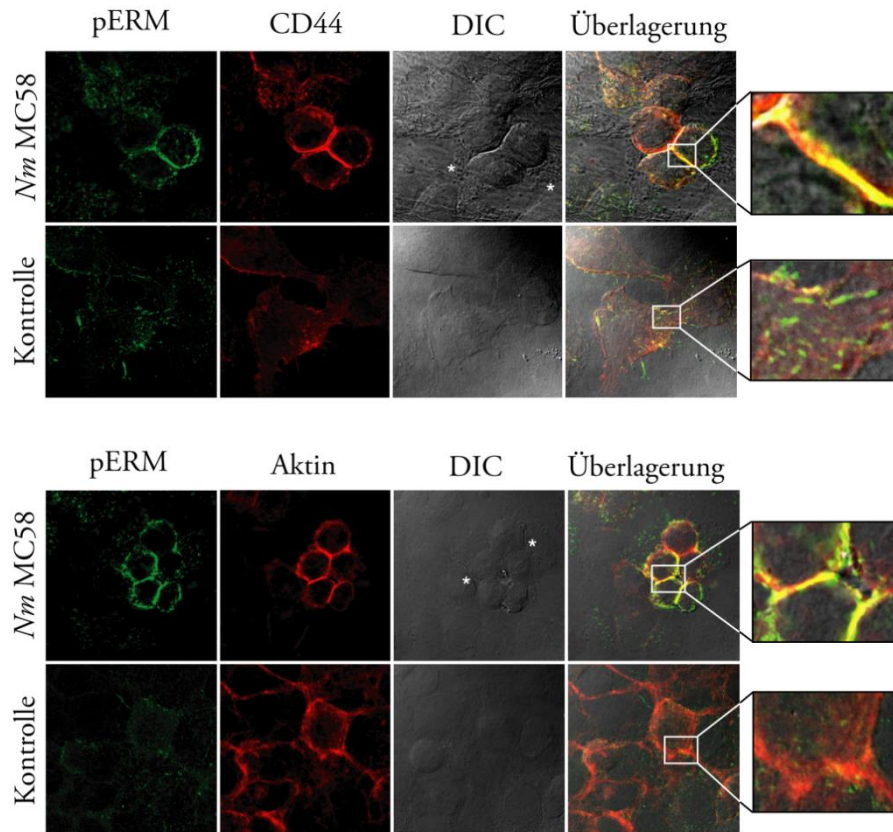


Abb. 3.4.6 Kolokalisation von phosphorylierten ERM-Proteinen mit CD44 und Aktin

HBMEC wurden mit einer MOI von 10 für 2 h mit dem SgB-Isolat MC58 infiziert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen. Nach der Fixation der Zellen erfolgte die milde Permeabilisierung der Zellmembran, um die intrazellulären ERM-Proteine detektieren zu können. Intrazelluläre phosphorylierte ERM-Proteine (Ezrin (Thr567), Radixin (Thr 664) und Moesin (Thr558)) (grün) wurden mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper spezifisch markiert und mit Hilfe eines Kaninchen-spezifischer Alexa488-gekoppelten-Antikörper detektiert. Die Darstellung von CD44 (rot) erfolgte mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpers und einem Cy3-gekoppelten-Sekundärantikörper. Aktin (rot) wurde mit Hilfe von Alexa Fluor 546 Phalloidin dargestellt. Zellmorphologie und Bakterien (*) sind mit Hilfe von Differentialinterferenzkontrast-Aufnahme dargestellt. Die gezeigten Aufnahmen sind repräsentativ für drei unabhängig von einander durchgeführte Versuche.

3.4.5 Die Infektion von HBMEC mit *N. meningitidis* führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERM-Proteinen.

Bei der Infektion von HBMEC mit *N. meningitidis* konnte durch die Immunfluoreszenz-Mikroskopie festgestellt werden, dass es zu einer Akkumulation von phosphorylierten ERM-Proteinen unterhalb von Ceramid-reichen Membranregionen kommt. Jedoch konnte dabei noch nicht geklärt werden, ob es sich nur um eine vermehrte Akkumulation handelte oder es auch zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERM-Proteinen während der Infektion kommt. Deshalb wurden die Phosphorylierungsstellen der Aminosäuren Threonin 567 beim Ezrin, Threonin 564 beim Radixin und Threonin 558 beim Moesin untersucht. Zur Detektion der Proteinmenge wurden zwei verschiedene polyklonale ERM-Antikörper verwendet, zum einem ein Kaninchen-Antikörper, welcher die Gesamtmenge der ERM-Proteine erfasste und zum anderen ein spezifischer Antikörper, welcher phosphoryliertes Ezrin (Thr567), Radixin (Thr 664) und Moesin (Thr558) bindet. Wie die Abb. 3.4.7 zeigt konnte in HBMEC während der Infektion eine ansteigende ERM-Phosphorylierung mit einem Maximum 2 h p.i. beobachtet werden. Die Expression der ERM-Proteine blieb dabei unbeeinflusst. Die Ergebnisse konnten mit Hilfe der Durchflusszytometrie reproduziert werden. Dazu erfolgte die Permeabilisierung der Zellen und eine Markierung der phosphorylierten ERM-Proteine durch einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper und einen Cy5-gekoppelten sekundären Antikörper. Die Phosphorylierung erreichte nach 2 h p.i. mit einer Steigerung auf 149,8% ein hochsignifikantes Maximum im Vergleich mit nicht-infizierten Zellen und anschließend nach 4 h p.i. einen Abfall auf 137,7% im Vergleich mit den Kontrollzellen (s. Abb. 3.4.7 B).

Um zu überprüfen, ob Ezrin auch eine funktionelle Relevanz bei der Aufnahme von Meningokokken in HBMEC hat, wurde als nächstes die Ezrin-Expression mit Hilfe von RNA-Interferenz reduziert und anschließend der Einfluss auf die Invasivität der Bakterien untersucht. Dafür wurden HBMEC mit 100 nM Ezrin-spezifischer siRNA transfiziert und nach 72 h Gentamicin-Protektionsassays durchgeführt (s. Kap. 2.2.3). Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der bakteriellen Invasion in HBMEC nach 2 h und 4 h p.i..

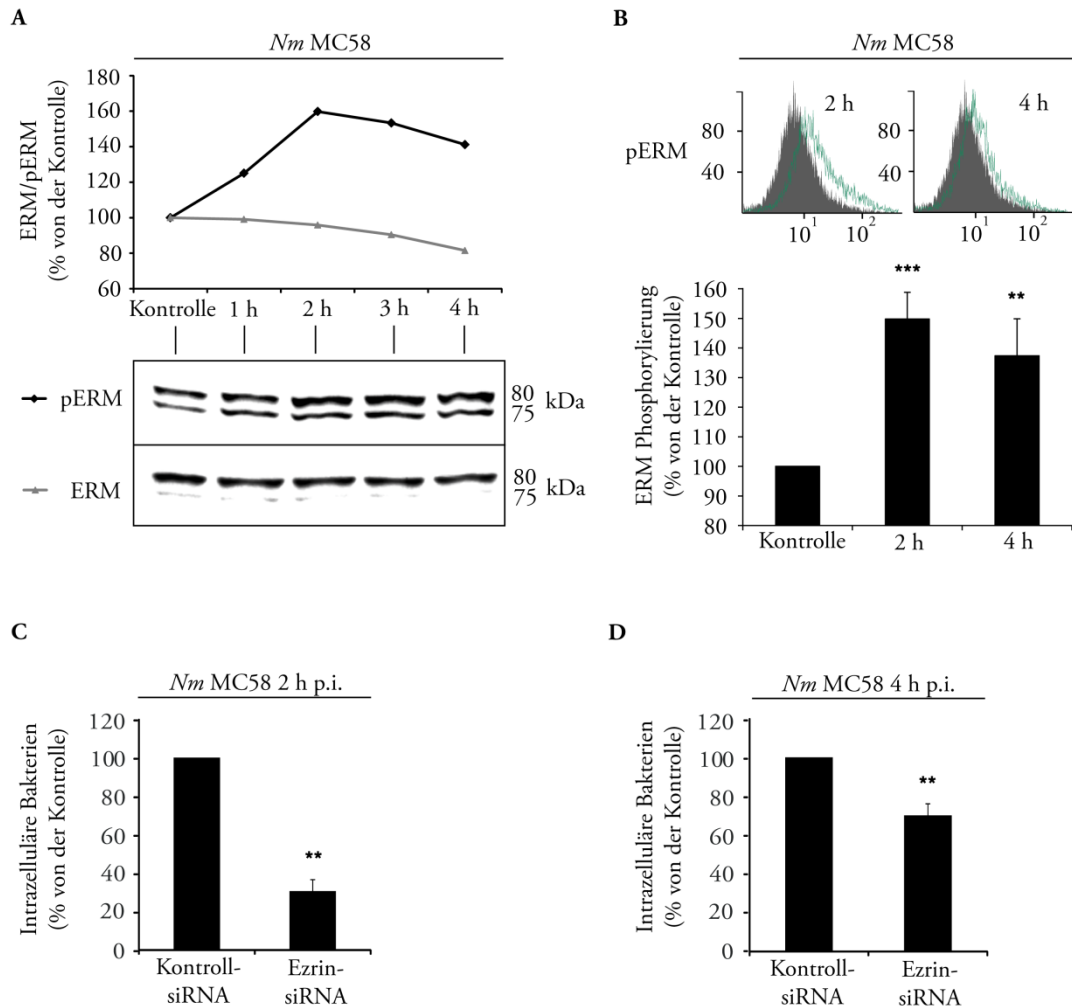


Abb. 3.4.7 Phosphorylierung von ERM-Proteinen und deren Einfluss auf die Invasivität von *N. meningitidis*

HBMEC wurden mit dem SgB-Isolat MC58 zu definierten Zeitpunkten infiziert und die Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen (schwarze Kurve) und die Gesamt-ERM-Menge (graue Kurve) im Western Blot analysiert (Obere Bande 80 kDa: Ezrin und Radixin; Untere Bande 75 kDa Moesin). Dargestellt sind ein repräsentativer Blot und die entsprechende densitometrische Auswertung (A). Neben Western Blot Analysen wurden die Veränderung der ERM-Phosphorylierung während der Infektion mit durchflusszytometrische Messungen analysiert. Gezeigt wird neben einem exemplarischen Versuch (ERM-Phosphorylierung: grüne Histogramme; nicht-infizierte Kontrollzellen: gefüllte Histogramme) die Auswertung von drei unabhängigen Versuche. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (B). Gezeigt wird weiterhin die Ergebnisse der RNA-Interferenz Versuche mit Ezrin-spezifischer siRNA 2 h (C) und 4 h p.i. (D). Als Kontrolle dienten Zellen die mit einer nicht-spezifische siRNA transfiziert wurden ** $p < 0,01$.

3.4.6 Der ErbB2-Rezeptor und die Proteinkinase C sind bei der verstärkten Phosphorylierung von ERM-Proteinen beteiligt.

Die ERM-Proteine werden über ihre Phosphorylierung reguliert, dies geschieht u.a. über die Proteinkinase C (PKC), die dabei Phosphat auf Serin- oder Threoningruppen überträgt [183]. Ein Rezeptor, welcher die PKC aktivieren kann, ist der ErbB2-Rezeptor [184]. Um zu überprüfen, ob diese Signalkaskade einen Einfluss auf die ERM-Phosphorylierung hat, wurde dieser Signalweg mit Inhibitoren unterbrochen und die ERM-Phosphorylierung mit Western Blot-Analysen untersucht. Neben phosphorylierten ERM-Proteinen wurde die Gesamtmenge ERM und β -Aktin gemessen, um eine Veränderung der phosphorylierten ERM-Menge auf Grund einer unterschiedlichen Gesamtproteinmenge auszuschließen. Bei den infizierten HBMEC erkannte man, bei gleichbleibender Gesamtproteinmenge, eine deutlich verstärkte Phosphorylierung der ERM-Proteine 2 h p.i. im Vergleich mit den nicht-infizierten Kontrollen. Bei dem EGFR-Inhibitor EKB-569 (Pelitinib), zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der ERM-Phosphorylierung im Vergleich mit den infizierten HBMEC ohne EGFR-Inhibition (s. Abb. 3.4.8 A). Bei dem PKC-Inhibitor kam es zu einer deutlichen Reduktion ab 1 μ M, so dass ab 5 μ M kaum noch phosphorylierte ERM-Proteine nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 3.4.8 B). Die Gesamtproteinmenge blieb auch in höheren Konzentrationen unbeeinflusst.

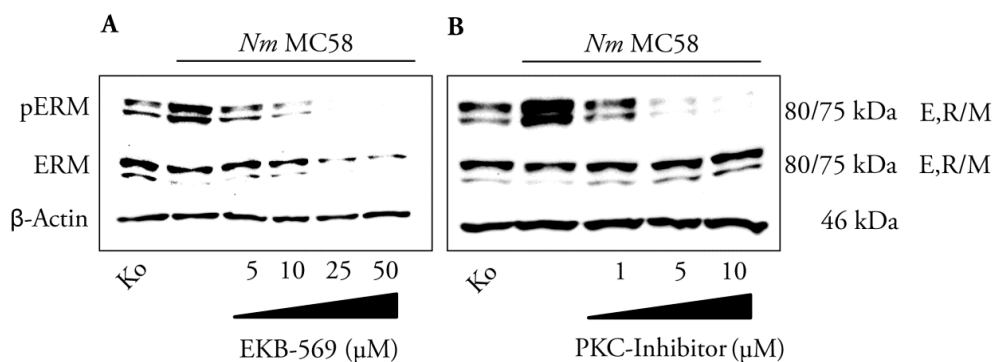


Abb. 3.4.8 Einfluss der ErbB2- und PKC-Inhibition auf die Phosphorylierung von ERM Proteinen

HBMEC wurden 1 h vor Infektion mit dem EGFR-Inhibitor EKB-569 oder einem PKC-Inhibitor behandelt und anschließend mit dem Isolat MC58 für 2 h infiziert. Anschließend wurden Zellysate hergestellt und die Proteinmenge mittels Western Blot bestimmt. Als Kontrolle (Ko) dienten nicht infizierte Zellen.

3.5 Ceramide sind in die Regulation der ERM-CD44 Interaktion involviert.

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass es während der Infektion von HBMEC mit Meningokokken zu einer Kollokalisierung von Ceramid-reichen Membrandomänen und *cortical plaque*-assoziierten Proteinen kommt. Unklar bleibt, weshalb diese Akkumulation von *cortical plaque*-assoziierten Proteinen mit zellmembranständigen Ceramiden assoziiert ist. Vorangegangene Arbeiten von Donatello et al. (2012) und Megha et al. (2004) konnten einerseits zeigen, dass es zu einer Restriktion der CD44-ERM-Interaktion, welche ein wichtiger Vorgang in der Ausbildung von *cortical plaques* darstellt, in Cholesterol-reichen *lipid rafts* kommt, andererseits Ceramide, auf Grund ihrer biophysikalischen Eigenschaften in der Lage sind, Cholesterol aus Cholesterol-reichen *lipid rafts* zu entfernen [185; 186; 187]. Dies führt wiederum zu veränderten Eigenschaften und Strukturen der *lipid rafts*. Um die Hypothese, dass Ceramide *lipid rafts* verändern und zugleich CD44 freisetzen, so dass letztlich eine verstärkte ERM-CD44-Interaktion möglich wird, zu überprüfen, folgte als nächstes die Analyse von *lipid rafts* während der Infektion mit *N. meningitidis*.

3.5.1 Der Einfluss der Infektion von *N. meningitidis* auf die ERM-CD44 Interaktion

Die Isolierung der *lipid rafts* erfolgte mit der Dichtegradientenzentrifugation (s. Kap. 2.2.8). Zunächst wurden HBMEC wiederum mit *Nm* MC58 für 2 h bzw. 4 h mit einer MOI von 10 infiziert. Als Kontrolle dienten HBMEC, welche nur mit RPMI inkubiert wurden. Bei der Dichtegradientenzentrifugation wurden je 1000 µl-Fractionen gewonnen, die zur weiteren Analyse verwendet wurden. Von jeder Probe wurden 500 µl für die TCA-Proteinfällung genutzt und 500 µl für eine massenspektrometrische Lipid-Analyse. Die gefällten Proteine wurden in 80 µl SDS-Puffer aufgenommen und mittels Western Blot-Versuche analysiert. Die *lipid rafts* befanden sich in der 0/20%-Interphase in Fraktion zwei. Als *lipid raft* Marker wurde Flotillin-1 verwendet, das sich in *lipid rafts* anreichert [188]. Bei den nicht-infizierten Zellen zeigte sich eine deutliche Flotillin-1-

Bande in Fraktion zwei. Flotillin-1 konnte auch in den Fraktionen 5–8 nachgewiesen werden. Wurden HBMEC für 2 h mit dem *Nm*-Isolat MC58 infiziert, ließ sich in Fraktion zwei, der *lipid raft* Fraktion, kein Flotillin-1 mehr nachweisen. In den Fraktionen 5–8, war wie in den Kontroll-Zellen auch, Flotillin-1 weiterhin vorhanden. Nach 4 h p.i. konnte Flotillin-1 wieder in Fraktion zwei nachgewiesen werden (s. Abb. 3.5.1 A). Parallel hierzu wurden die Proben zur massenspektrometrischen Analyse aufgearbeitet (s. Kap. 2.2.5). Die Analyse der Lipide erfolgte in Kooperation mit Prof. Burkhard Kleuser, Institut für Ernährungswissenschaft, Universität Potsdam. Die Lipidanalysen zeigten, dass die Ceramidmenge (Cer16–24) in Fraktion zwei 2 h p.i. um das Siebenfache im Vergleich mit den nicht-infizierten Kontrollproben erhöht war (Kontrollzellen: 10,32 pmol/Probe; HBMEC 2 h p.i.: 70,96 pmol/Probe). Die Sphingomyelinmenge (SM16–24) blieb nahezu unbeeinflusst. (Kontrollzellen: 1098,6 pmol/Probe; HBMEC 2 h p.i.: 977,75 pmol/Probe) (s. Abb. 3.5.1 B). Darüber hinaus wurde auch die CD44-Menge in der Fraktion zwei bestimmt. Dazu wurden die Proben verwendet, mit denen das Flotillin-1 detektiert worden war (s. Abb. 3.5.1 B). In den Zellen, die für 2 h infiziert wurden, konnte kein CD44 in der Fraktion zwei nachgewiesen werden. Die Kontrollproben und die infizierten HBMEC unterschieden sich nicht in der Gesamtmenge des CD44, sodass die Differenz der CD44-Menge in den Fraktionen zwei nicht auf verschiedene CD44-Mengen in den einzelnen Proben zurückzuführen war. Neben dem Anstieg des Ceramid-Anteils in der *lipid raft* Fraktion konnte, wie schon in vorrausgegangenen Versuchen, ein Anstieg der Ceramide an der Zelloberfläche 2 h p.i. beobachtet werden. Der Einfluss der Infektion von HBMEC mit *N. meningitidis* auf die ERM-CD44-Interaktion wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie verdeutlicht. Es zeigten sich eine vermehrte Kolo-kalisation von CD44 und Proteinen der Ezrin-Familie im Verlauf der Infektion (s. Abb. 3.5.1 D). Während bei den Kontroll-Zellen die ERM-Proteine noch relativ diffus in der Zelle verteilt waren, kam es während der Infektion mit *Nm* MC58 zu einer Akkumulation von phosphorylierten ERM-Proteinen, welche mit CD44 kolo-kalisiert. Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse konnte unter Verwendung einer bakteriellen Sphingomyelinase (bSM) reproduziert werden (s. Anhang, Abb. 6.6).

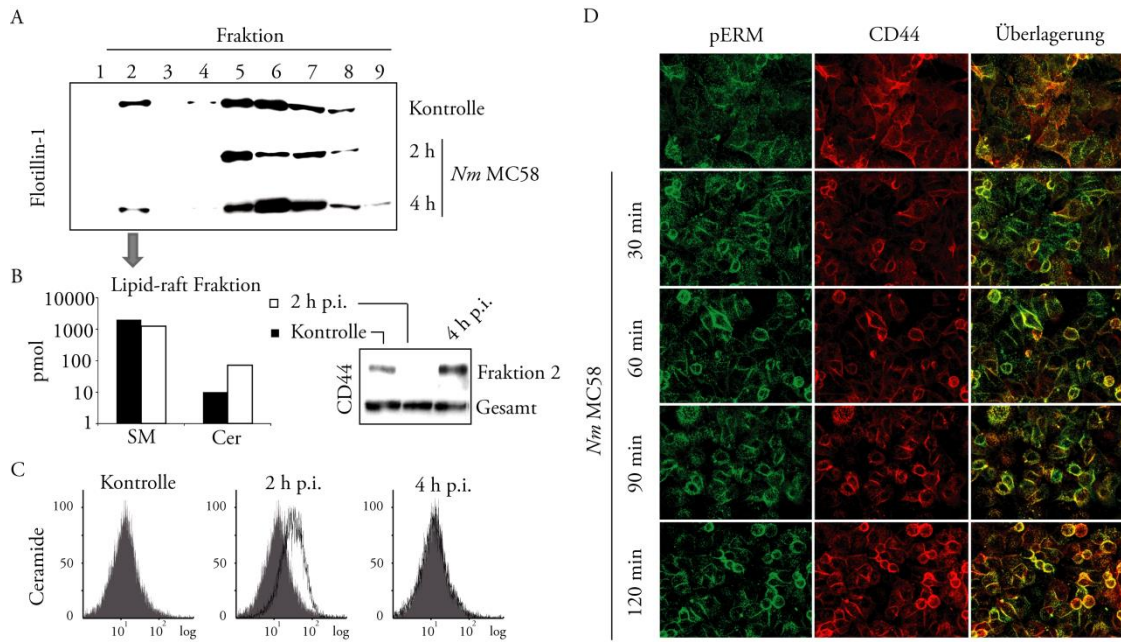


Abb. 3.5.1 Einfluss der Infektion von *N. meningitidis* auf die *lipid raft* Fraktion und die Kolokalisation von phosphorylierten ERM Proteinen und CD44

Gezeigt wird der Flotillin-1-Nachweis in Proben, welche mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt wurden. HBMEC wurden für 2 h bzw. 4 h mit dem SgB-Isolat MC58 mit einer MOI von 10 infiziert und anschließend für die Dichtegradientenzentrifugation aufbereitet. Nach der Zentrifugation erfolgten die Auftrennung der Proben in neun Fraktionen und der Flotillin-1-Nachweis mittels Western Blot (A). Weiterhin wurden die *lipid raft*-Fraktion massenspektrometrisch untersucht (B). Gemessen wurden die Ceramid- (Cer) und Sphingomyelin (SM)-Konzentration von HBMEC 2 h p.i. (weiße Balken) und nicht-infizierten Zellen (schwarze Balken). Neben der Lipidanalyse der Fraktion zwei erfolgte die Messung der CD44-Proteinmenge mittels Western Blot. Dazu wurde CD44 in der Fraktion zwei von Kontrollzellen sowie von Zellen 2 h und 4 h p.i. detektiert und in Vergleich zur Gesamt-CD44-Menge aller Fraktionen gesetzt (B). Als Kontrolle wurde weiterhin die Veränderung der Ceramidmenge an der Zelloberfläche von HBMEC mittels Durchflusszytometrie gemessen (C). Für die immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen wurden Zellen zu definierten Zeitpunkten mit dem *Nm* SgB-Isolat MC58 infiziert. Als Kontrolle dienten HBMEC, welche nur mit RPMI inkubiert wurden. Nachdem die Zellen milde permeabilisiert worden waren, wurden die phosphorylierten ERM-Proteine (grün) mit einem spezifischen polyklonalen Kaninchen-Antikörper und einem Alexa488-gekoppelten Kaninchen-spezifischen sekundären Antikörper dargestellt. CD44 (rot) wurde mit einem monoklonalen Maus-Antikörper sowie einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper markiert. Eine Darstellung der Bakterien erfolgte nicht. Dargestellt sind jeweils repräsentative Versuche.

3.6 Verschiedene *N. meningitidis* Isolate unterscheiden sich in der Aktivierung des ASM/Ceramid-Systems.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welche bakteriellen Faktoren zur Aktivierung der ASM beitragen bzw. ob Meningokokken unterschiedlicher klonaler Komplexe sich hinsichtlich der Aktivierung unterscheiden. Hierzu wurden sieben weitere Isolate ausgewählt und getestet. Dabei wurde insbesondere eine Auswahl anhand der klonalen Komplexe getroffen, da sich die klinische Krankheitsausprägung unter diesen unterscheiden kann. So führt eine Infektion mit Isolaten des ST-32 cc v.a. zu einer Meningitis, während Isolate des ST-11/8 cc überwiegend ein septisches Krankheitsbild hervorrufen [39; 40; 41; 42]. Vorangegangene Genomanalysen zeigten weiterhin, dass sich die ausgewählten Isolate u.a. hinsichtlich ihrer Virulenzfaktor-Gene unterscheiden [164].

Isolat	Sg	ST	CC	Ursprung
MC58	B	74	32	IMD, UK, 1983
DE6894	B	32	32	IMD, D, 2000
DE7901	B	18	18	IMD, D, 2001
$\alpha 4$	B	19	18	NTI, D, 1999
WUE2121	C	11	11	IMD, D, 1997
DE7017	C	11	11	IMD, D, 2000
FAM18	C	11	11	IMD, USA, 1980
DE6904	C	8	8	IMD, D, 2002

Abb. 3.6.1 Übersicht über die getesteten *N. meningitidis*-Isolate

Sg = Serogruppe, ST = Sequenz-Typ, CC = Klonaler Komplex, IMD = Invasive Meningokokkenerkrankung, NTI = Nasopharyngeales Trägerisolat.

3.6.1 Der Einfluss der ASM-Aktivität auf die Invasion verschiedener *N. meningitidis* Isolate in HBMEC

Um den Einfluss der ASM auf die Invasion von verschiedenen *Nm*-Isolaten zu überprüfen, wurden zuerst Gentamicin-Protektionsassays mit und ohne Zugabe von Amitriptylin

durchgeführt (s. Kap. 2.2.3). Getestet wurden die SgB-Isolate DE6894, DE7901, $\alpha 4$ und die SgC-Isolate WUE2121, FAM18, DE7017 und DE6904. Als Kontrolle diente das SgB-Isolat MC58. Die Versuche wurden wie schon in Kap. 3.1.1 beschrieben durchgeführt. Zuerst erfolgte ein Vergleich der Invasivität der Isolate im Verhältnis zu dem Isolat MC58 (s. Abb. 3.6.2). Für das Isolat *Nm* DE6894 konnte eine leicht stärkere Invasivität mit einer Steigerung auf 125% im Vergleich mit dem *Nm* MC58 Isolat festgestellt werden. Bei allen anderen getesteten Isolaten war die Anzahl der intrazellulären Bakterien signifikant geringer. Am niedrigsten war deren Anteil bei den Isolaten $\alpha 4$ und WUE2121 mit einer auf ca. 2% reduzierten Invasivität im Vergleich mit dem Isolat MC58. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Isolaten in der Adhärenz konnte nicht festgestellt werden (s. Abb. 3.6.3 B).

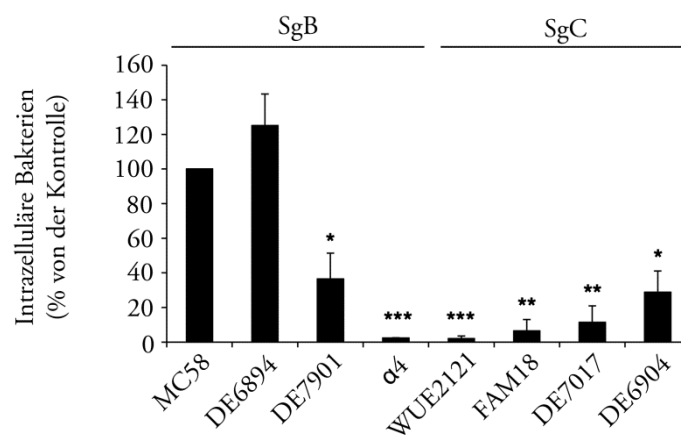


Abb. 3.6.2 Invasivität verschiedener *N. meningitidis* Isolate im Vergleich mit dem SgB-Isolat MC58

HBMEC wurden mit verschiedenen *Nm*-Isolaten für 4 h infiziert und die Anzahl intrazellulärer Bakterien anschließend mit Hilfe von Gentamicin-Protektionassays bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. Die Anzahl der intrazellulären Bakterien der verschiedenen Isolate wurde ins Verhältnis zu der Anzahl der intrazellulären Bakterien des Isolates MC58 gesetzt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Bei den Inhibitorversuchen mit Amitriptylin konnte beobachtet werden, dass nur bei dem SgB-Isolat MC58 die Invasivität durch die Zugabe von Amitriptylin (weiße Balken) signifikant reduziert werden konnte. Zur Kontrolle dienten jeweils infizierte Zellen, welche

nicht mit Amitriptylin vorbehandelt worden waren (schwarze Balken) (s. Abb. 3.6.3 A). Weiterhin erfolgte die Auswertung der Adhärenz der Isolate. Hier konnte bei keinem Isolat eine signifikante Veränderung der Adhärenz, durch die Vorbehandlung der Zellen mit Amitriptylin festgestellt werden. (s. Abb. 3.6.3 B).

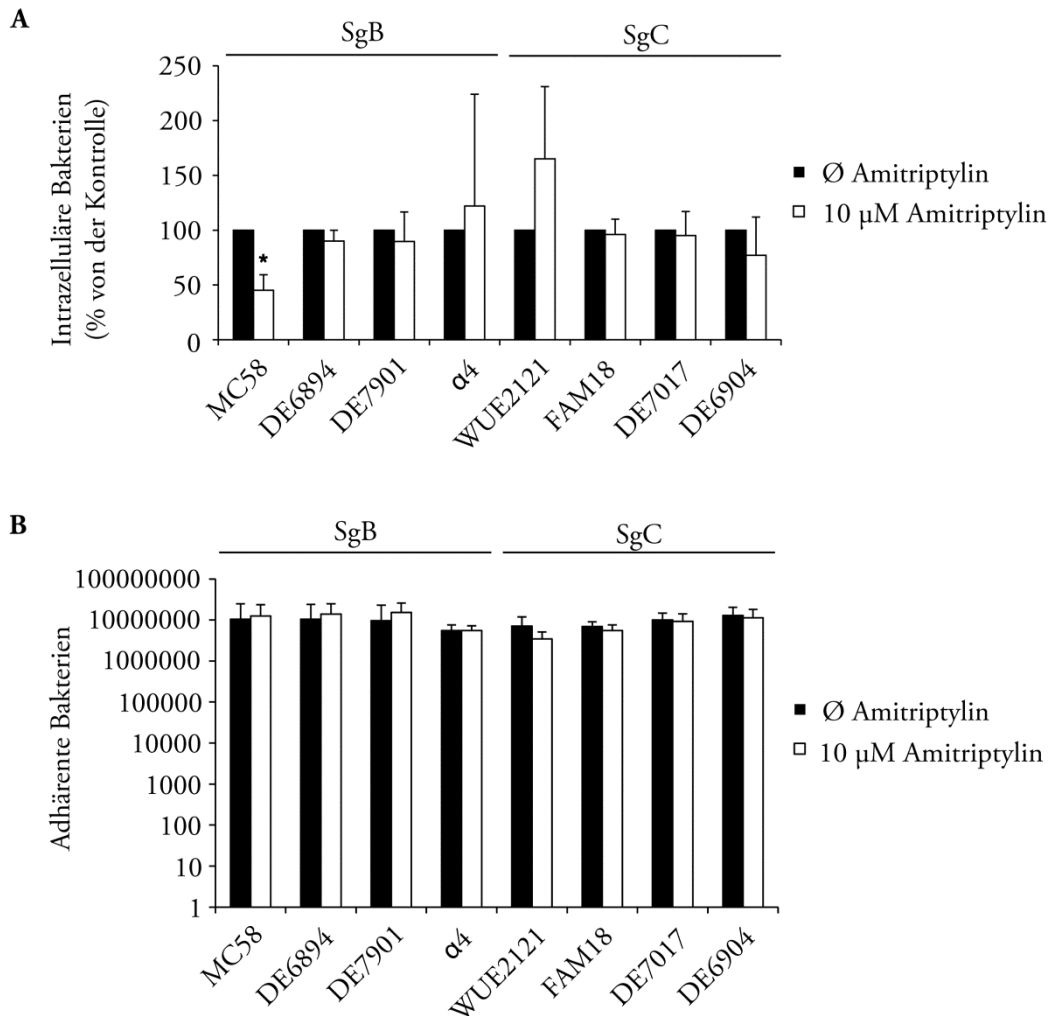


Abb. 3.6.3 Einfluss von Amitriptylin auf die Invasivität verschiedener *N. meningitidis*-Isolate

HBMEC wurden 1 h vor der Infektion mit verschiedenen *Nm*-Isolaten mit 10 µM Amitriptylin (weiße Balken) bzw. nur mit Zellkulturmedium (schwarze Balken) inkubiert. Nach 4 h p.i. erfolgte die Auswertung mittels Gentamicin-Protektionsassay. Neben den intrazellulären Bakterien (A) wurde der Einfluss von Amitriptylin auf die Adhärenz untersucht (B). Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen.

* $p < 0,05$.

3.6.2 Vergleich verschiedener *N. meningitidis* Isolate in ihrer Fähigkeit zur Ceramid-Induktion und Enzymaktivierung

Da die Inhibition der ASM keinen Einfluss auf die Invasion der verschiedenen *Nm*-Isolate zeigte, wurde im nächsten Schritt zunächst untersucht, ob diese Isolate zu einer gesteigerten ASM-Aktivierung in HBMEC führen. Zuerst wurde die ASM Aktivierung der getesteten SgC-Isolate im Vergleich mit dem Isolat MC58 und dessen unbekapselten Mutante MC58 *siaD* gemessen. Dafür wurden HBMEC mit einer MOI von 10 für 2 h infiziert und anschließend wurde die ASM-Aktivität bestimmt. Es konnte eine signifikant geringere Aktivierung der SgC-Isolate im Vergleich mit den beiden SgB-Isolaten festgestellt werden (s. Abb. 3.6.4).

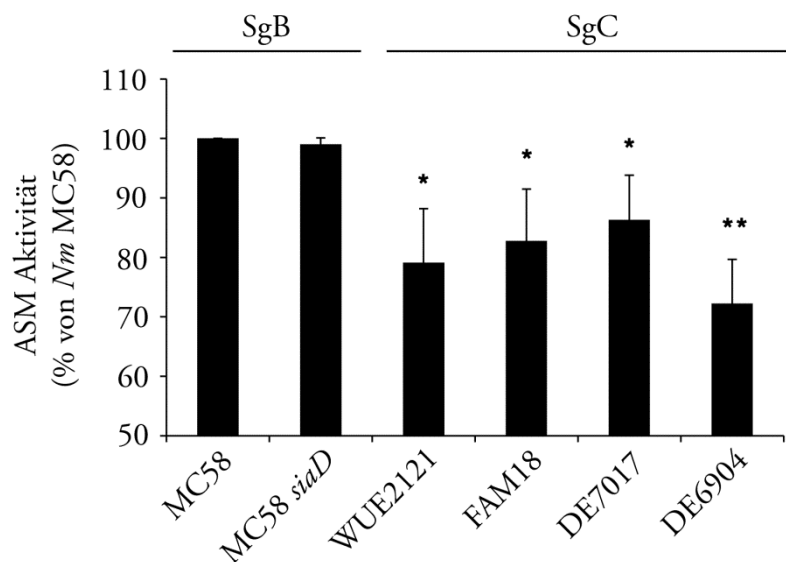


Abb. 3.6.4 Aktivität der sauren Sphingomyelinase in HBMEC bei der Infektion mit verschiedenen SgC-Isolaten

Gemessen wurde die Enzymaktivität der ASM in HBMEC 2 h p.i.. HBMEC wurden mit verschiedenen SgC-Isolaten sowie dem SgB-Isolat MC58 und dessen unbekapselter Mutante *Nm* MC58 *siaD* infiziert. Die Auswertung der Enzymaktivität erfolgte in Bezug auf die Enzymaktivität bei der Infektion mit dem Isolat MC58. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Um Unterschiede bei der Bildung von Ceramiden in der Zellmembran zwischen verschiedenen Isolaten zu erfassen, erfolgte die Infektion von HBMEC mit den verschiedenen Isolaten und anschließend wurde die Veränderung des Ceramid-Anteils an deren Oberfläche im Vergleich mit den nicht-infizierten Kontrollzellen bzw. im Vergleich mit dem Isolat MC58 gemessen. Bei allen getesteten Isolaten konnte ein signifikant geringerer Ceramidanteil an der Zelloberfläche im Vergleich mit dem Isolat MC58 festgestellt werden (s. Abb. 3.6.5 A). Um eine mögliche veränderte Kinetik der Ceramid-Produktion auszuschließen, wurde bei dem Isolat DE6894 zusätzlich eine Messung an vier Zeitpunkten durchgeführt. Als Kontrolle dienten HBMEC, welche nur mit RPMI inkubiert wurden. Als Referenz diente das Isolat MC58. Es konnte keine signifikante Steigerung der Ceramidmenge an der Zelloberfläche im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollen festgestellt werden. In Relation zu dem Isolat MC58 bildete das Isolat DE6894 nach 1 h, 2 h und 3 h p.i. signifikant weniger Ceramide (s. Abb. 3.6.5 B). Die Darstellung von Ceramiden an der Zelloberfläche wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Die Färbung der Bakterien erfolgte durch die Markierung dieser mit FITC vor der Infektion. Die anschließende Infektion erfolgte mit einer MOI von 30 für 2h. Nach der Fixierung der Präparate, wurden die Ceramide mit einem primären Maus-Antikörper und mit einem Cy3-gekoppelten Antikörper markiert. Bei den nicht-infizierten Kontrollzellen zeigte sich eine diffuse Verteilung der Ceramide an der Zelloberfläche. Dagegen akkumulierten bei dem SgB-Isolat MC58 die Ceramide in der Nähe von zelladhärenten Bakterien und bildeten Ceramid-reiche Membrandomänen. Bei den anderen getesteten Isolaten konnte eine Clusterbildung nicht festgestellt werden. Stattdessen kam zu einer diffusen Verteilung der Ceramide auf der Zelloberfläche ähnlich wie bei den Kontrollzellen (s. Abb. 3.6.6).

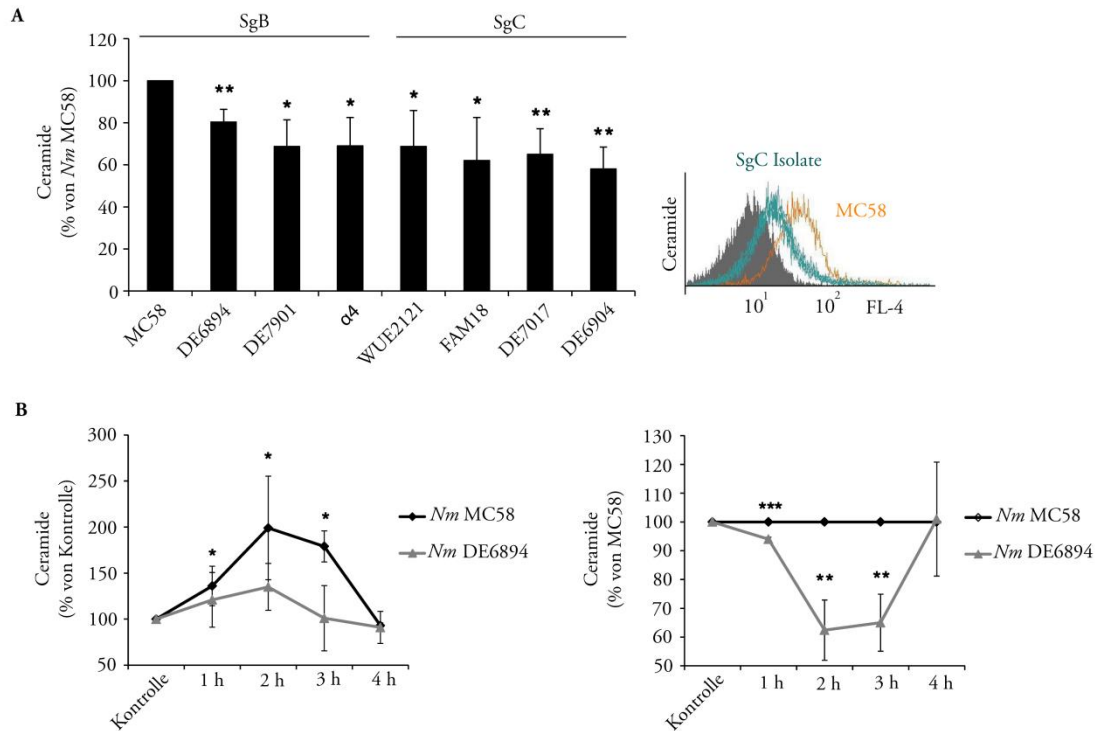


Abb. 3.6.5 Vergleich des Ceramid-Anteils an der Zelloberfläche bei der Infektion von HBMEC mit verschiedenen *N. meningitidis* Isolaten

Gemessen wurde der Ceramid-Anteil an der Zelloberfläche 2 h p.i. bei verschiedenen Isolaten im Vergleich mit dem Isolat MC58. Gezeigt wird neben der Auswertung von drei unabhängigen Versuchen das Histogramm eines exemplarischen Versuchs mit Überlagerung der gemessenen Signale für die SgC-Isolate (blaue Linie) im Vergleich zum Isolat MC58 (orange Linie), sowie einer Isotypenkontrolle (grau gefülltes Histogramm). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (A). Weiterhin wurden die beiden Isolate DE6894 und MC58 zu nicht-infizierten Kontrollzellen, sowie untereinander verglichen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (B).

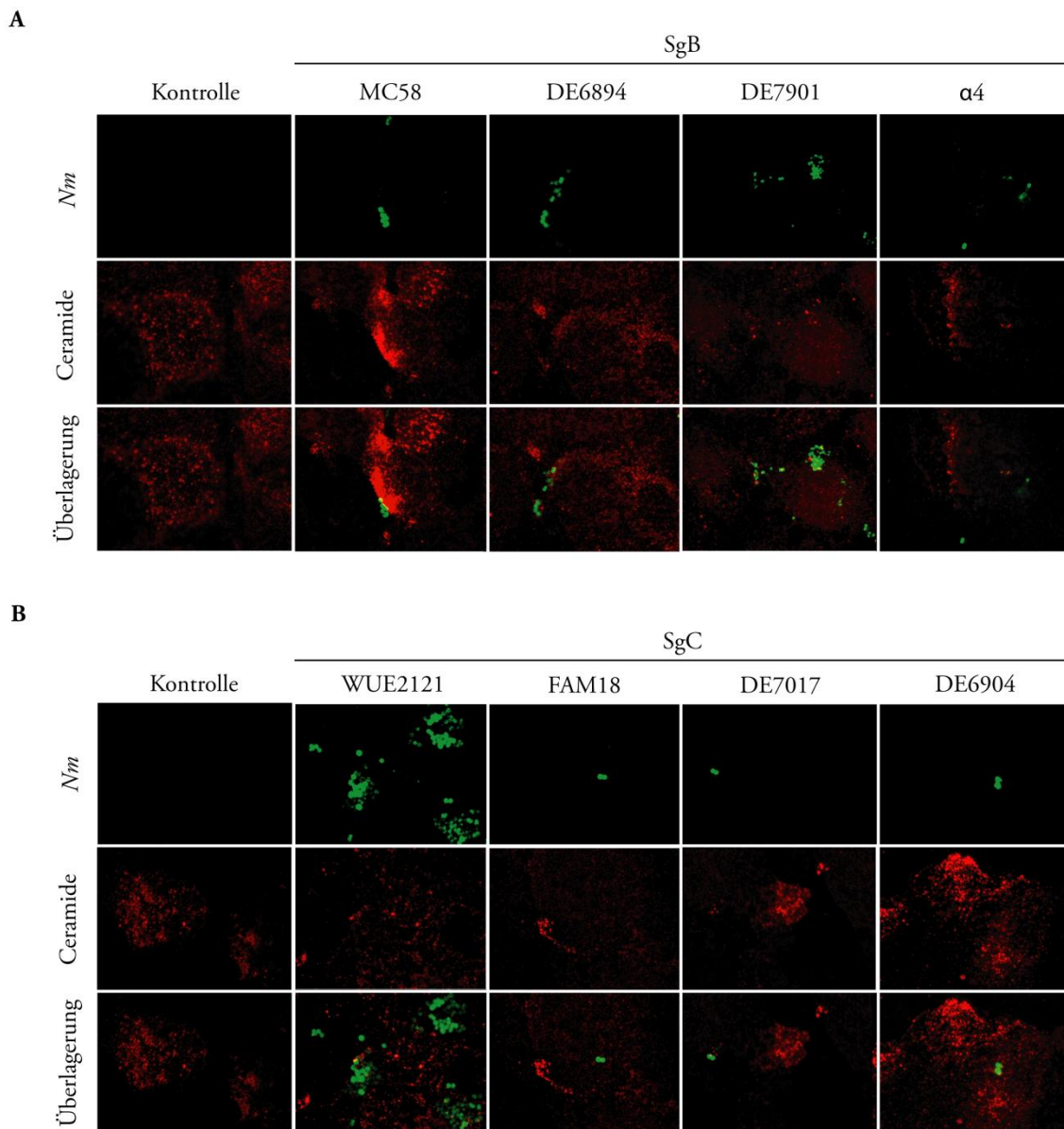


Abb. 3.6.6 Darstellung Ceramid-reicher Membrandomänen bei der Infektion mit verschiedenen *N. meningitidis* Isolaten

Getestet wurden verschiedene SgB- (A) und SgC-Isolate (B). Als Kontrolle dienten nicht-infizierte HBMEC. Dargestellt wurden FITC-markierte Bakterien (grün) und Ceramide (rot). Die Ceramid-Markierung erfolgte wie zuvor beschrieben. Die gezeigten Aufnahmen sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche.

3.6.3 Untersuchung der Expression verschiedener Virulenzfaktoren

In den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich die verschiedenen Isolate nicht nur in ihrer Fähigkeit unterscheiden das ASM/Ceramidsystem zu aktivieren, sondern auch in ihrer Invasivität. Ursächlich für diese sind u.a. Virulenzfaktoren, welche von den Bakterien exprimiert werden und maßgeblich an der Pathogenität der Meningokokken beteiligt sind. Da möglicherweise verschiedene Virulenzfaktoren für die unterschiedliche Aktivierung der ASM, der Ceramidproduktion und der Invasivität verantwortlich sind, war das nächste Ziel, die getesteten Isolate hinsichtlich ihrer Expression von Virulenzfaktoren zu untersuchen. Daher erfolgte die Analyse der Genexpression auf Proteinebene mit Hilfe von Western Blot-Versuchen (s. Kap. 2.3.20). Getestet wurden die Virulenzfaktoren Opc, Opa, NarE und NadA. Als Negativ-Kontrolle dienten jeweils Isolate, bei denen gezielt das jeweilige Virulenzgen ausgeschaltet wurde. Ein Nachweis des Transmembranproteins Opc konnte nur bei dem Isolat MC58 festgestellt werden, obwohl auch die Isolate DE6894 und DE6904 nach Genomanalysen das *opc*-Gen besitzen (s. Abb. 3.6.7 A) [164]. Die Detektion des Opc-Proteins erfolgte bei 27 kDa. Opa konnte bei allen Isolaten nachgewiesen werden (s. Abb. 3.6.7 B). Die ADP-Ribosyltransferase NarE konnte bei dem Isolat MC58 und in geringeren Mengen bei dem Isolat DE6894 nachgewiesen werden (s. Abb. 3.6.7 C) [189]. Das Adhäsिन NadA wurde von den Isolaten DE7017 und FAM18 exprimiert. Die Isolate MC58, DE6894 und WUE2121 exprimierten dieses Protein trotz vorhandenen Gens nicht, da es in diesen Stämmen unter der Kontrolle des Transkriptionsregulator FarR liegt. Die Ausschaltung dieses Transkriptionsregulators führt zu einer verstärkten Expression des NadA-Proteins [190]. Als Positiv-Kontrolle für die NadA-Expression diene daher eine Deletionsmutante des Isolats MC58 mit einer Deletion im *farR*-Gen (s. Abb. 3.6.7 D).

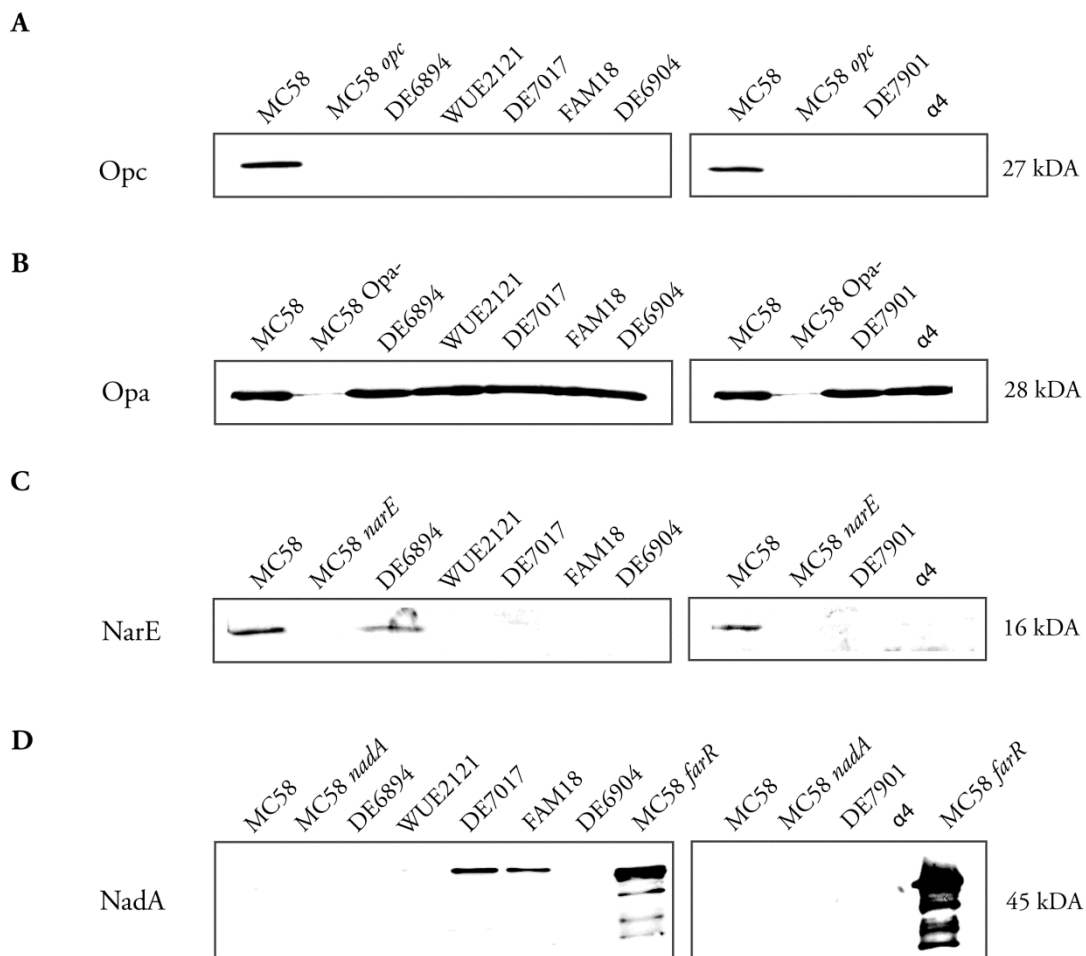


Abb. 3.6.7 Expression verschiedener Virulenzfaktoren der getesteten *N. meningitidis* Isolate

Während das Außenmembranprotein OpC nur von dem Isolat MC58 exprimiert wird, können OpA-Proteine bei allen verwendeten Isolaten nachgewiesen werden. Die ADP-Ribosyltransferase NarE kann bei dem Isolat MC58 und DE6894 nachgewiesen werden, NadA bei den SgC-Isolaten DE7017 und FAM18. Als Positivkontrolle bei der NadA-Expression diente eine Deletionsmutante des Isolats MC58 mit einer Deletion im Transkriptionsregulator-Gen *farR*.

3.6.4 Analyse der OpC-Expression des Isolates DE6894

Genanalysen der Isolate ergaben, dass die Isolate MC58, DE6894 und DE6904 ein *opc*-Gen besitzen, jedoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nur *Nm* MC58 das OpC-Protein auch exprimiert (s. Kap. 3.6.3) [164]. Dieser Sachverhalt wurde im Rahmen dieser Arbeit noch weiter analysiert. Neben Colony-Blot Analysen des Isolates MC58 und

DE6894 zum Nachweis von Opc-Proteinen (s. Anhang, Abb. 6.8), erfolgte die Sequenzierung der Promoterregion des *opc*-Gens. Die Expression des Opc-Proteins von *N. meningitidis* unterliegt unter anderem der Kontrolle des Promoters, welcher in Abhängigkeit von einer variablen Anzahl an Cytidin-Nukleotiden die Expression steuert. Bei einer Anzahl von 12 oder 13 Cytidin-Nukleotiden erfolgt eine suffiziente Expression des *opc*-Gens. Die Expression variiert bei einer Anzahl von 11 oder 14 Cytidin-Nukleotide und erfolgt nicht mehr bei einer niedrigeren oder höheren Anzahl [60]. Um zu überprüfen, ob die Phasenvariation des Opc bei den Isolaten durch diesen transkriptionalen Regulationsmechanismus bedingt war, wurde eine Sequenzierung dieser speziellen Promoterregion durchgeführt. Sie ergab, dass das Isolat DE6904 eine größere Deletion im Bereich des *opc*-Gen besitzt und die Angaben in den Genanalysen auf einen Hybridisierungsfehler zurückzuführen sind. Für das Isolat MC58 konnten 12 Cytidin-Nukleotide nachgewiesen werden. Dies entsprach einer effizienten Expression, wie es auch in den Western Blot- und Colony Blot-Analysen gezeigt werden konnte. Bei der Sequenzierung des Isolates DE6894 konnte eine repetitive Sequenz mit 10 Cytidin-Nukleotiden in der Promoterregion nachgewiesen werden, welche die Expression des *opc*-Gens verhinderte (s. Abb. 3.6.8).

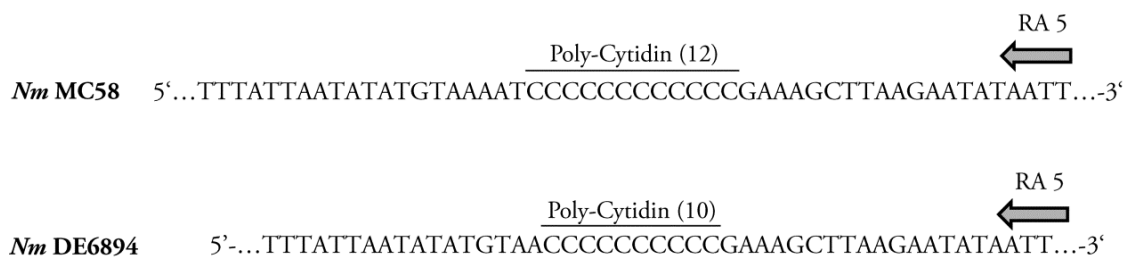


Abb. 3.6.8 Poly-Cytidin-Länge der Isolate MC58 und DE6894

Ausschnitt aus der DNA-Sequenz der Promoterregion des *opc*-Gens. Hierfür wurden die *Nm*-Isolate MC58 und DE6894 auf Blutagarplatten angezogen, DNA extrahiert und mittels PCR die Promoterregion amplifiziert. Anschließend erfolgte die Sequenzierung des amplifizierten Gen-Abschnittes zur Untersuchung der Poly-Cytidin Region.

3.7 Das Außenmembranprotein Opc spielt eine maßgebliche Rolle bei der Aktivierung des ASM/Ceramid-Systems.

Um die Rolle des Außenmembranproteins Opc bei der Aktivierung der ASM und nachfolgender Generierung von Ceramiden zu bestätigen, wurden isogene, Opc-defiziente Mutanten des Wildtypisolates MC58 sowie des unbekapselten Isolates MC58 *siaD* getestet. Neben der Testung dieser Mutanten mit *loss-of-function*-Mutationen wurde im Umkehrschluss zur Kontrolle eine *gain-of-function*-Mutation durchgeführt. Dafür wurde Opc rekombinant in einen *E. coli* Stamm exprimiert und der Einfluss dieser Mutation auf die Invasivität und das Ceramid/ASM-System im Vergleich mit dem Wildtyp *E. coli*-Stamm getestet.

3.7.1 Infektion von HBMEC mit Opc-defizienten, isogenen Mutanten des Isolates MC58

Für die Versuche wurden drei verschiedene isogene Mutanten des Isolates MC58 verwendet. Neben dem unbekapselten Isolat MC58 *siaD* wurden die zwei Mutanten MC58 *opc* und MC58 *siaD, opc* gewählt, welche kein Opc-Protein exprimieren. In einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die unbekapselte Mutante MC58 *siaD* invasiver ist als der Wildtyp MC58, es jedoch bei beiden zu einer Verringerung der Invasivität kommt bei fehlendem Opc Protein [83]. Zuerst wurde die Veränderung des Ceramidanteils an der Zelloberfläche von HBMEC bei der Infektion mit den verschiedenen Isolaten untersucht. Im Vergleich mit dem Wildtyp Isolat MC58 konnte bei der unbekapselten Mutante MC58 *siaD* eine signifikantere Steigerung der Ceramidmenge um 10% festgestellt werden (s. Abb. 3.7.1 A) und die Infektion mit Opc-Mutanten führte zu einer deutlich geringeren Detektion von Ceramiden auf der Zelloberfläche von HBMEC (s. Abb. 3.7.1 A/B). Daneben wurde auch die sich an der Oberfläche befindliche ASM gemessen. Verglichen wurden, wie schon zuvor, jeweils MC58 mit MC58 *opc* sowie die unbekapselte Mutante MC58 *siaD* mit MC58 *siaD opc*. Bei beiden Opc-Mutanten konnten signifikant geringere ASM-Mengen 2 h p.i. detektiert werden (s. Abb. 3.7.1 C).

Passend dazu konnte eine um ca. 50% verringerte ASM-Aktivität in HBMEC bei der Infektion mit den *Opc*-Mutanten im Vergleich mit den *Opc* exprimierenden Isolaten festgestellt werden. (s. Abb. 3.7.1 D)

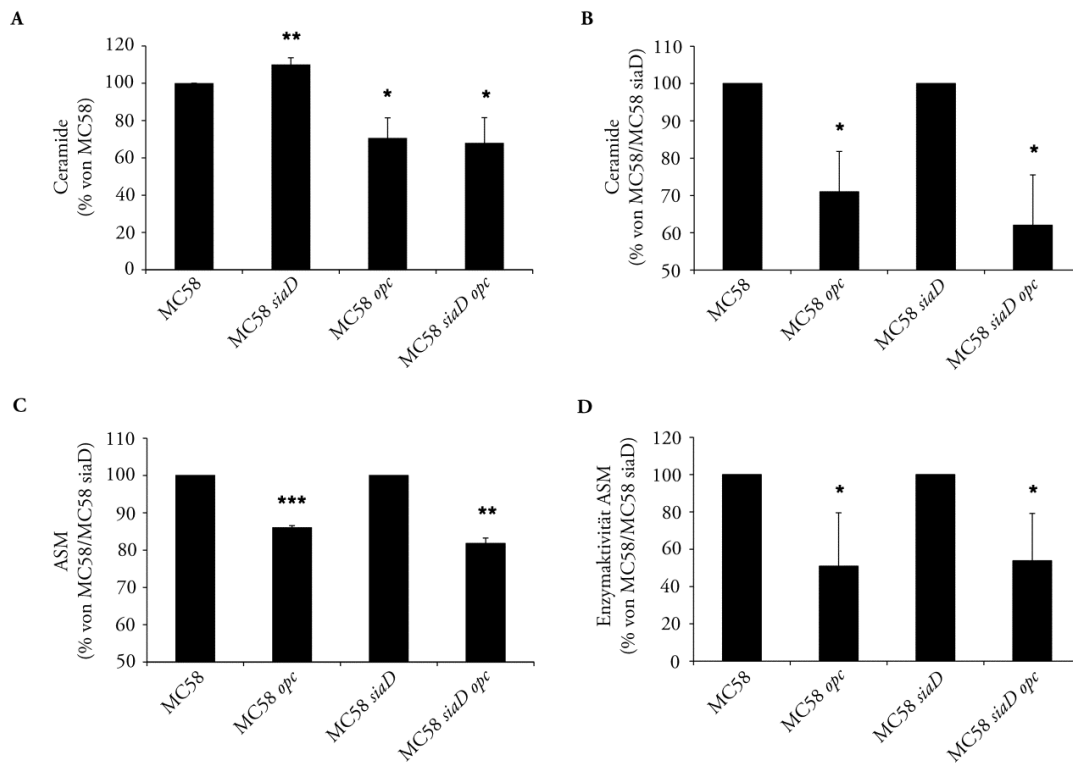


Abb. 3.7.1 Einfluss des *Opc*-Proteins auf das ASM/Ceramidsystem

HBMEC wurden mit dem Wildtypisolat MC58, sowie verschiedenen Kapsel- bzw. *opc*-defizienten Isolaten mit einer MOI von 10 für 2 h infiziert. Neben der Analyse des Ceramid- (A,B) und ASM-Gehalt (C) der Zellmembran von intakten Zellen mittels Durchflusszytometrie, erfolgte die Bestimmung der ASM-Aktivität aus Zellysate (D). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.7.2 Herstellung eines rekombinant *Opc*-exprimierenden *E. coli*

In den vorherigen Versuchen wurde der Einfluss des *Opc* durch Verwendung von *knock-out* Isolaten, d.h. Isolaten bei denen gezielt das *opc*-Gen ausgeschaltet wurde, untersucht. Darüber hinaus kann durch die Einbringung des Gens in einen anderen Organismus, welcher dieses Gen nicht besitzt, der Einfluss dieses Genes bzw. dessen Produkt untersucht werden. Die Einbringung des Gens erfolgt dabei mit einem Vektor, z.B. in Form eines

Plasmids. Um zu zeigen, dass das Protein Opc einen maßgeblichen Anteil an der Aktivierung der ASM und der Ceramidinduktion hat, erfolgte daher die Einbringung des *opc*-Gens in einen *E. coli* Stamm. Zur Amplifikation des *opc*-Gens wurden die Primer OpcA-MC58 *sense* und OpcA-MC58 *antisense* (s. Abb. 3.7.2) verwendet.

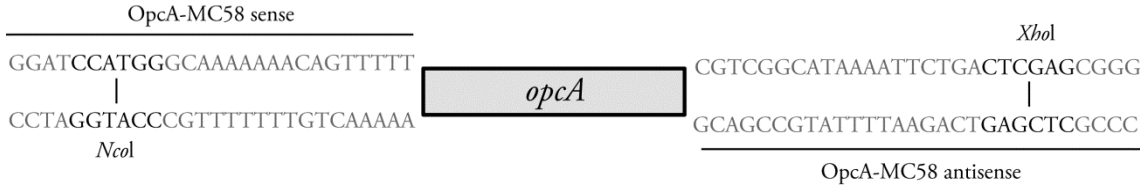


Abb. 3.7.2 Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *XhoI* im *opc*-Gen

Identische Schnittstellen des *opc*-Gens und des Vektors erlauben die Ligation und damit die Integration des Gens in das Plasmid.

Die PCR-Produkte wurden mittels Restriktion (*NcoI* und *XhoI*) in den prokaryontischen Expressionsvektor pET28 a(+) unter Kontrolle des lac-Promotors kloniert und anschließend mittels Sequenzierung verifiziert. Für die Expression des rekombinanten Opc-Proteins wurde der Protease-defiziente *E. coli*-Expressionsstamm BL21 D3 verwendet.

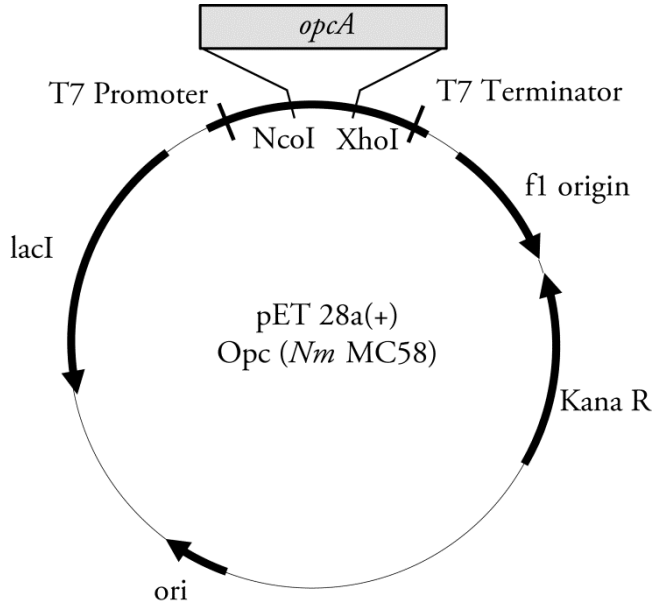


Abb. 3.7.3 Verwendeter pET 28a(+)-Vektor mit integriertem *opcA*-Gen

Die Expressionseffizienz des eingebrachten *opc*-Gens wurde mittels Western Blot überprüft (s. Abb. 3.7.4 F). Ein Proteinnachweis gelang sowohl in induzierten als auch in nicht induzierten *E. coli*. Eine Präsentation des Opc-Proteins an der Zelloberfläche wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft und bestätigt (Daten hier nicht gezeigt; [170]).

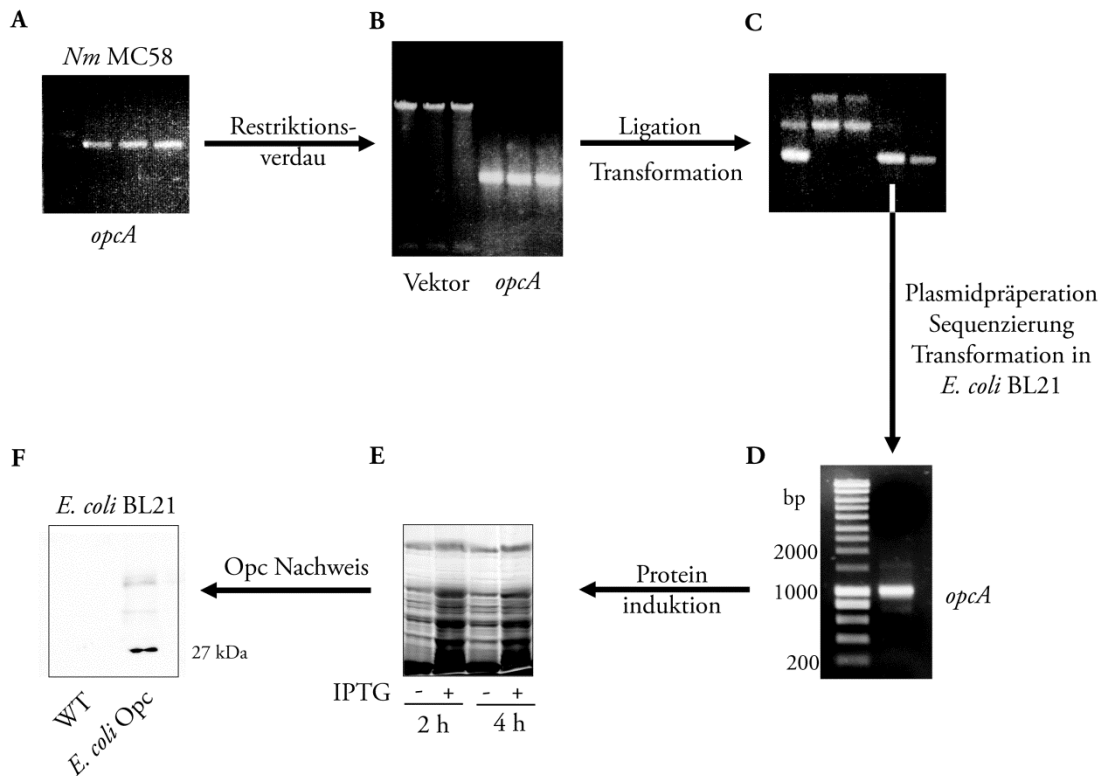


Abb. 3.7.4 Übersicht zur Herstellung eines Opc-exprimierenden *E. coli*

Nachdem das *opcA*-Gen aus der genomischen DNA von *N. meningitidis* gewonnen worden war (A), erfolgte der Restriktionsverdauung des *opcA*-Genabschnitts und des Plasmides (B), sodass eine Ligation, d.h. die Integration des Gens in das Plasmid, möglich war. Das erzeugte Plasmid wurde anschließend in einen kompetenten *E. coli*-Stamm transformiert und die Sequenz überprüft (C). Nach der fehlerfreien Integration des *opcA*-Gens in den Vektor und die Transformation in einen kompetenten *E. coli* BL21-Stamm (D), konnte mit Hilfe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) die Proteinexpression induziert werden (E). Die Überprüfung der Opc-Expression erfolgte mittels Western Blot-Analysen (F).

3.7.3 Analyse des Einflusses eines rekombinanten Opc auf die Invasivität und Aktivierung des ASM/Ceramid-Systems bei der Infektion von HBMEC mit *E. coli*

Nachdem ein Opc-exprimierender *E. coli* hergestellt worden war, erfolgte der Vergleich mit dem *E. coli* BL21-Isolat in dem verwendeten Infektionsmodell. Dafür wurden zuerst HBMEC mit einer MOI von 30 für 2 h und mit einer MOI von 10 für 4 h mit den entsprechenden Isolaten infiziert. Anschließend wurde die Invasivität/Adhärenz (s. Kap. 2.2.3), die Ceramidproduktion (s. Kap. 2.2.6) und die ASM-Aktivität analysiert (s. Kap. 2.2.4). Der rekombinant Opc-exprimierende *E. coli* Stamm zeigte eine Steigerung der Invasivität auf 1014% nach 2 h und auf 2040% nach 4 h bei keinem signifikanten Unterschied in der Adhärenz bei den beiden Stämmen (s. Abb. 3.7.5 A,B). Analysen des Ceramidanteils an der Oberfläche von HBMEC während der Infektion zeigten, dass es zu einer signifikanten Steigerung der Ceramidmenge um 120% nach 2 h und 126% nach 4 h p.i. bei der Infektion mit dem Isolat *E. coli* BL21 Opc kam (s. Abb. 3.7.6 A,B). Ähnliches konnte bei der Messung der ASM-Aktivität beobachtet werden. Es konnte eine Steigerung der ASM-Aktivität 2 h p.i. auf 122% bei der Infektion mit Opc-exprimierenden *E. coli* im Vergleich mit dem *E. coli* BL21-Isolat beobachtet werden (s. Abb. 3.7.6 C).

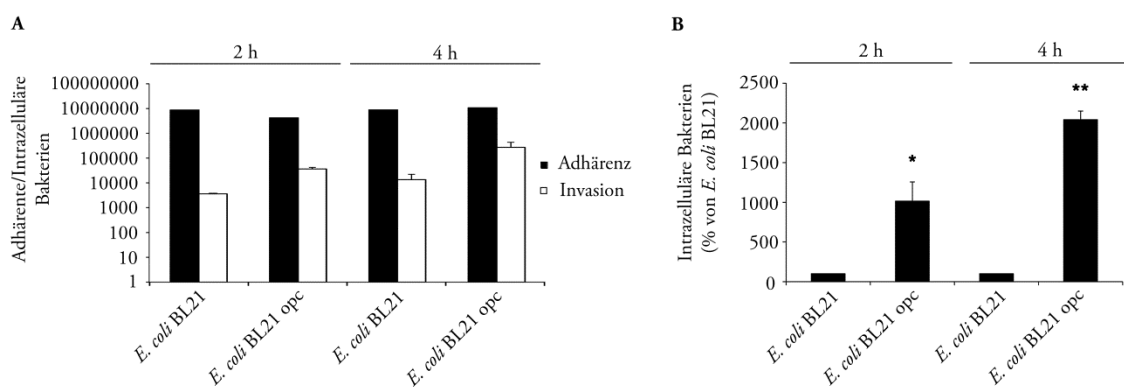


Abb. 3.7.5: Einfluss eines rekombinant exprimiertes Opc-Proteins auf die Invasivität von *E. coli*

Für die Analyse der Invasivität wurden HBMEC drei Tage zuvor ausgesät und in 24-well-Zellkulturplatten inkubiert. Die Infektion erfolgte in RPMI, supplementiert mit 10% Humanserum, mit einer MOI von 30 für 2 h und mit einer MOI von 10 für 4 h. Die Anzahl der adhärenen (schwarze Balken) und intrazellulären (weiße Balken) Bakterien erfolgte mit Hilfe von Gentamicin-Protektionsassays. * p<0,05; ** p<0,01.

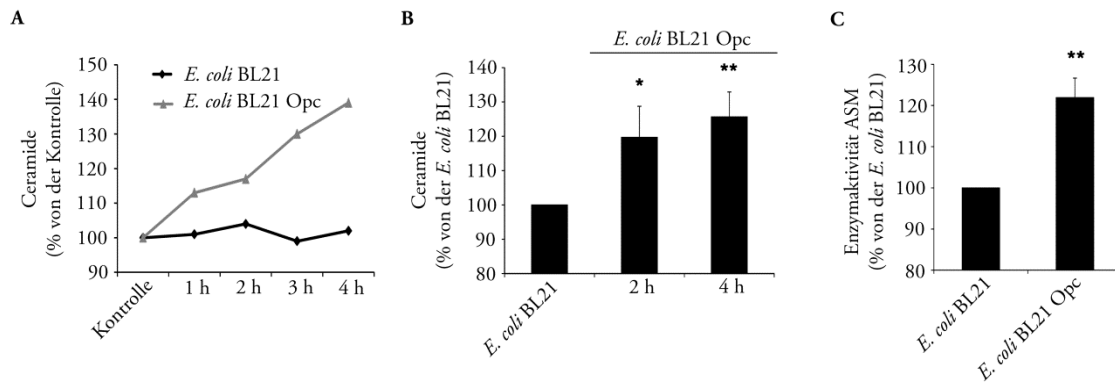


Abb. 3.7.6: Einfluss eines rekombinant exprimiertes Opc-Proteins auf die Ceramidbildung und ASM-Aktivität

Analysen des Ceramidanteils an der Oberfläche von HBMEC während der Infektion wurden mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Dargestellt ist ein exemplarischer Versuch der Ceramidbildung zu verschiedenen Zeitpunkten von *E. coli* BL21 (schwarze Linie) und *E. coli* BL21 Opc (graue Linie) im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen (A). Weiterhin dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen für die Ceramidbildung 2 h und 4 h p.i. von *E. coli* BL21 Opc im Vergleich zu *E. coli* BL21 (B). Aus Zelllysats wurde zudem die ASM-Aktivität 2 h p.i. gemessen und die ASM-Aktivität des Isolates *E. coli* BL21 Opc in Relation zu die des Isolates *E. coli* BL21 gesetzt (C). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4 Diskussion

Die Ceramide sind, wie weitere Sphingolipide auch, an einer Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt. Neben ihrer zentralen Rolle im Sphingolipid-Metabolismus und ihrer Funktion als Signaling-Molekül sind sie darüber hinaus in der Lage, sich zu Membranplattformen zusammenzulagern [128]. Die Synthese der Ceramide ist u.a. durch die Enzymgruppe der Sphingomyelinasen möglich, welche Sphingomyelin zu Ceramiden hydrolysieren. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass verschiedene Pathogene wie z.B. *N. gonorrhoea*, *Pseudomonas aeruginosa* oder das Masernvirus in der Lage sind, die saure Sphingomyelinase (ASM) zu aktivieren [121; 158; 160]. Zentraler Mechanismus scheint dabei die vermehrte Ceramidproduktion mit Ausbildung von Ceramid-reichen Plattformen zu sein. Beispielsweise führt die Infektion von dendritischen Zellen mit dem Masernvirus zu einer gesteigerten Ceramidproduktion mit einer Akkumulation des für die Invasion benötigten CD150-Rezeptors innerhalb von Ceramid-reichen Plattformen [158]. Grassmé et al. (2003) konnten weiterhin zeigen, dass es innerhalb von Ceramid-reichen Plattformen zu einer Aktivierung bzw. Verstärkung von Rezeptorsignalen kommen kann [131]. Die Aktivierung der ASM und die damit verbundene Generation von Ceramid-reichen Membrandomänen scheint dabei ein allgemeiner Mechanismus sein, der bei verschiedensten Erregern eine Rolle spielt und somit auch ein möglicher Pathomechanismus in der Meningokokkeninfektion darstellen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss der ASM und der Ceramide auf die Invasion von Meningokokken in HBMEC untersucht.

4.1 Einfluss der ASM und der Ceramide auf die Invasion von *N. meningitidis* in Gehirndothelzellen

Um die Bedeutung der ASM bzw. der Ceramide für die Meningokokkenpathogenese zu untersuchen, wurde zuerst mit unterschiedlichen Methoden die ASM-Aktivität in HBMEC reduziert und der Einfluss auf die Invasivität von Meningokokken untersucht. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Invasivität des *Nm* Serogruppe-B-Isolates

MC58 durch die Inhibition der ASM zu einer verringerten Aufnahme des Erregers in Gehirndothelzellen führt. Dies konnte sowohl mittels Inhibitorversuchen als auch mit Hilfe von RNA-Interferenz und der Verwendung von ASM-defizienten Zellen bestätigt werden. In Übereinstimmung mit verschiedenen anderen Arbeiten zur Rolle der ASM bei der Infektion, konnte eine Steigerung der ASM-Aktivität während der Infektion mit einem Maximum nach 2 h und einem anschließenden Abfall festgestellt werden. Als ein wichtiger Faktor für die Aktivierung der ASM konnte das bakterielle Protein Opc identifiziert werden, auf dessen Rolle näher in Kap. 4.2. eingegangen wird. Die Steigerung der ASM-Aktivität korrelierte dabei mit der vermehrten Präsentation des Enzyms an der Zelloberfläche, welche ebenfalls nach 2 h ein Maximum erreicht. Weiterhin führt die Inhibition der ASM zu einer geringeren Ceramidproduktion an der Oberfläche. Diese Daten legen nahe, dass die vermehrte Ceramidproduktion, welche während der Infektion von HBMEC mit dem Isolat *Nm* MC58 auftritt, vor allem auf die erhöhte ASM-Aktivität zurückzuführen ist. Eine vermehrte ASM-Expression als Ursache des gesteigerten Substratumsatzes in der ASM-Aktivitätsmessung konnte nicht festgestellt werden. Die Regulation der Aktivität der sauren Sphingomyelinase ist sehr vielfältig und kann dabei über mehrere Mechanismen, wie z.B. die biophysikalische bzw. die chemische Umgebung oder andere Proteine wie z.B. das *sphingolipid activator protein* (Saposin), erfolgen, sodass die Identifikation eines Mechanismus, der für die Erhöhung der ASM-Aktivität verantwortlich ist, schwierig ist [133; 149]. Jedoch scheint der Transport des Enzyms an die Zelloberfläche und die damit verbundene Translokation in ein Milieu, welches neben günstigen biophysikalischen Eigenschaften, wie z.B. einen pH-Wert in der Nähe des pH-Optimums des Enzyms auch genügend Substrat bereitstellt, einen wichtigen Schritt in der Aktivierung der ASM darzustellen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass möglicherweise weitere Mechanismen wie z.B. eine *de-novo*-Synthese mitverantwortlich für den Anstieg des Ceramidgehaltes in der Zellmembran ist. Im Gegensatz zur verwandten Spezies *N. gonorrhoea* konnte jedoch eine Beteiligung der neutralen Sphingomyelinase (NSM) in dem in dieser Arbeit verwendeten Infektionsmodell ausgeschlossen werden (s. Anhang, Abb. 6.9) [143]. In der Literatur, konnte für die verwandte Spezies *N. gonorrhoea* eine

Opa-vermittelte Aktivierung der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C über Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) bei nicht-phagozytierenden Zellen beschrieben werden [121]. Die Aktivierung der PC-PLC und die damit verbundene vermehrte Bildung von 1,2-Diacylglycerin scheint dabei einen Schlüsselfaktor in der Translokation und damit der Aktivierung der ASM darzustellen [121; 179; 191]. In Übereinstimmung mit diesen Daten für *N. gonorrhoea* konnte in dieser Arbeit für *N. meningitidis* ebenfalls gezeigt werden, dass die Infektion von Gehirndothelzellen mit Meningokokken zu einer Aktivierung der PC-PLC mit einer nachfolgenden verstärkten Translokation und Aktivierung der ASM führt. Als Interaktionspartner für diese Aktivierung, konnte das bakterielle Protein Opc und zelluläre Heparansulfat-Proteoglykanen identifiziert werden. Folglich führt sowohl die Opa/HSPG vermittelte Interaktion von *N. gonorrhoeae* mit Epithelzellen als auch die Opc/HSPG vermittelte Interaktion von *N. meningitidis* mit Endothelzellen zu einer Aktivierung der PC-PLC mit nachfolgender Aktivierung des ASM/Ceramid-Systems. Die Bedeutung von weiteren Signaltransduktionswegen bzw. die Beteiligung von weiteren Rezeptoren bei der Aktivierung der PC-PLC wurden in dieser Arbeit nicht direkt untersucht. So konnte eine Aktivierung der ASM wie durch *N. gonorrhoeae* in Neutrophilen mittels einer Opa52-CEACAM-Rezeptor Interaktion ausgeschlossen werden, da die verwendete Zelllinie in der vorliegenden Arbeit keine CEACAM-Rezeptor exprimiert. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass besonders weitere Rezeptoren, für die eine Interaktion mit *N. meningitidis* bekannt ist, bei der Aktivierung der PC-PLC eine Rolle spielen könnten. So können Meningokokken durch ihr Oberflächenprotein Opc mittels Vitronectin/Fibronectin an $\alpha\beta3$ oder $\alpha5\beta1$ -Integrine binden [83; 192]. Weiterhin konnten andere Arbeiten zeigen, dass Integrine an der Aktivierung der PC-PLC beteiligt sind [193]. Folglich könnten neben HSPGs auch Integrine eine Rolle bei der ASM-Aktivierung und der Ausbildung von Ceramid-reichen Plattformen spielen. Dies muss jedoch in weiterführenden Arbeiten genauer untersucht werden. Desweiteren könnten Integrine selbst in Ceramid-reichen Plattformen aktiviert werden. In Studien zur Integrinaktivierung konnte, neben einer Konformationsänderung

von Integrine, welche die Affinität für den Liganden erhöhen kann, das Clustering von Integrinen für eine Steigerung der Aktivität identifiziert werden [194].

Nachdem die Mechanismen der ASM-Aktivierung untersucht worden waren, folgte die nähere Analyse der Rolle von Ceramid-reichen Plattformen in der Meningokokkenpathogenese. Mit Hilfe von immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass während der Infektion Ceramide an der Zelloberfläche zu Clustern akkumulieren. Die Akkumulation von Ceramiden innerhalb der Zellmembran kann durch diverse Stimuli ausgelöst werden, z.B. durch verschiedene Pathogene wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oder Rhinoviren [195; 196; 197]. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass innerhalb dieser Ceramid-reichen Plattformen Rezeptoren wie z.B. CD40, CD95 sowie B- und T-Zellrezeptoren akkumulieren können und zum Teil aktiviert werden [131; 180; 198; 199]. Beispielsweise führt die Infektion von dendritischen Zellen mit dem Masernvirus zu einer gesteigerten Ceramidproduktion mit einer Akkumulation des für die Invasion benötigten CD150-Rezeptors innerhalb von Ceramid-reichen Plattformen [158]. Die Ceramid-reichen Plattformen sind dabei vermutlich nicht Teil der rezeptorspezifischen Signaltransduktion, sondern verstärken vielmehr durch die Akkumulation das Signal. So konnten Grassmé et al. (2003) für den CD95-Rezeptor eine 100-fache Signalverstärkung durch die Akkumulation des Rezeptors innerhalb von Ceramid-reichen Plattformen zeigen [200]. Die genauen Mechanismen, die zu einer Akkumulation und zu einer Signalverstärkung führen, sind bisher unbekannt. Möglicherweise könnte eine Aktivierung eines Rezeptors eine Konformationsänderung auslösen, die letztlich eine Akkumulation innerhalb von Ceramid-reichen Plattformen bedingt. Die Ceramid-reichen Plattformen könnten ihrerseits die Rezeptor-Ligand-Interaktion stabilisieren und somit eine Signaltransduktion verstärken. Weiterhin denkbar wäre eine Konformationsänderung der Rezeptoren durch die veränderten biophysikalischen Eigenschaften innerhalb der Ceramid-reichen Plattformen, die zu einer verbesserten Rezeptor-Ligand-Interaktion führen könnte [161].

So et al. (1999) und Nassif et al. (2002) konnten unterhalb von Mikrokolonien sowohl für Epithel- als auch Endothelzellen die Formierung sogenannter *cortical plaques* beschreiben [89; 90]. In diesen kommt es zur Akkumulation der Zellmembranrezeptoren CD44, ICAM-1 und ErbB2 sowie von intrazellulären Proteinen wie Ezrin und Moesin. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Akkumulation von CD44 und ErbB2 in Ceramidreichen Domänen auf der Zelloberfläche von HBMEC während der Infektion mit *N. meningitidis* beobachtet werden. Es konnte in den Arbeiten von Nassif et al. (2002) gezeigt werden, dass die Interaktion von *N. meningitidis* mit Endothelzellen zu einer Aktivierung des ErbB2-Rezeptors, eine Rezeptor-Tyrosinkinase, führt [90]. Die Signaltransduktion erfolgt dabei nach der Ligandenbindung über eine Homo- bzw. Heterodimerisierung zweier ErbB-Rezeptoren, welche letztlich zu einer Aktivierung der intrazellulären Kinase-Domäne führt [201]. Dies wiederum bedingt bei der Infektion mit *N. meningitidis* u.a. eine Phosphorylierung des Aktin-bindenden Proteins Cortactin, welches an einer Veränderung der Zellmorphologie beteiligt ist, sodass die Aufnahme des Erregers in die Zelle ermöglicht wird [86]. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, der Akkumulation von ErbB2 und CD44 in Ceramidreichen Plattformen lassen keinen eindeutigen Rückschluss zu, wie es zu diesem Clustering kommt bzw. ob dies die Aktivität der Rezeptoren beeinflusst. Die Ceramidreichen Plattformen könnten möglicherweise die essentielle Dimerisierung des ErbB2-Rezeptors begünstigen. So konnte beispielsweise in einer Arbeit eine verstärkte Dimerisierung mit folgender verstärkter Signaltransduktion innerhalb Cholesterolreicher Mikrodomänen, sogenannten *lipid rafts* aufgezeigt werden [202]. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch die ErbB2-Signaltransduktion in den Ceramidreichen Plattformen verstärken. Zusätzlich könnte auch die Interaktion mit dem CD44-Rezeptor, ein Korezeptor des ErbB2-Rezeptors, innerhalb der Ceramidreichen Plattformen verstärkt werden [203]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Kollokalisierung des CD44-Rezeptors und des ErbB2-Rezeptors in Ceramidreichen Domänen während der Infektion von HBMEC mit *N. meningitidis* gezeigt werden. Dies könnte erklären, warum die ASM eine wichtige Rolle bei der Invasion von *N. meningitidis* in HBMEC spielt. Eine Aktivierung der ASM durch den Erreger führt möglicherweise über eine vermehrte

Ausbildung von Ceramid-reichen Plattformen zu einer gesteigerten Rezeptoraktivierung und damit letztendlich zu einer gesteigerten Invasivität des Erregers. Um diese Hypothese jedoch zu verifizieren, müsste durch weitere Experimente nachgewiesen werden, dass eine Inhibition der ASM bzw. der Ceramid-reichen Plattformen schließlich auch eine geringere Rezeptoraktivierung nach sich zieht bzw. dass die Induktion dieser Membran-Plattformen zu einer Signalverstärkung der spezifischen Rezeptoren führt.

Die Akkumulation von *cortical plaque*-assoziierten Proteinen während der Infektion in Ceramid-reichen Plattformen beschränkt sich dabei nicht nur auf die Rezeptoren der Zellmembran, sondern auch auf die intrazellulären Bestandteile dieser Strukturen. So konnte in dieser Arbeit eine Formation von phosphorylierten ERM-Proteinen und Aktin in unmittelbarer Nähe von Ceramid-reichen Plattformen detektiert werden. Durch die Inhibition der ASM kann eine Kollokalisierung dieser Strukturen unterbunden werden. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es zu einer Akkumulation von *cortical plaques* innerhalb von Ceramid-reichen Plattformen während der Infektion kommt. Die ERM-Proteinfamilie, bestehend aus Ezrin, Radixin und Moesin, bilden dabei eine Vernetzung zwischen Zellmembran und Zytoskelett und können so zu einer Veränderung der Zellmorphologie führen [91]. Ihr N-terminus, auch FERM-Domäne genannt, bindet dabei verschiedene, in der Zellmembran verankerte Proteine, während ihr C-Terminus mit Aktin interagiert [91; 92]. Dabei können die ERM-Proteine in zwei Formen vorliegen. Bei der inaktiven, geschlossenen Form interagiert der N-Terminus mit dem C-Terminus, sodass die Bindungsstellen blockiert sind [204]. Die Interaktion mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, welches sich vor allem auf der Innenseite der Zellmembran befindet, führt zu einer Öffnung dieser Form in einen aktiven Zustand. Dieser aktive Zustand wird durch die Phosphorylierung von Threonin durch Kinasen am C-Terminus stabilisiert, sodass die ERM-Proteine mit Proteinen der Zellmembran und des Zytoskeletts interagieren können [205]. Einer dieser Bindungspartner ist das Glykoprotein CD44 [206]. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass es während der Infektion zu einer verstärkten Kollokalisierung von CD44 bzw. Aktin und phosphoryliertem Ezrin kommt. Dabei führt die Infektion von HBMEC mit *N. meningitidis* zu einer verstärkten Phosphorylierung

konservierter Threonin-Reste innerhalb der C-terminalen Domäne von Ezrin Thr567, Radixin Thr 564 und Moesin Thr558, während eine Inhibition von Ezrin wiederum eine geringere Invasivität von Meningokokken bedingt. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Infektion von HBMEC mit *N. meningitidis* nicht nur zu einer Rekrutierung von Ezrin bzw. ERM-Proteinen in *cortical plaques* führt, sondern dass die Interaktion zwischen Erreger und Wirtszellen eine Signaltransduktion induziert, die letztlich zu einer Phosphorylierung von ERM-Proteinen führt und somit die intrazelluläre Aufnahme des Erregers begünstigt. Beteiligt an dieser Signaltransduktion sind u.a. EGF-Rezeptoren, zu denen auch der ErbB2 gehört sowie die Proteinkinase C. Eine Inhibition dieser Proteine führt zu einer signifikanten Reduktion der ERM-Phosphorylierung während der Infektion. Für andere Erreger wie z.B. *Listeria monocytogenes* konnte zwar eine funktionelle Rolle der ERM-Proteine bei der Invasion in die Wirtszelle gezeigt werden, jedoch konnte in bisherigen Arbeiten zur Infektionspathogenese von *N. meningitidis* alleine eine Rekrutierung von ERM-Proteinen unterhalb von *N. meningitidis*-Mikrokolonien gezeigt werden [207]. Die funktionelle Relevanz und Aktivierung während der Infektion wurde erstmals in dieser Arbeit nachgewiesen.

Die Formation von phosphorylierten Ezrin konnte direkt unterhalb von Ceramid-reichen Plattformen detektiert werden. Dies ist nachvollziehbar, da auch der membrangebundene Bindungspartner CD44 der phosphorylierten ERM-Proteine, während der Infektion in Ceramid-reichen Plattformen akkumuliert. Möglicherweise spielen jedoch die Ceramide auch eine direkte Rolle bei der Regulation der CD44-ERM-Interaktion und nicht nur bei ihrer Akkumulation. Arbeiten über die Migration von Tumorzellen konnten zeigen, dass Cholesterol-reiche *lipid rafts* die Interaktion von CD44 und Ezrin inhibieren können. Befindet sich CD44 innerhalb von solchen Cholesterol-reichen *lipid rafts*, ist eine Bindung mit phosphoryliertem Ezrin nicht möglich [187]. Weiterhin konnte in verschiedenen anderen Arbeiten nachgewiesen werden, dass Ceramide das Cholesterol in *lipid rafts* verdrängen und damit die Struktur und Funktion der *lipid rafts* verändern können [185; 186]. Um den Einfluss der Infektion bzw. der Ceramide auf die *lipid rafts* zu präzisieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit die *lipid rafts* mit Hilfe der Dichtegradienten-

zentrifugation isoliert, wobei als Marker für die *lipid rafts* Flotillin-1 diente. Während der Infektion von HBMEC mit *N. meningitidis* zeigte sich nach 2 h p.i. eine Reduktion von Flotillin-1 in der *lipid raft* Fraktion im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. Nach 4 h p.i. konnte Flotillin-1 in der *lipid raft* Fraktion wieder nachgewiesen werden. Dieser zeitlicher Verlauf passt zu den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der Zelloberfläche, welche ein Maximum der Ceramidmenge nach 2 h p.i. zeigen mit einem anschließenden Abfall der nach 4 h p.i. wieder den Stand von nicht-infizierten Kontrollzellen erreichte. Auch massenspektrometrische Analysen der *lipid raft* Fraktion wiesen eine 10-fach gesteigerte Ceramidmenge während der Infektion im Vergleich mit den nicht-infizierten Kontrollzellen auf. Die Menge an Sphingomyelin in der *lipid raft* Fraktion war dagegen bei den infizierten und nicht-infizierten Zellen beinahe gleich. Proteinanalysen der *lipid raft* Fraktion zeigten weiterhin nach 2 h p.i. im Vergleich mit den Kontrollzellen bzw. im Vergleich mit Zellen 4 h p.i. eine reduzierte CD44-Menge. Diese Ergebnisse ließen sich durch die Verwendung von bakterieller Sphingomyelinase reproduzieren. Die durch die Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Daten könnten darauf hinweisen, dass es durch die Ceramid-Bildung während der Infektion zu einer Veränderung der Cholesterolreichen *lipid rafts* kommt, welche eine Freisetzung von CD44 bedingten und letztlich eine vermehrte CD44-ERM-Interaktion ermöglichen (s. Abb. 4.1). Da bereits beschrieben wurde, dass Ceramide die Struktur und Funktion von *lipid rafts* verändern können, stellt dies ein interessanter Mechanismus dar, wie Ceramide die CD44-ERM-Interaktion beeinflussen könnten. Um diese Hypothese jedoch weiter zu prüfen, müssen die *lipid raft* Fraktionen noch genauer analysiert und insbesondere muss deren Cholesterol-Gehalt bestimmt werden. Ein zusätzlicher wichtiger Aspekt ist, dass bisher nur eine Kolo-kalisation von phosphoryliertem Ezrin und von CD44 gezeigt wurde. Es kann daher nicht eindeutig geschlossen werden, ob eine vermehrte CD44-ERM-Interaktion stattfindet, sondern dies muss noch durch weitere Immunpräzipitationsanalysen bestätigt werden.

Interessanterweise zieht die Zugabe von bSM eine Dephosphorylierung von ERM-Proteinen nach sich. Dieser Effekt konnte auch in anderen Arbeiten gezeigt werden. Unabhängig von dem zuvor beschriebenen Rezeptorclustering in Ceramid-reichen

Plattformen, können Ceramide intrazelluläre Signalwege beeinflussen und auch selbst als Signaling-Molekül fungieren. Wie in einer Arbeit von Canals et al. (2010) gezeigt werden konnte, führen Ceramide dabei zu einer Dephosphorylierung von ERM-Proteinen, während Sphingosin-1-phosphat, ein Abbauprodukt der Ceramide, zu einer Phosphorylierung von ERM-Proteinen führt [208]. Diese Erkenntnisse stehen nicht unbedingt im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit, dass phosphorylierte ERM-Proteine mit zellmembranständigen Ceramiden kolokalisieren. So konnte gezeigt werden, dass die Infektion von Zellen mit *N. meningitidis* zu einer Signaltransduktion, gefolgt von einer starken ERM-Phosphorylierung, führt. Dies stellt einen wesentlichen Unterschied zu den oben erwähnten Arbeiten dar, bei denen letztlich allein der Einfluss der Lipide gemessen wurde. Daher ist es gut möglich, dass diese Protein-induzierte Phosphorylierung der ERM-Proteinfamilie, hervorgerufen durch *N. meningitidis*, den direkten Einfluss der Lipide überwiegt.

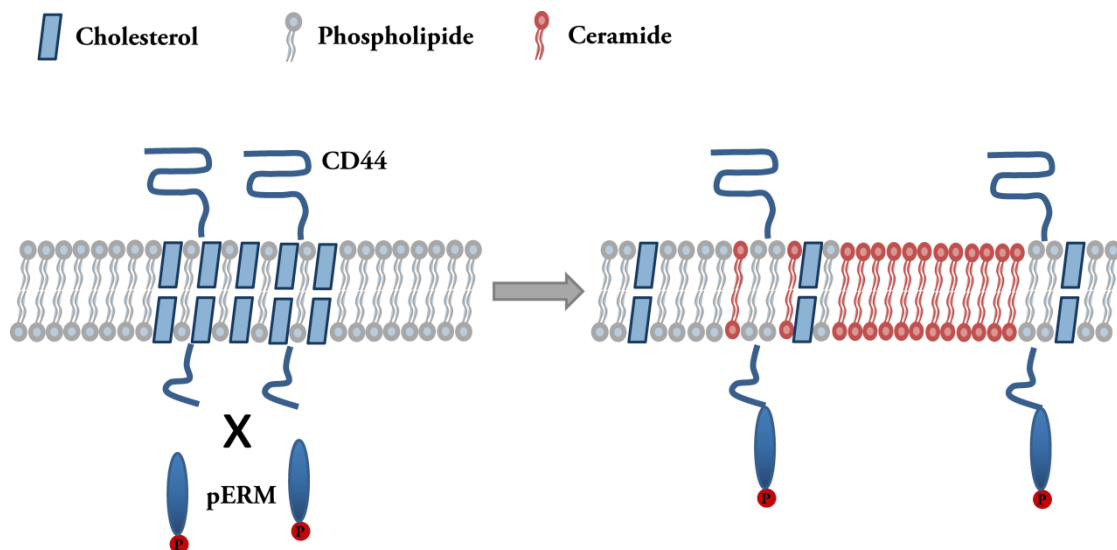


Abb. 4.1 Hypothetisches Modell einer Ceramid-induzierten Regulation der CD44-ERM-Interaktion

Während es innerhalb von Cholesterin-reichen *lipid rafts* zu einer Restriktion der CD44-ERM-Interaktion kommt, führt eine vermehrte Ceramid-Bildung an der Oberfläche zu einer Strukturänderung der *lipid rafts* die eine CD44-ERM-Interaktion erlaubt.

4.2 Unterschiede zwischen verschiedenen Isolaten und die klinische Relevanz eines durch die saure Sphingomyelinase vermittelten zellulären Aufnahme-mechanismus von *N. meningitidis*

N. meningitidis gilt, wie der Name schon verdeutlicht, als klassischer Meningitis-Erreger. Dabei kommt es zu einer Infektion der Hirnhäute, welche das ZNS umgeben. Kommt es zu einer disseminierten Infektion bzw. systematischen Entzündungsreaktion, kann sich eine Meningokokken-Infektion, wie bei vielen gram-negativen Erregern auch, in Form einer Sepsis äußern. Interessanterweise konnten genauere Analysen von invasiven Isolaten mittels Multilokus-Sequenztypisierung zeigen, dass sich die Isolate der verschiedenen klonalen Komplexe nicht nur in ihrer Virulenz, sondern auch in ihrem klinisches Erscheinungsbild unterscheiden. Während Isolate des ST-32 Komplex, darunter das Isolat *Nm* MC58, überwiegend eine Meningitis und Sepsis verursachen, wurde von Ausbrüchen berichtet, verursacht durch Isolate des klonalen Komplexes ST-11, die vorwiegend eine schwere Sepsis, jedoch seltener eine Meningitis verursacht hatten [39; 40; 41; 42]. In dieser Arbeit wurden daher Isolate aus verschiedenen klonalen Komplexen ausgewählt und es wurde überprüft, ob sich ST-spezifische Unterschiede in der Aktivierung des ASM/Ceramid-Systems finden lassen. Genomanalysen des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg zeigten weiterhin, dass die ausgewählten Isolate bzw. klonalen Komplexe sich auch anhand ihrer Virulenzfaktoren unterscheiden [164]. Als Referenz diente das Serogruppe B Isolat MC58, mit welchem auch die bisherigen Versuche durchgeführt wurden und welches als klassisches ST-32 cc Isolat gilt. Durchgeführte Invasionsversuche zeigten, dass die ausgewählten Isolate bis auf das SgB-Isolat DE6894 im Vergleich mit dem Isolat MC58 deutlich weniger invasiv waren. Die Adhärenz der Isolate unterschied sich nicht signifikant. Neben der verringerten Invasivität konnte bei allen Isolaten eine signifikant geringere Ceramid-Produktion während der Infektion festgestellt werden. Die ASM Aktivitätsmessungen der ST11 cc-Isolate zeigten auch hier eine signifikant geringere Aktivität während der Infektion im Vergleich mit dem Referenz-Isolat MC58. Diese Daten deuten darauf hin, dass das Isolat MC58 Eigenschaften besitzt, die zu einer verstärkten Aktivierung der ASM führen. Da bei den Genomanalysen keine Aussage darüber getroffen

wird, ob ein Gen auch wirklich exprimiert wird, wurden als erstes Proteinanalysen der verschiedenen Isolate durchgeführt, um einen spezifischen Virulenzfaktor zu identifizieren, der erklärt, warum das SgB-Isolat MC58 in der Lage ist, die ASM zu aktivieren. Als einer der interessantesten Kandidaten stellte sich das Opc-Protein heraus, das nur die Isolate MC58 und DE6894 besitzen, wovon wiederum nur das Isolat MC58 es auch exprimiert. Das Isolat DE6894 stellt einen Sonderfall dar, denn die Opc-Phasenvariation unterliegt einer Regulation auf Transskriptionsebene, welche über die Länge einer Poly-Cytidin Sequenz in der Promotorregion gesteuert wird [60]. Es zeigte sich, dass es bei dem Isolat DE6894 aufgrund der Sequenzlänge zu einer Verhinderung der Opc-Expression kommt. Weiterhin fällt auf, dass dieses Isolat ähnlich invasiv wie das Isolat MC58 ist, jedoch keine Ceramid-Produktion induziert. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass dieses Isolat seine verstärkte Invasivität über andere Mechanismen als eine verstärkte ASM-Aktivierung verursacht, deren genauere Untersuchung jedoch nicht Teil dieser Arbeit war. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Opc-defizienten Isolaten bzw. durch die Verwendung eines rekombinant Opc-exprimierenden *E. coli* konnten den herausragenden Einfluss des Opc-Proteins in der ASM-Aktivierung, Ceramidbildung sowie bei der Invasion von Meningokokken in Gehirndothelzellen gezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen weiterhin im Einklang mit den aus HBMEC gewonnenen Erkenntnissen über eine durch Heparansulfat-Proteoglykane vermittelte ASM-Aktivierung, da Vorarbeiten von van Putten et al. eine Interaktion von Opc und Heparansulfat-Proteoglykanen zeigen konnten [74].

Nachdem sich ein Unterschied in der Aktivierung der ASM zwischen verschiedenen *N. meningitidis* Isolaten *in vitro* gezeigt hat, stellt sich die Frage, ob dieses Ergebnis auch eine klinische Relevanz hat. Im Vergleich zu dem SgB-Isolat MC58 zeigten untersuchte ST-11 cc-Isolate *in vitro* eine deutlich geringere Aktivierung der ASM in Gehirndothelzellen, eine geringere Ceramid-Produktion und fehlende Fähigkeit, Ceramid-reiche Plattformen zu generieren. ST-11 cc-Isolate verursachen vermehrt eine Sepsis und weniger eine Meningitis, wohingegen das Isolat MC58, zugehörig zum klonalen Komplex ST-32 cc, hauptsächlich eine Meningitis verursacht. In Übereinstimmung mit der

Hypothese, dass die ASM-Aktivierung eine wesentliche Rolle bei der Invasion von Meningokokken in Gehirndothelzellen spielt, weisen die Opc-defizienten Isolate auch eine deutlich geringere Invasivität auf, verglichen mit dem Opc-exprimierenden Isolat MC58. Hervorzuheben ist, dass dieser Unterschied anscheinend Zelltyp-spezifisch ist. Die Analyse von verwendeten Pharynxepithelzellen, welche die Eintrittspforte von *N. meningitidis* in den Wirt darstellen, zeigten keinen Unterschied in der ASM-Aktivierung und Ceramidgeneration zwischen den Isolaten [47; 209]. Auch konnte keine signifikante Differenz in der Invasivität der getesteten Isolate in Pharynxepithelzellen festgestellt werden (s. Anhang, Abb. 6.10). Die spezifische Stimulierung der ASM durch die Opc-vermittelte Interaktion von *N. meningitidis* mit Gehirndothelzellen könnte also einen Erklärungsansatz bieten, dass es Unterschiede in der klinischen Ausprägung der invasiven Meningokokkenerkrankung zwischen verschiedenen Isolaten bzw. verschiedenen klonalen Komplexen gibt. Anzumerken ist, dass sich die verwendeten Isolate noch in weiteren Virulenzfaktoren, als die in dieser Arbeit untersuchten, unterscheiden, die auch einen Einfluss auf die Aktivierung der ASM bzw. die Invasivität nehmen könnten. In einer neueren Studie von Bourdoulous et al. (2014) konnte als endothelialer Pilusrezeptor das Membranprotein CD147 identifiziert werden [72]. Inwieweit dieser Rezeptor mit Ceramid-reichen Plattformen assoziiert bzw. der zu den *major*-Adhäsinen zählende Typ IV-Pilus bei Aktivierung der ASM beteiligt ist bleibt offen. Auch die geringe Anzahl an getesteten Isolaten bzw. klonalen Komplexen lässt nur eine geringe Aussagekraft zur prädiktiven Korrelation von ASM-Aktivierung und klinischen Erscheinungsbild einer invasiven Meningokokkenerkrankung zu. Zur genaueren Korrelation von klonalen Komplexen, klinischer Ausprägung und Aktivierung des Ceramid/ASM-Systems, benötigt es neben einer genauen epidemiologischen Analyse von invasiven Isolaten, eine umfassende Testung dieser in ihrer Fähigkeit die ASM zu aktivieren und damit Ceramid-reiche Plattformen zu generieren. Wünschenswert wäre weiterhin eine Testung dieser für verschiedene Zellmodelle. Dies ist jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich und bleibt weiteren Arbeiten auf diesem Gebiet vorbehalten. Dennoch bieten die in dieser

Arbeit *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse einen Erklärungsansatz warum sich verschiedene Meningokokkenisolate *in vivo* in ihrer klinischen Erscheinungsform unterscheiden können.

4.3 Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigte Rolle des ASM/Ceramid Systems bei der Aufnahme von Meningokokken in Gehirndothelzellen bietet theoretisch verschiedene Möglichkeiten der Nutzung an. Einerseits wäre eine Inhibition des Mechanismus denkbar, um einen Durchtritt von Erregern durch die Blut-Hirn- bzw. durch die Blut-Liquor-Schranke zu verhindern, andererseits die Nutzung des Mechanismus, um aktiv einen Transport über diese Barriere z.B. für Medikamente zu ermöglichen. Die Inhibition der ASM als pharmakologisches Targetprotein kann bei verschiedenen Erkrankungen zur Anwendung kommen. So existiert eine Studie über die Verwendung von Amitriptylin bei Patienten mit zystischer Fibrose mit dem Ziel, u.a. einer chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* vorzubeugen [210]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Effekt von bestimmten Antidepressiva nicht alleine auf ihren Einfluss auf die Neurotransmitterkonzentration innerhalb des synaptischen Spaltes zurückzuführen ist, sondern ihr Wirkmechanismus zum Teil auf ihre Funktion als FIASMA, d.h. als Inhibitor der sauren Sphingomyelinase, beruht [211]. Ein wesentlicher Unterschied dieser Erkrankungen im Vergleich mit der akuten Meningokokken-Infektion ist jedoch, dass es sich um chronische Krankheiten handelt. Treten hingegen Symptome einer Meningokokken-Infektion auf, hat sich der Erreger schon im Körper verbreitet und im Falle einer Meningitis die Blut-Hirn-Schranke schon überschritten. Dabei bleibt als wichtigste Therapie die schnellstmögliche Gabe von Antibiotika, um Morbidität und Mortalität effektiv zu senken. Denkbar wäre jedoch neben einer adäquaten Antibiotikatherapie die zusätzliche Blockierung der ASM bei noch nicht stattgefundenener meningealer Beteiligung in neuro-protektiver Absicht. Voraussetzung hierfür wäre eine schnell wirksame und gut verträgliche Inhibition. Die Inhibition der ASM erfolgte in dieser Arbeit jedoch u.a. mit dem trizyklischen Antidepressivum Amitriptylin. Neben seiner Eigenschaft als nicht selektiver Monoamin-Wiederaufnahmehemmer gehört Amitriptylin auch zu der Gruppe der funktionellen Inhibitoren der sauren

Sphingomyelinase (FIASMA) [212]. Der Nachteil von Amitriptylin sind die ausgeprägten Nebenwirkungen und die enge therapeutische Breite. Der Abstand zwischen der therapeutischen Dosis, welche bei einer Serumkonzentration zwischen 80–200 ng/ml liegt und der kritischen toxischen Dosis, welche ab einer Serumkonzentration von 300 ng/ml zu erwarten ist, ist relativ gering [213; 214]. Die in dieser Arbeit zur Inhibition der ASM in der Zellkultur verwendete Konzentration von 10 μ M entspricht dabei einer Serumkonzentration von 2774 ng/ml und liegt damit in einem letalen Bereich. Deshalb stellt Amitriptylin für den oben genannten Verwendungszweck kein geeignetes Therapeutikum dar. Es gibt jedoch eine Reihe weiterer Medikamente, welche zur Gruppe der FIASMA gezählt werden und möglicherweise eine günstigere Pharmakodynamik besitzen [215]. Neben den FIASMA, welche über ihre kationisch-amphiphilen Eigenschaften zu einer Ablösung der ASM von der lysosomalen Membran und anschließend über einen proteolytischen Abbau innerhalb des Lysosoms indirekt zu einer Senkung der ASM Aktivität führen, wäre auch eine direkte Inhibition der ASM an der Oberfläche z.B. durch Antikörper denkbar [216]. Offen bleibt die Frage, ob eine effektive Inhibition der ASM bei der Behandlung einer Meningokokken-Infektion wirklich einen Vorteil erbringt und die Morbiditäts- und Mortalitätsrate effektiv senkt.

Neben der Inhibition der ASM wäre auch die aktive Nutzung des ASM/Ceramid-Mechanismus denkbar. Diese Überlegung lässt sich besonders gut nachvollziehen, wenn man bedenkt, dass die in dieser Arbeit gezeigte rekombinante Expression des Opc-Proteins in *E. coli* zu einer 20-fach gesteigerten Aufnahme nach 4 h p.i. in HBMEC im Vergleich mit dem Wildtyp führte. *Drug targeting* bezeichnet dabei die zielgerichtete Anreicherung eines Arzneistoffes, um die Effektivität eines Medikaments unter Verringerung der Nebenwirkungen zu erhöhen. Dabei erfolgt eine spezifische Modifikation des Medikaments. Eine Möglichkeit dazu stellen partikuläre Träger, wie Liposomen, Nanopartikel oder Mizellen dar, welche den Arzneistoff enthalten und weiter mit spezifischen Antikörpern oder Zell-penetrierenden Peptiden modifiziert werden können, damit sie selektiv den Wirkort erreichen [217; 218]. Außerdem bietet der Transport von Wirkstoffen in partikulären Trägern einen Schutz vor einem vorzeitigen Metabolismus und

die Möglichkeit zur Reduktion von Nebenwirkungen [219]. Es gibt verschiedene Bestrebungen, Medikamente soweit zu modifizieren, dass sie sich gezielt im ZNS anreichern. Beispielsweise lässt sich durch die Kopplung von Medikamenten an basische zellpenetrierende Peptide, wie das aus dem HI-Virus isolierte Tat (*trans-activator of transcription*)-Protein, eine verstärkte intrazelluläre Aufnahme erreichen [220]. Ebenso gibt es Bestrebungen, bakterielle Proteine, wie z.B. Lektine, als zellpenetrierende Peptide zu modifizieren bzw. zu nutzen [221]. Möglicherweise bietet das Opc-Protein ebenfalls das Potential für eine ZNS-spezifische Medikamentenmodifikation, z.B. durch die Einbringung in die Membran von Liposomen. Dann könnte eine Opc-vermittelte, erhöhte Aufnahme von Medikamenten in Gehirndothelzellen mit einem möglicherweise erhöhten Wirkspiegel im ZNS bei verringerten peripheren Nebenwirkungen erreicht werden. Die Realisierung solcher Eigenschaften wäre z.B. bei der Chemotherapie von Gehirntumoren, bei der antibiotischen Behandlung von ZNS-Infektionen oder auch für verschiedene Neuroleptika überaus wünschenswert und hilfreich.

5 Zusammenfassung

In den aufgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass es bei einer Infektion von HBMEC mit verschiedenen *N. meningitidis* Isolaten zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Aktivierung der ASM mit einer nachfolgenden Bildung von Ceramiden an der Zelloberfläche kommt. Die Aktivität der ASM spielt eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Meningokokken in die Wirtszelle. Die Invasivität verschiedener Isolate korreliert dabei mit ihrer Fähigkeit, die ASM zu aktivieren. Eine Inhibition der ASM mit einer daraus resultierenden geringeren Ceramidbildung an der Oberfläche führt zu einer verminderten Aufnahme von Bakterien in HBMEC. Einen wichtigen Virulenzfaktor für die Aktivierung stellt das bakterielle Membranprotein Opc dar. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion von Opc mit zellulären Heparansulfat-Proteoglykanen eine Aktivierung einer PC-PLC vermittelten Zellsignalkaskade auslöst, welche über nicht weiter untersuchte Mechanismen eine Translokation der ASM an die Zelloberfläche von HBMEC bewirkt. Die verstärkte Ceramidbildung an der Zelloberfläche lässt Ceramid-reiche Membrandomänen entstehen, in denen es zu einer Akkumulation verschiedener Rezeptoren wie ErbB2 und CD44 kommt. Daneben konnte eine Akkumulation von Proteinen, welche mit der Zellmorphologie und -motilität assoziiert sind, in diesen Regionen festgestellt werden. Diese Proteine, wie z.B. ERM-Proteine und Aktin, spielen auch eine wichtige Rolle bei der Bildung von sogenannten *cortical plaques*, welche unterhalb von *N. meningitidis* auftreten und die Aufnahme des Erregers in die Zelle bedingen können. Für die Veränderung der Zellmorphologie müssen die ERM-Proteine phosphoryliert und damit aktiviert werden. In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass der ErbB2-Rezeptor und die Proteinkinase C bei der Phosphorylierung der ERM-Proteine involviert sind. Diese sind im phosphorylierten und damit aktivierten Zustand in der Lage, mit zellmembranassoziierten Proteinen, wie CD44 sowie Aktin, einem wichtigen Protein des Zytoskeletts, zu interagieren und somit eine Brücke zwischen Zelloberfläche und dem intrazellulären Zytoskelett zu schlagen. Diese Verbindung könnte letztlich für eine Veränderung der Zellmorphologie verantwortlich sein, die am Beginn einer Aufnahme des Erregers in die Wirtszelle steht. Als möglicher Regulationsmechanismus dieser ERM-

Aktin-Interaktion konnte ein Einfluss von Ceramiden auf Cholesterol-reiche *lipid rafts* gezeigt werden, welcher möglicherweise für eine verstärkte CD44-ERM Interaktion verantwortlich ist. Diese Hypothese muss jedoch noch in weiterführenden Experimenten überprüft werden.

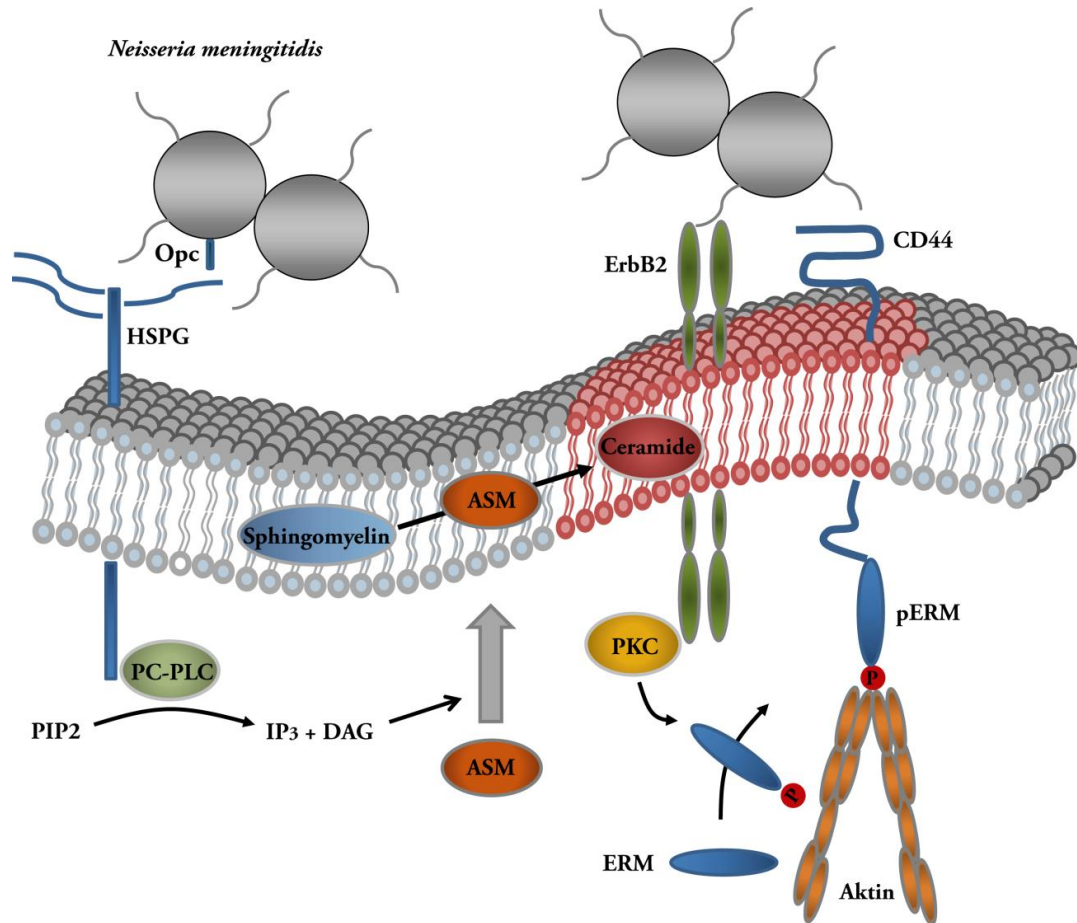


Abb. 5.1 Infektionsmodell einer durch die sauren Sphingomyelinase vermittelten Invasion von *N. meningitidis* in humane Gehirndothelzellen

Die Interaktion des bakteriellen Opc mit membranständigen HSPG führt über eine Aktivierung der PC-PLC zu einer Translokation der lysosomalen ASM an die äußere Schicht der Zellmembran. Die dadurch gesteigerte ASM-Aktivität führt zur Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramiden und die nachfolgende Formation dieser zu Ceramid-reichen Plattformen. Innerhalb bzw. unterhalb dieser Plattformen kommt es zu einer Akkumulation von *cortical plaques*-assoziierten Rezeptoren und Proteinen. Neben einer Akkumulation kommt es zu einer Phosphorylierung von ERM-Proteinen, welche eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Meningokokken in Gehirndothelzellen spielen.

6 Anhang

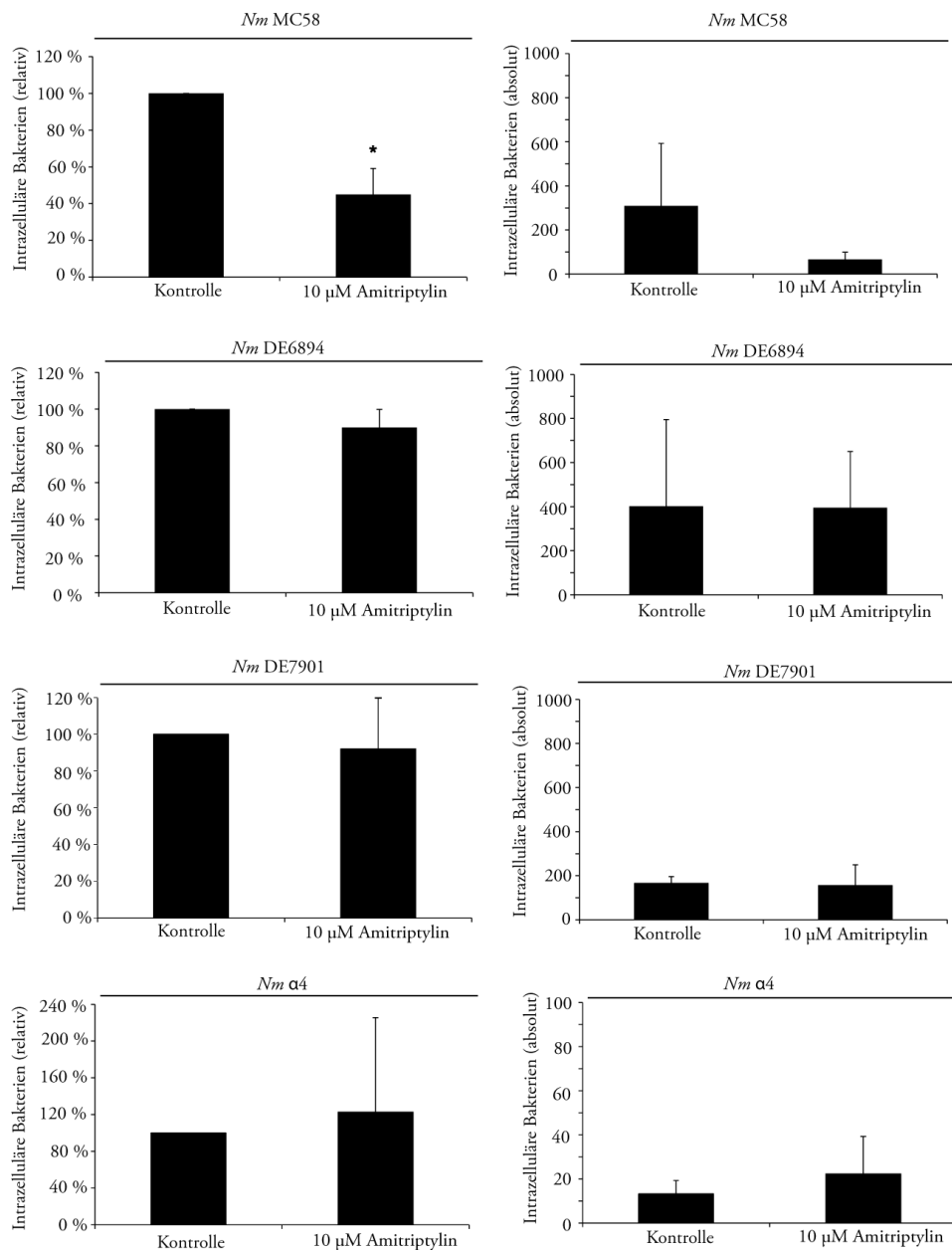


Abb. 6.1 Invasionsdaten SgB-Isolate

Gezeigt sind die Ergebnisse der ASM-Inhibition mit 10 μM Amitriptylin auf die Invasion verschiedener SgB-Isolate 4 h p.i. Als Kontrolle dienten HBMEC, welche nicht mit Amitriptylin vorbehandelt wurden. Neben den relativen Invasionsdaten (linke Spalte) ist auch die absolute Anzahl von invasiven Bakterien angegeben (rechte Spalte; bezogen auf 4×10^5 Zellen). * $p < 0,05$.

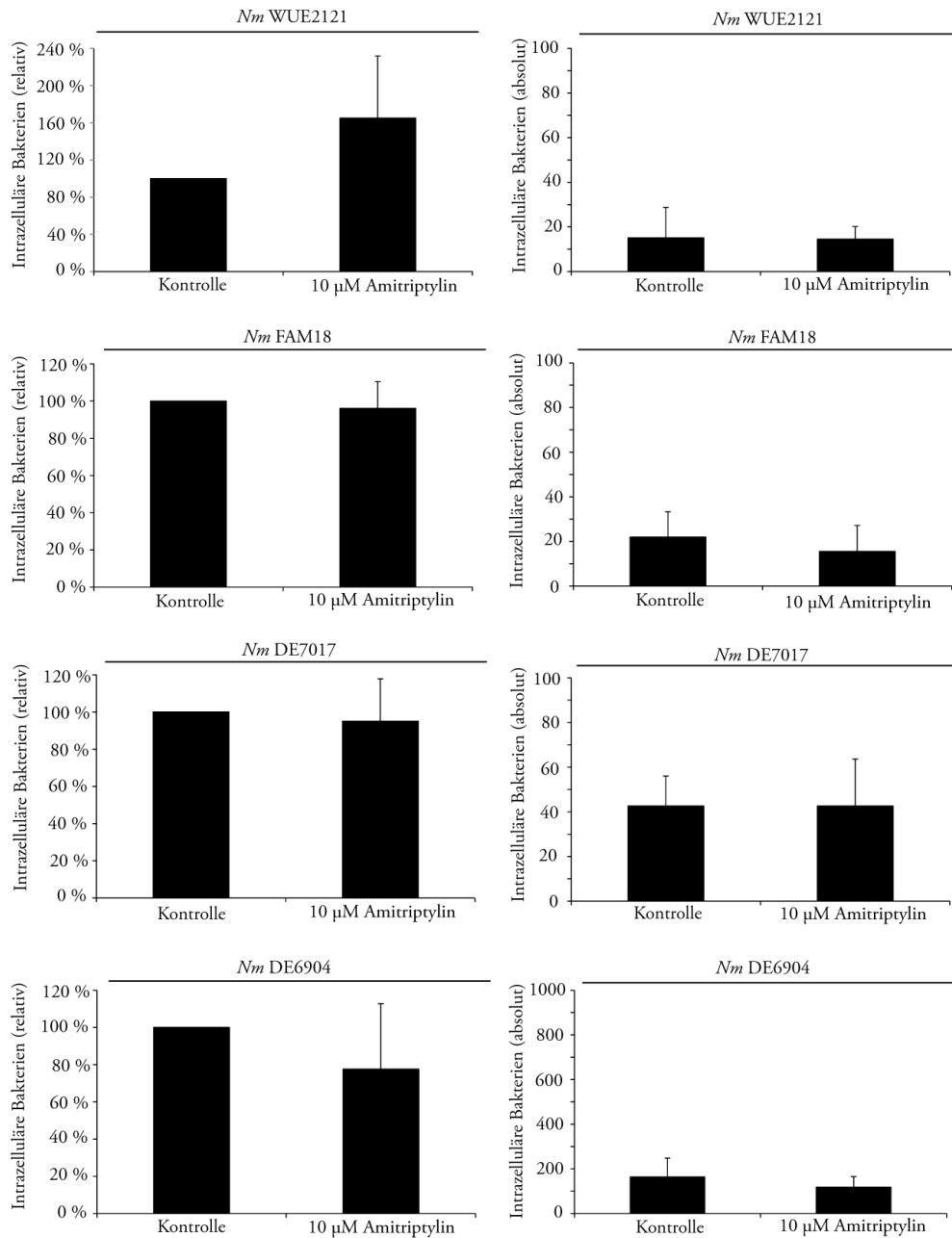


Abb. 6.2 Invasionsdaten SgC-Isolate

Gezeigt sind die Ergebnisse der ASM-Inhibition mit 10 μM Amitriptylin auf die Invasion verschiedener SgC-Isolate 4 h p.i. Als Kontrolle dienten HBMEC, welche nicht mit Amitriptylin vorbehandelt wurden. Neben den relativen Invasionsdaten (linke Spalte) ist auch die absolute Anzahl von invasiven Bakterien angegeben (rechte Spalte).

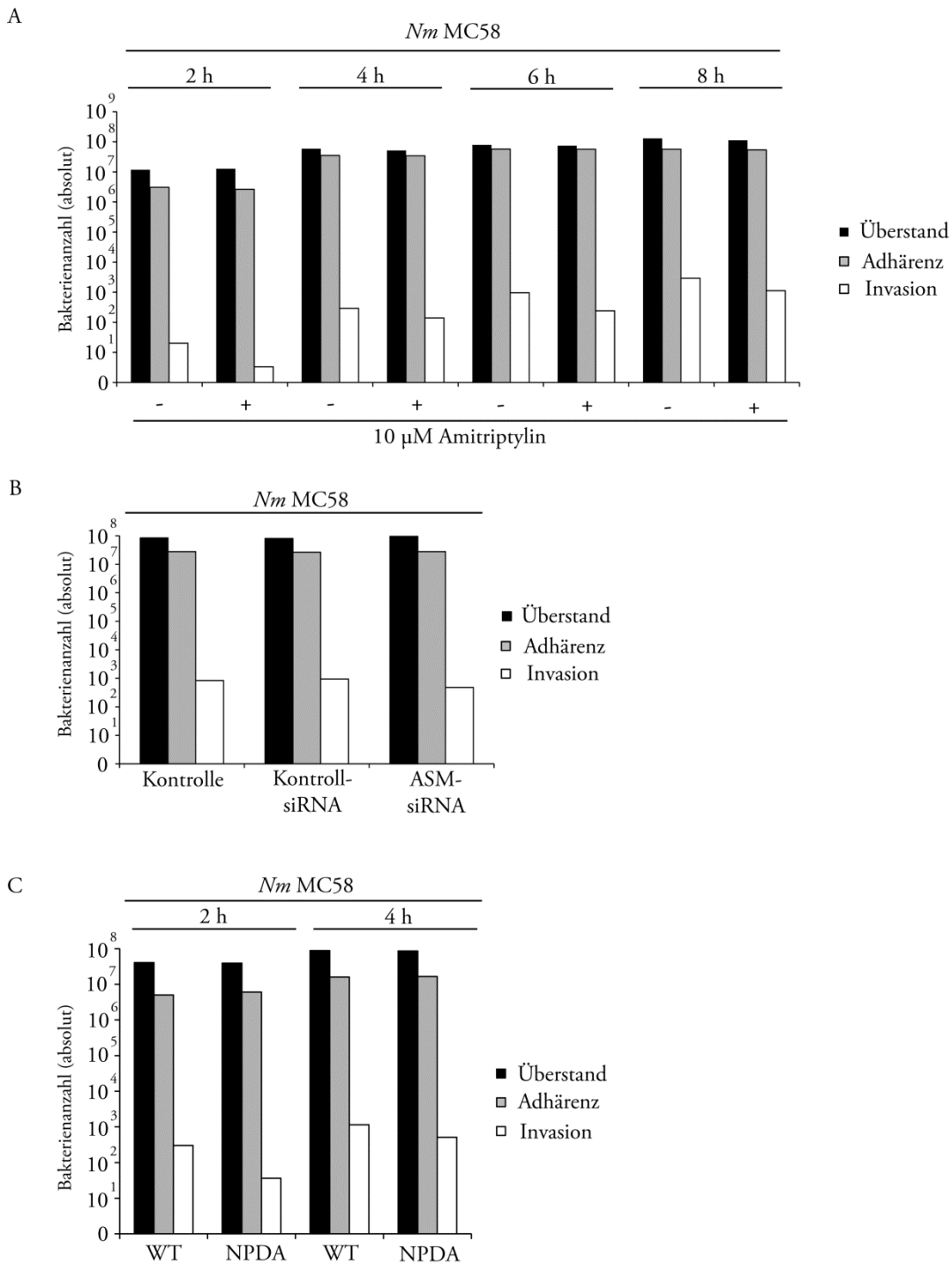


Abb. 6.3 Absolute Bakterienanzahl Invasionsversuche

Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse (absolute Bakterienanzahl) eines exemplarischen Versuches. Neben einem Kinetikversuch mit dem Isolat SgB-Isolat MC58 und dem Einfluss von Amitriptylin (A), sind ein siRNA Versuch (B) sowie die Ergebnisse der NPDA Fibroblasten (C) gezeigt.

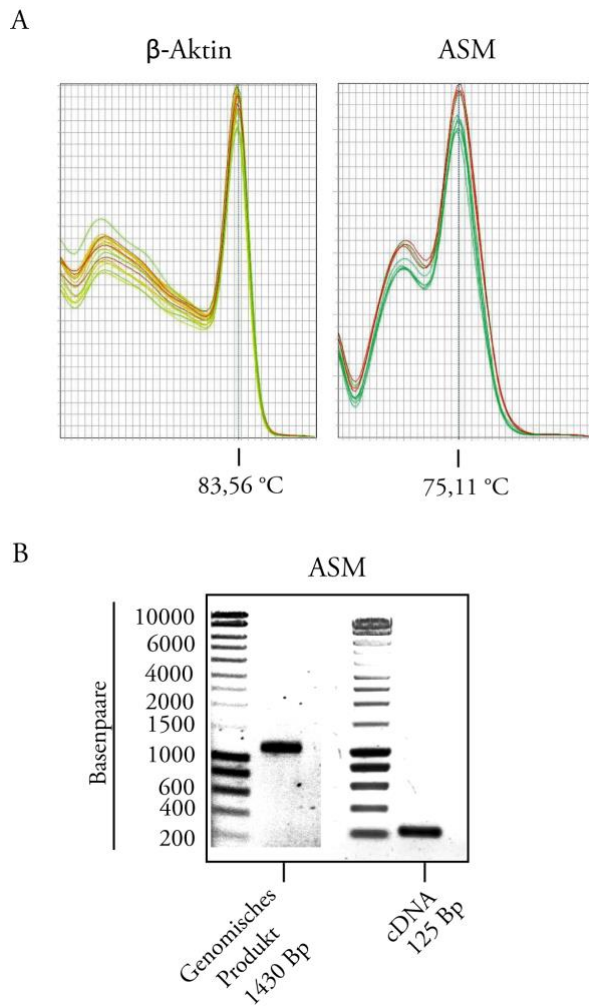


Abb. 6.4 Kontrolle Primer quantitative Real-time PCR

Vor der Analyse der ASM-Transkription in HBMEC erfolgte zuerst eine Überprüfung der Primer. Zuerst wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (A). Dabei wird die für ein DNA-Fragment spezifische Schmelztemperatur bestimmt, bei der DNA-Doppelstränge in zwei einzelsträngige Moleküle denaturieren. Weiterhin gezeigt wird die Kontrolle der Primer, welche eine Intron-Region flankieren (B).

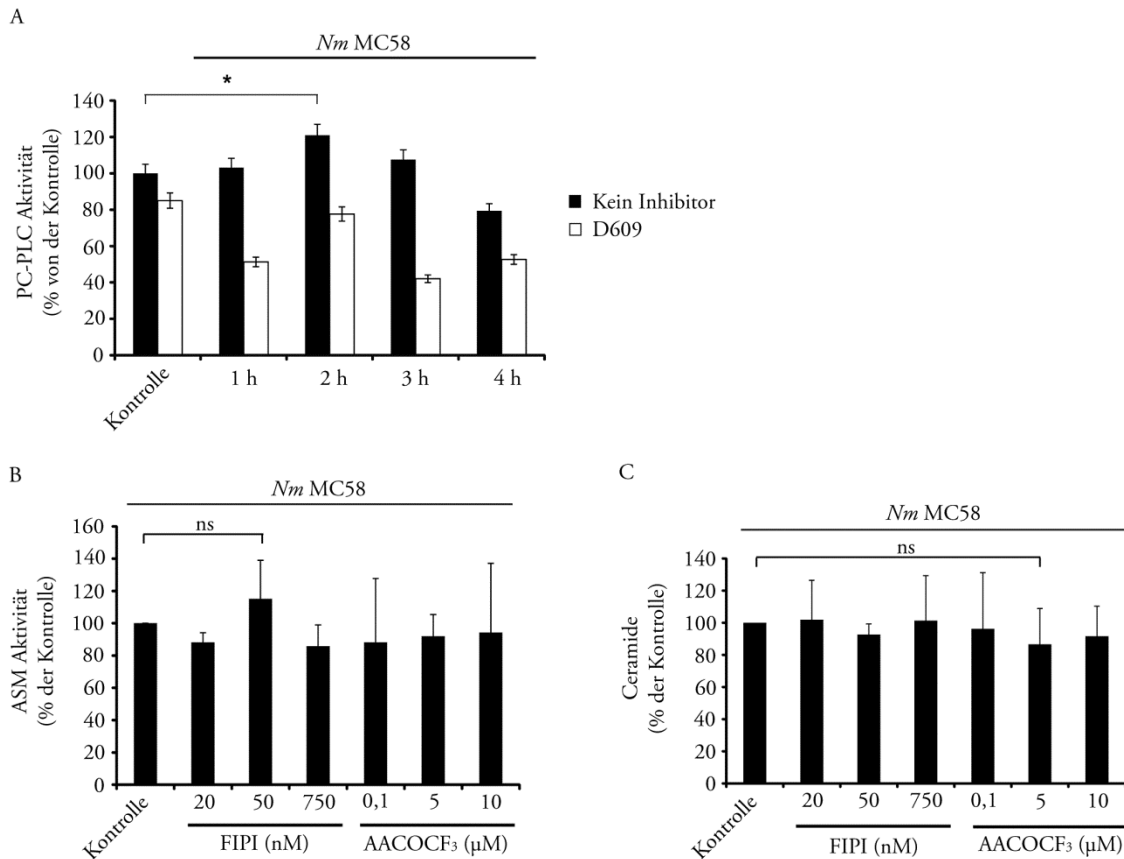


Abb. 6.5 Analyse verschiedener Phospholipasen

Gezeigt wird neben der Aktivitätsmessung der PC-PLC (A) der Einfluss der Inhibition der PLA₂ und PLD auf die ASM-Aktivität (B) und Ceramidmenge (C) an der Zelloberfläche von HBMEC. Dazu wurden HBMEC vor der Infektion mit dem SgB-Isolat MC58 mit einem spezifischen Inhibitor vorbehandelt. Als Kontrolle dienten infizierte Zellen, welche nur mit Zellkulturmedium inkubiert wurden. Für die Inhibition der Phospholipase D (PLD1 und PLD2) wurde der Inhibitor *5-Fluoro-2-Indolyl des-Chlorohalopemide* (FIPI) verwendet. Die Phospholipase A₂ wurde mit Hilfe von *Arachidonyl trifluoromethyl ketone* (AACOCF₃) inhibiert. * $p < 0,05$.

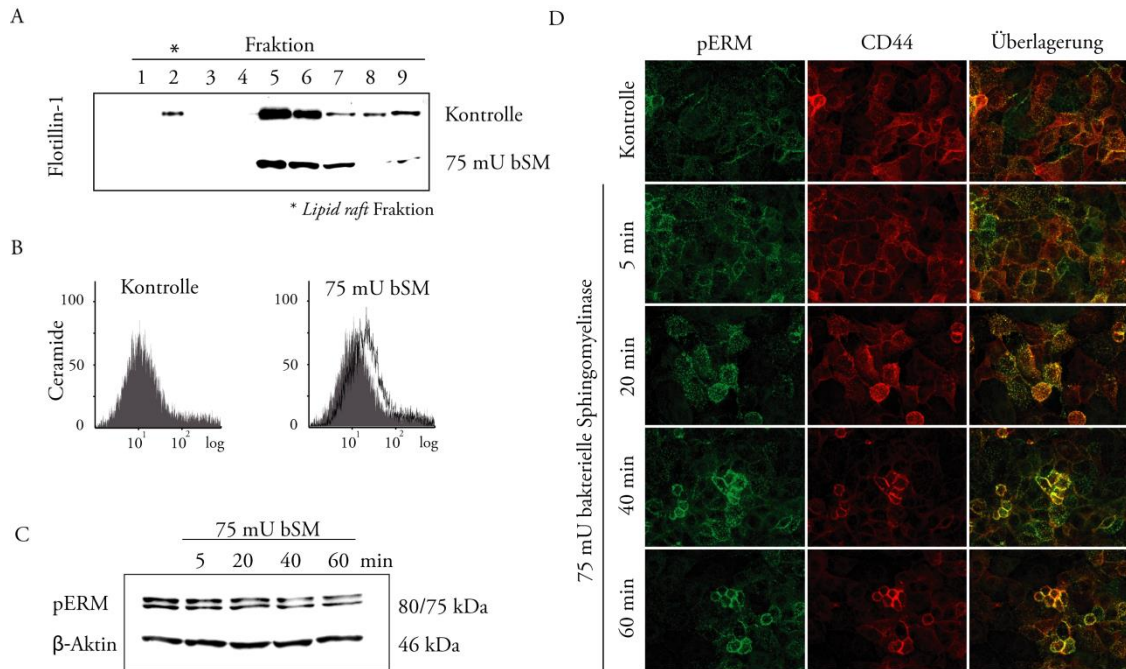


Abb. 6.6 Einfluss von bakterieller Sphingomyelinase auf die *lipid raft* Fraktion, Phosphorylierung von ERM-Proteinen und die Kolokalisation von phosphorylierten ERM Proteinen und CD44

HBMEC wurden mit 75 mU einer bakteriellen Sphingomyelinase (bSM) behandelt bzw. zur Kontrolle nur mit Zellkulturmedium inkubiert. Gezeigt ist der Flotillin-1-Nachweis in Proben, welche mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt wurden. Neben dem Einfluss der bSM auf die *lipid-raft*-Fraktion (*) ist der Einfluss auf die Ceramidmenge der Zelloberfläche (B), die ERM-Phosphorylierung (C) und die pERM-CD44 Kolokalisation im zeitlichen Verlauf gezeigt (D).

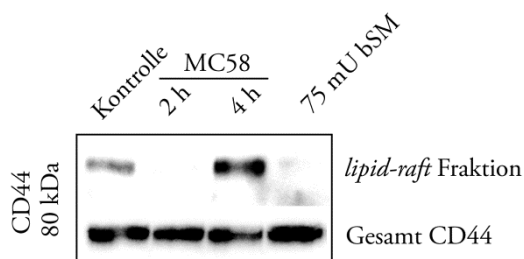


Abb. 6.7 CD44-Analyse der *lipid raft*-Fraktion

Nachdem eine Auftrennung der Zellfraktionen mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation erfolgte, wurde mit Hilfe von Western-Blot Analysen die CD44-Menge bestimmt. Verwendet wurden infizierte HBMEC (2 h bzw. 4 h p.i.), nicht-infizierte Zellen als Kontrolle sowie HBMEC, welche mit 75 mU bakterielle Sphingomyelinase (bSM) behandelt wurden. Als Kontrolle diente die Bestimmung der CD44-Menge aus allen Fraktionen zusammen.

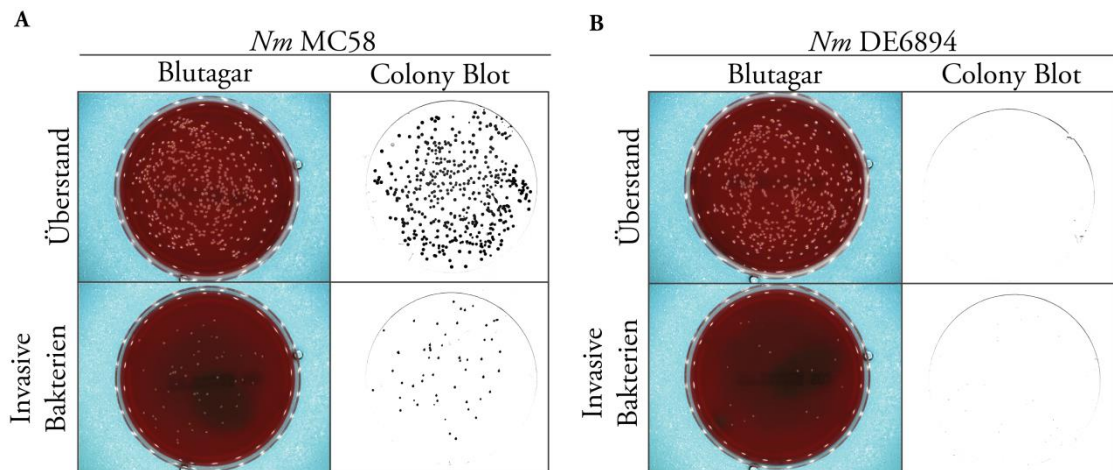


Abb. 6.8 Colony Blot zum Nachweis der Opc-Expression

Gezeigt wird die Überprüfung der Opc-Expression der beiden SgB-Isolate auf Blutagarplatten. Dafür wurden jeweils HBMEC mit einer MOI von 10 mit den beiden Isolaten für 4 h infiziert und anschließend wurde ein Gentamicin-Protektionsassay durchgeführt. Es wurden die Fraktionen des Überstandes sowie die intrazellulären Bakterien auf Blutagarplatten ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien mit Hilfe einer Nitrocellulosemembran abgezogen und die Membran wurde fixiert. Anschließend erfolgte der Nachweis des Opc-Proteins.

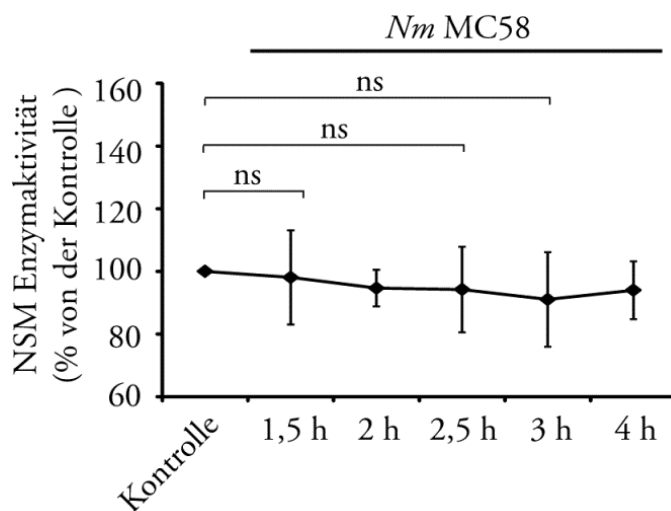


Abb. 6.9 Enzymaktivität der neutralen Sphingomyelinase in HBMEC

HBMEC wurden mit einer MOI von 10 mit dem SgB-Isolat MC58 für definierte Zeitintervalle infiziert. Anschließend erfolgte die Messung der Enzymaktivität der Neutralen Sphingomyelinase (NSM) aus Zellysate.

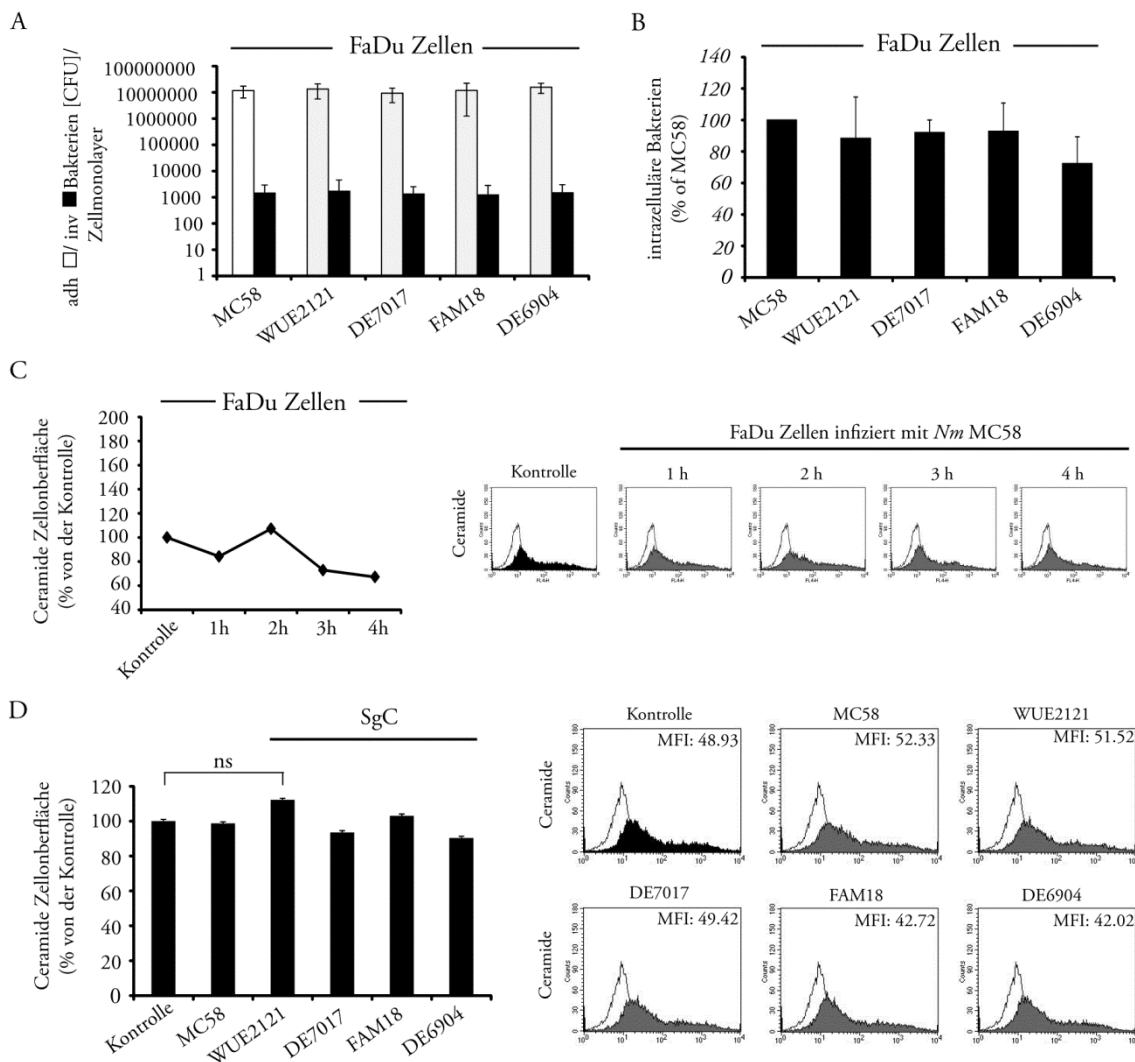


Abb. 6.10 Analyse der Infektion von humanen Pharynxepithelzellen mit *N. meningitidis*

Zellen aus dem menschlichen Hypopharynx (FaDu-Zellen) wurden mit dem SgB-Isolat MC58 bzw. mit den SgC-Isolaten WUE2121, DE7017, FAM 18 und DE6904 für 4 h infiziert. Anschließend erfolgte die Auswertung der adhärennten und intrazellulären Bakterien (A). Gezeigt wird, neben der absoluten Bakterienanzahl, auch die relative Auswertung der intrazellulären Bakterien im Verhältnis zu dem Isolat MC58 (B). Neben der Bestimmung der adhärennten und invasiven Bakterien, erfolgte die Analyse der Veränderung der Ceramidmenge während der Infektion. Einerseits für das Isolat MC58 zu verschiedenen Zeitpunkten (C), andererseits für die SgC-Isolate 2 h p.i. (D). Als Kontrolle dienten nicht-infizierte FaDu-Zellen. Neben der Auswertung von drei unabhängigen Versuchen, sind die Histogramme eines exemplarischen Versuches gezeigt.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Weichselbaum, A. (1887) Über die Ätiologie der akuten Meningitis cerebrospinalis. Fortschr Med. 5:620-626.
- [2] Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (2005) Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2: The Proteobacteria Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. New York: Springer.
- [3] Stephens, D.S. (2009) Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. Vaccine. 27 (Suppl 2): B71–7.
- [4] Roupheal, N.G., Stephens, D.S. (2012). *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology. Methods Mol Biol. 799:1-20.
- [5] Caugant, D. A., Hoiby, E.A, Magnus, P., Scheel, O., Hoel, T., Bjune, G., Wedege, E., Eng, J., Froholm, L.O. (1994) Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. J Clin Microbiol. 32: 323-330.
- [6] Cartwright, K.A., Stuart, J.M., Jones, D.M., Noah, N.D. (1987) The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. Epidemiol Infect. 99: 591-601.
- [7] Caugant, D.A., Hoiby, E.A., Rosenqvist, E., Froholm, L.O., Selander. R.K. (1992) Transmission of *Neisseria meningitidis* among asymptomatic military recruits and antibody analysis. Epidemiol Infect. 109: 241-253.
- [8] Glover, J (1998) The cerebrospinal fever epidemic of 1917 at “X” depot. J R Army Med Corps. 30:23.
- [9] Rosenstein, N.E., Perkins, B.A., Stephens, D.S., Popovic, T., Hughes, J.M. (2001) Meningococcal disease. N Engl J Med. 344(18):1378-1388.
- [10] Young, L.S., Laforce, J.J., Head, J.C., Feeley, J.V. and Benett, A. A (1979) Simultaneous outbreak of meningococcal and influenza infections. New Engl. J. Med. 287, 59.
- [11] Moore, P.S., Hierholzer, J., Dewitt, W., Gouan, K., Djore, D., Lippeveld, T., Plikaytis, B., Broome, C.V. (1990) Respiratory virus and mycoplasma as cofactors for epidemic group A meningococcal meningitis. J. Am. Med. Assoc. 264, 1271-1275.
- [12] Fischer, M., Hedberg, K., Cardosi, P. (1997). Tobacco smoke as a risk factor for meningococcal disease. Pediatr Infect Dis J. 16:979–83.
- [13] Greenwood, B. (1999) Meningococcal meningitis in Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg. 93:341–53.

- [14] Yazdankhah, S.P., Caugant, D.A. (2004) *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol.* 53: 821-832.
- [15] Lapeyssonnie, L. (1963) Cerebrospinal Meningitis in Africa. *Bull World Health Organ.* 28: SUPPL:1-114.
- [16] Tikhomirov, E., Santamaria M., Esteves, K. (1997). Meningococcal disease: public health burden and control. *World Health Stat Q.* 50: 170-177.
- [17] Cohn, A.C., MacNeil, J.R., Harrison, L.H. (2010) Changes in *Neisseria meningitidis* disease epidemiology in the United States, 1998–2007: implications for prevention of meningococcal disease. *Clin Infect Dis.* 50:184–91.
- [18] Robert-Koch-Institut, Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2014. (2015) Berlin : Robert Koch-Institut, 978-3-89606-263-5.
- [19] Sharip, A., Sorvillo, F., Redelings, M.D. (2006) Population-based analysis of meningococcal disease mortality in the United States: 1990–2002. *Pediatr Infect Dis J.* 25:191–4.
- [20] Tzeng, Y.L., Stephens D.S. (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microbes Infect.* 2: 687-700.
- [21] Chaudhuri, A. (2004) Adjunctive Dexamethasone Treatment in Acute Bacterial Meningitis. *The Lancet Neurology.* 3.1: 54-62.
- [22] Van de Beek, D., de Gans, J., Spanjaard, L., Weisfelt, M., Reitsma, J.B., Vermeulen, M. (2004) Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med.* 351(18):1849-1859.
- [23] Brandtzaeg, P., Dahle, J.S., Høiby, E.A. (1983) The occurrence and features of hemorrhagic skin lesions in 115 cases of systemic meningococcal disease. *NIPH Ann.* 6(2):183-90, 202-3.
- [24] Kirsch, E.A., Barton, R.P., Kitchen, L., Giroir, B.P. (1996) Pathophysiology, treatment and outcome of meningococemia: a review and recent experience. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 15 (11): 967–78.
- [25] Waterhouse, R. (1911) A case of suprarenal apoplexy. *Lancet.* 1 (4566): 577–8.
- [26] Adem, P., Montgomery, C., Husain, A., Koogler, T., Arangelovich, V., Humilier, M., Boyle-Vavra, S., Daum, R. (2005) *Staphylococcus aureus* sepsis and the Waterhouse-Friderichsen syndrome in children. *N Engl J Med.* 353 (12): 1245–51.
- [27] Romero-Gomez, M.P., Renteroa, Z., Pañob, J.R., Mingorancea, J. (2012) Bacteraemic pneumonia caused by *Neisseria meningitidis* serogroup Y. *Respiratory Medicine Case Reports.* Vol. 5, 23–24.

- [28] Razminia, M., Salem, Y., Elbzour, M., Deshmukh, H., Khosla, S. (2005) Importance of early diagnosis and therapy of acute meningococcal myocarditis: a case report with review of literature. *Am J Ther.* May-Jun;12(3):269-71.
- [29] Mattila, P.S., Carlson, P. (1998) Pharyngolaryngitis caused by *Neisseria meningitidis*. *Scand J Infect Dis.* 30(2):198-200.
- [30] Frasch, C.E., Zollinger, W.D., Poolman, J.T. (1985) Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis.* Jul-Aug; 7(4):504-10.
- [31] Branham, S. (1953) Serological relationships among meningococci. *Bact Rev.* 17:175–88.
- [32] Jackson LA, Schuchat A, Reeves MW, Wenger JD. Serogroup C meningococcal outbreaks in the United States. An emerging threat. *JAMA.* 273:383–9., 1995.
- [33] Hart, C.A., Cuevas, L.E. (1997) Meningococcal disease in Africa. *Ann Trop Med Parasitol.* 91:777–85.
- [34] Snape, M.D., Pollard, A.J. (2005) Meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Lancet Infect Dis.* 5:21–30.
- [35] Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:3140–5.
- [36] Yazdankhah, S.P., Kriz, P., Tzanakaki, G., Kremastinou, J., Kalmusova, J. (2004) Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. *J Clin Microbiol.* 42: 5146–5153.
- [37] Jolley, K.A., Kalmusova, J., Feil, E.J., Gupta, S., Musilek, M. (2000) Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. *J Clin Microbiol.* 38: 4492–4498.
- [38] Claus, H., Maiden, M.C., Wilson, D.J., McCarthy, N.D., Jolley, K.A. (2005) Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis.* 191: 1263–1271.
- [39] Siamak, P., Yazdankhah, P.K., Tzanakaki, G., Kremastinou, J., Kalmusova, J., Musilek, M., Alvestad, T., Jolley, K.A., Wilson, D.J., McCarthy, N.D., Caugant, A.D., Maiden, M.C. (2004) Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. *J Clin Microbiol.* 42:5146–53.

- [40] Feil, E.J., Maiden, M.C., Achtman, M., Spratt, B.G. (1999) The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria*. *Mol Biol Evol.* . Nov;16(11):1496-502.
- [41] Whalen, C.M., Hockin, J.C., Ryan, A., Ashton, F. (1995) The changing epidemiology of invasive meningococcal disease in Canada, 1985 through 1992. Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis*. *Jama.* 273: 390–394.
- [42] Kriz, P., Vlckova, J., Bobak, M. (1995) Targeted vaccination with meningococcal polysaccharide vaccine in one district of the Czech Republic. *Epidemiol Infect.* 115: 411–418.
- [43] Hammerschmidt, S., Müller, A., Sillmann, H., Mühlenhoff, M., Borrow, R., van Putten, J., Zollinger, W.D., Gerardy-Schahn, R., Frosch, M. (1996) Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol. Microbiol.* 20,1211–1220.
- [44] Deghmane, A.E., Giorgini, D., Larribe, M., Alonso, J.M., Taha, M.K. (2002) Down-regulation of pili and capsule of *Neisseria meningitidis* upon contact with epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein. *Mol. Microbiol.* 43, 1555–1564.
- [45] Diaz, R.J., Outschoorn, I.M. (1994) Current status of meningococcal group B vaccine candidates: capsular or noncapsular? . *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 559–575.
- [46] Uria, M.J., Zhang, Q., Li, Y., Chan, A., Exley, R.M., Gollan, B., Chan, H., Feavers, I., Yarwood, A., Abad, R., Borrow, R., Fleck, R.A., Mulloy, B., Vazquez, J.A., Tang, C.M. (2008) A generic mechanism in *Neisseria meningitidis* for enhanced resistance against bactericidal antibodies. *J Exp Med.* 205:1423–34.
- [47] Virji, M. (2009) Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nat Rev Microbiol.* Apr;7(4):274-86.
- [48] Raetz, C.R., Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 635–700.
- [49] Kahler, C.M., Stephens, D.S. (1998) Genetic basis for biosynthesis, structure, and function of meningococcal lipooligosaccharide (endotoxin). *Crit Rev Microbiol.* 24:281–334.
- [50] Plant, L., Sundqvist, J., Zughaier, S., Lövkvist, L., Stephens, D.S., Jonsson, A.B. (2006) Lipooligosaccharide structure contributes to multiple steps in the virulence of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* 74:1360–7.
- [51] Virji, M., Saunders, J.R., Sims, G., Makepeace, K., Maskell, D., Ferguson, D.J. (1993) Pilus-facilitated adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and

- endothelial cells: modulation of adherence phenotype occurs concurrently with changes in primary amino acid sequence and the glycosylation status of Pilin. *Mol. Microbiol.* 10, 1013–1028.
- [52] Craig, L., Pique, M.E., Tainer, J.A. (2004) Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology.* 2, 363–378.
- [53] Pinner, R.W., Spellman, P.A., Stephens, D.S. (1991) Evidence for functionally distinct pili expressed by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* 59:3169–75.
- [54] Merz, A.J., So, M. (2000) Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16:423–57.
- [55] Proft, T., Baker, E.N. (2009) Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria – structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci.* 66:613–35.
- [56] Stern, A., Brown, M., Nickel, P., Meyer, T.F. (1986) Opacity genes in *Neisseria gonorrhoeae*: control of phase and antigenic variation. *Cell.* 47, 61–71.
- [57] Prince, S.M., Achtman, M., Derrick, J.P. (2002) Crystal structure of the OpcA integral membrane adhesion from *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 99, 3417–3421.
- [58] Virji, M., Watt, S.M., Barker, S., Makepeace, K., Doyonnas, R. (1996) The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol.* 22:929–39.
- [59] Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D.J., Achtman, M., Sarkari, J., Moxon, E.R. (1992) Expression of the Opc protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 6:2785–95.
- [60] Sarkari, J., Pandit, N., Moxon, E.R., Achtman, M. (1994) Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine. *Mol Microbiol.* 13(2):207-17.
- [61] Comanducci, M., Bambini, S., Brunelli, B., Adu-Bobie, J., Aricò, B., Capecchi, B., Giuliani, M.M., Massignani, V., Santini, L., Savino, S., Granoff, D.M., Caugant, D.A., Pizza, M., Rappuoli, R., Mora, M. (2002) NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J. Exp. Med.* 195, 1445–1454.
- [62] Scarselli, M., Serruto, D., Montanari, P., Capecchi, B., Adu-Bobie, J., Veggi, D., Rappuoli, R., Pizza, M., Aricò, B. (2006) *Neisseria meningitidis* NhhA is a multifunctional trimeric autotransporter adhesin. *Mol. Microbiol.* 61, 631–644.
- [63] Peak, I.R., Srikhanta, Y., Dieckelmann, M., Moxon, E.R., Jennings, M.P. (2000) Identification and characterisation of a novel conserved outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 28(4):329-34.

- [64] Weinberg, E.D. (1974) Iron and susceptibility to infectious disease. *Science* 184: 952-956.
- [65] Gray-Owen, S.D., Schryvers, A.B. (1996) Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol.* 4:185-191.
- [66] Virji, M., Makepeace, K., Peak, I.R., Ferguson, D.J., Jennings, M.P., Moxon, E.R. (1995) Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol. Microbiol.* 18, 741–754.
- [67] Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D.J. P., Achtman, M., Moxon, E.R. Meningococcal Opa and Opc proteins- their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial-cells. *Infect. Immun.* 59, 3169–3175.
- [68] Heckels, J.E., Blackett, B., Everson, J.S., Ward, M.E. (1976) The influence of surface charge on the attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to human cells. *J. Gen. Microbiol.* 96, 359–364.
- [69] Källström, H., Blackmer, G.D., Albiger, B., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., Jonsson, A.B. (2001) Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence. *Cell. Microbiol.* 3, 133–143.
- [70] Kirchner, M., Heuer, D., Meyer, T.F. (2005) CD46-independent binding of neisserial type IV pili and the major pilus adhesin, PilC, to human epithelial cells. *Infect Immun.* . 73(5):3072-82.
- [71] Tobiason, D.M., Seifert, H.S. (2001) Inverse relationship between pilus-mediated gonococcal adherence and surface expression of the pilus receptor, CD46. *Microbiology.* 147(Pt 8):2333-40.
- [72] Bernard, S.C., Simpson, N., Join-Lambert, O., Federici, C., Laran-Chich, M.P., Maïssa, N., Bouzinba-Ségard, H., Morand, P.C., Chretien, F., Taouji, S., Chevet, E., Janel, S., Lafont, F., Coureuil, M., Segura, A., Niedergang, F., Marullo, S., Couraud, P.O., Nassif, X., Bourdoulous, S. (2014) Pathogenic *Neisseria meningitidis* utilizes CD147 for vascular colonization. *Nat Med.* . 20(7):725-31.
- [73] van Putten, J.P., Paul, S.M. (1995) Binding of syndecan-like cell surface proteoglycan receptors is required for *Neisseria gonorrhoeae* entry into human mucosal cells. *EMBo J.* 14, 2144–2154.
- [74] de Vries, F.P., Cole, R., Dankert, J., Frosch, M., van Putten, J.P. (1998) *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Mol Microbiol.* 27(6):1203-12.

- [75] Sarrazin, S., Lamanna, W.C., Jeffrey, D.E. (2011) Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(7): a004952.
- [76] Estabrook, M.M., Griffiss, J.M., Jarvis, G.A. (1997) Sialylation of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-N-neotetraose. *Infect Immun.* 65:4436–4.
- [77] Zimmer, S.M., Stephens, D.S. (2006) Serogroup B meningococcal vaccines. *Curr Opin Investig Drugs.* 7:733–9.
- [78] Opal, S.M. (2006) Endotoxins and other sepsis triggers. *C. Nephrol.* 167:14–24.
- [79] Reese, T.S., Karnovsky, M.J. (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol.* 34(1):207–217.
- [80] Rubin, L.L., Staddon, J.M. (1999) The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci.* 22:11–28
- [81] González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., Jaramillo, B.E. (2003) Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 81(1):1–44.
- [82] Engelhardt, B., Sorokin, L. (2009) The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol.* 31(4):497–511.
- [83] Unkmeir, A., Latsch, K., Dietrich, G., Wintermeyer, E., Schinke, B., Schwender, S., Kim, K.S., Eigenthaler, M., Frosch, M. (2002) Fibronectin mediates Opc dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol. Microbiol.* 46, 933–946.
- [84] Virji, M., Makepeace, K., Moxon, E.R. (1994) Distinct mechanisms of interactions of Opc-expressing meningococci at apical and basolateral surfaces of human endothelial-cells — the role of integrins in apical interactions. *Mol. Microbiol.* . 14, 173–184.
- [85] Sokolova, O., Heppel, N., Jägerhuber, R., Kim, K.S., Frosch, M., Eigenthaler, M., Schubert-Unkmeir, A. (2004) Interaction of *Neisseria meningitidis* with human brain microvascular endothelial cells: role of MAP- and tyrosine kinases in invasion and inflammatory cytokine release. *Cell Microbiol.* 6(12):1153–66.
- [86] Slanina, H., Hebling, S., Hauck, C.R., Schubert-Unkmeir, A. (2012) Cell invasion by *Neisseria meningitidis* requires a functional interplay between the focal adhesion kinase, Src and cortactin. *PLoS One.* 7(6):e39613.
- [87] Slanina, H., Mündlein, S., Hebling, S., Schubert-Unkmeir, A. (2014) Role of epidermal growth factor receptor signaling in the interaction of *Neisseria meningitidis* with endothelial cells. *Infect Immun.* 82(3):1243–55.

- [88] Bublil, E.M., Yarden, Y. (2007) The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19 (2): 124–134.
- [89] Merz, A.J., Enns, C.A., So, M. (1999) Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells. *Mol Microbiol.* 32(6):1316-32.
- [90] Eugène, E., Hoffmann, I., Pujol, C., Couraud, P.O., Bourdoulous, S., Nassif, X. (2002) Microvilli-like structures are associated with the internalization of virulent capsulated *Neisseria meningitidis* into vascular endothelial cells. *J Cell Sci.* 15;115(Pt 6):1231-41.
- [91] Bretscher, A., Edwards, K., Fehon, R.G. (2002) ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8 (8): 586–99.
- [92] Chishti, A.H., Kim, A.C., Marfatia, S.M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S.C., Low, P.S., Rouleau, G.A., Mohandas, N., Chasis, J.A., Conboy, J.G., Gascard, P., Takakuwa, Y., Huang, S.C., Benz, E.J., Bretscher, A., Fehon, R.G., Gusella, J.F., Ramesh, V., Solomon, F., Marchesi, V.T., Tsukita, S. (1998) The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem. Sci.* 23 (8): 281–2.
- [93] Tony, N., Parson, M., William, E.H., Monypenny, J., Zicha, D., Gautreau, A., Arpin, M., Gschmeissner, S., Verveer, P.J., Bastiaens, P.I., Parker, P.J. (2001) Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC–integrin complexes involved in the control of cell motility. *EMBO.* Jun 1; 20(11): 2723–2741.
- [94] Hoffmann, I., Eugène, E., Nassif, X., Couraud, P.O., Bourdoulous, S. (2001) Activation of ErbB2 receptor tyrosine kinase supports invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *J Cell Biol.* Oct 1;155(1):133-43.
- [95] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. (2002) *Molecular Biology of the Cell.* New York: Garland Science.
- [96] Singer, S.J., Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175: 720–731.
- [97] Nagle, J.F., Tristram-Nagle, S. (2000) Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 1469 (3): 159–95.
- [98] Bretscher, M.S. (1972) Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nature.* 236 (61): 11–12.
- [99] Hollenberg, M.D. (1991) Structure–activity relationships for transmembrane signaling: the receptor's turn. *FASEB J.* 5 178–186.
- [100] Todeschini, A.R., Hakomori, S.I. (2008) Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, growth, through glycosynaptic microdomains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1780; 421–433.

- [101] Futerman, A.H., Hannun, Y.A. (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO J.* 5: 777–782.
- [102] Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L.S. (2004) *Molecular Cell Biology* 4. Auflage. New York: Scientific American Books.
- [103] Simons, K., Ehehalt, R. (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *Journal of Clinical Investigation.* 110 (5): 597–603.
- [104] Kim, K.B., Lee, J.S., Ko, Y.G. (2008) *Methods in molecular biology: The isolation of detergent-resistant lipid rafts for two-dimensional electrophoresis.* S. 413–422.
- [105] Korade, Z., Kenworthy, A.K. (2008) Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology.* 55 (8): 1265–73.
- [106] IJen, J.A., Halverson-Tamboli, R.A., Rasenick, M.M. (2006) Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nature Reviews Neuroscience.* 8 (2): 128–40.
- [107] Pike, L.J. (2008) The challenge of lipid rafts. *J of Lipid Research.* 50: S. 323.
- [108] Field, K.A., Holowka, D., Baird, B. (1995) FcεRI-Mediated Recruitment of p53/56lyn to Detergent-Resistant Membrane Domains Accompanies Cellular Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 (20): 9201–5.
- [109] Sheets, E.D., Holowka, D., Baird, B. (1999) Membrane organization in immunoglobulin E receptor signaling. *Cur Op in Chemical Biology.* 3 (1): 95–9.
- [110] Brdička, T., Černý, J., Hořejší, V. (1998) T Cell Receptor Signalling Results in Rapid Tyrosine Phosphorylation of the Linker Protein LAT Present in Detergent-Resistant Membrane Microdomains. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 248 (2): 356–60.
- [111] Munro, S. (2009) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell.* 115 (4): 377–88.
- [112] Dickson, R.C. (1998) Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison to mammals. *Annual Review of Biochemistry.* 67, 27-48.
- [113] Morad, S.A., Cabot, M.C. (2013) Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nature Reviews Cancer.* 13, 51-65.
- [114] Goñi, F.M., Alonso, A. (2002) Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett.* 30;531(1):38-46.
- [115] Hanada, K. (2010) Intracellular trafficking of ceramide by ceramide transfer protein. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86(4): 426–437.
- [116] Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J., Hannun, Y.A. (2008) The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signaling.* 30 (6): 1010–1018.

- [117] Bose, R., Verheij, M., Haimovitz-Friedman, A., Scotto, K., Fuks, Z., Kolesnick, R. (1995) Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell*. Aug 11;82(3):405-14.
- [118] Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., Sánchez, C., Haro, A., Guzmán, M. (2002) De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem J*. 1;363(Pt 1):183-8.
- [119] Jenkins, G.M., Cowart, L.A., Signorelli, P., Pettus, B.J., Chalfant, C.E., Hannun, Y.A. (2002) Acute activation of de novo sphingolipid biosynthesis upon heat shock causes an accumulation of ceramide and subsequent dephosphorylation of SR proteins. *J Biol Chem*. 8;277(45):42572-8.
- [120] Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., Bayoumy, S., Garzotto, M., McLoughlin, M., Gallily, R., Edwards, C.K., Schuchman, E.H., Fuks, Z., Kolesnick, R. (1997) Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med*. 186(11):1831-41.
- [121] Grassmé, H., Gulbins, E., Brenner, B., Ferlinz, K., Sandhoff, K., Harzer, K., Lang, F., Meyer, T.F. (1997) Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into nonphagocytic cells. *Cell*. Nov 28;91(5):605-15.
- [122] Goldkorn, T., Balaban, N., Shannon, M., Chea, V., Matsukuma, K., Gilchrist, D., Wang, H., Chan, C. (1998) H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci*. 111:3209-20.
- [123] Kim, M.Y., Linardic, C., Obeid, L., Hannun, Y. (1991) Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. *J Biol Chem*. 5;266(1):484-9.
- [124] Brenner, B., Ferlinz, K., Grassmé, H., Weller, M., Koppenhoefer, U., Dichgans, J., Sandhoff, K., Lang, F., Gulbins, E. (1998) Fas/CD95/Apo-I activates the acidic sphingomyelinase via caspases. *Cell Death Differ*. 5(1):29-37.
- [125] Hait, N.C., Oskeritzian, C.A., Paugh, S.W., Milstien, S., Spiegel, S. (2006) Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1758(12):2016-26.
- [126] Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A., Hannun, Y.A. (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science*. 259, 1769-1771.
- [127] Venable, M.E. (1995) Role of ceramide in cellular senescence. *J. Biol. Chem*. 270 (51): 30701-30708.

- [128] Holopainen, J.M., Subramanian, M., Kinnunen, P.K. (1998) Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane. *Biochemistry* . 37: 17562–17570.
- [129] Kolesnick, R.N., Goni, F.M., Alonso, A. (2000) Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J. Cell. Physiol.* 184: 285–300.
- [130] Bollinger, C.R., Teichgräber, V., Gulbins, E. (2005) Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim Biophys Acta.* 30;1746(3):284-94.
- [131] Grassme', H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., Gulbins, E. (2001) CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 276: 20589– 20596.
- [132] Samet, D., Barenholz, Y. (1999) Characterization of acidic and neutral sphingomyelinase activities in crude extracts of HL-60 cells. *Chem Phys Lipids.* 102(1-2):65-77.
- [133] Jenkins R.W., Canals, D., Hannun, Y.A. (2009) Roles and Regulation of Secretory and Lysosomal Acid Sphingomyelinase. *Cell Signal.* 21(6): 836–846.
- [134] Titball, R.W. (1993) Bacterial phospholipases C. *Microbiol Rev.* 57(2):347-66.
- [135] Zückert, W.R., Marquis, H., Goldfine, H. (1998) Modulation of Enzymatic Activity and Biological Function of *Listeria monocytogenes* Broad-Range Phospholipase C by Amino Acid Substitutions and by Replacement with the *Bacillus cereus*. *Infect Immun.* 66(10): 4823–4831.
- [136] Huseby, M., Shi, K., Brown, C.K., Digre, J., Mengistu, F., Seo, K.S., Bohach, G.A., Schlievert, P.M., Ohlendorf, D.H., Earhart, C.A. (2007) Structure and Biological Activities of Beta Toxin from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 189(23): 8719–8726.
- [137] Duan, R.D., Bergman, T., Xu, N., Wu, J., Cheng, Y., Duan, J., Nelander, S., Palmberg, C., Nilsson, A. (2003) Identification of human intestinal alkaline sphingomyelinase as a novel ecto-enzyme related to the nucleotide phosphodiesterase family. *J Biol Chem.* 278 (40): 38528–36.
- [138] Duan, R.D., Nyberg, L., Nilsson, A. (1995) Alkaline sphingomyelinase activity in rat gastrointestinal tract: distribution and characteristics. *Biochim. Biophys. Acta.* 1259 (1): 49–55.
- [139] Nyberg, L., Nilsson, Å., Lundgren, P., Duan, R-D. (1997) Localization and capacity of sphingomyelin digestion in the rat intestinal tract. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 8 (3): 112–118.

- [140] Hertervig, E., Nilsson, A., Nyberg, L., Duan, R.D. (1997) Alkaline sphingomyelinase activity is decreased in human colorectal carcinoma. *Cancer*. 79 (3): 448–53.
- [141] Andersson, D., Kotarsky, K., Wu, J., Agace, W., Duan, R.D. (2009) Expression of alkaline sphingomyelinase in yeast cells and anti-inflammatory effects of the expressed enzyme in a rat colitis model. *Dig. Dis. Sci.* 54 (7): 1440–8.
- [142] Adam, D., Wiegmann, K., Adam-Klages, S., Ruff, A., Krönke, M. (1996) A novel cytoplasmic domain of the p53 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway. *J. Biol. Chem.* 271: 14617.
- [143] Faulstich, M., Hagen, F., Avota, E., Kozjak-Pavlovic, V., Winkler, A.C., Xian, Y., Schneider-Schaulies, S., Rudel, T. (2015) Neutral sphingomyelinase 2 is a key factor for PorB-dependent invasion of *Neisseria gonorrhoeae*. *Cell Microbiol.* 17(2):241-53.
- [144] Barnholz, Y., Roitman, A., Gatt, S. (1966) Hydrolysis of sphingomyelin by an enzyme from rat brain. *J. Biol. Chem.* . 241: 3731-3737.
- [145] Kornfeld, S. (1987) Trafficking of lysosomal enzymes. . *FASEB J.* 1(6):462–8.
- [146] Schuchman, E.H. (2010) Acid sphingomyelinase, cell membranes and human disease: lessons from Niemann-Pick disease. *FEBS Lett.* 3;584(9):1895-900.
- [147] McGovern, M.M. (2006) Natural history of Type A Niemann-Pick disease: possible endpoints for therapeutic trials. *Neurology.* 66(2):228–32.
- [148] Schuchman, E.H., Desnick, R.J. (2000) Niemann-Pick disease types A and B: acid sphingomyelinase deficiencies. Beaudet, A.L., Scriver, C.R. *The metabolic and molecular basis of inherited disease* 8. Auflage. New York: McGraw-Hill.
- [149] Linke, T., Wilkening, G., Lansmann, S., Moczall, H., Bartelsen, O., Weisgerber, J., Sandhoff, K. (2001) Stimulation of acid sphingomyelinase activity by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *Biol Chem.* 382(2):283-90.
- [150] Cremesti, A., Paris, F., Grassme', H., Holler, N., Tschopp, J., Fuks, Z., Gulbins, E., Kolesnick, R. (2001) Ceramide enables fas to cap and kill. *J. Biol. Chem.* 276: 23954– 23961.
- [151] Lin, T., Genestier, L., Pinkoski, M.J., Castro, A., Paris, F., Fuks, Z., Schuchman, E.H., Kolesnick, R.N., Green, D.R. (2000) Role of acidic sphingomyelinase in Fas/CD95-mediated cell death. *J Biol Chem.* 275(12):8657–63.
- [152] García-Ruiz, C., Colell, A., Marí, M., Morales, A., Calvo, M., Enrich, C., Fernández-Checa, J.C. (2003) Defective TNF-alpha-mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J Clin Invest.* . 111(2):197-208.

- [153] Santana, P., Peña, L.A., Haimovitz-Friedman, A., Martin, S., Green, D., McLoughlin, M., Cordon-Cardo, C., Schuchman, E.H., Fuks, Z., Kolesnick, R. (1996) Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell*. 86(2):189–99.
- [154] Rebillard, A., Rioux-Leclercq, N., Muller, C., Bellaud, P., Jouan, F., Meurette, O., Jouan, E., Vernhet, L., Le Quément, C., Carpinteiro, A., Schenck, M., Lagadic-Gossmann, D., Gulbins, E., Dimanche-Boitrel, M.T. (2008) Acid sphingomyelinase deficiency protects from cisplatin-induced gastrointestinal damage. *Oncogene*. 20;27(51):6590-5.
- [155] Pavoine, C., Pecker, F. (2009) Sphingomyelinases: their regulation and roles in cardiovascular pathophysiology. *Cardiovasc Res*. 1;82(2):175-83.
- [156] Zhang, Y., Li, X., Carpinteiro, A., Gulbins, E. (2008) Acid sphingomyelinase amplifies redox signaling in *Pseudomonas aeruginosa*-induced macrophage apoptosis. *J Immunol*. 15;181(6):4247-54.
- [157] Grassmé, H., Riehle, A., Wilker, B., Gulbins, E. (2005) Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms. *J Biol Chem*. Jul 15;280(28): 26256-62.
- [158] Avota, E., Gulbins, E., Schneider-Schaulies, S. (2011) DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells. *PLoS Pathog*. 7(2):e1001290.
- [159] Hauck, C.R., Grassmé, H., Bock, J., Jendrossek, V., Ferlinz, K., Meyer, T.F., Gulbins, E. (2000) Acid sphingomyelinase is involved in CEACAM receptor-mediated phagocytosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS Lett*. 478:260–266.
- [160] Grassmé, H., Kirschnek, S., Riethmueller, J., Riehle, A., von Kürthy, G., Lang, F., Weller, M., Gulbins, E. (2000) CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*. 20;290(5491):527-30.
- [161] Gulbins, E., Li, P.L. (2006) Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 290(1):R11-26.
- [162] Stins, M.F., Gilles, F., Kim, K.S. (1997) Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol*. 76(1-2):81-90.
- [163] McGuinness, B.T., Clarke, I.N., Lambden, P.R., Barlow, A.K., Poolman, J.T., Jones, D.M., Heckels, J.E. (1991) Point mutation in meningococcal por A gene associated with increased endemic disease. *Lancet*. 2;337(8740):514-7.
- [164] Joseph, B., Schwarz, R.F., Linke, B., Blom, J., Becker, A., Claus, H., Goesmann, A., Frosch, M., Müller, T., Vogel, U., Schoen, C. (2001) Virulence Evolution of

- the Human Pathogen *Neisseria meningitidis* by Recombination in the Core and Accessory Genome. *PLoS One*. 26;6(4):e18441.
- [165] Brehony, C., Jolley, K.A., Maiden, M.C. (2007) Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol Rev*. 31: 15–26.
- [166] Vogel, U., Morelli, G., Zurth, K., Claus, H., Kriener, E., Achtman, M., Frosch, M. (1998) Necessity of molecular techniques to distinguish between *Neisseria meningitidis* strains isolated from patients with meningococcal disease and from their healthy contacts. *J Clin Microbiol*. 36(9):2465-70.
- [167] Bentley, S.D., Vernikos, G.S., Snyder, L.A., Churcher, C., Arrowsmith, C., Chillingworth, T., Cronin, A., Davis, P.H., Holroyd, N.E., Jagels, K., Maddison, M., Moule, S., Rabinowitsch, E., Sharp, S., Unwin, L., Whitehead, S., Quail, M.A., Achtman, M., Barrell, B., Saunders, N.J., Parkhill, J. (2007) Meningococcal genetic variation mechanisms viewed through comparative analysis of serogroup C strain FAM18. *PLoS Genet*. 16;3(2):e23.
- [168] Schielke, S., Huebner, C., Spatz, C., Nägele, V., Ackermann, N., Frosch, M., Kurzai, O., Schubert-Unkmeir, A. (2009) Expression of the meningococcal adhesin NadA is controlled by a transcriptional regulator of the MarR family. *Mol Microbiol*. 72(4):1054-67.
- [169] Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*. 5;189(1):113-30.
- [170] Simonis, A., Hebling, S., Gulbins, E., Schneider-Schaulies, S., Schubert-Unkmeir, A. (2014) Differential activation of acid sphingomyelinase and ceramide release determines invasiveness of *Neisseria meningitidis* into brain endothelial cells. *PLoS Pathog*. 12;10(6):e1004160.
- [171] Lu, M.L., McCarron, R.J., Jacobson, B.S. (1992) Initiation of HeLa cell adhesion to collagen is dependent upon collagen receptor upregulation, segregation to the basal plasma membrane, clustering and binding to the cytoskeleton. *J Cell Sci*. 101 (Pt 4):873-83.
- [172] Mahoney, W.C., Kurachi, K., Hermodson, M.A. (1980) Formation and Dissociation of the Covalent Complexes Between Trypsin and Two Homologous Inhibitors, α 1-Antitrypsin and Antithrombin III. *European Journal of Biochemistry*. 105; 3, 545–552.
- [173] Fulwyler, M.J. (1965) Electronic separation of biological cells by volume. *Science*. 150 (3698): 910–911.
- [174] Julius, M.H., Masuda, T., Herzenberg, L.A. (1972) Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69 (7): 1934–8.

- [175] Ostrom, R.S., Liu, X. (2007) Detergent and detergent-free methods to define lipid rafts and caveolae. *Methods Mol Biol.* 400:459-68.
- [176] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 19;391(6669):806-11.
- [177] Saiki, R. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239 (4839): 487–491.
- [178] Adibhatla, R.M. (2012) Tricyclodecan-9-yl-xanthogente (D609) mechanism of actions: a Mini-review of literature. *Neurochem Res.* 37(4): 671-679.
- [179] Schutze, S., Potthoff, K., Machleidt, T., Berkovic, D., Wiegmann, K. (1992) TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced “acidic” sphingomyelin breakdown. *Cell.* 71: 765–776.
- [180] Grassmé, H., Jendrossek, V., Bock, J., Riehle, A., Gulbins, E. (2002) Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J Immunol.* . 1;168(1):298-307.
- [181] Goodison, S., Urquidi, V., Tarin, D. (1999) CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol.* . 52(4): 189–196.
- [182] Pályi-Krek, Z., Barok, M., Kovács, T., Saya, H., Nagano, O., Szöllosi, J., Nagy, P. (2008) EGFR and ErbB2 are functionally coupled to CD44 and regulate shedding, internalization and motogenic effect of CD44. *Cancer Lett.* 18;263(2):231-42.
- [183] Stapleton, G., Malliri, A., Ozanne, B.W. (2002) Downregulated AP-1 activity is associated with inhibition of Protein-Kinase-C-dependent CD44 and ezrin localisation and upregulation of PKC theta in A431 cells. *J Cell Sci.* 115, 2713-2724.
- [184] Roy, V., Perez, E.A. (2009) Beyond trastuzumab: small molecule tyrosine kinase inhibitors in HER-2-positive breast cancer. *Oncologist.* 14(11):1061-9.
- [185] Megha, L.E. (2004) Ceramide Selectively Displaces Cholesterol from Ordered Lipid Domains (Rafts). *The Journal of Biological Chemistry.* 279, 9997-10004.
- [186] Yu, C., Alterman, M., Dobrowsky, R.T. (2005) Ceramide displaces cholesterol from lipid rafts and decreases the association of the cholesterol binding protein caveolin-1. *The Journal of Lipid Research.* 46, 1678-1691.
- [187] Donatello, S., Babina, I.S., Hazelwood, L.D., Hill, A.D., Nabi, I.R., Hopkins, A.M. (2012) Lipid raft association restricts CD44-ezrin interaction and promotion of breast cancer cell migration. *Am J Pathol.* . 181(6):2172-87.

- [188] Dermine, J.F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R.G., Desjardins, M. (2001) Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem.* 25;276(21):18507-12.
- [189] Masignani V, Balducci E, Di Marcello F, Savino S, Serruto D, Veggi D, Bambini S, Scarselli M, Aricò B, Comanducci M, Adu-Bobie J, Giuliani MM, Rappuoli R, Pizza M. NarE: a novel ADP-ribosyltransferase from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* . 50(3):1055-67., 2003.
- [190] Schielke, S., Spatz, C., Schwarz, R.F., Joseph, B., Schoen, C., Schulz, S.M., Hubert, K., Frosch, M., Schubert-Unkmeir, A., Kurzai, O. (2001) Characterization of FarR as a highly specialized, growth phase-dependent transcriptional regulator in *Neisseria meningitidis*. *Int J Med Microbiol.* . 301(4):325-33.
- [191] Wiegmann, K., Schutze, S., Machleidt, T., Witte, D., Kronke, M. (1994) Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell.* 78: 1005–1015.
- [192] Sa, E., Cunha, C., Griffiths, N.J., Virji, M. (2010) *Neisseria meningitidis* Opc invasin binds to the sulphated tyrosines of activated vitronectin to attach to and invade human brain endothelial cells. *PLoS Pathog.* 6: e1000911.
- [193] Miao, J.Y., Araki, S., Hayashi, H. (1997) Relationships between phosphatidylcholine-specific phospholipase C and integrins in cell-substratum adhesion and apoptosis in vascular endothelial cells. *Endothelium.* 5(4):297-305.
- [194] Hogg, N., Laschinger, M., Giles, K., McDowall, A. (2003) T-cell integrins: more than just sticking points. *J Cell Sci.* 1;116(Pt 23):4695-705.
- [195] Grassmé, H., Jendrossek, V., Riehle, A., von Kurthy, G., Berger, J. (2003) Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med.* 9: 322–330.
- [196] Esen, M., Schreiner, B., Jendrossek, V., Lang, F., Fassbender, K., Grassmé, H., Gulbins, E. (2001) Mechanisms of *Staphylococcus aureus* induced apoptosis of human endothelial cells. *Apoptosis.* 6(6):431-9
- [197] Grassmé, H., Riehle, A., Wilker, B., Gulbins, E. (2005) Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms. *J Biol Chem.* 80: 26256–26262.
- [198] Boniface, J.J., Rabinowitz, J.D., Wulfig, C., Hampl, J., Reich, Z., Altman, J.D., Kantor, R.M., Beeson, C., McConnell, H.M., Davis, M.M. (1998) Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands. *Immunity.* 9: 459–466.

- [199] Graziadei, L., Riabowol, K., Bar-Sagi, D. (1990) Co-capping of ras proteins with surface immunoglobulins in B lymphocytes. *Nature*. 347: 396–400.
- [200] Grassmé, H., Cremesti, A., Kolesnick, R., Gulbins, E. (2003) Ceramide mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene*. 22: 5457–5470.
- [201] Hynes, N.E. (1996) ErbB2 activation and signal transduction in normal and malignant mammary cells. *Hynes Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* . 1;2 S.199-206.
- [202] Nagy, P., Vereb, G., Sebestyén, Z., Horváth, G., Lockett, S.J., Damjanovich, S., Park, J.W., Jovin, T.M., Szöllosi, J. (2002) Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *Journal of Cell Science*. 115, 4251-4262.
- [203] Louderbough, J.M., Schroeder, J.A. (2011) Understanding the Dual Nature of CD44 in Breast Cancer Progression. . *Mol Cancer Res* December. 9; 1573.
- [204] Fiévet, B.T, Louvard, D., Arpin, M. (2007) ERM proteins in epithelial cell organization and functions. *Biochim Biophys Acta* . 1773 (5): 653–60.
- [205] Fievet, B.T., Gautreau, A., Roy, C., Del Maestro, L., Mangeat, P., Louvard, D., Arpin, M. (2004) Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol* . 164 (5): 653–9.
- [206] Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S. (1998) Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) Proteins Bind to a Positively Charged Amino Acid Cluster in the Juxta-Membrane Cytoplasmic Domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J. Cell Biol* . 140 (4): 885–95.
- [207] Pust, S., Morrison, H., Wehland, J., Sechi, A.S., Herrlich, P. (2005) *Listeria monocytogenes* exploits ERM protein functions to efficiently spread from cell to cell. *EMBO J*. 23;24(6):1287-300.
- [208] Canals, D., Jenkins, R.W., Roddy, P., Hernández-Corbacho, M.J., Obeid, L.M., Hannun, Y.A. (2010) Differential effects of ceramide and sphingosine 1-phosphate on ERM phosphorylation: probing sphingolipid signaling at the outer plasma membrane. *J Biol Chem* . 15;285(42):32476-85.
- [209] Rangan, S.R. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer*. 29(1):117-21.
- [210] Nahrlich, L., Mainz, J.G., Adams, C., Engel, C., Herrmann, G. (2013) Therapy of CF-patients with amitriptyline and placebo—a randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb multicenter, cohort-study. *Cell Physiol Biochem* . 31: 505–512.

- [211] Gulbins, E., Palmada, M., Reichel, M., Lüth, A., Böhmer, C., Amato, D., Müller, C.P., Tischbirek, C.H., Groemer, T.W., Tabatabai, G., Becker, K.A., Tripal, P., Staedtler, S., Ackermann, T.F., van Brederode, J., Alzheimer, C., Weller, M., Lang, U.E., Kleuser, B., Grassmé, H., Kornhuber, J. (2013) Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs. *Nat Med.* . 19(7):934-8.
- [212] Kornhuber, J., Tripal, P., Reichel, M., Mühle, C., Rhein, C., Muehlbacher, M., Groemer, T.W., Gulbins, E. (2010) Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell Physiol Biochem.* . 26, Nr. 1, S. 9–20.
- [213] Wille, S.M., Cooreman, S.G., Neels, H.M., Lambert, W.E. (2008) Relevant issues in the monitoring and the toxicology of antidepressants. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 45(1):25-89.
- [214] Baumann, P., Hiemke, C., Ulrich, S. (2004) The AGNP-TDM expert group consensus guidelines: therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Pharmacopsychiatry.* 37(6):243-265.
- [215] Kornhuber, J., Muehlbacher, M., Trapp, S., Pechmann, S., Friedl, A., Reichel, M., Mühle, C., Terflath, L., Groemer, T., Spitzer, G., Liedl, K., Gulbins, E., Tripal, P. (2011) Identification of Novel Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase. *PLoS ONE.* 6, Nr. 8.
- [216] Kölzer, M., Werth, N., Sandhoff, K. (2004) Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine. *FEBS Letters.* 559, Nr. 1, S. 96-98.
- [217] Torchilin, V.P. (2008) Cell penetrating peptide-modified pharmaceutical nanocarriers for intracellular drug and gene delivery. *Biopolymers.* . 90(5):604-10.
- [218] Sharma, A., Mayhew, E., Bolcsak, L., Cavanaugh, C., Harmon, P., Janoff, A., Bernacki, R.J. (1997) Activity of paclitaxel liposome formulations against human ovarian tumor xenografts. In *Int J Cancer.* 71, S. 103-107.
- [219] Immordino, M.L., Dosio, F., Cattel, L. (2006) Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine.* . 1, Nr. 3, S. 297–315.
- [220] Scherrmann, J.M. (2002) Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vascul. Pharmacol.* 38, Nr. 6, S. 349–54.
- [221] Arnaud, J., Tröndle, K., Claudinon, J., Audfray, A., Varrot, A., Römer, W., Imberty, A. (2014) Membrane deformation by neolectins with engineered glycolipid binding sites. *Angew Chem Int Ed Engl.* 25;53(35):9267-70.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir für die exzellente Betreuung, die stetige Inspiration, Motivation und Unterstützung, sowie für das Aufzeigen vieler Möglichkeiten für die Zukunft. Neben ihrer hervorragenden Organisation und Planung der Promotionsarbeit, hatte ich stets die Freiheit eigene Ideen einzubringen und zu verwirklichen.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Matthias Frosch für die Schaffung eines sehr guten Forschungsumfeldes, ohne das diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Sabrina Hebling und Dr. Heiko Slanina möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen für die Erlernung vieler praktischer Fähigkeiten, sowie für den ständigen Rat im Laboralltag.

Ich danke Prof. Dr. Ulrich Vogel und PD Dr. Heike Claus für die Bereitstellung von Meningokokken-Stämmen und die fachliche Unterstützung.

Herzlich danken möchte ich Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies für die Erstellung der shASM-HBMEC und Prof. Dr. Erich Gulbins für die Bereitstellung der NPDA-Fibroblasten. Prof. Dr. Burkhard Kleuser und Dr. Lukasz Japtok gilt mein Dank für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen. Auch möchte ich Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies für die fachliche Unterstützung des Projektes danken.