

**Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Matthias Frosch

**Untersuchungen zum Einfluss der Meningokokkeninfektion
auf den Zellzyklus von Epithelzellen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Hans Michael von Papen

aus Wiesbaden

Würzburg, September 2018



Referentin: Prof. Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir
Institut für Hygiene und Mikrobiologie

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Knut Ohlsen
Institut für Molekulare Infektionsbiologie (IMIB)

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch
Institut für Hygiene und Mikrobiologie

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2019

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	<i>Neisseria meningitidis</i> – Mikrobiologie und Epidemiologie.....	1
1.2	Pathophysiologie des Trägerstatus.....	5
1.3	Pathogenese der invasiven Meningokokkenerkrankung (IME).....	8
1.4	Klinik der Meningokokkeninfektion.....	12
1.5	Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen.....	14
1.6	Beeinflussung des Zellzyklus eukaryotischer Zellen durch bakterielle Infektion.....	21
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit.....	24
2.	Material und Methoden	26
2.1	Material.....	26
2.1.1	Geräte.....	26
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Enzyme.....	29
2.1.4	Puffer und Lösungen.....	32
2.1.5	Nährmedien für Zellkulturen.....	37
2.1.6	Nährmedien für Bakterienkulturen.....	38
2.1.7	Reaktionskits.....	39

2.1.8	Oligonukleotid-Primer	39
2.1.9	Primärantikörper	40
2.1.10	Sekundärantikörper	41
2.1.11	Software	42
2.1.12	Zelllinien	42
2.1.13	Bakterienstämme.....	43
2.2	Methoden.....	45
2.2.1	Zellkultur.....	45
2.2.2	Infektion von Epithelzellen mit <i>N. meningitidis</i> -Isolaten.....	50
2.2.3	Gewinnung von hitzeinaktivierten Bakterien für Infektionsversuche ...	50
2.2.4	Gewinnung und Aufkonzentrierung bakterieller Kulturüberstände.....	51
2.2.5	Gentamicin-Protektionsassay	52
2.2.6	Propidiumiodid-Färbung zur Analyse des zellulären DNA-Gehaltes ..	54
2.2.7	Zellzyklusanalyse mit Detroit 562-Zellen mittels EdU-Färbung	58
2.2.8	Protein-Überexpression in <i>Escherichia coli</i>	62
2.2.9	Herstellung von Zelllysaten der Zelllinie Detroit 562.....	62
2.2.10	Herstellung bakterieller Lysate	63
2.2.11	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	63
2.2.12	Coomassie-brilliant-blue-Färbung von Proteingelen.....	64
2.2.13	Western Blot.....	65
2.2.14	Immunfluoreszenz mit Detroit 562-Zellen.....	66

2.2.15	Extraktion genomischer DNA aus <i>N. meningitidis</i> Isolaten.....	67
2.2.16	PCR zum Nachweis des <i>opcA</i> -Gens.....	67
2.2.17	Reinigung, Analyse und Sequenzierung von DNA	69
2.2.18	RNA-Isolation aus Detroit 562-Zellen	71
2.2.19	Bestimmung der RNA-Integrität mittels Agilent 2100 Bioanalyzer	71
2.2.20	Synthese von cDNA aus zellulärer RNA.....	72
2.2.21	Aufreinigung von cDNA mithilfe des QIAquick PCR Purification Kit ...	73
2.2.22	Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) zur Quantifizierung der Cyclin-Transkription in Detroit 562-Zellen.....	74
3.	Ergebnisse	77
3.1	Adhärenz und Invasion von pathogenen Meningokokkenisolaten sowie von Trägerstämmen an pharyngealen Epithelzellen	77
3.2	Zellzyklusanalysen	82
3.2.1	Zellzyklusanalyse durch Propidiumiodidfärbung an verschiedenen pharyngealen Epithelzellen	82
3.2.2	Zellzyklusanalyse durch Messung der Ethinyl-deoxy-Uridin- Inkorporation in Detroit 562-Zellen	91
3.3	Charakterisierung der kolonisierenden Stämme α 711 und α 4.....	94
3.3.1	Western Blot zur Detektion von Opa, Opc und Typ IV Pili bei den Isolaten α 711 und α 4	94

3.3.2	PCR und Gensequenzierung zur Detektion von des <i>opcA</i> -Gens bei den Isolaten α 711 und α 4	96
3.4	Charakterisierung des Effektes der Meningokokkeninfektion auf den Zellzyklus.....	98
3.4.1	Propidium-Iodidfärbung von Detroit 562-Zellen nach Inkubation mit hitzeinaktivierten Meningokokkenisolaten	99
3.4.2	Propidium-Iodidfärbung von Detroit 562-Zellen nach Inkubation mit bakteriellen Kulturüberständen.....	99
3.4.3	Zellzyklusanalysen mit Detroit 562-Zellen nach Infektion mit Opa- und Opc-exprimierenden <i>E. coli</i> -Stämmen.....	101
3.4.4	Western Blot zur Detektion zellzyklusregulierender Proteine in Detroit 562-Zellen	103
3.4.5	Immunfluoreszenzfärbung von Detroit 562-Zellen zur Visualisierung zellzyklusregulierender Proteine.....	106
3.4.6	qRT-PCR zur Untersuchung der Transkription der Cycline A, B, D1 und E	111
4.	Diskussion	116
4.1	Auswahl der verwendeten Epithelzelllinien	116
4.2	Auswahl der verwendeten Bakterienisolate	118
4.3	Interaktion der verschiedenen Meningokokkenisolate mit der Zielzelle – Invasion und Adhärenz	120
4.4	Zellzyklusanalysen	122

4.5	Identifizierung relevanter bakterieller Faktoren	125
4.6	Regulation von Zellzyklusmediatoren durch die Infektion mit <i>N. meningitidis</i>	127
4.7	Beeinflussung des Zellzyklus durch andere Pathogene im Vergleich mit <i>N. meningitidis</i> und Ausblick	131
5.	Zusammenfassung	135
6.	Anhang.....	137
7.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	147
7.1	Tabellenverzeichnis	147
7.2	Abbildungsverzeichnis	147
8.	Literaturverzeichnis	152
9.	Abkürzungsverzeichnis.....	172

1. Einleitung

1.1 *Neisseria meningitidis* – Mikrobiologie und Epidemiologie

Neisseria meningitidis ist ein gramnegatives, aerobes β -Proteobacterium, das der Familie der Neisseriaceae angehört und dessen einziges Reservoir der Mensch ist [1]. Als Ursache der weltweit vorkommenden invasiven Meningokokkenerkrankung (IME), die sporadisch oder als Epidemie auftreten kann und mit einer hohen Morbidität und Mortalität behaftet ist, stellt *N. meningitidis* ein bis in die heutige Zeit gefürchtetes Pathogen dar [2].

Der erste bekannte Bericht über eine vermutlich durch *N. meningitidis* verursachte Epidemie stammt von G. Vieusseux und beschreibt ein „bösesartiges, nicht ansteckendes zerebrales Fieber“, das im Jahre 1805 in Genf um sich gegriffen und 33 Menschenleben gekostet habe [3, 4]. Über einen weiteren Ausbruch wurde ein Jahr später in New Bedford, Massachusetts, berichtet [5]. Die erstmalige Beschreibung der intrazellulär lokalisierten oval-kokkenförmigen Bakterien im Liquor cerebrospinalis erkrankter Personen erfolgte 1884 durch E. Marchiafava und A. Celli [6] und die erste Isolierung gelang schließlich im Jahre 1887 durch A. Weichselbaum [7].

Meningokokken treten als Diplokokken mit einem Durchmesser von 0,6-1,0 μm auf und entsprechen in ihrer Feinstruktur dem klassischen Aufbau gramnegativer Bakterien mit einer inneren Zellmembran, einer dünnen Peptidoglykan-Zellwand und einer äußeren Membran, in die die pathogenetisch wichtigen Außenmembranproteine und Lipooligosaccharide (LOS) eingelagert sind. Sie reagieren positiv im Oxidasetest und sind auf verschiedenen Nährböden anzüchtbar, wobei sich ein optimales Wachstum bei 35-37 °C und 5-10 % (v/v) CO_2 einstellt [1]. Das Genom der bislang sequenzierten Stämme hat eine durchschnittliche Größe von 2,193 Megabasenpaaren, enthält rund 2000 kodierende Sequenzen [8-10] und weist auf Nukleotidebene ca. 90 % Homologie mit den verwandten Spezies *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria lactamica* auf

[11]. Zu den am besten untersuchten Virulenzfaktoren gehören die Typ IV Pili, die Opa-Proteine, die Porine, das Lipooligosaccharid sowie die Polysaccharidkapsel. Anhand struktureller Unterschiede der Kapselantigene lassen sich Meningokokkenstämme zwölf verschiedenen Serogruppen zuordnen, wobei invasive Meningokokkenerkrankungen mehrheitlich durch die sechs Serogruppen A, B, C, W, X und Y verursacht werden [12]. Eine präzisere Charakterisierung ist möglich durch das „multilocus sequence typing“ (MLST) [13], das sich zum heutigen Goldstandard entwickelt hat. Hierbei werden 400-500 bp große, gut konservierte Abschnitte von sieben verschiedenen Haushaltsgenen (housekeeping genes) sequenziert und zu einem Sequenztyp (ST) zusammengefasst [14]. Gruppen verschiedener Sequenztypen, die in mindestens vier der sieben untersuchten Fragmente identisch sind, werden als klonaler Komplex (cc) definiert und nach dem Sequenztyp benannt, den der mutmaßliche gemeinsame Vorfahr hatte, z.B. ST-32 cc [14].

Einziges natürliches Habitat von *N. meningitidis* ist der menschliche obere Respirationstrakt, speziell im Naso- und Oropharynxbereich, der Mundhöhle und den Tonsillen [15]. Je nach Altersgruppe sind 10-35 % der Bevölkerung mit Meningokokkenstämmen asymptomatisch kolonisiert [16-20]. Diese Trägerrate kann in geschlossenen Gruppen wie etwa Studentenwohnheimen oder Kasernen jedoch drastisch ansteigen und dort temporär Werte über 70 % erreichen [21, 22]. Es wird geschätzt, dass ein Mensch im Laufe seines Lebens durchschnittlich viermal zeitweise Träger von Meningokokken der Serogruppe B, siebenmal von Meningokokken anderer Serogruppen und sechsmal Träger von *N. lactamica* ist, wobei die ersten zehn Episoden als Träger im Durchschnitt bereits vor Vollendung des dreißigsten Lebensjahres ablaufen [23]. Eine Kolonisierung mit *N. lactamica* hat bei über 90 % der Sechsjährigen schon einmal stattgefunden, eine asymptomatische Besiedelung mit *N. meningitidis* bei 90 % der Achtzehnjährigen [23].

Nur in Ausnahmefällen kommt es in der Folge der Kolonisierung zur Erkrankung. Dennoch stellt die IME mit weltweit jährlich mindestens 1,2 Millionen Erkrankungsfällen, von denen rund 135.000 zum Tode führen, eine ernst zu nehmende Erkrankung dar [24].

Die bei Weitem höchste Inzidenz besteht im Bereich des „erweiterten afrikanischen Meningitisgürtels“, der sich südlich der Sahara vom Senegal bis nach Äthiopien erstreckt und 26 Staaten umfasst [25]. Das Muster, mit dem die Erkrankung in dieser Region auftritt, ist in mehrfacher Hinsicht weltweit einzigartig. Neben einer vergleichsweise hohen Inzidenz endemisch auftretender Erkrankungen, treten dort in unregelmäßigen Abständen von etwa sieben bis zehn Jahren ausgedehnte Epidemien auf, im Rahmen derer die Inzidenz in bestimmten Regionen 1000 Fälle/100.000 Einwohner übersteigen kann [26-28]. Die genauen Auslöser für das Auftreten dieser Epidemien sind nicht bekannt. Jedoch werden klimatische Ursachen vermutet, da die Epidemien ausschließlich während der Trockenzeiten (Dezember bis Ende Mai) auftreten und mit Beginn der Regenzeit enden [29]. Möglicherweise verändern die geringe Luftfeuchtigkeit und die hohe Konzentration an Staubpartikeln während dieser Trockenepisoden das Mikromilieu des Nasopharynxraumes und begünstigen damit die Passage des Erregers durch die epitheliale Barriere [29, 30]. Vor der Einführung des Serogruppe A-Konjugatimpfstoffs MenAfriVac® im Jahre 2010 wurden über 80 % der Epidemien im afrikanischen Meningitisgürtel durch Meningokokken der Serogruppe A verursacht [31], wie zuletzt 2009 mit rund 90.000 Fällen in Niger und Nigeria [32]. Bis Ende 2015 wurden über 237 Millionen Personen zwischen einem und 29 Jahren mit MenAfriVac® geimpft [33], was zu einem massiven Rückgang sowohl der Krankheitsfälle als auch der Trägerraten mit Meningokokken der Serogruppe A in den betreffenden Regionen führte [34, 35]. Epidemien mit Meningokokken der Serogruppe A sind dort seither nicht mehr vorgekommen, doch auch weiterhin treten schwere Ausbrüche im Bereich des Meningitisgürtels auf, die nun vorrangig durch die Serogruppen C und W verursacht werden [25, 36].

In anderen Teilen der Welt sind die jährlichen Fallzahlen der IME weitaus geringer. So liegt die jährliche Inzidenz in Europa, Nordamerika und Australien bei 0,3-3,0 Fällen/100.000 Einwohner, wobei die meisten Erkrankungsfälle durch die Serogruppen B und C verursacht werden [24, 29]. An dritthäufigster Stelle stehen in Europa Erkrankungen durch Serogruppe Y, jedoch haben diese insbesondere in Nordeuropa deutlich zugenommen und machten in Schweden

im Jahr 2012 sogar 49 % der Krankheitsfälle aus [37]. Erkrankungen durch Meningokokken der Serogruppe X, gegen die gegenwärtig kein Impfstoff zur Verfügung steht, treten in den Industriestaaten nur selten auf, nehmen jedoch in Subsahara-Afrika zu [38, 39]. Die Serogruppe W verursacht die meisten Erkrankungen in Chile und Argentinien sowie in Südafrika, Mosambik und Saudi Arabien [36], hat allerdings im Jahr 2000 auch in Großbritannien und Frankreich Ausbrüche verursacht, die im Zusammenhang mit Pilgerfahrten nach Mekka im Rahmen des Haddsch standen [40].

In Deutschland wurden im Zeitraum 2012 bis 2015 insgesamt 1294 Erkrankungsfälle und 122 Todesfälle durch Meningokokken gemeldet, womit sich eine jährliche Inzidenz von 0,40 Fällen/100.000 Einwohner und eine Gesamtletalität von 9,6 % ergaben [41]. Die meisten Fälle wurden durch Stämme der Serogruppe B verursacht (68,9 %), gefolgt von Serogruppe C (19,7 %) und am häufigsten waren Kinder unter fünf Jahren betroffen (29,9 % der Fälle) [41]. Bei über 10 % der Überlebenden wurden bleibende Beeinträchtigungen wie Hörverlust, andere neurologische Defizite oder Extremitätenamputationen berichtet [42]. Die Erkrankung ist in Deutschland seit 2001 meldepflichtig [43] und für alle Kinder ab zwölf Monaten wird seit 2006 die Impfung mit einem gegen Meningokokken der Serogruppe C gerichteten Konjugatimpfstoff empfohlen [44]. Die Gesamtinzidenz ist in Deutschland seit 2003 rückläufig, was insbesondere auf niedriger werdende Fallzahlen bei Kindern und Jugendlichen zurückzuführen ist [41, 45]. Auch aus diesem Grund empfiehlt die Ständige Impfkommission (STIKO) bislang keine routinemäßige Impfung mit dem neuerdings zugelassenen Multikomponentenimpfstoff gegen Meningokokken der Serogruppe B [42]. Diese wird gegenwärtig nur empfohlen für Personen mit einem erhöhten Risiko an IME zu erkranken, etwa durch Komplementdefekte, Hypogammaglobulinämien, Einschränkungen der B- und T-zellulären Funktion oder Asplenie [46].

Da Übertragungen von *N. meningitidis* im Wesentlichen von asymptomatischen Trägern ausgehen, muss eine Impfung auch die Trägerraten effektiv reduzieren, um eine Herdenimmunität erzeugen zu können [47]. Ein besseres Verständnis über die Physiologie und Pathophysiologie des Trägertums könnte daher in

Zukunft insbesondere für die Prävention der durch Meningokokken verursachten Erkrankungen wertvoll sein.

1.2 Pathophysiologie des Trägerstatus

Die Übertragung von *N. meningitidis* ist nur von Mensch zu Mensch möglich und geschieht über direkten Kontakt mit Speichel oder durch Inhalation keimhaltiger Tröpfchen [19]. Die kritische Infektionsdosis ist bislang nicht bekannt. Vermutlich schützt die stark hydratisierte Polysaccharidkapsel das Bakterium während der Übertragung vor dem Austrocknen an der Luft [48, 49].

Beim Kontakt des Erregers mit epithelialen Zellen kommt es zur Adhäsion, die zunächst durch Typ-IV-Pili vermittelt wird [50-52]. Diese fadenförmigen, zum Teil einige Mikrometer langen, dynamischen Heteromultimere überragen die Kapsel, und sind neben der Adhäsion auch am DNA-Austausch durch Transformation, der Bewegung an der Oberfläche durch „twitching motility“ und an der Aggregation von Bakterien mit der Bildung von Mikrokolonien beteiligt [53-56]. Der entscheidende Rezeptor epithelialer Zellen für Pili ist nicht bekannt und wird kontrovers diskutiert. Eine Bindung an CD46 konnte in der Vergangenheit gezeigt werden [57], jedoch ist die Relevanz dieses Effektes umstritten, da die Interaktion von Pili mit der Zielzelle auch unabhängig von CD46 nachgewiesen werden konnte und die Effektivität der Adhäsion nicht mit der Quantität der CD46-Expression korreliert [58]. Ein weiterer möglicher Rezeptor, der die Bindung von Typ-IV-Pili an Epithelzellen vermitteln könnte, ist der Platelet activating Factor Receptor (PAFr) [59]. Im Verlauf wird die Adhäsion durch die Bindung weiterer bakterieller Oberflächenproteine an Rezeptoren der Epithelzelle intensiviert, wobei die „Major-Adhäsine“ Opa und Opc eine wichtige Rolle spielen. Opa-Proteine binden an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) [60] und an Rezeptoren der CEACAM-Familie [61], die ubiquitär vorkommen und während einer Entzündungsreaktion sogar verstärkt exprimiert werden [62]. Opc bindet ebenfalls auf Epithelzellen befindliche HSPG [63], wodurch neben einer verstärkten Adhäsion auch die Invasion in die Zielzelle durch Endozytose initiiert

wird [64]. Erleichtert wird die Bindung von Opa und Opc durch die Herunterregulation der Kapsel [65], die sonst durch ihre negative Ladung die Aktivität subkapsulär gelegener Außenmembranproteine hemmt [66]. Auch für eine Reihe weiterer, sogenannter „Minor-Adhäsine“ konnten wichtige Funktionen bei der Adhäsion und der Kolonisierung nachgewiesen werden, wie etwa für TspA (T-cell stimulating protein A) [67], NhhA (*Neisseria hia/hsf* homologue A) [68], App (Adhesion and penetration protein) [69], NadA (*Neisseria adhesin A*) [70] und für das Zweipartner-Sekretionssystem HrpA-HrpB [71].

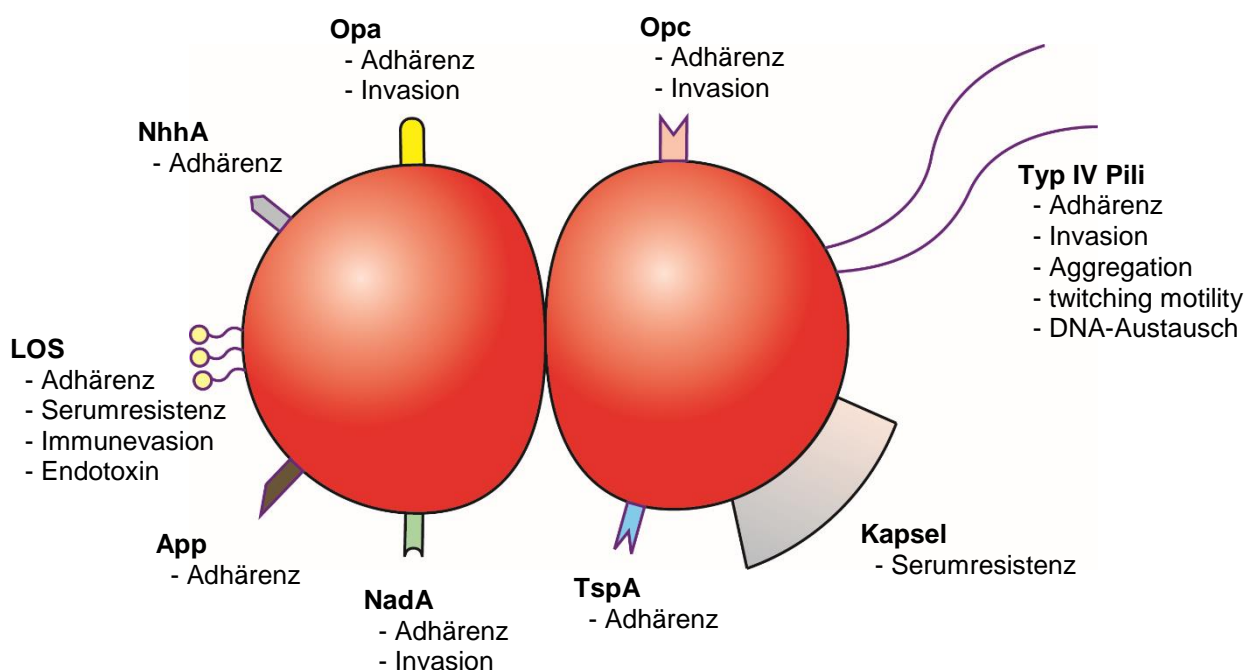


Abb. 1.1: Die wichtigsten Adhäsine von *N. meningitidis*. Auswahl relevanter Adhäsine und deren wichtigste Funktionen.

Durch Adhäsion am Epithel, Aggregation von Bakterien und die Sekretion einer Matrix aus DNA, Polysacchariden und Lipiden sind Meningokokken in der Lage, einen Biofilm zu bilden [72, 73]. Dieser ist *in vitro* gut untersucht und könnte auch *in vivo* eine dauerhafte Kolonisierung durch Abschirmung gegen das Immunsystem und gegen mechanische Clearance-Mechanismen begünstigen. Darüber hinaus entzieht sich *N. meningitidis* während der Kolonisierung der Immunabwehr des Wirtes durch Phasen- und Antigenvariation zahlreicher

Oberflächenproteine [74], Modifikationen der Lipooligosaccharide [75], Invasion in die Epithelzellen, Abschnürung von Außenmembranvesikeln sowie durch Sekretion von IgA-Proteasen [76], der NO-Reduktase NorB [77] und des Faktor H bindenden Proteins (fHbp), das neben Komplementfaktoren auch im Speichel befindliche antimikrobielle Peptide in ihrer Aktion hemmt [78].

Auch bezüglich der Nährstoffversorgung ist *N. meningitidis* an das Mikromilieu des pharyngealen Epithels gut adaptiert. Als organische Energiequellen dienen in Sekreten des Respirationstraktes vorhandene Glukose und Laktat, wobei insbesondere Laktat für eine erfolgreiche Besiedelung essenziell ist [79]. Die wesentliche Eisenquelle ist während der Kolonisation an Lactoferrin gebundenes Eisen, welches *N. meningitidis* durch Expression eines Lactoferrin bindenden Proteins (LbpA/B) aufnimmt, doch auch an Hämoglobin und an Transferrin gebundenes Eisen kann mithilfe entsprechender Rezeptoren verwertet werden [80].

Longitudinale Studien ergaben, dass der so erworbene Trägerstatus in der Regel mindestens fünf Monate andauert [81] und selbst ein immunisierender Prozess ist, in dessen Folge Antikörper auf Schleimhäuten und im Serum nachweisbar werden, die eine protektive Wirkung gegen die Erkrankung durch Meningokokken haben [82, 83]. Auch die Kolonisation durch die verwandte, nicht humanpathogene Art *N. lactamica* induziert sekretorische IgA und systemische IgG Antikörper, die gegen *N. meningitidis* kreuzreaktiv sind und protektiv wirken [84, 85]. Umgekehrt senkt die Immunisierung durch einen Konjugatimpfstoff auch die Trägerraten durch *N. meningitidis*, wodurch bei flächendeckender Impfung eine Herdenimmunität erreicht werden kann [86, 87]. Eine Besiedelung durch *N. meningitidis* führt zwar nur in seltenen Fällen auch zur invasiven Erkrankung, geht dieser jedoch in jedem Fall voraus. Ein besseres Verständnis der Anpassungsvorgänge während des Trägertums sowohl auf der Seite des Pathogens, als auch auf der Seite des Trägers wird daher in Zukunft auch das Verständnis der Pathogenese der invasiven Erkrankung verbessern.

1.3 Pathogenese der invasiven Meningokokkenerkrankung (IME)

Die IME kann entstehen, wenn Meningokokken die Epithelbarriere des Pharynx durchbrechen, in das Blutgefäßsystem eindringen und in der Lage sind, sich dort zu vermehren. Voraussetzung hierfür ist, dass der pathogene Meningokokkenstamm im Blut befindliche essenzielle Nährstoffe aufnehmen kann und den im Blut aktiven Effektoren des Immunsystems widersteht [88].

Die genauen Mechanismen, die das Überschreiten des Pharynxepithels ermöglichen, sind noch nicht hinreichend erforscht und in der Vergangenheit weniger intensiv untersucht worden, als die Interaktion des Erregers mit Endothelzellen. Vermutet wird, dass die Passage des Epithels rein transzellulär und nicht parazellulär abläuft, da verschiedene Arbeiten übereinstimmend ergeben haben, dass Meningokokken nach Infektion epithelialer Zellen in intrazellulären Vakuolen nachweisbar werden und dass die Integrität des Epithelverbandes inklusive der interzellulären Haftkomplexe durch die Infektion nicht beeinträchtigt wird [89-91]. Auch die Möglichkeit, dass Meningokokken an der Oberfläche des Epithels durch Phagozyten aufgenommen werden, intrazellulär überleben und nach der Rückkehr der phagozytierenden Zelle in das subepitheliale Gewebe wieder freigesetzt werden, wird als sogenannter „Mechanismus des Trojanischen Pferdes“ diskutiert [92].

Im Blut wird das Überleben des Erregers durch eine Vielzahl von Mechanismen zur Umgehung des Immunsystems ermöglicht, wobei die Hemmung des Komplementsystems am besten untersucht ist und besonders wichtig erscheint. Der wohl bedeutendste Pathogenitätsfaktor ist die Polysaccharidkapsel, die die Phagozytose und die Lyse durch Komplementfaktoren verhindert und für das Überleben im Blut essenziell ist [93]. Daneben bestehen weitere, zum Teil redundant angelegte bakterielle Faktoren, die mit dem Komplementsystem interferieren und Serumresistenz vermitteln, wie etwa das Faktor H bindende Protein (fHbp) [78], das Neisserial Surface Protein A (NspA) [94], das Neisseria Autotransporter Lipoprotein (NalP) [95] und das Porin PorA [96]. Die Expression der Kapsel und weiterer für das Umgehen der Immunantwort wichtiger Faktoren wird vermutlich durch die geänderten Umgebungsbedingungen nach dem Eintritt

in das Blut gefördert. So wurde gezeigt, dass die Kapsel und das fHbp durch einen Anstieg der Temperatur auf 37 °C, wie sie im Blut, aber nicht auf dem Pharynxepithel vorliegt, vermehrt exprimiert werden [97]. Auch die Haupteisenquelle beeinflusst das Transkriptom von *N. meningitidis*. So wurde gezeigt, dass mit Hämoglobin als wesentlicher Eisenquelle, wie dies im Blut der Fall ist, die Expression der Kapsel und einiger Faktoren zur Hemmung des Komplementsystems verstärkt und somit die Serumresistenz erhöht wird [98].

Nach dem Eintritt in das Blut ist *N. meningitidis* in der Lage, mittels Typ-IV-Pili am Endothel jedes Organs inklusive des zentralen Nervensystems zu adhären und Mikrokolonien zu bilden, indem eine zunächst kleine Zahl adhärenter Bakterien proliferiert und Aggregate bildet [99]. Diese vaskuläre Kolonisierung spielt sich vorrangig in Kapillaren ab, da dort ein langsamer Blutstrom vorliegt [100]. In relativ kurzer Zeit kann dies zu einer starken Vermehrung von Bakterien und zur septischen Streuung führen. Als Rezeptor für die Adhäsion durch Typ-IV-Pili an Endothelzellen verschiedener Gewebe konnte in neuen Untersuchungen das Oberflächenprotein CD147 identifiziert werden [101]. CD147 könnte möglicherweise auch ein relevanter Pilusrezeptor auf Epithelzellen sein, da viele Epithelien CD147 exprimieren und es im Pharynxbereich auch als Rezeptor für einige respiratorische Viren dient [102]. Daten hierzu liegen aber derzeit noch nicht vor. Ebenfalls nicht vollständig bekannt ist, inwieweit Opa-Proteine durch Bindung an CEACAM-Moleküle die Adhäsion am Endothel verstärken können. Gut untersucht ist dagegen die Rolle von Opc bei der Interaktion mit dem Endothel. Opc kann an die Serumproteine Vitronektin [103] und Fibronektin [104] binden, wodurch über den Kontakt mit Vitronektin-Rezeptoren (Integrin $\alpha V\beta 3$) und Fibronektin-Rezeptoren (Integrin $\alpha 5\beta 1$) der Endothelzellen einerseits die Adhäsion verstärkt wird, andererseits verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden zur Einleitung der Invasion aktiviert werden [103, 104].

Durch die Adhäsion verändert sich auch die Oberfläche der Endothelzelle: Die der Bakterienkolonie gegenüberliegende Seite der Zellmembran reichert β_2 -Adrenozeptoren an, die durch allosterische Bindung der Pilusproteine PilE und

PilV den β -Arrestin-Signalweg in der Endothelzelle aktivieren, ohne dass die sonst übliche G_{α_s} -Protein gekoppelte Aktivierung der Adenylatcyclase eintritt [105]. In der Folge werden Membranproteine wie etwa CD44, ICAM-1 und die Aktin-bindenden Proteine der Ezrin-Radixin-Moesin- (ERM-) Familie in sogenannten „kortikalen Plaques“ der Zellmembran konzentriert [106], was die Ausbildung Mikrovilli-ähnlicher Zellmembranprotrusionen bewirkt [107]. In diese werden die Bakterienaggregate förmlich eingebettet und dadurch vor den mechanischen Kräften des Blutstroms geschützt [108]. Einerseits fördern diese Protrusionen die Endozytose der bekapselten Meningokokken, andererseits bewirkt die Anordnung der „kortikalen Plaques“ die Delokalisation und/oder Zerstörung verschiedener Komponenten des Zell-Zell-Kontakts, wie etwa des Polaritätskomplexes Par3/Par6/PKC ζ [109], Occludin [110], verschiedener Claudine und p120-Catenin [111]. Dies deutet darauf hin, dass die Passage durch das Endothel, anders als beim Epithel, sowohl transzellulär als auch parazellulär abläuft, was sowohl an Endothelzellen des zentralen Nervensystems, als auch an Endothelzellen peripherer Gewebe gezeigt wurde [91]. Das Krankheitsbild der bakteriellen Meningitis kann auftreten, wenn Meningokokken auf diesem Weg durch das Kapillarendothel von Blutgefäßen der Leptomeningen, des Plexus choroideus oder intrazerebral gelegener Kapillaren treten und somit die Blut-Hirn-Schranke passieren [111]. Doch auch die typischen hämorrhagischen Läsionen der Haut und einiger innerer Organe entstehen vermutlich durch die vaskuläre Kolonisierung und die nachfolgende stellenweise Auflösung des Endothelverbandes [112]. Eine thrombotische Gefäßverlegung kann die Folge sein und zu ischämischen Infarkten betroffener Hautareale oder im schlimmsten Fall ganzer Extremitäten führen.

Der sehr großen Anzahl gesunder Personen, deren oberer Respirationstrakt asymptomatisch mit *N. meningitidis* besiedelt ist, steht eine sehr kleine Zahl an Personen gegenüber, die tatsächlich an der IME erkranken. Es ist daher von besonderem Interesse, die Bedingungen in Erfahrung zu bringen, die sowohl durch den Bakterienstamm, als auf Seiten des Wirtes erfüllt werden müssen, damit die IME entstehen kann. Obwohl Unterschiede zwischen Trägerstämmen

aus Rachenabstrichen und krankheitsverursachenden Isolaten aus Blut oder Liquor von Patienten intensiv untersucht werden, konnte bislang kein Virulenzfaktor identifiziert werden, der allein für die Entwicklung der IME verantwortlich ist. Praktisch alle Fälle von IME werden von bekapselten Stämmen verursacht [81], die mehrheitlich bestimmten, sogenannten hypervirulenten klonalen Komplexen angehören, wie etwa dem ST-11 cc, dem ST-32 cc oder dem ST 41/42 cc [13]. Isolate, die aus Rachenabstrichen asymptomatischer Träger gewonnen werden, zeichnen sich dagegen durch eine sehr viel größere Diversität aus und tragen häufig keine Kapsel [81, 113]. Trotz dieser Unterschiede konnte der Vergleich kompletter Genome mehrerer pathogener und lediglich kolonisierender Stämme kein „Pathogenom“ zeigen, das die pathogenen Isolate direkt von den Trägerstämmen unterscheidet [114]. Daher ist zu vermuten, dass für die Entstehung der IME ein komplexes Zusammenspiel verschiedener, insbesondere auch metabolischer Regulationsprozesse bedeutsam ist, das es dem Pathogen ermöglicht, in so unterschiedlichen Kompartimenten wie dem Pharynxepithel, dem Blut und dem Liquor cerebrospinalis intrazellulär und extrazellulär zu überleben und sich zu vermehren [115].

Auch auf der Seite des Wirtes sind Faktoren bekannt, die die Wahrscheinlichkeit erhöhen, an einer Sepsis oder Meningitis durch *N. meningitidis* zu erkranken oder die einen Einfluss auf die Schwere der Erkrankung haben. Hierzu gehören die Asplenie [116], systemische Defekte der Immunabwehr wie angeborene Komplementdefekte [117, 118], bestimmte Polymorphismen in Genen für Zytokine [119] und in Genen für Toll-like Rezeptoren [120], aber auch lokale Schädigungen oder entzündliche Veränderungen des Pharynxepithels wie die vorausgehende Infektion mit viralen Erregern [121] oder die aktive oder passive Exposition gegenüber Zigarettenrauch [121, 122].

1.4 Klinik der Meningokokkeninfektion

Obwohl die Übertragung von *N. meningitidis* durch eine Infektion der oberen Atemwege erfolgt, ist die Entstehung einer Pharyngitis relativ selten. In den allermeisten Fällen verursacht die Kolonisierung des Rachenraums keine Symptome und wird entsprechend nicht bemerkt. Biologisch betrachtet kann dieser asymptomatische Trägerstatus als „Normalfall der Meningokokkeninfektion“ angesehen werden und die vergleichsweise seltene IME eher als eine für Wirt und Erreger unglückliche Komplikation des Trägertums, die durch eine bestimmte Konstellation von Adaptationsprozessen des Mikroorganismus möglich wird [123].

Kommt es zur IME, so entsteht diese in der Regel innerhalb der ersten vierzehn Tage nach Aufnahme des verursachenden Meningokokkenstammes. Nur selten geht eine längere Kolonisierung voraus [124]. Die Schwere der Krankheit kann variieren und reicht von der selbstlimitierenden Bakteriämie bis hin zu dramatischen septischen Verläufen, bei denen der Tod wenige Stunden nach Auftreten der ersten Symptome eintreten kann [124].

Die häufigsten durch *N. meningitidis* verursachten Krankheitsbilder sind die Sepsis und die Meningitis. 53,8 % der in den letzten Jahren in Deutschland gemeldeten Fälle entwickelten eine Sepsis. Bei 26,3 % dieser Patienten trat zusätzlich eine Meningitis auf. Bei 45,9 % der gemeldeten Fälle trat eine Meningitis auf, ohne dass die Kriterien einer Sepsis erfüllt waren [41].

Klinisch präsentieren sich die Patienten in den ersten Stunden nach Manifestation der Erkrankung zunächst meist mit unspezifischen Allgemeinsymptomen wie Fieber, Kopfschmerzen und Arthralgien, die leicht als harmloserer viraler Infekt fehlgedeutet werden können [125]. Spezifischere Anzeichen der Erkrankung entwickeln sich im Verlauf. Ist das Krankheitsbild der Meningitis führend, sind Fieber mit Kopfschmerzen, Erbrechen, Photophobie und Nackensteife die typischen Symptome [126]. Bei Säuglingen und Kleinkindern, die von der Erkrankung mit am häufigsten betroffen sind, manifestiert sich die Meningitis jedoch meist ohne diese klassischen Meningitiszeichen und es dominieren weniger richtungsweisende klinische Befunde, wie Appetitlosigkeit,

Lethargie und ungewöhnliche Reizbarkeit [2]. Eine gefürchtete Komplikation ist der Anstieg des intrakraniellen Drucks [127].

Führt die Sepsis, so sind die Symptome zu Beginn ebenfalls eher unspezifisch. Ein verändertes Hautkolorit und kühle, diffus schmerzhaft untere Extremitäten können als erste Alarmzeichen eines schweren Verlaufs mit Kreislaufzentralisation und peripherer Mikrozirkulationsstörung auffallen. Im späteren Verlauf kann es zum Blutdruckabfall, Delir und der Entstehung eines septischen Schocks mit Multiorganversagen kommen [128]. Ein Kardinalsymptom der Meningokokkämie ist die Entwicklung eines nicht wegdrückbaren, petechialen Hautausschlags, der in 40 bis 72 % der Fälle vorkommt und meist die unteren Extremitäten betrifft, aber auch auf Schleimhäuten und Skleren vorhanden sein kann [128]. Trotz der diagnostischen Wichtigkeit dieses Symptoms sind jedoch die wenigsten Kinder, die sich mit Petechien und Fieber präsentieren, tatsächlich an IME erkrankt. Meist sind es andere, häufigere Differenzialdiagnosen wie etwa Infektionen mit Adenoviren oder Enteroviren, die zu den Symptomen geführt haben [129, 130]. Das Vollbild der Meningokokkensepsis bilden die Purpura fulminans mit septischem Schock, Purpura mit flächigeren hämorrhagischen Hautläsionen und disseminierter intravasaler Gerinnung, sowie das Waterhouse-Friderichsen-Syndrom mit Einblutungen in die Nebennieren. Beide sind mit einer hohen Letalität behaftet [131].

Neben diesen häufigsten Manifestationsformen der IME, können Meningokokken in selteneren Fällen auch Pneumonien verursachen. Diese betreffen mehrheitlich ältere Erwachsene, werden gehäuft durch Stämme der Serogruppe Y verursacht, und haben eine deutlich bessere Prognose, als die Meningokokkensepsis oder -meningitis [132].

Weitere Krankheitsbilder, die seltener durch Meningokokken verursacht werden können, sind die pyogene Arthritis und Osteomyelitis, Peritonitis, Konjunktivitis, Endophthalmitis und die eitrige Perikarditis [30].

Auch chronische Meningokokkämien wurden beschrieben, bei denen es zu rezidivierenden Phasen mit Fieber, Purpura und wandernden Arthralgien kommt, zwischen denen symptomfreie Intervalle liegen [133, 134].

Insgesamt bleiben bei 7 bis 20 % der Personen, die eine IME überlebt haben, dauerhafte Schäden zurück [124, 135]. Nach einer Meningitis gehören zu den häufigsten Langzeitfolgen Gehörverlust, andere Hirnnervenausfälle, kognitive Einschränkungen und psychische Veränderungen. Nach einer Meningokokkensepsis können Extremitätenamputationen, chronische Schmerzsyndrome und Narben durch Hautnekrosen zur dauerhaften Behinderung führen [124, 135].

1.5 Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen

Der Begriff Zellzyklus beschreibt den Prozess der Bildung zweier Tochterzellen aus einer Ursprungszelle. Dieser Vorgang erfordert das geordnete Durchlaufen verschiedener Stadien, die zeitlich strikt voneinander getrennt sind und deren korrekte Abfolge durch ein komplexes Netzwerk von Regulationsmechanismen gesteuert wird. Unterteilt wird der Zellzyklus in die Mitosephase (M-Phase), in der der doppelt angelegte Chromosomensatz getrennt und auf zwei neu entstehende Tochterzellen verteilt wird, und in die Interphase, in der die Vorbereitungen auf die nächste M-Phase getroffen werden oder in der die Zelle verbleibt, wenn keine weitere Zellteilung erfolgt. Die Interphase bestimmt die Dauer des Zellzyklus, die je nach Zelltyp und Umgebungsbedingungen variabel ausfallen kann. Sie lässt sich weiter unterteilen in die Gap-1-Phase (G₁-Phase), die unmittelbar auf die M-Phase folgt, die Synthese-Phase (S-Phase) und die anschließende Gap-2-Phase (G₂-Phase), nach der schließlich wieder die M-Phase eingeleitet wird [136, 137]. Jede Zellzyklusphase hat spezifische Funktionen und wird auf eine bestimmte Weise biochemisch reguliert, wobei an verschiedenen Kontrollpunkten („Checkpoints“) geprüft wird, ob die Voraussetzungen erfüllt sind, um erfolgreich in die nächste Phase des Zellzyklus einzutreten.

Die Funktion der G₁-Phase besteht in der Vorbereitung auf die nachfolgende S-Phase durch Zellwachstum, Neubildung von Zellorganellen und Synthese von Nukleotiden und Enzymen für die spätere DNA-Replikation [138]. Daneben entscheidet sich im Laufe der späteren G₁-Phase, am G₁-Kontroll- oder

Restriktionspunkt, ob die Zelle überhaupt in eine weitere Runde des Zellzyklus eintritt, oder ob sie sich in ein Ruhestadium ohne weitere Zellteilungen begibt (G_0 -Phase) [139]. Ob der Restriktionspunkt überschritten wird, ist wesentlich von extrazellulären Faktoren abhängig, wie etwa der Verfügbarkeit ausreichender Mengen an Nährstoffen, der Populationsdichte des Zellverbandes, der Aktion von mitogenen Wachstumsfaktoren sowie der Abwesenheit antiproliferativer Signale [140]. Zudem wird geprüft, ob die zelluläre DNA frei von Schäden ist. Sind die Voraussetzungen erfüllt und wird der G_1 -Restriktionspunkt passiert, ist ein Austritt aus dem Zellzyklus nicht mehr möglich und eine weitere Runde bis zum nächsten G_1 -Restriktionspunkt muss vollendet werden.

In der nachfolgenden S-Phase findet die DNA-Replikation statt. Sie dauert etwa sechs bis acht Stunden an und endet, wenn jedes Chromosom vollständig verdoppelt aus zwei Schwesterchromatiden besteht.

Hieran schließt sich die G_2 -Phase an, die der Vorbereitung auf die Mitose dient. In dieser Phase werden Proteine und RNA für den Vorgang der Zellteilung synthetisiert und die neu replizierte DNA auf Vollständigkeit und intakte Beschaffenheit überprüft. Falls die DNA Schäden aufweist, kann der Zellzyklus in der G_2 -Phase, am sogenannten G_2 -Kontrollpunkt, arretiert werden, wodurch Zeit für die DNA-Reparatur zur Verfügung steht. Ist eine DNA-Reparatur nicht möglich, wird durch die Aktivierung von Caspasen die Apoptose eingeleitet.

Wird auch dieser Kontrollpunkt überschritten, beginnt die Mitose, die nur etwa 30 Minuten bis eine Stunde dauert und sich in weitere untergeordnete Phasen, die Prophase, die Metaphase, die Anaphase und die Telophase, untergliedern lässt [138]. In der Prophase verdichtet sich das Chromatin und wird lichtmikroskopisch sichtbar. Die Kernmembran löst sich auf und die Mikrotubuli des Spindelapparates formieren sich, ausgehend von den Zentriolen. In der Metaphase hat bereits die Anheftung des Mitosespindelapparats an die Kinetochore der Chromosomen stattgefunden und die Chromosomen liegen aufgespannt im Zentrum der Zelle („Metaphaseplatte“). Dieser Phase kommt eine besonders wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation zu, da am sogenannten Metaphasen-Kontrollpunkt erneut die Möglichkeit besteht, den Zellzyklus anzuhalten [141]. An diesem Punkt wird überprüft, ob jedes Kinetochor

vollständig an die Mikrotubuli der Mitosespindel gebunden hat. Eine zu frühzeitige Aufteilung der Chromosomen hätte eine ungleiche Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen zur Folge, was gravierende Folgen für die Tochterzellen und möglicherweise den gesamten Organismus haben könnte. In der anschließenden Anaphase trennen sich die Schwesterchromatiden und wandern an die gegenüberliegenden Pole der Zelle. In der Telophase stehen sich die nun aus nur noch einem Chromatid bestehenden Chromosomen an den Zellpolen gegenüber. Der Spindelapparat löst sich auf und es entstehen neue Kernmembranen um die beiden getrennten Chromosomensätze. In der Zellmembran bildet sich ein kontraktiler Ring aus, der schließlich auch die Aufteilung des Zytoplasmas auf zwei Tochterzellen bewirkt (Zytokinese) [138].

Die korrekte und zeitgerechte Abfolge dieser Vorgänge wird durch ein hochkomplexes „biochemisches Uhrwerk“ gesteuert, dessen wichtigste Effektoren die Cyclin-abhängigen Kinasen (engl. cyclin-dependent-kinases, CDKs), sowie deren regulatorischen Untereinheiten, die Cycline, sind.

Erste Erkenntnisse über Gene, die für das Durchlaufen des Zellzyklus essenziell sind, wurden in den 1970er Jahren durch Experimente mit Hefen gewonnen. Diese Gene bzw. deren Produkte wurden zunächst Cdc2 (cell division cycle) in *Schizosaccharomyces pombe* und Cdc28 in *Saccharomyces cerevisiae* benannt [142, 143] und später auch analog in humanen Zellen beschrieben [144]. Unabhängig davon wurden 1983 in Eizellen von Seeigeln Proteine beschrieben, die innerhalb eines jeden Teilungszyklus vollständig degradiert und im Verlauf wieder neu nachweisbar wurden und somit als Cycline benannt wurden [145]. 1989 gelang schließlich in mehreren Spezies der Nachweis einer Komplexbildung zwischen Cdc2 und den Cyclinen A und B, wobei das Cyclin als aktivierende regulatorische Untereinheit dient, nach deren Bindung Cdc2 seine Serin-Threonin-Kinase-Aktivität entfalten und den Übergang der betreffenden Zelle in die M-Phase einleiten kann. Es folgte die Beschreibung weiterer Cycline sowie weiterer durch sie aktivierter Kinasen und schließlich 1991 die Einführung einer neuen Nomenklatur zur systematischeren Beschreibung, wobei der Begriff „CDK“ eingeführt und unter anderem Cdc2 in CDK1 umbenannt wurde [146]. Inzwischen sind in humanen Zellen 29 Cycline und 20 zur Familie der CDKs

gehörende Serin-Threonin-Kinasen beschrieben [147], die jedoch noch nicht alle in ihrer genauen Funktion bekannt sind und mit Sicherheit auch weitreichende Aufgaben außerhalb der Zellzyklusregulation haben [148]. Die Konzentrationen der Cycline oszillieren dabei ständig durch transkriptionelle Regulation und kontrollierten Abbau im Proteasom [149] wodurch in jeder Zellzyklusphase ein unterschiedliches, typisches Muster an Cyclin-CDK-Komplexen vorherrscht.

Während der G₁-Phase kommt es zu ansteigenden Konzentrationen der sogenannten D-Typ-Cycline (Cyclin D1, D2 und D3). Sie gelten als die wichtigsten Sensoren extrazellulärer zellzyklusrelevanter Signale, da ihre Expression durch die Aktivität von Wachstumsfaktoren und die nachfolgende Aktivierung der RAS-abhängigen MAP-Kinase-Kaskade induziert wird [140]. Durch eine Komplexbildung mit CDK4 oder CDK6 können sie diese in einen aktivierten Zustand überführen und in den Zellkern translozieren, was zunächst zu einer Monophosphorylierung und partiellen Inaktivierung des Tumorsuppressorproteins RB (Retinoblastom-Protein) führt [150, 151]. Beim Austritt aus der Mitose liegt RB in einer dephosphorylierten (aktiven) Form vor, in der es einerseits die Histon-Deacetylase (HDAC), andererseits Transkriptionfaktoren E2F-Familie bindet und inaktiviert. Wird RB phosphoryliert, erfolgt die Freisetzung von E2F-1 und hierdurch die Transkription von Genen, die für spätere S-Phase erforderlich sind, wie etwa Cyclin E, Cdc25A, Dihydrofolat-Reduktase, Thymidinkinase, die Initiationsfaktoren MCM2-7 und Cdc6 sowie verschiedene DNA-Polymerasen [152]. Durch die Expression von Cyclin E in der späten G₁-Phase wird schließlich die S-Phase einleitet: Cyclin E dimerisiert mit der CDK2, was zu einer Hyperphosphorylierung von RB an weiteren (insgesamt 14) Aminosäureresten führt [153]. Im hyperphosphorylierten Zustand ist RB vollständig inaktiviert und es kommt zur verstärkten Expression der Target-Gene von E2F-1. Da E2F-1 somit über Cyclin E seine eigene Freisetzung bewirkt, handelt es sich um einen positiven Feedback-Mechanismus, der sich, einmal angestoßen, selbst verstärkt bis schließlich die Initiation der DNA-Replikation einsetzt [149]. Auf der anderen Seite kann die Aktivität der CDK4 und CDK6 auch durch negative Feedback-Mechanismen gezügelt werden. Beispielsweise wird durch starke onkogene Stimuli die Expression des Zellzyklusinhibitors p16^{INK4a}

gesteigert, welcher selektiv an die CDKs 4 und 6 bindet, die Interaktion mit den D-Typ-Cyclinen verhindert und somit einen G₁-Phasen-Arrest induzieren kann [154]. Diese konkurrierenden positiven und negativen Feedback-Loops bilden das biochemische Korrelat des G₁-Restriktionspunkts: Wird er überschritten und überwiegt das positive Feedback durch Cyclin E, unterhält sich die weitere Aktivierung von E2F-1 selbst und verstärkt sich unabhängig von äußeren Faktoren, bis die DNA-Replikation und somit die S-Phase eingeleitet wird. Weitere für die Progression in die S-Phase wichtige Substrate des Cyclin E-CDK2-Komplexes sind neben RB auch Smad3 [155], p220 (NPAT) [156], Nucleophosmin [155] sowie CP110, welches an der Zentriolenverdopplung beteiligt ist [157].

Während der S-Phase kommt es zur Akkumulation von Cyclin A, welches ebenfalls an die CDK2 bindet. Hierdurch werden unter anderem Cdc6, RPA (Replication protein A), PCNA (proliferating cell nuclear antigen) sowie die DNA-Polymerasen α und δ phosphoryliert [158] und damit die Elongation der DNA-Replikation und das Durchschreiten der S-Phase vorangetrieben.

Die anschließende G₂-Phase wird zunächst durch den Komplex aus Cyclin A und der CDK1 reguliert. Dieser phosphoryliert und aktiviert unter anderem den Transkriptionsfaktor FoxM2, der hierauf einen Komplex mit dem Koaktivator CREB-binding protein (CBP) bildet. Hierdurch wird wiederum die Transkription einer ganzen Reihe von Genen aktiviert, deren Produkte für die Einleitung und Durchführung der nachfolgenden Mitose erforderlich sind, wie etwa Cyclin B, Aurora B, PLK-1 und viele weitere [159]. In der späten G₂-Phase steigt schließlich die Konzentration von Cyclin B massiv an, welches ebenfalls einen Komplex mit der CDK1 bildet. Der Cyclin B-CDK1-Komplex wird auch MPF (Mitosis promoting factor) genannt und phosphoryliert über 70 für die Mitose relevante Substrate, zu denen die Lamine der Kernlamina, verschiedene Bestandteile des Kernporenkomplexes, des Golgi-Apparats, der Zentrosomen, mikrotubuli-assoziierte Proteine (u.a. Dynein), Securin und die Separase gehören [160]. Ähnlich, wie schon beim Übergang in die S-Phase beschrieben, existieren auch hier konkurrierende negative und positive Feedback-Mechanismen. Beispielsweise hemmen die Kinasen Wee1 und Myt1 (myelin transcription factor

1) die CDK1 durch Phosphorylierungen in deren aktivem Zentrum [161]. Auf der anderen Seite bewirkt der aktivierte Cyclin B-CDK1-Komplex die Transkription der Phosphatase Cdc25C, die die CDK1 im aktiven Zentrum dephosphoryliert, den MPF weiter aktiviert und somit seine eigene Expression fördert [162]. Überwiegt die weitere Synthese von Cyclin B, tritt ab einem gewissen Punkt die sich selbst verstärkende Aktivierung des Cyclin B-CDK1-Komplexes ein und sukzessive die Depolymerisierung der Kernlamina, die Chromosomenkondensations- und -separation und die Vervollständigung der Mitose. Durch Aktivierung der Ubiquitinligasen SCF und APC/C (Anaphase promoting complex/Cyclosom) wird Cyclin B im Laufe der M-Phase zunehmend für den Abbau im Proteasom markiert und der MPF wieder deaktiviert [163]. Die Protein-Phosphatase Cdc14 hebt hierauf die Phosphorylierung einiger Substrate des MPF wieder auf, woraufhin diese die Funktion, die sie vor der Mitose ausgeübt haben, wieder aufnehmen und somit die Zytokinese einleiten [164].

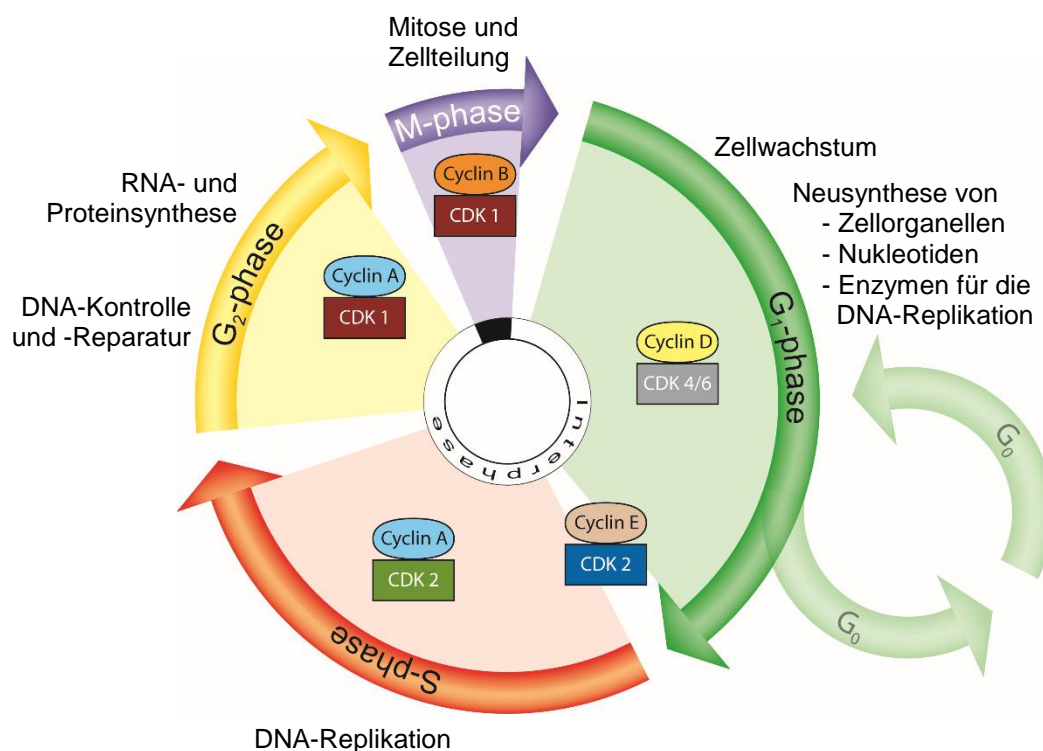


Abb. 1.2: Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen. Zellzyklusphasen mit den in der entsprechenden Phase relevanten Cyclin-CDK-Komplexen und den wichtigsten Funktionen der jeweiligen Zellzyklusphase.

Ein ebenfalls essenzieller Bestandteil der Regulation der CDK-Aktivität sind die CDK-Inhibitoren (CKI) der INK4-Familie und der Cip/Kip-Familie (CDK-interacting protein/kinase inhibitory protein), die den Zellzyklus an verschiedenen Stellen anhalten können. Das bereits erwähnte p16^{INK4} bindet spezifisch an die CDK 4 und 6 und wirkt somit nur in der G₁-Phase. Dagegen hemmen die CKI der Cip/Kip-Familie eine ganze Reihe von Cyclin-CDK-Komplexen in verschiedenen Zellzyklusphasen. p21^{WAF1/Cip1} (wild-type p53 activated factor/CDK interacting protein 1) kann die Komplexe Cyclin-CDK 1, -CDK2, -CDK4 und -CDK6 hemmen und damit einen Zellzyklusarrest sowohl in der G₁-Phase als auch in der G₂-Phase induzieren [165]. Zudem bindet und hemmt p21^{WAF1/Cip1} den Transkriptionsfaktor E2F-1 [166], das in die DNA-Replikation involvierte Protein PCNA und eine Reihe weiterer zellzyklusrelevanter Regulatoren [167]. Wichtigster Stimulus für die Expression von p21^{WAF1/Cip1} ist die Detektion einer beeinträchtigten DNA-Integrität durch bestimmte Sensorproteine. Treten, z.B. durch schädigende äußere Einflüsse, DNA-Doppelstrangbrüche auf, werden diese durch die Sensorproteine ATM und ATR registriert, und in der Folge der antiproliferativ wirkende Transkriptionsfaktor p53 aktiviert [168]. Dieser stimuliert die Transkription von p21^{WAF1/Cip1}, was die Hemmung der genannten Cyclin-CDK-Komplexe und die Induktion eines Zellzyklusarrestes bewirkt. Daneben existieren jedoch auch p53-unabhängige Signalwege, die die Expression von p21^{WAF1/CIP1} fördern [169]. Die Fähigkeit von p21^{WAF1/CIP1} einen Zellzyklusarrest zu induzieren korreliert dabei mit der Lokalisation von p21^{WAF1/CIP1} im Zellkern, während im Zytoplasma lokalisiertes p21^{WAF1/Cip1} unter anderem antiapoptotische Funktionen ausübt [170]. Ein weiterer Zellzyklusinhibitor der Cip/Kip-Familie ist p27^{Kip}, das sehr ähnliche Funktionen durch Hemmung mehrerer Cyclin-CDK-Komplexe hat, jedoch insbesondere in der Regulation seiner Aktivität auch Unterschiede zu p21^{WAF1/Cip1} aufweist [171].

Insgesamt ist die Regulation des Zellzyklus humaner Zellen ein hochkomplexes und intensiv untersuchtes Thema, das hier nur in Grundzügen und mit beispielhaften Mechanismen aufgezeigt werden kann. Auch wird das hier erläuterte „klassische Modell“ der Zellzyklusregulation inzwischen zunehmend infrage gestellt, da zum Einen jeder Zellzyklusregulator auch in mannigfache

andere biochemische Signalwege eingeschaltet ist, die andere Funktionen als die Zellzyklusregulation haben [148] und da sich zum Anderen zentrale Zellzyklusregulatoren wie beispielsweise CDK 4 und CDK 6 für das Durchlaufen eines kompletten Zellteilungszyklus als entbehrlich herausgestellt haben [172]. Weitere Untersuchungen über die Zellzyklusregulation sind daher insbesondere aus Sicht der Tumorforschung erforderlich und werden zukünftig das Verständnis und die Therapieoptionen bei Krebserkrankungen erweitern.

1.6 Beeinflussung des Zellzyklus eukaryotischer Zellen durch bakterielle Infektion

Seit Langem ist bekannt, dass Viren über zahlreiche verschiedene Wege in die Regulation des Zellzyklus ihrer Wirtszellen eingreifen können, was bei vielen viral bedingten Erkrankungen von der Influenza bis zum Zervixkarzinom pathogenetisch bedeutsam ist [173].

Neuer ist dagegen die Entdeckung, dass auch komplexer strukturierte Erreger, wie Bakterien [174] und sogar einige Protozoen [175, 176] in der Lage sein können, den Zellzyklus humaner Zellen zu beeinflussen. Dies könnte den Erregern verschiedene Vorteile verschaffen, wie etwa die erleichterte Kolonisierung sich ständig erneuernder Epithelien, die Destabilisierung epithelialer Barrieren, verbunden mit der Möglichkeit, vermehrt Nährstoffe zu gewinnen oder Epithelbarrieren zu durchbrechen, oder die Beeinträchtigung lokaler Immunabwehrmechanismen [177]. Nachdem in mehreren Bakterienspezies Toxine mit Einfluss auf den Zellzyklus der Wirtszelle nachgewiesen worden waren und sich diese als pathogenetisch relevant herausgestellt hatten, wurden diese Toxine als eine Gruppe neuer Virulenzfaktoren eingestuft und der Begriff „Zyklomoduline“ für sie eingeführt [174, 178]. Im Folgenden wird daher der Begriff Zyklomodulin für verschiedenartige bakterielle Effektoren verwendet, die den Zellzyklus der Wirtszellen beeinflussen können.

Die erste beschriebene Gruppe solcher bakterieller Zyklomoduline sind die Cytolethal distending toxins (CDTs), die von verschiedenen gramnegativen Erregern sezerniert werden können, darunter *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus ducreyi*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Helicobacter cinaedi* [179]. Die aktive Untereinheit CdtB wirkt dabei als Typ I DNase [180, 181] und induziert nach Transport in den Zellkern der Wirtszelle DNA-Einzel- und/oder Doppelstrangbrüche, die eine Aktivierung zelleigener DNA-Reparaturmechanismen zur Folge haben [182]. Über die Aktivierung von ATM wird ein Zellzyklusarrest induziert [182, 183], wobei jedoch, abhängig von der untersuchten Zelllinie, unterschiedliche nachfolgende Signalwege dominieren können. In der Vergangenheit wurde daher bei verschiedenen Zelltypen sowohl über die Induktion eines G₀/G₁-Phasenarrestes berichtet, als auch über einen G₂/M-Phasenarrest [184-186].

Eine ähnliche Wirkung hat das von *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* und *Citrobacter koseri* gebildete Zyklomodulin Colibactin. Dieses verursacht ebenfalls DNA-Doppelstrangbrüche [187], die eine persistierende Hochregulierung der Zellzyklusinhibitoren p16^{INK4} und p21^{WAF1/CIP1} und eine andauernde Akkumulation von Zellen in der G₀/G₁-Phase und in der G₂/M-Phase bewirken [188-190].

Ebenfalls ausführlich beschrieben sind die Cycle inhibiting factors (CIFs), die bei pathogenen *E. coli* Stämmen (EHEC und EPEC) entdeckt wurden, jedoch auch von *Yersinia*, *Burkholderia* und *Photobacterium*-Arten gebildet werden können [191-193]. CIFs werden mithilfe eines Typ 3 Sekretionssystems in die Wirtszelle injiziert und sind dort nach kurzer Zeit im Zellkern nachweisbar [194]. Je nach Versuchsbedingungen und Zellzyklusphase zum Infektionszeitpunkt können sie einen irreversiblen Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase oder in der G₂/M-Phase induzieren, zusammenhängend mit einer gesteigerten Phosphorylierung und Inaktivierung der Cdk1 [195-197].

Neben diesen gut untersuchten Zyklomodulinen existiert noch eine Vielzahl weiterer bakterieller Toxine, für die *in vitro* ein hemmender Einfluss auf den Zellzyklus der Wirtszelle gezeigt wurde.

Mycolacton von *Mycobacterium ulcerans* etwa induziert in kultivierten Fibroblasten einen G₀-/G₁-Phasenarrest und verursacht bei intradermaler Injektion im Tierversuch mit Meerschweinchen dem Buruli-Ulkus vergleichbare Läsionen [198-200].

Der von *Shigella* Spezies exprimierte Effektor IpaB induziert in HeLa Zellen einen G₂-/M-Phasen-Arrest durch Hemmung des APC/C-Inhibitors Mad2L2, wodurch eine Akkumulation von Cyclin B während der G₂- und M-Phase verhindert wird [201]. In Infektionsversuchen an Kaninchen-Dünndarmschlingen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass durch Expression von IpaB die Erneuerung des Epithels verzögert wurde und dies eine erleichterte Kolonisation durch die eingesetzten Shigellenstämme bewirkte [201].

Interessanterweise kann auch durch Infektion mit *Neisseria gonorrhoeae* der Zellzyklus mehrerer Zelllinien *in vitro* beeinflusst werden. An HeLa-Zellen wurde dabei nach Infektion zunächst eine Akkumulation von Zellen in der G₀-/G₁-Phase gezeigt, die mit einer Reduktion von Cyclin D1 und Cyclin E einherging [202]. In einer neueren Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Infektion mit *N. gonorrhoeae* in benignen Epithelzellen DNA-Doppelstrangbrüche induzierte, was mit einer Anreicherung von p21^{WAF1/CIP1} und p27^{KIP} im Zellkern sowie mit einer Verlängerung der G₂-/M-Phase einherging [203]. Genauere Informationen über zugrundeliegende Mechanismen sind jedoch noch nicht verfügbar.

Auch bei der Infektion durch *N. meningitidis* liegen erste Hinweise darauf vor, dass diese den Zellzyklus der Wirtszelle beeinflussen. In einer erst kürzlich erschienenen Forschungsarbeit der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Infektion von humanen mikrovaskulären Gehirndothelzellen mit Meningokokken zu verschiedenen Zeitpunkten zu einer Akkumulation von Zellen in der S-Phase führte [204]. Dieser Effekt war begleitet von einer gesteigerten Expression und nukleären Lokalisation von p21^{WAF1/CIP1}, die zwar mit einer DNA-Schädigung einherging, jedoch unabhängig von p53 war [204]. Zudem war der Effekt abhängig von der Expression von Opa und Opc und konnte auch durch Opa- oder Opc-exprimierende *E. coli*-Stämme induziert werden [204].

Des Weiteren wurden auch für grampositive Erreger Effekte auf den Zellzyklus beschrieben: Die Infektion zweier humaner Karzinomzelllinien mit *Listeria*

monocytogenes bewirkte eine Verlangsamung des Zellzyklus und nach 17 Stunden eine signifikante Akkumulation von Zellen in der S-Phase [205]. Diese wurde verursacht als Folge von DNA-Strangbrüchen, wobei interessanterweise ATM- und ATR-unabhängige Mechanismen für die Effekte auf den Zellzyklus verantwortlich waren [205].

Zudem wurden für die Effektoren Phenol-soluble Modulin (PSM) α 1, PSM α 3 und Staphylococcal enterotoxin-like toxin O (SEIO) von *Staphylococcus aureus* hemmende Effekte auf den Zellzyklus verschiedener Karzinomzelllinien beschrieben [206-208].

Die Menge bisher beschriebener Zyklomoduline bei verschiedensten Krankheitserregern und erste Ergebnisse über eine erleichterte Kolonisierung durch Synthese von Zyklomodulinen lassen vermuten, dass die Beeinflussung des Wirtszellzyklus eine weit verbreitete und möglicherweise bei vielen Infektionskrankheiten bedeutsame Funktion ist. Weitere Forschungsergebnisse und die Entdeckung neuer Zyklomoduline sind daher in Zukunft zu erwarten. Eventuell wird ein genaueres Wissen hierüber zukünftig auch neue Möglichkeiten der pharmakologischen Prävention und/oder Therapie von Infektionskrankheiten eröffnen.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Pathomechanismen, die das Überschreiten der Blut-Hirn/Liquor-Schranke durch *N. meningitidis* und die Entstehung der bakteriellen Meningitis bewirken, sind Gegenstand zahlreicher aktueller Forschungsprojekte. In den vergangenen Jahren konnte daher ein großer Wissenszuwachs über hierfür entscheidende bakterielle Virulenzfaktoren und deren Interaktion mit den endothelialen Zielzellen erreicht werden [209]. Weniger intensiv erforscht werden dagegen bakterielle Faktoren, die die Kolonisierung von Epithelien des Nasenrachenraumes ermöglichen. Das dauerhafte Überleben verschiedener Meningokokkenstämme im oberen Respirationstrakt setzt ein komplexes Gefüge diverser Anpassungsmechanismen voraus, die vermutlich erst zum Teil bekannt

sind. Hierzu gehören unter anderem die Adhäsion an die Zielzelle, die Akquirierung von Nährstoffen sowie das Umgehen verschiedener Mechanismen der Immunabwehr [210]. Jedoch wäre ein erweitertes Wissen über zusätzliche für die Kolonisierung wichtige Mechanismen insbesondere für die erfolgreiche Prävention der durch Meningokokken verursachten Krankheitsbilder von großem Wert.

Die Fähigkeit zur Beeinflussung des Zellzyklus der Wirtszelle konnte in der Vergangenheit bei unterschiedlichen Bakterienspezies nachgewiesen werden und die hieran beteiligten Effektoren, die Zyklomoduline, gelten als neue Gruppe bakterieller Virulenzfaktoren [174, 178]. Auch bei der Infektion durch *N. meningitidis* konnte kürzlich in einer Forschungsarbeit am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg ein Effekt auf den Zellzyklus kultivierter endothelialer Zellen *in vitro* nachgewiesen werden (s.o.) [204].

Speziell bei der asymptomatischen Kolonisierung könnte eine Beeinflussung der Zellerneuerung im Nasenrachenraum einen begünstigenden Effekt haben oder die dauerhafte Kolonisierung eventuell erst ermöglichen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher zu untersuchen, ob und wie die Infektion durch *N. meningitidis* auch den Zellzyklus pharyngealer Epithelzellen beeinflusst und ob mögliche Effekte vergleichbar sind mit den bereits beschriebenen Effekten auf den Zellzyklus endothelialer Zellen. Zunächst sollten hierzu zwei maligne und zwei nicht maligne pharyngeale Epithelzelllinien mittels Adhäsions- und Invasionsassays auf ihre Eignung für Infektionsversuche mit Meningokokken geprüft werden. Hiernach sollte mit den am besten geeigneten Zelllinien mittels Propidium-Iodid (PI)-Färbungen ermittelt werden, ob der Zellzyklus beeinflusst wird, und erste Informationen über mögliche zugrunde liegende Mechanismen der beobachteten Effekte gewonnen werden. Dazu wurden zellzyklusregulierende Proteine (Cycline und CDK-Inhibitoren) auf Proteinebene, auf Transkriptionsebene und hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation im Infektionversuch analysiert. Ein besonderes Augenmerk lag bei der vorliegenden Arbeit auf dem Vergleich von pathogenen Meningokokkenisolaten und bislang nicht als pathogen in Erscheinung getretenen Trägerisolaten und deren Einfluss auf den Zellzyklus pharyngealer Epithelzelllinien.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Artikel	Hersteller	Modell
Analysewaage	Mettler-Toledo GmbH, Gießen	P1200
Analysewaage (fein)	Sartorius AG, Göttingen	PT 120
Bioanalyzer	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn	2100 Bioanalyzer
Blot-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Mini Trans-Blot® Cell
Brutschrank	Heraeus, Hanau	B5060 EC-CO2
	Nuaire, Plymouth (USA)	Nu-5510E
Durchflusszytometer	BD Biosciences, München	FACS Calibur
Elektrophoresekammern	Biometra GmbH, Göttingen	Minigel-Twin
	Biometra GmbH, Göttingen	Compact M
Flüssigstickstofftanksystem	Taylor-Wharton, Husum	38K (K-Series)
Gasbrenner	Schütt biotec, Göttingen	Flammy S
Gefrierschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß	GS 5203
Geldokumentationsanlage	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Universal Hood III
Geldokumentationsanlage	Herolab Laborgeräte GmbH, Wiesloch	UVT-20 LP
Heizblock	Liebisch	2099-DA
Kolonienzähler	Synbiosis, Cambridge (UK)	ProtoCOL SR
Kühlschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß	FKS 5000
Kryoeinfriergerät	A. Hartenstein GmbH, Würzburg	Nalgene Isopropanol Cryo Box "Mr. Frosty"

Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach	MR Hei-Standard
Mikroskope	Zeiss, Jena	Axio Imager Z1
	Zeiss, Jena	Axiovert 40 CFL
	Will Wetzlar GmbH, Wetzlar	Wilovert
Kameras	Zeiss, Jena	AxioCam ICc 1
	Zeiss, Jena	AxioCam MRm
Multipette	Eppendorf AG, Hamburg	Multipette
pH-Meter	SI Analytics GmbH, Mainz	Lab 850
Photometer	Biochrom Ltd., Cambridge (UK)	CO8000
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg	Reference®
	Eppendorf AG, Hamburg	Research pro
Pipettierhilfe	Brand GmbH, Wertheim	Accu-jet® pro
Real-Time-Thermocycler	Life Technologies GmbH, Darmstadt	Step-One-Plus™
Schüttelinkubator	B. Braun AG, Melsungen	Certomat® R Certomat® H
Schüttler	Biometra GmbH, Göttingen	ThermoShaker TS1
	Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen	PHERO-Shaker
Sicherheitswerkbank Klasse II	Thermo Scientific, Braunschweig	Safe 2020
Spannungsgeber	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	PowerPac™ 300
	Biometra GmbH, Göttingen	Standard Power Pack P25
Sterile Werkbank	Nuaire, Plymouth (USA)	Nu-437-400E
Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen	T3000
UV-Vis Spektrophotometer	VWR International GmbH, Erlangen	NanoDrop ND-1000
Vakuumpumpe	Ilmvac GmbH, Ilmenau	Membranpumpe chemiefest Typ 4000 SZ
Vortexer	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach	Reax 2000

Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen	Neubauer improved
Zentrifugen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	Micro centrifuge IR
	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen	EBA 12
	Hitachi Power Tools GmbH, Willich	Himac CT15RE
	Heraeus, Hanau	Megafuge 1.0R
	Heraeus, Hanau	Megafuge 1.0

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
15 ml Cellstar® PP Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
50 ml Cellstar® PP Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Blottingpapier (Stärke 1,3 mm)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Columbia Agar + 5 % Schafsblut	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Cryopure Gefäß 1 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Deckgläser (Durchmesser: 12 mm)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Dispensertips 12,5 ml	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Dispensertips 2,5 ml	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Laborglasflaschen SIMAX® Braunglas	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Nitrocellulosemembran (Amersham Protran 0,2 µm)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH, Lauda- Königshofen
Pipettenspitzen 20 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Reagiergefäße 0,5 ml, PP	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Reagiergefäße 1,5 ml, PP	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Reagiergefäße 2,0 ml, PP	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Rundboden-Röhrchen 5 ml PP	BD Biosciences, Heidelberg
SafeSeal Gefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Spritze HSW Norm-Ject 20 ml, steril	Henke Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Sterilfilter Filtropur S 0.2	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht

Tissue culture (TC) Platte 24 Well Standard F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
TC Platte 6 Well Standard F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
TC Platte 96 Well Standard F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
TC-Flasche T175 Standard	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
TC-Flasche T25 Standard	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
TC-Flasche T75 Standard	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
TC-Platte 24 Well Standard F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Vivaspin 20 (für 10.000 Dalton)	Sartorius AG, Göttingen
Wattestäbchen 15 cm	Heinz Herenz Medizinalbearf GmbH, Hamburg
Whatman Chromatographiepapier	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
MicroAmp Fast 96 well reaction plate	Applied Biosystems by Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Name	Hersteller, Standort
10 x PBS	Life Technologies GmbH, Darmstadt
100 % Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
25 % HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
2-Propanol (≥99,8 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
A. dest.	B Braun AG, Melsungen
Agarose UltraPure™	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Albumin Fraction V	AppliChem GmbH, Darmstadt
AlexaFluor 488 Azide	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
BD-FACS-Clean	BD Biosciences, Heidelberg
BD-FACS-Flow	BD Biosciences, Heidelberg
BD-FACS-Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
Blue Protein Standard	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a. M.
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Coomassie brilliant blue	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dinatrium-EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	Merck KGaA, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

DNase-freies Wasser	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
dNTP-Lösungen	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a. M.
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Eisen(III)nitrat Nonahydrat ($\geq 96\%$, reinst)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol (vergällt)	Nedalco, Heilbronn
Ethanol Rotipuran	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Eukitt [®] quick hardening mounting medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
FBS (fetal bovine serum)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
FxCycle [®] Far red stain	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Gelred Nucleic Acid Gel Stain	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
Gentamicin	Merck KGaA, Darmstadt
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin ($\geq 99,5\%$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
K ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin sulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kartoffelstärke	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
Kupfer (II)-Sulfat-Pentahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
LB-Broth Base	Life Technologies GmbH, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol ($\geq 99,99\%$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid-Pellets	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumpyruvat (100 mM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Nichtessentielle Aminosäuren	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Para-Formaldehyd (reinst)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Platinum [®] Taq DNA Polymerase high fidelity	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Proteose Pepton	BD Biosciences, Heidelberg
Random Primer Nona	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

RNase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNase Exitus Plus	AppliChem GmbH, Darmstadt
RNase OUT recombinant ribonuclease inhibitor	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Saponin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
SDS-Pellets	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Smart Ladder (DNA-Ladder)	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
Super Script® II reverse transcriptase (200 U/μl)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
<i>Taq</i> -Polymerase (MS0267S)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a. M.
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
10 x Thermopol-Reaction-Buffer	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Thiamin Pyrophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tris (Tris(hydroxymethyl)- aminomethan)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TRITON-X100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tween20	Merck KGaA, Darmstadt
Veriquest Fast SYBR Green qPCR Master Mix	Affymetrix UK Ltd., High Wycombe (UK)
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Trypanblau 0,5 %	Biochrom KG, Berlin

2.1.4 Puffer und Lösungen

10 x PBS	für 1000 ml
----------	-------------

Ein Päckchen 10 x PBS-Pulver in 1000 ml A. dest lösen.
Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

1 x PBS	für 1000 ml
---------	-------------

10 x PBS	100 ml
A. dest.	900 ml

In 250 ml-Glasflaschen geben und autoklavieren.
Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

Coomassie	für 200 ml
-----------	------------

Coomassie brilliant blue	250 mg
Methanol 99,9 %	100 ml
Essigsäure 96 %	20 ml
A. dest.	80 ml

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

Coomassie-Entfärber	für 1000 ml
---------------------	-------------

Methanol	500 ml
96 % Essigsäure	100 ml
A. dest.	400 ml

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

10 x SDS-Puffer	für 1000 ml
Glycin	144 g
Tris	30 g
SDS-Pellets	10 g

Zunächst Glycin und Tris in A. dest. lösen.
pH auf 8,3 einstellen.
Nun SDS-Pellets zugeben.
Mit A. dest. auf 1000 ml auffüllen.
Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

1 x SDS-Puffer	für 1000 ml
10 x SDS	100 ml
A. dest.	900 ml

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

10 x Western Blot-Puffer	für 1000 ml
Glycin	144 g
Tris	30 g

Mit A. dest. auf 1000 ml auffüllen.
Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

1 x Western Blot-Puffer	für 1000 ml
10 x Western Blot-Puffer	100 ml
Methanol	200 ml
A. dest.	700 ml

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

10 x TBS	für 1000 ml
NaCl	87,6 g
Tris	60,5 g

Mit A. dest. auf 1000 ml auffüllen.
pH auf 7,4 einstellen.
Anschließend autoklavieren.
Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

1 x TBS-T		für 1000 ml
10 x TBS		100 ml
A. dest.		899 ml
Tween20		1 ml

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

Kanamycin		für 15 ml
Kanamycin		750 mg
A. dest.		15 ml

Zu je 1 ml aliquotieren.
Aufbewahrung bei -20 °C.

16 % APS		für 20 ml
Ammoniumpersulfat		3,2 g

Mit A. dest. auf 20 ml auffüllen.
Zu je 1 ml aliquotieren.
Aufbewahrung bei -20 °C.

2 x Stop mix		
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)		7,0 ml
Glycerin (99 %)		5,6 ml
20 % SDS		5,6 ml
A. dest.		4,9 ml

Ab jetzt muss unter dem Abzug weitergearbeitet werden!

β -Mercaptoethanol		1,72 ml
--------------------------	--	---------

Eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau zugeben.
Gut vermischen und zu je 2 ml aliquotieren.
Aufbewahrung bei -20 °C.

3,7 % para-Formaldehyd für 100 ml

Para-Formaldehyd 3,7 g

Mit A. dest. auf 100 ml auffüllen.

Erhitzen auf 60 °C.

1 M NaOH Tropfen für Tropfen zugeben, bis die Lösung vollständig klar ist.

Nach Abkühlung die Lösung sterilfiltrieren.

Aufbewahrung bei 4 °C.

20 % SDS für 100 ml

SDS-Pellets 20 g

Mit A. dest. Auf 100 ml auffüllen.

Unter leichtem Erhitzen auf dem Magnetrührer lösen.

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

8,4 % NaHCO₃ für 50 mlNaHCO₃ 4,2 g

Mit A. dest. auf 50 ml auffüllen.

Sterilfiltrieren.

Aliquots zu je 10 ml herstellen.

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

20 % Saponin für 20 ml

Saponin 4 g

Mit A. dest. auf 20 ml auffüllen.

Sterilfiltrieren.

Zu je 1 ml aliquotieren.

Aufbewahrung bei -20 °C.

Blocking-Puffer für Immunfluoreszenz für 100 ml

BSA 2 g

FBS 1 ml

Mit 1 x PBS auf 100 ml auffüllen.

Aufbewahrung bei 4 °C.

10 x TBE	für 1000 ml
Tris	121,0 g
Borsäure	61,8 g
EDTA	7,3 g

Mit A. dest. auf 1000 ml auffüllen.
Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

6 x Agarosepuffer	für 20 ml
Saccharose	8 mg
100 % Glycerin	6 ml

Mit A. dest. auf 20 ml auffüllen.
Auf dem Magnetrührer lösen.
Jeweils eine kleine Spatelspitze Brophenolblau und Xylencyanol zugeben.
Zu je 1 ml aliquotieren.
Aufbewahrung bei -20 °C.

100 x Kellogg's Supplement I	für 1000 ml
Glucose	40 g
L-Glutamin	1 g
Thiamin Pyrophosphat	2 mg

Mit A. dest. auf 1000 ml auffüllen.

1000 x Kellogg's Supplement II	für 100 ml
Eisen(III)nitrat	50 mg

Mit A. dest. auf 100 ml auffüllen.

Kellogg's Supplement I+II zur Bakterienkulturanreicherung	
100 x Kellogg's Supplement I	100 ml
1000 x Kellogg's Supplement II	10 ml

Sterilfiltrieren.
Zu je 500 µl aliquotieren (→ Aliquots enthalten 100 x die gewünschte Endkonzentration).
Aufbewahrung bei -20 °C.

PPM-Stammlösung		für 1000 ml
KH ₂ PO ₄		200 g
K ₂ HPO ₄		50 g

Mit A. dest. auf 1000 ml auffüllen.
pH auf 7,4 einstellen.
Anschließend autoklavieren.

2.1.5 Nährmedien für Zellkulturen

NP69-Medium		für 500 ml
Keratinocyte-SFM (K-SFM)		500 ml
Bovine pituitary extract		mitgelieferte Menge
EGF human recombinant		mitgelieferte Menge

In steriler Werkbank bei ausgeschaltetem Licht arbeiten.
Komplette mitgelieferte Aliquots beider Supplemente zu dem Keratinocyte-SFM geben.
Nach gründlichem Vermischen Medium in Lichtschutz-Glasflaschen füllen.
Aufbewahrung bei 4 °C.

Detroit-Medium		für 200 ml
DMEM		172,0 ml
FBS		20,0 ml
L-Glutamin	200 mM	4,0 ml
Natriumpyruvat	100 mM	2,0 ml
100 x nichtessenzielle Aminosäuren		2,0 ml

Aufbewahrung bei 4 °C.

FaDu-Medium		für 200 ml
DMEM		180,0 ml
FBS		20,0 ml

Aufbewahrung bei 4 °C.

Einfriermedium-Medium		für 20 ml
Medium zur Kultivierung der betreffenden Zelllinie	60 %	12 ml
FBS	30 %	6 ml
DMSO	10 %	2 ml

Einfriermedium bis unmittelbar vor der Nutzung bei 4 °C lagern.

2.1.6 Nährmedien für Bakterienkulturen

PPM		für 500 ml
Proteose Pepton		7,5 g
NaCl		2,5 g
Kartoffelstärke		0,25 g
PPM-Stammlösung		10 ml

Mit A. dest. auf 500 ml auffüllen.
Möglichst direkt im Anschluss autoklavieren.
Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

PPM+		für 10 ml
PPM		9,85 ml
NaHCO ₃ (sterilfiltriert)	8,4 %	25 µl
MgCl ₂ (sterilfiltriert)	2 M	25 µl
Kellogg's I+II		100 µl

Unmittelbar nach der Herstellung für Infektionsversuche zu verwenden.

LB-Medium		für 1000 ml
LB Broth Base		20 g
A. dest.		1000 ml

Direkt im Anschluss autoklavieren.
Danach Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

2.1.7 Reaktionskits

Kit	Anwendung
QIAmp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Braunschweig
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Click-iT [®] EdU Alexa Fluor [®] 488 Imaging Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies Inc., Waldbronn

2.1.8 Oligonukleotid-Primer

Primer	Sequenz	Hersteller / zur Verfügung gestellt durch
RA1 (opc)	5'-CAA AGC GCA CAT CAC CGT C-3'	H. Claus, Würzburg
RA2 (opc)	5'-CCA TCA AAT GAA TAT CCA TAC C-3'	H. Claus, Würzburg
RA3 (opc)	5'-CAT CTC AAG TCT CGT CAT TCC-3'	H. Claus, Würzburg
RA4 (opc)	5'-AGC CTG TGT AAA GAT CGA TAC-3'	H. Claus, Würzburg
human GAPDH (sense-primer)	5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3'	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
human GAPDH (antisense-primer)	5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GT-3'	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Cyclin A (sense-primer)	5'-CGG TAC TGA AGT CCG GGA AC-3'	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Cyclin A (antisense-primer)	5'-AAC GGT GAC ATG CTC ATC ATT T-3'	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Cyclin B (sense-primer)	5'-TCT GGA TAA TGG TGA ATG GAC A-3'	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Cyclin B (antisense-primer)	5'-CGA TGT GGC ATA CTT GTT CTT G-3'	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Cyclin D (sense-primer)	5'-CGG TAG TAG GAC AGG AGG TT-3'	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Cyclin D (antisense-primer)	5'-CTG TGC CAC AGA TGT GAA GT-3'	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Cyclin E (sense-primer)	5'-AGC GGT AAG AAG CAG AGC AG-3'	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Cyclin E (antisense-primer)	5'-CGC TGC AAC AGA CAG AAG AG-3'	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Erläuterungen zu den Primern zur Detektion des *opcA*-Gens:

RA3 hybridisiert mit einer Sequenz der 5' flankierenden Region des *opcA*-Gens. Die Zielsequenz der Primers RA4 liegt dagegen im kodierenden Bereich des *opcA*-Gen. Eine Amplifikation kann folglich nur bei Anwesenheit des *opcA*-Gens stattfinden. Das PCR-Produkt hat in diesem Fall eine Länge von 825 bp.

Das Primerpaar RA1/RA2 wurde verwendet, um die mit dem Primerpaar RA3/RA4 erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren. Die Zielsequenzen dieser Primer liegen jeweils in den benachbarten Genen *glyA* und *dedA* (Siehe Abb. 2.1). Bei Anwesenheit des Gens ergibt sich somit ein langes Amplifikat (3471 bp), bei Deletion des *opcA*-Gens ein um die Länge der Deletion verkürztes PCR-Produkt.

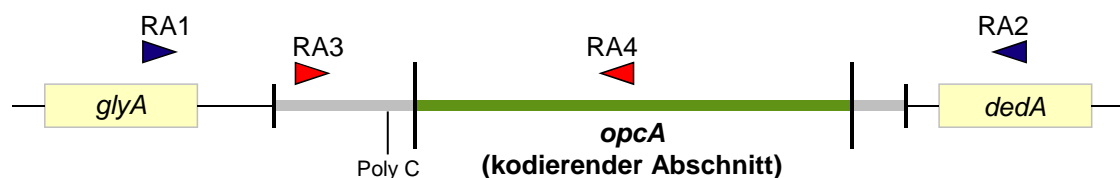


Abb. 2.1: Das *opcA*-Gen und die flankierenden Regionen sowie die Bindungsstellen der hier verwendeten Primerpaare RA1/RA2 und RA3/RA4.

2.1.9 Primärantikörper

Antikörper (Klon)	Spezies	Isotyp	Verdünnung	Lieferant (Bestell-Nr.)
Opa (4B12/C11)	Maus	IgG	WB: 1/1000	M. Achtmann, Berlin [211]
β -actin (polyklonal)	Kaninchen	IgG	WB: 1/1000	Cell signaling technology, Frankfurt a.M. (#4967)
Cyclin D1 (EP272Y)	Kaninchen	IgG	WB: 1/1000	Merck KGaA, Darmstadt (ab40754)
Cyclin D1 (A-12)	Maus	IgG	IF: 1/50	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg (sc-8396)

Cyclin E (HE12)	Maus	IgG	IF: 1/50 WB: 1/1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg (sc-247)
p21 ^{WAF1/Cip1} (12D1)	Kaninchen	IgG	IF: 1/400 WB: 1/1000	Cell signaling technology, Frankfurt a.M. (#2947)
p27 ^{Kip} (G173-524)	Maus	IgG	IF: 1/50	BD Biosciences, Heidelberg (554069)
opc (B306)	Maus	IgG	WB: 1/1000	M. Achtmann, Berlin [211]
Pili (SM1)	Maus	IgG	WB: 1/4000	M. Virji, Oxford [212]
IF: Immunfluoreszenz WB: Western Blot				

2.1.10 Sekundärantikörper

Antikörper/Spezifität	Spezies	Isotyp	Verdünnung	Lieferant (Bestell-Nr.)
AffiniPure Anti-Kaninchen IgG (H+L)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat	Ziege	IgG	WB: 1/5000	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket (UK) (111-035-144)
AffiniPure Anti-Maus IgG+IgM (H+L) - Meerrettich-Peroxidase-Konjugat	Ziege	IgG	WB: 1/10000	Dianova GmbH, Hamburg (115-035-068)
Alexa Fluor [®] 488 Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	IgG	IF: 1/200	Life Technologies GmbH, Darmstadt (R37116)
Cy3 Anti-Maus IgG (H+L)	Kaninchen	IgG	IF: 1/200	Dianova GmbH, Hamburg (315-165-047)
IF: Immunfluoreszenz WB: Western Blot				

2.1.11 Software

Programm	Version	Hersteller
BD-CellQuest™ Pro	5.2	BD Biosciences, Heidelberg
Image Lab Version	5.2 build 14	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ProtoCol SR/HR	1.27.1664	Synoptics Ltd., Cambridge (UK)
Step One Software	2.3	Life Technologies GmbH, Darmstadt
2100 Expert	B.02.08.SI648 (SR2)	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn
Weasel	3.1	Frank Battye PhD
Image J	1.48	National Institutes of Health, Bethesda (USA)
AxioVision	4.7.2.0	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH
NanoDrop 1000	3.8.0	Thermo Scientific, Braunschweig
Pregap4	1.6	Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology
Gap4	4.11.2	Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology
BioEdit	7.2.5	Hall, T.A.

2.1.12 Zelllinien

Zelllinie	Informationen
FaDu	1968 isoliert aus dem Hypopharynx-Plattenepithelkarzinom eines 56-jährigen, männlichen Patienten aus Kalkutta, Indien [213]. Kommerziell erworben von der American Type Culture Collection (ATCC® HTB-43™).
Detroit 562	Gewonnen aus dem Punktat eines malignen Pleraugusses von einer Patientin mit Pharynxkarzinom [214]. Kommerziell erworben von der American Type Culture Collection (ATCC® CCL-138™).
NP69	Nasopharyngeale Epithelzelllinie, isoliert aus dem Biopsat eines Patienten ohne maligne Erkrankung und anschließend immortalisiert durch Transfektion mit einem das Simian Virus 40T-Antigen tragenden Plasmid [215]. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. S. W. Tsao, Hongkong, China

NP460hTert	Nasopharyngeale Epithelzelllinie, isoliert aus einer Biopsie nicht malignen Gewebes und immortalisiert durch Expression einer humanen Telomerase reversen Transkriptase (hTert) mithilfe eines retroviralen Vektors [216]. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. S. W. Tsao, Hongkong, China
------------	---

2.1.13 Bakterienstämme

Meningokokkenstämme

WUE-ID	Stamm	Status	Ursprung	Sg	cc	ST	Referenz
2135	MC58	IME	1983, Großbritannien	B	32	74	[8, 217]
2832	8013/ Klon 12	IME	1989, Frankreich	C	18	177	[218, 219]
α 14	α 14	TI	1999/2000, Deutschland	cnl	53	53	[18]
α 711	α 711	TI	1999/2000, Deutschland	32	32	B	[18]
α 4	α 4	TI	1999/2000, Deutschland	B	18	19	[18]

IME: Invasive Meningokokkenerkrankung
TI: Trägerisolat
Sg: Serogruppe
cc: klonaler Komplex
ST: Sequenztyp

N. meningitidis Mutanten

Stamm	Referenz	Informationen
MC58 <i>siaD</i>	[104]	Ausgeschaltetes Sialyltransferase-Gen, zur Verfügung gestellt durch das IHM Würzburg
MC58 <i>Opa</i>	[220]	Ausgeschaltete Opa-Expression, zur Verfügung gestellt durch das IHM Würzburg

E. coli-Stämme

Stamm	Referenz	Informationen
BL21 (DE3)	[221]	Wildtypstamm von Novagen (Merck KGaA, Darmstadt), zur Verfügung gestellt durch PD Dr. K. Ohlsen, IMIB Würzburg
BL21 Opa1	[204]	<i>E. coli</i> -Stamm mit Opa1-Expression, zur Verfügung gestellt durch das IHM Würzburg
BL21 Opa2	[204]	<i>E. coli</i> -Stamm mit Opa2-Expression, zur Verfügung gestellt durch das IHM Würzburg
BL21 Opa3	[204]	<i>E. coli</i> -Stamm mit Opa3-Expression, zur Verfügung gestellt durch das IHM Würzburg
BL21 Opa4	[204]	<i>E. coli</i> -Stamm mit Opa4-Expression, zur Verfügung gestellt durch das IHM Würzburg
BL21 Opc	[220]	<i>E. coli</i> -Stamm mit Opc-Expression, zur Verfügung gestellt durch das IHM Würzburg

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultur von Bakterien

Zur Anzucht wurde das gewünschte, bei -80 °C gelagerte Bakterienisolat am Abend vor dem geplanten Infektionsversuch unter der Sicherheitswerkbank auf einer Kochblutagarplatte fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Am Versuchstag wurden für jedes verwendete Isolat zunächst 10 ml PPM+ in einem 50 ml-Greiner-Röhrchen vorgelegt. Unter der Sicherheitswerkbank wurde die dritte Fraktion der über Nacht gewachsenen Stämme mithilfe eines Watteschübchens abgenommen und das Gefäß mit PPM+ angeimpft. Die Bakterienkulturen wurden hierauf für eine Stunde im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die OD₆₀₀ der Bakterienkultur im Vergleich zur OD₆₀₀ von PPM+ als Leerwert photometrisch ermittelt und die Bakterienzahl pro ml errechnet, wobei eine OD₆₀₀ von 1 einer Bakterienzahl von 10⁹ Bakterien/ml entspricht.

2.2.1.2 Kultur der verschiedenen Zelllinien

Für die hier vorgestellten Versuche wurden die drei pharyngealen Epithelzelllinien FaDu, Detroit 562 und NP69 verwendet, die sich auch in ihren idealen Kulturbedingungen voneinander unterscheiden. Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in ihrem jeweiligen Zellkulturmedium (s.o.) bei 37 °C und 5 % CO₂ in nicht beschichteten Zellkulturflaschen. Wachstum und Phänotyp wurden täglich lichtmikroskopisch kontrolliert. Die jeweiligen Kulturbedingungen sind in Tab. 2.1 dargestellt.

	FaDu	Detroit 562	NP69
Kultiviert in	T75- oder T175-Flaschen	T75- oder T175-Flaschen	T75-Flaschen
Gesamtvolumen in T25-Flasche	5 ml	5 ml	3 ml
Gesamtvolumen in T75-Flasche	10 ml	10 ml	7 ml
Gesamtvolumen in T175-Flasche	20 ml	20 ml	nicht verwendet
geeignete Trypsinisierungszeit	2 min.	5-7 min.	2 min.
Medium zur Neutralisierung des Trypsins	FaDu-Medium	Detroit-Medium	NP69-Medium mit Zusatz von 2 % FBS
Zentrifugationsgeschwindigkeit zur Sedimentation	1300 g	1300 g	900 g

Tab. 2.1: Kulturbedingungen von FaDu-, Detroit 562-, und NP69-Zellen im Überblick.

Alle Schritte bei der Bearbeitung von NP69-Zellen (Kultivierung und Infektionsversuche) wurden aufgrund lichtempfindlicher Nährzusätze des K-SFM-Mediums bei so geringer Lichteinstrahlung wie möglich durchgeführt, d.h. bei ausgeschalteter Beleuchtung in der sterilen Werkbank und gedämpfter Raumbelichtung. Das K-SFM-Medium wurde nach Aufbereitung sofort in Lichtschutzflaschen überführt und in diesen aufbewahrt.

2.2.1.3 Zellen auftauen

Nach Erwärmung aller Zellkulturmedien auf Raumtemperatur wurden die Cryopure-Gefäße mit den gewünschten Zellen aus dem Flüssigstickstoff-Kühlsystem entnommen und aufgetaut. Die enthaltene Zellsuspension wurde mit

einer 1 ml-Pipette entnommen und in ein 50 ml-Greiner Tube mit 9 ml Kulturmedium überführt. Zur Entfernung des im Einfriermedium enthaltenen DMSO erfolgte die Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 1300 g (für FaDu- und Detroit 562-Zellen) oder 900 g (für NP69-Zellen) für fünf Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Zellkultur-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in eine T25-Zellkulturflasche mit einem geeigneten Volumen (siehe Tab. 2.1) Zellkulturmedium gegeben.

Am Folgetag wurde ein Medienwechsel durchgeführt und die Zellen weiter kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz erfolgte der Transfer in Zellkulturflaschen der geeigneten Größe.

2.2.1.4 Zellen splitten

- FaDu- und Detroit 562-Zellen (in T175-Kulturflaschen):

Trypsin, 1 x PBS und FaDu- oder Detroit-Medium wurden zunächst auf Raumtemperatur erwärmt. Um die Zellen im Verhältnis 1/6 zu splitten wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen, die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend 3 ml Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben. Es erfolgte die Inkubation im Brutschrank für eine geeignete Dauer (siehe Tab. 2.1). Durch kräftiges Schlagen gegen die Wände des Kulturgefäßes wurden die Zellen vom Boden abgelöst. Es folgte die Neutralisierung des Trypsins durch Zugabe von 9 ml Medium (siehe Tab. 2.1). Nach gründlichem Auf- und Abpipettieren wurden 2 ml der Zellsuspension in eine neue T175-Kulturflasche mit 18 ml Zellkulturmedium gegeben und weiter kultiviert.

- NP69-Zellen (in T75-Kulturflaschen):

Trypsin, 1 x PBS, FBS und NP69-Medium wurden auf Zimmertemperatur erwärmt. Da NP69-Medium serumfrei ist und somit nur einen

geringfügigen, durch die Supplemente beigesteuerten Proteingehalt hat, wurde zur späteren Neutralisierung des Trypsins NP69-Medium mit Zusatz von 2 % FBS vorbereitet. Um die Zellen im Verhältnis 1/3 zu splitten wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen und die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Die Trypsinisierung erfolgte mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C für 2-3 Minuten. Nach Abschlagen der Zellen vom Boden des Kulturgefäßes erfolgte die Neutralisierung des Trypsins durch Zugabe von 3 ml 2 % FBS in NP69-Medium. Die gesamte Zellsuspension wurde hierauf in ein 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt. Um verbliebene Zellen mit zu erfassen, wurde der Boden des leeren Kulturgefäßes nochmals gründlich mit 1 x PBS gewaschen und dieses anschließend der Zellsuspension zugeführt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 900 g für 5 Minuten. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in 6 ml NP69-Medium resuspendiert und je 2 ml der Zellsuspension wurden in neue T75-Zellkulturflaschen mit je 5 ml NP69-Medium gegeben und weiter kultiviert.

2.2.1.5 Zellen einfrieren

Das Einfriermedium wurde vorbereitet und vor Gebrauch auf 4 °C gekühlt. Die einzufrierenden Zellen wurden zweimal mit 1 x PBS gewaschen und mittels Trypsinisierung (analog dem Splitten, siehe 2.2.1.4) vom Boden der Kulturflasche gelöst. Nach Neutralisierung des Trypsins wurde die gesamte Zellsuspension in ein 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 1300 g (für FaDu- und Detroit-Zellen) bzw. 900 g (für NP69-Zellen) zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in einer geeigneten Menge Einfriermedium resuspendiert und die Zellsuspension zu je 1 ml in Cryopure-Gefäße aliquotiert. Dabei wurde eine bis zur Konfluenz bewachsene T75-Flasche mit NP69-Zellen in drei Cryotubes aliquotiert, eine konfluente T175-Flasche mit FaDu- oder Detroit 562-Zellen ergab zehn Aliquots. Die Aliquots wurden in eine nicht gekühlte Isopropanol-Einfrierbox gestellt und

über Nacht bei -80 °C eingefroren. Am Folgetag wurden die Kryogefäße in den Stickstofftank überführt.

2.2.1.6 Aussaat von Zellen und Bestimmung der Zellzahl

Zunächst wurden alle erforderlichen Medien und Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmt und die für den Versuch geeigneten TC-Platten beschriftet. Darauf folgten die Trypsinisierung der gewünschten Zellen, die Neutralisation des Trypsins sowie die Überführung der Zellsuspension in ein 50 ml-Greiner-Röhrchen, wie unter 2.2.1.4 beschrieben. Dann wurde die Zellsuspension bei 1300 g (FaDu- oder Detroit 562-Zellen) oder 900 g (NP69-Zellen) für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellpellet in einer geeigneten Menge Zellkulturmedium resuspendiert. In eine Vertiefung einer 96-Well-Platte wurden 90 µl Trypanblau gegeben und diese mit 10 µl der Zellsuspension gut vermischt. Hiervon wurden wiederum 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zelldichte der Zellsuspension unter dem Mikroskop durch Zählen ermittelt. Nach Auszählung von 4 großen Quadraten errechnete sich die Zelldichte wie folgt:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor}$$

- Verdünnungsfaktor: 10
- Kammerfaktor: 10^4 ml^{-1}

Die Zellsuspension wurde daraufhin mit Zellkulturmedium auf die für den Versuch gewünschte Zelldichte verdünnt, geeignete Volumina wurden in die Vertiefungen der TC-Platten gegeben (siehe bei den jeweiligen Versuchen) und die Zellen bis zum Versuchsbeginn bei 37 °C und 5 % CO₂ weiter kultiviert.

2.2.2 Infektion von Epithelzellen mit *N. meningitidis*-Isolaten

Für alle Infektionsversuche wurden FaDu-, Detroit 562-, oder NP69-Zellen in der gewünschten Dichte auf unbehandelte 6- oder 24-Well Platten wie unter 2.2.1.6 beschrieben ausgesät und bis zum Versuchstag bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Mithilfe der Verdopplungszeit wurde am Versuchstag die Anzahl der Zellen pro Well zum Infektionszeitpunkt errechnet, wobei bei FaDu- und Detroit 562-Zellen von einer Verdopplungszeit von 24 h, bei NP69-Zellen von einer Verdopplungszeit von 30 h ausgegangen wurde. Am Versuchstag erfolgte die Kultur von Bakterien, wie unter 2.2.1.1 beschrieben und über Messung der OD₆₀₀ die Bestimmung der Bakterienzahl pro ml Bakterienkultur. Unmittelbar vor der Infektion wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen, die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen und jedes Well mit frischem Zellkulturmedium befüllt. Die Infektion erfolgte dann unter der Sicherheitswerkbank durch Zugabe von Bakterienkultur in die entsprechenden Wells, sodass sich je nach Versuch eine MOI („multiplicity of infection“) von 30 Bakterien pro Zelle oder 100 Bakterien pro Zelle ergab. Das hierfür geeignete Volumen an Bakterienkultur errechnete sich wie folgt:

$$\text{ml Bakterienkultur pro Well} = \frac{\text{Anzahl Zellen pro Well}}{\text{OD}_{600} \times 10^9} \times \text{gewünschte MOI}$$

Nach Zugabe des errechneten Volumens Bakterienkultur zu den Zellen erfolgte die weitere Inkubation der infizierten und nicht-infizierten Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.3 Gewinnung von hitzeinaktivierten Bakterien für Infektionsversuche

N. meningitidis-Stämme wurden auf Blutagarplatten fraktioniert ausgestrichen und bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurde eine Bakterienkultur in PPM+ erstellt und für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Die OD₆₀₀ der Bakteriensuspension wurde bestimmt, je 500 µl

Bakteriensuspension in 1,5 ml-Reagiergefäße mit einem zusätzlichen Sicherheitsverschluss gegeben und für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der gewünschte Infektionsversuch durchgeführt. Das hierfür geeignete Volumen an Suspension mit hitzeinaktivierten Bakterien wurde aus der vor der Hitzeinaktivierung gemessenen OD₆₀₀ errechnet, sodass sich die gewünschte MOI ergab. Um die Effektivität der Hitzeinaktivierung zu kontrollieren, wurden nach der Infektion je 100 µl der Suspension auf Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.4 Gewinnung und Aufkonzentrierung bakterieller Kulturüberstände

Die gewünschten Bakterienstämme wurden am Abend auf Blutagarplatten fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die dritte Fraktion mit einem sterilen Wattestäbchen abgenommen und in 10 ml DMEM mit 100 µl Kellogg's I+II-Supplement überführt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C im Schüttelinkubator wurde die OD₆₀₀ der Bakterienkultur bestimmt. Ein neues Gefäß mit 20 ml DMEM und 200 µl Kellogg's I+II wurde daraufhin mit einem Volumen der ersten Kultur angeimpft, mit dem sich in der neuen Kultur rechnerisch eine OD₆₀₀ von 0,05 ergab. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert.

Am nächsten Morgen erfolgte die Zentrifugation bei 4 °C und 4000 g für 20 Minuten. Die Überstände wurden sterilfiltriert und zur Aufkonzentrierung der Proteine in 10.000 MWCO-Vivaspin-Tubes überführt, die daraufhin für 20 Minuten bei 20 °C und 4000 g zentrifugiert wurden. Das so erhaltene Proteinkonzentrat wurde aus der Tasche des Vivaspin-Tubes abpipettiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.4.1 Bestimmung des Proteingehaltes der bakteriellen Kulturüberstände

Um den Proteingehalt der verschiedenen bakteriellen Überstände quantitativ zu bestimmen, wurde der Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet. Diesem liegt die Biuret-Reaktion zugrunde, bei der durch Proteine zweiwertige Kupferionen zu einwertigem Kupfer reduziert werden. Diese lassen sich dann durch Zugabe von Bicinchoninsäure (BCA) sensitiv nachweisen, da sich ein intensiv violett gefärbtes Reaktionsprodukt ergibt.

Zur Durchführung wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit BSA (200 µg/ml bis 1200 µg/ml) in A. dest. erstellt, dann wurden die zu messenden Proben im Verhältnis 1/5 ebenfalls mit A. dest. verdünnt. Hierauf wurden von der Verdünnungsreihe und von den Proben jeweils 50 µl in neue Tubes pipettiert und aus den mitgelieferten Lösungen A und B die Reaktionslösung hergestellt. Je 1 ml Reaktionslösung wurde zu den Proben und der Verdünnungsreihe gegeben. Als Leerwert wurden außerdem 50 µl A. dest. mit 1 ml Reaktionslösung versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden jeweils 200 µl Probe in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte gegeben und die Lichtextinktion bei 540 nm am Elisa-Reader gemessen. Aus dem bekannten Proteingehalt der Messpunkte der Verdünnungsreihe wurden mittels Ausgleichsgerade die unbekannt Proteinkonzentrationen der Überstände errechnet.

2.2.5 Gentamicin-Protektionsassay

Um *N. meningitidis*-Isolate auf ihre Fähigkeit zur Adhärenz an die Zielzelle und zur Invasion in die Zelle zu prüfen wurde der Gentamicin-Protektionsassay angewandt.

Hierzu wurden Detroit 562- oder NP69-Zellen in geeigneter Zelldichte (siehe Tab. 2.2) in eine 24-Well-Platte ausgesät und bis zum Erreichen eines konfluenten Monolayers (nach 72 h) bei 37 °C und 5 % CO₂ unter täglicher lichtmikroskopischer Kontrolle kultiviert.

Am Versuchstag wurden Bakterienkulturen für die Infektion vorbereitet und die Zellen nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS in dem für die Infektion geeigneten Medium (siehe Tab. 2.2) aufgenommen. Die Infektion der Zellen erfolgte für alle Zelllinien mit einer MOI von 30 Bakterien pro Zelle.

Nach 2, 4, und 6 h wurden zur Überprüfung der Anzahl freier Bakterien im Überstand, die nicht an einer Zelle anhefteten, Aliquots zu je 1 ml Überstand entnommen und Reihenverdünnungen in 1 x PBS (10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5}) erstellt. Von diesen wurden je 100 μ l auf Blutagarplatten ausplattiert, die dann über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet wurden.

Um die Anzahl adhärenter Bakterien zu bestimmen wurden die Zellen nach 2, 4 und 6 h zweimal mit 1 x PBS gewaschen und durch Zugabe von je 300 μ l 1 % Saponin und Inkubation für 15 Minuten bei 37 °C lysiert. Analog zur Behandlung der Überstände wurden von den Lysaten Reihenverdünnungen in 1 x PBS (10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5}) erstellt, je 100 μ l auf Blutagarplatten ausplattiert und diese über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Zur Bestimmung der Invasion wurde das Medium vorsichtig entfernt, durch frisches Medium mit Antibiotikazusatz (10 % FBS in DMEM mit 200 μ g/ml Gentamicin oder NP69-Medium mit 200 μ g/ml Gentamicin) ersetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach somit erfolgter Abtötung aller extrazellulären Bakterien wurde das Medium abgenommen, die Zellen in 1 x PBS gewaschen und durch Zugabe von 1 % Saponin für 15 Minuten bei 37 °C lysiert. Von diesen Lysaten wurden wiederum Verdünnungsreihen (hier 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3}) erstellt und zu je 100 μ l auf Blutagarplatten ausplattiert, die über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet wurden.

Am Folgetag wurden alle Platten aus dem Brutschrank entnommen, für eine Stunde an der Raumluft getrocknet und am Colony-Counter ausgezählt. Aus den bekannten Verdünnungsfaktoren und dem Volumen, in dem die Bakterien aufgenommen worden waren (1 ml bzw. 0,5 ml für die Überstände, 300 μ l für die Adhärenz- und Invasionsmessungen) wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (colony forming units, CFU) pro ml Überstand oder Zelllysat errechnet.

	Detroit 562	NP69
Auszusäende Zellen	5 x 10 ⁴ pro Well	1 x 10 ⁵ pro Well
Volumen Medium pro Well	1 ml	0,5 ml
Medium für die Infektion	10 % FBS in DMEM	NP69-Medium
Verdopplungszeit	24 Std.	30 Std.
Zellzahl am Versuchstag	ca. 4 x 10 ⁵ pro Well	ca. 5,28 x 10 ⁵ pro Well

Tab. 2.2: Kulturbedingungen von Detroit 562- und NP69-Zellen für den Gentamicin-Protektionsassay im Vergleich.

2.2.6 Propidiumiodid-Färbung zur Analyse des zellulären DNA-Gehaltes

Zur Analyse des Zellzyklus wurde die Propidiumiodidfärbung angewandt. Hierbei wurden die in der Zelle befindlichen DNA-Moleküle mit dem in Nukleinsäuren interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid (PI) angefärbt und die Zellen im Anschluss durchflusszytometrisch gezählt. Über den so ermittelten DNA-Gehalt einer Zelle wurde dann auf die Zellzyklusphase rückgeschlossen, in der sich die Zelle zum Zeitpunkt der Fixierung befunden hat, da der zelluläre DNA-Gehalt im Laufe des Zellzyklus variiert (siehe Abb. 2.2).

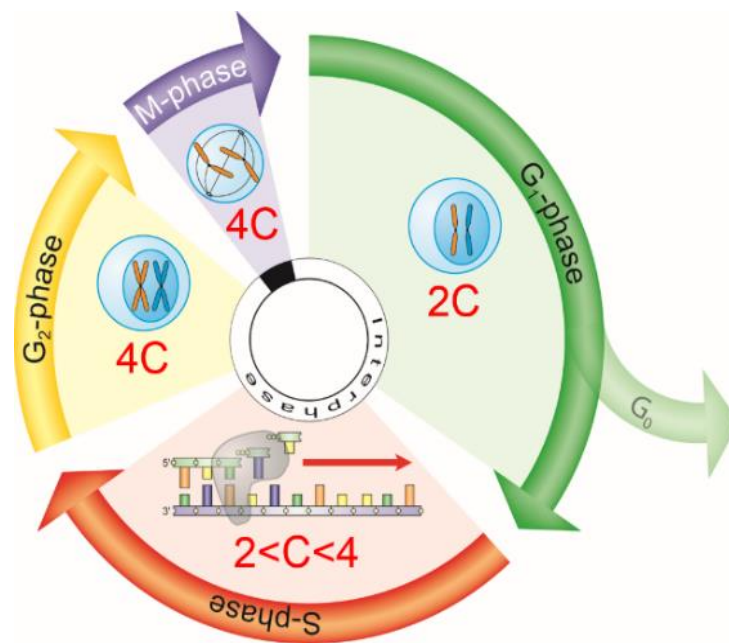


Abb. 2.2: Der variable DNA-Gehalt während der Zellzyklusphasen.

Während der S-Phase verdoppelt sich der DNA-Gehalt einer Zelle von 2 C auf 4 C. Die Quantifizierung der zellulären DNA-Menge ermöglicht daher den Rückschluss auf die Zellzyklusphase, in der sich die Zelle befindet.

Bei der Zählung ergaben sich typischerweise drei Populationen unterschiedlich intensiv angefarbter Zellen, wobei sich zwei Peaks (grün in Abb. 2.3) und eine dazwischenliegende Fläche (gelb in Abb. 2.3) darstellten. Wurde für die Farbintensität des zweiten Peaks ein annähernd doppelt so hoher Wert bestimmt, wie für die Farbintensität des ersten Peaks, wurde davon ausgegangen, dass die erste Population die Zellen in der G₁- (oder G₀-) Phase mit einem DNA-Gehalt von 2 C repräsentierte und der zweite Peak die Zellen in der G₂- und M-Phase mit einem DNA-Gehalt von 4 C. Die Fläche zwischen beiden Peaks wurde den Zellen in der S-Phase zugeordnet, die, je nachdem wie weit die DNA-Synthese zum Fixierungszeitpunkt vorangeschritten war, jeden DNA-Gehalt zwischen 2 C und 4 C haben konnten.

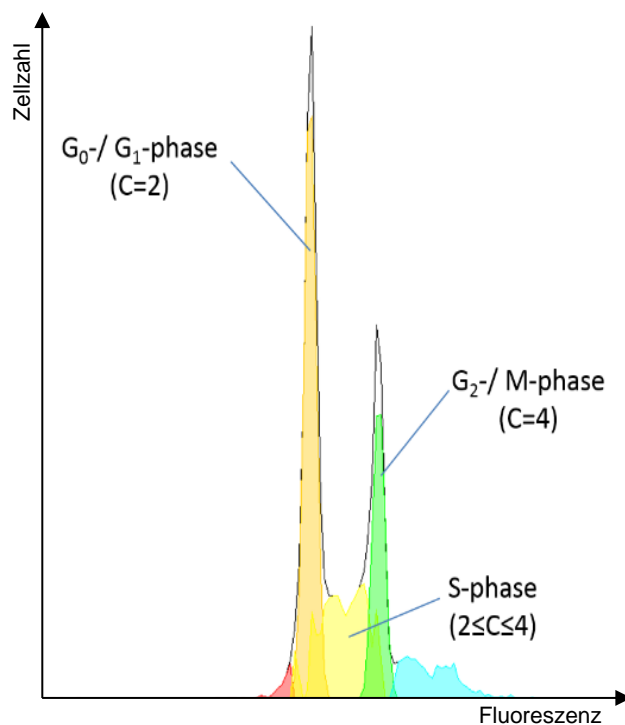


Abb. 2.3: Typisches Histogramm bei PI-Färbung.

Gezeigt ist ein Histogramm nach PI-Färbung nicht infizierter, nicht synchronisierter Detroit 562-Zellen. Die hier dargestellte farbliche Unterlegung der Flächen, die Zuordnung zu den verschiedenen Zellzyklusphasen und die Quantifizierung über die Flächeninhalte unter den Kurven wurden automatisiert durch WEASEL (Version 3.1) durchgeführt.

Zur Durchführung des Versuchs wurden 24 Stunden vor dem Infektionszeitpunkt die gewünschten Zellen in geeigneter Dichte in eine 6-Well-Platte ausgesät (siehe Tab. 2.3).

Um zu gewährleisten, dass die Zellen bis zum Ende des Versuchs (24 oder 30 h nach der Infektion) noch immer proliferativ sein und von neuem in den Zellzyklus eintreten würden, erfolgte am Versuchstag zunächst eine lichtmikroskopische Begutachtung, wobei kontrolliert wurde, dass die Zellen keinen konfluenten Monolayer gebildet, sondern einen Konfluenzgrad von höchstens 60 % erreicht hatten (vgl. Abb. 2.4).

War dies der Fall, wurden die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen, in einer geeigneten Menge Infektionsmedium (siehe Tab. 2.3) aufgenommen und mit einer MOI von 100 infiziert. Um eine bakterielle Überwucherung zu verhindern, wurde 6 h nach der Infektion das bakterienhaltige Medium durch frisches Medium mit Antibiotikazusatz (10 % FBS in DMEM mit 200 µg/ml Gentamicin oder NP69-Medium mit 200 µg/ml Gentamicin) ersetzt.

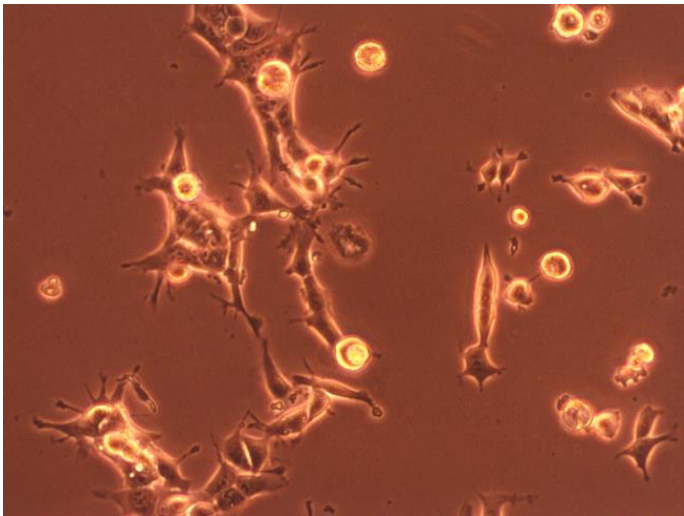


Abb. 2.4: Detroit 562-Zellen direkt vor der Infektion für eine PI-Färbung.

Zu den gewünschten Untersuchungszeitpunkten wurden die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen und zur Ablösung der Zellen in jedes Well 200 μ l Trypsin/EDTA gegeben. Nach Inkubation bei 37 °C für eine angemessene Zeit wurde das Trypsin durch Hinzugeben von 600 μ l Neutralisationsmedium (siehe Tab. 2.3) antagonisiert, die Zellen in 2 ml-Eppendorf-Tubes überführt und für 5 Minuten bei 2400 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 1 ml 1 x PBS resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Nach erneutem Abnehmen des Überstandes wurde das Zellpellet in 500 μ l 1 x PBS aufgenommen, die Zellsuspension langsam tröpfchenweise in ein FACS-Tube mit 4,5 ml 4 °C kaltem 70 % Ethanol gegeben und bei 4 °C für mindestens 1 h fixiert.

Danach wurden die Zellen bei 4000 g für 5 Minuten zentrifugiert, das Ethanol abgegossen und das Zellpellet in 1 ml 1 x PBS resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und die Zellen zur Permeabilisierung der Zellmembran in 300 μ l 0,05 % Triton-X in 1 x PBS aufgenommen. Um zelluläre RNA zu eliminieren, die ebenfalls durch PI interkaliert und angefärbt würde, wurden 3 μ l RNase A (10 mg/ml) zugegeben, für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und die Zellen schließlich durch Zugabe von 30 μ l PI (1 mg/ml) angefärbt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C erfolgte die durchflusszytometrische Zellzählung, wobei zur Detektion des PI aufgrund der

maximalen Exzitation bei 536 nm und der Emission von rotem Licht (617 nm) der FL-3-Kanal verwendet wurde.

Die Messung des Verhältnisses der Färbungsintensität der beiden Peaks sowie die Quantifizierung der Zellpopulationen in den verschiedenen Zellzyklusphasen wurden automatisiert mithilfe des Softwareprogramms WEASEL 3.1 durchgeführt.

	FaDu	Detroit 562	NP69
Volumen Medium pro Well	2 ml	2 ml	1 ml
Kulturmedium	FaDu-Medium	Detroit-Medium	NP69-Medium
angenommene Verdopplungszeit	24 h	24 h	30 h
Zellzahl am Versuchstag	ca. 4×10^5 pro Well	ca. 4×10^5 pro Well	$3,5 \times 10^5$ pro Well
Medium für die Infektion	10 % FBS in DMEM	10 % FBS in DMEM	NP69-Medium
Trypsinisierungszeit	3 min.	5-7 min.	2-3 min.
Medium für die Neutralisierung	10 % FBS in DMEM	10 % FBS in DMEM	2 % FBS in NP69-Medium

Tab. 2.3: Kulturbedingungen von FaDu-, Detroit 562- und NP69-Zellen für PI-Färbungen im Vergleich.

2.2.7 Zellzyklusanalyse mit Detroit 562-Zellen mittels EdU-Färbung

Als weitere Methode zur Differenzierung von Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen wurde die Färbung mit Ethinyl-deoxy-Uridin (EdU; Abb. 2.5) angewendet. Anders als Propidiumiodid ist dieses selbst ein Nukleosidanalogen und kann durch DNA-Polymerasen anstelle von Deoxy-Thymidin in zelluläre DNA inkorporiert und im Anschluss mittels Azid/Alkin-Clickreaktion angefärbt werden (Abb. 2.6 und 2.7).

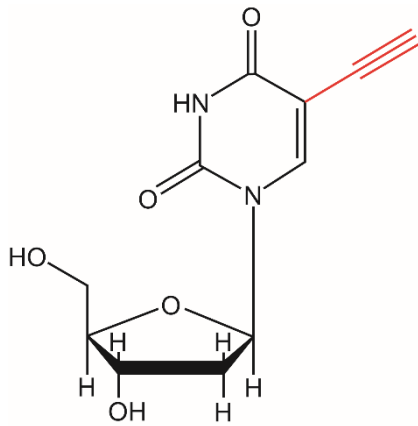


Abb. 2.5: Ethynyl-deoxy-Uridin (EdU). Das Thymidin-Analogon enthält einen für die Azid/Alkin-Clickreaktion erforderlichen Alkin-Rest (rot).

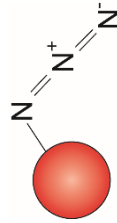


Abb. 2.6: Azid-konjugierter Farbstoff. Als Farbstoff wurde Alexa-Fluor 488 verwendet.

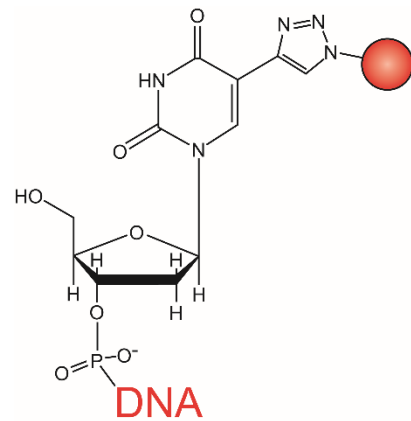


Abb. 2.7: EdU nach der Clickreaktion. Das in die DNA inkorporierte EdU bildet durch die Azid/Alkin-Clickreaktion eine stabile Verbindung mit dem Farbstoff.

Da die DNA-Polymerisation sich während der S-Phase abspielt ist davon auszugehen, dass Zellen, in denen EdU nachgewiesen werden kann, sich im Zeitraum zwischen EdU-Zugabe und Fixierung in der S-Phase befunden haben, oder zumindest in sie ein- oder aus ihr ausgetreten sind. Die gleichzeitige Anfärbung mit einem DNA-interkalierenden Farbstoff wurde durchgeführt, um eine Differenzierung der EdU-negativen Zellen in G₁- und G₂-Phase-Zellen vornehmen zu können.

Zur Durchführung wurden 24 Stunden vor dem geplanten Infektionszeitpunkt Detroit 562-Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät (2×10^5 Zellen in 2 ml Detroit-Medium pro Well).

Vor der Infektion wurden die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen und in 2 ml 10 % FBS in DMEM pro Well aufgenommen. Dann erfolgte die Infektion mit einer MOI von 100. Sechs Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und das bakterienhaltige Medium durch das gleiche Volumen Detroit-Medium mit Zusatz von 200 µg/ml Gentamicin ersetzt. Zwei Stunden vor dem gewünschten Untersuchungszeitpunkt wurden je 4 µl EdU (10 mM) zu den Zellen

gegeben (Endkonzentration 20 μM EdU) und für 2 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Danach wurde das EdU-haltige Medium verworfen, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und durch Inkubation mit 200 μl Trypsin-EDTA für 5-7 Minuten bei 37 °C vom Boden abgelöst. Nach Zugabe von 600 μl 10 % FBS in DMEM wurden die Zellen in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und für fünf Minuten bei 2400 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 1 ml 1 x PBS gewaschen und ein weiterer Zentrifugationsschritt angeschlossen. Das nun entstandene Pellet wurde in 500 μl 1 x PBS resuspendiert und zur Fixierung langsam tröpfchenweise in ein FACS-Tube mit 4,5 ml 4 °C kaltem 70 % Ethanol überführt. Nach 15 Minuten Fixierung bei 4 °C wurden die Zellen erneut bei 4000 g für fünf Minuten zentrifugiert, das Ethanol abgegossen und die Zellen in 1 ml 1 x PBS resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellpellets in 200 μl 0,05 % Triton X-100 in PBS resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Der im Click-iT[®] EdU Alexa Fluor[®] 488 Imaging Kit mitgelieferte Click-iT-Cocktail wurde durch Zugabe von AlexaFluor- 488-Azid-Konjugat vorbereitet, je 500 μl der Lösung zu den Zellsuspensionen gegeben und für 30 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter größtmöglicher Abschirmung von Licht. Die Proben wurden mit je 1 ml 1 x PBS vermischt und bei 4000 g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde in 300 μl 1 x PBS resuspendiert und jeder Probe 3 μl RNase A (10 mg/ml) zugegeben. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C erfolgte die Zugabe von 2 μl DNA-interkalierendem FxCycle Far Red Stain (200 μM) und die erneute Inkubation für 30 Minuten bei 4 °C. Darauf folgte die durchflusszytometrische Zählung der doppelt angefärbten Zellen. Für die Detektion des EdU-gebundenen AlexaFluor 488, welches mit einer Wellenlänge von 519 nm im cyan-grünen Bereich emittiert, wurde der FL-1 Kanal verwendet, für den FxCycle Far Red Stain (Emission bei 658 nm) der FL-4 Kanal.

Zur Auswertung wurden die Zellen mit CellQuest Pro ausgezählt. Wurde zur Zählung der S-Phase-Zellen allein die Färbung mit EdU detektiert, resultierten zwei Populationen von Zellen, nämlich EdU-positive S-Phase-Zellen und EdU-

negative Zellen in der G₁-, G₂- oder M-Phase (siehe Abb. 2.8). Zur Quantifizierung wurde ein Gate eingesetzt, das die beiden Populationen voneinander trennte und für alle weiteren gemessenen Proben nicht mehr

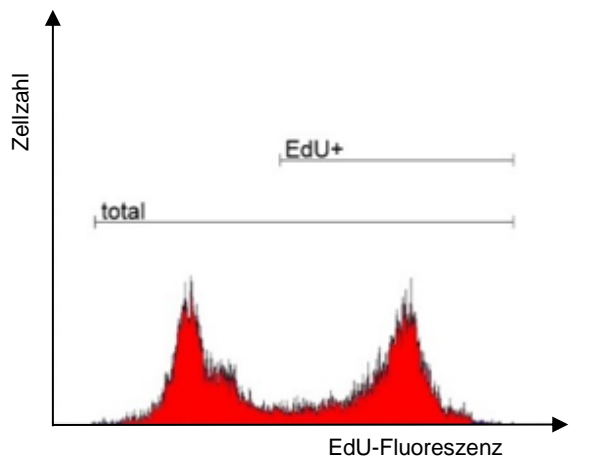


Abb. 2.8: EdU-Färbung. Für alle Proben wurde dasselbe Gate für EdU-positive Zellen verwendet.

verändert wurde.

Wurden die Signalintensitäten beider Farbstoffe in einem Diagramm aufgetragen, so entstanden drei Populationen, welche die Zellen in der G₁-Phase (EdU negativ, geringerer DNA-Gehalt), in der S-Phase (EdU-positiv, jeder DNA-Gehalt zwischen 2 C und 4 C möglich) und der G₂- bzw. M-Phase (EdU-negativ, höherer DNA-Gehalt) repräsentierten (siehe Abb. 2.9).

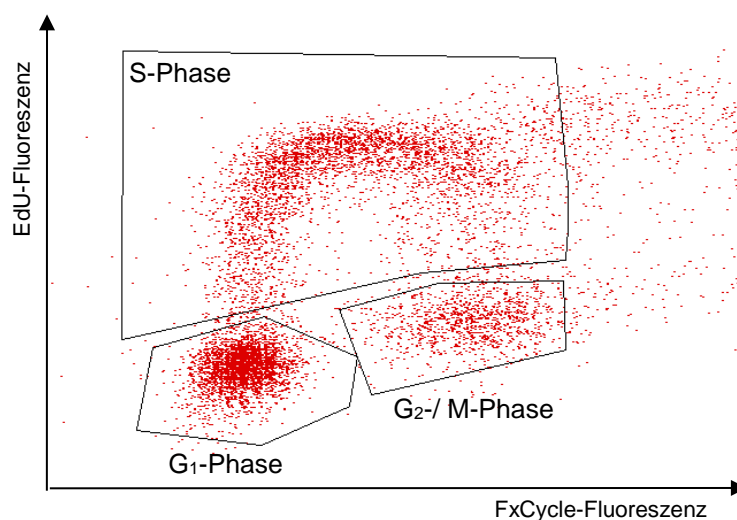


Abb. 2.9: EdU- und FxCycle-Färbung.

Durch die zusätzliche Messung des DNA-Gehaltes mittels FxCycle-Färbung wurden die EdU-negativen Zellen hinsichtlich der Zellzyklusphase weiter differenziert.

2.2.8 Protein-Überexpression in *Escherichia coli*

Zur Überexpression von Proteinen (Opa-Proteine und Opc-Protein) wurden der *E. coli*-Kontrollstamm (BL21) und der entsprechende *E. coli*-Expressionsstamm (*E. coli* Opa 1, *E. coli* Opa2, *E. coli* Opa3, *E. coli* Opa4 sowie *E. coli* Opc [204]) in je 30 ml LB-Medium mit oder ohne Zusatz von 30 µg/ml Kanamycin aufgenommen und über Nacht bei 37 °C und unter 220 rpm angezogen.

Am Folgetag wurden 20 ml kanamycinhaltiges sowie antibiotikafreies LB-Medium mit 1 ml der Übernacht-Kultur versetzt und bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) für eine Stunde inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und der Ansatz für weitere 2 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der OD₆₀₀ der *E. coli*-Stämme und die Infektion von Detroit 562-Zellen mit einer MOI von 100 analog der Infektion Meningokokken wie unter 2.2.2 beschrieben. Der weitere Versuchsablauf zur Analyse des Einflusses auf den Zellzyklus erfolgte durch PI-Färbungen wie unter 2.2.6 ausgeführt.

Zur Kontrolle der Überexpression wurden vor der Zugabe von IPTG und vor der Infektion jeweils Aliquots entnommen, von denen Bakterienlysate mit 1×10^8 Bakterien pro 100 µl Lysat hergestellt wurden (siehe 2.2.10). Die Analyse der Überexpression erfolgte anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

2.2.9 Herstellung von Zelllysaten der Zelllinie Detroit 562

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden Detroit 562-Zellen mit einer MOI von 100 infiziert und wie bei den übrigen Zellzyklusanalysen weiterbehandelt (vgl. 2.2.6). Zum gewünschten Untersuchungszeitpunkt wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und in jedes Well 80 µl 2x-Stop-Mix gegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurden die so gewonnenen Zelllysate in Eppendorf-Tubes überführt und zur Denaturierung für 10 Minuten bei 100 °C gekocht. Die Lysate wurden hierauf direkt für Versuche weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.2.10 Herstellung bakterieller Lysate

Die gewünschten Bakterienstämme wurden zunächst auf Blutagarplatten fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde die dritte Fraktion mit einem sterilen Wattestäbchen abgenommen und 1 ml PBS mit den Bakterien angeimpft. Mittels Bestimmung der OD₆₀₀ wurde der Bakteriengehalt der Suspension bestimmt, wobei eine OD₆₀₀ von 1,0 einer Anzahl von 10⁹ Bakterien/ml entspricht. Das Volumen Bakteriensuspension, das rechnerisch 10⁸ Mikroorganismen enthielt, wurde in ein Eppendorf-Tube gegeben und bei 2400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Bakterienpellet in 100 µl 2 x Stop-Mix aufgenommen. Zur Denaturierung der Proteine wurde das Lysat für 10 Minuten bei 100 °C gekocht und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

2.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen aus Zell- oder Bakterienlysaten nach Molekülgröße wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, an die ein Western blot oder eine Coomassie-Färbung angeschlossen wurde.

Zur Herstellung der Proteingele wurde das Minigel-Twin System von Biometra verwendet. Die Trenngele besaßen je nach Größe des zu untersuchenden Proteins eine Polyacrylamid-Konzentration zwischen 10 % und 15 % (für alle hier getesteten zellzyklusrelevanten Proteine 12 %). Für das Sammelgel wurden stets 4,2 % Polyacrylamid eingesetzt (Tab 2.4). Zunächst wurden die Gelkammern mit je 4,5 ml Trenngel befüllt, dieses 70 % Ethanol überschichtet und für 30 Minuten unter dem Abzug belassen. Nach der kompletten Polymerisation des Gels wurde das Ethanol entfernt und nach mehrmaligem Auswaschen der Kammer mit A. dest. das Sammelgel über das Trenngel gegossen. In das flüssige Sammelgel wurde der Kamm eingeschoben die Polymerisation für 15 Minuten abgewartet, dann der Kamm und die Gummiabdichtung entfernt und schließlich 5 µl Proteinmarker bzw. ein adäquates Volumen an Lysat in die Geltaschen geladen.

Dann wurden die Gelkammern in die Elektrophoresekammer eingespannt, diese mit 1 x SDS-Puffer befüllt und zunächst 120 V angelegt. Bei Erreichen des Trenngels und beginnender sichtbarer Auftrennung der Proteinbanden wurde die Spannung auf 160 V erhöht. Nach ausreichender Auftrennung wurden die Gele den Kammern entnommen und für Coomassie-Färbungen oder Western Blots weiterverwendet.

	Ansatz für 2 Gele	
	Sammelgel	12 % Trenngel
30 % Polyacrylamid	0,7 ml	4,0 ml
1,5 M Tris HCl pH 8,8		2,5 ml
0,5 M Tris HCl pH 6,8	1,25 ml	
20 % SDS	25 µl	50 µl
16 % APS	30 µl	60 µl
TEMED	5 µl	10 µl
A. dest.	3,0 ml	3,4 ml

Tab. 2.4: Schema zur Herstellung Sammel- und 12 %- Trenngelen für die SDS-PAGE

2.2.12 Coomassie-brilliant-blue-Färbung von Proteingelen

Die Anfärbung mit Coomassie-brilliant-blue wurde zur Visualisierung aller in einem Proteingel befindlichen Proteine eingesetzt. Nachdem die gewünschten Überstände, Zell- oder Bakterienlysate und der Proteinmarker mittels SDS-PAGE in einem 12 % Polyacrylamid-Gel aufgetrennt worden waren, wurde das Trenngel vom Sammelgel abgeschnitten und in einer Plastikschiene auf dem Schüttler mit Coomassie inkubiert. Nach einer Stunde wurde der Farbstoff verworfen und das Gel mehrmals für jeweils 20 Minuten mit Coomassie-Entfärber auf dem Schüttler gewaschen. Bei ausreichender Entfärbung des Hintergrundes und klarer Abgrenzbarkeit der Proteinbanden wurde das angefärbte Gel zur Dokumentation fotografiert.

2.2.13 Western Blot

Der selektive Nachweis und die Quantifizierung eines bestimmten Proteins erfolgten durch Markierung mit spezifischen Antikörpern mittels Western Blot. Hierzu wurde zunächst eine SDS-PAGE durchgeführt, das Sammelgel vom Trenngel abgeschnitten und dieses auf eine Nitrocellulosemembran aufgelegt. Trenngel und Nitrocellulosemembran wurden dann in eine Blotkammer mit den zugehörigen Schwämmen und mit in Western Blot-Puffer getränktem Filterpapier eingespannt. Nach Einsetzen eines Kühlelementes wurde die Blotkammer mit kaltem (4 °C) Western Blot-Puffer aufgefüllt und durch Anlegen einer Spannung, mit der sich eine Stromstärke von 350 mA ergab, der Transfer der Proteine auf die Membran für 1 h durchgeführt. Danach wurde die Membran für 1 h in 12 ml Blocking-Medium (5 % Magermilchpulver in 1 x TBS-T oder 5 % BSA in 1 x TBS-T) auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische freie Proteinbindungsstellen abzusättigen, und anschließend der Erstantikörper gegen das nachzuweisende Protein in 10 ml Blocking-Medium zu der Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte auf dem Schüttler bei 4 °C über Nacht.

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten mit 1 x TBS-T gewaschen und der Zweitantikörper in 10 ml Blocking-Medium unter Schütteln inkubiert. Dieser ist gegen Antikörper der Spezies gerichtet, der der Erstantikörper entstammt und mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish-peroxidase, HRP) konjugiert, welche später die Luminolreaktion katalysiert und den Proteinnachweis durch Chemilumineszenz ermöglicht. Nach 1 h Inkubation wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten in 1 x TBS-T gewaschen, 1 ml luminolhaltiger ECL-Detektionsmix auf die Membran gegeben und die Chemilumineszenz nach einer Minute Einwirkzeit im Chemidoc-Geldokumentationssystem detektiert.

Die anschließende Analyse und Quantifizierung der Bandenintensität wurde mit ImageJ® durchgeführt.

2.2.14 Immunfluoreszenz mit Detroit 562-Zellen

Zur Visualisierung zellulärer Proteine mittels Immunfluoreszenz wurden Detroit 562-Zellen in einer Dichte von $0,75 \times 10^5$ Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte auf Deckgläser (Durchmesser 12 mm), die zuvor mit 70 % Ethanol gereinigt wurden, ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

24 h nach dem Aussäen erfolgte die Infektion der Zellen mit einer MOI von 100, wobei wiederum 6 h nach dem Infektionszeitpunkt das bakterienhaltige Medium aus den Wells entfernt wurde, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und dann in je 1 ml Detroit-Medium mit Zusatz von 200 µg/ml Gentamicin aufgenommen wurden. Zum gewünschten Untersuchungszeitpunkt wurde das Medium verworfen, die Zellen in 1 x PBS gewaschen und für 20 Minuten mit 3,7 % para-Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 x PBS wurden die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur durch Zugabe von 0,1 % Triton-X100 permeabilisiert. Die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen erfolgte dann, nach einem weiteren Waschschrift mit 1 x PBS, durch Zugabe von Blocking Puffer (PBS mit 2 % BSA und 1 % FBS) zu den fixierten Zellen. Nach 45 Minuten Einwirkzeit wurde der Erstantikörper, verdünnt in 200 µl Blocking-Puffer, zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag folgten drei Waschschrift mit 1 x PBS und die Inkubation mit 200 µl farbstoffkonjugiertem Zweitantikörper (1/200 in Blocking-Puffer) für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS wurden je 300 µl DAPI (1/10.000 in PBS) zu den fixierten Zellen gegeben und für 5 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Zellen wiederum dreimal in 1 x PBS gewaschen, die Deckgläser aus den Wells entnommen, an der Luft getrocknet und mit einem Tropfen FluoPrep® auf einem Objektträger befestigt. Nach Aushärtung für eine Stunde bei 4 °C erfolgten die Mikroskopie und die fotografische Dokumentation.

2.2.15 Extraktion genomischer DNA aus *N. meningitidis* Isolaten

Für die Extraktion genomischer DNA aus *N. meningitidis*-Isolaten diente der QIAmp DNA Mini Kit der Firma Qiagen. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

Der *N. meningitidis*-Stamm am wurde Vorabend auf eine Kochblutagarplatte fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet.

Einige Kolonien wurden entnommen und in 180 µl des mitgelieferten ATL-Puffers gegeben. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K wurde die Probe bis zur vollständigen Lyse der Bakterien unter Schütteln auf 56 °C erhitzt. Dem Lysat wurden 4 µl RNase A (100 mg/ml) zugesetzt und gründlich vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten bei Raumtemperatur wurden 200 µl AL-Puffer zugegeben, für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert und der Probe anschließend 200 µl 99,8 % Ethanol zugesetzt. Die gesamte Probe wurde auf eine QIAmp Mini spin Säule pipettiert und 500 µl AW1-Puffer hinzugefügt. Nach Zentrifugation der Säule mit 6000 g für eine Minute wurde die Säule erneut mit 500 µl AW1-Puffer beladen und nochmals zentrifugiert. Dann wurde die Säule in ein sauberes 2 ml-Tube eingesetzt und für 3 Minuten bei 20.000 g und abschließend für 1 Minute bei maximaler Rotationsgeschwindigkeit zentrifugiert. Darauf wurde die Säule mit 200 µl AE-Puffer beladen und nach einer Einwirkzeit von 5 Minuten für 1 Minute bei 6000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde in ein neues 1,5 ml-Tube gegeben, der letzte Zentrifugationsschritt nochmals wiederholt und schließlich der DNA-Gehalt des Eluates mittels Nanodrop bestimmt.

2.2.16 PCR zum Nachweis des *opcA*-Gens in bakterieller genomischer DNA

Für die spezifische Amplifizierung von DNA-Fragmenten zum Nachweis des *opcA*-Gens wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet. Als Matrize („template“) diente die extrahierte genomische DNA aus den kolonisierenden *N. meningitidis*-Stämmen α 711 und α 4. Als Positivkontrolle wurde *N. meningitidis* MC58 verwendet, als Negativkontrolle 8013/Klon 12.

25 µl PCR-Ansatz enthielten 2,5 µl 10 x PCR-Puffer (Qiagen), 1 µl Magnesiumsulfat (50 mM), je 0,5 µl von beiden Primern, 0,5 µl dNTPs (10mM, New England Biolabs), 0,1 µl *Taq* DNA-Polymerase (New England Biolabs) sowie 100 ng genomische DNA (siehe Tab 2.5). Die hier verwendeten Oligonukleotid-Primer sind tabellarisch unter Angabe der Sequenzen in Kapitel 2.1.8 aufgeführt.

Das PCR-Protokoll umfasste folgende Schritte: initiale Denaturierung bei 94 °C für 1 Minute, darauf folgend 35 Zyklen, bestehend aus einer weiteren Denaturierung für 15 Sekunden bei 94 °C, dem Primer-Annealing für 30 Sekunden sowie der Elongation bei 68 °C (siehe Tab. 2.6). Die Annealing-Temperatur wurde für die jeweils verwendeten Primerpaare berechnet, wobei die Temperatur zunächst auf 5 °C unter der niedrigeren Schmelztemperatur T_m der beiden Primer eingestellt und später gegebenenfalls nachjustiert wurde. Die Schmelztemperatur wird dabei vom Hersteller angegeben oder wurde alternativ ausgehend von der Nukleotidsequenz errechnet mithilfe der Formel:

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Die Elongationsdauer wurde in Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentlänge eingestellt, wobei der Berechnung eine durchschnittliche DNA-Syntheserate von 1 kb/min für die *Taq* DNA-Polymerase zugrunde gelegt wurde.

Mastermix (Volumina pro gDNA-Probe)	
10 x Reaktions-Puffer	2,5 µl
MgSO ₄ (50 mM)	1,0 µl
Primer	0,5 µl (jeweils)
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,1 µl (erst unmittelbar vor der Reaktion zuzugeben)

Tab. 2.5: PCR - Ansatz für den Mastermix

Programmierung des Thermocyclers		
Initiale Denaturierung	94 °C	1 Min.
35 Zyklen	Denaturierung	94 °C
	Annealing	55 °C
	Elongation	68 °C
Nach Abschluss	4 °C	unbestimmt

Tab. 2.6: PCR - Programmierung des Thermocyclers

2.2.17 Reinigung, Analyse und Sequenzierung von DNA

2.2.17.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 60 ml 1 x TBE mit 1 % Agarose erhitzt, mit 6 µl Gelred Nucleic acid stain versetzt, in eine Form gegossen und die Polymerisation abgewartet. Dann wurde das Gel in eine Gelkammer eingesetzt und mit 1 x TBE überschichtet. Nach erfolgter PCR wurden zu den PCR-Produkten je 5 µl 6 x Agarose-Puffer gegeben und 7 µl der entsprechenden Probe bzw. 5 µl SL-DNA-Ladder in die Geltaschen pipettiert. Die Separierung der in den Proben enthaltenen DNA-Fragmente erfolgte durch Anlegen von 120 V über 40 Minuten. Die resultierenden Banden wurden mithilfe des Chemidoc-Geldokumentationssystems detektiert und fotografisch dokumentiert.

2.2.17.2 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen und Konzentrationsbestimmung

Für weitergehende Anwendungen (hier die DNA-Sequenzierung) wurden die PCR-Produkte zunächst gelelektrophoretisch analysiert und anschließend die Extraktion der gewünschten Bande aus dem Gel mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits (Qiagen) entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Nach erfolgter Agarose-Gelelektrophorese wurde die zu untersuchende Bande mit einem Skalpell unter UV-Durchleuchtung aus dem Gel geschnitten und das Gewicht des Gelfragmentes bestimmt. Dann wurde das Dreifache des

Gelvolumens an mitgeliefertem QG-Puffer zu dem Gel gegeben und das Gemisch unter mehrmaligem Schütteln bis zur vollständigen Lösung bei 50 °C inkubiert. Zur Ausfällung der DNA wurde ein Gelvolumen Isopropanol zugegeben, vermischt und eine QIAquick-Säule mit der Lösung beladen. Nach Zentrifugation (1 Min., Raumtemperatur, 15.000 g) wurde die an die Säule gebundene DNA mit 500 µl PE-Puffer gewaschen und nochmals zentrifugiert (1 Min., Raumtemperatur, 15.000 g). Um schließlich die gebundene DNA aus der Säule zu eluieren, wurde diese in ein frisches 1,5ml-Tube eingesetzt und nach Zugabe von 50 µl A. dest. erneut für eine Minute zentrifugiert (1 Min., Raumtemperatur, 15.000 g).

2.2.17.3 Sequenzierung

Mit der Sequenzierung wurde das DNA-Labor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg beauftragt. Es wurden 50 ng genomische DNA sowie das Primerpaar RA3/RA4 eingereicht und zur Sequenzierung an GATC (Köln, D) verschickt.

2.2.17.4 Sequenzierauswertung

Die Rohsequenzdaten wurden mit Hilfe der Software-Programmpakete Pregap4 und Gap4 analysiert. Die DNA-Sequenzen wurden mit der Datenbank („Genbank“) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter Verwendung des „Basic Local Alignment Search Tools“ (BLAST) abgeglichen [222], wozu BioEdit (V. 7.2.5) verwendet wurde.

2.2.18 RNA-Isolation aus Detroit 562-Zellen

Die Präparation von mRNA aus Wirtszellen (hier Detroit 562-Zellen) erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kits entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Das Medium wurde von den zu untersuchenden Zellen abgenommen, die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen und mit 200 µl Trypsin/EDTA bei 37 °C für 5-7 Minuten trypsinisiert. Die Neutralisierung des Trypsins erfolgte durch Zugabe von 600 µl Detroit-Medium. Nach Überführung der Zellen in ein 2 ml-Tube und Zentrifugation für 5 Minuten bei 300 g wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 350 µl RLT-Puffer lysiert, das Lysat auf eine QIAshredder spin-Säule pipettiert und für 2 Minuten bei 13.000 rpm (16.156 g) zentrifugiert. Das Lysat wurde anschließend mit 350 µl Ethanol (70%) vermischt, auf eine RNeasy mini spin-Säule gegeben und bei 10.000 rpm (9560 g) für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule mit 700 µl RW1-Puffer beladen und erneut für 15 Sekunden bei 10.000 rpm (9560 g) zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl RPE-Puffer auf die Säule erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 10.000 rpm (9560 g) für 15 Sekunden. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt und die Säule im Anschluss für eine Minute bei maximaler Rotationsgeschwindigkeit trocken zentrifugiert. Nach Einsetzen in ein neues Tube wurden schließlich 30 µl nukleasefreies Wasser auf die Säule pipettiert, eine Minute bei 10.000 rpm (9560 g) zentrifugiert und die RNA-Konzentration des Eluates mittels NanoDrop-Spektrophotometer bestimmt. Unmittelbar anschließend erfolgte die Überprüfung der RNA-Integrität mittels Agilent 2100 Bioanalyser-System. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA-Proben bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.19 Bestimmung der RNA-Integrität mittels Agilent 2100 Bioanalyser

Um zu analysieren, ob und in welchem Ausmaß Degradierungsprozesse in den RNA-Proben durch ubiquitär vorkommende RNasen stattgefunden haben und so das Ergebnis der Quantifizierung verfälschen könnten, wurde die RNA Integrity

Number (RIN) mittels Agilent Bioanalyzer System bestimmt. Hierbei findet auf einem Mikrochip eine elektrophoretische Trennung der in der Probe enthaltenen RNA-Moleküle statt. Das entstandene Bandenmuster wird dann nach einem automatisierten Algorithmus, in den die Intensitäten der verschiedenen Banden eingehen, ausgewertet, wobei auf den Gehalt an fragmentierter RNA rückgeschlossen werden kann und die RIN bestimmt wird.

Die Durchführung erfolgte dem Protokoll des Herstellers entsprechend. 65 µl der im Kit enthaltenen Gel-Matrix wurden mit 1 µl RNA-Farbstoff-Konzentrat versetzt und für zehn Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Die Chip-Priming-Station wurde mit einer Spritze versehen und der RNA-Chip eingesetzt. Dann wurden 9 µl des Gel-Farbstoff-Gemisches in die dafür vorgesehene Öffnung des Chips gegeben, durch Herunterdrücken des Spritzenstempels für 30 Sekunden Druck auf das System ausgeübt und anschließend jeweils 9 µl Gel-Farbstoff-Gemisch in die beiden entsprechenden Öffnungen pipettiert. Nach Beladung aller Proben-Wells und des RNA-Ladder-Wells mit je 5 µl RNA-Marker wurden in die Proben-Wells je 1 µl RNA-Probe, in das RNA-Ladder-Well 1 µl RNA-Ladder und in alle nicht verwendeten Wells je 1 µl RNA-Marker gegeben. Schließlich wurde der Chip für eine Minute bei 2400 rpm geschüttelt und in das Agilent 2100 Bioanalyzer-System eingesetzt, in dem automatisiert die elektrophoretische Auftrennung und die Auswertung erfolgten.

2.2.20 Synthese von cDNA aus zellulärer RNA

Für die cDNA-Erststrangsynthese aus mRNA wurde der Super Script II Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem beiliegenden Protokoll. Zunächst wurden 1 µg RNA mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl verdünnt und 0,5 µl Random Primer Nona (5 µg/µl) zugegeben. Dieser enthält Nonanukleotide in zufälliger Sequenz, die beim späteren Umschreiben der RNA in cDNA an allen möglichen Stellen der RNA als Primer dienen. Nach Inkubation für 5 Minuten bei 70 °C wurden die

Proben kurz auf Eis abgekühlt und 20 µl der RNA-Probe zu je 20 µl Mastermix (Tab. 2.7) gegeben.

Mastermix für cDNA-Synthese		pro RNA-Probe
DTT	100 mM	0,4 µl
5x first strand buffer		8 µl
RNase freies Wasser		5,6 µl
dNTPs	10 mM	je 1 µl (insgesamt 4 µl)
RNase out		1 µl
Super Script II reverse Transkriptase		1 µl

Tab. 2.7: Umschrieb von RNA in cDNA - Mastermix-Ansatz

Nach zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die cDNA-Synthese bei 42 °C für zwei Stunden. Anschließend wurden die Proben nochmals für 15 Minuten auf 70 °C erhitzt, um die beteiligten Enzyme wieder zu inaktivieren. Zum Abbau noch vorhandener RNA wurden zu jeder Probe 2 µl DNase-freie RNase gegeben und bei 37 °C für 45 Minuten inkubiert, woraufhin schließlich die Aufreinigung der gewonnenen cDNA erfolgte.

2.2.21 Aufreinigung von cDNA mithilfe des QIAquick PCR Purification Kit

Die Aufreinigung erfolgte mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits von Qiagen. Jede Probe wurde mit 210 µl des mitgelieferten PB-Puffers verdünnt und auf eine Säule pipettiert. Nach einer Minute Zentrifugation bei 15.000 g wurde der Durchfluss verworfen, die Säule mit 750 µl PE-Puffer beladen und nochmals bei 15.000 g für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen, die Säule trocken zentrifugiert und nach erneutem Verwerfen des Durchflusses nochmals trocken zentrifugiert. Dann wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-Tube eingesetzt, 40 µl A. dest. auf die Säulenmitte pipettiert und erneut bei 15.000 g für eine Minute zentrifugiert. Nach spektrophotometrischer Messung der DNA-Konzentration am Nanodrop wurde die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.22 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) zur Quantifizierung der Cyclin-Transkription in Detroit 562-Zellen

Die qRT-PCR wurde durchgeführt, um zu analysieren, ob die bakterielle Infektion von Detroit 562-Zellen einen Einfluss auf die Expression der Cycline hat. Verwendet wurden hierzu die cDNA-Proben, die zuvor von der RNA infizierter und nicht infizierter Detroit 562-Zellen umgeschrieben worden waren.

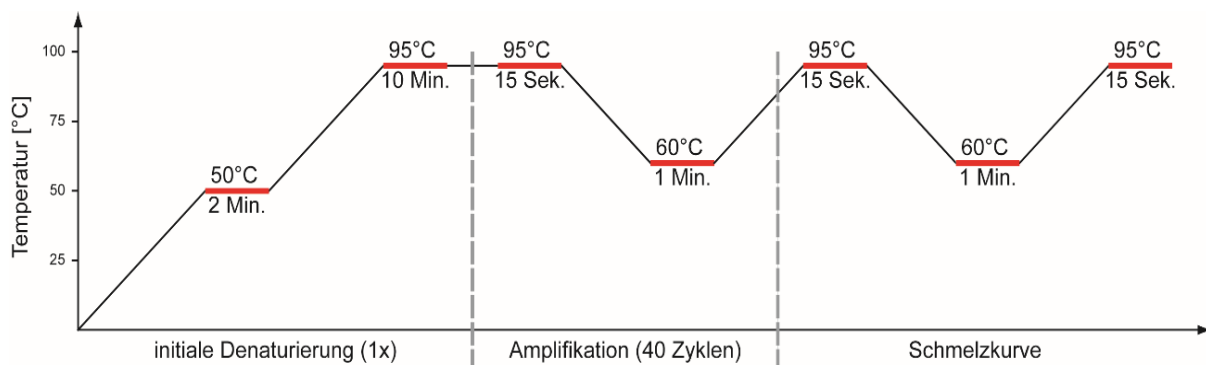
Das Prinzip der qRT-PCR besteht darin, dass die Menge des bei der PCR entstehenden PCR-Produktes durch Zugabe eines Farbstoffes messbar gemacht wird. Aus ihr kann auf die Menge der in der Probe enthaltenen cDNA mit der zu amplifizierenden Sequenz rückgeschlossen werden, die wiederum anzeigt, ob unterschiedlich viel mRNA mit der entsprechenden Sequenz aus den infizierten oder nicht infizierten Zellen extrahiert wurde. Als Farbstoff wurde SYBR-Green verwendet, welches bevorzugt an doppelsträngige DNA, mit sehr viel geringerer Kapazität jedoch auch an einzelsträngige DNA oder RNA bindet. Die Bindung an doppelsträngige DNA bewirkt eine Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes und resultiert bei Absorption von blauem Licht mit einer Wellenlänge von 494 nm in einer Emission grünen Lichtes mit einer Wellenlänge von 521 nm. Im Vergleich zu ungebundenem Farbstoff ist die Intensität der emittierten Strahlung etwa um den Faktor 2.000 erhöht [223]. Die Fluoreszenz wurde automatisiert nach jedem Replikationszyklus gemessen und die Anzahl an Zyklen, die durchlaufen werden musste, um einen bestimmten Schwellenwert an Fluoreszenzzunahme zu überschreiten wurde als C_t -Wert („cycle threshold“) bestimmt.

Die Auswertung erfolgte mithilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode automatisiert durch die zugehörige Step One-Software, wobei die Werte für das Hintergrundsignal (Baseline) und den Schwellenwert (Threshold), ab dessen Überschreiten ein Signal als messbare Amplifikation gewertet wird, für jede Probe automatisch erstellt wurden. Jede cDNA-Probe wurde als Triplikat analysiert und die qRT-PCR wurde insgesamt mit drei verschiedenen Sätzen von cDNA-Proben durchgeführt, die aus Ansätzen von Detroit 562-Zellen aus drei Infektionsversuchen gewonnen wurden. Um Kontaminationen auszuschließen,

wurden Kontrollen durchgeführt, bei denen keine cDNA-Probe zugegeben wurde (non target control; NTC).

Zur Durchführung wurden zunächst die Step One Software-Einstellungen für das qRT-PCR-Protokoll wie in Tab. 2.8 aufgeführt vorgenommen und das Protokoll für den Thermocycler eingestellt (siehe Abb. 2.10).

Protocol:	
Quantifizierungsmethode	$\Delta\Delta C_T$
Farbstoff	SYBR-Green
Volumen pro Well	20 μ l
Mastermix-Konzentration	2 x
Forward-Primer Start-Konzentration	20 pmol/ μ l (Endkonzentration: 900 nM)
Reverse-Primer Start-Konzentration	20 pmol/ μ l (Endkonzentration: 900 nM)
Konzentration der cDNA-Probe	5 ng/ μ l
Analysis settings:	
C_T -Settings:	AUTO
Baseline start	AUTO
Baseline end	AUTO
Threshold	AUTO



Tab. 2.8 und Abb. 2.10: Step One-Software-Einstellungen und Thermocycler-Protokoll für die qRT-PCR.

Die Proben wurden entsprechend den Vorgaben des durch die Step One-Software automatisch erstellten Protokolls auf eine cDNA-Konzentration von 5 ng/ μ l verdünnt und die Reaktionsansätze (Tab. 2.9) vorbereitet. Sowohl

verdünnte Proben, als auch Reaktionsansätze wurden bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Reaktionsansätze für qRT-PCR	
2 x Veriquest SYBR-Green Mater-Mix	180,0 µl
Nukleasefreies Wasser	111,6 µl
Forward Primer	16,2 µl
Reverse Primer	16,2 µl

Tab. 2.9: qRT-PCR - Reaktionsansatz für eine Probe

Als Primer wurden in dieser Arbeit spezifische Oligonukleotide für humanes Cyclin A, Cyclin B, Cyclin D und Cyclin E verwendet. Um eine relative Quantifizierung zu ermöglichen, wurde die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzwert in jeder Probe mitbestimmt und die für die Cyclin-Expression bestimmten C_t -Werte in Relation zur GAPDH-Expression gesetzt. Der hier verwendete Veriquest SYBR-Green Master-Mix enthält eine hot-start *Taq*-DNA-Polymerase, $MgCl_2$, Nucleotide einschließlich dUTP, Uracil-n-Glykosylase (UNG), SYBR-Green und ROX als passiven Referenz-Farbstoff. Da die Anfärbung mit SYBR-Green unabhängig von der Sequenz der doppelsträngigen DNA ist, besteht insbesondere bei dieser Methode das Risiko für die Detektion unspezifischer Signale, etwa durch Kontamination mit genomischer DNA. Zur Reduktion dieses Risikos wird daher speziell bei der Verwendung von SYBR-Green empfohlen, eine hot-start-Polymerase zu verwenden [223]. Im Folgenden wurden je 64,8 µl Reaktionsansatz mit 7,2 µl nukleasefreiem Wasser als non-target-control (NTC) oder mit 7,2 µl cDNA-Probe vermischt und hiervon jeweils 20 µl in die Vertiefungen einer MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate pipettiert. Für jeden Messwert wurden drei Wells beladen. Dann wurde die Platte mit der beiliegenden Folie versiegelt, kurz zentrifugiert und im Thermocycler analysiert. Da zur Degradierung von möglicher kontaminierender dUTP-enthaltender DNA das Enzym Uracil-n-Glykosylase im Master-Mix enthalten ist, wurden dabei, wie vom Hersteller empfohlen, vor Beginn der initialen Denaturierung alle Proben für 2 Minuten auf 50 °C erwärmt (siehe Abb. 2.10).

3. Ergebnisse

3.1 Adhärenz und Invasion von pathogenen Meningokokkenisolaten sowie von Trägerstämmen an pharyngealen Epithelzellen

Die Bindung von Meningokokken an epitheliale Zellen und die Invasion in die Zielzelle wurden bislang an mehreren humanen Epithelzelllinien als Modell untersucht, etwa an konjunktivalen Chang-Zellen [62, 63, 66, 69, 70, 224-227], an primären humanen Nasopharynx-Epithelzellen aus Explantaten [79, 224], pharyngealen FaDu- [228-232] und Detroit 562-Zellen [68, 228, 233-235], Calu-3-Zellen aus humanem respiratorischem Epithel [90], laryngealen Hep-2-Zellen [71, 225, 236, 237], pulmonalen A549- [62, 66, 237] und H292-Zellen [224], intestinalen T84- [89] und HT29-Zellen [238], HEC 1-B-Endometriumzellen [218, 224, 239-241] und verschiedenen Cervixkarzinom-Zelllinien (ME180-Zellen [242], HeLa-Zellen [243]). All diese Arbeiten hatten zum Ziel, die Rolle eines bestimmten bakteriellen Effektors oder einer zellulären Zielstruktur zu untersuchen. Dagegen liegen nur sehr wenige Studien vor, in denen gezielt pathogene Meningokokkenstämme mit Trägerisolaten verglichen wurden (siehe auch 4.3). Es wurde daher in dieser Arbeit zunächst für alle verwendeten Isolate untersucht, mit welcher Kinetik die Anheftung und die Aufnahme in die Zielzelle erfolgt, wobei krankheitsverursachende Stämme und Trägerisolate gegenübergestellt wurden.

Da aus Untersuchungen an anderen Zielzellen bekannt ist, dass die Herunterregulation der Kapsel mit einer gesteigerten Fähigkeit zur Invasion einhergeht [104], wurde zusätzlich das Isolat MC58 *siaD* getestet, das durch Ausschaltung des Sialyltransferase-Gens keine Kapsel exprimieren kann.

Als Zielzelle wurde mit Detroit 562 eine Zelllinie gewählt, die humanem Pharynxepithel entstammt und im Infektionsversuch mit Meningokokken bereits durch zahlreiche Arbeiten zur zellulären Signaltransduktion (siehe 4.1) sehr gut etabliert ist. Um auch eine pharyngeale Epithelzelllinie zu untersuchen, die nicht aus maligne entartetem Gewebe entnommen wurde und somit wahrscheinlich in ihrer Zellzyklusregulation ähnlicher einer physiologisch vorkommenden Zelle ist,

wurden zum Vergleich NP69-Zellen verwendet, die allerdings zuvor noch nie für Infektionsversuche mit Meningokokken verwendet worden waren.

Es zeigte sich im Versuch für alle Isolate ein Anstieg der Anzahl adhärenter und invasiver Bakterien mit der Zeit. Die Adhärenz von Meningokokken an die neu etablierte Zelllinie NP69 war vergleichbar mit der Adhärenz an Detroit 562-Zellen. Beim unbekapselten Stamm MC58 *siaD* ergab sich, verglichen mit dem Wildtyp, eine signifikant gesteigerte Invasion in Detroit 562-Zellen, wie dies bereits von anderen Zelllinien bekannt ist [104]. In NP69 Zellen war die Invasion von MC58 deutlich stärker ausgeprägt, als bei Detroit 562 Zellen. Hingegen war die Invasion von MC58 *siaD* in NP69-Zellen nur geringfügig höher, als die des Wildtyps (siehe Abb. 3.2).

N. meningitidis Stamm 8013/Klon 12 zeigte bei längerer Inkubationszeit eine starke Fähigkeit zur Adhärenz, die bei NP69-Zellen sogar die Adhärenz des Referenzisolates MC58 überstieg. Dennoch war die Invasion in jedem Fall signifikant geringer als die Invasion durch MC58 und erreichte sechs Stunden nach Infektionsbeginn ihr Maximum von 25,6% in Detroit 562-Zellen und 26,7% in NP69-Zellen, jeweils im Vergleich zur Invasion von MC58 (siehe Abb. 3.3 und 3.4). Die kolonisierenden Isolate $\alpha 711$ und $\alpha 4$ dienten als Vergleichsisolat zu den krankheitsverursachenden Isolaten MC58 und 8013/Klon 12, wobei $\alpha 711$ und MC58 dem ST-32 cc angehören, $\alpha 4$ und 8013/Klon 12 dem ST-18 cc. Die Fähigkeit zur Adhärenz fiel bei den beiden kolonisierenden Isolaten sehr unterschiedlich aus, wobei $\alpha 711$ stark und insbesondere früh an Detroit 562-Zellen adhärierte, $\alpha 4$ hingegen deutlich geringer adhärent war (siehe Abb. 3.3 und 3.4). Die Fähigkeit zur Invasion war in beiden kolonisierenden Isolaten zu jedem Zeitpunkt signifikant geringer, als bei dem pathogenen Isolat MC58. Als weiterer kolonisierender Stamm wurde der Kapsel-Null-Lokus (*cnI-*) Stamm $\alpha 14$ getestet. Dieser zeigte eine sehr geringfügige bis fehlende Fähigkeit zur Interaktion mit der Zielzelle, sowohl bei der Adhärenz als auch bei der Invasion (siehe Abb. 3.3 und 3.4).

 Detroit 562

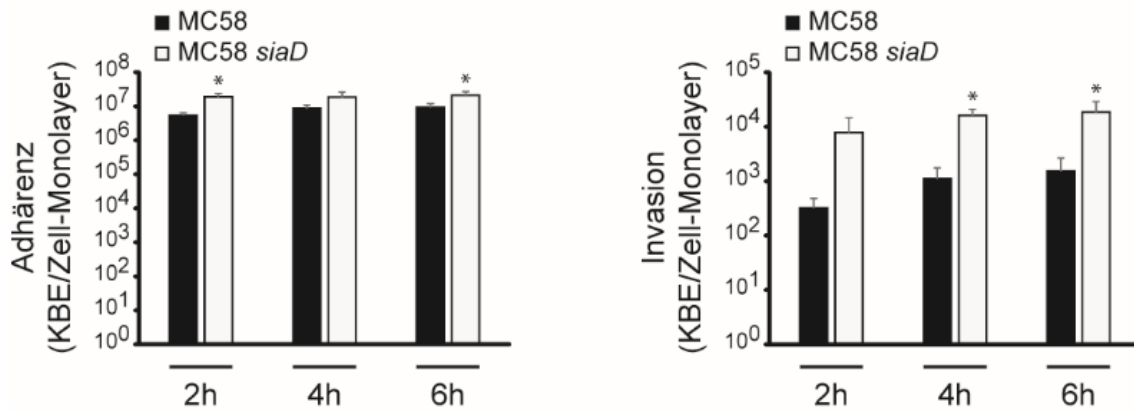


Abb. 3.1: Adhärenz und Invasion von *N. meningitidis*. Experiment mit MC58 und der isogenen, unbekapselte Mutante MC58 *siaD* an Detroit 562-Zellen. Gezeigt sind die Absolutwerte (koloniebildende Einheiten (KBE)). Messungen wurden 2, 4 und 6 Stunden nach Infektion durchgeführt.

*: statistisch signifikanter Unterschied zum Vergleichsisolat MC58 ($p < 0,05$).

 NP69

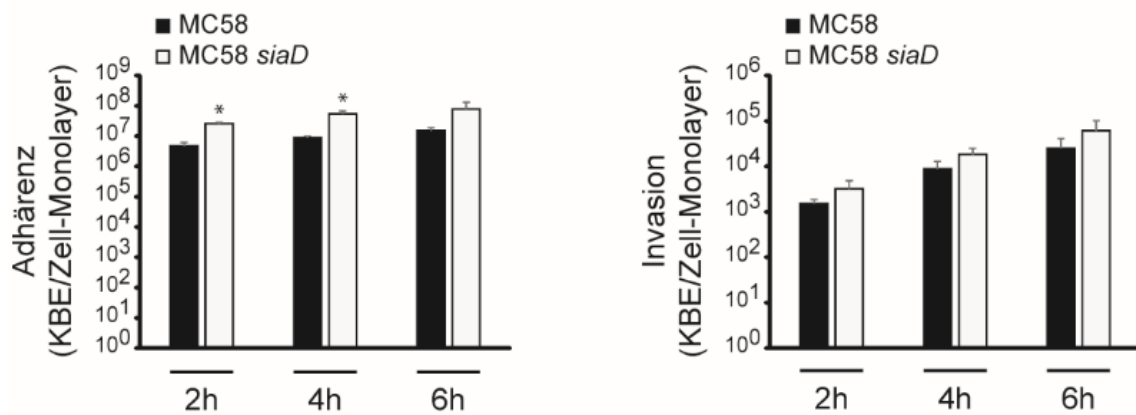


Abb. 3.2: Adhärenz und Invasion von *N. meningitidis*. Experiment mit MC58 und der isogenen, unbekapselte Mutante MC58 *siaD* an NP69-Zellen. Durchführung und Auswertung wie in Abb. 3.1 beschrieben.

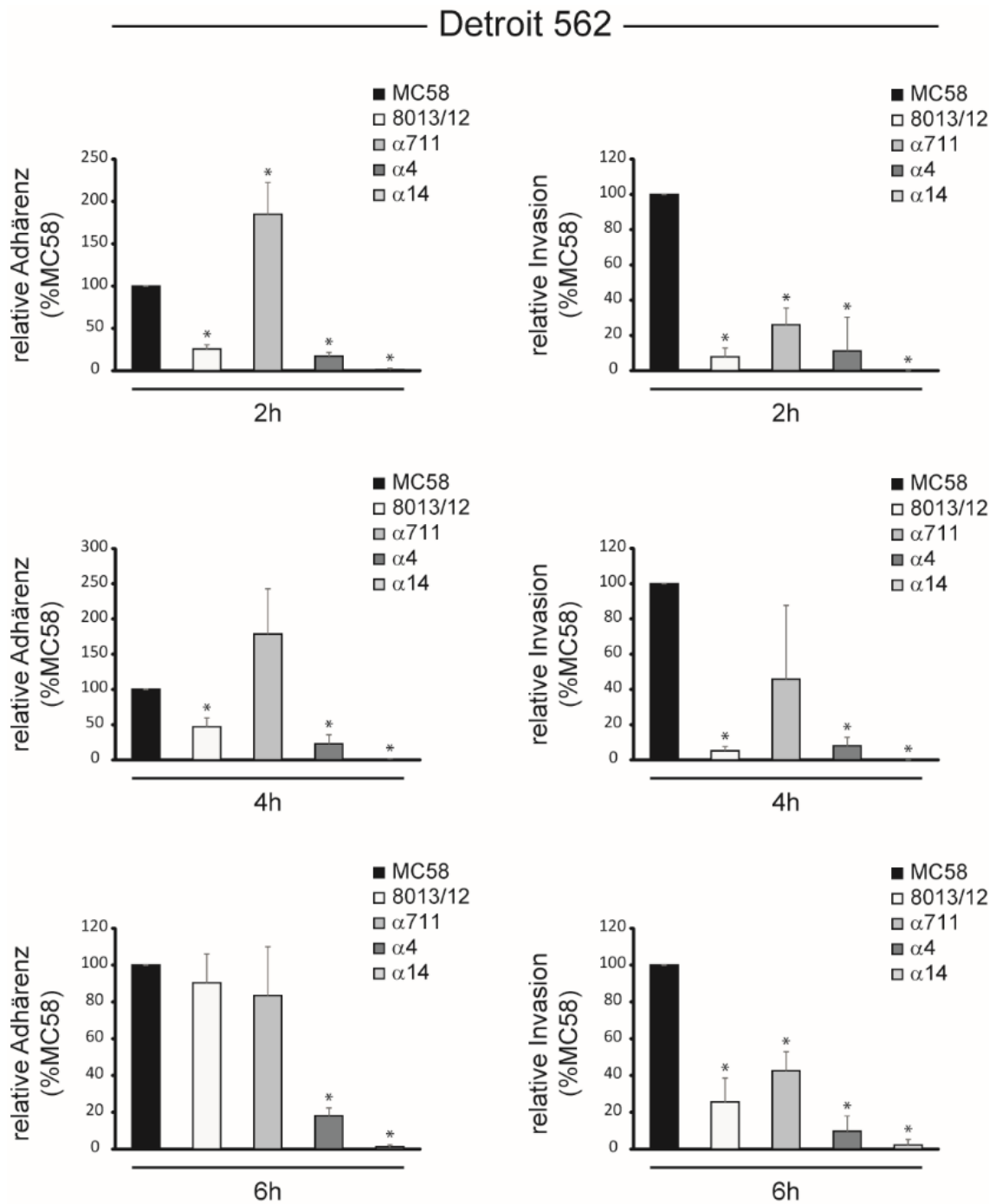


Abb. 3.3: Adhärenz und Invasion von *N. meningitidis*. Experiment mit MC58, 8013/Klon 12, α 711, α 4 und α 14 an Detroit 562-Zellen zu den Zeitpunkten 2, 4 und 6 Stunden p.i. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden alle Messwerte relativ zu MC58 als Prozentsatz gezeigt. *: statistisch signifikanter Unterschied zum Vergleichsisolat MC58 in drei unabhängigen Versuchen ($p < 0,05$).

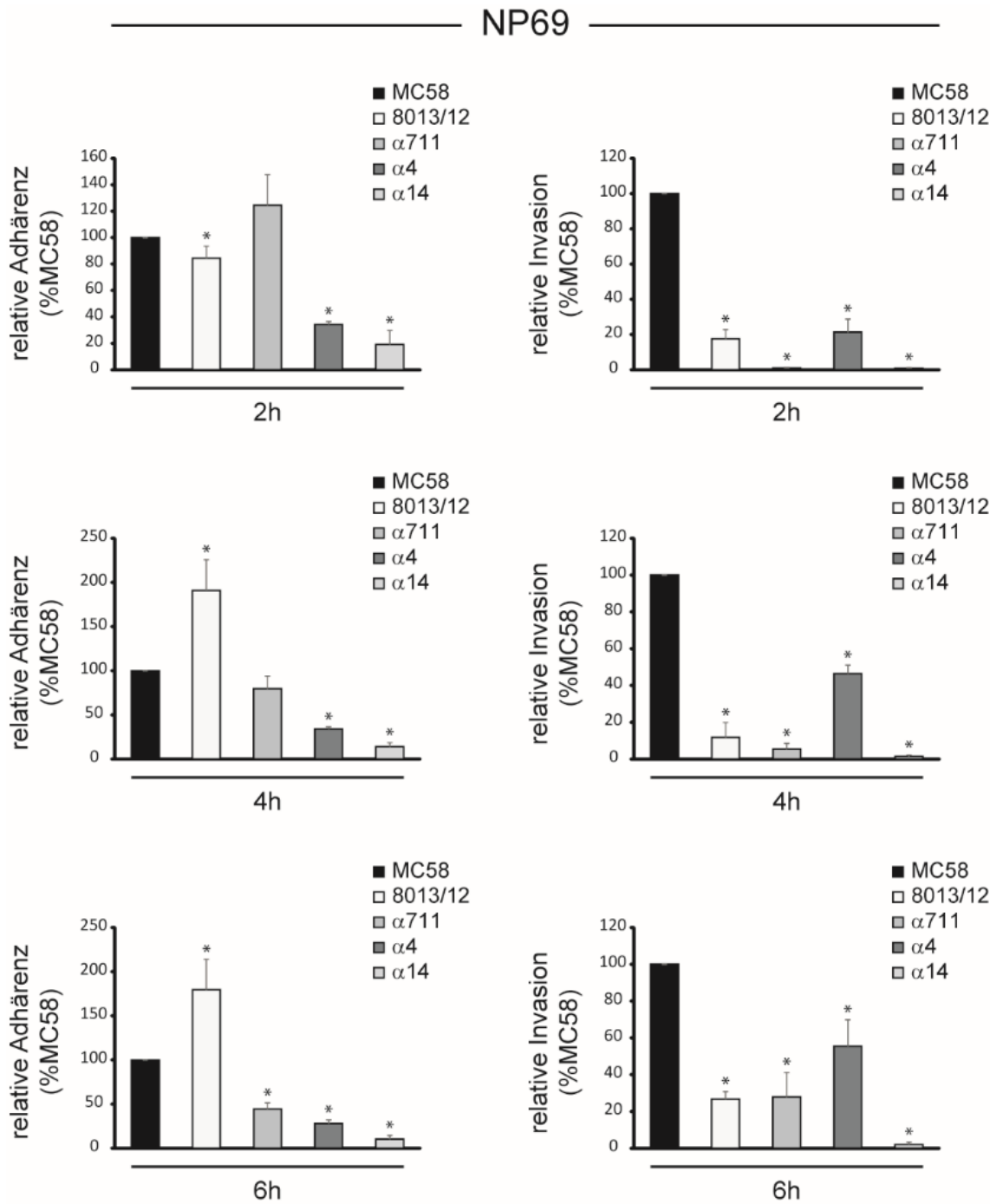


Abb. 3.4: Adhärenz und Invasion von *N. meningitidis*. Experiment mit MC58, 8013/Klon 12, $\alpha 711$, $\alpha 4$ und $\alpha 14$ an NP69-Zellen. Durchführung und Auswertung wie in Abb. 3.3 beschrieben.

3.2 Zellzyklusanalysen

3.2.1 Zellzyklusanalyse durch Propidiumiodidfärbung an verschiedenen pharyngealen Epithelzellen

Zur Untersuchung, ob die Infektion von Pharynxepithelzellen durch Meningokokken einen Einfluss auf den Zellzyklus der Wirtszelle hat, wurden die Zellen verschiedener pharyngealer Zelllinien mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid (PI) angefärbt und die Verteilung der Zellen auf bestimmte Zellzyklusphasen durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen wurden hierzu für sechs Stunden infiziert, danach wurde das bakterienhaltige Medium durch Medium mit Zusatz von Gentamicin ausgetauscht, um eine bakterielle Überwucherung zu vermeiden. Die Messungen wurden zu fünf verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion durchgeführt, wobei die malignen FaDu- und Detroit 562-Zellen über einen Zeitraum bis zu 24 Stunden beobachtet wurden. Bei FaDu-Zellen ergab sich 24 h nach Infektion eine signifikante Akkumulation von Zellen in der G₀-/G₁-phase. Zu allen anderen Zeitpunkten zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen. Eine gleichzeitige Reduktion von Zellen in der S-Phase deutete sich an, war aber statistisch nicht signifikant. Bei Infektion mit dem Trägerisolat α 14 konnten keine statistisch signifikanten Effekte nachgewiesen werden (Abb. 3.6).

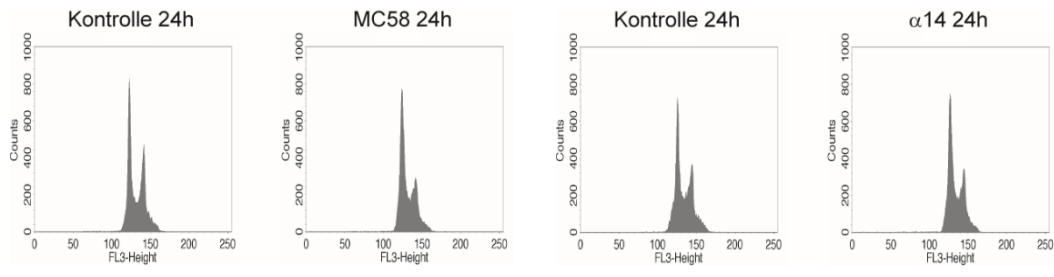


Abb. 3.5: PI-Färbung von FaDu-Zellen. Repräsentative Histogramme zum Zeitpunkt 24 h nach Infektion. Die Histogramme zu den anderen gemessenen Zeitpunkten sind im Anhang (Abb. 6.1 und 6.2) dargestellt.

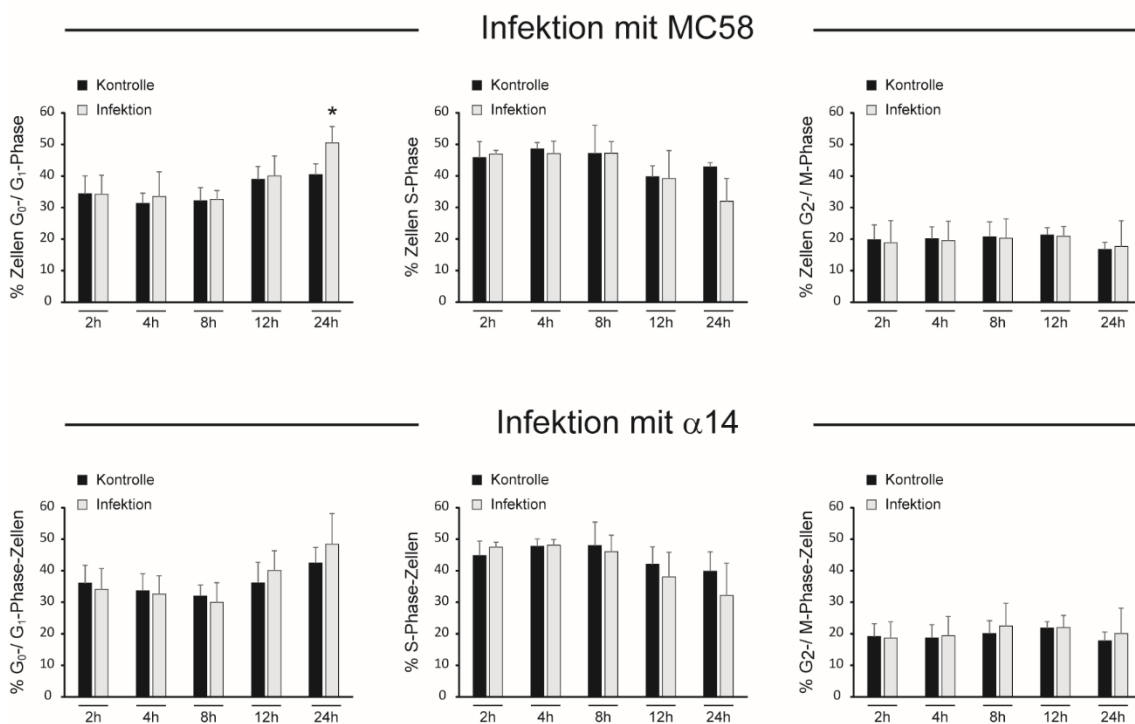


Abb. 3.6: PI-Färbung von FaDu-Zellen nach Infektion mit MC58 und $\alpha 14$ für 2 h, 4 h, 8 h, 12 h und 24 h. Gezeigt sind die Prozentsätze der ausgezählten Zellen in der G_1 -/ G_0 -Phase (links), der S-Phase (Mitte) und der G_2 -/ M -Phase (rechts) für nicht infizierte Zellen (schwarz) und infizierte Zellen (grau) als Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. *: statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle desselben Zeitpunktes mit $p < 0,05$.

Dagegen zeigte die Messung von Detroit 562-Zellen 24 h nach der Infektion mit MC58 eine deutliche Akkumulation von Zellen in der G₀-/G₁-Phase und korrespondierend dazu eine signifikante Reduktion von S-Phase-Zellen (siehe Abb. 3.7 und 3.8). Im Folgenden wurden daher weitere Isolate auf die Fähigkeit geprüft, einen G₁-Phasen-Arrest in Detroit 562-Zellen zu induzieren. Auch das der Serogruppe C angehörende Isolat 8013/Klon 12 bewirkte 24 h nach der Infektion einen signifikanten G₀-/G₁-Phasen-Arrest mit entsprechender Reduktion der Zellen in der S-Phase (siehe Abb. 3.7 und 3.8).

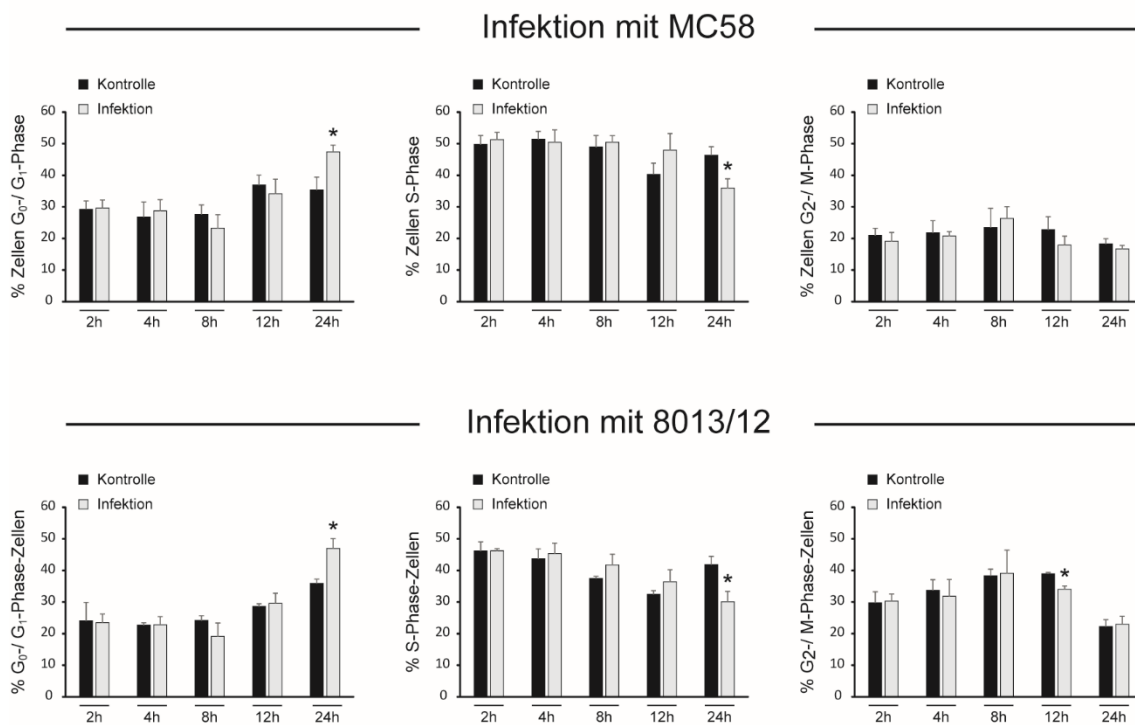
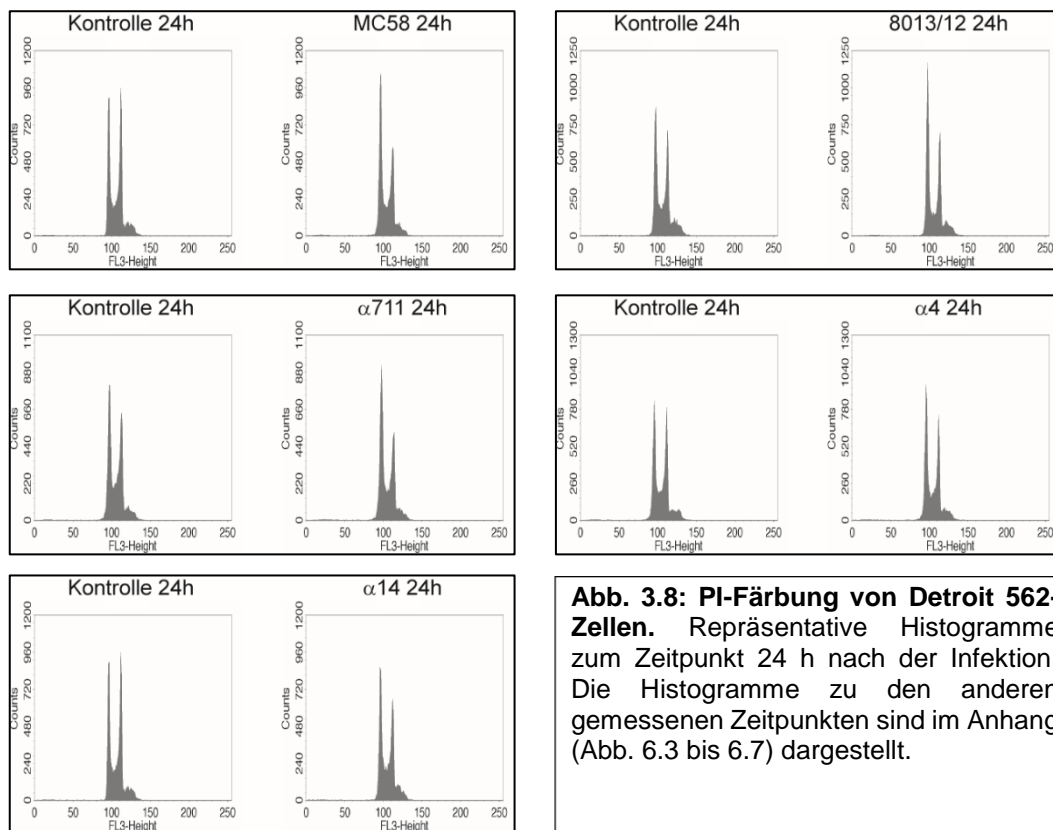


Abb. 3.7: PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit MC58 und 8013/Klon 12 für 2 h, 4 h, 8 h, 12 h und 24 h. Gezeigt sind die Prozentsätze der ausgezählten Zellen in der G₁-/G₀-Phase (links), der S-Phase (Mitte) und der G₂-/M-Phase (rechts) für nicht infizierte Zellen (schwarz) und infizierte Zellen (grau) als Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. *: statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle desselben Zeitpunktes mit $p < 0,05$.

Um zu ermitteln, ob auch kolonisierende und vermutlich apathogene Meningokokkenstämme fähig sind, einen Zellzyklusarrest zu induzieren, wurde der Versuch mit den Isolaten $\alpha 711$, $\alpha 4$ und $\alpha 14$ durchgeführt. $\alpha 711$ und $\alpha 4$ zeigten dabei ebenfalls 24 h nach der Infektion einen G_0 -/ G_1 -Phasen-Arrest, der zwar im Vergleich mit MC58 schwächer, jedoch auch statistisch signifikant war. Das einzige Isolat, das zu keinem Zeitpunkt einen reproduzierbaren Effekt auf den Zellzyklus hatte, war der kolonisierende cnl-Stamm $\alpha 14$ (siehe Abb. 3.8 und 3.9).



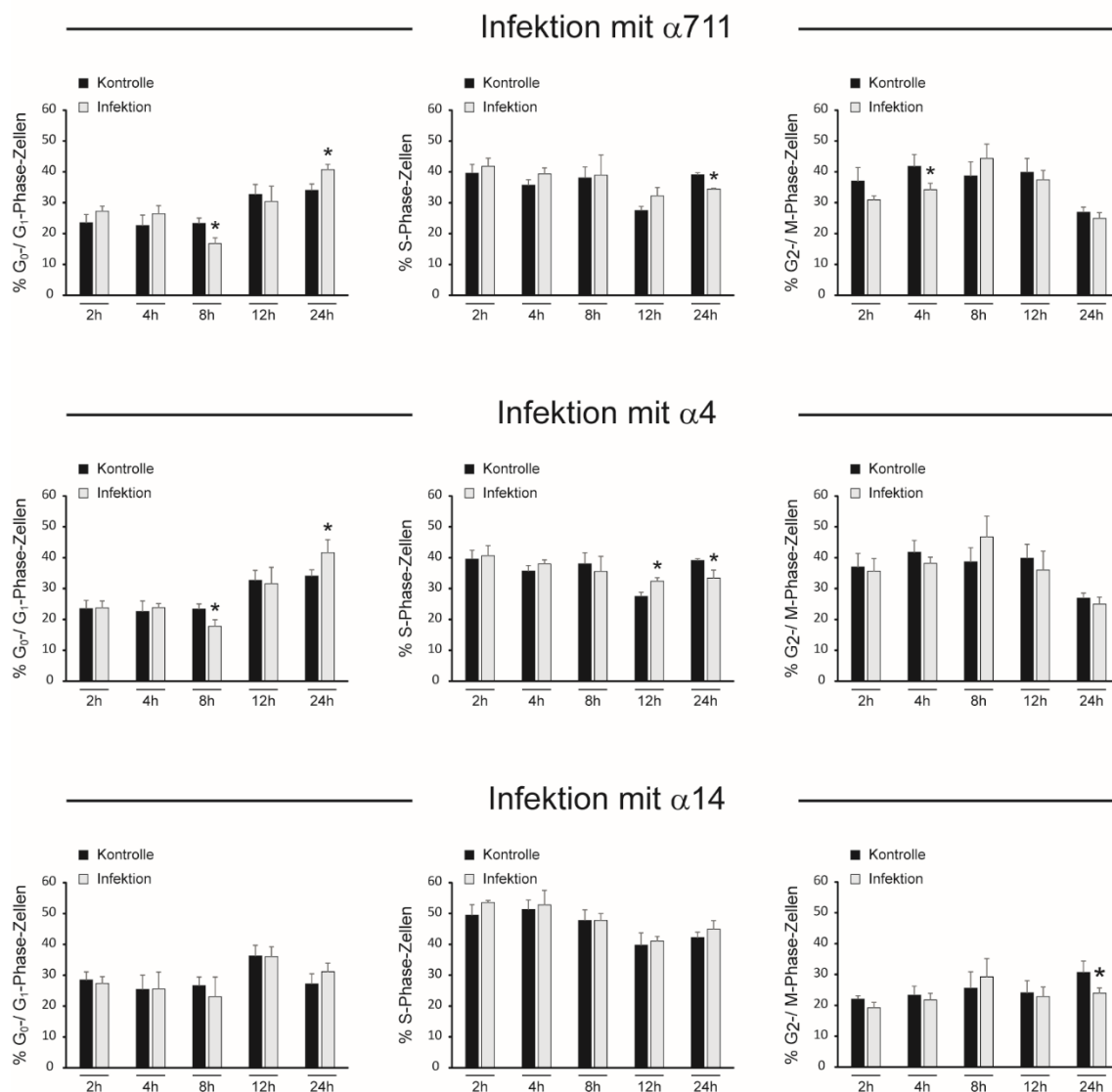


Abb. 3.9: PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit den kolonisierenden Isolaten $\alpha 711$, $\alpha 4$ und $\alpha 14$ für 2 h, 4 h, 8 h, 12 h und 24 h. Durchführung und Auswertung wie in Abb. 3.7 beschrieben.

Als dritte pharyngeale Zelllinie wurden benigne NP69-Zellen untersucht. Da diese Zellen eine im Vergleich mit den malignen Zellen längere Verdopplungszeit haben, wurden die Messungen zu den Zeitpunkten 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 30 h p.i. durchgeführt. Zu den frühen Zeitpunkten zeigten sich weder bei der Infektion mit pathogenen Isolaten, noch mit kolonisierenden Stämmen eine signifikante Veränderung bei den infizierten gegenüber den nicht infizierten Kontroll-Zellen (siehe Abb. 3.11 und 3.12). Zu den Zeitpunkten 24- und 30 h p.i. fiel bei der

durchflusszytometrischen Analyse eine deutlich vermehrte Fraktion an Partikeln außerhalb des Gates auf. Da diese auch ein verstärktes Signal im mit PI detektierenden Messkanal zeigten und somit bei der Analyse in den Bereich „super-G₂“ eingeordnet wurden, ist davon auszugehen, dass es sich dabei am ehesten um kleine Aggregate mehrerer Zellen handelte. Die Auswertung, bei der diese Zellaggregate in die Analyse mit einfließen, ergab eine insgesamt verminderte Zahl an Zellen in der G₁-, S- und G₂-Phase, sodass davon ausgegangen werden muss, dass die Messungen der beiden späten Zeitpunkte mit großer Wahrscheinlichkeit nicht die wirkliche und genaue Verteilung auf die Zellzyklusphasen repräsentieren.

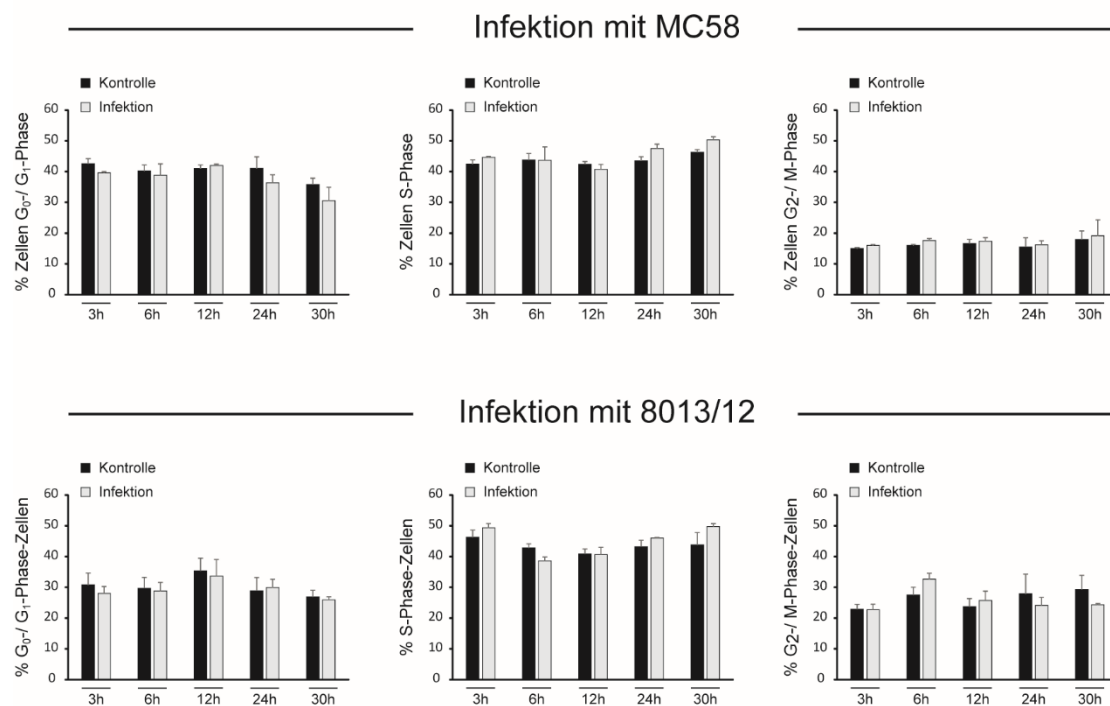


Abb. 3.10: PI-Färbung von NP69-Zellen nach Infektion mit MC58 und 8013/Klon 12 für 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 30 h. Durchführung und Auswertung wie in Abb. 3.7 beschrieben.

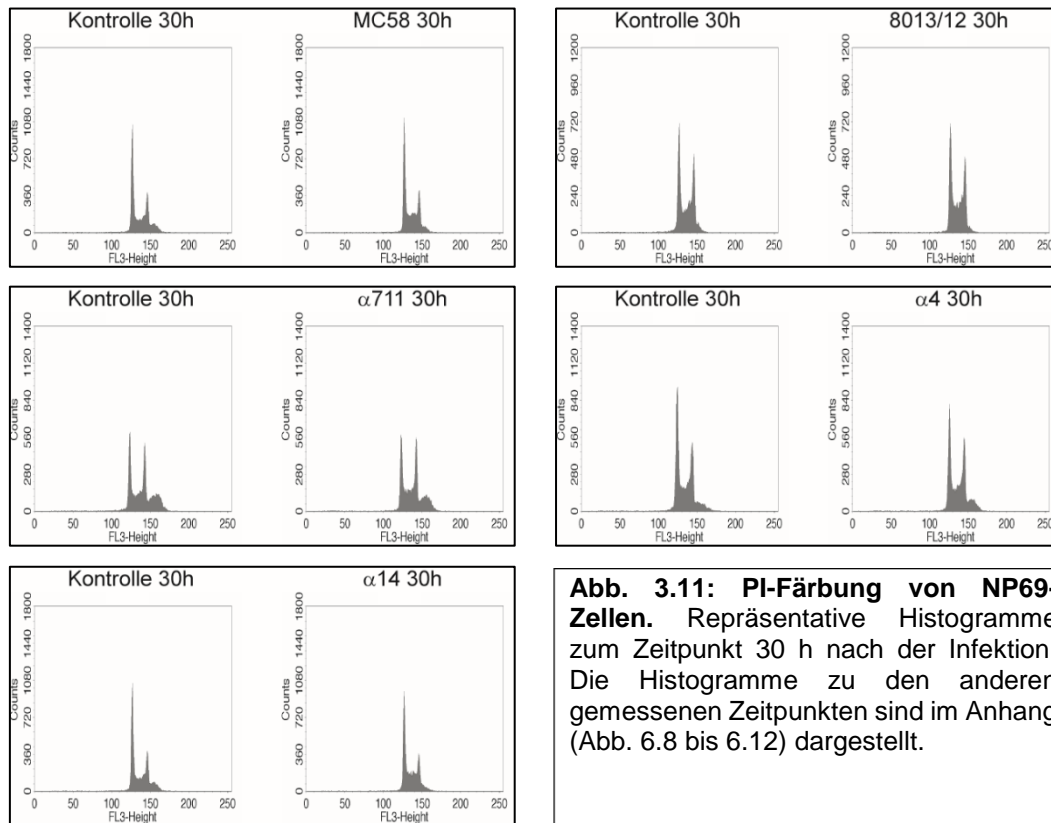


Abb. 3.11: PI-Färbung von NP69-Zellen. Repräsentative Histogramme zum Zeitpunkt 30 h nach der Infektion. Die Histogramme zu den anderen gemessenen Zeitpunkten sind im Anhang (Abb. 6.8 bis 6.12) dargestellt.

In der Folge wurde für die weiteren Versuche die Zelllinie Detroit 562 ausgewählt, da sich in dieser der Effekt der Meningokokkeninfektion auf den Zellzyklus am sichersten reproduzieren ließ und da sie über den gesamten Messzeitraum, d.h. über eine Verdopplungszeit, zuverlässig auswertbar blieb.

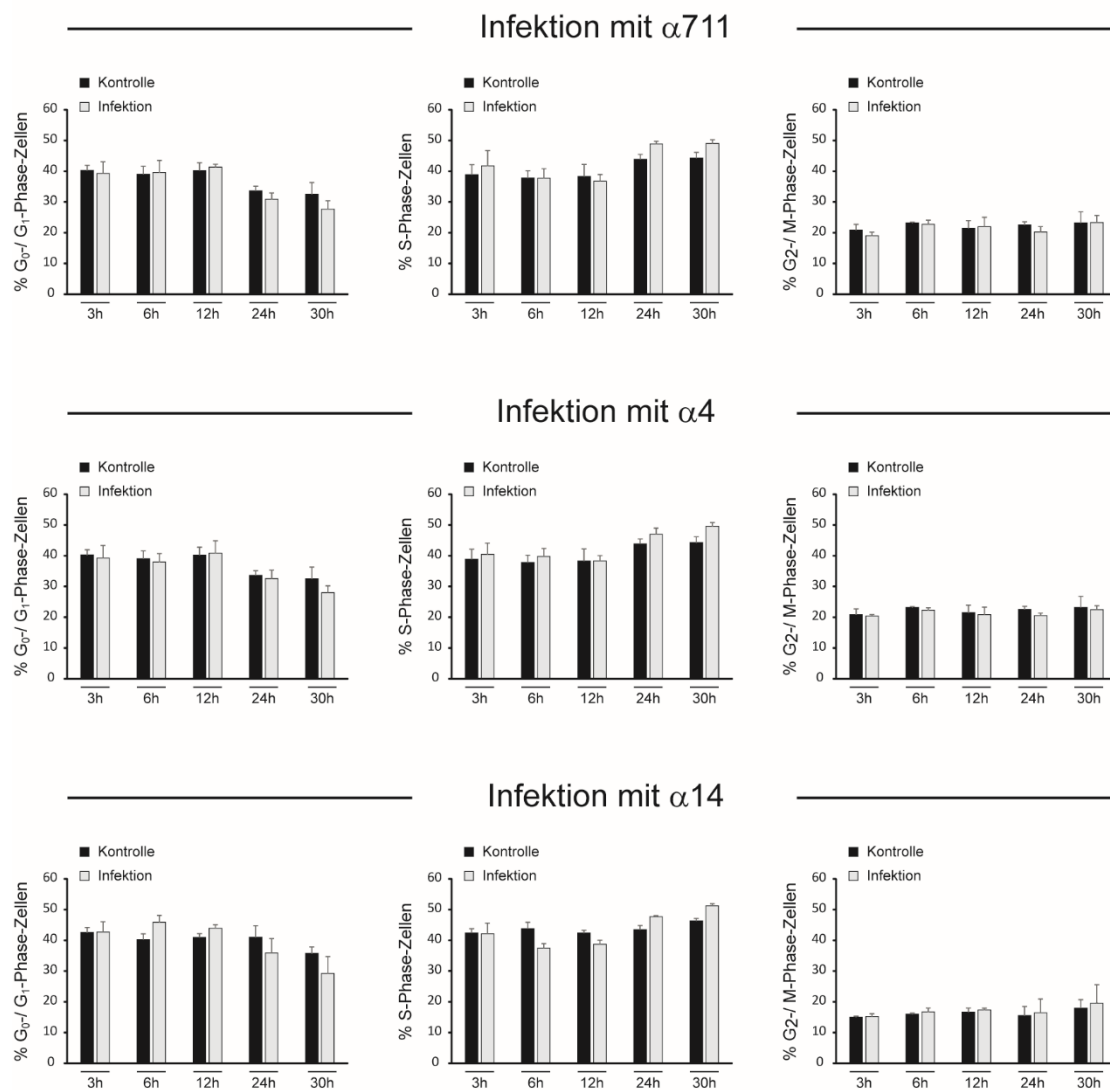


Abb. 3.12: PI-Färbung von NP69-Zellen nach Infektion mit den kolonisierenden Isolaten $\alpha 711$, $\alpha 4$ und $\alpha 14$ für 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 30 h. Durchführung und Auswertung wie in Abb. 3.7 beschrieben.

Um zu überprüfen, ob auch eine kürzere direkte Exposition gegenüber Meningokokken ausreichend wäre, um Effekte auf den Zellzyklus der Wirtszelle zu induzieren, wurden Detroit 562-Zellen versuchsweise nur zwei Stunden lang infiziert, dann das bakterienhaltige Medium ersetzt und 24 h nach der Infektion PI-Färbungen durchgeführt. Hierbei ergab sich noch keine Veränderung des Zellzyklus (siehe Abb. 3.13), sodass für alle folgenden Versuche an Detroit 562-Zellen die Inkubation mit den verschiedenen Meningokokkenisolaten für sechs Stunden erfolgte.

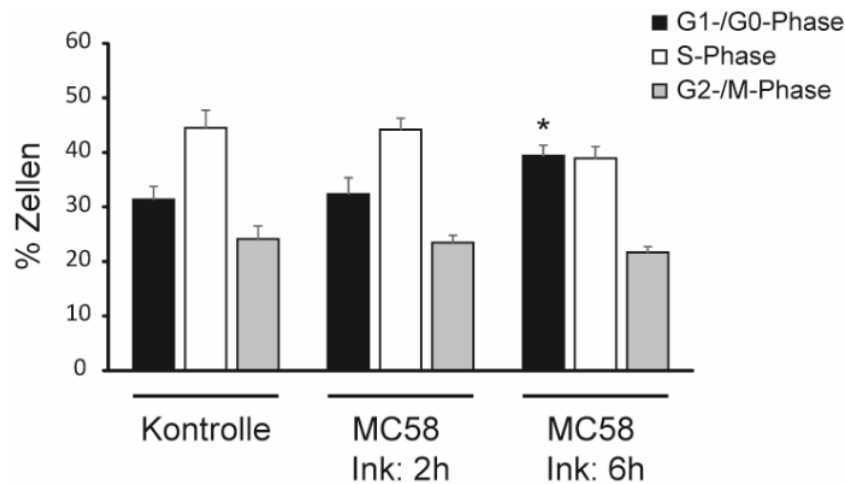


Abb. 3.13: PI-Färbung von Detroit 562-Zellen 24 h nach der Infektion. Abgebildet sind die Verteilungen auf die Zellzyklusphasen von nicht infizierten Kontrollzellen, Zellen, die für 2 h inkubiert und nach 24 Stunden analysiert wurden (Ink: 2h) und Zellen, die wie in den vorherigen Versuchen für 6 h infiziert und nach 24 h ausgewertet wurden.

*: $p < 0,05$ in drei unabhängigen Experimenten.

Um außerdem sicherzustellen, dass die Zellen nach der Infektion über sechs Stunden und der anschließenden Kultivierung bis 24 h p.i. noch vital und somit für die Messung geeignet sind, wurden lichtmikroskopische Bilder und Färbungen mit Trypan-Blau durchgeführt. Durch diese ließen sich vitale von toten Zellen unterscheiden und der Anteil vitaler Zellen von nicht infizierten Kontrollzellen konnte mit dem von mit MC58 infizierten Zellen verglichen werden. Es ergaben sich lichtmikroskopisch keine sichtbaren Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen (siehe Abb. 3.14) und die Anteile vitaler Zellen unterschieden sich in den verglichenen Gruppen nicht signifikant (siehe Abb. 3.15).

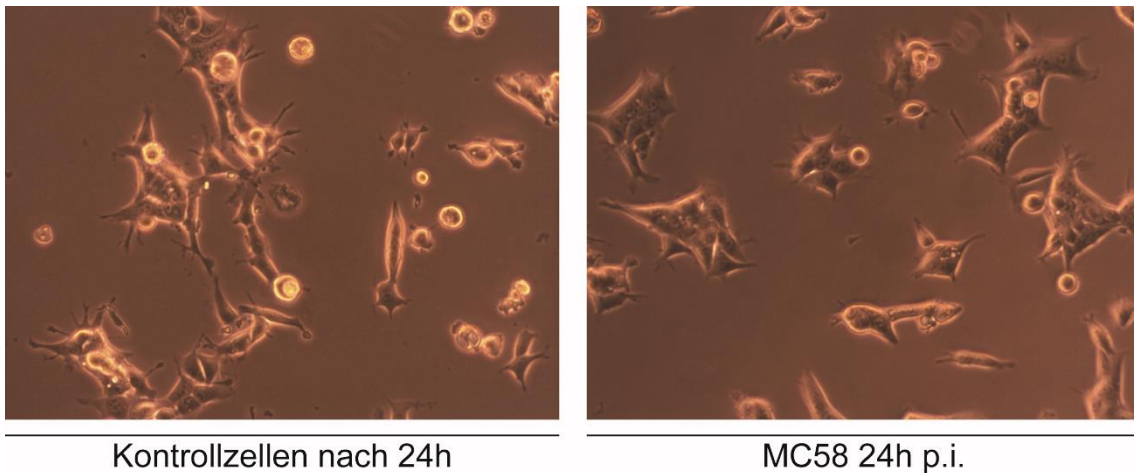


Abb. 3.14: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Detroit 562-Zellen. Abgebildet sind nicht infizierte Kontrollzellen, die identisch zu den infizierten Zellen behandelt wurden (links) und mit MC58 infizierte Zellen unmittelbar vor der Fixierung für die PI-Färbung.

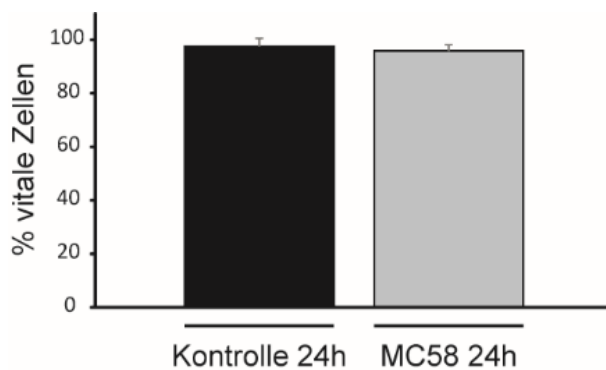


Abb. 3.15: Trypan-Blau-Färbung von Detroit 562-Zellen. Gezeigt sind der Anteil vitaler Zellen ohne Exposition gegenüber Meningokokken (Kontrolle) sowie die der Anteil vitaler Zellen 24 Stunden nach der Infektion mit MC58. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Infektionsversuchen.

3.2.2 Zellzyklusanalyse durch Messung der Ethinyl-deoxy-Uridin-Inkorporation in Detroit 562-Zellen

Nachdem die PI-Färbungen ergeben hatten, dass es 24 h nach der Infektion mit verschiedenen Meningokokkenisolaten zu einer signifikanten Akkumulation von Detroit 562-Zellen in der G₁-Phase gekommen war, sollte dieses Ergebnis mithilfe einer anderen Messmethode bestätigt werden. Hierzu wurden Detroit 562-Zellen für 24 h mit den Isolaten MC58, α 711 und α 14 infiziert und zwei Stunden vor der Messung mit dem Thymidinanalogon Ethinyl-deoxy-Uridin (EdU)

behandelt. Anders als PI interkaliert dieses nicht in jede Art von Nukleinsäuren, sondern wird durch DNA-Polymerasen im Zuge der DNA-Replikation aktiv in die zelluläre DNA inkorporiert. Somit ist es nur in Zellen nachweisbar, die sich während der Anwesenheit von EdU in der S-Phase befunden haben, und kann in diesen durch eine Click-Reaktion angefärbt werden. Die Messung bestätigte die Ergebnisse der PI-Färbungen, da 24 Stunden nach der Infektion mit MC58 und $\alpha 711$ signifikant weniger Zellen in die S-Phase eingetreten waren (siehe Abb. 3.16 und 3.17). Wie schon bei den PI-Färbungen induzierte das Isolat $\alpha 14$ keinen signifikanten Effekt.

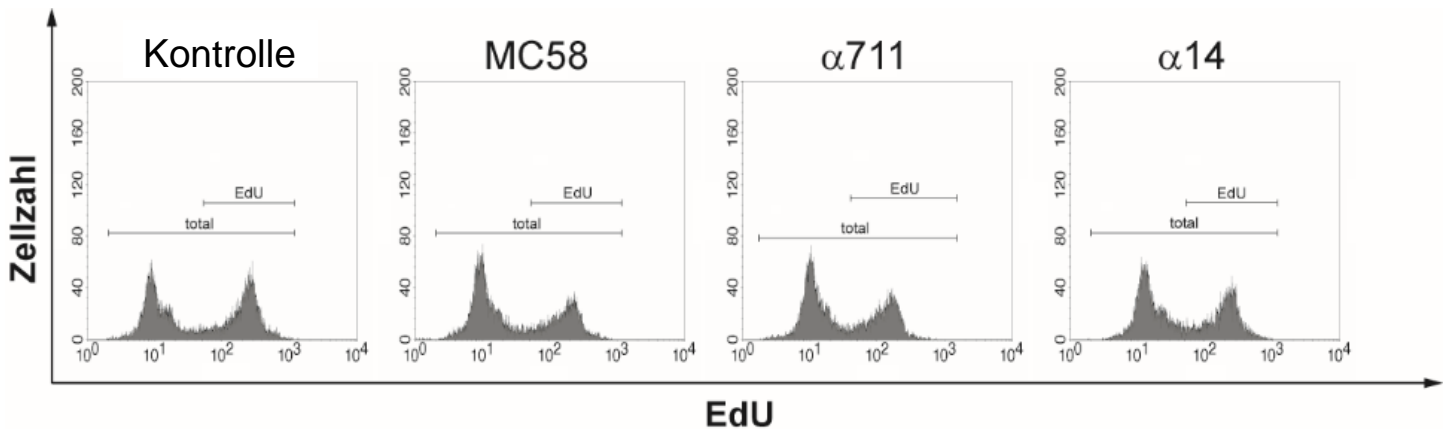


Abb. 3.16: EdU-Färbung von Detroit 562-Zellen. Messung jeweils 24 h nach der Infektion mit MC58, $\alpha 711$ und $\alpha 14$. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Histogramm mit dem eingezeichneten Bereich, in dem eine Zelle als EdU-positiv eingestuft wurde.

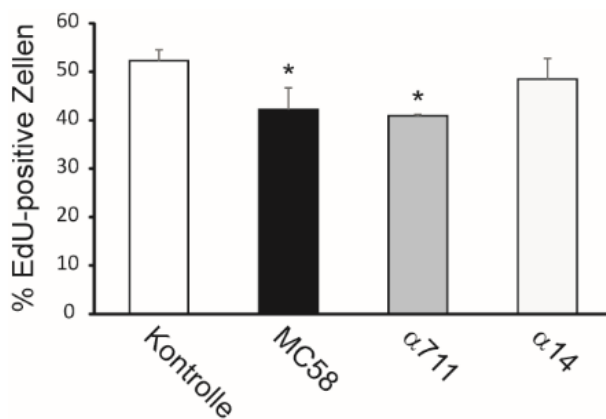


Abb. 3.17: EdU-Färbung von Detroit 562-Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen als Mittelwert mit Standardabweichung. *: statistische Signifikanz im Vergleich mit der nicht infizierten Kontrolle mit $p < 0,05$.

Um auch die Fraktion der Zellen analysieren zu können, in denen kein EdU nachweisbar war, und die sich somit außerhalb der S-Phase befunden hatten, wurde zeitgleich eine Färbung mit FxCycle® Far Red durchgeführt. Dieses färbt wie PI Nukleinsäuren an und erlaubt daher die Unterteilung der EdU-negativen Zellen in solche mit einem niedrigen DNA-Gehalt (G_1 -/ G_0 -Phase-Zellen) und solche mit einem hohen DNA-Gehalt (G_2 -/ M -Phase-Zellen). Zusammen mit der Auswertung des EdU-Signals wurde durch Erstellen von drei Gates die Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen ermittelt. Diese entsprach der Verteilung in der PI-Färbung und bestätigte somit ebenfalls den G_1 -Phasen-Arrest 24 Stunden nach der Infektion (siehe Abb. 3.18 und 3.19).

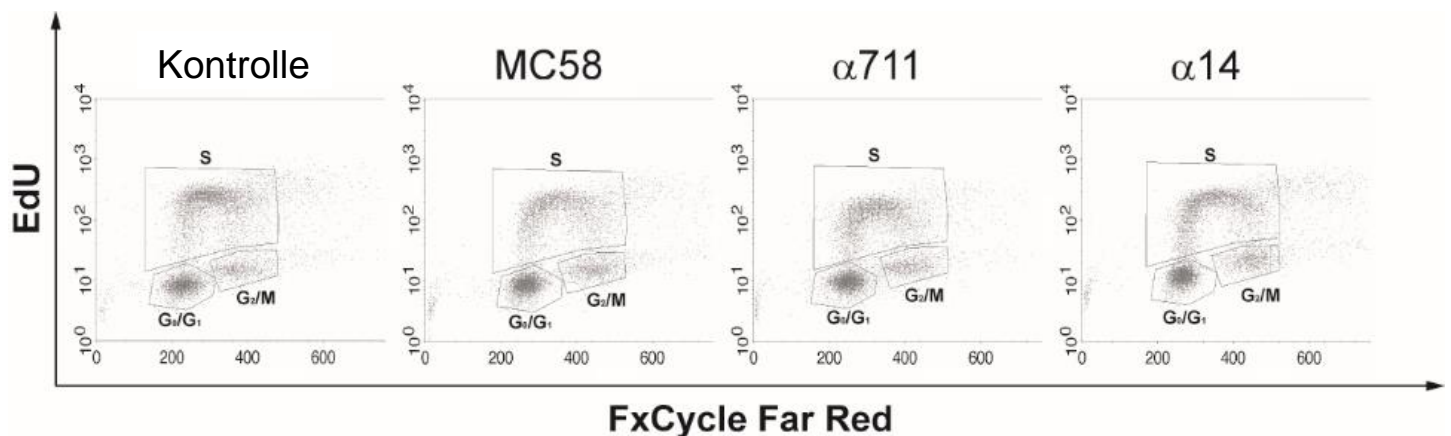


Abb. 3.18: EdU- und FxCycle Far Red-Färbung von Detroit 562-Zellen. Die Messung erfolgte 24 h nach der Infektion. Gezeigt sind die Scatter-Plots jeweils eines repräsentativen Experimentes mit den Gates, in denen die Zellen der jeweiligen Zellzyklusphase ausgezählt wurden.

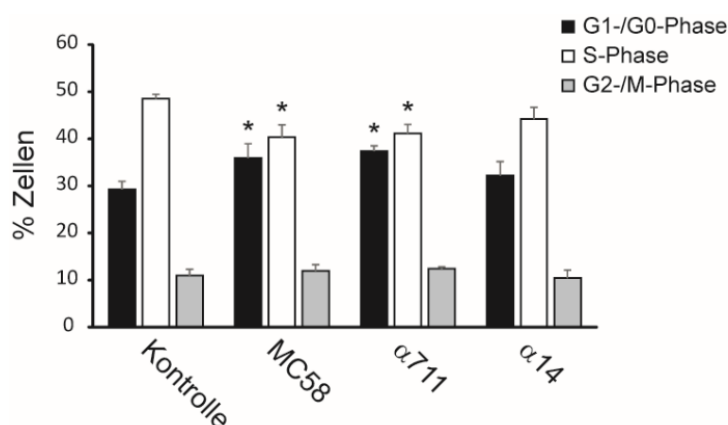


Abb. 3.19: EdU- und FxCycle Far Red-Färbung von Detroit 562-Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen als Mittelwert mit Standardabweichung. *: statistische Signifikanz im Vergleich mit der nicht infizierten Kontrolle mit $p < 0,05$.

3.3 Charakterisierung der kolonisierenden Stämme $\alpha 711$ und $\alpha 4$

3.3.1 Western Blot zur Detektion von Opa, Opc und Typ IV Pili bei den Isolaten $\alpha 711$ und $\alpha 4$

Forschungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass das human-spezifische Pathogen *N. meningitidis* eine Reihe von Oberflächenstrukturen exprimiert, die unter anderem die Kolonisierung und Invasion eukaryotischer Zellen ermöglichen. Bekannte Faktoren, die eine Rolle bei der Adhäsion spielen, sind die Typ IV Pili, die Opa Proteine, das Opc Protein sowie weitere, sogenannte „minor adhesion“ Proteine, zu denen unter anderem NadA (Neisserial adhesin A), App (Adhesion and penetration protein), MspA (Meningococcal serin protease A) und NhhA (Neisserial hia/hsf homologue A) gehören.

Da auch die kolonisierenden Meningokokkenisolate $\alpha 711$ und $\alpha 4$ einen signifikanten Einfluss auf den Zellzyklus hatten, jedoch bezüglich der Expression dieser Pathogenitätsfaktoren noch nicht charakterisiert sind, sollten diese im Folgenden untersucht werden. Zunächst wurden Western Blots von bakteriellen Lysaten angefertigt und die bakteriellen Außenmembranproteine Opa und Opc sowie die Pili mithilfe spezifischer Antikörper detektiert. Daneben wurden Opa⁻, opc⁻ und pilE⁻ Meningokokkenisolate als Negativkontrollen sowie der Wildtypstamm MC58 als Positivkontrolle mitgeführt.

Es zeigte sich, dass sowohl das Isolat $\alpha 711$, als auch das Isolat $\alpha 4$ Opa-Protein exprimierten, wohingegen Opc in keinem der beiden Stämme nachweisbar war (siehe Abb. 3.20 und 3.21).

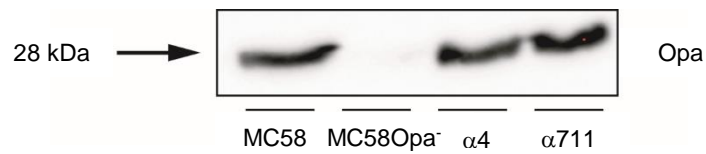


Abb. 3.20: Western Blot von Bakterienlysaten zur Detektion von **Opa-Proteinen**. Verwendet wurde der pan-Opa-Antikörper 4B12/C11. Eine Mutante von MC58 ohne Expression von Opa-Proteinen wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

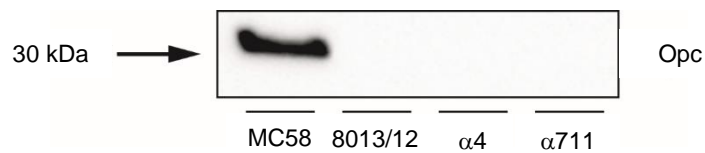


Abb. 3.21: Western Blot von Bakterienlysaten zur Detektion von **Opc**. Verwendet wurde der monoklonale Opc-Antikörper B306. 8013/Klon 12 wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

Ebenso wie Opa wurden auch Klasse-I-Pili, detektierbar durch den Antikörper SM-1, von beiden kolonisierenden Isolaten exprimiert (siehe Abb. 3.22)

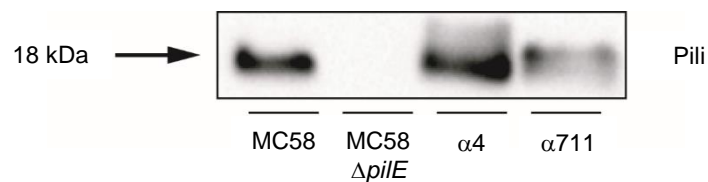


Abb. 3.22: Western Blot von Bakterienlysaten zur Detektion von **Klasse-I-Pili**. Verwendet wurde der Antikörper SM-1. Eine Mutante von MC58 mit einer Deletion im *pilE*-Gen wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

3.3.2 PCR und Gensequenzierung zur Detektion von des *opcA*-Gens bei den Isolaten $\alpha 711$ und $\alpha 4$

Da weder im Lysat von $\alpha 711$, noch in dem von $\alpha 4$ die Expression von Opc auf Proteinebene nachweisbar war, stellte sich die Frage, ob diese Isolate das *opcA*-Gen besitzen, die Expression jedoch durch Phasenvariation abgeschaltet ist, oder ob das kodierende Gen im betreffenden Genom deletiert ist. Es wurde daher genomische DNA aus den Isolaten $\alpha 711$ und $\alpha 4$ isoliert, sowie aus MC58 als Positivkontrolle und aus 8013/Klon 12 als Negativkontrolle, da 8013/Klon 12 bekanntermaßen eine größere Deletion im *opcA*-Gen aufweist [51]. Als Primerpaar wurde zunächst RA3/RA4 (s.o.) verwendet. Mit diesem war eine Bande nur in der Positivkontrolle und beim Isolat $\alpha 711$ nachweisbar (siehe Abb. 3.23). Zur Verifizierung wurde die PCR nochmals mit dem Primerpaar RA1/RA2 durchgeführt. Hierbei entstanden ein verkürztes PCR-Produkt in der Negativkontrolle und bei $\alpha 4$ sowie ein langes Amplifikat bei der Positivkontrolle und bei $\alpha 711$ (siehe Abb. 3.24).

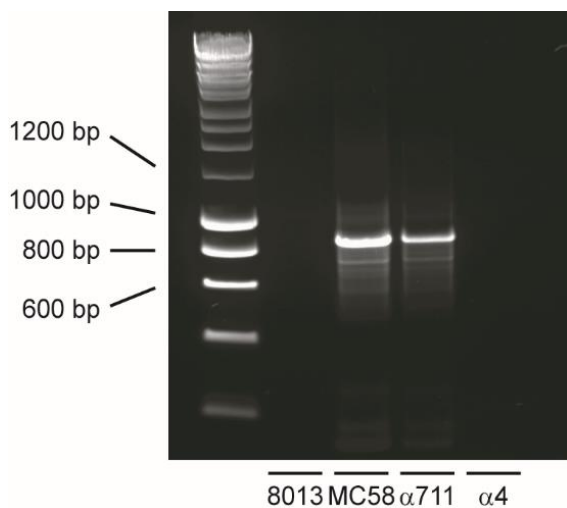


Abb. 3.23: PCR mit dem Primerpaar RA3/RA4. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 825 bp. Bei 8013/Klon 12 und $\alpha 4$ ist es nicht nachweisbar.

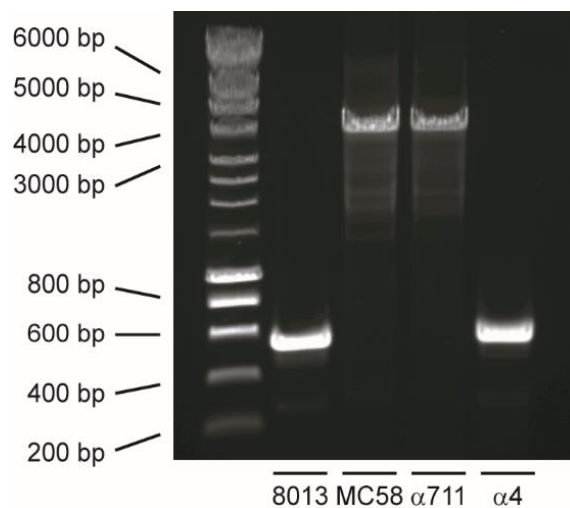


Abb. 3.24: PCR mit dem Primerpaar RA1/RA2. Bei Anwesenheit des *opcA*-Gens entsteht ein langes (3471 bp), bei Abwesenheit ein verkürztes PCR-Produkt.

Beide Ergebnisse zeigen, dass $\alpha 4$ das *opcA*-Gen nicht enthält, wohingegen es bei $\alpha 711$ vorhanden ist.

Es ist bekannt, dass sich die Regulation der Opc-Expression auf transkriptioneller Ebene abspielt, wobei die variable Länge eines in der Promotorregion gelegenen Poly-C-Abschnittes die Effizienz der Transkription bestimmt. Bei Vorliegen von 12 oder 13 Cytidinresten in der Poly-C-Region erfolgt die maximale, bei Vorliegen von 11 oder 14 Cytidinresten eine intermediäre Expression. Sind dagegen weniger als 11 oder mehr als 14 Cytidiningruppen vorhanden, ist die Opc-Expression supprimiert [244].

Um zu untersuchen, ob die fehlende Opc-Proteinexpression trotz des vorhandenen *opcA*-Gens im Isolat $\alpha 711$ durch Phasenvariation begründet ist, wurde das PCR-Produkt von $\alpha 711$ aus dem Gel extrahiert und eine Sequenzierung durchgeführt. Hierbei zeigte sich in der Promotorregion des *opcA*-Gens ein Poly-C-Abschnitt mit nur neun Cytidinbasen, verglichen mit 12 Cytidinbasen beim Referenzisolat MC58 (siehe Abb. 3.25). Zusammenfassend konnte somit nachgewiesen werden, dass die beiden Trägerisolate $\alpha 711$ und $\alpha 4$ kein Opc-Protein exprimieren, was bei dem Isolat $\alpha 4$ aus der Deletion des *opcA*-Gens, bei $\alpha 711$ aus der transkriptionellen Regulation des *opcA*-Gens resultiert.

	— Poly C —
MC58	TATATGTAAAATCCCCCCCCCGAAAGCTTAAGAATATAAATTGTAAGCGTAACGATTA
alpha711	TATATGTAAAAT---CCCCCCCCCGAAAGCTTAAGAATATAAATTGTAAGCGTAACGATTA
	***** Start codon
MC58	TTTACGTTATGTTACCATATCCGACTACAATCCAAATTTTAGAGGTTTAACTATGAAAA
alpha711	TTTACGTTATGTTACCATATCCGACTACAATCCAAATTTTAGAGGTTTAACTATGAAAA

MC58	AAACAGTTTTTACATGTGCCATGATTGCCCTGACCGGTACTGCCGCCGCTGCACAAGAGC
alpha711	AAACAGTTTTTACATGTGCCATGATTGCCCTGACCGGTACTGCCGCCGCTGCACAAGAGC

MC58	TTCAAACCGCTAATGAGTTTACCGTCCACA
alpha711	TTCAAACCGCTAATGAGTTTACCGTCCACA

Abb. 3.25: Sequenzierung der Promotorregion des *opcA*-Gens bei MC58 und α 711.

3.4 Charakterisierung des Effektes der Meningokokkeninfektion auf den Zellzyklus

Im Folgenden sollten die bakteriellen Faktoren identifiziert werden, die für den Zellzyklusarrest verantwortlich sind. Hierzu wurden Infektionsversuche mit hitzeinaktivierten Meningokokken sowie mit bakteriellen Kulturüberständen durchgeführt. Zudem wurde die Rolle der Außenmembranproteine Opa und Opc bei der Induktion des Zellzyklusarrestes durch Infektionsversuche mit Opa- und Opc-exprimierenden *E. coli*-Stämmen untersucht.

Demgegenüber sollten auch die biochemischen Mechanismen auf der Seite der Zielzelle genauer analysiert werden, die für den oben gezeigten Zellzyklusarrest relevant sind. Hierfür wurden zellzyklusregulierende Proteine (Cycline und CDK-Inhibitoren der Cip/Kip-Familie) auf Proteinebene (mittels Western Blot), auf Transkriptionsebene (mittels qRT-PCR) und hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation (mittels Immunfluoreszenz) im Infektionversuch analysiert.

3.4.1 Propidium-Iodidfärbung von Detroit 562-Zellen nach Inkubation mit hitzeinaktivierten Meningokokkenisolaten

Um Erkenntnisse über die wirksamen bakteriellen Effektoren bei den zuvor beschriebenen Effekten auf den Zellzyklus zu gewinnen, wurden Detroit 562-Zellen zunächst mit hitzeinaktivierten Meningokokkenisolaten infiziert und PI-Färbungen durchgeführt. Die hierzu verwendeten Meningokokkenstämme wurden unmittelbar vor der Infektion für 10 Minuten bei 95 °C inaktiviert. Als Positivkontrolle wurde parallel die Infektion mit lebenden Meningokokken durchgeführt. Die Untersuchungen ergaben, dass der Effekt auf den Zellzyklus durch hitzeinaktivierte Bakterien nicht reproduzierbar war (siehe Abb. 3.26). Die aus den PI-Färbungen gewonnenen Histogramme werden im Anhang (Abb. 6.13) gezeigt.

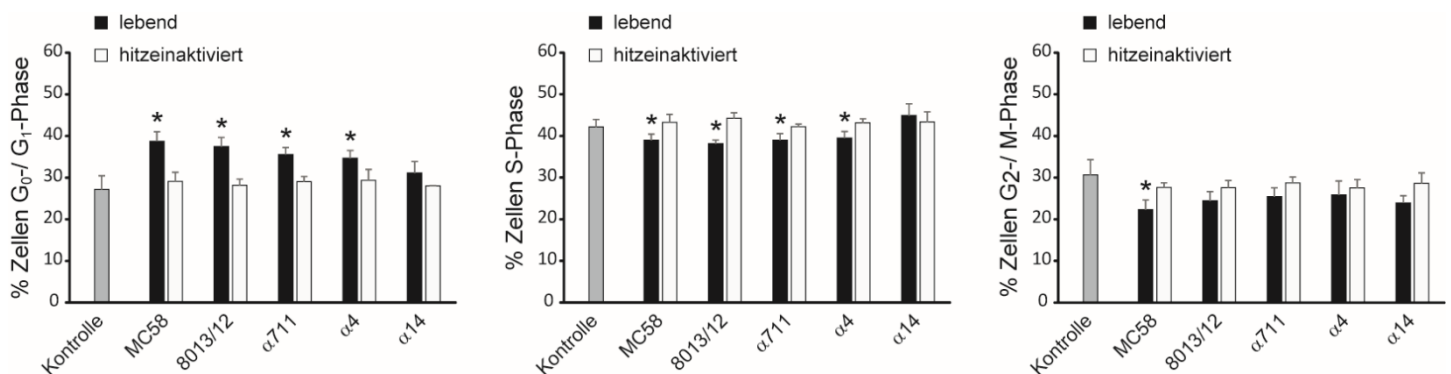


Abb. 3.26: PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit lebenden und hitzeinaktivierten Meningokokkenisolaten. Messung jeweils 24 h nach der Infektion. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten als Mittelwerte mit Standardabweichungen. *: p < 0,05 verglichen mit den nicht infizierten Kontroll-Zellen.

3.4.2 Propidium-Iodidfärbung von Detroit 562-Zellen nach Inkubation mit bakteriellen Kulturüberständen

Nachdem gezeigt worden war, dass hitzeinaktivierte Bakterien den Zellzyklus in Detroit 562-Zellen nicht beeinflussen, sollte untersucht werden, ob Kulturüberstände von *N. meningitidis* einen hemmenden Einfluss auf die Zellzyklusprogression haben. Bakterielle Kulturüberstände enthalten

bekanntermaßen eine Vielzahl an Stoffen, die entweder von den Bakterien sezerniert oder aus zugrunde gegangenen Bakterien freigesetzt wurden und als wirksamer Faktor infrage kommen [204]. Insbesondere die bakteriellen Zellwände enthalten Bestandteile, deren immunmodulatorisches Potential bekannt ist [245].

Zur Untersuchung eines möglichen Effektes auf den Zellzyklus wurden PI-Färbungen an Detroit 562-Zellen durchgeführt, die mit Überständen von Über-Nacht-Bakterienkulturen behandelt wurden. Nach Aufkonzentrierung des bakteriellen Proteins wurde mittels BCA Protein Assay die Proteinkonzentration für jede Probe ermittelt (siehe Tab. 3.1). Am Versuchstag wurden Detroit 562-Zellen mit jeweils 25 µl und 100 µl des Konzentrates versetzt. Die folgende Behandlung verlief exakt wie die bisherigen PI-Färbungen. Die Messungen erfolgten 24 h nach Zugabe der Konzentrate der bakteriellen Überstände und ergaben, dass auch die bakteriellen Kulturüberstände keinen Effekt auf den Zellzyklus auszuüben vermochten, selbst wenn sie in der höheren Konzentration eingesetzt wurden (siehe Abb. 3.27).

	Proteinkonzentration	Protein in 25 µl	Protein/100 µl
MC58	1,510 mg/ml	37,75 µg	151,0 µg
8013/Klon 12	1,010 mg/ml	25,25 µg	101,0 µg
α711	1,235 mg/ml	30,875 µg	123,5 µg
α4	1,185 mg/ml	29,625 µg	118,5 µg
α14	1,160 mg/ml	29,0 µg	116,0 µg

Tab. 3.1: Proteinkonzentration in den Kulturüberständen der getesteten Meningokokken-isolate.

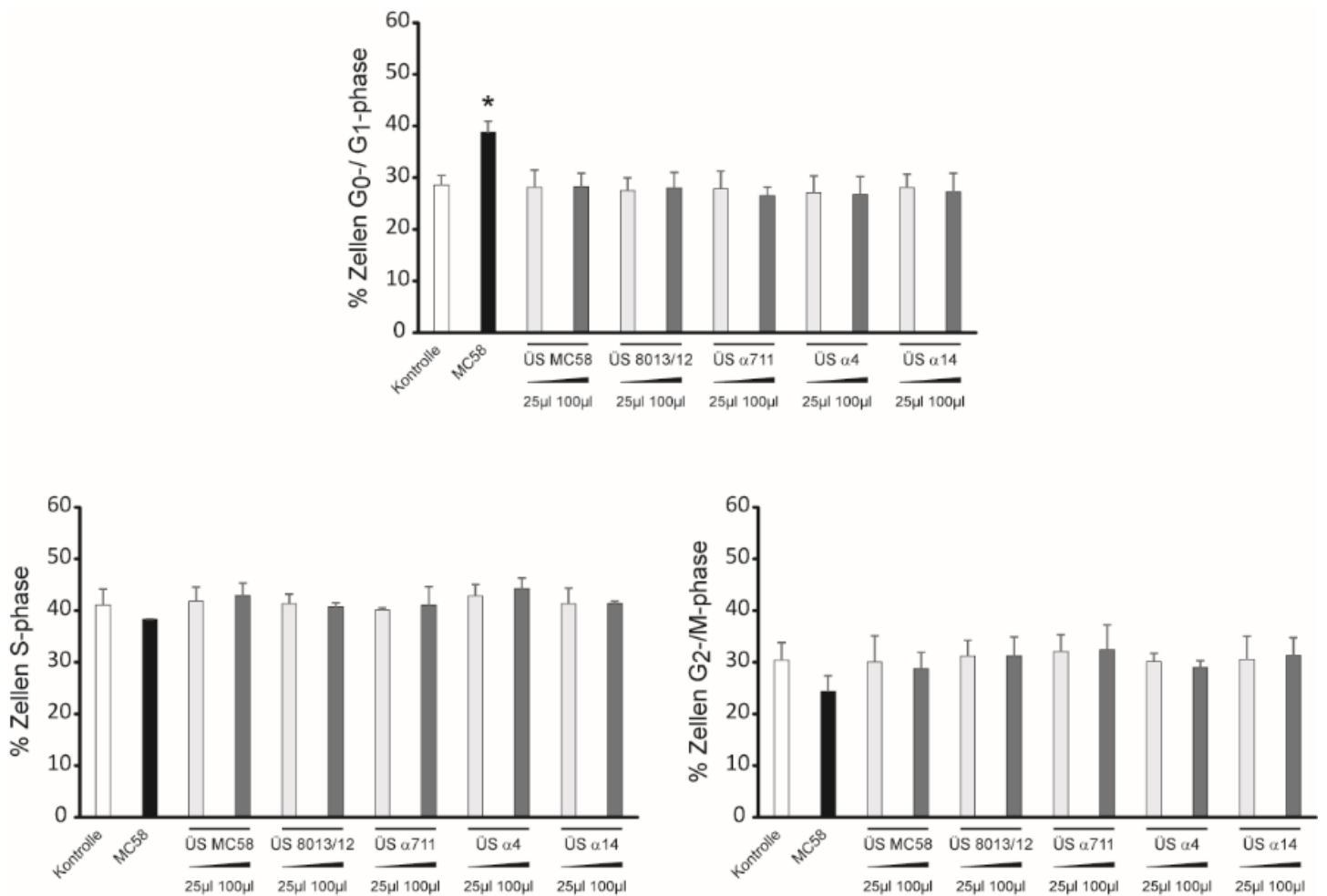


Abb. 3.27: PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Behandlung mit bakteriellen Kulturüberständen. Messung jeweils 24 h nach Zugabe des bakteriellen Kulturüberstandes (ÜS) des betreffenden Bakterienstammes. Als Positivkontrolle wurde auch eine Infektion mit MC58 durchgeführt. Gezeigt sind die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente als Mittelwerte mit Standardabweichungen. *: $p < 0,05$ verglichen mit den nicht infizierten Kontrollzellen.

3.4.3 Zellzyklusanalysen mit Detroit 562-Zellen nach Infektion mit Opa- und Opc-exprimierenden *E. coli*-Stämmen

Um zu ermitteln, ob die Oberflächenproteine Opa und Opc für die Effekte auf den Zellzyklus entscheidend sind, wurden Infektionsversuche mit *E. coli*-Stämmen durchgeführt, die rekombinant Opa-Proteine oder das Opc-Protein exprimieren. Hierfür wurden in Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe alle vier *opa*-Gene des verwendeten Meningokokkenstammes, die von den offenen Leserastern (ORFs) ORF NMB0442 (Opa1), ORF NMB0926 (Opa2), ORF NMB1465 (Opa3) und ORF

NMB1636 (Opa4) kodiert werden, sowie das *opcA*-Gen, welches von dem ORF NMB1053 kodiert wird, in den prokaryotischen Expressionvektor pET28a kloniert [246, 247].

Für die Synthese der rekombinanten Opa-Proteine wurde der Protease-defiziente *E. coli*-Expressionsstamm BL21 DE3 verwendet. Die Expressionseffizienz der Proteine ohne bzw. nach IPTG-Induktion wurde mittels SDS-PAGE in den bakteriellen Lysaten kontrolliert.

Nach Induktion der jeweiligen Opa-Proteine (Opa1, Opa2, Opa3 und Opa4) konnte jeweils eine verstärkte Proteinbande bei ca. 30 kDa ermittelt werden. Das ermittelte Molekulargewicht der Banden lässt vermuten, dass es sich um die Opa-Proteine handelt.

Detroit 562-Zellen wurden, wie zuvor für die Meningokokkenisolate beschrieben, mit Opa- bzw. Opc-exprimierenden *E. coli*-Stämmen mit einer MOI von 100 infiziert und die Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen wurde 24 Stunden nach der Infektion durch PI-Färbung ermittelt. Es zeigte sich bei keinem der verwendeten *E. coli*-Stämme ein signifikanter Unterschied zu dem Wildtypstamm *E. coli* BL21 DE3, welcher keines der Meningokokkenproteine exprimiert (Abb. 3.28).

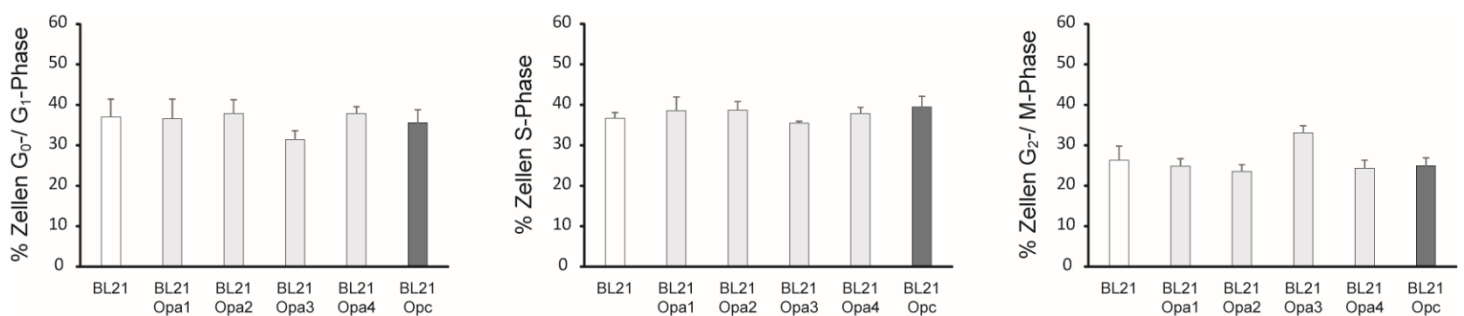


Abb. 3.28: PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit Opa1-, Opa2-, Opa3-, Opa4- und Opc-exprimierenden *E. coli*-Stämmen. Messung jeweils 24 h nach Infektion. Als Vergleichswert wurde der Wildtyp (BL21) eingesetzt. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten als Mittelwerte mit Standardabweichungen.

3.4.4 Western Blot zur Detektion zellzyklusregulierender Proteine in Detroit 562-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *N. meningitidis* die Zellzyklusprogression moduliert und einen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase induziert, wurde der Einfluss von *N. meningitidis* auf relevante Zellzyklusregulatoren untersucht.

Als zentrale Effektoren im Zellzyklus humaner Zellen gelten die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), die einerseits durch die variable Expression der Cycline aktiviert, andererseits durch verschiedene CDK-Inhibitoren (CKI) gehemmt werden. Entscheidend für die Progression durch die G₁-Phase ist die Synthese der Cycline D und E mit resultierender Aktivierung der CDKs 4, 6 und 2. Dagegen kann durch Expression von CKI der INK4- und der Cip/Kip-Familie den Progress in die G₂-Phase durch Inaktivierung der betreffenden CDKs gehemmt werden.

Zur Untersuchung der Rolle dieser Regulatoren für den hier beschriebenen Zellzyklusarrest wurden Zelllysate von Detroit 562-Zellen hergestellt, die zuvor für 24 Stunden mit den oben genannten Meningokokkenisolaten infiziert worden waren. Die Detektion und Quantifizierung der Zellzyklusregulatoren auf der Basis des zellulären Proteingehaltes wurde mittels Western Blot durchgeführt.

Hierbei zeigte sich nach Infektion mit den kolonisierenden Isolaten α 711 und α 4 eine statistisch signifikante Reduktion der Cyclin D1-Expression (siehe Abb. 3.29). Auch nach der Infektion mit dem Meningokokkenisolat 8013/Klon 12 deutete sich eine Reduktion von Cyclin D1 an. Diese war jedoch in der Auswertung dreier Versuche nicht statistisch signifikant. Mit den Isolaten MC58 und α 14 ergab sich in keinem der drei Versuche ein relevanter Unterschied, verglichen mit der nicht infizierten Kontrolle.

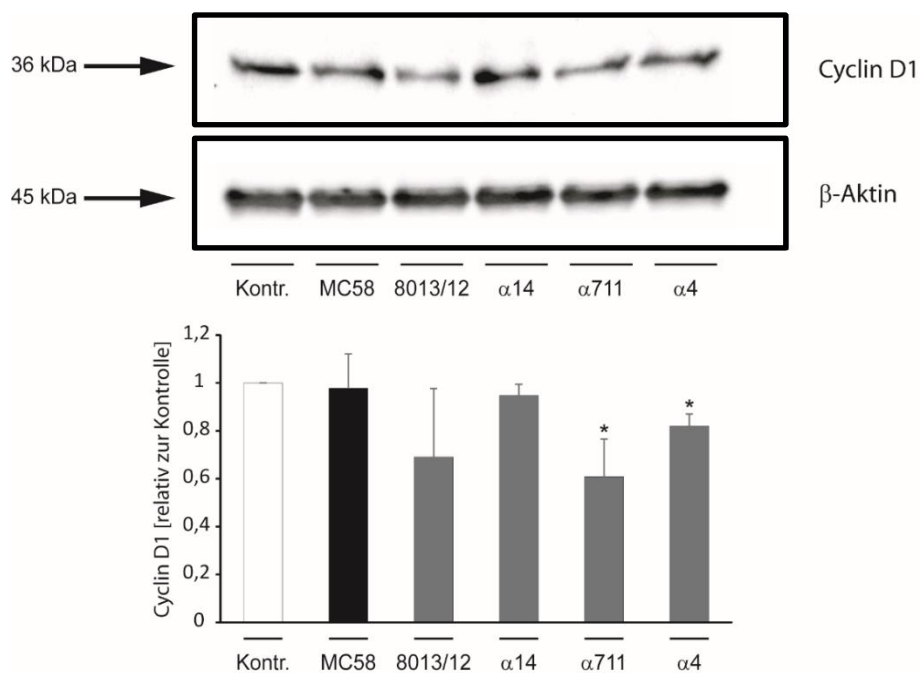


Abb. 3.29. Western Blot von Zelllysaten von Detroit 562-Zellen. Die obere Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot zur Detektion von **Cyclin D1**. Als Ladekontrolle wurde in demselben Lysat β -Aktin detektiert. In der unteren Abbildung sind die Ergebnisse der Quantifizierung dreier unabhängiger Western Blots von drei verschiedenen Zelllysaten gezeigt. Dabei wurde jede Bande im Cyclin D1-Blot densitometrisch quantifiziert und in Relation zu der entsprechenden Bande im β -Aktin-Blot gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. *: $p < 0,05$ im Vergleich mit der Kontroll-Bande.

Interessanterweise zeigte sich bei den Western Blots zur Detektion von Cyclin E nach Infektion mit allen Isolaten eine deutliche Verstärkung des Signals, die im Falle von MC58 auch statistisch signifikant war (siehe Abb. 3.30). Das Trägerisolat $\alpha 14$ bewirkte nur eine geringfügige Veränderung der Expression im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollzellen.

Als weiteres wichtiges Regulationsprotein wurde der Zellzyklusinhibitor $p21^{WAF1/Cip1}$ analysiert. Dieser CKI hemmt das Fortschreiten des Zellzyklus an mehreren Punkten, unter anderem auch am Übergang von der G_1 -Phase in die S-Phase. Die Messungen zeigten bei Infektion mit den Isolaten MC58, 8013/Klon 12 und $\alpha 711$ deutlich erhöhte Signalwerte. Bei Infektion mit dem Referenzstamm MC58 war die Expression statistisch signifikant gesteigert (siehe Abb. 3.31).

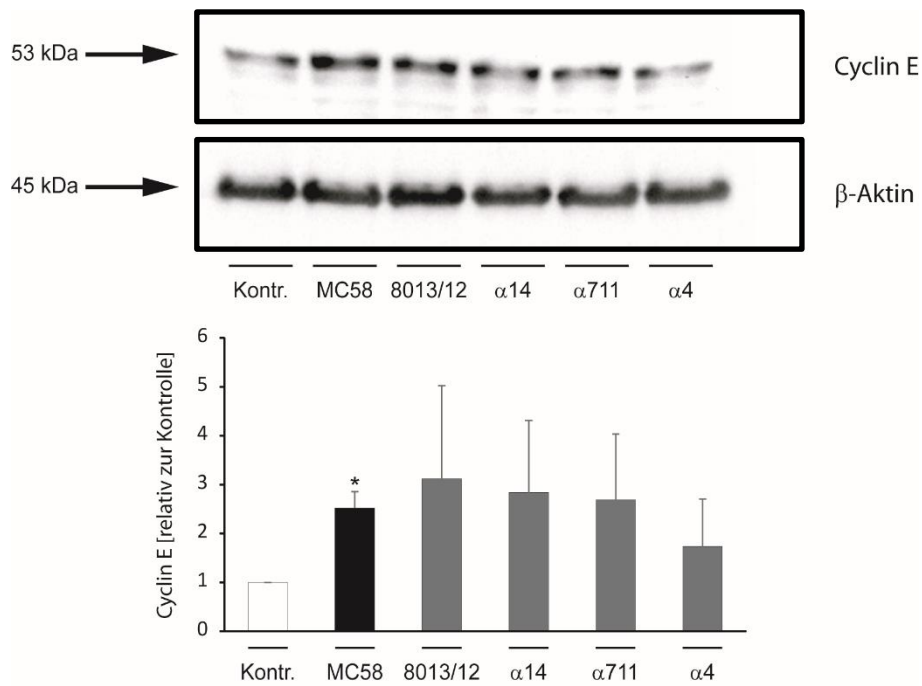


Abb. 3.30: Western Blot von Zelllysaten aus Detroit 562-Zellen zur Detektion der Expression von Cyclin E. Durchführung und Auswertung wie bei Abb. 3.29 beschrieben.

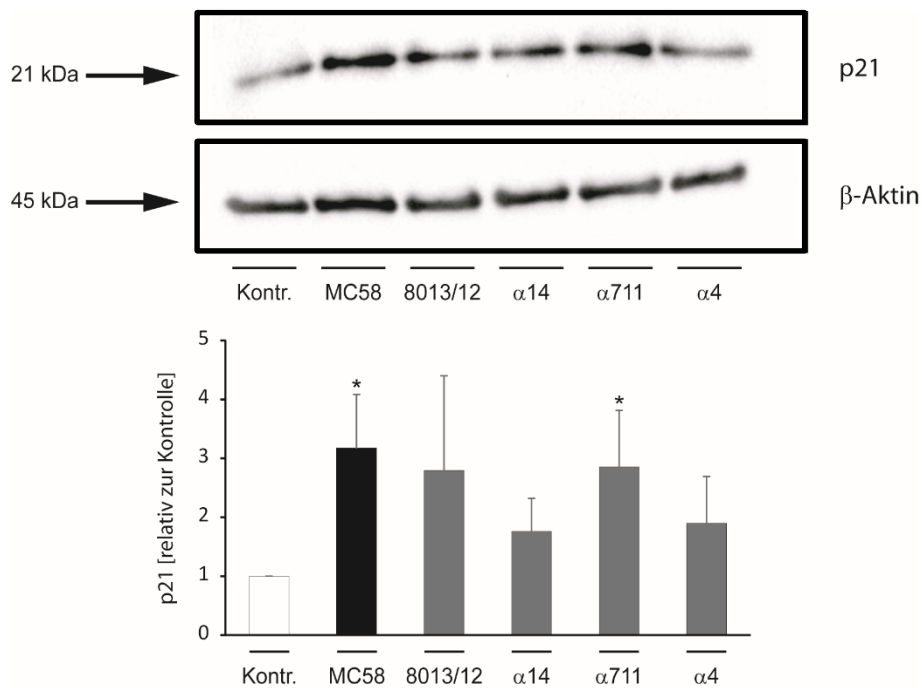


Abb. 3.31: Western Blot von Zelllysaten aus Detroit 562-Zellen zur Detektion der Expression des Zellzyklusinhibitors p21^{WAF1/Cip1}. Durchführung und Auswertung wie bei Abb. 3.29 beschrieben.

Leider gelang es trotz Anwendung mehrerer unterschiedlicher Antikörper und verschiedener Blockiermedien nicht, den ebenfalls wichtigen Zellzyklusinhibitor p27^{Kip} mittels Western Blot darzustellen.

3.4.5 Immunfluoreszenzfärbung von Detroit 562-Zellen zur Visualisierung zellzyklusregulierender Proteine

Um Rückschlüsse auf die Lokalisation der interessierenden Zellzyklusregulatoren in der Zielzelle ziehen zu können, wurden Immunfluoreszenzmessungen mit infizierten und nicht infizierten Detroit 562-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer MOI von 100 infiziert und im Folgenden weiterbehandelt, wie bei den zuvor gezeigten PI-Färbungen. Die Fixierung und Antikörperbehandlung wurden 24 Stunden nach der Infektion durchgeführt.

Bei der Färbung von Cyclin D1 und Cyclin E ergab ein eher diffuses Anfärbemuster, das sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma zu sehen war. Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen waren dabei lichtmikroskopisch nicht erkennbar (siehe Abb. 3.32 und 3.33).

Dagegen ergab die Messung von p21^{WAF1/Cip1}, dass nach Infektion mit MC58 deutlich mehr Zellkerne angefärbt waren, als bei nicht infizierten Kontrollzellen (siehe Abb. 3.34). Eine Auszählung von jeweils ca. 250 angefärbten Zellen erbrachte bei Kontrollzellen 4,12 % Zellen mit einem deutlichen Signal im Zellkern, bei mit MC58 infizierten Zellen dagegen 15,71 %. Nach Infektion mit α 711 waren 8,75 %, nach Infektion mit α 14 7,87 % der Zellkerne auf p21^{WAF1/Cip1} anfärbbar.

Bei der Visualisierung von p27^{Kip} ergab sich bei nicht infizierten Kontrollzellen ein eher diffuses Signal, das sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma erkennbar war. Nach Infektion mit MC58 und α 711 war das Signal bei einem großen Anteil der Zellen durch stark fluoreszierende Punkte gekennzeichnet und unterschied sich deutlich von dem der Kontrollzellen (siehe Abb. 3.35). In den mit dem Meningokokkenisolat α 14 infizierten Zellen kamen sowohl Zellen mit einem diffus

angefärbten Kern, als auch solche mit dem gepunkteten Anfärbemuster zur Darstellung.

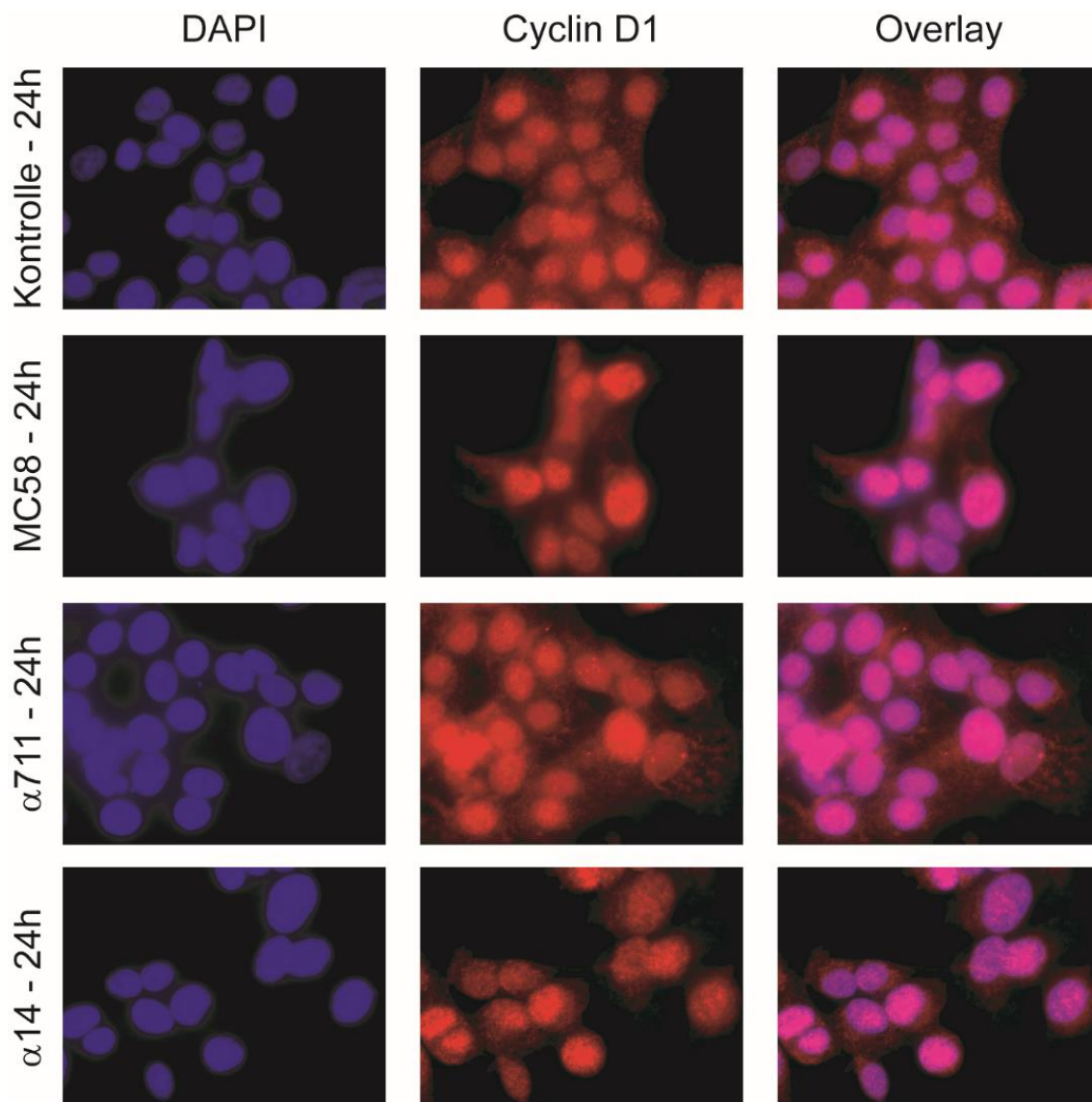


Abb. 3.32: Immunfluoreszenz von Detroit 562-Zellen für Cyclin D1. Die Fixierung und Anfärbung erfolgten 24 h nach der Infektion. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (linke Spalte), Cyclin D1 wurde mit einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper rot dargestellt (mittlere Spalte) und ein Overlay beider Signale wurde erstellt (rechte Spalte).

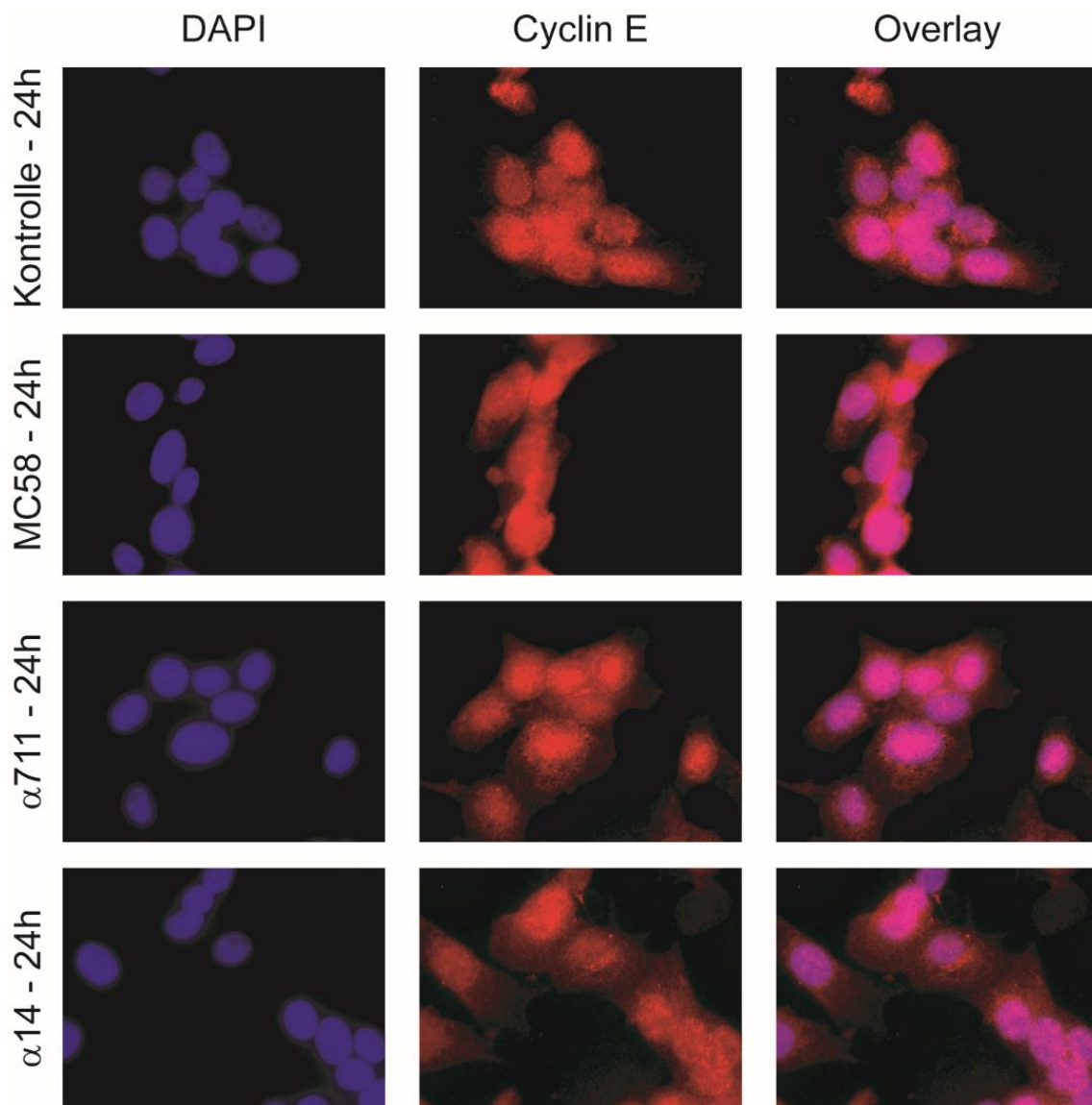


Abb. 3.33: Immunfluoreszenz von Detroit 562-Zellen für Cyclin E. Durchführung und Darstellung wie in Abb. 3.32 beschrieben.

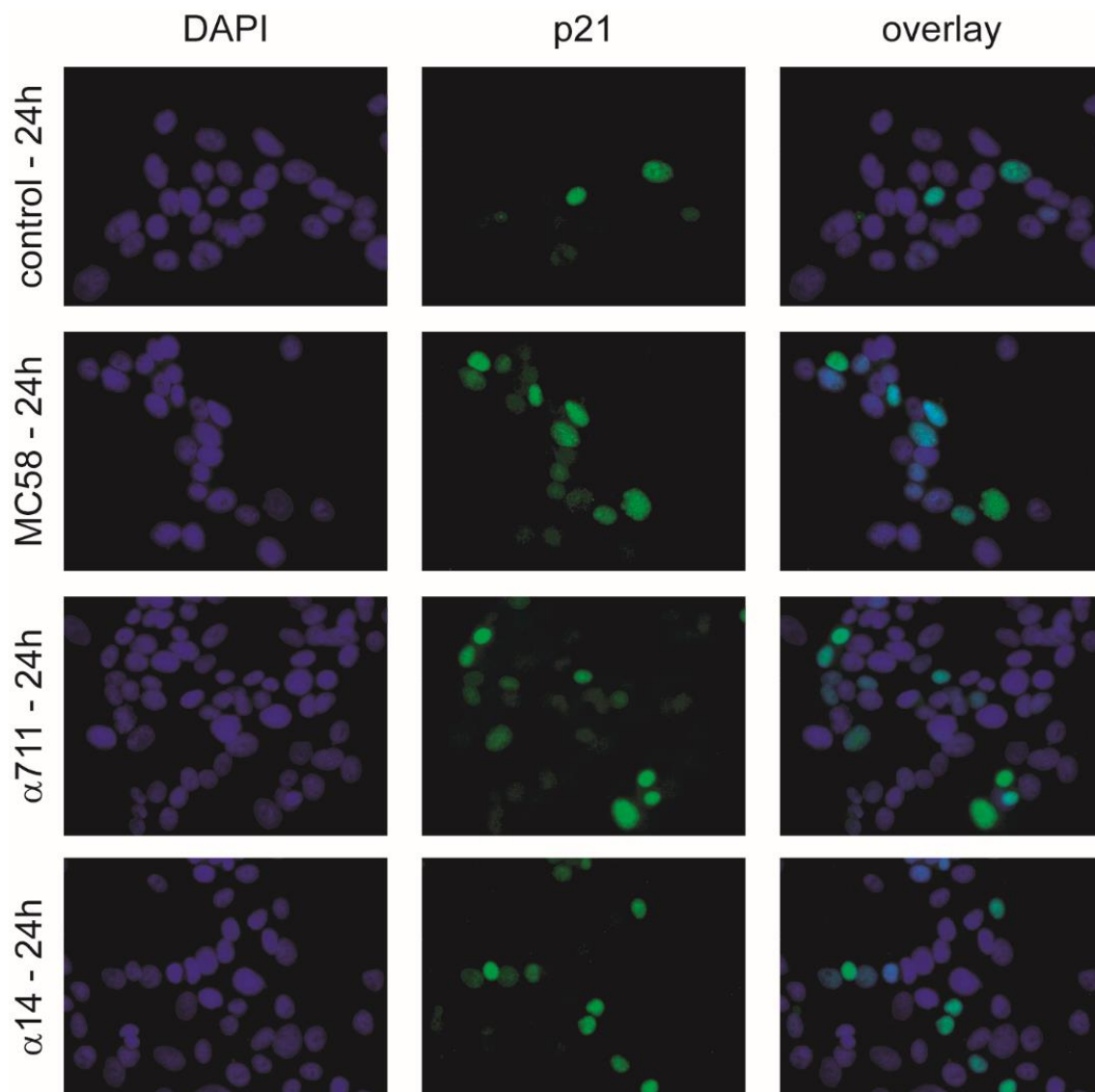


Abb. 3.34: Immunfluoreszenz von Detroit 562-Zellen für p21^{WAF1/CIP1}. Die Fixierung und Anfärbung erfolgten 24 h nach der Infektion. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (linke Spalte), p21^{WAF1/CIP1} wurde mit einem AlexaFluor 488-konjugierten Sekundärantikörper grün dargestellt (mittlere Spalte) und ein Overlay beider Signale wurde erstellt (rechte Spalte).

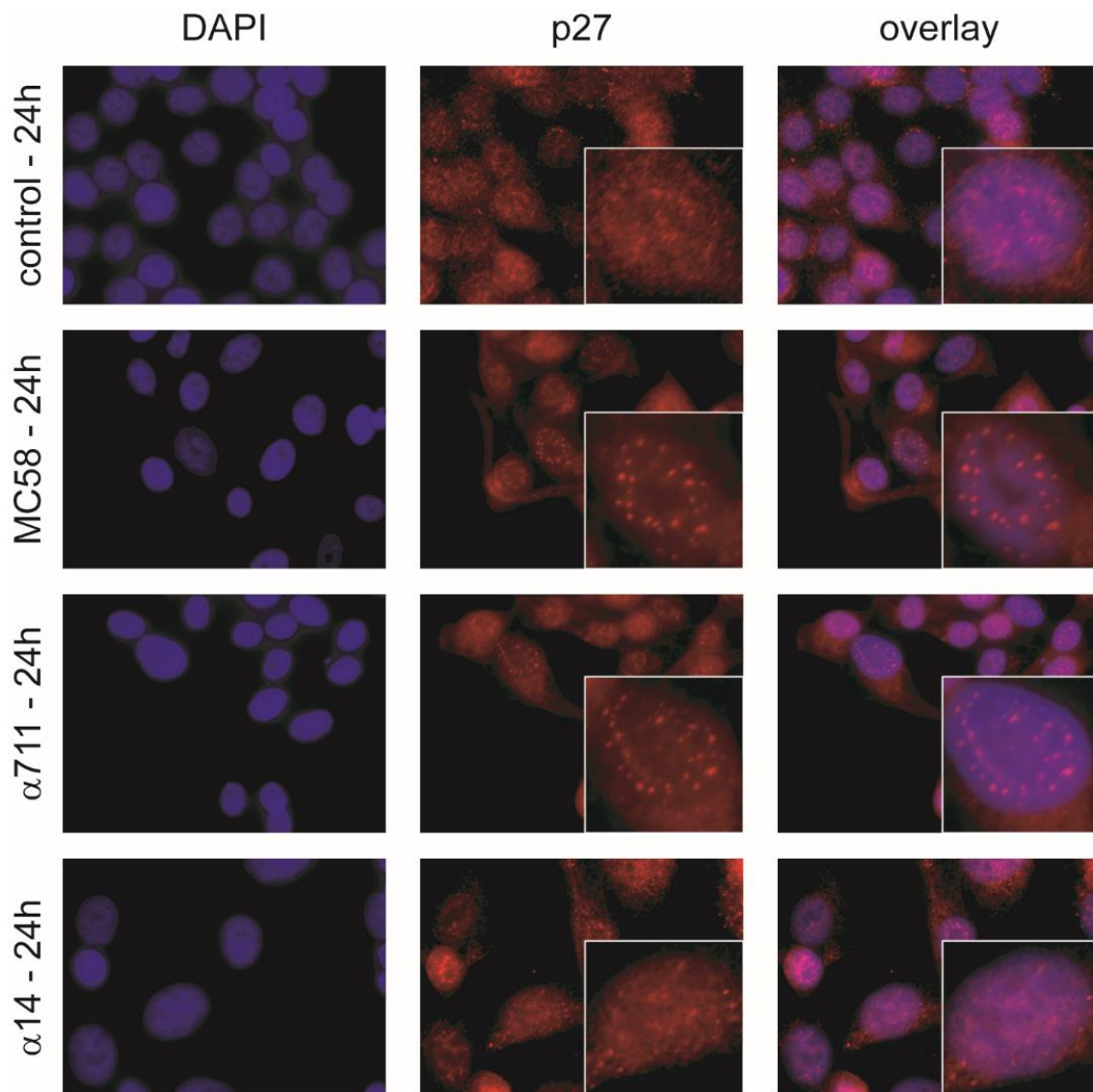


Abb. 3.35: Immunfluoreszenz von Detroit 562-Zellen für p27^{Kip}. Die Fixierung und Anfärbung erfolgten 24 h nach der Infektion. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (linke Spalte), p27^{Kip} wurde mit einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper rot dargestellt (mittlere Spalte) und ein Overlay beider Signale wurde erstellt (rechte Spalte). Zur deutlicheren Erkennbarkeit wurde je ein Zellkern vergrößert unten rechts abgebildet.

3.4.6 qRT-PCR zur Untersuchung der Transkription der Cycline A, B, D1 und E

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Proteingehalt von Cyclin D1 und Cyclin E in zellulären Lysaten durch die Infektion mit Meningokokken beeinflusst wird, wurde mittels qRT-PCR analysiert, ob diese Veränderungen auf transkriptioneller Ebene reguliert sind und folglich auch die Menge an transkribierter mRNA für diese Cycline durch die Infektion verändert wird. Es wurden hierzu Detroit 562-Zellen infiziert und bis zur RNA-Extraktion 24 Stunden nach der Infektion exakt so behandelt, wie zuvor bei den PI-Färbungen. Um relevante Degradierungsprozesse in den RNA-Proben ausschließen zu können, wurde die RNA-Integrität mittels Agilent 2100 Bioanalyzer für jede Probe getestet und die RNA-integrity-number (RIN) bestimmt. Alle verwendeten Proben zeigten dabei zwei gut abgrenzbare Peaks als Korrelat zu einer gut erhaltenen 18S- und 28S rRNA bei nur sehr geringem Hintergrundsignal (siehe Abb. 3.36). Die automatisch bestimmte RIN betrug für alle Proben 10.

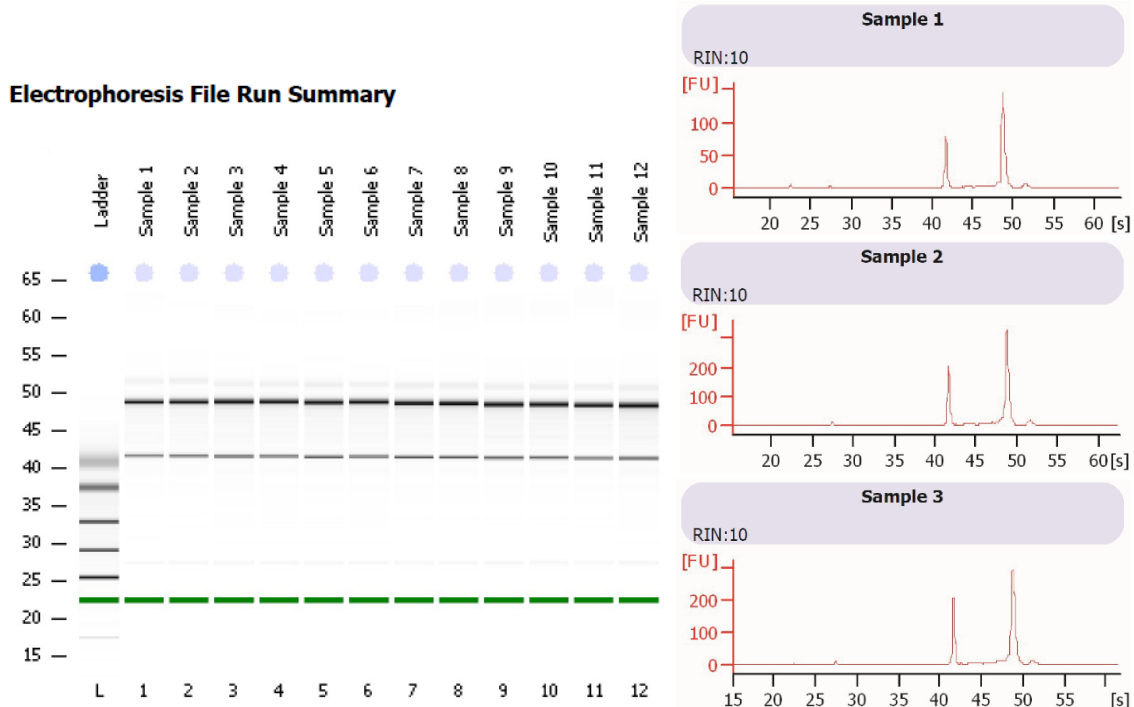


Abb. 3.36: Analyse der RNA-Integrität mittels BioAnalyzer. Links abgebildet sind die Elektrophoresen aller zwölf Proben. Rechts sind exemplarisch die Densitogramme der ersten drei Proben abgebildet.

Hierauf folgte der Umschrieb der RNA in cDNA mithilfe des Super Script II Reverse Transcriptase Kits und zufälligen Primern sowie anschließend eine PCR-Purifikation. Die cDNA-Proben wurden dann mittels qRT-PCR bezüglich der Menge an cDNA quantifiziert, die für Cyclin A, -B, -D1 und -E kodiert. Als Farbstoff wurde SYBR-Green verwendet und es erfolgte eine relative Quantifizierung, bei der als Referenzgen das Gen für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) detektiert wurde. Dieses zeigte keine messbaren Unterschiede in der Expression in infizierten und nicht infizierten Zellen (siehe Abb. 3.37).

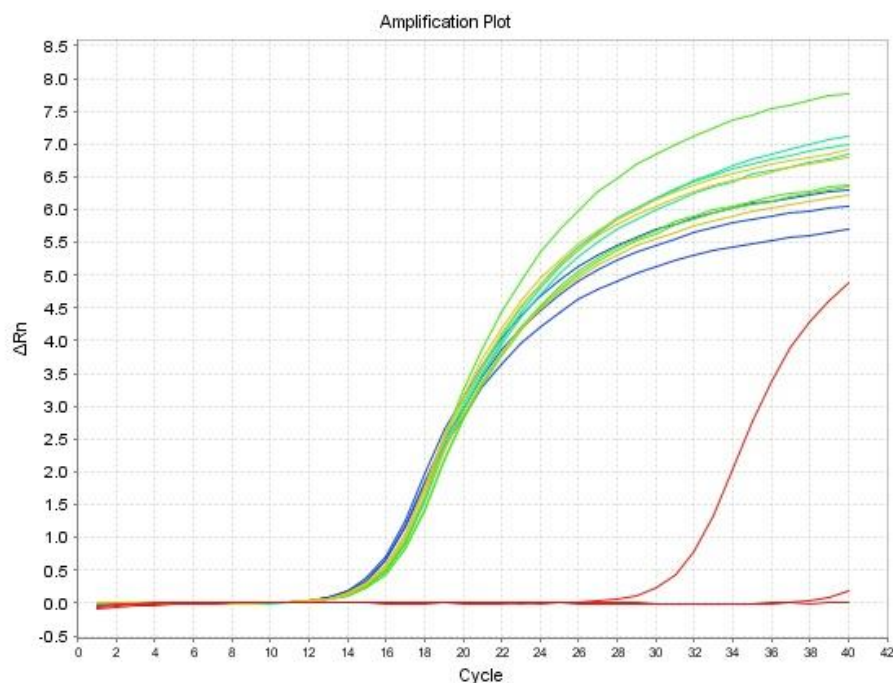


Abb. 3.37: qRT-PCR. Gemessen wurde die Expression von **GAPDH**. Die roten Kurven zeigen die Non Target Kontrollen (NTC). Die grünen und blauen Kurven zeigen die Amplifikation bei nicht infizierten Kontroll-Zellen und mit MC58, α 711 und α 14 infizierten Zellen. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment als Triplikate.

Die Auswertung erfolgte mithilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode automatisiert. Dem von der Step One-Software erstellten Protokoll entsprechend, wurden von jeder cDNA-Probe drei Messwerte erhoben. Der Versuch wurde mit insgesamt drei verschiedenen Sätzen von cDNA-Proben durchgeführt, die jeweils in unabhängigen Infektionsversuchen gewonnen worden waren.

Es ergaben sich bei allen analysierten Cyclinen keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollzellen und mit den verschiedenen Bakterienisolaten infizierten Zellen (siehe Abb. 3.38-3.42).

Um außerdem unspezifische Signale detektieren zu können, die etwa durch die Formation von Primer-Dimeren entstehen können, wurde nach jeder qRT-PCR eine Schmelzkurve angefertigt, die einen Verlust der Fluoreszenz idealerweise nur bei der Schmelztemperatur des gewünschten Amplifikates zeigen sollte. Bei jeder Probe stellte sich genau ein Peak in der Schmelzkurve bei derselben Temperatur dar (siehe Abb. 6.15 und 6.16 im Anhang).

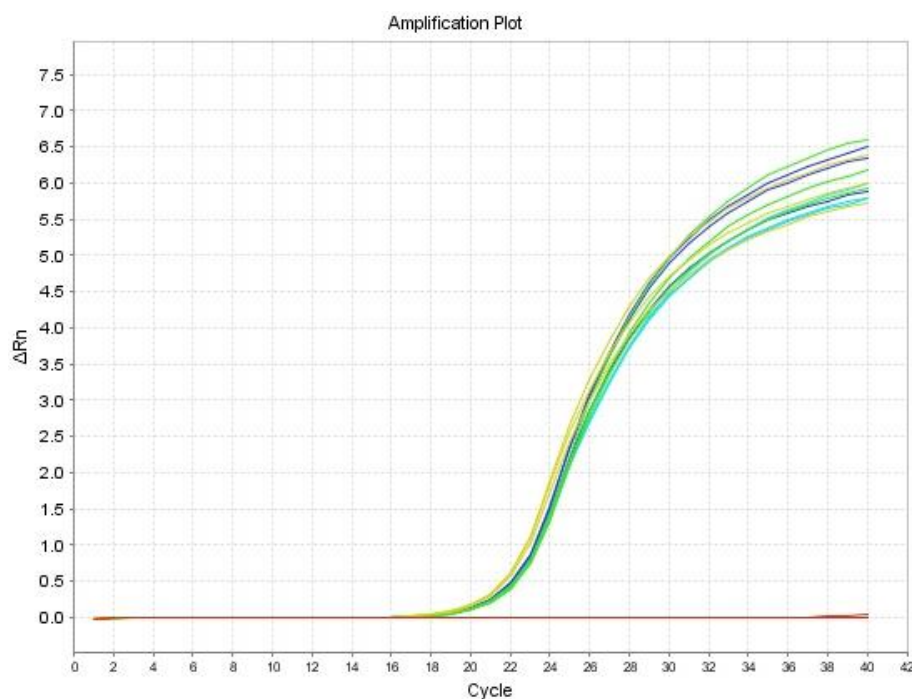


Abb. 3.38: qRT-PCR. Gemessen wurde die Expression von **Cyclin A**. Die roten Kurven ohne relevante Amplifikation zeigen die Non Target Kontrollen (NTC). Die grünen und blauen Kurven zeigen die Amplifikation bei nicht infizierten Kontroll-Zellen und mit MC58, α 711 und α 14 infizierten Zellen. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment als Triplikat.

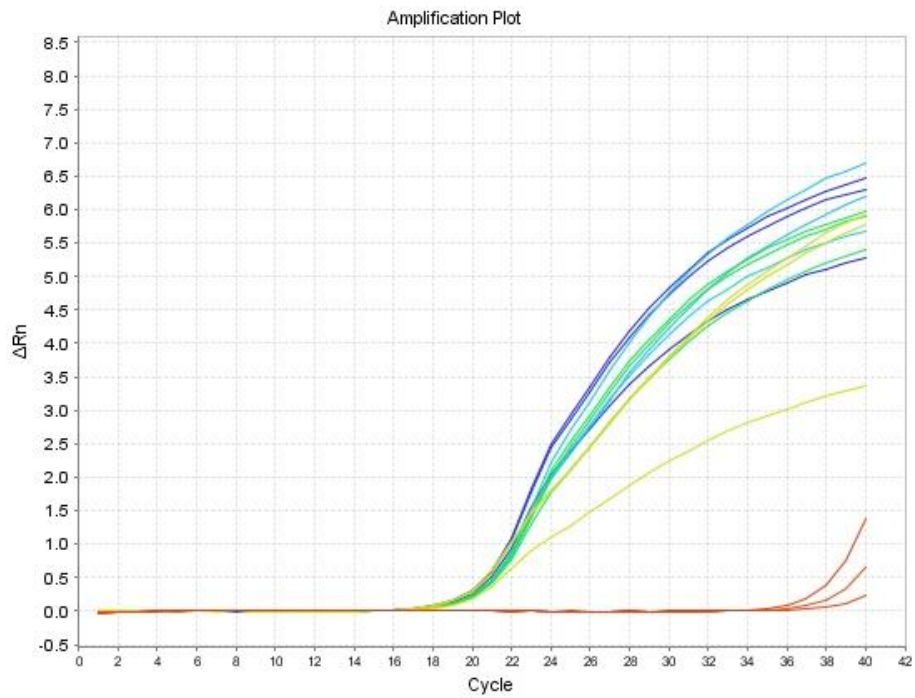


Abb. 3.39: qRT-PCR. Gemessen wurde die Expression von **Cyclin B**. Durchführung und Darstellung wie in Abb. 3.38.

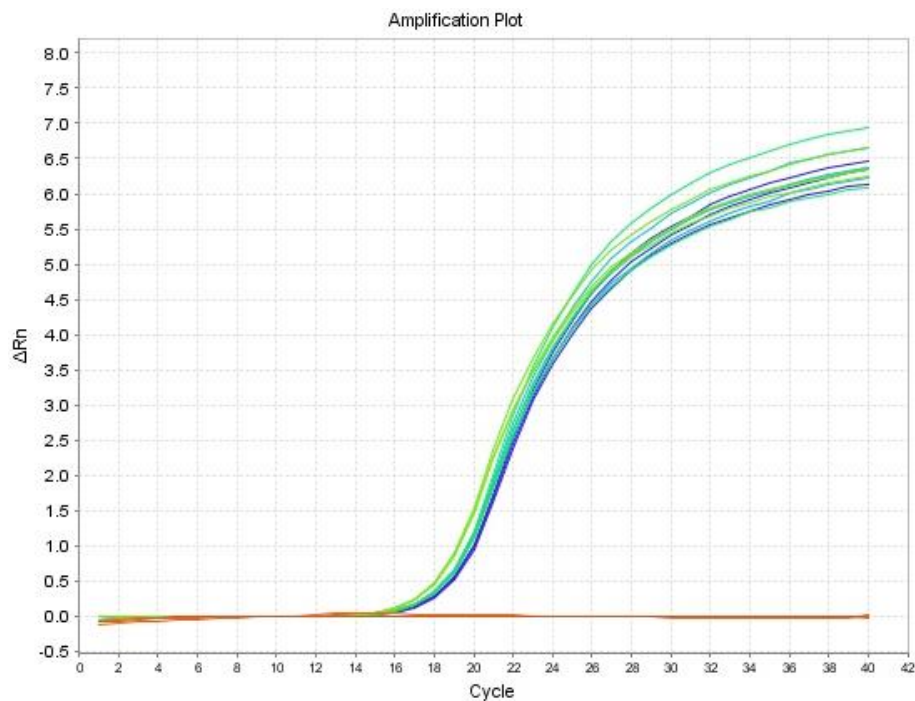


Abb. 3.40: qRT-PCR. Gemessen wurde die Expression von **Cyclin D1**. Durchführung und Darstellung wie in Abb. 3.38.

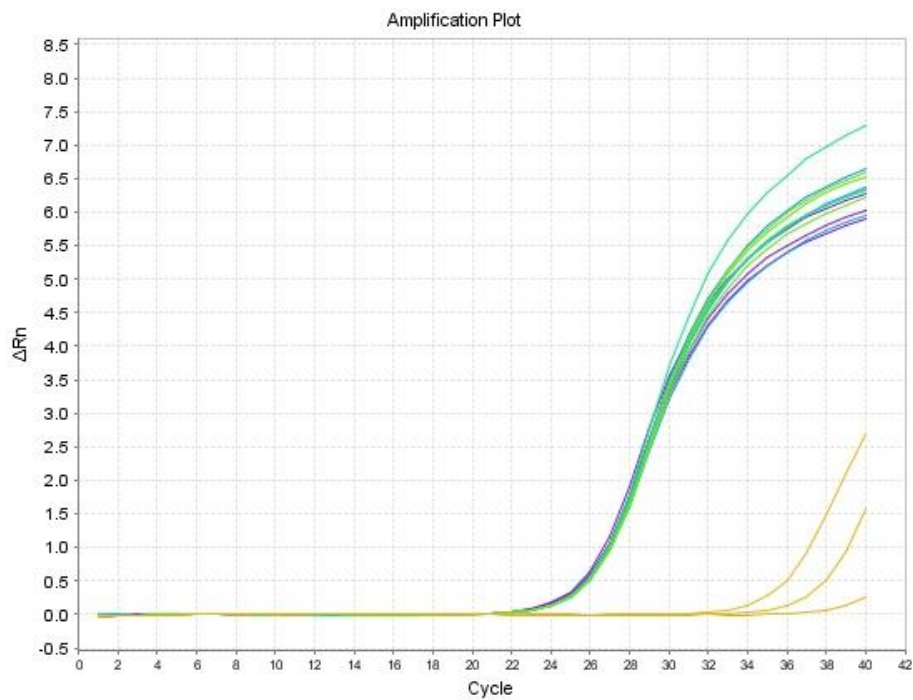


Abb. 3.41: qRT-PCR. Gemessen wurde die Expression von **Cyclin E**. Durchführung und Darstellung wie in Abb. 3.38.

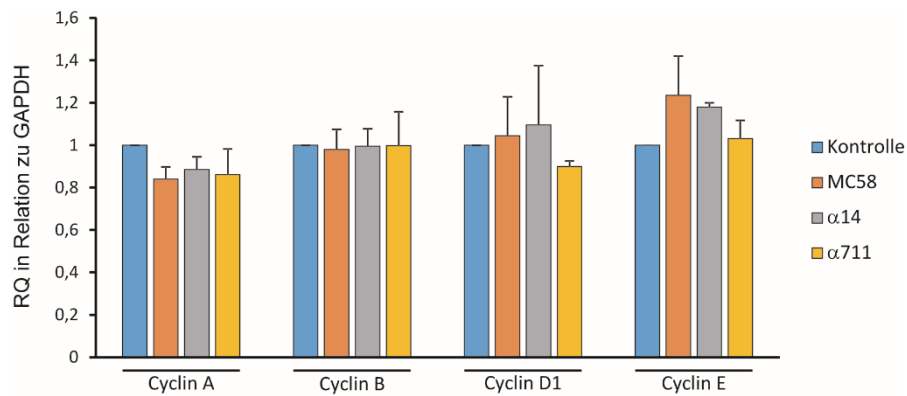


Abb. 3.42: qRT-PCR. Quantifizierung der Amplifikationskurven mithilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente.

4. Diskussion

4.1 Auswahl der verwendeten Epithelzelllinien

Bei zahlreichen bakteriellen Pathogenen konnten in der Vergangenheit Effektoren nachgewiesen werden, durch deren Expression der Zellzyklus der Wirtszelle während der Infektion moduliert und somit vermutlich die Bedingungen für die bakterielle Kolonisation und/oder Infektion begünstigt werden [178]. Auch in Infektionsversuchen mit *N. meningitidis* an endothelialen Zellen konnte kürzlich ein Effekt auf den Zellzyklus *in vitro* nachgewiesen werden [204].

Da das Epithel des menschlichen oberen Respirationstraktes das bislang einzige bekannte Reservoir für *N. meningitidis* darstellt [15] und Meningokokken bei der Kolonisation und Infektion möglicherweise ebenfalls von einer Einflussnahme auf den Zellzyklus der Wirtszellen profitieren könnten, war die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, in Infektionsversuchen mit humanen pharyngealen Epithelzellen zu evaluieren, ob ein Einfluss auf den Zellzyklus solcher Zellen ausgeübt wird, welche bakteriellen und zellulären Effektoren hierbei eine Rolle spielen und ob sich pathogene Meningokokkenisolate von Trägerisolaten diesbezüglich unterscheiden.

Hierfür ausgewählt wurden vier von humanem Pharynxepithel stammende Zelllinien, die sich hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften deutlich unterscheiden und im Infektionsversuch mit *N. meningitidis* unterschiedlich gut etabliert sind:

- 1) Die Zelllinie Detroit 562 stammt aus der Aussaat eines Pharynxkarzinoms und wurde aus malignem Pleuraexsudat isoliert [214, 248]. Die Zelllinie ist im Infektionsversuch mit *N. meningitidis* bereits gut etabliert und wurde in zahlreichen Studien, unter anderem zum Adhärenz- und Invasionsverhalten [68, 228, 233-235, 249-251] und zur Signaltransduktion bei der Meningokokkeninfektion [68, 91, 252-254] verwendet. Auch die Expression für die Meningokokkeninfektion relevanter Mengen von CEACAM-Molekülen, die als Rezeptoren für die

Opa-Proteine von *N. meningitidis* dienen [61], wurde in dieser Zelllinie nachgewiesen [62, 255], ebenso wie der potentielle Pilus-Rezeptor CD46 [62] und die Expression und Funktionalität verschiedener Toll like Rezeptoren (TLR) [252, 254, 256-260].

- 2) FaDu Zellen stammen dagegen nicht aus einer Metastase, sondern aus einem primären Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx [213, 261]. Auch sie wurden in der Vergangenheit bereits in großem Umfang für Experimente mit Meningokokken eingesetzt [91, 220, 228-232, 262-267]. Die Expression von CD46 [268] sowie bestimmter CAECAM-Moleküle (CEACAM6) [269] wurde auch in dieser Zelllinie nachgewiesen, letztere jedoch nicht im Zusammenhang mit der Infektion durch *N. meningitidis*. TLR 3 und TLR 9 werden exprimiert, sind jedoch, anders als bei Detroit 562-Zellen, nur teilweise funktionell [257, 260].

Zum Vergleich wurden auch zwei Zelllinien nicht malignen Ursprungs verwendet. Diese sind zwar vermutlich in ihrer Zellzyklusregulation weitaus weniger dereguliert, als die Zellen eines Karzinoms, und weisen daher mehr Gemeinsamkeiten mit gesunden Zellen *in vivo* auf. Jedoch sind sie im Versuch mit Meningokokken bislang noch nicht etabliert.

- 3) Die Zelllinie NP69 wurde aus dem Nasopharynx von Patienten isoliert, die an nasaler Obstruktion und/oder Nasenbluten litten, ohne dass eine maligne Erkrankung zugrunde lag [215]. Die Immortalisierung erfolgte durch Transfektion mit einem für das Simian Virus 40T-Antigen kodierenden Plasmid [215]. Das Cytokeratinmuster ist in dieser Zelllinie identisch mit dem Cytokeratinmuster primärer nasopharyngealer Zellen, was den epithelialen Ursprung beweist. Jedoch wurden eine sehr hohe Telomeraseaktivität und weitere Gemeinsamkeiten mit malignen nasopharyngealen Zellen nachgewiesen, weswegen die Zellen vermutlich eher als „prämaligne“ anzusehen sind [215, 270]. Verwendet wurde diese Zelllinie bisher vorwiegend zur Untersuchung karzinogener Effekte der

Epstein-Barr-Virus Infektion [270-276]. Infektionsversuche an NP69-Zellen mit Meningokokken sind bislang nicht publiziert.

- 4) Als eine weitere nicht maligne nasopharyngeale Epithelzelllinie sollten auch NP460hTert Zellen untersucht werden. Diese wurden ebenfalls aus nicht malignen Biopsien isoliert, jedoch erfolgte die Immortalisierung durch Expression einer humanen Telomerase reversen Transkriptase (hTert) mithilfe eines retroviralen Vektors [216]. Leider gelang die Kultivierung dieser Zelllinie trotz strenger Einhaltung der Arbeitsanweisungen des Zulieferers nicht, sodass keine Zellzyklusuntersuchungen im Infektionsversuch mit dieser Zelllinie erfolgen konnten.

4.2 Auswahl der verwendeten Bakterienisolate

Das Meningokokkenisolat MC58 gilt als Referenz und am besten charakterisiertes invasives Isolat der Serogruppe B (Serotyp 15; Serosubtyp P1.7,16b). Es wurde 1983 in Stroud (Gloucestershire, UK) aus dem Blut eines erkrankten Patienten isoliert und gehört dem Sequenztyp ST-74 sowie dem ST-32 klonalen Komplex (cc) an [217, 277, 278]. Sein Genom wurde im Jahre 2000 als bis dahin erstes Genom eines *N. meningitidis*-Stammes vollständig sequenziert und veröffentlicht [8]. Zum Vergleich wurde mit α 711 ein Trägerisolat der Serogruppe B verwendet, das ebenfalls zu dem ST-32 cc gehört. Es wurde im Jahre 2000 im Rahmen einer epidemiologischen Studie aus Rachenabstrichen drei- bis 26-jähriger gesunder Probanden in Bayern isoliert [18].

Als gut charakterisiertes invasives Isolat der Serogruppe C wurde der Meningokokkenstamm 8013/Klon 12 eingesetzt. Der Stamm 8013 wurde im Jahre 1989 am Institut Pasteur in Paris aus dem Blut eines erkrankten Patienten isoliert, gehört zum ST-18 cc [219] und wurde seither in zahlreichen Arbeiten, insbesondere zur Untersuchung der Interaktion des Typ-4-Pilus (TfP) mit humanen Zielzellen, verwendet [51, 101, 105, 279, 280]. Klon 12, auch bekannt

als 2C43, ist ein Abkömmling dieses Stammes, der Klasse-I-Pili der Variante SB exprimiert, die eine vergleichsweise starke Adhäsion an epitheliale Zellen ermöglicht [51, 218]. Er ist bekapselt, enthält jedoch kein *opcA*-Gen und seine Opa-Expression ist durch Phasenvariation abgeschaltet [281]. Sein Genom wurde im Jahr 2009 vollständig sequenziert [219]. Als Trägerisolat wurde zum Vergleich das Meningokokkenisolat α 4 verwendet, das zwar zur Serogruppe B, jedoch ebenfalls zum ST-18 cc gehört und in derselben Studie wie α 711 aus dem Rachen eines gesunden Trägers gewonnen wurde [18].

Um auch ein Trägerisolat in die Analysen aufzunehmen, das zum einen bereits gut untersucht ist und sich zum anderen in seinen Eigenschaften von den übrigen Isolaten deutlich unterscheidet, wurde zusätzlich der Meningokokkenstamm α 14 verwendet. Dieses Isolat wurde ebenfalls im Rahmen der oben genannten Studie [18] von einem gesunden Träger gewonnen. Es gehört dem ST-53 cc an, der zahlreiche Trägerisolate enthält, und sein Genom wurde 2008 vollständig sequenziert [114]. Als einziger hier für die Zellzyklusanalysen verwendeter Meningokokkenstamm ist α 14 nicht bekapselt und damit auch keiner klassischen Serogruppe zugehörig, da sein *cps* Gencluster eine nicht kodierende Sequenz, den sogenannten Kapsel-null-Locus (*cnI*), enthält, der auch bei anderen Trägerisolaten häufig vorkommt [113].

Um zusätzliche Informationen über die bisher wenig charakterisierten Isolate α 711 und α 4 zu erhalten, wurden diese mittels Western Blot auf die Expression der Hauptinvasine Opa, Opc und Klasse-I Pili geprüft. Opa und Klasse-I Pili wurden von beiden Stämmen exprimiert, die Expression von Opc war hingegen nicht nachweisbar. Eine PCR zeigte, dass das *opcA*-Gen im Genom von α 711 enthalten, bei α 4 jedoch deletiert war. Um zu prüfen, ob die fehlende Expression von Opc bei α 711 durch eine Abschaltung des Gens durch Phasenvariation begründet ist, wurde das Gen einschließlich seines Promotors sequenziert. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die Expression des *opcA*-Gens phasenvariabel ist und auf transkriptioneller Ebene reguliert wird [244]. In der Promotorregion des Gens befindet sich ein Polycytidin-Stretch in variabler Länge. Die effektive Expression von Opc ist möglich, wenn dieser eine Länge von 12-13

Nukleotiden hat. Bei elf oder 14 Cytidingruppen bleibt eine variable verminderte Expression und bei weniger als elf oder mehr als 14 Cytidingruppen ist die Expression supprimiert [244]. Die Sequenzierung des *opcA*-Gens von α 711 ergab eine Länge von neun Cytidin-Resten und bestätigte damit die Abschaltung des *opcA*-Gens. Der Referenzstamm MC58, der bei für die Western Blot Analysen auf Opc als Positivkontrolle eingesetzt wurde enthält hingegen im Promotor des *opcA* Gens 12 Cytidinreste.

4.3 Interaktion der verschiedenen Meningokokkenisolate mit der Zielzelle – Invasion und Adhärenz

NP69 Zellen sind bislang nicht für Experimente mit Meningokokken verwendet worden. Somit musste zunächst mittels Adhärenz- und Invasionsassays überprüft werden, ob eine Interaktion dieser Zellen mit den von uns verwendeten Meningokokkenisolaten stattfindet, wie sie sich im zeitlichen Verlauf entwickelt und inwiefern sich pathogene- und Trägerisolate darin unterscheiden.

Dagegen haben sich Detroit 562 Zellen bereits in vielfältigen Versuchen mit Meningokokken als einsetzbar erwiesen (s.o.). Doch auch an dieser Zelllinie wurde bislang kaum das Verhalten von Trägerisolaten untersucht. Lediglich eine Publikation liegt vor, in der gezeigt wurde, dass ein Trägerisolat im Vergleich zu MC58 eine geringere Fähigkeit zur Adhärenz und zur Invasion bei Detroit 562-Zellen hatte [264]. Studien zur Adhärenz und Invasion von Trägerisolaten mit anderen Epithelzellen liefern widersprüchliche Ergebnisse. So wurde in einer Arbeit gezeigt, dass eine Auswahl von Trägerisolaten *in vitro* an zwei epithelialen und zwei endothelialen Zelllinien eine geringere Fähigkeit zur Adhärenz und zur Invasion hatten, als pathogene Vergleichsisolate [282]. Ältere Studien zeigten dagegen, dass Trägerstämme in größeren Zahlen an Epithelzellen adhärten, als von Erkrankten isolierte Stämme [283, 284].

Daher wurden zunächst Versuche zur Bestimmung der Adhärenz und der Invasion aller in dieser Arbeit verwendeten Meningokokkenisolate an Detroit 562- und NP69-Zellen durchgeführt. Das Phänomen, dass die unbekapselte Mutante

MC58 *siaD* bei Detroit 562-Zellen geringfügig stärker adhärent, jedoch signifikant invasiver war, als der Wildtyp-Stamm MC58, spiegelt die Ergebnisse anderer Arbeiten an anderen Zelltypen wider [104, 224, 225, 233, 243, 255, 285-288]. Vermutlich maskiert die Kapsel durch ihre eigene Ladung Invasine der äußeren Membran, wie etwa Opa und Opc, was deren Wirkung abschwächt [92]. Die Kapsel wird nur von Pili überragt, die somit den ersten Kontakt zwischen dem bekapselten Bakterium und der Zielzelle vermitteln [287]. Dieses Ergebnis sowie die Tatsache, dass Detroit 562-Zellen CEACAM-Moleküle in großer Zahl exprimieren [62, 255], lassen vermuten, dass für die Adhärenz und die Invasion bei Detroit 562-Zellen dieselben Mechanismen bedeutsam sind, die bereits in Versuchen mit anderen Zelltypen nachgewiesen wurden. Bei NP69-Zellen war dagegen für MC58 *siaD* nur eine sehr geringfügige und nicht signifikante Steigerung der Invasion, verglichen mit MC58, messbar. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass MC58 selbst in dieser Zelllinie bereits stärker invasiv war. Ob die Ursache hierfür möglicherweise ein anderer Rezeptorbesatz dieser Zelllinie ist, oder ob andere Gründe hierfür vorliegen, konnte in dieser Arbeit nicht näher analysiert werden und bleibt in zukünftigen Studien zu untersuchen.

Die Fähigkeit zur Adhärenz war bei den Trägerisolaten sehr unterschiedlich ausgeprägt, wobei $\alpha 711$ an beiden Zelllinien am stärksten adhärierte. Auch bezüglich der Invasion zeigten sich große Unterschiede zwischen den Trägerisolaten und zwischen den beiden untersuchten Zelllinien. So war etwa das stark adhärente Trägerisolat $\alpha 711$ bei Detroit 562 Zellen auch der am stärksten invasive Trägerstamm. Bei NP69 Zellen war hingegen das Isolat $\alpha 4$ stärker invasiv, obwohl es an diese Zellen in geringerem Ausmaß adhärierte. Über deutliche Unterschiede der Adhärenz und der Invasion gleicher Meningokokkenstämme bei verschiedenen Zelllinien wurde auch in anderen Studien berichtet [233]. Trotz dieser Variabilität zeigten die Ergebnisse eindeutig, dass alle getesteten Trägerisolate bei beiden Zelllinien signifikant weniger invasiv waren, als MC58. Auch der Serogruppe C-Stamm 8013/Klon 12 war, obwohl er ein pathogener Stamm ist und stark adhärierte, ähnlich schwach invasiv wie die getesteten Trägerisolate. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die fehlende

Expression von Opc, die 8013/Klon 12 und allen hier getesteten Trägerisolaten gemein ist, während MC58 als einziges Isolat Opc exprimiert. Die wichtige Rolle von Opc bei der Invasion in andere Epithelzelllinien wurde bereits vielfach beschrieben [63, 64, 66, 224]. Bei 8013/Klon 12 und $\alpha 4$ ist das *opcA* Gen aufgrund einer Deletion nicht vorhanden (siehe 3.3). Bei $\alpha 711$ ist seine Expression durch Phasenvariation abgeschaltet, was durch die Sequenzierung des *opcA* Gens und seiner Promotorregion nachgewiesen werden konnte.

Das einzige Isolat, das bei beiden Zelllinien nahezu unfähig zur Adhärenz und zur Invasion war, war $\alpha 14$. Dies bestätigte die Ergebnisse einer anderen Studie, bei der die Invasion von $\alpha 14$ in HIBCPP Zellen, gewonnen aus humanem Plexus choroideus Epithel, untersucht wurde [289]. Wie die anderen hier getesteten Trägerisolate exprimiert auch $\alpha 14$ Klasse I Pili, nicht jedoch Opc, da auch in seinem Genom das *opcA*-Gen deletiert ist [289]. Trotzdem wurde $\alpha 14$ für die nachfolgenden Experimente weiterverwendet, auch um Rückschlüsse auf die Relevanz des Adhäsions- oder Invasionsverhaltens für mögliche Effekte auf den Zellzyklus der Wirtszelle ziehen zu können.

4.4 Zellzyklusanalysen

Als Standard und am häufigsten angewandte Methode für die Analyse des Zellzyklus in eukaryotischen Zellen gilt seit Langem die Bestimmung des zellulären DNA-Gehaltes mithilfe von Propidiumiodid (PI) [290, 291].

Um zu untersuchen, ob die Infektion mit den oben beschriebenen Meningokokkenisolaten den Zellzyklus der epithelialen Zielzellen beeinflusst, wurden zunächst Färbungen mit PI zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Die überprüften Zeiträume richteten sich orientierend nach den Verdoppelungszeiten der verwendeten Zelllinien.

Die Histogramme, die sich bei der durchflusszytometrischen Analyse der FaDu-Zellen ergaben, waren von Versuch zu Versuch relativ variabel. Trotzdem zeigte sich 24 Stunden nach der Infektion mit MC58 im Vergleich mit nicht infizierten Zellen eine signifikante Akkumulation von Zellen in der G_0 -/ G_1 -Phase. Die

Differenz betrug nach drei Versuchen durchschnittlich 10,07 %. Zu diesem Zeitpunkt deutete sich dazu passend auch eine Reduktion von Zellen in der S-Phase an. Diese war jedoch, vermutlich aufgrund der starken Abweichungen von Versuch zu Versuch, nicht statistisch signifikant. Zu anderen Zeitpunkten konnte kein Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen nachgewiesen werden. Beim ebenfalls getesteten Trägerisolat $\alpha 14$ deuteten sich ähnliche Veränderungen an, die jedoch bei der Auswertung nicht signifikant waren. Aufgrund dieser großen Abweichungen zwischen einzelnen Versuchen wurde die Zelllinie FaDu nicht für weitere Experimente verwendet.

Wesentlich deutlichere Ergebnisse erbrachten die Zellzyklusanalysen mit Detroit 562-Zellen. Hier waren die Ergebnisse aller Versuche über mehr als 15 Passagen hinweg sehr konstant reproduzierbar. Bei Infektion mit den Isolaten MC58 und 8013/Klon 12 konnte ebenfalls 24 Stunden nach der Infektion eine signifikante Akkumulation von Zellen in der G_0 -/ G_1 -Phase gezeigt werden, begleitet von einer signifikanten Reduktion von Zellen in der S-Phase. Zu allen anderen gemessenen Zeitpunkten ergaben sich keine relevanten Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Jones et al. überein, die mit derselben Technik ebenfalls bei nicht synchronisierten, malignen, epithelialen (HeLa-) Zellen einen G_1 -Phasen Arrest 24 Stunden nach der Infektion mit *N. gonorrhoeae* nachweisen konnte [202]. Die Trägerisolate $\alpha 711$ und $\alpha 4$, die in dieser Arbeit erstmals getestet wurden, induzierten ebenfalls 24 Stunden nach der Infektion einen signifikanten G_1 -Phasen-Arrest. $\alpha 14$ hatte als einziges getestetes Isolat zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf den Zellzyklus. Da dieses Isolat auch als einziger Stamm nahezu nicht adhärent und invasiv an beiden überprüften Zelllinien war, liegt die Vermutung nahe, dass eine direkte Interaktion der Bakterien mit der Zielzelle erforderlich ist, um den Zellzyklus zu beeinflussen. Die benigne Zelllinie NP69 wurde ebenfalls mit allen genannten Meningokokkenisolaten untersucht. Anders als bei Detroit 562 Zellen ergab die Auswertung bei infizierten Zellen zu den späten Zeitpunkten (24 und 30 Stunden) eher einen Anstieg von Zellen in der S-Phase. Dieser Unterschied war jedoch nur

geringfügig ausgeprägt (je nach verwendetem Stamm ca. 4-6%) und zu keinem Zeitpunkt signifikant. Leider zeigte sich bei der durchflusszytometrischen Zählung dieser Zellen mit zunehmender Zeit nach der Infektion auch eine immer weiter zunehmende Population großer Partikel außerhalb des Gates, das für die Zählung der Zellen voreingestellt worden war. Zu den Zeitpunkten 24 und 30 Stunden p.i. lag bereits die deutliche Mehrheit der detektierten Zellen in diesem Bereich, sodass nur ein geringer Anteil tatsächlich in die Messung mit einging. Die spätere Analyse der Histogramme einschließlich der Partikel außerhalb des Gates zeigte, dass auch diese großen Partikel mit PI angefärbt waren und zwar in stärkerem Ausmaß, als eine Zelle in der G₂-/M-Phase. Dies lässt vermuten, dass es sich bei den größeren Partikeln um Aggregate mehrerer Zellen handelt. Auch den Informationen des Zulieferers der NP69-Zellen war zu entnehmen, dass es bei dieser Zelllinie unter bestimmten Bedingungen zu Verklumpungen kommen kann. Ob das Messergebnis, das sich bei NP69 Zellen von den an Detroit 562-Zellen bestimmten Werten unterscheidet, eine Verfälschung durch diese Aggregatbildung der Zellen ist, oder ob die Zelllinie tatsächlich in ihrem Zellzyklus auf andere Weise beeinflusst wird, als FaDu- und Detroit 562-Zellen, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Aufgrund der nur kleinen Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen und der fraglichen Nutzbarkeit dieser Zelllinie zur Untersuchung späterer Messzeitpunkte wurden auch NP69 nicht für weitere Versuche eingesetzt, sondern Detroit 562 als die am besten geeignete Zelllinie eingeschätzt und weiterverwendet.

Zur Verifizierung des G₀-/G₁-Phasen-Arrestes 24 Stunden nach der Infektion wurden im Folgenden Anfärbungen mit 5-ethynyl-2'-Deoxyuridin (EdU) an Detroit 562-Zellen durchgeführt. Diese relativ neue Methode dient wie die PI-Färbung auch der durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus, jedoch handelt es sich nicht um eine in die DNA interkalierende Verbindung, sondern um ein Nukleotidanalogen, das während der S-Phase enzymatisch in die DNA eingebaut wird und dann durch eine Click-Reaktion nachgewiesen werden kann [292, 293]. Aufgrund dieser unterschiedlichen Wirkweise wurde die Methode zur Überprüfung der Ergebnisse, die mittels PI-Färbung gewonnen wurden,

ausgewählt. Der Vorteil des EdU gegenüber anderen gängigen Nukleotidanaloga wie etwa 5-bromo-2'-Deoxyridin (BrdU) besteht darin, dass EdU nicht durch einen Antikörper detektiert werden muss, sondern durch ein Farbstoff-Azid-Konjugat nachweisbar ist. Dieses kann aufgrund seiner geringen Größe, anders als ein Antikörper, die Zellmembran ohne vorherige Permeabilisierung passieren und doppelsträngige DNA anfärben, ohne dass diese zuvor denaturiert werden muss [292-294]. Jedoch wirkt EdU in proliferierenden Zellen als Antimetabolit zytotoxisch und apoptoseinduzierend [295-297], weswegen es in dieser Arbeit erst zu einem möglichst späten Zeitpunkt (22 Stunden nach der Infektion) zugegeben wurde. Repräsentativ wurden dabei nur noch die Stämme MC58, α 711 und α 14 sowie nur noch der Zeitpunkt 24 Stunden nach der Infektion untersucht. Die Untersuchung bestätigte die bisher gewonnenen Ergebnisse: eine signifikant erniedrigte Zahl an Zellen in der S-Phase, wenn diese mit MC58 oder α 711 infiziert worden waren und einen geringeren, nicht signifikanten Effekt bei Infektion mit α 14.

4.5 Identifizierung relevanter bakterieller Faktoren

Aus anderen Publikationen sind bakterielle Faktoren, die eine Modulation des Zellzyklus der Wirtszelle bewirken, bekannt. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, nachdem auch bei der Infektion durch *N. meningitidis* ein Effekt auf den Zellzyklus nachgewiesen werden konnte, ebenfalls Informationen über mögliche relevante bakterielle Effektoren zu gewinnen. Um die infrage kommenden bakteriellen Strukturen eingrenzen zu können, wurden Detroit 562-Zellen zunächst mit hitzeinaktivierten Meningokokken behandelt, wodurch Peptide und andere thermolabile Verbindungen denaturiert werden und ihre Funktionalität verlieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich der Effekt auf den Zellzyklus von Detroit 562-Zellen bei keinem der getesteten Isolate nach Hitzeinaktivierung reproduzieren ließ.

Dass die Präsenz vitaler Bakterien zur Auslösung des Zellzyklusarrestes erforderlich ist, könnte einerseits bedeuten, dass ein aktiv sezerniertes Peptid oder Protein als Zyklomodulin wirkt, welches unter der Hitzeeinwirkung denaturierbar ist, so wie dies etwa für das cytolethal distending toxin (CDT) beschrieben wurde [298]. Auch für Opa-Proteine von Meningokokken konnte kürzlich eine Wirkung auf den Zellzyklus von Endothelzellen gezeigt werden, die durch Hitzeeinwirkung aufgehoben wurde [204]. Dennoch erscheint ein Einfluss der Opa-Proteine oder des Opc auf den Zellzyklus der hier untersuchten Epithelzellen eher unwahrscheinlich. Zum einen bewirkte die Infektion mit Opa- und Opc-exprimierenden *E. coli*-Stämmen im Vergleich zu dem unbehandelten Stamm *E. coli* BL21 keinen signifikanten Unterschied bei den Zellzyklusanalysen. Zum anderen verursachte bei Detroit 562-Zellen auch das Isolat 8013/Klon 12 trotz fehlender Opa- bzw. Opc-Proteinexpression einen signifikanten G₁-Phasen-Arrest. Dieser war in seiner Ausprägung vergleichbar mit dem Effekt durch das Isolat MC58, welches sowohl Opa-Proteine als auch Opc exprimiert. Auch die Tatsache, dass bakterielle Kulturüberstände keinen Effekt auf den Zellzyklus hatten, lässt einen Einfluss von Opa- bzw. Opc-Proteinen oder sezernierten Proteinen unwahrscheinlich erscheinen. Mit derselben Technik gewonnene Überstände von MC58 enthielten in der vorangegangenen Arbeit über den Zellzyklus von Endothelzellen relevante Mengen von Opa und Opc und induzierten in Endothelzellen den dort beschriebenen S-Phasen-Arrest [204]. Auch eine Wirkung der in der Außenmembran befindlichen Lipooligosaccharide (LOS) erscheint eher unwahrscheinlich. Zwar sind sie in für die Aktivierung zahlreicher Signalwege in der Zielzelle maßgeblich [299]. Jedoch sind sie ausgesprochen thermostabil und waren in anderen Forschungsarbeiten auch nach Hitzeeinaktivierung der sie tragenden Bakterien in der Lage, zytopathische Effekte in ihren Zielzellen zu bewirken [300].

Andererseits wäre die Möglichkeit denkbar, dass die bakterielle Invasion in die Zielzelle die nötigen Signalwege zur Auslösung des Zellzyklusarrestes anstößt. Dies wäre mit allen präsentierten Ergebnissen vereinbar, da nur vitale und nicht hitzeabgetötete Bakterien den Zellzyklusarrest auszulösen vermochten, und da die Infektion mit dem Isolat α 14, der als einziger getesteter Stamm nicht zur

Invasion in die Zielzelle fähig war, keinen signifikanten Effekt bewirkte. Auch ein möglicher Einfluss der Polysaccharidkapsel könnte die Resultate erklären, da auch diese nicht hitzebeständig ist [301] und α 14 das einzige getestete Isolat ist, das keine Kapsel trägt.

4.6 Regulation von Zellzyklusmediatoren durch die Infektion mit *N. meningitidis*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch die Infektion mit *N. meningitidis* in Detroit 562-Zellen ein Zellzyklusarrest ausgelöst wird, sollten die an der Regulation beteiligten molekularen Mechanismen in der Zielzelle genauer charakterisiert werden.

Die Akkumulation von Detroit 562 Zellen in der G₀/G₁-Phase 24 Stunden nach der Infektion lässt den Rückschluss zu, dass durch die Meningokokkeninfektion entweder die G₁-Phase des Zellzyklus verlängert, oder die Progression in die S-Phase gehemmt wird. Wesentliche und am besten untersuchte Regulatoren für diesen Abschnitt des Zellzyklus sind die G₁-Cycline im Komplex mit den entsprechenden Cyclinabhängigen Kinasen (CDKs) [140]. Cyclin D im Komplex mit der CDK4 oder der CDK6 ist dabei entscheidend am Durchlaufen der G₁-Phase beteiligt, während eine zunehmende Konzentration des Cyclin E-CDK2-Komplexes den Eintritt in die S-Phase einleitet. Ein Einfluss bakterieller Infektionen auf die Expression von Cyclinen in der Zielzelle konnte in der Vergangenheit bereits bei mehreren anderen Pathogenen, wie etwa *Helicobacter pylori* [302], *Porphyromonas gingivalis* [303] und *Neisseria gonorrhoeae* [202] nachgewiesen werden.

Die Untersuchung mittels Western Blot ergab, dass nach der Infektion mit 8013/Klon 12 sowie mit den Trägerisolaten α 711 und α 4 Cyclin D1 reduziert war, was eine verlangsamte Progression durch die G₁-Phase verursachen könnte. Wie in den vorherigen anderen Untersuchungen rief die Infektion mit α 14 keinen Effekt hervor. Interessanterweise bewirkte auch die Infektion mit MC58 keine

messbare Veränderung des Proteingehaltes an Cyclin D. Ob die Ursache hierfür in der Messmethode liegt, oder ob tatsächlich unterschiedliche Mechanismen bei der Infektion dieser verschiedenen Isolate ablaufen, ist ein hochinteressantes und in zukünftigen Studien zu klärendes Thema.

Interessanterweise konnte nach Infektion mit allen verwendeten Meningokokkenisolaten eine gesteigerte Expression von Cyclin E auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die Regulation des Cyclinstoffwechsels ist sehr komplex und erfordert, um die in jeder Zellzyklusphase unterschiedlichen Konzentrationen an Cyclinen bereitzustellen, sowohl eine genaue Steuerung der Genexpression, als auch eine strenge Regulation des Cyclinabbaus im Proteasom [304]. Um weitere Informationen darüber zu erhalten, auf welcher Ebene die von uns nachgewiesenen Änderungen des Cyclingehaltes vermutlich reguliert sind, wurde die Menge an mRNA-Kopien für beide Cycline mittels qRT-PCR quantifiziert. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen, was vermuten lässt, dass die Expression der Cycline auf transkriptioneller Ebene durch die Infektion nicht beeinflusst wird. Jedoch wäre ein interessanter Aspekt für mögliche zukünftige Arbeiten, auch hinsichtlich der mRNA-Expression die zeitliche Kinetik zu analysieren. Möglicherweise lassen sich Veränderungen der Transkription bereits zu früheren Zeitpunkten nach der Infektion nachweisen, als zum hier erhobenen Zeitpunkt 24 Stunden nach der Infektion, zu dem schließlich bereits Unterschiede der Cyclin-Expression auf Protein-Ebene eingetreten waren. Denkbar und in zukünftigen Studien zu untersuchen wäre auch, dass möglicherweise die Translation der Cycline durch die Meningokokkeninfektion moduliert wird, oder dass der Abbau der vollständig synthetisierten Cycline durch posttranslationale Modifikationen gesteigert wird. Auch für Cyclin A und Cyclin B ergaben sich auf mRNA-Ebene keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen. Da diese Cycline jedoch in anderen Phasen des Zellzyklus vorrangig an der Regulation beteiligt sind, wurden sie auf Proteinebene nicht weiter untersucht.

Auch im Hinblick auf die Verteilung der Cycline zwischen Zytoplasma und Zellkern konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen infizierten und nicht

infizierten Zellen nachgewiesen werden. Die Immunfluoreszenzfärbung von Cyclin D1 in Detroit 562 Zellen ergab eine Anfärbung sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern. Vergleichbare Daten zu Immunfluoreszenzfärbungen von Cyclin D1 sind in der Literatur beschrieben [305], jedoch waren im Anfärbemuster keine Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen erkennbar. Auch die Anfärbung von Cyclin E zeigte eine ähnliche, zytoplasmatische und nukleäre Anfärbung, die sich perinukleär oft besonders intensiv darstellte. Doch auch hier waren durch die Infektion keine Unterschiede in der Anfärbung zu erkennen.

Als weitere Regulatoren auf der Ebene der Zielzelle wurden die Zellzyklusinhibitoren p21^{WAF1/CIP1} und p27^{KIP} untersucht. Diese können bei Aktivierung auf transkriptioneller Ebene in verschiedene Phasen des Zellzyklus eingreifen und außer einem G₁-Phasen-Arrest auch einen G₂-Phasen-Arrest induzieren [165]. Die Untersuchung dieser Inhibitoren erschien besonders interessant und naheliegend, da bereits bei Infektionen mit verschiedenen anderen Erregern ein Effekt auf die Expression dieser Inhibitoren nachgewiesen werden konnte, so etwa durch pathogene *E. coli*-Stämme [192] und *H. pylori* [306]. Auch in der kürzlich vorausgegangenen Arbeit an Endothelzellen konnte durch Infektion mit dem Meningokokkenisolat MC58 eine gesteigerte Synthese von p21^{WAF1/CIP1} und dessen vermehrte Lokalisation im Zellkern nachgewiesen werden [204]. Zudem wurde 24 Stunden nach der Infektion mit *N. gonorrhoeae* in Epithelzellen ein gesteigerter zellulärer Gehalt an p21^{WAF1/CIP1} und p27^{KIP} sowie deren verstärkte Lokalisation im Zellkern gezeigt [203].

Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit mit Detroit 562 Zellen teilweise reproduziert und erweitert werden. 24 Stunden nach der Infektion war der mittels Western Blot quantifizierte zelluläre Proteingehalt an p21^{WAF1/CIP1} sowohl in Zellen, die mit den Trägerisolaten, als auch in Zellen, die mit den krankheitsverursachenden Isolaten infiziert worden waren, deutlich erhöht. Besonders stark und statistisch signifikant war dieser Effekt bei der Infektion mit den Isolaten MC58 und α 711, am schwächsten fiel er, korrelierend mit den Ergebnissen der Zellzyklusanalysen, bei Infektion mit dem Trägerisolat α 14 aus.

Die Immunfluoreszenz zeigte ebenfalls 24 Stunden nach der Infektion einen deutlich gesteigerten Anteil an Zellkernen mit einem positiven Signal für p21^{WAF1/CIP1}. Diese Lokalisation im Zellkern war bei dem pathogenen Isolat MC58 noch wesentlich ausgeprägter, als bei den Trägerisolaten α 711 und α 14. Dennoch waren auch bei der Verwendung von α 711 noch annähernd doppelt so viele Zellkerne anfärbbar, als in nicht infizierten Zellen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass p21^{WAF1/CIP1} an der Einleitung des G₁-Phasen-Arrest maßgeblich beteiligt ist, da eine Korrelation der Aktivität des Zellzyklusinhibitors und seiner Anreicherung im Zellkern bekannt ist [307]. Endgültig bewiesen ist diese These jedoch nicht, da für den Zellzyklusarrest noch weitere hier nicht untersuchte Faktoren letztlich ursächlich, und der gesteigerte Proteingehalt an p21^{WAF1/CIP1} für den Effekt entbehrlich sein könnte. So wurde zum Beispiel in einer anderen Studie über Cycle inhibiting factors (CIFs) von pathogenen *E. coli*-Stämmen ebenfalls über einen G₁-Phasen-Arrest berichtet, der zwar mit einer Akkumulation von p21^{WAF1/CIP1} in den Zielzellen einherging, der jedoch durch den effektiven Knock down von p21^{WAF1/CIP1} mittels siRNA nicht aufzuheben war [195]. Die Bedeutung des p21^{WAF1/CIP1} für den hier gezeigten G₁-Phasen-Arrest in Detroit 562-Zellen sowie die Mechanismen, die zur Akkumulation von p21^{WAF1/CIP1} führen, bleiben daher in Zukunft zu überprüfen.

Leider gelang es trotz intensiver Austestung verschiedener Antikörperchargen nicht, p27^{KIP} mittels Western Blot-Analysen zu detektieren. Einer der verwendeten Antikörper war jedoch für den Nachweis von p27^{KIP} mittels Immunfluoreszenz geeignet. Hierbei ließen sich die Ergebnisse der zuvor genannten Arbeit an *N. gonorrhoeae* [203] nicht direkt reproduzieren, obwohl derselbe Antikörper wie in dieser Arbeit verwendet wurde. Eine verstärkte Anfärbung von p27^{KIP} zeigte sich bei infizierten Zellen weder im Zellkern, noch im Zytoplasma. Auffallend war jedoch, dass Zellen, die mit MC58 oder α 711 infiziert worden waren, sehr häufig ein punktförmiges, granuläres Anfärbemuster im Zellkern aufwiesen, das bei nicht infizierten Zellen niemals beobachtet werden konnte. Ähnliche punktförmige Verteilungen bei Immunfluoreszenzen von p27^{KIP} sind auch in anderen Publikationen dokumentiert [308, 309], jedoch ohne

Rückschlüsse auf dessen Expression oder Funktionalität. Es bleibt daher in zukünftigen Experimenten zu untersuchen, ob und wie p27^{KIP} in den hier gezeigten Zellzyklusarrest involviert ist.

4.7 Beeinflussung des Zellzyklus durch andere Pathogene im Vergleich mit *N. meningitidis* und Ausblick

Auf welche unterschiedlichen Arten verschiedene bakterielle Krankheitserreger den Zellzyklus ihrer Wirtszellen beeinflussen können, ist bereits in Kapitel 1.6. dargestellt worden. Analogien der hier beschriebenen Ergebnisse zu Ergebnissen von Forschungsarbeiten mit anderen Erregern könnten interessante Impulse über zukünftig zu untersuchende Mechanismen bei der Meningokokkeninfektion geben.

Auffallend ist, dass der hier untersuchte Effekt große Ähnlichkeiten mit dem durch *N. gonorrhoeae* induzierten Zellzyklusarrest aufweist, der bereits durch die Arbeitsgruppe um Jones et al. untersucht wurde [202]. Auch der an HeLa-Zellen beschriebene Zellzyklusarrest durch *N. gonorrhoeae* ist ein G₁-Phasen-Arrest und ereignet sich 24 Stunden nach der Infektion. Wie bei dem hier untersuchten Zellzyklusarrest wurde 24 Stunden nach der Infektion mit *N. gonorrhoeae* eine gesteigerte Expression von p21^{WAF1/CIP1} sowie dessen verstärkte Lokalisation im Zellkern detektiert [203]. Die Ursache hierfür sind sehr wahrscheinlich DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, die in der Zielzelle nach der Infektion mit *N. gonorrhoeae* gehäuft nachgewiesen werden konnten und vermutlich unabhängig von p53 die Expression von p21^{WAF1/CIP1} und p27^{KIP} bewirken [203]. Auch in der vorausgegangenen Arbeit mit Meningokokken an Endothelzellen konnten nach Infektion mit dem Isolat MC58 DNA-Schädigungen durch oxidativen Stress nachgewiesen werden, in deren Folge es unabhängig von p53 zur Expression von p21^{WAF1/CIP1} kam.

Cytel lethal distending toxin B (CdtB), eines der am ausgiebigsten untersuchten Zyklomoduline, welches von zahlreichen gramnegativen Bakterienspezies exprimiert wird, induziert ebenfalls DNA-Strangbrüche, gefolgt von einer p53-

unabhängigen Akkumulation von p21^{WAF1/CIP1} [310]. In der Folge wurde, je nach untersuchter Zelllinie, entweder ein G₁-Phasen-Arrest, oder ein G₂-Phasen-Arrest beschrieben [184-186]. Auch dies ist eine Parallele zu den in Ergebnissen der Versuche mit *N. meningitidis*, die in endothelialen Zellen einen S-Phasen-Arrest induzieren [204], in den hier untersuchten epithelialen Detroit 562-Zellen jedoch einen G₁-Phasen-Arrest. Ebenso wurden nach der Infektion mit *N. gonorrhoeae* in verschiedenen Zelllinien ein G₁-Phasen-Arrest [202] und ein S-Phasenarrest [203] beschrieben.

Obwohl Schädigungen der DNA-Integrität ein häufig beschriebener, starker Stimulus für die gesteigerte Expression von p21^{WAF1/CIP1} und die nachfolgende Induktion eines Zellzyklusarrestes sind, genügt eine Hochregulation von p21^{WAF1/CIP1} allerdings nicht als Beweis dafür, dass eine solche DNA-Schädigung stattgefunden haben muss. So werden beispielsweise durch von pathogenen *E. coli*-Stämmen exprimierte Cycle inhibiting factors (CIFs) sowohl p21^{WAF1/CIP1} als auch p27^{KIP} unabhängig von p53 hochreguliert und ein Zellzyklusarrest induziert, ohne dass es zu nachweisbaren Schädigungen der DNA-Integrität oder zu einer Aktivierung ATM-/ATR-abhängiger DNA-Reparaturmechanismen kommt [183]. Sehr interessant ist dabei, dass diese Hochregulierung von p21^{WAF1/CIP1} und p27^{KIP} ohne Unterschiede auf Transkriptionsebene abläuft, sondern die Zellzyklusinhibitoren durch ausschließlich posttranslationale Modifikationen vor dem Abbau im Proteasom geschützt werden [194, 195].

Ein anderer hier untersuchter Aspekt der Zellzyklusregulation sind die Cycline D und E, deren Expression durch die Meningokokkeninfektion beeinflusst wird. Auch durch die Infektion mit *N. gonorrhoeae* wurde eine Herunterregulation von Cyclin D1 beschrieben, jedoch anders als in den hier präsentierten Daten auch eine Reduktion von Cyclin E [202]. In einer anderen Arbeit wurde der Effekt von *P. gingivalis* auf den Zellzyklus von humanen Trophoblastzellen untersucht. Hierbei wurde ein G₀/G₁-Phasen-Arrest beschrieben, der wie der hier untersuchte Effekt begleitet ist von einem Abfall von Cyclin D1 sowie einem Anstieg von Cyclin E und p21^{WAF1/CIP1} [303]. Maßgeblichen Einfluss auf die Veranlassung des Zellzyklusarrestes hatte in dieser Studie die Aktivierung der Proteinkinase Extracellular-signal regulated kinase 1/2 (Erk1/2) [303]. Der Effekt

konnte mit anderen Zelllinien reproduziert werden [311] und ist einer neueren Arbeit zufolge ebenfalls das Resultat einer DNA-Schädigung mit nachfolgender Aktivierung des ATR-p53-Weges [312].

Um die hier präsentierten Effekte der Meningokokkeninfektion auf den Zellzyklus von Epithelzellen zukünftig besser zu verstehen, wäre von Interesse, ob der gezeigte G₁-Phasen-Arrest bei Detroit 562-Zellen auch als Teil einer Reaktion auf DNA-Schädigungen zu verstehen ist, oder unabhängig von DNA-Schäden abläuft, wie etwa für die CIFs beschrieben. Aufgrund der oben beschriebenen Parallelen zu den durch *N. gonorrhoeae* und *P. gingivalis* induzierten Effekten und dem gut untersuchten Zyklomodulin CDT ist zu vermuten, dass auch der hier untersuchte Zellzyklusarrest auf Schädigungen der DNA-Integrität beruhen könnte und Bestandteil zellulärer DNA-Reparaturmechanismen ist. Zudem stellt es sich als wahrscheinlich dar, dass auch die hier gezeigte gesteigerte Expression von p21^{WAF1/CIP1} unabhängig von p53 abläuft. Zwar sind Detroit 562-Zellen in der Lage, p53 zu exprimieren und in den Zellkern zu translozieren [313]. Jedoch tragen Detroit 562-Zellen, wie die Mehrheit der malignen Zellen, eine Mutation im Gen für p53 (mutp53 R175H), welche die p53-induzierte Expression von p21^{WAF1/CIP1} nach experimentell induzierter DNA-Schädigung verhindert [314].

Zukünftige Experimente zur Detektion von DNA-Strangbrüchen in Detroit 562-Zellen sowie zum Aktivierungsgrad der Regulatoren der DNA-Reparatur, wie beispielsweise der Sensorproteine ATM und ATR und ihrer nachgeschalteten Effektorinasen CHK1 und CHK2, könnten daher weiteren wertvollen Aufschluss über die genauen Mechanismen geben, durch die der hier beschriebene Zellzyklusarrest ausgelöst wird. Zudem verbleibt eine große Zahl an zellulären Regulatoren, die sich bereits für die Wirkung anderer bakterieller Zyklomoduline als bedeutsam herausgestellt haben. Die Transkriptionsfaktoren und Regulatorproteine Rb, p130, p107 und E2F, die kleinen G-Proteine der Rho-GTPase-Familie, Cullin und E3-Ubiquitinligasen sind nur einige Beispiele für Proteine von Relevanz für den G₁-S-Phasen-Übergang, deren Untersuchung auf

mRNA-Gehalt, Proteingehalt und ggf. Phosphorylierungsstatus weitere wertvolle Einblicke liefern könnte [315].

Auch auf der Seite des Erregers könnten weitere Experimente zur genauen Identifizierung des verantwortlichen bakteriellen Effektors unternommen werden. Zum Beispiel könnte die Bedeutung der Kapsel oder der Expression bakterieller Pili bei dem hier gezeigten Effekt durch Experimente mit Mutanten untersucht werden.

Die genauere Charakterisierung der Mechanismen, die der Hemmung des Zellzyklus der Wirtszelle bei der Meningokokkeninfektion zugrunde liegen, wird in zukünftigen Forschungsprojekten möglicherweise das Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie des asymptomatischen Trägerstatus sowie der Pathogenese des Überschreitens der epithelialen Barriere und der Meningokokkeninfektion an sich verbessern und könnte langfristig einen Einfluss auf die Möglichkeiten zur Prävention und Therapie der invasiven Meningokokkenerkrankung haben.

5. Zusammenfassung

In den vergangenen 15 Jahren konnte bei zahlreichen bakteriellen Krankheitserregern die Fähigkeit festgestellt werden, Toxine zu produzieren, welche den Zellzyklus der humanen Wirtszellen beeinflussen. Vermutlich kann hierdurch auch *in vivo* die Erneuerung epithelialer Oberflächen gehemmt werden, was dem Erreger einen Vorteil bei der Kolonisierung verschaffen könnte. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob und inwiefern *N. meningitidis* ebenfalls in der Lage ist, das Zellteilungsverhalten humaner epithelialer Zellen zu beeinflussen, wobei insbesondere pathogene im Vergleich mit kolonisierenden Isolaten untersucht werden sollten.

Zunächst wurde die Fähigkeit zur Invasion und zur Adhärenz aller verwendeten Bakterienisolate an zwei Zelllinien untersucht. Hierbei waren alle kolonisierenden Stämme signifikant weniger invasiv als das pathogene Referenzisolat MC58. In Zellzyklusanalysen konnte mit zwei verschiedenen Methoden übereinstimmend nachgewiesen werden, dass sowohl pathogene als auch kolonisierende Stämme 24 Stunden nach der Infektion von Detroit 562-Zellen eine signifikante Akkumulation von Zellen in der G₁-Phase bewirken. Die Vitalität der infizierten Zellen war dabei gegenüber der Vitalität nicht infizierter Zellen unverändert. Eine Charakterisierung der kolonisierenden Bakterienisolate α 711 und α 4 erbrachte, dass diese Opa, nicht jedoch Opc exprimieren, was möglicherweise die geringere Fähigkeit zur Invasion in beide untersuchten Epithelzelllinien erklärt. Durch Infektion mit hitzeinaktivierten Bakterien sowie durch Inkubation von Detroit 562-Zellen mit Proteinkonzentraten aus bakteriellen Kulturüberständen konnte der Zellzyklusarrest nicht reproduziert werden. Ebenso konnten *E. coli*-Stämme, welche Opa oder Opc rekombinant exprimieren, im Vergleich zu dem Wildtypisolat *E. coli* BL21 keine signifikante Veränderung der Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen induzieren. Diese Ergebnisse sprechen insgesamt dagegen, dass ein sezerniertes Protein oder ein Oberflächenprotein für den Effekt auf den Zellzyklus der Wirtszelle maßgeblich ist. Möglicherweise

ist die Invasion vitaler Bakterien erforderlich, um eine Signalkaskade einzuleiten, die schließlich den Zellzyklusarrest induziert.

Es konnten weiterhin 24 Stunden nach der Infektion von Detroit 562-Zellen sowohl mit pathogenen als auch mit kolonisierenden Meningokokkenisolaten ein signifikanter Anstieg des CDK-Inhibitors p21^{WAF1/Cip1} und dessen gesteigerte Lokalisation im Zellkern von Detroit 562-Zellen nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich eine verstärkte Expression der für die G₁-Phase relevanten Cycline D und E. Die Unterschiede im Proteingehalt der Cycline scheinen erst posttranslational, möglicherweise durch Hemmung des Abbaus im Proteasom, zu entstehen, da Unterschiede auf mRNA-Ebene nicht nachgewiesen werden konnten.

Zukünftige Forschungsarbeiten zur genaueren Untersuchung, welche bakteriellen Effektoren für den hier beschriebenen Zellzyklusarrest essenziell sind sowie zur weiteren Entschlüsselung der beteiligten zellulären Mechanismen könnten das Verständnis der Pathophysiologie des asymptomatischen Trägerstatus bereichern und möglicherweise Aufschluss darüber geben, welche Anforderungen ein Meningokokkenstamm erfüllen muss, um die Epithelbarriere zu überschreiten und eine invasive Meningokokkenerkrankung verursachen zu können.

6. Anhang

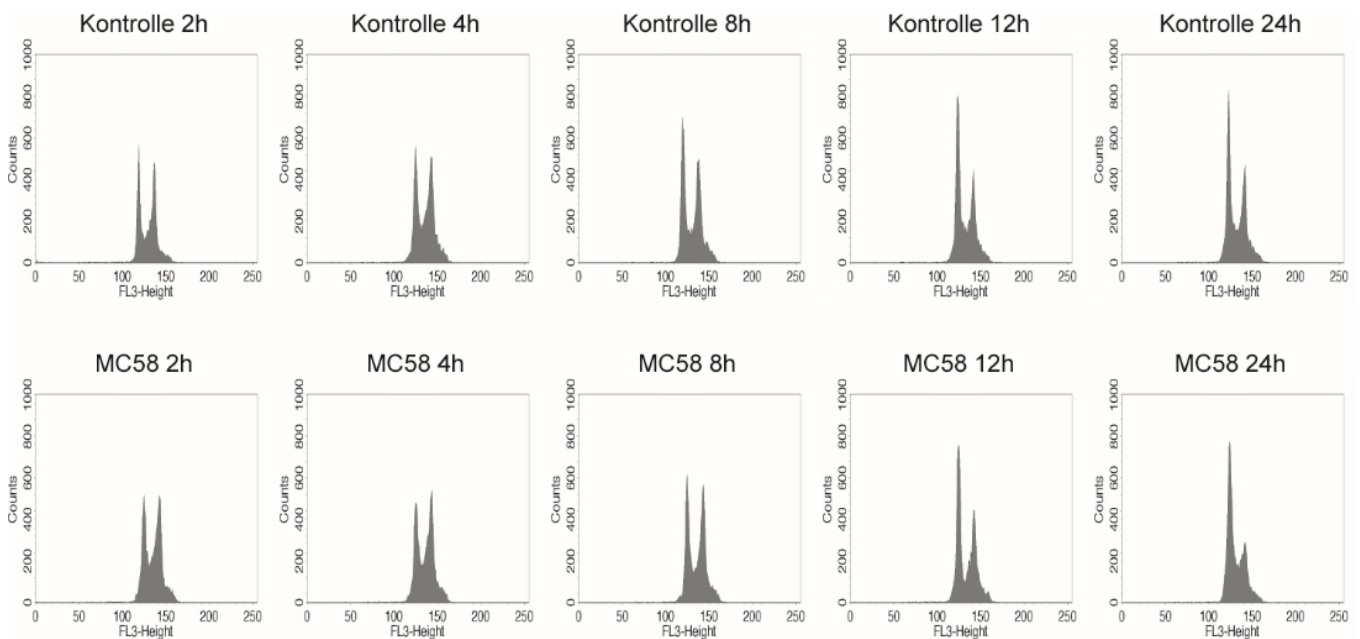


Abb. 6.1: PI-Färbung von FaDu-Zellen nach Infektion mit MC58. Histogramme zu den Zeitpunkten 2 h bis 24 h nach Infektion.

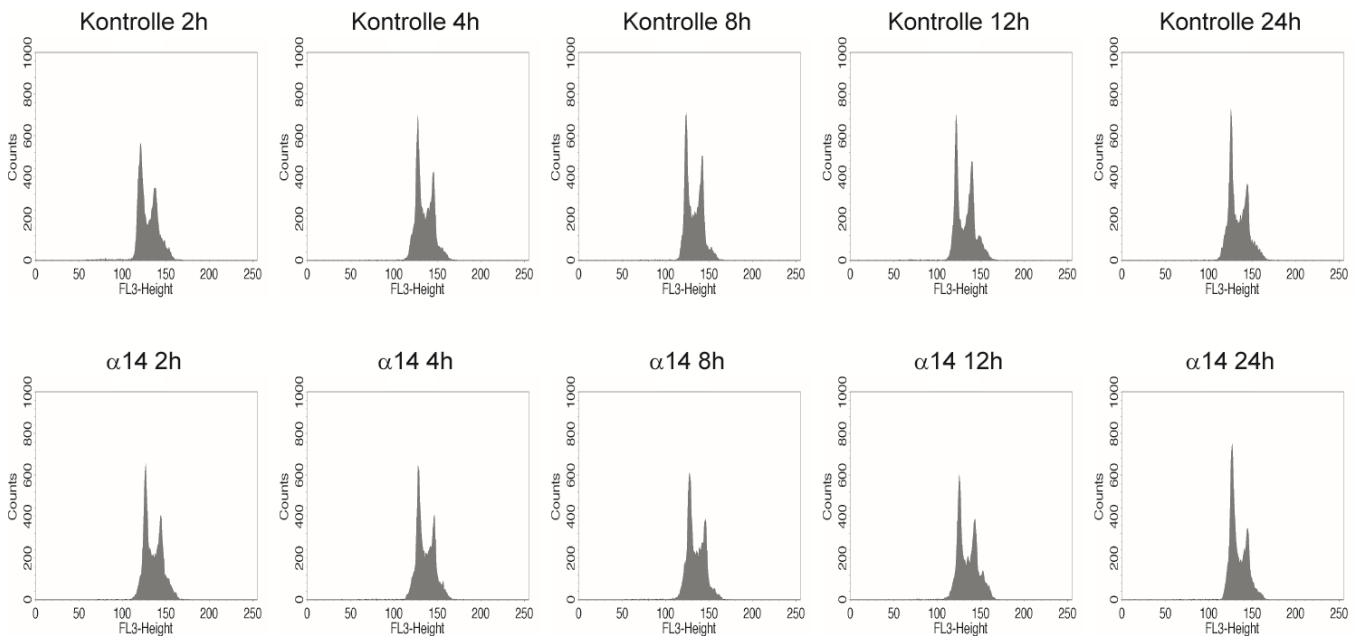


Abb. 6.2: PI-Färbung von FaDu-Zellen nach Infektion mit alpha14. Histogramme zu den Zeitpunkten 2 h bis 24 h nach Infektion.

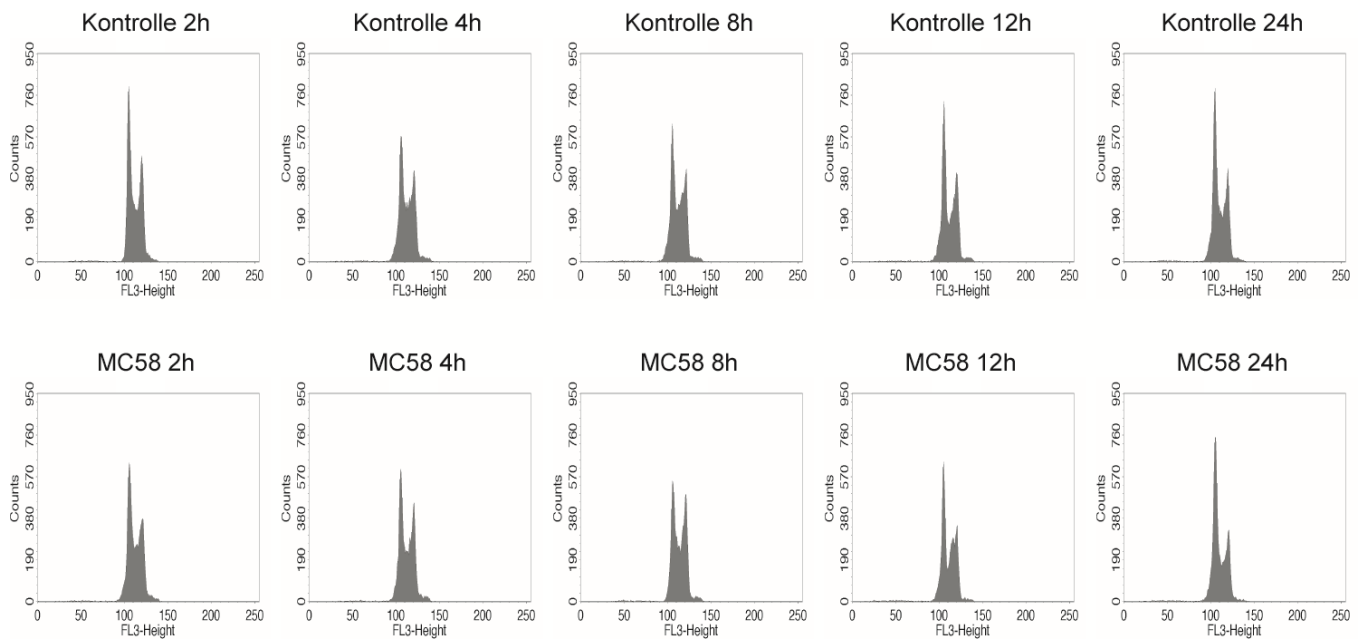


Abb. 6.3: PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit MC58. Histogramme zu den Zeitpunkten 2 h bis 24 h nach Infektion.

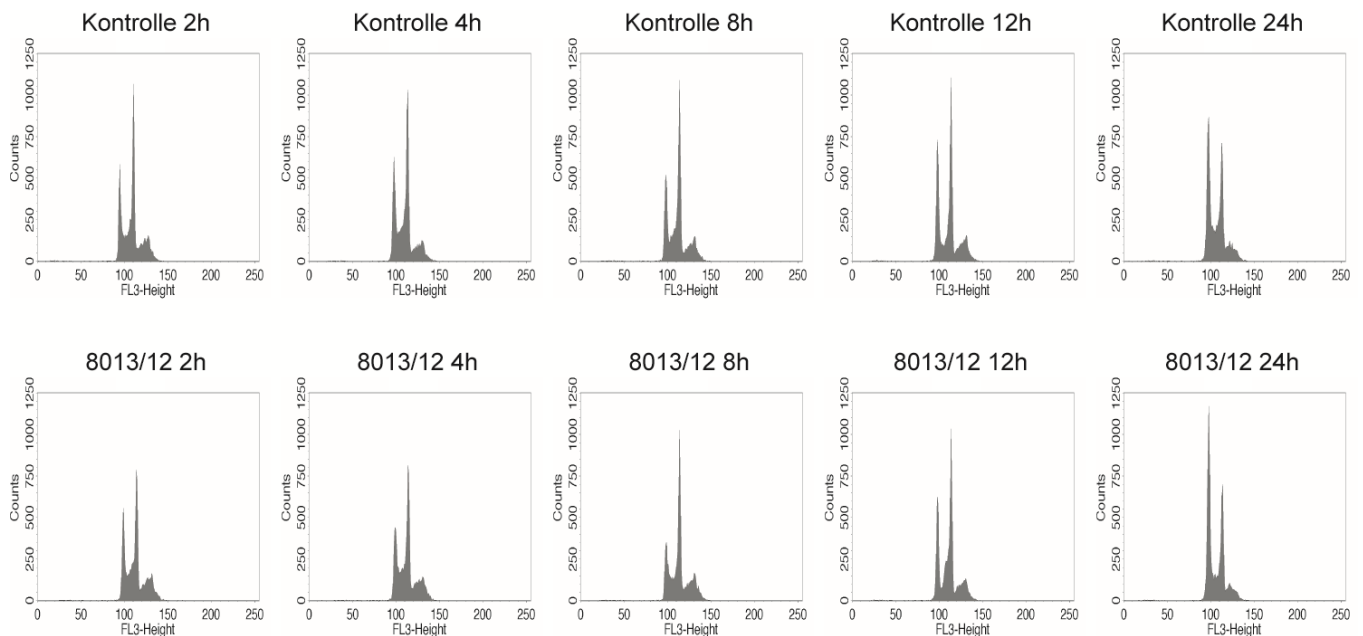


Abb. 6.4: PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit 8013/Klon 12. Histogramme zu den Zeitpunkten 2 h bis 24 h nach Infektion.

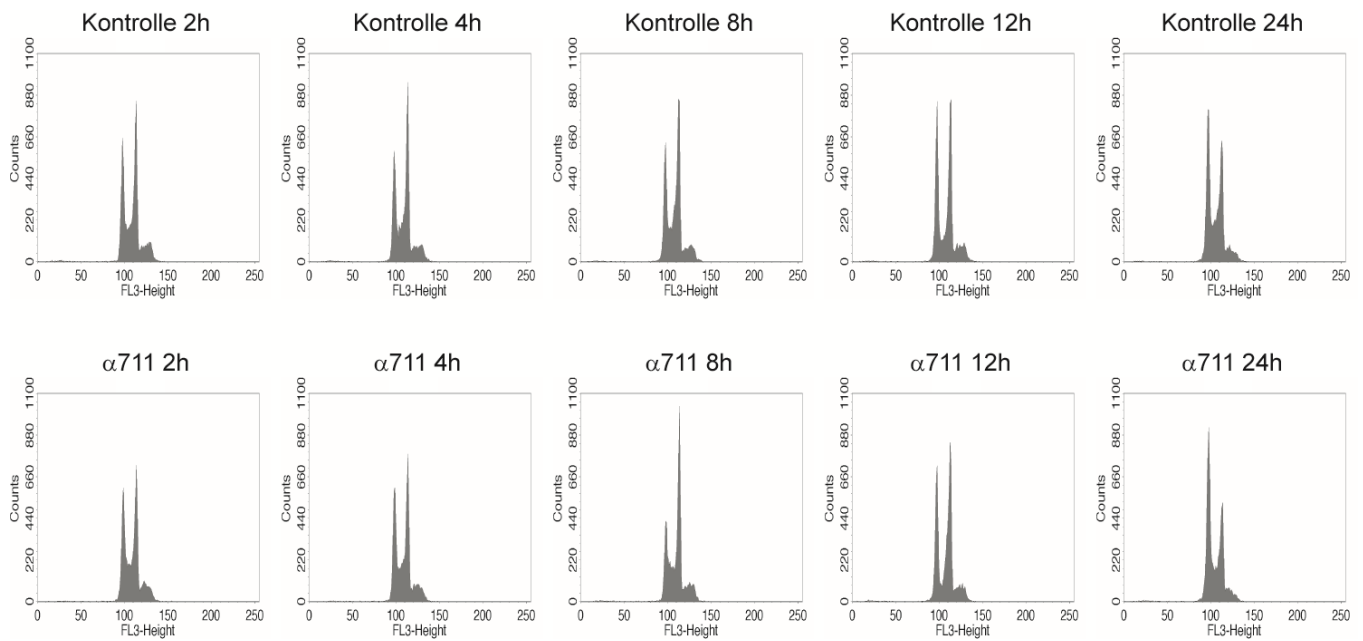


Abb. 6.5: PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit $\alpha 711$. Histogramme zu den Zeitpunkten 2 h bis 24 h nach Infektion.

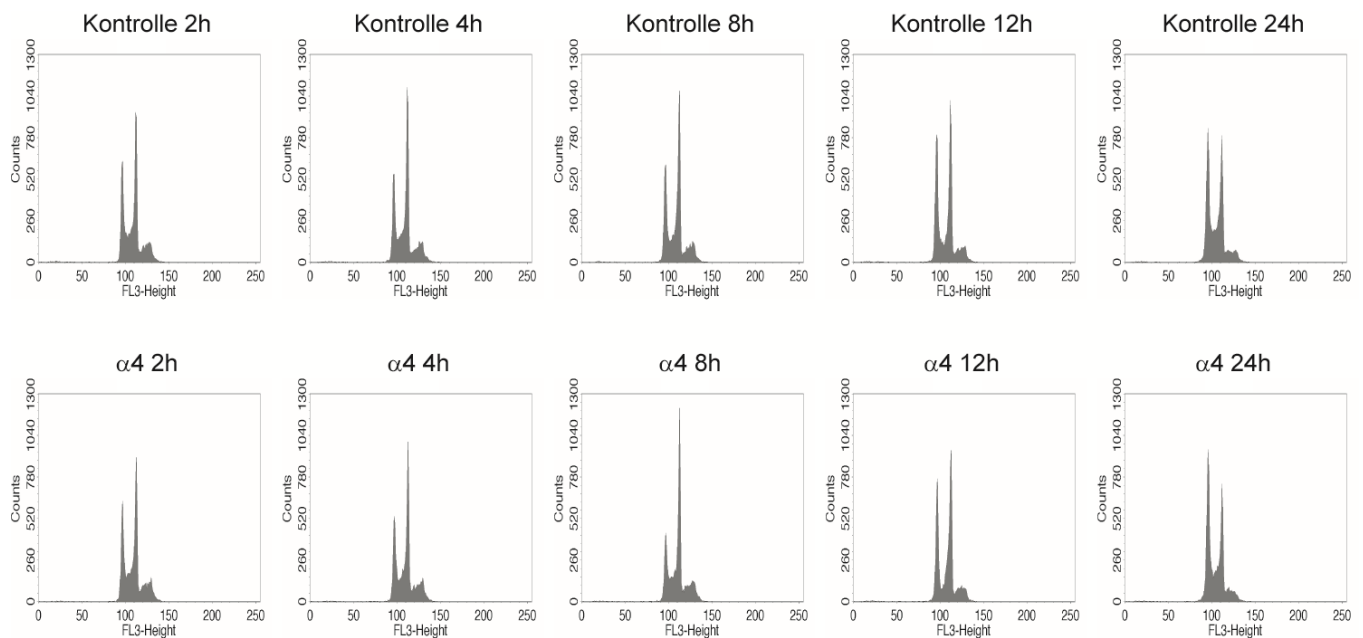


Abb. 6.6: PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit $\alpha 4$. Histogramme zu den Zeitpunkten 2 h bis 24 h nach Infektion.

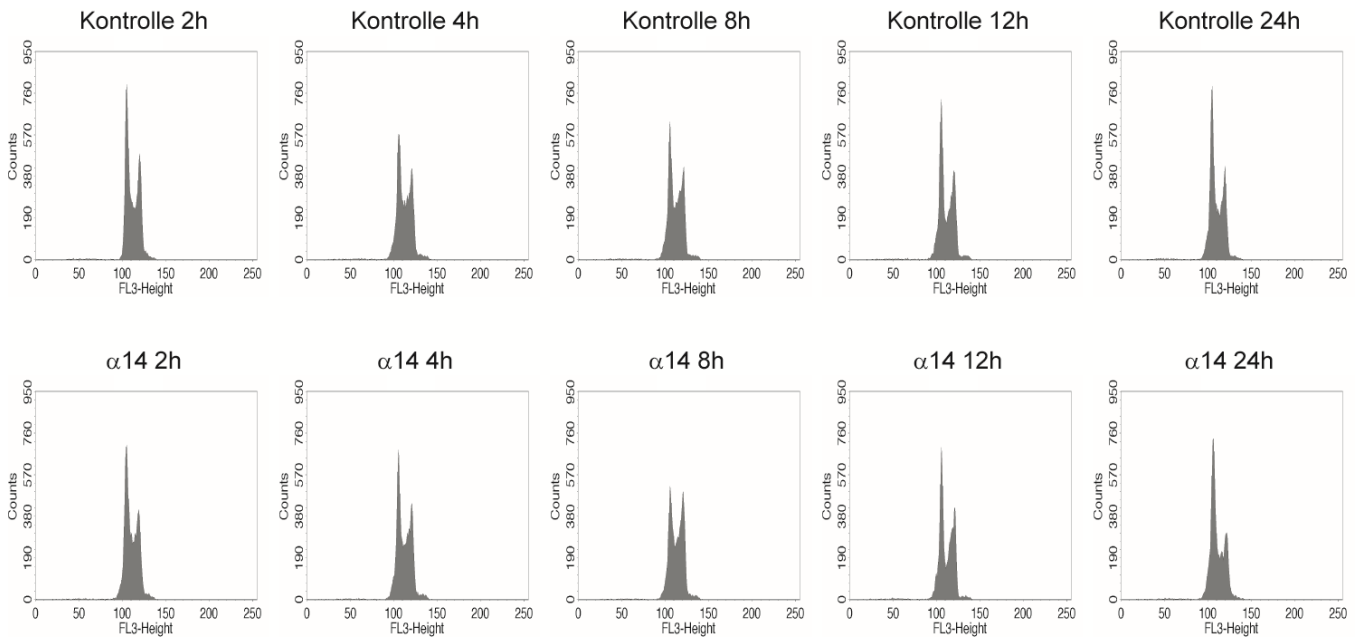


Abb. 6.7: PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit $\alpha 14$. Histogramme zu den Zeitpunkten 2 h bis 24 h nach Infektion.

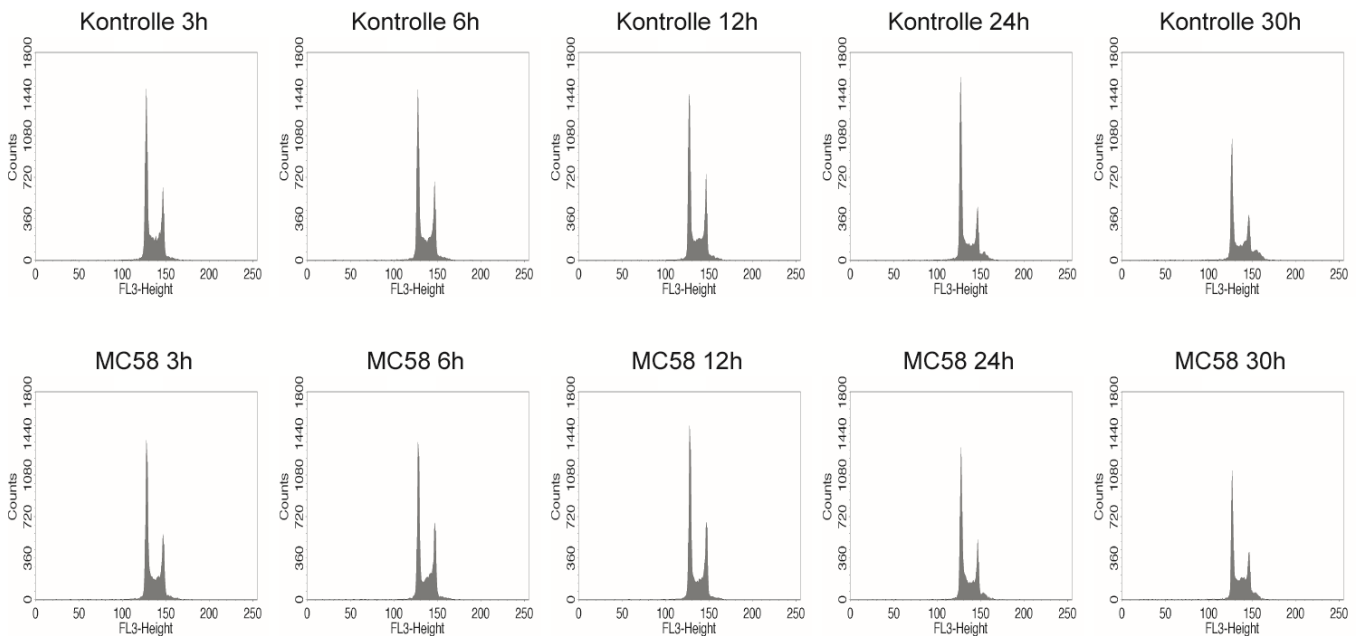


Abb. 6.8: PI-Färbung von NP69-Zellen nach Infektion mit MC58. Histogramme zu den Zeitpunkten 3 h bis 30 h nach Infektion.

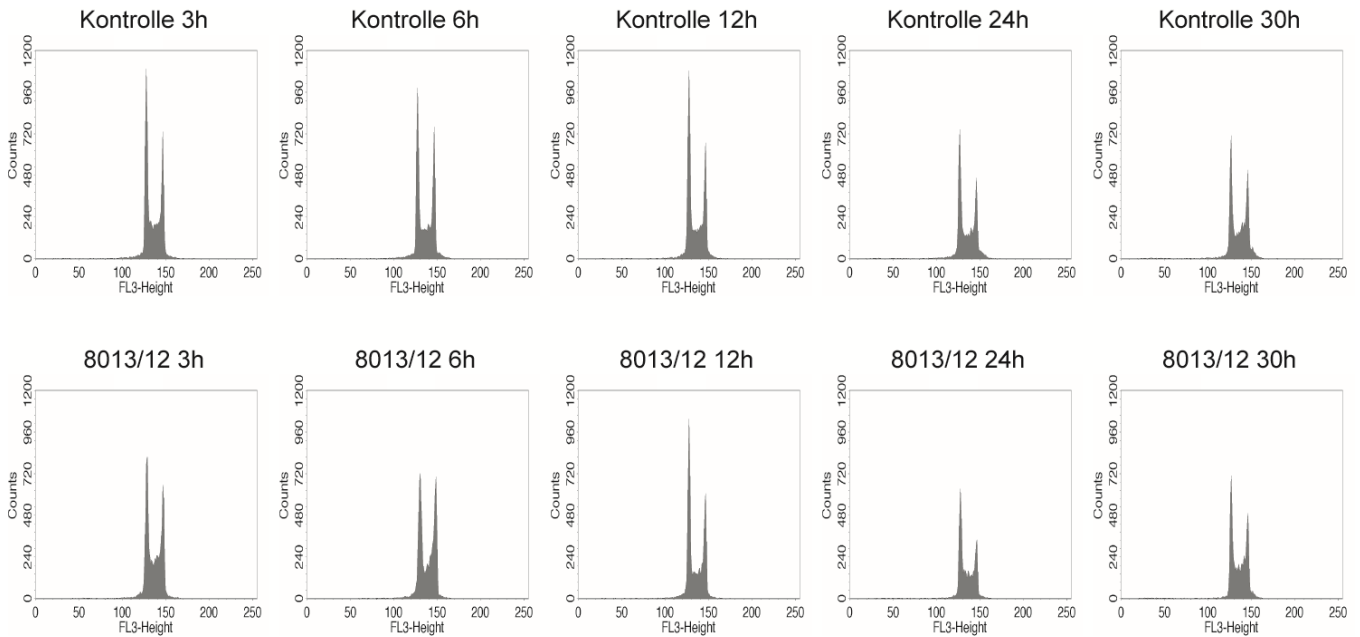


Abb. 6.9: PI-Färbung von NP69-Zellen nach Infektion mit 8013/Klon 12. Histogramme zu den Zeitpunkten 3 h bis 30 h nach Infektion.

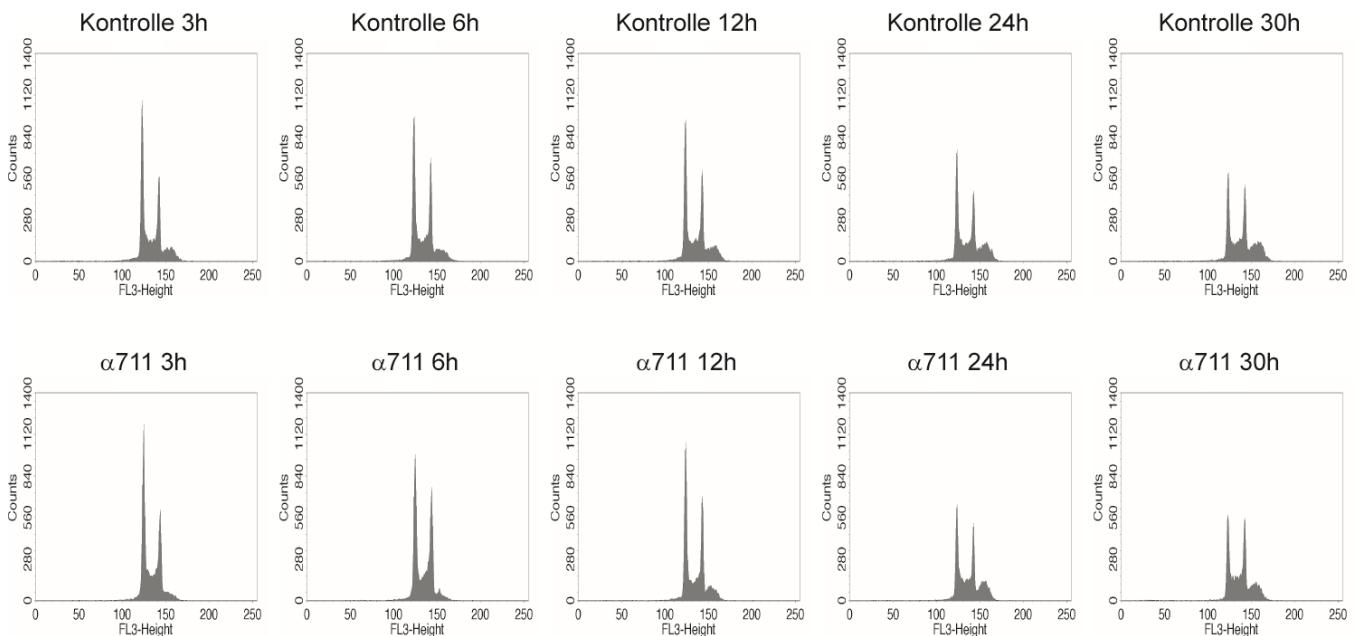


Abb. 6.10: PI-Färbung von NP69-Zellen nach Infektion mit α 711. Histogramme zu den Zeitpunkten 3 h bis 30 h nach Infektion.

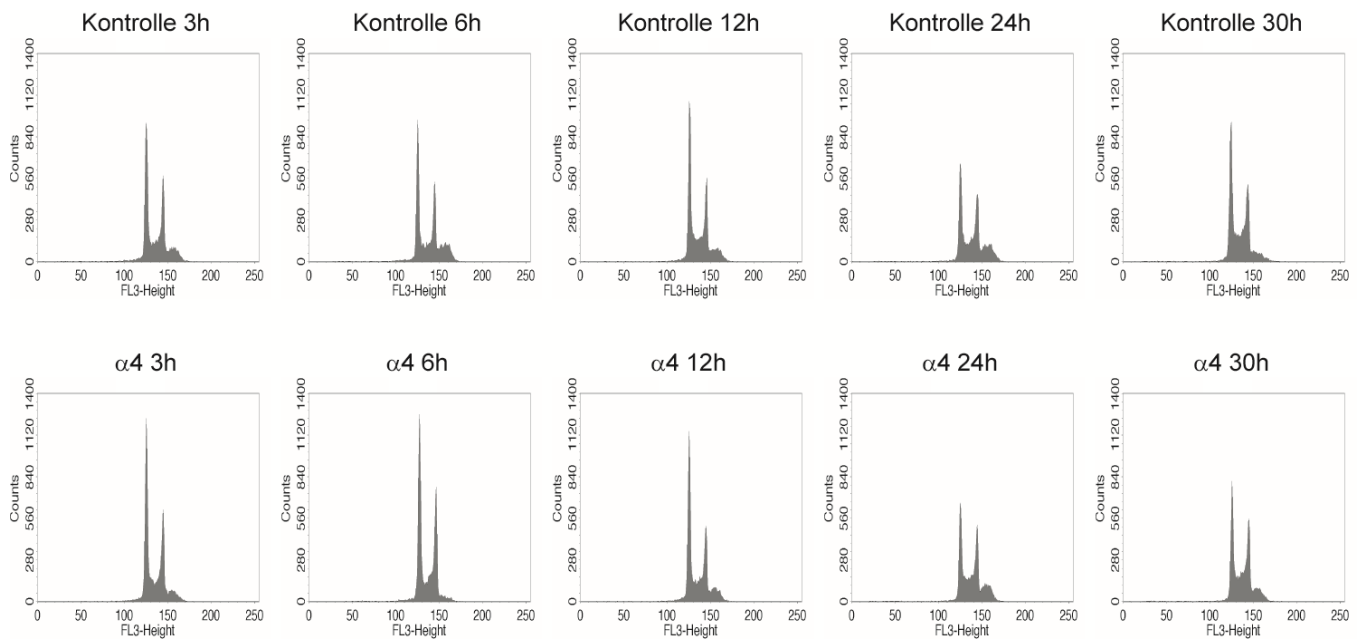


Abb. 6.11: PI-Färbung von NP69-Zellen nach Infektion mit $\alpha 4$. Histogramme zu den Zeitpunkten 3 h bis 30 h nach Infektion.

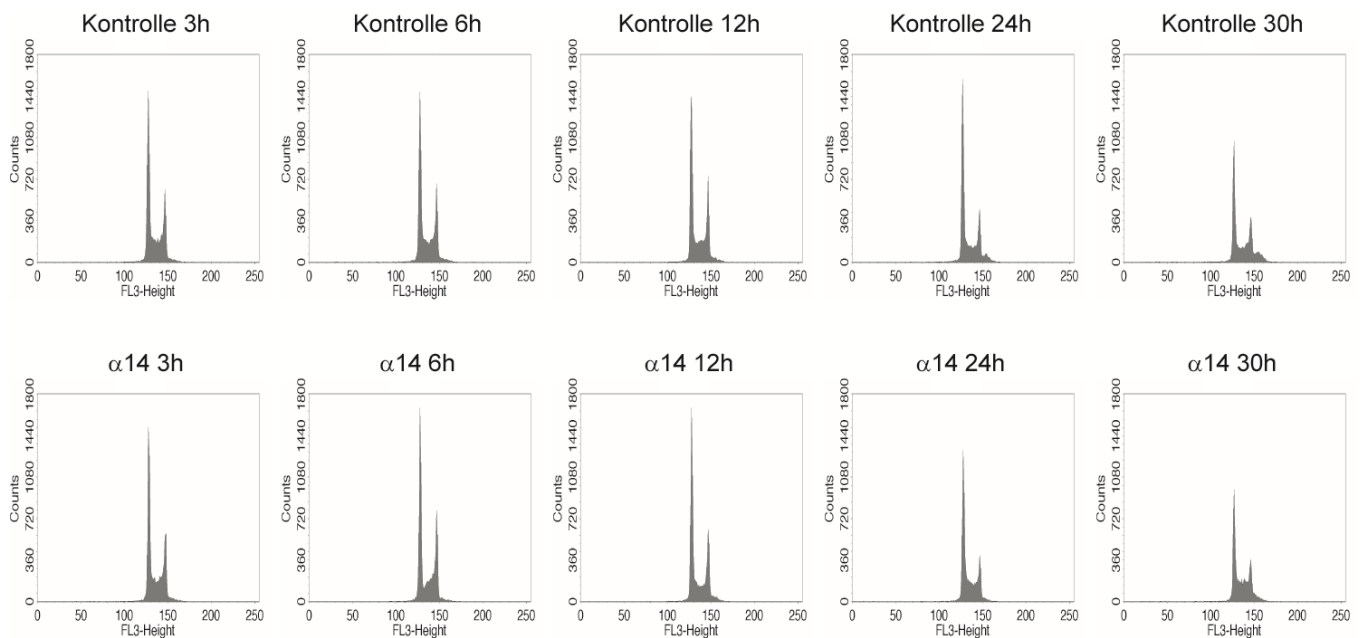


Abb. 6.12: PI-Färbung von NP69-Zellen nach Infektion mit $\alpha 14$. Histogramme zu den Zeitpunkten 3 h bis 30 h nach Infektion.

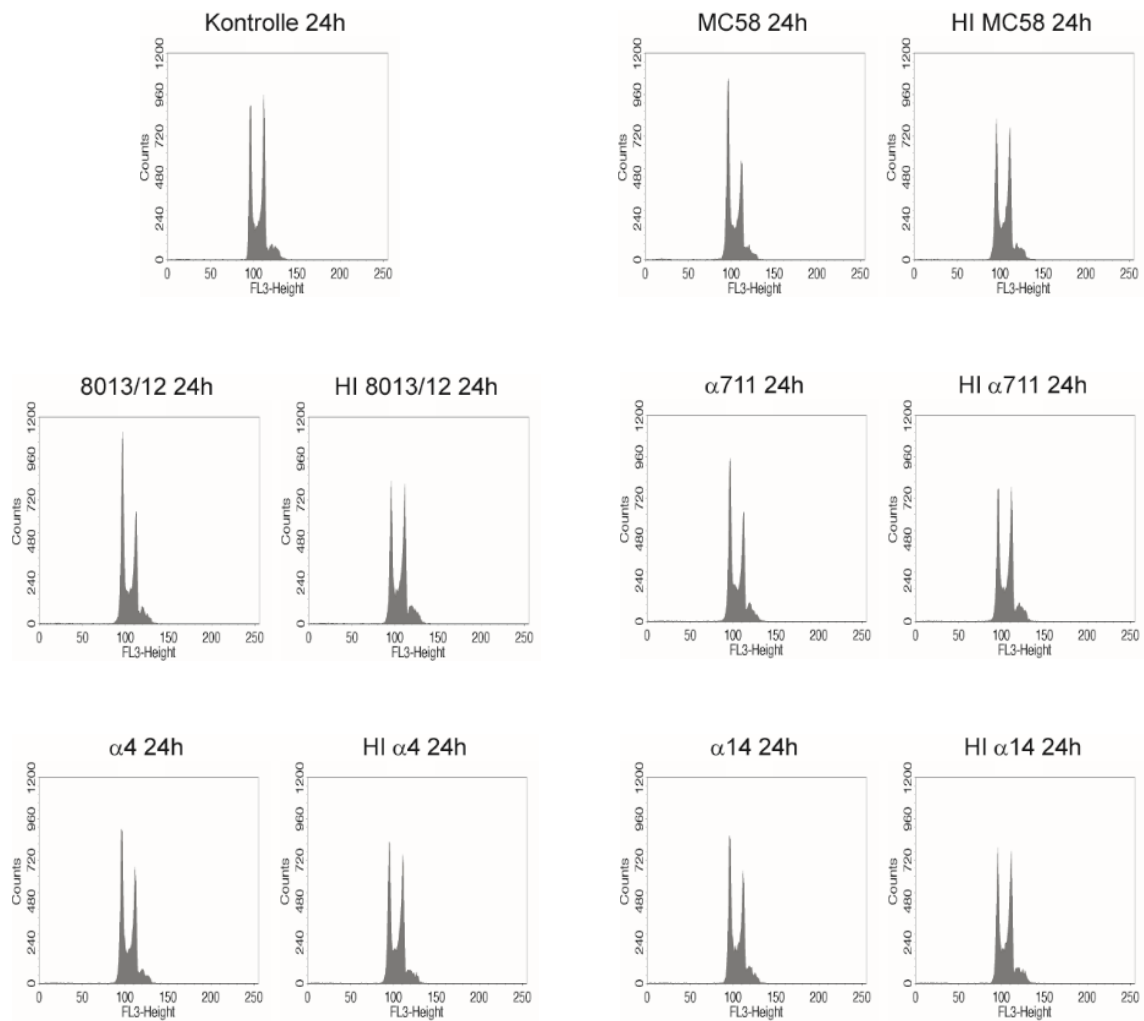


Abb. 6.13: PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Behandlung mit lebenden oder hitzeinaktivierten (HI) Meningokokkenstämmen. Alle Messungen wurden 24 h nach Infektion durchgeführt.

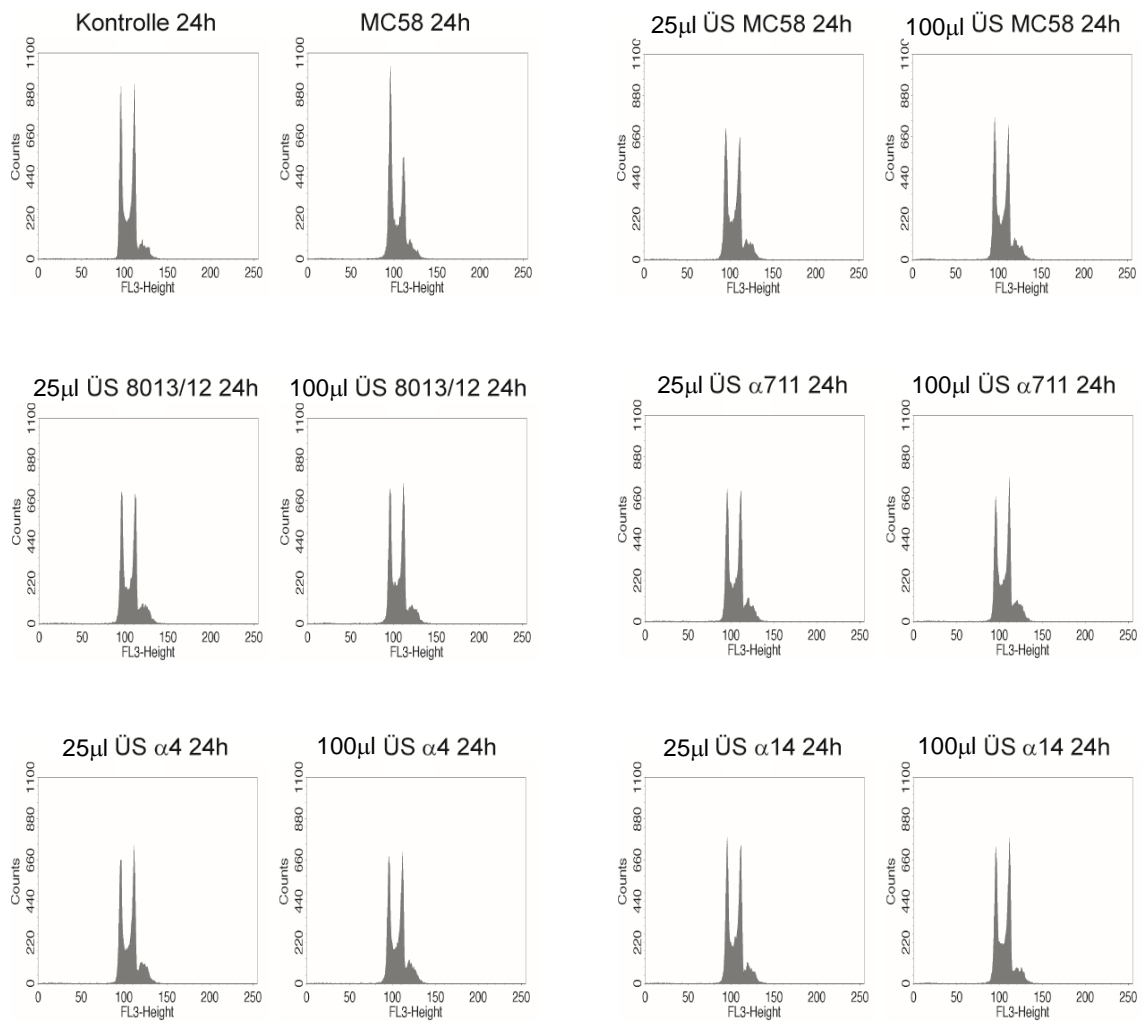


Abb. 6.14: PI-Färbung von Detroit 562-Zellen 24 h nach Behandlung mit bakteriellen Kulturüberständen. Histogramme von PI-Färbungen 24 h nach Inkubation der Zellen mit entweder 25 µl oder 100 µl Konzentrat aus bakteriellen Kulturüberständen (ÜS). Als Positivkontrolle wurde das Referenzisolat MC58 verwendet.

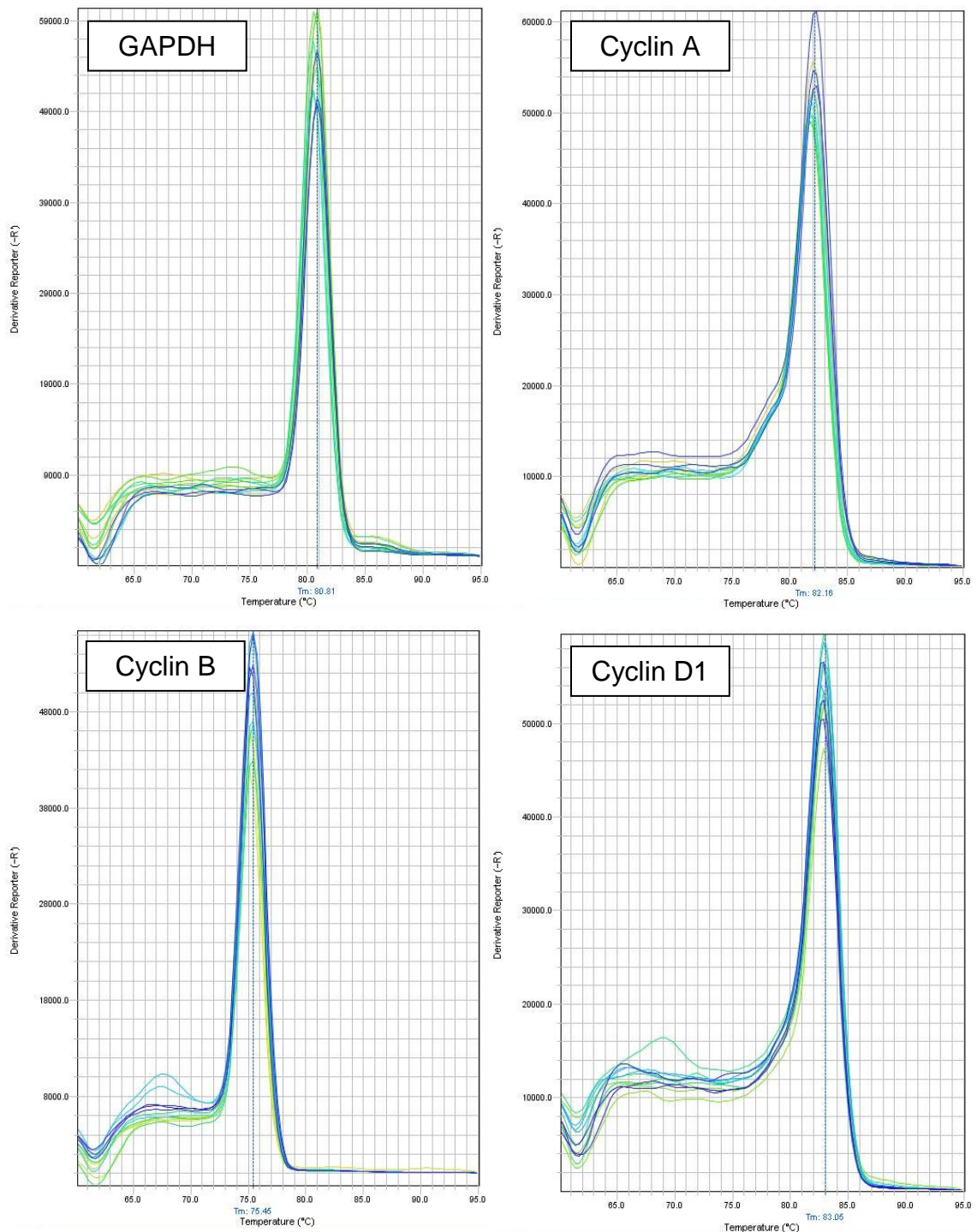


Abb. 6.15: qRT-PCR. Gezeigt sind die Schmelzkurven, die nach den Amplifikationszyklen zur Detektion von GAPDH, Cyclin A, -B und -D1 zum Ausschluss einer unspezifischen Amplifikation erstellt wurden.

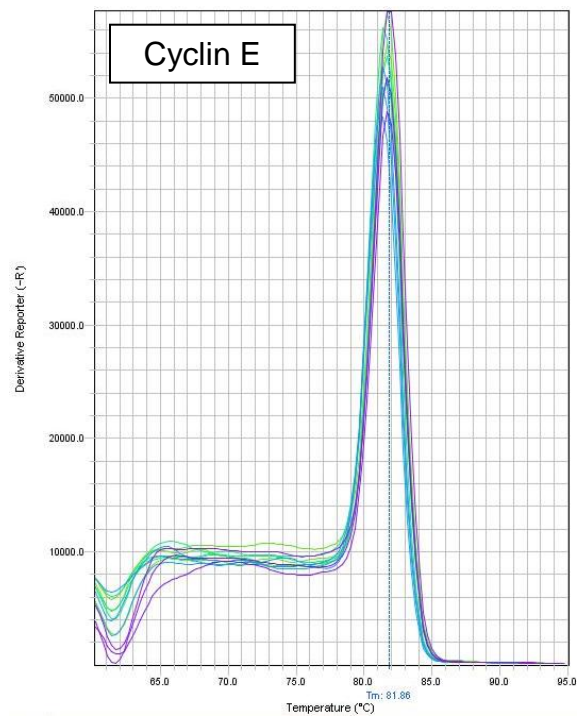


Abb. 6.16: qRT-PCR. Gezeigt sind die Schmelzkurven, die nach den Amplifikationszyklen zur Detektion von Cyclin E zum Ausschluss einer unspezifischen Amplifikation erstellt wurden.

7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.1 Tabellenverzeichnis

	Seite	
Tab. 2.1	Kulturbedingungen von FaDu-, Detroit 562- und NP69-Zellen im Überblick	46
Tab. 2.2	Kulturbedingungen von Detroit 562- und NP69-Zellen für den Gentamicin-Protektionsassay im Vergleich	54
Tab. 2.3	Kulturbedingungen von FaDu-, Detroit 562- und NP69-Zellen für PI-Färbungen im Vergleich	58
Tab. 2.4	Western Blot: Ansatz für zwei Gele	64
Tab. 2.5	PCR: Ansatz für den Mastermix (Mengen für eine Probe)	68
Tab. 2.6	PCR: Programmierung des Thermocyclers	69
Tab. 2.7	Umschrieb von RNA in cDNA: Mastermix-Ansatz (Mengen für eine Probe)	73
Tab. 2.8	qRT-PCR: Einstellungen der Step One-Software	75
Tab. 2.9	qRT-PCR: Reaktionsansatz für eine Probe	76
Tab. 3.1	Proteinkonzentration in den Kulturüberständen der getesteten Meningokokkenisolate	100

7.2 Abbildungsverzeichnis

	Seite	
Abb. 1.1	Die wichtigsten Adhäsine von <i>N. meningitidis</i>	6
Abb. 1.2	Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen	19
Abb. 2.1	Das <i>opcA</i> -Gen	40
Abb. 2.2	Der variable DNA-Gehalt während der Zellzyklusphasen	55
Abb. 2.3	Typisches Histogramm bei PI-Färbung nicht synchronisierter Zellen	56

Abb. 2.4	Detroit 562-Zellen	57
Abb. 2.5	Ethynyl-deoxy-Uridin	59
Abb. 2.6	Azid-konjugierter Farbstoff	59
Abb. 2.7	EdU nach der Clickreaktion	59
Abb. 2.8	EdU-Färbung	61
Abb. 2.9	EdU- und FxCycle-Färbung	61
Abb. 2.10	qRT-PCR: Thermocycler-Protokoll	75
Abb. 3.1	Adhärenz und Invasion: MC58 und MC58 <i>siaD</i> an Detroit 562-Zellen (Absolutwerte)	79
Abb. 3.2	Adhärenz und Invasion: MC58 und MC58 <i>siaD</i> an NP96-Zellen (Absolutwerte)	79
Abb. 3.3	Adhärenz und Invasion: MC58, 8013/Klon 12, $\alpha 711$, $\alpha 4$ und $\alpha 14$ an Detroit 562-Zellen (relative Werte)	80
Abb. 3.4	Adhärenz und Invasion: MC58, 8013/Klon 12, $\alpha 711$, $\alpha 4$ und $\alpha 14$ an NP69-Zellen (relative Werte)	81
Abb. 3.5	PI-Färbung von FaDu-Zellen (Histogramme 24 Stunden p.i.)	83
Abb. 3.6	PI-Färbung von FaDu-Zellen (Auswertung)	83
Abb. 3.7	PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit MC58 und 8013/Klon 12 (Auswertung)	84
Abb. 3.8	PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit MC58, 8013/Klon 12, $\alpha 711$, $\alpha 4$ und $\alpha 14$ (Histogramme 24 Stunden p.i.)	85
Abb. 3.9	PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit $\alpha 711$, $\alpha 4$ und $\alpha 14$ (Auswertung)	86
Abb. 3.10	PI-Färbung von NP69-Zellen nach Infektion mit MC58 und 8013/Klon 12 (Auswertung)	87

Abb. 3.11	PI-Färbung von NP69-Zellen nach Infektion mit MC58, 8013/Klon 12, α 711, α 4 und α 14 (Histogramme 30 Stunden p.i.)	88
Abb. 3.12	PI-Färbung von NP69-Zellen nach Infektion mit α 711, α 4 und α 14 (Auswertung)	89
Abb. 3.13	PI-Färbung von Detroit 562-Zellen, die zwei Stunden oder sechs Stunden mit MC58 infiziert wurden	90
Abb. 3.14	Lichtmikroskopische Aufnahmen von infizierten und nicht infizierten Detroit 562-Zellen	91
Abb. 3.15	Trypan-Blau-Färbung von infizierten und nicht infizierten Detroit 562-Zellen	91
Abb. 3.16	EdU-Färbung von Detroit 562-Zellen (Histogramme)	92
Abb. 3.17	EdU-Färbung von Detroit 562-Zellen (Auswertung)	92
Abb. 3.18	EdU- und FxCycle Far Red-Färbung von Detroit 562-Zellen (Plots und eingestellte Gates)	93
Abb. 3.19	EdU- und FxCycle Far Red-Färbung von Detroit 562-Zellen (Auswertung)	93
Abb. 3.20	Western Blot von Bakterienlysaten zur Detektion von Opa	95
Abb. 3.21	Western Blot von Bakterienlysaten zur Detektion von Opc	95
Abb. 3.22	Western Blot von Bakterienlysaten zur Detektion von Klasse-I-Pili	95
Abb. 3.23	PCR mit dem Primerpaar RA3/RA4	96
Abb. 3.24	PCR mit dem Primerpaar RA1/RA2	96
Abb. 3.25	Sequenzierung der Promotorregion des <i>opcA</i> -Gens bei MC58 und α 711	98
Abb. 3.26	PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit lebenden und hitzeinaktivierten Meningokokkenisolaten (Auswertung)	99
Abb. 3.27	PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Behandlung mit bakteriellen Proteinkonzentraten (Auswertung)	101

Abb. 3.28	PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit Opa- und Opc-exprimierenden <i>E. coli</i> -Stämmen (Auswertung)	102
Abb. 3.29	Western Blot von Zelllysaten von Detroit 562-Zellen zur Detektion von Cyclin D1 (Blot und Auswertung)	104
Abb. 3.30	Western Blot von Zelllysaten von Detroit 562-Zellen zur Detektion von Cyclin E (Blot und Auswertung)	105
Abb. 3.31	Western Blot von Zelllysaten von Detroit 562-Zellen zur Detektion von p21 ^{WAF1/Cip1} (Blot und Auswertung)	105
Abb. 3.32	Immunfluoreszenz von Detroit 562-Zellen für Cyclin D1	107
Abb. 3.33	Immunfluoreszenz von Detroit 562-Zellen für Cyclin E	108
Abb. 3.34	Immunfluoreszenz von Detroit 562-Zellen für p21 ^{WAF1/Cip1}	109
Abb. 3.35	Immunfluoreszenz von Detroit 562-Zellen für p27 ^{Kip}	110
Abb. 3.36	Analyse der RNA-Integrität mittels BioAnalyzer	111
Abb. 3.37	qRT-PCR zur Messung der Expression der GAPDH in Detroit 562-Zellen (Amplifikationskurven)	112
Abb. 3.38	qRT-PCR zur Quantifizierung der Expression von Cyclin A in Detroit 562-Zellen (Amplifikationskurven)	113
Abb. 3.39	qRT-PCR zur Quantifizierung der Expression von Cyclin B in Detroit 562-Zellen (Amplifikationskurven)	114
Abb. 3.40	qRT-PCR zur Quantifizierung der Expression von Cyclin D1 in Detroit 562-Zellen (Amplifikationskurven)	114
Abb. 3.41	qRT-PCR zur Quantifizierung der Expression von Cyclin E in Detroit 562-Zellen (Amplifikationskurven)	115
Abb. 3.42	qRT-PCR: Auswertung mithilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode	115
Abb. 6.1	PI-Färbung von FaDu-Zellen nach Infektion mit MC58 (Histogramme 2 bis 24 Stunden)	137
Abb. 6.2	PI-Färbung von FaDu-Zellen nach Infektion mit $\alpha 14$ (Histogramme 2 bis 24 Stunden)	137
Abb. 6.3	PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit MC58 (Histogramme 2 bis 24 Stunden)	138

Abb. 6.4	PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit 8013/Klon 12 (Histogramme 2 bis 24 Stunden)	138
Abb. 6.5	PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit α 711 (Histogramme 2 bis 24 Stunden)	139
Abb. 6.6	PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit α 4 (Histogramme 2 bis 24 Stunden)	139
Abb. 6.7	PI-Färbung von Detroit 562-Zellen nach Infektion mit α 14 (Histogramme 2 bis 24 Stunden)	140
Abb. 6.8	PI-Färbung von NP69-Zellen nach Infektion mit MC58 (Histogramme 3 bis 30 Stunden)	140
Abb. 6.9	PI-Färbung von NP69-Zellen nach Infektion mit 8013/Klon 12 (Histogramme 3 bis 30 Stunden)	141
Abb. 6.10	PI-Färbung von NP69-Zellen nach Infektion mit α 711 (Histogramme 3 bis 30 Stunden)	141
Abb. 6.11	PI-Färbung von NP69-Zellen nach Infektion mit α 4 (Histogramme 3 bis 30 Stunden)	142
Abb. 6.12	PI-Färbung von NP69-Zellen nach Infektion mit α 14 (Histogramme 3 bis 30 Stunden)	142
Abb. 6.13	PI-Färbung von Detroit 562-Zellen 24 Stunden nach Behandlung mit lebenden oder hitzeinaktivierten Meningokokkenstämmen (Histogramme)	143
Abb. 6.14	PI-Färbung von Detroit 562-Zellen 24 Stunden nach Behandlung mit bakteriellen Kulturüberständen (Histogramme)	144
Abb. 6.15	qRT-PCR: Schmelzkurven nach den Amplifikationszyklen von GAPDH, Cyclin A, -B und -D1	145
Abb. 6.16	qRT-PCR: Schmelzkurven nach den Amplifikationszyklen von Cyclin E	146

8. Literaturverzeichnis

1. Roupheal, N.G. and D.S. Stephens, *Neisseria meningitidis: biology, microbiology, and epidemiology*. Methods Mol Biol, 2012. **799**: p. 1-20.
2. Dwilow, R. and S. Fanella, *Invasive meningococcal disease in the 21st century-an update for the clinician*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2015. **15**(3): p. 2.
3. Vieusseux, M., *Mémoire sur la maladie qui a régné a Genève au printemps de 1805*. J Med Chir Pharmacol, 1805. **11**: p. 163.
4. Manchanda, V., S. Gupta, and P. Bhalla, *Meningococcal disease: history, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention*. Indian J Med Microbiol, 2006. **24**(1): p. 7-19.
5. Danielson, L. and E. Mann, *Letter to Medical and Agricultural Registrar*. Boston, MA, 1806.
6. Marchiafava, E. and A. Celli, *Spra i micrococchi della meningite cerebrospinale epidemica*. Gazz degli Ospedali, 1884. **5**: p. 59.
7. Weichselbaum, A., *Ueber die Aetiologie der akuten Meningitis cerebrospinalis*. Fortschr Med, 1887. **5**: p. 573-583.
8. Tettelin, H., et al., *Complete genome sequence of Neisseria meningitidis serogroup B strain MC58*. Science, 2000. **287**(5459): p. 1809-15.
9. Parkhill, J., et al., *Complete DNA sequence of a serogroup A strain of Neisseria meningitidis Z2491*. Nature, 2000. **404**(6777): p. 502-6.
10. Bentley, S.D., et al., *Meningococcal genetic variation mechanisms viewed through comparative analysis of serogroup C strain FAM18*. PLoS Genet, 2007. **3**(2): p. e23.
11. Stephens, D.S., *Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium Neisseria meningitidis*. Vaccine, 2009. **27 Suppl 2**: p. B71-7.
12. Harrison, O.B., et al., *Description and nomenclature of Neisseria meningitidis capsule locus*. Emerg Infect Dis, 2013. **19**(4): p. 566-73.
13. Maiden, M.C., et al., *Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3140-5.
14. Brehony, C., K.A. Jolley, and M.C. Maiden, *Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease*. FEMS Microbiol Rev, 2007. **31**(1): p. 15-26.
15. Armstrong, S.K., *Bacterial Metabolism in the Host Environment: Pathogen Growth and Nutrient Assimilation in the Mammalian Upper Respiratory Tract*. Microbiol Spectr, 2015. **3**(3).
16. Cartwright, K.A., et al., *The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and Neisseria lactamica*. Epidemiol Infect, 1987. **99**(3): p. 591-601.
17. Caugant, D.A., et al., *Asymptomatic carriage of Neisseria meningitidis in a randomly sampled population*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(2): p. 323-30.

18. Claus, H., et al., *Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults*. J Infect Dis, 2005. **191**(8): p. 1263-71.
19. Caugant, D.A. and M.C. Maiden, *Meningococcal carriage and disease--population biology and evolution*. Vaccine, 2009. **27 Suppl 2**: p. B64-70.
20. Christensen, H., et al., *Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2010. **10**(12): p. 853-61.
21. Ala'aldeen, D.A., et al., *Carriage of meningococci by university students, United Kingdom*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(9): p. 1762-3.
22. Caugant, D.A., et al., *Transmission of Neisseria meningitidis among asymptomatic military recruits and antibody analysis*. Epidemiol Infect, 1992. **109**(2): p. 241-53.
23. Trotter, C.L., N.J. Gay, and W.J. Edmunds, *The natural history of meningococcal carriage and disease*. Epidemiol Infect, 2006. **134**(3): p. 556-66.
24. Jafri, R.Z., et al., *Global epidemiology of invasive meningococcal disease*. Popul Health Metr, 2013. **11**(1): p. 17.
25. *Meningitis control in countries of the African meningitis belt, 2015*. Wkly Epidemiol Rec, 2016. **91**(16): p. 209-16.
26. Harrison, L.H., C.L. Trotter, and M.E. Ramsay, *Global epidemiology of meningococcal disease*. Vaccine, 2009. **27 Suppl 2**: p. B51-63.
27. Koutangni, T., H. Boubacar Mainassara, and J.E. Mueller, *Incidence, carriage and case-carrier ratios for meningococcal meningitis in the African meningitis belt: a systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0116725.
28. Greenwood, B., *Manson Lecture. Meningococcal meningitis in Africa*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1999. **93**(4): p. 341-53.
29. Giancchetti, E., et al., *Neisseria meningitidis infection: who, when and where?* Expert Rev Anti Infect Ther, 2015. **13**(10): p. 1249-63.
30. Stephens, D.S., B. Greenwood, and P. Brandtzaeg, *Epidemic meningitis, meningococcaemia, and Neisseria meningitidis*. The Lancet, 2007. **369**(9580): p. 2196-2210.
31. *Meningococcal meningitis Fact sheet N°141*. 2015 November 2015; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs141/en/>.
32. Lingani, C., et al., *Meningococcal Meningitis Surveillance in the African Meningitis Belt, 2004-2013*. Clin Infect Dis, 2015. **61 Suppl 5**: p. S410-5.
33. *Affordable and effective vaccine brings Africa close to elimination of meningitis A*. 2015 November 2015; Available from: <http://www.who.int/features/2015/meningitis-africa-elimination/en/>.
34. Daugla, D.M., et al., *Effect of a serogroup A meningococcal conjugate vaccine (PsA-TT) on serogroup A meningococcal meningitis and carriage in Chad: a community study [corrected]*. Lancet, 2014. **383**(9911): p. 40-7.
35. Kristiansen, P.A., et al., *Persistent low carriage of serogroup A Neisseria meningitidis two years after mass vaccination with the meningococcal conjugate vaccine, MenAfriVac*. BMC Infect Dis, 2014. **14**: p. 663.

36. Borrow, R., et al., *The Global Meningococcal Initiative: global epidemiology, the impact of vaccines on meningococcal disease and the importance of herd protection*. *Expert Rev Vaccines*, 2016: p. 1-16.
37. Toros, B., et al., *Surveillance of invasive Neisseria meningitidis with a serogroup Y update, Sweden 2010 to 2012*. *Euro Surveill*, 2014. **19**(42).
38. Delrieu, I., et al., *Emergence of epidemic Neisseria meningitidis serogroup X meningitis in Togo and Burkina Faso*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e19513.
39. Xie, O., et al., *Emergence of serogroup X meningococcal disease in Africa: need for a vaccine*. *Vaccine*, 2013. **31**(27): p. 2852-61.
40. Taha, M.K., et al., *Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims*. *Lancet*, 2000. **356**(9248): p. 2159.
41. *Invasive Meningokokken-Erkrankungen 2012 – 2015*. *Epidemiologisches Bulletin*, 2016. **Nr. 43/2016**: p. 471-485.
42. *Stellungnahme der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut (RKI) zum Stand der Bewertung des neuen Meningokokken-B-Impfstoffs Bexsero®*. *Epidemiologisches Bulletin*, 2013. **Nr. 49/2013**: p. 495-498.
43. *RKI-Ratgeber für Ärzte - Meningokokken-Erkrankungen*. 2016 07.04.2016; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Meningokokken.html.
44. *Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut – 2016/2017*. *Epidemiologisches Bulletin*, 2016. **Nr. 34/2016**: p. 301-340.
45. *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2015*. 2016 01.03.2016; Available from: http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2015.pdf?__blob=publicationFile.
46. *Aktualisierung der Meningokokken-Impfempfehlung: Anwendung des Meningokokken-B-Impfstoffs bei Personen mit erhöhtem Risiko für Meningokokken-Erkrankungen*. *Epidemiologisches Bulletin*, 2015. **Nr 37/2015**: p. 393-410.
47. Gabutti, G., A. Stefanati, and P. Kuhdari, *Epidemiology of Neisseria meningitidis infections: case distribution by age and relevance of carriage*. *J Prev Med Hyg*, 2015. **56**(3): p. E116-20.
48. Swain, C.L. and D.R. Martin, *Survival of meningococci outside of the host: implications for acquisition*. *Epidemiol Infect*, 2007. **135**(2): p. 315-20.
49. Livorsi, D.J., E. Stenehjem, and D.S. Stephens, *Virulence factors of gram-negative bacteria in sepsis with a focus on Neisseria meningitidis*. *Contrib Microbiol*, 2011. **17**: p. 31-47.
50. Virji, M., et al., *Variations in the expression of pili: the effect on adherence of Neisseria meningitidis to human epithelial and endothelial cells*. *Mol Microbiol*, 1992. **6**(10): p. 1271-9.

51. Nassif, X., et al., *Roles of pilin and PilC in adhesion of Neisseria meningitidis to human epithelial and endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3769-73.
52. Pujol, C., et al., *The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 4017-22.
53. Merz, A.J., M. So, and M.P. Sheetz, *Pilus retraction powers bacterial twitching motility*. Nature, 2000. **407**(6800): p. 98-102.
54. Eriksson, J., et al., *Characterization of motility and piliation in pathogenic Neisseria*. BMC Microbiol, 2015. **15**: p. 92.
55. Brown, D.R., et al., *Systematic functional analysis reveals that a set of seven genes is involved in fine-tuning of the multiple functions mediated by type IV pili in Neisseria meningitidis*. Infect Immun, 2010. **78**(7): p. 3053-63.
56. Ryll, R.R., et al., *PilC of Neisseria meningitidis is involved in class II pilus formation and restores pilus assembly, natural transformation competence and adherence to epithelial cells in PilC-deficient gonococci*. Mol Microbiol, 1997. **23**(5): p. 879-92.
57. Kallstrom, H., et al., *Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic Neisseria*. Mol Microbiol, 1997. **25**(4): p. 639-47.
58. 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*. Infect Immun, 2005. **73**(5): p. 3072-82.
59. Jen, F.E., et al., *Dual pili post-translational modifications synergize to mediate meningococcal adherence to platelet activating factor receptor on human airway cells*. PLoS Pathog, 2013. **9**(5): p. e1003377.
60. Virji, M., et al., *Critical determinants of host receptor targeting by Neisseria meningitidis and Neisseria gonorrhoeae: identification of Opa adhesin topes on the N-domain of CD66 molecules*. Mol Microbiol, 1999. **34**(3): p. 538-51.
61. Virji, M., et al., *The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of Neisseria meningitidis and Neisseria gonorrhoeae*. Mol Microbiol, 1996. **22**(5): p. 929-39.
62. Griffiths, N.J., et al., *IFN-gamma amplifies NFkappaB-dependent Neisseria meningitidis invasion of epithelial cells via specific upregulation of CEA-related cell adhesion molecule 1*. Cell Microbiol, 2007. **9**(12): p. 2968-83.
63. de Vries, F.P., et al., *Neisseria meningitidis producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors*. Mol Microbiol, 1998. **27**(6): p. 1203-12.
64. Virji, M., et al., *Expression of the Opc protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by Neisseria meningitidis*. Mol Microbiol, 1992. **6**(19): p. 2785-95.
65. 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*. Mol Microbiol, 2002. **43**(6): p. 1555-64.

66. Virji, M., et al., *Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells*. Mol Microbiol, 1993. **10**(3): p. 499-510.
67. Oldfield, N.J., et al., *T-cell stimulating protein A (TspA) of Neisseria meningitidis is required for optimal adhesion to human cells*. Cell Microbiol, 2007. **9**(2): p. 463-78.
68. Sjolinder, H., et al., *Meningococcal outer membrane protein NhhA is essential for colonization and disease by preventing phagocytosis and complement attack*. Infect Immun, 2008. **76**(11): p. 5412-20.
69. Serruto, D., et al., *Neisseria meningitidis App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity*. Mol Microbiol, 2003. **48**(2): p. 323-34.
70. Capecchi, B., et al., *Neisseria meningitidis NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells*. Mol Microbiol, 2005. **55**(3): p. 687-98.
71. Schmitt, C., et al., *A functional two-partner secretion system contributes to adhesion of Neisseria meningitidis to epithelial cells*. J Bacteriol, 2007. **189**(22): p. 7968-76.
72. Lappann, M. and U. Vogel, *Biofilm formation by the human pathogen Neisseria meningitidis*. Med Microbiol Immunol, 2010. **199**(3): p. 173-83.
73. Neil, R.B. and M.A. Apicella, *Clinical and laboratory evidence for Neisseria meningitidis biofilms*. Future Microbiol, 2009. **4**(5): p. 555-63.
74. Alamro, M., et al., *Phase variation mediates reductions in expression of surface proteins during persistent meningococcal carriage*. Infect Immun, 2014. **82**(6): p. 2472-84.
75. Tzeng, Y.L., et al., *Cationic antimicrobial peptide resistance in Neisseria meningitidis*. J Bacteriol, 2005. **187**(15): p. 5387-96.
76. Lin, L., et al., *The Neisseria type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells*. Mol Microbiol, 1997. **24**(5): p. 1083-94.
77. Stevanin, T.M., J.W. Moir, and R.C. Read, *Nitric oxide detoxification systems enhance survival of Neisseria meningitidis in human macrophages and in nasopharyngeal mucosa*. Infect Immun, 2005. **73**(6): p. 3322-9.
78. 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*. Infect Immun, 2009. **77**(1): p. 292-9.
79. Exley, R.M., et al., *Neisseria meningitidis lactate permease is required for nasopharyngeal colonization*. Infect Immun, 2005. **73**(9): p. 5762-6.
80. Perkins-Balding, D., M. Ratliff-Griffin, and I. Stojiljkovic, *Iron Transport Systems in Neisseria meningitidis*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004. **68**(1): p. 154-171.
81. Caugant, D.A., G. Tzanakaki, and P. Kriz, *Lessons from meningococcal carriage studies*. FEMS Microbiol Rev, 2007. **31**(1): p. 52-63.
82. Jordens, J.Z., et al., *Development of immunity to serogroup B meningococci during carriage of Neisseria meningitidis in a cohort of university students*. Infect Immun, 2004. **72**(11): p. 6503-10.

83. Raghunathan, P.L., et al., *Predictors of immunity after a major serogroup W-135 meningococcal disease epidemic, Burkina Faso, 2002*. J Infect Dis, 2006. **193**(5): p. 607-16.
84. Evans, C.M., et al., *Nasopharyngeal colonization by Neisseria lactamica and induction of protective immunity against Neisseria meningitidis*. Clin Infect Dis, 2011. **52**(1): p. 70-7.
85. Deasy, A.M., et al., *Nasal Inoculation of the Commensal Neisseria lactamica Inhibits Carriage of Neisseria meningitidis by Young Adults: A Controlled Human Infection Study*. Clin Infect Dis, 2015. **60**(10): p. 1512-20.
86. Trotter, C.L. and M.C. Maiden, *Meningococcal vaccines and herd immunity: lessons learned from serogroup C conjugate vaccination programs*. Expert Rev Vaccines, 2009. **8**(7): p. 851-61.
87. Read, R.C., et al., *Effect of a quadrivalent meningococcal ACWY glycoconjugate or a serogroup B meningococcal vaccine on meningococcal carriage: an observer-blind, phase 3 randomised clinical trial*. Lancet, 2014. **384**(9960): p. 2123-31.
88. Coureuil, M., et al., *Pathogenesis of meningococemia*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(6).
89. Pujol, C., et al., *Interaction of Neisseria meningitidis with a polarized monolayer of epithelial cells*. Infect Immun, 1997. **65**(11): p. 4836-42.
90. Sutherland, T.C., et al., *Transcellular passage of Neisseria meningitidis across a polarized respiratory epithelium*. Infect Immun, 2010. **78**(9): p. 3832-47.
91. Lecuyer, H., X. Nassif, and M. Coureuil, *Two strikingly different signaling pathways are induced by meningococcal type IV pili on endothelial and epithelial cells*. Infect Immun, 2012. **80**(1): p. 175-86.
92. Virji, M., *Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(4): p. 274-86.
93. Rosenstein, N.E., et al., *Meningococcal disease*. N Engl J Med, 2001. **344**(18): p. 1378-88.
94. 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 Pathog, 2010. **6**(7): p. e1001027.
95. Del Tordello, E., et al., *Neisseria meningitidis NaIP cleaves human complement C3, facilitating degradation of C3b and survival in human serum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(1): p. 427-32.
96. Jarva, H., et al., *Binding of the complement inhibitor C4bp to serogroup B Neisseria meningitidis*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6299-307.
97. Loh, E., et al., *Temperature triggers immune evasion by Neisseria meningitidis*. Nature, 2013. **502**(7470): p. 237-40.
98. Jordan, P.W. and N.J. Saunders, *Host iron binding proteins acting as niche indicators for Neisseria meningitidis*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5198.
99. Melican, K. and G. Dumenil, *Vascular colonization by Neisseria meningitidis*. Curr Opin Microbiol, 2012. **15**(1): p. 50-6.

100. Mairey, E., et al., *Cerebral microcirculation shear stress levels determine Neisseria meningitidis attachment sites along the blood-brain barrier*. J Exp Med, 2006. **203**(8): p. 1939-50.
101. Bernard, S.C., et al., *Pathogenic Neisseria meningitidis utilizes CD147 for vascular colonization*. Nat Med, 2014. **20**(7): p. 725-31.
102. Watanabe, A., et al., *CD147/EMMPRIN acts as a functional entry receptor for measles virus on epithelial cells*. J Virol, 2010. **84**(9): p. 4183-93.
103. Sa, E.C.C., N.J. Griffiths, and M. Virji, *Neisseria meningitidis Opc invasin binds to the sulphated tyrosines of activated vitronectin to attach to and invade human brain endothelial cells*. PLoS Pathog, 2010. **6**(5): p. e1000911.
104. Unkmeir, A., et al., *Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of Neisseria meningitidis in human brain microvascular endothelial cells*. Mol Microbiol, 2002. **46**(4): p. 933-46.
105. Coureuil, M., et al., *Meningococcus Hijacks a beta2-adrenoceptor/beta-Arrestin pathway to cross brain microvasculature endothelium*. Cell, 2010. **143**(7): p. 1149-60.
106. Merz, A.J., C.A. Enns, and M. So, *Type IV pili of pathogenic Neisseriae elicit cortical plaque formation in epithelial cells*. Mol Microbiol, 1999. **32**(6): p. 1316-32.
107. Eugene, E., et al., *Microvilli-like structures are associated with the internalization of virulent capsulated Neisseria meningitidis into vascular endothelial cells*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 6): p. 1231-41.
108. Mikaty, G., et al., *Extracellular bacterial pathogen induces host cell surface reorganization to resist shear stress*. PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000314.
109. Coureuil, M., et al., *Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium*. Science, 2009. **325**(5936): p. 83-7.
110. Schubert-Unkmeir, A., et al., *Neisseria meningitidis induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8*. PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000874.
111. Coureuil, M., et al., *Invasive meningococcal disease: a disease of the endothelial cells*. Trends Mol Med, 2014. **20**(10): p. 571-8.
112. Melican, K., et al., *Adhesion of Neisseria meningitidis to dermal vessels leads to local vascular damage and purpura in a humanized mouse model*. PLoS Pathog, 2013. **9**(1): p. e1003139.
113. Claus, H., et al., *Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 6): p. 1813-9.
114. Schoen, C., et al., *Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in Neisseria meningitidis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(9): p. 3473-8.
115. Schoen, C., et al., *Metabolism and virulence in Neisseria meningitidis*. Front Cell Infect Microbiol, 2014. **4**: p. 114.

116. Holdsworth, R.J., A.D. Irving, and A. Cuschieri, *Postsplenectomy sepsis and its mortality rate: actual versus perceived risks*. Br J Surg, 1991. **78**(9): p. 1031-8.
117. Fijen, C.A., et al., *Assessment of complement deficiency in patients with meningococcal disease in The Netherlands*. Clin Infect Dis, 1999. **28**(1): p. 98-105.
118. Emonts, M., et al., *Host genetic determinants of Neisseria meningitidis infections*. Lancet Infect Dis, 2003. **3**(9): p. 565-77.
119. Read, R.C., et al., *Variation within genes encoding interleukin-1 and the interleukin-1 receptor antagonist influence the severity of meningococcal disease*. Ann Intern Med, 2003. **138**(7): p. 534-41.
120. Giancchetti, E., et al., *N. meningitidis and TLR Polymorphisms: A Fascinating Immunomodulatory Network*. Vaccines (Basel), 2016. **4**(2).
121. McCall, B.J., A.S. Neill, and M.M. Young, *Risk factors for invasive meningococcal disease in southern Queensland, 2000-2001*. Intern Med J, 2004. **34**(8): p. 464-8.
122. Murray, R.L., J. Britton, and J. Leonardi-Bee, *Second hand smoke exposure and the risk of invasive meningococcal disease in children: systematic review and meta-analysis*. BMC Public Health, 2012. **12**: p. 1062.
123. Pollard, A.J., *Meningokokkeninfektionen*, in *Harrisons Innere Medizin* 2012. p. 1298-1306.
124. Pace, D. and A.J. Pollard, *Meningococcal disease: clinical presentation and sequelae*. Vaccine, 2012. **30 Suppl 2**: p. B3-9.
125. Horino, T., et al., *Meningococemia without meningitis in Japan*. Intern Med, 2008. **47**(17): p. 1543-7.
126. Ragunathan, L., et al., *Clinical features, laboratory findings and management of meningococcal meningitis in England and Wales: report of a 1997 survey. Meningococcal meningitis: 1997 survey report*. J Infect, 2000. **40**(1): p. 74-9.
127. Dass Hazarika, R., et al., *Invasive meningococcal infection: analysis of 110 cases from a tertiary care centre in North East India*. Indian J Pediatr, 2013. **80**(5): p. 359-64.
128. Thompson, M.J., et al., *Clinical recognition of meningococcal disease in children and adolescents*. Lancet, 2006. **367**(9508): p. 397-403.
129. Sabatini, C., et al., *Clinical presentation of meningococcal disease in childhood*. J Prev Med Hyg, 2012. **53**(2): p. 116-9.
130. Mandl, K.D., A.M. Stack, and G.R. Fleisher, *Incidence of bacteremia in infants and children with fever and petechiae*. J Pediatr, 1997. **131**(3): p. 398-404.
131. Sabra, A. and J. Benger, *Meningococcal disease in children: a clinical review*. Turk J Pediatr, 2011. **53**(5): p. 477-88.
132. Winstead, J.M., et al., *Meningococcal pneumonia: characterization and review of cases seen over the past 25 years*. Clin Infect Dis, 2000. **30**(1): p. 87-94.
133. Theulin, A., et al., *Chronic meningococcaemia and immunoglobulin A deficiency*. J Med Microbiol, 2010. **59**(Pt 11): p. 1375-8.

134. Harwood, C.A., et al., *Chronic meningococcaemia: a forgotten meningococcal disease*. Br J Dermatol, 2005. **153**(3): p. 669-71.
135. Martinon-Torres, F., *Deciphering the Burden of Meningococcal Disease: Conventional and Under-recognized Elements*. J Adolesc Health, 2016. **59**(2 Suppl): p. S12-20.
136. Norbury, C. and P. Nurse, *Animal cell cycles and their control*. Annu Rev Biochem, 1992. **61**: p. 441-70.
137. Sherr, C.J., *The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited*. Cancer Res, 2000. **60**(14): p. 3689-95.
138. Heinrich, P.M., M. Graeve, L., *Zellzyklus - Koordination der Zellteilung*, in *Biochemie und Pathobiochemie*, Löffler/Petrides, Editor 2014. p. 535-544.
139. Zetterberg, A., O. Larsson, and K.G. Wiman, *What is the restriction point?* Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(6): p. 835-42.
140. Sherr, C.J., D. Beach, and G.I. Shapiro, *Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy*. Cancer Discov, 2016. **6**(4): p. 353-67.
141. Musacchio, A., *The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics*. Curr Biol, 2015. **25**(20): p. R1002-18.
142. Hartwell, L.H., J. Culotti, and B. Reid, *Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **66**(2): p. 352-9.
143. Russell, P. and P. Nurse, *Schizosaccharomyces pombe and Saccharomyces cerevisiae: a look at yeasts divided*. Cell, 1986. **45**(6): p. 781-2.
144. Lee, M.G. and P. Nurse, *Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2*. Nature, 1987. **327**(6117): p. 31-5.
145. Evans, T., et al., *Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division*. Cell, 1983. **33**(2): p. 389-96.
146. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Mammalian cyclin-dependent kinases*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(11): p. 630-41.
147. Malumbres, M., *Cyclin-dependent kinases*. Genome Biol, 2014. **15**(6): p. 122.
148. Lim, S. and P. Kaldis, *Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation*. Development, 2013. **140**(15): p. 3079-93.
149. Hwang, H.C. and B.E. Clurman, *Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2776-86.
150. Matsushime, H., et al., *Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34^{PSK}-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins*. Cell, 1992. **71**(2): p. 323-34.
151. Meyerson, M. and E. Harlow, *Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(3): p. 2077-86.
152. Bracken, A.P., et al., *E2F target genes: unraveling the biology*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(8): p. 409-17.
153. Narasimha, A.M., et al., *Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation*. Elife, 2014. **3**.

154. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. *Cell*, 1997. **88**(5): p. 593-602.
155. Tarapore, P., M. Okuda, and K. Fukasawa, *A mammalian in vitro centriole duplication system: evidence for involvement of CDK2/cyclin E and nucleophosmin/B23 in centrosome duplication*. *Cell Cycle*, 2002. **1**(1): p. 75-81.
156. Ma, T., et al., *Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription*. *Genes Dev*, 2000. **14**(18): p. 2298-313.
157. Tsang, W.Y., et al., *CP110 cooperates with two calcium-binding proteins to regulate cytokinesis and genome stability*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(8): p. 3423-34.
158. Woo, R.A. and R.Y. Poon, *Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells*. *Cell Cycle*, 2003. **2**(4): p. 316-24.
159. Chen, Y.J., et al., *A conserved phosphorylation site within the forkhead domain of FoxM1B is required for its activation by cyclin-CDK1*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(44): p. 30695-707.
160. Malumbres, M., *Physiological relevance of cell cycle kinases*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(3): p. 973-1007.
161. Perry, J.A. and S. Kornbluth, *Cdc25 and Wee1: analogous opposites?* *Cell Div*, 2007. **2**: p. 12.
162. Hoffmann, I., et al., *Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis*. *EMBO J*, 1993. **12**(1): p. 53-63.
163. Machado, E., M. Eguren, and M. Malumbres, *The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions*. *Biochem Soc Trans*, 2010. **38**(Pt 1): p. 65-71.
164. Wurzenberger, C. and D.W. Gerlich, *Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(8): p. 469-82.
165. Karimian, A., Y. Ahmadi, and B. Yousefi, *Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage*. *DNA Repair (Amst)*, 2016. **42**: p. 63-71.
166. Afshari, C.A., et al., *A role for a p21-E2F interaction during senescence arrest of normal human fibroblasts*. *Cell Growth Differ*, 1996. **7**(8): p. 979-88.
167. Jung, Y.S., Y. Qian, and X. Chen, *Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity*. *Cell Signal*, 2010. **22**(7): p. 1003-12.
168. Blackford, A.N. and S.P. Jackson, *ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response*. *Mol Cell*, 2017. **66**(6): p. 801-817.
169. Abbas, T. and A. Dutta, *p21 in cancer: intricate networks and multiple activities*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(6): p. 400-14.

-
170. Cmielova, J. and M. Rezacova, *p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization*. J Cell Biochem, 2011. **112**(12): p. 3502-6.
 171. Hnit, S.S., et al., *p27(Kip1) signaling: Transcriptional and post-translational regulation*. Int J Biochem Cell Biol, 2015. **68**: p. 9-14.
 172. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(3): p. 153-66.
 173. Bagga, S. and M.J. Bouchard, *Cell cycle regulation during viral infection*. Methods Mol Biol, 2014. **1170**: p. 165-227.
 174. Oswald, E., et al., *Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression*. Curr Opin Microbiol, 2005. **8**(1): p. 83-91.
 175. Kuzmenok, O.I., et al., *Retardation of cell cycle progression of macrophages from G1 to S phase by ICAM-L from Leishmania*. Int J Parasitol, 2005. **35**(14): p. 1547-55.
 176. Brunet, J., et al., *Toxoplasma gondii exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation*. Cell Microbiol, 2008. **10**(4): p. 908-20.
 177. Kim, M., et al., *Bacterial interactions with the host epithelium*. Cell Host Microbe, 2010. **8**(1): p. 20-35.
 178. Nougayrede, J.P., et al., *Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle*. Trends Microbiol, 2005. **13**(3): p. 103-10.
 179. Bezine, E., J. Vignard, and G. Mirey, *The cytolethal distending toxin effects on Mammalian cells: a DNA damage perspective*. Cells, 2014. **3**(2): p. 592-615.
 180. Lara-Tejero, M. and J.E. Galan, *A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein*. Science, 2000. **290**(5490): p. 354-7.
 181. Elwell, C.A. and L.A. Dreyfus, *DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest*. Mol Microbiol, 2000. **37**(4): p. 952-63.
 182. Frisan, T., et al., *The Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA*. Cell Microbiol, 2003. **5**(10): p. 695-707.
 183. Taieb, F., et al., *Escherichia coli cyclomodulin Cif induces G2 arrest of the host cell cycle without activation of the DNA-damage checkpoint-signalling pathway*. Cell Microbiol, 2006. **8**(12): p. 1910-21.
 184. Cortes-Bratti, X., T. Frisan, and M. Thelestam, *The cytolethal distending toxins induce DNA damage and cell cycle arrest*. Toxicon, 2001. **39**(11): p. 1729-36.
 185. Cortes-Bratti, X., et al., *The Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest and apoptosis via the DNA damage checkpoint pathways*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 5296-302.
 186. Varon, C., et al., *Helicobacter pullorum cytolethal distending toxin targets vinculin and cortactin and triggers formation of lamellipodia in intestinal epithelial cells*. J Infect Dis, 2014. **209**(4): p. 588-99.
 187. Nougayrede, J.P., et al., *Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells*. Science, 2006. **313**(5788): p. 848-51.
-

188. Secher, T., et al., *Escherichia coli* producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77157.
189. Arthur, J.C., et al., *Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota*. Science, 2012. **338**(6103): p. 120-3.
190. Cuevas-Ramos, G., et al., *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(25): p. 11537-42.
191. Taieb, F., J.P. Nougayrede, and E. Oswald, *Cycle inhibiting factors (cifs): cyclomodulins that usurp the ubiquitin-dependent degradation pathway of host cells*. Toxins (Basel), 2011. **3**(4): p. 356-68.
192. Jubelin, G., et al., *Cycle inhibiting factors (CIFs) are a growing family of functional cyclomodulins present in invertebrate and mammal bacterial pathogens*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4855.
193. Yao, Q., et al., *A bacterial type III effector family uses the papain-like hydrolytic activity to arrest the host cell cycle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3716-21.
194. Jubelin, G., et al., *Pathogenic bacteria target NEDD8-conjugated cullins to hijack host-cell signaling pathways*. PLoS Pathog, 2010. **6**(9): p. e1001128.
195. Samba-Louaka, A., et al., *Bacterial cyclomodulin Cif blocks the host cell cycle by stabilizing the cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27*. Cell Microbiol, 2008. **10**(12): p. 2496-508.
196. Marches, O., et al., *Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. Mol Microbiol, 2003. **50**(5): p. 1553-67.
197. Chavez, C.V., et al., *The cyclomodulin Cif of Photorhabdus luminescens inhibits insect cell proliferation and triggers host cell death by apoptosis*. Microbes Infect, 2010. **12**(14-15): p. 1208-18.
198. George, K.M., et al., *Mycolactone: a polyketide toxin from Mycobacterium ulcerans required for virulence*. Science, 1999. **283**(5403): p. 854-7.
199. George, K.M., et al., *A Mycobacterium ulcerans toxin, mycolactone, causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells*. Infect Immun, 2000. **68**(2): p. 877-83.
200. George, K.M., et al., *Partial purification and characterization of biological effects of a lipid toxin produced by Mycobacterium ulcerans*. Infect Immun, 1998. **66**(2): p. 587-93.
201. Iwai, H., et al., *A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling*. Cell, 2007. **130**(4): p. 611-23.
202. Jones, A., A.B. Jonsson, and H. Aro, *Neisseria gonorrhoeae* infection causes a G1 arrest in human epithelial cells. FASEB J, 2007. **21**(2): p. 345-55.
203. Vielfort, K., et al., *Neisseria gonorrhoeae* infection causes DNA damage and affects the expression of p21, p27 and p53 in non-tumor epithelial cells. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 1): p. 339-47.

204. Oosthuysen, W.F., et al., *Neisseria meningitidis* causes cell cycle arrest of human brain microvascular endothelial cells at S phase via p21 and cyclin G2. *Cell Microbiol*, 2016. **18**(1): p. 46-65.
205. Leitao, E., et al., *Listeria monocytogenes* induces host DNA damage and delays the host cell cycle to promote infection. *Cell Cycle*, 2014. **13**(6): p. 928-40.
206. Alekseeva, L., et al., *Staphylococcus aureus*-induced G2/M phase transition delay in host epithelial cells increases bacterial infective efficiency. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e63279.
207. Deplanche, M., et al., *Phenol-soluble modulins alpha* induces G2/M phase transition delay in eukaryotic HeLa cells. *FASEB J*, 2015. **29**(5): p. 1950-9.
208. Hodille, E., et al., *Staphylococcal Enterotoxin O Exhibits Cell Cycle Modulating Activity*. *Front Microbiol*, 2016. **7**: p. 441.
209. 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 Lett*, 2016.
210. Yazdankhah, S.P. and D.A. Caugant, *Neisseria meningitidis: an overview of the carriage state*. *J Med Microbiol*, 2004. **53**(Pt 9): p. 821-32.
211. Achtman, M., et al., *Purification and characterization of eight class 5 outer membrane protein variants from a clone of Neisseria meningitidis serogroup A*. *J Exp Med*, 1988. **168**(2): p. 507-25.
212. Virji, M., J.E. Heckels, and P.J. Watt, *Monoclonal antibodies to gonococcal pili: studies on antigenic determinants on pili from variants of strain P9*. *J Gen Microbiol*, 1983. **129**(6): p. 1965-73.
213. Rangan, S.R., *A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma*. *Cancer*, 1972. **29**(1): p. 117-21.
214. Peterson, W.D., Jr., C.S. Stulberg, and W.F. Simpson, *A permanent heteroploid human cell line with type B glucose-6-phosphate dehydrogenase*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1971. **136**(4): p. 1187-91.
215. Tsao, S.W., et al., *Establishment of two immortalized nasopharyngeal epithelial cell lines using SV40 large T and HPV16E6/E7 viral oncogenes*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1590**(1-3): p. 150-8.
216. Li, H.M., et al., *Molecular and cytogenetic changes involved in the immortalization of nasopharyngeal epithelial cells by telomerase*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(7): p. 1567-76.
217. McGuinness, B.T., et al., *Point mutation in meningococcal por A gene associated with increased endemic disease*. *Lancet*, 1991. **337**(8740): p. 514-7.
218. Nassif, X., et al., *Antigenic variation of pilin regulates adhesion of Neisseria meningitidis to human epithelial cells*. *Mol Microbiol*, 1993. **8**(4): p. 719-25.
219. Rusniok, C., et al., *NeMeSys: a biological resource for narrowing the gap between sequence and function in the human pathogen Neisseria meningitidis*. *Genome Biol*, 2009. **10**(10): p. R110.

220. Simonis, A., et al., *Differential activation of acid sphingomyelinase and ceramide release determines invasiveness of Neisseria meningitidis into brain endothelial cells*. PLoS Pathog, 2014. **10**(6): p. e1004160.
221. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J Mol Biol, 1986. **189**(1): p. 113-30.
222. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3389-402.
223. Tevlik Dorak, M., *Real-time PCR*. Vol. 1. 2006. ISBN: 041537734X.
224. de Vries, F.P., et al., *Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by Neisseria meningitidis is controlled by phase variation of multiple surface antigens*. Infect Immun, 1996. **64**(8): p. 2998-3006.
225. Hammerschmidt, S., et al., *Modulation of cell surface sialic acid expression in Neisseria meningitidis via a transposable genetic element*. EMBO J, 1996. **15**(1): p. 192-8.
226. Jennings, M.P., et al., *Identification of a novel gene involved in pilin glycosylation in Neisseria meningitidis*. Mol Microbiol, 1998. **29**(4): p. 975-84.
227. Merz, A.J. and M. So, *Attachment of piliated, Opa- and Opc- gonococci and meningococci to epithelial cells elicits cortical actin rearrangements and clustering of tyrosine-phosphorylated proteins*. Infect Immun, 1997. **65**(10): p. 4341-9.
228. Lappann, M., et al., *Impact of moderate temperature changes on Neisseria meningitidis adhesive phenotypes and proteome*. Infect Immun, 2016.
229. Engman, J., et al., *Neisseria meningitidis Polynucleotide Phosphorylase Affects Aggregation, Adhesion, and Virulence*. Infect Immun, 2016. **84**(5): p. 1501-13.
230. Eriksson, J., O.S. Eriksson, and A.B. Jonsson, *Loss of meningococcal PilU delays microcolony formation and attenuates virulence in vivo*. Infect Immun, 2012. **80**(7): p. 2538-47.
231. Kuwae, A., et al., *NafA negatively controls Neisseria meningitidis piliation*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21749.
232. Liu, Y., et al., *Dynamic niche-specific adaptations in Neisseria meningitidis during infection*. Microbes Infect, 2016. **18**(2): p. 109-17.
233. Bartley, S.N., et al., *Attachment and invasion of Neisseria meningitidis to host cells is related to surface hydrophobicity, bacterial cell size and capsule*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55798.
234. Green, L.R., et al., *Cooperative role for tetraspanins in adhesin-mediated attachment of bacterial species to human epithelial cells*. Infect Immun, 2011. **79**(6): p. 2241-9.
235. Plant, L., et al., *Lipooligosaccharide structure contributes to multiple steps in the virulence of Neisseria meningitidis*. Infect Immun, 2006. **74**(2): p. 1360-7.

-
236. Gorter, A.D., et al., *Involvement of lipooligosaccharides of Haemophilus influenzae and Neisseria meningitidis in defensin-enhanced bacterial adherence to epithelial cells*. Microb Pathog, 2003. **34**(3): p. 121-30.
237. Takahashi, H., et al., *Modification of lipooligosaccharide with phosphoethanolamine by LptA in Neisseria meningitidis enhances meningococcal adhesion to human endothelial and epithelial cells*. Infect Immun, 2008. **76**(12): p. 5777-89.
238. Virji, M., et al., *Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic neisseriae*. Mol Microbiol, 1996. **22**(5): p. 941-50.
239. Deghmane, A.E., et al., *Intimate adhesion of Neisseria meningitidis to human epithelial cells is under the control of the crgA gene, a novel LysR-type transcriptional regulator*. EMBO J, 2000. **19**(5): p. 1068-78.
240. Marceau, M., J.L. Beretti, and X. Nassif, *High adhesiveness of encapsulated Neisseria meningitidis to epithelial cells is associated with the formation of bundles of pili*. Mol Microbiol, 1995. **17**(5): p. 855-63.
241. Rameix-Welti, M.A., et al., *Influenza A virus neuraminidase enhances meningococcal adhesion to epithelial cells through interaction with sialic acid-containing meningococcal capsules*. Infect Immun, 2009. **77**(9): p. 3588-95.
242. Albiger, B., L. Johansson, and A.B. Jonsson, *Lipooligosaccharide-deficient Neisseria meningitidis shows altered pilus-associated characteristics*. Infect Immun, 2003. **71**(1): p. 155-62.
243. Spinosa, M.R., et al., *The Neisseria meningitidis capsule is important for intracellular survival in human cells*. Infect Immun, 2007. **75**(7): p. 3594-603.
244. Sarkari, J., et al., *Variable expression of the Opc outer membrane protein in Neisseria meningitidis is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine*. Mol Microbiol, 1994. **13**(2): p. 207-17.
245. Neyen, C. and B. Lemaitre, *Sensing Gram-negative bacteria: a phylogenetic perspective*. Curr Opin Immunol, 2016. **38**: p. 8-17.
246. Kuespert, K., A. Roth, and C.R. Hauck, *Neisseria meningitidis has two independent modes of recognizing its human receptor CEACAM1*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e14609.
247. Kupsch, E.M., et al., *Variable opacity (Opa) outer membrane proteins account for the cell tropisms displayed by Neisseria gonorrhoeae for human leukocytes and epithelial cells*. EMBO J, 1993. **12**(2): p. 641-50.
248. Peterson, W.D., Jr., et al., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzymes in human cell cultures determined by sucrose-agar gel and cellulose acetate zymograms*. Proc Soc Exp Biol Med, 1968. **128**(3): p. 772-6.
249. Horton, R.E., et al., *IgA1 antibodies specific for outer membrane protein PorA modulate the interaction between Neisseria meningitidis and the epithelium*. Microb Pathog, 2009. **46**(5): p. 253-60.
250. Reimer, A., et al., *Inhibitors of macrophage infectivity potentiator-like PPLases affect neisserial and chlamydial pathogenicity*. Int J Antimicrob Agents, 2016.
-

-
251. Wormann, M.E., et al., *Neisseria cinerea* isolates can adhere to human epithelial cells by type IV pilus-independent mechanisms. *Microbiology*, 2016. **162**(3): p. 487-502.
252. Liu, X., et al., *Human airway epithelial cell responses to Neisseria lactamica and purified porin via Toll-like receptor 2-dependent signaling*. *Infect Immun*, 2010. **78**(12): p. 5314-23.
253. Quattroni, P., et al., *Galectin-3 binds Neisseria meningitidis and increases interaction with phagocytic cells*. *Cell Microbiol*, 2012. **14**(11): p. 1657-75.
254. Tezera, L.B., et al., *Neisseria lactamica attenuates TLR-1/2-induced cytokine responses in nasopharyngeal epithelial cells using PPAR-gamma*. *Cell Microbiol*, 2011. **13**(4): p. 554-68.
255. Bradley, C.J., et al., *Critical determinants of the interactions of capsule-expressing Neisseria meningitidis with host cells: the role of receptor density in increased cellular targeting via the outer membrane Opa proteins*. *Cell Microbiol*, 2005. **7**(10): p. 1490-503.
256. Dogan, S., et al., *Pneumolysin-induced CXCL8 production by nasopharyngeal epithelial cells is dependent on calcium flux and MAPK activation via Toll-like receptor 4*. *Microbes Infect*, 2011. **13**(1): p. 65-75.
257. Matijevic, T., M. Marjanovic, and J. Pavelic, *Functionally active toll-like receptor 3 on human primary and metastatic cancer cells*. *Scand J Immunol*, 2009. **70**(1): p. 18-24.
258. Matijevic, T. and J. Pavelic, *The dual role of TLR3 in metastatic cell line*. *Clin Exp Metastasis*, 2011. **28**(7): p. 701-12.
259. Rydberg, C., et al., *Toll-like receptor agonists induce inflammation and cell death in a model of head and neck squamous cell carcinomas*. *Immunology*, 2009. **128**(1 Suppl): p. e600-11.
260. Tengroth, L., et al., *Functional effects of Toll-like receptor (TLR)3, 7, 9, RIG-I and MDA-5 stimulation in nasal epithelial cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e98239.
261. Fogh, J., W.C. Wright, and J.D. Loveless, *Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors*. *J Natl Cancer Inst*, 1977. **58**(2): p. 209-14.
262. Georg, M., et al., *Meningococcal resistance to antimicrobial peptides is mediated by bacterial adhesion and host cell RhoA and Cdc42 signalling*. *Cell Microbiol*, 2013. **15**(11): p. 1938-54.
263. Jones, A., et al., *Endotoxin, capsule, and bacterial attachment contribute to Neisseria meningitidis resistance to the human antimicrobial peptide LL-37*. *J Bacteriol*, 2009. **191**(12): p. 3861-8.
264. Joseph, B., et al., *Comparative genome biology of a serogroup B carriage and disease strain supports a polygenic nature of meningococcal virulence*. *J Bacteriol*, 2010. **192**(20): p. 5363-77.
265. Miller, F., et al., *The hypervariable region of meningococcal major pilin PilE controls the host cell response via antigenic variation*. *MBio*, 2014. **5**(1): p. e01024-13.
266. Sjolinder, M., et al., *Meningococcal outer membrane protein NhhA triggers apoptosis in macrophages*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e29586.
-

-
267. Soderholm, N., et al., *Pathogenic Neisseria hitchhike on the uropod of human neutrophils*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24353.
268. Kallstrom, H., et al., *Attachment of Neisseria gonorrhoeae to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence*. Cell Microbiol, 2001. **3**(3): p. 133-43.
269. Cameron, S., et al., *Focal overexpression of CEACAM6 contributes to enhanced tumourigenesis in head and neck cancer via suppression of apoptosis*. Mol Cancer, 2012. **11**: p. 74.
270. Zhang, H., et al., *Sequential cytogenetic and molecular cytogenetic characterization of an SV40T-immortalized nasopharyngeal cell line transformed by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 gene*. Cancer Genet Cytogenet, 2004. **150**(2): p. 144-52.
271. Lo, A.K., et al., *Alterations of biologic properties and gene expression in nasopharyngeal epithelial cells by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1*. Lab Invest, 2003. **83**(5): p. 697-709.
272. Li, H.M., et al., *Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) upregulates Id1 expression in nasopharyngeal epithelial cells*. Oncogene, 2004. **23**(25): p. 4488-94.
273. Lo, A.K., et al., *Phenotypic alterations induced by the Hong Kong-prevalent Epstein-Barr virus-encoded LMP1 variant (2117-LMP1) in nasopharyngeal epithelial cells*. Int J Cancer, 2004. **109**(6): p. 919-25.
274. Wong, H.L., et al., *Stable expression of EBERs in immortalized nasopharyngeal epithelial cells confers resistance to apoptotic stress*. Mol Carcinog, 2005. **44**(2): p. 92-101.
275. Zhang, Q., et al., *Proteome analysis of the transformation potential of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 in nasopharyngeal epithelial cells NP69*. Mol Cell Biochem, 2008. **314**(1-2): p. 73-83.
276. Jiang, R., et al., *Synergism of BARP1 with Ras induces malignant transformation in primary primate epithelial cells and human nasopharyngeal epithelial cells*. Neoplasia, 2009. **11**(9): p. 964-73.
277. Virji, M., et al., *The role of pili in the interactions of pathogenic Neisseria with cultured human endothelial cells*. Mol Microbiol, 1991. **5**(8): p. 1831-41.
278. Dunn, K.L., M. Virji, and E.R. Moxon, *Investigations into the molecular basis of meningococcal toxicity for human endothelial and epithelial cells: the synergistic effect of LPS and pili*. Microb Pathog, 1995. **18**(2): p. 81-96.
279. Taha, M.K., D. Giorgini, and X. Nassif, *The pilA regulatory gene modulates the pilus-mediated adhesion of Neisseria meningitidis by controlling the transcription of pilC1*. Mol Microbiol, 1996. **19**(5): p. 1073-84.
280. Gault, J., et al., *Neisseria meningitidis Type IV Pili Composed of Sequence Invariable Pilins Are Masked by Multisite Glycosylation*. PLoS Pathog, 2015. **11**(9): p. e1005162.
281. Taha, M.K., *Neisseria meningitidis induces the expression of the TNF-alpha gene in endothelial cells*. Cytokine, 2000. **12**(1): p. 21-5.
-

-
282. Takahashi, H., K.S. Kim, and H. Watanabe, *Differential in vitro infectious abilities of two common Japan-specific sequence-type (ST) clones of disease-associated ST-2032 and carrier-associated ST-2046 Neisseria meningitidis strains in human endothelial and epithelial cell lines*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008. **52**(1): p. 36-46.
283. Craven, D.E., et al., *Adherence of isolates of Neisseria meningitidis from patients and carriers to human buccal epithelial cells*. J Infect Dis, 1980. **142**(4): p. 556-68.
284. Greenblatt, J.J., et al., *Morphological differences in Neisseria meningitidis pili*. Infect Immun, 1988. **56**(9): p. 2356-62.
285. Schwerk, C., et al., *Polar invasion and translocation of Neisseria meningitidis and Streptococcus suis in a novel human model of the blood-cerebrospinal fluid barrier*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30069.
286. Unkmeir, A., et al., *Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of Neisseria meningitidis that determine meningococcal interaction with human dendritic cells*. Infect Immun, 2002. **70**(5): p. 2454-62.
287. Virji, M., et al., *Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides*. Mol Microbiol, 1995. **18**(4): p. 741-54.
288. McNeil, G., M. Virji, and E.R. Moxon, *Interactions of Neisseria meningitidis with human monocytes*. Microb Pathog, 1994. **16**(2): p. 153-63.
289. Borkowski, J., et al., *Neisseria meningitidis elicits a pro-inflammatory response involving I κ B ζ in a human blood-cerebrospinal fluid barrier model*. J Neuroinflammation, 2014. **11**: p. 163.
290. Jayat, C. and M.H. Ratinaud, *Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications*. Biol Cell, 1993. **78**(1-2): p. 15-25.
291. Gray, J.W., et al., *Cell cycle analysis using flow cytometry*. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1986. **49**(2): p. 237-55.
292. Salic, A. and T.J. Mitchison, *A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(7): p. 2415-20.
293. Buck, S.B., et al., *Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies*. Biotechniques, 2008. **44**(7): p. 927-9.
294. Cavanagh, B.L., et al., *Thymidine analogues for tracking DNA synthesis*. Molecules, 2011. **16**(9): p. 7980-93.
295. Seo, S., et al., *Phosphorylated 5-ethynyl-2'-deoxyuridine for advanced DNA labeling*. Org Biomol Chem, 2015. **13**(15): p. 4589-95.
296. Zhao, H., et al., *DNA damage signaling, impairment of cell cycle progression, and apoptosis triggered by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporated into DNA*. Cytometry A, 2013. **83**(11): p. 979-88.
297. Ross, H.H., et al., *Ethynyldeoxyuridine (EdU) suppresses in vitro population expansion and in vivo tumor progression of human glioblastoma cells*. J Neurooncol, 2011. **105**(3): p. 485-98.
-

-
298. Johnson, W.M. and H. Lior, *A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by Campylobacter spp.* Microb Pathog, 1988. **4**(2): p. 115-26.
299. Preston, A., et al., *The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria.* Crit Rev Microbiol, 1996. **22**(3): p. 139-80.
300. Koturbash, I., et al., *Heat-killed bacteria induce genome instability in mouse small intestine, liver and spleen tissues.* Cell Cycle, 2009. **8**(12): p. 1935-9.
301. Taylor, C.M. and I.S. Roberts, *Capsular polysaccharides and their role in virulence.* Contrib Microbiol, 2005. **12**: p. 55-66.
302. Chang, Y.J., et al., *Mechanisms for Helicobacter pylori CagA-induced cyclin D1 expression that affect cell cycle.* Cell Microbiol, 2006. **8**(11): p. 1740-52.
303. Inaba, H., et al., *Porphyromonas gingivalis invades human trophoblasts and inhibits proliferation by inducing G1 arrest and apoptosis.* Cell Microbiol, 2009. **11**(10): p. 1517-32.
304. Nakayama, K.I. and K. Nakayama, *Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 369-81.
305. Diehl, J.A., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization.* Genes Dev, 1998. **12**(22): p. 3499-511.
306. Shirin, H., et al., *Helicobacter pylori inhibits the G1 to S transition in AGS gastric epithelial cells.* Cancer Res, 1999. **59**(10): p. 2277-81.
307. Rodriguez-Vilarrupla, A., et al., *Identification of the nuclear localization signal of p21(cip1) and consequences of its mutation on cell proliferation.* FEBS Lett, 2002. **531**(2): p. 319-23.
308. Ishida, N., et al., *Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export.* J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 14355-8.
309. Caballero, O.L., et al., *Interaction and colocalization of PGP9.5 with JAB1 and p27(Kip1).* Oncogene, 2002. **21**(19): p. 3003-10.
310. Sato, T., et al., *p53-independent expression of p21(CIP1/WAF1) in plasmacytic cells during G(2) cell cycle arrest induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin.* Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 528-34.
311. Pischon, N., et al., *Effects of Porphyromonas gingivalis on cell cycle progression and apoptosis of primary human chondrocytes.* Ann Rheum Dis, 2009. **68**(12): p. 1902-7.
312. Inaba, H., et al., *Identification of signaling pathways mediating cell cycle arrest and apoptosis induced by Porphyromonas gingivalis in human trophoblasts.* Infect Immun, 2012. **80**(8): p. 2847-57.
313. Li, L.N., et al., *Extracellular matrix-regulated p53 expression and nuclear localization in cultured Detroit 562 cells derived from pharyngeal carcinoma.* Arch Histol Cytol, 2003. **66**(5): p. 419-28.
314. Zhou, G., et al., *Gain-of-function mutant p53 promotes cell growth and cancer cell metabolism via inhibition of AMPK activation.* Mol Cell, 2014. **54**(6): p. 960-74.
-

315. Bertoli, C., J.M. Skotheim, and R.A. de Bruin, *Control of cell cycle transcription during G1 and S phases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(8): p. 518-28.

9. Abkürzungsverzeichnis

a. dest.	Aqua destillata
APC/C	Anaphase promoting complex/Cyclosom
App	Adhesion and penetration protein
ATM	ataxia-telangiectasia mutated
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
bp	Basenpaare
BrdU	5-bromo-2'-Deoxyruidin
CBP	CREB-binding protein
cc	Klonaler Komplex
Cdc14	Cell division cycle 14
Cdc2	Cell division cycle 2
Cdc25A	cell division cycle 25 homolog A
Cdc6	Cell division cycle 6
CDK	Cyclin-dependent kinase
cDNA	Complementary DNA
CDT	Cytolethal distending toxin
CEACAM	Carcinoembrionic antigen-related cell adhesion molecule
CHK 1	Checkpoint kinase 1
CHK 2	Checkpoint kinase 2
CIF	cycle inhibiting factor
CKI	CDK-Inhibitoren
<i>cnl</i>	Kapsel-null-Locus
CP110	Centriolar coiled-coil protein of 110 kDa
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-ethynyl-2'-Deoxyuridin
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
FBS	fetal bovine serum
fHbp	Factor H binding protein
FoxM2	Forkhead box protein M1
G ₁ -Phase	Gap-1-Phase
G ₂ -Phase	Gap-2-Phase
gDNA	Genomische DNA
HDAC	Histon-Deacetylase
HrpA-HrpB	hemagglutinin/hemolysin-related proteins
HSPG	Heparansulfat Proteoglykan

hTert	humane Telomerase reverse Transkriptase
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IHM	Institut für Hygiene und Mikrobiologie
IME	Invasive Meningokokkenerkrankung
INK4a	INHibitors of CDK4
IpaB	Invasion protein antigen B
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kip	kinase inhibitory protein
K-SFM	Keratinocyte serum free medium
LbpA/B	Lactoferrin binding protein A/B
LOS	Lipooligosaccharid
Mad2L2	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2B
MAP	Mitogen activated protein
MCM2-7	mini-chromosome maintenance proteins 2-7
MLST	Multilocus sequence typing
MOI	Multiplicity of infection
MPF	Mitosis promoting factor
M-Phase	Mitose-Phase
Myt1	myelin transcription factor 1
NadA	Neisseria adhesin A
NalP	Neisseria autotransporter Lipoprotein
NhhA	<i>Neisseria hia/hsf</i> homologue A
NorB	Nitric oxide reductase B
NPAT	nuclear protein of the ATM locus
NspA	Neisserial Surface Protein A
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
Opa	Opacity protein a
Opc	Opacity protein c
ORF	Open reading frame (offenes Leseraster)
PAFr	Platelet activating Factor Receptor
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Propidiumiodid
PLK-1	polo-like kinase 1
PSM	Phenol-soluble Modulin
qRT-PCR	Quantitative real time PCR
RAS	Rat sarcoma-Protein
RB	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROX	carboxy-X-rhodamine
RPA	Replication protein A
SCF	Skp, Cullin, F-box containing complex
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumlaurylsulfat
SEIO	staphylococcal enterotoxin-like toxin O
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure siRNA

Smad3	Mothers against decapentaplegic homolog 3
S-Phase	Synthese-Phase
ST	Sequenztyp
STIKO	Ständige Impfkommission
TBS	Tris buffered saline
TC	Tissue culture
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TspA	T-cell stimulating protein A
WAF1/Cip1	wild-type p53 activated factor/CDK interacting protein 1

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 02.11.1988
Geburtsort: Wiesbaden Dotzheim
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

August 1999 - Juni 2008: Gymnasium Gutenbergschule Wiesbaden
Abschluss: Abitur

Zivildienst:

Juli 2008 - März 2009: Pflegehilfe im St. Josefs-Hospital Wiesbaden
(Medizinische Klinik II - Gastroenterologie)

Hochschulbildung:

April 2009 bis Juni 2016: Studium der Humanmedizin an der Julius-
Maximilians-Universität Würzburg
März 2011: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2014: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juni 2016: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
28. Juni 2016: Erhalt der Ärztlichen Approbation

Beruflicher Werdegang:

Seit März 2017: Assistenzarzt an der Klinik für Innere Medizin I
(Kardiologie und konservative Intensivmedizin) der
Helios Dr. Horst Schmidt Kliniken Wiesbaden

Publikationen im Rahmen der Promotionsarbeit:

30. September 2015: Vortrag auf der 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) in Münster
18. Juli 2016: Publikation: von Papen M, Oosthuysen WF, Becam J, Claus H, Schubert-Unkmeir A. 2016. Disease and carrier isolates of *Neisseria meningitidis* cause G₁ cell cycle arrest in human epithelial cells. Infect Immun 84:2758–2770. doi:10.1128/IAI.00296-16
05. September 2016: Posterpräsentation auf der International Pathogenic Neisseriae Conference (IPNC) in Manchester (Präsentation durch Prof. Dr. med. A. Schubert-Unkmeir)

Wiesbaden, den 08.09.2018

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir für die exzellente Betreuung bei dieser Promotionsarbeit sowie für die hervorragende Organisation des Projektes ganz besonders herzlich bedanken. Der häufige und konstruktive Austausch über Ergebnisse und weitere Planung sowie die wirklich außergewöhnliche Förderung, die ich als Doktorand erhalten habe, haben mich sehr motiviert, persönlich weitergebracht und maßgeblich dazu beigetragen, dass mir die Zeit, in der ich Teil ihrer Arbeitsgruppe sein durfte, immer in bester Erinnerung bleiben wird.

Ebenfalls bedanke ich mich bei dem Direktor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, Prof. Dr. med. Matthias Frosch, dafür, dass ich meine Promotionsarbeit an seinem Institut durchführen und von dem von ihm geschaffenen hervorragenden Forschungsumfeld profitieren durfte.

Bei Priv.-Doz. Dr. Knut Ohlsen (Institut für Molekulare Infektionsbiologie, IMIB) bedanke ich mich sehr herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Dr. Wilhelm F. Oosthuisen möchte ich danken für die gute Einarbeitung in die Methoden zur Zellkultur und zur Zellzyklusanalyse.

Bei Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Heike Claus bedanke ich mich herzlich für die wertvolle Beratung, unter anderem bei der Auswahl der Trägerisolate. Des Weiteren danke ich Jérôme Becam für die Einarbeitung und Hilfe bei den molekularbiologischen Untersuchungen (PCR und Gensequenzierung) und für die konstruktive und zugleich lustige Zeit, die wir in und außerhalb des Labors verbracht haben. Auch möchte ich Sabrina Hebling und Julia Dick sehr herzlich danken für ihre Hilfsbereitschaft und die vielen wertvollen Tipps und Tricks, mit denen sie mir im Labor geholfen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner lieben Familie für den Rückhalt und die Unterstützung, die ich zu jeder Zeit von ihr erhalte. Ohne Euch hätte ich den akademischen Bildungsweg einschließlich meiner Promotion nicht beschreiten können.
