Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg Vorstand: Professor Dr. med. Matthias Frosch

# Wirkmechanismus von Sphingolipiden und Sphingosin gegen mikrobielle Erreger

Inaugural - Dissertation zur Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von Lena Franziska Kaiser aus Künzelsau

Würzburg, Juli 2020

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

Korreferent: Prof. Dr. Christian Stigloher

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2020

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Für meine Eltern und die ganze Familie

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsv	verzeichnis	
Tabellenver	zeichnis	
Abkürzungs	verzeichnis	
1 Einleitur	ng	1
1.1 Neis	sseria meningitidis	1
1.1.1	Epidemiologie und Inzidenz	1
1.1.2	Krankheitsbild, Therapie und Vorsorge	3
1.1.3	Pathogenese und Virulenzfaktoren von N. meningitidis	4
1.2 Sph	ingolipide und ihre antibakterielle Wirkung	9
1.2.1	Sphingolipide	9
1.2.2	Ceramide	10
1.2.3	Antibakterielle Wirkung	12
1.3 Ziels	setzung dieser Arbeit	14
2 Material	und Methoden	15
2.1 Mate	erial	15
2.1.1	Laborgeräte	15
2.1.2	Software	16
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	17
2.1.5	Medium für die Bakterienkultur	18
2.1.6	Lösungen und Puffer	19
2.1.7	Bakterienstämme	20
2.1.8	Lipide	20
2.1.9	Farbstoffe	20
2.2 Met	hoden	21
2.2.1	Bakterien	21
2.2.2	Lipide	22
2.2.3	Wachstumskurven	22
2.2.4	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	22
2.2.5	Click-Chemie	23
2.2.6	Durchflusszytometrische Messung	25
2.2.6.1	I Funktionsweise der Durchflusszytometrie	25
2.2.6.2	2 Durchführung der Messung	25
2.2.7	Transmissionselektronenmikroskopie	26

	2.2	.8	Rasterelektronenmikroskopie	28
	2.2	.9	Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie	30
	2.2	.10	Das Korrelieren	34
	2.2	.11	Statistik	36
3	Erg	jebn	isse	37
3	3.1	Ant	ibakterielle Wirkung von Sphingolipiden	37
	3.1	.1	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration und minimalen bakteriziden Konzentration	.37
	3.1	.2	Wachstumshemmung von N. meningitidis	38
3	3.2	Auf	nahme der funktionalisierten Sphingolipide	39
3	3.3	Мо	rphologische Veränderungen	41
	3.3	.1	Die Morphologie von N. meningitidis und der Kontrollgruppe	41
	3.3	.2	Morphologische Veränderungen durch ω-azido-Sphingosin	44
	3.3	.3	Morphologische Veränderungen durch ω-azido-C <sub>6</sub> -Ceramid	46
	3.4	Lok	alisation nach der Aufnahme in <i>N. meningitidis</i>	48
	3.4	.1	Aufnahmen der Kontrollgruppe	49
	3.4	.2	Lokalisation von Sphingosin und C6-Ceramid nach Aufnahme in <i>N. meningitidis</i> bei Verwendung niedriger Konzentrationen	.50
	3.4	.3	Lokalisation der Sphingolipide nach Aufnahme in <i>N. meningitidis</i> bei Verwendung höherer Konzentrationen	.51
3	3.5	Wir	kung eines Detergens auf die Morphologie von <i>N. meningitidis</i>	53
3	3.6	Wir	kung des funktionellen Sphingosins und Ceramids auf andere Bakterien	55
	3.6	.1	Wirkung von azido-funktionalisiertem Sphingosin und C <sub>6</sub> -Ceramid auf <i>E. coli</i>	.56
	3.6	.2	Wirkung azido-funktionalisiertem Sphingosin und C <sub>6</sub> -Ceramid auf <i>S. aureus</i>	.57
4	Dis	kuss	sion	58
4	4.1	Ant	ibakterielle Wirkung von Sphingolipiden	.58
4	4.2	Auf	nahme der Sphingolipide durch <i>N. meningitidis</i>	.59
2	4.3	Wir	kmechanismus der Sphingolipide und Sphingobasen	60
	4.3	.1	Morphologische Veränderungen	61
	4.3	.2	Lokalisation der Lipide nach Aufnahme von N. meningitidis	66
2	4.4	Clic	k-CLEM	67
4	4.5	Aus	blick	70
5	Zu	samr	nenfassung	71
6	Lite	eratu	rverzeichnis	73

Danksagung
Lebenslauf
Publikationen im Rahmen der Promotionsarbeit
Eidesstattliche Erklärung

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturformeln verwendeter Lipide	. 22
Abbildung 2:	Click-Reaktion von ω-azido-C6-Ceramid und DBCO-Alexa	
	Fluor® 488	.24
Abbildung 3:	Arbeitsablauf für die CLEM-Aufnahmen	. 33
Abbildung 4:	Korrelieren der REM- und SIM-Bilder	. 35
Abbildung 5:	Wachstumskurven von N. meningitidis	. 39
Abbildung 6:	Aufnahme in N. meningitidis	40
Abbildung 7:	TEM- und REM-Aufnahmen von N. meningitidis	43
Abbildung 8:	TEM- und REM-Aufnahmen von N. meningitidis	45
Abbildung 9:	TEM- und REM-Aufnahmen von N. meningitidis	47
Abbildung 10:	CLEM-Aufnahmen von N. meningitidis	49
Abbildung 11:	CLEM-Aufnahmen nach Behandlung mit $\omega$ -azido-	
	Sphingosin	50
Abbildung 12:	CLEM-Aufnahmen nach Behandlung mit $\omega$ -azido-C <sub>6</sub> -	
	Ceramid	51
Abbildung 13:	CLEM-Aufnahmen nach Behandlung mit $\omega$ -azido-	
	Sphingosin.	52
Abbildung 14:	CLEM Aufnahmen nach Behandlung mit $\omega$ -azido-C <sub>6</sub> -	
	Ceramid	53
Abbildung 15:	TEM- und REM-Aufnahmen von N. meningitidis	54
Abbildung 16:	TEM-Aufnahmen von <i>E. coli</i>	56
Abbildung 17:	TEM-Aufnahmen von S. aureus	57

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Laborgeräte	. 15
Tabelle 2:	Software	. 16
Tabelle 3:	Verbrauchsmaterialien	. 16
Tabelle 4:	Chemikalien und Reagenzien	. 17
Tabelle 5:	Medium für Bakterienkultur	. 18
Tabelle 6:	Lösungen und Puffer	. 19
Tabelle 7:	Verwendete Bakterienstämme	. 20
Tabelle 8:	Lipide	. 20
Tabelle 9:	Farbstoffe	. 20
Tabelle 10:	Entwässerung der TEM Proben	. 27
Tabelle 11:	Entwässerung der REM Proben	. 29
Tabelle 12:	Entwässerung der CLEM Proben	. 31
Tabelle 13:	MHK- und MBK-Werte von N. meningitidis	. 37
Tabelle 14:	MHK- und MBK-Werte von E. coli und S. aureus	55

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
bidest. H <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
CLEM	<i>correlative light and electron microscopy</i> korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie
dest.	destilliert
D	Deutschland
DAPI	4´,6-Diamidin-2-phenylindol
DBCO	Dibenzocyclooctin
DIC	disseminated intravascular coagulation Disseminierte intravasale Koagulopathie
DMSO	Dimethylsufoxid
E. coli	Escherichia coli
Engl.	Englisch
EUCAST	European Committee on antimicrobial susceptibility testing
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FSC	forward scatter
GA	Glutaraldehyd
GFP	green fluorescent protein
IF	Immunfluoreszenz
IHM	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg
IME	Invasive Meningokokken-Erkrankung
Kap.	Kapitel
MBC	minimum bactericidal concentration (deutsch: MBK)
MBK	Minimale bakterizide Konzentration,
МНК	Minimale Hemmkonzentration
MIC	minimum inhibitory concentration (deutsch: MHK)
N. gonorrhoeae	Neisseria gonorrhoeae
N. meningitidis	Neisseria meningitidis
NRZMHi	Nationale Referenzzentrum für Meningokokken und Haemophilus influenzae
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte; Wellenlänge $\lambda$ =600nm
O/N	over night, über Nacht
PFA	Paraformaldehyd
PBS	phosphate buffered saline

rcf	relative centrifugal force, Relative
	Zentrifugalbeschleunigung
REM	Rasterelektronenmikroskop
RKI	Robert Koch-Institut
Rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehung pro Minute (UpM)
RT	Raumtemperatur
S. aureus	Staphylococcus aureus
SSC	sidewards scatter
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
UK	United Kingdom, Großbritannien
VE	vollentsalzt

# 1 Einleitung

## 1.1 Neisseria meningitidis

## 1.1.1 Epidemiologie und Inzidenz

*Neisseria meningitidis* ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerob und pleomorph bekapseltes Bakterium, welches häufig als Diplococcus vorliegt und auch unter der Bezeichnung Meningokokkus bekannt ist. Das erste Mal wurde es 1884 von Marchiafava und Celli beschrieben und drei Jahre später vom österreichischen Pathologen A. Weichselbaum aus dem Serum eines erkrankten Patienten isoliert (1887) [1]. Der Mensch stellt den einzigen natürlichen Wirt der Meningokokken dar. Sie werden durch Tröpfcheninfektion übertragen und besiedeln asymptomatisch vor allem den Nasopharynx, wurden aber auch schon auf der Mundschleimhaut und in Zahnbelag gefunden [2]. Asymptomatische Träger sind in Europa 5-10% der Bevölkerung, was jedoch von Alter, sozialem Umfeld und Wohnort abhängt [3, 4]. Einen sehr hohen Trägerstatus mit bis zu 35% haben Jugendliche bzw. junge Erwachsene [3, 5, 6] und Militärrekruten [7, 8].

Anhand der unterschiedlichen Struktur der Polysaccharidkapsel können 13 Serogruppen unterschieden werden, von denen nur die Gruppen A, B, C, W-135, X und Y Infektionen hervorrufen [9].

Jedes Jahr erkranken weltweit 500.000-1,2 Millionen Menschen an einer invasiven Meningikokken-Erkrankung, von denen 50.000-135.000 an der Infektion sterben [10]. Die meisten Infektionen weltweit werden durch die Serogruppe A verursacht. Zusammen mit den Serogruppe W-135 und X sind sie für Epidemien vor allem im Gebiet des Meningitisgürtels verantwortlich. Der Meningitisgürtel erstreckt sich vom Senegal bis nach Äthiopien im Gebiet der Subsahara und wurde erstmals 1963 von Lapeyssonnie definiert [11]. Die Epidemien treten seit 1905 zyklisch alle 8-10 Jahre auf und beginnen meist zu Anfang der Trockenzeit und enden mit dem ersten Regen [12, 13]. Die letzte große Epidemie ereignete sich 2009 mit über 80.000 gemeldeten Fällen im Gebiet von Nigeria und Niger (WHO), wohingegen die größte Epidemie 1996 im Meningitisgürtel 250.000 Erkrankten und 25.000 Tote zu beklagen hatte [14].

Doch nicht nur Afrika ist von wiederkehrenden Epidemien betroffen. Während und nach dem Hadsch, der jährlichen islamischen Pilgereise nach Mekka, werden auch regelmäßige Meningokokkenausbrüche verzeichnet. Im Jahr 2000 kam es nach dem Hadsch zu mehreren, von heimkehrenden Pilgern verursachten Ausbrüchen von W-135 Infektionen in ganz Europa. Besonders betroffen waren das Vereinigte Königreich und Frankreich [15]. Epidemien durch Serogruppe A kamen Anfang des 20. Jahrhunderts auch in Europa und den USA vor, verschwanden jedoch nach dem Zweiten Weltkrieg [10, 16]. Auch Meningokokken der Serogruppe B können Epidemien auslösen, die sich aber durch eine langsamere Ausbreitung, niedrigere Infektionsraten, aber auch länger andauernde Erkrankungszeiträume unterscheiden [17]. Neben epidemischen Ausbrüchen gibt es auch sporadisch auftretende Fälle invasiver Meningokokken-Erkrankungen. In Europa werden diese vor allem durch die Serogruppe B und C ausgelöst [16]. Seit 2001 ist in Deutschland die Meningokokken-Meningitis und Meningokokken-Sepsis meldepflichtig (Infektionsschutzgesetz §6). Im Jahr 2018 wurden 295 Fälle invasiver Meningokokken Erkrankungen dem Robert Koch-Institut gemeldet [18]. Die Inzidenz lag 2018 somit bei 0,36/100.000 Einwohner (NRZMHi). Auch in anderen Industriestaaten ist die Erkrankungshäufigkeit relativ niedrig und sinkt durch die Einführung von Impfstoffen weiterhin ab [19]. Im Vergleich dazu kann die Erkrankungshäufigkeit bei Epidemien auf bis zu 1.000/100.000 ansteigen [12]. Die meisten Erkrankungen in Deutschland wurden 2018, und in den Jahren zuvor, von der Serogruppe B (58,6%) ausgelöst, gefolgt von den Gruppen Y (14,3%), C (13,1%) und W-135 (12,7%), die in den letzten Jahren zunimmt (Vorjahr 9%). Eine saisonale Häufung der Erkrankung ist im ersten Quartal zu sehen. In den Jahren 2013-2018 wurde ca. ein Drittel der Infektionen in den Monaten Januar bis März gemeldet [18]. Bestimmte Altersgruppen sind stärker von invasiven Meningokokken-Erkrankungen betroffen als andere. Säuglinge haben das höchste Erkrankungsrisiko (5/100.000), welches ab dem 2. Lebensjahr deutlich abnimmt. Bei Jugendlichen gibt es einen zweiten, jedoch niedrigeren, Erkrankungsgipfel (0,9/100.000) [19, 20].

#### 1.1.2 Krankheitsbild, Therapie und Vorsorge

Gelingt den Meningokokken der Übertritt über das Epithel des Nasopharynx ins Blut, kann es zu einer invasiven Meningokokken-Erkrankung (IME) kommen. Die häufigsten Krankheitsbilder sind die Meningokokkenmeningitis und die Sepsis, die sowohl einzeln als auch in Kombination miteinander auftreten können [21]. Prädispositionen für eine IME sind Rauchen, vorangegangene respiratorische Infekte mit z.B. Mykoplasmen oder Influenzaviren, trockene und staubige Luft, eine geschwächte Immunabwehr oder Immundefekte, wie z. B. Defekte des Komplementsystems [2, 22, 23].

Die Inkubationszeit beträgt zwischen einem und 14 Tagen [24], wobei ein plötzlicher und rasch fortschreitender Erkrankungsbeginn innerhalb der ersten 24 Stunden charakteristisch ist [25]. Oft gehen unspezifische Symptome wie die eines fiebrigen Infekts mit Schüttelfrost, Muskelschmerzen, Übelkeit und Erbrechen den typischen Merkmalen einer IME voraus [21]. Klinisch präsentiert sich die bakterielle Meningitis durch Kopfschmerzen, Fieber, Nackensteife und Bewusstseinstrübung, wobei 95% der Patienten mindestens zwei der vier Symptome haben [26]. Ein diagnostisch wichtiges Zeichen einer IME ist das Auftreten von Petechien am Körper oder den Schleimhäuten [27]. Die Meningokokken-Sepsis äußert sich durch Fieber, Schock, Verbrauchskoagulopathien (DIC) und Organversagen [28]. Die Ursache dafür ist Endotoxin ausgelöste Aktivierung des Gerinnungseine durch und Komplementsystems [25]. Eine besonders schwere Verlaufsform der IME stellt das Waterhouse-Friderichsen-Syndrom dar. In diesem Fall sorgt die Verbrauchskoagulopathie für eine Durchblutungsstörung der Nebennierenrinde, was zu einer akuten Verschlechterung des Krankheitsverlaufes führt [25, 29]. Bei Säuglingen verläuft die Erkrankung deutlich weniger typisch, was eine schnelle Diagnostik oft schwierig macht [24, 30]. Als geeignete Therapie gilt die sofortige Gabe von Cephalosporinen der 3. Generation (Ceftriaxon, Cefotaxim), Ampicillin oder Penicillin G. Auf Grund von Penicillinresistenzen sollte eine Therapie mit Penicillin G nur bei Vorliegen eines Antibiogramms erfolgen [31].

Trotz der niedrigen Inzidenz in Industrieländern stellen die invasiven Meningokokken-Erkrankungen auf Grund ihrer oft schwerwiegenden Verläufe

und häufigen Komplikationen ein wichtiges Krankheitsbild dar [32]. Die Letalität konnte durch Verwendung adäquater Antibiotika von ca. 80% zu Beginn des 20. Jahrhundert auf durchschnittlich 10% gesenkt werden [33-35]. Erkrankungen, die durch die Serogruppe C ausgelöst werden, führen in den letzten Jahren häufiger zum Tod als solche, die von Serogruppe B verursacht wurden [18, 20]. Neben der Serogruppe hat auch die klinische Erscheinungsform Auswirkungen auf die Letalität [20]. So beträgt die Letalität ca. 5% bei Meningitis [25, 35], bis zu 40% bei Sepsis [10] und bis zu 80% beim Waterhouse-Friderichsen-Syndrom [25, 36]. Nach überstandener IME sind bei ungefähr 10-30% der Patienten schwere Langzeitfolgen zu erwarten [37, 38]. Dazu zählen unter anderem Taubheit [39, 40], geistige Retardierung [25, 41] und der Verlust von Extremitäten durch Amputation [22].

Zur Prävention vor IME stehen verschiedene Impfstoffe zur Verfügung. Gegen die Serogruppe C gibt es einen Konjugatimpfstoff, der von der ständigen Impfkomission des RKI (STIKO) für Kinder im frühen 2. Lebensjahr empfohlen wird [42, 43]. Außerdem gibt es gegen die Serogruppen A, C, W und Y Polysaccharid-Impfstoffe, die bivalent (A+C), trivalent (A, C+W) oder tetravalent (A, C, W+Y) zur Verfügung stehen [43, 44].

Gegen die Serogruppe B gab es aufgrund der niedrigen Antigenität der Kapsel bis 2013 keinen Impfstoff. Durch die Genomanalyse konnten nun Oberflächenproteine identifiziert werden, die als Antigene fungieren. Diese neue Technik zur Entwicklung von Impfstoffen wird als reverse Vakzinologie bezeichnet [45]. Die Wirksamkeit und Wirkdauer der neuen Bexsero® Impfung ist noch nicht abschließend geklärt und soll nur nach individueller Risikoabschätzung verwendet werden [42, 46, 47].

#### 1.1.3 Pathogenese und Virulenzfaktoren von *N. meningitidis*

Die Pathogenese der invasiven Meningokokken-Erkrankung beginnt mit der Adhäsion von *N. meningitidis* an den nicht-zilientragenden Epithelzellen des Nasopharynx [24]. Diese primäre Adhäsion wird durch Typ IV Pili vermittelt, die aus verschiedenen Pil-Proteinen (Haupt-Pilin PilE, Pil-C, Pil-V und Pil-X) aufgebaut sind. Sie überragen die Kapsel der Meningokokken und ermöglichen

so die Anhaftung der Bakterien an der Mukosa [48, 49]. Die Dynamik des Typ IV Pilus erzeugt eine Bewegung, die als "twitching motility" bezeichnet wird und für die Bildung von Mikrokolonien und die Transzytose durch die Mukosa von Bedeutung ist [50, 51]. Mit welchem humanen Epithelbestandteil sie interagieren ist noch nicht genau geklärt und sowohl der CD46-Rezeptor [52, 53], wie auch das Glykoprotein CD147 [54] werden diskutiert. Die Polysaccharidkapsel stellt bei der aerogenen Übertragung einen wichtigen Schutz vor Umwelteinflüssen dar, verdeckt aber auch wichtige Faktoren, die für die Adhäsion und Invasion notwendig sind [55, 56]. Meningokokken ist es deswegen möglich nach der Adhäsion über verschiedene Mechanismen die Expression ihrer Polysaccharidkapsel herunter zu regulieren [53, 57, 58]. Dies ermöglicht die Bindung an sogenannte opacity-Proteine, von denen N. meningitidis Opa und Opc exprimiert [59]. Sie werden wie die Pili zu den Adhäsinen gezählt und stimulieren durch die Bindung an ihre Rezeptoren die Aufnahme der Meningokokken in Epithelzellen und die Transzytose [53]. Sowohl Opa als auch Opc binden an membranständige Heperansulfat-Proteoglykane, die als Rezeptor und Korezeptor dienen [60-62]. Außerdem binden Opa-Proteine an CEACAM-Proteine (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule), von denen CEACAM-1 am häufigsten vorkommt [56]. Neben der Adhäsion sind die Meningokokken auch für das Überleben im Nasopharynx ausgestattet. Der Schleim, der das Epithel des Nasopharynx überzieht, ist nährstoffarm und enthält antibakterielle Peptide, Bestandteile des Komplementsystems und das sekretorische Immunglobulin A (slgA) [63-67]. Neben der Polysaccharidkapsel ist das Lipooligosaccharid (LOS), sowie das Faktor H bindende Protein (fHbp) und das Neisseria-Oberflächenprotein A (NspA) wichtig für die Hemmung des Komplementsystems [68-70]. Desweiteren exprimieren N. meningitidis IgA-Proteasen und Efflux Pumpen (MtrCDE), um sich vor antibakteriellen Peptiden zu schützen [67, 71]. Das Wachstum anderer Bakterien im dichtbesiedelten Nasopharynx hemmt N. meningitidis durch die Produktion von polymorphen Toxinen [72, 73]. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Kolonisation des Nasopharynx scheinen fadenförmige Bakteriophagen (MDAΦ, Meningococcal Disease Associated) zu sein. Sie sorgen für eine Interaktion zwischen den

Meningokokken, eine Vergrößerung der Bakterienkolonie auf dem Epithel und einer höheren Invasivität [74, 75].

Nach der Transzytose durch das Epithel erfolgt der Eintritt der Meningokokken in den Blutkreislauf, WO sie vor Phagozytose und Lyse durch das Komplementsystem geschützt werden müssen. Ein wichtiger Schutzmechanismus ist die Reexpression der Polysaccharidkapsel [76, 77]. Der Kapselbestandteil N-Acetylneuraminsäure ist auch in der Glykokalyx humaner Zellen vorhanden und wird deshalb vom Immunsystem nicht als fremd erkannt [78]. Wie auch im Nasopharynx sind neben der Polysaccharidkapsel auch das Faktor H bindende Protein und die MtrCDE Efflux Pumpe für das Überleben im Blut wichtig [69, 71]. Das für den Erreger wichtige Eisen bekommen sie durch Häm-Transporter (HmbR und HpuAB) oder eisenbindende Proteine, die das Transferrin und Lactoferrin aus dem Serum binden [79, 80].

Die äußere Membran Gram-negativer Bakterien ist aus Phospholipiden mit darin verankerten Lipopolysacchariden (LPS) aufgebaut, wohingegen die äußere Membran von *N. meningitidis* Lipooligosaccharide (LOS) enthält. Das LPS besteht aus dem O-Antigen, einem Core-Polysaccharid und dem Lipid A und wird auch als Endotoxin bezeichnet [81, 82]. Im Körper sorgt das LPS bzw. LOS und vor allem die Teilstruktur Lipid A für die Aktivierung des Immunsystems und hat toxische sowie proinflammatorische Wirkungen [83]. Des Weiteren hat das LOS auch Einfluss auf die Invasivität der Meningokokken [84]. Bei Patienten mit invasiver Meningokokken-Erkrankung können im Blut oder im Liquor sehr hohe LOS-Werte festgestellt werden, die durch Bakterienlyse oder Abschnürung der äußeren Membran ("blebbing") verursacht werden [85, 86].

Eine Besonderheit von *N. meningitidis* ist ihre Fähigkeit sowohl die peripheren als auch die zentralen kapillären Endothelzellen zu besiedeln und mit ihnen zu interagieren. Dies führt zur Überwindung der Blut-Liquor-Schranke, Vermehrung im Blut, Bildung von Thromben und zur Ruptur der Kapillaren. Ohne die Adhäsion an die Endothelzellen würden die Bakterien schnell aus dem Blutkreislauf entfernt werden [73, 87, 88]. Die primäre Haftung an den Endothelzellen wird

durch Typ IV Pili vermittelt, welche sich eventuell auch als Therapieansatz gegen eine Meningokokkensepsis eignen [89]. Sie binden wie auf der Epitheloberfläche an verschiedene humane Rezeptoren wie den Laminin-Rezeptor, den PAF-Rezeptor (PAF = Plättchenaktivierender Faktor) und den CD147-Rezeptor. Vorallem die Interaktion mit dem CD147-Rezeptor scheint sowohl in den Gehirn-Endothelzellen, als auch in den peripheren Endothelzellen eine wichtige Rolle einzunehmen [54]. Wie auch andere Bakterien sorgt N. meningitidis für die Translokation und Aktivierung der sauren Sphingomyelinase und führt dadurch zur Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid. Die hierfür verantwortlichen Pathogenitätsfaktoren sind das opacity Protein Opc und die Typ IV Pili. Durch die Aktivierung kommt es zur Bildung von ceramidreichen Plattformen in den Hirnendothelzellen und anschließender Anreicherung des ErbB2-Rezeptors, wodurch die Menigokokken in die Endothelzellen aufgenommen werden [90, 91]. Um eine bakterielle Meningitis zu verursachen müssen die Meningokokken die Blut-Liquor-Schranke überwinden. Diese Barriere besteht aus speziellen Endothelzellen, die für eine starke Abschirmung des ZNS von der Blutzirkulation sorgen. Dadurch ist das Aufrechterhalten eines konstanten Milieus im ZNS und der Schutz vor Noxen im Blut möglich [92]. Die starke Barriere der Endothelzellen wird durch eine hohe Anzahl an Zell-Zell-Verbindungen gebildet. Tight-Junctions sorgen für die Abdichtung gegenüber dem Gefäßlumen, während die Adherens-Junctions für die Verbindung der Zellen untereinander sorgen [93]. Die Aufnahme der Meningokokken in die Endothelzellen erfolgt durch eine Interaktion von Opc mit den Serumfaktoren Vitronektin und Fibronektin [94, 95]. Durch die Bindung an diese Proteine wird die Bindung an die zellulären Integrine  $\alpha_{v}\beta_{3}$  (Vitronektin) und  $\alpha_5\beta_1$  (Fibronektin) möglich. Auch bei der Überwindung der Endothel-Barriere spielt die Interaktion von Opa mit dem CEACAM-1 Protein eine wichtige Rolle [96].

Nach der initialen Bindung von *N. meningitidis* an die Oberfläche von Epithel- und Endothelzellen kommt es durch die Bakterienvermehrung zur Formation von Mikrokolonien. Unterhalb dieser Kolonien kommt es zur Bildung von sogenannten *cortical plaques*, die sich durch eine erhöhte Dichte an Rezeptoren wie EGFR und CD44 und den Proteinen ICAM-1/2, Ezrin und Moesin

auszeichnen [97, 98]. Induziert durch die Bindung der Meningokokken an die Zelle kommt es zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade, die durch Tyrosinkinasen vermittelt wird. An der Signaltransduktion sind sowohl nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen wie die Src-Proteinfamilie, als auch Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie die Erb-Familie, beteiligt [99, 100]. Schließlich führt die Signaltransduktion zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts und einer Internalisierung der *N. meningitidis*, sowie zu der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 [101]. Nach der Überwindung der Blut-Liquor-Schranke kann es dann zu einer bakteriellen Meningitis kommen.

## **1.2** Sphingolipide und ihre antibakterielle Wirkung

#### 1.2.1 Sphingolipide

Die Sphingolipide wurden 1884 von dem Arzt J. L. W. Thudichum entdeckt und benannt. Er benannte sie nach der Sphinx, da ihm ihre Funktion rätselhaft war [102].

Die Sphingolipide gehören zusammen mit den Phosphoglyceriden zu der Hauptgruppe der Phospholipide, die die größte Fraktion der Lipide einer Plasmamembran darstellen. Im Gegensatz zu den Phosphoglyceriden leiten sich die Sphingolipide nicht von Glycerin, sondern vom ungesättigten Aminoalkohol Sphingosin ab [103]. Lipide sind amphiphile Moleküle mit einer hydrophilen Kopfgruppe und den lipophilen Kohlenstoffketten. Sie organisieren sich im wässrigen Medium spontan zu charakteristischen Strukturen, wie Vesikeln und Lipiddoppelschichten, welche die Grundstruktur von Plasmamembranen darstellen [104]. Die Lipidzusammensetzung der intra- und extrazellulären Seite der Lipiddoppelschicht ist jedoch nicht symmetrisch [105]. Die Plasmamembran umgibt jede Zelle und stellt so eine Abgrenzung zwischen dem Zellinneren und der Umgebung dar. Sie ist neben der Kompartimentierung auch an dem Stoffaustausch mit der Umgebung und der Signaltransduktion beteiligt [106]. Um die verschiedenen Aufgaben zu erfüllen sind Proteine in die Lipiddoppelschicht eingelagert, die je nach Verankerung, als integrale oder periphere Membranproteine bezeichnet werden [106, 107]. Die Zellmembran enthält außerdem Kohlenhydrate, die an Proteine oder Lipide gebunden sind. Sie ragen in den Extrazellularraum und sind wichtige Erkennungsmerkmale für andere Zellen [108]. Das 1972 von Singer und Nicolson veröffentlichte Flüssig-Mosaik-Modell war das erste Plasmamembran-Modell [109]. Nachdem man damals von einer zufälligen Verteilung und freier Beweglichkeit der Lipide und Proteine ausging, vermutet man heute eine unterschiedliche Verteilung der Membranbestandteile und eine eingeschränkte Beweglichkeit, die unter anderem durch das Zytoskelett limitiert ist [110]. Dadurch entstehen dynamische, temporäre Membrandomänen, deren Zusammensetzung einen Einfluss auf die Fluidität und Struktur der Membran hat [102, 111]. Vor allem Sphingolipide und

Cholesterol sind in diesen Membrandomänen angereichert, wobei das Cholesterol als Abstandshalter zwischen den Kohlenstoffketten dient [112]. Ihre chemische Struktur ermöglicht eine engere Zusammenlagerung der Moleküle, wodurch diese Bereiche eine höhere Dichte als die restliche Zellmembran aufweisen und deshalb auch als "lipid rafts" bezeichnet werden [113]. Bestimmte Membranproteine haben eine hohe Affinität zu diesen Lipiden und reichern sich deshalb auch in diesen Bereichen an [114, 115]. Die "Lipid rafts" spielen eine Rolle verschiedenen zellulären wichtige in Prozessen. wie der Signaltransduktion, dem Membrantransport, der Wirkung von Neurotransmittern und der Exo- und Endozytose. Des Weiteren sollen auch einige Bakterien und Viren die "lipid rafts" zum Eintritt in die Zelle nutzen und auch ein Zusammenhang mit Krankheiten wie Alzheimer oder Chorea Huntington wurde beobachtet [111, 116, 117]. Die Existenz, die Zusammensetzung und die Funktion der "lipid rafts" wird jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert [111].

Sphingolipide und ihre Metaboliten sind nicht nur Bestandteile der Plasmamembran, sondern stellen auch wichtige biologische Mediatoren dar, die an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind [118]. Einige der wichtigsten bioaktiven Moleküle sind Ceramid und Ceramid-1-Phosphat, welches von der Ceramid Kinase synthetisiert wird, sowie Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat, welches durch die Sphingosin Kinase entsteht. Sie regulieren wichtige Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Immunzellmigration, Angiogenese, Entzündung und Krebs [119-122].

#### 1.2.2 Ceramide

Ceramide bestehen aus einem Sphingosin, welches über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verbunden ist. Sie gelten aufgrund ihrer Struktur als die einfachsten Sphingolipide und bilden die Grundlage für die Bildung von komplexeren Sphingolipiden, wie zum Beispiel Glykosphingolipide und Sphingomyelin [123]. Die Länge der Fettsäure kann unterschiedlich sein, besteht jedoch bei Ceramiden typischerweise aus 16-24 C-Atomen [124, 125]. Ceramide sind stark hydrophob und kommen vermehrt im *stratum corneum* vor, wo sie die

Haut vor Austrocknung und dem Befall von Mikroorganismen schützen [126, 127].

Für die Ceramid Synthese gibt es mehrere Möglichkeiten. Sie können de novo im Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch die Serin-Palmitoyltransferase aus Serin und Palmitoyl-CoA synthetisiert werden [128, 129]. Die im ER gebildeten Ceramide werden zum Golgi-Apparat transportiert und dort zu anderen Sphingolipiden synthetisiert [129]. Des Weiteren entstehen Ceramide bei der Hydrolyse von Sphingomyelin, welches das häufigste Sphingolipid der Membran ist. Das Sphingomyelin wird in der Plasmamembran durch Sphingomyelinasen in Ceramid und Phosphocholin gespalten. Es gibt sechs verschiedene Sphingomyelinasen, die nach ihrem pH-Optimum in saure, neutrale und alkalische Sphingomyelinasen eingeteilt werden und in unterschiedlichen Geweben lokalisiert sind [130-132]. Die letzte Möglichkeit der Ceramid-Synthese stellt der salvage pathway dar, der einen Großteil (50-90%) des Sphingolipid Stoffwechsels ausmacht [133, 134]. Hierbei wird das aus dem Sphingolipid Katabolismus gewonnene Sphingosin wiederverwertet [135]. Der Abbau erfolgt durch Ceramidasen, welche die Ceramide in Sphingosin und Fettsäuren spalten [128]. Neben dem salvage pathway kann das gewonnene Sphingosin zum Beispiel auch mittels Sphingosin-Kinase zu Sphingosin-1-Phosphat synthetisiert werden.

Es sind mehrere Stimuli für die Aktivierung der verschiedenen Synthesewege bekannt. Die *de novo* Synthese wird z.B. durch Cannabinoide oder Hitze bedingten Stress aktiviert [136, 137]. Die Aktivierung der Enzymgruppe der Sphingomyelinasen erfolgt unter anderem durch oxidativen Stress, TNF- $\alpha$  oder die Bindung an den Fas-Rezeptor [130, 138, 139]. Auch Infektionen mit bestimmten Pathogenen können die enzymatische Synthese aktivieren [140-143]. Durch die vermehrte Bildung der Ceramide und ihre chemischen Eigenschaften kommt es, durch enge Zusammenlagerung der Ceramide, zur Bildung von Ceramid-reichen Plattformen (CRPs) [144, 145]. Innerhalb dieser Plattformen kommt es zur Akkumulation von Rezeptoren, was zu einer Verstärkung des Signals oder ihrer Aktivierung führt. Die Rekrutierung von intrazellulären Signalmolekülen und eine Stabilisierung der Ligand-Rezeptor

Interaktion konnte für Fas-Rezeptor CD95 gezeigt werden [146]. Eine leichtere Membranausstülpung, die zur Vesikelbildung und deren Fusion führt, wird auch durch die CRPs ermöglicht [147]. Die Infektion mit bestimmten Pathogenen, wie *Staphylococcus aureus* [148], *Pseudomonas aeruginosa* [149], *Neisseria gonorrhoeae* [141], *Neisseria meningitidis [90]*, Rhinoviren [150] und Masernviren [151] führt zu einer Aktivierung der Sphingomyelinase und dadurch zur Bildung von CRPs. Die Pathogene nutzen die CRPs für die Internalisierung in die Zelle oder induzieren damit sogar die Apoptose der Zelle.

#### 1.2.3 Antibakterielle Wirkung

Schon 1940 beschrieb Burtenshaw die antibakterielle Wirkung der auf der Haut vorkommenden Lipide gegenüber *Staphylococcus aureus* [152]. Zu den antibakteriell wirkenden Lipiden auf der Haut zählen neben antibakteriell wirkenden Fettsäuren auch langkettiger Sphingobasen. Die Sphingobasen, Sphingosin, Dihydrosphingosin und 6-Hydroxysphingosin, zeigen eine starke antibakterielle Wirkung und spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr gegen bakterielle Infektionen der Haut und Schleimhäute [153, 154]. Die antibakteriellen Eigenschaften von Lipiden sind jedoch nicht auf Hautpathogene beschränkt und wurden inzwischen an unterschiedlichsten Mikroorganismen untersucht. Der erste Hinweis auf die antibakterielle Wirkung von Sphingosin stammt aus dem Jahr 1948. In einem Versuch sollte das Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis* gefördert werden und es fiel die Wachstumshemmung durch Sphingosin auf [154, 155].

Viele der natürlich vorkommenden und synthetisch erzeugten Sphingobasen haben antibakterielle Eigenschaften und sind für Krebszellen zytotoxisch [156]. Ein wachstumshemmender Effekt gegenüber vielen Gram-positiven und Gramnegativen Bakterien, sowie gegenüber Pilzen konnte gezeigt werden [157-161]. In einer Studie in unserem Labor wurde die antibakterielle Wirkung von kurzkettigen C<sub>6</sub>- und langkettigen C<sub>16</sub>-Ceramiden, sowie den azidofunktionalisierten Ceramid Analoga getestet. Die kurzen C<sub>6</sub>-Ceramide und das  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid zeigten einen wachstumshemmenden Effekt gegenüber *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* [162]. Sphingosin und Dihydrosphingosin

hemmen das Wachstum von *Escherichia coli* und *S. aureus*, wohingegen das C<sub>6</sub>-Ceramid und das  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid keinen Effekt gegen diese Bakterien zeigten [162, 163]. Auch gegen intrazelluläre Pathogene, wie *Chlamydia trachomatis* zeigen bestimmte Ceramide einen antibakteriellen Effekt [164].

Die Biofilmbildung und die Adhärenz von *Streptococcus mutans* auf Zahnschmelz konnte durch Sphingosin, Phytosphingosin und Sphinganin gehemmt werden. Zusätzlich zeigten die Lipide einen Schutz gegen säureinduzierte Demineralisierung, was sie zu einer interessanten Substanz zur Bekämpfung von Oralen Biofilmen und Karies macht [165].

Die wichtige Rolle von Sphingosin als Teil des angeborenen Immunsystems und die mögliche medikamentöse Anwendung von Sphingosin, konnte am Beispiel von Infektionen der Atemwege mit *P. aeruginosa* gezeigt werden. Die epitheliale Sphingosinkonzentration ist bei Patienten mit Mukoviszidose reduziert und macht sie so anfälliger für Infektionen. Die Inhalation von Sphingosin oder saurer Ceramidase verhindert die Infektion oder konnte eine bestehende Infektion mit *P. aeruginosa* heilen [166, 167]. Dihydrosphingosin zeigte sogar gegen einen multirestistenen Stamm des *M. tuberculosis* antibakterielle Wirkung [168]. Dies lässt hoffen, dass die Gruppe der Sphingolipide und ihrer Metaboliten neue Substanzen für die Bekämpfung multiresistenter Keime bereithält.

Trotz der vielfältigen antimikrobiellen Wirkung von Sphingolipiden ist der genaue Wirkmechanismus noch nicht bekannt [169]. Die Wirkung könnte auf einer Interaktion der Sphingolipide mit der bakteriellen Membran und deren Ruptur oder Veränderung der Membranstruktur beruhen. Jedoch werden auch die Aufnahme und Akkumulation der Lipide im Zytoplasma und der damit verbundene Einfluss auf den bakteriellen Metabolismus diskutiert [157, 159, 163, 170].

## 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Zunahme der multiresistenten Erreger in den letzten Jahren stellt gerade in Krankenhäusern ein immer größer werdendes Problem dar, wodurch die Suche nach neuen antimikrobiell wirkenden Substanzen in den Fokus gerückt ist.

Ziel der Dissertationsarbeit ist es, die Wirkungsweise von Sphingolipiden und den sphingolipidbasierten Pharmaka gegen mikrobielle Erreger näher aufzuklären. Hierzu sollen in einem ersten Schritt ultrastrukturelle Veränderungen der Membran von *Neisseria meningitidis* nach Inkubation mit Sphingosin, C<sub>6</sub>-Ceramid und den azido-funktionalisierten Analoga untersucht werden. Das azidmodifizierte Sphingosin und C<sub>6</sub>-Ceramid werden dem Projekt in einem Kooperationsverbund von der Arbeitsgruppe Prof. Jürgen Seibel (Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Hierzu sollen transmissionselektronenmikroskopische (TEM) und rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen von unbehandelten und behandelten Meningokokken ausgewertet werden.

In einem zweiten Schritt soll unter Verwendung der funktionalisierten Sphingosinund C<sub>6</sub>-Ceramid-Analoga die genaue Lokalisation nach Aufnahme in *N. meningitidis* durch korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM) ermittelt werden.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

## 2.1.1 Laborgeräte

#### Tabelle 1:Laborgeräte

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Elyra S.1	Zeiss
(Structured Illumination	SIM	
Microscope)		
Gasbrenner	Flammy S	Schütt
Gefrierschrank	LGex	Liebherr
Diamantmesser	Histo Diamond	DIATOME
	Knife	
Inkubator 37 °C, 5% CO <sub>2</sub>	Serie 6000	Heraeus
Inkubator 37 °C	Serie 6000	Heraeus
Kritisch Punkt-Trockner	CPD030	Baltec
Kühlschrank	LKexv	Liebherr
Magnetrührer	MR Hei-	Heidolph
	Standard	
Microplatten Photometer	Infinite F200	Tecan Deutschland
	Pro Reader	GmbH
Photometer	CO8000	Biochrom GmbH
Pipettierhilfe	AccuJet pro	Brand
Rasterelektronenmikroskop	JSM-7500F	JOEL
Schüttel Inkubator	Certomat®	B. Braun Biotech
		International GmbH
Sicherheitswerkbank	Safe 2020	Thermo Scientific
Transmissionselektronenmikroskop	JEM-2100	JOEL
Ultramikrotom	EM UC7	Leika
Waage	-	Sartorius
Wärmeschrank	-	Memmert
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Kendro Laboratory
		Products GmbH
Zentrifuge	CT15RE	VWR (USA)

#### 2.1.2 Software

Anwendung	Produktname	Herausgeber
Bildbearbeitung	Image J	Wayne Rasband
	InkScape 0.91	Inkscape Community
	GIMP 2.10.8	GIMP Team
Datenauswertung	Exel 2016	Microsoft Corporation
	GraphPad Prism	Graphpad Software
Durchflusszytometrie	FlowJo v10	FLowJo, LLC
Mikroskopie	ZEN (black edition)	Zeiss
Strukturformeln	ChemDraw 18.1	PerkinElmer Informatics
Textverarbeitung	Word 2016	Microsoft Corporation

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

#### Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
24-Mikrotiterplatte Standard F	Sarstedt AG & Co. KG
96-Mikrotiterplatte Standard F	Sarstedt AG & Co. KG
Columbia Agar (mit 5% Schafsblut)	Bio Mérieux
	Deutschland
Deckgläser, rund, Ø 12 mm	A. Hartenstein
Deckgläser, high precision, 24x50 mm	A. Hartenstein
Diamantmesser, DiATOME Histo	Science Services GmbH
FACS Röhrchen Rundbodenröhrchen, 5ml,	Falcon
Polystyrol	
Halb-Mikro-Küvetten, 1,6 ml, Polystyrol	Sarstedt AG & Co. KG
Kupfergrids, Pioloform beschichtete Einloch-	Plano GmbH
Netzchen	
Linsenpapier, 90x72 mm	Assistent, Karl Hecht
	GmbH & Co KG
Objektträger (Glas, Polysine Slides)	Thermo Scientific
Pasteur-Pipette, 3 ml	A. Hartenstein
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Reaktionsgefäß, SafeSeal, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co. KG
Reaktionsgefäß, CellStart tubes, 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH
Spritze, HSW Norm-Ject, 20 ml	Henke Sass
Sterilfilter Filtropur S 0,2, Porengröße 0,2 µm	Sarstedt AG & Co. KG
Wattestäbchen, 150 x 2,2 mm	Heinz Herenz Hamburg

## 2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4:	Chemikalien u	Ind Reagenzien
	ononnunon a	

Bezeichnung	Hersteller
Aqua dest.	Braun
Bacto Proteose Pepton	BD Biosciences (D)
DMSO (Dimethylsufoxid)	Carl Roth (D)
Ethanol (100%)	Carl Roth (D)
Ethanol (96% reinst)	Carl Roth (D)
Ethanol (96% vergällt)	IHM, Würzburg
FACS Clean, Flow, Rinse	BD Biosciences (D)
FCS (Fetal Calf Serum)	Life Technologies (D)
Glutaraldehyd 25%	Carl Roth (D)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck Chemicals GmbH (D)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck Chemicals GmbH (D)
LB broth base	Invitrogen (D)
MgCl <sub>2</sub>	Carl Roth (D)
Mowiol	Carl Roth (D)
Mueller-Hinton broth	Difco Laboratories
NaCl	Carl Roth (D)
NaHCO₃	Merck Chemicals GmbH (D)
Paraformaldehyd	Carl Roth (D)
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Gibco (D)
Poly-L-Lysin (0,1% (w/v) in H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich (D)
Proteose Pepton (Bacto <sup>™</sup> )	BD Biosciences (D)
RPMI-1640 Medium	Gibco (D)
Stärke (Kartoffelstärke)	Sigma-Aldrich (D)
Triton-X 100	Carl Roth (D)
Tryptic Soy Broth	Sigma-Aldrich (D)

## 2.1.5 Medium für die Bakterienkultur

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Menge	Anmerkungen
Kellog's I	Glukose	40 g	auf 100 ml mit bidest.
	Glutamin	1 g	H <sub>2</sub> O auffüllen
	Thiamin Pyrophosphat	2 mg	
Kellog's II	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	50 mg	auf 100 ml mit bidest. H₂O auffüllen
Kellog's für	Kellog's I	100 ml	sterilfiltrieren
PPM+	Kellog's I	10 ml	
LB Medium	LB broth base	20 g	auf 1000 ml mit bidest.
			H <sub>2</sub> O auffüllen,
			autoklavieren
Müller-Hinton-	Mueller-Hinton Broth	21 g	auf 1000 ml mit bidest.
Medium			H <sub>2</sub> O auffüllen, zum Lösen
			erwärmen, autoklavieren
PPM	Proteose Pepton	7,5 g	auf 500 ml mit bidest.
	NaCl	2,5 g	H <sub>2</sub> O auffüllen,
	Stärke	0,25 g	autoklavieren
	Stammlösung	10 ml	
PPM+	PPM	25 ml	
	Kellog's für PPM+	250 µl	
	MgCl <sub>2</sub> , 2 M	125 µl	
	NaHCO <sub>3</sub> , 8,4%	125 µl	
Stammlösung	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 g	auf 1000 ml mit bidest.
für PPM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 g	H <sub>2</sub> O auffüllen, pH auf
			7,25-7,5 einstellen,
			autoklavieren
TSB Medium	Tryptic Soy Broth	30 g	auf 1000 ml mit bidest.
			H <sub>2</sub> O auffüllen, 1 min
			kochen, autoklavieren

#### Tabelle 5: Medium f ür Bakterienkultur

## 2.1.6 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Menge	Anmerkungen
FACS Puffer	1x PBS	95%	
	FCS	5%	
Formaldehyd 1%	Formaldehyd	1g	auf 100 ml mit bidest. H <sub>2</sub> O auffüllen
Glutaraldehyd 2,5% + Ionen	25% Glutaraldehyd KCl 1 M MgCl <sub>2</sub> (CaCl <sub>2</sub> ) 0,1 M Cacodylat 0,2 M	2,5 ml 1,25 ml 625 µl 6,25 ml	auf 25 ml mit bidest. H <sub>2</sub> O auffüllen hergestellt von der Abteilung für Elektronenmikroskopie, Biozentrum Universität Würzburg
Glutaraldehyd 6,25% in Sörensen Puffer	Glutaradehyd Sörensen Puffer (50mM, pH 7,4)		hergestellt von der Abteilung für Elektronenmikroskopie, Biozentrum Universität Würzburg
MgCl <sub>2</sub> 2M	MgCl <sub>2</sub>	20,3 g	auf 50 ml mit bidest. H <sub>2</sub> O auffüllen, sterilfiltrieren
Mowiol-Lösung	Mowiol PBS Glycerin	10 g 40 ml 20 ml	hergestellt von der Abteilung für Elektronenmikroskopie, Biozentrum Universität Würzburg
NaHCO3 8,4%	NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g	auf 100 ml mit bidest. H <sub>2</sub> O auffüllen, sterilfiltrieren
Paraformaldehyd 3,7%, 4%	Paraformaldehyd	3,7 g/4 g	auf 100ml mit bidest. H <sub>2</sub> O auffüllen, auf 60°C erwärmen, tropfenweise 1 M NaOH zugeben, bis Lösung klar wird, sterilfiltrieren
PBS		1 Päckchen (95 g)	auf 1000 ml mit bidest. H <sub>2</sub> O auffüllen, autoklavieren
Sörensenpuffer (pH 7,4)	Lösung A: 100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Lösung B: 100mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,2 ml (18,2 ml) 81,8 ml	hergestellt von der Abteilung für Elektronenmikroskopie, Biozentrum Universität Würzburg

## Tabelle 6: Lösungen und Puffer

#### 2.1.7 Bakterienstämme

#### Tabelle 7: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung	Herkunft
E. coli	Serotyp 06, Biotyp 1	ATCC, FDA strain Seattle
ATCC 25922		1946 (DSM 1103, NCIB
		1221)
N. meningitidis	Serogruppe B, WT	E. R. Moxon, Universität
Isolat MC58		Oxford, UK
S. aureus	S. aureus subsp.	ATCC, Wichita
ATCC 29213	aureus Rosenbach	

## 2.1.8 Lipide

## Tabelle 8: Lipide

Bezeichnung	Summenformel	Molare Masse	Hersteller
ω-azido-C <sub>6</sub> -	C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	438,66 g/mol	Tim Walter
Ceramid			(AG Prof. Dr. Seibel)
ω-azido-	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	340,51 g/mol	Julian Fink
Sphingosin		_	(AG Prof. Dr. Seibel)
D-erythro-	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>2</sub>	299,49 g/mol	Santa Cruz
Sphingosin		-	Biotechnology

## 2.1.9 Farbstoffe

#### Tabelle 9: Farbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe	Hersteller	Verwendung
Alexa Fluor® 488-DBCO	Jena Bioscience	10mM Stock in
		DMSO
Methylgrün	E. Merck, Darmstadt	Stock 2% in
		bidest. H <sub>2</sub> O;
		1:5000 verdünnt

## 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Bakterien

Für diese Doktorarbeit wurden *N. meningitidis*, *E. coli* und *S. aureus* verwendet. Die unterschiedlichen Bakterienstämme wurden bei -80 °C gelagert. Für die Aufzucht von *N. meningitidis* wird am Vortag eine geringe Menge der gefrorenen Probe auf eine Blut-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und einem Gasatmosphärenanteil von 5% (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Versuchstag werden mit einem sterilen Wattestäbchen Kolonien von der Blut-Agarplatte entnommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml PPM+ überführt. Danach erfolgt die Inkubation auf einem Schüttler bei 200 rpm und 37 °C für 90 Minuten.

Die Aufzucht von *E. coli* und *S. aureus* erfolgte in flüssiger Übernachtkultur in einem 50 ml Reaktionsgefäß bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub> auf einem Rüttler bei 200 rpm. Als Nährmedium wurde für *E. coli* LB-Medium und für *S. aureus* TSB-Medium verwendet. Am Versuchstag wird eine neue Kultur in einem 50 ml Greiner mit 10 ml frischem Nährmedium gestartet. Die optische Dichte der Übernachtkultur wird gemessen und eine bestimmte Menge in die neue Kultur übertragen, sodass die optische Dichte 0,1 ( $\lambda$  = 600 nm) beträgt. Diese optische Dichte entspricht 1 x 10<sup>8</sup> Bakterien pro ml. Die neue Bakterienkultur wird wiederum für 90 min auf dem Rüttler bei 37 °C inkubiert.

Die Bakterienanzahl pro ml wird anschließend über die optische Dichte mit einem Photometer bei einer Wellenlänge ( $\lambda$ ) von 600 nm bestimmt.

## 2.2.2 Lipide

Das D-Erythro-Sphingosin (C18) stammt von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland. Das azido-funktionalisierte Ceramid (C6) und das azido-funktionalisierte Sphingosin (C18) wurden von Tim Walter und Julian Fink aus der Arbeitsgruppe von Prof. Jürgen Seibel (Organische Chemie, Universität Würzburg) synthetisiert und uns zur Verfügung gestellt. Die in 96% Ethanol gelösten Lipide wurden lichtgeschützt bei -20 °C gelagert.



ω-azido-C<sub>6</sub>-Ceramid

#### Abbildung 1: Strukturformeln verwendeter Lipide

### 2.2.3 Wachstumskurven

Die Bakterien werden wie in Absatz 2.2.1 beschrieben vorbereitet. Nach der Dichtemessung werden jeweils 1 x 10<sup>9</sup> Bakterien in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml Nährmedium überführt. Dies entspricht 1 x 10<sup>8</sup> Bakterien pro ml. Es werden unterschiedliche Konzentrationen der zu testenden antibakteriell wirkenden Substanzen hinzugegeben und die Proben werden auf einem Rüttler bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Die optische Dichte wird alle 30 min über einen Zeitraum von drei Stunden mit einem Photometer ( $\lambda = 600$  nm) ermittelt und so die Bakterienanzahl pro ml bestimmt.

## 2.2.4 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration werden Nährlösungen mit absteigenden Konzentrationen der hemmenden Substanz hergestellt. Die höchste verwendete Konzentration ist 64 µg/ml, da höhere Konzentrationen an

Sphingosin und Sphingolipiden ausfallen. Die 64 µg/ml Lösung wird, mittels geometrischer Verdünnung, bis zu 1 µg/ml in einer 96-Mikrotiterplatte verdünnt. Die Bakterien werden wie in Absatz 2.2.1 beschrieben vorbereitet und jede Vertiefung wird mit jeweils 1 x 10<sup>8</sup> Bakterien pro ml beimpft. Durch die Zugabe der Bakterien erfolgt eine weitere Verdünnung der getesteten Substanz, sodass die höchste Konzentration nun 32 µg/ml beträgt. Während sich die Bakterien in der Wachstumskontrolle (ohne inhibierende Substanz) vermehren, kommt es bei steigender Konzentration der inhibierenden Substanz zu einer Reduktion oder totalen Hemmung der Bakterienteilung. Die Vermehrung der Bakterien wird durch eine Trübung der Nährlösung sichtbar. Die niedrigste Konzentration an hemmender Substanz, bei der keine Trübung mit dem bloßen Auge sichtbar ist, wird als minimale Hemmkonzentration (MHK; engl. MIC = minimum inhibitory concentration) bezeichnet. Die Trübung der einzelnen Vertiefungen wird mit dem Tecan Reader anschließend genau bestimmt. Aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in denen keine Trübung sichtbar ist, werden je 100 µl auf eine Blutagarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C und je nach Bakterium mit oder ohne CO<sub>2</sub> inkubiert. Die geringste Konzentration, bei der am nächsten Tag kein Bakterienwachstum sichtbar ist, wird als minimale bakterizide Konzentration (MBK; engl. MBC = minimum batericidal concentration) bezeichnet.

#### 2.2.5 Click-Chemie

Die Click-Chemie wird für das selektive Markieren von modifizierten Molekülen (hier Sphingosin und C<sub>6</sub>-Ceramid) mit Fluoreszenzfarbstoffen verwendet. Der Begriff "Click Chemie" wurde von Kolb, Finn und Sharpless 2001 eingeführt. Die Reaktionen sollten bestimmte Anforderungen erfüllen, wie eine hohe Spezifität, eine große Ausbeute und einfache Reaktionsbedingungen [171]. Laut der Autoren erfüllt die 1,3 – dipolare Cycloaddition von Aziden und Alkynen nach Huisgen [172] am besten die Kriterien der Click-Chemie. Die Reaktion verlief jedoch nur bei sehr hohen Temperaturen und zeigte auch nur eine geringe Selektivität. Diese Nachteile wurden durch die Entwicklung der Kupfer(I)katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition; CuAAC) 2002 aufgehoben [173, 174]. Auf Grund der Toxizität von

Kupfer und die Auswirkung auf den untersuchten Organismus wird die CuAAC vor allem zur Markierung von fixierten Zellen verwendet [175]. Die Azide-Alkyne Cycloaddition kann jedoch auch durch Ringspannung induziert werden (strainpromoted Azide-Alkyne Cycloaddition, SPAAC), wodurch kein Kupfer benötigt wird. Dies wird durch die Verwendung von Cyclooctinen ermöglicht [176, 177]. Chemische Reaktionen, deren Nebenprodukte keinen Einfluss auf das System haben und nicht mit anderen, im System vorkommenden, funktionellen Gruppen reagieren, werden auch als bioorthogonale Reaktionen bezeichnet.



Abbildung 2: Click-Reaktion von ω-azido-C6-Ceramid und DBCO-Alexa Fluor® 488

Das funktionalisierte C<sub>6</sub>-Ceramid reagiert mit dem Farbstoff DBCO-AF 488 in einer SPAAC-Reaktion. Die funktionellen Gruppen sind mit roten Kreisen markiert.

#### 2.2.6 Durchflusszytometrische Messung

#### 2.2.6.1 Funktionsweise der Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie ist es möglich verschiedene physikalische Parameter von Partikeln in einer Lösung (meistens Zellen) gleichzeitig zu messen. Die Probenflüssigkeit wird von dem Gerät durch einen engen Kanal aufgenommen, es entsteht ein laminarer Fluss, durch den die Zellen in einem dünnen Strahl an einem Laser vorbeigeleitet werden. Verschiedene Detektoren nehmen das Streulicht und die Fluoreszenzemission auf. Ein Durchflusszytometer besitzt zwei Streulichtdetektoren (engl. scatter). Vorwärts gestreutes Licht (FSC = forward scatter) wird von einem Detektor, der in derselben Achse wie die Lichtquelle liegt, gemessen und korreliert mit der Größe der Zelle. Das seitlich gestreute Licht (SSC = sidewards scatter) wird von orthogonal zum ursprünglichen Lichtpfand gelegenen Detektoren aufgenommen und wird verwendet, um die Granularität der Zelle zu bestimmen. Werden die Zellen oder bestimmte Zellbestandteile z. B. durch fluoreszenzmarkierte Antikörper oder durch Click-Chemie markiert, können verschiedene Detektoren die Fluoreszenzemission und deren Intensität aufzeichnen.

#### 2.2.6.2 Durchführung der Messung

Die Bakterien werden wie im Abschnitt 2.2.1 beschrieben vorbereitet. Nach der Messung der optischen Dichte werden jeweils 1 x 10<sup>6</sup> Bakterien pro Probe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in der benötigten Menge (100 µl pro Probe) 1x PBS resuspendiert und je 100 µl der Bakteriensuspension in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben werden wieder bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es wird eine 5 µM Ceramidbzw. Sphingosinlösung in RPMI vorbereitet und jeweils 100 µl auf die Proben gegeben. Die Kontrollgruppen (unbehandelt und Farbstoffkontrolle) erhalten nur 100 µl RPMI. Die Proben werden für unterschiedliche Zeiten (5 min, 15 min, 25 min und 30 min) bei 37 °C und 5% CO2 inkubiert. Während der Inkubation wird die Lösung mit dem clickbaren Farbstoff Alexa 488 (5 µM) hergestellt. Nach der Inkubation werden die Proben 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wird jeweils 100 µl der Farbstofflösung zu der Probe gegeben und für 15 min bei 37 °C und 5% CO2 inkubiert. Danach werden die Proben wieder 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überschuss abgenommen und dreimal mit 1x PBS gewaschen. Das Pellet wird dann in 1% Formaldehyd 4 °C resuspendiert und zur Fixierung bei O/N Lösung gelagert. Am nächsten Tag werden die Proben wieder für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 500 µl FACS Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur und die Datenanalyse mit dem Programm FlowJo.

#### 2.2.7 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Bakterien werden wie im Abschnitt 2.2.1 beschrieben vorbereitet. Nach der Dichtemessung werden jeweils 1 x 10<sup>8</sup> Bakterien in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml Nährlösung überführt und die bestimmte Menge an  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid,  $\omega$ -azido-Sphingosin, 96% reinst. Ethanol oder Triton hinzugegeben. Die Proben werden für 180 min bei 200 rpm und 37 °C auf einem Rüttler inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wird die Bakterienanzahl pro ml über die optische Dichte mit einem Photometer ( $\lambda = 600$  nm) bestimmt. Danach werden die Proben bei 4000 x g für 15 min zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird verworfen, das Zellpellet in 1 ml 1x PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Proben werden nun bei 16200 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in 100 µl Fixans (2,5% gepuffertes Glutaraldehyd, angesetzt von der Arbeitsgruppe von Prof. C. Stigloher, Abteilung Elektronenmikroskopie Universität Würzburg) resuspendiert. Zur Fixierung werden die Proben 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 50 µl auf Blut-Agarplatten ausplattiert. Die Proben werden über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Blut-Agarplatten werden über Nacht inkubiert, um die Fixierung zu überprüfen. Nur wenn am nächsten Tag kein Wachstum zu sehen ist, können die Proben in die Abteilung für Elektronenmikroskopie des Biozentrums am Hubland in Würzburg mitgenommen werden.
Die Einbettung für das Transmissionselektronenmikroskop erfolgt in Epon, einem aliphatischen Epoxidharz. Die Proben werden 5 min bei 16200 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Daraufhin werden die Proben fünfmal für jeweils 5 min mit 50 mM Cacodylatpuffer pH 7,2 gewaschen und anschließend mit 2% gepuffertem OsO4 für 90-120 min fixiert. Danach werden die Proben fünfmal für jeweils 3 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Kontrastierung erfolgt mit 0,5 % wässrigem Uranylacetat über Nacht. Danach werden die Proben wieder fünfmal für jeweils 3 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen und darauffolgend mittels aufsteigender Ethanolreihe entwässert (s. Tabelle 10).

Lösung	Zeit	Temperatur
50% Ethanol	30 min	4 °C (im Kühlschrank)
(verdünnt mit Rotisol)		
70% Ethanol	30 min	4 °C
90% Ethanol	30 min	4 °C
100% Ethanol (abs. EtOH)	30 min	Raumtemperatur (RT)
100% Ethanol	30 min	RT
100% Ethanol	30 min	RT
Propylenoxid	30 min	RT
Propylenoxid	30 min	RT
Propylenoxid	30 min	RT

 Tabelle 10:
 Entwässerung der TEM Proben

Beim Abpipettieren der einzelnen Entwässerungslösungen muss unbedingt ein Flüssigkeitsrest im Gefäß verbleiben, um ein Austrocknen durch Verdampfen des Lösungsmittels zu verhindern. Nach der Entwässerung wird das Propylenoxid durch eine 1:1 Mischung von Propylenoxid und Epon ersetzt und über Nacht offen unter dem Abzug gelagert, sodass das Propylenoxid verdampfen kann. Am nächsten Tag wird das Epon-Propylengemisch durch reines Epon ersetzt, welches über Nacht oder für mindestens 2 h auf den Proben verbleibt. Danach wird das Epon erneut ausgetauscht und verbleibt 2 h auf den Proben, bevor es ein weiteres Mal ausgetauscht wird und 1 h auf den Proben verbleibt. Die Polymerisation erfolgt danach für 48 h in einem Wärmeschrank bei 60 °C.

Nach Aushärtung des Epons wird die Eponkapsel mit der Probe aus dem 1,5 ml Reaktionsgefäß genommen und mit einer Rasierklinge wird die Spitze der Kapsel entfernt. Da die Probe sich immer sehr nah an der Spitze der Kapsel befindet, enthalten die Schnitte bald Anteile der Probe. Um zu überprüfen, ob man eine

gute Stelle in der Probe gefunden hat, kann man einen Schnitt auf einem Objektträger mit Methylenblau anfärben und unter dem Lichtmikroskop anschauen. Hat man einen interessanten Abschnitt gefunden wird die Probe per Hand zu einer trapezförmigen Frontfläche mit einer Rasierklinge getrimmt und es werden mit dem Ultramikrotom (Leica EM UC7) Ultradünnschnitte (100 nm) angefertigt. Die Ultradünnschnitte werden in einem Wasserbecken aufgefangen und mit Hilfe einer an einem Holzstäbchen befestigten Wimper auf ein gebracht. Proben werden Kupfergitter (Kupfer-Grids) Die mit dem Transmissionselektronenmikroskop Jeol JEM-2100 in der Abteilung für Elektronenmikroskopie im Biozentrum am Hubland (Leitung: Prof. Stigloher) mikroskopiert.

#### 2.2.8 Rasterelektronenmikroskopie

Die Bakterien werden wie oben beschrieben vorbereitet. Nach Bestimmung der Bakterienanzahl pro ml mit Hilfe eines Photometers ( $\lambda = 600$ nm) werden 1 x 10<sup>8</sup> Bakterien in 10 ml PPM+ in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Kontrollgruppe wird zusätzlich 96% reinst. Ethanol hinzugefügt, den anderen Ansätzen Triton,  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid oder  $\omega$ -azido-Sphingosin. Die Proben werden für 180 min bei 37 °C und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert.

Da die Bakterien für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen auf Glas haften müssen, werden runde Deckgläser zuerst mit Ethanol abgeflammt und anschließend mit 300 µl Poly-L-Lysin bei 37 °C für eine Stunde in einer 24-Mikrotiterplatte beschichtet. Danach wird das Poly-L-Lysin abgenommen und die Deckgläschen mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Die Reaktionsgefäße mit der Bakteriensuspension werden nach Inkubationszeit abzentrifugiert, der Überstand weggeschüttet und das Zellpellet in 1 ml PPM+ resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird auf die vorbereiteten Deckgläschen gegeben und für 2 h bei 37 °C und einem Gasanteil von 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach werden die nicht adhärenten Bakterien abgenommen und die Deckgläschen einmal mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Die Fixation der Bakterien erfolgt mit 1 ml 6,25% Glutaraldehyd in Sörensen-Puffer je Vertiefung der Mikrotiterplatte für eine Stunde bei Raumtemperatur, danach erfolgt die Lagerung bei 4 °C O/N. Die

Glasplättchen werden in der Fixierlösung in der 24-Mikrotiterplatte in die Abteilung für Elektronenmikroskopie im Biozentrum am Hubland gebracht. Die Proben werden zuerst fünfmal mit Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen und anschließend mit Aceton entwässert (s. Tabelle 11).

Lösung	Zeit	Temperatur
30% Aceton	15 min	RT
50% Aceton	20 min	RT
75% Aceton	30 min	RT
90% Aceton	45 min	RT
100% Aceton	30 min	RT
100% Aceton	30 min	RT
100% Aceton	30 min	RT
100% Aceton	30 min	RT
100% Aceton	30 min	RT
100% Aceton	Aufbewahrung bis zur	4 °C
	Weiterverarbeitung	

Tabelle 11: Entwässerung der REM Proben

Die entwässerten Proben werden in frisches wasserfreies Aceton überführt. Die Trocknungskörbchen werden zu dreiviertel ihrer Höhe in wasserfreies Aceton gestellt und die Proben rasch, um ein Austrocknen zu vermeiden, in die Körbchen überführt und mit einem Deckel verschlossen. Die Körbchen werden in die mit Aceton gefüllte Druckkammer eingesetzt und die Druckkammer verschlossen. Die Trocknung über dem kritischen Punkt erfolgt mit dem Gerät CPD030 der Firma Bal-Tec.

Die Glasplättchen mit den getrockneten Proben werden mit Haft-Kleber auf dem REM-Objekttisch befestigt und das Glasplättchen und der Metalltisch werden durch einen kleinen Leitsilbertropfen verbunden. Danach werden die Proben dünn mit Metall beschichtet. Dieser als "Sputtern" bezeichnete Vorgang ist notwendig, um das Abfließen der Elektronen beim Mikroskopieren zu ermöglichen, die sonst das Bild stören würden. Das Beschichten erfolgte mit dem Sputter Coater SCD005 der Firma Bal-Tec. Die Proben wurden mit einem ca. 20 nm dicken Gold-Palladium (80:20) Film beschichtet. Die Proben werden danach bis zum Mikroskopieren in einem Exsikkator gelagert.

#### 2.2.9 Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie

Die Bakterien werden wie oben beschrieben vorbereitet. Nach der Dichtemessung werden jeweils 1 x 10<sup>8</sup> Bakterien in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml PPM+ überführt und die bestimmte Menge an azido-funktionalisiertem Ceramid oder Sphingosin hinzugegeben. Die Proben werden für 180 min bei 200 rpm und 37 °C auf einem Rüttler inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wird die Bakterienanzahl pro ml über die optische Dichte mit einem Photometer ( $\lambda = 600$  nm) bestimmt. Danach werden die Proben bei 4000 x g für 15 min zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird verworfen, das Zellpellet in 1 ml 1x PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Proben werden nun bei 16200 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand wird wieder abgenommen. Das Anfärben des azido-funktionalisierten Ceramids bzw. Sphingosins erfolgt mit Hilfe der sogenannten Click-Reaktion. Das Zellpellet wird in der Farbstofflösung mit DBCO-Alexa Fluor 488 (5µM) resuspendiert und für 15 min bei 37 °C und einem Gasanteil von 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach werden die Proben wieder bei 16200 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und die Probe mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Nach wiederholtem Zentrifugieren wird das Zellpellet in 100 µl Fixans (4% Paraformaldehyd) resuspendiert. Zur Fixierung werden die Proben 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 50 µl auf Agarplatten ausplattiert. Die Proben werden über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Agarplatten werden über Nacht inkubiert, um die Fixierung zu überprüfen. Nur wenn am nächsten Tag kein Wachstum zu sehen ist, können die Proben in die Abteilung für Elektronenmikroskopie am Hubland mitgenommen werden.

Der Arbeitsablauf für die Herstellung der CLEM Proben ist in der Abbildung 3 dargestellt. Die Einbettung für die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie erfolgt in LR-White, ein Einbettmedium auf Acrylatbasis. Es hat eine sehr geringe Viskosität, ist ungiftig und die Polymerisation erfolgt durch Hitze oder UV-Licht.

Die Proben werden bei 16200 x g für 5 min zentrifugiert, sodass ein deutliches Zellpellet sichtbar wird. Die Proben werden fünfmal für jeweils 3 min mit 4 °C kaltem 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Absättigung der freien

Aldehydgruppen mit NH<sub>4</sub>Cl (50 mM Lösung in 1x PBS) für 15 min bei Raumtemperatur und danach das Waschen mit 4 °C H<sub>2</sub>O (fünfmal, je 3 min). Die Entwässerung erfolgt mit aufsteigender Ethanolreihe (s. Tabelle 12). Beim Wechseln des Alkohols muss man zügig arbeiten, um das Austrocknen der Präparate zu vermeiden. Da LR-White Plastik anlöst müssen die Präparate nach den Entwässerungschritten mit 100% Ethanol in Glasgefäße mit Deckel überführt werden.

Lösung	Zeit	Temperatur		
30% EtOH	2x 15 min	4 °C		
50% EtOH	2x 30 min	-20 °C		
70% EtOH *	2x 30 min	-20 °C		
90% EtOH *	2x 30 min	-20 °C		
100% EtOH	2x 60 min	-20 °C		
100% EtOH/LR-White	über Nacht	4 °C		
(Verhältnis 1:1)				
LR-White	1 Stunde	4 °C		
LR-White	3 – 4 Stunden	4 °C		
LR-White	über Nacht	4 °C		
LR-White	3 – 4 Stunden	Raumtemperatur		
* diese EtOH Lösungen enthalten zusätzlich 0,2% Uranylacetat				
(angesetzt aus 10% Uranylacetat in 100% EtOH)				

Tabelle 12:	Entwässerung der CLEM Proben
-------------	------------------------------

Nach der Entwässerung und der Lagerung in LR White erfolgt die Überführung der Präparate in Gelatinekapseln, die anschließend geschlossen werden.

Die Polymerisation erfolgt bei 40 °C im Wärmeschrank für mindestens drei Tage. Auch diese Proben werden per Hand mit einer Rasierklinge vorgeschnitten, bis man im Pellet ist, und anschließend werden mit dem Mikrotom EM UC7 der Firma Leica Ultradünnschnitte (100 nm) angefertigt, die dann auf einen Glas Objektträger gebracht werden. Die Objektträger werden dann zum Trocken in einen Wärmeschrank gelegt, bis der Wassertropfen getrocknet ist, und so die Schnitte auf dem Glas haften.

Für das unvoreingenommene Korrelieren ist es wichtig, nicht nur das gesuchte Sphingolipid anzufärben, sondern auch ein spezifisches Zellorganell. Hierfür eignet sich z. B. das Anfärben der DNA. Die DNA-Färbung erfolgte auf den Deckgläsern mit Methylgrün (1:5000 verdünnt mit destilliertem H<sub>2</sub>O) für 10 min.

Die Objektträger mit den Proben wurden danach mit dest. H<sub>2</sub>O abgespült, um die Farbstofflösung vollständig zu entfernen, und getrocknet. Um nach der Fluoreszenzmikroskopie die Proben für das Rasterelektronenmikroskop vorbereiten zu können, wurde als Einschlussmittel wasserlösliches Mowiol verwendet. Die Proben wurden mit einem Präzisionsdeckglas abgedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop Elyra S.1 SIM der Firma Zeiss betrachtet. Das SIM ist mit einem 63x/1.4 Immersionsöl-Objektiv, einer sCMOS- (engl. scientific complemetary metal-oxide-semiconductor) Kamera und vier verschiedenen Anregungslasern ausgestattet. Für diese Arbeit wurden die Laser 488 nm und 642 nm verwendet. Nachdem man alle fluoreszenzmikroskopischen Bilder aufgenommen hat, werden die Deckgläser mit Hilfe einer Rasierklinge abgenommen und das Moviol mit dest. H<sub>2</sub>O abgespült.

Die Proben werden danach für das Rasterelektronenmikroskop (REM) vorbereitet. Da die Objektträger für das Rasterelektronenmikroskop zu groß sind, wird das Glas der Objektträger mit einem Diamantstift in kleinere Teile geschnitten. Die Kontrastierung der Proben erfolgt mit 2,5% Uranylacetat in Ethanol für 15 min und 50% Bleicitrat nach Reynolds [178] in H<sub>2</sub>O für 10 min. Danach werden die Proben mit H<sub>2</sub>O abgespült und getrocknet. Die Objektträger werden auf einen REM Objekttisch geklebt und Objektträger und Objekttisch werden an einer Stelle durch Leitsilber miteinander verbunden. Anschließend werden die Proben mit Kohle gesputtert. Dieser Schritt erfolgt durch Verdampfen eines Kohlefadens mit der Compact Coating Unit CCU-010 der Firma Safematic. Die Schichtdicke der Kohle sollte ungefähr 2,5 – 3 nm betragen. Vor der Aufnahme der rasterelektronenmikroskopischen Bilder hilft es, die Fluoreszenz-Aufnahmen anzuschauen und für die Fragestellung interessante Bereiche auszusuchen. Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder wurden mit dem JSM-7500F der Firma JEOL mit einem LABE-Detektor aufgenommen. Der LABE-Detektor nimmt zurückgestreute Elektronen auf, die in flachem Winkel die Probe verlassen und gibt so zusätzliche Informationen über die Oberfläche. Es ist hilfreich, einige Übersichtsaufnahmen von besonderen Bakteriengruppierungen, Randverläufen oder bakterienfreien Bereichen zu machen, um die Korrelation der

Bilder und die Orientierung innerhalb der Probe zu erleichtern. Danach können auch Detailaufnahmen gemacht werden.



## Abbildung 3: Arbeitsablauf für die CLEM-Aufnahmen

Die Abbildung wurde in Anlehnung an [179] erstellt.

## 2.2.10 Das Korrelieren

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Bildern wurden mehrere Z-Schichten aufgenommen, von denen man sich die hellste Aufnahme in beiden aufgenommenen Kanälen aussucht und diese Bilder exportiert.

Für das Korrelieren wurde die Software Inkscape verwendet. Um ein Bild zu korrelieren wird das REM-Bild und jeweils ein SIM-Bild des jeweiligen Kanals geöffnet. Zuerst werden die zwei Fluoereszenzbilder miteinander korreliert und zu einem Bild gruppiert. Für das unvoreingenommene Korrelieren ist es wichtig, das Bild mit dem gesuchten Sphingolipid unter dem Bild mit der DNA-Färbung zu verstecken. Nun kann man die Opazität des REM-Bildes reduzieren und über die SIM-Bilder legen. Dank der Gruppierung sieht man nur die DNA-Färbung und kann diese mit dem REM-Bild korrelieren. Passen die Strukturen des SIM- und REM-Bildes zueinander, kann man die Gruppierung aufheben und das Bild mit dem gesuchten Sphingolipid nach oben legen. Nun kann man sehen, wo das Signal des Sphingolipids im REM-Bild lokalisiert ist. Das nachträgliche Korrelieren ist <u>nicht</u> erlaubt. Die korrelierten Bilder werden exportiert und mit GIMP übereinander gelagert.



#### Abbildung 4: Korrelieren der REM- und SIM-Bilder.

[A] Neben dem gesuchten Sphingolipid, hier  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid (DBCO-Alexa Fluor® 488), wurde auch die DNA (Methylgrün) angefärbt. Zuerst werden die verschiedenen Kanäle der Fluoreszenz Aufnahmen miteinander korreliert. [B] Anschließend wird der Kanal mit dem gesuchten Ceramid/ Sphingosin verdeckt und die DNA Färbung mit dem REM-Bild korreliert. Erst danach wird der Kanal mit dem gesuchten Ceramid oder Sphingosin wieder sichtbar gemacht. Maßstabsbalken: 1 µm.

## 2.2.11 Statistik

Für die statistische Analyse wurde GraphPad Prism verwendet. Die Analyse von Datensätze mit mehr als zwei Gruppen wurde beim Vorliegen einer Gruppenvariablen per one-way ANOVA, bei mehreren Gruppenvariablen per two-way ANOVA und anschließendem Dunnett-Test durchgeführt. Als statistisch relevant wurden P-Werte kleiner als 0,05 bewertet.

# 3 Ergebnisse

# 3.1 Antibakterielle Wirkung von Sphingolipiden

# 3.1.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration und minimalen bakteriziden Konzentration

Um die antibakterielle Wirkung des funktionalisierten Sphingosins und C<sub>6</sub>-Ceramids im Vergleich zu anderen Stoffen einordnen zu können, wurden zuerst die MHK- und MBK-Werte von dem vielfach untersuchten Sphingosin bestimmt. Die Wirkung von Sphingosin gegenüber Gram-negativen *N. meningitidis* (MC58) wurde mit Hilfe der Bouillon-Dilutionsmethode (engl.: broth microdilution assay) bestimmt. Die ermittelten MHK- und MBK-Werte für Sphingosin betragen 4 µg/ml bzw. 8 µg/ml (Tabelle 13). Danach wurde mit dem gleichen Testverfahren die Wirkung des ω-azido-Sphingosins und ω-azido-C<sub>6</sub>-Ceramids gegenüber MC58 bestimmt. Die MHK- und MBK-Werte liegen für ω-azido-Sphingosin ebenfalls bei 4 µg/ml und 8 µg/ml und für ω-azido-C<sub>6</sub>-Ceramid bei 2 µg/ml und 4 µg/ml (Tabelle 13). Die Werte zeigen, dass beide funktionalisierten Stoffe eine antibakterielle Wirkung zeigen. Die bakterizide Wirkung des ω-azido-Sphingosins und Sphingosins ist identisch und liegt bei jeweils 8 µg/ml. Das ω-azido-C<sub>6</sub>-Ceramid zeigt jedoch eine stärkere bakteriostatische und bakterizide Wirkung als das Sphingosin (MHK 2 µg/ml und MBK 4 µg/ml, statt 4 µg/ml und 8 µg/ml).

#### Tabelle 13: MHK- und MBK-Werte von N. meningitidis

**MHK und MBK von Sphingosin,**  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid und  $\omega$ -azido-Sphingosin gegenüber *N. meningitidis.* Alle Werte sind in  $\mu$ g/ml angegeben. MHK ist definiert als die geringste Konzentration einer Substanz, die das sichtbare Wachstum verhindert. MBK ist definiert als die geringste Konzentration, bei der 99,9% der Individuen der getesteten Mikroorganismen abgetötet werden.

Linido	N. meningitidis			
Libide	MHK (µg/ml)	MBK (µg/ml)	Quelle	
Sphingosin	4	4	Becam <i>et al.</i> (2017) [162]	
ω-azido-Sphingosin	4	8	Diese Arbeit	
ω-azido-C6-Ceramid	2	4	Diese Arbeit	

## 3.1.2 Wachstumshemmung von N. meningitidis

Die antibakterielle Wirkung von  $\omega$ -azido-Sphingosin und  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid gegenüber MC58 wurde außerdem mittels Wachstumskurven untersucht. Es wurden verschiedene Konzentrationen des  $\omega$ -azido-Sphingosins und des  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramids getestet und ihr Einfluss auf das bakterielle Wachstum dokumentiert. Das Bakterienwachstum wurde über 3 h hinweg beobachtet und alle 30 min durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge ( $\lambda$ ) von 600 nm bestimmt. In Abbildung 5 sind die Wachstumskurven von  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid und  $\omega$ -azido-Sphingosin zu sehen. Schon die niedrigste getestete Konzentration von  $\frac{1}{10}$  der ermittelten minimalen bakteriziden Konzentration zeigt bei beiden getesteten Substanzen einen hemmenden Effekt auf das Bakterienwachstum. Auch hier wird sichtbar, dass der antibakterielle Effekt von  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid etwas stärker ist als bei  $\omega$ -azido-Sphingosin.





Einfluss von  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid und  $\omega$ -azido-Sphingosin auf das Wachstum von *N. meningitidis* (MC58). Wachstumskurven von MC58 (OD<sub>600</sub> = 0,1; t = 0 min) in PPM+ mit unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Lipids; Bakteriendichte alle 30 min anhand der OD<sub>600</sub> bestimmt. Drei unabhängige Versuche mit Standardabweichung sind zu sehen. Statistisch analysiert mit two-way ANOVA und Dunnett Test (Vergleichsgruppe: MC58 Kontrollgruppe) (\*, P<0,05; \*\*, P<0,01; \*\*\*,P<0,001; \*\*\*\* P<0,001).

## 3.2 Aufnahme der funktionalisierten Sphingolipide

Um den Wirkmechanismus von Sphingosin und Sphingolipiden genauer zu verstehen, wurden das funktionelle Sphingosin und das funktionelle Sphingolipid verwendet. Durch die funktionelle Azid-Gruppe ist es möglich, das ω-azido-

Sphingosin und das  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid mit einem Farbstoff zu markieren und so die Aufnahme in *N. meningitidis* zu verfolgen. Die Bakterien wurden für unterschiedlich lange Zeiträume (5-30 min) mit 5 µM des  $\omega$ -azido-Sphingosins oder des  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramids behandelt. Als Farbstoff wurde DBCO-Alexa Fluor® 488 (DBCO-AF 488) verwendet und die Click-Reaktion erfolgte durch spannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition. Die Proben wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Schon nach 5 Minuten sieht man bei beiden untersuchten Komponenten einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität (Abbildung 6). Die Fluoreszenzintensität nimmt durch längere Inkubation der Bakterien mit  $\omega$ -azido-Sphingosin und  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid nicht zu. Vergleicht man beide Versuchsgruppen, ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität beim  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid etwas größer ist als beim  $\omega$ -azido-Sphingosin.



#### Abbildung 6: Aufnahme in N. meningitidis

ω-azido-C<sub>6</sub>-Ceramid [A] und ω-azido-Sphingosin [B] werden in kurzer Zeit von *N. meningitidis* aufgenommen. Die Bakterien wurden mit 5 µM ω-azido-C<sub>6</sub>-Ceramid bzw. ω-azido-Sphingosin für die angegebenen Zeitintervalle behandelt und anschließend mit DBCO-Alexa Fluor 488 angefärbt. Die Aufnahme der Lipide wurde mit Hilfe von Durchflusszytometrie analysiert. Zur Darstellung kommt die relative Fluoreszenzintensität dreier unabhängiger Versuche. Die statistische Analyse erfolgt mit one-way ANOVA und Dunnett Test, (Vergleichsgruppe: Farbstoff Kontrolle der unbehandelten Bakterien (DBCO-AF 488); (\*\*\*, P<0,001; \*\*\*\*, P<0,0001).

## 3.3 Morphologische Veränderungen

Um mehr über den Wirkmechanismus von Sphingosin und Sphingolipiden zu erfahren, wurden nun mikroskopische Aufnahme angefertigt, um morphologische Veränderungen der Bakterien zu erkennen. Es wurden zwei unterschiedliche Mikroskope verwendet: Ein Transmissionselektronenmikroskop und ein Rasterelektronenmikroskop. Durch TEM-Aufnahmen können dünne Schnitte der behandelten Bakterien betrachtet werden und Aussagen über die innere und äußere Membran sowie den intrazellulären Raum getroffen werden. Mit den REM-Bildern kann hingegen vor allem die Oberfläche der Bakterien, sowie ihre räumliche Anordnung betrachtet werden.

## 3.3.1 Die Morphologie von *N. meningitidis* und der Kontrollgruppe

Zuerst wurden Proben von unbehandelten N. meningitidis (Isolat MC58) angefertigt, um die Morphologie mit der der behandelten Proben zu vergleichen. Die Aufnahmen sind Abbildung 7 zusammengestellt. in In der Übersichtsaufnahme sieht man eine dichte Anordnung der Bakterien. Die runde Form der Gram-negativen Kokken ist deutlich sichtbar und sie sind oft als Diplokokken angeordnet. In den Detailaufnahmen ist deutlich die für Gramnegative Bakterien typische innere und äußere Membran sichtbar. Beide Membranen sind kontinuierlich und werden durch den dünnen periplasmatischen Raum und die als dünne, dunkle Linie sichtbare Peptidoglykanschicht getrennt. Die äußere Membran ist leicht gewellt, was sowohl in den TEM- als auch den REM-Aufnahmen zu sehen ist. Die Vesikelabschnürungen der äußeren Membran, die als "blebbing" bezeichnet werden, sind auch zu erkennen.

Da das funktionalisierte Sphingosin und das funktionalisierte Ceramid in Ethanol gelöst sind, wurde für die Kontrollgruppe *N. meningitidis* mit Ethanol behandelt. Das Volumen von 100 µl Ethanol entspricht der größten Ethanolmenge, die im Zusammenhang mit dem funktionalisierten Ceramid für die Versuche verwendet wurde. In der TEM-Übersichtsaufnahme weisen einige Bakterien ein elektronendichteres Zytosol als andere auf. In den Detailaufnahmen erkennt man jedoch keine weiteren Unterschiede zu den unbehandelten Bakterien. Bei der REM-Übersichtsaufnahme sieht man jedoch zwischen den morphologisch

unauffälligen Bakterien zellulären Debris liegen. Dieser besteht vermutlich aus zellulären Bestandteilen lysierter Zellen. In der Detailaufnahme sieht *N. meningitidis* jedoch unauffällig aus und man erkennt die leicht gewellte kontinuierliche äußere Membran.



Abbildung 7: TEM- und REM-Aufnahmen von N. meningitidis

Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) und rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen von *N. meningitidis.* Die Bakterien blieben entweder unbehandelt (Bilder A-E) oder wurden mit 100 µl Ethanol für 3 h behandelt (Kontrollgruppe, Bilder F-K). Innere und äußere Membran sind in Bild C mit \* markiert und der Intra- (IZR) sowie Extrazellulärraum (EZR) sind beschriftet. "Blebs" sind in Bild B und G mit ► markiert. Die Bilder F-K zeigen keine Veränderung der morphologischen Struktur durch Ethanol. Maßstabsbalken der Übersichtsaufnahmen TEM und REM: 1 µm. Maßstabsbalken der Detailaufnahmen, wenn nicht anders angegeben TEM und REM: 500 nm.

## 3.3.2 Morphologische Veränderungen durch ω-azido-Sphingosin

Die Bakterien wurden mit der MBK-Konzentration (=  $8 \mu g/ml$ ) an  $\omega$ -azido-Sphingosin und einem Zehntel der MBK behandelt. Bei der Probe, die mit 0,8  $\mu g/ml$  behandelt wurde, sieht man in der Übersichtsaufnahme kaum Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 8, Bilder A-E). Die meisten Bakterien sind klein, rund und oft als Diplokokken zu erkennen. Die Ausstülpungen der äußeren Membran sind jedoch bei einigen Zellen zu erkennen. Auch bei den REM-Aufnahmen sieht man in der Detailaufnahme viele kleine Vesikel, die auf der Oberfläche der Bakterien lokalisiert sind. In der REM-Übersichtsaufnahme sieht man zwischen den meisten morphologisch unauffälligen Bakterien auch zellulären Debris von vermutlich lysierten Zellen.

Die 8 µg/ml Probe zeigt auf den ersten Blick deutliche Veränderungen (Abbildung 8, Bilder F-K). Der Großteil der Bakterien ist lysiert und man sieht viele Membranreste zwischen den verbliebenen Bakterien. Intrazellulär erkennt man, dass sich viele kleine und ein paar größere Vesikel gebildet haben, und es gibt Bereiche mit Anreicherung einer elektronendichteren Substanz. Die Ausstülpung der äußeren Membran mit dem weniger elektronendichten Inhalt ist auch zu erkennen. Die äußere Membran zeigt keinen wellenförmigen Verlauf mehr und ist oft nicht mehr kontinuierlich zu erkennen.

In der REM-Übersichtsaufnahme sind zwischen den Bakterien hoch komplexe Strukturen angeordnet, die sich vermutlich aus den lysierten Bakterien gebildet haben.





**Einfluss von**  $\omega$ **-azido-Sphingosin auf die Morphologie von** *N. meningitidis.* Die Bakterien wurden mit 0,8 µg/ml (Bild A-E) oder 8 µg/ml (Bild F-K)  $\omega$ -azido-Sphingosin für 3 h behandelt. Die Bilder zeigen deutliche Veränderung der morphologischen Strukutur. Erweiterung der äußeren Membran sind mit  $\blacktriangleright$ , Vesikel sind mit  $\rightarrow$ , elektronendichtere Bereiche sind mit \* gekennzeichnet, kristallähnliche Strukturen sind mit  $\star$  markiert. Maßstabsbalken der Übersichtsaufnahmen TEM und REM: 1 µm. Maßstabsbalken der Detailaufnahmen TEM und REM: 500 nm.

## 3.3.3 Morphologische Veränderungen durch ω-azido-C<sub>6</sub>-Ceramid

Die Bakterien wurden mit der ermittelten MBK (= 4  $\mu$ g/ml) und einem Zehntel der MBK mit  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid behandelt (Abbildung 9).

Bei der niedrigen Konzentration (Abbildung 9, Bilder A-E) sehen die meisten Bakterien morphologisch unauffällig aus, jedoch sieht man bei einigen Bakterien Ausstülpungen der äußeren Membran. Diese Ausstülpungen sieht man sowohl in den TEM- als auch in den REM-Aufnahmen. Den TEM-Detailaufnahmen kann man entnehmen, dass bei den meisten Bakterien die innere und äußere Membran intakt ist.

Die hohe Konzentration (Abbildung 9, Bilder F-K) zeigt einen starken Effekt auf die Morphologie der Bakterien. Man erkennt viele lysierte Bakterien und Bakterien mit elektronendichterem und weniger elektronendichtem Zytosol. In den TEM-Detailaufnahmen erkennt man Vesikel, die sich intrazellulär oder im periplasmatischen Raum befinden. Der periplasmatische Raum ist an manchen Stellen erweitert. Im Zytosol einiger Bakterien zeigen sich Bereiche, in denen eine elektronendichtere Substanz angereichert ist. In der REM-Übersichtsaufnahme ist eine netzartige Struktur zwischen den Bakterien bzw. den Bakterienresten angeordnet. In der Detailaufnahme lässt sich erahnen, dass die netzartige Struktur von der äußeren Membran ausgeht oder dort ansetzt. Die Oberfläche der Bakterien ist konvex und konkav verformt und sie sind nicht mehr einheitlich rund.





**Einfluss von**  $\omega$ **-azido-C**<sub>6</sub>-**Ceramid auf die Morphologie von** *N. meningitidis.* Die Bakterien wurden mit 0,4 µg/ml (Bilder A-E) oder 4 µg/ml (Bilder F-K)  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid für 3 h behandelt. Erweiterung der äußeren Membran sind mit  $\blacktriangleright$ , Vesikel sind mit  $\rightarrow$ , elektronendichtere Bereiche sind mit \* und Erweiterung des periplasmatischen Raum sind mit • markiert. Maßstabsbalken der Übersichtsaufnahmen TEM und REM: 1 µm. Maßstabsbalken der Detailaufnahmen TEM und REM: 500 nm.

# 3.4 Lokalisation nach der Aufnahme in *N. meningitidis*

Um die genauere Lokalisation des Sphingosins und des Ceramids nach Inkorporation zu ermitteln, wurden das funktionalisierte Sphingosin bzw. das funktionalisierte C6-Ceramid verwendet.

Nach Behandlung der Bakterien mit den funktionellen Substanzen, wurden diese mit DBCO-Alexa Fluor 488 angefärbt. Um sowohl ein gutes Fluoreszenz-Signal, aber auch die genaue Information über die Lokalisation zu bekommen, wurde die korrelative Licht- und Elektronenmikrokopie verwendet. Es werden zuerst Fluoreszenzbilder der Proben aufgenommen, die danach für das Rasterelektronenmikroskop weiterverarbeitet werden. Im Anschluss werden von derselben Stelle in der Probe REM-Bilder aufgenommen und am Computer mit den Fluoreszenzbildern überlagert.

## 3.4.1 Aufnahmen der Kontrollgruppe

Um auszuschließen, dass der DBCO-Alexa Fluor 488 Farbstoff unspezifisch bindet wurden als erstes Proben der Kontrollgruppe (N.m. (Isolat MC58) behandelt mit 100 µl Ethanol) angefärbt und prozessiert. In der Abbildung 10 sind zwei Aufnahmen gezeigt (A-C und D-F), auf denen zu erkennen ist, dass der Farbstoff nicht unspezifisch bindet.



Abbildung 10: CLEM-Aufnahmen von N. meningitidis

*N. meningitidis* behandelt mit Ethanol (Kontrollgruppe). Die Meningokokken wurden für 3 h mit 100 µl Ethanol behandelt. Keine unspezifische Färbung durch DBCO-Alexa Fluor 488 sichtbar. Die Bilder A-C und D-F zeigen zwei unterschiedliche Ausschnitte der Probe. Maßstabsbalken: 1 µm.

## 3.4.2 Lokalisation von Sphingosin und C6-Ceramid nach Aufnahme in *N. meningitidis* bei Verwendung niedriger Konzentrationen

Als erstes wurden die Bakterien mit einem Zehntel der bestimmten MBK von  $\omega$ azido-Sphingosin (= 0,8 µg/ml) und  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid (= 0,4 µg/ml) behandelt. In Abbildung 11 sieht man die Bakterien, die mit 0,8 µg/ml  $\omega$ -azido-Sphingosin behandelt wurden. In den korrelierten Bildern (C und F) ist zu erkennen, dass das Alexa 488-Fluoreszenzsignal vor allem in Bereichen der Ausstülpungen der äußeren Membran lokalisiert ist.



Abbildung 11: CLEM-Aufnahmen nach Behandlung mit ω-azido-Sphingosin

*N. meningitidis* behandelt mit 0,8 µg/ml  $\omega$ -azido-Sphingosin für 3 h, Anreicherungen des funktionellen Sphingosins sind in der Membran sichtbar. Das  $\omega$ -azido-Sphingosin wurde über Click-Reaktion mit DBCO-Alexa Fluor 488 angefärbt. A-C und D-F zeigen zwei Ausschnitte der Probe. Maßstabsbalken: 1 µm.

Bei den Proben, die mit  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid behandelt wurden, sehen die Ergebnisse ähnlich aus (Abbildung 12). Auch hier ist ein stärkeres Alexa 488-Signal im Bereich der Membranausstülpungen zu erkennen. Das Ceramid scheint jedoch auch bei den morphologisch unauffälligen Bakterien in der Membran angereichert zu sein, sodass in dem Fluoreszenzbild v.a. in Bild E die Umrandung der Bakterien sichtbar ist.



Abbildung 12: CLEM-Aufnahmen nach Behandlung mit ω-azido-C<sub>6</sub>-Ceramid

*N. meningitidis* behandelt mit 0,4 µg/ml  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid für 3 h. Eine Anreicherung des Ceramids ist, wie bei der Probe mit dem funktionellen Sphingosin in der Membran erkennbar. Das funktionelle Ceramid wurde über Click-Reaktion mit DBCO-Alexa Fluor 488 angefärbt. A-C und D-F zeigen zwei unterschiedliche Ausschnitte der Probe. Maßstabsbalken: 1 µm.

## 3.4.3 Lokalisation der Sphingolipide nach Aufnahme in *N. meningitidis* bei Verwendung höherer Konzentrationen

Zur Überprüfung der Lokalisation von  $\omega$ -azido-Sphingosin und  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid bei höheren Konzentrationen wurden die Bakterien mit der minimalen bakteriziden Konzentration behandelt. Hierbei war das Korrelieren deutlich schwieriger, da die meisten Bakterien lysiert sind und dadurch die DNA-Färbung deutlich schwächer ist.

Die Ergebnisse der Probe, die mit 8  $\mu$ g/ml  $\omega$ -azido-Sphingosin behandelt wurden, sind in Abbildung 13 dargestellt. Man sieht eine Anreicherung des

Sphingosins im Zytosol. Dieses Fluoreszenzsignal korreliert überwiegend mit der Anreicherung von elektronendichterem Material im REM-Bild.



Abbildung 13: CLEM-Aufnahmen nach Behandlung mit  $\omega$ -azido-Sphingosin.

*N. meningitidis* behandelt mit 8 µg/ml  $\omega$ -azido-Sphingosin für 3 h. Sphingosin Anreicherungen sind im Cytosol erkennbar. Das  $\omega$ -azido-Sphingosin wurde über eine Click-Reaktion mit DBCO-Alexa Fluor 488 angefärbt. A-C und D-F zeigen zwei unterschiedliche Ausschnitte der Probe. Maßstabsbalken: 1 µm.

Die Behandlung von *N. meningitidis* mit  $4 \mu g/ml \omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid zeigt vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 14). Auch hier sieht man eine Anreicherung des Ceramids im Zytosol, die teilweise mit den elektronendichteren Bereichen in den REM Aufnahmen korrelieren.



Abbildung 14: CLEM Aufnahmen nach Behandlung mit ω-azido-C<sub>6</sub>-Ceramid

*N. meningitidis* behandelt mit 4 µg/ml  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid für 3 h. Ceramid Anreicherungen sind wie beim funktionellen Sphingosin im Zytosol sichtbar. Das  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid wurde auch über eine Click-Reaktion mit DBCO-Alexa Fluor 488 angefärbt. A-C und D-F zeigen zwei unterschiedliche Ausschnitte der Probe. Maßstabsbalken: 1 µm.

# 3.5 Wirkung eines Detergens auf die Morphologie von *N. meningitidis*

Um weitere Einblicke über den Wirkmechanismus des Sphingosins und Ceramids zu bekommen, wurden Proben angefertigt, die mit einem nichtionischen Detergens behandelt wurden. Triton-X-100 wird in der Forschung häufig zur Permeabilisierung von Zellmembranen verwendet, da es im Vergleich zu anderen Detergenzien, wie z.B. Natriumlaurylsulfat nicht zu einer Denaturierung von Membranproteinen führt [180]. Das Detergenz wird in die äußere Membran aufgenommen, kann dann in die innere Membran wechseln und es kommt zur Bildung von Poren in der Membran, die mit steigender Konzentration größer werden [181]. Die verwendete Triton-Konzentration von 0,01% liegt knapp unter der kritischen Mizellen-Konzentration von Triton (0,015%). Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

In der TEM-Übersichtsaufnahme erkennt man viele lysierte Bakterien und Ausstülpungen der äußeren Membran. Im Zytosol sieht man Vesikel und Bereiche mit einer Anreicherung an elektronendichtem Material. In den REM-Bildern erkennt man, dass von der äußeren Membran fadenartige Strukturen ausgehen, die zwischen den Bakterien angeordnet sind oder um das Bakterium zu liegen kommen.



Abbildung 15: TEM- und REM-Aufnahmen von N. meningitidis

**Einfluss von Triton-X-100 auf die Morphologie von** *N. meningitidis.* Die Bakterien wurden für 3 h mit 0,01% Triton behandelt. Die morphologische Veränderungen durch das Detergenz sind deutlich zu erkennen. Die Erweiterung der äußeren Membran ist mit  $\blacktriangleright$ , Vesikel sind mit  $\rightarrow$ , elektronendichtere Bereiche sind mit \* markiert und die schlaufenähnliche Struktur ist mit  $\star$  markiert. Maßstabsbalken der Übersichtsaufnahmen TEM und REM: 1 µm. Maßstabsbalken der Detailaufnahmen TEM und REM: 500 nm.

# 3.6 Wirkung des funktionellen Sphingosins und Ceramids auf andere Bakterien

Es stellte sich die Frage, ob das funktionelle Sphingosin und Ceramid auch auf andere Bakterienarten antibakteriell wirkt. Dafür wurden die Versuche mit *E. coli*, einem Gram-negativen Bakterium, und *S. aureus*, einem Gram-positiven Bakterium, durchgeführt. Da Gram-positive und Gram-negative Bakterien einen unterschiedlichen Aufbau der Membran haben, kann verglichen werden, ob dies einen Effekt auf die antibakterielle Wirkung hat.

Zuerst wurden für beide Bakterienstämme die minimale Hemmkonzentration und die minimale bakterizide Konzentration ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Das  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid hat keinen Effekt auf *E. coli* und *S. aureus* (MHK und MBK >32 µg/ml). Der antibakterielle Effekt von  $\omega$ -azido-Sphingosin ist schlechter als bei *N. meningitidis*, es wirkt jedoch gegen beide getesteten Bakterienstämme (MBK jeweils 16 µg/ml, bei *N. meningitidis* 8 µg/ml). Die Bakterien wurden für die TEM-Bilder mit der ermittelten minimalen bakteriziden Konzentration behandelt. Da  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid mit den getesteten Konzentrationen keinen antibakteriellen Effekt gezeigt hat, wurde die MBK der Meningokokken verwendet (MBK: 4 µg/ml).

Tabelle 14:	MHK- und MBK-Werte von E. coli und S. aureus
l abelle 14:	MHK- und MBK-Werte von <i>E. coli</i> und <i>S. aureu</i>

**MHK und MBK von Sphingosin,**  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid und  $\omega$ -azido-Sphingosin gegenüber *E. coli* und *S. aureus.* Alle Werte sind in µg/ml angegeben. MHK ist definiert als die geringste Konzentration einer Substanz, die das sichtbare Wachstum verhindert. MBK ist definiert als die geringste Konzentration, bei der 99,9% der Individuen der getesteten Mikroorganismen abgetötet werden.

Lipid	<b>E. coli</b> (Werte in μg/ml)		<b>S. aureus</b> (Werte in μg/ml)		Quelle
	MHK	MBK	MHK	MBK	
Sphingosin	16	16	8	>64	Becam <i>et al.</i> (2017) [162]
ω-azido- Sphingosin	16	16	8	16	Diese Arbeit
ω-azido-C <sub>6</sub> - Ceramid	>32	>32	>32	>32	Diese Arbeit

## 3.6.1 Wirkung von azido-funktionalisiertem Sphingosin und C<sub>6</sub>-Ceramid auf *E. coli*

Die *E.coli*, die mit 16  $\mu$ g/ml  $\omega$ -azido-Sphingosin behandelt wurden, zeigen starke morphologische Veränderungen (Abbildung 16, Bilder A-C). Man sieht viele lysierte Zellen und zellulären Debris zwischen den beschädigten Zellen. Die innere und äußere Membran ist nicht mehr kontinuierlich. Im Zytosol erkennt man elektronendichte Einschlusskörper, die verschiedenen Größen und Formen haben. Das restliche Zytosol weist eine uneinheitliche Elektronendichte auf. An einigen Stellen kommt es wie bei den *N. meningitidis* zu einer Ausstülpung der äußeren Membran.

In der Übersichtsaufnahme der mit Ceramid behandelten Gruppe sieht man morphologisch unauffällige Bakterien (Bild D). Man erkennt Gram-negative Stäbchen und deren äußere und innere Membran sowie den periplasmatischen Raum mit der Peptidoglykanschicht. Das Zytoplasma hat eine einheitlich granuläre Struktur und der Ansatz der Fimbrien ist zu erkennen.



#### Abbildung 16: TEM-Aufnahmen von E. coli

Die *E. coli* wurden für 3 h mit 16 µg/ml  $\omega$ -azido-Sphingosin (A-C) oder 4 µg/ml  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid (D-F) behandelt. Das funktionelle Sphingosin zeigt einen deutlichen Effekt auf die Morphologie der Bakterien, das funktionelle Ceramid nicht. Maßstabsbalken der Übersichtsaufnahmen: 1 µm. Maßstabsbalken der Detailaufnahmen: 500 nm.

## 3.6.2 Wirkung von azido-funktionalisiertem Sphingosin und C6-Ceramid auf *S. aureus*

In der mit ω-azido-Sphingosin behandelten Gruppe ist der antibakterielle Effekt deutlich zu erkennen (Abbildung 17, Bilder A-C). Man sieht viele lysierte Bakterien und Bakterien in verschiedenen Stufen des Zerfalls. Bei einigen Bakterien ist die Membran noch intakt, jedoch hat das Zytosol eine uneinheitlich Elektronendichte. Außerdem erkennt man intrazelluläre weniger elektronendichte Vesikel. Zwischen den beschädigten Bakterien liegen Membranbestandteile und intrazelluläre Bestandteile bzw. Debris.

Bei der mit Ceramid behandelten Gruppe erkennt man typische Gram-positive Haufenkokken (Abbildung 17, Bilder D-F). Man erkennt deutlich die dicke Peptidoglykanschicht und die dahinterliegende Zellmembran. Das Zytosol ist einheitlich elektronendicht und man sieht oft eine unterschiedlich geformte intrazelluläre Aufhellung, die charakteristisch für das Nukleotid ist.



Abbildung 17: TEM-Aufnahmen von S. aureus

Die *S. aureus* wurden für 3h mit 16 µg/ml  $\omega$ -azido-Sphingosin (A-C) oder 4 µg/ml  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid (D-F) behandelt. Das funktionelle Sphingosin zeigt einen deutlichen Effekt auf die Morphologie, das funktionelle Ceramid nicht. Maßstabsbalken der Übersichtsaufnahmen: 1 µm. Maßstabsbalken der Detailaufnahmen: 500 nm.

# 4 Diskussion

## 4.1 Antibakterielle Wirkung von Sphingolipiden

Die antibakterielle Wirkung von natürlichen wie auch von synthetisierten Sphingolipiden und Sphingobasen konnte in vielen vorangegangenen Studien gezeigt werden [156]. Primär waren sie, neben antibakteriell wirkenden Fettsäuren, als Bestandteile des angeborenen Immunsystems in der Haut und Schleimhaut bekannt [153, 154]. Die Rolle des Sphingosins in der Immunabwehr gesunder Atemwege konnte in einer Studie mit Pseudomonas aeruginosa gezeigt werden [166, 167]. Sphingolipide zeigen jedoch antibakterielle Effekte gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen. Eine Wachstumshemmung konnte gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie gegenüber Pilzen gezeigt werden [157-161, 164, 168]. Die Stärke der antibakteriellen Wirkung ist von der Struktur des Sphingolipids und den getesteten Pathogenen abhängig. Vor allem die Sphingobasen Sphingosin, welche am besten untersucht ist, sowie Dihydrosphingosin und 6-Hydroxysphingosin zeigen eine starke antibakterielle Wirkung. In einer früheren Studie konnte in unserem Labor die antibakterielle Wirkung von Sphingosin, C<sub>6</sub>-Ceramid und  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid gegen N. meningitidis und N. gonorrhoeae gezeigt werden. Das kurzkettige Ceramid und das azid-funktionalisierte Ceramid zeigten dagegen keinen Effekt gegenüber E. coli und S. aureus [162]. Eine Wachstumshemmung von E. coli und S. aureus kann jedoch durch Sphingosin und Dihydrosphingosin erreicht werden [163].

In dieser Studie konnte die antibakterielle Wirkung von  $\omega$ -azido-Sphingosin und  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid gegenüber *N. meningitidis, E. coli* und *S. aureus* nachgewiesen werden. Zur Ermittlung der antibakteriellen Wirkung wurden Wachstumskurven erstellt und die MHK und MBK mittels der Bouillon-Dilutionsmethode ermittelt, was ein oft verwendetes Testverfahren ist [159, 160]. Wie viele andere anspruchsvolle Bakterien wachsen *N. meningitidis* unter den klassischen Versuchsbedingungen für den MHK-Test nicht ausreichend und mussten durch die Verwendung von PPM+ und die Inkubation mit 5% CO<sub>2</sub> angepasst werden. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass

das Medium einen Einfluss auf die MHK- und MBK-Werte hat [162]. Die Auswertung des MHK-Tests kann mit einem Gerät, welches die Trübung des Mediums misst, oder mit dem Auge erfolgen. Für diesen Versuch erfolgte die Auswertung der MHK-Werte mit dem Auge, wie es von der "European committee on antimicrobial susceptibility testing" (EUCAST) empfohlen wird.

Die antibakterielle Wirkung ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus anderen Untersuchungen [157, 159, 162]. Warum das C<sub>6</sub>-Ceramid und das  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid nur gegen *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* antibakteriell wirken, bedarf weiterer Untersuchungen.

# 4.2 Aufnahme der Sphingolipide durch *N. meningitidis*

Der antibakterielle Wirkmechanismus der Sphingolipide und Sphingobasen ist nicht bekannt. Um genauere Einblicke zu bekommen, wurde azidofunktionalisiertes C<sub>6</sub>-Ceramid azido-funktionalisiertes und Sphingosin synthetisiert. Die funktionalisierten Lipide können durch die Azid-Gruppe mit einem Cyclooctin in einer spannungsinduzierten Azid-Alkin-Cycloaddition reagieren. Durch die Ringspannung wird kein zytotoxisches Kupfer benötigt, weshalb diese Reaktion häufig zur Markierung von Zellen oder Biomolekülen mit einem Farbstoff verwendet wird [175, 182, 183]. Durch das Markieren mit einem Fluoreszenzfarbstoff ist es möglich die Aufnahme des C6-Ceramids und des Sphingosins in N. meningitidis zu beobachten. Das Protokoll für diese Fluoreszenzmarkierung von ω-azido-Sphingosin und ω-azido-C6-Ceramid in lebenden N. meningitidis wurde in unserem Labor entwickelt. Vergleichbare Versuche wurden in einer anderen Gruppe bereits an Wirtszellen durchgeführt. Hier wurde die Aufnahme von verschiedenen azido-Ceramiden in Jurkat-T-Zellen und humane T-Zellen beobachtet [184].

Nach Etablierung des Protokolls konnte mit Hilfe der Durchflusszytometer-Analyse in dieser Studie gezeigt werden, dass sowohl das  $\omega$ -azido-Sphingosin als auch das  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid innerhalb kurzer Zeit in *N. meningitidis* aufgenommen werden. Die Aufnahme erfolgte innerhalb von 5 min und konnte durch eine längere Inkubation (15 min, 25 min und 30 min) nicht gesteigert werden. In vorangegangenen Studien in unserer Gruppe wurde gezeigt, dass

sowohl kurzkettige C<sub>6</sub>-Ceramide als auch langkettige C<sub>16</sub>-Ceramide in *N. meningitidis* aufgenommen werden. Die Bakterien wurden nach dem gleichen Protokoll vorbereitet, das Anfärben der funktionellen Ceramide erfolgte jedoch mit DBCO-sulfo-Cy5. In dieser Studie war die Aufnahme der Ceramide nach 15 min Inkubationszeit am größten und ging danach wieder etwas zurück [162]. Die Aufnahme des azido-C<sub>6</sub>-Ceramids in Wirtszellen erreichte nach 25 min ihr Maximum und ging danach wieder zurück [184]. Die Aufnahme des funktionellen Ceramids in die Wirtszellen erfolgte trotz höherer Konzentration von 25  $\mu$ M azido-C<sub>6</sub>-Ceramid, langsamer als in die *N. meningitidis*. Die aufgenommenen Ceramide wurden in diesem Versuch ebenfalls mittels Durchflusszytometrie analysiert. Diese Ergebnisse stimmen mit Erkenntnissen anderer Studien überein, in denen gezeigt wurde, dass *E. coli* und *S. aureus* Sphingobasen innerhalb kurzer Zeit aufnehmen [163]. Hierbei wurden die Aufnahme der Sphingobasen jedoch mittels Dünnschichttomatographie analysiert.

## 4.3 Wirkmechanismus der Sphingolipide und Sphingobasen

Welcher Wirkmechanismus dem antibakteriellen Effekt der Sphingolipide und Sphingobasen zu Grunde liegt, ist noch nicht bekannt. Eine Möglichkeit ist die Interaktion der Sphingolipide mit der bakteriellen Zellmembran, die zu einer direkten Ruptur oder einer Veränderung der Membranstruktur führt. Eine sichtbare Ruptur wurde schon bei Studien zur antibakteriellen Wirkung von Sphingobasen gegenüber *S. aureus* und von antibakteriell wirkenden freien Fettsäuren gegenüber *S. aureus* und Streptokokken gezeigt [170, 185]. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass Sphingolipide die Membranstruktur von *S. aureus*, aber nicht von *E. coli* verändern [159]. Einige Versuche deuten darauf hin, dass freie Fettsäuren und Monoglyceride die Membran von *Candida albicans* zerstören oder zersetzen [186]. Die Aufnahme der Sphingolipide und Sphingobasen in die Bakterien und eine anschließende Akkumulation der Lipide im Zytosol wird auch diskutiert. So könnten sie, vergleichbar mit der Hemmung der Proteinkinase C, einen Einfluss auf den bakteriellen Metabolismus haben [163, 187].

#### 4.3.1 Morphologische Veränderungen

Die unbehandelten *N. meningitidis* und die Kontrollgruppe weisen eine für Gramnegative Diplokokken typische Morphologie auf. In den TEM-Aufnahmen sieht man die äußere und innere Membran mit der dazwischen liegenden Peptidoglykanschicht und einem dünnen periplasmatischen Raum. Die leichte Wellung der äußeren Membran ist in den TEM- und REM-Aufnahmen sichtbar. Zwischen den Bakterien liegen kugelförmige Abschnürungen der äußeren Membran, die auch schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurden [48]. Die Abschnürungen der äußeren Membran werden als "blebs" bezeichnet und enthalten äußere Membranproteine (*outer membrane proteins*, OMPs) und LPS [24, 86]. Sie sind bei der invasiven Meningokokken-Erkrankung für die hohen LPS- bzw. LOS-Spiegel im Blut und Liquor verantwortlich und spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung des Immunsystems [83-86].

Sphingosin,  $\omega$ -azido-Sphingosin und  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid lösen konzentrationsabhängig morphologische Veränderungen starke bei N. meningitidis aus. Nach der Behandlung mit einem Zehntel der MBK des azidofunktionalisierten Sphingosins und C6-Ceramids sind nur wenige Bakterien von den morphologischen Veränderungen betroffen, welche außerdem deutlich schwächer ausgeprägt sind. Schon bei niedriger Konzentration des ω-azido-C6-Ceramids und des w-azido-Sphingosins ist eine Veränderung der bakteriellen Membran zu erkennen. Die äußere Zellmembran der N. meningitidis scheint bei vielen Bakterien noch intakt zu sein. Es kommt jedoch bei einigen Bakterien zu einer Ablösung der äußeren Membran von der inneren Membran, die große Ausstülpungen bildet und in den TEM- und REM-Aufnahmen zu sehen sind. Kommt es zu einer Ruptur der inneren Membran, gelangt das Zytosol in den erweiterten periplasmatischen Raum.

Bei den getesteten Substanzen kommt es, im Vergleich zur Kontrollgruppe, außerdem häufiger zur Abschnürung kleiner Vesikel von der äußeren Membran. Die vermehrten Abschnürungen der äußeren Membran sind in den REM-Aufnahmen als kleine Kügelchen auf der Bakterienoberfläche zu erkennen oder kommen zwischen den Bakterien zu liegen. Die Vesikelabschnürung der äußeren

Membran konnte auch bei *E. coli* nach der Behandlung mit antibakteriellen Peptiden gezeigt werden [188].

In den REM-Aufnahmen der  $\omega$ -azido-Sphingosin-Probe liegen zwischen den morphologisch unauffälligen Bakterien vereinzelt Vesikelabschnürungen der äußeren Membran und Membranbestandteile von lysierten Zellen. Die morphologischen Veränderungen durch die niedrige Konzentration an  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid sind im Vergleich zum  $\omega$ -azido-Sphingosin deutlich geringer. In den REM-Aufnahmen sind keine Vesikel der äußeren Membran oder Bestandteile lysierter Zellen zu erkennen.

Durch die Erhöhung der Konzentration auf die ermittelte MBK ist die antibakterielle Wirkung von ω-azido-Sphingosin und ω-azido-C6-Ceramid deutlich sichtbar. Die meisten N. meningitidis zeigen deutliche morphologische Veränderungen und es sind viele lysierte Bakterien zu erkennen. Die Bakterien haben unterschiedliche Größen und Formen und sind zum größten Teil nicht mehr als Diplokokken angeordnet. Die morphologischen Veränderungen durch Behandlung von S. aureus und E. coli mit Sphingosin konnte auch in vorangegangenen Studien gezeigt werden [158, 163]. Die äußere Membran ist nicht mehr leicht gewellt und einige Bakterien haben nur noch eine Zellmembran. Ob dies die innere oder äußere Membran ist, gilt es noch zu analysieren. Intrazellulär hat das Zytosol eine uneinheitliche Elektronendichte, was auf eine Aggregation oder Ausflockung von intrazellulären Bestandteilen hindeutet. Diese Veränderung des Zytosols ist bei der Behandlung mit  $\omega$ -azido-Sphingosin und  $\omega$ azido-C<sub>6</sub>-Ceramid zu beobachten. Dies konnte auch im Zytosol der mit ω-azido-Sphingosin behandelten E. coli und S. aureus beobachtet werden und wurde auch schon in anderen Versuchen mit antibakteriellen Lipiden und Sphingobasen beschrieben [154, 158]. Zusätzlich sind bei der azido-funktionalisierten Ceramid-Probe bei Sphingosinund einigen Bakterien intrazellulär unterschiedlich große Vesikel ohne elektronendichten Inhalt zu erkennen.

Viele morphologische Veränderungen sind, unabhängig vom verwendeten Lipid, bei allen behandelten Bakterien zu erkennen. Es kommt jedoch auch zu Lipidspezifischen morphologischen Veränderungen. Bei mit ω-azido-C<sub>6</sub>-Ceramid und
ω-azido-Sphingosin behandelten *N. meningitidis* sind z. B. einige elektronendichte Bereiche klar gegen die Umgebung abgegrenzt und stellen sich als elektronendichte Einschlusskörper dar. Die Bildung von Einschlusskörpern im Zytosol von Bakterien nach Behandlung mit Sphingolipiden wurde auch von Fischer *et al.* beschrieben. Ob sie aus Lipiden oder bakteriellen Proteinen bestehen ist noch nicht geklärt [159]. Nach der Behandlung mit ω-azido-Sphingosin oder ω-azido-C<sub>6</sub>-Ceramid ist intrazellulär keine Bildung von membranähnlichen Strukturen zu erkennen, wie sie bei *E. coli* nach der Behandlung mit antibakteriellen Peptiden gezeigt werden konnten [188].

In den REM-Aufnahmen ist eine Veränderung der Membranoberfläche deutlich zu erkennen. Die Oberfläche wirkt bei allen behandelten *N. meningitidis* uneben und zerklüftet. Die konvexen Ausbeulungen der Membran in den REM-Aufnahmen unterstützen die oben beschriebene Ablösung und Ausstülpung der äußeren Membran. Die Veränderung der bakteriellen Oberfläche konnte auch bei *S. aureus*, *E. coli*, *H. pylori* und *P. gingivalis* nach Behandlung mit verschiedenen antibakteriellen Fettsäuren, Peptiden oder Lipiden beobachtet werden [163, 189, 190].

In den REM-Aufnahmen sieht man beim  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid eine netzartige Struktur zwischen den morphologisch veränderten Bakterien, die vermutlich aus Membranbestandteilen lysierter Zellen und bakteriellen Pili besteht. Das Netz scheint von der äußeren Membran der *N. meningitidis* auszugehen. Nach Behandlung mit  $\omega$ -azido-Sphingosin mit der ermittelten MBK sind zwischen den veränderten *N. meningitidis* hochkomplexe kristallartige Strukturen zu erkennen. Ob sie aus Membranbestandteilen der lysierten Bakterien aufgebaut sind und warum sie sich zu solchen Gebilden formatieren, gilt es noch herauszufinden.

Die morphologischen Veränderungen durch ein Detergens zeigen ähnliche Effekte. Auch hier zeigt sich eine Ablösung der äußeren von der inneren Membran. Die äußere Membran bildet dabei große Ausstülpungen und es kommt zu einer Erweiterung des periplasmatischen Raums. Die innere Membran ist meist nicht mehr intakt und das Zytosol breitet sich in den periplasmatischen Raum aus. Bei anderen *N. meningitidis* sind sowohl die innere als auch die

äußere Membran aufgelöst oder rupturiert. Intrazellulär zeigt das Zytosol eine uneinheitliche Elektronendichte. Es sind intrazelluläre Vesikel und elektronendichte Einschlusskörper zu erkennen. In den REM-Aufnahmen erscheint die Oberfläche der Bakterien uneben, was man durch die Ablösung der äußeren Membran erklären kann. Von der äußeren Membran gehen fadenartige Strukturen ab. Ob es sich hierbei um Pili oder Membranbestandteile handelt, ist nicht geklärt. In anderen Versuchen konnten Pili bei der Adhärenz von N. meningitidis an Epitheloberflächen gezeigt werden. Die Pili gehen von der äußeren Membran aus und spannen sich zwischen den Bakterien und zwischen den Bakterien und der Epitheloberfläche auf [48]. Einige der beschriebenen Veränderungen sind sowohl nach der Behandlung von N. meningitidis mit Sphingolipiden und Sphingobasen als auch nach Behandlung mit Triton-X-100 zu erkennen. In den REM-Aufnahmen ist jedoch keine netzartige Struktur zwischen den Bakterien sichtbar. Dieser unterschiedliche Effekt lässt vermuten, dass sich der Wirkmechanismus der getesteten Substanzen unterscheidet. Bibel et al. beschrieb auch, dass der antibakterielle Effekt von Sphinganin gegenüber S. aureus nicht auf der Wirkung als Detergens beruht [158]. Triton-X-100 sorgt jedoch nicht nur für die Permeabilisierung von Zellmembran, sondern hat noch weitere Effekte. Es wurde festgestellt, dass bei Verwendung von Triton-X-100 und anderen Detergenzien, Membranbereiche mit einem hohen Anteil an Sphingolipiden und Cholesterol unlöslich bleiben [191]. Diese Bereiche werden als "detergent resistance membranes" (DRM) bezeichnet und sind trotz ähnlicher Zusammensetzung nicht mit "lipid rafts" gleichzusetzen [192]. Triton-X-100 führt in Membranen zu einer Trennung von flüssig-geordneten (liquid-ordered, lo) und flüssig-ungeordneten (liquid-disordered, ld) Membrandomänen. Die ld-Domänen können durch Triton gelöst werden, während die lo-Domänen zurückbleiben [193]. Die in den TEM-Aufnahmen sichtbaren elektronendichteren Bereiche könnten auch die nicht auflösbaren lo-Domänen darstellen. Um den genauen Einfluss von Triton-X-100 auf die Membran von N. meningitidis nachzuweisen bedarf es weiterer Versuche.

Die antibakterielle Wirkung des  $\omega$ -azido-Sphingosin gegenüber *E. coli* und *S. aureus* ist in den TEM-Bildern deutlich zu erkennen.

Die Zellmembran von *S. aureus* ist häufig nicht mehr intakt und es kam zu einem Ausfluss des Zytosols aus der Zelle. Dies konnte auch bei anderen Versuchen gezeigt werden, in denen *S. aureus* mit Sphinganin und anderen Sphingobasen behandelt wurde [158, 163]. Intrazellulär ist eine uneinheitliche Elektronendichte des Zytosols zu erkennen, was auf eine Aggregation oder Ausflockung von intrazellulären Bestandteilen hindeutet und auch schon bei der Behandlung von *N. meningitidis* beobachtet wurde. Dies konnte auch im Zytosol von behandelten *E. coli* beobachtet werden und wurde auch schon in anderen Versuchen beschrieben [163]. Zusätzlich sind bei *E. coli* unterschiedlich große elektronendichte Einschlusskörper im Zytosol zu sehen.

Die äußere Zellmembran der *E. coli* scheint bei den meisten Bakterien intakt zu sein. Es kommt jedoch zu einer Ablösung der äußeren Membran von der inneren Membran, die große Ausstülpungen bildet. Die innere Membran ist oft nicht mehr intakt und so gelangt das Zytosol in den erweiterten periplasmatischen Raum. Diese Ablösung der äußeren Membran von der inneren Membran wurde auch schon bei *H. pylori* nach Behandlung mit antibakteriellen Fettsäuren beschrieben [189]. In anderen Versuchen waren jedoch keine morphologischen Veränderungen der *E. coli* Membran nach Behandlung mit Sphingobasen zu erkennen [163].

Das  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramid zeigt gegenüber dem Gram-negativen *E. coli* und dem Gram-positiven *S. aureus* keine antibakterielle Wirkung. Die Aufnahmen der Bakterien zeigen keine morphologische Veränderung, was die Ergebnisse der MHK-Untersuchungen unterstützt. In vorangegangenen Untersuchungen in unserem Labor konnte gezeigt werden, dass sowohl kurzkettige C<sub>6</sub>-Ceramide als auch langkettige C<sub>16</sub>-Ceramide keinen wachstumshemmenden Effekt gegenüber *E. coli* und *S. aureus* haben [162].

#### 4.3.2 Lokalisation der Lipide nach Aufnahme von *N. meningitidis*

Die deutlichen morphologischen Veränderungen zeigen jedoch nicht, wo das Sphingolipid nach der Aufnahme in N. meningitidis lokalisiert ist. Diese Information würde jedoch helfen, den genauen Wirkmechanismus der Sphingolipide genauer zu verstehen. Hierfür wurden korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie Aufnahmen angefertigt. Die zuerst aufgenommenen Fluoreszenzbilder wurden mit den später aufgenommenen rasterelekronenmikroskopischen Bildern am Computer überlagert, um den genauen Ort der Inkorporation der markierten Moleküle beurteilen zu können [179]. Durch das azido-funktionalisierte Sphingosin und das azidofunktionalisierte C6-Ceramid ist ein Anfärben der Lipide mit einem "click"-Farbstoff durch eine Azid-Alkin-Cycloaddition möglich [175].

Bei den niedrigen Konzentrationen sieht man sowohl beim Ceramid also auch beim Sphingosin eine Anreicherung in den Membranausstülpungen. Das Ceramid scheint jedoch nicht nur in den Bereichen der Membranausstülpung morphologisch veränderter Bakterien, sondern auch bei morphologisch unauffälligen Bakterien in der gesamten Membran verteilt zu sein. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass die antibakterielle Wirkung durch die Interaktion der Sphingolipide mit der bakteriellen Membran entsteht.

Bei höherer Konzentration des azido-funktionalisierten Sphingosins und des azido-funktionalisierten C<sub>6</sub>-Ceramids kommt es zu einer Akkumulation im Zytosol. Es ist zu klären, ob die Sphingolipide bei höheren Konzentrationen fähig sind, die bakterielle Membran zu überwinden, oder ob dies erst durch die vorangegangene Zerstörung der Membran möglich ist. Da in den TEM- und REM-Bildern bei diesen Konzentrationen hauptsächlich lysierte Bakterien zu sehen sind, ist die nachträgliche Akkumulation im Zytosol wahrscheinlich.

### 4.4 Click-CLEM

Um die genaue Lokalisation des  $\omega$ -azido-Sphingosins und des  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramids in *N. meningitidis* mikroskopisch zu analysieren haben wir die Click-Chemie mit der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie (correlative light and electron microscopy, CLEM) kombiniert. Hierfür galt es ein neues Protokoll zu etablieren.

Die CLEM ermöglicht es, fluoreszenzmarkierte Moleküle in ihrer ultrastrukturellen Umgebung darzustellen. Hierbei werden die Proben zuerst mit einem superauflösendem Lichtmikroskop begutachtet und anschließend die Ultrastruktur mit einem Rasterelektronenmikroskop analysiert.

Bei der Vorbereitung der Proben haben wir uns an dem Protokoll von Markert *et al.* orientiert [179]. Im Gegensatz zu der häufig verwendeten klassischen Immunofärbung über Antikörper nutzen wir jedoch die Click-Chemie zum Anfärben des  $\omega$ -azido-Sphingosins und des  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramids. Click-Chemie ist ein relativ neues Verfahren, dass seit seiner Einführung im Jahr 2001 in vielen naturwissenschaftlichen Bereichen Anwendung findet [194]. Es wird z. B. für die Fluoreszenzmarkierung modifizierter Moleküle in Zellen, Geweben oder gesamten Organismen verwendet [195]. Die durch Ringspannung induzierte Azid-Alkin-Cycloaddition ermöglicht es, die funktionalisierten Lipide in lebenden *N. meningitidis* mit DBCO-Alexa 488 anzufärben. Auch lebende Jurkat T Zellen konnten nach Aufnahme von  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramids durch dieselbe Reaktion angefärbt werden [184].

Bei der klassischen Immunofärbung mit Antikörpern kommt es durch die Größe der Antikörper zu einem Abstand von 10 – 15 nm zwischen dem Fluorophor und dem markierten Molekül. Durch die immer höhere Auflösung stellt diese Größe einen limitierenden Faktor in der hochauflösenden Mikroskopie dar [196]. Durch die Anwendung von strukturierter Beleuchtung ("Structured Illumination Microscopy", SIM) kommt es gegenüber klassischen Lichtmikroskopen zu einer Verdopplung des Auflösungsvermögens [197]. Organische Fluorophore die durch Click-Chemie direkt an ein Molekül binden, sind mit einer Größe von ca. 1 nm deutlich kleiner [198].

Bei der Markierung mittels Click-Chemie kommt es zu einer kovalenten Bindung zwischen dem markierten Molekül und dem clickbaren Farbstoff [199]. Dies sorgt für eine hohe Spezifität und erlaubt eine quantitative Auswertung, da ein funktionelles Lipid mit nur einem Fluorophor kovalent markiert ist. In mehreren Versuchen wurde die Click-Chemie schon zur Markierung von verschiendenen Molekülen und anschließender Analyse mit hochauflösenden Mikroskopen (*d*STORM, "direct stochastic optical reconstruction microscopy") verwendet [182, 195, 196, 199].

Mittels Click-Reaktion kann theoretisch sowohl auf den Schnitten als auch in lebenden Bakterien vor dem Einbetten angefärbt werden. Das Anfärben lebender Bakterien mittels Click-Chemie kann Probleme vermeiden, die bei der Anfärbung von Ultradünnschnitten mit Antikörpern auftreten können. Fixation, Entwässern und die hohen Temperaturen beim Prozessieren der Proben verändern die Epitope dahingehend, dass Antikörper oft nicht mehr binden können. Aufgrund der geringen Schichtstärke in Ultradünnschnitten sind Antigene außerdem weniger häufig auffindbar. All dies führt zu einer geringeren Anfärbung interessanter Bereiche [200].

Um lebende Bakterien anzufärben, muss der clickbare Farbstoff jedoch das Prozessieren der Proben überstehen. Hierfür sind Rhodamin Derivate wie z. B. Alexa 488 besonders gut geeignet (Rücksprache mit Prof. C. Stigloher, Abteilung Elektronenmikroskopie, Biozentrum, Univeristät Würzburg). In einer vorangegangenen Arbeit von Dr. Lena Collenburg (Arbeitskreis Prof. S. Schneider-Schaulies, Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg) konnte außerdem gezeigt werden, dass sich DIBO 488 gut für das Anfärben von funktionalisierten Ceramiden nach Aufnahme in Jukat T Zellen eignet, da es keine lebenden Zellen unspezifisch anfärbt [184]. Aus diesen Gründen entschieden wir uns für die Verwendung von DBCO-Alexa Fluor 488 für das Anfärben des funktionalisierten Sphingosins und C6-Ceramids. Ob das Färben von ω-azido-Sphingosin und ω-azido-C6-Ceramid durch Click-Chemie auf prozessierten Schnitten ebenso erfolgreich ist, gilt es noch zu testen.

Die für das Korrelieren wichtige Anfärbung eines spezifischen Zellorganells erfolgt auf den fertig prozessierten Schnitten. Da die DNA bei Bakterien frei im

Zytoplasma schwimmt kann sie gut mit Methylgrün angefärbt werden. Im Fluoreszenzbild scheint deshalb das ganze Bakterium angefärbt und kann gut mit dem rasterelektronenmikroskopischen Bild überlagert werden. Trotz der genauen Markierung der Lipide mit einem Fluorophor mittels Click-Chemie und der Überlagerung mit rasterelektronenmikroskopischen Bildern ist nicht genau zu erkennen, ob die Lipide in die innere oder äußere Membran aufgenommen wurden. Hierfür müssen weitere Untersuchungen erfolgen. Eine Möglichkeit die genaue Lokalisation der Lipide zu analysieren wäre die Verwendung hochauflösenderer Mikroskope oder die relativ neu entwickelte Expansionsmikroskopie Neben den Lipiden müssten [201]. auch membranspezifische Proteine der inneren oder äußeren Membran mit einem Fluorophor markiert werden um eine räumliche Orientierung zu bekommen. Ebenso wäre nach Behandlung von Bakterien mit Lipiden eine Separation von innerer und äußerer Membran und eine anschließende massenspektroskopische Analyse der angereicherten Lipide möglich.

### 4.5 Ausblick

Mit dieser Arbeit konnten erste Einblicke in den Wirkungsmechanismus von antibakteriell wirkenden Sphingolipiden am Beispiel von Sphingosin und C6-Ceramid gewonnen werden. Dank des funktionellen  $\omega$ -azido-Sphingosins und  $\omega$ -azido-C6-Ceramids konnten deren Aufnahme durch *N. meningitidis* und der Ort der Inkorporation mikroskopisch genauer analysiert werden.

Jedoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um den Wirkungsmechanismus genauer zu verstehen. Es gilt zu klären, ob die Sphingolipide in die innere oder in die äußere Membran der Gram-negativen Meningokokken aufgenommen werden und wie es bei höherer Konzentration zur beobachteten Akkumulation der Sphingolipide im Zytosol kommt. Eine Seperation von innerer und äußerer Membran nach Behandlung von *N. meningitidis* mit Sphingosin und C<sub>6</sub>-Ceramid und anschließende massenspektrometrische Analyse könnte genauere Information bringen, in welche Membran die Lipide aufgenommen werden. Eine solche Analyse wurde nun in unserem Labor in Kooperation mit Dr. Fabian Schumacher (AG Kleuser, Universität Postdam) durch Simon Peters (AG Schubert-Unkmeir) durchgeführt. Die ersten Ergebnisse unterstützen unsere Vermutung, dass die Lipide in die äußere Membran aufgenommen werden.

Auf Grund der steigenden Anzahl antibiotikaresistenter Bakterien ist die Suche nach neuen antibakteriellen Substanzen wichtiger geworden. Auch wenn die untersuchten *N. meningitidis* bislang wenige Resistenzen zeigen, weisen die artverwandten *N. gonorrhoeae* viele Resistenzen auf. Die gewonnenen Informationen über den Wirkmechanismus von Sphingolipiden gegenüber *N. meningitidis* können eventuell auch für neue Therapieansätze gegen resistente *N. gonorrhoeae* verwendet werden.

Die in dieser Doktorarbeit untersuchten Substanzen könnten nach weiteren Untersuchungen auch für die Anwendung am Patienten geeignet sein. Vorallem das  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramids könnte wegen der spezifischen Wirkung gegen *N. meningitidis* geeignet sein.

### 5 Zusammenfassung

Die steigenden Antibiotikaresistenzen vieler Erreger stellen die Medizin und die Forschung vor völlig neue Herausforderungen und fordern die Suche nach anderen antibakteriell wirkenden Substanzen. Neben antibakteriellen Fettsäuren ist auch die antibakterielle Wirkung von Sphingobasen in den Fokus gerückt. Neben ihrer Funktion als Bestandteil der angeborenen Immunabwehr von Haut und Schleimhäuten, wurde ihre antibakterielle Wirkung inzwischen gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen gezeigt, wobei der genaue Wirkmechanismus nach wie vor nicht geklärt ist.

*N. meningitidis* ist ein Gram-negatives, bekapseltes und humanspezifisches Bakterium, welches asymptomatisch den oberen Nasenrachenraum des Menschen besiedelt. In bestimmten Fällen können sie die Epithelbarriere überwinden und lebensbedrohliche Krankheiten wie eine Sepsis oder Meningitis auslösen. Auf Grund der hohen Letalität und dem Potential Epidemien auszulösen sind *N. meningitidis* ernst zu nehmende Erreger. Jährlich erkranken bis zu 1.2 Millionen Menschen, wobei vor allem Kleinkinder eine Risikogruppe darstellen.

In dieser Arbeit wurde der Wirkmechanismus von antibakteriell wirkendem azidofunktionalisiertem Sphingosin und C6-Ceramid gegenüber N. meningitidis untersucht. Um den antibakteriellen Effekt zu zeigen wurden zuerst Wachstumskurven erstellt und die MHK und MBK bestimmt. Anschließend konnte mit Hilfe von Rasterelektronenmikroskopischenund Transmissionselektronenmikroskopischen-Bildern die morphologischen Veränderungen von N. meningitidis gezeigt werden. Hierbei zeigten sich vor allem Effekte auf die äußere Membran, wie deren Ablösung von der inneren Membran oder deren Ruptur. Durch Fluoreszenz-Markierung des  $\omega$ -azido-Sphingosins und des  $\omega$ azido-C<sub>6</sub>-Ceramids und die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM) konnte die Aufnahme und Lokalisation in N. meningitidis genauer beurteilt werden. Die untersuchten Substanzen werden von den Meningokokken aufgenommen und sind bei niedrigen Konzentrationen vorallem in der Zellmembran lokalisiert, wobei sie sich bei höheren Konzentrationen im Zytosol anreichern. Diese Arbeit gibt einen ersten Einblick in den Wirkmechanismus von

Sphingobasen und Sphingolipiden, den es aber noch in weiteren Untersuchungen genauer aufzuklären gilt.

# 6 Literaturverzeichnis

- 1. Weichselbaum, A., *Über die Ätiologie der akuten Meningitis cerebrospinalis.* Fortschr. Med. 5, 1887: p. 573-583, 620-626.
- Stephens, D.S., Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium Neisseria meningitidis. Vaccine, 2009. 27 Suppl 2(Suppl 2): p. B71-B77.
- Cartwright, K.A., et al., *The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and Neisseria lactamica.* Epidemiol Infect, 1987. 99(3): p. 591-601.
- 4. Caugant, D.A., et al., *Asymptomatic carriage of Neisseria meningitidis in a randomly sampled population.* Journal of clinical microbiology, 1994. **32**(2): p. 323-330.
- 5. Neal, K.R., et al., *Changing carriage rate of Neisseria meningitidis among university students during the first week of term: cross sectional study.* BMJ (Clinical research ed.), 2000. **320**(7238): p. 846-849.
- 6. Christensen, H., et al., *Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis.* The Lancet Infectious Diseases, 2010. **10**(12): p. 853-861.
- 7. Caugant, D.A., et al., *Transmission of Neisseria meningitidis among asymptomatic military recruits and antibody analysis.* Epidemiology and infection, 1992. **109**(2): p. 241-253.
- 8. Blackwell, C.C., et al., Factors affecting carriage of Neisseria meningitidis among Greek military recruits. Epidemiology and infection, 1992. **108**(3): p. 441-448.
- 9. Harrison, O.B., et al., *Description and nomenclature of Neisseria meningitidis capsule locus.* Emerging infectious diseases, 2013. **19**(4): p. 566-573.
- 10. Chang, Q., Y.-L. Tzeng, and D.S. Stephens, *Meningococcal disease: changes in epidemiology and prevention.* Clinical epidemiology, 2012. **4**: p. 237-245.
- Greenwood, B., Manson Lecture: Meningococcal meningitis in Africa. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1999.
   93(4): p. 341-353.
- 12. Rouphael, N.G. and D.S. Stephens, *Neisseria meningitidis: biology, microbiology, and epidemiology.* Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2012. **799**: p. 1-20.
- 13. Greenwood, B.M., A.K. Bradley, and R.A. Wall, *Meningococcal disease and season in sub-saharan Africa.* The Lancet, 1985. **326**(8459): p. 829-830.
- 14. Geneva, W., *Weekly epidemiological record*. Weekly epidemiological record, 2003. **78**: p. 294-296.
- Aguilera, J.-F., et al., Outbreak of serogroup W135 meningococcal disease after the Hajj pilgrimage, Europe, 2000. Emerging infectious diseases, 2002. 8(8): p. 761-767.
- 16. Harrison, L.H., C.L. Trotter, and M.E. Ramsay, *Global epidemiology of meningococcal disease.* Vaccine, 2009. **27**: p. B51-B63.
- 17. Stephens, D.S., B. Greenwood, and P. Brandtzaeg, *Epidemic meningitis, meningococcaemia, and Neisseria meningitidis.* The Lancet, 2007. **369**(9580): p. 2196-2210.
- 18. Robert Koch-Institut, Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2018. Berlin, 2019, S. 176-182.
- 19. Cohn, A.C., et al., *Changes in Neisseria meningitidis Disease Epidemiology in the United States, 1998–2007: Implications for Prevention of Meningococcal Disease.* Clinical Infectious Diseases, 2010. **50**(2): p. 184-191.

- 20. Robert Koch-Institut, *Invasive Meningokokken-Erkrankungen 2012-2015.* Epidemiologisches Bulletin, Berlin, 2016, **43**: S. 471-485.
- 21. Nadel, S., *Treatment of Meningococcal Disease.* Journal of Adolescent Health, 2016. **59**(2, Supplement): p. S21-S28.
- 22. Tzeng, Y.-L. and D.S. Stephens, *Epidemiology and pathogenesis of Neisseria meningitidis.* Microbes and Infection, 2000. **2**(6): p. 687-700.
- 23. Herrmann, J.B., et al., *Complement C5a Receptor 1 Exacerbates the Pathophysiology of N. meningitidis Sepsis and Is a Potential Target for Disease Treatment.* mBio, 2018. **9**(1): p. e01755-17.
- 24. Rosenstein, N.E., et al., *Meningococcal Disease*. 2001. **344**(18): p. 1378-1388.
- 25. van Deuren, M., P. Brandtzaeg, and J.W. van der Meer, *Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management.* Clinical microbiology reviews, 2000. **13**(1): p. 144-166.
- 26. van de Beek, D., et al., *Clinical Features and Prognostic Factors in Adults with Bacterial Meningitis.* New England Journal of Medicine, 2004. **351**(18): p. 1849-1859.
- 27. Heckenberg, S.G.B., et al., *Clinical Features, Outcome, and Meningococcal Genotype in 258 Adults With Meningococcal Meningitis: A Prospective Cohort Study.* Medicine, 2008. **87**(4): p. 185-192.
- 28. Kirsch, E.A., et al., *Pathophysiology, Treatment and Outcome of Meningococcemia: A Review and Recent Experience.* The Pediatric Infectious Disease Journal, 1996. **15**(11): p. 967-979.
- 29. Sonavane, A., et al., *Waterhouse-friderichsen syndrome in an adult patient with meningococcal meningitis.* Indian journal of dermatology, 2011. **56**(3): p. 326-328.
- 30. Cahalane, S.F. and M. Waters, *Fulminant meningococcal septicaemia: A Hospital Experience.* The Lancet, 1975. **306**(7925): p. 120-121.
- 31. Pfister, H.-W., et.al., S2k-Leitlinie Ambulant erworbene bakterielle (eitrige) Meningoenzephalitis im Erwachsenenalter. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Hrsg. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Berlin, 2015.
- 32. Sadarangani, M., et al., Outcomes of Invasive Meningococcal Disease in Adults and Children in Canada Between 2002 and 2011: A Prospective Cohort Study. Clinical Infectious Diseases, 2015. **60**(8): p. e27-e35.
- 33. Sharip, A., et al., *Population-Based Analysis of Meningococcal Disease Mortality in the United States: 1990–2002.* The Pediatric Infectious Disease Journal, 2006. **25**(3): p. 191-194.
- 34. Flexner, S., *The results of the serum treatment in thirteen hundred cases of epidemic meningitis.* The Journal of experimental medicine, 1913. **17**(5): p. 553-576.
- 35. Takada, S., et al., *Meningococcemia in Adults: A Review of the Literature.* Internal Medicine, 2016. **55**(6): p. 567-572.
- Cvetkovic, M., et al., *Timing of Death in Children Referred for Intensive Care* With Severe Sepsis: Implications for Interventional Studies\*. Pediatric Critical Care Medicine, 2015. 16(5): p. 410-417.
- 37. Stoof, S.P., et al., *Disease Burden of Invasive Meningococcal Disease in the Netherlands Between June 1999 and June 2011: A Subjective Role for Serogroup and Clonal Complex.* Clinical Infectious Diseases, 2015. **61**(8): p. 1281-1292.
- Schildkamp, R.L., et al., *Clinical Manifestations and Course of Meningococcal Disease in 562 Patients.* Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 1996.
  28(1): p. 47-51.

- 39. Banks, H.S., *Meningococcosis: A protean disease.* The Lancet, 1948. **252**(6531): p. 677-681.
- Edwards, M.S. and C.J. Baker, Complications and sequelae of meningococcalinfections in children. The Journal of Pediatrics, 1981. 99(4): p. 540-545.
- Grimwood, K., et al., *Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects*. Archives of disease in childhood, 2000.
   83(2): p. 111-116.
- 42. Robert Koch-Institut, *Ständige Impfkommission: Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut.* Epidemiologisches Bulletin, Berlin, 2019. **34**: S. 313-364.
- 43. Trotter, C.L. and M.E. Ramsay, *Vaccination against meningococcal disease in Europe: review and recommendations for the use of conjugate vaccines.* FEMS Microbiology Reviews, 2007. **31**(1): p. 101-107.
- 44. Crum-Cianflone, N. and E. Sullivan, *Meningococcal Vaccinations*. Infectious diseases and therapy, 2016. **5**(2): p. 89-112.
- 45. Rappuoli, R., et al., *Meningococcal B vaccine (4CMenB): the journey from research to real world experience.* Expert Review of Vaccines, 2018. **17**(12): p. 1111-1121.
- 46. Watson, P.S. and D.P.J. Turner, *Clinical experience with the meningococcal B vaccine, Bexsero®: Prospects for reducing the burden of meningococcal serogroup B disease.* Vaccine, 2016. **34**(7): p. 875-880.
- Jessica R. MacNeil, M.L.R., MD; Temitope Folaranmi, MBChB; et. al., Use of Serogroup B Meningococcal Vaccines in Adolescents and Young Adults: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2015. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 2015. 64: p. 1171-1176.
- 48. Virji, M., et al., *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. Molecular Microbiology, 1993. **10**(5): p. 1013-1028.
- 49. Craig, L., M.E. Pique, and J.A. Tainer, *Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity.* Nature Reviews Microbiology, 2004. **2**(5): p. 363-378.
- 50. Proft, T. and E.N. Baker, *Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria structure, assembly and their role in disease.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. **66**(4): p. 613.
- 51. Wall, D. and D. Kaiser, *Type IV pili and cell motility.* Molecular Microbiology, 1999. **32**(1): p. 01-10.
- 52. Kirchner, M., D. Heuer, and T.F. Meyer, *CD46-independent binding of neisserial type IV pili and the major pilus adhesin, PilC, to human epithelial cells.* Infection and immunity, 2005. **73**(5): p. 3072-3082.
- 53. Merz, A.J. and M. So, *Interactions of Pathogenic Neisseriae with Epithelial Cell Membranes.* Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2000. **16**(1): p. 423-457.
- 54. Bernard, S.C., et al., *Pathogenic Neisseria meningitidis utilizes CD147 for vascular colonization.* Nature Medicine, 2014. **20**(7): p. 725-731.
- 55. Diaz Romero, J. and I.M. Outschoorn, *Current status of meningococcal group B vaccine candidates: capsular or noncapsular?* Clinical microbiology reviews, 1994. **7**(4): p. 559-575.
- 56. Virji, M., Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. Nature Reviews Microbiology, 2009. **7**(4): p. 274-286.
- 57. Hammerschmidt, S., et al., 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. Molecular Microbiology, 1996. **20**(6): p. 1211-1220.

- 58. Deghmane, A.-E., et al., *Down-regulation of pili and capsule of Neisseria meningitidis upon contact with epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein.* Molecular Microbiology, 2002. **43**(6): p. 1555-1564.
- 59. Virji, M., et al., *Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells.* Molecular Microbiology, 1993. **10**(3): p. 499-510.
- 60. Prince, S.M., M. Achtman, and J.P. Derrick, *Crystal structure of the OpcA integral membrane adhesin from Neisseria meningitidis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(6): p. 3417-3421.
- 61. De Vries, F.P., et al., *Neisseria meningitidis producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors.* Molecular Microbiology, 1998. **27**(6): p. 1203-1212.
- 62. Sarrazin, S., W.C. Lamanna, and J.D. Esko, *Heparan sulfate proteoglycans*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2011. **3**(7): p. a004952.
- 63. Garnett, J.P., et al., *Hyperglycaemia and Pseudomonas aeruginosa acidify cystic fibrosis airway surface liquid by elevating epithelial monocarboxylate transporter 2 dependent lactate-H(+) secretion.* Scientific reports, 2016. **6**: p. 37955-37955.
- 64. Smith, D.J., et al., *Targeting iron uptake to control <em&gt;Pseudomonas aeruginosa&lt;/em&gt; infections in cystic fibrosis.* European Respiratory Journal, 2013. **42**(6): p. 1723.
- 65. De Rose, V., et al., *Airway Epithelium Dysfunction in Cystic Fibrosis and COPD.* Mediators of inflammation, 2018. **2018**: p. 1309746-1309746.
- 66. Bals, R. and P.S. Hiemstra, *Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens.* European Respiratory Journal, 2004. **23**(2): p. 327.
- 67. Lomholt, H., K. Poulsen, and M. Kilian, *Comparative characterization of the iga* gene encoding IgA1 protease in Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae and Haemophilus influenzae. Molecular Microbiology, 1995. **15**(3): p. 495-506.
- 68. Geoffroy, M.-C., et al., *Large-scale analysis of the meningococcus genome by gene disruption: resistance to complement-mediated lysis.* Genome research, 2003. **13**(3): p. 391-398.
- 69. Seib, K.L., et al., Factor H-binding protein is important for meningococcal survival in human whole blood and serum and in the presence of the antimicrobial peptide LL-37. Infection and immunity, 2009. **77**(1): p. 292-299.
- 70. Lewis, L.A., et al., *The meningococcal vaccine candidate neisserial surface* protein A (NspA) binds to factor H and enhances meningococcal resistance to complement. PLoS pathogens, 2010. **6**(7): p. e1001027-e1001027.
- 71. Handing, J.W., et al., *The MtrCDE Efflux Pump Contributes to Survival of Neisseria gonorrhoeae From Human Neutrophils and Their Antimicrobial Components.* Frontiers in microbiology, 2018. **9**: p. 2688-2688.
- 72. Jamet, A. and X. Nassif, *New players in the toxin field: polymorphic toxin systems in bacteria.* mBio, 2015. **6**(3): p. e00285.
- 73. Coureuil, M., et al., *Molecular interactions between Neisseria meningitidis and its human host.* Cellular microbiology, 2019. **21**(11): p. e13063-e13063.
- Meyer, J., et al., Characterization of MDAΦ, a temperate filamentous bacteriophage of Neisseria meningitidis. Microbiology, 2016. 162(2): p. 268-282.

- 75. Bille, E., et al., *A virulence-associated filamentous bacteriophage of Neisseria meningitidis increases host-cell colonisation.* PLOS Pathogens, 2017. **13**(7): p. e1006495.
- Uria, M.J., et al., A generic mechanism in Neisseria meningitidis for enhanced resistance against bactericidal antibodies. The Journal of experimental medicine, 2008. 205(6): p. 1423-1434.
- 77. Vogel, U. and M. Frosch, *Mechanisms of neisserial serum resistance*. Molecular Microbiology, 1999. **32**(6): p. 1133-1139.
- 78. Estabrook, M.M., J.M. Griffiss, and G.A. Jarvis, *Sialylation of Neisseria meningitidis lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-N-neotetraose.* Infection and immunity, 1997. **65**(11): p. 4436-4444.
- 79. Perkins-Balding, D., M. Ratliff-Griffin, and I. Stojiljkovic, *Iron transport systems in Neisseria meningitidis.* Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 2004. **68**(1): p. 154-171.
- 80. Schryvers, A.B. and I. Stojiljkovic, *Iron acquisition systems in the pathogenic Neisseria.* Molecular Microbiology, 1999. **32**(6): p. 1117-1123.
- 81. Raetz, C.R.H. and C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins*. Annual review of biochemistry, 2002. **71**: p. 635-700.
- 82. Schlagenhauf, U., Parodontologie, Begleitskript zur Hauptvorlesung Parodontologie, Teil 1: Anatomie, Mikrobiologie, Immunsystem, Ätiologie, Epidemiologie. Würzburg, 2008. **2**.
- 83. Opal, S.M., *Endotoxins and Other Sepsis Triggers.* Endotoxemia and Endotoxin Shock, 2010. **167**: p. 14-24.
- 84. Plant, L., et al., *Lipooligosaccharide structure contributes to multiple steps in the virulence of Neisseria meningitidis.* Infection and immunity, 2006. **74**(2): p. 1360-1367.
- 85. Kahler, C.M. and D.S. Stephens, *Genetic Basis for Biosynthesis, Structure, and Function of Meningococcal Lipooligosaccharide (Endotoxin)*. Critical Reviews in Microbiology, 1998. **24**(4): p. 281-334.
- 86. Frosch, M., *Akute bakterielle Meningitis*. UNI-MED-Verlag, Bremen (u.a.), 2003.1. Auflage.
- 87. Harrison, O.B., et al., *Analysis of pathogen-host cell interactions in purpura fulminans: expression of capsule, type IV pili, and PorA by Neisseria meningitidis in vivo.* Infection and immunity, 2002. **70**(9): p. 5193-5201.
- 88. Capel, E., et al., *Peripheral blood vessels are a niche for blood-borne meningococci.* Virulence, 2017. **8**(8): p. 1808-1819.
- 89. Denis, K., et al., *Targeting Type IV pili as an antivirulence strategy against invasive meningococcal disease.* Nature Microbiology, 2019. **4**(6): p. 972-984.
- 90. Simonis, A., et al., *Differential activation of acid sphingomyelinase and ceramide release determines invasiveness of Neisseria meningitidis into brain endothelial cells.* PLoS pathogens, 2014. **10**(6): p. e1004160-e1004160.
- 91. Peters, S., et al., *Neisseria meningitidis Type IV Pili Trigger Ca2+-Dependent Lysosomal Trafficking of the Acid Sphingomyelinase To Enhance Surface Ceramide Levels.* Infection and Immunity, 2019. **87**(8): p. e00410-19.
- Engelhardt, B. and L. Sorokin, *The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction.* Seminars in Immunopathology, 2009.
  31(4): p. 497-511.
- 93. Rubin, L.L. and J.M. Staddon, *The cell biology of the blood-brain barrier.* Annual Review of Neuroscience, 1999. **22**(1): p. 11-28.
- 94. Unkmeir, A., et al., *Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of Neisseria meningitidis in human brain microvascular endothelial cells.* Molecular Microbiology, 2002. **46**(4): p. 933-946.

- 95. Virji, M., K. Makepeace, and E.R. Moxon, *Distinct mechanisms of interactions of Opc-expressing meningococci at apical and basolateral surfaces of human endothelial cells; the role of integrins in apical interactions.* Molecular Microbiology, 1994. **14**(1): p. 173-184.
- 96. Muenzner, P., et al., Carcinoembryonic antigen family receptor specificity of Neisseria meningitidis Opa variants influences adherence to and invasion of proinflammatory cytokine-activated endothelial cells. Infection and immunity, 2000. **68**(6): p. 3601-3607.
- 97. Merz, A.J., C.A. Enns, and M. So, *Type IV pili of pathogenic Neisseriae elicit cortical plaque formation in epithelial cells.* Molecular Microbiology, 1999. **32**(6): p. 1316-1332.
- 98. Simonis, A. and A. Schubert-Unkmeir, *Interactions of meningococcal virulence factors with endothelial cells at the human blood–cerebrospinal fluid barrier and their role in pathogenicity.* FEBS Letters, 2016. **590**(21): p. 3854-3867.
- Slanina, H., et al., Cell invasion by Neisseria meningitidis requires a functional interplay between the focal adhesion kinase, Src and cortactin. PloS one, 2012.
   7(6): p. e39613-e39613.
- 100. Slanina, H., et al., *Role of epidermal growth factor receptor signaling in the interaction of Neisseria meningitidis with endothelial cells.* Infection and immunity, 2014. **82**(3): p. 1243-1255.
- 101. Sokolova, O., et al., Interaction of Neisseria meningitidis with human brain microvascular endothelial cells: role of MAP- and tyrosine kinases in invasion and inflammatory cytokine release. Cellular Microbiology, 2004. **6**(12): p. 1153-1166.
- 102. Futerman, A.H. and Y.A. Hannun, *The complex life of simple sphingolipids.* EMBO reports, 2004. **5**(8): p. 777-782.
- 103. Rassow J., et al., *Biochemie*. Duale Reihe, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2012. 3. Auflage, Teil B, Kapitel 3.2, S. 329-341.
- 104. Nagle, J.F. and S. Tristram-Nagle, *Structure of lipid bilayers*. Biochimica et biophysica acta, 2000. **1469**(3): p. 159-195.
- 105. Bretscher, M.S., *Asymmetrical Lipid Bilayer Structure for Biological Membranes.* Nature New Biology, 1972. **236**(61): p. 11-12.
- 106. Nicolson, G.L., *Cell Membrane Fluid*–Mosaic Structure and Cancer Metastasis. Cancer Research, 2015. **75**(7): p. 1169.
- 107. Purves, W.K.S., D.; Hillih, D.M.; Heller, H.C.; Hacker, S.D., *Biologie*. Vol. 7. Auflage. Springer Spektrum.
- 108. Ohtsubo, K. and J.D. Marth, *Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease.* Cell, 2006. **126**(5): p. 855-867.
- 109. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes.* Science, 1972. **175**(4023): p. 720.
- 110. Vereb, G., et al., *Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(14): p. 8053-8058.
- 111. Munro, S., *Lipid Rafts: Elusive or Illusive?* Cell, 2003. **115**(4): p. 377-388.
- 112. Simons, K. and R. Ehehalt, *Cholesterol, lipid rafts, and disease.* The Journal of clinical investigation, 2002. **110**(5): p. 597-603.
- 113. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes.* Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-572.
- Allen, J.A., R.A. Halverson-Tamboli, and M.M. Rasenick, *Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling*. Nature Reviews Neuroscience, 2007. 8(2): p. 128-140.
- 115. Brown, D.A., *Lipid Rafts, Detergent-Resistant Membranes, and Raft Targeting Signals.* Physiology, 2006. **21**(6): p. 430-439.

- 116. Korade, Z. and A.K. Kenworthy, *Lipid rafts, cholesterol, and the brain.* Neuropharmacology, 2008. **55**(8): p. 1265-1273.
- 117. Pike, L.J., *The challenge of lipid rafts.* Journal of lipid research, 2009. **50 Suppl**(Suppl): p. S323-S328.
- 118. Hait, N.C. and A. Maiti, *The Role of Sphingosine-1-Phosphate and Ceramide-1-Phosphate in Inflammation and Cancer.* Mediators of inflammation, 2017. **2017**: p. 4806541-4806541.
- Hait, N.C., et al., Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes, 2006.
  1758(12): p. 2016-2026.
- 120. Obeid, L., et al., *Programmed cell death induced by ceramide*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1769-1771.
- 121. Venable, M.E., et al., *Role of Ceramide in Cellular Senescence*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(51): p. 30701-30708.
- Hannun, Y.A. and L.M. Obeid, *Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids.* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008. 9(2): p. 139-150.
- 123. Kolter, T., R.L. Proia, and K. Sandhoff, *Combinatorial Ganglioside Biosynthesis*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(29): p. 25859-25862.
- Dickson, R.C., Sphingolipid functions in Saccharomyces Cerevisiae: Comparison to Mammals. Annual Review of Biochemistry, 1998. 67(1): p. 27-48.
- 125. Deigner H.P., G.E., Claus R.A., *Sphingolipid Metabolism in Systemic Inflammation*. Intensive Care Medicine. Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine. Vol. 2007. 2007: Springer, Berlin, Heidelberg.
- 126. Feingold, K.R., *The Importance of Lipids in Cutaneous Function.* Journal of Lipid Research, 2007. **48**(12): p. 2529-2530.
- 127. Lee, S.H., S.K. Jeong, and S.K. Ahn, *An update of the defensive barrier function of skin.* Yonsei medical journal, 2006. **47**(3): p. 293-306.
- 128. Morad, S.A.F. and M.C. Cabot, *Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells*. Nature Reviews Cancer, 2013. **13**(1): p. 51-65.
- 129. Hanada, K., *Intracellular trafficking of ceramide by ceramide transfer protein.* Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences, 2010. **86**(4): p. 426-437.
- 130. Goñi, F.M. and A. Alonso, *Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity.* FEBS Letters, 2002. **531**(1): p. 38-46.
- 131. Duan, R.-D., et al., *Purification, localization, and expression of human intestinal alkaline sphingomyelinase.* Journal of Lipid Research, 2003. **44**(6): p. 1241-1250.
- 132. Kornhuber, J., et al., *The ceramide system as a novel antidepressant target.* Trends in Pharmacological Sciences, 2014. **35**(6): p. 293-304.
- 133. Tettamanti, G., et al., *Salvage pathways in glycosphingolipid metabolism.* Biochimie, 2003. **85**(3): p. 423-437.
- 134. Gillard, B.K., R.G. Clement, and D.M. Marcus, *Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in de novo and recycling pathways.* Glycobiology, 1998. **8**(9): p. 885-890.
- Kitatani, K., J. Idkowiak-Baldys, and Y.A. Hannun, *The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling*. Cellular signalling, 2008. **20**(6): p. 1010-1018.
- 136. Gómez del Pulgar, T., et al., *De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis.* The Biochemical journal, 2002. **363**(Pt 1): p. 183-188.

- Jenkins, G.M., et al., Acute Activation of de Novo Sphingolipid Biosynthesis upon Heat Shock Causes an Accumulation of Ceramide and Subsequent Dephosphorylation of SR Proteins. Journal of Biological Chemistry, 2002.
   277(45): p. 42572-42578.
- 138. Brenner, B., et al., *Fas/CD95/Apo-I activates the acidic sphingomyelinase via Caspases.* Cell Death & Differentiation, 1998. **5**(1): p. 29-37.
- 139. Goldkorn, T., et al., *H2O2 acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells.* Journal of Cell Science, 1998. **111**(21): p. 3209-3220.
- 140. Haimovitz-Friedman, A., et al., *Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation.* The Journal of experimental medicine, 1997. **186**(11): p. 1831-1841.
- 141. Grassmé, H., et al., Acidic Sphingomyelinase Mediates Entry of N. gonorrhoeae into Nonphagocytic Cells. Cell, 1997. **91**(5): p. 605-615.
- 142. Grassmé, H., et al., *Host defense against Pseudomonas aeruginosa requires ceramide-rich membrane rafts.* Nature Medicine, 2003. **9**(3): p. 322-330.
- 143. Ma, J., et al., Staphylococcus aureus α-Toxin Induces Inflammatory Cytokines via Lysosomal Acid Sphingomyelinase and Ceramides. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017. 43(6): p. 2170-2184.
- 144. Holopainen, J.M., M. Subramanian, and P.K.J. Kinnunen, *Sphingomyelinase Induces Lipid Microdomain Formation in a Fluid Phosphatidylcholine/Sphingomyelin Membrane.* Biochemistry, 1998. **37**(50): p. 17562-17570.
- 145. Kolesnick, R.N., F.M. Goñi, and A. Alonso, *Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects.* Journal of Cellular Physiology, 2000. **184**(3): p. 285-300.
- 146. Bollinger, C.R., V. Teichgräber, and E. Gulbins, *Ceramide-enriched membrane domains.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research, 2005. **1746**(3): p. 284-294.
- 147. Stancevic, B. and R. Kolesnick, *Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling.* FEBS letters, 2010. **584**(9): p. 1728-1740.
- 148. Esen, M., et al., *Mechanisms of Staphylococcus aureus induced apoptosis of human endothelial cells.* Apoptosis, 2001. **6**(6): p. 431-439.
- Zhang, Y., et al., Acid Sphingomyelinase Amplifies Redox Signaling in Pseudomonas aeruginosa - Induced Macrophage Apoptosis. The Journal of Immunology, 2008. 181(6): p. 4247.
- Grassmé, H., et al., *Rhinoviruses Infect Human Epithelial Cells via Ceramide*enriched Membrane Platforms. Journal of Biological Chemistry, 2005. 280(28): p. 26256-26262.
- 151. Avota, E., E. Gulbins, and S. Schneider-Schaulies, *DC-SIGN mediated* sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells. PLoS pathogens, 2011. **7**(2): p. e1001290-e1001290.
- 152. Burtenshaw, J.M., *The mechanism of self-disinfection of the human skin and its appendages.* The Journal of hygiene, 1942. **42**(2): p. 184-210.
- 153. Drake, D.R., et al., *Thematic Review Series: Skin Lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface.* Journal of Lipid Research, 2008. **49**(1): p. 4-11.
- 154. Fischer, C.L., et al., *The roles of cutaneous lipids in host defense.* Biochimica et biophysica acta, 2014. **1841**(3): p. 319-322.
- 155. Dubos, R.J., *The effect of sphingomyelin on the growth of tubercle bacilli.* The Journal of experimental medicine, 1948. **88**(1): p. 73-79.
- 156. Pruett, S.T., et al., *Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols.* Journal of lipid research, 2008. **49**(8): p. 1621-1639.

- 157. Bibel, D.J., R. Aly, and H.R. Shinefield, *Antimicrobial Activity of Sphingosines*. Journal of Investigative Dermatology, 1992. **98**(3): p. 269-273.
- 158. Bibel, D.J., Aly, R., Shah, S., and Shinefield, H. R., *Sphingosines: antimicrobial barriers of the skin.* Acta Derm. Venereol., 1993. **73**: p. 407-411.
- 159. Fischer, C.L., et al., *Antibacterial Activity of Sphingoid Bases and Fatty Acids against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.* 2012. **56**(3): p. 1157-1161.
- 160. Dongfack, M.D.J., et al., *A New Sphingolipid and Furanocoumarins with Antimicrobial Activity from Ficus exasperata.* Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2012. **60**(8): p. 1072-1075.
- 161. El-Amraoui, B., J.-F. Biard, and A. Fassouane, *Haliscosamine: a new antifungal sphingosine derivative from the Moroccan marine sponge Haliclona viscosa.* SpringerPlus, 2013. **2**(1): p. 252.
- 162. Becam, J., et al., *Antibacterial activity of ceramide and ceramide analogs against pathogenic Neisseria.* Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 17627.
- 163. Fischer, C.L., et al., *Sphingoid Bases Are Taken Up by Escherichia coli and Staphylococcus aureus and Induce Ultrastructural Damage.* Skin Pharmacology and Physiology, 2013. **26**(1): p. 36-44.
- 164. Saied, E.M., et al., A series of ceramide analogs modified at the 1-position with potent activity against the intracellular growth of Chlamydia trachomatis. Future Medicinal Chemistry, 2015. **7**(15): p. 1971-1980.
- Cukkemane, N., et al., Anti-adherence and bactericidal activity of sphingolipids against Streptococcus mutans. European Journal of Oral Sciences, 2015.
   123(4): p. 221-227.
- 166. Pewzner-Jung, Y., et al., *Sphingoid long chain bases prevent lung infection by Pseudomonas aeruginosa.* EMBO Molecular Medicine, 2014. **6**(9): p. 1205-1214.
- 167. Becker, K.A., et al., *Neutrophils Kill Reactive Oxygen Species-Resistant Pseudomonas aeruginosa by Sphingosine.* Cellular Physiology and Biochemistry, 2017. **43**(4): p. 1603-1616.
- 168. del Olmo, E., et al., *Simple dihydrosphyngosine analogues with potent activity against MDR-Mycobacterium tuberculosis.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009. **19**(19): p. 5764-5768.
- Kunz, T.C. and V. Kozjak-Pavlovic, *Diverse Facets of Sphingolipid Involvement in Bacterial Infections*. Frontiers in cell and developmental biology, 2019. 7: p. 203-203.
- 170. Bibel, D.J., R. Aly, and H.R. Shinefield, *Topical sphingolipids in antisepsis and antifungal therapy.* Clinical and Experimental Dermatology, 1995. **20**(5): p. 395-400.
- 171. Kolb, H.C., M.G. Finn, and K.B. Sharpless, *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions.* Angewandte Chemie International Edition, 2001. **40**(11): p. 2004-2021.
- 172. Huisgen, R., G. Szeimies, and L. Möbius, *1.3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik der Additionen organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen.* Chemische Berichte, 1967. **100**(8): p. 2494-2507.
- 173. Tornøe, C.W., C. Christensen, and M. Meldal, *Peptidotriazoles on Solid Phase:* [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. The Journal of Organic Chemistry, 2002. **67**(9): p. 3057-3064.
- Rostovtsev, V.V., et al., A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. Angewandte Chemie International Edition, 2002. 41(14): p. 2596-2599.
- 175. Jewett, J.C. and C.R. Bertozzi, *Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology*. Chemical Society reviews, 2010. **39**(4): p. 1272-1279.

- 176. Agard, N.J., J.A. Prescher, and C.R. Bertozzi, A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(46): p. 15046-15047.
- 177. Jewett, J.C., E.M. Sletten, and C.R. Bertozzi, *Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones.* Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(11): p. 3688-3690.
- 178. Reynolds, E.S., *The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.* The Journal of cell biology, 1963. **17**(1): p. 208-212.
- 179. Markert, S.M., et al., *Chapter 2 3D subcellular localization with superresolution array tomography on ultrathin sections of various species*, in *Methods in Cell Biology*, T. Müller-Reichert and P. Verkade, Editors. 2017, Academic Press. p. 21-47.
- 180. Jones, M.N., *Surfactants in membrane solubilisation.* International Journal of Pharmaceutics, 1999. **177**(2): p. 137-159.
- 181. Lichtenberg, D., H. Ahyayauch, and F.M. Goñi, *The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers.* Biophysical journal, 2013. **105**(2): p. 289-299.
- 182. Letschert, S., et al., *Super-Resolution Imaging of Plasma Membrane Glycans.* Angewandte Chemie International Edition, 2014. **53**(41): p. 10921-10924.
- 183. Mertsch, A., et al., Synthesis and application of water-soluble, photoswitchable cyanine dyes for bioorthogonal labeling of cell-surface carbohydrates, in Zeitschrift für Naturforschung C. 2016. p. 347.
- Collenburg, L., et al., A Functionalized Sphingolipid Analogue for Studying Redistribution during Activation in Living T Cells. The Journal of Immunology, 2016. **196**(9): p. 3951.
- 185. Bergsson, G., et al., *Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglyceridesNote.* APMIS, 2001. **109**(10): p. 670-678.
- 186. Bergsson, G., et al., *In vitro killing of Candida albicans by fatty acids and monoglycerides.* Antimicrobial agents and chemotherapy, 2001. **45**(11): p. 3209-3212.
- 187. Hannun, Y.A., et al., Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**(27): p. 12604-12609.
- 188. Hartmann, M., et al., *Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy.* Antimicrobial agents and chemotherapy, 2010. **54**(8): p. 3132-3142.
- 189. Jung, S.W., et al., *Mechanism of antibacterial activity of liposomal linolenic acid against Helicobacter pylori*. PloS one, 2015. **10**(3): p. e0116519-e0116519.
- 190. Fischer, C.L., et al., Oral mucosal lipids are antibacterial against Porphyromonas gingivalis, induce ultrastructural damage, and alter bacterial lipid and protein compositions. International Journal of Oral Science, 2013. 5(3): p. 130-140.
- London, E. and D.A. Brown, *Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts).* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2000. **1508**(1): p. 182-195.
- 192. Caritá, A.C., et al., *Effect of Triton X-100 on Raft-Like Lipid Mixtures: Phase Separation and Selective Solubilization.* Langmuir, 2017. **33**(29): p. 7312-7321.
- 193. Casadei, B.R., et al., *Direct visualization of the action of Triton X-100 on giant vesicles of erythrocyte membrane lipids.* Biophysical journal, 2014. **106**(11): p. 2417-2425.

- 194. Moses, J.E. and A.D. Moorhouse, *The growing applications of click chemistry*. Chemical Society Reviews, 2007. **36**(8): p. 1249-1262.
- 195. Mateos-Gil, P., et al., *Super-Resolution Imaging of Plasma Membrane Proteins with Click Chemistry.* Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2016. **4**(98).
- 196. Beliu, G., et al., *Bioorthogonal labeling with tetrazine-dyes for super-resolution microscopy.* Communications biology, 2019. **2**: p. 261-261.
- 197. Gustafsson, M.G., Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. J Microsc, 2000. **198**(Pt 2): p. 82-7.
- 198. Boujard, D., et al., *Zell- und Molekularbiologie im Überblick*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2014. 1. Auflage: Kapitel 6, S. 182-183.
- 199. Neubert, F., et al., Bioorthogonal Click Chemistry Enables Site-specific Fluorescence Labeling of Functional NMDA Receptors for Super-Resolution Imaging. Angew Chem Int Ed Engl, 2018. 57(50): p. 16364-16369.
- 200. Mulisch, M. und U. Welsch, *Romeis Mikroskopische Technik*. Springer Spektrum, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2015. 19. Auflage: Kapitel 19, S.431-432.
- 201. Wassie, A.T., Y. Zhao, and E.S. Boyden, *Expansion microscopy: principles and uses in biological research*. Nature Methods, 2019. **16**(1): p. 33-41.

# Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir für die kollegiale Aufnahme in Ihre Abreitsgruppe, die produktiven Gespräche und die immer hilfreiche Unterstützung bei meiner Promotionsarbeit bedanken.

Meinem Betreuer Simon Peters danke ich ganz herzlich für die Einführung in den Laboralltag, die hervorragende Betreuung, seine Geduld und das offene Ohr für all meine Fragen, die als Laborneuling durchaus zahlreich waren.

Danke auch an Lena Wolter, die mir im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Die schöne, abwechslungsreiche und manchmal auch lustige Zeit mit Euch, wird mir immer in guter Erinnerung bleiben.

Ich bedanke mich auch bei dem Direktor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, Prof. Dr. med. Matthias Frosch für die Möglichkeit der Durchführung dieser Promotionsarbeit an seinem Institut.

Mein herzlicher Dank gilt auch Prof. Dr. Christian Stigloher für die Einführung in die Elektronenmikroskopie und die Nutzung seiner Mikroskope für diese Arbeit. Desweiteren möchte ich mich bei Daniela Bunsen und Claudia Gehring für ihre Hilfe beim Prozessieren meiner Proben und das gemeinsame Mikroskopieren bedanken. Danke auch an Veronika Perschin und Sebastian Britz für die Hilfe bei allen mikroskopischen Fragen und die Einführung in das Korrelieren der Bilder.

Ebenfalls danke ich Prof. Dr. Jürgen Seibel und Julian Fink für die Bereitstellung des  $\omega$ -azido-Sphingosins und des  $\omega$ -azido-C<sub>6</sub>-Ceramids.

Danke auch an alle Mitglieder der SphingoFOR 2123 Forschergruppe, für die herzliche Aufnahme und die Möglichkeit meine Ergebnisse zu präsentieren.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser Arbeit vielseitig unterstützt haben. Ohne euch hätte ich das nicht geschafft.

## Publikationen im Rahmen der Promotionsarbeit

- 27. Juni 2019: Vortrag im Rahmen des SphingoFOR 2123 Treffens am Institut für Virologie und Immunbiologie in Würzburg
- 10. Oktober 2019: Posterpräsentation auf dem "14. EUREKA Symposium der GSLS der Universität Würzburg"
- Mai 2020: Publikation: Peters S, Kaiser L, Fink J, Schumacher F, Kleuser B, Schlegel J, Sauer M, Stigloher Ch, Seibel J, Schubert-Unkmeir A. 2020. Click-Correlative light electron microscopy for imaging and tracking azide-functionalized sphingolipids in bacteria. Manuskript zur Publikation eingereicht.

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Lena Kaiser, geboren am 07.12.1992 in Bad Friedrichshall, an Eides statt, die Dissertation <u>"Wirkmechanismus von</u> <u>Sphingolipiden und Sphingosin gegen mikrobielle Erreger"</u> eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet haben.

Ich erkläre weiterhin, dass ich die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten habe.

Meine Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erzielen, vorgelegt.

Würzburg, den 11.12.2020

Lena Kaiser