

Inaugural -Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
M. Sc. Rosanna Herold  
geboren in Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung: 23.09.2021

Manipulation von Wirtszellmechanismen während der Infektion durch Gram-positive  
und Gram-negative Erreger in einem humanen Modell der Blut-Liquor-Schranke

Gutachter: Prof. Dr. Michael Lanzer

Prof. Dr. Horst Schrotten

**Für meine Familie**

# Eidesstattliche Versicherung gemäß § 8 der Promotionsordnung für die Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät der Universität Heidelberg.

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema:

Manipulation von Wirtszellmechanismen während der Infektion durch Gram-positive und Gram-negative Erreger in einem humanen Modell der Blut-Liquor-Schranke

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich ~~wie folgt/~~ bislang nicht<sup>1</sup> an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

.....

Ort und Datum

Unterschrift

<sup>1</sup> Nicht Zutreffendes streichen. Bei Bejahung sind anzugeben: der Titel der andernorts vorgelegten Arbeit, die Hochschule, das Jahr der Vorlage und die Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung

# Inhalt

Zusammenfassung .....	1
Summary .....	2
1 Einleitung .....	3
1.1 Das zentrale Nervensystem .....	3
1.1.1 Die Blut-Hirn-Schranke .....	3
1.1.2 Die Blut-Liquor-Schranke .....	4
1.2 Infektionen des Zentralen Nervensystems .....	7
1.2.1 Bakterielle Meningitis .....	8
1.3 Pathogenese der Bakteriellen Meningitis .....	9
1.3.1 Adhäsion und Invasion bakterieller Erreger .....	10
1.3.2 Manipulation des Aktin-Zytoskeletts durch bakterielle Erreger .....	13
1.3.3 Manipulation von Signalwegen durch bakterielle Erreger .....	14
1.3.4 Intrazelluläre Multiplikation und Überleben der Erreger .....	18
1.3.5 Zielgenaktivierung und Entzündungsreaktion .....	18
1.4 Infektion der Blut-Liquor-Schranke durch verschiedene Erreger .....	19
1.4.1 <i>Neisseria meningitidis</i> .....	21
1.4.2 <i>Haemophilus Influenzae</i> .....	23
1.4.3 <i>Streptococcus suis</i> .....	25
1.5 Zielsetzung .....	30
2 Material .....	31
2.1 Laborgeräte .....	31
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	32

2.3	Bakterienstämme .....	34
2.4	Zelllinie.....	35
2.5	Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	35
2.6	Größenstandards und Ladepuffer.....	36
2.7	Antikörper.....	36
2.7.1	Primärantikörper.....	36
2.7.2	Sekundärantikörper und Fluoreszenzfarbstoffe .....	37
2.8	Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	37
2.9	Oligonukleotid Primer .....	40
2.9.1	Primer zur Bestimmung der Identität der Bakterienstämme .....	40
2.9.2	Primer für die quantitative real-time PCR .....	40
2.10	Kits.....	41
2.11	Software.....	41
3	Methoden .....	42
3.1	Bakterien.....	42
3.1.1	Kultivierung der Bakterien .....	42
3.1.2	Aufbewahrung in Dauerkulturen .....	44
3.1.3	Überprüfung der Identität der Bakterienstämme .....	44
3.2	HIBCPP-Zellen.....	46
3.2.1	Kultivierung der Zellen.....	46
3.2.2	Aufbewahrung in Dauerkulturen .....	47
3.2.3	Überprüfung der Barrierefunktion der HIBCPP-Zellen .....	47
3.2.4	Behandlung/ Stimulation der HIBCPP-Zellen.....	48

3.2.5	Infektion der HIBCPP-Zellen .....	48
3.2.6	Vitalitätsprüfung .....	49
3.3	Zell- und Molekularbiologische Methoden .....	50
3.3.1	Immunfluoreszenzfärbungen .....	50
3.3.2	Herstellung von Proteinlysaten.....	51
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	51
3.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblot .....	52
3.3.5	RNA Isolierung.....	53
3.3.1	cDNA Synthese.....	53
3.3.2	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion .....	54
3.3.3	Bestimmung der RNA integrity number zur Qualitätskontrolle .....	56
3.3.4	MACE Analyse (Externe Kollaboration).....	57
3.3.5	Statistische Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten: <i>Differentially Expressed Genes</i> und <i>Gene Ontology</i> .....	57
3.3.6	Phosphoproteomik Analyse.....	58
3.4	Statistik .....	61
4	Ergebnisse .....	62
4.1	Vergleich des Einflusses der Dynamin-vermittelten Endozytose bei verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Meningitiserregern .....	62
4.1.1	Der Dynamin Inhibitor Dynasore hat eine toxische Wirkung auf die HIBCPP-Zellen	62
4.1.2	Die Rolle der Dynamin-vermittelten Endozytose während der Infektion von HIBCPP-Zellen durch <i>N. meningitidis</i> Stämme der Serogruppe B ist Kapsel abhängig	65
4.1.3	Die Rolle der Dynamin-vermittelten Endozytose während der Infektion von HIBCPP-Zellen durch <i>N. meningitidis</i> Stämme der Serogruppe C ist Kapsel abhängig	67

4.1.4	Inhibition der Dynamin-vermittelten Endozytose hat keinen Effekt auf die Invasion von <i>H. influenzae</i> unabhängig von der An- und Abwesenheit der Virulenzfaktoren Kapsel und Fimbrien. ....	69
4.1.5	Die Infektion der HIBCPP-Zellen durch den Erreger <i>S. suis</i> und dessen Kapselmutante wird in hohem Maße durch Dynamin vermittelt. ....	71
4.2	Einfluss der MAPK Signalwege Erk1/2 und p38 auf die Invasion verschiedener bakterieller Erreger .....	74
4.2.1	Aktivierung der MAPK Erk1/2 und p38 nach basolateraler Infektion der HIBCPP-Zellen mit <i>N. meningitidis</i> Serogruppe B- und C-Stämmen .....	74
4.2.2	Inhibition der MAPK Signalwege Erk1/2 und p38 durch Anwendung spezifischer Inhibitoren .....	75
4.2.3	Für die Infektion der HIBCPP-Zellen durch den <i>N. meningitidis</i> B Wildtyp sind die MAPK Erk1/2 und p38 notwendig, nicht jedoch für die Kapselmutante .....	76
4.2.4	Die MAPK Erk1/2 und p38 sind notwendig für eine effektive Infektion der HIBCPP-Zellen durch den <i>N. meningitidis</i> C Wildtyp, während bei Deletion der Kapsel nur der p38 MAPK Signalweg notwendig ist .....	79
4.2.5	Erk1/2 und p38 sind relevant für eine effiziente Infektion von HIBCPP-Zellen durch <i>H. influenzae</i> .....	81
4.2.6	Für die erfolgreiche Infektion der HIBCPP-Zellen durch <i>S. suis</i> und dessen Kapselmutante sind die MAPK Erk1/2 und p38 notwendig. ....	83
4.3	Einfluss der MAPK auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit bakteriellen Erregern .....	86
4.3.1	Effekt der Inhibition der MAPK auf die Expression von <i>il6</i> und <i>il8</i> .....	86
4.3.2	Einfluss der MAPK auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit <i>N. meningitidis</i> .....	88
4.3.3	Einfluss der MAPK auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit <i>H. influenzae</i> .....	92
4.3.4	Einfluss der MAPK auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit <i>S. suis</i> .....	94



4.4	MACE Analyse der HIBCPP-Zellen nach Infektion mit <i>N. meningitidis</i> Serogruppe B Stämmen .....	96
4.4.1	Bestimmung der RIN als Qualitätskontrolle der RNA Proben .....	96
4.4.2	Statistische Auswertung der sequenzierten Proben durch Vergleich der <i>Differentially Expressed Genes</i> und <i>Gene Ontology</i> Analyse .....	98
4.4.3	Validierung ausgewählter Gene mit Hilfe der qRT-PCR .....	98
4.4.4	Differentielle Genexpression in HIBCPP-Zellen infolge einer Infektion mit <i>N. meningitidis</i> .....	100
4.5	Phosphoproteomik Analyse der HIBCPP-Zellen nach Infektion mit den <i>NmB</i> Wildtyp MC58 sowie der Kapselmutante MC58siaD <sup>-</sup> .....	111
4.5.1	Enrichment Analyse der Signalwege nach Infektion mit <i>NmB</i> .....	112
4.5.2	Enrichment Analyse der zellulären Komponenten nach Infektion mit <i>NmB</i> ....	114
4.5.3	Enrichment Analyse der molekularen Funktionen nach Infektion mit <i>NmB</i> ....	115
4.5.4	Enrichment Analyse der biologischen Funktionen nach Infektion mit <i>NmB</i> ....	116
4.5.5	Enrichment Analyse der Kinase-Anreicherung nach Infektion mit <i>NmB</i> .....	117
5	Diskussion.....	118
5.1	Die Rolle des <i>Plexus choroideus</i> während der Infektion verschiedener bakterieller Erreger.....	118
5.2	Die Rolle von Dynamin während der Infektion der HIBCPP-Zellen durch verschiedene bakterielle Erreger .....	119
5.2.1	<i>N. meningitidis</i> .....	120
5.2.2	<i>H. influenzae</i> .....	120
5.2.3	<i>S. suis</i> .....	121
5.2.4	Zusammenhang der Dynamin vermittelten Endozytose und Wirtszell- Signaltransduktion während bakterieller Infektionen.....	122

5.3	Die Rolle der MAPK-Signalkaskade in Folge einer Infektion der HIBCPP-Zellen durch verschiedene bakterielle Erreger.....	123
5.3.1	<i>N. meningitidis</i> .....	123
5.3.2	<i>H. influenzae</i> .....	125
5.3.3	<i>S. suis</i> .....	126
5.4	Bakterielle Erreger induzieren die Expression von <i>il6</i> und <i>il8</i> in HIBCPP-Zellen in Abhängigkeit von der MAPK-Signalkaskade .....	127
5.4.1	<i>N. meningitidis</i> .....	127
5.4.2	<i>H. influenzae</i> .....	128
5.4.3	<i>S. suis</i> .....	129
5.5	<i>N. meningitidis</i> induzieren die Expression verschiedener Gene während einer Infektion der HIBCPP-Zellen in Abhängigkeit von Serogruppe, Kapselexpression und Aktivierung der MAPK Erk1/2.....	130
5.6	Einfluss der Infektion mit <i>N. meningitidis</i> auf das Phosphoproteom der HIBCPP-Zellen	136
6	Fazit und Ausblick .....	140
7	Verzeichnisse .....	141
7.1	Tabellenverzeichnis.....	141
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	142
7.3	Abkürzungsverzeichnis .....	144
7.4	Literaturverzeichnis .....	147
Anhang	.....	173
8	Publikationen.....	189
9	Danksagung .....	190

## Zusammenfassung

Infektionen durch Gram-positive und Gram-negative Bakterien können zur Entwicklung der lebensbedrohlichen Erkrankung Meningitis führen. Um eine Meningitis zu verursachen, müssen die Krankheitserreger die Schutzbarrieren des Gehirns überwinden. Eine dieser Barrieren, die das zentrale Nervensystem (ZNS) schützt, ist die Blut-Liquor-Schranke (BLS), deren morphologisches Korrelat die Epithelzellen des *Plexus choroideus* (PC) sind. Für den Gram-positiven Erreger *Streptococcus suis* (*S. suis*) und die Gram-negativen Erreger *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) und *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) wurde die BLS als mögliche Eintrittspforte in das ZNS diskutiert. *In vitro* Studien, unter Verwendung eines Modells des BLS, das durch humane Papillomzellen des PC (HIBCPP-Zellen) dargestellt wird, haben eine polare Infektion dieser Erreger von der basolateralen Seite der Zellen gezeigt. Es ist bekannt, dass bakterielle Erreger die Signaltransduktionswege des Wirts während der Infektion zu ihrem eigenen Vorteil manipulieren können. Dazu gehören Endozytosemechanismen wie die Dynamin-vermittelte Endozytose, um die Aufnahme der Krankheitserreger in die Wirtszellen zu erleichtern. Während von den untersuchten Bakterien die *S. suis* Stämme und die *N. meningitidis* Kapselmutante eine Abhängigkeit von diesem Mechanismus für eine optimale Infektion der HIBCPP-Zellen aufwiesen, konnte für die *N. meningitidis* Wildtyp Stämme und die Varianten von *H. influenzae* keine signifikante Abhängigkeit von der Dynamin-vermittelten Endozytose bei Infektion der HIBCPP-Zellen beobachtet werden. Weitere, von Bakterien häufig manipulierte, Signalkaskaden sind die extrazellulären signalregulierten Kinasen 1 und 2 (Erk1/2) und p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Die Pathogene *S. suis* und *H. influenzae* konnten HIBCPP-Zellen, unabhängig von der Kapselexpression, nicht effizient infizieren, wenn diese MAPK inhibiert wurden. In ähnlicher Weise wurde eine Abhängigkeit von beiden Signalwegen für die *N. meningitidis* Wildtyp Stämme beobachtet. Jedoch konnte die *N. meningitidis* Kapselmutante die HIBCPP-Zellen unabhängig von der Aktivität beider MAPK infizieren. Aus diesem Grund wurde eine Transkriptomanalyse der HIBCPP-Zellen nach Infektion mit dem *N. meningitidis* Wildtyp Stamm und der Kapselmutante durchgeführt, um die zugrunde liegenden Prozesse während der Infektion der HIBCPP-Zellen weiter zu charakterisieren. Die Ergebnisse deuten auf eine Rolle des PC bei der Entzündungsreaktion hin und heben Unterschiede in der Stärke der Auswirkungen auf die Genexpression nach Infektion mit den *N. meningitidis* Stämmen in Gegenwart oder Abwesenheit der Bakterienkapsel hervor. Darüber hinaus ergab eine Analyse des Phosphoproteoms nach Infektion von HIBCPP-Zellen mit *N. meningitidis* eine Vielzahl von regulierten Signalwegen und Proteinen, mit deren Hilfe die genauen Infektionsmechanismen der BLS durch *N. meningitidis* weiter untersucht werden können.

## Summary

Infections with Gram-positive and Gram-negative bacteria can result in the development of the life-threatening disease meningitis. In order to cause meningitis, the pathogens have to overcome the protective barriers of the brain. One of these barriers protecting the central nervous system (CNS) is the blood-cerebrospinal fluid barrier (BCSFB) which is represented by the epithelial cells of the *choroid plexus* (CP). For the Gram-positive pathogen *Streptococcus suis* (*S. suis*) and the Gram-negative pathogens *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) and *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), the BCSFB has been discussed as possible entry site to the CNS. *In vitro* studies, using a model of the BCSFB represented by human choroid plexus papilloma cells (HIBCPP cells), have demonstrated polar infection of these pathogens from the basolateral side of the cells. Bacterial pathogens are known for manipulating the hosts signal transduction pathways during infection for their own advantage. Among those are endocytosis mechanisms, such as the dynamin-mediated endocytosis, to facilitate uptake of the pathogens into the host cells. While, concerning the analysed bacteria, *S. suis* and *N. meningitidis* capsule-deficient mutants displayed a dependency on this mechanism for optimal infection of the HIBCPP cells, the *N. meningitidis* wildtype strains and *H. influenzae* variants showed no significant dependency on dynamin-mediated endocytosis for infection of the HIBCPP cells. Further commonly manipulated signaling cascades by bacterial pathogens are the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (Erk1/2) and p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK). The pathogens *S. suis* and *H. influenzae* could not infect HIBCPP cells as efficiently when those MAPK were inhibited, regardless of capsule expression. Similarly, a dependency on these signaling pathways was observed for the *N. meningitidis* wildtype strains. The *N. meningitidis* capsule-deficient mutant on the other hand could infect HIBCPP cells regardless of the activity of both MAPK pathways. For this reason, a transcriptome analysis of the HIBCPP cells after infection with *N. meningitidis* wildtype strain and the capsule-deficient mutant was done to further characterize the underlying processes during infection of the HIBCPP cells. These results point towards a role of the CP in the inflammatory response as well as highlighting differences in the impact on gene expression after infection with the *N. meningitidis* strains in presence or absence of the bacterial capsule, even though both strains resulted in the induction of mostly the same genes. Furthermore, an analysis of the phosphoproteome after infection of HIBCPP cells with the *N. meningitidis* strains revealed a variety of signaling pathways and regulated proteins that will help further study the exact mechanisms of infection of the BCSFB by *N. meningitidis*.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das zentrale Nervensystem

Zum Schutz des Gehirns existieren physiologische Barrieren, deren Entdeckung in hohem Maße auf den Beobachtungen von Paul Ehrlich (Ehrlich 1904) und Edwin Goldmann (Goldmann 1913) im 20ten Jahrhundert basiert. In ihren Experimenten wurde gezeigt, dass nach Zugabe eines Farbstoffes in den Blutkreislauf alle Organe bis auf das zentrale Nervensystem (ZNS) angefärbt waren. Bei Injektion des Farbstoffes in das ZNS wurde umgekehrt zwar das Gehirn, nicht jedoch die restlichen Organe des Körpers angefärbt (Goldmann 1913; Ehrlich 1904). Diese physiologischen Barrieren erfüllen eine essenzielle Rolle zum Schutz des Gehirns und zur Aufrechterhaltung seiner Funktion (Marques *et al.*, 2013). Eine Übersicht der wichtigsten Schnittstellen zwischen dem ZNS und den peripheren Geweben ist in Abbildung 1 skizziert. Zu diesen Strukturen gehören die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und Blut-Liquor-Schranke (BLS), auf die im Folgenden näher eingegangen wird, sowie die Barriere der zirkumventrikulären Organe und der Hirn-Liquor-Schranke am Ependym der Ventrikel. Wichtige Komponenten dieser Barrieren sind interzelluläre *Tight Junctions* (TJ), auf welchen die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion beruht. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Kontrolle des Transports von Molekülen über die Barriere hinweg, der unter anderem von *ATP-binding cassette* (ABC) Transportern sowie Effluxpumpen gewährleistet wird (Saunders *et al.*, 2016). Durch das Zusammenspiel dieser Mechanismen schützen die Barrieren das ZNS vor Giftstoffen, vielen pharmakologisch wirksamen Stoffen sowie einer Reihe verschiedener Krankheitserreger (Lauer *et al.*, 2018 1249; Doran *et al.*, 2016; van Sorge *et al.*, 2012).

### 1.1.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Eine, die Hirnkapillare auskleidende, Endothelschicht stellt die Verbindung zwischen dem ZNS und dem peripheren Kreislauf dar (Abbildung 1A). Dabei weist diese Endothelschicht sowohl strukturelle als auch funktionale Eigenschaften auf (Daneman 2015 1236; Abbott *et al.*, 2010; Kim 2008). Zusammen mit Astrozyten und Perizyten bilden die Endothelzellen eine Barriere zum ZNS. Diese Barriere repräsentiert die BHS, welche, im Gegensatz zu anderen Kapillarendothelien, einen stark reduzierten parazellularen und transzellularen Transport aufweist (Bauer *et al.*, 2014; Adam *et al.*, 2004). Die Barrierefunktion der Endothelzellen basiert dabei auf einer sehr geringen Anzahl von pinozytotischen Vesikeln, dem Fehlen von Fenestrierungen sowie der Anwesenheit von mehrreihigen TJ (Bauer *et al.*, 2014; Hawkins *et al.*, 2006; Adam *et al.*, 2004). Auf Grund dieser Eigenschaften der Endothelzellen wird für verschiedene Moleküle das Durchqueren dieser Barriere eingeschränkt sowie die Homöostase

des ZNS gewährleistet. Rezeptorvermittelte Endozytose, aktiver Effluxtransport durch *Solute carrier* Transporter sowie Ionen-transport zählen zu den wichtigsten Transportsystemen der BHS (Sweeney *et al.*, 2019). Zusätzlich deutet eine große Anzahl an Mitochondrien auf eine ausgeprägte metabolische Aktivität hin, die, ausgelöst durch den Energiebedarf der verschiedenen Transportsysteme, einen selektiven Austausch über die Barriere unterstreicht (Tietz *et al.*, 2015; Abbott *et al.*, 2010).

### 1.1.2 Die Blut-Liquor-Schranke

Neben der BHS existieren weitere Systeme, welche als Grenzflächen zwischen Blut und Gehirn fungieren (Abbildung 1). Dazu zählen die *Plexus choroidi* (PC) sowie die *Arachnoidea* (Abbildung 1B, C). Zusammen bilden diese Systeme die BLS. Im Folgenden wird auf die Barriere zur inneren Zerebrospinalflüssigkeit (Liquor) an den PC eingegangen.

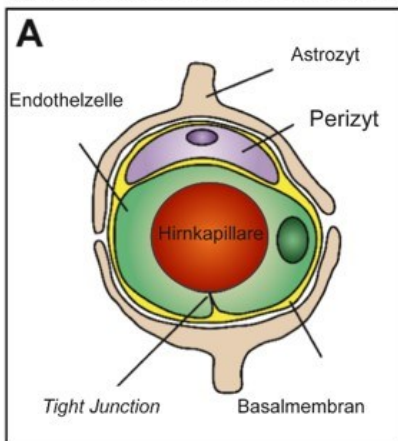
Im Ventrikelsystem befinden sich insgesamt vier Areale, an welchen sich eine solche BLS ausbildet. Zu diesen Arealen gehören die zwei PC in den Dächern des dritten und vierten Ventrikels sowie die PC der beiden Seitenventrikel (Liddelw 2015). Die Epithelzellschicht der PC liegt auf einer Basallamina, welche wiederum eine Bindegewebsschicht bedeckt. Diese führt Kapillaren in ihrem Inneren, die durch ein fenestriertes Endothel ausgekleidet werden und somit durchlässig für Bestandteile des Bluts sind und nicht zur Schrankenfunktion beitragen (Wolburg *et al.*, 2010). Die Funktion dieser stark vaskularisierten Schranke beruht stattdessen auf dem spezialisierten neuroektodermalen Epithel, dessen Zelloberfläche, auf Grund einer hohen Anzahl von Mikrovilli auf der dem Liquor zugewandten apikalen Seite, stark vergrößert ist. Diese hochkuboidalen, polarisierten Zellen stammen von Ependymzellen ab und gehen im Bereich der Aufhängung im Ventrikel in diese über (Narita *et al.*, 2015). Des Weiteren ist dieses Epithel durch die Ausbildung von TJ sowie die Expression von Proteinen, die mit diesen assoziiert werden, wie Zonula Occludens 1 (ZO1) und Occludin, charakterisiert (Engelhardt *et al.*, 2001).

Die BLS stellt nicht ausschließlich eine physikalische Barriere zum ZNS dar, welche vor pathogenen Erregern und anderen potentiell schadhafte Bestandteile im Blut schützt, sondern fungiert auch als Barriere zum Schutz vor neurotoxischen Substanzen (Gherzi-Egea *et al.*, 2018; Liddelw 2015). Hierfür besitzen die Epithelzellen eine Reihe von Efflux-Transmembrantransportern sowie metabolisierenden Enzymen, um diese Substanzen zu entfernen (Gherzi-Egea *et al.*, 2018). Eine weitere Schutzfunktion besteht darin, die unkontrollierte Diffusion aus dem Blutkreislauf in das ZNS zu unterbinden. Dies geschieht durch kontrollierten passiven und aktiven Transport von Substanzen über die Barriere hinweg (Liddelw 2015).

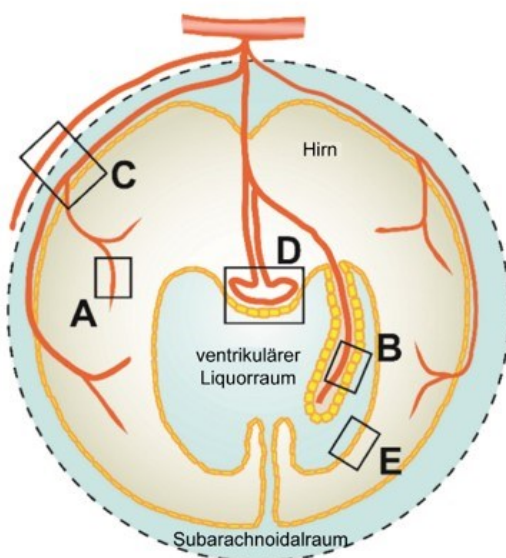
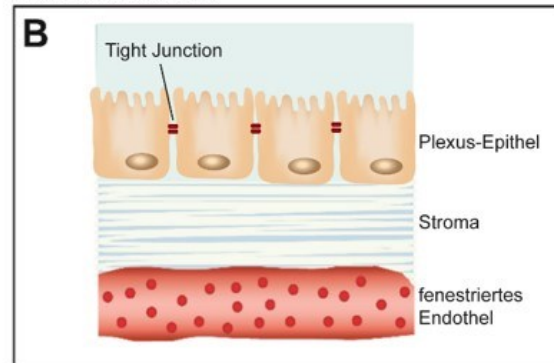
Zusätzlich zu der zuvor beschriebenen Barrierefunktion produziert der CP einen Großteil des Liquors. Dieser vermittelt eine Schutzfunktion vor mechanischen Stößen und umspült das Gehirn sowie das Rückenmark (Liddelow 2015). Hierbei ist die, durch die Mikrovilli vergrößerte, apikale Oberfläche der Zellen involviert, durch welche eine Sekretion größerer Mengen des Liquors ermöglicht wird (Gherzi-Egea *et al.*, 2018). Schätzungsweise werden in den PC rund 500 ml Liquor pro Tag produziert, was einen Austausch des Liquors drei bis fünf Mal täglich ermöglicht (Ransohoff *et al.*, 2012). Die sekretierte Liquorflüssigkeit weist dabei eine konstante Zusammensetzung auf. Bei ihrer Produktion spielt die polare Expression von Transportern und Ionenkanälen in den Epithelzellen des PC eine zentrale Rolle (Gherzi-Egea *et al.*, 2018). Die im Folgenden erläuterte Liquorproduktion beginnt mit dem Enzym Carboanhydrase, welches eine Dissoziation von Kohlensäure katalysiert. Die an der basolateralen Membran lokalisierten Ionenaustauscher  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ - und  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher führen dazu, dass die hierbei entstandenen  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{H}^+$  Ionen gegen  $\text{Cl}^-$  und  $\text{Na}^+$  ausgewechselt werden und sich in den Plexusepithelzellen anreichern. Der weitere Transport dieser Ionen erfolgt durch komplexe Interaktionen von Enzymen, Transportern und Ionenkanälen und resultiert letztendlich in einer Nettodiffusion von Natriumchlorid und Natriumbikarbonat. Hierbei entsteht ein osmotischer Gradient, auf Grund dessen Wasser des Blutkreislaufs über Aquaporin-Kanäle in das ZNS gebracht und somit letztendlich der Liquor produziert wird (Gherzi-Egea *et al.*, 2018; Liddelow 2015).

Auf Grund der wichtigen Funktionen des PC als Schutzbarriere des ZNS sowie der Produktion des Liquors und der damit verbundenen Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS, kann eine Beeinträchtigung der BLS schwere Folgen haben. Unter anderem können pathogene Erreger über die BLS in das ZNS gelangen (Herold *et al.*, 2019; Lauer *et al.*, 2018; Doran *et al.*, 2016; Schwerk *et al.*, 2015; Vandenhoute *et al.*, 2015; Vercellino *et al.*, 2008).

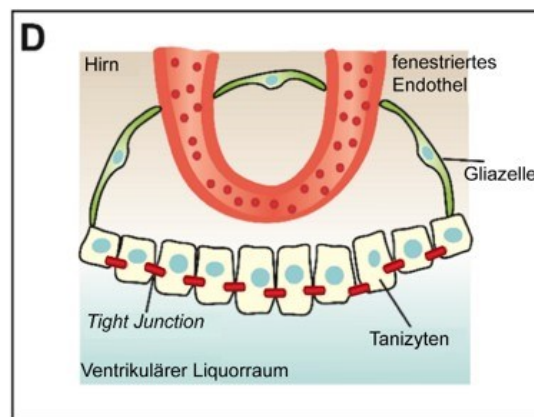
Mikrovaskuläre Blut-Hirn-Schranke



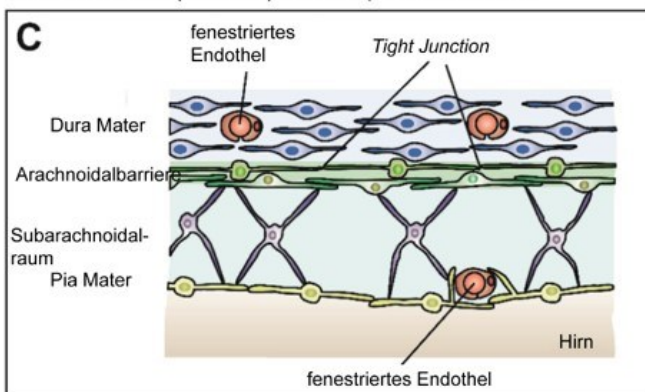
Choroidale innere Blut-Liquor-Schranke- Plexus Choroideus



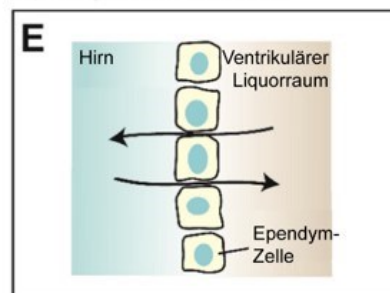
Zirkumventrikuläre Organe



Arachnoidale (äußere) Blut-Liquor-Schranke



Hirn-Liquor-Schranke- Ependym der Ventrikel



**Abbildung 1: Schnittstellen zwischen peripherem Gewebe und dem ZNS.** Die BHS besteht aus den mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns, die durch TJ versiegelt sind und durch Astrozyten und Perizyten umschlossen werden. Sie trennt das Gehirnparenchym vom Blutkreislauf (A). Der PC befindet sich im Ventrikelsystem und ist durch ein fenestriertes Endothel ausgekleidet. Die BLS wird durch Epithelzellen gebildet und trennt das Blut von dem ventrikulären Liquor (B). Die arachnoidale (äußere) Blut-Liquor-Schranke bildet sich zwischen Subarachnoidalraum (äußerem Liquorraum) und *Dura mater* aus. Sie bildet sich durch arachnoidale Grenzstellen (C). Zirkumventrikuläre Organe mit Blutgefäßen teilen Charakteristika peripherer Gefäße. Die Tanyzyten bilden die Barriere zum inneren Liquorraum (D). Ependymzellen, welche die Ventrikel auskleiden, trennen den ventrikulären Liquor vom Gehirnparenchym (E). Modifiziert nach: (Borkowski *et al.*, 2020).



## 1.2 Infektionen des Zentralen Nervensystems

Das ZNS ist auf Grund seiner Barrieren, maßgeblich der BHS und der BLS, gut vor pathogenen Erregern geschützt. Obwohl die Zellen dieser Barrieren in der Lage sind eine Immunantwort auf pathogene Erreger hervor zu rufen, gelingt es einer Reihe von Erregern dennoch in das ZNS vorzudringen (Dando *et al.*, 2014). Diese Infektionen können sich als Meningitis, Enzephalitis und Meningoenzephalitis äußern (Dando *et al.*, 2014). Meningitis bezeichnet eine Entzündung der Hirnhäute (Meningen), die das Gehirn und Rückenmark als schützende Hülle umgeben. Die Meningen werden in drei Hirnhäute aufgeteilt, die *Pia mater*, die *Arachnoidea* und die *Dura mater*. Symptome einer Meningitis sind Fieber, Kopfschmerzen sowie Nackensteifheit. Während einer Enzephalitis liegt eine Entzündung des Hirnparenchym vor. Die Symptome ähneln denen der Meningitis. Zudem können auch Krampfanfälle als Symptom der Enzephalitis auftreten. Die Meningoenzephalitis, welche oftmals einen letalen Verlauf hat, beschreibt die Entzündung sowohl der Hirnhäute als auch des Gehirns selbst (Dando *et al.*, 2014).

Diverse Erreger können eine Entzündungsreaktion der Hirnhäute hervorrufen. Diese können in Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten unterteilt werden. Der höchste Anteil an Meningitisfällen wird durch Viren ausgelöst, die zudem auch der Hauptauslöser einer Enzephalitis sind (Wright *et al.*, 2019; Glaser *et al.*, 2006). Eine virale Meningitis kann meist gut behandelt werden und es kann eine vollständige Erholung erzielt werden. Der effektivste Schutz gegen eine Vielzahl der Viren, die eine virale Meningitis auslösen können, besteht in der Impfung gegen die Erreger (Wright *et al.*, 2019). Die bakterielle Meningitis ist die am zweithäufigsten vorkommende Form der Erkrankung. Sie ist jedoch, im Vergleich zur viralen Meningitis, häufiger mit einer schlechten Erholung oder gar, trotz der Anwendung von Antibiotika, mit einem tödlichen Verlauf verbunden (Doran *et al.*, 2016). Im Vergleich zu der bakteriellen und viralen Meningitis hat eine durch Parasiten oder Pilze ausgelöste Meningitis ein deutlich niedrigeres Vorkommen. Von dieser Form der Meningitis sind meist immungeschwächte und immunkompetente Menschen betroffen (Goralska *et al.*, 2018).

### 1.2.1 Bakterielle Meningitis

Der Verlauf einer bakteriellen Meningitis ist, im Vergleich zu einer viralen Meningitis, oftmals schwerer und kann tödlich enden. Mit entscheidend für die Schwere des Verlaufs der Erkrankung ist unter anderem das Alter der Patienten sowie deren Immunstatus (van Ettehoven *et al.*, 2017). Am meisten betroffen sind aufgrund dieser beiden Faktoren Neugeborene, Kinder, Jugendliche und Senioren (Gowin *et al.*, 2018; Dando *et al.*, 2014).

Viele Personen können bakterielle Erreger asymptomatisch tragen, während sich bei anderen Individuen eine Krankheit entwickelt. Der Grund hierfür ist bislang noch nicht vollständig geklärt (Gowin *et al.*, 2018), wobei einige Studien eine genetische Prädisposition als möglichen Faktor diskutieren (McGill *et al.*, 2017). Fast alle bakteriellen Erreger können in der Theorie den Menschen infizieren und eine Meningitis auslösen (Adam *et al.*, 2004). Dabei ist jedoch die relative Häufigkeit von Infektionen auf eine begrenzte Anzahl von Erregern reduziert, was sich unter anderem aus der zuvor beschriebenen Altersspezifität und dem Immunstatus der Patienten bei Infektionen mit diesen Erregern ableitet. Beispiele für Erreger, die eine Meningitis auslösen können, sind *Neisseria meningitidis*, (*N. meningitidis*, Meningokokken) *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) type b (*Hib*), *Streptococcus Suis* (*S. suis*) sowie *Escherichia coli* K1 (Dutkiewicz *et al.*, 2018; van Ettehoven *et al.*, 2017; Kim 2010).

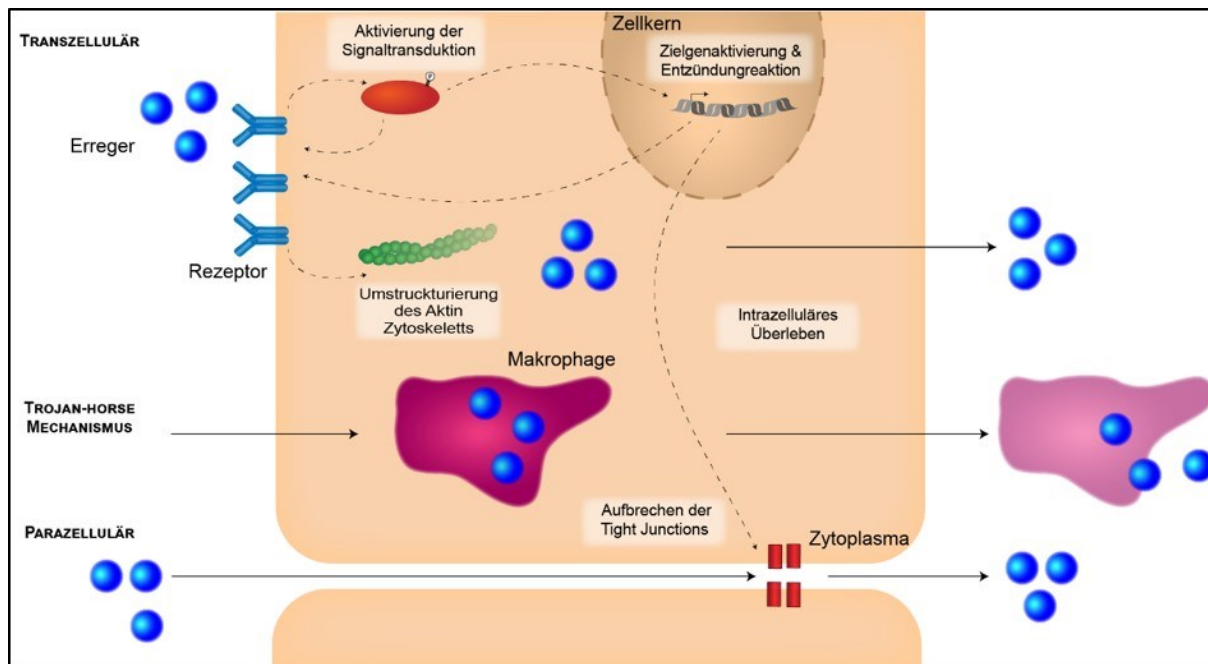
Trotz der Entwicklung von Impfstoffen gegen die meisten Meningitiserreger kommt es noch immer zu Infektionen mit diesen Bakterien, die schnell diagnostiziert und behandelt werden müssen. Hierbei wird eine Reihe von Antibiotika eingesetzt, sowie, in speziellen Fällen, eine Therapie bestehend aus Antibiotika und zusätzlichen Kortikosteroiden (van Ettehoven *et al.*, 2017). Eine frühe Behandlung durch Verabreichung von Antibiotika wurde mit einer geringeren Sterblichkeitsrate korreliert (Proulx *et al.*, 2005). Die Auswahl der Antibiotika wird dabei von mehreren Faktoren beeinflusst, unter anderem dem Erreger selbst sowie den bekannten regionalen Antibiotikaresistenzen (McGill *et al.*, 2017). Oftmals werden Penicillin und  $\beta$ -Lactame angewandt, da diese gegen die meisten bakteriellen Erreger eine Wirkung zeigen. Ein Vorteil hierbei ist, dass diese Antibiotika nicht nur eine hohe Wirksamkeit gegen eine Reihe von Erregern haben, sondern auch ein für den Patienten unschädliches Maß an Toxizität aufweisen (Nau *et al.*, 2010). Eine Zunahme an Antibiotikaresistenzen erschwert jedoch zunehmend die Behandlung von bakterieller Meningitis (McGill *et al.*, 2017).

Viele Aspekte der Pathogenese der bakteriellen Meningitis sind noch nicht vollständig geklärt. Um eine Meningitis auszulösen, muss jedoch eine bestimmte Anzahl von Ereignissen erfolgen. Diese beginnen mit der Kolonisierung der Schleimhäute des oberen Respirationstrakts oder des Gastrointestinaltrakts. Besonders betroffen ist hierbei das Nasopharynxepithel. Werden diese Barrieren überwunden, folgt der Eintritt in den Blutkreislauf. Um der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen, besitzen Meningitiserreger eine Reihe von Virulenzfaktoren und Abwehrmechanismen. Überlebt der Erreger in der Blutbahn, folgt die Bakteriämie und Dissemination. Dadurch können die Erreger die Schranken des Gehirns erreichen, an deren Endothelzellen (BHS) oder Epithelzellen (BLS) sie im ersten Schritt der Infektion adhären. Werden diese Schranken erfolgreich überwunden, besiedeln die Erreger den Liquorraum, was eine leptomenigeale Entzündung zur Folge hat (Doran *et al.*, 2016; McGill *et al.*, 2016; Adam *et al.*, 2004).

Meningitiserreger überwinden die Schranken des ZNS in den meisten Fällen transzellulär oder parazellulär (Kim 2008). Diese Prozesse sind durch die Interaktion zwischen Virulenzfaktoren der Erreger und Proteinen der Wirtszelle charakterisiert. Die transzelluläre Überwindung der Barrieren wird dabei mit intrazellulärer Invasion der Erreger assoziiert, die hierbei die Signalwege der Wirtszelle zu Ihrem Vorteil nutzen. Dringen die Erreger parazellulär in das ZNS vor, so kann dies mit und ohne permanente Öffnung der TJ einhergehen (Doran *et al.*, 2016; Kim 2008). Des Weiteren können bakterielle Toxine zu einer Beschädigung der Barriere führen und auf diese Weise den parazellulären Weg ermöglichen. Eine weitere Möglichkeit der Infektion des ZNS besteht in dem „Trojan-horse“-Mechanismus, der die Migration der Erreger über die Schranken des ZNS, innerhalb von Zellen des Wirtes, beschreibt (Abbildung 2) (Kim 2008).

### 1.3 Pathogenese der Bakteriellen Meningitis

Die Pathogenese der bakteriellen Meningitis ist charakterisiert durch eine Reihe an Schritten, mit Hilfe derer die pathogenen Erreger die Schranken des ZNS überwinden können. Diese verlaufen meist in einer bestimmten Reihenfolge. Diese Abfolge an Ereignissen, der Adhäsion und der folgenden Invasion der schützenden Barrieren, geht ein Schwellenwert an bakteriellen Erregern im Blutkreislauf voraus (Kim 2016; Sullivan *et al.*, 1982; Dietzman *et al.*, 1974). Dieses Phänomen korreliert mit der Schwere der Infektion sowie der Wahrscheinlichkeit, eine Meningitis zu entwickeln (Bell *et al.*, 1985).



**Abbildung 2: Pathogenese der bakteriellen Meningitis.** Dargestellt sind die verschiedenen Mechanismen mit welchen die pathogenen Erreger die Zellen überwinden können. Unterschieden wird zwischen transzellulärer und parazellulärer Infektion sowie dem Trojan-horse Mechanismus. Modifiziert nach: (Herold *et al.*, 2019)

### 1.3.1 Adhäsion und Invasion bakterieller Erreger

Ist der Schwellenwert der Erreger im Blutkreislauf erreicht, erfolgt der Kontakt der bakteriellen Erreger mit der Oberfläche der Wirtszellen. Für einige Erreger wurde auch eine Interaktion mit Proteinen der extrazellulären Matrix beschrieben, welche den ersten Kontakt mit der Wirtszelle ermöglicht. Die Adhäsion der Erreger an der Oberfläche der Wirtszelle ist ein komplexer Prozess, in welchen verschiedenste Adhäsionsmoleküle involviert sind. Diese interagieren wiederum mit einer Reihe von Rezeptoren der Wirtszelle, wobei mehrere bakterielle Adhäsionsmoleküle gleichzeitig in diesen Prozess involviert sein können. Der erste Kontakt der Erreger mit den Rezeptoren der Wirtszelle kann die Expression weiterer Rezeptoren zur Folge haben, die folglich mit weiteren Virulenzfaktoren der Bakterien interagieren können (Virji 2009). Zudem kann die Interaktion der bakteriellen Adhäsionsmoleküle mit den Rezeptoren der Wirtszelle die Aktivierung verschiedener Signalwege zur Folge haben. Diese Aktivierung bestimmter Signalwege führt wiederum zu einer verstärkten Anheftung der Erreger sowie deren Internalisierung (Doran *et al.*, 2016). Wichtige Virulenzfaktoren vieler Meningitiserreger sind hierbei die Pili oder Fimbrien, deren Rolle in der Invasion der BHS in *in vitro* Modellen beobachtet und beschrieben wurde (van Sorge *et al.*, 2012). Um in die Wirtszellen vorzudringen und intrazellulär zu überleben, nutzen pathogene Erreger die Endozytosemechanismen der Wirtszellen sowie die eukaryotischen Regulationsmechanismen des Zytoskeletts.

### 1.3.1.1 Endozytose

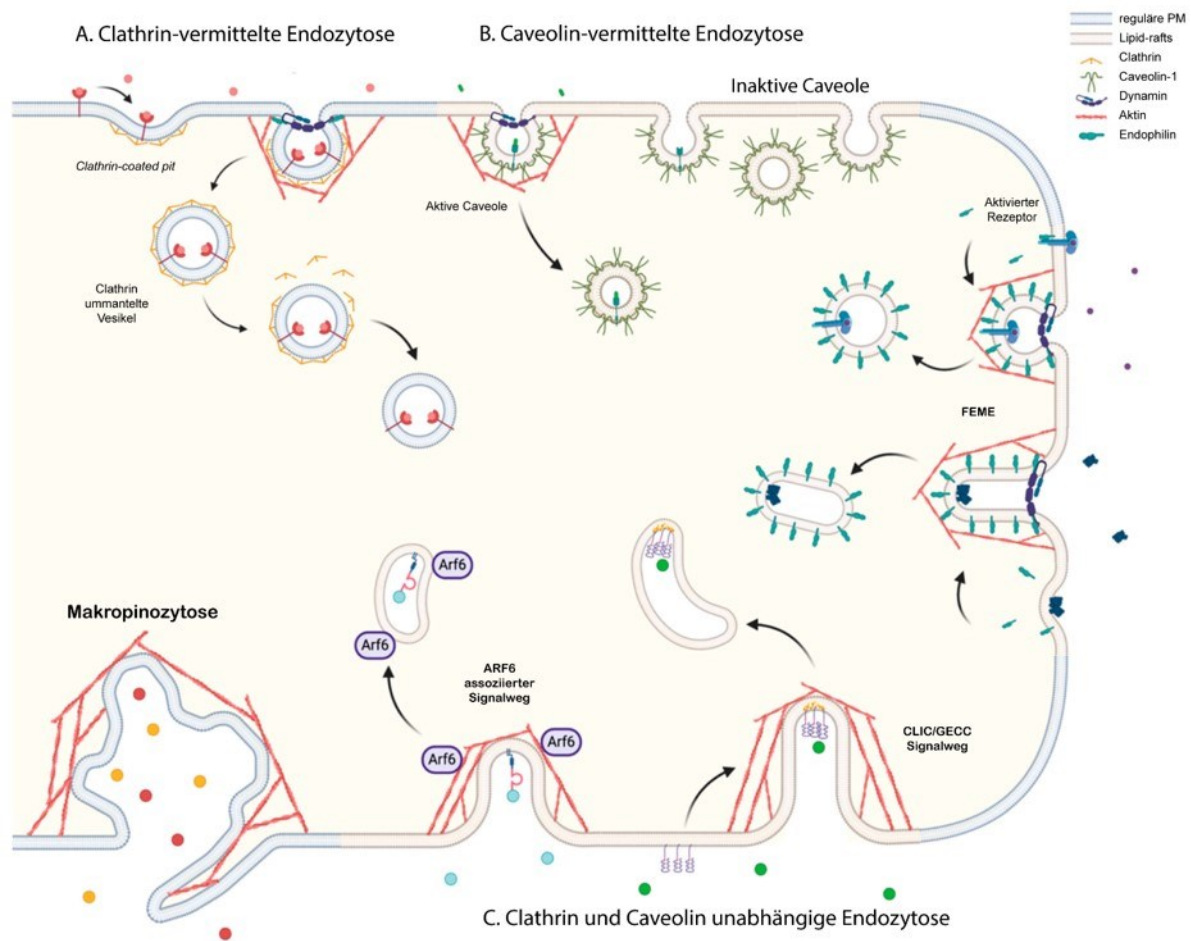
Endozytose beschreibt die Internalisierung von Plasmamembranproteinen oder Lipiden, extrazellulären Molekülen, Partikeln, Exosomen sowie Viren und Bakterien. Es handelt sich dabei um einen konservierten Mechanismus in eukaryotischen Zellen, der in verschiedenste Zellfunktionen involviert ist. Zu diesen Prozessen gehören unter anderem Umsatz und Abbau von Plasmamembranproteinen und Rezeptoren, die Transduktion und Verbreitung von Signalen in den Zellen oder unter angrenzenden Zellen eines Gewebes, die Eliminierung von pathogenen Erregern und die Aufnahme von Nährstoffen (Samaj *et al.*, 2004).

Die Endozytose ermöglicht die Aufnahme einer Vielzahl von Molekülen, unter anderem Wachstumsfaktoren, Lipide und Proteine. Auf Grund der hohen Anzahl an verschiedenen Molekülen, die in den Prozess der Endozytose involviert sind, kann dieser Vorgang in verschiedene Subkategorien unterteilt werden. Basis hierfür sind Proteine, die während der Endozytose an der Plasmamembran in hohen Konzentrationen vorgefunden werden. Auf zellulärer Ebene wird zwischen Phagozytose, die von phagozytischen Zellen des Immunsystems angewandt wird, und Pinozytose unterschieden. Die Pinozytose, welche unter anderem von Epithelzellen genutzt werden kann, um kleinere Moleküle aus dem extrazellulären Raum kontrolliert aufzunehmen, kann in weitere Prozesse unterteilt werden (siehe Abbildung 3), die in Abhängigkeit oder unabhängig von der Guanosin-5'-triphosphat (GTP)ase Dynamin, welche Membranabschnürungen katalysiert, stattfinden. Die Dynamin-abhängige Aufnahme von extrazellulären Faktoren kann wiederum in Clathrin-vermittelte Endozytose (CVE) (Abbildung 3A) und Caveolin-vermittelte Endozytose (Abbildung 3B) unterschieden werden. Ein weiterer Dynamin-abhängiger Prozess ist die Endophilin-vermittelte Endozytose (FEME). Hierbei werden unter anderem Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) oder Interleukin (IL)-Rezeptoren durch eine Interaktion von Endophilin, welches ursprünglich im Zusammenhang mit der Rekrutierung der GTPase Dynamin während der CVE beschrieben wurde, mit dem Aktin Zytoskelett internalisiert. Zudem konnte die Aufnahme von Cholera und Shiga Toxinen mittels der FEME beobachtet werden (Rueda-Gensini *et al.*, 2020). Wie bereits angedeutet, kann jedoch auch Dynamin-unabhängige Endozytose stattfinden (Sathe *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2010) (Abbildung 3C). Zwei der Prozesse, die sowohl Clathrin-, Caveolin als auch Dynamin unabhängig sind, finden sich in dem sogenannten CLIC/GEEC Signalweg und der Arf6-assoziierten Endozytose. In beiden Fällen werden Glycosylphosphatidylinositol-verankerte Proteine aufgenommen, welche in *Lipid-raft* Mikrodomänen organisiert sind und Cholesterin-induzierte *Clustering*-Fähigkeiten besitzen, um das Knospen der Zellmembran zu induzieren. Ein dritter Clathrin-, Caveolin- und Dynamin-unabhängiger Prozess ist die Makropinozytose. Hierbei werden, durch das Aktin-Zytoskelett

vermittelt, große Mengen extrazellulärer Fluide und Moleküle aufgenommen (Rueda-Gensini *et al.*, 2020).

Bakterielle Erreger nutzen den Mechanismus der Endozytose unter anderem, um das Zytosol oder eine Vakuole der Wirtszellen zu erreichen. Die Invasion der Zellen schützt die Bakterien zudem vor der Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem des Wirts (Cossart *et al.*, 2014). Manche Bakterien können aus der Vakuole austreten und sich durch Rekrutierung des Aktin-Zytoskeletts intra- und interzellulär fortbewegen (Gouin *et al.*, 2005). Andere Erreger vermehren sich hingegen im Zytosol und verbreiten sich nach der Lyse der Wirtszelle weiter.

Für die Nutzung der Endozytose zur Infektion der Wirtszellen durch Bakterien werden zwei Hauptmechanismen beschrieben. Einer der beiden, der „*zipper*“-Mechanismus, setzt die Adhäsion eines bakteriellen Liganden an Rezeptoren der Wirtszelle voraus. Dies führt zum *Clustering* von Rezeptoren und einer Umhüllung („*zippering*“) des Bakteriums in die Zelle durch die Plasmamembran, und resultiert in der Einleitung verschiedener Signaltransduktionsreaktionen und dem Eintritt des Bakteriums in die Wirtszelle (Cossart 2004). Sowohl das Aktin-Zytoskelett sowie dessen Dynamik, als auch die Zusammensetzung und damit die Plastizität der Zellmembran spielen hierbei eine entscheidende Rolle (Cossart *et al.*, 2010; Pizarro-Cerda *et al.*, 2006). Ein weiterer Mechanismus ist der „*trigger*“-Mechanismus, welcher einen transienten Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle voraussetzt. Daraufhin können aktive Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) Effektoren direkt in die Zelle gebracht werden, in der sie zu einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts sowie der Zellmembran führen, in einem Prozess, welcher der Macropinocytose ähnelt (Cossart *et al.*, 2014).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung verschiedener Endozytosemechanismen durch Pinozytose.** Die Unterteilung erfolgt in Caveolin-vermittelte Endozytose (A), Caveolin-vermittelte Endozytose und Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose (FEME, CLIC/GEEC Signalweg, Arf6-assoziiert und Makropinozytose) modifiziert nach: (Rueda-Gensini *et al.*, 2020).

### 1.3.2 Manipulation des Aktin-Zytoskeletts durch bakterielle Erreger

Um in die Wirtszellen vorzudringen oder sie auch wieder zu verlassen, haben einige Erreger Mechanismen entwickelt, mit Hilfe derer sie sich die Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts zu Nutzen machen (Stradal *et al.*, 2018; Selbach *et al.*, 2005). Diese Mechanismen werden nicht nur durch die Erreger genutzt, um sich in den Zellen zu bewegen und auszubreiten, sondern oftmals werden auch die regulatorischen Mechanismen der Aktin-Polymerisation selbst untergraben (Frischknecht *et al.*, 2001). Des Weiteren können die Erreger sich auch verschiedene Signalwege zu Nutzen machen, um zu ihrem Vorteil Einfluss auf das Zytoskelett zu nehmen (Kim 2008). Hierdurch wird den Erregern letztendlich das initiale Anbinden an die Zelle ermöglicht, gefolgt von dem Eindringen in die Wirtszelle und der Fortbewegung in dieser. An den damit verbundenen Prozessen sind eine Vielzahl von Faktoren beteiligt, unter anderem die Gruppe der Aktin-modulierenden Proteine (Stradal *et al.*, 2018; Lamason *et al.*, 2017).

### 1.3.3 Manipulation von Signalwegen durch bakterielle Erreger

Die Nutzung wirtszelleigener Signalmoleküle ist eine Strategie, die von vielen pathogenen Erregern während einer Infektion ausgenutzt wird. Diesen Signalwegen liegt ein komplexes Netzwerk biomolekularer Interaktionen und molekularer Regelkreise zugrunde, das extrazelluläre Signale in intrazelluläre Antworten verarbeitet (Arkun *et al.*, 2018). Auf der anderen Seite können bestimmte konservierte Strukturen der Erreger von dem angeborenen Immunsystem des Wirts erkannt werden. Diese pathogenassoziierten molekularen Muster (*pathogen associated molecular patterns*; PAMP) werden von Wirtszellrezeptoren (*pathogen recognition receptors*; PRR) erkannt, was die Aktivierung von Signalkaskaden zur Folge hat. Beispiele hierfür sind der *pathogen recognition receptors (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, NF-κB)* Signalweg und die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) (Krachler *et al.*, 2011; Kawai *et al.*, 2010).

#### 1.3.3.1 NF-κB Signalweg

Eine wichtige Gruppe der PPR sind die *Toll-like* Rezeptoren (TLR). Diese spielen eine zentrale Rolle bei der Erkennung von Erregern sowie der Einleitung der Immunantwort (Janeway *et al.*, 2002). Werden spezifische PAMP durch die TLR erkannt, erfolgt eine Oligomerisierung von TLR-Molekülen sowie eine Rekrutierung von *downstream* Adaptermolekülen (Lu *et al.*, 2008). Dies resultiert, nach einigen Phosphorylierungsschritten, in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB durch die Ubiquitinylierung und Degradation der inhibitorischen κB-Proteine (IκB), welche vorher die Translokation von NF-κB in den Zellkern unterbinden. Dadurch wird die, durch NF-κB induzierte, Transkription verschiedener *early response* Gene, zu denen auch inflammatorische Chemokine und Zytokine, wie IL8, TNFα, IL1β, CXCL1, CXCL2 und CXCL3, zählen, ermöglicht. Weitere, im Kern lokalisierte, IκB-Proteine können dort an NF-κB binden und somit zur Regulation der Transkription an Promotoren verschiedener Zielgene, zu denen auch einige *secondary response* Gene wie die Zytokine IL6 und IL12 gehören, beitragen (Hayden 2012; Yamamoto *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2004).

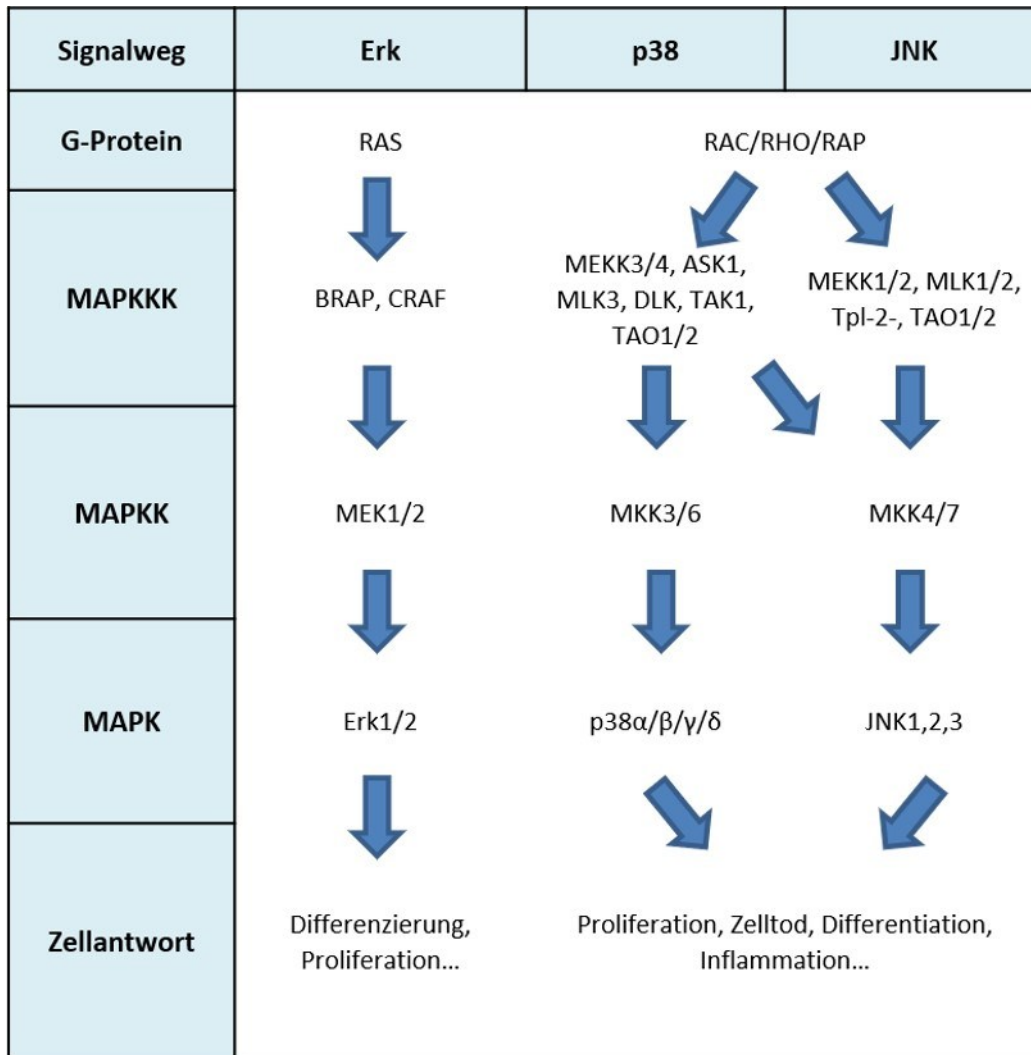


### 1.3.3.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Um auf extrazelluläre Reize zu reagieren und diese in intrazelluläre Antworten umzuwandeln, aktivieren Zellen spezifische Signalkaskaden, unter anderem auch die MAPK (Roux *et al.*, 2004). Bei den MAPK handelt es sich um Serin/Threonin Proteinkinasen, die durch diverse extrazelluläre Stimuli aktiviert werden können und für ein breites Spektrum an zellulären Antworten verantwortlich sind (Kranenburg *et al.*, 1999). Die MAPK Signalwege sind in allen eukaryotischen Zellen zu finden und regulieren diverse Prozesse wie Genexpression, Mitose, Metabolismus, Motilität, das Überleben der Zellen sowie die Apoptose und Differenzierung (Roux *et al.*, 2004). Zu den am meisten untersuchten MAPK zählen die extrazellulären Signal-regulierten Kinasen (Erk), die MAPK p38 sowie die c-Jun amino-terminalen Kinasen (JNK) (Kyriakis *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001). Trotz des breiten Spektrums an Stimuli, welche die MAPK aktivieren können, werden einige MAPK präferenziell von spezifischen Signalen aktiviert. So werden unter anderem Erk 1 und 2 (Erk1/2) meist durch Wachstumsfaktoren und Mitogene aktiviert. Die p38 Kinasen werden wiederum von Zytokinen aktiviert, JNK meist auf Grund von Stressfaktoren wie UV-Licht, Hitze oder osmotischen Schock (Chen *et al.*, 2001).

Jeder der MAPK-Signalwege umfasst drei Kinasen, welche in Serie aktiviert werden (Abbildung 4). Die Reihenfolge der Aktivierung beginnt hierbei mit einer MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), gefolgt von einer MAPK-Kinase (MAPKK) und endet in der Aktivierung der MAPK durch eine duale Phosphorylierung eines Tripeptids (Thr-X-Tyr), welches Teil des sogenannten Kinase *activation loops* ist (Roux *et al.*, 2004; Davis 2000). Als Folge eines extrazellulären Reizes erfolgt das Anschalten der ersten MAPKKK. Dies kann in Form einer Phosphorylierung stattfinden oder durch eine Interaktion mit einem kleinen GTP-bindenden Protein der Ras/Rho-Familie (Dan *et al.*, 2001; Kolch 2000).

Das Anschalten der MAPK Signalwege führt oftmals zu einer Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren. Diese werden in den Zellkern translokalisiert, was dort eine Regulierung der Transkription bestimmter Zielgene zur Folge hat. Weitere Substrate der MAPK sind unter anderem die MAPK-aktivierten Proteinkinasen (MAPKAP) sowie Phospholipasen und Proteine des Zytoskeletts. Die MAPKAP, zu denen MAPK-interagierende Kinasen (MNK), p90 ribosomale S6 Kinasen (RSK) sowie Mitogen- und Stress-aktivierte Kinasen (MSK) gehören, dienen der Amplifizierung verschiedener Signalkaskaden. Zusätzlich sind sie in der Kontrolle vieler weiterer biologischer Funktionen involviert (Cargnello *et al.*, 2011). Obwohl die MAPK einen linearen Signalweg darstellen, können sie unterschiedlichste regulatorische Einflüsse auf die Zelle haben. Faktoren hierfür sind *cross-talks* zu anderen Signalwegen, sowie die Regulation der Dauer des Signals und die intrazelluläre Lokalisation der MAPK (Katz *et al.*, 2007).



**Abbildung 4: Organisation der MAPK Signalwege** Zentral für den MAPK Signalweg sind jeweils die drei Kinasen (MAPKKK, MAPKK, MAPK) welche die Signalkaskade bilden, die den Input von G-Proteinen in verschiedene biologisch Outputs umwandeln. Modifiziert nach: (Lee *et al.*, 2020)

Der Erk-Signalweg ist einer der meist untersuchten Signalwege (Fey *et al.*, 2016; Orton *et al.*, 2005). Während der Aktivierung von Erk1/2 spielt zuerst das kleine G Protein Ras die Rolle eines *upstream*-aktivierenden Proteins. Dieses bindet an die Proteinkinase Raf, welche in diesem Signalweg die MAPKKK darstellt, gefolgt von einer MAPKK, der MAPK/Erk Kinase (MEK), die letztendlich die MAPK Erk aktiviert (Guo *et al.*, 2020). Die Aktivierung des kleinen G Proteins Ras, welches eine aktive GTP-bindende und eine inaktive Guanosin 5'-diphosphat (GDP)-bindende Konformation besitzt, kann durch viele Stimuli erfolgen. Dazu gehören unter anderem der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und die Proteinkinase C (PKC), aber auch Komponenten der Familie der Src Kinasen (Terrell *et al.*, 2019). Wird Erk1/2 durch einen Stimulus aktiviert, finden eine Dimerisierung sowie eine Translokation aus dem Zytoplasma der Zelle in den Zellkern statt. Dort reguliert Erk1/2 die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren mittels Phosphorylierung (Guo *et al.*, 2020). Erk1/2 kann jedoch auch

im Zytoplasma zurückgehalten werden, was die Regulation von verschiedenen zellulären Prozessen, einschließlich der Zellmotilität, der Struktur von Organellen, den Integrin Signalwegen und der Organisation des Zytoskeletts zur Folge hat (Pullikuth *et al.*, 2007).

Der Grund für die diversen regulatorischen Funktionen von Erk innerhalb der Zelle liegt in der Modulation des Erk Signals. Dieses kann in Dauer, Amplitude, Stabilität oder seiner Frequenz moduliert und reguliert werden und kann dadurch seine verschiedenen Rollen erfüllen (Ryu *et al.*, 2016; Ingolia *et al.*, 2004). Ein Beispiel dafür wurde in PC12-Zellen beschrieben. Hier wurde durch die Zugabe des EGF eine transiente Erk Dynamik beobachtet, während die Induktion des gleichen Signalwegs durch den Nervenwachstumsfaktor (NGF) eine anhaltende Aktivierung von Erk auslöste (Santos *et al.*, 2007; Brightman *et al.*, 2000; Roovers *et al.*, 2000). Dieses Phänomen wurde den negativen Rückkopplungsmechanismen der MAPK zugeschrieben (Brightman *et al.*, 2000).

Auch die Regulation des p38 Signalwegs kann verschiedenen Folgen für die Zelle haben. So wurde beobachtet, dass eine starke, andauernde Aktivierung oftmals in Apoptose, Seneszenz und terminaler Zelldifferenzierung resultiert, während eine schwache Aktivierung einen positiven Effekt auf das Überleben der Zelle hat (Martinez-Limon *et al.*, 2020; Haq *et al.*, 2002; Puri *et al.*, 2000). Nach der Aktivierung mittels Phosphorylierung kann p38 weitere Proteine im Zytoplasma und Nucleus phosphorylieren. Diese Aktivierung der MAPK durch Phosphorylierung des Thr-X-Tyr Motivs führt zu einer veränderten Faltung des Proteins und einer damit einhergehenden Stabilisierung des *activation loops* sowie einer daraus resultierenden höheren Kinase-Aktivität und Erkennung der Substrate (Martinez-Limon *et al.*, 2020). Dieser Prozess ist auch Voraussetzung für die Translokation von p38 in den Zellkern und ermöglicht zudem dessen Transport durch das Motorprotein Dynein (Zehorai *et al.*, 2019; Gong *et al.*, 2010). Eine Inaktivierung von p38 erfolgt wiederum durch die Dephosphorylierung des Thr-X-Thr Motivs (Zhang *et al.*, 2008).

### **1.3.3.2.1 Aktivierung und Manipulation der MAPK Signalwege durch pathogene Erreger**

Bei einer Infektion durch einen bakteriellen Erreger erfolgt zuerst die Stimulation der Mustererkennenden Rezeptoren, der PRR, durch spezifische Strukturen der Mikroorganismen (PAMP) (Arthur *et al.*, 2013). Diese PRR aktivieren sowohl den MAPK Signalweg als auch den NF- $\kappa$ B Signalweg. Dabei können sich die Mechanismen, mit welchen das Signal der verschiedenen PRR vermittelt wird, unterscheiden. Jedoch haben sie alle die Generierung einer Immunantwort zur Folge (Arthur *et al.*, 2013).

Um den Abwehrmechanismen der Wirtszellen zu entgehen, manipulieren viele pathogene Erreger deren intrazellulären Signalwege. Auch die MAPK-Signalkaskade gehört zu den Signalwegen, deren Beeinträchtigung von den Erregern zum eigenen Vorteil genutzt wird (Krachler *et al.*, 2011). Pathogene Erreger können die MAPK und NF- $\kappa$ B inhibieren, um die Immunantwort der Wirtszelle zu unterbinden, jedoch wurde auch die Aktivierung der MAPK Signalwege infolge einer Infektion beschrieben. Dies kann unter anderem eine Umordnung des Aktin-Zytoskeletts zur Folge haben sowie eine Inhibition der Apoptose und eine damit einhergehende begünstigte intrazelluläre Vermehrung der Erreger (McGuire *et al.*, 2015).

### **1.3.4 Intrazelluläre Multiplikation und Überleben der Erreger**

Pathogene Erreger vermehren sich am häufigsten mit Hilfe der extrazellulären Multiplikation. Jedoch wurde für einige Erreger auch die Vermehrung und das damit verbundene andauernde Verbleiben in den Zellen des Wirts beschrieben (Pizarro-Cerda *et al.*, 2006). Das Eindringen und die Replikation in den Zellen des Wirts hat zusätzlich eine Schutzfunktion für die Erreger, welche hierdurch nicht von dem Komplementsystem des Wirts oder zirkulierenden Antikörpern erkannt werden. Jedoch müssen trotzdem sowohl die zellulären Abwehrmechanismen der Wirtszellen überkommen werden, als auch die zelluläre Antwort auf den Erreger und die damit verbundene Inflammation überstanden werden. Letztere kann auch die Funktion der schützenden Barrieren des ZNS negativ beeinträchtigen (van Sorge *et al.*, 2012).

### **1.3.5 Zielgenaktivierung und Entzündungsreaktion**

Die Anzahl an Immunzellen im ZNS ist, im Vergleich zum Blutkreislauf, sehr gering. Trotzdem existieren unterschiedliche Zellen des Immunsystems im ZNS (Engelhardt *et al.*, 2017; Meeker *et al.*, 2012). Dazu gehören verschiedene Phagozyten, unter anderem die Mikroglia im Hirnparenchym. Im Stroma der BLS wurden zudem Makrophagen und dendritische Zellen beschrieben sowie Phagozyten an den Mikrovilli des PC (Ransohoff *et al.*, 2012). Trotz der Barrieren, die das ZNS schützen, wurden in diesem auch Immunzellen, die im nicht-inflammatorischen Zustand im Blutkreislauf vorkommen, beschrieben (Engelhardt *et al.*, 2017). Die Anzahl dieser Immunzellen im ZNS ändert sich während einer Infektion abhängig von deren Auslöser. Eine virale Meningitis korreliert meist mit einer erhöhten Anzahl an T-Zellen, während eine bakterielle Meningitis eine erhöhte Anzahl an Neutrophilen aufweist (Baunbaek Egelund *et al.*, 2017; Meeker *et al.*, 2012).

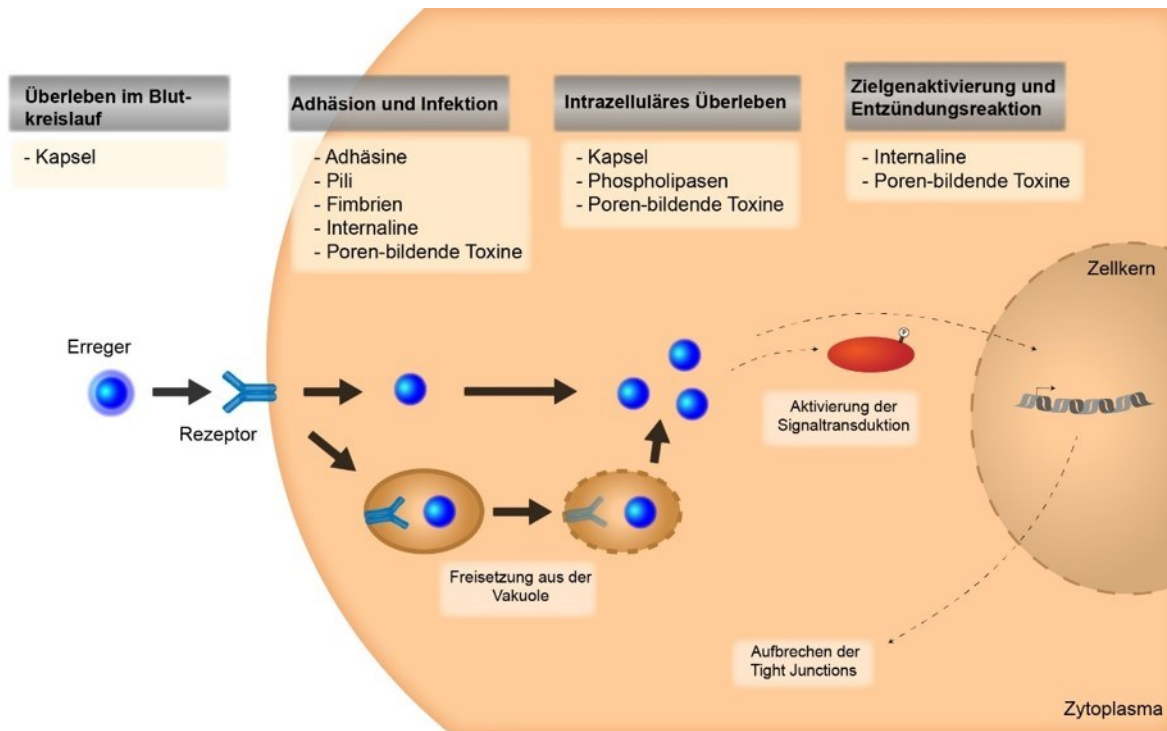
Charakteristisch für eine bakterielle Meningitis ist eine starke Immunantwort, welche zu neuronalen Schäden führen kann. Hierbei tragen unter anderem die Epithelzellen des PC zu der Immunreaktion des Wirts bei, indem sie Signalmoleküle wie Zytokine und Chemokine

abgeben (Borkowski *et al.*, 2014). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B kann, als Folge einer bakteriellen Infektion der Barrieren des ZNS, zu erhöhten Konzentrationen an inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen im Blut und im Liquor führen (Wang *et al.*, 2016). In Folge davon werden Immunzellen zum Ort der Infektion rekrutiert. Die proinflammatorische Antwort der Zellen dieser Barrieren kann unter anderem von Komponenten der bakteriellen Zellwand ausgelöst werden. Beispiele hierfür wären das Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien und Lipoteichonsäure (LTA) Gram-positiver Bakterien. Die Barrierefunktion der Zellen der BHS kann auch durch bakterielle Toxine sowie das Anschalten der inflammatorischen Signalwege als Folge der Infektion beeinträchtigt werden (Banerjee *et al.*, 2011).

Die während einer bakteriellen Meningitis ausgelösten inflammatorischen Signalkaskaden, die zu der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen sowie proteolytischen Enzymen führen, können zu Gewebeschäden führen (Doran *et al.*, 2016). Die Replikation der Erreger im ZNS kann des Weiteren zu einer Schädigung von Neuronen sowie zu Ödemen führen (Koedel *et al.*, 2002). Aus diesem Grund hat die Immunreaktion der Wirtszellen während der bakteriellen Meningitis oftmals negative Folgen für den Wirt (Doran *et al.*, 2016).

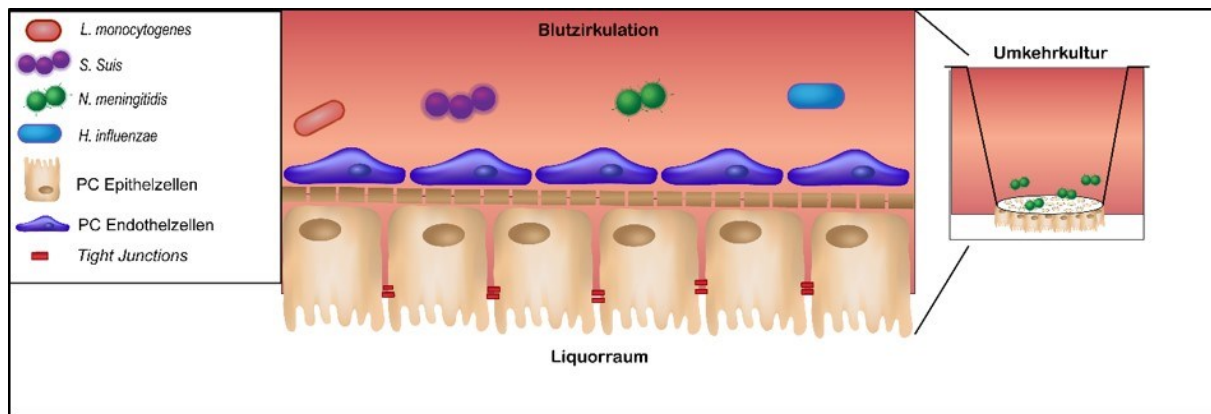
### **1.4 Infektion der Blut-Liquor-Schranke durch verschiedene Erreger**

Für viele pathogene Erreger wurde nachgewiesen, dass diese die Schranken des ZNS überwinden können. Bei diesen Untersuchungen lag der Focus bisher meist auf der BHS, die von ihrer Oberfläche her die größte Schnittstelle zwischen dem Blutkreislauf und dem ZNS darstellt. Jedoch wurde die BLS auch als möglicher Zugang für diese Erreger beschrieben (Herold *et al.*, 2019; Lauer *et al.*, 2018; Schwerk *et al.*, 2015). Dabei wurde eine Reihe an Virulenzfaktoren beschrieben, welche einen Einfluss auf die Infektion an dieser Barriere haben. Jedoch bleiben viele Aspekte der Infektion durch pathogene Erreger in diesem System weiter ungeklärt. Einige bekannte Virulenzfaktoren Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien sind in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: Übersicht diverser Virulenzfaktoren, die in den verschiedenen Phasen der Infektion von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien eingesetzt werden.** Das Überleben im Blutkreislauf wird durch die Expression der Kapsel unterstützt. Adhäsion und Infektion kann durch Adhäsine, Pili, Fimbrien, Internaline und Poren-bildende Toxine ermöglicht werden. Diese Toxine können auch bei der Freisetzung aus der Vakuole sowie dem intrazellulären Überleben der Erreger helfen. Verschiedene Virulenzfaktoren, unter anderem die Poren-bildenden Toxine sowie Internaline, können Einfluss auf die zellulären Signalwege nehmen und eine Entzündungsreaktion auslösen. Modifiziert nach: (Herold *et al.*, 2019)

Um die Interaktionen von Meningitisserregern mit der BLS zu untersuchen, wurden eine Reihe von *in vivo* und *in vitro* Modellen aus einer Vielzahl von Organismen beschrieben. Beispiele für *in vitro* Systeme sind unter anderem eine humane Papillomzelllinie des Plexusepithels (*human choroid plexus papilloma*, HIBCPP) (Ishiwata *et al.*, 2005), primäre (Haselbach *et al.*, 2001) und immortalisierte (Schroten *et al.*, 2012) porcine Plexusepithelzellen sowie primäre (Tsutsumi *et al.*, 1989) und immortalisierte (Zheng *et al.*, 2002) Plexusepithelzellen aus Ratten. In unserer Arbeitsgruppe wurde die Kultivierung der HIBCPP-Zellen auf Zellkultur-Filtereinsätzen so modifiziert, dass diese in einer Umkehrkultur (UK) angezogen werden konnten (Abbildung 6). Dies ermöglicht eine basolaterale Infektion der Zellen nach Zugabe von Erregern im oberen Kompartiment der Filtereinsätze.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der BLS.** Rechts die Darstellung der Kultivierung auf Filtereinsätzen, links das korrespondierende Schema der entsprechenden Anatomie, in welchem die PC Epithelzellen und das fenestrierte PC Endothel dargestellt sind. Beispielhaft sind Gram-positive und Gram-negative Erreger gezeigt, für welche eine Infektion des *in vitro* Zellkultursystems bereits beschrieben wurde.

### 1.4.1 *Neisseria meningitidis*

Zu den beiden humanpathogenen Spezies der Familie der *Neisseriaceae* zählen *N. meningitidis* sowie *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*; Gonokokken). Des Weiteren werden dieser Familie auch eine Vielzahl kommensaler unbekapselter Erreger zugeordnet, unter anderem *N. lactamica*, *N. mucosa* und *N. sicca*, welche die Nasopharynx des Menschen besiedeln. Anhand des Kapselpolysaccharids erfolgt eine serologische Klassifizierung der Meningokokken in 13 Serogruppen (A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, Y, W-135, X, Z) (Taha *et al.*, 2002). Die Großzahl der von Meningokokken verursachten Erkrankungen werden jedoch nur von fünf dieser Serogruppen ausgelöst. Dazu gehören die Gruppen A, B, C, W-135 und Y (Hill *et al.*, 2010). Eine weitere Unterteilung erfolgt mittels der Virulenzfaktoren PorA-, PorB sowie der LPS Subtypen (Vogel *et al.*, 2011).

#### 1.4.1.1 Pathogenese

Im Jahr 1884 wurde der Erreger *N. meningitidis* erstmals identifiziert (Marchiafava 1884). Es handelt sich hierbei um einen Gram-negativen Diplokokkus und einen obligat humanen Erreger. Die Meningokokken kolonisieren die Mukosa des Nasopharynx des Menschen und werden meist asymptomatisch in 10% der Population vorgefunden (Caugant *et al.*, 2009). Auf Grund des hohen Vorkommens der Trägerstämme in der Natur, im Vergleich zu den krankheitsverursachenden invasiven Stämmen, gelten die Meningokokken vorwiegend als kommensal (Taha *et al.*, 2002). Obwohl die Entwicklung einer Erkrankung selten ist, kann diese innerhalb von 24 h nach der Feststellung erkennbarer Symptome zum Tod oder dauerhaften Behinderungen führen (Stephens *et al.*, 2007). Dabei ist das Spektrum der

Erkrankungen, die durch die Meningokokken hervorgerufen werden können, sehr breit und kann von lokalen Infektionen bis zu schwerwiegenden, tödlichen Verläufen reichen. Der Verlauf ist primär davon abhängig, ob der Erreger in die sterilen Kompartimente des Körpers, wie das Blut, den Liquor, die Gelenksflüssigkeit oder die Herzbeutelflüssigkeit vordringen, und sich dort vermehren kann. Das Eindringen in diese Kompartimente führt zu folgenschweren Erkrankungen, zu denen die Meningitis, Sepsis, aber auch eine Arthritis oder Perikarditis zählen (Taha *et al.*, 2002). Welche der verschiedenen Serogruppen Erkrankungen in hohem Maße auslösen, ändert sich sowohl aus zeitlicher als auch aus geographischer Sicht. Eine Erklärung hierfür könnte im Immunstatus der betroffenen Population liegen. Mit dem Ausbruch von Epidemien wurde zuletzt die Serogruppe A in Verbindung gebracht. Infektionen mit diesem Serotyp wurden vermehrt in Afrika verzeichnet, 2010 wurde in Afrika jedoch ein Impfstoff gegen diesem Serotyp eingeführt, welcher zu einer Reduktion der Erkrankungen führte. In vielen industrialisierten Ländern führt noch immer die Serogruppe B zu endemisch und hyperendemischen Krankheiten und auch das Auftreten der durch Serogruppe C ausgelösten Erkrankungen kam zuletzt noch sporadisch vor, ging jedoch mit der Entwicklung eines Impfstoffs im letzten Jahrzehnt zurück (Caugant *et al.*, 2020).

### **1.4.1.2 Virulenzfaktoren von *N. meningitidis***

Um die schützenden Barrieren des ZNS zu überwinden, muss *N. meningitidis* den Blutkreislauf erreichen. Hierbei spielen verschiedene Virulenzfaktoren eine Rolle, um das Überleben des Erregers im Blutkreislauf zu gewähren und vor der Immunantwort des Wirts zu schützen, sowie die Infektion der Barrieren des ZNS zu ermöglichen. Der wichtigste Virulenzfaktor der Neisserien ist die Polysaccharidkapsel. Obwohl die Kapsel für das Überleben des Erregers im Blutkreislauf wichtig ist, hindert sie den Erreger bei der Adhäsion an und der Invasion in Wirtsgewebe (Pizza *et al.*, 2015), da die Kapsel weitere Virulenzfaktoren, mit der Ausnahme der Pili, abdecken kann. Um diese Behinderung durch die Kapsel zu umgehen, kann die Expression der Kapsel durch den Erreger stark reguliert werden (Nagele *et al.*, 2011). Auch posttranslationale Modifikationen von Oberflächenproteinen können die Virulenz und das Entkommen vor der Immunabwehr von *N. meningitidis* beeinflussen (Caugant *et al.*, 2020). Dabei können Kapsel und das LPS des Erregers durch das Anbringen von 5-N-Acetylneuraminsäure (NANA oder Sialinsäure) maskiert werden, um Strukturen des Wirts zu imitieren (Jennings *et al.*, 1999; Kahler *et al.*, 1998).

Die Invasion der Neisserien wird durch Pili und Oberflächenproteine wie Opa und Opc gefördert. Dabei werden die Typ IV Pili als essenzielle Faktoren der Adhäsion von *N. meningitidis* an Wirtszellen beschrieben (Berry *et al.*, 2015). Mit der Ausnahme von Genen,



welche in der Biosynthese der Kapsel involviert sind, wurden die meisten anderen Gene, die mit der Virulenz des Erregers assoziiert werden, auch in nicht-pathogenen Stämmen vorgefunden (Caugant *et al.*, 2020).

### 1.4.1.3 Infektion des ZNS

Um das ZNS zu erreichen, müssen *N. meningitidis* dessen schützende Barrieren überwinden. Es wurde sowohl für die BHS als auch die BLS eine Infektion mit *N. meningitidis* beschrieben (Kim *et al.*, 2019; Gomes *et al.*, 2019; Schwerk *et al.*, 2012; Stephens 2009). Im Fall der BHS wurde eine verstärkte Infektion der *N. meningitidis* Erreger der Serogruppe B (*NmB*) und Serogruppe C (*NmC*) mit einem einhergehenden Verlust der Kapsel beobachtet (Unkmeir *et al.*, 2002). In einem *in vitro* Modell der BLS wurde ebenfalls eine stärkere Infektion der Kapselmutanten beider Serogruppen beschrieben (Borkowski *et al.*, 2014; Schwerk *et al.*, 2012). Des Weiteren konnte ein Einfluss der Infektion von HIBCPP-Zellen durch *NmB* Stämme auf die Induktion der Zytokinproduktion ermittelt werden (Borkowski *et al.*, 2014). Auch bei diesem Prozess wies die Expression der Kapsel einen Effekt auf die Wirtszellantwort in HIBCPP-Zellen auf (Borkowski *et al.*, 2014).

## 1.4.2 *Haemophilus Influenzae*

*H. influenzae* ist ein Gram-negatives Bakterium, welches kommensal die oberen Atemwege besiedeln kann. Der Erreger wurde 1892 das erste Mal beschrieben und kann anhand der Polysaccharidkapsel in verschiedene Serotypen von a-f unterteilt werden (Pittman 1931; Pfeiffer 1892). Die Infektion mit *Hib* ist verantwortlich für eine Reihe an Erkrankungen, wie Epiglottitis, Septikämie sowie Meningitis, durch welche neurologische Folgeschäden, vor allem bei Kindern unter dem Alter von 5 Jahren, auftreten können (Watt *et al.*, 2009). Vor der Einführung eines Impfstoffes war die Infektion mit *Hib* für über 80% der invasiven Infektionen mit *H. influenzae* verantwortlich (Wen *et al.*, 2020).

### 1.4.2.1 Pathogenese

*H. influenzae* war der erste Organismus, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Fleischmann *et al.*, 1995). *H. influenzae* Stämme können in bekapselte Stämme oder unbekapselte Stämme (*non-typable H. influenzae*, NTHi) unterteilt werden (Pittman 1931). Die bekapselten *H. influenzae* Stämme (*typable*) können wiederum in die zuvor beschriebenen Serotypen a-f unterschieden werden. Auf Grund der Einführung eines Impfstoffes gegen *Hib*, und dem Rückgang der damit verbundenen Infektionen, wurden seither die NTHi vermehrt mit

Infektionen der unteren Atemwege in Verbindung gebracht (Wen *et al.*, 2020). Infektionen mit *H. influenzae* werden unter anderem mit Beta-Lactam und Cephalosporinen behandelt (Schotte *et al.*, 2019). Jedoch wurden molekulare Mechanismen beschrieben, die *H. influenzae* eine Resistenz gegen Beta-Lactame verleihen (Wen *et al.*, 2020; Schotte *et al.*, 2019).

#### 1.4.2.2 Virulenzfaktoren von *H. influenzae*

Auch *H. influenzae* muss die Epithelzellen der oberen Atemwege überwinden und, nachdem der Erreger im Blutkreislauf überlebt und sich verteilt hat, die schützenden Barrieren des ZNS infizieren (Doran *et al.*, 2013). Dabei nutzt *H. influenzae* eine Reihe an Virulenzfaktoren. Für das Anheften an den Zellen des Wirtes nutzt der Erreger die Kapsel sowie die Fimbrien, welche reversibel durch Phasenvariation reguliert werden (van Ham *et al.*, 1993). Die Infektion von Endothelzellen durch *H. influenzae* wird durch die Bindung an den *Platelet-activating factor* Rezeptor (PAFR) durch Phosphorylcholin vermittelt und ermöglicht auf diese Weise das Eintreten des Erregers in die Zellen der BHS (Swords *et al.*, 2001; Cundell *et al.*, 1995). Hierbei spielt die Aktivierung der  $\beta$ -Arrestin vermittelten Aufnahme des Erregers eine Rolle (Radin *et al.*, 2005). Eine weitere Interaktion zwischen Wirtszellen und *H. influenzae* wird durch die Interaktion zwischen dem Laminin-Rezeptor und dem Virulenzfaktor *outer membrane protein* (Omp) P2 vermittelt (Orihuela *et al.*, 2009). In einem *in vitro* Modell der BLS wurde die Infektion durch *Hib* durch die Präsenz der Kapsel und Fimbrien behindert (Häuser *et al.*, 2018). *In vivo* Versuche, bei welchen eine Meningitis in Ratten induziert wurde, konnten einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Permeabilität der BHS nach Zugabe von *Hib* LPS verzeichnen (Wispelwey *et al.*, 1988). Darauf folgende Studien in Ratten konnten zudem eine Zunahme der BHS Permeabilität nach Zugabe von *H. influenzae* Vesikeln der äußeren Bakterienmembran (OMV) feststellen und damit einen möglichen Transport des LPS in das ZNS durch diese Vesikel beschreiben (Wispelwey *et al.*, 1989).

#### 1.4.2.3 Infektion des ZNS

In den meisten Fällen kolonisiert *H. influenzae* die Schleimhäute der Atemwege des Menschen. Des Weiteren wurde beschrieben, dass der Erreger eine Beschädigung der TJ von Epithelzellen verursachen kann. Obwohl dies auf eine interzelluläre Überwindung der Schleimhäute hindeutet, wurde auch eine intrazelluläre Invasion beschrieben (Aubrey *et al.*, 2003). Darauf folgen die Verbreitung und das Überleben des Erregers im Blutkreislauf und eine daraus resultierende Interaktion mit den schützenden Barrieren des ZNS. Um an die Zellen dieser Barrieren erfolgreich anzuheften und diese in Folge zu infizieren, sind die Kapsel

sowie die Fimbrien des Erregers essenziell (Wegele *et al.*, 2020; Häuser *et al.*, 2018). Für die BLS wurde eine basolaterale Infektion von *Hib* in Abhängigkeit der Kapsel und Fimbrien in einem *in vitro* Modell basierend auf humanen Epithelzellen des CP gezeigt (Häuser *et al.*, 2018).

### 1.4.3 *Streptococcus suis*

Bei *S. suis* handelt es sich um ein Gram-positives zoonotisches Bakterium, welches von einer Polysaccharidkapsel umgeben ist. Auf Basis dieser Kapsel wird *S. suis* in verschiedene Serotypen unterteilt (Smith *et al.*, 1999). Resultierend aus dem Vorkommen verschiedener Antigene auf der Kapsel wird *S. suis* momentan in 35 verschiedene Serotypen klassifiziert (Dutkiewicz *et al.*, 2017). Diese Serotypen können weiter auf Grund verschiedener Sequenzen unterschieden werden, die durch *Multilocus Sequence Typing* ermittelt werden. Dabei werden die Nukleotidsequenzen verschiedener *house-keeping* Gene betrachtet und damit der evolutionäre Verwandtschaftsgrad bestimmt (Goyette-Desjardins *et al.*, 2014; King *et al.*, 2002).

Der Serotyp 2 (ST 2) stellt hierbei den am weitesten verbreiteten Serotyp unter den invasiven Isolaten dar, der sowohl für seinen primären Wirt, das Schwein, als auch für den Menschen gefährlich werden kann. Insgesamt werden 75% der Infektionen durch *S. suis* dem ST2 zugeschrieben (Goyette-Desjardins *et al.*, 2014). Der Erreger führt bei einer Infektion sowohl in Schweinen als auch beim Menschen unter anderem zu einer Meningitis. Des Weiteren können Sepsis, Endokarditis, Arthritis, Lungenentzündung und Peritonitis auftreten. Das Auftreten von Infektionen durch *S. suis* hat vor allem in asiatischen Ländern erneut an Bedeutung gewonnen (Dutkiewicz *et al.*, 2018; Dutkiewicz *et al.*, 2017).

Zum Schutz vor Infektionen durch *S. suis* existieren einige, in der Veterinärmedizin entwickelte, Maßnahmen, die primär darauf fokussiert sind Infektionen in Schweinen zu unterbinden. Dabei liegt der Fokus auf der Entwicklung eines Vakzins, um der bisherigen Überbeanspruchung von antimikrobiellen Mitteln entgegenzuwirken. Jedoch liegt noch kein Impfstoff vor, der gegen die Mehrheit an *S. suis* Stämmen Wirkung zeigt (Segura *et al.*, 2020). Dies beruht unter anderem auf der hohen Varianz der Kapselzusammensetzung der *S. suis* Stämme (Haas *et al.*, 2018; Baums *et al.*, 2006).

### 1.4.3.1 Pathogenese

Der natürliche Wirt von *S. suis* sind Schweine, deren Mandeln, Nasenhöhlen, Verdauungstrakt sowie Genitaltrakt von dem Erreger asymptomatisch kolonisiert werden können (Wertheim *et al.*, 2009). Da es sich um ein zoonotisches Bakterium handelt, kann neben der Infektion von Schweinen auch eine Infektion von Menschen stattfinden. Die ersten Fälle von, durch *S. suis* ausgelöster, Meningitis und Sepsis bei Menschen wurden 1968 beschrieben (Perch *et al.*, 1968). Die Zahl der Infektionen ist seither gestiegen (Dutkiewicz *et al.*, 2017).

Der primäre Risikofaktor für eine Infektion mit *S. suis* ist eine Arbeit in der Schweineindustrie sowie die Arbeit als Metzger oder im Schlachthof (Rayanakorn *et al.*, 2018). Zwei Ausbrüche der Erkrankung in China in den Jahren 1998 und 2005 (Yu *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2000) konnten mit Infektionswellen in der Schweinepopulation korreliert werden, die insgesamt mehr als 80.000 Tiere betrafen (Dutkiewicz *et al.*, 2017; Du *et al.*, 2017). Zudem kann der Konsum von rohem oder nicht durchgebratenem Schweinefleisch, welches oftmals Teil der traditionellen Küche in China, Thailand und Vietnam ist, zur Infektion führen (Rayanakorn *et al.*, 2018). Dies, zusammengenommen mit dem Umfang der asiatischen Schweineindustrie, die einen Großteil der weltweiten Produktion an Schweinefleisch abdeckt, ist der Grund weshalb *S. suis* der primäre Auslöser für bakterielle Meningitis in Erwachsenen in den südöstlichen asiatischen Ländern ist (Dutkiewicz *et al.*, 2017; Pappas 2013).

Auch in europäischen Ländern wurden Infektionen mit *S. suis* gemeldet, mit der höchsten Anzahl an Fällen in den Niederlanden, Großbritannien, Spanien und Frankreich (Dutkiewicz *et al.*, 2017). Das Krankheitsbild der Infektion mit *S. suis* beinhaltet Meningitis, Sepsis, das Streptokokken-induzierte toxische Schocksyndrom sowie Arthritis und Endokarditis (Huong *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2006). Auf Grund einer *S. suis* Meningitis können auch langfristige Auswirkungen auftreten. Dazu zählen vestibuläre Dysfunktion, Sehstörungen sowie partieller oder kompletter Hörverlust (Huong *et al.*, 2014).

### 1.4.3.2 Virulenzfaktoren von *S. suis*

Für den Erreger *S. suis* wurden ca. 200 Virulenzfaktoren beschrieben, die bei der Infektion des Wirts und der Entwicklung eines Krankheitsbildes eine Rolle spielen (Dutkiewicz *et al.*, 2018). Die meisten dieser Faktoren werden der Entstehung der Krankheit zugeordnet, während die Kapsel des Erregers als einziger Virulenzfaktor beschrieben wird, der essenziell zur Krankheitsentwicklung beiträgt (Smith *et al.*, 1999). Diese Erkenntnis beruht auf Experimenten in Schweinen, bei welchen die Deletion der Kapsel mit einem vollständigen Verlust der Pathogenität einherging (Smith *et al.*, 1999). Es wurde eine Schutzfunktion der Kapsel

während der Ausbreitung des Erregers im Blutkreislauf beschrieben, die durch die Maskierung von Antigenen auf der Oberfläche gewährleistet wird und somit vor der Erkennung durch das Immunsystem schützt (Fittipaldi *et al.*, 2012). Des Weiteren wird vermutet, dass *S. suis* die Expression der Kapsel kontrollieren und damit eine Anpassung an die Umgebung vornehmen kann. Dies beruht auf Studien, in welchen eine Hinderung der Adhärenz an die Zellen des Wirts (z.B. Epithelzellen) durch die Expression einer Kapsel beschrieben wurde (Fittipaldi *et al.*, 2012). Für eine hohe Konzentration an Nährstoffen, wie sie im Blutkreislauf vorliegt, wurde eine hohe Expression der Kapsel beobachtet, während die nährstoffarme Umgebung des ZNS zu einer reduzierten Expression führte (Wu *et al.*, 2014; Willenborg *et al.*, 2011).

Neben der Kapsel existieren noch weitere wichtige Virulenzfaktoren, die in vielen der virulenten ST vorgefunden werden. Zu diesen zählen Sulysin (SLY), der *extracellular factor* (EF) und das Mauraminidase-*released* Protein (MRP) (Haas *et al.*, 2018). Bei dem Virulenzfaktor SLY handelt es sich um ein porenbildendes Toxin, welches zur Lyse der Wirtszelle führen kann und somit die Invasion des Erregers unterstützt (Gottschalk *et al.*, 1995). Während der EF sekretiert wird, befindet sich MRP in der Zellwand verankert. Beide wurden mit *S. suis* Infektionen in Verbindung gebracht (Vecht *et al.*, 1991).

### 1.4.3.3 Infektion des ZNS

Um in das ZNS einzudringen, muss *S. suis* den Wirt infizieren und daraufhin diverse Barrieren aus Epithelzellen überwinden, um erst einmal in den Blutkreislauf zu gelangen. Überlebt der Erreger im Blutkreislauf kann er die BHS und die BLS erreichen. Eine Infektion der Zellen dieser beiden Barrieren durch den Erreger wurde bereits in humanen *in vitro* Modellen und in Schweinemodellen gezeigt (Schwerk *et al.*, 2012; Gottschalk *et al.*, 2010; Tenenbaum *et al.*, 2009; Vanier *et al.*, 2007).

Nachweise für die Interaktionen der in dieser Studie analysierten Gram-positiven und Gram-negativen Erreger sowie der zuvor *in vitro* in HIBCPP untersuchten *L. monocytogenes* mit der BHS und der BLS sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengefasst. Dabei liegt der Fokus auf den bisher beschriebenen Infektionsmechanismen der Erreger an den schützenden Barrieren des ZNS sowie in diesem Kontext wichtigen Virulenzfaktoren.

Tabelle 1: Nachweise für die Interaktion verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien mit der BHS und der BLS

Erreger	Infektions-mechanismen		Wichtige Virulenzfaktoren	
Gram-positiv	BHS	BLS	BHS	BLS
<i>L. monocytogenes</i>	<p>Retrograde Fortbewegung innerhalb der Axone der Hirnnerven (Drevets <i>et al.</i>, 2004)</p> <p>Transzelluläre Invasion (Drevets <i>et al.</i>, 2004)</p> <p>‘Trojan horse’ Mechanismus in Leukozyten (Drevets <i>et al.</i>, 2004)</p>	<p>Transzelluläre Invasion (Grundler <i>et al.</i>, 2013)</p> <p>Dynamamin-vermittelte Endozytose (Dinner <i>et al.</i>, 2017)</p> <p>Invasion ist von der Aktivität der MAPK Erk1/2 und p38 abhängig (Dinner <i>et al.</i>, 2017)</p>	<p>Durch Internalin (InI) B induzierte Rezeptor-vermittelte Endozytose (Cossart <i>et al.</i>, 2014)</p> <p>InIF vermittelte Interaktion mit Vimentin der Wirtszelle (Ghosh <i>et al.</i>, 2018)</p> <p>Induktion von Signalwegen durch bakterielles Cytolysin LLO (NF-κB, MAPK) (Kayal <i>et al.</i>, 2002; Weiglein <i>et al.</i>, 1997)</p> <p>Intrazelluläre Mobilität durch ActA vermittelte F-Aktin Modulation (Kocks <i>et al.</i>, 1992)</p>	<p>Durch InIA und InIB induzierte Rezeptor-vermittelte Endozytose (Dinner <i>et al.</i>, 2017; Grundler <i>et al.</i>, 2013)</p>
<i>S. suis</i>	<p>Geringe Infektionsraten <i>in vivo</i> in Schweinen (Vanier <i>et al.</i>, 2007; Vanier <i>et al.</i>, 2004).</p>	<p>Infektion <i>in vitro</i> Modellen humaner und porciner Zellen; (Schwerk <i>et al.</i>, 2012; Tenenbaum <i>et al.</i>, 2009)</p> <p>Möglicherweise ‘Trojan-horse’ Mechanismus (Wewer <i>et al.</i>, 2011)</p>	<p>Enolase erhöht Permeabilität (Sun <i>et al.</i>, 2016)</p> <p>Suilysin-induzierte Poren in der Membran (Lun <i>et al.</i>, 2003)</p>	<p>Regulierung durch Expression der Kapsel (Schwerk <i>et al.</i>, 2012; Tenenbaum <i>et al.</i>, 2009)</p>

Gram-negativ	BHS	BLS	BHS	BLS
<i>N. meningitidis</i>	Überwindung der BHS <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> (Kim 2008; Nassif <i>et al.</i> , 2002)	Überwindung der BLS <i>in vitro</i> in CP Epithelzellen (Schwerk <i>et al.</i> , 2012)  Infektion der äußeren BLS in induzierten pluripotenten Stammzell-abgeleiteten Gehirn Endothelzellen (Gomes <i>et al.</i> , 2019)	Schützende Funktion der Kapsel im Blutkreislauf und verringerte Infektionsraten (Pizza <i>et al.</i> , 2015)  Anheftung durch Pili und Oberflächenproteine (Berry <i>et al.</i> , 2015)  Infektion wird durch Proteine der äußeren Membran Opa und Opc vermittelt (Carbonnelle <i>et al.</i> , 2009)	Kapsel verringert Infektionsrate <i>in vitro</i> (Schwerk <i>et al.</i> , 2012)
<i>H. influenzae</i>	Überwindung der BHS <i>in vitro</i> (Al-Obaidi <i>et al.</i> , 2018)	Überwindung der BLS <i>in vitro</i> in CP Epithelzellen (Häuser <i>et al.</i> , 2018)	Infektion der Zellen durch Bindung an PAFR (Swords <i>et al.</i> , 2001; Cundell <i>et al.</i> , 1995)  Anheftung durch Bindung des Laminin Rezeptors (Orihuela <i>et al.</i> , 2009)	Kapsel und Fimbrien verringern Infektionsrate <i>in vitro</i> (Häuser <i>et al.</i> , 2018)  Intrazelluläre Infektion von <i>H. influenzae</i> (Häuser <i>et al.</i> , 2018)

## 1.5 Zielsetzung

Die Infektion des ZNS ist für diverse Gram-positive und Gram-negative Erreger nachgewiesen und kann eine lebensbedrohliche Meningitis auslösen. Zu ihnen gehören *S. suis*, *H. influenzae* und *N. meningitidis*. Im Verlauf der Pathogenese der Meningitis überwinden die Erreger die Barrieren zwischen dem Blutstrom und dem ZNS. Als Eintrittspforte für die Erreger wird die BLS diskutiert, deren morphologisches Korrelat die Epithelzellen des PC sind. Zur Untersuchung der Interaktion zwischen pathogenen Erregern und den Wirtszellen wurde ein funktionelles *in vitro* Modell der BLS etabliert, welches auf humanen choroidalen Papillomzellen des Plexusepithels (HIBCPP-Zellen) basiert. Dieses Modell ermöglicht die Infektion der Plexusepithelzellen von der physiologisch relevanten basolateralen Zellseite, welche die Erreger über den Blutkreislauf gelangen. In diversen Vorarbeiten unseres Labors wurde gezeigt, dass die genannten Erreger polar von der basolateralen Zellseite aus die HIBCPP-Zellen infizieren. Jedoch sind die genauen Infektionsmechanismen, sowie die molekularen Vorgänge, die während der Infektion in den Plexusepithelzellen stattfinden, noch weitestgehend ungeklärt.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf dem Vergleich der Infektionsmechanismen verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer Erreger in HIBCPP-Zellen. Auf Grund verschiedener Vorarbeiten, die auf einen Einfluss der Dynamin-vermittelten Endozytose sowie der Erk1/2 und p38 MAPK Signalwege während der Infektion mit dem Gram-positiven Erreger *L. monocytogenes* deuteten, wurde der Fokus des Vergleichs auf diese Mechanismen gelegt. Hierbei soll überprüft werden, ob die Erreger *S. suis*, *H. influenzae* und *N. meningitidis* auch eine Abhängigkeit von diesen molekularen Mechanismen der Plexusepithelzellen während der Infektion aufweisen, oder ob Unterschiede unter den Erregern, auch in Abhängigkeit der Kapselexpression, ermittelt werden können.



## 2 Material

### 2.1 Laborgeräte

Modell und Beschreibung	Hersteller
Absaugsystem Vacusafe Comfort	IBS Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Aligent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Autoclave 5075 ELV	Systec, Linden, Deutschland
Blotting Kammer	Hoefler Inc., Holliston, MA, USA
Chemilumineszenzdetektor Chemi Smart 5100	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
CO2 Inkubator Hera Cell 240	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop ApoTome Linse/ 636/1,4	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Geldokumentation Biovision-3026WL/26MX	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Gelkammer SUB-CELL®GT	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Hämazytometer (Neubauer Chamber); 0,1 mm Tiefe; 0,0025 mm <sup>2</sup>	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Heiz-/Magnetrührer VMS –C4-2	VWR, Darmstadt, Deutschland
Kühlaggregat F12/ED	Julabo, Seelbach, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Microplate Reader Infinite M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikrowelle MWG758	Clatronic, Kempen, Deutschland
pH-Meter 766 Calimetric	Knick, Berlin, Deutschland
Pipetboy Comfort	IBS Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Pipette Reference (10 µl/ 2,5 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette Research (1000 µl/ 200 µl/ 100 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Plattformschüttler Titramax 1000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Powersupply Power Pac™ Basic	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

SDS Gelelektrophorese Kammer XCell SureLock electrophoresis Novex Mini Cell	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Spektralphotometer NanoDrop® ND1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Spektralphotometer WPA biowave Co 8000	Biochrom, Berlin, Deutschland
Sterilbank Hera Save	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Thermocycler 2720	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Thermocycler MX3005P™	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Voltohmmeter Millicell® -ERS	Millipore, Billerica, MA, USA
Voltohmmeter-Elektrode MERSSTX 01	Millipore, Billerica, MA, USA
Vortex-Schüttler	VWR, Darmstadt, Deutschland
Waage CPA 623s	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Waage Extend ED2245	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad SW22	Julabo, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge – Micro 200R: 242A Rotor	Hettich, Kirchlengern, Deutschland
Zentrifuge – Picofuge® II Microfuge	Stratagene, San Diego, CA, USA
Zentrifuge – Rotana 460R: Rotor 5624	Hettich, Kirchlengern, Deutschland

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

96-Well-Platte, schwarz, unbeschichtet	Nunc, Roskilde, Dänemark
Chromatographiepapier Whatman 3mm	Maidstone, Kent, UK
Deckgläschen 24 x 50 mm	Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
Gel Saver II Tip 1-200 µl	Starlab, Hamburg, Deutschland
Impfschlinge hart, 1 µl steril	VWR, Darmstadt, Deutschland
Küvetten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Mx3000P Optical Strip Caps (120 count)	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Mx3000P Strip Tubes	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

Nitrozellulose Trans-Blot Transfermembran 0,45 µm	Bio-Rad Technologies, München, Deutschland
NUNCLON™ Surface 96-Well-Platte, DNase- und RNase-frei	Nunc, Roskilde, Dänemark
NuPAGE NOVEX 4-12 % Bis-Tris Gele 1,5 mm; 15 Well	Novex, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Objektträger Mattrand 76 x 26 mm	Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
QPCR Wellplates, non-skirted	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Röhrchen 15 ml konisch	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Röhrchen 50 ml konisch	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Röhrchen kryo 1 ml	Nunc, Roskilde, Dänemark
Safe-Lock Reaktionsgefäß 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Safe Seal Tips Professional 1250 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Schafsblutagar	Oxoid, Wesel, Deutschland
Serologische Pipetten 5 ml/10 ml/ 25 ml	Becton and Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA
Skalpell Nr.11, Einmal	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
TipOne®1000 µl XL Graduated Filter Tip (Sterile)	Starlab, Hamburg, Deutschland
TipOne®200 µl Graduated Filter Tip (Sterile)	Starlab, Hamburg, Deutschland
TipOne®100 µl Graduated Filter Tip (Sterile)	Starlab, Hamburg, Deutschland
TipOne®10 µl XL Graduated Filter Tip Max. Vol. 20 µl (Sterile)	Starlab, Hamburg, Deutschland
TipOne® RPT 1000 µl XL Graduated Filter Tip (Sterile)	Starlab, Hamburg, Deutschland
TipOne® RPT 200 µl Graduated Filter Tip (Sterile)	Starlab, Hamburg, Deutschland
TipOne® RPT 100 µl Graduated Filter Tip (Sterile)	Starlab, Hamburg, Deutschland
TipOne® RPT 10 µl XL Graduated Filter Tip Max. Vol. 20 µl (Sterile)	Starlab, Hamburg, Deutschland
Thincert Zellkultureinsätze für 24-Well Zellkultur Platten 3 µm 2 x 10E6 Poren	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

Tissue Culture Flasks 75 cm <sup>2</sup> 250 ml PS red filter cap sterile	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
6-Well Zellkultur Platten	Starlab, Hamburg, Deutschland
12-Well Zellkultur Platten	Starlab, Hamburg, Deutschland
24-Well Zellkultur Platten	Starlab, Hamburg, Deutschland

## 2.3 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden die hier aufgelisteten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienstämme eingesetzt, sowie verschiedene Deletionsmutanten. Die folgende Tabelle listet die verschiedenen Bakterienstämme, deren Ausprägung und die jeweilige Referenz auf.

Stamm	Serogruppe	Ausprägung	Referenz
<b><i>N. meningitidis</i></b>			
<b>MC58</b>	B	Wildtyp	(McGuinness <i>et al.</i> , 1991)
<b>MC58siaD<sup>-</sup></b>	Unbekapselt	Isogene siaD <sup>-</sup> Mutante des Stamms MC58	(Ram <i>et al.</i> , 2003)
<b>WUE2120</b>	C	Wildtyp	(Vogel <i>et al.</i> , 1999)
<b>WUE2120siaD<sup>-</sup></b>	Unbekapselt	Isogene siaD <sup>-</sup> Mutante des Stamms WUE2120	(Ram <i>et al.</i> , 2003)
<b><i>H. influenzae</i></b>			
<b>Stamm 770235</b>		<i>Fimbriated</i> (F+) Bekapselt (b+)	(Vanalphen <i>et al.</i> , 1988)
	Unbekapselt	F+b-	(Vanalphen <i>et al.</i> , 1988)
		F-b+	(Vanalphen <i>et al.</i> , 1988)
	Unbekapselt	F-b-	(Vanalphen <i>et al.</i> , 1988)
<b><i>S. suis</i></b>			
<b>ST2 Stamm 10</b>	2	Wildtyp („H4“)	(Smith <i>et al.</i> , 1999)
	Unbekapselt	Isogene cpsEF Mutante des Stamm 10 („H5“)	(Smith <i>et al.</i> , 1999)

## 2.4 Zelllinie

Als Modell der BLS diene in dieser Arbeit eine humane Papillomzelllinie des Plexusepithels, die HIBCPP-Zellen, welche von Ishiwata und dessen Mitarbeitern isoliert und charakterisiert wurden (Ishiwata *et al.*, 2005). Dieses *in vitro* Modell besitzt Merkmale der PC-Epithelzellen auf, welche einen hohen transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) sowie eine geringe Permeabilität für Makromoleküle aufweisen (Schwerk *et al.*, 2012).

## 2.5 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Beschreibung	Endkonzentration	Hersteller
<b>10% HIBCPP Medium:</b>		
<b>DMEM/F12 1:1 (1 x) liquid + L-Glut + 15 mM HEPES</b>		Gibco/Life Technologies™, Paisley, UK
<b>FCS (fötale Kälberserum)</b>	10% (v/v)	Gibco/Life Technologies™, Paisley, UK
<b>Humane Insulinlösung (10 <math>\frac{mg}{ml}</math>)</b>	0,05%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>1% HIBCPP Medium:</b>		
<b>DMEM/F12 1:1 (1 x) liquid + L-Glut + 15 mM; HEPES ohne Phenolrot</b>		Gibco/Life Technologies™, Paisley, UK
<b>FCS</b>	1%	Gibco/Life Technologies™, Paisley, UK
<b>Humane Insulinlösung (10 <math>\frac{mg}{ml}</math>)</b>	0,05%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>Medium zur Langzeit Aufbewahrung der HIBCPP-Zellen</b>		
<b>10% HIBCPP Medium</b>	70%	
<b>DMSO</b>	10% (v/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>FCS</b>	20% (v/v)	Gibco/Life Technologies™, Paisley, UK
<b>Trypsin 0,25% (1x) with EDTA Na liquid</b>		Gibco/Life Technologies, Paisley, UK
<b>Trypanblau</b>		Fluka/Sigma, Steinheim, Deutschland

## 2.6 Größenstandards und Ladepuffer

Beschreibung	Hersteller
<i>Gene Ruler</i> 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Novex Sharp Protein Standard	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

## 2.7 Antikörper

### 2.7.1 Primärantikörper

Beschreibung	Verdünnung	Hersteller
<b>Bakterien</b>		
Anti- <i>N. meningitidis</i> P1.7	1:1000	NIBSC, Blanche Lane, Ridge, Hertfordshire, GB
Huhn-anti- <i>N. meningitidis</i> C	1:100	(Schwerk <i>et al.</i> , 2012)
Kaninchen-anti- <i>H. influenzae</i>	1:200	Hergestellt von Immunoglobule Antikörpertechnik GmbH, Himmelstadt, Germany
Ziege-anti <i>S. suis</i>	1:100	(Schwerk <i>et al.</i> , 2012)
<b>Western blot</b>		
Kaninchen-anti-Erk1/2	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK
Kaninchen-anti-phospho-Erk1/2	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK
Kaninchen-anti-p38	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK
Kaninchen-anti-phospho-p38	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK
Kaninchen-anti-MAPKAPK2	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK
Kaninchen-anti-phospho-MAPKAPK2	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK

## 2.7.2 Sekundärantikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Beschreibung	Verdünnung	Hersteller
<b>Western blot</b>		
Esel anti-Kaninchen HRP-gekoppelt	1:5000	Millipore, Billerica, MA, USA
Esel anti-Maus HRP-gekoppelt	1:5000	Millipore, Billerica, MA, USA
<b>Fluoreszenzfarbstoffe</b>		
4', 6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI)	1:25.000	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
FITC-Inulin		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phalloidin Alexa Fluor 660	1:250	Molecular Probes, OR, USA

## 2.8 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Agarose NEEQ Ultra Quality		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Anisomycin aus <i>Streptomyces griseolus</i>		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Blockierungslösung	TBST, 1x 5% Milchpulver (w/v)	siehe TBST 20x Supermarkt
Desoxydinucleotid Triphosphat Set PCR Grade		Roche Custom Biotech, Mannheim, Deutschland
Dithiothreitol		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DPBS 1x liquid -/- Mg/Ca		Gibco/Life Technologies, Paisley, UK
Dynasore		Abcam, Cambridge, UK
Ethanol absolut		Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande

Ethidiumbromid		AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Fixierungslösung	3,7% Formaldehyd, 37% (v/v)	Neolab, Heidelberg, Deutschland
LDS Proben Puffer	NuPAGE LDS Sample Buffer, 1x	Novex, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Lyse Puffer (Phosphoproteomik)	6 M Guanidinium Hydrochlorid 10 mM Tris (2-carboxyethyl) phosphine 40 mM Chloracetamid 50 mM HEPES pH 8,5	Biogenity, Dänemark
MOPS-Laufpuffer	NuPage SDS MOPS-Laufpuffer, 1x	Novex, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Permeabilisierungslösung	DMEM/F12 1:1 (1x) + L-Glut + 15 mM Hepes 1% Bovine Serum Albumine (BSA) (w/v) 0,5% Triton X-100 (v/v)	Gibco/Life Technologies, Paisley, UK PAA Laboratories, Pasching, Österreich Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phorbol –1 –myristate 13-acetat (PMA)		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
ProLong Gold Antifade Reagent		Molecular Probes, Eugene, OR, USA
RIPA-Puffer, modifiziert	RIPA-Puffer, 1x 50 mM NaF Protease Inhibitor Cocktail, 1x 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Millipore, Billerica, MA, USA Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
RLT Lyse Puffer, modifiziert	RLT Lyse Puffer 10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol	Qiagen, Hilden, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SB203580		Merck Millipore, Billerica, MA, USA
TAE-Puffer, 1x	40 mM Tris 20 mM Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland



	1 mM EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Tris-buffered saline with Tween20 (TBST), 1x</i>	20 mM Tris (pH 7,6; HCl) 150 mM NaCl Tween20, 10% (v/v)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Transferpuffer, 1x	NuPage Transferpuffer, 1x 5 mM Methanol	Novex, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA  Merck, Darmstadt, Deutschland
U0126		Merck Millipore, Billerica, MA, USA

## 2.9 Oligonukleotid Primer

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgelistet, die von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen wurden. Diese wurden, nach Angaben des Herstellers, in deionisiertem Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt.

### 2.9.1 Primer zur Bestimmung der Identität der Bakterienstämme

Gen	Primer forward 5'→3'	Primer reverse 5'→3'	Fragmentgröße [bp]	Referenz
<i>NmB</i> siaD	CGCCTTTGCATCTGTCGTA GC	GGAGATCAGAAGTCAT AGTA	1800	
<i>NmC</i> siaD	AAATCTATAAATTGACTC	GGAGATTTGTTTAGCT	2100	
<i>H. influenzae</i> BexA	CGTTTGTATGATGTTGATC CAGACT	TGTCCATGTCTTCAAAA TGATG	343	(van Ketel <i>et al.</i> , 1990)
hifA	ATGAAAAAAACACT(AT)CT TGGTAGC	TTAT(CT)CGTAAGCAAT T(GT)GGAAACC	650	(Clemans <i>et al.</i> , 1998)
<i>S. suis</i> ORF E&F des cps	ATTGGAGATATGAGTCTAG TCGGTA	CATGACCGTCTGGGTT TACG	695	(Lakkitjar oen <i>et al.</i> , 2011)

### 2.9.2 Primer für die quantitative real-time PCR

Gen	Primer forward 5'→3'	Primer reverse 5'→3'	Fragmentgröße [bp]	Referenz
<i>il6</i>	AACCTGAACCTTCCA AAGATGG	TCTGGCTTGTTCTCACT ACT	159	(Dinner <i>et al.</i> , 2017)
<i>il8</i>	CAAGAGCCAGGAAGA AACCA	GTCCACTCTCAATCACTC TCAG	225	(Dinner <i>et al.</i> , 2017)
<i>nfbiz</i>	CAGTTCAAGTTAGCT GGCTGA	TCTGTGGAGAATACTGG TACAGG	177	(Borkowski <i>et al.</i> , 2014)
<i>zc3h12a</i>	GGCAGTGAAGTGGTT TCTGGA	GATCCCGTCAGACTCGT AGG	232	(Borkowski <i>et al.</i> , 2014)

<b><i>tnfa</i></b>	GAGCACTGAAAGCAT GATCC	CGAGAAGATGATCTGAC TGCC	234	(Borkowski <i>et al.</i> , 2014)
<b><i>gapdh</i></b>	TGTTGCCATCAATGA CCCCTT	CTCCACGACGTACTCAG CG	202	(Dinner <i>et al.</i> , 2017)

## 2.10 Kits

AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Brilliant II SYBR® Green QPCR Mastermix	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Immobilon Western Chemiluminescent HRP	Millipore, Billerica, MA, USA
LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
MACE-Seq Kit	GenXPro, Frankfurt, Deutschland
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNAse free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
Taq DNA Polymerase Kit (1000U)	Qiagen, Hilden, Deutschland

## 2.11 Software

Vision-Capt	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Chemi-Capt	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
i-control™	Tecan, Männedorf, Schweiz
MXPro	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Prism 9.0.0	GraphPad Software, Inc.
SAS system, release 9.4	SAS Institute Inc., Cary, NC, USA
Zeiss ZEN Imaging Software	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

## 3 Methoden

### 3.1 Bakterien

#### 3.1.1 Kultivierung der Bakterien

Die Bakterienanzucht erfolgte für alle Stämme in einer Übernachtkultur vor dem Tag des Infektionsversuchs. Dabei wurden die verschiedenen Bakterienstämme unterschiedlich angesetzt.

##### 3.1.1.1 *N. meningitidis*

Zum Anzüchten der *N. meningitidis* Stämme der Serogruppen B (MC58, MC58siaD<sup>-</sup>) und C (WUE2120, WUE2120siaD<sup>-</sup>) wurden Kryostocks der verschiedenen Stämme auf Schokoagarplatten ausgestrichen und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Am Tag des Infektionsversuchs wurden mehrere einzeln gewachsene Kolonien mit Hilfe einer Impföse abgenommen und in 10 ml 1% HIBCPP Medium überführt. Dieses wurde für 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 1% HIBCPP Medium resuspendiert und dessen optische Dichte (OD) mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Für jeden Bakterienstamm wurde bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) eine bestimmte OD eingestellt (Tabelle 2), damit im Infektionsversuch eine festgelegte *Multiplicity Of Infection* (MOI) erreicht werden konnte. Mit diesem Inokulum, welches auf die vorgegebene OD eingestellt wurde, erfolgte die Infektion der Zellen. Zur Überprüfung der Zahl lebender Bakterien (*Colony Forming Units* - CFU) zu Beginn sowie während des Infektionsexperiments wurden Wachstumskurven erstellt, welche die Bedingungen des jeweiligen Experimentes widerspiegeln. Hierfür wurden serielle Verdünnungen auf bis 10<sup>-6</sup> des Inokulums zu Beginn sowie entsprechende Ansätze zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments auf Schokoagarplatten ausplattiert. Diese Platten wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert und die Kolonien am nächsten Tag quantifiziert.

##### 3.1.1.2 *H. influenzae*

Die vier verschiedenen *H. influenzae* Stämme (F+b+, F+b-, F-b+, F-b-) wurden, wie in 3.1.1.1 beschrieben, über Nacht auf Schokoagarplatten angesetzt und am nächsten Tag auf die in Tabelle 2 beschriebene OD eingestellt. Auch hier wurden die CFU mit Hilfe von Wachstumskurven gleichermaßen bestimmt.

### 3.1.1.3 *S. suis*

Die zwei verwendeten *S. suis* Stämme (H4, H5) wurden, im Gegensatz zu den Gram-negativen Bakterienstämmen, in einer Flüssigkultur über Nacht angezogen. Hierfür wurde am Tag vor dem Infektionsexperiment ein Aliquot aus dem Kryostock in 10 ml Todd Hewitt Broth (THB) angesetzt und für 6 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Am Tag des Infektionsexperiments wurde dieser Ansatz zunächst 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert und das Pellet daraufhin wieder in 1% HIBCPP Medium gelöst. Die weiteren Schritte entsprachen dem in 3.1.1.1 beschriebenen Vorgehen und unterschieden sich lediglich in der eingestellten OD, wie in Tabelle 2 beschrieben, und den Schafsblut-Agarplatten, die für die Wachstumskurve verwendet wurden.

**Tabelle 2: Auflistung der OD der Inokuli, die jeweils im Infektionsexperiment einer MOI 10 entsprachen.** Bei Experimenten mit einer MOI 100 wurde die OD<sub>600</sub> des Inokulums entsprechend mit dem Faktor 10 angepasst.

Bakterium	Stamm	OD <sub>600</sub> (Inokulum; MOI 10)	Eingesetztes Inokulum
<i>N. meningitidis</i>	MC58	0,07	40 µl
	MC58siaD <sup>-</sup>	0,12	40 µl
	WUE2120	0,1	40 µl
	WUE2120siaD <sup>-</sup>	0,1	40 µl
<i>H. influenzae</i>	F+b+	0,1	40 µl
	F+b-	0,1	40 µl
	F-b+	0,1	40 µl
	F-b-	0,1	40 µl
<i>S. suis</i>	H4	0,65	10 µl
	H5	0,65	15 µl

### 3.1.2 Aufbewahrung in Dauerkulturen

Für die verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, wurden Dauerkulturen zu deren Aufbewahrung angefertigt. Im Folgenden werden diese für die verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Stämme beschrieben.

Um Bakterienaliquots für Dauerkulturen herzustellen, wurden die Neisserien Stämme, wie in 3.1.1.1 beschrieben, aus einer Übernachtskultur angesetzt und auf die in Tabelle 2 beschriebene OD eingestellt. Dieser Suspension wurde als Einfriermedium Glycerin hinzugefügt, entsprechend einer Endkonzentration von 15%. Von dieser Suspension wurden pro Kryotube 100 µl der Suspension aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Die Dauerkulturen für die *H. influenzae* Stämme wurden gleichermaßen angesetzt wie die der *N. meningitidis* Stämme. Die *S. suis* Stämme wurden wie in 3.1.1.3 beschrieben angesetzt und auf eine OD 0,65 eingestellt. Dieser Suspension wurde Glycerol entsprechend einer Endkonzentration von 20% hinzugegeben, und als jeweils 100 µl Aliquots in Kryotubes bei -80°C aufbewahrt.

### 3.1.3 Überprüfung der Identität der Bakterienstämme

Die Überprüfung der Identität der Bakterienstämme wurde in regelmäßigen Abständen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde jeweils eine Kolonie des über Nacht auf der entsprechenden Agar-Platte herangezogenen Bakterienstamms abgenommen und in 50 µl PBS aufgenommen. Diese Suspension wurde daraufhin für 15 min bei 99°C gekocht, um die Desoxyribonukleinsäure (DNA) freizusetzen sowie die Bakterien abzutöten. Der Ansatz für die PCR-Reaktionen wird in der folgenden Tabelle 3 beschrieben. Die verwendeten Primer werden in 2.9.1 aufgeführt.

**Tabelle 3: PCR-Ansatz zur Verifizierung der Bakterienstämme.** Pipettierschema für eine PCR-Reaktion mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl.

Ansatz für 1x PCR Reaktion	
<b>Puffer (10x)</b>	2 µl
<b>10 mM dNTP- Mix</b>	0,8 µl
<b>forward+ reverse Primermix (jeweils 10 µM)</b>	2 µl
<b>Taq-Polymerase</b>	0,8 µl

<b>A.dest</b>	0,2 µl
<b>DNA</b>	x
$\Sigma$	20 µl

In Tabelle 4 wird beschrieben, welches Programm zur Durchführung der PCR verwendet wurde. Dabei wurde die Annealing Temperatur entsprechend der Spezifikationen der Primer angepasst. Das Programm wurde im Thermocycler 2720 durchgeführt.

**Tabelle 4: Programm zur Durchführung der PCR.**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
<b>Initiale Denaturierung</b>	95°C	5 min	1
<b>Denaturierung</b>	95°C	1 min	35
<b>Annealing</b>	40-60°C	1 min	35
<b>Elongation</b>	72°C	2 min	35
<b>Finale Elongation</b>	72°C	7 min	1
<b>Lagerung</b>	4°C	$\infty$	

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5% Ethidiumbromid-Agarosegel aufgetragen und bei 120 V für 40 min aufgetrennt. Die Banden wurden mit Hilfe eines Geldokumentationssystems visualisiert und mit der *VisioCapt* Software aufgenommen.

## 3.2 HIBCPP-Zellen

### 3.2.1 Kultivierung der Zellen

Die HIBCPP-Zellen wurden in T75 Zellkulturflaschen in 10% HIBCPP Medium kultiviert. Zum Aufteilen der Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit DPBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen. Daraufhin wurden 3 ml Trypsin zugegeben und die Zellkulturflaschen im Inkubator bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert bis sich die Zellen gelöst hatten. Die Reaktion wurde dann mit 7 ml 10% HIBCPP Medium abgestoppt und die Suspension für 10 min bei 500 rpm zentrifugiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden vor der Zentrifugation 10  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension entnommen und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Anzahl der lebenden Zellen ermittelt. Damit die Vitalität der Zellen bestimmt werden konnte, wurde zuerst eine Trypanblaufärbung der zu zählenden Zellen durchgeführt. Nach dem Ende der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10% HIBCPP Medium auf eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Diese Suspension wurde nun verwendet, um die Kultivierung der HIBCPP-Zellen weiterzuführen oder, um die Zellen für verschiedene Versuche auszusäen.

Zur Kultivierung der HIBCPP-Zellen in der UK auf Zellkultureinsätzen für 24-Well (bzw. 12-Well) Zellkulturplatten (3  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser,  $2 \times 10^6$  Poren/ $\text{cm}^2$ ), wurden die Zellkultureinsätze zuerst über Kopf in 12-Well (6-Well) Platten platziert und die Wells mit 10% HIBCPP Medium befüllt, bis die Filtermembran von unten mit Medium benetzt war. Zusätzlich wurde die Membran auch auf der oberen Seite mit Medium benetzt. Darauffolgend wurden 100  $\mu\text{l}$  ( $1 \times 10^5$  Zellen) der eingestellten Zellsuspension von oben auf die Filtermembran pipettiert. Die Zellkultureinsätze wurden an dem darauffolgenden Tag gedreht und in 24-Well (12-Well) Platten überführt, die zuvor mit dem konditionierten Medium der bisher benutzten Platte befüllt wurden. Für die Kultivierung auf den Zellkultureinsätzen, sowie während der Experimente, betrug das Volumen des Mediums im Well 1 ml (2,5 ml) und das im Filtereinsatz 500  $\mu\text{l}$  (1250  $\mu\text{l}$ ). Zu Beginn der Experimente entsprach die Zellzahl auf den Einsätzen  $4 \times 10^5$  ( $1 \times 10^6$ ) Zellen. Für alle Experimente in dieser Arbeit wurden HIBCPP-Zellen der Passagen 22-35 verwendet.



### 3.2.2 Aufbewahrung in Dauerkulturen

Um die Zellen in Dauerkultur aufbewahren zu können, wurden diese, nach der unter 3.2.1 beschriebenen Trypsin-Behandlung und anschließender Zentrifugation, auf Eis in 10% FCS HIBCPP Medium, 20% (v/v) FCS, und 10% (v/v) DMSO gelöst. Die Zellzahl der Aliquots entsprach dabei  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml. Damit die Zellen möglichst schonend eingefroren werden können, wurden diese zunächst bei  $-20^\circ\text{C}$  und danach bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert, bis sie schließlich dauerhaft in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

### 3.2.3 Überprüfung der Barrierefunktion der HIBCPP-Zellen

#### 3.2.3.1 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands

Um die Barrierefunktion der HIBCPP-Zellen auf den Zellkultureinsätzen zu überprüfen, wurde der TEER gemessen. Dieser wird von der Konfluenz der Zellen sowie der Integrität der TJ beeinflusst, und wurde zunächst 4-5 Tage nach dem Aussähen der Zellen überprüft. Hierfür wurde ein Epithelgewebe Volt-/Ohmmeter verwendet. Die Elektrode des Messgeräts wurde zuerst in 80% Ethanol sterilisiert und daraufhin mit sterilem Zellkulturmedium gespült. Durch die Messung des TEER wird der ausgebildete Widerstand der Zellschicht gemessen, von dem der Leerwert (Widerstand eines Einsatzes ohne Zellen) noch abgezogen werden muss. Um eine einheitliche Darstellung des Widerstands mit Bezug auf die unterschiedlichen Größen der verwendeten Zellkultureinsätze zu gewährleisten, wurde der gemessene Widerstand noch auf die Fläche der Membran bezogen und in  $[\Omega \cdot \text{cm}^2]$  angegeben. Wurde ein Widerstand von ca.  $70 \Omega \cdot \text{cm}^2$  ermittelt, so wurden die Zellkultureinsätze in 1% HIBCPP Medium umgestellt. Diese Reduktion des Serumgehalts (*serum starvation*) wurde schon bei der Kultivierung von porzinen Plexusepithelzellen durchgeführt und hat eine Steigerung der Barrierefunktion zur Folge (Gath *et al.*, 1997). Die Infektionsversuche wurden durchgeführt, wenn am darauffolgenden Tag ein Widerstand zwischen mindestens  $230 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und maximal  $770 \Omega \cdot \text{cm}^2$  erreicht worden war. Zu Beginn und am Ende jedes Infektionsversuchs wurde der TEER erneut bestimmt.

#### 3.2.3.2 Messung der parazellulären Permeabilität

Als weiteres Maß zur Bestimmung der Barrierefunktion wurde die Messung der parazellulären Permeabilität herangezogen. Zu diesem Zweck wurde der Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelte Marker (FITC-Inulin) verwendet. Dieser wurde zu Beginn eines Versuchs als  $50 \mu\text{g/ml}$  FITC-Inulin, gelöst in 1% HIBCPP Medium, angesetzt und in den Filtereinsatz gegeben. Am Ende des Experiments wurde Medium aus dem unteren Kompartiment genommen um

damit zu bestimmen, welche Menge FITC-Inulin die Barriere passieren konnte. Dadurch können Rückschlüsse auf die Barriereintegrität gezogen werden. Durch die Messung der Absorption in einem Tecan Infinite M200 Mikroplatten-Lesegerät, wurde mit Hilfe einer Standardkurve der prozentuale Anteil des Farbstoffes bestimmt, der in das untere Kompartiment gelangt war.

### **3.2.4 Behandlung/ Stimulation der HIBCPP-Zellen**

Am Tag der Infektion wurden, wie unter 3.2.3.1 beschrieben, die TEER gemessen und alle Zellkultureinsätze verwendet, deren TEER zwischen 230  $\Omega\cdot\text{cm}^2$  und 770  $\Omega\cdot\text{cm}^2$  lag. Die Einsätze wurden nach der Messung in eine Platte mit frischem 1% HIBCPP Medium gesetzt und eine Stunde im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> ruhen gelassen, um einen möglichen Einfluss des Stresses durch das Umstellen auszuschließen.

Zur Untersuchung der Endozytosemechanismen, die von den unterschiedlichen Bakterienstämmen genutzt werden, wurde der Dynamininhibitor Dynasore in einer Endkonzentration von 120  $\mu\text{M}$  verwendet. Um des Weiteren den Einfluss der Erk1/2 und p38 MAPK Signalwege zu untersuchen, wurden die Inhibitoren U0126 und SB203580 in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  oder 50  $\mu\text{M}$  verwendet, jeweils in Abhängigkeit von den verschiedenen eingesetzten Bakterienstämmen. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte immer eine Stunde vor Zugabe der Bakterien. Dynasore wurde nach dieser Stunde abgenommen und das Filterkompartiment mit 1% HIBCPP Medium gewaschen bevor die Bakterien zugegeben wurden. Die MAPK Inhibitoren blieben während des gesamten Versuchs im Filterkompartiment. Zur Aktivierung der beiden MAPK Signalkaskaden wurden die Zellen jeweils 2 h mit 200 nM PMA zur Aktivierung von Erk1/2 oder mit 25  $\mu\text{g/ml}$  Anisomycin zur Aktivierung von p38 behandelt. Dies diente als Positivkontrolle, um die Wirkung der MAPK Inhibitoren bestätigen zu können.

### **3.2.5 Infektion der HIBCPP-Zellen**

Die Infektion der HIBCPP-Zellen erfolgte, wie unter 3.2.4 beschrieben, entweder nach dem Umsetzen der Filtereinsätze in 1% HIBCPP Medium und einer Stunde Ruhen im Inkubator oder nach der zusätzlichen Behandlung der Zellen. Für die Experimente in den 24-Well Platten wurde für jeden Versuch das Medium in Well und Filtereinsatz so vorgelegt, dass nach Zugabe des FITC-Inulins, der Bakteriensuspension und der Inhibitoren definierte Volumina von 1 ml im Well und 500  $\mu\text{l}$  im Filtereinsatz vorhanden waren. Für die Versuche in den 12-Well Platten wurden alle Angaben mit dem Faktor 2,5 multipliziert.

Während der Infektionsversuche wurden verschiedene MOI eingesetzt. Hierfür wurde die Bakteriensuspension, wie in 3.1.1 beschrieben, auf eine zuvor experimentell bestimmte  $OD_{600}$  eingestellt. Das Wachstum der Bakterien wurde während des gesamten Infektionsexperiments mit Hilfe von Wachstumskurven überprüft (siehe 3.1.1). Zusätzlich zum Wachstum der Bakterien in 1% HIBCPP Medium wurde auch der Einfluss der Inhibitoren auf das Wachstum der Bakterien getestet. Zu diesem Zweck wurden die Wachstumsraten der Bakterien in An- und Abwesenheit des Inhibitors verglichen. Zum Errechnen der Anzahl intrazellulärer Bakterien wurde eine Quantifizierung der invadierten Erreger mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung (DIF), bezogen auf die Anzahl der Bakterien zu Ende des Experiments, wie in der Wachstumskurve ermittelt, herangezogen.

### 3.2.6 Vitalitätsprüfung

Um die Vitalität der HIBCPP-Zellen nach bestimmten Behandlungen oder Stimuli zu überprüfen, wurde ein *Life/Dead* Assay verwendet. Hierzu wurde das LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit nach Anweisung des Herstellers angewandt. Durch den Einsatz zweier Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht dieser Assay die Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen. Hierbei beruht die Funktionsweise auf der ubiquitären intrazellulären Aktivität der Esterase sowie einer intakten Zellmembran. In lebenden Zellen wird der Calcein-Acetoxy-methylester durch die Esterase in Calcein umgesetzt, was eine Emission im grünen Bereich (515 nm) zur Folge hat. Bei einem Verlust der Integrität der Zellmembran kann das rot fluoreszierende Ethidium-Homodimer-1 in die Zelle gelangen. Die dortige Bindung an Nukleinsäuren hat eine 40-fache Intensivierung der Fluoreszenz zur Folge. Nach Ende des Versuchs wurden die Zellen zunächst mit serumfreiem Medium (SFM) gewaschen. Daraufhin folgte eine Inkubation mit den beiden Farbstoffen (2  $\mu$ M Calcein-Acetoxy-methylester, 4  $\mu$ M Ethidium-Homodimer-1) für 15 min bei 37°C im Dunkeln. Nach weiterem zweimaligem Waschen in SFM wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei zehnfacher Vergrößerung betrachtet. Anhand der jeweiligen rot/grün-Färbung wurde die Vitalität der Zellen festgestellt.

## 3.3 Zell- und Molekularbiologische Methoden

### 3.3.1 Immunfluoreszenzfärbungen

#### 3.3.1.1 Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Die DIF wurde am Ende der Infektionsexperimente durchgeführt, um die adhärenenten sowie die sich in den Zellen befindlichen Bakterien quantifizieren zu können (Schwerk *et al.*, 2012). Hierfür wurden die Filtereinsätze am Ende des jeweiligen Infektionsexperiments zuerst zwei Mal mit einer 1% Lösung Bovines Serumalbumin (BSA) (w/v) in SFM (1% SFM/BSA) gewaschen. Darauf folgte ein Inkubationsschritt in 1% BSA/SFM für 20 min, um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper zu blockieren. Die Filtereinsätze wurden daraufhin für 20 min im primären Antikörper inkubiert. Dieser wurde zuvor in 1% BSA/SFM verdünnt. Die Verdünnungen der Primärantikörper für die verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten, Erreger finden sich in 2.7.1. Nach Ende der Antikörperinkubation wurden die Zellen noch zwei weitere Male mit 1% BSA/SFM gewaschen, gefolgt von einem Waschschrift in SFM, um ungebundenen Erstantikörper zu entfernen. Die Fixierung der Zellen erfolgte für 10 min in 3,7% Formaldehyd gelöst in destilliertem Wasser. Anschließend wurden die Filter zwei weitere Male in PBS gewaschen. Daraufhin konnten die Filtereinsätze in PBS bei 4°C für bis zu einer Woche gelagert werden.

Vor Beginn des zweiten Teils des Färbeprotokolls der DIF wurden die Membranen der Filtereinsätze, auf welchen sich die fixierten Zellen befanden, mit einem Skalpell ausgeschnitten und zurück in das PBS transferiert. Zum Waschen der Membranen wurde eine Lösung aus 1% BSA (w/v) in DPBS verwendet (1% BSA/PBS). Die Membranen wurden zuerst drei Mal mit der beschriebenen 1% BSA/PBS Lösung gewaschen, gefolgt von einer 30 min Inkubation mit einem Alexa Fluor 594 gekoppelten Sekundärantikörper, welcher den im ersten Teil der Färbung eingesetzten Primärantikörper erkennt (siehe 0). Damit wurden die, an der Zellmembran adhärenenten, nicht invadierten Bakterien markiert. Darauf folgten erneut drei Waschschriffe mit 1% BSA/PBS Lösung. Um die invadierten Erreger zu detektieren, wurde die Zellmembran anschließend 10 min mit der Permeabilisierungslösung (siehe 2.8) aufgeschlossen. Nach weiteren zwei Waschschriffen mit 1% BSA/PBS Lösung erfolgte eine 20 min Inkubation in 1% BSA/PBS, um erneut unspezifische Bindungen zu blockieren. Daraufhin wurden die Membranen 30 min mit dem Primärantikörper inkubiert, der, wie im ersten Teil der Färbung, in 1% BSA/SFM in der gleichen Verdünnung (2.7.1) vorlag. Hierbei wurden die intrazellulär lokalisierten Erreger angefärbt. Nach erneutem dreimaligem Waschen in 1% BSA/PBS folgte die letzte Färbung der Membranen. Neben den extrazellulär und

intrazellulär lokalisierten Erregern, wurden in diesem Schritt auch das Aktin Zytoskelett und die Zellkerne gefärbt. Zu diesem Zweck wurden die Membranen 1 h in einer Lösung inkubiert, welche einen Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundäntikörper sowie die Fluoreszenzfarbstoffe Phalloidin Alexa Fluor 660 und DAPI enthielt. Letztere sind in 0 beschrieben. Somit wurden die adhärenierten Bakterien, die sich in der Zelle befindlichen Bakterien, und auch das Aktinzytoskelett und der Zellkern angefärbt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Filtermembranen in ProLong Gold Antifade Reagent auf Objektträgern eingebettet.

Die Infektionsrate der Bakterien wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops bei 63x Vergrößerung vorgenommen. Für jede Filtermembran wurde die Zahl der invadierten Bakterien innerhalb 20 Blickfelder ermittelt. Von der Fläche der ausgezählten Blickfelder wurde auf die Anzahl der interzellulären Erreger auf der gesamten Filtermembran hochgerechnet. Die prozentuale Invasionsrate der Bakterien ermittelte sich dann aus diesem Wert im Verhältnis zu der, aus der Wachstumskurve ermittelten, Anzahl der Bakterien zu Ende des Versuchs.

### **3.3.2 Herstellung von Proteinlysaten**

Um Proteinlysate herzustellen, wurden die Zellen nach Ende eines Versuchs zunächst mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde der Lysepuffer hinzugegeben, bei welchem es sich um einen modifizierten RIPA-Puffer handelte. Im Fall der 24-well Filtereinsätze wurden zwei Mal 75 µl auf die mit den Zellen bewachsene Seite der Membran gegeben und nach 1 min Inkubation mit der Pipettenspitze abgekratzt. Die insgesamt 150 µl Lysepuffer wurden daraufhin in ein 1,5 ml Eppendorf Tube transferiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Wurden die Zellen auf größeren Filtereinsätzen (12-well) oder in Zellkulturplatten kultiviert, wurde die Menge des Lysepuffers entsprechend der Oberfläche angepasst. Die Proteinlysate wurden auf Eis wieder aufgetaut, in einem Vortexer gemischt und 10 min bei 4°C und 14.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Tube pipettiert, um somit das gelöste Protein von den Zelltrümmern zu trennen.

### **3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration von Proben wurde mit Hilfe des DC Proteinassay Kits ermittelt, welches auf Basis der Lowry-Methode funktioniert (Lowry 1951). Die Bestimmung der Proteinkonzentration basiert hier auf einem kolorimetrischen Test, der im ersten Schritt, der Biuretreaktion, auf Grund der Reaktion der Peptidbindungen mit den Cu<sup>2+</sup>-Ionen eine alkalische Kupfertatratlösung bildet. Hierfür wurden 2 µl des Proteinlysats mit 20 µl des

Gemischs der Reagenzien A+S (20 µl Reagenz S je 1 ml Reagenz A) des Kits in einer 96-Well-Mikrotiterplatte gemischt. Anschließend wurden 200 µl des Reagenz B hinzugegeben, welche die typische Farbreaktion auslöst, die auf der Reduktion des  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  beruht und zu einer Reduktion der gelben Fiolinreagenz (Reagenz B) zu Molybdänblau führt. Mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegerät wurde die Intensität der Blaufärbung bestimmt, die proportional zu der Proteinkonzentration ist. Um diese Werte mit den tatsächlichen Konzentrationen zu korrelieren, wurde parallel eine Eichkurve gemessen, die aus mehreren Verdünnungen einer 10 mg/ml Lösung von BSA in dem modifizierten RIPA-Lysepuffer hergestellt wurde.

### 3.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblot

Um die Expression bestimmter Proteine zu untersuchen, wurden diese zunächst anhand ihres Molekulargewichts mit Hilfe der SDS-PAGE im elektrischen Feld aufgetrennt. Hierfür wurden die Proben zunächst in 1x LDS Probenpuffer, versetzt mit 50 µM Dithioereitol, angesetzt. Hierbei wurde die gleiche Menge Gesamtprotein für jede Probe angesetzt und später auf dem Gel aufgetragen. Unmittelbar vor dem Auftragen wurden die Proben für 5 min auf 99°C erhitzt und daraufhin für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Zusätzlich zu den Proben wurde auch der Größenstandard *Novex Sharp Protein Standard* aufgetragen, um später die Proteine auf Grund ihres Molekulargewichts identifizieren zu können. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 12% Bis-Tris Gelen in 1x MOPS-Laufpuffer bei einer angelegten Spannung von 200 Volt. Der Transfer der Proteine von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran fand in einer Tankblotapparatur statt. Diese wurde mit Transferpuffer gefüllt, welcher auf 4°C gekühlt wurde. Der Transfer fand bei 20 Volt für 16 h oder bei 400 mA für 150 min statt.

Nach Ende des Transfers wurden die Membranen entsprechend der Größe des zu untersuchenden Proteins geschnitten und für eine Stunde in Magermilchpulverlösung (5% in 1x TBST-Puffer) oder in einer 5% BSA-Lösung in 1x TBST inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Zur Detektion der Zielproteine wurden die Membranen daraufhin bei 4°C über Nacht schüttelnd mit den entsprechenden Primärantikörpern (siehe 2.7.1) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Membranen 3 Mal in 1x TBST gewaschen, gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit den spezifischen Sekundärantikörpern (anti-Kaninchen- bzw. anti-Maus-*Horseradish Peroxidase* (HRP) - gekoppelter-Antikörper). Die chemische Reaktion, die auf Grund der HRP, nach Zugabe des Substrats in Form des *Immobilon Western Chemiluminescent Kits* stattfand, wurde mit Hilfe eines Chemolumineszenz Detektors *Chemi Smart 5100* und der Software *ChemiCapt 5000* gemessen.

### 3.3.5 RNA Isolierung

Nach dem Ende eines Infektionsexperiments wurden zunächst die Filtereinsätze in DPBS gewaschen. Daraufhin wurden die Filter über Kopf platziert, damit die mit den Zellen bewachsene Seite der Membran nach oben zeigte. Auf die Membran wurden 75 µl modifizierter RLT-Puffer gegeben, und nach einer einminütigen Inkubation wurde dieser in Kreisbewegungen über die Membran geführt und der Puffer dabei auf und abpipettiert, um die Zellen zu lösen. Dies wurde mit weiteren 75 µl wiederholt und die Suspension anschließend direkt in flüssigem Stickstoff gefroren. Vor der Isolation der Ribonukleinsäure (RNA) wurden die Proben auf Eis aufgetaut.

Zur Isolation der RNA nach Infektionsexperimenten wurde das *RNeasy* Mini Kit von Quiagen verwendet. Die Isolation der RNA erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Im ersten Schritt wurde die RNA gewaschen und durch einen Zentrifugationsschritt an die Silikamembran der Säule gebunden. Um eine Kontamination der RNA mit Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu vermeiden, wurden die Membranen 15 min mit DNase I inkubiert. Es folgten mehrere Waschschriffe, um mögliche DNase und Pufferester zu entfernen. Zum Abschluss wurde die Membran eine Minute mit 18 µl RNase-freiem Wasser inkubiert und die RNA schließlich in einem letzten Zentrifugationsschritt eluiert. Um die Konzentration der isolierten DNA zu bestimmen, wurde das Ultraviolett (UV)-Spektrophotometer Nanodrop® ND1000 verwendet.

#### 3.3.1 cDNA Synthese

Die isolierte RNA wurde unter Anwendung des *AffinityScript* QPCR cDNA Synthese Kits gemäß der Anleitung des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden 0,5 µg der RNA eingesetzt, welche revers transkribiert wurde. In Tabelle 5 sind die einzelnen Komponenten der Reaktion aufgelistet.

Tabelle 5: Ansatz für eine cDNA Reaktion.

Ansatz für 1x cDNA Reaktion	
Erststrangmastermix (2x)	10 µl
Oligo dT Primer	3 µl
AffinityScript Reverse Transkriptase/ RNase Block Enzymmix	1 µl
RNA	x µl
RNase-freies H <sub>2</sub> O	x µl
Σ	20 µl

Tabelle 6 beschreibt das Programm, welches für die cDNA Synthese angewandt wurde. Hierfür wurde der Thermocycler 2720 verwendet. Die cDNA wurde nach Ende der Reaktion bei -20°C gelagert.

Tabelle 6: Programm zur Durchführung einer cDNA Reaktion.

Programm für die PCR	Temperatur	Zeit
Primer Annealing	25°C	5 min
cDNA-Synthese	42°C	15 min
Ende der Reaktion	95°C	5 min
Lagerung	4°C	∞

### 3.3.2 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) kann die Expression der mRNA quantifiziert werden. Dem liegt das Prinzip der Detektion der vorliegenden Menge DNA nach dem jeweiligen Amplifikationszyklus zu Grunde. Hierbei wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green eingesetzt, der sich spezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert. Um festzustellen, ob zusätzlich zu dem entstandenen Amplifikat noch weitere unspezifische Produkte vorlagen, wurde der Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse angehängt. Da jedes DNA-Fragment eine spezifische Schmelztemperatur besitzt, wird bei Erreichen dieser das eingelagerte SYBR Green freigesetzt und damit die Fluoreszenzintensität verringert. Letztendlich wird die Fluoreszenz in Relation zur Temperatur dargestellt und damit überprüft, ob ein PCR-Produkt in der erwarteten Länge vorliegt. Zur Durchführung der qRT-



PCR wurde das Kit Brilliant II SYBR Green QPCR Mastermix verwendet. Die Zusammensetzung einer Reaktion ist in der Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Ansatz für eine qRT-PCR Reaktion.

Ansatz für 1x qRT-PCR Reaktion	
Brilliant II SYBR Green Mastermix (2x)	12,5 µl
Reference Dye (30 nM)	0,375 µl
forward + reverse - Primermix	1 µl
cDNA (1:10)	2 µl
RNAse freies H <sub>2</sub> O	9,125 µl
Σ	25 µl

Die qRT-PCR wurde mit den Stratagene Mx3005P System und der MX Software durchgeführt. Das dafür verwendete Programm ist in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Programm für die qRT-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	15 min	1
Denaturierung	94°C	15 s	40
Annealing	60°C	30 s	40
Elongation	72°C	30 s	40
Schmelzkurvenanalyse	95°C	30 s	1
	60°C	20 s	1
	bis 95°C	20 min	1

Während der qRT-PCR wurde der sogenannte *threshold cycle* ( $C_T$ ) bestimmt. Dieser wird herangezogen, um Unterschiede in den Expressionslevels verschiedener Gene feststellen zu können. Hierbei wird meist ein Phänotyp A (infiziert) mit einem Phänotyp B (nicht infiziert) verglichen und der *fold change* ermittelt. Der  $C_T$  wird von dem Programm des Thermocyclers innerhalb der exponentiellen Phase bestimmt, in welcher sich die initial eingesetzte DNA nach jedem Amplifikationszyklus verdoppelt, und zwar an dem Punkt, an welchem sich die detektierte Fluoreszenz deutlich vom Hintergrundrauschen unterscheiden lässt. Dabei benötigt jedes PCR-Produkt eine spezifische Anzahl an Zyklen um diesen Wert zu erreichen, was ermöglicht auf die initial eingesetzte Menge an DNA und somit den Expressionslevel der RNA rückzuschließen. Zur Normalisierung der Werte wurde die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode herangezogen (Livak *et al.*, 2001). Hierbei wird zu der Normalisierung der Daten ein sogenanntes Haushaltsgen betrachtet, welches ubiquitär und homogen exprimiert wird, und somit immer den gleichen  $C_T$ -Wert aufweist. Der *fold change* des Gens wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \frac{C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Haushaltsgen der behandelten Probe}}{C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Haushaltsgen der Kontrollprobe}}$$

Als Haushaltsgen wurde *gapdh* verwendet. Wurden Inhibitoren während der Infektionsversuche verwendet, so wurden zunächst der *fold change* der Kontrollen, behandelt mit dem Inhibitor, mit Bezug auf die unbehandelte Kontrolle berechnet. Somit konnte der Effekt der Inhibitoren auf die Zellen dargestellt werden. Die Proben, bei welchen ein Inhibitor und Bakterium auf die Zellen gegeben wurden, wurden auf die jeweilige, mit dem Inhibitor behandelten, Kontrollen bezogen, um somit die Wirkung des Inhibitors von der des Bakteriums unterscheiden zu können.

### 3.3.3 Bestimmung der RNA integrity number zur Qualitätskontrolle

Um die Qualität der isolierten RNA, die in der *Massive Analysis of cDNA Ends* (MACE)-Analyse verwendet werden sollte, zu ermitteln, wurde die *RNA Integrity Number* (RIN) zur Qualitätskontrolle bestimmt. Hierfür wurde der Agilent 2100 Bioanalyzer mit dem Agilent Bioanalyzer RNA Nano Chip verwendet. Dabei nutzt das System einen automatisierten Elektrophoreseprozess um das Verhältnis zwischen 18S und 28S ribosomalen RNA (rRNA) Untereinheiten zu bestimmen. Dieses Verhältnis kann zwischen eins und zehn liegen und wird als RIN bezeichnet. Die höchste Qualität der RNA ist durch einen Score von 10 gegeben. In diesem Fall besteht ein 2 zu 1 Verhältnis zwischen der 28S und 18S rRNA. RNA, die in *Next Generation Sequencing* Anwendungen eingesetzt wird, sollte eine RIN von mindestens sechs aufweisen (Kukurba *et al.*, 2015).

### 3.3.4 MACE Analyse (Externe Kollaboration)

Die MACE-Analyse der RNA Proben nach 6 h Infektion mit den *N. meningitidis* Stämmen wurde in Kollaboration mit Dr. rer. nat. René Scholtysik am Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Zur Durchführung der MACE-Analyse wurde das MACE-Kit zur 3'-mRNA Sequenzierung (GenXpro, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Sequenzierung wurde das *Nextseq 550* mit einer *High Output Flow Cell* angewandt. Dabei fand ein *multiplexing* aller Proben mit 75 Basenpaaren langen *Reads* statt. Nach dem Demultiplexen unter Anwendung von Casava (Illumina, USA), wurden die sogenannten *unique molecular barcodes* (UMI) von jedem *Read* extrahiert. Mit Hilfe des BWA Software Paktes wurden diese Reads mit dem *Genome Reference Consortium Human Reference 38* (hg38) *aligned* (Li 2013). *Reads* mit der gleichen Position und UMI wurden mit Hilfe des picard Programms angepasst (Broad Institute 2019). Die daraus resultierenden Konsensus-Sequenzen wurden in die *CLC Genomics Workbench* (Qiagen, Germany) geladen, und durch Anwendung des Tools „*RNA-Seq Analysis*“ wurde jede einzelne Probe analysiert.

### 3.3.5 Statistische Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten: *Differentially Expressed Genes* und *Gene Ontology*

Die in 3.3.4 beschriebenen Daten wurden für die differentielle Expressionsanalyse verwendet. Zu diesem Zweck wurden entsprechende Tools der *CLC Genomics Workbench* für die verschiedenen analysierten Konditionen angewandt. Hierbei wurden Expressionsdaten der infizierten HIBCPP-Zellen mit denen der unbehandelten Kontrolle verglichen, um den Effekt der Infektion mit den *N. meningitidis* Stämmen zu untersuchen. Zusätzlich wurden Zellen, die mit *NmB* nach Inhibition des Erk1/2 Signalwegs infiziert wurden, mit HIBCPP-Zellen, die auch mit dem Inhibitor behandelt wurden, verglichen. Schließlich wurden *Differentially Expressed Genes* (DEG)-Listen durch manuelles Filtern mit Hilfe des Programms Excel von Microsoft Office erstellt. Die Kriterien, nach welchen die Listen gefiltert wurden, waren ein *False Discovery Rate* (FDR)  $p\text{-Wert} \leq 0,05$  sowie  $\log_2$  *fold-changes*, welche größer oder kleiner als zwei waren. Zur Analyse der *Gene Ontology* (GO) wurde die online Anwendung LAGO (Logically Accelerated GO Term Finder) verwendet (LAGO 2020; Boyle *et al.*, 2004). Überrepräsentierte biologische Signalwege wurden durch Anwendung einer  $p\text{-Wert}$  Obergrenze von 0,01 unter Bonferroni-Korrektur analysiert.

### 3.3.6 Phosphoproteomik Analyse

Zur Durchführung der Phosphoproteomik Analyse wurden 12-Well Filter mit den *NmB* Stämmen MC58 und MC58siaD<sup>-</sup> mit einer MOI 100 für 4 h infiziert. Daraufhin wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, mit modifiziertem RIPA Puffer von den Filtermembranen abgekratzt und eingefroren. Zuvor wurden 200 µl der Suspension entnommen, welche der Firma Biogenity (Dänemark) zur Analyse des Phosphoproteoms geschickt wurden. Die restliche Suspension wurde genutzt, um die Proteinkonzentration der Proben zu bestimmen sowie Western Blots zur Verifizierung der Infektion anhand bekannter, durch *NmB* phosphorylierter Proteine, durchzuführen.

#### 3.3.6.1 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

Die Probenvorbereitung der Phosphoproteomik Analyse mittels Massenspektrometrie sowie die bioinformatische Auswertung der Daten wurden von der Firma Biogenity (Dänemark) durchgeführt und sind in den folgenden Abschnitten zusammengefasst. Zur Vorbereitung der Proben wurden diese lysiert (Lysepuffer siehe 2.8), für 5 min bei 95°C gekocht und anschließend 5 Mal für 30 s bei 4°C sonifiziert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe des Pierce Gold BCA Kit (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Für die nächsten Schritte wurden 500-1000 µg Protein eingesetzt. Die Proben wurden 1:3 mit 10% Acetonitril, 50 mM HEPES, pH 8,5 verdünnt. LysC (Wako) wurde in einem 1:50 Verhältnis (Enzym zu Protein) zugegeben, und die Proben wurden 4 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgte noch eine Verdünnung der Proben 1:10 mit 10% Acetonitril, 50 mM HEPES, pH 8,5. Trypsin (Promega) wurde in einem 1:100 Verhältnis (Enzym zu Protein) hinzugegeben und die Proben wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Enzymaktivität wurde durch Zugabe von 2% Trifluoressigsäure in einer Endkonzentration von 1% abgestoppt. Im nächsten Schritt wurden die Peptide unter Anwendung einer SOLAµ C18 Platte (Thermo Fischer) entsalzt. Die aus der Platte eluierten Peptide wurden in einem Eppendorf Speedvac aufkonzentriert und in 50 mM HEPES (pH 8,5) rekonstituiert.

#### 3.3.6.2 Anreicherung der Phosphorylierungen

Ti-IMAC Partikel wurden nach Anweisung des Herstellers angesetzt. Von den Partikeln wurden 50 µl auf 500 µg der aufkonzentrierten Peptide in einem 2 ml Tube angesetzt, die daraufhin für 10 s in einen magnetischen Tubehalter platziert wurden. Die *shipping*-Lösung wurde abgenommen und die Partikel mit 200 µl 70% Ethanol, 100 µl Ammoniakwasser und zuletzt drei Mal mit 100 µl 80% Acetonitril, 1M Glycolsäure, 5% Trifluoressigsäure für jeweils

1-5 min gewaschen. Die Proben wurden daraufhin 1:1 in 80% Acetonitril, 1M Glycolsäure, 5% Trifluoressigsäure verdünnt und zu den equilibrierten Partikeln hinzugegeben. Die Suspension wurde bei RT unter Schütteln für 30 min inkubiert, und die gebundenen Peptide daraufhin 2 Mal mit 400 µl 80% Acetonitril, 1% Trifluoressigsäure gewaschen, gefolgt von zweimaligem Waschen mit 400 µl 10% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure. Die angereicherten Phosphopeptide wurden 3 Mal bei Raumtemperatur unter Schütteln mit 80 µl Ammoniakwasser eluiert, anschließend in ein 0,5 ml Protein-LoBind Tube transferiert und für 30 min bei 60°C *Speed-vaced*, um das Ammoniakwasser zu entfernen. Die Proben wurden mit 10% Trifluoressigsäure angesäuert und einem C18 Entsalzungsschritt unterzogen. Die getrockneten Peptide wurden in 100 mM Tetraethylammonium Bromid (pH 8,5) für das *Tandem Mass Tag* (TMT) resuspendiert.

### 3.3.6.3 *Tandem Mass Tag labelling*

Das *labelling* wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die *gelabelten* Peptide wurden 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1 (16-plex) gemischt, mit 1% Trifluoressigsäure angesäuert, sowie auf eine Acetonitrilkonzentration unter 5% gebracht. Vor der Massenspektrometrie-Analyse wurden die Peptide unter Verwendung eines *offline*-Flüssigchromatographiesystems (Thermo Fisher Ultimate3000) durch eine *high pH fractionation* (5 mM Ammoniumbicarbonat, pH 10) bei einer Durchflussrate von 5 µl min<sup>-1</sup> fraktioniert. Peptide (20 µg) wurden 120 min über einen Gradienten (5% bis 35% Acetonitril) getrennt, Fraktionen wurden alle 120 s gesammelt. Die resultierenden 60 Fraktionen wurden in 30 Endfraktionen gepoolt (Fraktionen 1+31, 2+32, 3+33 usw.), angesäuert auf pH <2 mit 1% Trifluoressigsäure, und gemäß dem Protokoll des Herstellers auf EvoSep StageTips geladen.

### 3.3.6.4 *Tandem Mass Tag-labelled Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie Datenerfassung*

Für jede Fraktion wurden die Peptide mit der voreingestellten Methode „30 samples per day“ auf dem EvoSep One analysiert. Die Peptide wurden über einen 44-minütigen Gradienten eluiert und weiter durch das Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific) analysiert, welches in einem Daten-abhängigen Tandem Massenspektrometrie Top-speed Modus lief (3 s/Zyklus). Die Massenspektrometriedaten wurden bei einer Auflösung von 60.000, mit einem normalisierten *automatic gain control target* von 300% und automatischer maximalen Einspritzzeit in einem Scanbereich von 375–1.500 m/z, dokumentiert. Die Tandem Massenspektrometrie-Spektren wurden mit einer Auflösung von 30.000 bei aktivierter

TurboTMT-Funktion mit einem normalisierten *automatic gain control target* von 100% und einer automatischen maximalen Injektionszeit, einer normalisierten Kollisionsenergie von 33, und einem Intensitätsschwellwert von  $8e^3$  erhalten. Die erste Masse wurde auf 120 m/z eingestellt, um das Einfangen der TMT-Reporterionen sicherzustellen. *Precursors* wurden mit einem 0,7 m/z-Isolationsrahmen isoliert und der *Precursor Fit* auf 70% aktiviert in einem Bereich von 0,7 m/z. Der dynamische Ausschluss wurde auf 60 s eingestellt, und Ionen mit einem Ladungszustand  $<2$ ,  $>7$  sowie einem unbekanntem Ladungszustand wurden ausgeschlossen. Die Massenspektrometrie-Analyse wurde durch komplexe Zellysat-Qualitätskontrollstandards verifiziert, die Chromatographie wurde durchgehend überwacht und auf Reproduzierbarkeit geprüft.

### 3.3.6.5 Tandem Mass Tag Proteomics Analyse

Die Rohdaten wurden mit Hilfe des Proteome Discoverer 2.4 analysiert. TMTPro Reporterionenquantifizierung wurde in den Verarbeitungs- und Konsensschritten durchgeführt, die Spektren wurden mit dem *Homo sapiens* Referenzproteom der Uniprot Datenbank abgeglichen (UP000005640, zuletzt modifiziert am 18. Oktober 2020; Anzahl der Proteine: 75776). Dynamische Modifikationen wurden als Phosphorylierungen (S, T, Y), Oxidation (M), Desaminierung (N, Q) und Acetylierung am N-Terminus des Proteins festgelegt. Zystein Carbaminomethyl (an C-Enden) und TMTPro (an Peptid N-Termini und K-Enden) wurden als statische Modifikationen festgelegt. Alle Ergebnisse wurden mit einer 1% FDR gefiltert. Die TMT Reporterionenquantifizierung wurde mit Hilfe der „*reporter ions quantifier*“ Funktion durchgeführt.

### 3.4 Statistik

Die statistischen Analysen der in dieser Arbeit aufgeführten Datensätze in den Kapiteln 4.1 und 4.2 wurden mit der Software SAS System Release 9.4 (SAS Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Für die Experimente mit dem Inhibitor Dynasore wurde, nachdem eine Normalverteilung getestet wurde, ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt. Um die Unterschiede zwischen mehreren unterschiedlich behandelten Gruppen bei Einsatz der MAPK Inhibitoren zu untersuchen, wurden Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses wurde der Scheffe Test als Anpassung für mehrere Vergleiche herangezogen. Dabei fungierten die Infektionen mit den Bakterienstämmen ohne Behandlung mit Inhibitoren als Referenzgruppen. Für die qRT-PCR Analysen wurden nach Untersuchung der Normalverteilung Zweistichproben-t-Tests, um einen Unterschied zwischen der normalisierten Kontrolle und Behandlung zu ermitteln sowie Varianzanalysen (ANOVA), in denen erneut die Infektionen mit den Bakterienstämmen ohne Behandlung mit Inhibitoren als Referenzgruppen fungierten, angewandt. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses wurde der Dunnett Test als Anpassung für mehrere Vergleiche herangezogen. Die ermittelten *p*-Werte wurden als signifikant, hoch signifikant oder extrem signifikant eingestuft, wenn sich *p* Werte <0,05; <0,01 bzw. < 0,001 ergaben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vergleich des Einflusses der Dynamin-vermittelten Endozytose bei verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Meningitiserregern

Bei dem Protein Dynamin handelt es sich um eine GTPase der Wirtszellen. Seine Funktion besteht in dem Abkapseln von Vesikeln an der Zellmembran. Hierbei katalysiert Dynamin die Hydrolyse von GTP, was wiederum eine Konformationsänderung auslöst, die zu der Einschnürung der Spiralstruktur Dynamins führt. Die Abschnürung des Vesikels wird somit durch die aneinander gebrachten gegenüberliegenden Seiten des Vesikelhalses und deren darauffolgende Fusionierung hervorgerufen. Dynamin ist sowohl an der Clathrin- als auch der Caveolin-vermittelten Endozytose beteiligt (Lin *et al.*, 2010).

Die genauen Invasionsmechanismen, mit welchen Bakterien die BLS überwinden, sind noch nicht geklärt. Es konnte zuletzt gezeigt werden, dass die Invasion von Listerien in einem *in vitro* Modell der BLS, den HIBCPP-Zellen, durch Inhibition von Dynamin mittels des Inhibitors Dynasore verringert werden konnte (Dinner *et al.*, 2017).

#### 4.1.1 Der Dynamin Inhibitor Dynasore hat eine toxische Wirkung auf die HIBCPP-Zellen

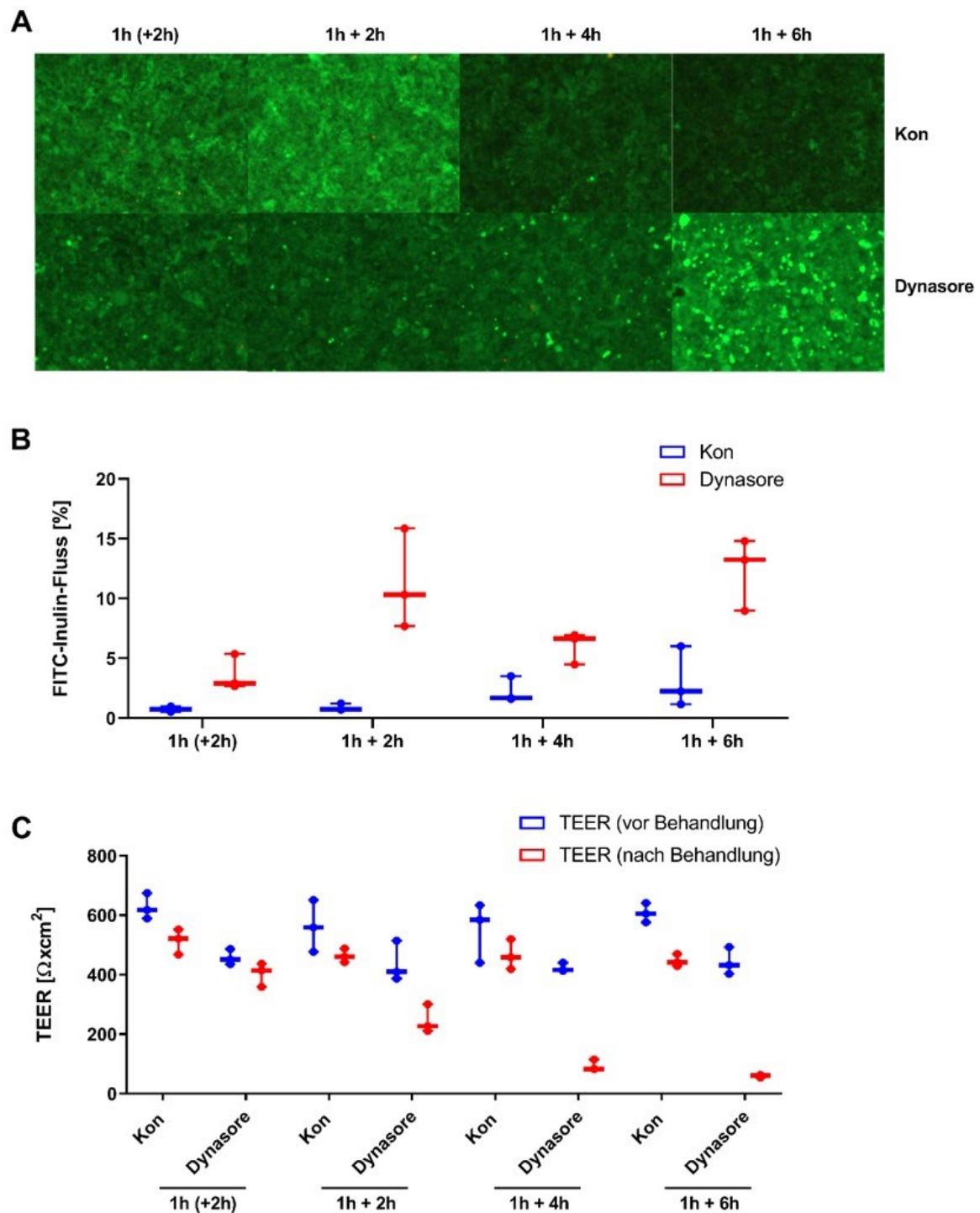
Die Wirkung des Inhibitors Dynasore auf die Invasion von Listerien in HIBCPP-Zellen wurde bereits in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis beschrieben (Dinner *et al.*, 2017). Hierbei wurde die stärkste Inhibition bei einer Konzentration von 120  $\mu\text{M}$  des Inhibitors Dynasore beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte bei 30  $\mu\text{M}$  Dynasore keine signifikante Inhibition ermittelt werden, während bei einer Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  ein signifikanter, jedoch, im Unterschied zu der bei Zugabe von 120  $\mu\text{M}$  beobachteten Inhibition, geringer Effekt auftrat (Dinner *et al.*, 2017).

In initialen Experimenten wurde der Einfluss des Inhibitors Dynasore auf HIBCPP-Zellen über einen Zeitraum von 2-6 h hinweg untersucht, da die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme bei einer Infektion der HIBCPP-Zellen durch die Erreger mit einer MOI 10, Infektionszeiten von 4 h bzw. 6 h benötigen, um eine adäquate Quantifizierung der intrazellulären Bakterien in der DIF durchführen zu können (Häuser *et al.*, 2018; Borkowski *et al.*, 2014; Schwerk *et al.*, 2012). Hierbei wurde der Inhibitor in der Konzentration von 120  $\mu\text{M}$  dem Filterkompartiment sowie dem Well zugegeben, um sowohl die apikale als auch die



basolaterale Seite der Zellen zu erreichen. Die Parameter zur Überprüfung der Barrierefunktion sowie potentieller toxischer Effekte des Inhibitors, die während der Versuche ermittelt wurden, beinhalteten den TEER, den FITC-Inulin-Fluss über die Barriere hinweg sowie einen Life/Dead Assay zur Überprüfung der Vitalität der HIBCPP-Zellen am Ende der Experimente. Es wurde eine Vorbehandlung der Zellen von 1 h, wie sie bei den Infektionsexperimenten vor Zugabe der Erreger stattfindet, getestet, gefolgt von verschiedenen Inkubationszeiten mit dem Inhibitor, welche die potentiellen Infektionszeiten mit den verschiedenen Erregern abdecken. Die Kondition 1 h (+2 h) wiederum beschreibt die Abnahme des Inhibitors nach einer Stunde Inkubation mit einer darauffolgenden Inkubationszeit von 2 h in Abwesenheit des Inhibitors.

Wie in Abbildung 7B, C gezeigt ist, hat der Inhibitor Dynasore einen negativen Effekt auf die Zellvitalität ab einer Inkubationszeit von 4 h. Es ist jedoch noch keine erhöhte Anzahl an toten Zellen (rot) in Abbildung 7A nach Behandlung mit Dynasore zu beobachten. Der FITC-Inulin-Fluss ist jedoch schon nach einer Behandlung von 3 h (1 h +2 h) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen erhöht. Auch der TEER fällt nach der Behandlung mit dem Inhibitor über den Verlauf des Experiments deutlich ab. In der Kondition (1 h (+2 h)), konnte kein negativer Einfluss des Inhibitors auf die HIBCPP-Zellen ermittelt werden. Allerdings wurde bei weiteren Tests (Daten hier nicht gezeigt) ein toxischer Effekt des Inhibitors auf das Wachstum der Bakterien beobachtet. Daher wurden Infektionen der HIBCPP-Zellen für maximal 2 h nach einstündiger Vorinkubation und der darauffolgenden Abnahme des Inhibitors durchgeführt. Für die Infektionsexperimente mit den verschiedenen Erregern wurde eine erhöhte MOI von 100 gewählt, um auch nach 90 min bzw. 2 h Infektion Invasionsraten zu erreichen, die eine Quantifizierung der intrazellulären Erreger ermöglichen.



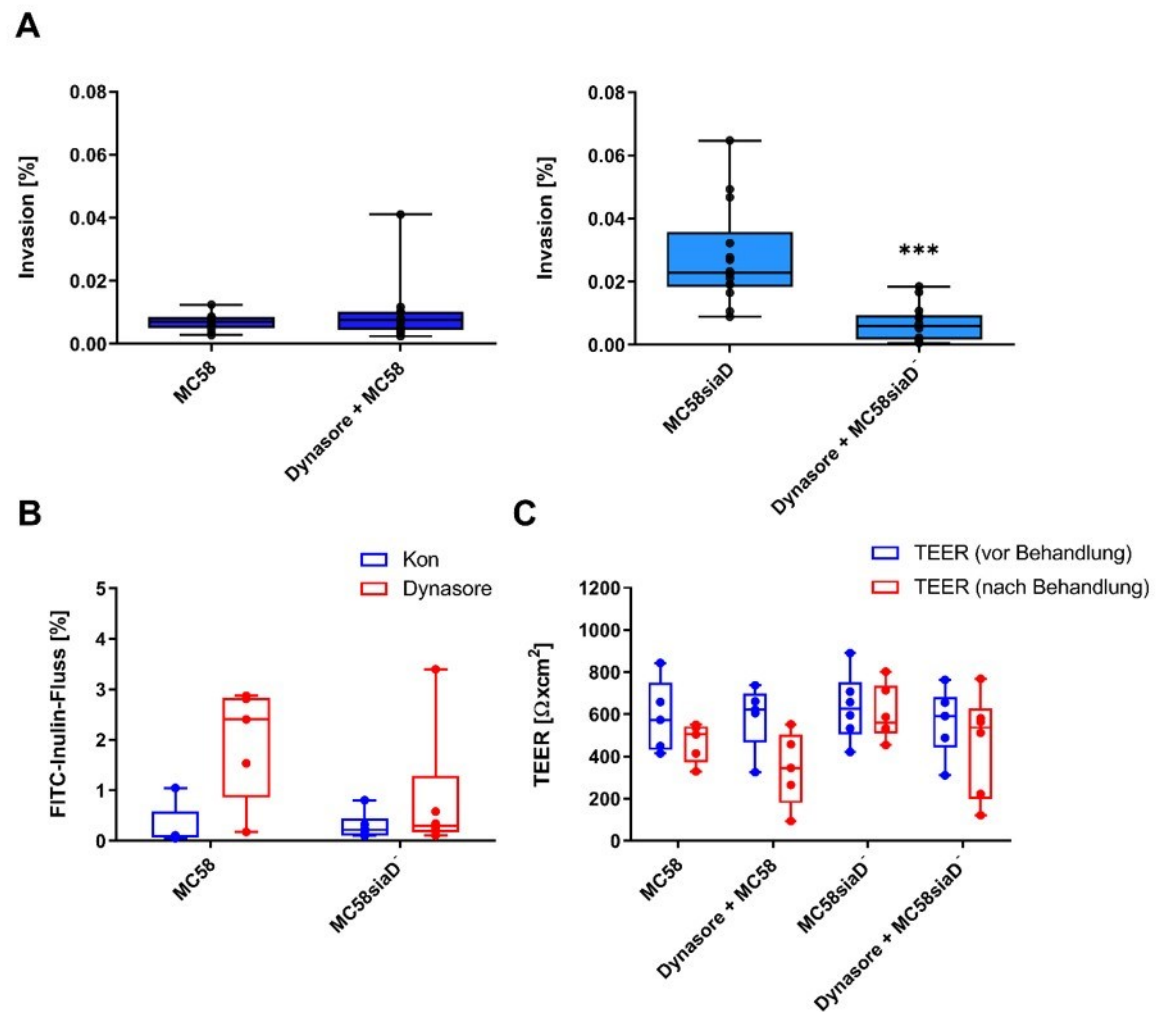
**Abbildung 7: Einfluss von Dynasore auf die Zellvitalität.** HIBCPP-Zellen wurden eine Stunde mit dem Inhibitor Dynasore vorbehandelt und daraufhin in einem Zeitverlauf über 2 h, 4 h und 6 h mit dem Inhibitor bei einer Konzentration von 120  $\mu\text{M}$  behandelt. Die Kondition 1 h (+2 h) zeigt Zellen, die 1 h mit dem Inhibitor behandelt wurden und nach dessen Abnahme noch 2 h bei 37°C inkubiert wurden. Die Kontrollen (Kon) blieben unbehandelt. Repräsentative Aufnahmen eines Live/Dead-Experiments (A) sowie der FITC-Inulin-Fluss (B) und die TEER-Messungen (C) sind dargestellt.

#### 4.1.2 Die Rolle der Dynamin-vermittelten Endozytose während der Infektion von HIBCPP-Zellen durch *N. meningitidis* Stämme der Serogruppe B ist Kapsel abhängig

*N. meningitidis*, ein humanspezifisches Pathogen, gelangt über den Blutkreislauf zu den Gefäßen des PC. Dort muss der Erreger die Plexusepithelzellen überwinden, welche die BLS darstellen. Eine polare Invasion der Neisserien wurde bereits für die HIBCPP-Zellen gezeigt, wobei die Kapselmutanten der Serogruppen B- und C-Stämme (MC58siaD<sup>-</sup> und WUE2120siaD<sup>-</sup>) eine höhere Infektionsrate von HIBCPP-Zellen aufwiesen, als die Wildtyp Stämme (Borkowski *et al.*, 2014; Schwerk *et al.*, 2012). Die Rolle von Dynamin bei Infektion von Epithelzellen durch *N. meningitidis* wurde noch nicht untersucht.

Die folgenden Infektionsversuche wurden für 90 min bei einer MOI von 100 durchgeführt (vgl. 4.1.1), um eine adäquate Quantifizierung der invadierten Erreger zu ermöglichen. Auf Grund der zuvor beschriebenen toxischen Eigenschaften des Inhibitors auf die HIBCPP-Zellen, wurden diese zunächst für eine Stunde mit dem Inhibitor bei einer Konzentration von 120 µM inkubiert. Vor Infektion der Zellen mit den Erregern wurde der Inhibitor wieder abgenommen. Um die Barrierefunktion der Zellen zu überprüfen, wurde der TEER zu Beginn und Ende des Experiments bestimmt. Zusätzlich wurde der Inulin-Fluss über die Barriere hinweg nach Ende des Experiments ermittelt. Anschließend an die Infektion wurden die Zellen einer DIF unterzogen, um die Anzahl der intra- und extrazellulären Bakterien zu ermitteln.

Abbildung 8A zeigt die Infektionsrate des *NmB* Wildtyps MC58 sowie dessen Kapselmutante MC58siaD<sup>-</sup> in der UK der HIBCPP-Zellen in An- und Abwesenheit des Inhibitors Dynasore. Der Wildtyp Stamm der *NmB* zeigt keine signifikante Inhibition der Invasion nach Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor. Die Kapselmutante weist hingegen eine signifikante Reduktion der intrazellulären Bakterien auf. Wie in Abbildung 8B und C dargestellt, blieben der TEER und der FITC-Inulin-Fluss stabil, was darauf hinweist, dass die Barrierefunktion der HIBCPP-Zellen durch Zugabe des Inhibitors sowie die Infektion mit den Bakterien nicht negativ beeinflusst wird.

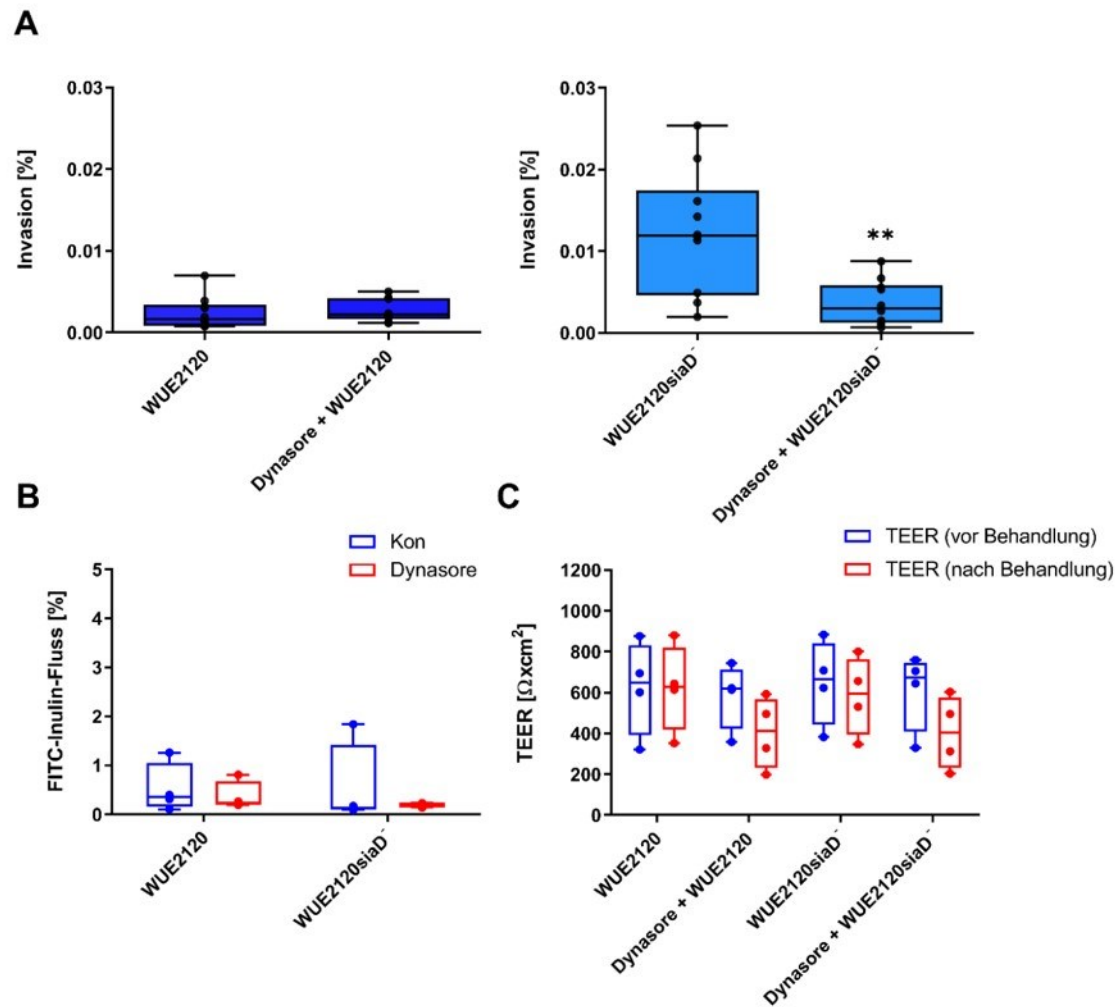


**Abbildung 8: Dynamin ist nicht maßgeblich an der Aufnahme des *N. meningitidis* Wildtyp Stamms der Serogruppen B in HIBC-PP-Zellen beteiligt, jedoch an der Aufnahme der Kapselmutante.** Zur Blockierung von Dynamin wurden, in der UK kultivierte, HIBC-PP-Zellen für 1 h mit dem Inhibitor Dynasore bei einer Konzentration von 120  $\mu\text{M}$  behandelt. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle herangezogen. Nachdem der Inhibitor abgenommen wurde, erfolgte eine 90 min Infektion mit den *N. meningitidis* Stämmen bei einer MOI 100. Die Quantifizierung der Infektionsrate erfolgte mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie (A). Des Weiteren wurde die Barrierefunktion der Zellen anhand des FITC-Inulin-Flusses (B) und des TEER (C) bestimmt. \*\*\* extrem signifikant,  $p < 0,001$ ; Vergleich der mit Dynasore vorbehandelten Zellen mit den Kontrollzellen.

### **4.1.3 Die Rolle der Dynamin-vermittelten Endozytose während der Infektion von HIBCPP-Zellen durch *N. meningitidis* Stämme der Serogruppe C ist Kapsel abhängig**

Die Infektionsversuche zur Ermittlung des Einflusses der Dynamin-vermittelten Endozytose auf den Wildtyp sowie die Kapselmutante der *NmC* wurden auf die gleiche Weise durchgeführt wie für die Erreger der Serogruppe B beschrieben (siehe 4.1.2).

Abbildung 9A zeigt, dass der Einsatz des Dynamin Inhibitors Dynasore keinen signifikanten Einfluss auf die Infektion des *NmC* Wildtyps WUE2120 aufweist. Die Kapselmutante hingegen demonstriert, nach Inhibition der Dynamin-vermittelten Endozytose, eine signifikant verringerte Infektionsrate in HIBCPP-Zellen. Auch die Auswirkungen der Behandlung mit dem Inhibitor und der Infektion der HIBCPP-Zellen mit dem Erreger auf die Barrierefunktion der Zellen wurden ermittelt und sind in Abbildung 9B und C dargestellt. Dabei blieben TEER und der FITC-Inulin-Fluss über das Experiment hinweg stabil.

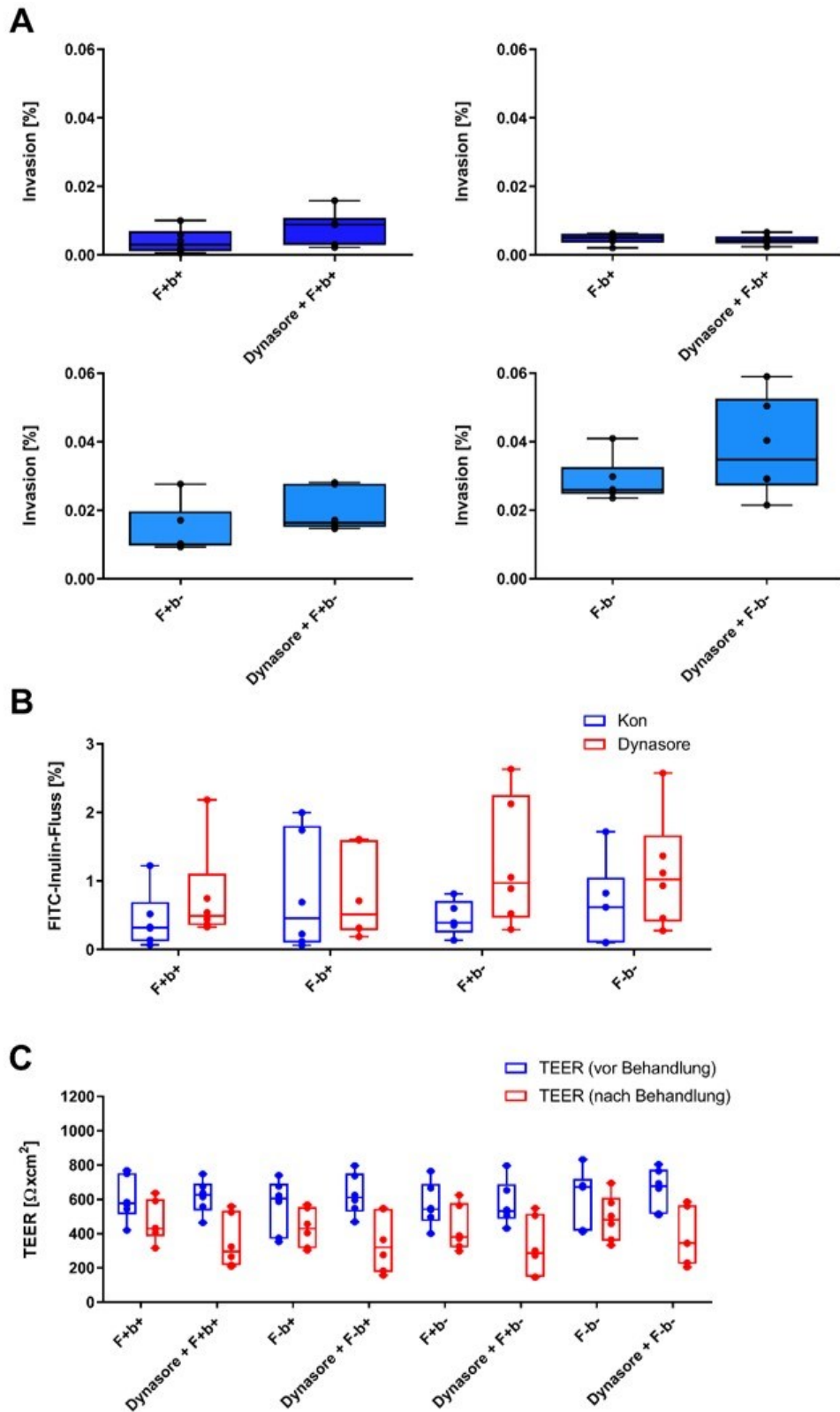


**Abbildung 9: Dynamin ist nicht maßgeblich an der Aufnahme des *N. meningitidis* Wildtyp Stamms der Serogruppen C in HIBCPP-Zellen beteiligt, jedoch an der Aufnahme der Kapselmutante.** Zur Blockierung von Dynamin wurden, in der UK kultivierte, HIBCPP-Zellen für 1 h mit dem Inhibitor Dynasore bei einer Konzentration von 120  $\mu\text{M}$  behandelt. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle herangezogen. Nachdem der Inhibitor abgenommen wurde, erfolgte eine 90 min Infektion mit den *N. meningitidis* Stämmen bei einer MOI von 100. Die Quantifizierung der Infektionsrate erfolgte mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie (A). Des Weiteren wurde die Barrierefunktion der Zellen anhand des FITC-Inulin-Flusses (B) und des TEERs (C) bestimmt. \*\* hoch signifikant,  $p < 0,01$ ; Vergleich der mit Dynasore vorbehandelten Zellen mit den Kontrollzellen.

#### **4.1.4 Inhibition der Dynamamin-vermittelten Endozytose hat keinen Effekt auf die Invasion von *H. influenzae* unabhängig von der An- und Abwesenheit der Virulenzfaktoren Kapsel und Fimbrien.**

Um einen Vergleich des Einflusses der Inhibition von Dynamamin während der Endozytose Gram-positiver und Gram-negativer pathogener Erreger zu ermöglichen, wurde mit *H. influenzae* ein weiterer Gram-negativer Erreger untersucht. Dabei wurde die Infektionsrate von *H. influenzae* Stämmen in An- und Abwesenheit der Virulenzfaktoren Kapsel und Fimbrien unter dem Einfluss des Inhibitors der Dynamamin-vermittelten Endozytose bestimmt. Die Infektionsraten dieser *H. influenzae* Stämme in HIBCPP-Zellen sowie der dabei wirkende Einfluss der Kapsel und Fimbrien, wurden schon beschrieben (Häuser *et al.*, 2018). Die beobachteten höheren Infektionsraten der stabilen Varianten des Erregers, welche die Kapsel (b-) oder Fimbrien nicht exprimieren (F-), konnten reproduziert werden (Abbildung 10). In dieser Arbeit erfolgte nun eine Vorbehandlung der HIBCPP-Zellen in der UK mit dem Inhibitor Dynasore für 1 h bei einer Konzentration von 120  $\mu\text{M}$ . Die Infektion mit den *H. influenzae* Stämmen wurde, nach Abnahme des Inhibitors, bei einer MOI 100 für 2 h durchgeführt und mit Hilfe der DIF quantifiziert.

Wie in Abbildung 10A dargestellt ist, konnte keine signifikante Verringerung der Infektionsrate auf Grund der Inhibition der Dynamamin-vermittelten Endozytose beobachtet werden. Zudem führte weder die Deletion der Kapsel oder der Fimbrien, noch die Kombination der Deletion beider Virulenzfaktoren, zu einer Verringerung der Infektionsrate nach Inhibition der Dynamamin-vermittelten Endozytose im Vergleich zu der unbehandelten, infizierten Kontrolle. Wie bei den vorhergehenden Experimenten beschrieben, wurden auch hier der TEER und FITC-Inulin-Fluss ermittelt, um die Barrierefunktion zu überprüfen. In Abbildung 10B und C ist zu erkennen, dass die Barrierefunktion über die Experimente hinweg stabil blieb.



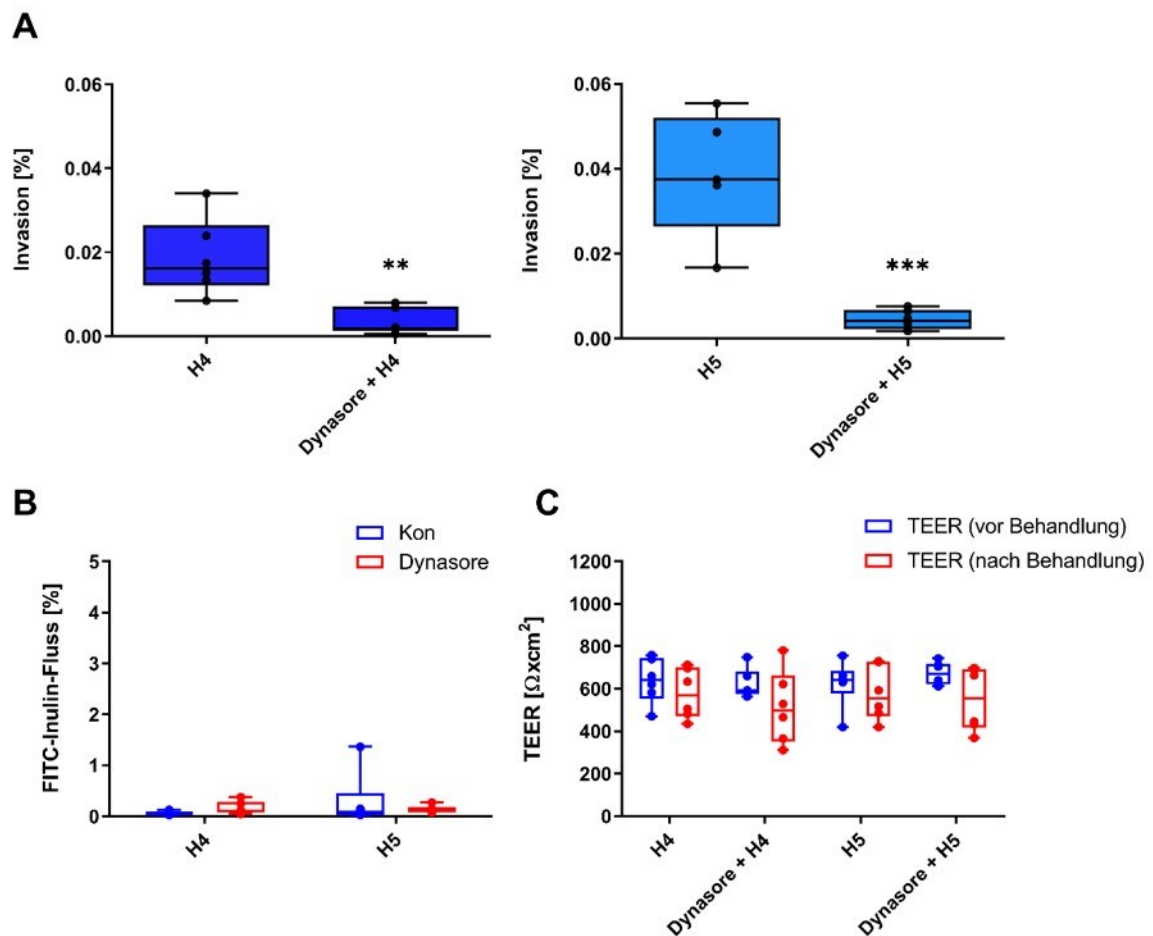
**Abbildung 10: Dynamine ist nicht maßgeblich an der Aufnahme des *H. influenzae* Typ B Wildtyp Stamms sowie dessen Deletionsmutanten der Kapsel und Fimbrien in HIBCPP-Zellen beteiligt.** Um Dynamine zu blockieren, wurden, in der UK kultivierte, HIBCPP-Zellen für 1 h mit dem Inhibitor Dynasore bei einer Konzentration 120  $\mu\text{M}$  behandelt. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle herangezogen. Nachdem der Inhibitor abgenommen wurde erfolgte eine 2 h Infektion mit den *H. influenzae* Stämmen bei einer MOI von 100. Die Quantifizierung der Infektionsrate erfolgte mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie (A). Des Weiteren wurde die Barrierefunktion der Zellen anhand des FITC-Inulin-Flusses (B) und des TEERs (C) bestimmt.



#### **4.1.5 Die Infektion der HIBCPP-Zellen durch den Erreger *S. suis* und dessen Kapselmutante wird in hohem Maße durch Dynamin vermittelt.**

Um auch den Einfluss der Inhibition der Dynamin vermittelten Endozytose bei der Invasion des Gram-positiven Erregers *S. suis* zu ermitteln, wurden Infektionsexperimente in der UK der HIBCPP-Zellen in An- und Abwesenheit des Inhibitors Dynasore mit dem Wildtyp-Stamm des Erregers und dessen Kapselmutante durchgeführt. Infektion der HIBCPP-Zellen durch *S. suis* von der physiologisch relevanten basolateralen Seite der HIBCPP-Zellen aus wurden zuvor beschrieben (Schwerk *et al.*, 2012). Die höheren Infektionsraten der Kapselmutante H5 im Vergleich zu dem Wildtyp Stamm H4 bei Infektion der basolateralen Seite der HIBCPP-Zellen konnten in dieser Arbeit reproduziert werden (Abbildung 11). Wie auch bei der in 4.1.2 beschriebenen Infektion mit *H. influenzae*, wurden die Zellen mit dem Inhibitor für eine Stunde vorbehandelt, bevor dieser abgenommen wurde und die Zellen für 2 h mit den Bakterien bei einer MOI 100 infiziert wurden.

Wie in Abbildung 11A dargestellt, vermindert die Inhibition der Dynamin-vermittelten Endozytose signifikant die Anzahl der intrazellulären Bakterien. Dies ist sowohl während der Infektion der HIBCPP-Zellen mit dem *S. suis* Wildtyp als auch dessen Kapselmutante zu beobachten. Auch die Barrierefunktion wurde, wie zuvor beschrieben, mittels Messung des FITC-Inulin-Flusses sowie des TEER überprüft, und blieb, wie in Abbildung 11B und C dargestellt, über den Verlauf des Experiments hinweg konstant.



**Abbildung 11: Dynamin ist maßgeblich an der Aufnahme des *S. suis* Wildtyp Stamms sowie dessen Kapselmutante in HIBCPP-Zellen beteiligt.** Um Dynamin zu blockieren, wurden, in der UK kultivierte, HIBCPP-Zellen für 1 h mit dem Inhibitor Dynasore bei einer Endkonzentration 120  $\mu\text{M}$  behandelt. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle herangezogen. Nachdem der Inhibitor abgenommen wurde, erfolgte eine 2 h Infektion mit den beiden *S. suis* Stämmen bei einer MOI von 100. Die Quantifizierung der Infektionsrate erfolgte mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie (A). Des Weiteren wurde die Barrierefunktion der Zellen anhand des FITC-Inulin-Flusses (B) und des TEERs (C) bestimmt. \*\*\* extrem signifikant,  $p < 0,001$ , \*\* hoch signifikant,  $p < 0,01$ ; Vergleich der mit Dynasore vorbehandelten Zellen mit den Kontrollzellen.

In Tabelle 9 ist der Einfluss der Dynamin-vermittelten Endozytose auf die Infektion der verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Erreger zusammengefasst.

Tabelle 9: Zusammenfassung des Effekts der Inhibition der GTPase Dynamin auf die Infektionsraten der Erreger in HIBCPP-Zellen.

	Gram-negativ			Gram-positiv
	<i>NmB</i>	<i>NmC</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>S. suis</i>
<b>Wildtyp</b>	<b>Keine Verringerung</b> der Infektionsrate in HIBCPP-Zellen nach Inhibition der Dynamin vermittelten Endozytose	<b>Keine Verringerung</b> der Infektionsrate in HIBCPP-Zellen nach Inhibition der Dynamin vermittelten Endozytose	<b>Keine Verringerung</b> der Infektionsrate in HIBCPP-Zellen nach Inhibition der Dynamin vermittelten Endozytose	<b>Verringerung</b> der Infektionsrate nach Inhibition der Dynamin-vermittelten Endozytose
<b>Kapselmutante</b>	<b>Verringerung</b> der Infektionsrate nach Inhibition der Dynamin-vermittelten Endozytose	<b>Verringerung</b> der Infektionsrate nach Inhibition der Dynamin-vermittelten Endozytose	<b>Keine Verringerung</b> der Infektionsrate in HIBCPP-Zellen nach Inhibition der Dynamin vermittelten Endozytose	<b>Verringerung</b> der Infektionsrate nach Inhibition der Dynamin-vermittelten Endozytose
<b>Deletion der Fimbrien</b>	n. d.	n. d.	<b>Keine Verringerung</b> der Infektionsrate in HIBCPP-Zellen nach Inhibition der Dynamin vermittelten Endozytose	n. d.

## 4.2 Einfluss der MAPK Signalwege Erk1/2 und p38 auf die Invasion verschiedener bakterieller Erreger

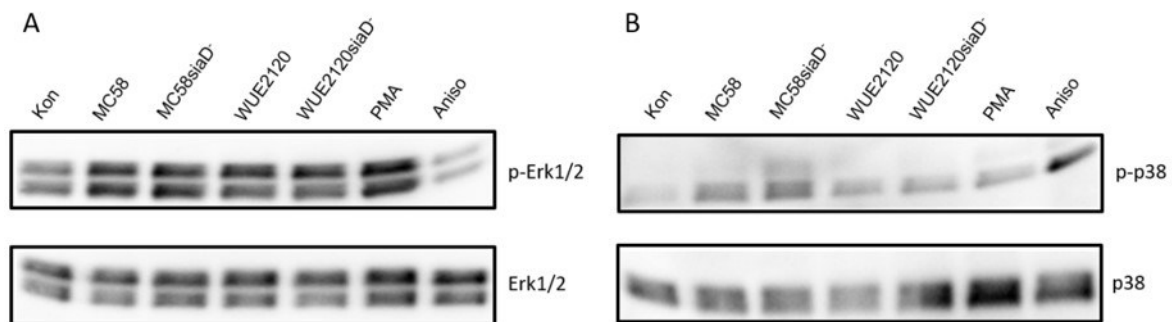
Die CVE reguliert die Aufnahme von Zelloberflächenrezeptoren, reguliert deren Expression und nimmt somit Einfluss auf die *downstream* Signalkaskaden dieser Rezeptoren. Zu den zentralen Signalkaskaden, die durch Endozytosemechanismen reguliert werden können, zählen die MAPK (Xiao *et al.*, 2018). Bakterielle Erreger nutzen zudem auch Effektorproteine, um direkt die Signalwege der Wirtszellen, unter anderem auch die MAPK, während einer Infektion zu manipulieren (Krachler *et al.*, 2011). Diese beeinflussen Schlüsselprozesse der Zellen wie das Zellwachstum, die Differenzierung, die Motilität sowie das Überleben der Zellen, aber auch den Prozess der Apoptose (Kim *et al.*, 2010). Aus diesem Grund wurde der Einfluss der MAPK auf die Infektion durch Gram-positive und Gram-negative Erreger in An- und Abwesenheit der bakteriellen Kapsel untersucht.

### 4.2.1 Aktivierung der MAPK Erk1/2 und p38 nach basolateraler Infektion der HIBCPP-Zellen mit *N. meningitidis* Serogruppe B- und C-Stämmen

Die Infektion der HIBCPP-Zellen durch den Erreger *L. monocytogenes* wurde mit einer Aktivierung der MAPK Erk1/2 und p38 korreliert. Diese Aktivierung der MAPK fand primär bei Infektion der basolateralen Seite der HIBCPP-Zellen statt (Dinner *et al.*, 2017). Der Effekt von *N. meningitidis* auf die MAPK Signalwege in HIBCPP-Zellen wurde noch nicht im Detail entschlüsselt. Bei Infektion von HBMEC mit *N. meningitidis* in einem *in vitro* Modell der BHS wurde eine Aktivierung der JNK und p38 Signalkaskaden beobachtet (Sokolova *et al.*, 2004).

Um den Einfluss der verschiedenen Neisserien Stämme der Serogruppen B und C und des Virulenzfaktors Kapsel auf die HIBCPP-Zellen an der physiologisch relevanten basolateralen Seite zu ermitteln, wurden die Zellen in der UK für 4 h mit den Erregern bei einer MOI 100 infiziert. Die Aktivierung von Erk1/2 und p38 wurde mittels Immunoblot festgestellt. Abbildung 12 zeigt ein repräsentatives Experiment aus dieser Versuchsreihe. PMA und Anisomycin wurden als Positivkontrollen eingesetzt. Wie in Abbildung 12A dargestellt, aktivieren die *NmB* und *NmC* Stämme die MAPK Erk1/2 nur geringfügig. Zudem ist zu erkennen, dass auch in der unbehandelten Kontrolle phosphoryliertes Erk1/2 vorhanden ist. Im Gegensatz hierzu kann in unbehandelten HIBCPP-Zellen fast kein phosphoryliertes p38 detektiert werden (Abbildung 12B). Sowohl nach Infektion mit den *NmB* als auch den *NmC* Stämmen ist eine Aktivierung der MAPK p38 zu beobachten, wobei der Effekt nach der Infektion mit den *NmB* Stämmen stärker ist (Abbildung 12B). Die Barrierefunktion der Zellen blieb über den Verlauf der

Experimente hinweg intakt und wurde mittels TEER und FITC-Inulin-Fluss Messung überprüft (Daten nicht gezeigt).



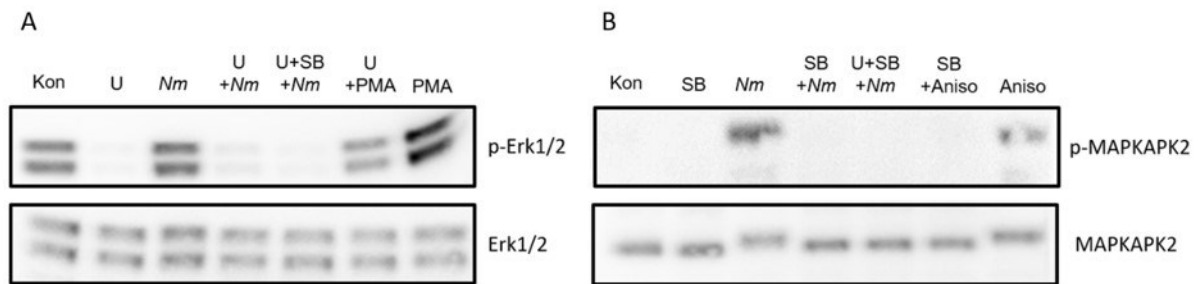
**Abbildung 12:** *N. meningitidis* Stämme der Serogruppen B und C sowie deren Kapselmutanten aktivieren die MAPK p38 bei Infektion der basolateralen Seite der HIBCPP-Zellen, während die MAPK Erk1/2 nur schwach aktiviert wird. Die Aktivierung der MAPK Erk1/2 (A) und p38 (B) wurde mit Hilfe von Western Blots detektiert. HIBCPP-Zellen wurden für vier Stunden mit *NmB* und *NmC* Wildtyp und Kapselmutanten im UK-Modell von der basolateralen Seite mit einer MOI 100 infiziert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen (Kon), als Positivkontrollen für die Aktivierung des Erk1/2- bzw. p38-Signalwegs fungierten die mit PMA bzw. Anisomycin (Aniso) behandelten Zellen.

#### 4.2.2 Inhibition der MAPK Signalwege Erk1/2 und p38 durch Anwendung spezifischer Inhibitoren

Für die folgenden Versuche wurden die HIBCPP-Zellen mit dem selektiven Mek1/2 Inhibitor U0126 sowie dem p38 Inhibitor SB203580 inkubiert. Die Wirkung dieser Inhibitoren wurde für HIBCPP-Zellen bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  nachgewiesen (Dinner *et al.*, 2017). Beide Inhibitoren wurden allerdings in der vorliegenden Dissertation bei Infektionsexperimenten mit *N. meningitidis* und *S. suis* in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Grund hierfür war eine Unverträglichkeit der Inhibitoren bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  für die Kapselmutanten der *N. meningitidis* Stämme sowie der *S. suis* Stämme.

Die Wirkung der Inhibitoren bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  wurde exemplarisch unter Bedingungen untersucht, bei denen HIBCPP-Zellen mit dem *NmB* Stamm MC58siaD<sup>-</sup> infiziert worden waren, da dieser eine starke Aktivierung der MAPK bewirkte (vgl. Abbildung 12). Für die Experimente wurden die HIBCPP-Zellen in der UK kultiviert. Anschließend wurde die Wirkung der Inhibitoren auf infizierte und nicht-infizierte Zellen analysiert. Als Positivkontrollen für die Aktivierung von Erk1/2 und p38 wurden PMA und Anisomycin eingesetzt.

Abbildung 13 zeigt, dass der Erk1/2 Inhibitor U0126 die Phosphorylierung, und damit die Aktivierung, von Erk1/2 in infizierten und nicht-infizierten Zellen verhindert. Ebenso wurde die Aktivierung von p38 durch SB203580 unterbunden, was an der Inhibition der Phosphorylierung des p38 Substrats MAPKAPK2 verdeutlicht wird.



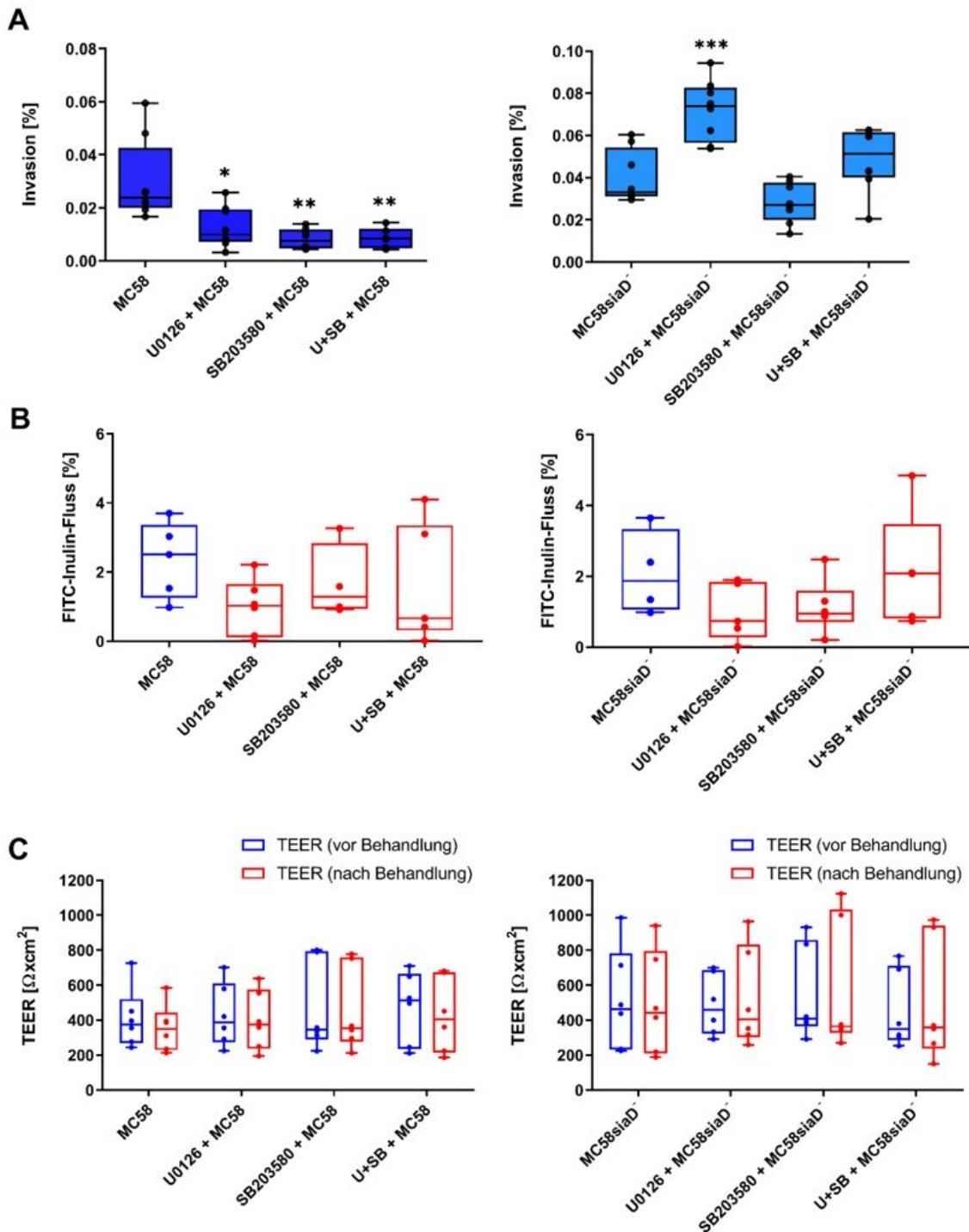
**Abbildung 13: Inhibition der Erk1/2 und p38 Signalwege durch Anwendung spezifischer Inhibitoren.** In UK kultivierte HIBCPP-Zellen wurden für 4 h mit dem *N. meningitidis* Stamm MC58siaD<sup>-</sup> (*Nm*) infiziert. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle (Kon) herangezogen. Die Aktivierung von Erk1/2 wurde durch Zugabe von 25  $\mu$ M U0126 (U) inhibiert und mit Hilfe eines Immunoblots nachgewiesen (A). Dabei dienten die mit PMA behandelten Zellen als Positivkontrolle des Erk1/2-Signalweges. Die Phosphorylierung von p38 wurde durch den Inhibitor SB203580 (SB) bei einer Konzentration von 25  $\mu$ M unterbunden. Die Funktionalität des Inhibitors wurde anhand eines Immunoblots des p38 Zielproteins MAPKAPK-2 untersucht (B). Die Behandlung mit Anisomycin (Aniso) stellt eine Positivkontrolle für die Aktivierung des p38-Signalwegs dar.

#### 4.2.3 Für die Infektion der HIBCPP-Zellen durch den *N. meningitidis* B Wildtyp sind die MAPK Erk1/2 und p38 notwendig, nicht jedoch für die Kapselmutante

Im Folgenden wurden die Auswirkungen der Inhibition des Erk1/2 und p38 Signalwegs auf die Infektion der HIBCPP-Zellen durch *N. meningitidis* in Infektionsexperimenten getestet. Zu diesem Zweck wurden die HIBCPP-Zellen eine Stunde mit den Inhibitoren inkubiert und anschließend für 4 h mit dem *N. meningitidis* Wildtyp (MC58) und dessen Kapselmutante (MC58siaD<sup>-</sup>) infiziert. Die Infektion fand in der UK von der basolateralen Seite der Zellen aus statt. Eingesetzt wurde eine MOI 10, die von Borkowski *et al.* für eine Infektionsdauer von 4 h etabliert wurde (Borkowski *et al.*, 2014). Im Anschluss an die Infektion wurde eine DIF durchgeführt, um die Zahl der intra- und extrazellulären Bakterien zu ermitteln. Die Barrierefunktion wurde zu Beginn und Ende der Infektion mittels der Bestimmung des TEER und nach Ablauf der vier Stunden durch die Messung des Inulin-Flusses überprüft.

Die Blockierung der Aktivierung der MAPK Erk1/2 sowie p38 führte im Fall des Wildtyp Stamms MC58 zu einer signifikanten Reduktion der intrazellulären Bakterien (Abbildung 14A). Die Inhibition der MAPK p38 durch den Inhibitor SB203580 resultierte in einer stärker reduzierten Infektionsrate als die Inhibition der MAPK Erk1/2 durch den Inhibitor U0126. Eine Kombination beider Inhibitoren konnte keinen signifikanten additiven Effekt auf die Anzahl intrazellulärer Bakterien aufweisen. Die Infektionsrate der Kapselmutante hingegen wurde weder durch die Inhibition von Erk1/2 noch von p38 signifikant reduziert. Die Blockierung des Erk1/2 Signalwegs hatte stattdessen einen signifikanten positiven Effekt auf die Infektionsrate, während die Zahl der intrazellulären Bakterien bei Blockierung von p38 leicht verringert wurde, sich jedoch nicht signifikant von der Kontrolle unterschied. Bei Zugabe beider Inhibitoren wurde eine Infektionsrate beobachtet, welche sich nicht signifikant von der Infektionsrate in unbehandelten HIBCPP-Zellen unterschied.

Um die Barrierefunktion zu überwachen, wurden TEER und FITC-Inulin-Fluss (Abbildung 14B, C) gemessen, die über den Zeitraum der Experimente stabil blieben.



**Abbildung 14:** Die MAPK Erk1/2 und p38 werden für die Infektion der HIBCPP-Zellen durch den *NmB* Wildtyp Stamm benötigt, während die Inhibition des Erk1/2 Signalwegs zu einer erhöhten Infektion durch die Kapselmutante führt, p38 jedoch keinen Einfluss auf die Infektion der Kapselmutante zeigt. HIBCPP-Zellen wurden eine Stunde lang mit den Inhibitoren U0126, SB203580 oder beiden Inhibitoren (U+SB) in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  inkubiert. Unbehandelte Zellen fungierten als Kontrolle. Die HIBCPP-Zellen wurden für 4 h bei einer MOI 10 in der UK infiziert. Durch Immunfluoreszenzfärbung konnten die intrazellulären Bakterien quantifiziert werden (A). Die Integrität der Barrierefunktion wurde im Verlauf des Experiments durch Messung der Permeabilität für FITC-Inulin (B) sowie der TEER-Werte (C) bestimmt. \*\*\* extrem signifikant,  $p < 0,001$ ; \*\* hoch signifikant,  $p < 0,01$ ; \* signifikant,  $p < 0,05$ ; bei Vergleich der Infektionsrate von behandelten Zellen mit der Infektionsrate der Kontrollzellen.

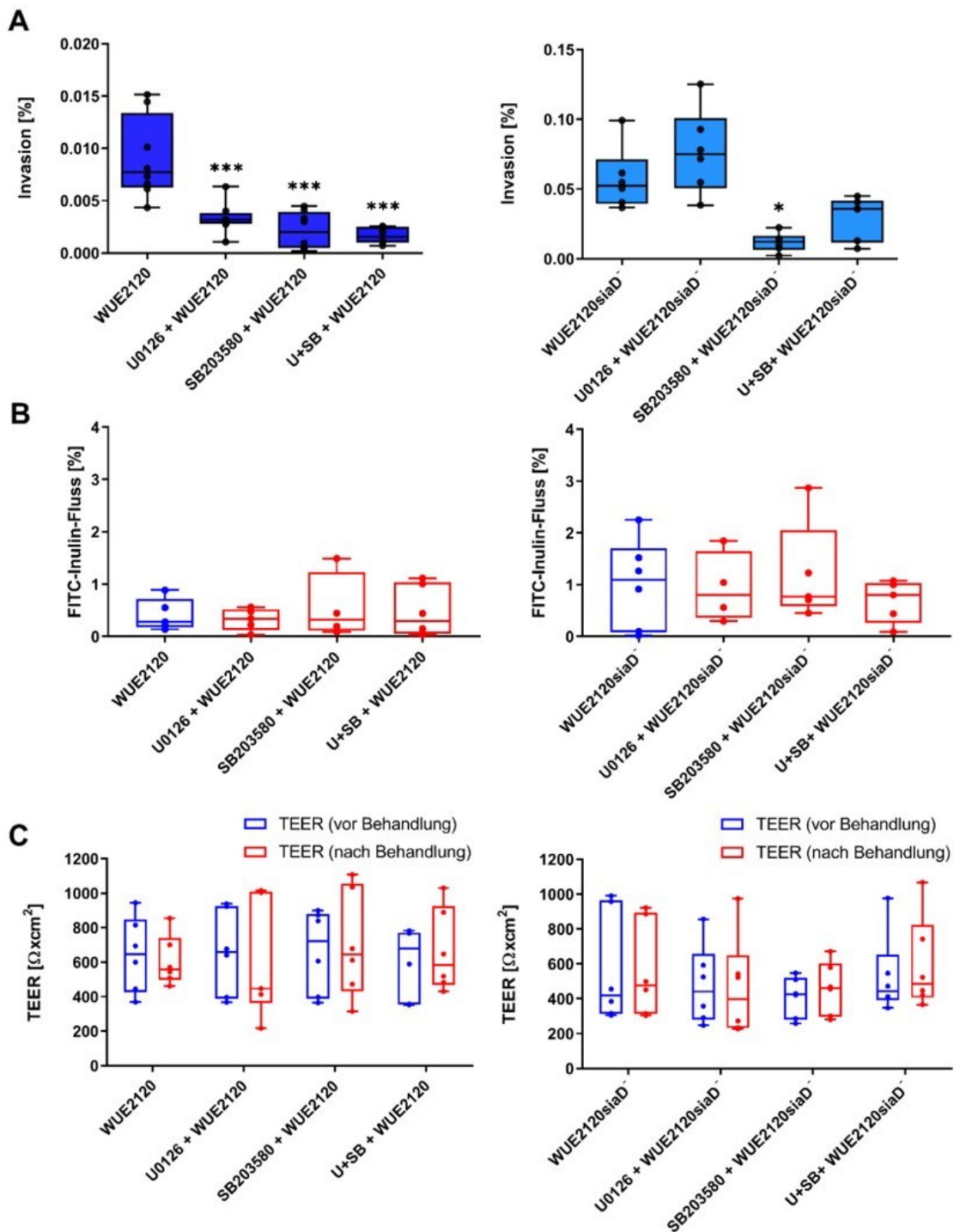


#### **4.2.4 Die MAPK Erk1/2 und p38 sind notwendig für eine effektive Infektion der HIBCPP-Zellen durch den *N. meningitidis* C Wildtyp, während bei Deletion der Kapsel nur der p38 MAPK Signalweg notwendig ist**

Für die Infektionsexperimente mit den *NmC* Erregern wurden, wie in 4.2.3 beschrieben, die Inhibitoren der MAPK Erk1/2 und p38 in einer Konzentration von 25  $\mu$ M eingesetzt. Nach der einstündigen Vorinkubation der HIBCPP-Zellen in der UK wurden diese von der basolateralen Seite für 4 h und einer MOI 10 mit dem Wildtyp (WUE2120) und dessen Kapselmutante (WUE2120siaD<sup>-</sup>) infiziert. Die Zahl der intrazellulären Erreger wurde im Anschluss an die Infektion durch eine DIF-Färbung ermittelt. Die Barrierefunktion der HIBCPP-Zellen wurde zu Beginn und Ende der Infektion mittels der Bestimmung des TEER sowie der Messung des Inulin-Flusses überprüft.

In Fall des Wildtyp Stamms (WUE2120) führte die Blockierung der MAPK Erk1/2 zu einer signifikanten Inhibition der Infektionsrate. Die Blockierung der MAPK p38 resultierte ebenfalls in einer Verringerung der intrazellulären Bakterien (Abbildung 15A). Die Kombination beider Inhibitoren führte zu einem Effekt, welcher dem entsprach, der bei der alleinigen Zugabe des p38 Inhibitors erreicht wurde. Ein additiver Effekt konnte hier nicht beobachtet werden. Die Kapselmutante (WUE2120siaD<sup>-</sup>) hingegen wies keine Inhibition der Infektion von *NmC* in HIBCPP-Zellen nach Behandlung mit dem Erk1/2 Inhibitor auf. Ähnlich wie bei der *NmB* Kapselmutante, war hier ein Anstieg der Anzahl intrazellulärer Bakterien zu beobachten, der allerdings nicht signifikant war. Inhibition der MAPK p38 führte hingegen zu einer signifikanten Inhibition der Infektion. Die Kombination beider Inhibitoren resultierte in einer geringen, jedoch nicht signifikanten, Verminderung der intrazellulären Bakterien gegenüber der Infektionsrate in unbehandelten HIBCPP-Zellen.

Die Barrierefunktion der HIBCPP-Zellen wurde durch Messung von TEER und des FITC-Inulin Flusses überprüft. Beide Indikatoren wiesen auf eine stabile Barrierefunktion hin (Abbildung 15B, C).



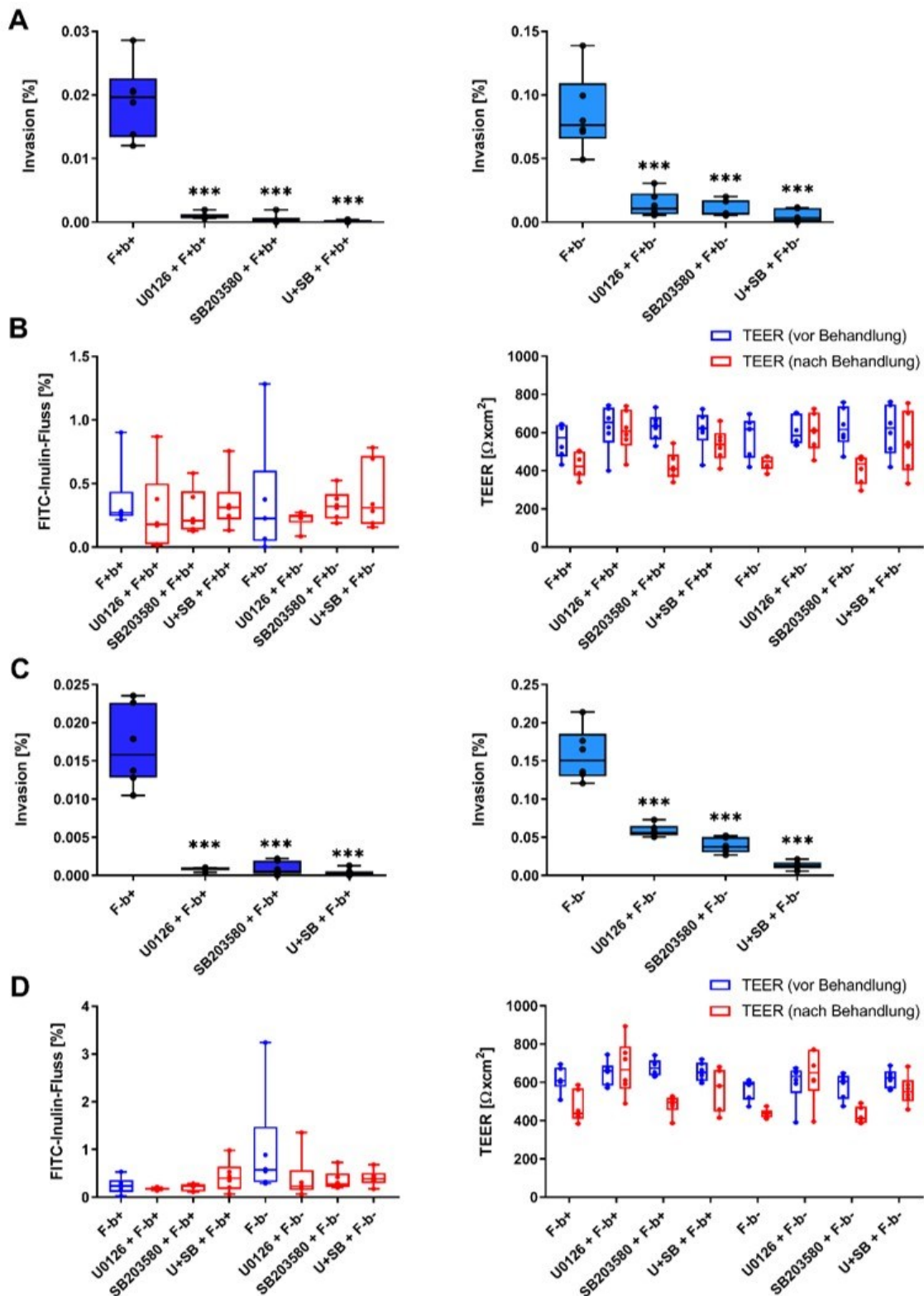
**Abbildung 15:** Die MAPK p38 wird für die Infektion der HIBCPP-Zellen durch den *NmC* Wildtyp Stamm und dessen Kapselmutante benötigt, während Erk1/2 nur Einfluss auf die Infektion durch den *NmC* Wildtyp Stamm aufweist. HIBCPP-Zellen wurden für eine Stunde mit den Inhibitoren U0126, SB203580 oder einer Kombination beider Inhibitoren (U+SB) in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  inkubiert. Unbehandelte Zellen fungierten als Kontrolle. Die HIBCPP-Zellen wurden für 4 h bei einer MOI 10 in der UK infiziert. Mit Hilfe der DIF konnten die intrazellulären Bakterien quantifiziert werden (A). Die Integrität der Barrierefunktion wurde im Verlauf des Experiments durch Messung der Permeabilität für FITC-Inulin (B) sowie der TEER-Werte (C) bestimmt. \*\*\*extrem signifikant,  $p < 0,001$ , \* signifikant,  $p < 0,05$ ; bei Vergleich der Infektionsrate von behandelten Zellen mit der Infektionsrate der Kontrollzellen.

#### 4.2.5 Erk1/2 und p38 sind relevant für eine effiziente Infektion von HIBCPP-Zellen durch *H. influenzae*

Um den Einfluss der MAPK Signalwege auf die Infektionsrate von *H. influenzae* in HIBCPP-Zellen zu untersuchen, wurden diese zunächst für eine Stunde mit den MAPK Inhibitoren U0126 und SB203580 in einer Endkonzentration von jeweils 50  $\mu$ M inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen in der UK von der basolateralen Seite für 6 h infiziert. Die Anzahl der intrazellulären Bakterien wurde mittels DIF quantifiziert. Um zusätzlich den Einfluss der Virulenzfaktoren Kapsel und Fimbrien zu ermitteln, wurden stabile Varianten des Wildtyps (F+b+) eingesetzt. Diese exprimierten entweder keine Kapsel (F+b-), keine Fimbrien (F-b+) oder keine Kapsel und keine Fimbrien (F-b-). Die Unterschiede in den Infektionsraten dieser Varianten und des Wildtyps in HIBCPP-Zellen wurden bereits beschrieben (Häuser *et al.*, 2018). Die Barrierefunktion wurde mittels der Messung des TEER und des FITC-Inulinflusses ermittelt.

Sowohl die Blockierung des Erk1/2 als auch des p38 Signalwegs führte zu einer sehr starken, signifikanten Verringerung der Anzahl intrazellulärer Bakterien in den HIBCPP-Zellen, unabhängig von der An- und Abwesenheit der bakteriellen Kapsel und der Fimbrien (Abbildung 16A, C). Die Kombination beider Inhibitoren hatte den stärksten negativen Effekt auf die Infektionsraten bei allen *H. influenzae* Stämmen. Sowohl der Wildtyp Stamm (F+b+) als auch die Variante ohne Fimbrien (F-b+) wiesen eine fast vollständige Unterbindung der Infektion nach Inhibition der beiden Signalwege auf. Des Weiteren wurde bei Abwesenheit der Kapsel, nicht jedoch der Fimbrien (F+b-), ein vergleichsweise geringerer Effekt durch die Inhibition der Signalwege auf die Anzahl der intrazellulären Bakterien festgestellt, als bei den bekapselten Stämmen beobachtet wurde. Die Zahl der intrazellulären Bakterien war auch hier signifikant verringert, jedoch war der Effekt nicht so ausgeprägt, wie es bei den beiden bekapselten Stämmen der Fall war. Bei der Variante ohne Kapsel und Fimbrien (F-b-) ist der Effekt der Blockierung der Signalwege, im Vergleich zu den anderen Stämmen, am geringsten, jedoch noch immer hoch signifikant. Zudem ist bei dieser Variante der Effekt der Blockierung des Erk1/2 Signalwegs auf die Infektionsrate geringer als der Effekt der Blockierung des p38 Signalwegs, und die Inhibition beider Signalwege gleichzeitig weist einen additiven Effekt auf.

Auch bei diesen Experimenten wurden TEER und Inulin-Fluss gemessen, um die Barrierefunktion der HIBCPP-Zellen überprüfen zu können. Diese blieben während der Experimente konstant (Abbildung 16B, D)



**Abbildung 16: Die MAPK Erk1/2 und p38 werden für die Infektion der HIBCPP-Zellen durch *H. influenzae* in An- und Abwesenheit der Kapsel und Fimbrien benötigt** HIBCPP-Zellen wurden für eine Stunde mit den Inhibitoren U0126, SB203580 oder einer Kombination beider Inhibitoren (U+SB) in einer Konzentration von jeweils 50  $\mu\text{M}$  inkubiert. Unbehandelte Zellen fungierten als Kontrolle (Kon). Die HIBCPP-Zellen wurden für 6 h bei einer MOI 10 in der UK infiziert. Mit Hilfe der DIF konnten die intrazellulären Bakterien quantifiziert werden (A, C). Die Integrität der Barrierefunktion wurde im Verlauf des Experiments durch Messung der TEER-Werte und der Permeabilität für FITC-Inulin (B, D) bestimmt. \*\*\*extrem signifikant,  $p < 0,001$ ; bei Vergleich der Infektionsrate von behandelten Zellen mit der Infektionsrate der Kontrollzellen.

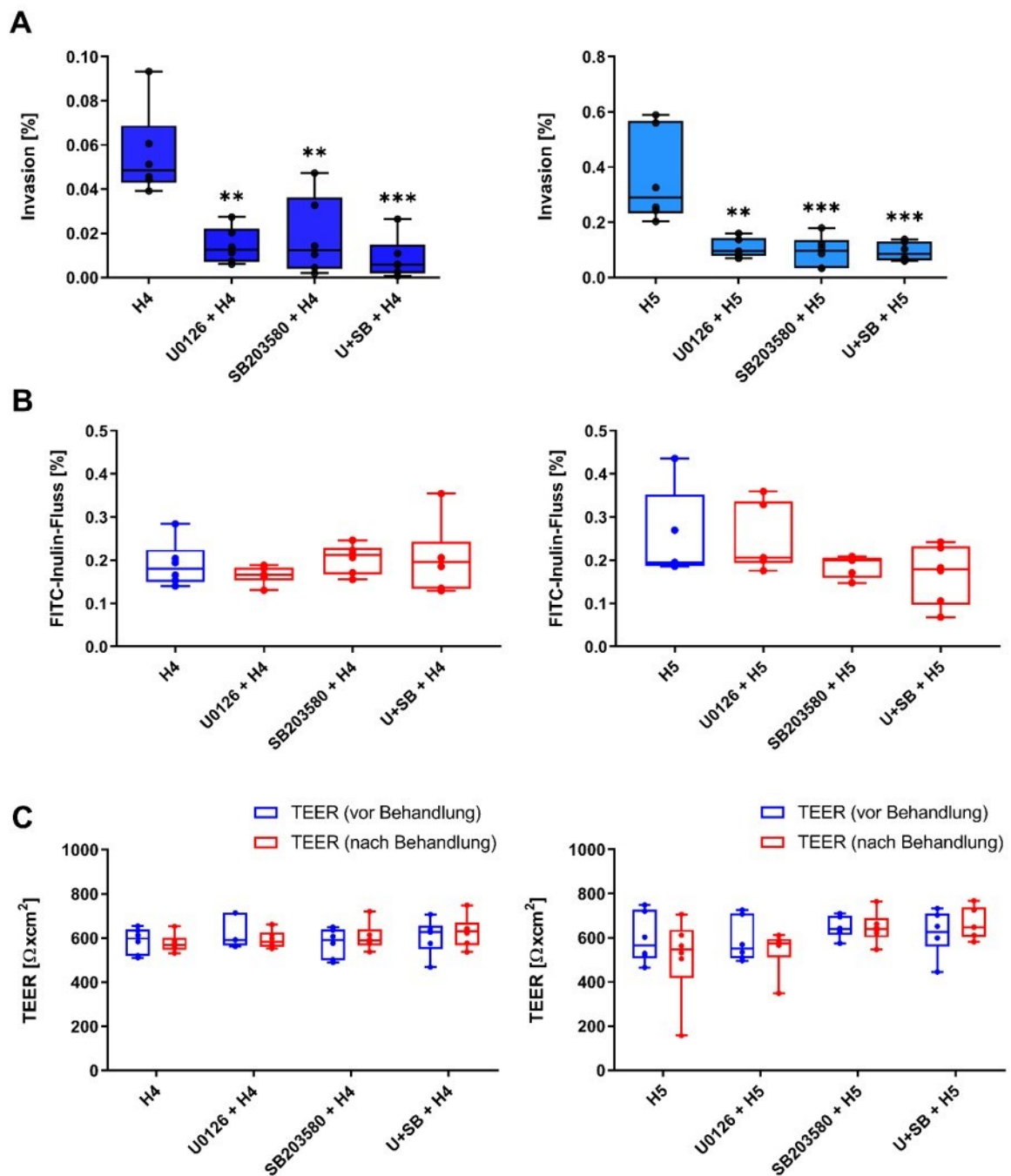
---

#### **4.2.6 Für die erfolgreiche Infektion der HIBCPP-Zellen durch *S. suis* und dessen Kapselmutante sind die MAPK Erk1/2 und p38 notwendig.**

Um den Einfluss der MAPK Erk1/2 und p38 auf die Infektionsrate des Erregers *S. suis* in HIBCPP-Zellen zu ermitteln, wurden die Zellen mit den Inhibitoren U0126 und SB203580 behandelt (vgl. 4.2.3). Die HIBCPP-Zellen wurden mit den beiden Inhibitoren (25 µM) für eine Stunde inkubiert, bevor sie in der UK bei einer MOI 10 für 4 h infiziert wurden. TEER und Inulin-Fluss wurden wie für die anderen Erreger beschrieben (4.2.3) gemessen, um die Barrierefunktion der Zellen über das Experiment hinweg zu kontrollieren.

Sowohl der Wildtyp als auch die Kapselmutante von *S. suis* wiesen eine signifikant reduzierte Anzahl an intrazellulären Bakterien nach Inhibition der beiden MAPK Signalwege auf (Abbildung 17A), wobei die Inhibition der beiden Signalwege eine fast identische Reduktion der Invasionsraten bewirkte. Ein additiver Effekt der Inhibition beider Signalwege konnte weder für den Wildtyp Stamm noch für die Kapselmutante beobachtet werden. Die Barrierefunktion blieb während der Experimente konstant (Abbildung 17B, C).

Der Effekt der Inhibition der MAPK Erk1/2 und p38 auf die Infektionsraten der verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Erreger ist in Tabelle 10 zusammengefasst.



**Abbildung 17: Für die Infektion der HIBCPP-Zellen durch den Erreger *S. suis* und dessen Kapselmutante werden die MAPK Erk1/2 und p38 benötigt.** HIBCPP-Zellen wurden für eine Stunde mit den MAPK Inhibitoren U0126, SB203580 oder einer Kombination beider Inhibitoren (U+SB) in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  inkubiert. Unbehandelte Zellen fungierten als Kontrolle (Kon). Die HIBCPP-Zellen wurden für 4 h bei einer MOI 10 in der UK infiziert. Mit Hilfe der DIF konnten die intrazellulären Bakterien quantifiziert werden (A). Die Integrität der Barrierefunktion wurde im Verlauf des Experiments durch Messung der Permeabilität für FITC-Inulin (B) und der TEER-Werte (C) bestimmt. \*\*\* extrem signifikant,  $p < 0,001$ ; \*\* hoch signifikant,  $p < 0,01$ ; bei Vergleich der Infektionsrate von behandelten Zellen mit der Infektionsrate der Kontrollzellen.

Tabelle 10: Zusammenfassung des Effekts der Inhibition der MAPK Erk1/2 und p38 auf die Infektionsraten der Erreger in HIBCPP-Zellen.

	Gram-negativ			Gram-positiv
	<i>NmB</i>	<i>NmC</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>S. suis</i>
<b>Wildtyp</b>	<b>Verringerung</b> der Infektionsrate nach Inhibition von Erk1/2 und/ oder p38	<b>Verringerung</b> der Infektionsrate nach Inhibition von Erk1/2 und/ oder p38	<b>Verringerung</b> der Infektionsrate nach Inhibition von Erk1/2 und/ oder p38	<b>Verringerung</b> der Infektionsrate nach Inhibition von Erk1/2 und/ oder p38
<b>Kapselmutante</b>	<b>Keine Verringerung</b> der Infektion der HIBCPP-Zellen nach Inhibition von Erk1/2 und/ oder p38	<b>Keine Verringerung</b> der Infektion der HIBCPP-Zellen nach Inhibition von Erk1/2 <b>Verringerung</b> der Infektionsrate nach Inhibition von p38	<b>Verringerung</b> der Infektionsrate nach Inhibition von Erk1/2 und/ oder p38	<b>Verringerung</b> der Infektionsrate nach Inhibition von Erk1/2 und/ oder p38
<b>Deletion der Fimbrien</b>			<b>Verringerung</b> der Infektionsrate nach Inhibition von Erk1/2 und/ oder p38	

## 4.3 Einfluss der MAPK auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit bakteriellen Erregern

Da die Induktion und Regulation der Entzündungsantwort unter anderem von MAPK gesteuert wird, kann die Aktivierung von MAPK nach Infektion von Wirtszellen die Expression von Zytokinen und Chemokinen zur Folge haben. Insbesondere die Expression von *il6* und *il8* wurde nach Infektion der BHS und BLS mit verschiedenen Erregern beschrieben (Dinner *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2011; Sokolova *et al.*, 2004). Eine Regulation der Expression dieser Botenstoffe durch MAPK Signalwege wurde ebenfalls bereits beschrieben (Dinner *et al.*, 2017; Xing *et al.*, 2010; Sokolova *et al.*, 2004). Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, in welchem Maße die MAPK Erk1/2 und p38 an der Expression von *il6* und *il8* in HIBCPP-Zellen während der Infektion mit verschiedenen Erregern beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden die Inhibitoren U0126 und SB203580 oder eine Kombination der beiden Inhibitoren (U+SB) eingesetzt, um die Aktivierung des Erk1/2 Signalwegs, des p38 Signalwegs oder beider Signalwege zu unterbinden.

### 4.3.1 Effekt der Inhibition der MAPK auf die Expression von *il6* und *il8*

Um den Einfluss der Inhibition der MAPK auf die Zellen durch die eingesetzten chemischen Inhibitoren von dem Effekt der Infektion durch die Erreger unterscheiden zu können, wurde zuerst untersucht, inwiefern der Einsatz der Inhibitoren selbst die relative Expression von *il6* und *il8* beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden die HIBCPP-Zellen im UK System kultiviert und in An- und Abwesenheit der Inhibitoren U0126 und SB203580 oder einer Kombination beider Inhibitoren inkubiert. Der Einfluss der Inhibitoren wurde für die Konzentration 25  $\mu$ M und 50  $\mu$ M für 7 h getestet (1 h Vorinkubation der Zellen+ 6 h Versuchsdurchführung), da sich die eingesetzte Konzentration der Inhibitoren bei den Infektionen mit den verschiedenen Erregern unterschied.

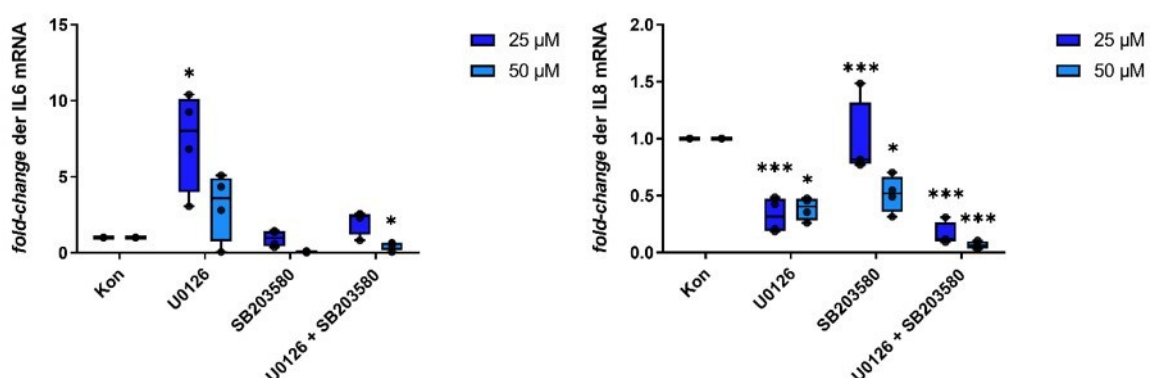
Abbildung 18 zeigt, dass die Inhibitoren U0126 und SB203580 selbst schon einen Einfluss auf die Expression der für die Analysen ausgewählten Zielgene *il6* und *il8* haben. Bei den folgenden Infektionsexperimenten mit den bakteriellen Erregern sollte der Einfluss der Bakterien auf die Expression der Zielgene unter den verschiedenen Bedingungen isoliert betrachtet werden. Dazu wurden unbehandelte HIBCPP-Zellen sowie solche, die mit einem Inhibitor oder der Kombination beider Inhibitoren vorbehandelt worden waren, mit den Bakterien infiziert.



Die im Anschluss an die Durchführung der Experimente in der qRT-PCR gemessene relative Expression der Zielgene wurde nach Normalisierung auf das Referenzgen GAPDH ermittelt. In einem ersten Schritt wurde dann bestimmt, in welchem Maße die Bakterien die Expression von *il6* und *il8* nach den verschiedenen Vorbehandlungen (kein Inhibitor, einzelne Inhibitoren, Kombination der Inhibitoren) regulieren können. Dazu wurde der *fold change* der Zielgenexpression nach Infektion der unterschiedlich vorbehandelten HIBCPP-Zellen bezogen auf die entsprechende, nicht-infizierte und normalisierte Kontrolle (*fold change* = 1) ermittelt. Die statistische Signifikanz der Änderung der Zielgenexpression nach Infektion unter den verschiedenen Bedingungen im Vergleich zu den nicht-infizierten Proben wurde bestimmt, und ist in den folgenden Abbildungen durch Rautensymbole (#) gekennzeichnet. *Fold changes* zwischen 0,5 und 2 wurden als nicht signifikant betrachtet.

In einem zweiten Schritt wurde eine Varianzanalyse der ermittelten *fold changes* nach Infektion unter den verschiedenen Bedingungen (kein Inhibitor, einzelne Inhibitoren, Kombination der Inhibitoren) durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den *fold changes* sind in den folgenden Abbildungen durch Sternchensymbole (\*) gekennzeichnet.

Im Fall der *N. meningitidis* Stämme sowie der *S. suis* Stämme wurde die Inhibitoren in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  eingesetzt, im Fall der *H. influenzae* Stämme wurde eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  angewandt. Bei jedem Infektionsversuch wurde die RNA der behandelten Kontrollen zeitgleich mit der RNA der behandelten und infizierten Zellen isoliert.



**Abbildung 18: Einfluss der Inhibitoren U0126 und SB203580 auf die Expression von *il6* und *il8* in HIBCPP-Zellen.** Die HIBCPP-Zellen wurden im UK-System kultiviert und für 7 h nicht (Kon) oder mit den Inhibitoren U0126 und SB203580 oder beiden Inhibitoren behandelt. Die Inhibitoren wurden in den Endkonzentrationen 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Genaktivität von *il6*, *il8* wurde durch qRT-PCR bestimmt wobei *gapdh* als Kontrollgen fungierte. \*\*\* extrem signifikant,  $p < 0,01$ ; \* signifikant,  $p < 0,05$ ; Vergleich der unbehandelten Kontrolle mit den Zellen, die mit den angegebenen Inhibitoren behandelt wurden.

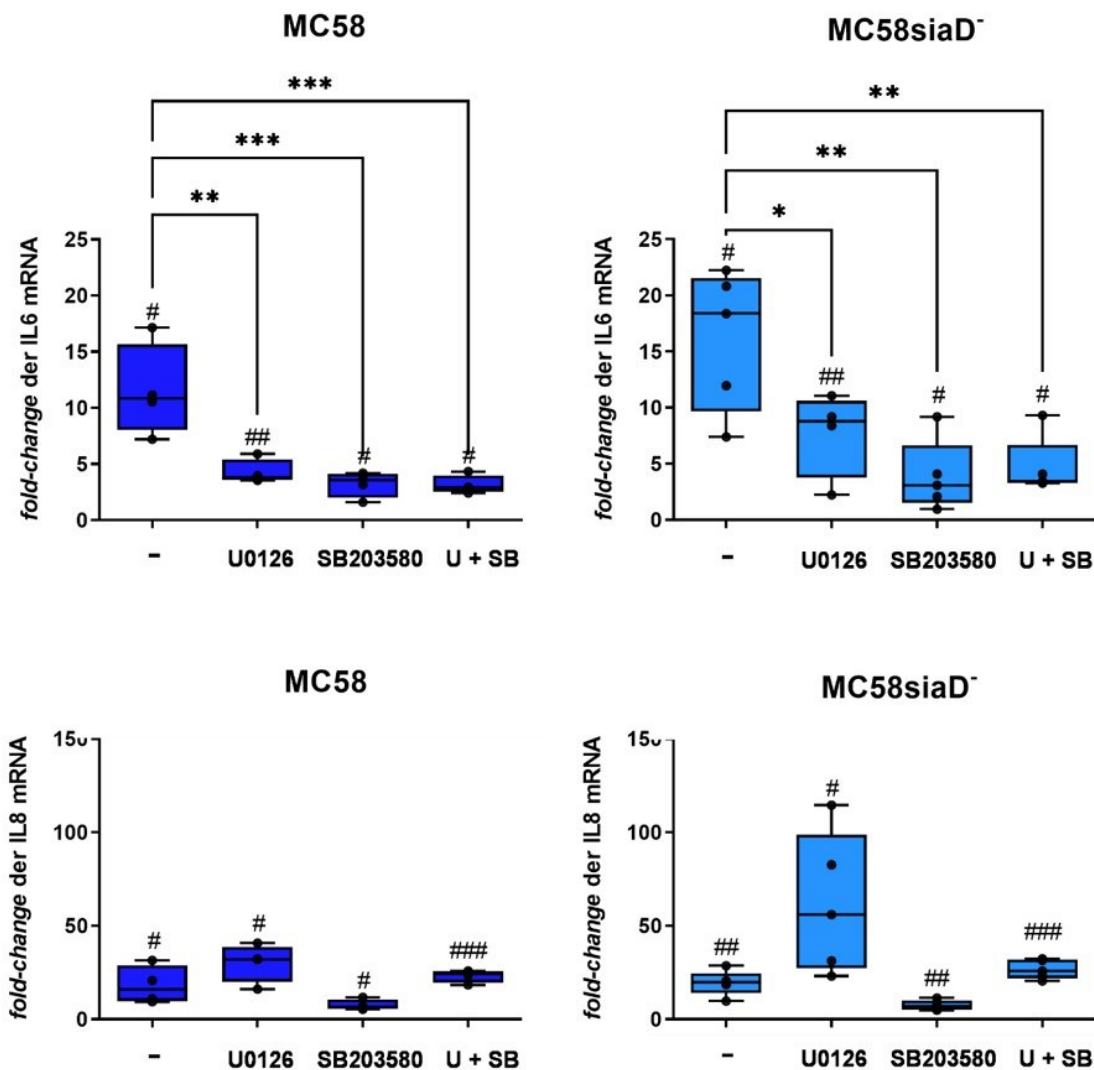
### **4.3.2 Einfluss der MAPK auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit *N. meningitidis***

Die Aktivierung der MAPK wurde mit der Expression verschiedener Zytokine und Chemokine nach Infektion mit *N. meningitidis* in Verbindung gebracht (Sokolova *et al.*, 2004). Die Induktion der Genexpression in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit *NmB* wurde zuletzt für einige Zytokine und Chemokine nachgewiesen (Borkowski *et al.*, 2014). Um den Einfluss der MAPK Erk1/2 und p38 auf die Expression von *il6* und *il8* während der Infektion mit den *NmB* und *NmC* Stämmen in An- und Abwesenheit der Kapsel und der Inhibitoren U0126 und SB203580 zu erforschen, wurden die HIBCPP-Zellen, nach einstündiger Vorbehandlung mit den Inhibitoren, in der UK für 6 h infiziert.

#### **4.3.2.1 Einfluss der MAPK auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit *NmB***

Der Einfluss der MAPK Inhibitionen auf die Expression von *il6* und *il8* in HIBCPP-Zellen ist in Abbildung 19 dargestellt. Die Infektion der HIBCPP-Zellen mit Wildtyp und Kapselmutante der *NmB* Stämme resultierte in einer signifikanten Induktion der Expression von *il6* im Vergleich zu den Kontrollen. Auch nach Behandlung mit den MAPK Inhibitoren konnte, eine signifikant höhere Expression von *il6* im Vergleich zu den Kontrollkonditionen festgestellt werden. Die Behandlung der Zellen mit beiden Inhibitoren vor und während der Infektion der Zellen resultierte allerdings sowohl für den Wildtyp als auch für die Kapselmutante in einem signifikant geringeren *fold-change* im Vergleich zu den infizierten, nicht vorbehandelten Zellen.

Des Weiteren wurde die Expression des Gens *il8* nach Infektion der HIBCPP-Zellen in An- und Abwesenheit der MAPK Inhibitoren betrachtet (Abbildung 19). Die Infektion der Zellen mit beiden *NmB* Stämmen resultierte in einer signifikanten Induktion der *il8* Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen unter allen untersuchten Bedingungen. Die relative Expression von *il8* nach Inhibition der beiden MAPK Signalwege während der Infektion wies keinen signifikanten Unterschied zu der Expression in unbehandelten, infizierten Zellen auf.



**Abbildung 19: Expression von *il6* und *il8* nach Infektion der HIBCPP-Zellen mit *NmB*** Die HIBCPP-Zellen wurden mit den angegebenen Inhibitoren (U0126, SB203580 oder beiden Inhibitoren: U+SB) für 1 h vorbehandelt und anschließend für 6 h mit den *NmB* Stämmen MC58 oder MC58siaD<sup>-</sup> infiziert. Die Genaktivität von *il6*, *il8* wurde durch qRT-PCR bestimmt, wobei *gapdh* als Kontrollgen fungierte. Die behandelten infizierten Proben wurden auf die behandelten Kontrollen normalisiert; unbehandelte infizierte Proben auf die unbehandelte Kontrolle. \*\*\* extrem signifikant,  $p < 0,001$ ; \*\* hoch signifikant,  $p < 0,01$ ; \* signifikant,  $p < 0,05$ ; Vergleich wie angezeigt; Infizierte Zellen mit vorbehandelten infizierten Zellen. ### extrem signifikant,  $p < 0,001$ ; ## hoch signifikant,  $p < 0,01$ ; # signifikant,  $p < 0,05$  Vergleich der behandelten/infizierten Proben zu der korrespondierenden Kontrolle ( $fold-change=1$ ).

#### 4.3.2.2 Einfluss der MAPK auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit *NmC*

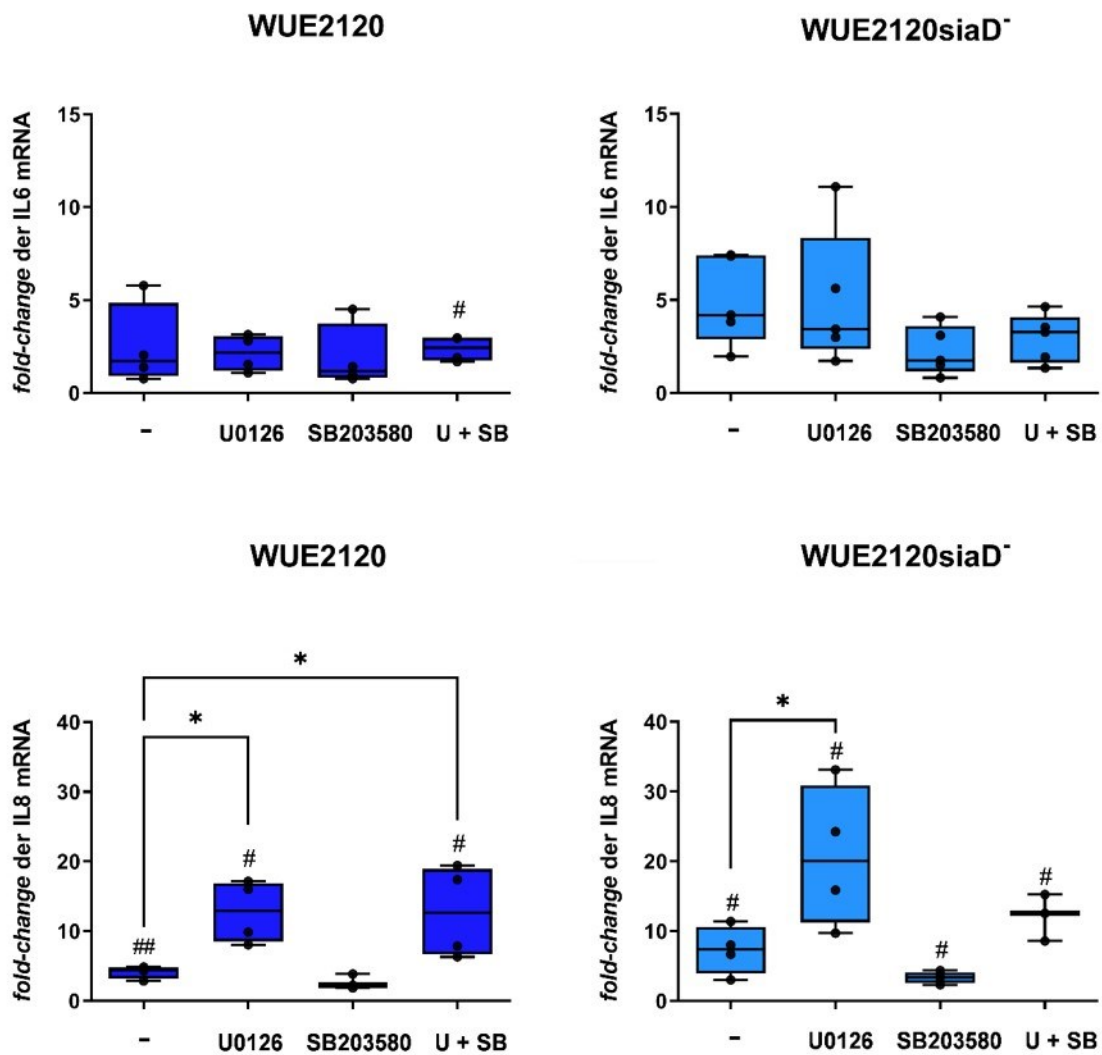
Auch für die *N. meningitidis* Stämme der Serogruppe C wurde der Effekt der MAPK Erk1/2 und p38 auf die Expression von *il6* und *il8* ermittelt (Abbildung 20). Die hierzu durchgeführten

Experimente wurden zeitgleich mit den zuvor in 4.3.2.1 beschriebenen Experimenten durchgeführt, um eine bessere Vergleichbarkeit der beiden Serogruppen und deren Kapselmutanten zu ermöglichen. Die Inhibitoren wurden für die *NmC* Stämme in einer Endkonzentration von 25  $\mu$ M zugegeben und die RNA nach 6 h Infektion der HIBCPP-Zellen isoliert.

Im Gegensatz zu den *NmB* Stämmen hatte die Infektion mit den *NmC* Wildtyp und dessen Kapselmutante keinen signifikanten Effekt auf die Expression von *il6* in HIBCPP-Zellen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Lediglich die Inhibition beider Signalwege während der Infektion der Zellen mit dem *NmC* Wildtyp Stamm wies eine signifikante, jedoch geringe Induktion von *il6* auf. Die Expression der *il8* mRNA hingegen konnte signifikant von beiden Stämmen der *NmC* in HIBCPP-Zellen induziert werden. Auch bei Inhibition der MAPK Signalwege konnte in allen Konditionen, mit Ausnahme der Inhibition von p38 bei Infektion mit dem *NmC* Wildtyp, ein signifikanter Unterschied zu den jeweiligen Kontrollzellen ermittelt werden.

Bei Vergleich der Expression von *il8* in unbehandelten, infizierten HIBCPP-Zellen zu den Konditionen, in welchen während der Infektion die MAPK inhibiert waren, konnte ein signifikant höherer *fold change* der *il8* Expression nach Inhibition von Erk1/2 für Wildtyp und Kapselmutante ermittelt werden. Nach Behandlung mit dem p38 Inhibitor SB203580, konnten keine signifikanten Unterschiede im *fold change* der Genexpression im Vergleich zu infizierten, unbehandelten Zellen beobachtet werden. Eine Kombination beider Inhibitoren wies einen signifikant höheren *fold change* in der Induktion von *il8* nach Infektion mit dem Wildtyp Stamm auf.

Um weiter den Vergleich verschiedener Erreger zu ermöglichen, wurde der Einfluss der MAPK während der Infektion der HIBCPP-Zellen auf die Expression von *il6* und *il8* auch anhand der Gram-negativen *H. influenzae* Stämme und der Gram-positiven *S. suis* Stämme untersucht.



**Abbildung 20: Expression von *il6* und *il8* nach Infektion der HIBCPP-Zellen mit *NmC*** Die HIBCPP-Zellen wurden mit den angegebenen Inhibitoren (U0126, SB203580 oder beiden Inhibitoren: U+SB) für 1 h vorbehandelt und anschließend für 6 h mit den *NmC* Stämmen WUE2120 oder WUE2120siaD<sup>-</sup> infiziert. Die Genaktivität von *il6*, *il8* wurde durch qRT-PCR bestimmt, wobei *gapdh* als Kontrollgen fungierte. \* signifikant,  $p < 0,05$ ; Vergleich wie angezeigt; Infizierte Zellen mit vorbehandelten infizierten Zellen. ## hoch signifikant,  $p < 0,01$ ; # signifikant,  $p < 0,05$  Vergleich der unbehandelten Kontrolle mit den infizierten Zellen (+/- Behandlung mit Inhibitoren)

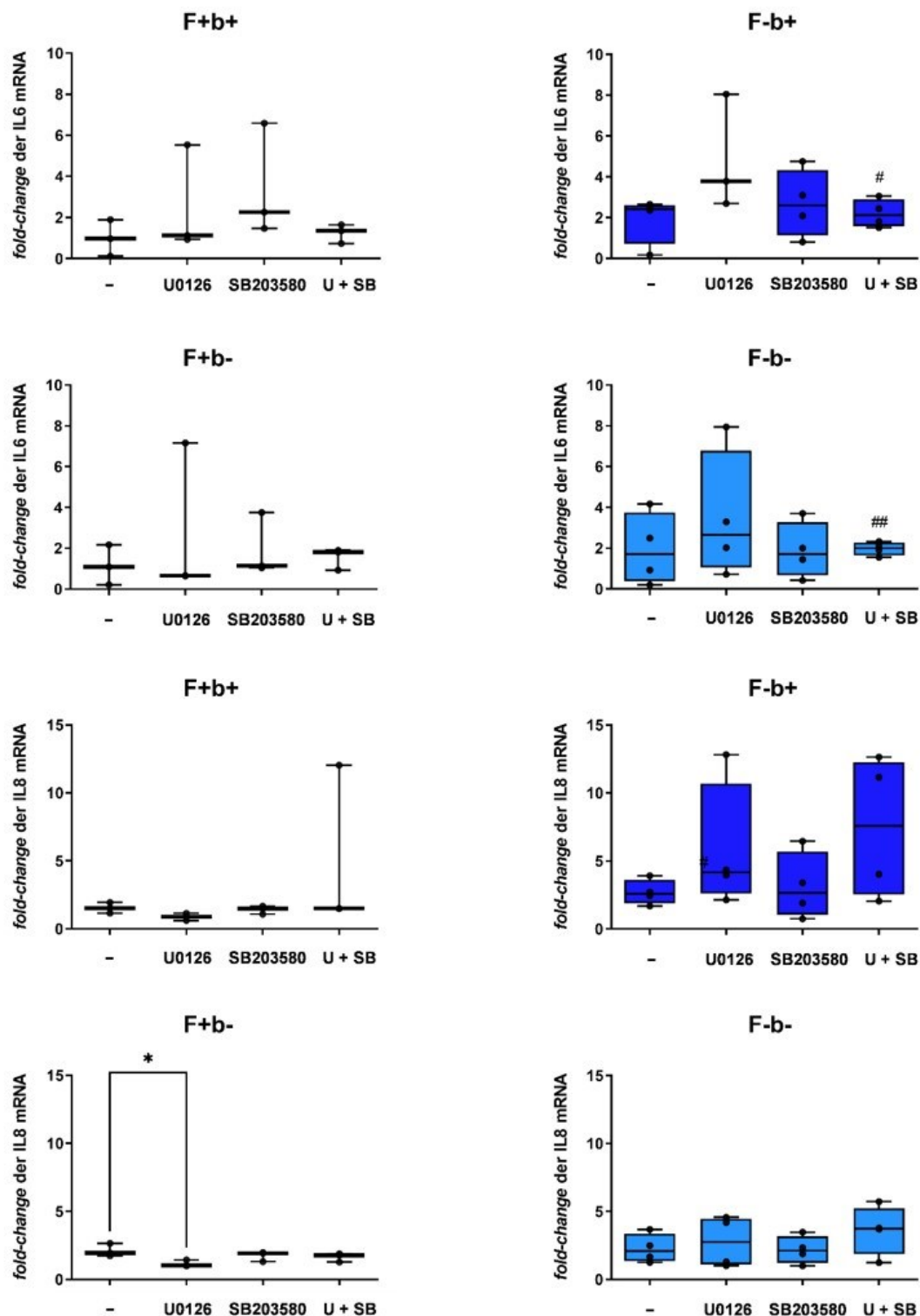
### 4.3.3 Einfluss der MAPK auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit *H. influenzae*

Nach der Analyse des Einflusses der MAPK Erk1/2 und p38 auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen während der Infektion mit dem Gram-negativen Erreger *N. meningitidis*, wurde dies auch für das Gram-negative Bakterium *H. influenzae* untersucht. Auch bei diesen Experimenten wurden die HIBCPP-Zellen für 6 h mit dem Erreger infiziert. Im Anschluss wurde die RNA isoliert und eine qRT-PCR und deren Auswertung sowie statistische Analyse wie zuvor in 4.3.1 beschrieben durchgeführt. Die MAPK Inhibitoren U0126 und SB203580 wurden in einer Endkonzentration von 50  $\mu$ M eingesetzt. Dies entspricht der Konzentration, mit welcher die Infektionsraten in Abhängigkeit der MAPK untersucht wurden.

Abbildung 21 zeigt die Expression von *il6* und *il8* nach Infektion der HIBCPP-Zellen mit den *H. influenzae* Stämmen in An- und Abwesenheit der MAPK Inhibitoren im Vergleich zu den Kontrollkonditionen. Betrachtet wurde der *H. influenzae* Stamm sowie die Varianten ohne die Virulenzfaktoren Kapsel und Fimbrien. In keiner der Konditionen konnte ein signifikant veränderter *fold-change* der *il6* mRNA festgestellt werden. Keiner der beiden bekapselten Stämme (F+b+ und F-b+) wies eine signifikante Induktion der Genexpression in Vergleich zu den Kontrollzellen auf. Gleiches konnte für die beiden Varianten ohne Kapsel beobachtet werden (F+b- und F-b-). Auch die An- und Abwesenheit der Fimbrien hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von *il6* und *il8* nach Infektion der HIBCPP-Zellen.

Zudem hatte Inhibition der Erk1/2 und p38 Signalwege keinen signifikanten Effekt auf die Expression beider Gene. Nach Behandlung mit dem Inhibitor U0126 während der Infektion der HIBCPP-Zellen mit der Variante F+b- konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dieser Kondition und der Infektion in Abwesenheit des Inhibitors ermittelt werden, jedoch unterscheiden sich beide Konditionen nicht signifikant von der Expression des *il8* Transkripts in den Kontrollzellen. Beide Gene wurden durch den Erreger *H. influenzae* sowie nach Inhibition der MAPK Signalwege Erk1/2 und p38 nur in sehr geringem Ausmaß induziert.

Im nächsten Schritt wurde der Effekt des Gram-positiven Erregers *S. suis* auf die Genexpression in HIBCPP-Zellen untersucht. Auch hier wurde der Einfluss der MAPK mit einbezogen.



**Abbildung 21: Expression von *il6* und *il8* nach Infektion der HIBCPP-Zellen mit *H. influenzae*** Die HIBCPP-Zellen wurden mit den angegebenen Inhibitoren (U0126, SB203580 oder beiden Inhibitoren: U+SB) für 1 h vorbehandelt und anschließend für 6 h mit den *H. influenzae* Stämmen F+b+, F+b-, F-b+ und F-b- infiziert. Die Genaktivität von *il6*, *il8* wurde durch qRT-PCR bestimmt, wobei *gapdh* als Kontrollgen fungierte; \* signifikant,  $p < 0,05$ ; Vergleich wie angezeigt; Infizierte Zellen mit vorbehandelten infizierten Zellen. ## hoch signifikant,  $p < 0,01$ ; # signifikant,  $p < 0,05$ ; Vergleich der unbehandelten Kontrolle mit den infizierten Zellen (+/- Behandlung mit Inhibitoren).

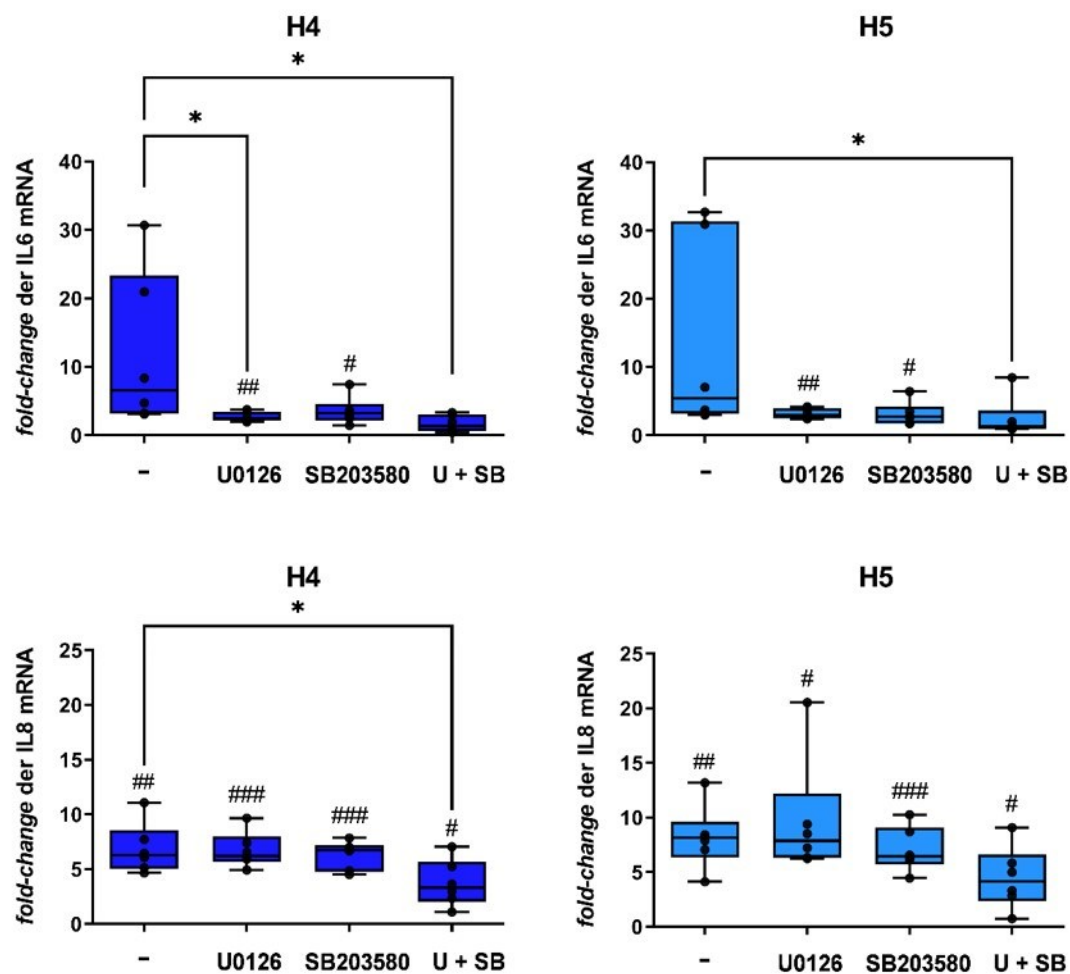
#### 4.3.4 Einfluss der MAPK auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit *S. suis*

Wie zuvor in 4.3.2.1 beschrieben wurde auch der Einfluss der MAPK Erk 1/2 und p38 auf die Expression von *il6* und *il8* während der Infektion der HIBCPP-Zellen durch das Gram-positive Bakterium *S. suis* ermittelt. Die HIBCPP-Zellen wurden für 6 h mit dem Wildtyp (H4) oder der Kapselmutante (H5) infiziert. Die MAPK Inhibitoren wurden in einer Endkonzentration von 25 µM eingesetzt. Nach Ende des Versuchs wurde die RNA isoliert und mit Hilfe der qRT-PCR die Expression der beiden Transkripte ermittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte wie in 4.3.1 beschrieben.

Die Expression der *il6* mRNA nach Infektion der HIBCPP-Zellen durch den *S. suis* Wildtyp und die Kapselmutante (Abbildung 22) unterschied sich nur bei Inhibition der jeweiligen MAPK Signalwege signifikant von der Expression des Botenstoffs in Kontrollzellen, jedoch nicht die Expression von *il6* nach Inhibition beider MAPK. Die Inhibition des MAPK Signalwegs Erk1/2 während der Infektion der HIBCPP-Zellen durch den Wildtyp Stamm verringerte signifikant den *fold change* der Expression von *il6* im Vergleich zu unbehandelten, infizierten Zellen. Gleiches konnte bei dem Einsatz beider Inhibitoren während der Infektion mit dem Wildtyp und der Kapselmutante für beide Transkripte beobachtet werden. Jedoch ist hervorzuheben, dass die Infektion der HIBCPP-Zellen weder durch den Wildtyp noch durch die Mutante zu einer signifikanten Induktion der Expression der *il6* mRNA im Vergleich zu den Kontrollkonditionen führte.

Sowohl der Wildtyp Stamm als auch die Kapselmutante konnten eine signifikante Induktion der Expression von *il8* herbeiführen. Auch nach Behandlung der Zellen mit beiden MAPK Inhibitoren während der Infektion der HIBCPP-Zellen unterschieden sich die *fold-changes* signifikant von denen der Kontrollkonditionen. Nur die Kombination beider MAPK Inhibitoren wies eine Reduktion des *fold-changes* im Vergleich zu den mit dem Wildtyp infizierten, unbehandelten Zellen auf.





**Abbildung 22: Expression von *il6* und *il8* nach Infektion der HIBCPP-Zellen mit *S. suis*** Die HIBCPP-Zellen wurden mit den angegebenen Inhibitoren (U0126, SB203580 oder beiden Inhibitoren: U+SB) für 1 h vorbehandelt und anschließend für 6 h mit den *S. suis* Stämmen H4 oder H5 infiziert. Die Genaktivität von *il6*, *il8* wurde durch qRT-PCR bestimmt, wobei *gapdh* als Kontrollgen fungierte. \* signifikant,  $p < 0,05$ ; Vergleich wie angezeigt; Infizierte Zellen mit vorbehandelten infizierten Zellen. ### extrem signifikant,  $p < 0,001$ ; ## hoch signifikant,  $p < 0,01$ ; # signifikant,  $p < 0,05$  Vergleich der unbehandelten Kontrolle mit den infizierten Zellen (+/- Behandlung mit Inhibitoren)

## 4.4 MACE Analyse der HIBCPP-Zellen nach Infektion mit *N. meningitidis* Serogruppe B Stämmen

Eine alternative und relativ neue Methode zur Genom-weiten Sequenzierung von RNA wurde von GenXPro entwickelt und heißt *Massive Analysis of cDNA Ends*, kurz MACE (Rotter 2017). Diese Sequenzierungsmethode, die nur das 3'-Endes des Transkripts sequenziert, hat Vorteile gegenüber den herkömmlichen RNA-Seq-Methoden. Mit der MACE ist es beispielsweise möglich die Proben tiefer zu sequenzieren, da jeder Lesevorgang für ein Transkript in der Stichprobe repräsentativ ist, während die konventionelle RNA-Seq mehrere *Reads* des gleichen Transkripts aufweisen kann, da die Sequenzierung auf der Gesamtheit der zufällig fragmentierten Transkripte durchgeführt wird (Rotter 2017).

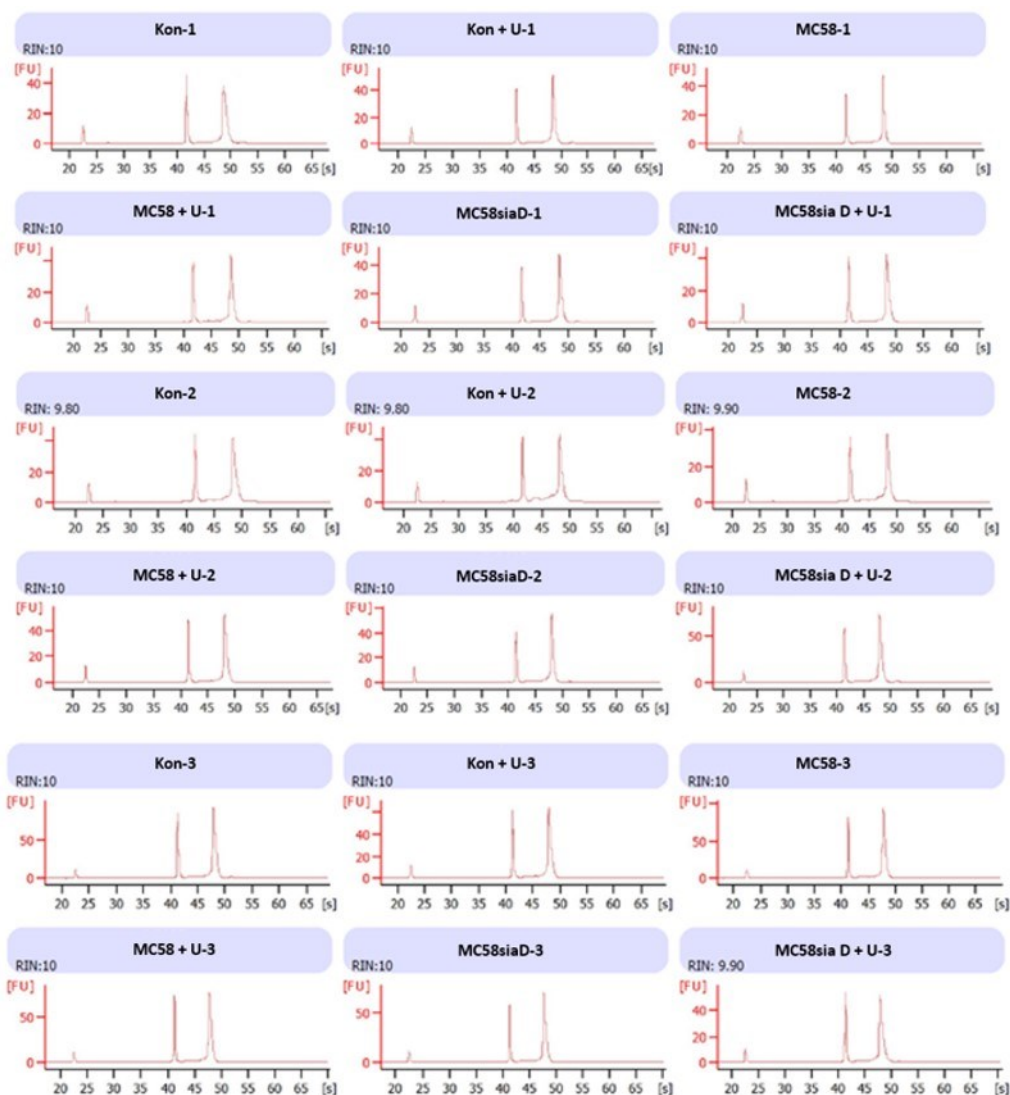
Nach Kontakt mit pathogenen Erregern trägt der PC zur Immunabwehr bei und produziert in Folge dessen Zytokine (Schwerk *et al.*, 2015; Schwerk *et al.*, 2011). Zuvor wurde die Regulation der Genexpression in HIBCPP-Zellen infolge einer Infektion mit *N. meningitidis* mit Hilfe der Mikroarray-Technologie analysiert (Borkowski *et al.*, 2014). Mit Hilfe der neuen MACE-Technologie wurde nun der Effekt der *NmB* Stämme auf die HIBCPP-Zellen erneut analysiert, um von der optimierten Technologie zur besseren Analyse der Interaktion Gebrauch zu machen sowie die Ergebnisse von Borkowski *et al.* zu bestätigen. Zudem wurde der Einfluss der MAPK Erk1/2 auf die Infektion der *NmB* Stämme in HIBCPP-Zellen untersucht. Dieser Aspekt wurde auf Grund der unterschiedlichen Infektionsraten von MC58 und MC58siaD<sup>-</sup> in HIBCPP-Zellen nach Inhibition der MAPK (vgl. Abbildung 14) untersucht. Für die MACE Analyse wurden die HIBCPP-Zellen in der UK bei einer MOI 10 für 6 h infiziert, da über diesen Zeitraum in Vorexperimenten eine ausgeprägte Expression bestimmter Gene nach Infektion der Zellen ermittelt wurden (Daten nicht gezeigt)

### 4.4.1 Bestimmung der RIN als Qualitätskontrolle der RNA Proben

Die HIBCPP-Zellen wurden in der Umkehrkultur mit den *NmB* Stämmen MC58 und MC58siaD<sup>-</sup> mit einer MOI 10 für 6 h infiziert. Zusätzlich wurde der Einfluss des Erk1/2 Inhibitors auf die Antwort der Wirtszellen während der Infektion mit den Erregern untersucht. Zu diesem Zweck wurde der Inhibitor in einer Konzentration von 25 µM, wie in 4.3.2.1 beschrieben, eingesetzt. Die RNA wurde am Ende der Infektion wie in Material und Methoden beschrieben isoliert.

Als erster Schritt vor der RNA Sequenzierung (RNA-Seq) wurde eine Qualitätskontrolle der isolierten RNA Proben durchgeführt. Hierzu wurde die RIN bestimmt, indem das Verhältnis der 28S und 18S rRNA ermittelt wurde. Die höchstmögliche RIN hat einen Wert von 10. In diesem Fall besteht ein Verhältnis der 28S zu der 18S rRNA von 2:1. Werte unter 10 deuten auf eine

Schädigung der rRNA hin (Schroeder *et al.*, 2006). Für gute Ergebnisse der RNA-Seq wird auf Basis verschiedener Studien eine RIN von 6 oder höher vorgeschlagen (Kukurba *et al.*, 2015; Gallego Romero *et al.*, 2014). Abbildung 23 zeigt die Elektropherogramme der mit Hilfe des Aligent 2100 Bioanalyser analysierten RNA Proben. Durch Anwendung der Software des Geräts wurden die RIN der Proben ermittelt. Diese befand sich bei allen ausgewählten RNA Proben zwischen 9,8 und 10. Somit entsprachen die Proben den Kriterien, welche zu der Durchführung einer MACE-Analyse empfohlen werden (Kukurba *et al.*, 2015; Gallego Romero *et al.*, 2014). In der MACE Analyse wurden für jede Kondition drei biologische Replikate untersucht.



**Abbildung 23: Zusammenfassung der Aligent 2100 Bioanalyser Elektropherogramme** Dargestellt sind die RNA Proben, die zu der Durchführung der MACE Analyse verwendet wurden. Beschriftet sind Probennahme sowie die biologischen Replikate und die RIN der Proben. Kontrollzellen (Kon) und Behandlung mit dem Inhibitor U0126 (U): Die Peaks bei 42 s und 49 s repräsentieren rRNA. Peaks bei 22 s repräsentieren den eingesetzten Marker.

#### 4.4.2 Statistische Auswertung der sequenzierten Proben durch Vergleich der *Differentially Expressed Genes* und *Gene Ontology* Analyse

Zur Analyse großer Datenmengen existieren eine Reihe an Möglichkeiten, die eine Interpretation dieser Daten ermöglichen. Die hier generierten RNA-Seq Daten wurden auf zwei Weisen statistisch analysiert. Zum einen wurden DEG-Listen erstellt, welche die Unterschiede in der Expression individueller Gene nach verschiedenen Behandlungen zu der Kontrollkondition beschreiben. Des Weiteren wurde durch Anwendung des *GO Analyse Tools* LAGO eine biologische Interpretation der DEG Listen ermöglicht.

#### 4.4.3 Validierung ausgewählter Gene mit Hilfe der qRT-PCR

Die durch die MACE Analyse erhaltenen DEG wurden durch Untersuchung der Expressionslevel verschiedener Gene mittels qRT-PCR verifiziert. Als Basis für die Auswahl der analysierten Gene wurden die Listen der DEG herangezogen (Anhang, Tabelle 16). Zwecks Validierung der Ergebnisse wurden die Gene NFκBIZ, Zc3H12A und TNFα, sowie IL6 und IL8 ausgewählt. Für diese Gene wurde bereits in Borkowski *et al.* eine Regulation während der Infektion mit *NmB* Stämmen gezeigt (Borkowski *et al.*, 2014).

In Tabelle 11 werden die *fold changes* und die dazu korrespondierenden FDR p-Werte, die durch die MACE Analyse ermittelt wurden, mit den relativen *fold changes* ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ), die mit Hilfe der qRT-PCR ermittelt wurden, verglichen. Die Werte der MACE Analyse konnten mit Hilfe der qRT-PCR reproduziert werden.

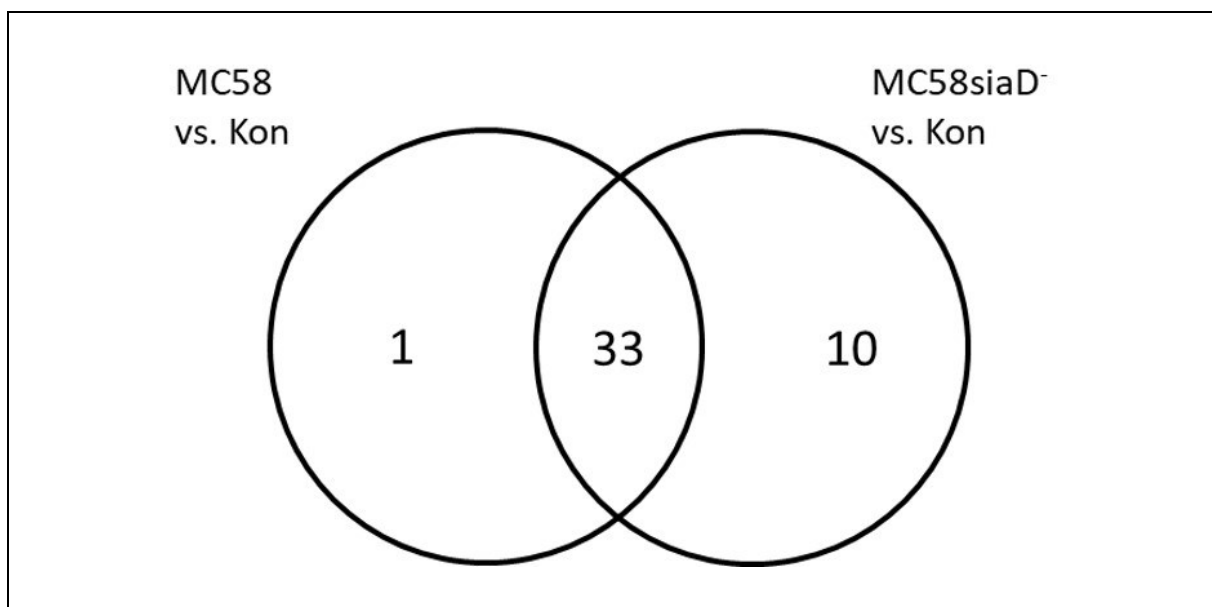
**Tabelle 11: Quantitative PCR zur Validierung der MACE Daten.** Die relativen *fold changes* wurden mittels der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  ermittelt. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (Stdev) der qRT-PCR Daten sowie der *fold change* der DEGs und die FDR p-Werte. Die DEG sind im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Kon) oder, bei Behandlung mit dem Inhibitor U0126, zu der behandelten Kontrolle.

	NFκBIZ			
	qRT-PCR	Stdev	MACE	FDR p-Werte
Kon vs. MC58	13,43	0,98	13,60	0
Kon + U0126 vs. MC58 + U0126	13,17	2,87	8,18	0
Kon vs. MC58siaD <sup>-</sup>	11,16	3,79	11,15	0
Kon + U0126 vs. MC58siaD <sup>-</sup> + U0126	11,99	4,21	8,80	0
	ZC3H12A			
	qRT-PCR	Stdev	MACE	FDR p-Werte
Kon vs. MC58	11,98	2,54	11,63	0
Kon + U0126 vs. MC58 + U0126	11,28	2,91	12,04	0
Kon vs. MC58siaD <sup>-</sup>	11,81	2,83	10,14	0
Kon + U0126 vs. MC58siaD <sup>-</sup> + U0126	10,40	2,35	14,27	0
	TNFα			
	qRT-PCR	Stdev	MACE	FDR p-Werte
Kon vs. MC58	14,35	2,89	18,47	0
Kon + U0126 vs. MC58 + U0126	17,08	1,72	18,21	0
Kon vs. MC58siaD <sup>-</sup>	15,36	2,55	17,79	0
Kon + U0126 vs. MC58siaD <sup>-</sup> + U0126	22,21	3,53	26,58	0
	IL6			
	qRT-PCR	Stdev	MACE	FDR p-Werte
Kon vs. MC58	11,52	3,58	-	-
Kon + U0126 vs. MC58 + U0126	4,28	0,95	-	-
Kon vs. MC58siaD <sup>-</sup>	16,16	5,62	16,49	0,02
Kon + U0126 vs. MC58siaD <sup>-</sup> + U0126	7,73	3,32	8,56	0,02
	IL8			
	qRT-PCR	Stdev	MACE	FDR p-Werte
Kon vs. MC58	18,21	8,86	14,03	0,00
Kon + U0126 vs. MC58 + U0126	30,36	8,88	16,17	0,00
Kon vs. MC58siaD <sup>-</sup>	19,51	6,04	14,45	0,00
Kon + U0126 vs. MC58siaD <sup>-</sup> + U0126	61,58	33,68	26,67	0,00

#### 4.4.4 Differentielle Genexpression in HIBCPP-Zellen infolge einer Infektion mit *N. meningitidis*

Die erhaltenen Expressionsdaten der Transkriptomanalyse wurden verwendet, um die differentielle Expression zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen zu bestimmen. Listen von differentiell exprimierten Genen wurden erhalten, indem die Genexpression infizierter Zellen mit der von nicht infizierten Kontrollen verglichen wurde (Anhang, Tabelle 16). Im Falle einer zusätzlichen Behandlung mit dem Erk1/2 Inhibitor U0126 wurden die Vergleiche zwischen behandelten Kontrollen und behandelten, infizierten Zellen gezogen. Um die statistische Signifikanz dieser Gene zu bewerten, wurden diese Listen unter Verwendung des FDR p-Werts ( $p \leq 0,05$ ) und einer minimalen  $\log_2$ -2-fachen nach Auf- oder Herunterregulierung gefiltert.

Nach Infektion mit MC58 wurden 34 Gene signifikant reguliert, von denen 33 ebenfalls durch MC58siaD<sup>-</sup> reguliert wurden. Zusätzlich wurde durch MC58siaD<sup>-</sup> die Expression von 10 weiteren Genen signifikant verändert (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Schematische Repräsentation der Anzahl der Gene, welche während der MACE Analyse in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit *NmB* reguliert wurden.** Die DEG wurden durch Vergleich der mit den *NmB* infizierten HIBCPP-Zellen mit den unbehandelten Kontrollen (Kon) ermittelt. Dargestellt sind die DEG, die in beiden Konditionen reguliert werden, sowie die DEG, die nur in jeweils einer der Konditionen reguliert werden.

Die stärkste Hochregulation nach Infektion mit dem *NmB* Wildtyp (MC58) war eine 64-fache Induktion des Gens *il1b*, während die Kapselmutante (MC58siaD<sup>-</sup>) nach 6-stündiger Infektion der HIBCPP-Zellen eine 77-fache Hochregulation des gleichen Gens (*il1b*) aufwies (Tabelle 12).

In HIBCPP-Zellen ist die Expression des Chemokins *cc120* nach Infektion mit den *NmB* Stämmen hochreguliert. Die Expression der Kapsel hatte in diesem Fall keinen Expressionsunterschied zur Folge. Auch die Expression von *cc120* wurde durch beide *NmB* Stämme induziert. Die Infektion der HIBCPP-Zellen mit der Kapselmutante resultierte jedoch in einem höheren *fold-change* im Vergleich zu der Infektion der Zellen mit dem Wildtyp Stamm. Auch die Zytokine *cxcl1*, *cxcl2*, *cxcl3* und *cxcl6* wurden bei Infektion der HIBCPP-Zellen durch beide *NmB* Stämme signifikant induziert. Zudem wiesen die Interleukine *il17c* und *il1b* einen hohen *fold-change* nach Infektion der HIBCPP-Zellen auf. Im Fall von *il17c* resultierte die Infektion der Zellen mit dem *N. meningitidis* Wildtyp in einer höheren Induktion der Expression des Gens, als die Infektion der HIBCPP-Zellen mit der Kapselmutante. Für *il1b* konnte wiederum kein Einfluss der Kapselexpression auf die Induktion des Gens infolge der Infektion mit den Erregern festgestellt werden. Auch die Expression von *nfkbia* und *nfbiz* wurde nach Infektion der HIBCPP-Zellen hochreguliert. Während *nfkbia* von beiden Stämmen gleichermaßen induziert wurde, konnte eine stärkere Expression von *nfbiz* nach Infektion mit dem *NmB* Wildtyp Stamm als mit dessen Kapselmutante festgestellt werden. Des Weiteren wurde eine signifikante Induktion von *rnd1*, *tcim*, *tnf* und *zc3h12a* nach Infektion der HIBCPP-Zellen durch beide Erreger ermittelt. Die 10 Gene, die nur durch die Kapselmutante reguliert wurden, waren *il6*, *spib*, *rasd1*, *igfbp1*, *adora2a*, *csf1*, *pi3*, *serpina3*, *tnfrsf6b* und *hilpda*.

Von den signifikant induzierten Genen nach Infektion der HIBCPP-Zellen mit den beiden *NmB* Stämmen kann eine Vielzahl davon der angeborenen Immunantwort sowie der Entzündungsreaktion zugeschrieben werden. Zu diesen Genen gehören *cc12*, *cc120*, *cxcl1*, *cxcl3*, *cxcl6*, *il8*, *il1b* und *tcim*. Dem NF- $\kappa$ B Signalweg kann die Expression der Gene *nfkbia* und *nfbiz* zugeordnet werden. Zudem wurde nach Infektion der HIBCPP-Zellen eine erhöhte Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls *icam1* beobachtet.

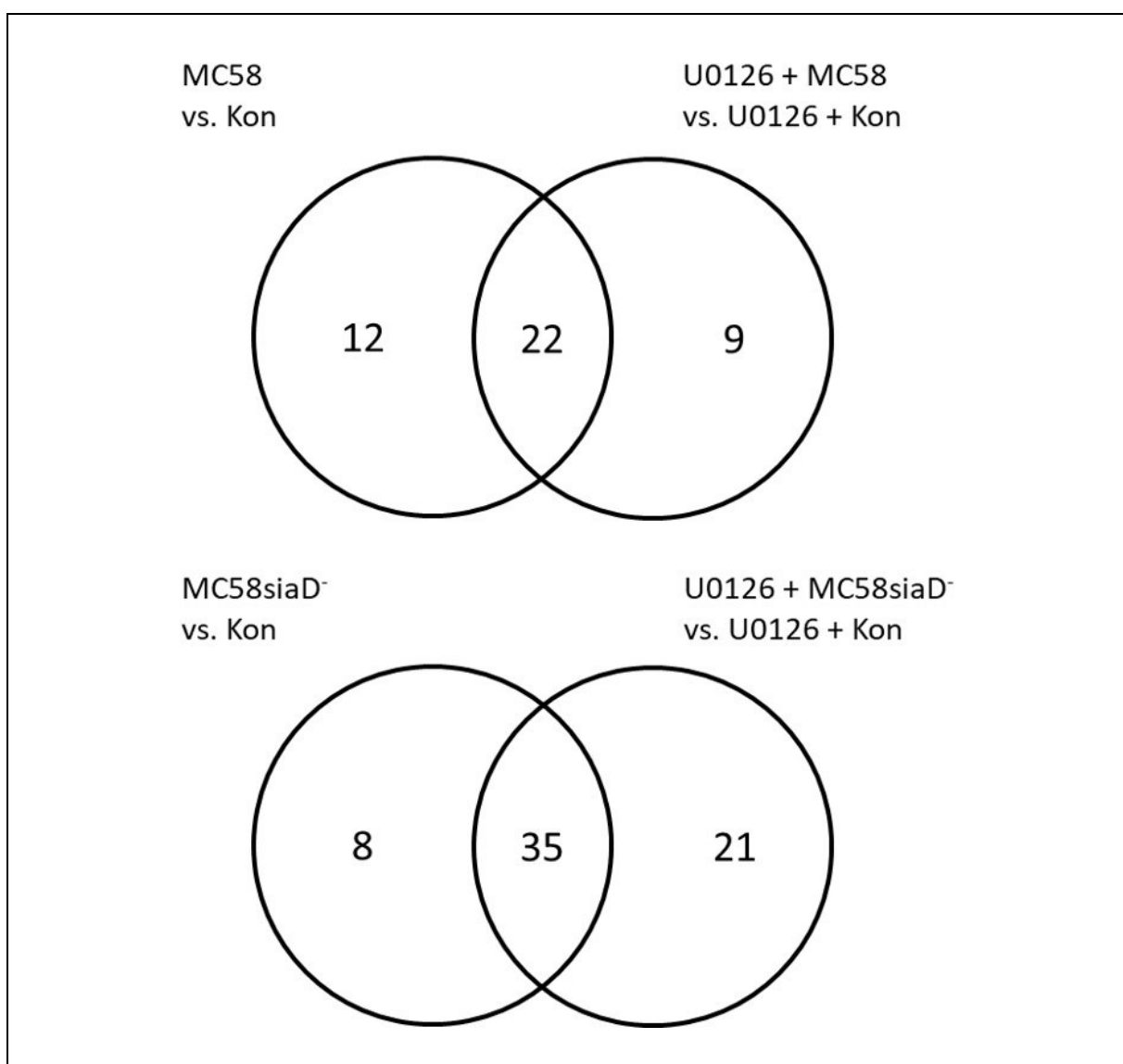
Tabelle 12: Vergleich der DEG des *NmB* Wildtyp Stamms und dessen Kapselmutante.

Gensymbol	Genname	Fold change	
		Kon vs. MC58	Kon vs. MC58siaD
IL1B	interleukin 1 beta	64,65	77,58
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	23,85	28,72
IL17C	interleukin 17C	22,48	20,25
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	20,76	19,03
TNF	tumor necrosis factor	18,47	17,79
IL6	interleukin 6		16,49
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1	15,80	16,35
CXCL3	C-X-C motif chemokine ligand 3	14,48	14,37
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	14,03	14,45
NFKBIZ	NFKB inhibitor zeta	13,60	11,15
CSF2	colony stimulating factor 2	13,01	15,08
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2	12,47	13,89
IL1A	interleukin 1 alpha	11,74	11,61
ZC3H12A	zinc finger CCCH-type containing 12A	11,63	10,14
TCIM	transcriptional and immune response regulator	9,73	10,53
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	9,68	9,46
RND1	Rho family GTPase 1	9,04	9,08
CXCL6	C-X-C motif chemokine ligand 6	7,92	9,75
CYP24A1	cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1	7,64	8,70
NFKBIA	NFKB inhibitor alpha	7,46	7,34
TNFAIP2	TNF alpha induced protein 2	7,24	7,81
SPIB	Spi-B transcription factor		6,49
RASD1	ras related dexamethasone induced 1		6,34
IGFBP1	insulin like growth factor binding protein 1		6,27
IL23A	interleukin 23 subunit alpha	6,10	8,24
LIF	LIF interleukin 6 family cytokine	5,97	5,01
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	5,89	5,68
ANGPTL4	angiopoietin like 4	5,69	5,34
ADORA2A	adenosine A2a receptor		5,44
ZFP36	ZFP36 ring finger protein	5,19	4,48
C6orf222		4,98	
CX3CL1	C-X3-C motif chemokine ligand 1	4,96	4,59
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	4,94	4,45
CSF1	colony stimulating factor 1		4,77
PI3	peptidase inhibitor 3		4,73
SERPINA3	serpin family A member 3		4,71
IER3	immediate early response 3	4,60	4,60
SLC6A14	solute carrier family 6 member 14	4,59	4,97
LTB	lymphotoxin beta	4,50	5,92
TNFRSF6B	TNF receptor superfamily member 6b		4,44
CEBPD	CCAAT enhancer binding protein delta	4,40	4,47



SOD2	superoxide dismutase 2	4,30	5,21
HILPDA	hypoxia inducible lipid droplet associated		4,27
MAFF	MAF bZIP transcription factor F	4,21	4,13

Weiterhin wurden die Gene identifiziert, die durch Infektion mit den *N. meningitidis* Stämmen signifikant reguliert wurden, wenn die HIBCPP-Zellen mit U0126 vorbehandelt worden waren. Insgesamt konnten 31 DEG ermittelt werden, von denen 22 auch reguliert wurden, wenn nicht mit U0126 vorbehandelte Zellen mit MC58 infiziert worden waren. Interessanterweise wurden 9 Gene gefunden, die nur dann nach Infektion mit MC58 signifikant reguliert waren, wenn die HIBCPP-Zellen vorher mit U0126 behandelt worden waren, während 12 Gene nach Behandlung mit U0126 nicht mehr signifikant reguliert vorgefunden wurden (Abbildung 25).



**Abbildung 25:** Schematische Repräsentation der Anzahl der Gene, welche während der MACE Analyse in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit *NmB* und Behandlung mit dem Erk1/2 Inhibitor reguliert wurden. Die DEG wurden durch Vergleich der mit den *NmB* infizierten HIBCPP-Zellen mit den unbehandelten Kontrollen (Kon) ermittelt, sowie den behandelten Kontrollzellen mit den behandelten, infizierten Zellen. Dargestellt sind die DEG, die in jeweils beiden Konditionen reguliert werden, sowie die DEG, die nur in jeweils einer der Konditionen reguliert werden.

Bei dem Vergleich der *fold-changes* dieser DEG der HIBCPP-Zellen nach Infektion mit dem *NmB*-Wildtyp-Stamm in An- und Abwesenheit des Inhibitors U0126 (Tabelle 13) sind diese, in beiden Konditionen, nahezu identisch. Eine interessante Ausnahme bildet *il17c*, welches bei Infektion der Zellen mit dem Wildtyp Stamm 22-fach hochreguliert ist, jedoch durch die Infektion sogar um den Faktor 79 hochreguliert wird, wenn der Erk1/2 Signalweg inhibiert ist. Darüber hinaus wiesen die Expressionsniveaus von *cc120*, *icam1* und *nfkbi* eine stärkere Hochregulation auf, wenn die Erk1/2-Signalgebung nicht gehemmt wurde. *il8* wurde hingegen bei Infektion der HIBCPP-Zellen und gleichzeitiger Hemmung des Erk1/2-Signalwegs stärker hochreguliert als in infizierten Zellen, in welchen der Erk1/2 Inhibitor nicht eingesetzt wurde.

Während der Infektion von HIBCPP-Zellen mit der Kapselmutante MC58siaD<sup>-</sup> wurden insgesamt 35 DEG ermittelt, die in An- und Abwesenheit des Inhibitors U0126 reguliert wurden (Abbildung 25). Weitere 21 DEG wurden nur bei Inhibition des Signalwegs während der Infektion der HIBCPP-Zellen signifikant induziert, während 8 DEG nur in Abwesenheit des Inhibitors hochreguliert wurden (Abbildung 25).

Bei den in Tabelle 14 dargestellten DEG führte die Hemmung des Erk1/2-MAPK-Signalwegs und Infektion der Zellen zu einer ähnlichen oder, in den meisten Fällen, stärkeren Hochregulation der Genexpression als in infizierten, unbehandelten Zellen. Die einzigen Ausnahmen hierbei sind die DEG *cyp24a1*, *il1b*, *il23a*, *il6*, *nfkbi* und *ptgs2*, die einen niedrigeren *fold-change* nach Inhibition des Erk1/2 Signalwegs aufwiesen. Am auffälligsten ist, dass *il17c*, welches während der Infektion unbehandelter HIBCPP-Zellen mit MC58siaD<sup>-</sup> 20-fach hochreguliert war, eine 191-fache Hochregulation bei Inhibition des Erk1/2-Signalwegs während der Infektion aufwies. Die Expression des Gens *il1b*, welches während der Infektion der unbehandelten Zellen mit beiden *NmB* Stämmen die stärkste Hochregulation aufwies, ist während der Hemmung des Erk1/2-Signalwegs bei Infektion mit der Kapselmutante nur 57-fach hochreguliert, im Gegensatz zu der 78-fachen Hochregulation in unbehandelten HIBCPP-Zellen, die mit der Kapselmutante infiziert waren.

Interessanterweise konnten 7 Gene ermittelt werden, die nach Inhibition von Erk1/2 bei Infektion mit beiden Erregern induziert wurden. Diese Gene sind *adm*, *ankrd37*, *bhlhe40*, *cxcl10*, *il4i1*, *mir210hg* und *pfkfb4*.

**Tabelle 13: Zusammenfassung der durch Infektion der HIBCPP-Zellen mit MC58 regulierten DEG in An- und Abwesenheit des Erk1/2 Inhibitors U0126.**

Gensymbol	Genname	Fold change	
		Kon vs. MC58	Kon + U0126 vs. MC58 + U0126
IL1B	interleukin 1 beta	64,65	
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	23,85	20,68
IL17C	interleukin 17C	22,48	79,66
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	20,76	20,30
TNF	tumor necrosis factor	18,47	18,21
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1	15,80	16,79
CXCL3	C-X-C motif chemokine ligand 3	14,48	15,66
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	14,03	16,17
NFKBIZ	NFKB inhibitor zeta	13,60	8,18
CSF2	colony stimulating factor 2	13,01	
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2	12,47	11,80
IL1A	interleukin 1 alpha	11,74	
ZC3H12A	zinc finger CCCH-type containing 12A	11,63	12,04
ANKRD37	ankyrin repeat domain 37		10,05
TCIM	transcriptional and immune response regulator	9,73	6,77
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	9,68	7,98
RND1	Rho family GTPase 1	9,04	7,02
CXCL6	C-X-C motif chemokine ligand 6	7,92	7,67
CYP24A1	cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1	7,64	
NFKBIA	NFKB inhibitor alpha	7,46	7,33
TNFAIP2	TNF alpha induced protein 2	7,24	5,59
IL23A	interleukin 23 subunit alpha	6,10	
LIF	LIF interleukin 6 family cytokine	5,97	
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	5,89	
ADORA2A	adenosine A2a receptor		6,91
ADM	adrenomedullin		6,36
PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4		6,34
ANGPTL4	angiopoietin like 4	5,69	7,59
MIR210HG	MIR210 host gene		5,63
IL4I1	interleukin 4 induced 1		5,48
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10		5,40
ZFP36	ZFP36 ring finger protein	5,19	
C6orf222		4,98	5,77
CX3CL1	C-X3-C motif chemokine ligand 1	4,96	6,12
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	4,94	5,03
FBXL8	F-box and leucine rich repeat protein 8		4,75
BHLHE40	basic helix-loop-helix family member e40		4,36
IER3	immediate early response 3	4,60	

SLC6A14	solute carrier family 6 member 14	4,59	
LTB	lymphotoxin beta	4,50	
CEBPD	CCAAT enhancer binding protein delta	4,40	4,01
SOD2	superoxide dismutase 2	4,30	4,09
MAFF	MAF bZIP transcription factor F	4,21	

**Tabelle 14: Zusammenfassung der durch Infektion der HIBCPP-Zellen mit MC58siaD<sup>-</sup> regulierten DEG in An- und Abwesenheit des Erk1/2 Inhibitors U0126.**

Gensymbol	Genname	Fold change	
		Kon vs. MC58siaD <sup>-</sup>	Kon + U0126 vs. MC58siaD <sup>-</sup> + U0126
IL1B	interleukin 1 beta	77,58	56,80
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	28,72	37,32
IL17C	interleukin 17C	20,25	190,68
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	19,03	26,60
TNF	tumor necrosis factor	17,79	26,58
IL6	interleukin 6	16,49	8,56
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1	16,35	25,62
CSF2	colony stimulating factor 2	15,08	15,09
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	14,45	26,67
CXCL3	C-X-C motif chemokine ligand 3	14,37	21,85
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2	13,89	22,91
ANKRD37	ankyrin repeat domain 37		12,78
IL1A	interleukin 1 alpha	11,61	28,19
NFKBIZ	NFKB inhibitor zeta	11,15	8,80
TCIM	transcriptional and immune response regulator	10,53	10,40
ZC3H12A	zinc finger CCCH-type containing 12A	10,14	14,27
CXCL6	C-X-C motif chemokine ligand 6	9,75	13,31
IL4I1	interleukin 4 induced 1		9,49
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	9,46	11,60
RND1	Rho family GTPase 1	9,08	11,45
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10		8,81
CYP24A1	cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1	8,70	4,63
NOS2	nitric oxide synthase 2		8,64
IL23A	interleukin 23 subunit alpha	8,24	7,28
TNFAIP2	TNF alpha induced protein 2	7,81	8,00
SAA2	serum amyloid A2		7,67
C6orf222			7,67
GFPT2	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2		7,60
PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4		7,43
NFKBIA	NFKB inhibitor alpha	7,34	9,29
ADM	adrenomedullin		7,28
MIR210HG	MIR210 host gene		6,90

SPIB	Spi-B transcription factor	6,49	
CHAC1	ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1		6,48
RASD1	ras related dexamethasone induced 1	6,34	
IGFBP1	insulin like growth factor binding protein 1	6,27	
ANKK1	ankyrin repeat and kinase domain containing 1		5,99
LTB	lymphotoxin beta	5,92	5,95
PTGS2	lymphotoxin beta	5,68	4,50
G0S2	G0/G1 switch 2		5,46
ADORA2A	adenosine A2a receptor	5,44	11,67
ZC3H12C	zinc finger CCCH-type containing 12C		5,44
ANGPTL4	angiopoietin like 4	5,34	10,50
LOC101929444			5,29
SOD2	superoxide dismutase 2	5,21	7,17
LIF	LIF interleukin 6 family cytokine	5,01	
SLC6A14	solute carrier family 6 member 14	4,97	6,04
TNFRSF11B	TNF receptor superfamily member 11b		4,90
CSF1	colony stimulating factor 1	4,77	
PI3	peptidase inhibitor 3	4,73	4,62
SERPINA3	serpin family A member 3	4,71	6,36
EGLN3	egl-9 family hypoxia inducible factor 3		4,70
IER3	immediate early response 3	4,60	
CX3CL1	C-X3-C motif chemokine ligand 1	4,59	8,78
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3		4,59
RCAN1	regulator of calcineurin 1		4,54
ZFP36	ZFP36 ring finger protein	4,48	
CEBPD	CCAAT enhancer binding protein delta	4,47	4,97
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	4,45	5,48
TNFRSF6B	TNF receptor superfamily member 6b	4,44	7,26
BHLHE40	basic helix-loop-helix family member e40		4,38
HILPDA	hypoxia inducible lipid droplet associated	4,27	4,99
PLAU	plasminogen activator, urokinase		4,02
MAFF	MAF bZIP transcription factor F	4,13	

Um weitere Informationen über die der Infektion mit *N. meningitidis* zugrunde liegenden Biologie zu erhalten, wurden GO-Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die GO-Software LAGO zur Identifizierung statistisch überrepräsentierter GO-Termini unter Verwendung eines p-Wert-Cutoffs von 0,01 verwendet. Eine Auswahl der signifikantesten, überrepräsentierten GO-Begriffe ist in Tabelle 15 dargestellt. Während der Infektion von HIBCPP-Zellen mit den NmB Stämmen weisen die am signifikantesten überrepräsentierten GO-Termini auf eine Rolle der CP-Epithelzellen in der antimikrobiellen Reaktion hin. Dazu gehören die Termini „*cellular response to lipopolysaccharide*“, „*cellular response to molecule of bacterial origin*“ und „*cytokine-mediated signaling pathway*“. Der GO-Terminus, der die negative Regulation der Interleukin-6-Produktion beschreibt („*negative regulation of interleukin-6 production*“), war für beide NmB Stämme überrepräsentiert. Die Regulation zellulärer Signalwege während der Infektion wurde durch die Termini „*NIK/NF-kappaB*“-Signalübertragung während der Infektion mit beiden NmB Stämmen beschrieben, sowie durch eine Regulation der MAPK Signalwege, repräsentiert durch die Termini „*positive regulation of MAPK cascade*“ und die „*regulation of ERK1 and ERK2 cascade*“. Ein anderer GO-Begriff, der während der Infektion mit den verschiedenen NmB Stämmen überrepräsentiert war, beschreibt die negative Regulation des Zelltods („*negative regulation of cell death*“).

Bei der Analyse der GO-Termini, die durch Infektion mit *N. meningitidis* reguliert werden konnten, wenn die Zellen mit U0126 vorbehandelt waren, viel auf, dass erneut Begriffe überrepräsentiert waren, die auf eine Rolle der CP-Epithelzellen bei der antimikrobiellen Reaktion hinweisen.

Interessanterweise wurden einige der GO-Termini, welche nach Infektion der nicht-behandelten Zellen identifiziert worden waren, nach Inhibition von Erk1/2 nicht mehr gefunden. Dabei handelte es sich unter anderem um GO Termini, die auf die Manipulation der MAPK Signalwege hindeuten, was die Funktion des Inhibitors während der Experimente unterstreicht. Weiterhin wurden die GO-Termini „*signal transduction by protein phosphorylation*“ und „*JAK-STAT cascade*“ nicht mehr identifiziert.

Unterschiede zu den nicht-behandelten Zellen zeigten sich auch in Bezug auf eine Unterrepräsentierung von GO-Termini, die auf eine Involvierung des NF-κB Signalwegs, eine Funktion von IL6 und eine Rolle des Tumornekrosefaktors hindeuten, wobei diese Unterschiede nach Infektion mit dem Wildtyp ausgeprägter waren.

**Tabelle 15: Statistisch überrepräsentierte GO-Termini** GO-Termini wurden anhand signifikant regulierter Gene (DEG) ermittelt, die aus dem Vergleich von HIBCPP-Zellen nach Infektion mit den *N. meningitidis* Stämmen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kon) oder bei zusätzlicher Behandlung mit dem Inhibitor U0126 der Kontrollzellen sowie der infizierten Zellen stammen. Die Analyse wurde mit der Software LAGO durchgeführt und es wurde eine Obergrenze von 0,01 für den p-Wert sowie eine Bonferroni Korrektur angewandt. Dargestellt sind die GO Termini, der korrigierte p-Wert sowie die Anzahl der analysierten Gene in den jeweiligen GO-Termini (Anzahl der Gene).

GO Terminus	Kon vs. MC58		Kon vs. MC58siaD <sup>-</sup>		Kon +U0126 vs. MC58+U		Kon + U0126 vs. MC58siaD <sup>-</sup> +U	
	p-Wert	Anzahl der Gene	p-Wert	Anzahl der Gene	p-Wert	Anzahl der Gene	p-Wert	Anzahl der Gene
<i>cellular response to lipopolysaccharide</i>	1,64x10 <sup>-20</sup>	16	3,03x10 <sup>-20</sup>	17	1,49x10 <sup>-15</sup>	13	1,35x10 <sup>-19</sup>	18
<i>cellular response to molecule of bacterial origin</i>	3,39x10 <sup>-20</sup>	16	6,55x10 <sup>-20</sup>	17	2,68x10 <sup>-15</sup>	13	3,06x10 <sup>-19</sup>	18
<i>cytokine-mediated signaling pathway</i>	4,08x10 <sup>-20</sup>	22	2,22x10 <sup>-21</sup>	25	5,17x10 <sup>-12</sup>	16	6,30x10 <sup>-19</sup>	26
<i>cellular response to interleukin-1</i>	1,97x10 <sup>-08</sup>	9	6,48x10 <sup>-09</sup>	10	1,08x10 <sup>-05</sup>	7	1,16x10 <sup>-07</sup>	10
<i>regulation of NIK/NF-kappaB signaling</i>	4,63x10 <sup>-05</sup>	6	2,26x10 <sup>-04</sup>	6			1,21x10 <sup>-03</sup>	6
<i>NIK/NF-kappaB signaling</i>	5,84x10 <sup>-04</sup>	6	2,78x10 <sup>-03</sup>	6				
<i>interleukin-6 production</i>	1,93x10 <sup>-04</sup>	6	3,37x10 <sup>-05</sup>	7			1,00x10 <sup>-05</sup>	8
<i>negative regulation of interleukin-6 production</i>	9,11x10 <sup>-04</sup>	4	2,68x10 <sup>-03</sup>	4	4,99x10 <sup>-04</sup>	4	8,35x10 <sup>-03</sup>	4
<i>cell surface receptor signaling pathway</i>	1,82x10 <sup>-10</sup>	25	7,24x10 <sup>-12</sup>	30	1,73x10 <sup>-06</sup>	20	3,69x10 <sup>-09</sup>	32
<i>signal transduction by protein phosphorylation</i>	3,11x10 <sup>-03</sup>	10	4,96x10 <sup>-03</sup>	11				
<i>MAPK cascade</i>	2,85x10 <sup>-03</sup>	10	4,51x10 <sup>-03</sup>	11				
<i>positive regulation of MAPK cascade</i>	3,93x10 <sup>-03</sup>	8	2,99x10 <sup>-03</sup>	9				
<i>regulation of ERK1 and ERK2 cascade</i>	7,13x10 <sup>-04</sup>	7	4,27x10 <sup>-03</sup>	7				
<i>JAK-STAT cascade</i>	8,91x10 <sup>-03</sup>	5	1,56x10 <sup>-03</sup>	6				
<i>negative regulation of cell death</i>	2,99x10 <sup>-08</sup>	15	6,62x10 <sup>-11</sup>	19	1,79x10 <sup>-04</sup>	11	1,76x10 <sup>-06</sup>	17

<i>GO Terminus</i>	Kon vs. MC58		Kon vs. MC58siaD <sup>-</sup>		Kon +U0126 vs. MC58+U		Kon + U0126 vs. MC58siaD <sup>-</sup> +U	
	p-Wert	Anzahl der Gene	p-Wert	Anzahl der Gene	p-Wert	Anzahl der Gene	p-Wert	Anzahl der Gene
<i>response to tumor necrosis factor</i>	9,23x10 <sup>-11</sup>	12	9,21x10 <sup>-11</sup>	13	8,05x10 <sup>-07</sup>	9	4,24x10 <sup>-09</sup>	13
<i>regulation of tumor necrosis factor production</i>	3,14x10 <sup>-04</sup>	6	5,93x10 <sup>-05</sup>	7			7,86x10 <sup>-03</sup>	6
<i>regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production</i>	3,52x10 <sup>-04</sup>	6	6,78x10 <sup>-05</sup>	7			8,79x10 <sup>-03</sup>	6



#### 4.5 Phosphoproteomik Analyse der HIBCPP-Zellen nach Infektion mit den *NmB* Wildtyp MC58 sowie der Kapselmutante MC58siaD<sup>-</sup>

Um weiter den Einfluss der *NmB* Stämme auf die Signaltransduktion in HIBCPP-Zellen zu untersuchen, wurde eine Phosphoproteomik Analyse der HIBCPP-Zellen nach Infektion mit dem Wildtyp Stamm und der Kapselmutante im Vergleich zu unbehandelten HIBCPP-Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die HIBCPP-Zellen in der Umkehrkultur für 4 h bei einer MOI 100 infiziert und mit Hilfe des modifizierten RIPA Puffer lysiert. Die Proben wurden daraufhin zu der Firma Biogenity zur Phosphoproteom Analyse geschickt, welche auch die statistische Auswertung der Daten durchführte. Die Probenvorbereitung und massenspektrometrische Analyse sind in Material und Methoden im Detail beschrieben.

Vor der statistischen Analyse wurden die erhaltenen Daten gefiltert, sodass nur die Phosphorylierungen, die in der Hälfte der Proben in mindestens einer Probengruppe detektiert wurden, in die Analyse einbezogen wurden. Zunächst wurde ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt, um zu untersuchen, ob die selektierten Phosphorylierungen einer Normalverteilung folgten. Immer wenn der Test eine Normalverteilung ( $p$ -Wert  $> 0,05$ ) nicht ablehnen konnte, wurde ein parametrischer Test (ANOVA) verwendet, um die Gruppen zu vergleichen, gefolgt von einem Tukey-Post-Hoc-Test. Falls der Test ablehnte, dass die Phosphorylierungen einer Normalverteilung folgten, wurde ein nicht-parametrischer Test wie der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewandt. Insgesamt wurden 5040 Vergleiche getestet, von denen 448 Vergleiche einen  $p$ -Wert unter oder gleich 0,05 aufwiesen. Bei Betrachtung des  $p$ -Wertes für *multiple comparisons* blieben 99 Vergleiche. Davon hatten 48 eine  $\log_2$ -fache Änderung höher als 1 oder niedriger als -1 und 96 hatten eine Regulierung von mehr als 30%. Die analysierten Phosphorylierungen wurden in Tabellen zusammengefasst. Diese wurden daraufhin nach den  $p$ -Wert *Cutoff* von kleiner oder gleich 0,05 gefiltert und sind im Anhang in Tabelle 17 dargestellt. Diese Daten wurden als Grundlage für weitere bioinformatische Analysen verwendet.

Im Vergleich der mit MC58 infizierten HIBCPP-Zellen zu den unbehandelten Kontrollen wurden 126 Regulationen detektiert, die nach der statistischen Analyse einen  $p$ -Wert größer oder gleich 0,05 aufwiesen. 66 dieser Regulationen wiesen dabei einen positiven  $\log_2$  *fold-change* auf, während 60 weitere Regulationen einen negativen *fold-change* aufwiesen und somit herunterreguliert waren. Die am stärksten hochregulierte Phosphorylierung ist dem Protein ZFP36 zuzuordnen, die stärkste durch die Infektion reduzierte Phosphorylierung dem Protein STIM1. Der Vergleich der mit der Kapselmutante infizierten HIBCPP-Zellen zu den unbehandelten Kontrollen ergab nach statistischer Analyse 256 Regulationen mit einem  $p$ -

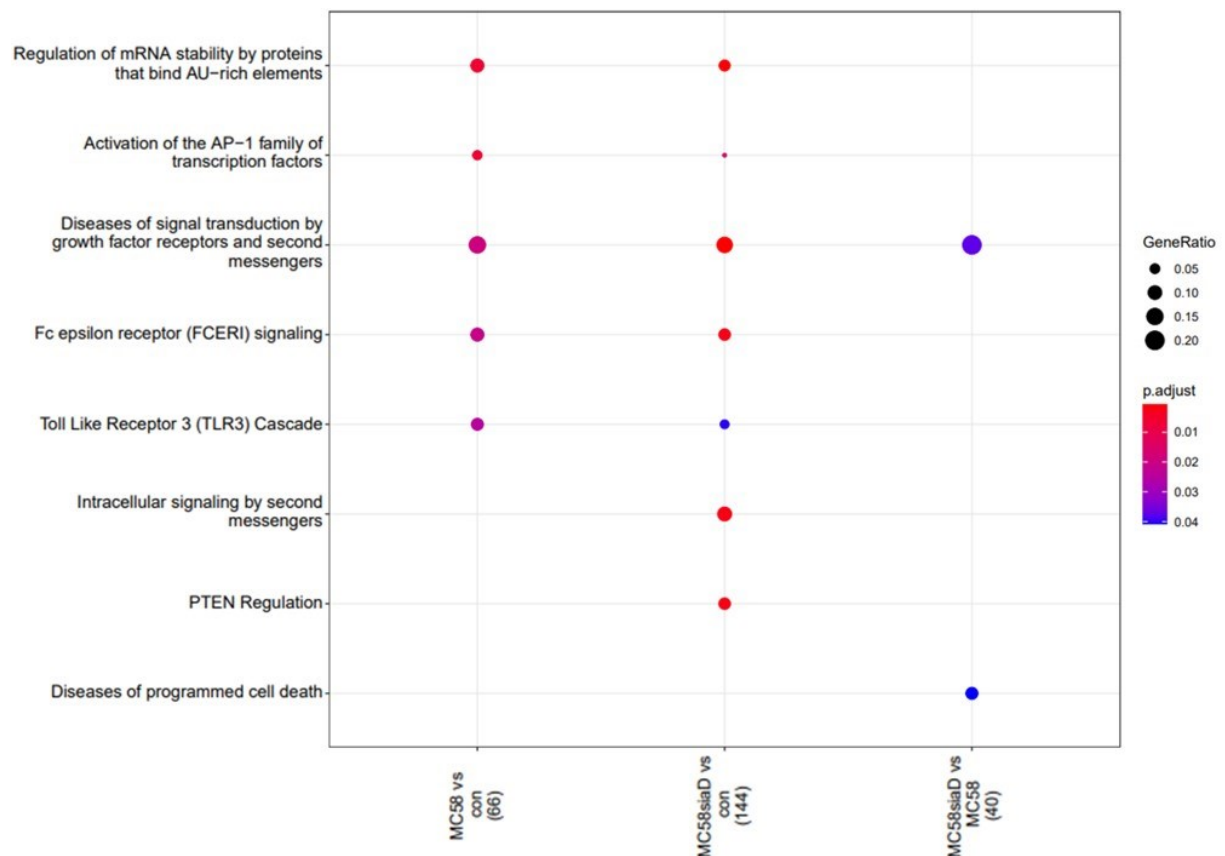
Wert kleiner oder gleich 0,05. Von diesen waren 148 durch die Infektion hochreguliert, während 108 herunter reguliert wurden. Die am stärksten regulierten Phosphorylierungen sind identisch mit den durch Infektion mit MC58 induzierten Regulationen. Wurden beide Konditionen verglichen, in welchen die HIBCPP-Zellen mit jeweils dem Wildtyp Stamm der *NmB* oder dessen Kapselmutante infiziert wurden, so ergaben sich 66 Regulationen mit einem p-Wert größer oder gleich 0,05, von welchen 52 durch die Kapselmutante stärker hochreguliert und 14 stärker herunterreguliert wurden, als durch den Wildtyp Stamm.

Um zu untersuchen, welche Signalwege, zelluläre Komponenten, molekulare und biologische Funktionen sowie welche Kinasen durch die Infektion mit den *NmB* Stämmen potentiell reguliert sind, wurden *Enrichment* Analysen angewandt. Diese *Enrichment* Analysen wurden unter Verwendung des Benjamini-Hochberg-Verfahrens durchgeführt mit einem p-Wert-*Cutoff* von 0,05 oder einen FDR von 5%. Für die Analyse wurden alle Regulationen mit einem unkorrigierten p-Wert unter oder gleich 0,05 verwendet (Tabelle 17). Zur Durchführung der *Enrichment* Analysen wurden diverse Datenbanken und Programme angewandt (Yu *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2012; Huang da *et al.*, 2009b; Huang da *et al.*, 2009a). Zur Analyse der Anreicherung der Kinasen wurde zusätzlich *PhosphoSite Bioinformatic* verwendet (Hornbeck *et al.*, 2015).

#### 4.5.1 Enrichment Analyse der Signalwege nach Infektion mit *NmB*

Eine *Enrichment* Analyse der regulierten Signalwege wurde für die Vergleiche *NmB* Wildtyp zu Kontrollzellen („MC58 vs con“), der Kapselmutante zu Kontrollzellen („MC58siaD vs con“) und zwischen den beiden Stämmen („MC58 vs MC58siaD“) durchgeführt. Ein Vergleich der annotierten Signalwege, die in den verschiedenen Proben Gruppen ermittelt wurden, ist in Abbildung 26 zusammenfassend dargestellt. Auf der x-Achse sind die Proben Gruppen dargestellt, sowie die Anzahl der phosphorylierten Proteine, die in der *Enrichment* Analyse untersucht wurden (in Klammern). Auf der y-Achse sind die Signalwege mit den niedrigsten p-Werten dargestellt. Das Farbschema links des Punktediagramms entspricht den *adjusted* p-Werten, das *Gene Ratio* stellt das Verhältnis zwischen regulierten phosphorylierten Proteinen, die einem bestimmten Signalweg zugeordnet wurden, und den gesamten Phosphorylierungen die in die Analyse eingegangen sind dar. Die Plots wurden mit Hilfe der in (Yu *et al.*, 2016) und (Yu *et al.*, 2012) beschriebenen Anwendungen durch die Firma Biogenity kreiert. Die ermittelten Termini der *Enrichment* Analyse und Beschreibung der Konditionen sind aus diesem Grund auf Englisch verfasst. Hierbei beschreibt „con“ die Kontrollzellen.

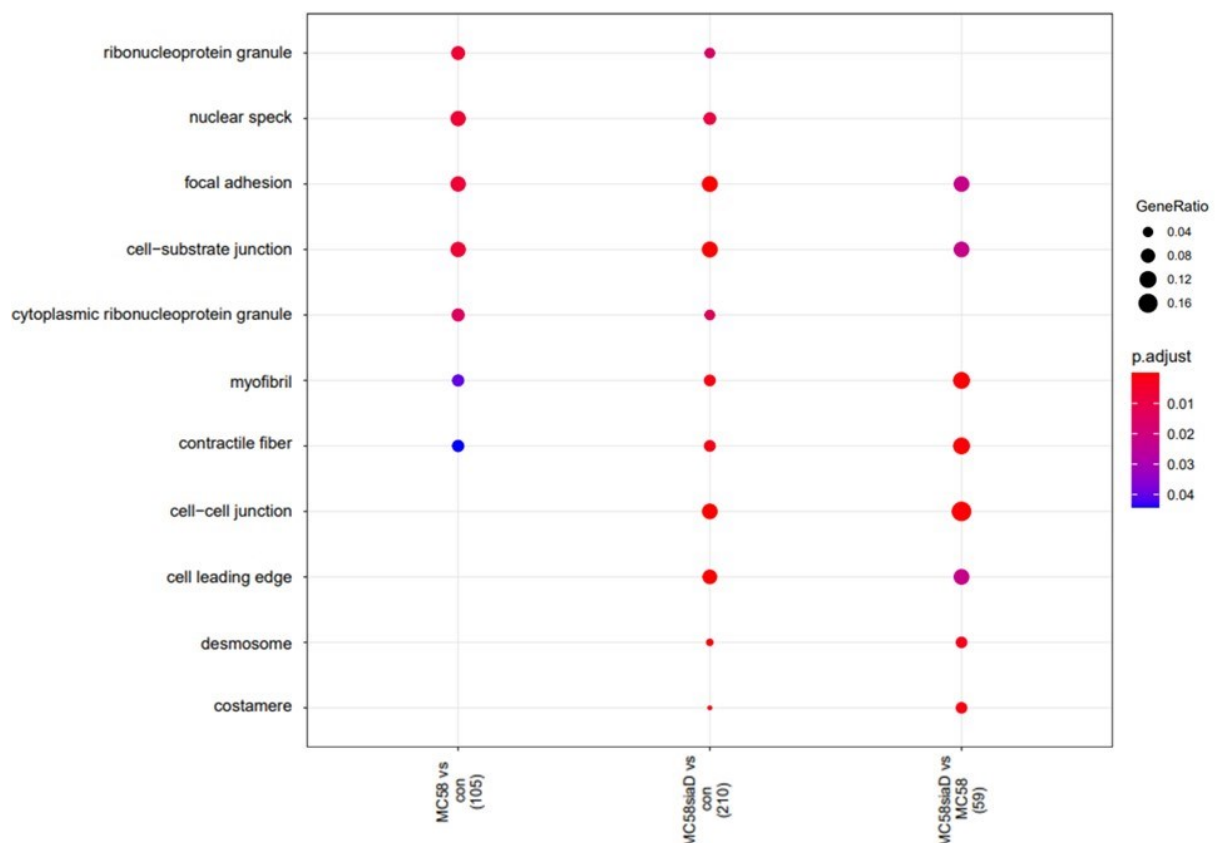
Wie in Abbildung 26 dargestellt, überlappen sich die annotierten Signalwege nach Infektion mit dem *NmB* Wildtyp und der Kapselmutante. Die höchste Signifikanz hat in beiden Untersuchungen der Terminus „*Regulation of mRNA stability by proteins that bind AU-rich elements*“. Die Kapselmutante weist zudem Termini auf, die nicht bei Analyse der Phosphorylierungen durch den Wildtyp Stamm ermittelt wurden. Zu diesen gehören „*Intracellular signaling by second messengers*“ und „*PTEN Regulation*“.



**Abbildung 26: Enrichment Analyse der Signalwege nach Infektion mit dem *NmB* Wildtyp und dessen Kapselmutante.** Die Signalweg Enrichment Analyse wurde unter Verwendung des Benjamini-Hochberg-Verfahrens mit einem p-Wert-Cutoff 0,05 oder einer FDR von 5% durchgeführt. Als Grundlage der Analyse wurden alle Regulationen mit einem unkorrigierten p-Wert unter 0,05 verwendet. Aufgeführt sind die Ergebnisse der Vergleiche des Wildtyps mit den Kontrollzellen („*MC58 vs con*“), der Kapselmutante mit den Kontrollzellen („*MC58siaD vs con*“) und der beiden Stämme untereinander („*MC58siaD vs MC58*“).

#### 4.5.2 Enrichment Analyse der zellulären Komponenten nach Infektion mit *NmB*

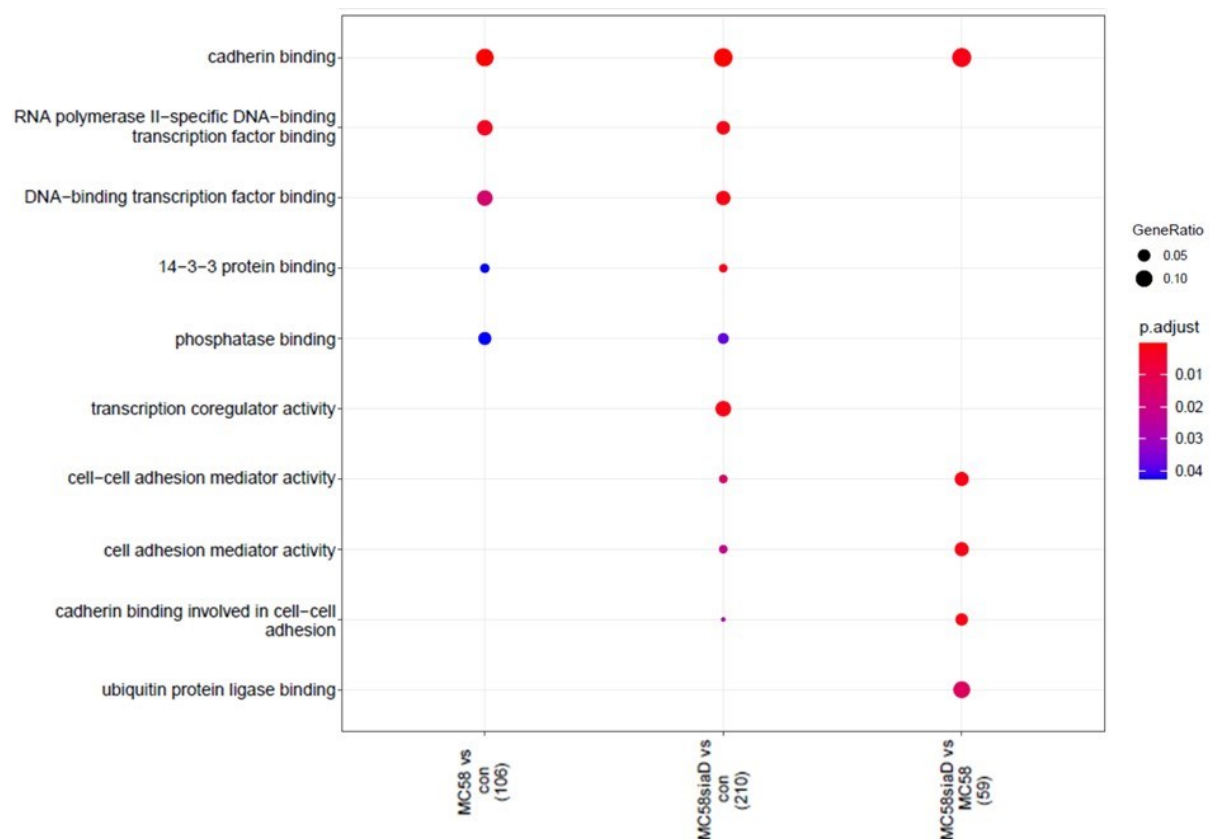
Eine weitere *Enrichment* Analyse wurde zur Untersuchung der zellulären Komponenten nach Infektion mit den *NmB* erstellt. Diese wurde in gleicher Weise erstellt, wie in 4.5.1 beschrieben. Auch in dieser Analyse wurde der Effekt der Infektion mit den beiden *NmB* Stämmen mit den uninfizierten Kontrollen verglichen sowie der Effekt der Kapselmutante auf die Phosphorylierungen in den HIBCPP-Zellen mit dem Effekt der Infektion mit dem Wildtyp Stamm. Eine große Anzahl der in Abbildung 27 aufgeführten Termini der zellulären Komponenten werden nach Infektion mit sowohl dem Wildtyp als auch der Kapselmutante identifiziert. Die Analyse der durch die Kapselmutante induzierten Phosphorylierungen ergab jedoch zusätzliche zelluläre Komponenten, die durch den Wildtyp Stamm nicht signifikant induziert wurden. Zu diesen gehören die Termini „*cell-cell-junction*“, „*cell leading edge*“, „*desmosome*“ und „*costamere*“. Weitere Termini wurden zudem durch die Kapselmutante stärker beeinflusst, als durch den Wildtyp („*MC58siaD vs con*“).



**Abbildung 27 Enrichment Analyse der zellulären Komponenten nach Infektion mit dem *NmB* Wildtyp und dessen Kapselmutante.** Die Enrichment Analyse der zellulären Komponenten wurde unter Verwendung des Benjamini-Hochberg-Verfahrens mit einem p-Wert-Cutoff 0,05 oder einer FDR von 5% durchgeführt. Als Grundlage der Analyse wurden alle Regulationen mit einem unkorrigierten p-Wert unter 0,05 verwendet. Aufgeführt sind die Ergebnisse der Vergleiche des Wildtyps mit den Kontrollzellen („*MC58 vs con*“), der Kapselmutante mit den Kontrollzellen („*MC58siaD vs con*“) und der beiden Stämme untereinander („*MC58siaD vs MC58*“).

### 4.5.3 Enrichment Analyse der molekularen Funktionen nach Infektion mit *NmB*

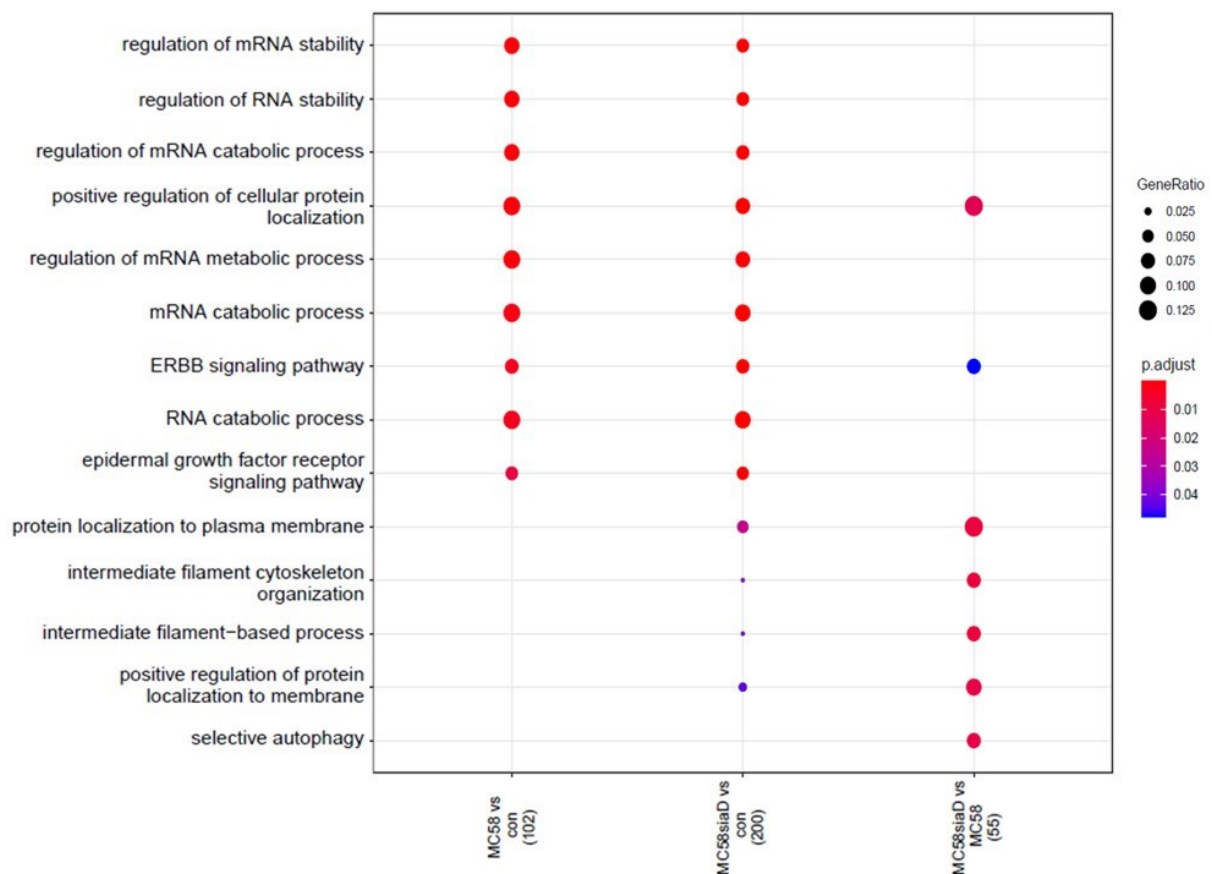
Auf die in 4.5.1 beschriebene Weise, wurden auch *Enrichment* Analysen der molekularen Funktion nach Infektion mit den *NmB* Stämmen durchgeführt (Abbildung 28). Auch in dieser Analyse ist zu erkennen, dass für die induzierten Phosphorylierungen des Wildtyps Termini ermittelt wurden, die auch durch die Kapselmutante reguliert werden. Zusätzlich zu den, nach Infektion mit dem Wildtyp ermittelten Termini, konnten bei Untersuchung der durch die Kapselmutante induzierten Phosphorylierungen weitere molekulare Funktionen festgestellt werden. Bei Vergleich der beiden infizierten Konditionen zeigt sich, dass die Kapselmutante einen größeren Einfluss auf die molekularen Funktionen der HIBCPP-Zellen hat. Die höchste Signifikanz hat in allen drei Vergleichen der Terminus „*cadherin binding*“.



**Abbildung 28: Enrichment Analyse der molekularen Funktionen nach Infektion mit dem *NmB* Wildtyp und dessen Kapselmutante.** Die Enrichment Analyse der molekularen Funktionen wurde unter Verwendung des Benjamini-Hochberg-Verfahrens mit einem p-Wert-Cutoff 0,05 oder einer FDR von 5% durchgeführt. Als Grundlage der Analyse wurden alle Regulationen mit einem unkorrigierten p-Wert unter 0,05 verwendet. Aufgeführt sind die Ergebnisse der Vergleiche des Wildtyps mit den Kontrollzellen („*MC58 vs con*“), der Kapselmutante mit den Kontrollzellen („*MC58siaD vs con*“) und der beiden Stämme untereinander („*MC58siaD vs MC58*“).

#### 4.5.4 Enrichment Analyse der biologischen Funktionen nach Infektion mit *NmB*

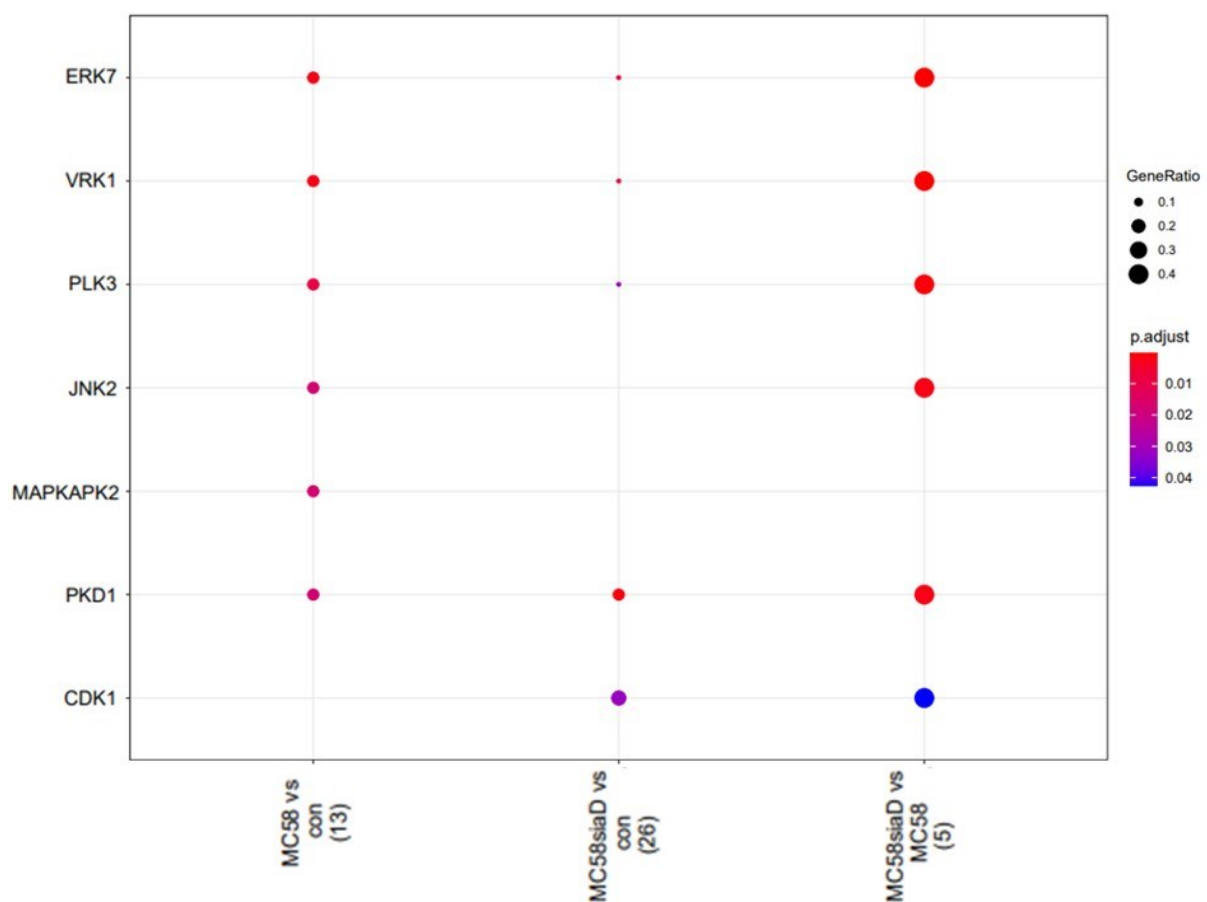
Auch der Einfluss der Infektion der *NmB* Stämme auf die biologischen Funktionen der HIBCPP-Zellen wurde mit Hilfe einer *Enrichment* Analyse der Phosphoproteomik Daten ermittelt (Abbildung 29). Fast alle Termini, die in der Analyse gefunden wurden, ergaben sich durch die Infektion der HIBCPP-Zellen mit sowohl dem Wildtyp Stamm als auch der Kapselmutante im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Es wurden zudem biologische Funktionen, die nur durch die Kapselmutante signifikant reguliert wurden, ermittelt. Die Mehrzahl der Termini, welche aus dem Vergleich beider Stämme mit den Kontrollzellen hervorgingen, weisen auf eine Regulation der mRNA während der Infektion der Zellen hin.



**Abbildung 29: Enrichment Analyse der biologischen Funktionen nach Infektion mit dem *NmB* Wildtyp und dessen Kapselmutante.** Die Enrichment Analyse der biologischen Funktionen wurde unter Verwendung des Benjamini-Hochberg-Verfahrens mit einem p-Wert-Cutoff 0,05 oder einer FDR von 5% durchgeführt. Als Grundlage der Analyse wurden alle Regulationen mit einem unkorrigierten p-Wert unter 0,05 verwendet. Aufgeführt sind die Ergebnisse der Vergleiche des Wildtyps mit den Kontrollzellen („MC58 vs con“), der Kapselmutante mit den Kontrollzellen („MC58siaD vs con“) und der beiden Stämme untereinander („MC58siaD vs MC58“).

#### 4.5.5 Enrichment Analyse der Kinase-Anreicherung nach Infektion mit *NmB*

Zuletzt wurde eine *Enrichment* Analyse der Kinasen nach Infektion der HIBCPP-Zellen mit den *NmB* Stämmen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen durchgeführt. In Abbildung 30 ist der Vergleich der Infektion der HIBCPP-Zellen mit den beiden *NmB* Stämmen in Bezug auf die Anreicherung verschiedener Kinasen dargestellt, sowie der Vergleich der Infektion mit Wildtyp und Kapselmutante zueinander. Fast alle der aufgeführten Kinasen wurden durch beide *NmB* Stämme reguliert, mit Ausnahme von MAPKAPK2 und CDK1. Die *Gene Ratio* bei Vergleich beider Stämme deutet auf einen stärkeren Einfluss der Kapselmutante auf die Anreicherung der Kinasen hin.



**Abbildung 30: Enrichment Analyse der Kinase Anreicherung nach Infektion mit dem *NmB* Wildtyp und dessen Kapselmutante.** Die Enrichment Analyse der Kinase Anreicherung wurde unter Verwendung des Benjamini-Hochberg-Verfahrens mit einem p-Wert-Cutoff 0,05 oder einer FDR von 5% durchgeführt. Als Grundlage der Analyse wurden alle Regulationen mit einem unkorrigierten p-Wert unter 0,05 verwendet. Aufgeführt sind die Ergebnisse der Vergleiche des Wildtyps mit den Kontrollzellen („MC58 vs con“), der Kapselmutante mit den Kontrollzellen („MC58siaD vs con“) und der beiden Stämme untereinander („MC58siaD vs MC58“).

## 5 Diskussion

### 5.1 Die Rolle des *Plexus choroideus* während der Infektion verschiedener bakterieller Erreger

Der PC stellt eine Barriere zwischen Blutkreislauf und dem CSF dar. Somit gelangen Bakterien bei einer systemischen Infektion über den Blutkreislauf mit den PC-Epithelzellen in Kontakt und müssen diese überwinden, um in das ZNS vorzudringen. Mit Hilfe eines invertierten Zellkulturmodells der HIBCPP-Zellen (Schwerk *et al.*, 2012) kann der Kontakt der Erreger mit der basolateralen (dem Blutstrom zugewandten) Seite der CP Epithelzellen *in vitro* untersucht werden, um somit die Rolle der BLS während einer bakteriellen Meningitis weiter zu charakterisieren. Die Infektion durch verschiedene Gram-positive und Gram-negative bakterielle Erreger wurde bereits für HIBCPP-Zellen nachgewiesen. So wurde die Infektion der HIBCPP-Zellen durch *N. meningitidis* Serogruppe B und Serogruppe C sowie *S. suis* und deren Kapselmutanten beschrieben (Borkowski *et al.*, 2014; Schwerk *et al.*, 2012). Auch die Infektion der HIBCPP-Zellen durch *H. influenzae* und verschiedene Varianten dieses Erregers, welche die Kapsel und/oder die Fimbrien nicht exprimieren, konnte in dem Zellkultursystem nachgewiesen werden (Häuser *et al.*, 2018). Für diese Gram-positiven und Gram-negativen Erreger wurden zudem erhöhte Infektionsraten von HIBCPP-Zellen nach Deletion der Kapsel beobachtet (Häuser *et al.*, 2018; Borkowski *et al.*, 2014; Schwerk *et al.*, 2012). Dies deutet auf eine wichtige Rolle der bakteriellen Kapsel und deren Rolle bei der Infektion der BHS hin.

Die Kapsel wird als essenzieller Virulenzfaktor bakterieller Erreger betrachtet. Die Expression eines Kapselpolysaccharides ermöglicht den Erregern das Überleben im Blutkreislauf, wodurch sie die Schranken des ZNS erreichen können. Die dort stattfindende Infektion von Wirtszellen durch die Bakterien wird jedoch durch die Kapsel auf Grund von elektrostatischer Abstoßung oder der Abdeckung bakterieller Strukturen, die zur Adhäsion genutzt werden können, inhibiert (Kim *et al.*, 2003; Hammerschmidt *et al.*, 1996a; St Geme *et al.*, 1991).

Da die genauen molekularen Vorgänge während der Infektion der BLS durch die Gram-negativen bzw. Gram-positiven pathogenen Erreger *N. meningitidis*, *H. influenzae* und *S. suis* noch nicht vollständig entschlüsselt sind, wurde in dieser Studie ein Vergleich der Rollen der Dynamin-vermittelten Endozytose sowie der MAPK Erk1/2 und p38 während der Infektion von HIBCPP-Zellen als *in vitro* Modell der BLS durch diese Erreger durchgeführt. Zusätzlich zu den Auswirkungen der Expression der Kapsel wurde, im Fall von *H. influenzae*, auch der Einfluss der Fimbrien auf die Infektionsraten untersucht. Auf Grund erster Ergebnisse wurde der Fokus im späteren Verlauf der Studie auf die *N. meningitidis* Stämme der Serogruppen B



und C sowie den Einfluss ihrer Kapselexpression während der Infektion der HIBCPP-Zellen gelegt.

## 5.2 Die Rolle von Dynamin während der Infektion der HIBCPP-Zellen durch verschiedene bakterielle Erreger

Pathogene Erreger haben eine Vielzahl an Mechanismen entwickelt, um Wirtszellen zu infizieren und dabei Mechanismen der Zellen zu ihrem Vorteil zu nutzen. Dabei ist während der Infektion der Wirtszelle durch die Erreger der erste Schritt oftmals die Adhäsion an der Oberfläche der Wirtszelle und eine Interaktion mit den Oberflächenproteinen der Zelle. Diese Interaktion kann durch die bakterielle Kapsel beeinflusst werden, da diese Oberflächenproteine der Erreger maskieren kann. Nach der Adhäsion an der Oberfläche der Wirtszelle nutzen Erreger die Endozytose-Maschinerie, um in die Zellen vorzudringen, was die Manipulation des Aktin-Zytoskeletts sowie wirtseigener Signalwege involviert (Cossart *et al.*, 2014; Scibelli *et al.*, 2007; Munter *et al.*, 2006). In dieser Studie wurden unterschiedliche Auswirkungen der Inhibition der Dynamin-vermittelten Endozytose auf die Infektionsraten verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer Erreger beobachtet.

Die Dynamin-abhängige Endozytose kann in CVE und Caveolin-vermittelte Endozytose unterschieden werden, jedoch können auch Dynamin-unabhängige Endozytoseprozesse an den Wirtszellen stattfinden (Sathe *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2010). Die CVE reguliert sowohl die Aufnahme von Oberflächenrezeptoren als auch deren nachgestellte Signaltransduktion (Xiao *et al.*, 2018). Diese Signalwege können durch eine Dysregulation der Endozytose, und dem damit einhergehenden Rezeptor-Recycling sowie dem Abbau in Lysosomen, reguliert werden (Xiao *et al.*, 2018; Paul *et al.*, 2015). Damit hat die CVE Einfluss auf die Internalisation von an der Plasmamembran lokalisierten Rezeptoren, deren Expression sowie auf die durch die Rezeptoren induzierten Signalkaskaden (Gonnord *et al.*, 2012; McMahon *et al.*, 2011; Sorkin *et al.*, 2009). Umgekehrt kann die CVE auch durch aufgenommene Substanzen sowie durch *downstream* Signalwege in den Zellen dynamisch reguliert werden (Reis *et al.*, 2015; Di Fiore *et al.*, 2014; Loerke *et al.*, 2009; Puthenveedu *et al.*, 2006). Die Endozytosemaschinerie der Zelle kann auch durch pathogene Erreger genutzt oder manipuliert werden, damit diese in den intrazellulären Raum der Zellen vordringen können. Hierbei nutzen die Erreger oft Strukturen, die denen der Wirtszellen ähneln (*molecular mimicry*) oder auch verschiedene Toxine, um den zelleigenen Endozytosemechanismus zu Ihrem Zweck zu nutzen (Walpole *et al.*, 2020). Für das Gram-positive Bakterium *L. monocytogenes* konnte zuletzt eine Abhängigkeit der Dynamin-vermittelten Endozytose während der Infektion von HIBCPP-Zellen ermittelt werden (Dinner *et al.*, 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde die Manipulation der Dynamin-

vermittelten Endozytose in HIBCPP-Zellen durch pathogene Erreger anhand eines weiteren Gram-positiven Erregers (*S. suis*) sowie Gram-negativer Erreger (*H. influenzae* und *N. meningitidis*) untersucht.

### 5.2.1 *N. meningitidis*

Im Fall des humanpathogenen Bakteriums *N. meningitidis* wurde bei Kontakt mit Epithelzellen bereits eine negative Regulation der Kapsel beschrieben (Deghmane *et al.*, 2002; Hammerschmidt *et al.*, 1996b). Eine höhere Infektionsrate der Kapselmutante im Vergleich zu dem bekapselten Wildtyp Stamm wurde auch in HIBCPP-Zellen beobachtet (Borkowski *et al.*, 2014; Schwerk *et al.*, 2012) und in dieser Arbeit bestätigt. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt der Effekt der Inhibition der Dynamamin-vermittelten Endozytose auf Stämme der *N. meningitidis* Serogruppen B und C in An- und Abwesenheit der Kapsel ermittelt. Zu diesem Zweck wurden die HIBCPP-Zellen in der UK mit dem Inhibitor Dynasore vorbehandelt, bevor die Zellen mit den *N. meningitidis* Stämmen infiziert wurden. Die Infektion in der UK entspricht dabei der *in vivo* Situation, in welcher die Erreger sich im Blut angereichert haben und von dort aus die Plexusepithelzellen infizieren. Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf eine zentrale Rolle der Dynamamin-vermittelten Endozytose während der Infektion durch die NmB und NmC Stämme hin, jedoch nur in Abwesenheit des wichtigsten Virulenzfaktors der Erreger: der bakteriellen Kapsel (Tzeng *et al.*, 2016). Es kann spekuliert werden, dass durch die Kapsel Oberflächenproteine von *N. meningitidis* maskiert werden, die im Fall von unbekapselten *N. meningitidis* Stämmen durch Manipulation des Dynamamin Signalwegs eine höhere Invasion ermöglichen. Im Kontrast dazu scheinen die bekapselten Stämme beider Serogruppen, welche eine geringere Infektionsrate in HIBCPP-Zellen aufweisen, in der Lage zu sein, einen Dynamamin-unabhängigen Signalweg zu aktivieren. Auch für einen unbekapselten Stamm des Erregers *Streptococcus pneumoniae* konnte eine Dynamamin-unabhängige Infektion von HBMEC, Endothelzellen der BHS, nachgewiesen werden (Anil *et al.*, 2020). Weitere Beispiele für Dynamamin-unabhängige Endozytose in Wirtszellen sind die *lipid raft*-abhängige Endozytose, Flotillin-abhängige Endozytose sowie Macropinocytose (Lin *et al.*, 2010).

### 5.2.2 *H. influenzae*

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit nach Inhibition der Dynamamin-vermittelten Endozytose keine Veränderung der Infektionsraten von *H. influenzae* festgestellt werden. Hierbei wurden die HIBCPP-Zellen mit den *H. influenzae* Stämmen in An- und Abwesenheit der Kapsel und Fimbrien nach Vorbehandlung der Zellen mit dem Dynamamin Inhibitor Dynasore von der basolateralen Seite der Zellen aus infiziert. Obwohl zuletzt unterschiedliche

Infektionsraten des *H. influenzae* Stamms und dessen Varianten festgestellt wurden, welche aus einem Verlust der Kapsel, der Fimbrien oder beider Virulenzfaktoren resultierten (Häuser *et al.*, 2018) und auf eine Rolle dieser Virulenzfaktoren bei der Infektion der HIBCPP-Zellen hindeuten, konnte keine Veränderung der Anzahl intrazellulärer Bakterien bei Inhibition der Dynamin-vermittelten Endozytose beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass auch *H. influenzae* einen der Dynamin-unabhängigen Endozytosemechanismen nutzt, zu denen die *lipid-raft*-abhängige Endozytose, die Flotilin-abhängige Endozytose sowie die Makropinozytose gezählt werden (Sathe *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2010). Diese Mechanismen wurden für einige pathogene Erreger sowie eine Vielzahl an Viren beschrieben (Lin *et al.*, 2010). Wie in 5.2.1 beschrieben, wird die Dynamin-unabhängige Form der Endozytose auch bei Infektion der HIBCPP-Zellen mit den bekapselten *N. meningitidis* Stämmen der Serogruppen B und C beobachtet.

### 5.2.3 *S. suis*

Zusätzlich zu den beiden Gram-negativen Erregern wurde auch der Einfluss der Dynamin-vermittelten Endozytose auf die Infektionsmechanismen eines Gram-positives Bakteriums, *S. suis*, untersucht. Dies ermöglicht Vergleiche mit dem zuvor analysierten Gram-positiven Erreger *L. monocytogenes* und dessen Infektionsmechanismen in HIBCPP-Zellen. Des Weiteren ist somit ein Vergleich der Infektion der Epithelzellen der BLS durch Gram-positive und Gram-negative Erreger möglich.

Auch für *S. suis* wurde eine höhere Infektionsrate in HIBCPP-Zellen in Abwesenheit der bakteriellen Kapsel nachgewiesen (Schwerk *et al.*, 2012), welche in dieser Studie bestätigt wurde. Sowohl für den Wildtyp als auch die Kapselmutante von *S. suis* konnte eine verringerte Infektionsrate nach Inhibition der Dynamin-vermittelten Endozytose festgestellt werden. Dies deutet auf eine Manipulation dieses Endozytose-Mechanismus bei der Infektion von HIBCPP-Zellen durch den Erreger hin. Die zuvor beschriebene Abhängigkeit der Infektion der HIBCPP-Zellen durch *L. monocytogenes* von der Dynamin-vermittelten Endozytose (Dinner *et al.*, 2017) wird somit bei einem weiteren Gram-positiven Erreger beobachtet. Im Unterschied zu den in dieser Studie analysierten Gram-negativen Erregern, scheint die Expression der Kapsel keinen Effekt auf die Abhängigkeit des Erregers von der Dynamin-vermittelten Endozytose während der Infektion der HIBCPP-Zellen zu haben.

Im Gegensatz zu den Mechanismen der Infektion durch Listerien (Radoshevich *et al.*, 2018), ist zu der Rolle der Endozytose bei Infektion mit *S. suis* vergleichsweise wenig bekannt. Als zell-aktivierende Komponenten von *S. suis* wurden unter anderem die Lipoproteine als auch

die Bestandteile der Zellwand wie LTA angeführt. Diese können Einfluss auf die Adhäsion der Erreger an den Zellen haben (Wichgers Schreur *et al.*, 2010; Fittipaldi *et al.*, 2008).

#### **5.2.4 Zusammenhang der Dynamin vermittelten Endozytose und Wirtszell-Signaltransduktion während bakterieller Infektionen**

In früheren Studien wurde schon der Einfluss des Inhibitors Dynasore auf die MAPK Erk1/2 und p38 beschrieben (Dinner *et al.*, 2017). Zudem wurde in Krebszellen eine Rolle von Erk1/2 bei der CVE sowie der Einleitung der Bildung von *clathrin-coated-pits* beobachtet, welche sich während der CVE ausbilden (Xiao *et al.*, 2018). Für die Aktivierung von Erk1/2 wurden auch  $\beta$ -Arrestine, die G-Protein gekoppelte Rezeptoren zur Endozytose vorbestimmen, als Faktor beschrieben (DeFea *et al.*, 2000; Daaka *et al.*, 1998). Des Weiteren wurden ein Zusammenhang zwischen  $\beta$ -Arrestinen und einer Steigerung der MEK1 vermittelten Aktivierung von Erk1 sowie die Lokalisation dieser aktivierten Form an Endosomen ermittelt (Luttrell *et al.*, 2001; McDonald *et al.*, 2000). In HBMEC konnte die Manipulation des  $\beta$ 2-Adrenorezeptor/ $\beta$ -Arrestine Signalwegs durch *N. meningitidis* als zentraler Mechanismus der Infektion der BHS beobachtet werden (Coureuil *et al.*, 2010). Eine Rolle der Dynamin-regulierten Endozytose während der Erk1-vermittelten Signaltransduktion wurde beobachtet, da dominant-negative Mutanten von Dynamin sowohl die Bildung von endozytotischen Vesikeln als auch die Aktivierung von Erk1 und dessen Aktivator MEK inhibierten (Kranenburg *et al.*, 1999; Daaka *et al.*, 1998). Zudem war das phosphorylierte MEK an den endozytotischen Vesikeln, nicht jedoch im Zytoplasma, lokalisiert (Kranenburg *et al.*, 1999). *In vitro* konnte in Endothelzellen eine Aktivierung der MAPK p38 durch den Inhibitor Dynasore beobachtet werden, jedoch nicht der MAPK Erk1/2 (Choi *et al.*, 2014). Gleiches wurde in HIBCPP-Zellen beobachtet (Dinner *et al.*, 2017). Auf Grund der Verbindung der Endozytose und der MAPK Signalwege wurde im nächsten Schritt der Einfluss der MAPK Erk1/2 und p38 auf die Infektion durch die verschiedenen Bakterienstämme untersucht.

### 5.3 Die Rolle der MAPK-Signalkaskade in Folge einer Infektion der HIBCPP-Zellen durch verschiedene bakterielle Erreger

Der MAPK Signalweg ist einer der wichtigsten regulatorischen Mechanismen in eukaryotischen Zellen und hält eine zentrale Rolle in der Immunantwort inne (Krachler *et al.*, 2011). Während einige pathogene Erreger die MAPK Signalwege aktivieren und diese zur erhöhten Invasion der Wirtszellen nutzen (Dinner *et al.*, 2017; Hashino *et al.*, 2015; Schorey *et al.*, 2003), inhibieren andere Erreger die Phosphorylierung der MAPK, um die Entzündungsreaktion der Zellen zu reduzieren (Reiterer *et al.*, 2011; Orth *et al.*, 1999).

Um die Rolle der beiden MAPK Signalwege während der Infektion durch verschiedene Erreger zu untersuchen, wurden die HIBCPP-Zellen mit spezifischen Inhibitoren, welche die Aktivierung der MAPK Erk1/2 (U0126) und p38 (SB203580) unterbinden, vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen in der UK mit den verschiedenen Bakterienstämmen infiziert. Beide Inhibitoren weisen eine hohe Selektivität auf, die in mehreren Studien belegt wurde (Favata *et al.*, 1998; Cuenda *et al.*, 1995), und wurden bereits in *in vivo* Studien angewandt (Marampon *et al.*, 2009; Favata *et al.*, 1998). Zusätzlich zur Inhibition der Erk1/2 MAPK Signalkaskade wurde jedoch eine Blockierung der Kaliumkanäle in primären Neuronen und Gehirnschnitten als weiterer Effekt des Inhibitors U0126 beobachtet (Wang *et al.*, 2018). Eine weitere Studie wies dem Inhibitor eine Wirkung als Antioxidans nach, der in PC12 Zellen eine schützende Wirkung gegen oxidativen Stress-induzierten Zelltod hatte (Ong *et al.*, 2015). Aus diesem Grund müssen bei der Anwendung von diesen Inhibitoren mögliche Nebeneffekte in Betracht gezogen und die Ergebnisse der Studien unter diesen Voraussetzungen interpretiert werden.

#### 5.3.1 *N. meningitidis*

Da der Fokus dieser Studie auf die Infektionsmechanismen von *N. meningitidis* gelegt war, wurde zunächst die Aktivierung der MAPK Erk1/2 und p38 durch die NmB und NmC Stämme untersucht. Nach Infektion der HIBCPP-Zellen in der UK konnte, im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle, eine schwache Aktivierung von Erk1/2 festgestellt werden. Dies steht in Kontrast zu der Infektion der HIBCPP-Zellen mit *L. monocytogenes*, bei welcher eine signifikante Aktivierung von Erk1/2 und p38 beobachtet wurde (Dinner *et al.*, 2017). Die MAPK p38 hingegen, wurde von allen untersuchten *N. meningitidis* Stämmen aktiviert, wobei eine stärkere Phosphorylierung nach Infektion mit den NmB Stämmen im Vergleich zu den NmC Stämmen beobachtet wurde. In HBMEC, einem *in vitro* Zellkultursystem der BHS, wurde

bereits eine Aktivierung der MAPK p38 und JNK nach Infektion mit dem *NmB* Wildtyps (MC58) sowie dessen Kapselmutante beschrieben, nicht jedoch von Erk1/2 (Sokolova *et al.*, 2004).

Die Inhibition des Erk1/2 Signalwegs resultierte in einer signifikanten Reduktion der intrazellulären Bakterien der *NmB* und *NmC* Wildtyp Stämme in HIBCPP-Zellen. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Dinner *et al.*, die eine Abhängigkeit der Infektion der *L. monocytogenes* in HIBCPP-Zellen von Erk1/2 beschreiben (Dinner *et al.*, 2017). In HBMEC, einem Modell der BHS, wurde hingegen eine Rolle der p38 und JNK MAPK Signalwege bei Infektion mit *N. meningitidis* beobachtet, jedoch konnte innerhalb der ersten 8 h der Infektion keine Aktivierung von Erk1/2 festgestellt werden. (Sokolova *et al.*, 2004). Auffällig ist, dass im Gegensatz zu der Invasion von *L. monocytogenes* in HIBCPP-Zellen, die *N. meningitidis* Wildtyp Stämme keine Dynamin-abhängige Endozytose aufweisen, jedoch gleichermaßen eine Abhängigkeit von der MAPK Erk1/2 bei der Infektion zeigen. Da eine komplexe Verzahnung und Abhängigkeit der Endozytose und den Signalkaskaden der Zelle besteht, lässt dies auf unterschiedliche Prozesse bei der Infektion beider Erreger schließen, die noch im Detail entschlüsselt werden müssen. In diesem Zusammenhang wurde unter anderem für verschiedene Rezeptoren der Wirtszellmembran eine Interaktion mit dem Erk1/2 Signalweg beschrieben (Cassier *et al.*, 2017; Caunt *et al.*, 2006).

Um den Einfluss der Polysaccharidkapsel zu untersuchen, wurden auch mit den Kapselmutanten beider *N. meningitidis* Stämme Infektionsversuche unter Anwendung der MAPK Inhibitoren durchgeführt. Interessanterweise wiesen die Kapselmutanten der *NmB* und *NmC* Stämme eine signifikant erhöhte Anzahl intrazellulärer Bakterien in HIBCPP-Zellen nach Inhibition des Erk1/2 Signalwegs auf. Dies steht in starkem Kontrast zu den Wildtyp Stämmen und deutet darauf hin, dass die Kapsel der Erreger wichtige Virulenzfaktoren maskiert, welche Einfluss auf den Infektionsmechanismus der Bakterien nehmen können. Eine verringerte Infektion von HIBCPP-Zellen durch *NmB* und *NmC* Wildtyp Stämme auf Grund der bakteriellen Kapsel wurde bereits gezeigt (Borkowski *et al.*, 2014; Schwerk *et al.*, 2012) und konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Auch die in 5.2.1 beschriebenen Dynamin-Inhibitionsexperimente weisen auf unterschiedliche Infektionsmechanismen des Wildtyps und der Kapselmutante beider Serogruppen hin.

Ein Kapsel-abhängiger Einfluss auf die Infektion von Wirtszellen sowie der Genexpression nach Infektion mit *N. meningitidis* wurde bereits beschrieben (Schubert-Unkmeir *et al.*, 2007; Unkmeir *et al.*, 2002; Virji *et al.*, 1995). Zudem konnte in einer Studie, in welcher Makrophagen mit dem Gram-negativen Bakterium *Burkholderia pseudomallei* infiziert wurden, nach Inhibition des Erk1/2 Signalwegs kein Effekt auf die Anzahl intrazellulärer Bakterien festgestellt werden (D'Elia *et al.*, 2017).

Die Inhibition von p38 resultierte in Fall beider Wildtyp Stämme der *N. meningitidis* Serogruppen B und C in signifikant verringerten Infektionsraten von HIBCPP-Zellen. Dies deutet auf eine Abhängigkeit der Infektion der Zellen durch diese Erreger von dem p38 Signalweg hin. Unterschiede in den Infektionsmechanismen der *N. meningitidis* Stämme beider Serogruppen konnten nach Inhibition des p38 MAPK Signalwegs in HIBCPP-Zellen festgestellt werden. Während die Unterbindung der Aktivierung von p38 zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl intrazellulärer Bakterien der *NmC* Kapselmutante in HIBCPP-Zellen führte, konnte keine signifikante Änderung der Infektionsrate für die *NmB* Kapselmutante festgestellt werden.

Da nach Behandlung mit Dynasore eine Aktivierung von p38 in HIBCPP-Zellen beschrieben wurde (Dinner *et al.*, 2017), ist es möglich, dass diese Aktivierung von p38 einen positiven Effekt auf die Infektion durch die Erreger hatte: Durch die Aktivierung von p38 bei Inhibition der Dynamamin-vermittelten Endozytose könnten die beiden *Nm* Wildtyp Stämme, deren Infektion von HIBCPP-Zellen in dieser Studie eine Abhängigkeit von p38 aufwies, besser invadiert sein.

Eine weitere Studie, welche die Endozytose mit den darauffolgenden Prozessen in den Zellen verbindet, konnte einen inhibitorischen Effekt durch Unterbindung der Aktivierung von Dynamamin auf die Aktivierung einer RTK, die primär durch CVE internalisiert wird, und der darauffolgenden *downstream* Aktivierung von Erk1/2 und Akt beschreiben. Die Inhibition der Dynamamin-abhängigen Endozytose konnte jedoch in der gleichen Studie nicht die Aktivierung des EGF Rezeptor (EGFR) und die *downstream* Aktivierung von Erk1/2 und Akt unterbinden (Heldin *et al.*, 2019). Diese Studien unterstreichen die Verzahnung der Endozytose verschiedener Rezeptoren mit den Signalkaskaden der Zellen.

### 5.3.2 *H. influenzae*

Die Rolle von Erk1/2 und p38 bei der Infektion von HIBCPP-Zellen wurde weiterhin für den Gram-negativen Erreger *H. influenzae* untersucht. *H. influenzae* wies eine signifikante Abhängigkeit von den MAPK Signalwegen bei der Infektion in HIBCPP-Zellen auf. Wurden die MAPK Erk1/2 oder p38 inhibiert, so war die Infektion durch den Erreger fast vollständig unterbunden. Auch bei Infektion mit den Varianten des Erregers ohne Kapsel und Fimbrien konnte eine signifikante Reduktion der Infektion nach Inhibition der MAPK Signalwege festgestellt werden. Dies unterscheidet *H. influenzae* von *N. meningitidis*, da, im Fall von *H. influenzae*, der Virulenzfaktor Kapsel keinen Einfluss auf die Abhängigkeit der Infektion von HIBCPP-Zellen von den beiden MAPK aufweist.

Während die Infektion von HIBCPP-Zellen durch *H. influenzae* generell von der Aktivierung der MAPK abhängig war, hatte die Inhibition der Dynamin-abhängigen Endozytose keinen Einfluss auf die Infektion durch alle Varianten (vgl. 5.2.2). Dieser Zusammenhang ist bisher unbeschrieben und muss weiter untersucht werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Glukokortikoide synergistisch die NTHi-induzierte *Toll-like* Rezeptor (TLR) 2-Expression durch spezifische Hochregulierung der MAPK-Phosphatase-1 verstärken können. Dies führt zu einer Dephosphorylierung und der damit einhergehenden Inaktivierung der MAPK p38, welche die Expression des TLR2 negativ reguliert. Darüber hinaus resultierte die erhöhte Expression von TLR2 in Epithelzellen auch in einer NTHi-induzierten Expression einiger Zytokine, wie *tnf $\alpha$* , *il1 $\beta$*  und *il8*, was die physiologische Relevanz der TLR2-Hochregulation für die bakterielle Pathogenese unterstreicht (Imasato *et al.*, 2002). Dies könnte auch darauf hindeuten, dass die Dephosphorylierung der MAPK p38 einen positiven Einfluss auf die Infektion der *N. meningitidis* Stämme nehmen könnte, da in HIBCPP-Zellen TLR2/TLR6 anstelle von TLR4 oder TLR2/TLR1 an der Zellreaktion nach einer *N. meningitidis*-Infektion beteiligt sind (Borkowski *et al.*, 2014).

### 5.3.3 *S. suis*

Auch für den Gram-positiven Erreger *S. suis* wurde der Einfluss der MAPK Erk1/2 und p38 auf die Infektion von HIBCPP-Zellen durch die Bakterien in An- und Abwesenheit der Kapsel untersucht. Die Ergebnisse dieser Infektionsexperimente deuten auf eine Abhängigkeit des Erregers und dessen Kapselmutante von der Aktivierung beider MAPK in HIBCPP-Zellen hin. Bei diesen Versuchen konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp und Kapselmutante festgestellt werden. Damit spiegeln die *S. suis* Stämme die MAPK-abhängige Infektion von HIBCPP-Zellen durch den Gram-positiven Erreger *L. monocytogenes* wieder (Dinner *et al.*, 2017). Die Kapsel von *S. suis* wurde bereits bei der Phagozytose mit einer Inhibition verschiedener Signalwege assoziiert. Die Infektion mit der Kapselmutante führte hingegen zu einem hohen Maß an Phosphorylierung von Akt and PKC $\alpha$  (Segura *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse in zukünftigen Studien den Einfluss des Erregers auf die Aktivierung oder Inhibition verschiedener Signalwege in HIBCPP-Zellen weiter zu untersuchen.



## 5.4 Bakterielle Erreger induzieren die Expression von *il6* und *il8* in HIBCPP-Zellen in Abhängigkeit von der MAPK-Signalkaskade

Kennzeichen einer schweren Infektion sind die Dysregulation der Immunantwort, welche durch einen Anstieg der Expression von Zytokinen und Chemokinen und einer erhöhten Belastung durch die Erreger charakterisiert wird (Klemm *et al.*, 2017). So ist auch für die bakterielle Meningitis eine, durch die bakteriellen Erreger und das Einströmen von Neutrophilen ausgelöste, Inflammation charakteristisch. Ein großer Anteil der im Liquor freigesetzten Zytokine wird von eingewanderten, aktivierten Leukozyten produziert, jedoch tragen auch das Parenchym, mikrovaskuläre Endothelzellen, Ependymzellen der Ventrikel sowie Plexusepithelzellen dazu bei (Neal *et al.*, 2013; Schwerk *et al.*, 2011; Tauber *et al.*, 1999). Im Fall der bakteriellen Meningitis sind erhöhte Konzentrationen an TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL8, CXCL1 und IL10 vorzufinden (Tauber *et al.*, 1999). Auch die Induktion verschiedener Signalwege, unter anderem der MAPK, bei der Infektion von Wirtszellen mit verschiedenen Erregern, wurde mit der Modulation der Immunantwort in Verbindung gebracht (Sokolova *et al.*, 2004; Ameixa *et al.*, 2002; Czerucka *et al.*, 2001).

Für die in dieser Arbeit untersuchten Erreger wird die BLS als Eintrittspforte in das ZNS diskutiert (Herold *et al.*, 2019), und somit auch ihre Rolle während der Immunantwort in Folge einer Infektion (Dinner *et al.*, 2017; Borkowski *et al.*, 2014; Schwerk *et al.*, 2011). Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen der Infektion von HIBCPP-Zellen mit verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Erregern auf die Expression der Botenstoffe *il6* und *il8* untersucht. Hierbei wurde der Fokus auf den Einfluss der Inhibition der MAPK Erk1/2 und p38 während der Infektion der HIBCPP-Zellen auf die Immunantwort gelegt, sowie den Einfluss der Virulenzfaktoren Kapsel und Fimbrien.

Bei einer durch Meningokokken verursachten Meningitis wurden bereits hohe Konzentrationen verschiedener Zytokine und Chemokine im CSF von Patienten nachgewiesen (Tauber *et al.*, 1999). Auch für HIBCPP-Zellen konnte eine erhöhte Transkription von Genen, welche für proinflammatorische Proteine codieren, nach der Infektion mit Neisserien ermittelt werden (Borkowski *et al.*, 2014).

### 5.4.1 *N. meningitidis*

Um die Expression beider Botenstoffe während der Infektion mit *N. meningitidis* zu untersuchen, wurden die HIBCPP-Zellen in der UK für 6 h infiziert. Verglichen wurde die Expression von *il6* und *il8* in unbehandelten, infizierten Zellen mit Zellen in welchen Erk1/2 und p38 bei der Infektion inhibiert wurden. Der NmB Stamm sowie dessen Kapselmutante

verursachten eine signifikante Induktion beider Botenstoffe in den Zellen. Die Inhibition der MAPK führte jedoch zu einem verringertem *fold change* von *il6* in infizierten HIBCPP-Zellen, während der *fold change* von *il8* nur nach Inhibition von p38 verringert vorgefunden wurde. Die Inhibition von Erk1/2 führte hingegen zu einer signifikanten Erhöhung des *il8 fold changes* bei Infektion der HIBCPP-Zellen mit der *NmB* Kapselmutante. Auch die Infektion mit Enterovirus in unreifen dendritischen Zellen wurde mit einer erhöhten Sekretion von IL6 korreliert, welche wiederum durch Behandlung der Zellen mit dem p38 MAPK Inhibitor SB203580 reduziert werden konnte (Peng *et al.*, 2014).

Für den *NmC* Wildtyp und dessen Kapselmutante konnte keine signifikante Änderung der *fold changes* von *il6* festgestellt werden. Bereits in Untersuchungen von Borkowski *et al.* wurde eine vergleichsweise niedrige Expression von *il6* in HIBCPP-Zellen beobachtet (Borkowski *et al.*, 2014). Auch die niedrigeren Infektionsraten der *NmC* Stämme im Vergleich zu Infektionsraten der *NmB* Stämme in HIBCPP-Zellen, welche bereits beschrieben wurden (Schwerk *et al.*, 2012), könnten für die geringe Induktion der *il6* Expression verantwortlich sein. Die *fold changes* von *il8* wurde von den *NmC* Stämmen in An- und Abwesenheit der Kapsel signifikant induziert. Zudem führte nach Infektion mit *NmC*, wie auch bei der *NmB* Kapselmutante, die Inhibition von Erk1/2 zu einer erhöhten Expression des Botenstoffs in HIBCPP-Zellen.

In Endothelzellen konnte, nach Inhibition von p38 oder Erk1/2 eine Reduktion von IL6 und IL8 während der Infektion mit *L. monocytogenes* ermittelt werden (Schmeck *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu konnte bei Infektion der HIBCPP-Zellen mit *L. monozytogenes* nach Inhibition von Erk1/2 eine stärkere Aktivierung der Expression von *il6* beobachtet werden (Dinner *et al.*, 2017).

### 5.4.2 *H. influenzae*

Die Auswirkung der Infektion der HIBCPP-Zellen in An- und Abwesenheit der MAPK Inhibitoren auf die Expression von *il6* und *il8* wurde auch mit verschiedenen *H. influenzae* Stämmen durchgeführt. Überraschenderweise konnte weder in den unbehandelten, infizierten Zellen noch nach Inhibition der MAPK eine signifikante Induktion der Genexpression festgestellt werden. Die Virulenzfaktoren Kapsel und Fimbrien hatten in diesem experimentellen Ansatz keinen signifikanten Einfluss. Zuvor konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass die Inhibition von Erk1/2 und p38 die Infektion der HIBCPP-Zellen durch *H. influenzae* fast vollständig unterband. Die geringe Anzahl invadierter Erreger könnte für den geringen Effekt auf die Genexpression durch die Infektion der Zellen während der Inhibition der MAPK verantwortlich sein. In Atemwegsepithelzellen konnten nach Inkubation mit *H. influenzae* Endotoxin signifikant höhere Konzentrationen an IL6 und IL8 ermittelt werden, die

wiederum zur chronischen Entzündung der Atemwege beitragen könnten (Khair *et al.*, 1995). Die Inkubation erfolgte hier jedoch für 24 h. Eine weitere Studie konnte eine Induktion von *il8* in peripheren mononukleären Blutzellen nach Infektion mit *H. influenzae* nachweisen und diese mit einer Interaktion des Erregers mit den TLR2 und 4 korrelieren (Mogensen *et al.*, 2006).

### 5.4.3 *S. suis*

Die Detektion von *S. suis* durch Immunzellen führt zu der Expression verschiedener Zytokine, um den Erreger zu eliminieren. Um diesem Prozess zu entgehen, nutzt *S. suis* eine Reihe an Virulenzfaktoren. Dabei dient die Kapsel dazu, der Phagozytose zu entgehen sowie, durch Abschirmung bakterieller Komponenten, die durch Zellen erkannt werden können, der Produktion von Zytokinen entgegenzuwirken (Bleuze *et al.*, 2020). Eine Infektion verschiedener Zelltypen durch *S. suis* wurde mit der Interaktion mit den TLR assoziiert. Diese Interaktion führt zu der Rekrutierung des Adaptermoleküls MyD88, welches intrazelluläre Signalwege wie die MAPK aktivieren kann. Daraus resultiert die Zytokinproduktion der von *S. suis* stimulierten Zellen (Bleuze *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2018; Bi *et al.*, 2015; de Greeff *et al.*, 2010; Dominguez-Punaro Mde *et al.*, 2010). Als Zell-aktivierende Komponenten, die eine Rolle während der Produktion der Zytokine spielen, wurden zudem die Lipoproteine und der Zellwandbestandteil LTA beschrieben (Wichgers Schreur *et al.*, 2010; Fittipaldi *et al.*, 2008).

Hohe Konzentration von Zytokinen, unter anderem auch IL6, wurden in porcinen, murinen und humanen Zellen nach Infektion mit dem Erreger festgestellt (Segura *et al.*, 2004; Segura *et al.*, 2002b; Segura *et al.*, 2002a; Segura *et al.*, 1999). Des Weiteren wurde für die Kapselmutante von *S. suis* eine höhere Expression von Zytokinen in Wirtszellen beschrieben (Vadeboncoeur *et al.*, 2003; Segura *et al.*, 1999). In dieser Dissertation konnte nach 6 h Infektion mit dem *S. suis* Wildtyp und dessen Kapselmutante eine signifikante Induktion der *il6* Expression nach Inhibition von Erk1/2 und p38 verzeichnet werden. Zudem stieg auch die Expression von *il8* nach Infektion mit beiden *S. suis* Stämmen signifikant an. Die Inhibition der MAPK Signalwege in den HIBCPP-Zellen resultierte nach Infektion mit den *S. suis* Stämmen in einer signifikanten Erhöhung der Genexpression im Vergleich zu den Kontrollkonditionen. Auch bei Infektion humaner peripherer mononuklearer Blut-Zellen mit dem Gram-positiven Organismus *Alloiococcus otitidis* konnte eine Induktion der *il8* Genexpression beobachtet werden, die durch die Inhibition von Erk1/2 und p38 allerdings signifikant vermindert wurde (Harimaya *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit hatte die Inhibition der MAPK jedoch nur vergleichsweise niedrige *fold changes* der Botenstoffe *il6* und *il8* im Vergleich zu unbehandelten, infizierten Zellen zur Folge.

## 5.5 *N. meningitidis* induzieren die Expression verschiedener Gene während einer Infektion der HIBCPP-Zellen in Abhängigkeit von Serogruppe, Kapselexpression und Aktivierung der MAPK Erk1/2

Die Reaktion des CP auf bakterielle Erreger ist weitestgehend unerforscht. Die Freisetzung einer Vielzahl an Zytokinen während einer Infektion durch die schützenden Barrieren des ZNS ist von besonderer Bedeutung, da der Liquor eine immunologisch privilegierte Lage innehält. Zudem ist die Erkennung und Eliminierung pathogener Erreger ein wichtiger Schritt zum Schutz des Wirts und kann in der Freisetzung weiterer Signalmoleküle enden (Koedel 2009; Pron *et al.*, 1997). Hierbei spielt die Inflammationsreaktion die Rolle eines unspezifischen Mechanismus in der frühen Reaktion auf eine Infektion, um die Verbreitung des Erregers zu verhindern und Immunzellen zu aktivieren (Klemm *et al.*, 2017).

Die Änderung der Genexpression der HIBCPP-Zellen wurde in Borkowski *et al.* nach 4-stündiger Infektion mit *N. meningitidis* Erregern der Serogruppe B sowie dem Trägerisolat  $\alpha 14$  untersucht, wobei die Zellen basolateral infiziert wurden (Borkowski *et al.*, 2014). Sowohl in der Studie von Borkowski *et al.* als auch in dieser Studie wurden Kapselmutanten der *N. meningitidis* Stämme eingesetzt, um den Einfluss der Kapsel auf die Interaktion mit den HIBCPP-Zellen zu untersuchen. Die Expression der Kapsel schützt pathogene Erreger, indem sie deren Erkennung im Wirt verhindert und somit vor dem Angriff des Komplementsystems und der Phagozytose schützt. Des Weiteren ermöglicht sie das Überleben im Blut und in phagozytischen und nicht-phagozytischen Zellen (Cress *et al.*, 2014; Spinosa *et al.*, 2007; Nikulin *et al.*, 2006). Eine Studie des Glycointeraktoms des *N. meningitidis* Stamms MC58 und dessen Kapselmutante wies durch die Deletion der Kapsel sowohl den Verlust von Kohlenhydrat Bindungen aber auch einen Zugewinn anderer Bindungen im Vergleich zu dem Wildtyp auf. Dies ist von besonderer Bedeutung, da Kohlenhydratstrukturen des Bakteriums und des Wirts während der Pathogenese des Erregers von Bedeutung sind (Mubaiwa *et al.*, 2017). Hierbei ist der Zugewinn an Bindungen nach Verlust der Kapsel nicht überraschend, da diese eine unterdrückende Funktion auf die Interaktionen von Wirt und Bakterium auf Grund der dichten polyanionischen Polysaccharidschicht mit hohem Molekulargewicht aufweist (Virji 2009; Corbett *et al.*, 2004).

Um das Expressionsprofil der HIBCPP-Zellen nach Infektion mit *N. meningitidis* weiter zu untersuchen, wurde eine MACE-Analyse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden HIBCPP-Zellen für 6 h mit dem NmB Wildtyp Stamm sowie dessen Kapselmutante infiziert. Des Weiteren wurde der Einfluss der MAPK Erk1/2 während der Infektion mit den NmB Stämmen

untersucht. Dabei wurde analysiert, welche Gene durch Infektion mit den *NmB* Stämmen induziert werden, wenn die Erk1/2 Signaltransduktion inhibiert ist, da die Inhibition von Erk1/2 die Invasion von bekapselten und unbekapselten *Nm* unterschiedlich beeinflusst (vgl. 5.3.1). Von besonderem Interesse sind auch die Unterschiede der Ergebnisse zwischen der publizierten Mikroarray Analyse der mit *N. meningitidis* infizierten HIBCPP-Zellen (Borkowski *et al.*, 2014) und der hier angewandten MACE-Analyse.

Bei einer bakteriellen Meningitis können verschiedene, meist pro-inflammatorische, Zytokine im CSF nachgewiesen werden. So sind unter anderem TNF $\alpha$  und IL1, auf Grund ihrer zentralen Rolle in der angeborenen Immunantwort, im CFS detektierbar (Tauber *et al.*, 1999). Zudem wird IL6 häufig nach Infektionen mit Gram-negativen Bakterien im CSF nachgewiesen. Zusammen mit TNF $\alpha$  und IL1 ist IL6 an der Akute-Phase-Reaktion beteiligt (Tauber *et al.*, 1999). Die mit *NmB* und *NmC* infizierten HIBCPP-Zellen wiesen eine sehr hohe Induktion von *il1 $\beta$*  auf. Auch konnte in allen Konditionen eine signifikant erhöhte Expression von *tnfa* nachgewiesen werden. Da die Listen der DEG nach den in 3.3.5 beschriebenen Kriterien gefiltert wurden, konnte eine signifikante *il6*-Regulierung nur durch Infektion mit MC58siaD nachgewiesen werden (Tabelle 16). Jedoch zeigten die ungefilterten Datensätze eine erhöhte Menge an Genprodukt in allen Konditionen. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den zuvor ermittelten Mikroarray Daten in der Studie von Borkowski *et al.*, (Borkowski *et al.*, 2014) da in der vorliegenden Studie nach 6-stündiger Infektion der HIBCPP-Zellen eine wesentlich höhere Induktion der Genexpression ermittelt wurde als in den zuvor beschriebenen Daten. Dem könnte sowohl die längere Infektion der HIBCPP-Zellen mit den Neisserien zu Grunde liegen, als auch technische Unterschiede zwischen der Mikroarray Analyse und der MACE-Analyse.

Weitere Zytokine, die bei einer Meningitis in erhöhten Maßen im CSF detektiert wurden, sind CSF2 (GM-CSF), CCL2 (MCP-1), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) (Hackett *et al.*, 2001; Tauber *et al.*, 1999; Sprenger *et al.*, 1996). *csf2* wurde nach Infektion mit den *NmB* Stämmen signifikant erhöht vorgefunden, wurde aber, wenn der Erk1/2 Signalweg inhibiert war, nur durch die Kapselmutante hochreguliert. *cc/2* wurde in allen untersuchten Konditionen, signifikant erhöht festgestellt. Eine Induktion von *cc/4* durch die Bakterien konnte im Vergleich zu den Kontrollbedingungen nicht festgestellt werden. In der Mikroarray-Analyse wurden diese Gene nur in sehr geringen Mengen detektiert, was wiederum auf die Sensitivität der MACE Analyse hindeuten könnte. In Meningiomazellen konnten nach Infektion mit Neisserien hingegen relativ hohe Konzentrationen an CCL2 und IL6 detektiert werden. Andere Zytokine, wie TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4, CSF2, CSF3 (G-CSF) und CSF1 (M-CSF), wurden jedoch auch in diesen Zellen nur in geringen Konzentrationen festgestellt (Fowler *et al.*, 2006). Ebenfalls wurden anti-inflammatorische Zytokine im CSF von Meningitispatienten nachgewiesen. Zu

ihnen zählen IL10, TGF $\beta$  oder auch die IL1-Rezeptorantagonisten IL1Rs und IL1R2 (Tauber *et al.*, 1999). Diese wurden jedoch in der vorliegenden MACE Analyse nicht detektiert.

Die Expression von Chemokinen, chemotaktisch wirkenden Zytokinen, wird durch NF- $\kappa$ B reguliert und somit im Verlauf einer Infektion induziert (Kawai *et al.*, 2007; Zwijnenburg *et al.*, 2006). Die Sekretion der CXC Chemokine CXCL1-3 wurde im PC von Ratten ins Blut (apikal) und in das CSF (basolateral) nachgewiesen (Szmydynger-Chodobska *et al.*, 2009). Diese Chemokine agieren als außerzelluläre chemische Lockstoffe für Neutrophile (Kobayashi 2008), deren Synthese in Epithelzellen durch den Kontakt mit den pro-inflammatorischen Zytokinen IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$  induziert wird (Handa *et al.*, 2004; Takaishi *et al.*, 2000). Sowohl diese beiden pro-inflammatorischen Zytokine als auch die Chemokine *cxcl1-3* wurden in der vorliegenden MACE Analyse in allen Konditionen hochreguliert vorgefunden. Auch bei Meningitispatienten konnten erhöhte Konzentrationen der Chemokine CXCL1-3, sowie IL8 (CXCL8) festgestellt werden (Stephens *et al.*, 1982). Während IL8 in gesunden Individuen kaum im CSF detektierbar ist, wurde eine signifikante Erhöhung des Chemokins in diversen Studien im CSF von Patienten mit bakterieller Meningitis nachgewiesen (Zwijnenburg *et al.*, 2006). In einem humanen Vollblutmodell wurde zudem nach Inkubation mit OMV von *NmB* die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 und IL8 detektiert. Auch in dieser Studie konnte in allen untersuchten Konditionen eine Induktion der Expression von *il8* festgestellt werden (Mirlashari *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde im PC, im Vergleich zu anderen Regionen des Gehirns, eine verstärkte Expression des Chemokins *ccl20* nachgewiesen (Reboldi *et al.*, 2009). Hierbei fungiert es als Chemokin für Lymphozyten. Nach Infektion der HIBCPP-Zellen mit den *N. meningitidis* Stämmen zählt *ccl20* zu den am höchsten induzierten Genen. Auch bei Erk1/2 Inhibition konnten die *N. meningitidis* Stämme *ccl20* stark induzieren. In HBMEC wurde, nach Infektion mit *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), eine vermehrte Produktion von CCL20 beobachtet. Auch Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis wiesen eine erhöhte Konzentration des Chemokins auf (van Sorge *et al.*, 2011; Kastenbauer *et al.*, 2005).

Die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle kann die Invasion von Leukozyten und eine einhergehende Inflammation fördern. Die meisten Studien beschäftigen sich mit dem Einwandern von Immunzellen in das Gehirn während einer Meningitis an der BHS. Jedoch wurde auch für PC-Epithelzellen die Expression von *icam1* und *vcam1* beschrieben (Wolburg *et al.*, 1999). Zudem konnten bei verschiedenen Entzündungen des ZNS sowie der Stimulation durch pro-inflammatorische Zytokine oder einer intraventrikulären LPS-Injektion eine erhöhte Expression dieser Adhäsionsmoleküle beobachtet werden (Engelhardt *et al.*, 2001). In der vorliegenden Studie sowie in der vorhergehenden Microarray-Analyse der HIBCPP-Zellen (Borkowski *et al.*, 2014) konnte keine signifikante Expression von *vcam1* nach Infektion mit *N.*

*meningitidis* festgestellt werden. Dies steht im Kontrast zu porzinen PC-Epithelzellen in welchen eine verstärkte Expression detektiert wurde (Schwerk *et al.*, 2011; Wewer *et al.*, 2011). *icam1* wurde hingegen in dieser Arbeit signifikant erhöht in infizierten HIBCPP-Zellen exprimiert vorgefunden. Dies deckt sich mit diversen Studien, bei welchen eine erhöhte Expression von *icam1* nach Infektion auch in HBMECs und primären porzinen PC-Epithelzellen festgestellt wurde (Schwerk *et al.*, 2011; Wewer *et al.*, 2011; Lakkitjaroen *et al.*, 2011; Doran *et al.*, 2003).

Ein weiteres Protein, welchem eine pro-inflammatorische Wirkung zugeordnet wird, und welches zuvor in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit der *NmB* Kapselmutante unter den am stärksten induzierten Genen vorgefunden wurde (Borkowski *et al.*, 2014), ist der Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (PLAU). Dieses Protein, welches zu dem PLAU-Rezeptor (PLAUR) System gehört, ist an der Meningitispathogenese beteiligt und wurde im CSF von Patienten mit bakterieller Meningitis nachgewiesen (Winkler *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Induktion des *plau* Gens im Vergleich zur Kontrolle nur nach Inhibition des Erk1/2 Signalwegs nach Infektion mit MC58siaD<sup>-</sup> detektiert werden. Dass eine Induktion von *plau* in den anderen Konditionen nicht festgestellt werden konnte, könnte an den strengen Kriterien liegen, die zu der Erstellung der DEG-Listen angewandt wurden, um signifikante Änderungen der Genexpression zu finden.

Ein weiteres Gen, welches in allen Konditionen eine erhöhte Expression nach Infektion der HIBCPP-Zellen aufwies, ist *tcim* (TC1, C8orf4). Assoziiert wird TCIM oftmals mit einem letalen Verlauf von Krebserkrankungen, da es in der Regulation des Wnt/ $\beta$ -catenin Signalwegs involviert ist (Kim *et al.*, 2009). Des Weiteren wird die Expression von *tcim* durch die pro-inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  hochreguliert (Kim *et al.*, 2006). Es wurde zudem eine Hochregulierung der Adhäsionsmoleküle *icam1* und *vcam1* durch TCIM beschrieben (Kim *et al.*, 2009). In Endothelzellen wurde TCIM eine regulatorische Rolle während der Inflammation zugeschrieben, da es durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B reguliert wird, jedoch auch selbst die Expression von NF- $\kappa$ B positiv regulieren kann (Kim *et al.*, 2009). Ebenfalls in allen Konditionen nach Infektion mit *N. meningitidis* hochreguliert war das Gen für *rnd1*. Für RND1 wurde eine Rolle während der Adhäsion von *N. meningitidis* an Zellen sowie der Modulierung des Aktin-Zytoskeletts nachgewiesen. Darüber hinaus wurde RND1 eine Rolle während viraler Infektionen gezeigt werden, unter anderem mit dem Nipah-Virus, welches auch das ZNS befallen kann (Glennon *et al.*, 2015; Nobes *et al.*, 1998). Die Induktion der Expression von *tcim* und *rnd1* nach Infektion von HIBCPP-Zellen mit *NmB* wurde auch in früheren Experimenten festgestellt (Borkowski *et al.*, 2014).

Adrenomedullin (ADM) trägt zum Erhalt der Gefäßintegrität und Stabilisierung der BHS bei, möglicherweise durch eine regulatorische Wirkung auf die Expression von Claudin 5 (Cheyuo *et al.*, 2012). In HBMEC und HIBCPP-Zellen konnte nach einer Infektion mit *N. meningitidis*, Inkubation mit LPS oder TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  und IL1 $\beta$  eine gesteigerte Expression von *adm* festgestellt werden, sowie auch in Plexuskarzinomzellen (Borkowski *et al.*, 2014; van Sorge *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit ist nur nach Inhibition des Erk1/2 Signalwegs während der Infektion mit beiden *NmB* Stämmen eine signifikante Induktion der Expression von *adm* zu verzeichnen. ADM ist von besonderem Interesse, da es eine antimikrobielle Wirkung gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien aufweist (Souza-Moreira *et al.*, 2011; Temmesfeld-Wollbruck *et al.*, 2007) und dessen Freisetzung vermutlich die pathogenen Erreger bekämpft. Zudem wurde *in vivo* beobachtet, dass ADM den Komplementfaktor H binden kann, einen Negativregulator der Komplementkaskade. Durch die daraus resultierende Inhibition der Komplementaktivierung wird das Gehirn vor Schädigung geschützt (Cheyuo *et al.*, 2012). Eine Freisetzung von ADM wurde nach Induktion durch pro-inflammatorische Zytokine oder LPS beschrieben (Temmesfeld-Wollbruck *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 1997). Das freigesetzte ADM kann G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren, welche über cAMP/PKA-Signalwege wirken. Dies resultiert in einer Reduktion der Bildung pro-inflammatorische Zytokine, sowie einer gesteigerten Expression anti-inflammatorischer Zytokine und einer verminderten Aktivierung von Immunzellen (Souza-Moreira *et al.*, 2011). Insgesamt deutet dies auf eine anti-inflammatorische Wirkung von ADM hin.

Während der MACE Analyse wurden verschiedenen Gene identifiziert, die nach Infektion mit *NmB* spezifisch nur bei Abwesenheit beziehungsweise Anwesenheit von U0126 signifikant reguliert waren. Bei Erk1/2 Inhibition wurden nach Infektion mit dem Wildtyp Stamm neun Gene spezifisch reguliert. Von diesen wurden sieben Gene auch nach Infektion mit der Kapselmutante spezifisch bei Erk1/2 Inhibition gefunden. Interessanterweise wurden durch die Mutante noch 14 weitere Gene spezifisch reguliert, unter anderem *plau*, *nos2* und *tnfrsf11b*. Weitere Studien werden benötigt, um zu analysieren, ob diese Gene eine Rolle bei der erhöhten Infektion von HIBCPP-Zellen durch die unbekapselte Mutante spielen.

Die Analyse der GO der DEG Listen wies auf eine antimikrobielle Reaktion der Zellen einschließlich einer Immunantwort als Antwort auf die Infektion mit *N. meningitidis* hin. Dies bestätigt Daten, die bereits in früheren Analysen nach Infektion von CP-Epithelzellen mit bakteriellen Erregern erhalten wurden (Borkowski *et al.*, 2014; Schwerk *et al.*, 2011). Weiterhin konnte eine negative Regulation der Apoptose sowie eine Zellantwort auf TNF in allen untersuchten Konditionen festgestellt werden. Für invasive ST-11 Isolate von *N. meningitidis* wurde in Epithelzellen eine Induktion der Apoptose, ein von der TNF- $\alpha$  Signalkaskade durch



den Rezeptor TNFR1 abhängiger Prozess, nachgewiesen (Deghmane *et al.*, 2009). Für nicht-invasive Trägerisolate wurde im Gegensatz eine Apoptose-vermindernde Wirkung festgestellt, welche durch die Freisetzung des Rezeptors in gelöster Form (sTNFR1) und den daraus resultierenden Komplex mit dem Ligand TNF- $\alpha$  vermittelt wird (Deghmane *et al.*, 2009). Der Apoptose-induzierende Effekt der invasiven Isolate wurde durch eine TLR4 abhängige Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs beschrieben (Deghmane *et al.*, 2011). Allerdings konnte in HIBCPP-Zellen nur eine geringe Expression des TLR4 Gens nachgewiesen werden (Borkowski *et al.*, 2014).

Die Wirkung des Erk1/2 Inhibitors während der Infektionsexperimente wurde nach Infektion von U0126 behandelten HIBCPP-Zellen durch die Nichtidentifizierung von GO Termini, die auf die Manipulation der MAPK Signalwege hindeuten, bestätigt. Ebenfalls wurden nach Inhibition von Erk1/2 die GO-Termini „*signal transduction by protein phosphorylation*“ und „*JAK-STAT cascade*“ nicht mehr gefunden. Die Rolle von JAK-STAT Signalübertragung während der Infektion von HIBCPP-Zellen mit *NmB* muss allerdings noch weiter untersucht werden.

Interessanterweise waren nach Erk1/2 Inhibition und Infektion mit den *NmB* Stämmen GO-Termini, die auf eine Involvierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs, eine Funktion von IL6 und eine Rolle des Tumornekrosefaktors hindeuten, im Vergleich zu den nicht-behandelten Zellen unterrepräsentiert. Es bleibt zu ermitteln, welche Rolle diese zellulären Funktionen bei der Regulierung der Infektion von HIBCPP-Zellen durch MAPK Signalwege spielen. Diese Unterrepräsentation von GO-Termini war nach Infektion mit dem Wildtyp ausgeprägter, was den unterschiedlichen Einfluss von U0126 auf die Infektion von HIBCPP-Zellen durch den Wildtyp und die unkapselte Mutante erklären könnte. Unter anderem wurden die GO-Termini „*regulation of NIK/NF $\kappa$ B signalling*“ und „*interleukin-6 production*“ bei Erk1/2 Inhibition nur nach Infektion mit der Kapselmutante, nicht jedoch mit dem Wildtyp Stamm, ermittelt. Eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B in HIBCPP-Zellen und eine durch NF- $\kappa$ B induzierte Expression von Entzündungsreaktionsgenen, unter anderem auch *il6*, nach Infektion mit *N. meningitidis*, wurde bereits gezeigt (Borkowski *et al.*, 2014). Weiterhin wurden die GO-Termini „*regulation of tumor necrosis factor production*“ und „*regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production*“ bei Erk1/2 Inhibition nur nach Infektion mit der Kapselmutante identifiziert. Die Funktion dieser Prozesse bei der Infektion durch *NmB* erfordert weitere Untersuchungen.

## 5.6 Einfluss der Infektion mit *N. meningitidis* auf das Phosphoproteom der HIBCPP-Zellen

Die Proteinphosphorylierung, die als reversibler „*molecular switch*“ fungiert, bietet einen Mechanismus zur Steuerung der Proteinfunktion während fast aller zellulären Prozesse und ist für die schnelle Reaktion von Zellen auf interne und externe Stimuli von wesentlicher Bedeutung. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Phosphoproteom der HIBCPP-Zellen in uniniziertem Zustand und nach vierstündiger Infektion mit dem *NmB* Wildtyp Stamm und dessen Kapselmutante untersucht.

Durch *Enrichment* Analysen der Phosphoproteomik Daten wurden potentielle, während der Infektion der HIBCPP-Zellen durch *N. meningitidis* regulierte, Signalwege identifiziert. Bei Infektion mit dem *NmB* Wildtyp Stamm sowie dessen Kapselmutante wurden den hierbei identifizierten Phosphorylierungen in der *Enrichment* Analyse der Signalwege einer Regulation der mRNA Stabilität durch Proteine, die Adenin und Uridin-*rich-elements* (ARE) binden, zugeordnet. Diesen ARE wird eine wichtige Funktion in der Kontrolle der mRNA Stabilität zugewiesen. Änderungen von mRNA Transkription und Stabilität sind für die Immunantwort der Zellen sowie der Stressreaktion von großer Bedeutung. Eine Deregulation dieser Mechanismen und die daraus resultierende Veränderung des Transkriptom der Wirtszelle kann von Erregern zu deren Vorteil genutzt werden (Gingerich *et al.*, 2004).

Ein weiterer Signalweg, der durch die *Enrichment* Analyse identifiziert wurde, ist die Aktivierung der AP-1 Transkriptionsfaktoren. Die Aktivität von AP-1 wird durch eine Vielzahl zellulärer Stimuli reguliert, zu denen Wachstumsfaktoren, bakterielle und virale Infektionen, Zytokine, UV-Strahlung und zellulärer Stress zählen. Die externen Stimuli, wie Wachstumsfaktoren oder Zytokine und ein komplexes Netzwerk von MAPK, führen hierbei zu der Aktivierung von AP-1. Die aktivierten AP-1 Transkriptionsfaktoren können wiederum Einfluss auf eine Vielzahl von zellulären Prozessen, einschließlich Entzündung, Proliferation, Differenzierung und Apoptose, nehmen (Gazon *et al.*, 2017). Die Infektion von Magenepithelzellen durch das Gram-negative Bakterium *Helicobacter pylori* resultierte in einer Aktivierung der MAPK JNK, Erk1/2 und p38, welche die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B induzierten, die zu einer erhöhten Expression des Chemokins IL8 führten (Seo *et al.*, 2004). Somit kann die Manipulation der MAPK Signalwege durch Erreger einen Einfluss auf die Aktivierung von AP-1 und auf die durch den Transkriptionsfaktor regulierten Prozesse in den Wirtszellen haben.

Der Terminus „*Diseases of signal transduction by growth factor receptors and second messengers*“ beschreibt wiederum eine allgemeine Dysregulation der Signalwege, die durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren induziert werden. Eine solche Dysregulation kann diverse Krankheiten wie Krebs zur Folge haben. Beispielsweise ist die Interaktion mit dem EGFR, einem zentralen Wachstumsfaktor-Rezeptor, zur Infektion von Wirtszellen, für einer Reihe an Gram-positiven und Gram-negativen Erregern beschrieben, zu denen auch *N. meningitidis* und *H. influenzae* zählen (Fu *et al.*, 2018). Die *Enrichment* Analyse deutet somit auf eine Rolle von Wachstumsfaktor-Rezeptoren während der Infektion der HIBCPP-Zellen hin.

Ein weiterer Terminus, der auf eine Regulation der Signalwege nach Infektion der HIBCPP-Zellen mit beiden *NmB* Stämmen hinweist, beschreibt die Signaltransduktion durch den Fc Epsilon Rezeptor. In Mastzellen wurde ein negativer Einfluss auf die Expression dieses Rezeptors nach Zugabe von LTA durch Interaktion mit dem TLR2 beschrieben (Yoshioka *et al.*, 2007). Der Fc Epsilon Rezeptor kann über Aktivierung von NF- $\kappa$ B die Produktion proinflammatorischer Zytokine induzieren und spielt somit eine signifikante Rolle in dem inflammatorischen Geschehen während einer Infektion des Wirts (Klemm *et al.*, 2006). Interessanter Weise ist der Rezeptor nach den Daten der hier durchgeführten MACE Analyse jedoch in HIBCPP-Zellen nicht exprimiert. Dies unterstreicht, dass die Daten der *Enrichment* Analysen nur Hinweise auf mögliche zelluläre Abläufe geben können.

Weiterhin wurde potentiell die TLR3 Signalkaskade während der Infektion der HIBCPP-Zellen durch beide *NmB* Stämme beeinflusst. TLR3 ist ein Rezeptor für doppelsträngige RNA, der die Transkription des Interferons (IFN)- $\beta$  aktiviert. TLR3, TLR7 und TLR9 erkennen zudem bakterielle oder virale Nukleinsäuren in Endosomen nach deren Phagozytose (Kawashima *et al.*, 2013). Studien mit humanen Fibroblasten und Epithelzellen zeigen, dass TLR3 sowohl intrazellulär als auch auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Matsumoto *et al.*, 2002). In murinen Ovidukt-Epithelzellen wurde eine zentrale Funktion des TLR3 und der TLR3-induzierten IFN- $\beta$  Expression bei der Immunantwort während einer Chlamydien-Infektion beschrieben (Derbigny *et al.*, 2012).

Auch die Phosphatase- und Tensin-Homolog (PTEN) Regulation wurde in der *Enrichment* Analyse nach Infektion der HIBCPP-Zellen, jedoch nur mit der Kapselmutante, identifiziert. PTEN ist eine Lipidphosphatase, die den Phosphatidylinositid-3-Kinase (PI3K) Signalweg negativ reguliert sowie ein bekannter Tumorsuppressor, der häufig bei einer Vielzahl von Krebsarten beim Menschen, einschließlich Melanomen, inaktiviert wird (Dong *et al.*, 2014). In Makrophagen wurde die Rolle der mikro RNA miR-718 in LPS-aktivierten Zellen mit der Intensität der Immunantwort durch Regulation von PTEN beschrieben (Kalantari *et al.*, 2017). Hierbei wurde eine Funktion der mikro RNA vorgeschlagen, die auf den TLR4 Signalweg und

die Freisetzung inflammatorischer Zytokine während einer bakteriellen Infektion durch einen negativen Feedback-Mechanismus Einfluss nimmt, der die Herunterregulierung des TLR4, der IL1 Rezeptor-assoziierten Kinase 1 (IRAK1) und von NF- $\kappa$ B beinhaltet (Kalantari *et al.*, 2017).

Die *Enrichment* Analyse der zellulären Komponenten weist wiederum auf einen Einfluss der Bakterien auf die Integrität der Zell-Zell Kontakte hin. Eine Disruption der Zellkontakte durch *N. meningitidis* wurde schon für die Infektion der BLS beschrieben und deutet darauf hin, dass die Erreger während der Infektion eine parazelluläre Überwindung der Barriere zwischen den Zellen nutzen (Schubert-Unkmeir *et al.*, 2010). In HIBCPP-Zellen könnte eine solche Manipulation der Zell-Zell Kontakte zu einer reduzierten Barrierefunktion führen und damit zu einer erleichterten Infektion des ZNS.

Die *Enrichment* Analyse der molekularen Funktion wies durch Wildtyp und Kapselmutante regulierte Termini, sowie weitere, nur durch die Kapselmutante regulierte, Termini auf. Bei beiden Stämmen ergab die Analyse einen potentiellen Einfluss auf die Bindung von Cadherin. Die Überwindung von Schutzbarrieren des Wirts durch die Zerstörung der Bestandteile der *adherens junctions* der Epithelzellen dieser Barrieren, zu denen auch Cadherin gehört, wurde bereits beschrieben (Devaux *et al.*, 2019). Auch weitere Termini der *Enrichment* Analyse wie „*cell adhesion mediator activity*“ und „*cadherin binding*“ deuten auf einen Einfluss der Infektion auf die Zell-Zell-Bindungen hin, welche die Erreger an der parazellulären Überwindung der Barriere hindern. Andere Termini deuten wiederum auf eine Manipulation verschiedener Transkriptionsfaktoren hin. Es wurde bereits in diversen Studien beschrieben, dass eine Sekretion verschiedener Effektoren es Bakterien ermöglicht, nicht nur in die Wirtszelle einzudringen, sondern auch deren Genexpression zu manipulieren, um die Immunantwort des Wirts zu umgehen (Denzer *et al.*, 2020). Weiterhin wurde gezeigt, dass Erreger die Genexpression auch auf der Ebene der mRNA-Stabilität, entweder durch Störung der mRNA-Stabilisierung oder des mRNA-Abbaus, sowie der Translation oder der Proteininstabilität beeinflussen, einschließlich der Mechanismen der Proteinaktivierung und des Proteinabbaus (Denzer *et al.*, 2020).

Auch die *Enrichment* Analyse der biologischen Funktion nach Infektion der HIBCPP-Zellen mit beiden *NmB* Stämmen weist auf eine Manipulation der Genexpression hin. Des Weiteren deutet die Analyse der Regulationen durch die Kapselmutante zusätzlich auf eine Manipulation des Zytoskeletts sowie einer Rekrutierung von Proteinen zur Plasmamembran während der Infektion hin. Beides wurde bereits für die Infektion der Neisserien in Zellen der BBB beschrieben (Maissa *et al.*, 2017; Doran *et al.*, 2016; Slanina *et al.*, 2012; Slanina *et al.*, 2010).

Die Analyse der Anreicherung der Kinasen hebt hervor, dass die MAPK Signalwege eine zentrale Rolle während der Infektion der HIBCPP-Zellen spielen. In der vorliegenden Arbeit und in vorhergehenden Studien wurde eine zentrale Rolle der MAPK bei der Infektion durch *N. meningitidis* sowie anderen Erregern beschrieben (Dinner *et al.*, 2017; Sokolova *et al.*, 2004). Interessanterweise wurden weder Erk1/2 noch p38 als angereicherte Kinasen in der *Enrichment* Analyse des Phosphoproteoms aufgeführt. Dies deutet auf eine wichtige Rolle weiterer Komponenten dieser Signalkaskaden bei der Infektion mit *N. meningitidis* hin. Jedoch ist die *downstream* von p38 aktivierte Kinase MAPKAPK2 angereichert detektiert worden. Nach Inhibition von Erk1/2 und/oder p38 kann somit eine zusätzliche Untersuchung angereichert gefundener Kinasen, wie Erk7 und JNK2, weitere Aufschlüsse zu den Infektionsmechanismen von *N. meningitidis* an HIBCPP-Zellen geben sowie den Einfluss der MAPK Signalwege während der Infektion genauer entschlüsseln.

Insgesamt konnten nach Infektion der HIBCPP-Zellen mit der *NmB* Kapselmutante, im Vergleich zum Wildtyp, den einzelnen Termini der *Enrichment* Analysen mehr regulierte Phosphorylierungen und insgesamt mehr Regulationen der Termini der verschiedenen Kategorien zugeordnet werden. Auch die Anzahl signifikant regulierter Phosphorylierungen ist nach Infektion mit der *NmB* Kapselmutante höher als nach Infektion der Zellen mit dem Wildtyp Stamm. Dies unterstreicht die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede der Infektion der HIBCPP-Zellen mit *N. meningitidis* in An- und Abwesenheit der Kapsel und bietet die Möglichkeit den Einfluss weiterer Signalwege auf die Infektion der Erreger weiter zu untersuchen.

## 6 Fazit und Ausblick

Die Meningitis ist noch immer eine lebensbedrohliche Erkrankung, die durch verschiedene pathogene Erreger hervorgerufen werden kann. Zu diesen gehören diverse Gram-positive und Gram-negative Bakterienstämme. Für eine Vielzahl von bakteriellen Erregern wurde neben der BHS auch der PC als Eintrittspforte in das ZNS beschrieben (Herold *et al.*, 2019). Zu diesen gehören die Gram-negativen *N. meningitidis* Stämme der Serogruppen B und C (Borkowski *et al.*, 2014; Schwerk *et al.*, 2012) sowie *Hib* (Häuser *et al.*, 2018) und der zoonotische, Gram-positive Erreger *S. suis* (Schwerk *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurde ein Vergleich verschiedener zellulärer Mechanismen durchgeführt und untersucht, wie diese durch die Gram-positiven und Gram-negativen Erreger zur Infektion der HIBCPP-Zellen ausgenutzt werden. Dabei konnten unterschiedliche Effekte der verschiedenen Erreger auf die Infektion der Zellen durch Blockierung der Dynamin-abhängigen Endozytose und der Erk1/2 und p38 MAPK Signalwege ermittelt werden, sowie durch An- und Abwesenheit der bakteriellen Kapsel. Während die Infektion der HIBCPP-Zellen durch den Gram-positiven Erreger *S. suis* maßgeblich in Abhängigkeit der Dynamin-vermittelten Endozytose sowie der Erk1/2 und p38 Signalwege stattfindet, konnten für beide Gram-negativen Erreger abweichende Infektionsmechanismen beobachtet werden. Für das Gram-negative Bakterium *H. influenzae* konnte eine Dynamin-unabhängige Endozytose in HIBCPP-Zellen beobachtet werden, jedoch wurde auch, wie bei *S. suis* zu beobachten war, eine starke Abhängigkeit von den beiden MAPK Signalwegen während der Infektion festgestellt. Die beiden *N. meningitidis* Stämme der Serogruppen B und C weisen wiederum unterschiedliche Infektionsmechanismen in Abhängigkeit der Kapselexpression, sowohl in Bezug auf die Dynamin-vermittelte Endozytose, wie auch der MAPK Signalwege, auf. Aus diesem Grund wurde die Infektion der HIBCPP-Zellen durch Analysen des Transkriptoms und Phosphoproteoms nach Infektion mit dem *NmB* Wildtyp Stamm und der Kapselmutante weiter untersucht. Die Transkriptomanalyse verifizierte die zuvor beschriebene Entzündungsantwort der HIBCPP-Zellen während der Infektion mit beiden *NmB* Stämmen. Die Phosphoproteomanalyse deutet wiederum auf diverse, durch die *N. meningitidis* Stämme genutzte Signalwege und zellulären Mechanismen hin, die weiter untersucht werden müssen. Die Daten, die in beiden Analysen ermittelt wurden, unterstreichen zum einen die Rolle der Kapselexpression während der Infektion und bieten zum anderen einen Ansatzpunkt für weitere funktionale Analysen der Neisserieninfektion an der BLS. Aus diesem Grund sollte zukünftig ein Fokus darauf gelegt werden, diese Signalwege, insbesondere die Rolle der MAPK, während der Infektion weiter zu erforschen, um dadurch die Mechanismen, mit welchen die Neisserien die BLS überwinden können, im Detail besser zu verstehen.

## 7 Verzeichnisse

### 7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nachweise für die Interaktion verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien mit der BHS und der BLS .....	28
Tabelle 2: Auflistung der OD der Inokuli, die jeweils im Infektionsexperiment einer MOI 10 entsprachen. ....	43
Tabelle 3: PCR-Ansatz zur Verifizierung der Bakterienstämme. ....	44
Tabelle 4: Programm zur Durchführung der PCR. ....	45
Tabelle 5: Ansatz für eine cDNA Reaktion. ....	54
Tabelle 6: Programm zur Durchführung einer cDNA Reaktion. ....	54
Tabelle 7: Ansatz für eine qRT-PCR Reaktion. ....	55
Tabelle 8: Programm für die qRT-PCR. ....	55
Tabelle 9: Zusammenfassung des Effekts der Inhibition der GTPase Dynamamin auf die Infektionsraten der Erreger in HIBCPP-Zellen. ....	73
Tabelle 10: Zusammenfassung des Effekts der Inhibition der MAPK Erk1/2 und p38 auf die Infektionsraten der Erreger in HIBCPP-Zellen. ....	85
Tabelle 11: Quantitative PCR zur Validierung der MACE Daten. ....	99
Tabelle 12: Vergleich der DEG des <i>NmB</i> Wildtyp Stamms und dessen Kapselmutante. ....	102
Tabelle 13: Zusammenfassung der durch Infektion der HIBCPP-Zellen mit MC58 regulierten DEG in An- und Abwesenheit des Erk1/2 Inhibitors U0126. ....	105
Tabelle 14: Zusammenfassung der durch Infektion der HIBCPP-Zellen mit MC58siaD regulierten DEG in An- und Abwesenheit des Erk1/2 Inhibitors U0126. ....	106
Tabelle 15: Statistisch überrepräsentierte <i>GO-Termini</i> .....	109
Tabelle 16: Zusammenfassung der DEG der MACE Analyse .....	173

Tabelle 17:Zusammenfassung der Regulierten Proteine nach Phosphoproteomik Analyse der mit *NmB* infizierten HIBCPP-Zellen. .... 177

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schnittstellen zwischen peripherem Gewebe und dem ZNS. .... 6

Abbildung 2: Pathogenese der bakteriellen Meningitis..... 10

Abbildung 3: Schematische Darstellung verschiedener Endozytosemechanismen durch Pinozytose..... 13

Abbildung 4: Organisation der MAPK Signalwege ..... 16

Abbildung 5: Übersicht diverser Virulenzfaktoren, die in den verschiedenen Phasen der Infektion von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien eingesetzt werden. .... 20

Abbildung 6: Schematische Darstellung der BLS..... 21

Abbildung 7: Einfluss von Dynasore auf die Zellvitalität. .... 64

Abbildung 8: Dynamin ist nicht maßgeblich an der Aufnahme des *N. meningitidis* Wildtyp Stamms der Serogruppen B in HIBCPP-Zellen beteiligt, jedoch an der Aufnahme der Kapselmutante. .... 66

Abbildung 9: Dynamin ist nicht maßgeblich an der Aufnahme des *N. meningitidis* Wildtyp Stamms der Serogruppen C in HIBCPP-Zellen beteiligt, jedoch an der Aufnahme der Kapselmutante. .... 68

Abbildung 10: Dynamin ist nicht maßgeblich an der Aufnahme des *H. influenzae* Typ B Wildtyp Stamms sowie dessen Deletionsmutanten der Kapsel und Fimbrien in HIBCPP-Zellen beteiligt. .... 70

Abbildung 11: Dynamin ist maßgeblich an der Aufnahme des *S. suis* Wildtyp Stamms sowie dessen Kapselmutante in HIBCPP-Zellen beteiligt. .... 72

Abbildung 12: *N. meningitidis* Stämme der Serogruppen B und C sowie deren Kapselmutanten aktivieren die MAPK p38 bei Infektion der basolateralen Seite der HIBCPP-Zellen, während die MAPK Erk1/2 nur schwach aktiviert wird..... 75

Abbildung 13: Inhibition der Erk1/2 und p38 Signalwege durch Anwendung spezifischer Inhibitoren. .... 76



Abbildung 14: Die MAPK Erk1/2 und p38 werden für die Infektion der HIBCPP-Zellen durch den <i>NmB</i> Wildtyp Stamm benötigt, während die Inhibition des Erk1/2 Signalwegs zu einer erhöhten Infektion durch die Kapselmutante führt, p38 jedoch keinen Einfluss auf die Infektion der Kapselmutante zeigt. ....	78
Abbildung 15: Die MAPK p38 wird für die Infektion der HIBCPP-Zellen durch den <i>NmC</i> Wildtyp Stamm und dessen Kapselmutante benötigt, während Erk1/2 nur Einfluss auf die Infektion durch den <i>NmC</i> Wildtyp Stamm aufweist.....	80
Abbildung 16: Die MAPK Erk1/2 und p38 werden für die Infektion der HIBCPP-Zellen durch <i>H. influenzae</i> in An- und Abwesenheit der Kapsel und Fimbrien benötigt.....	82
Abbildung 17: Für die Infektion der HIBCPP-Zellen durch den Erreger <i>S. suis</i> und dessen Kapselmutante werden die MAPK Erk1/2 und p38 benötigt.....	84
Abbildung 18: Einfluss der Inhibitoren U0126 und SB203580 auf die Expression von <i>il6</i> und <i>il8</i> in HIBCPP-Zellen. ....	87
Abbildung 19: Expression von <i>il6</i> und <i>il8</i> nach Infektion der HIBCPP-Zellen mit <i>NmB</i> .....	89
Abbildung 20: Expression von <i>il6</i> und <i>il8</i> nach Infektion der HIBCPP-Zellen mit <i>NmC</i> .....	91
Abbildung 21: Expression von <i>il6</i> und <i>il8</i> nach Infektion der HIBCPP-Zellen mit <i>H. influenzae</i> .....	93
Abbildung 22: Expression von <i>il6</i> und <i>il8</i> nach Infektion der HIBCPP-Zellen mit <i>S. suis</i> .....	95
Abbildung 23: Zusammenfassung der Aligent 2100 Bioanalyser Elektropherogramme .....	97
Abbildung 24: Schematische Repräsentation der Anzahl der Gene, welche während der MACE Analyse in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit <i>NmB</i> reguliert wurden. ....	100
Abbildung 25: Schematische Repräsentation der Anzahl der Gene, welche während der MACE Analyse in HIBCPP-Zellen nach Infektion mit <i>NmB</i> und Behandlung mit dem Erk1/2 Inhibitor reguliert wurden.....	103
Abbildung 26: Enrichment Analyse der Signalwege nach Infektion mit dem <i>NmB</i> Wildtyp und dessen Kapselmutante. ....	113
Abbildung 27 Enrichment Analyse der zellulären Komponenten nach Infektion mit dem <i>NmB</i> Wildtyp und dessen Kapselmutante.....	114

Abbildung 28: Enrichment Analyse der molekularen Funktionen nach Infektion mit dem <i>NmB</i> Wildtyp und dessen Kapselmutante.....	115
Abbildung 29: Enrichment Analyse der biologischen Funktionen nach Infektion mit dem <i>NmB</i> Wildtyp und dessen Kapselmutante.....	116
Abbildung 30: Enrichment Analyse der Kinase Anreicherung nach Infektion mit dem <i>NmB</i> Wildtyp und dessen Kapselmutante.....	117

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADM	Adrenomedullin
ARE	<i>Adenin und Uridin-rich-elements</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
BSA	Bovine Serum <i>Albumine</i>
CFU	<i>Colony Forming Units</i>
C <sub>T</sub>	<i>threshold cycle</i>
CVE	Clathrin-vermittelte Endozytose
DEG	<i>Differentially Expressed Genes</i>
DIF	Doppelimmunfluoreszenzfärbung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EF	<i>extracellular factor</i>
EGF	epidermale Wachstumsfaktor
EGFR	EGF Rezeptor
Erk	extrazellulären Signal-regulierten Kinasen
Erk1/2	Erk 1 und 2
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FEME	Endophilin-vermittelte Endozytose
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GDP	Guanosin 5'-diphosphat
GO	<i>Gene Ontology</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
hg38	<i>Human Reference 38</i>
HIBCPP	<i>human choroid plexus papilloma</i>

---

HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
InI	Internalin
IκB	inhibitorische κB-Proteine
JNK	c-Jun amino-terminalen Kinasen
Kon/ con	Kontrolle
LAGO	Logically Accelerated GO Term Finder
Liquor	<i>Zerebrospinalflüssigkeit</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
MACE	<i>Massive Analysis of cDNA Ends</i>
MAPK	<i>Mitogen-aktivierten Proteinkinasen</i>
MAPKAP	MAPK-aktivierten Proteinkinasen
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPK-Kinase-Kinase
MEK	MAPK/Erk Kinase
MNK	MAPK-interagierende Kinasen
MOI	Multiplicity Of Infection
MRP	<i>Mauraminidase-released Protein</i>
MSK	<i>Mitogen- und Stress-aktivierte Kinasen</i>
NANA	5-N-Acetylneuraminsäure
NF-κB	nuclear factor ' <i>kappa-light-chain-enhancer</i> ' of activated B-cells
NGF	<i>Nervenwachstumsfaktor</i>
OD	Optische Dichte
OD600	Optische Dichte von 600 nm
Omp	Outer membrane protein
OMV	<i>Vesikeln der äußeren Bakterienmembran</i>
PAFR	Platelet-activating factor Rezeptor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PC	<i>Plexus choridei</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PLAU	Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator
PLAUR	PLAU Rezeptor
PRR	pathogen recognition <i>receptors</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion</i>
RIN	RNA Integrity Number
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>

---

RNA-Seq	RNA Sequenzierung
rRNA	ribosomale RNA
RSK	ribosomalen S6 Kinasen
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinasen
SFM	Serumfreies Medium
SLY	Suilysin
ST	Serotyp
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TEER	Transepithelialen elektrische Widerstand
THB	Todd Hewitt Broth
TJ	Tight Junctions
TLR	<i>Toll-like Rezeptor</i>
TMT	Tandem Mass <i>Tag</i>
UK	<i>Umkehrkultur</i>
UMI	unique molecular <i>barcodes</i>
UV	<i>Ultraviolett</i>
ZNS	zentrale Nervensystem
ZO1	Zonula Occludens 1
<b>Erreger:</b>	
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Hib</i>	<i>H. influenzae type b</i>
NTHi	<i>non-typable H. influenzae</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>N. meningitidis</i> , Meningokokken	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>NmB</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> Serogruppe B
<i>NmC</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> Serogruppe C
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. Suis</i>	<i>Streptococcus Suis</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>

## 7.4 Literaturverzeichnis

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R. und Begley, D. J. (2010). **Structure and function of the blood-brain barrier**. *Neurobiol Dis* 37 (1), 13-25, doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
- Adam, R. A. und Schroten, H. (2004). **Pathogenese der bakteriellen Meningitis**. *Monatsschr Kinderheilkd* 4 (152), 9.
- Al-Obaidi, M. M. J. und Desa, M. N. M. (2018). **Mechanisms of Blood Brain Barrier Disruption by Different Types of Bacteria, and Bacterial-Host Interactions Facilitate the Bacterial Pathogen Invading the Brain**. *Cell Mol Neurobiol* 38 (7), 1349-1368, doi: 10.1007/s10571-018-0609-2.
- Ameixa, C. und Friedland, J. S. (2002). **Interleukin-8 secretion from Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes is regulated by protein tyrosine kinases but not by ERK1/2 or p38 mitogen-activated protein kinases**. *Infect Immun* 70 (8), 4743-4746, doi: 10.1128/iai.70.8.4743-4746.2002.
- Anil, A. und Banerjee, A. (2020). **Pneumococcal Encounter With the Blood-Brain Barrier Endothelium**. *Front Cell Infect Microbiol* 10, 590682, doi: 10.3389/fcimb.2020.590682.
- Arkun, Y. und Yasemi, M. (2018). **Dynamics and control of the ERK signaling pathway: Sensitivity, bistability, and oscillations**. *PLoS One* 13 (4), e0195513, doi: 10.1371/journal.pone.0195513.
- Arthur, J. S. und Ley, S. C. (2013). **Mitogen-activated protein kinases in innate immunity**. *Nat Rev Immunol* 13 (9), 679-692, doi: 10.1038/nri3495.
- Aubrey, R. und Tang, C. (2003). **The pathogenesis of disease due to type b Haemophilus influenzae**. *Methods Mol Med* 71, 29-50.
- Banerjee, A., Kim, B. J., Carmona, E. M., Cutting, A. S., Gurney, M. A., Carlos, C., Feuer, R., Prasadarao, N. V. und Doran, K. S. (2011). **Bacterial Pili exploit integrin machinery to promote immune activation and efficient blood-brain barrier penetration**. *Nat Commun* 2, 462, doi: 10.1038/ncomms1474.
- Bauer, H. C., Krizbai, I. A., Bauer, H. und Traweger, A. (2014). **"You Shall Not Pass"-tight junctions of the blood brain barrier**. *Front Neurosci* 8, 392, doi: 10.3389/fnins.2014.00392.
- Baums, C. G., Kaim, U., Fulde, M., Ramachandran, G., Goethe, R. und Valentin-Weigand, P. (2006). **Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in Streptococcus suis**. *Infect Immun* 74 (11), 6154-6162, doi: 10.1128/IAI.00359-06.
- Baunbaek Egelund, G., Ertner, G., Langholz Kristensen, K., Vestergaard Jensen, A., Benfield, T. L. und Brandt, C. T. (2017). **Cerebrospinal fluid pleocytosis in infectious and noninfectious central nervous system disease: A retrospective cohort study**. *Medicine (Baltimore)* 96 (18), e6686, doi: 10.1097/MD.0000000000006686.

- Bell, L. M., Alpert, G., Campos, J. M. und Plotkin, S. A. (1985). **Routine quantitative blood cultures in children with Haemophilus influenzae or Streptococcus pneumoniae bacteremia.** *Pediatrics* 76 (6), 901-904.
- Berry, J. L. und Pelicic, V. (2015). **Exceptionally widespread nanomachines composed of type IV pilins: the prokaryotic Swiss Army knives.** *Fems Microbiol Rev* 39 (1), 134-154, doi: 10.1093/femsre/fuu001.
- Bi, L., Pian, Y., Chen, S., Ren, Z., Liu, P., Lv, Q., Zheng, Y., Zhang, S., Hao, H., Yuan, Y. und Jiang, Y. (2015). **Toll-like receptor 4 confers inflammatory response to Sulysin.** *Front Microbiol* 6, 644, doi: 10.3389/fmicb.2015.00644.
- Bleuze, M., Auger, J. P., Lavagna, A., Gisch, N., Gottschalk, M. und Segura, M. (2020). **In vitro characterization of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) production by dendritic cells and macrophages during Streptococcus suis infection.** *Immunobiology* 225 (4), 151979, doi: 10.1016/j.imbio.2020.151979.
- Borkowski, J., Li, L., Steinmann, U., Quednau, N., Stump-Guthier, C., Weiss, C., Findeisen, P., Gretz, N., Ishikawa, H., Tenenbaum, T., Schroten, H. und Schwerk, C. (2014). **Neisseria meningitidis elicits a pro-inflammatory response involving IkappaBzeta in a human blood-cerebrospinal fluid barrier model.** *J Neuroinflammation* 11, 163, doi: 10.1186/s12974-014-0163-x.
- Borkowski, J., Schroten, H. und Schwerk, C. (2020). **Interactions and Signal Transduction Pathways Involved during Central Nervous System Entry by Neisseria meningitidis across the Blood-Brain Barriers.** *Int J Mol Sci* 21 (22), doi: 10.3390/ijms21228788.
- Boyle, E. I., Weng, S., Gollub, J., Jin, H., Botstein, D., Cherry, J. M. und Sherlock, G. (2004). **GO::TermFinder--open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes.** *Bioinformatics* 20 (18), 3710-3715, doi: 10.1093/bioinformatics/bth456.
- Brightman, F. A. und Fell, D. A. (2000). **Differential feedback regulation of the MAPK cascade underlies the quantitative differences in EGF and NGF signalling in PC12 cells.** *FEBS Lett* 482 (3), 169-174, doi: 10.1016/s0014-5793(00)02037-8.
- Broad Institute, G. R. (2019). **"Picard Toolkit."** <http://broadinstitute.github.io/picard/> [20.05.2021].
- Carbonnelle, E., Hill, D. J., Morand, P., Griffiths, N. J., Bourdoulous, S., Murillo, I., Nassif, X. und Virji, M. (2009). **Meningococcal interactions with the host.** *Vaccine* 27 Suppl 2, B78-89, doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.069.
- Cargnello, M. und Roux, P. P. (2011). **Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases.** *Microbiol Mol Biol Rev* 75 (1), 50-83, doi: 10.1128/MMBR.00031-10.
- Cassier, E., Gallay, N., Bourquard, T., Claeysen, S., Bockaert, J., Crepieux, P., Poupon, A., Reiter, E., Marin, P. und Vandermoere, F. (2017). **Phosphorylation of beta-arrestin2 at Thr(383) by MEK underlies beta-arrestin-dependent activation of Erk1/2 by GPCRs.** *Elife* 6, doi: 10.7554/eLife.23777.

- Caugant, D. A. und Brynildsrud, O. B. (2020). **Neisseria meningitidis: using genomics to understand diversity, evolution and pathogenesis**. *Nat Rev Microbiol* 18 (2), 84-96, doi: 10.1038/s41579-019-0282-6.
- Caugant, D. A. und Maiden, M. C. (2009). **Meningococcal carriage and disease--population biology and evolution**. *Vaccine* 27 Suppl 2, B64-70, doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.061.
- Caunt, C. J., Finch, A. R., Sedgley, K. R. und McArdle, C. A. (2006). **Seven-transmembrane receptor signalling and ERK compartmentalization**. *Trends Endocrinol Metab* 17 (7), 276-283, doi: 10.1016/j.tem.2006.07.008.
- Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C. und Cobb, M. H. (2001). **MAP kinases**. *Chem Rev* 101 (8), 2449-2476, doi: 10.1021/cr000241p.
- Cheyuo, C., Yang, W. L. und Wang, P. (2012). **The critical role of adrenomedullin and its binding protein, AMBP-1, in neuroprotection**. *Biol Chem* 393 (6), 429-439, doi: 10.1515/hsz-2012-0103.
- Choi, H., Nguyen, H. N. und Lamb, F. S. (2014). **Inhibition of endocytosis exacerbates TNF-alpha-induced endothelial dysfunction via enhanced JNK and p38 activation**. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306 (8), H1154-1163, doi: 10.1152/ajpheart.00885.2013.
- Clemans, D. L., Marrs, C. F., Patel, M., Duncan, M. und Gilsdorf, J. R. (1998). **Comparative analysis of Haemophilus influenzae hifA (pilin) genes**. *Infect Immun* 66 (2), 656-663, doi: 10.1128/IAI.66.2.656-663.1998.
- Corbett, A., Exley, R., Bourdoulous, S. und Tang, C. M. (2004). **Interactions between Neisseria meningitidis and human cells that promote colonisation and disease**. *Expert Rev Mol Med* 6 (14), 1-14, doi: 10.1017/S1462399404008087.
- Cossart, P. (2004). **Bacterial invasion: A new strategy to dominate cytoskeleton plasticity**. *Dev Cell* 6 (3), 314-315, doi: 10.1016/S1534-5807(04)00072-3.
- Cossart, P. und Helenius, A. (2014). **Endocytosis of Viruses and Bacteria**. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6 (8), doi: ARTN a01697210.1101/cshperspect.a016972.
- Cossart, P. und Roy, C. R. (2010). **Manipulation of host membrane machinery by bacterial pathogens**. *Curr Opin Cell Biol* 22 (4), 547-554, doi: 10.1016/j.ceb.2010.05.006.
- Coureuil, M., Lecuyer, H., Scott, M. G. H., Boullaran, C., Enslin, H., Soyer, M., Mikaty, G., Bourdoulous, S., Nassif, X. und Marullo, S. (2010). **Meningococcus Hijacks a beta 2-Adrenoceptor/beta-Arrestin Pathway to Cross Brain Microvasculature Endothelium**. *Cell* 143 (7), 1149-1160, doi: 10.1016/j.cell.2010.11.035.
- Cress, B. F., Englaender, J. A., He, W., Kasper, D., Linhardt, R. J. und Koffas, M. A. (2014). **Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules**. *FEMS Microbiol Rev* 38 (4), 660-697, doi: 10.1111/1574-6976.12056.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R. und Lee, J. C. (1995). **SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue**

- which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1.** FEBS Lett 364 (2), 229-233, doi: 10.1016/0014-5793(95)00357-f.
- Cundell, D. R., Gerard, N. P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I. und Tuomanen, E. I. (1995). **Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor.** Nature 377 (6548), 435-438, doi: 10.1038/377435a0.
- Czerucka, D., Dahan, S., Mograbi, B., Rossi, B. und Rampal, P. (2001). **Implication of mitogen-activated protein kinases in T84 cell responses to enteropathogenic Escherichia coli infection.** Infect Immun 69 (3), 1298-1305, doi: 10.1128/IAI.69.3.1298-1305.2001.
- D'Elia, R. V., Saint, R. J., Newstead, S. L., Clark, G. C. und Atkins, H. S. (2017). **Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are modulated during in vitro and in vivo infection with the intracellular bacterium Burkholderia pseudomallei.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis 36 (11), 2147-2154, doi: 10.1007/s10096-017-3038-0.
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., Ahn, S., Della Rocca, G. J., Ferguson, S. S., Caron, M. G. und Lefkowitz, R. J. (1998). **Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase.** J Biol Chem 273 (2), 685-688, doi: 10.1074/jbc.273.2.685.
- Dan, I., Watanabe, N. M. und Kusumi, A. (2001). **The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades.** Trends Cell Biol 11 (5), 220-230, doi: 10.1016/s0962-8924(01)01980-8.
- Dando, S. J., Mackay-Sim, A., Norton, R., Currie, B. J., St John, J. A., Ekberg, J. A. K., Batzloff, M., Ulett, G. C. und Beacham, I. R. (2014). **Pathogens Penetrating the Central Nervous System: Infection Pathways and the Cellular and Molecular Mechanisms of Invasion.** Clin Microbiol Rev 27 (4), 691-726, doi: 10.1128/Cmr.00118-13.
- Daneman, R. (2015). **Regulation of the Blood-Brain Barrier in Health and Disease.** Faseb J 29.
- Davis, R. J. (2000). **Signal transduction by the JNK group of MAP kinases.** Cell 103 (2), 239-252, doi: 10.1016/s0092-8674(00)00116-1.
- de Greeff, A., Benga, L., Wichgers Schreur, P. J., Valentin-Weigand, P., Rebel, J. M. und Smith, H. E. (2010). **Involvement of NF-kappaB and MAP-kinases in the transcriptional response of alveolar macrophages to Streptococcus suis.** Vet Microbiol 141 (1-2), 59-67, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.07.031.
- DeFea, K. A., Zalevsky, J., Thoma, M. S., Dery, O., Mullins, R. D. und Bunnett, N. W. (2000). **beta-Arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2.** J Cell Biol 148 (6), 1267-1281, doi: DOI 10.1083/jcb.148.6.1267.
- Deghmane, A. E., El Kafsi, H., Giorgini, D., Abaza, A. und Taha, M. K. (2011). **Late repression of NF-kappaB activity by invasive but not non-invasive meningococcal isolates is required to display apoptosis of epithelial cells.** PLoS Pathog 7 (12), e1002403, doi: 10.1371/journal.ppat.1002403.
- Deghmane, A. E., Giorgini, D., Larribe, M., Alonso, J. M. und Taha, M. K. (2002). **Down-regulation of pili and capsule of Neisseria meningitidis upon contact with**



- epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein.** *Mol Microbiol* 43 (6), 1555-1564, doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02838.x.
- Deghmane, A. E., Veckerle, C., Giorgini, D., Hong, E., Ruckly, C. und Taha, M. K. (2009). **Differential modulation of TNF-alpha-induced apoptosis by Neisseria meningitidis.** *PLoS Pathog* 5 (5), e1000405, doi: 10.1371/journal.ppat.1000405.
- Denzer, L., Schroten, H. und Schwerk, C. (2020). **From Gene to Protein-How Bacterial Virulence Factors Manipulate Host Gene Expression During Infection.** *Int J Mol Sci* 21 (10), doi: 10.3390/ijms21103730.
- Derbigny, W. A., Shobe, L. R., Kamran, J. C., Toomey, K. S. und Ofner, S. (2012). **Identifying a role for Toll-like receptor 3 in the innate immune response to Chlamydia muridarum infection in murine oviduct epithelial cells.** *Infect Immun* 80 (1), 254-265, doi: 10.1128/IAI.05549-11.
- Devaux, C. A., Mezouar, S. und Mege, J. L. (2019). **The E-Cadherin Cleavage Associated to Pathogenic Bacteria Infections Can Favor Bacterial Invasion and Transmigration, Dysregulation of the Immune Response and Cancer Induction in Humans.** *Front Microbiol* 10, doi: ARTN 259810.3389/fmicb.2019.02598.
- Di Fiore, P. P. und von Zastrow, M. (2014). **Endocytosis, signaling, and beyond.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6 (8), doi: 10.1101/cshperspect.a016865.
- Dietzman, D. E., Fischer, G. W. und Schoenknecht, F. D. (1974). **Neonatal Escherichia coli septicemia--bacterial counts in blood.** *J Pediatr* 85 (1), 128-130.
- Dinner, S., Kaltschmidt, J., Stump-Guthier, C., Hetjens, S., Ishikawa, H., Tenenbaum, T., Schroten, H. und Schwerk, C. (2017). **Mitogen-activated protein kinases are required for effective infection of human choroid plexus epithelial cells by Listeria monocytogenes.** *Microbes Infect* 19 (1), 18-33, doi: 10.1016/j.micinf.2016.09.003.
- Dominguez-Punaro Mde, L., Segura, M., Contreras, I., Lachance, C., Houde, M., Lecours, M. P., Olivier, M. und Gottschalk, M. (2010). **In vitro characterization of the microglial inflammatory response to Streptococcus suis, an important emerging zoonotic agent of meningitis.** *Infect Immun* 78 (12), 5074-5085, doi: 10.1128/IAI.00698-10.
- Dong, Y., Richards, J. A. E., Gupta, R., Aung, P. P., Emley, A., Kluger, Y., Dogra, S. K., Mahalingam, M. und Wajapeyee, N. (2014). **PTEN functions as a melanoma tumor suppressor by promoting host immune response.** *Oncogene* 33 (38), 4632-4642, doi: 10.1038/onc.2013.409.
- Doran, K. S., Banerjee, A., Disson, O. und Lecuit, M. (2013). **Concepts and Mechanisms: Crossing Host Barriers.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 3 (7), doi: ARTN a01009010.1101/cshperspect.a010090.
- Doran, K. S., Fulde, M., Gratz, N., Kim, B. J., Nau, R., Prasadarao, N., Schubert-Unkmeir, A., Tuomanen, E. I. und Valentin-Weigand, P. (2016). **Host-pathogen interactions in bacterial meningitis.** *Acta Neuropathologica* 131 (2), 185-209, doi: 10.1007/s00401-015-1531-z.
- Doran, K. S., Liu, G. Y. und Nizet, V. (2003). **Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain**

- endothelium and contributes to development of meningitis.** *J Clin Invest* 112 (5), 736-744, doi: 10.1172/Jci200317335.
- Drevets, D. A., Leenen, P. J. M. und Greenfield, R. A. (2004). **Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria.** *Clin Microbiol Rev* 17 (2), 323-+, doi: 10.1128/Cmr.17.2.323-347.2004.
- Du, P., Zheng, H., Zhou, J., Lan, R., Ye, C., Jing, H., Jin, D., Cui, Z., Bai, X., Liang, J., Liu, J., Xu, L., Zhang, W., Chen, C. und Xu, J. (2017). **Detection of Multiple Parallel Transmission Outbreak of Streptococcus suis Human Infection by Use of Genome Epidemiology, China, 2005.** *Emerg Infect Dis* 23 (2), 204-211, doi: 10.3201/eid2302.160297.
- Dutkiewicz, J., Sroka, J., Zajac, V., Wasinski, B., Cisak, E., Sawczyn, A., Kloc, A. und Wojcik-Fatla, A. (2017). **Streptococcus suis: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part I - Epidemiology.** *Ann Agric Environ Med* 24 (4), 683-695, doi: 10.26444/aaem/79813.
- Dutkiewicz, J., Zajac, V., Sroka, J., Wasinski, B., Cisak, E., Sawczyn, A., Kloc, A. und Wojcik-Fatla, A. (2018). **Streptococcus suis: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part II - Pathogenesis.** *Ann Agric Environ Med* 25 (1), 186-203, doi: 10.26444/aaem/85651.
- Ehrlich, P. (1904). **Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie.** *Abh Preuss Wissensch Phys-Math*, 69-72.
- Engelhardt, B., Vajkoczy, P. und Weller, R. O. (2017). **The movers and shapers in immune privilege of the CNS.** *Nat Immunol* 18 (2), 123-131, doi: 10.1038/ni.3666.
- Engelhardt, B., Wolburg-Buchholz, K. und Wolburg, H. (2001). **Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation.** *Microsc Res Tech* 52 (1), 112-129, doi: 10.1002/1097-0029(20010101)52:1<112::Aid-Jemt13>3.0.Co;2-5.
- Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A. und Trzaskos, J. M. (1998). **Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase.** *J Biol Chem* 273 (29), 18623-18632, doi: 10.1074/jbc.273.29.18623.
- Fey, D., Matallanas, D., Rauch, J., Rukhlenko, O. S. und Kholodenko, B. N. (2016). **The complexities and versatility of the RAS-to-ERK signalling system in normal and cancer cells.** *Semin Cell Dev Biol* 58, 96-107, doi: 10.1016/j.semcdb.2016.06.011.
- Fittipaldi, N., Segura, M., Grenier, D. und Gottschalk, M. (2012). **Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent Streptococcus suis.** *Future Microbiol* 7 (2), 259-279, doi: 10.2217/Fmb.11.149.
- Fittipaldi, N., Sekizaki, T., Takamatsu, D., Harel, J., Dominguez-Punaro Mde, L., Von Aulock, S., Draing, C., Marois, C., Kobisch, M. und Gottschalk, M. (2008). **D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of Streptococcus suis.** *Infect Immun* 76 (8), 3587-3594, doi: 10.1128/IAI.01568-07.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M. und et al. (1995). **Whole-**

- genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd.** *Science* 269 (5223), 496-512.
- Fowler, M. I., Yin, K. Y., Humphries, H. E., Heckels, J. E. und Christodoulides, M. (2006). **Comparison of the inflammatory responses of human meningeal cells following challenge with Neisseria lactamica and with Neisseria meningitidis.** *Infect Immun* 74 (11), 6467-6478, doi: 10.1128/IAI.00644-06.
- Frischknecht, F. und Way, M. (2001). **Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization.** *Trends Cell Biol* 11 (1), 30-38.
- Fu, J., Li, L., Yang, X., Yang, R., Amjad, N., Liu, L., Tan, C., Chen, H. und Wang, X. (2018). **Transactivated Epidermal Growth Factor Receptor Recruitment of alpha-actinin-4 From F-actin Contributes to Invasion of Brain Microvascular Endothelial Cells by Meningitic Escherichia coli.** *Front Cell Infect Microbiol* 8, 448, doi: 10.3389/fcimb.2018.00448.
- Gallego Romero, I., Pai, A. A., Tung, J. und Gilad, Y. (2014). **RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification.** *BMC Biol* 12, 42, doi: 10.1186/1741-7007-12-42.
- Gath, U., Hakvoort, A., Wegener, J., Decker, S. und Galla, H. J. (1997). **Porcine choroid plexus cells in culture: expression of polarized phenotype, maintenance of barrier properties and apical secretion of CSF-components.** *Eur J Cell Biol* 74 (1), 68-78.
- Gazon, H., Barbeau, B., Mesnard, J. M. und Peloponese, J. M., Jr. (2017). **Hijacking of the AP-1 Signaling Pathway during Development of ATL.** *Front Microbiol* 8, 2686, doi: 10.3389/fmicb.2017.02686.
- Gherzi-Egea, J. F., Strazielle, N., Catala, M., Silva-Vargas, V., Doetsch, F. und Engelhardt, B. (2018). **Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease.** *Acta Neuropathol* 135 (3), 337-361, doi: 10.1007/s00401-018-1807-1.
- Ghosh, P., Halvorsen, E. M., Ammendolia, D. A., Mor-Vaknin, N., O'Riordan, M. X. D., Brumell, J. H., Markovitz, D. M. und Higgins, D. E. (2018). **Invasion of the Brain by Listeria monocytogenes Is Mediated by InlF and Host Cell Vimentin.** *Mbio* 9 (1), doi: ARTN e00160-1810.1128/mBio.00160-18.
- Gingerich, T. J., Feige, J. J. und LaMarre, J. (2004). **AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability.** *Anim Health Res Rev* 5 (1), 49-63, doi: 10.1079/ahr200460.
- Glaser, C. A., Honarmand, S., Anderson, L. J., Schnurr, D. P., Forghani, B., Cossen, C. K., Schuster, F. L., Christie, L. J. und Tureen, J. H. (2006). **Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis.** *Clin Infect Dis* 43 (12), 1565-1577, doi: 10.1086/509330.
- Glennon, N. B., Jabado, O., Lo, M. K. und Shaw, M. L. (2015). **Transcriptome Profiling of the Virus-Induced Innate Immune Response in Pteropus vampyrus and Its Attenuation by Nipah Virus Interferon Antagonist Functions.** *J Virol* 89 (15), 7550-7566, doi: 10.1128/JVI.00302-15.

- Goldmann, E. E. (1913). **Vitalfärbung am Zentralnervensystem**. Abh Preuss Wissensch Phys-Math 1, 1-60.
- Gomes, S. F. M., Westermann, A. J., Sauerwein, T., Hertlein, T., Forstner, K. U., Ohlsen, K., Metzger, M., Shusta, E. V., Kim, B. J., Appelt-Menzel, A. und Schubert-Unkmeir, A. (2019). **Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Brain Endothelial Cells as a Cellular Model to Study Neisseria meningitidis Infection**. Front Microbiol 10, doi: ARTN 118110.3389/fmicb.2019.01181.
- Gong, X., Ming, X., Deng, P. und Jiang, Y. (2010). **Mechanisms regulating the nuclear translocation of p38 MAP kinase**. J Cell Biochem 110 (6), 1420-1429, doi: 10.1002/jcb.22675.
- Gonnord, P., Blouin, C. M. und Lamaze, C. (2012). **Membrane trafficking and signaling: two sides of the same coin**. Semin Cell Dev Biol 23 (2), 154-164, doi: 10.1016/j.semcdb.2011.11.002.
- Goralska, K., Blaszkowska, J. und Dzikowiec, M. (2018). **Neuroinfections caused by fungi**. Infection 46 (4), 443-459, doi: 10.1007/s15010-018-1152-2.
- Gottschalk, M., Xu, J. G., Calzas, C. und Segura, M. (2010). **Streptococcus suis: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen?** Future Microbiol 5 (3), 371-391, doi: 10.2217/Fmb.10.2.
- Gottschalk, M. G., Lacouture, S. und Dubreuil, J. D. (1995). **Characterization of Streptococcus suis capsular type 2 haemolysin**. Microbiology 141 ( Pt 1), 189-195, doi: 10.1099/00221287-141-1-189.
- Gouin, E., Welch, M. D. und Cossart, P. (2005). **Actin-based motility of intracellular pathogens**. Curr Opin Microbiol 8 (1), 35-45, doi: 10.1016/j.mib.2004.12.013.
- Gowin, E. und Januszkiewicz-Lewandowska, D. (2018). **Genes and their single nucleotide polymorphism involved in innate immune response in central nervous system in bacterial meningitis: review of literature data**. Inflamm Res 67 (8), 655-661, doi: 10.1007/s00011-018-1158-3.
- Goyette-Desjardins, G., Auger, J. P., Xu, J., Segura, M. und Gottschalk, M. (2014). **Streptococcus suis, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing**. Emerg Microbes Infect 3 (6), e45, doi: 10.1038/emi.2014.45.
- Grundler, T., Quednau, N., Stump, C., Orian-Rousseau, V., Ishikawa, H., Wolburg, H., Schroten, H., Tenenbaum, T. und Schwerk, C. (2013). **The surface proteins InlA and InlB are interdependently required for polar basolateral invasion by Listeria monocytogenes in a human model of the blood-cerebrospinal fluid barrier**. Microbes Infect 15 (4), 291-301, doi: 10.1016/j.micinf.2012.12.005.
- Guo, Y. J., Pan, W. W., Liu, S. B., Shen, Z. F., Xu, Y. und Hu, L. L. (2020). **ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis**. Exp Ther Med 19 (3), 1997-2007, doi: 10.3892/etm.2020.8454.
- Haas, B. und Grenier, D. (2018). **Understanding the virulence of Streptococcus suis: A veterinary, medical, and economic challenge**. Med Mal Infect 48 (3), 159-166, doi: 10.1016/j.medmal.2017.10.001.

- Hackett, S. J., Thomson, A. P. J. und Hart, C. A. (2001). **Cytokines, chemokines and other effector molecules involved in meningococcal disease**. *J Med Microbiol* 50 (10), 847-859, doi: 10.1099/0022-1317-50-10-847.
- Hammerschmidt, S., Muller, A., Sillmann, H., Muhlenhoff, M., Borrow, R., Fox, A., van Putten, J., Zollinger, W. D., Gerardy-Schahn, R. und Frosch, M. (1996a). **Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease**. *Mol Microbiol* 20 (6), 1211-1220, doi: 10.1111/j.1365-2958.1996.tb02641.x.
- Hammerschmidt, S., Muller, A., Sillmann, H., Muhlenhoff, M., Borrow, R., Fox, A., vanPutten, J., Zollinger, W. D., GerardySchahn, R. und Frosch, M. (1996b). **Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): Correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease**. *Mol Microbiol* 20 (6), 1211-1220, doi: 10.1111/j.1365-2958.1996.tb02641.x.
- Handa, O., Naito, Y., Takagi, T., Shimosawa, M., Kokura, S., Yoshida, N., Matsui, H., Cepinskas, G., Kvietyis, P. R. und Yoshikawa, T. (2004). **Tumor necrosis factor-alpha-induced cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) production by rat gastric epithelial cells: role of reactive oxygen species and nuclear factor-kappaB**. *J Pharmacol Exp Ther* 309 (2), 670-676, doi: 10.1124/jpet.103.062216.
- Haq, R., Brenton, J. D., Takahashi, M., Finan, D., Finkielstein, A., Damaraju, S., Rottapel, R. und Zanke, B. (2002). **Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence**. *Cancer Res* 62 (17), 5076-5082.
- Harimaya, A., Koizumi, J., Fujii, N. und Himi, T. (2007). **Interleukin-8 induction via NF-kappaB, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathways in human peripheral blood mononuclear cells by *Alloiococcus otitidis***. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 71 (9), 1465-1470, doi: 10.1016/j.ijporl.2007.06.003.
- Haselbach, M., Wegener, J., Decker, S., Engelbertz, C. und Galla, H. J. (2001). **Porcine Choroid plexus epithelial cells in culture: regulation of barrier properties and transport processes**. *Microsc Res Tech* 52 (1), 137-152, doi: 10.1002/1097-0029(20010101)52:1<137::AID-JEMT15>3.0.CO;2-J.
- Hashino, M., Tachibana, M., Nishida, T., Hara, H., Tsuchiya, K., Mitsuyama, M., Watanabe, K., Shimizu, T. und Watarai, M. (2015). **Inactivation of the MAPK signaling pathway by *Listeria monocytogenes* infection promotes trophoblast giant cell death**. *Front Microbiol* 6, 1145, doi: 10.3389/fmicb.2015.01145.
- Häuser, S., Wegele, C., Stump-Guthier, C., Borkowski, J., Weiss, C., Rohde, M., Ishikawa, H., Schrotten, H., Schwerk, C. und Adam, R. (2018). **Capsule and fimbriae modulate the invasion of *Haemophilus influenzae* in a human blood-cerebrospinal fluid barrier model**. *Int J Medl Microbiol* 308 (7), 829-839, doi: 10.1016/j.ijmm.2018.07.004.
- Hawkins, R. A., O'Kane, R. L., Simpson, I. A. und Vina, J. R. (2006). **Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids**. *Nutr J* 136 (1), 218s-226s.

- Hayden, M. S. (2012). **A less-canonical, canonical NF-kappaB pathway in DCs.** *Nat Immunol* 13 (12), 1139-1141, doi: 10.1038/ni.2476.
- Heldin, J., Sander, M. R., Leino, M., Thomsson, S., Lennartsson, J. und Soderberg, O. (2019). **Dynamin inhibitors impair platelet-derived growth factor beta-receptor dimerization and signaling.** *Exp Cell Res* 380 (1), 69-79, doi: 10.1016/j.yexcr.2019.04.004.
- Herold, R., Schroten, H. und Schwerk, C. (2019). **Virulence Factors of Meningitis-Causing Bacteria: Enabling Brain Entry across the Blood-Brain Barrier.** *Int J Mol Sci* 20 (21), doi: 10.3390/ijms20215393.
- Hill, D. J., Griffiths, N. J., Borodina, E. und Virji, M. (2010). **Cellular and molecular biology of Neisseria meningitidis colonization and invasive disease.** *Clin Sci (Lond)* 118 (9), 547-564, doi: 10.1042/CS20090513.
- Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J. M., Latham, V. und Skrzypek, E. (2015). **PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations.** *Nucleic Acids Res* 43 (Database issue), D512-520, doi: 10.1093/nar/gku1267.
- Hu, X., Zhu, F., Wang, H., Chen, S., Wang, G., Sun, J., Hua, C. und Yang, H. (2000). **[Studies on human streptococcal infectious syndrome caused by infected pigs].** *Zhonghua Yufang Yixue Zazhi* 34 (3), 150-152.
- Huang da, W., Sherman, B. T. und Lempicki, R. A. (2009a). **Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists.** *Nucleic Acids Res* 37 (1), 1-13, doi: 10.1093/nar/gkn923.
- Huang da, W., Sherman, B. T. und Lempicki, R. A. (2009b). **Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.** *Nat Protoc* 4 (1), 44-57, doi: 10.1038/nprot.2008.211.
- Huong, V. T., Ha, N., Huy, N. T., Horby, P., Nghia, H. D., Thiem, V. D., Zhu, X., Hoa, N. T., Hien, T. T., Zamora, J., Schultsz, C., Wertheim, H. F. und Hirayama, K. (2014). **Epidemiology, clinical manifestations, and outcomes of Streptococcus suis infection in humans.** *Emerg Infect Dis* 20 (7), 1105-1114, doi: 10.3201/eid2007.131594.
- Imasato, A., Desbois-Mouthon, C., Han, J., Kai, H., Cato, A. C., Akira, S. und Li, J. D. (2002). **Inhibition of p38 MAPK by glucocorticoids via induction of MAPK phosphatase-1 enhances nontypeable Haemophilus influenzae-induced expression of toll-like receptor 2.** *J Biol Chem* 277 (49), 47444-47450, doi: 10.1074/jbc.M208140200.
- Ingolia, N. T. und Murray, A. W. (2004). **The ups and downs of modeling the cell cycle.** *Curr Biol* 14 (18), R771-777, doi: 10.1016/j.cub.2004.09.018.
- Ishiwata, I., Ishiwata, C., Ishiwata, E., Sato, Y., Kiguchi, K., Tachibana, T., Hashimoto, H. und Ishikawa, H. (2005). **Establishment and characterization of a human malignant choroids plexus papilloma cell line (HIBCPP).** *Hum Cell* 18 (1), 67-72, doi: 10.1111/j.1749-0774.2005.tb00059.x.
- Janeway, C. A., Jr. und Medzhitov, R. (2002). **Innate immune recognition.** *Annu Rev Immunol* 20, 197-216, doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.

- Jennings, M. P., Srikhanta, Y. N., Moxon, E. R., Kramer, M., Poolman, J. T., Kuipers, B. und van der Ley, P. (1999). **The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis***. *Microbiology* 145 ( Pt 11), 3013-3021, doi: 10.1099/00221287-145-11-3013.
- Kahler, C. M., Martin, L. E., Shih, G. C., Rahman, M. M., Carlson, R. W. und Stephens, D. S. (1998). **The ( $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 8)-linked polysialic acid capsule and lipooligosaccharide structure both contribute to the ability of serogroup B *Neisseria meningitidis* to resist the bactericidal activity of normal human serum**. *Infect Immun* 66 (12), 5939-5947, doi: 10.1128/IAI.66.12.5939-5947.1998.
- Kalantari, P., Harandi, O. F., Agarwal, S., Rus, F., Kurt-Jones, E. A., Fitzgerald, K. A., Caffrey, D. R. und Golenbock, D. T. (2017). **miR-718 represses proinflammatory cytokine production through targeting phosphatase and tensin homolog (PTEN)**. *J Biol Chem* 292 (14), 5634-5644, doi: 10.1074/jbc.M116.749325.
- Kastenbauer, S., Angele, B., Sporer, B., Pfister, H. W. und Koedel, U. (2005). **Patterns of protein expression in infectious meningitis: a cerebrospinal fluid protein array analysis**. *J Neuroimmunol* 164 (1-2), 134-139, doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.03.009.
- Katz, M., Amit, I. und Yarden, Y. (2007). **Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases**. *Biochim Biophys Acta* 1773 (8), 1161-1176, doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.01.002.
- Kawai, T. und Akira, S. (2007). **TLR signaling**. *Semin Immunol* 19 (1), 24-32, doi: 10.1016/j.smim.2006.12.004.
- Kawai, T. und Akira, S. (2010). **The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors**. *Nat Immunol* 11 (5), 373-384, doi: 10.1038/ni.1863.
- Kawashima, T., Kosaka, A., Yan, H., Guo, Z., Uchiyama, R., Fukui, R., Kaneko, D., Kumagai, Y., You, D. J., Carreras, J., Uematsu, S., Jang, M. H., Takeuchi, O., Kaisho, T., Akira, S., Miyake, K., Tsutsui, H., Saito, T., Nishimura, I. und Tsuji, N. M. (2013). **Double-stranded RNA of intestinal commensal but not pathogenic bacteria triggers production of protective interferon-beta**. *Immunity* 38 (6), 1187-1197, doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.024.
- Kayal, S., Lilienbaum, A., Join-Lambert, O., Li, X. X., Israel, A. und Berche, P. (2002). **Listeriolysin O secreted by *Listeria monocytogenes* induces NF-kappa B signalling by activating the I kappa B kinase complex**. *Mol Microbiol* 44 (5), 1407-1419, doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02973.x.
- Khair, O. A., Devalia, J. L., Abdelaziz, M. M., Sapsford, R. J. und Davies, R. J. (1995). **Effect of erythromycin on *Haemophilus influenzae* endotoxin-induced release of IL-6, IL-8 and sICAM-1 by cultured human bronchial epithelial cells**. *Eur Respir J* 8 (9), 1451-1457.
- Kim, B. J., Shusta, E. V. und Doran, K. S. (2019). **Past and Current Perspectives in Modeling Bacteria and Blood-Brain Barrier Interactions**. *Front Microbiol* 10, 1336, doi: 10.3389/fmicb.2019.01336.

- Kim, E. K. und Choi, E. J. (2010). **Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases**. *Biochim Biophys Acta* 1802 (4), 396-405, doi: 10.1016/j.bbadis.2009.12.009.
- Kim, J., Kim, Y., Kim, H. T., Kim, D. W., Ha, Y., Kim, J., Kim, C. H., Lee, I. und Song, K. (2009). **TC1(C8orf4) is a novel endothelial inflammatory regulator enhancing NF-kappaB activity**. *J Immunol* 183 (6), 3996-4002, doi: 10.4049/jimmunol.0900956.
- Kim, K. J., Elliott, S. J., Di Cello, F., Stins, M. F. und Kim, K. S. (2003). **The K1 capsule modulates trafficking of E-coli-containing vacuoles and enhances intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells**. *Cell Microbiol* 5 (4), 245-252, doi: 10.1046/j.1462-5822.2003.t01-1-00271.x.
- Kim, K. S. (2008). **Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier**. *Nat Rev Microbiol* 6 (8), 625-634, doi: 10.1038/nrmicro1952.
- Kim, K. S. (2010). **Acute bacterial meningitis in infants and children**. *Lancet Infect Dis* 10 (1), 32-42, doi: 10.1016/S1473-3099(09)70306-8.
- Kim, K. S. (2016). **Human Meningitis-Associated Escherichia coli**. *EcoSal Plus* 7 (1), doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0015-2015.
- Kim, K. W., Im, J., Jeon, J. H., Lee, H. G., Yun, C. H. und Han, S. H. (2011). **Staphylococcus aureus induces IL-1beta expression through the activation of MAP kinases and AP-1, CRE and NF-kappaB transcription factors in the bovine mammary gland epithelial cells**. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 34 (4), 347-354, doi: 10.1016/j.cimid.2011.04.004.
- Kim, Y., Kim, J., Park, J., Bang, S., Jung, Y., Choe, J., Song, K. und Lee, I. (2006). **TC1(C8orf4) is upregulated by IL-1beta/TNF-alpha and enhances proliferation of human follicular dendritic cells**. *FEBS Lett* 580 (14), 3519-3524, doi: 10.1016/j.febslet.2006.05.036.
- King, S. J., Leigh, J. A., Heath, P. J., Luque, I., Tarradas, C., Dowson, C. G. und Whatmore, A. M. (2002). **Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen Streptococcus suis: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange**. *J Clin Microbiol* 40 (10), 3671-3680, doi: 10.1128/jcm.40.10.3671-3680.2002.
- Klemm, C., Bruchhagen, C., van Kruchten, A., Niemann, S., Löffler, B., Peters, G., Ludwig, S. und Ehrhardt, C. (2017). **Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) regulate IL-6 over-production during concomitant influenza virus and Staphylococcus aureus infection**. *Sci Rep* 7, 42473, doi: 10.1038/srep42473.
- Klemm, S. und Ruland, J. (2006). **Inflammatory signal transduction from the Fc epsilon RI to NF-kappa B**. *Immunobiology* 211 (10), 815-820, doi: 10.1016/j.imbio.2006.07.001.
- Kobayashi, Y. (2008). **The role of chemokines in neutrophil biology**. *Front Biosci* 13, 2400-2407, doi: 10.2741/2853.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. und Cossart, P. (1992). **L-Monocytogenes-Induced Actin Assembly Requires the Acta Gene-Product, a Surface Protein**. *Cell* 68 (3), 521-531, doi: 10.1016/0092-8674(92)90188-l.



- Koedel, U. (2009). **Toll-like receptors in bacterial meningitis**. *Curr Top Microbiol Immunol* 336, 15-40, doi: 10.1007/978-3-642-00549-7\_2.
- Koedel, U., Scheld, W. M. und Pfister, H. W. (2002). **Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis**. *Lancet Infect Dis* 2 (12), 721-736, doi: 10.1016/S1473-3099(02)00450-4.
- Kolch, W. (2000). **Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions**. *Biochem J* 351 Pt 2, 289-305.
- Krachler, A. M., Woolery, A. R. und Orth, K. (2011). **Manipulation of kinase signaling by bacterial pathogens**. *J Cell Biol* 195 (7), 1083-1092, doi: 10.1083/jcb.201107132.
- Kranenburg, O., Verlaan, I. und Moolenaar, W. H. (1999). **Dynamin is required for the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase**. *J Biol Chem* 274 (50), 35301-35304, doi: 10.1074/jbc.274.50.35301.
- Kukurba, K. R. und Montgomery, S. B. (2015). **RNA Sequencing and Analysis**. *Cold Spring Harb Protoc* 2015 (11), 951-969, doi: 10.1101/pdb.top084970.
- Kyriakis, J. M. und Avruch, J. (2001). **Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation**. *Physiol Rev* 81 (2), 807-869, doi: 10.1152/physrev.2001.81.2.807.
- LAGO (2020). **A Logically Accelerated GO Term Finder**. URL: <https://go.princeton.edu/cgi-bin/LAGO> [20.05.2020].
- Lakkitjaroen, N., Takamatsu, D., Okura, M., Sato, M., Osaki, M. und Sekizaki, T. (2011). **Loss of capsule among Streptococcus suis isolates from porcine endocarditis and its biological significance**. *J Med Microbiol* 60 (11), 1669-1676, doi: 10.1099/jmm.0.034686-0.
- Lamason, R. L. und Welch, M. D. (2017). **Actin-based motility and cell-to-cell spread of bacterial pathogens**. *Curr Opin Microbiol* 35, 48-57, doi: 10.1016/j.mib.2016.11.007.
- Lauer, A. N., Tenenbaum, T., Schroten, H. und Schwerk, C. (2018). **The diverse cellular responses of the choroid plexus during infection of the central nervous system**. *Am J Physiol Cell Physiol* 314 (2), C152-C165, doi: 10.1152/ajpcell.00137.2017.
- Lee, S., Rauch, J. und Kolch, W. (2020). **Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity**. *Int J Mol Sci* 21 (3), doi: 10.3390/ijms21031102.
- Li, H. (2013). **Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM**. *00 (002013)*, 1-3.
- Liddelov, S. A. (2015). **Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier**. *Front Neurosci* 9, doi: ARTN 3210.3389/fnins.2015.00032.
- Lin, A. E. und Guttman, J. A. (2010). **Hijacking the endocytic machinery by microbial pathogens**. *Protoplasma* 244 (1-4), 75-90, doi: 10.1007/s00709-010-0164-2.

- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001). **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method.** *Methods* 25 (4), 402-408, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Loerke, D., Mettlen, M., Yarar, D., Jaqaman, K., Jaqaman, H., Danuser, G. und Schmid, S. L. (2009). **Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation.** *PLoS Biol* 7 (3), e57, doi: 10.1371/journal.pbio.1000057.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lu, Y. C., Yeh, W. C. und Ohashi, P. S. (2008). **LPS/TLR4 signal transduction pathway.** *Cytokine* 42 (2), 145-151, doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006.
- Lun, S. C., Perez-Casal, J., Connor, W. und Willson, P. J. (2003). **Role of suliyisin in pathogenesis of Streptococcus suis capsular serotype 2.** *Microb Pathog* 34 (1), 27-37, doi: 10.1016/S0882-4010(02)00192-4.
- Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L. und Lefkowitz, R. J. (2001). **Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds.** *PNAS USA* 98 (5), 2449-2454, doi: 10.1073/pnas.041604898.
- Maissa, N., Covarelli, V., Janel, S., Durel, B., Simpson, N., Bernard, S. C., Pardo-Lopez, L., Bouzinba-Segard, H., Faure, C., Scott, M. G. H., Coureuil, M., Morand, P. C., Lafont, F., Nassif, X., Marullo, S. und Bourdoulous, S. (2017). **Strength of Neisseria meningitidis binding to endothelial cells requires highly-ordered CD147/beta2-adrenoceptor clusters assembled by alpha-actinin-4.** *Nat Commun* 8, 15764, doi: 10.1038/ncomms15764.
- Marampon, F., Bossi, G., Ciccarelli, C., Di Rocco, A., Sacchi, A., Pestell, R. G. und Zani, B. M. (2009). **MEK/ERK inhibitor U0126 affects in vitro and in vivo growth of embryonal rhabdomyosarcoma.** *Mol Cancer Ther* 8 (3), 543-551, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0570.
- Marchiafava, E. a. C., A. (1884). **Spra i micrococchi della meningite cerebrospinale epidemica.** *Gazz Osp Clin* 5, 59.
- Marques, F., Sousa, J. C., Sousa, N. und Palha, J. A. (2013). **Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease.** *Mol Neurodegener* 8, doi: Artn 3810.1186/1750-1326-8-38.
- Martinez-Limon, A., Joaquin, M., Caballero, M., Posas, F. und de Nadal, E. (2020). **The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy.** *Int J Mol Sci* 21 (6), doi: 10.3390/ijms21061913.
- Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K. und Seya, T. (2002). **Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling.** *Biochem Biophys Res Commun* 293 (5), 1364-1369, doi: 10.1016/S0006-291X(02)00380-7.
- McDonald, P. H., Chow, C. W., Miller, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F. T., Davis, R. J. und Lefkowitz, R. J. (2000). **Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold**

- for the activation of JNK3.** *Science* 290 (5496), 1574-1577, doi: 10.1126/science.290.5496.1574.
- McGill, F., Heyderman, R. S., Panagiotou, S., Tunkel, A. R. und Solomon, T. (2016). **Acute bacterial meningitis in adults.** *Lancet* 388 (10063), 3036-3047, doi: 10.1016/S0140-6736(16)30654-7.
- McGill, F. und Solomon, T. (2017). **Acute bacterial meningitis in adults - Authors' reply.** *Lancet* 389 (10079), 1610, doi: 10.1016/S0140-6736(17)31021-8.
- McGuinness, B. T., Clarke, I. N., Lambden, P. R., Barlow, A. K., Poolman, J. T., Jones, D. M. und Heckels, J. E. (1991). **Point Mutation in Meningococcal Por-a Gene Associated with Increased Endemic Disease.** *Lancet* 337 (8740), 514-517, doi: Doi 10.1016/0140-6736(91)91297-8.
- McGuire, V. A. und Arthur, J. S. (2015). **Subverting Toll-Like Receptor Signaling by Bacterial Pathogens.** *Front Immunol* 6, 607, doi: 10.3389/fimmu.2015.00607.
- McMahon, H. T. und Boucrot, E. (2011). **Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 12 (8), 517-533, doi: 10.1038/nrm3151.
- Meeker, R. B., Williams, K., Killebrew, D. A. und Hudson, L. C. (2012). **Cell trafficking through the choroid plexus.** *Cell Adh Migr* 6 (5), 390-396, doi: 10.4161/cam.21054.
- Mirlashari, M. R., Hoiby, E. A., Holst, J. und Lyberg, T. (2001). **Outer membrane vesicles from Neisseria meningitidis: effects on tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 production in human monocytes.** *Thromb Res* 102 (4), 375-380, doi: 10.1016/s0049-3848(01)00256-0.
- Mogensen, T. H., Paludan, S. R., Kilian, M. und Ostergaard, L. (2006). **Live Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Neisseria meningitidis activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns.** *J Leukoc Biol* 80 (2), 267-277, doi: 10.1189/jlb.1105626.
- Mubaiwa, T. D., Hartley-Tassell, L. E., Semchenko, E. A., Jen, F. E., Srikhanta, Y. N., Day, C. J., Jennings, M. P. und Seib, K. L. (2017). **The glycointeractome of serogroup B Neisseria meningitidis strain MC58.** *Sci Rep* 7 (1), 5693, doi: 10.1038/s41598-017-05894-w.
- Munter, S., Way, M. und Frischknecht, F. (2006). **Signaling during pathogen infection.** *Sci STKE* 2006 (335), re5, doi: 10.1126/stke.3352006re5.
- Nagele, V., Heesemann, J., Schielke, S., Jimenez-Soto, L. F., Kurzai, O. und Ackermann, N. (2011). **Neisseria meningitidis adhesin NadA targets beta1 integrins: functional similarity to Yersinia invasin.** *J Biol Chem* 286 (23), 20536-20546, doi: 10.1074/jbc.M110.188326.
- Narita, K. und Takeda, S. (2015). **Cilia in the choroid plexus: their roles in hydrocephalus and beyond.** *Front Cell Neurosci* 9, 39, doi: 10.3389/fncel.2015.00039.
- Nassif, X., Bourdoulous, S., Eugene, E. und Couraud, P. O. (2002). **How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier?** *Trends Microbiol* 10 (5), 227-232, doi: Pii S0966-842x(02)02349-1 doi: 10.1016/S0966-842x(02)02349-1.

- Nau, R., Sorgel, F. und Eiffert, H. (2010). **Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections.** *Clin Microbiol Rev* 23 (4), 858-883, doi: 10.1128/CMR.00007-10.
- Neal, J. W. und Gasque, P. (2013). **How does the brain limit the severity of inflammation and tissue injury during bacterial meningitis?** *J Neuropathol Exp Neurol* 72 (5), 370-385, doi: 10.1097/NEN.0b013e3182909f2f.
- Nikulin, J., Panzner, U., Frosch, M. und Schubert-Unkmeir, A. (2006). **Intracellular survival and replication of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells.** *Int J Med Microbiol* 296 (8), 553-558, doi: 10.1016/j.ijmm.2006.06.006.
- Nobes, C. D., Lauritzen, I., Mattei, M. G., Paris, S., Hall, A. und Chardin, P. (1998). **A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion.** *J Cell Biol* 141 (1), 187-197, doi: 10.1083/jcb.141.1.187.
- Ong, Q., Guo, S., Zhang, K. und Cui, B. (2015). **U0126 protects cells against oxidative stress independent of its function as a MEK inhibitor.** *ACS Chem Neurosci* 6 (1), 130-137, doi: 10.1021/cn500288n.
- Orihuela, C. J., Mahdavi, J., Thornton, J., Mann, B., Wooldridge, K. G., Abouseada, N., Oldfield, N. J., Self, T., Ala'Aldeen, D. A. und Tuomanen, E. I. (2009). **Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models.** *J Clin Invest* 119 (6), 1638-1646, doi: 10.1172/JCI36759.
- Orth, K., Palmer, L. E., Bao, Z. Q., Stewart, S., Rudolph, A. E., Bliska, J. B. und Dixon, J. E. (1999). **Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector.** *Science* 285 (5435), 1920-1923, doi: 10.1126/science.285.5435.1920.
- Orton, R. J., Sturm, O. E., Vyshemirsky, V., Calder, M., Gilbert, D. R. und Kolch, W. (2005). **Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway.** *Biochem J* 392 (Pt 2), 249-261, doi: 10.1042/BJ20050908.
- Pappas, G. (2013). **Socio-economic, industrial and cultural parameters of pig-borne infections.** *Clin Microbiol Infect* 19 (7), 605-610, doi: 10.1111/1469-0691.12262.
- Paul, N. R., Jacquemet, G. und Caswell, P. T. (2015). **Endocytic Trafficking of Integrins in Cell Migration.** *Curr Biol* 25 (22), R1092-1105, doi: 10.1016/j.cub.2015.09.049.
- Peng, H., Shi, M., Zhang, L., Li, Y., Sun, J., Zhang, L., Wang, X., Xu, X., Zhang, X., Mao, Y., Ji, Y., Jiang, J. und Shi, W. (2014). **Activation of JNK1/2 and p38 MAPK signaling pathways promotes enterovirus 71 infection in immature dendritic cells.** *BMC Microbiol* 14, 147, doi: 10.1186/1471-2180-14-147.
- Perch, B., Kristjansen, P. F. und Skadhauge, K. (1968). **[Human-pathogenic Group R streptococci. 2 cases of meningitis and one case of fatal sepsis].** *Ugeskr Laeg* 130 (27), 1130-1132.
- Pfeiffer, R. (1892). **I.-Preliminary Communication on the Exciting causes of Influenza.** *Br Med J* 1 (1620), 128, doi: 10.1136/bmj.1.1620.128.

- Pittman, M. (1931). **Variation and Type Specificity in the Bacterial Species Hemophilus Influenzae**. *J Exp Med* 53 (4), 471-492, doi: 10.1084/jem.53.4.471.
- Pizarro-Cerda, J. und Cossart, P. (2006). **Bacterial adhesion and entry into host cells**. *Cell* 124 (4), 715-727, doi: 10.1016/j.cell.2006.02.012.
- Pizza, M. und Rappuoli, R. (2015). **Neisseria meningitidis: pathogenesis and immunity**. *Curr Opin Microbiol* 23, 68-72, doi: 10.1016/j.mib.2014.11.006.
- Pron, B., Taha, M. K., Rambaud, C., Fournet, J. C., Pattey, N., Monnet, J. P., Musilek, M., Beretti, J. L. und Nassif, X. (1997). **Interaction of Neisseria meningitidis with the components of the blood-brain barrier correlates with an increased expression of PilC**. *J Infect Dis* 176 (5), 1285-1292, doi: 10.1086/514124.
- Proulx, N., Frechette, D., Toye, B., Chan, J. und Kravcik, S. (2005). **Delays in the administration of antibiotics are associated with mortality from adult acute bacterial meningitis**. *QJM* 98 (4), 291-298, doi: 10.1093/qjmed/hci047.
- Pullikuth, A. K. und Catling, A. D. (2007). **Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective**. *Cell Signal* 19 (8), 1621-1632, doi: 10.1016/j.cellsig.2007.04.012.
- Puri, P. L., Wu, Z., Zhang, P., Wood, L. D., Bhakta, K. S., Han, J., Feramisco, J. R., Karin, M. und Wang, J. Y. (2000). **Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells**. *Genes Dev* 14 (5), 574-584.
- Puthenveedu, M. A. und von Zastrow, M. (2006). **Cargo regulates clathrin-coated pit dynamics**. *Cell* 127 (1), 113-124, doi: 10.1016/j.cell.2006.08.035.
- Radin, J. N., Orihuela, C. J., Murti, G., Guglielmo, C., Murray, P. J. und Tuomanen, E. I. (2005). **beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of Streptococcus pneumoniae**. *Infect Immun* 73 (12), 7827-7835, doi: 10.1128/IAI.73.12.7827-7835.2005.
- Radoshevich, L. und Cossart, P. (2018). **Listeria monocytogenes: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis**. *Nat Rev Microbiol* 16 (1), 32-46, doi: 10.1038/nrmicro.2017.126.
- Ram, S., Cox, A. D., Wright, J. C., Vogel, U., Getzlaff, S., Boden, R., Li, J. J., Plested, J. S., Meri, S., Gulati, S., Stein, D. C., Richards, J. C., Moxon, E. R. und Rice, P. A. (2003). **Neisserial lipooligosaccharide is a target for complement component C4b - Inner core phosphoethanolamine residues define C4b linkage specificity**. *J Biol Chem* 278 (51), 50853-50862, doi: 10.1074/jbc.M308364200.
- Ransohoff, R. M. und Engelhardt, B. (2012). **The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system**. *Nat Rev Immunol* 12 (9), 623-635, doi: 10.1038/nri3265.
- Rayanakorn, A., Goh, B. H., Lee, L. H., Khan, T. M. und Saokaew, S. (2018). **Risk factors for Streptococcus suis infection: A systematic review and meta-analysis**. *Sci Rep* 8 (1), 13358, doi: 10.1038/s41598-018-31598-w.

- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B. und Sallusto, F. (2009). **C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE.** *Nat Immunol* 10 (5), 514-523, doi: 10.1038/ni.1716.
- Reis, C. R., Chen, P. H., Srinivasan, S., Aguet, F., Mettlen, M. und Schmid, S. L. (2015). **Crosstalk between Akt/GSK3beta signaling and dynamin-1 regulates clathrin-mediated endocytosis.** *EMBO J* 34 (16), 2132-2146, doi: 10.15252/embj.201591518.
- Reiterer, V., Grossniklaus, L., Tschon, T., Kasper, C. A., Sorg, I. und Arrieumerlou, C. (2011). **Shigella flexneri type III secreted effector OspF reveals new crosstalks of proinflammatory signaling pathways during bacterial infection.** *Cell Signal* 23 (7), 1188-1196, doi: 10.1016/j.cellsig.2011.03.006.
- Roovers, K. und Assoian, R. K. (2000). **Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery.** *Bioessays* 22 (9), 818-826, doi: 10.1002/1521-1878(200009)22:9<818::AID-BIES7>3.0.CO;2-6.
- Rotter, B., Rodriguez, A., Krezdorn, N., Jost, L., and Winter, P. (2017). **Massive Analysis of cDNA Ends (MACE): eine effektive RNA-Seq-Variante.** *BIOspektrum Springer* 23, 58-60.
- Roux, P. P. und Blenis, J. (2004). **ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions.** *Microbiol Mol Biol Rev* 68 (2), 320-344, doi: 10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004.
- Rueda-Gensini, L., Cifuentes, J., Castellanos, M. C., Puentes, P. R., Serna, J. A., Munoz-Camargo, C. und Cruz, J. C. (2020). **Tailoring Iron Oxide Nanoparticles for Efficient Cellular Internalization and Endosomal Escape.** *Nanomaterials (Basel)* 10 (9), doi: 10.3390/nano10091816.
- Ryu, H., Chung, M., Dobrzynski, M., Fey, D., Blum, Y., Sik Lee, S., Peter, M., Kholodenko, B. N., Li Jeon, N. und Pertz, O. (2016). **Frequency modulation of ERK activation dynamics rewires cell fate.** *Mol Syst Biol* 12 (4), 866, doi: 10.15252/msb.20166982.
- Samaj, J., Baluska, F., Voigt, B., Schlicht, M., Volkmann, D. und Menzel, D. (2004). **Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling.** *Plant Physiol* 135 (3), 1150-1161, doi: 10.1104/pp.104.040683.
- Santos, S. D., Verveer, P. J. und Bastiaens, P. I. (2007). **Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate.** *Nat Cell Biol* 9 (3), 324-330, doi: 10.1038/ncb1543.
- Sathe, M., Muthukrishnan, G., Rae, J., Disanza, A., Thattai, M., Scita, G., Parton, R. G. und Mayor, S. (2018). **Small GTPases and BAR domain proteins regulate branched actin polymerisation for clathrin and dynamin-independent endocytosis.** *Nat Commun* 9 (1), 1835, doi: 10.1038/s41467-018-03955-w.
- Saunders, N. R., Habgood, M. D., Mollgard, K. und Dziegielewska, K. M. (2016). **The biological significance of brain barrier mechanisms: help or hindrance in drug delivery to the central nervous system?** *F1000Res* 5, doi: 10.12688/f1000research.7378.1.

- Schmeck, B., Beermann, W., van Laak, V., Zahlten, J., Opitz, B., Witzenrath, M., Hocke, A. C., Chakraborty, T., Kracht, M., Rosseau, S., Suttorp, N. und Hippenstiel, S. (2005). **Intracellular bacteria differentially regulated endothelial cytokine release by MAPK-dependent histone modification.** *J Immunol* 175 (5), 2843-2850, doi: 10.4049/jimmunol.175.5.2843.
- Schorey, J. S. und Cooper, A. M. (2003). **Macrophage signalling upon mycobacterial infection: the MAP kinases lead the way.** *Cell Microbiol* 5 (3), 133-142, doi: 10.1046/j.1462-5822.2003.00263.x.
- Schotte, L., Wautier, M., Martiny, D., Pierard, D. und Depypere, M. (2019). **Detection of beta-lactamase-negative ampicillin resistance in Haemophilus influenzae in Belgium.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 93 (3), 243-249, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.009.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. und Ragg, T. (2006). **The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements.** *BMC Mol Biol* 7, 3, doi: 10.1186/1471-2199-7-3.
- Schroten, M., Hanisch, F. G., Quednau, N., Stump, C., Riebe, R., Lenk, M., Wolburg, H., Tenenbaum, T. und Schwerk, C. (2012). **A novel porcine in vitro model of the blood-cerebrospinal fluid barrier with strong barrier function.** *PLoS One* 7 (6), e39835, doi: 10.1371/journal.pone.0039835.
- Schubert-Unkmeir, A., Konrad, C., Slanina, H., Czapek, F., Hebling, S. und Frosch, M. (2010). **Neisseria meningitidis induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8.** *PLoS Pathog* 6 (4), e1000874, doi: 10.1371/journal.ppat.1000874.
- Schubert-Unkmeir, A., Sokolova, O., Panzner, U., Eigenthaler, M. und Frosch, M. (2007). **Gene expression pattern in human brain endothelial cells in response to Neisseria meningitidis.** *Infect Immun* 75 (2), 899-914, doi: 10.1128/IAI.01508-06.
- Schwerk, C., Adam, R., Borkowski, J., Schneider, H., Klenk, M., Zink, S., Quednau, N., Schmidt, N., Stump, C., Sagar, A., Spellerberg, B., Tenenbaum, T., Koczan, D., Klein-Hitpass, L. und Schroten, H. (2011). **In vitro transcriptome analysis of porcine choroid plexus epithelial cells in response to Streptococcus suis: release of pro-inflammatory cytokines and chemokines.** *Microb Infect* 13 (11), 953-962, doi: 10.1016/j.micinf.2011.05.012.
- Schwerk, C., Papandreou, T., Schuhmann, D., Nickol, L., Borkowski, J., Steinmann, U., Quednau, N., Stump, C., Weiss, C., Berger, J., Wolburg, H., Claus, H., Vogel, U., Ishikawa, H., Tenenbaum, T. und Schroten, H. (2012). **Polar Invasion and Translocation of Neisseria meningitidis and Streptococcus suis in a Novel Human Model of the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier.** *Plos One* 7 (1), doi: ARTN e3006910.1371/journal.pone.0030069.
- Schwerk, C., Tenenbaum, T., Kim, K. S. und Schroten, H. (2015). **The choroid plexus-a multi-role player during infectious diseases of the CNS.** *Front Cell Neurosci* 9, doi: Unsp 8010.3389/Fncel.2015.00080.
- Scibelli, A., Roperto, S., Manna, L., Pavone, L. M., Tafuri, S., Della Morte, R. und Staiano, N. (2007). **Engagement of integrins as a cellular route of invasion by bacterial pathogens.** *Vet J* 173 (3), 482-491, doi: 10.1016/j.tvjl.2006.01.010.

- Segura, M., Aragon, V., Brockmeier, S. L., Gebhart, C., Greeff, A., Kerdsin, A., O'Dea, M. A., Okura, M., Sallery, M., Schultz, C., Valentin-Weigand, P., Weinert, L. A., Wells, J. M. und Gottschalk, M. (2020). **Update on Streptococcus suis Research and Prevention in the Era of Antimicrobial Restriction: 4th International Workshop on S. suis**. *Pathogens* 9 (5), doi: 10.3390/pathogens9050374.
- Segura, M. und Gottschalk, M. (2002a). **Streptococcus suis interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity**. *Infect Immun* 70 (8), 4312-4322, doi: 10.1128/iai.70.8.4312-4322.2002.
- Segura, M., Gottschalk, M. und Olivier, M. (2004). **Encapsulated Streptococcus suis inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis**. *Infect Immun* 72 (9), 5322-5330, doi: 10.1128/IAI.72.9.5322-5330.2004.
- Segura, M., Stankova, J. und Gottschalk, M. (1999). **Heat-killed Streptococcus suis capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages**. *Infect Immun* 67 (9), 4646-4654, doi: 10.1128/IAI.67.9.4646-4654.1999.
- Segura, M., Vadeboncoeur, N. und Gottschalk, M. (2002b). **CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by Streptococcus suis capsular type 2**. *Clin Exp Immunol* 127 (2), 243-254, doi: 10.1046/j.1365-2249.2002.01768.x.
- Selbach, M. und Backert, S. (2005). **Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens**. *Trends Microbiol* 13 (4), 181-189, doi: 10.1016/j.tim.2005.02.007.
- Seo, J. H., Lim, J. W., Kim, H. und Kim, K. H. (2004). **Helicobacter pylori in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases, AP-1, and NF-kappaB and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS cells**. *Lab Invest* 84 (1), 49-62, doi: 10.1038/sj.labinvest.3700010.
- Slanina, H., Hebling, S., Hauck, C. R. und Schubert-Unkmeir, A. (2012). **Cell invasion by Neisseria meningitidis requires a functional interplay between the focal adhesion kinase, Src and cortactin**. *PLoS One* 7 (6), e39613, doi: 10.1371/journal.pone.0039613.
- Slanina, H., Konig, A., Hebling, S., Hauck, C. R., Frosch, M. und Schubert-Unkmeir, A. (2010). **Entry of Neisseria meningitidis into mammalian cells requires the Src family protein tyrosine kinases**. *Infect Immun* 78 (5), 1905-1914, doi: 10.1128/IAI.01267-09.
- Smith, H. E., Damman, M., van der Velde, J., Wagenaar, F., Wisselink, H. J., Stockhofe-Zurwieden, N. und Smits, M. A. (1999). **Identification and characterization of the cps locus of Streptococcus suis serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor**. *Infect Immun* 67 (4), 1750-1756.
- Sokolova, O., Heppel, N., Jagerhuber, R., Kim, K. S., Frosch, M., Eigenthaler, M. und Schubert-Unkmeir, A. (2004). **Interaction of Neisseria meningitidis with human brain microvascular endothelial cells: role of MAP- and tyrosine kinases in invasion and inflammatory cytokine release**. *Cell Microbiol* 6 (12), 1153-1166, doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00422.x.



- Sorkin, A. und von Zastrow, M. (2009). **Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (9), 609-622, doi: 10.1038/nrm2748.
- Souza-Moreira, L., Campos-Salinas, J., Caro, M. und Gonzalez-Rey, E. (2011). **Neuropeptides as pleiotropic modulators of the immune response**. *Neuroendocrinology* 94 (2), 89-100, doi: 10.1159/000328636.
- Spinosa, M. R., Progida, C., Tala, A., Cogli, L., Alifano, P. und Bucci, C. (2007). **The Neisseria meningitidis capsule is important for intracellular survival in human cells**. *Infect Immun* 75 (7), 3594-3603, doi: 10.1128/IAI.01945-06.
- Sprenger, H., Rosler, A., Tonn, P., Braune, H. J., Huffmann, G. und Gemsa, D. (1996). **Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis**. *Clin Immunol Immunopathol* 80 (2), 155-161, doi: 10.1006/clin.1996.0109.
- St Geme, J. W., 3rd und Falkow, S. (1991). **Loss of capsule expression by Haemophilus influenzae type b results in enhanced adherence to and invasion of human cells**. *Infect Immun* 59 (4), 1325-1333.
- Stephens, D. S. (2009). **Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium Neisseria meningitidis**. *Vaccine* 27 Suppl 2, B71-77, doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.070.
- Stephens, D. S., Edwards, K. M., Morris, F. und McGee, Z. A. (1982). **Pili and outer membrane appendages on Neisseria meningitidis in the cerebrospinal fluid of an infant**. *J Infect Dis* 146 (4), 568, doi: 10.1093/infdis/146.4.568.
- Stephens, D. S., Greenwood, B. und Brandtzaeg, P. (2007). **Epidemic meningitis, meningococcaemia, and Neisseria meningitidis**. *Lancet* 369 (9580), 2196-2210, doi: 10.1016/S0140-6736(07)61016-2.
- Stradal, T. E. B. und Schelhaas, M. (2018). **Actin dynamics in host-pathogen interaction**. *Febs Lett* 592 (22), 3658-3669, doi: 10.1002/1873-3468.13173.
- Sullivan, T. D., Lascolea, L. J. und Neter, E. (1982). **Relationship between the Magnitude of Bacteremia in Children and the Clinical-Disease**. *Pediatrics* 69 (6), 699-702.
- Sun, Y., Li, N., Zhang, J., Liu, H., Liu, J., Xia, X., Sun, C., Feng, X., Gu, J., Du, C., Han, W. und Lei, L. (2016). **Enolase of Streptococcus Suis Serotype 2 Enhances Blood-Brain Barrier Permeability by Inducing IL-8 Release**. *Inflammation* 39 (2), 718-726, doi: 10.1007/s10753-015-0298-7.
- Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R. und Zlokovic, B. V. (2019). **Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back**. *Physiol Rev* 99 (1), 21-78, doi: 10.1152/physrev.00050.2017.
- Swords, W. E., Ketterer, M. R., Shao, J., Campbell, C. A., Weiser, J. N. und Apicella, M. A. (2001). **Binding of the non-typeable Haemophilus influenzae lipooligosaccharide to the PAF receptor initiates host cell signalling**. *Cell Microbiol* 3 (8), 525-536.
- Szmydynger-Chodobska, J., Strazielle, N., Zink, B. J., Ghersi-Egea, J. F. und Chodobski, A. (2009). **The role of the choroid plexus in neutrophil invasion after traumatic brain injury**. *J Cereb Blood Flow Metab* 29 (9), 1503-1516, doi: 10.1038/jcbfm.2009.71.

- Taha, M. K., Deghmane, A. E., Antignac, A., Zarantonelli, M. L., Larribe, M. und Alonso, J. M. (2002). **The duality of virulence and transmissibility in *Neisseria meningitidis***. *Trends Microbiol* 10 (8), 376-382, doi: 10.1016/s0966-842x(02)02402-2.
- Takahashi, K., Satoh, F., Hara, E., Murakami, O., Kumabe, T., Tominaga, T., Kayama, T., Yoshimoto, T. und Shibahara, S. (1997). **Production and secretion of adrenomedullin by cultured choroid plexus carcinoma cells**. *J Neurochem* 68 (2), 726-731, doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.68020726.x.
- Takaishi, K., Ohtsuka, T., Tsuneyoshi, S., Maehara, N., Harada, M., Yoshida, H., Watanabe, K. und Tsurufuji, S. (2000). **Inhibition of the production of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1, a member of the interleukin-8 family, by adenovirus-mediated overexpression of IkappaBalpha**. *J Biochem* 127 (3), 511-516, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022634.
- Tang, J., Wang, C., Feng, Y., Yang, W., Song, H., Chen, Z., Yu, H., Pan, X., Zhou, X., Wang, H., Wu, B., Wang, H., Zhao, H., Lin, Y., Yue, J., Wu, Z., He, X., Gao, F., Khan, A. H., Wang, J., Zhao, G. P., Wang, Y., Wang, X., Chen, Z. und Gao, G. F. (2006). **Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2**. *PLoS Med* 3 (5), e151, doi: 10.1371/journal.pmed.0030151.
- Tauber, M. G. und Moser, B. (1999). **Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications**. *Clin Infect Dis* 28 (1), 1-11; quiz 12, doi: 10.1086/515079.
- Temmesfeld-Wollbruck, B., Hocke, A. C., Suttorp, N. und Hippenstiel, S. (2007). **Adrenomedullin and endothelial barrier function**. *Thromb Haemost* 98 (5), 944-951, doi: 10.1160/th07-02-0128.
- Tenenbaum, T., Papandreou, T., Gellrich, D., Friedrichs, U., Seibt, A., Adam, R., Wewer, C., Galla, H. J., Schwerk, C. und Schroten, H. (2009). **Polar bacterial invasion and translocation of *Streptococcus suis* across the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro**. *Cell Microbiol* 11 (2), 323-336, doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01255.x.
- Terrell, E. M. und Morrison, D. K. (2019). **Ras-Mediated Activation of the Raf Family Kinases**. *Cold Spring Harb Perspect Med* 9 (1), doi: 10.1101/cshperspect.a033746.
- Tietz, S. und Engelhardt, B. (2015). **Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions**. *J Cell Biol* 209 (4), 493-506, doi: 10.1083/jcb.201412147.
- Tsutsumi, M., Skinner, M. K. und Sanders-Bush, E. (1989). **Transferrin gene expression and synthesis by cultured choroid plexus epithelial cells. Regulation by serotonin and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate**. *J Biol Chem* 264 (16), 9626-9631.
- Tzeng, Y. L., Thomas, J. und Stephens, D. S. (2016). **Regulation of capsule in *Neisseria meningitidis***. *Crit Rev Microbiol* 42 (5), 759-772, doi: 10.3109/1040841X.2015.1022507.
- Unkmeir, A., Latsch, K., Dietrich, G., Wintermeyer, E., Schinke, B., Schwender, S., Kim, K. S., Eigenthaler, M. und Frosch, M. (2002). **Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells**. *Mol Microbiol* 46 (4), 933-946.

- Vadeboncoeur, N., Segura, M., Al-Numani, D., Vanier, G. und Gottschalk, M. (2003). **Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by Streptococcus suis serotype 2**. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 35 (1), 49-58, doi: PII S0928-8244(02)00440-6 DOI 10.1111/j.1574-695X.2003.tb00648.x.
- van Ettekovén, C. N., van de Beek, D. und Brouwer, M. C. (2017). **Update on community-acquired bacterial meningitis: guidance and challenges**. *Clin Microbiol Infect* 23 (9), 601-606, doi: 10.1016/j.cmi.2017.04.019.
- van Ham, S. M., van Alphen, L., Mooi, F. R. und van Putten, J. P. (1993). **Phase variation of H. influenzae fimbriae: transcriptional control of two divergent genes through a variable combined promoter region**. *Cell* 73 (6), 1187-1196, doi: 10.1016/0092-8674(93)90647-9.
- van Ketel, R. J., de Wever, B. und van Alphen, L. (1990). **Detection of Haemophilus influenzae in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification**. *J Med Microbiol* 33 (4), 271-276, doi: 10.1099/00222615-33-4-271.
- van Sorge, N. M. und Doran, K. S. (2012). **Defense at the border: the blood-brain barrier versus bacterial foreigners**. *Future Microbiol* 7 (3), 383-394, doi: 10.2217/Fmb.12.1.
- van Sorge, N. M., Zialcita, P. A., Browne, S. H., Quach, D., Guiney, D. G. und Doran, K. S. (2011). **Penetration and activation of brain endothelium by Salmonella enterica serovar Typhimurium**. *J Infect Dis* 203 (3), 401-405, doi: 10.1093/infdis/jiq048.
- Vanalphen, L., Vandenberghe, N. und Geelenvandenbroek, L. (1988). **Interaction of Hemophilus-Influenzae with Human-Erythrocytes and Oropharyngeal Epithelial-Cells Is Mediated by a Common Fimbrial Epitope**. *Infect Immun* 56 (7), 1800-1806.
- Vandehaute, E., Stump-Guthier, C., Laserra Losada, M., Tenenbaum, T., Rudolph, H., Ishikawa, H., Schwerk, C., Schrotten, H., Durken, M., Marz, M. und Karremann, M. (2015). **The choroid plexus may be an underestimated site of tumor invasion to the brain: an in vitro study using neuroblastoma cell lines**. *Cancer Cell Int* 15, 102, doi: 10.1186/s12935-015-0257-2.
- Vanier, G., Segura, M., Friedl, P., Lacouture, S. und Gottschalk, M. (2004). **Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by Streptococcus suis serotype 2**. *Infect Immun* 72 (3), 1441-1449, doi: 10.1128/iai.72.3.1441-1449.2004.
- Vanier, G., Segura, M. und Gottschalk, M. (2007). **Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by Streptococcus suis serotype 2**. *Can J Vet Res* 71 (2), 81-89.
- Vecht, U., Wisselink, H. J., Jellema, M. L. und Smith, H. E. (1991). **Identification of two proteins associated with virulence of Streptococcus suis type 2**. *Infect Immun* 59 (9), 3156-3162.
- Vercellino, M., Votta, B., Condello, C., Piacentino, C., Romagnolo, A., Merola, A., Capello, E., Mancardi, G. L., Mutani, R., Giordana, M. T. und Cavalla, P. (2008). **Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: a neuropathological study**. *J Neuroimmunol* 199 (1-2), 133-141, doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.04.035.

- Virji, M. (2009). **Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control**. *Nat Rev Microbiol* 7 (4), 274-286, doi: 10.1038/nrmicro2097.
- Virji, M., Makepeace, K., Peak, I. R., Ferguson, D. J., Jennings, M. P. und Moxon, E. R. (1995). **Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides**. *Mol Microbiol* 18 (4), 741-754, doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi\_18040741.x.
- Vogel, U. und Claus, H. (2011). **Vaccine development against *Neisseria meningitidis***. *Microb Biotechnol* 4 (1), 20-31, doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00178.x.
- Vogel, U., Morelli, G., Zurth, K., Claus, H., Kriener, E., Achtman, M. und Frosch, H. (1999). **Necessity of molecular techniques to distinguish between *Neisseria meningitidis* strains isolated from patients with meningococcal disease and from their healthy contacts (vol 36, pg 2465, 1998)**. *J Clin Microbiol* 37 (3), 882-882.
- Walpole, G. F. W. und Grinstein, S. (2020). **Endocytosis and the internalization of pathogenic organisms: focus on phosphoinositides**. *F1000Res* 9, doi: 10.12688/f1000research.22393.1.
- Wang, J. Z., Long, C., Li, K. Y., Xu, H. T., Yuan, L. L. und Wu, G. Y. (2018). **Potent block of potassium channels by MEK inhibitor U0126 in primary cultures and brain slices**. *Sci Rep* 8 (1), 8808, doi: 10.1038/s41598-018-27235-1.
- Wang, S., Peng, L., Gai, Z., Zhang, L., Jong, A., Cao, H. und Huang, S. H. (2016). **Pathogenic Triad in Bacterial Meningitis: Pathogen Invasion, NF-kappaB Activation, and Leukocyte Transmigration that Occur at the Blood-Brain Barrier**. *Front Microbiol* 7, 148, doi: 10.3389/fmicb.2016.00148.
- Watt, J. P., Wolfson, L. J., O'Brien, K. L., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Levine, O. S., Hajjeh, R., Mulholland, K., Cherian, T. und Dis, H. P. G. B. (2009). **Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 years: global estimates**. *Lancet* 374 (9693), 903-911, doi: 10.1016/S0140-6736(09)61203-4.
- Wegele, C., Stump-Guthier, C., Moroniak, S., Weiss, C., Rohde, M., Ishikawa, H., Schroten, H., Schwerk, C., Karremann, M. und Borkowski, J. (2020). **Non-Typeable *Haemophilus influenzae* Invade Choroid Plexus Epithelial Cells in a Polar Fashion**. *Int J Mol Sci* 21 (16), doi: 10.3390/ijms21165739.
- Weiglein, I., Goebel, W., Troppmair, J., Rapp, U. R., Demuth, A. und Kuhn, M. (1997). ***Listeria monocytogenes* infection of HeLa cells results in listeriolysin O-mediated transient activation of the Raf-MEK-MAP kinase pathway**. *Fems Microbiol Lett* 148 (2), 189-195, doi: 10.1016/S0378-1097(97)00032-3.
- Wen, S., Feng, D., Chen, D., Yang, L. und Xu, Z. (2020). **Molecular epidemiology and evolution of *Haemophilus influenzae***. *Infect Genet Evol* 80, 104205, doi: 10.1016/j.meegid.2020.104205.
- Wertheim, H. F., Nghia, H. D., Taylor, W. und Schultz, C. (2009). ***Streptococcus suis*: an emerging human pathogen**. *Clin Infect Dis* 48 (5), 617-625, doi: 10.1086/596763.
- Wewer, C., Seibt, A., Wolburg, H., Greune, L., Schmidt, M. A., Berger, J., Galla, H. J., Quitsch, U., Schwerk, C., Schroten, H. und Tenenbaum, T. (2011). **Transcellular migration of**

- neutrophil granulocytes through the blood-cerebrospinal fluid barrier after infection with *Streptococcus suis***. *J Neuroinflamm* 8, doi: Artn 51 doi:10.1186/1742-2094-8-51.
- Wichgers Schreur, P. J., Rebel, J. M., Smits, M. A., van Putten, J. P. und Smith, H. E. (2010). **Differential activation of the Toll-like receptor 2/6 complex by lipoproteins of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9**. *Vet Microbiol* 143 (2-4), 363-370, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.010.
- Willenborg, J., Fulde, M., de Greeff, A., Rohde, M., Smith, H. E., Valentin-Weigand, P. und Goethe, R. (2011). **Role of glucose and CcpA in capsule expression and virulence of *Streptococcus suis***. *Microbiology-Sgm* 157, 1823-1833, doi: 10.1099/mic.0.046417-0.
- Winkler, F., Kastenbauer, S., Koedel, U. und Pfister, H. W. (2002). **Role of the urokinase plasminogen activator system in patients with bacterial meningitis**. *Neurology* 59 (9), 1350-1355, doi: 10.1212/01.wnl.0000031427.81898.96.
- Wispelwey, B., Hansen, E. J. und Scheld, W. M. (1989). **Haemophilus influenzae outer membrane vesicle-induced blood-brain barrier permeability during experimental meningitis**. *Infect Immun* 57 (8), 2559-2562.
- Wispelwey, B., Lesse, A. J., Hansen, E. J. und Scheld, W. M. (1988). **Haemophilus influenzae lipopolysaccharide-induced blood brain barrier permeability during experimental meningitis in the rat**. *J Clin Invest* 82 (4), 1339-1346, doi: 10.1172/JCI113736.
- Wolburg, H. und Paulus, W. (2010). **Choroid plexus: biology and pathology**. *Acta Neuropathol* 119 (1), 75-88, doi: 10.1007/s00401-009-0627-8.
- Wolburg, K., Gerhardt, H., Schulz, M., Wolburg, H. und Engelhardt, B. (1999). **Ultrastructural localization of adhesion molecules in the healthy and inflamed choroid plexus of the mouse**. *Cell Tissue Res* 296 (2), 259-269, doi: 10.1007/s004410051287.
- Wright, W. F., Pinto, C. N., Palisoc, K. und Baghli, S. (2019). **Viral (aseptic) meningitis: A review**. *J Neurol Sci* 398, 176-183, doi: 10.1016/j.jns.2019.01.050.
- Wu, Z. F., Wu, C. Y., Shao, J., Zhu, Z. Z., Wang, W. X., Zhang, W. W., Tang, M., Pei, N., Fan, H. J., Li, J. G., Yao, H. C., Gu, H. W., Xu, X. und Lu, C. P. (2014). **The *Streptococcus suis* transcriptional landscape reveals adaptation mechanisms in pig blood and cerebrospinal fluid**. *Rna* 20 (6), 882-898, doi: 10.1261/rna.041822.113.
- Xiao, G. Y., Mohanakrishnan, A. und Schmid, S. L. (2018). **Role for ERK1/2-dependent activation of FCHSD2 in cancer cell-selective regulation of clathrin-mediated endocytosis**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115 (41), E9570-E9579, doi: 10.1073/pnas.1810209115.
- Xing, Z., Cardona, C. J., Anunciacion, J., Adams, S. und Dao, N. (2010). **Roles of the ERK MAPK in the regulation of proinflammatory and apoptotic responses in chicken macrophages infected with H9N2 avian influenza virus**. *J Gen Virol* 91 (Pt 2), 343-351, doi: 10.1099/vir.0.015578-0.

- Yamamoto, M. und Takeda, K. (2008). **Role of nuclear I $\kappa$ B proteins in the regulation of host immune responses.** *J Infect Chemother* 14 (4), 265-269, doi: 10.1007/s10156-008-0619-y.
- Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saitoh, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Yamamoto, S., Muta, T., Takeda, K. und Akira, S. (2004). **Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I $\kappa$ B $\zeta$ .** *Nature* 430 (6996), 218-222, doi: 10.1038/nature02738.
- Yoshioka, M., Fukuishi, N., Iriguchi, S., Ohsaki, K., Yamanobe, H., Inukai, A., Kurihara, D., Imajo, N., Yasui, Y., Matsui, N., Tsujita, T., Ishii, A., Seya, T., Takahama, M. und Akagi, M. (2007). **Lipoteichoic acid downregulates Fc $\epsilon$ RI expression on human mast cells through Toll-like receptor 2.** *J Allergy Clin Immunol* 120 (2), 452-461, doi: 10.1016/j.jaci.2007.03.027.
- Yu, G. und He, Q. Y. (2016). **ReactomePA: an R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization.** *Mol Biosyst* 12 (2), 477-479, doi: 10.1039/c5mb00663e.
- Yu, G., Wang, L. G., Han, Y. und He, Q. Y. (2012). **clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters.** *OMICS* 16 (5), 284-287, doi: 10.1089/omi.2011.0118.
- Yu, H., Jing, H., Chen, Z., Zheng, H., Zhu, X., Wang, H., Wang, S., Liu, L., Zu, R., Luo, L., Xiang, N., Liu, H., Liu, X., Shu, Y., Lee, S. S., Chuang, S. K., Wang, Y., Xu, J., Yang, W. und Streptococcus suis study, g. (2006). **Human Streptococcus suis outbreak, Sichuan, China.** *Emerg Infect Dis* 12 (6), 914-920, doi: 10.3201/eid1206.051194.
- Zehorai, E. und Seger, R. (2019). **Beta-Like Importins Mediate the Nuclear Translocation of MAPKs.** *Cell Physiol Biochem* 52 (4), 802-821, doi: 10.33594/000000056.
- Zhang, L., Wang, J., Xu, W., Sun, Y., You, J., Lu, H., Song, Y., Wei, J. und Li, L. (2018). **Magnolol inhibits Streptococcus suis-induced inflammation and ROS formation via TLR2/MAPK/NF- $\kappa$ B signaling in RAW264.7 cells.** *Pol J Vet Sci* 21 (1), 111-118, doi: 10.24425/119028.
- Zhang, Y. Y., Mei, Z. Q., Wu, J. W. und Wang, Z. X. (2008). **Enzymatic activity and substrate specificity of mitogen-activated protein kinase p38 $\alpha$  in different phosphorylation states.** *J Biol Chem* 283 (39), 26591-26601, doi: 10.1074/jbc.M801703200.
- Zheng, W. und Zhao, Q. (2002). **Establishment and characterization of an immortalized Z310 choroidal epithelial cell line from murine choroid plexus.** *Brain Res* 958 (2), 371-380, doi: 10.1016/s0006-8993(02)03683-1.
- Zwijnenburg, P. J., van der Poll, T., Roord, J. J. und van Furth, A. M. (2006). **Chemotactic factors in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis.** *Infect Immun* 74 (3), 1445-1451, doi: 10.1128/IAI.74.3.1445-1451.2006.

## Anhang

**Tabelle 16: Zusammenfassung der DEG der MACE Analyse** Untersucht wurden die Expressionsprofile der HIBCPP-Zellen nach Infektion mit den *NmB* und *NmC* Stämmen. DEG wurden durch Vergleich der jeweiligen Kontrollzellen (Kon) und den behandelten, infizierten Zellen erstellt wie angegeben. Die Dargestellten Listen der DEG wurden nach einem FDR p-Wert < 0,05 gefiltert, sowie einem *fold change* +/- 4 ( $\log_2$  *fold change* +/- 2).

Kon vs. MC58			
Gensymbol	Genname	Fold change	FDR p-Wert
IL1B	interleukin 1 beta	64,65	0,001022
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	23,85	0,000000
IL17C	interleukin 17C	22,48	0,000000
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	20,76	0,000000
TNF	tumor necrosis factor	18,47	0,000000
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1	15,80	0,000000
CXCL3	C-X-C motif chemokine ligand 3	14,48	0,000000
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	14,03	0,000000
NFKBIZ	NFKB inhibitor zeta	13,60	0,000000
CSF2	colony stimulating factor 2	13,01	0,000008
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2	12,47	0,000001
IL1A	interleukin 1 alpha	11,74	0,015505
ZC3H12A	zinc finger CCCH-type containing 12A	11,63	0,000000
TCIM	transcriptional and immune response regulator	9,73	0,000000
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	9,68	0,000000
RND1	Rho family GTPase 1	9,04	0,000000
CXCL6	C-X-C motif chemokine ligand 6	7,92	0,000000
CYP24A1	cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1	7,64	0,000000
NFKBIA	NFKB inhibitor alpha	7,46	0,000000
TNFAIP2	TNF alpha induced protein 2	7,24	0,000000
IL23A	interleukin 23 subunit alpha	6,10	0,000004
LIF	LIF interleukin 6 family cytokine	5,97	0,000000
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	5,89	0,000000
ANGPTL4	angiopoietin like 4	5,69	0,000000
ZFP36	ZFP36 ring finger protein	5,19	0,000000
C6orf222		4,98	0,021321
CX3CL1	C-X3-C motif chemokine ligand 1	4,96	0,025366
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	4,94	0,000000
IER3	immediate early response 3	4,60	0,000000
SLC6A14	solute carrier family 6 member 14	4,59	0,000000
LTB	lymphotoxin beta	4,50	0,000000
CEBPD	CCAAT enhancer binding protein delta	4,40	0,000000
SOD2	superoxide dismutase 2	4,30	0,000000
MAFF	MAF bZIP transcription factor F	4,21	0,000000

Kon vs. MC58siaD			
Gensymbol	Genename	Fold change	FDR p-Wert
IL1B	interleukin 1 beta	77,58	0,000399
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	28,72	0,000000
IL17C	interleukin 17C	20,25	0,000000
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	19,03	0,000000
TNF	tumor necrosis factor	17,79	0,000000
IL6	interleukin 6	16,49	0,016260
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1	16,35	0,000000
CSF2	colony stimulating factor 2	15,08	0,000001
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	14,45	0,000000
CXCL3	C-X-C motif chemokine ligand 3	14,37	0,000000
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2	13,89	0,000000
IL1A	interleukin 1 alpha	11,61	0,015914
NFKBIZ	NFKB inhibitor zeta	11,15	0,000000
TCIM	transcriptional and immune response regulator	10,53	0,000000

ZC3H12A	zinc finger CCCH-type containing 12A	10,14	0,000000
CXCL6	C-X-C motif chemokine ligand 6	9,75	0,000000
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	9,46	0,000000
RND1	Rho family GTPase 1	9,08	0,000000
CYP24A1	cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1	8,70	0,000000
IL23A	interleukin 23 subunit alpha	8,24	0,000000
TNFAIP2	TNF alpha induced protein 2	7,81	0,000000
NFKBIA	NFKB inhibitor alpha	7,34	0,000000
SPIB	Spi-B transcription factor	6,49	0,022577
RASD1	ras related dexamethasone induced 1	6,34	0,039433
IGFBP1	insulin like growth factor binding protein 1	6,27	0,036090
LTB	lymphotoxin beta	5,92	0,000000
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	5,68	0,000000
ADORA2A	adenosine A2a receptor	5,44	0,000219
ANGPTL4	angiopoietin like 4	5,34	0,000000
SOD2	superoxide dismutase 2	5,21	0,000000
LIF	LIF interleukin 6 family cytokine	5,01	0,000000
SLC6A14	solute carrier family 6 member 14	4,97	0,000000
CSF1	colony stimulating factor 1	4,77	0,003530
PI3	peptidase inhibitor 3	4,73	0,014113
SERPINA3	serpin family A member 3	4,71	0,000000
IER3	immediate early response 3	4,60	0,000000
CX3CL1	C-X3-C motif chemokine ligand 1	4,59	0,044719
ZFP36	ZFP36 ring finger protein	4,48	0,000003
CEBPD	CCAAT enhancer binding protein delta	4,47	0,000000
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	4,45	0,000000
TNFRSF6B	TNF receptor superfamily member 6b	4,44	0,000000
HILPDA	hypoxia inducible lipid droplet associated	4,27	0,000000
MAFF	MAF bZIP transcription factor F	4,13	0,000000

Kon vs. Kon + U0126			
Gensymbol	Genename	Fold change	FDR p-Wert
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	9,73	0,000000
CLDN2	claudin 2	9,47	0,000275
ANKRD37	ankyrin repeat domain 37	7,72	0,000000
EGR1	early growth response 1	6,78	0,044671
ETV5	ETS variant transcription factor 5	6,52	0,000004
ANGPTL4	angiopoietin like 4	4,17	0,000005
CYP1B1	cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1	-4,20	0,000000
LOC105374986		-5,01	0,000105
TNFSF12	TNF superfamily member 12	-5,03	0,006733
VASN	vasorin	-5,41	0,000403
NUPR1	nuclear protein 1, transcriptional regulator	-5,76	0,000908
SECTM1	secreted and transmembrane 1	-6,30	0,000001
AHRR	aryl-hydrocarbon receptor repressor	-7,48	0,000000
BMF	Bcl2 modifying factor	-13,19	0,000000

Kon + U0126 vs. MC58 + U0126			
Gensymbol	Genename	Fold change	FDR p-Wert
IL17C	interleukin 17C	79,66	0,000425
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	20,68	0,000000
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	20,30	0,000000
TNF	tumor necrosis factor	18,21	0,000000
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1	16,79	0,000000
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	16,17	0,000000
CXCL3	C-X-C motif chemokine ligand 3	15,66	0,000000
ZC3H12A	zinc finger CCCH-type containing 12A	12,04	0,000000
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2	11,80	0,000000
ANKRD37	ankyrin repeat domain 37	10,05	0,000000
NFKBIZ	NFKB inhibitor zeta	8,18	0,000000



<b>ICAM1</b>	intercellular adhesion molecule 1	7,98	0,000000
<b>CXCL6</b>	C-X-C motif chemokine ligand 6	7,67	0,000000
<b>ANGPTL4</b>	angiopoietin like 4	7,59	0,000000
<b>NFKBIA</b>	NFKB inhibitor alpha	7,33	0,000000
<b>RND1</b>	Rho family GTPase 1	7,02	0,000000
<b>ADORA2A</b>	adenosine A2a receptor	6,91	0,014927
<b>TCIM</b>	transcriptional and immune response regulator	6,77	0,000000
<b>ADM</b>	adrenomedullin	6,36	0,000000
<b>PFKFB4</b>	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	6,34	0,000000
<b>CX3CL1</b>	C-X3-C motif chemokine ligand 1	6,12	0,003608
<b>C6orf222</b>		5,77	0,006118
<b>MIR210HG</b>	MIR210 host gene	5,63	0,000105
<b>TNFAIP2</b>	TNF alpha induced protein 2	5,59	0,000000
<b>IL4I1</b>	interleukin 4 induced 1	5,48	0,000001
<b>CXCL10</b>	C-X-C motif chemokine ligand 10	5,40	0,011115
<b>TNFAIP3</b>	TNF alpha induced protein 3	5,03	0,000000
<b>FBXL8</b>	F-box and leucine rich repeat protein 8	4,75	0,041838
<b>BHLHE40</b>	basic helix-loop-helix family member e40	4,36	0,000000
<b>SOD2</b>	superoxide dismutase 2	4,09	0,000000
<b>CEBPD</b>	CCAAT enhancer binding protein delta	4,01	0,000000

<b>Kon + U0126 vs. MC58siaD + U0126</b>			
<b>Gensymbol</b>	<b>Genename</b>	<b>Fold change</b>	<b>FDR p-Wert</b>
<b>IL17C</b>	interleukin 17C	190,68	0,000002
<b>IL1B</b>	interleukin 1 beta	56,80	0,002956
<b>CCL20</b>	C-C motif chemokine ligand 20	37,32	0,000000
<b>IL1A</b>	interleukin 1 alpha	28,19	0,003607
<b>CXCL8</b>	C-X-C motif chemokine ligand 8	26,67	0,000000
<b>CXCL2</b>	C-X-C motif chemokine ligand 2	26,60	0,000000
<b>TNF</b>	tumor necrosis factor	26,58	0,000000
<b>CXCL1</b>	C-X-C motif chemokine ligand 1	25,62	0,000000
<b>CCL2</b>	C-C motif chemokine ligand 2	22,91	0,000000
<b>CXCL3</b>	C-X-C motif chemokine ligand 3	21,85	0,000000
<b>CSF2</b>	colony stimulating factor 2	15,09	0,000273
<b>ZC3H12A</b>	zinc finger CCCH-type containing 12A	14,27	0,000000
<b>CXCL6</b>	C-X-C motif chemokine ligand 6	13,31	0,000000
<b>ANKRD37</b>	ankyrin repeat domain 37	12,78	0,000000
<b>ADORA2A</b>	adenosine A2a receptor	11,67	0,000061
<b>ICAM1</b>	intercellular adhesion molecule 1	11,60	0,000000
<b>RND1</b>	Rho family GTPase 1	11,45	0,000000
<b>ANGPTL4</b>	angiopoietin like 4	10,50	0,000000
<b>TCIM</b>	transcriptional and immune response regulator	10,40	0,000000
<b>IL4I1</b>	interleukin 4 induced 1	9,49	0,000000
<b>NFKBIA</b>	NFKB inhibitor alpha	9,29	0,000000
<b>CXCL10</b>	C-X-C motif chemokine ligand 10	8,81	0,000033
<b>NFKBIZ</b>	NFKB inhibitor zeta	8,80	0,000000
<b>CX3CL1</b>	C-X3-C motif chemokine ligand 1	8,78	0,000034
<b>NOS2</b>	nitric oxide synthase 2	8,64	0,023055
<b>IL6</b>	interleukin 6	8,56	0,016570
<b>TNFAIP2</b>	TNF alpha induced protein 2	8,00	0,000000
<b>SAA2</b>	serum amyloid A2	7,67	0,015618
<b>C6orf222</b>		7,67	0,000176
<b>GFPT2</b>	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	7,60	0,009101
<b>PFKFB4</b>	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	7,43	0,000000
<b>ADM</b>	adrenomedullin	7,28	0,000000
<b>IL23A</b>	interleukin 23 subunit alpha	7,28	0,000004
<b>TNFRSF6B</b>	TNF receptor superfamily member 6b	7,26	0,000000
<b>SOD2</b>	superoxide dismutase 2	7,17	0,000000
<b>MIR210HG</b>	MIR210 host gene	6,90	0,000003
<b>CHAC1</b>	ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1	6,48	0,000065
<b>SERPINA3</b>	serpin family A member 3	6,36	0,000000
<b>SLC6A14</b>	solute carrier family 6 member 14	6,04	0,000000

<b>ANKK1</b>	ankyrin repeat and kinase domain containing 1	5,99	0,001924
<b>LTB</b>	lymphotoxin beta	5,95	0,000000
<b>TNFAIP3</b>	TNF alpha induced protein 3	5,48	0,000000
<b>G0S2</b>	G0/G1 switch 2	5,46	0,000000
<b>ZC3H12C</b>	zinc finger CCCH-type containing 12C	5,44	0,039084
<b>LOC101929444</b>		5,29	0,000252
<b>HILPDA</b>	hypoxia inducible lipid droplet associated	4,99	0,000000
<b>CEBPD</b>	CCAAT enhancer binding protein delta	4,97	0,000000
<b>TNFRSF11B</b>	TNF receptor superfamily member 11b	4,90	0,000006
<b>EGLN3</b>	egl-9 family hypoxia inducible factor 3	4,70	0,000000
<b>CYP24A1</b>	cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1	4,63	0,000000
<b>PI3</b>	peptidase inhibitor 3	4,62	0,021402
<b>PFKFB3</b>	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	4,59	0,000000
<b>RCAN1</b>	regulator of calcineurin 1	4,54	0,000000
<b>PTGS2</b>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	4,50	0,000002
<b>BHLHE40</b>	basic helix-loop-helix family member e40	4,38	0,000000
<b>PLAU</b>	plasminogen activator, urokinase	4,02	0,000000

**Tabelle 17: Zusammenfassung der Regulierten Proteine nach Phosphoproteomik Analyse der mit *NmB* infizierten HIBCPP-Zellen.** Die Listen wurden nach einem p-Wert < 0,05 gefiltert und dienen als Basis der *Enrichment* Analysen.

MC58 vs. Kon: Protein ID	Gensymbol	Genname	Fold change	Log <sub>2</sub> Fold change	p-Wert	Adj. p-Wert
P26651 1xPhospho [S60(99.6)]	ZFP36	ZFP36 ring finger protein	3,53	1,82	3,4 x10 <sup>-6</sup>	0,001902
Q14764 1xPhospho [S445(100)]	MVP	major vault protein	3,17	1,66	4,06 x10 <sup>-8</sup>	6,83E-05
P26651 1xPhospho [S186(100)]	ZFP36	ZFP36 ring finger protein	2,98	1,57	2,85 x10 <sup>-5</sup>	0,005202
Q16539 2xPhospho [T180(100); Y182(100)]	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	2,74	1,45	0,000148	0,020777
Q8ND04 1xPhospho [S742(99.7)]	SMG8	SMG8 nonsense mediated mRNA decay factor	2,64	1,40	0,00048	0,042477
Q92844 1xPhospho [S208(100)]	TANK	TRAF family member associated NFKB activator	2,54	1,34	5,8 x10 <sup>-6</sup>	0,002198
O75420 1xPhospho [S638(100)]			2,50	1,32	6,63 x10 <sup>-6</sup>	0,002198
Q8IY17 1xPhospho [S420(100)]	PNPLA6		2,49	1,32	1,34 x10 <sup>-5</sup>	0,003228
Q6ZRS2 1xPhospho [S2725(99.7)]	SRCAP	Snf2 related CREBBP activator protein	2,36	1,24	2,84 x10 <sup>-5</sup>	0,005202
Q6PJT7 1xPhospho [S343(100)]	ZC3H14	zinc finger CCCH-type containing 14	2,35	1,23	0,002558	0,122778
Q9H307 1xPhospho [S66(100)]	PNN	pinin, desmosome associated protein	2,32	1,21	7,85 x10 <sup>-6</sup>	0,002198
P78347 1xPhospho [S412(100)]	GTF2I	general transcription factor Iii	2,18	1,12	0,000641	0,053862
P04792 1xPhospho [S82(99.8)]	HSPB1	heat shock protein family B (small) member 1	2,11	1,08	0,000239	0,028624
Q15154 1xPhospho [S93(100)]	PCM1	pericentriolar material 1	2,06	1,04	0,013799	0,335973
P05412 1xPhospho [S63(99.7)]	JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	1,89	0,92	0,000825	0,062966
Q6PKG0 1xPhospho [S847(100)]	LARP1	La ribonucleoprotein 1, translational regulator	1,86	0,89	0,022107	0,426885
Q7Z434 1xPhospho [S222(100)]	MAVS	mitochondrial antiviral signaling protein	1,83	0,87	0,000419	0,041433
Q86UE4 1xPhospho [S298(100)]	MTDH	metadherin	1,83	0,87	0,035269	0,550004
Q99704 1xPhospho [S269(100)]	DOK1	docking protein 1	1,80	0,85	0,02829	0,495077
Q6UXY8 1xPhospho [S79(100)]	TMC5	transmembrane channel like 5	1,79	0,84	2 x10 <sup>-7</sup>	0,000168
Q15365 1xPhospho [S246(100)]	PCBP1	poly(rC) binding protein 1	1,79	0,84	0,003578	0,15028
Q16649 1xPhospho [S353(99.6)]	NFIL3	nuclear factor, interleukin 3 regulated	1,77	0,82	0,007951	0,26551
Q01082-3 2xPhospho [S10(99.6); S/T/Y]	SPTBN1	spectrin beta, non-erythrocytic 1	1,71	0,77	0,003275	0,144784
Q9Y2H5 1xPhospho [S867(100)]	PLEKHA6	pleckstrin homology domain containing A6	1,71	0,77	0,032519	0,525304
Q09666 1xPhospho [S210(100)]	AHNAK	AHNAK nucleoprotein	1,70	0,77	0,000941	0,066225
Q14573 1xPhospho [S916(100)]	ITPR3	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	1,69	0,76	0,013104	0,330306
Q9UPN4 1xPhospho [S47(100)]	CEP131	centrosomal protein 131	1,68	0,75	0,008419	0,26551
Q13263 1xPhospho [S473(100)]	TRIM28	tripartite motif containing 28	1,68	0,75	0,000171	0,022158
Q8IVF2 1xPhospho [S5175(99.6)]	AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2	1,68	0,75	0,000946	0,066225
Q9Y2L9 1xPhospho [S536(100)]	LRCH1	leucine rich repeats and calponin homology domain containing 1	1,67	0,74	0,048533	0,652279
O95453 1xPhospho [S557(100)]	PARN	poly(A)-specific ribonuclease	1,66	0,73	0,036867	0,553726
Q5VZL5 1xPhospho [S1181(100)]	ZMYM4	zinc finger MYM-type containing 4	1,63	0,71	0,009867	0,296002
Q6IQ26 1xPhospho [S193(100)]	DENN5A	DENN domain containing 5A	1,63	0,70	0,018002	0,400162
P05412 1xPhospho [S73(100)]	JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	1,59	0,67	0,001486	0,086084
Q01970 1xPhospho [S537(100)]	PLCB3	phospholipase C beta 3	1,56	0,65	0,002365	0,116834
P84243 1xPhospho [T46(100)]	H3-3A, H3-3B	H3.3 histone A; H3.3 histone B	1,56	0,64	0,035357	0,550004
P04920 1xPhospho [S144(99.6)]	SLC4A2	solute carrier family 4 member 2	1,55	0,63	0,001963	0,103078
Q3ZCW2 1xPhospho [S22(99.6)]	LGALS1	galectin like	1,54	0,63	0,019214	0,411448
Q9Y618 1xPhospho [S67(100)]	NCOR2	nuclear receptor corepressor 2	1,52	0,60	0,000316	0,033145
Q14573 1xPhospho [S1832(100)]	ITPR3	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	1,51	0,60	0,000447	0,041749

<b>Q99460 1xPhospho [T273(100)]</b>	PSMD1	proteasome 26S subunit, non-ATPase 1	1,49	0,57	0,005904	0,220421
<b>O00231 1xPhospho [S14(100)]</b>	PSMD11	proteasome 26S subunit, non-ATPase 11	1,49	0,57	0,013487	0,333217
<b>P02545 1xPhospho [S652(100)]</b>	LMNA	lamin A/C	1,48	0,56	0,030099	0,505662
<b>P51149 1xPhospho [S72(100)]</b>	RAB7A	RAB7A, member RAS oncogene family	1,44	0,52	0,025274	0,46153
<b>Q9HB19 1xPhospho [S184(100)]</b>	PLEKHA2	pleckstrin homology domain containing A2	1,43	0,51	0,045328	0,631121
<b>P57682 1xPhospho [S250(100)]</b>	KLF3	Kruppel like factor 3	1,42	0,51	0,013173	0,330306
<b>P20749 1xPhospho [S41(100)]</b>	BCL3	BCL3 transcription coactivator	1,42	0,50	0,029793	0,505587
<b>O60784 1xPhospho [S355(100)]</b>	TOM1	target of myb1 membrane trafficking protein	1,41	0,49	0,004333	0,169277
<b>Q9HCK8 2xPhospho [T1982(99.2); S1991(100)]</b>	CHD8	chromodomain helicase DNA binding protein 8	1,40	0,49	0,021566	0,422185
<b>Q6ZUT9 1xPhospho [S178(100)]</b>	DENND5B	DENN domain containing 5B	1,37	0,45	0,002984	0,139255
<b>Q13501 2xPhospho [S355(100); S361(99.1)]</b>	SQSTM1	sequestosome 1	1,34	0,42	0,029744	0,505587
<b>P26651 1xPhospho [S90(99.2)]</b>	ZFP36	ZFP36 ring finger protein	1,33	0,41	0,030891	0,513557
<b>Q13131 1xPhospho [S496(100)]</b>	PRKAA1	protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1	1,32	0,40	0,027356	0,48688
<b>Q5VV41 1xPhospho [S107(100)]</b>	ARHGEF16	Rho guanine nucleotide exchange factor 16	1,31	0,39	0,018683	0,407631
<b>O00515 1xPhospho [S38(100)]</b>	LAD1	ladinin 1	1,31	0,39	0,03447	0,550004
<b>P28482 1xPhospho [T185(100)]</b>	MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	1,30	0,38	0,029578	0,505587
<b>Q05209 1xPhospho [S673(100)]</b>	PTPN12	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 12	1,29	0,37	0,037465	0,557004
<b>Q6P0Q8 1xPhospho [S1032(100)]</b>	MAST2	microtubule associated serine/threonine kinase 2	1,29	0,36	0,035338	0,550004
<b>Q01082-3 1xPhospho [S14(99.6)]</b>	SPTBN1	spectrin beta, non-erythrocytic 1	1,28	0,36	0,036151	0,552128
<b>Q7Z417 1xPhospho [S652(100)]</b>	NUFIP2	nuclear FMR1 interacting protein 2	1,27	0,35	0,007686	0,26551
<b>Q8WUZO 3xPhospho [S114(100); T118(100); S126(98.9)]</b>	BCL7C	BAF chromatin remodeling complex subunit BCL7C	1,25	0,32	0,046898	0,635398
<b>Q96T23 1xPhospho [T1305(100)]</b>	RSF1	remodeling and spacing factor 1	1,25	0,32	0,012753	0,330306
<b>O75376 1xPhospho [S2120(100)]</b>	NCOR1	nuclear receptor corepressor 1	1,24	0,31	0,011116	0,316531
<b>Q8ND76 1xPhospho [S25(100)]</b>	CCNY	cyclin Y	1,20	0,26	0,009703	0,296002
<b>Q5VV41 2xPhospho [S239(100); S240(100)]</b>	ARHGEF16	Rho guanine nucleotide exchange factor 16	1,19	0,25	0,018103	0,400162
<b>P10398 1xPhospho [S162(99.7)]</b>	ARAF	A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase	1,19	0,25	0,004075	0,163007
<b>Q13627 1xPhospho [Y321(100)]</b>	DYRK1A	dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A	0,82	-0,28	0,007611	0,26551
<b>Q9P0M6 1xPhospho [S129(100)]</b>	MACROH2A2	macroH2A.2 histone	0,82	-0,29	0,032053	0,522806
<b>Q9UHB7 1xPhospho [S1055(100)]</b>	AFF4	AF4/FMR2 family member 4	0,81	-0,31	0,04233	0,613061
<b>Q6ZV73 1xPhospho [S554(99.7)]</b>	FGD6	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6	0,79	-0,35	0,001046	0,069867
<b>Q8N3F8 1xPhospho [S578(100)]</b>	MICALL1	MICAL like 1	0,78	-0,35	0,011841	0,325883
<b>P46013 2xPhospho [S538(100); T543(100)]</b>	MKI67	marker of proliferation Ki-67	0,78	-0,37	0,035823	0,552127
<b>Q6PKG0 2xPhospho [S766(100); S774(100)]</b>	LARP1	La ribonucleoprotein 1, translational regulator	0,77	-0,38	0,0465	0,635125
<b>Q9Y618 1xPhospho [S939(100)]</b>	NCOR2	nuclear receptor corepressor 2	0,77	-0,38	0,03118	0,513557
<b>O43815 1xPhospho [S376(100)]</b>	STRN	striatin	0,77	-0,38	0,003534	0,15028
<b>A6ND36 1xPhospho [S610(100)]</b>	FAM83G	family with sequence similarity 83 member G	0,76	-0,40	0,001137	0,070739
<b>O75427 1xPhospho [S513(99.4)]</b>	LRCH4	leucine rich repeats and calponin homology domain containing 4	0,75	-0,41	0,020693	0,417651
<b>Q9UK61 1xPhospho [S979(99.5)]</b>	TASOR	transcription activation suppressor	0,75	-0,42	0,040371	0,594946
<b>Q6ZRV2 1xPhospho [S523(100)]</b>	FAM83H	family with sequence similarity 83 member H	0,74	-0,43	9,42 x10 <sup>-5</sup>	0,014389
<b>Q13469 1xPhospho [S326(99.5)]</b>	NFATC2	nuclear factor of activated T cells 2	0,74	-0,43	0,045459	0,631121
<b>O60292 1xPhospho [S1364(100)]</b>	SIPA1L3	signal induced proliferation associated 1 like 3	0,74	-0,44	0,001081	0,069867
<b>P41279 1xPhospho [S141(100)]</b>	MAP3K8	mitogen-activated protein kinase 8	0,72	-0,47	0,001712	0,095889
<b>Q9P206 1xPhospho [S979(99.7)]</b>	KIAA1522	KIAA1522	0,72	-0,48	0,010919	0,316289
<b>Q86W92-2 1xPhospho [S534(99.7)]</b>	PPFIBP1	PPFIA binding protein 1	0,71	-0,50	0,049775	0,659054

<b>Q86YV5 1xPhospho [S907(100)]</b>	PRAG1	PEAK1 related, kinase-activating pseudokinase 1	0,71	-0,50	0,016356	0,38164
<b>Q8N5Y2 1xPhospho [S400(99.7)]</b>	MSL3	MSL complex subunit 3	0,70	-0,51	0,036915	0,553726
<b>Q9UPU5 1xPhospho [T1289(100)]</b>	USP24	ubiquitin specific peptidase 24	0,70	-0,51	0,013142	0,330306
<b>Q5VT52-5 1xPhospho [S567(100)]</b>	RPRD2	regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2	0,70	-0,52	0,008287	0,26551
<b>Q5VT52 1xPhospho [S593(100)]</b>	RPRD2	regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2	0,70	-0,52	0,008287	0,26551
<b>Q99959 1xPhospho [S251(100)]</b>	PKP2	plakophilin 2	0,70	-0,52	0,023986	0,447741
<b>Q9Y520 1xPhospho [S2260(100)]</b>	PRRC2C	proline rich coiled-coil 2C	0,69	-0,53	0,02038	0,417651
<b>Q9Y5K6 1xPhospho [S458(100)]</b>	CD2AP	CD2 associated protein	0,69	-0,54	0,006116	0,223369
<b>Q14244 1xPhospho [T673(99.7)]</b>	MAP7	microtubule associated protein 7	0,68	-0,57	0,027532	0,48688
<b>Q9H910 1xPhospho [S30(100)]</b>	JPT2	Jupiter microtubule associated homolog 2	0,67	-0,57	0,017681	0,400162
<b>Q14244 1xPhospho [S183(99.8)]</b>	MAP7	microtubule associated protein 7	0,67	-0,58	0,000268	0,030001
<b>Q8IVT5 1xPhospho [S334(100)]</b>	KSR1	kinase suppressor of ras 1	0,67	-0,58	0,025132	0,46153
<b>Q92844 1xPhospho [S129(100)]</b>	TANK	TRAF family member associated NFKB activator	0,66	-0,59	0,023207	0,43807
<b>Q9BW04 1xPhospho [S519(100)]</b>	C1orf116	chromosome 1 open reading frame 116	0,66	-0,60	0,012843	0,330306
<b>Q9BTE3 1xPhospho [T160(99.5)]</b>	MCMBP	minichromosome maintenance complex binding protein	0,66	-0,61	0,015562	0,373489
<b>Q70EL4 1xPhospho [S969(99.7)]</b>	USP43	ubiquitin specific peptidase 43	0,65	-0,61	0,0047	0,17946
<b>Q5SQI0 1xPhospho [S315(100)]</b>	ATAT1	alpha tubulin acetyltransferase 1	0,65	-0,63	0,042009	0,613061
<b>Q9UHF7 1xPhospho [S90(100)]</b>	TRPS1	transcriptional repressor GATA binding 1	0,65	-0,63	0,045132	0,631121
<b>Q96EY5 1xPhospho [S170(100)]</b>	MVB12A	multivesicular body subunit 12A	0,64	-0,64	0,011452	0,320668
<b>Q9Y3Q8 1xPhospho [T211(100)]</b>	TSC22D4	TSC22 domain family member 4	0,63	-0,66	0,012027	0,325883
<b>O60825 1xPhospho [S493(99.3)]</b>	PFKFB2	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2	0,63	-0,66	0,008083	0,26551
<b>Q00613 1xPhospho [S314(100)]</b>	HSF1	heat shock transcription factor 1	0,63	-0,67	0,043195	0,620234
<b>Q9P227 1xPhospho [S423(100)]</b>	ARHGAP23	Rho GTPase activating protein 23	0,62	-0,68	0,020883	0,417651
<b>Q86UE4 1xPhospho [S568(100)]</b>	MTDH	metadherin	0,62	-0,69	0,043933	0,625485
<b>Q8WXH0 1xPhospho [S4159(98.8)]</b>	SYNE2	spectrin repeat containing nuclear envelope protein 2	0,62	-0,69	0,020661	0,417651
<b>Q9Y3E2 1xPhospho [S81(100)]</b>	BOLA1	bolA family member 1	0,62	-0,69	0,003235	0,144784
<b>Q9UPT5 1xPhospho [S250(100)]</b>	EXOC7	exocyst complex component 7	0,60	-0,73	0,019348	0,411448
<b>Q8WUF5 1xPhospho [S292(99.7)]</b>	PPP1R13L	protein phosphatase 1 regulatory subunit 13 like	0,60	-0,73	0,045831	0,631121
<b>P06748 1xPhospho [S137(100)]</b>	NPM1	nucleophosmin 1	0,60	-0,74	0,016915	0,389279
<b>Q86TB9-4 1xPhospho [T194(100)]</b>	PATL1	PAT1 homolog 1, processing body mRNA decay factor	0,59	-0,75	0,021612	0,422185
<b>Q66K14 1xPhospho [S435(100)]</b>	TBC1D9B	TBC1 domain family member 9B	0,59	-0,76	0,010386	0,306121
<b>Q9Y520 1xPhospho [T2682(100)]</b>	PRRC2C	proline rich coiled-coil 2C	0,59	-0,76	0,008534	0,26551
<b>Q9Y6G9 1xPhospho [S421(100)]</b>	DYNC1LI1	dynein cytoplasmic 1 light intermediate chain 1	0,59	-0,77	0,003778	0,154801
<b>P46013 1xPhospho [T1557(100)]</b>	MKI67	marker of proliferation Ki-67	0,58	-0,78	0,015829	0,37455
<b>Q9NQT8 1xPhospho [S1644(100)]</b>	KIF13B	kinesin family member 13B	0,58	-0,79	0,000706	0,056447
<b>Q5VTL8 1xPhospho [S529(100)]</b>	PRPF38B	pre-mRNA processing factor 38B	0,55	-0,85	0,002159	0,109908
<b>Q5VZK9 1xPhospho [T1228(100)]</b>	CARMIL1	capping protein regulator and myosin 1 linker 1	0,55	-0,86	0,019621	0,41205
<b>A6ND36 1xPhospho [S760(100)]</b>	FAM83G	family with sequence similarity 83 member G	0,51	-0,97	0,001772	0,096029
<b>Q9NRZ9 1xPhospho [S503(100)]</b>	HELLS	helicase, lymphoid specific	0,49	-1,02	0,022824	0,435724
<b>Q5T0W9 2xPhospho [S803(99.2); S809(100)]</b>	FAM83B	family with sequence similarity 83 member B	0,47	-1,09	0,026881	0,485598
<b>Q5TH69 1xPhospho [S2061(100)]</b>	ARFGEF3	ARFGEF family member 3	0,44	-1,19	0,001296	0,077765
<b>Q13586 1xPhospho [S575(100)]</b>	STIM1	stromal interaction molecule 1	0,41	-1,29	3,1 x10 <sup>-5</sup>	0,005202

MC58siaD <sup>-</sup> vs. Kon: Protein ID	Gensymbol	Genname	Fold change	Log <sub>2</sub> Fold change	p-Wert	Adj. p-Wert
P26651 1xPhospho [S60(99.6)]	ZFP36	ZFP36 ring finger protein	7,66	2,94	1,71 x10 <sup>-8</sup>	9,59E-06
P26651 1xPhospho [S186(100)]	ZFP36	ZFP36 ring finger protein	6,34	2,67	8,96 x10 <sup>-8</sup>	3,76E-05
Q14764 1xPhospho [S445(100)]	MVP	major vault protein	4,91	2,30	1,07 x10 <sup>-9</sup>	8,97E-07
P05412 1xPhospho [S63(99.7)]	JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	4,02	2,01	4,56 x10 <sup>-7</sup>	9,57E-05
Q8ND04 1xPhospho [S742(99.7)]	SMG8	SMG8 nonsense mediated mRNA decay factor	3,77	1,92	1,57 x10 <sup>-5</sup>	0,001072
Q01082-3 2xPhospho [S10(99.6); S/T/Y]	SPTBN1	spectrin beta, non-erythrocytic 1	3,42	1,78	1,45 x10 <sup>-6</sup>	0,000203
Q9H307 1xPhospho [S66(100)]	PNN	pinin, desmosome associated protein	3,36	1,75	1,39 x10 <sup>-7</sup>	4,68E-05
Q92844 1xPhospho [S208(100)]	TANK	TRAF family member associated NFKB activator	3,34	1,74	3,16 x10 <sup>-7</sup>	8,86E-05
O75420 1xPhospho [S638(100)]			3,26	1,71	4,1 x10 <sup>-7</sup>	9,57E-05
Q8IY17 1xPhospho [S420(100)]	PNPLA6	patatin like phospholipase domain containing 6	3,21	1,68	7,68 x10 <sup>-7</sup>	0,000129
Q15154 1xPhospho [S93(100)]	PCM1	pericentriolar material 1	3,07	1,62	0,000488	0,015754
Q9C0C2 1xPhospho [S1029(100)]	TNKS1BP1	tankyrase 1 binding protein 1	3,04	1,60	0,00096	0,028289
Q6UXY8 1xPhospho [S79(100)]	TMC5	transmembrane channel like 5	2,94	1,56	1,91x10 <sup>-10</sup>	3,21E-07
Q16539 2xPhospho [T180(100); Y182(100)]	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	2,89	1,53	9,07 x10 <sup>-5</sup>	0,004918
Q3ZCW2 1xPhospho [S22(99.6)]	LGALS1	galectin like	2,80	1,49	1,85 x10 <sup>-5</sup>	0,001194
Q6ZRS2 1xPhospho [S2725(99.7)]	SRCAP	Snf2 related CREBBP activator protein	2,78	1,47	5,04x10 <sup>-06</sup>	0,000498
Q6PJT7 1xPhospho [S343(100)]	ZC3H14	zinc finger CCCH-type containing 14	2,75	1,46	0,000377	0,01349
P35658 1xPhospho [S1023(99.6)]	NUP214	nucleoporin 214	2,73	1,45	0,010591	0,131601
P04792 1xPhospho [S82(99.8)]	HSPB1	heat shock protein family B (small) member 1	2,72	1,45	9,83 x10 <sup>-6</sup>	0,000826
Q13501 2xPhospho [S355(100); S361(99.1)]	SQSTM1	sequestosome 1	2,68	1,42	6,42 x10 <sup>-7</sup>	0,00012
P51149 1xPhospho [S72(100)]	RAB7A	RAB7A, member RAS oncogene family	2,57	1,36	1,47 x10 <sup>-5</sup>	0,001072
Q86UE4 1xPhospho [S298(100)]	MTDH	metadherin	2,49	1,32	0,003398	0,062732
O95425-3 1xPhospho [S221(100)]	SVIL	supervillin	2,43	1,28	0,004217	0,072299
P78347 1xPhospho [S412(100)]	GTF2I	general transcription factor Iii	2,39	1,25	0,000242	0,010981
Q7Z434 1xPhospho [S222(100)]	MAVS	mitochondrial antiviral signaling protein	2,36	1,24	1,11 x10 <sup>-5</sup>	0,000886
Q15365 1xPhospho [S246(100)]	PCBP1	poly(rC) binding protein 1	2,34	1,23	0,000116	0,006094
P05412 1xPhospho [S73(100)]	JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	2,29	1,20	7,84x10 <sup>-06</sup>	0,000693
Q9Y446 1xPhospho [S314(99.8)]	PKP3	plakophilin 3	2,29	1,19	0,000281	0,011276
Q99460 1xPhospho [T273(100)]	PSMD1	proteasome 26S subunit, non-ATPase 1	2,28	1,19	1,23 x10 <sup>-5</sup>	0,000942
O95453 1xPhospho [S557(100)]	PARN	poly(A)-specific ribonuclease	2,28	1,19	0,001068	0,029916
Q13017 1xPhospho [S590(100)]	ARHGAP5	Rho GTPase activating protein 5	2,26	1,18	0,009706	0,123532
P02545 1xPhospho [S652(100)]	LMNA	lamin A/C	2,24	1,16	8,73 x10 <sup>-5</sup>	0,004889
Q09666 1xPhospho [S5552(100)]	AHNAK	AHNAK nucleoprotein	2,22	1,15	0,000477	0,015754
O60784 1xPhospho [S355(100)]	TOM1	target of myb1 membrane trafficking protein	2,19	1,13	1,83 x10 <sup>-6</sup>	0,00023
Q9UP83 1xPhospho [S49(100)]	COG5	component of oligomeric golgi complex 5	2,18	1,12	0,00421	0,072299
Q9UPN4 1xPhospho [S47(100)]	CEP131	centrosomal protein 131	2,16	1,11	0,000346	0,012731

<b>Q6PKG0 1xPhospho [S847(100)]</b>	LARP1	La ribonucleoprotein 1, translational regulator	2,12	1,08	0,004108	0,071885
<b>Q9Y2L9 1xPhospho [S536(100)]</b>	LRCH1	leucine rich repeats and calponin homology domain containing 1	2,09	1,07	0,003191	0,06023
<b>Q70E73 1xPhospho [S996(100)]</b>	RAPH1	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1	2,08	1,05	0,01408	0,15352
<b>Q13263 1xPhospho [S473(100)]</b>	TRIM28	tripartite motif containing 28	2,03	1,02	7,44x10 <sup>-06</sup>	0,000693
<b>Q99959 1xPhospho [S225(100)]</b>	PKP2	plakophilin 2	2,02	1,01	0,002507	0,052653
<b>Q07960 1xPhospho [S51(99.8)]</b>	ARHGAP1	Rho GTPase activating protein 1	1,98	0,98	0,004085	0,071885
<b>Q9HB19 1xPhospho [S184(100)]</b>	PLEKHA2	pleckstrin homology domain containing A2	1,95	0,96	0,00048	0,015754
<b>Q14573 1xPhospho [S1832(100)]</b>	ITPR3	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	1,94	0,96	4,84x10 <sup>-06</sup>	0,000498
<b>Q9H0D6 2xPhospho [S471(99.5); S473(100)]</b>	XRN2	5'-3' exoribonuclease 2	1,92	0,94	0,016816	0,167399
<b>P82980 1xPhospho [S56(100)]</b>	RBP5	retinol binding protein 5	1,91	0,93	0,00046	0,015754
<b>Q9UHB6 1xPhospho [S686(100)]</b>	LIMA1	LIM domain and actin binding 1	1,88	0,91	0,01369	0,151311
<b>Q6IQ26 1xPhospho [S193(100)]</b>	DENND5A	DENN domain containing 5A	1,88	0,91	0,001899	0,044298
<b>Q96RR4 1xPhospho [S511(100)]</b>	CAMKK2	calcium/calmodulin dependent protein kinase 2	1,87	0,91	0,030039	0,247384
<b>Q8IVF2 1xPhospho [S4419(99.6)]</b>	AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2	1,87	0,90	0,009786	0,123607
<b>Q99704 1xPhospho [S269(100)]</b>	DOK1	docking protein 1	1,86	0,90	0,021014	0,193977
<b>Q7Z6Z7 1xPhospho [S3662(100)]</b>	HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	1,86	0,90	5x10 <sup>-05</sup>	0,002898
<b>O95425-3 1xPhospho [S1198(100)]</b>	SVIL	supervillin	1,85	0,89	0,008316	0,114497
<b>Q8NFA0 1xPhospho [T1326(100)]</b>	USP32	ubiquitin specific peptidase 32	1,84	0,88	0,006513	0,096605
<b>Q12792 1xPhospho [S143(99.7)]</b>	TWF1	twinfilin actin binding protein 1	1,84	0,88	0,001471	0,036354
<b>Q7Z417 1xPhospho [S652(100)]</b>	NUFIP2	nuclear FMR1 interacting protein 2	1,84	0,88	1,92E-06	0,00023
<b>Q09666 1xPhospho [S210(100)]</b>	AHNAK	AHNAK nucleoprotein	1,83	0,87	0,000241	0,010981
<b>Q14573 1xPhospho [S916(100)]</b>	ITPR3	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	1,83	0,87	0,004276	0,072558
<b>P20749 1xPhospho [S41(100)]</b>	BCL3	BCL3 transcription coactivator	1,82	0,87	0,000746	0,022776
<b>Q5UIP0 1xPhospho [S2393(100)]</b>	RIF1	replication timing regulatory factor 1	1,78	0,83	0,019193	0,182168
<b>Q9BQF6 1xPhospho [S11(99.8)]</b>	SEN7	SUMO specific peptidase 7	1,78	0,83	0,033185	0,258105
<b>P05783 1xPhospho [S86(99.5)]</b>	KRT18	keratin 18	1,77	0,82	0,00083	0,02491
<b>P08727 1xPhospho [S46(100)]</b>	KRT19	keratin 19	1,76	0,82	0,008485	0,114951
<b>Q8IW35 1xPhospho [S500(100)]</b>	CEP97	centrosomal protein 97	1,75	0,81	0,03155	0,2524
<b>P26651 1xPhospho [S90(99.2)]</b>	ZFP36	ZFP36 ring finger protein	1,75	0,81	0,000248	0,010981
<b>Q9UKL3 1xPhospho [S1537(100)]</b>	CASP8AP2	caspase 8 associated protein 2	1,74	0,80	0,029603	0,247384
<b>Q9Y2H5 1xPhospho [S867(100)]</b>	PLEKHA6	pleckstrin homology domain containing A6	1,74	0,80	0,018595	0,17892
<b>P04920 1xPhospho [S144(99.6)]</b>	SLC4A2	solute carrier family 4 member 2	1,74	0,80	0,000277	0,011276
<b>O14639 2xPhospho [S431(100); S435(100)]</b>	ABLIM1	actin binding LIM protein 1	1,73	0,79	0,005604	0,086375
<b>A8MTL0 1xMet-loss [N-Term]</b>	IQCF5	IQ motif containing F5	1,72	0,78	0,025083	0,218339
<b>Q16649 1xPhospho [S353(99.6)]</b>	NFIL3	nuclear factor, interleukin 3 regulated	1,70	0,77	0,009625	0,123433
<b>Q6ZUT9 1xPhospho [S178(100)]</b>	DENND5B	DENN domain containing 5B	1,70	0,77	2,56 x10 <sup>-5</sup>	0,001534

<b>Q96H79 1xPhospho [S257(99.6)]</b>	ZC3HAV1L	zinc finger CCCH-type containing, antiviral 1 like	1,70	0,76	0,020431	0,190691
<b>Q8N5Y2 2xPhospho [S400(99.7); T405(100)]</b>	MSL3	MSL complex subunit 3	1,69	0,75	0,016453	0,166512
<b>P55265 1xPhospho [T601(100)]</b>	ADAR	adenosine deaminase RNA specific	1,68	0,75	0,026139	0,224052
<b>Q07889 1xPhospho [S1134(99.6)]</b>	SOS1	SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1	1,67	0,74	0,02219	0,20151
<b>O00231 1xPhospho [S14(100)]</b>	PSMD11	proteasome 26S subunit, non-ATPase 11	1,66	0,73	0,001765	0,042369
<b>Q01082-3 1xPhospho [S14(99.6)]</b>	SPTBN1	spectrin beta, non-erythrocytic 1	1,66	0,73	0,000183	0,009308
<b>Q9H8Y8 1xPhospho [S451(100)]</b>	GORASP2	golgi reassembly stacking protein 2	1,66	0,73	0,049172	0,324578
<b>Q9BY89 1xPhospho [S981(100)]</b>	KIAA1671	KIAA1671	1,64	0,72	0,005448	0,084751
<b>Q5JSZ5 1xPhospho [S226(99.6)]</b>	PRRC2B	proline rich coiled-coil 2B	1,64	0,71	0,00031	0,011829
<b>Q5T0Z8 1xPhospho [S1087(99.7)]</b>	C6orf132	chromosome 6 open reading frame 132	1,64	0,71	0,002106	0,047739
<b>Q9C0C2 1xPhospho [S1385(100)]</b>	TNKS1BP1	tankyrase 1 binding protein 1	1,63	0,70	0,024639	0,216723
<b>Q9Y490 1xPhospho [S1201(100)]</b>	TLN1	talin 1	1,62	0,69	0,029974	0,247384
<b>Q8IVF2 1xPhospho [S5175(99.6)]</b>	AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2	1,61	0,69	0,001423	0,035681
<b>Q96PC5 1xPhospho [S747(99.8)]</b>	MIA2	MIA SH3 domain ER export factor 2	1,59	0,67	0,033625	0,259127
<b>P50851 1xPhospho [S2496(100)]</b>	LRBA	LPS responsive beige-like anchor protein	1,56	0,64	0,002032	0,046763
<b>P08621 1xPhospho [S320(100)]</b>	SNRNP70	small nuclear ribonucleoprotein U1 subunit 70	1,56	0,64	0,017007	0,168071
<b>Q14573 1xPhospho [S2670(100)]</b>	ITPR3	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	1,54	0,62	0,049353	0,324578
<b>Q6PJF5 2xPhospho [S325(100); S328(100)]</b>	RHBDF2	cellular retinoic acid binding protein 1	1,54	0,62	0,036304	0,268709
<b>Q13131 1xPhospho [S496(100)]</b>	PRKAA1	protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1	1,53	0,62	0,00133	0,034365
<b>Q9C0B5 1xPhospho [S621(100)]</b>	ZDHHC5	zinc finger DHHC-type palmitoyltransferase 5	1,53	0,62	0,01208	0,140936
<b>A1X283 1xPhospho [S291(100)]</b>	SH3PXD2B	SH3 and PX domains 2B	1,53	0,61	0,002422	0,052176
<b>Q14207 1xPhospho [S554(100)]</b>	NPAT	nuclear protein, coactivator of histone transcription	1,53	0,61	0,00224	0,04888
<b>Q96BD0 1xPhospho [S40(100)]</b>	SLCO4A1	solute carrier organic anion transporter family member 4A1	1,53	0,61	0,007737	0,110111
<b>Q01804 1xPhospho [S893(100)]</b>	OTUD4	OTU deubiquitinase 4	1,52	0,61	0,029407	0,247019
<b>Q6P996 1xPhospho [S786(100)]</b>	PDXDC1	pyridoxal dependent decarboxylase domain containing 1	1,52	0,61	0,038815	0,279871
<b>O95817 1xPhospho [S173(100)]</b>	BAG3	BAG cochaperone 3	1,51	0,60	0,041589	0,291122
<b>Q5VZK9 1xPhospho [S1288(100)]</b>	CARMIL1	capping protein regulator and myosin 1 linker 1	1,50	0,58	0,032369	0,255308
<b>O00515 1xPhospho [S38(100)]</b>	LAD1	ladinin 1	1,49	0,58	0,002601	0,053191
<b>Q86YS3 1xPhospho [S527(99.8)]</b>	RAB11FIP4	RAB11 family interacting protein 4	1,49	0,58	0,01578	0,162997
<b>P28482 1xPhospho [T185(100)]</b>	MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	1,48	0,57	0,002132	0,047739
<b>Q13158 1xPhospho [S194(100)]</b>	FADD	Fas associated via death domain	1,48	0,56	0,004837	0,077394
<b>Q9HCK8 2xPhospho [T1982(99.2); S1991(100)]</b>	CHD8	chromodomain helicase DNA binding protein 8	1,46	0,55	0,010693	0,131601
<b>Q53SF7 1xPhospho [S1069(99.7)]</b>	COBLL1	cordons-bleu WH2 repeat protein like 1	1,45	0,54	0,0014	0,035643
<b>Q01970 1xPhospho [S537(100)]</b>	PLCB3	phospholipase C beta 3	1,45	0,54	0,008928	0,118099
<b>Q8IZD4 1xPhospho [S275(100)]</b>	DCP1B	decapping mRNA 1B	1,45	0,54	0,030471	0,24971
<b>Q15262 2xPhospho [S856(100); T860(100)]</b>	PTPRK	protein tyrosine phosphatase receptor type K	1,43	0,52	0,03437	0,260094
<b>Q86V81 1xPhospho [S239(100)]</b>	ALYREF	Aly/REF export factor	1,43	0,52	0,011164	0,134931
<b>O00401 1xPhospho [S430(99.6)]</b>	WASL	WASP like actin nucleation promoting factor	1,41	0,50	0,015815	0,162997



<b>Q8N1G0 1xPhospho [T377(100)]</b>	ZNF687	zinc finger protein 687	1,40	0,49	0,009403	0,121514
<b>O60664 1xPhospho [S241(100)]</b>	PLIN3	perilipin 3	1,39	0,48	0,025064	0,218339
<b>P51858 1xPhospho [S165(100)]</b>	HDGF	heparin binding growth factor	1,39	0,47	0,015614	0,16293
<b>O14686 1xPhospho [S2274(100)]</b>	KMT2D	lysine methyltransferase 2D	1,38	0,47	0,027988	0,236277
<b>Q68CZ2 1xPhospho [S1154(100)]</b>	TNS3	tensin 3	1,38	0,47	0,001047	0,029802
<b>Q6PJF5 1xPhospho [S385(100)]</b>	RHBDF2	rhomoid 5 homolog 2	1,37	0,46	0,040594	0,288971
<b>P57682 2xPhospho [S92(100); S101(98.7)]</b>	KLF3	Kruppel like factor 3	1,37	0,45	0,038725	0,279871
<b>Q13153 1xPhospho [T219(100)]</b>	PAK1	p21 (RAC1) activated kinase 1	1,37	0,45	0,000349	0,012731
<b>P24928 1xPhospho [S1847(99.2)]</b>	POLR2A	RNA polymerase II subunit A	1,37	0,45	0,006319	0,094779
<b>Q9Y2K7 2xPhospho [T713(100); S718(98.6)]</b>	KDM2A	lysine demethylase 2A	1,36	0,45	0,006185	0,094215
<b>O75822 1xPhospho [T109(100)]</b>	EIF3J	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	1,36	0,44	0,000289	0,011276
<b>P18583 1xPhospho [S283(99.7)]</b>	SON	SON DNA and RNA binding protein	1,36	0,44	0,040844	0,289529
<b>Q6P0Q8 1xPhospho [S1032(100)]</b>	MAST2	microtubule associated serine/threonine kinase 2	1,35	0,43	0,01684	0,167399
<b>Q9H3R2 1xPhospho [S506(100)]</b>	MUC13	mucin 13, cell surface associated	1,35	0,43	0,002457	0,052249
<b>P31943 1xPhospho [S104(100)]</b>	HNRNPH1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	1,34	0,42	0,016152	0,164455
<b>Q5TH69 1xPhospho [S1061(100)]</b>	ARFGEF3	ARFGEF family member 3	1,33	0,42	0,018365	0,178338
<b>Q13501 1xPhospho [S272(100)]</b>	SQSTM1	sequestosome 1	1,33	0,42	0,037118	0,272308
<b>O60292 2xPhospho [T175(99.7); S]</b>	SIPA1L3	signal induced proliferation associated 1 like 3	1,33	0,41	0,045432	0,309008
<b>P57682 1xPhospho [S250(100)]</b>	KLF3	Kruppel like factor 3	1,32	0,40	0,048167	0,321297
<b>Q86YP4 3xPhospho [S100(100); S107(100); S114(100)]</b>	GATAD2A	GATA zinc finger domain containing 2A	1,31	0,39	0,048195	0,321297
<b>Q9Y6Q9 1xPhospho [S214(100)]</b>	NCOA3	nuclear receptor coactivator 3	1,31	0,39	0,009343	0,121514
<b>P46108 1xPhospho [S125(100)]</b>	CRK	CRK proto-oncogene, adaptor protein	1,31	0,39	0,032212	0,255262
<b>Q8WWI1-3 1xPhospho [S533(99.7)]</b>	LMO7	LIM domain 7	1,31	0,39	0,01084	0,131966
<b>Q58WW2 1xPhospho [S336(100)]</b>	DCAF6	DDB1 and CUL4 associated factor 6	1,30	0,38	0,036206	0,268709
<b>P53396 1xPhospho [S455(100)]</b>	ACLY	ATP citrate lyase	1,30	0,37	0,002569	0,053191
<b>Q9Y618 1xPhospho [S67(100)]</b>	NCOR2	nuclear receptor corepressor 2	1,29	0,37	0,014168	0,15352
<b>Q7Z3B3 1xPhospho [S249(100)]</b>	KANSL1	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	1,27	0,34	0,047285	0,319031
<b>Q8WUI4 1xPhospho [S486(99.6)]</b>	HDAC7	histone deacetylase 7	1,26	0,34	0,048856	0,324421
<b>Q13459 2xPhospho [S1267(100); T1271(100)]</b>	MYO9B	myosin IXB	1,26	0,33	0,017724	0,174135
<b>Q5VV41 1xPhospho [S107(100)]</b>	ARHGEF16	Rho guanine nucleotide exchange factor 16	1,25	0,32	0,038745	0,279871
<b>Q5VV41 2xPhospho [S239(100); S240(100)]</b>	ARHGEF16	Rho guanine nucleotide exchange factor 16	1,24	0,31	0,004577	0,075293
<b>Q9BW04 1xPhospho [S131(100)]</b>	C1orf116	chromosome 1 open reading frame 116	1,23	0,30	0,014542	0,153656
<b>Q8TAQ2 1xPhospho [S347(100)]</b>	SMARCC2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin subfamily c member 2	1,22	0,28	0,043621	0,300101
<b>Q92934 1xPhospho [S75(99.4)]</b>	BAD	BCL2 associated agonist of cell death	1,22	0,28	0,014307	0,15352
<b>Q9H6Z4 1xPhospho [S126(99.5)]</b>	RANBP3	RAN binding protein 3	1,21	0,28	0,002996	0,057854
<b>P10398 1xPhospho [S162(99.7)]</b>	ARAF	A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase	1,20	0,26	0,002669	0,053376
<b>Q8ND76 1xPhospho [S25(100)]</b>	CCNY	cyclin Y	1,19	0,26	0,011658	0,137922

<b>Q9UKE5 1xPhospho [S640(100)]</b>	TNIK	TRAF2 and NCK interacting kinase	1,16	0,22	0,004707	0,076038
<b>O95394 1xPhospho [S64(100)]</b>	PGM3	phosphoglucomutase 3	0,84	-0,25	0,040295	0,288971
<b>O60292 1xPhospho [S1364(100)]</b>	SIPA1L3	signal induced proliferation associated 1 like 3	0,84	-0,26	0,041368	0,290787
<b>P52926 1xPhospho [S44(100)]</b>	HMGA2	high mobility group AT-hook 2	0,78	-0,35	0,030733	0,250636
<b>Q86UE4 1xPhospho [S308(99.7)]</b>	MTDH	metadherin	0,78	-0,36	0,040529	0,288971
<b>Q96JP2 1xPhospho [S1025(100)]</b>	MYO15B	myosin XVB	0,77	-0,37	0,046231	0,313175
<b>Q13469 1xPhospho [S856(100)]</b>	NFATC2	nuclear factor of activated T cells 2	0,77	-0,38	0,031215	0,252123
<b>Q14839 1xPhospho [S1535(100)]</b>	CHD4	chromodomain helicase DNA binding protein 4	0,77	-0,38	0,044983	0,3072
<b>Q14244 1xPhospho [S183(99.8)]</b>	MAP7	microtubule associated protein 7	0,76	-0,39	0,006225	0,094215
<b>Q99569 1xPhospho [S221(100)]</b>	PKP4	plakophilin 4	0,76	-0,40	0,014438	0,153521
<b>Q9UHB7 1xPhospho [S1055(100)]</b>	AFF4	AF4/FMR2 family member 4	0,76	-0,41	0,010732	0,131601
<b>Q63ZY3 1xPhospho [S375(100)]</b>	KANK2	KN motif and ankyrin repeat domains 2	0,75	-0,41	0,048063	0,321297
<b>P15924 1xPhospho [S2815(100)]</b>	DSP	desmoplakin	0,75	-0,41	0,035444	0,267019
<b>P62316 1xPhospho [T12(100)]</b>	SNRPD2	small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide	0,75	-0,42	0,004375	0,072769
<b>O75427 1xPhospho [S513(99.4)]</b>	LRCH4	leucine rich repeats and calponin homology domain containing 4	0,74	-0,43	0,013537	0,151311
<b>Q6PKG0 2xPhospho [S766(100); S774(100)]</b>	LARP1	La ribonucleoprotein 1, translational regulator	0,74	-0,44	0,031385	0,252277
<b>Q8N3F8 1xPhospho [S578(100)]</b>	MICALL1	MICAL like 1	0,73	-0,45	0,00216	0,047739
<b>Q13111 1xPhospho [S873(100)]</b>	CHAF1A	chromatin assembly factor 1 subunit A	0,73	-0,46	0,007123	0,103164
<b>Q9UPU5 1xPhospho [T1289(100)]</b>	USP24	ubiquitin specific peptidase 24	0,72	-0,47	0,019685	0,185794
<b>A6ND36 1xPhospho [S610(100)]</b>	FAM83G	family with sequence similarity 83 member G	0,72	-0,48	0,000218	0,010446
<b>Q9H1E3 2xPhospho [T179(100); S181(100)]</b>	NUCKS1	nuclear casein kinase and cyclin dependent kinase substrate 1	0,71	-0,49	0,025985	0,223867
<b>Q70EL4 1xPhospho [S969(99.7)]</b>	USP43	ubiquitin specific peptidase 43	0,70	-0,51	0,013651	0,151311
<b>Q9UHB6 1xPhospho [S369(99.7)]</b>	LIMA1	LIM domain and actin binding 1	0,69	-0,53	0,03265	0,256317
<b>P42166 1xPhospho [S424(100)]</b>	TMPO	thymopoietin	0,69	-0,53	0,008231	0,11428
<b>O60825 1xPhospho [S493(99.3)]</b>	PFKFB2	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2	0,69	-0,53	0,035816	0,268616
<b>Q9Y6Q6 1xPhospho [S463(100)]</b>	TNFRSF11A	TNF receptor superfamily member 11a	0,69	-0,53	0,023795	0,212637
<b>O43815 1xPhospho [S376(100)]</b>	STRN	striatin	0,69	-0,54	0,000188	0,009308
<b>Q9H4G0 1xPhospho [S650(99.8)]</b>	EPB41L1	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 1	0,69	-0,54	0,032922	0,25725
<b>P22455 1xPhospho [S419(100)]</b>	FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4	0,69	-0,54	0,043494	0,300101
<b>Q6ZV73 1xPhospho [S554(99.7)]</b>	FGD6	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6	0,69	-0,55	1,6E-05	0,001072
<b>Q53GA4 1xPhospho [S144(98.5)]</b>	PHLDA2	pleckstrin homology like domain family A member 2	0,68	-0,55	0,024505	0,216674
<b>Q92574 1xPhospho [S505(100)]</b>	TSC1	TSC complex subunit 1	0,68	-0,55	0,021767	0,199824
<b>P16144 1xPhospho [S1494(100)]</b>	ITGB4	integrin subunit beta 4	0,68	-0,56	0,013605	0,151311
<b>Q5VZK9 1xPhospho [S122(100)]</b>	CARMIL1	capping protein regulator and myosin 1 linker 1	0,67	-0,58	0,013408	0,151311
<b>Q6UUV7 1xPhospho [S329(100)]</b>	CRTC3	CREB regulated transcription coactivator 3	0,67	-0,58	0,029861	0,247384
<b>Q86YV5 1xPhospho [S907(100)]</b>	PRAG1	PEAK1 related, kinase-activating pseudokinase 1	0,67	-0,59	0,004616	0,075293
<b>O60716-3 1xPhospho [T933(99.6)]</b>	CTNND1	catenin delta 1	0,67	-0,59	0,033506	0,259127

<b>Q9P212 1xPhospho [S1709(100)]</b>	PLCE1	phospholipase C epsilon 1	0,66	-0,59	0,016578	0,166776
<b>Q9H910 1xPhospho [S97(100)]</b>	JPT2	Jupiter microtubule associated homolog 2	0,66	-0,60	0,034254	0,260094
<b>Q13469 1xPhospho [S326(99.5)]</b>	NFATC2	nuclear factor of activated T cells 2	0,66	-0,60	0,00505	0,080045
<b>Q92783 1xPhospho [S156(100)]</b>	STAM	signal transducing adaptor molecule	0,66	-0,60	0,002847	0,056264
<b>Q8IWB9 1xPhospho [S196(99.8)]</b>	TEX2	testis expressed 2	0,66	-0,61	0,041355	0,290787
<b>Q6ZN28 1xPhospho [S17(99.7)]</b>	MACC1	MET transcriptional regulator MACC1	0,65	-0,61	0,025451	0,220403
<b>P27448 1xPhospho [S469(100)]</b>	MARK3	microtubule affinity regulating kinase 3	0,65	-0,62	0,014982	0,157309
<b>Q9BTX1 1xPhospho [T414(100)]</b>	NDC1	NDC1 transmembrane nucleoporin	0,65	-0,62	0,034063	0,260094
<b>P51608 1xPhospho [S229(100)]</b>	MECP2	methyl-CpG binding protein 2	0,65	-0,62	0,024349	0,216436
<b>Q9H910 1xPhospho [S30(100)]</b>	JPT2	Jupiter microtubule associated homolog 2	0,65	-0,63	0,006555	0,096605
<b>P35269 1xPhospho [T389(100)]</b>	GTF2F1	general transcription factor IIF subunit 1	0,65	-0,63	0,049459	0,324578
<b>Q15366 1xPhospho [S173(100)]</b>	PCBP2	poly(rC) binding protein 2	0,64	-0,63	0,034108	0,260094
<b>Q12834 1xPhospho [T70(99.7)]</b>	CDC20	cell division cycle 20	0,64	-0,63	0,043765	0,300101
<b>Q96EY5 1xPhospho [S170(100)]</b>	MVB12A	multivesicular body subunit 12A	0,64	-0,63	0,013635	0,151311
<b>P19013 1xPhospho [S51(100)]</b>			0,64	-0,63	0,001878	0,044298
<b>Q15652 1xPhospho [S617(100)]</b>	JMJD1C	jumonji domain containing 1C	0,64	-0,64	0,043386	0,300101
<b>Q6ZRV2 1xPhospho [S523(100)]</b>	FAM83H	family with sequence similarity 83 member H	0,63	-0,66	1,16 x10 <sup>-6</sup>	0,000178
<b>Q9P227 1xPhospho [S423(100)]</b>	ARHGAP23	Rho GTPase activating protein 23	0,63	-0,67	0,027277	0,231443
<b>Q5VTL8 1xPhospho [S529(100)]</b>	PRPF38B	pre-mRNA processing factor 38B	0,63	-0,67	0,013528	0,151311
<b>Q8IVF2 1xPhospho [S102(100)]</b>	AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2	0,63	-0,68	0,001512	0,03682
<b>Q9H425 1xPhospho [S174(99.3)]</b>	C1orf198	chromosome 1 open reading frame 198	0,62	-0,69	0,019077	0,182101
<b>Q8N6H7 1xPhospho [S432(100)]</b>	ARFGAP2	ADP ribosylation factor GTPase activating protein 2	0,62	-0,69	0,019945	0,187189
<b>Q5JTV8 1xPhospho [S305(100)]</b>	TOR1AIP1	torsin 1A interacting protein 1	0,62	-0,70	0,011433	0,136218
<b>Q8WWI1-3 1xPhospho [T714(100)]</b>	LMO7	LIM domain 7	0,61	-0,71	0,022336	0,201742
<b>Q8N5Y2 1xPhospho [S400(99.7)]</b>	MSL3	MSL complex subunit 3	0,61	-0,71	0,008383	0,114497
<b>Q9BTE3 1xPhospho [T160(99.5)]</b>	MCMBP	minichromosome maintenance complex binding protein	0,61	-0,72	0,00683	0,09978
<b>P46013 2xPhospho [S538(100); T543(100)]</b>	MKI67	marker of proliferation Ki-67	0,61	-0,72	0,000287	0,011276
<b>Q96B97 1xPhospho [S587(100)]</b>	SH3KBP1	SH3 domain containing kinase binding protein 1	0,60	-0,74	0,017876	0,174605
<b>Q9Y5K6 1xPhospho [S458(100)]</b>	CD2AP	CD2 associated protein	0,60	-0,74	0,000736	0,022776
<b>Q9NQ8 1xPhospho [S1644(100)]</b>	KIF13B	kinesin family member 13B	0,60	-0,74	0,001215	0,03241
<b>Q14244 1xPhospho [T673(99.7)]</b>	MAP7	microtubule associated protein 7	0,59	-0,75	0,010115	0,126816
<b>P78536 1xPhospho [S791(100)]</b>	ADAM17	ADAM metallopeptidase domain 17	0,59	-0,75	0,000462	0,015754
<b>O00151 1xPhospho [S90(100)]</b>	PDLIM1	PDZ and LIM domain 1	0,59	-0,75	0,012477	0,144559
<b>P41279 1xPhospho [S141(100)]</b>	MAP3K8	mitogen-activated protein kinase 8	0,59	-0,76	2,2x10 <sup>-05</sup>	0,001368
<b>Q9Y3E2 1xPhospho [S81(100)]</b>	BOLA1	bolA family member 1	0,59	-0,77	0,001311	0,034365
<b>P46013 2xPhospho [T2203(100); T2212(100)]</b>	MKI67	marker of proliferation Ki-67	0,58	-0,78	0,036839	0,271442
<b>Q9Y6G9 1xPhospho [S421(100)]</b>	DYNC1LI1	dynein cytoplasmic 1 light intermediate chain 1	0,58	-0,78	0,003326	0,062076
<b>Q9Y580 1xPhospho [S137(100)]</b>	RBM7	RNA binding motif protein 7	0,58	-0,78	0,037764	0,275843

<b>Q08945 1xPhospho [S659(100)]</b>	SSRP1	structure specific recognition protein 1	0,58	-0,79	0,003157	0,06023
<b>Q9Y520 1xPhospho [S2260(100)]</b>	PRRC2C	proline rich coiled-coil 2C	0,58	-0,79	0,001159	0,031402
<b>Q5SQI0 1xPhospho [S315(100)]</b>	ATAT1	alpha tubulin acetyltransferase 1	0,56	-0,83	0,011882	0,139595
<b>O95295 1xPhospho [S133(100)]</b>	SNAPIN	SNAP associated protein	0,56	-0,83	0,0078	0,110111
<b>Q8WUF5 1xPhospho [S292(99.7)]</b>	PPP1R13L	protein phosphatase 1 regulatory subunit 13 like	0,56	-0,85	0,036308	0,268709
<b>Q9Y2K7 2xPhospho [T550(100); S]</b>	KDM2A	lysine demethylase 2A	0,55	-0,86	0,004353	0,072769
<b>O00151 1xPhospho [S130(100)]</b>	PDLIM1	PDZ and LIM domain 1	0,55	-0,87	0,011258	0,1351
<b>Q86UE4 1xPhospho [S568(100)]</b>	MTDH	metadherin	0,54	-0,88	0,020561	0,190842
<b>P46013 1xPhospho [T1557(100)]</b>	MKI67	marker of proliferation Ki-67	0,54	-0,89	0,007712	0,110111
<b>Q9H4G0 1xPhospho [S639(100)]</b>	EPB41L1	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 1	0,54	-0,89	0,022816	0,204977
<b>Q13330 1xPhospho [T564(100)]</b>	MTA1	metastasis associated 1	0,54	-0,90	0,008747	0,117558
<b>Q9BW04 1xPhospho [S519(100)]</b>	C1orf116	chromosome 1 open reading frame 116	0,54	-0,90	0,000558	0,01769
<b>Q9H0K1 1xPhospho [S534(100)]</b>	SIK2	salt inducible kinase 2	0,53	-0,92	0,018637	0,17892
<b>Q92530 1xPhospho [S252(99.4)]</b>	PSMF1	proteasome inhibitor subunit 1	0,52	-0,95	0,015971	0,163605
<b>P33991 1xPhospho [S120(100)]</b>	MCM4	minichromosome maintenance complex component 4	0,51	-0,97	0,021888	0,199845
<b>P25789 1xPhospho [S13(100)]</b>	PSMA4	proteasome 20S subunit alpha 4	0,50	-0,99	0,008867	0,118099
<b>Q5VZK9 1xPhospho [T1228(100)]</b>	CARMIL1	capping protein regulator and myosin 1 linker 1	0,50	-1,01	0,014347	0,15352
<b>Q15311 1xPhospho [S463(100)]</b>	RALBP1	ralA binding protein 1	0,50	-1,01	0,043721	0,300101
<b>P16070 1xPhospho [S706(100)]</b>	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	0,49	-1,03	0,031149	0,252123
<b>Q14847 1xPhospho [T104(100)]</b>	LASP1	La ribonucleoprotein 1, translational regulator	0,49	-1,03	0,01409	0,15352
<b>Q86TB9-4 1xPhospho [T194(100)]</b>	PATL1	PAT1 homolog 1, processing body mRNA decay factor	0,49	-1,04	0,002904	0,056726
<b>Q9Y520 1xPhospho [T2682(100)]</b>	PRRC2C	proline rich coiled-coil 2C	0,48	-1,07	0,001124	0,030964
<b>Q9ULW0 1xPhospho [S486(100)]</b>	TPX2	TPX2 microtubule nucleation factor	0,46	-1,12	0,005185	0,081407
<b>P46013 1xPhospho [T1315(100)]</b>	MKI67	marker of proliferation Ki-67	0,46	-1,12	0,032184	0,255262
<b>P06748 1xPhospho [S137(100)]</b>	NPM1	nucleophosmin 1	0,45	-1,15	0,001026	0,029717
<b>Q08999 1xPhospho [S1080(100)]</b>	RBL2	RB transcriptional corepressor like 2	0,45	-1,16	0,008103	0,113442
<b>P46013 1xPhospho [T1476(100)]</b>	MKI67	marker of proliferation Ki-67	0,43	-1,20	0,003466	0,063285
<b>P07900 1xPhospho [S231(100)]</b>	HSP90AA1	heat shock protein 90 alpha family class A member 1	0,42	-1,25	0,027228	0,231443
<b>O75683 1xPhospho [T229(100)]</b>	SURF6	surfeit 6	0,40	-1,32	0,002628	0,053191
<b>Q9Y6G9 1xPhospho [S398(100)]</b>	DYNC1LI1	dynein cytoplasmic 1 light intermediate chain 1	0,39	-1,36	0,009255	0,121474
<b>Q9NRZ9 1xPhospho [S503(100)]</b>	HELLS	helicase, lymphoid specific	0,36	-1,48	0,003604	0,064409
<b>Q5TH69 1xPhospho [S2061(100)]</b>	ARFGEF3	ARFGEF family member 3	0,36	-1,48	0,000266	0,011276
<b>Q5T0W9 2xPhospho [S803(99.2); S809(100)]</b>	FAM83B	family with sequence similarity 83 member B	0,35	-1,50	0,003541	0,063971
<b>Q13586 1xPhospho [S575(100)]</b>	STIM1	stromal interaction molecule 1	0,33	-1,59	4,31x10 <sup>-06</sup>	0,000483

MC58siaD vs. MC58: Protein ID	Gensymbol	Genname	Fold change	Log <sub>2</sub> Fold change	p-Wert	Adj. p-Wert
P26651 1xPhospho [S60(99.6)]	ZFP36	ZFP36 ring finger protein	2,17	1,12	0,000378	0,089472
P26651 1xPhospho [S186(100)]	ZFP36	ZFP36 ring finger protein	2,13	1,09	0,000589	0,10818
P05412 1xPhospho [S63(99.7)]	JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	2,13	1,09	0,000252	0,089472
Q01082-3 2xPhospho [S10(99.6); S/T/Y]	SPTBN1	spectrin beta, non-erythrocytic 1	2,00	1,00	0,000392	0,089472
Q13501 2xPhospho [S355(100); S361(99.1)]	SQSTM1	sequestosome 1	1,99	1,00	2,12x10 <sup>-05</sup>	0,017788
Q3ZCW2 1xPhospho [S22(99.6)]	LGALS1	galectin like	1,81	0,86	0,002485	0,310196
Q9C0C2 1xPhospho [S1029(100)]	TNKS1BP1	tankyrase 1 binding protein 1	1,81	0,86	0,035099	1
P51149 1xPhospho [S72(100)]	RAB7A	RAB7A, member RAS oncogene family	1,79	0,84	0,001421	0,216979
O95425-3 1xPhospho [S1198(100)]	SVIL	supervillin	1,73	0,79	0,010869	0,874655
Q9H8Y8 1xPhospho [S451(100)]	GORASP2	golgi reassembly stacking protein 2	1,67	0,74	0,024777	1
Q6UXY8 1xPhospho [S79(100)]	TMC5	transmembrane channel like 5	1,64	0,71	1,28 x10 <sup>-8</sup>	0,002148
Q96H79 1xPhospho [S257(99.6)]	ZC3HAV1L	zinc finger CCCH-type containing, antiviral 1 like	1,62	0,70	0,030753	1
Q09666 1xPhospho [S5552(100)]	AHNAK	AHNAK nucleoprotein	1,56	0,64	0,018252	0,989154
O60784 1xPhospho [S355(100)]	TOM1	target of myb1 membrane trafficking protein	1,56	0,64	0,000426	0,089472
P05783 1xPhospho [S86(99.5)]	KRT18	keratin 18	1,55	0,63	0,006127	0,605514
Q14764 1xPhospho [S445(100)]	MVP	major vault protein	1,55	0,63	0,000644	0,10818
Q00537 1xPhospho [S122(100)]	CDK17	cyclin dependent kinase 17	1,55	0,63	0,015149	0,989154
Q99959 1xPhospho [S225(100)]	PKP2	plakophilin 2	1,55	0,63	0,040763	1
Q99460 1xPhospho [T273(100)]	PSMD1	proteasome 26S subunit, non-ATPase 1	1,53	0,62	0,004583	0,481266
P02545 1xPhospho [S652(100)]	LMNA	lamin A/C	1,51	0,60	0,011454	0,874655
O95817 1xPhospho [S173(100)]	BAG3	BAG cochaperone 3	1,51	0,59	0,049692	1
Q9Y446 1xPhospho [S314(99.8)]	PKP3	plakophilin 3	1,51	0,59	0,027231	1
Q7Z6Z7 1xPhospho [S3662(100)]	HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	1,47	0,56	0,002371	0,310196
O75822 1xPhospho [T109(100)]	EIF3J	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	1,47	0,55	4,35x10 <sup>-05</sup>	0,024362
Q9P1Q0 1xMet-loss+Acetyl [N-Term]	VPS54	VPS54 subunit of GARP complex	1,46	0,55	0,019484	1
	RNF20	ring finger protein 20	1,46	0,54	0,00272	0,310196
Q9H307 1xPhospho [S66(100)]	PNN	pinin, desmosome associated protein	1,45	0,53	0,007307	0,682013
Q7Z417 1xPhospho [S652(100)]	NUFIP2	nuclear FMR1 interacting protein 2	1,44	0,53	0,000272	0,089472
P05412 1xPhospho [S73(100)]	JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	1,44	0,52	0,009957	0,874655
Q9C0B5 1xPhospho [S621(100)]	ZDHHC5	zinc finger DHHC-type palmitoyltransferase 5	1,41	0,50	0,046469	1
P82980 1xPhospho [S56(100)]	RBP5	retinol binding protein 5	1,41	0,50	0,031444	1
Q8WWI1-3 1xPhospho [S533(99.7)]	LMO7	LIM domain 7	1,40	0,49	0,00277	0,310196
Q86V81 1xPhospho [S239(100)]	ALYREF	Aly/REF export factor	1,38	0,46	0,023394	1
A1X283 1xPhospho [S291(100)]	SH3PXD2B	SH3 and PX domains 2B	1,37	0,46	0,016312	0,989154
Q14207 1xPhospho [S554(100)]	NPAT	nuclear protein, coactivator of histone transcription	1,36	0,44	0,015881	0,989154

<b>P15923 1xPhospho [S379(100)]</b>	TCF3	transcription factor 3	1,35	0,43	0,030889	1
<b>Q5VT52-5 1xPhospho [S567(100)]</b>	RPRD2	regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2	1,33	0,41	0,031405	1
<b>Q5VT52 1xPhospho [S593(100)]</b>	RPRD2	regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2	1,33	0,41	0,031405	1
<b>P24928 1xPhospho [S1847(99.2)]</b>	POLR2A	RNA polymerase II subunit A	1,32	0,40	0,012711	0,889802
<b>P26651 1xPhospho [S90(99.2)]</b>	ZFP36	ZFP36 ring finger protein	1,32	0,40	0,038585	1
<b>Q5JSZ5 1xPhospho [S226(99.6)]</b>	PRRC2B	proline rich coiled-coil 2B	1,32	0,40	0,02461	1
<b>Q5TH69 1xPhospho [S1061(100)]</b>	ARFGEF3	ARFGEF family member 3	1,31	0,39	0,027868	1
<b>Q13158 1xPhospho [S194(100)]</b>	FADD	Fas associated via death domain	1,30	0,38	0,048346	1
<b>P20020 1xPhospho [S1155(100)]</b>	ATP2B1	ATPase plasma membrane Ca <sup>2+</sup> transporting 1	1,30	0,38	0,047779	1
<b>Q01082-3 1xPhospho [S14(99.6)]</b>	SPTBN1	spectrin beta, non-erythrocytic 1	1,29	0,37	0,023218	1
<b>Q14573 1xPhospho [S1832(100)]</b>	ITPR3	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	1,28	0,36	0,018147	0,989154
<b>Q7Z406 2xPhospho [S1969(100); S1983(100)]</b>	MYH14	myosin heavy chain 14	1,25	0,33	0,034615	1
<b>Q6ZUT9 1xPhospho [S178(100)]</b>	DENND5B	DENN domain containing 5B	1,25	0,32	0,024587	1
<b>Q68CZ2 1xPhospho [S1154(100)]</b>	TNS3	tensin 3	1,22	0,29	0,027183	1
<b>P31949 1xPhospho [S6(100)]</b>	S100A11	S100 calcium binding protein A11	1,22	0,28	0,026695	1
<b>Q13153 1xPhospho [T219(100)]</b>	PAK1	p21 (RAC1) activated kinase 1	1,20	0,26	0,021712	1
<b>Q92934 1xPhospho [S75(99.4)]</b>	BAD	BCL2 associated agonist of cell death	1,18	0,24	0,04087	1
<b>Q6ZV73 1xPhospho [S554(99.7)]</b>	FGD6	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6	0,87	-0,20	0,039053	1
<b>Q6ZRV2 1xPhospho [S523(100)]</b>	FAM83H	family with sequence similarity 83 member H	0,85	-0,23	0,011997	0,876311
<b>O75376 1xPhospho [S2120(100)]</b>	NCOR1	nuclear receptor corepressor 1	0,82	-0,28	0,017817	0,989154
<b>P41279 1xPhospho [S141(100)]</b>	MAP3K8	mitogen-activated protein kinase 8	0,82	-0,29	0,035776	1
<b>Q13111 1xPhospho [S873(100)]</b>	CHAF1A	chromatin assembly factor 1 subunit A	0,78	-0,35	0,039677	1
<b>P46013 2xPhospho [S538(100); T543(100)]</b>	MKI67	marker of proliferation Ki-67	0,78	-0,35	0,03929	1
<b>Q8IVF2 1xPhospho [S102(100)]</b>	AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2	0,76	-0,39	0,048234	1
<b>P78536 1xPhospho [S791(100)]</b>	ADAM17	ADAM metalloproteinase domain 17	0,72	-0,48	0,010997	0,874655
<b>Q08945 1xPhospho [S659(100)]</b>	SSRP1	structure specific recognition protein 1	0,67	-0,57	0,023896	1
<b>P22455 1xPhospho [S419(100)]</b>	FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4	0,66	-0,59	0,026828	1
<b>Q8IWB9 1xPhospho [S196(99.8)]</b>	TEX2	testis expressed 2	0,63	-0,68	0,016579	0,989154
<b>P46013 2xPhospho [T2203(100); T2212(100)]</b>	MKI67	marker of proliferation Ki-67	0,61	-0,72	0,041376	1
<b>Q9NV70 1xPhospho [S501(100)]</b>	EXOC1	exocyst complex component 1	0,53	-0,91	0,028073	1
<b>P07900 1xPhospho [S231(100)]</b>	HSP90AA1	heat shock protein 90 alpha family class A member 1	0,46	-1,14	0,026379	1

## 8 Publikationen

Herold, R., Schrotten, H. und Schwerk, C. (2019). **Virulence Factors of Meningitis-Causing Bacteria: Enabling Brain Entry across the Blood-Brain Barrier.** Int J Mol Sci 20 (21)

Herold, R., Sünwoldt G., Stump-Guthier C., Weiss C., Ishikawa H., Schrotten H., Adam R. und Schwerk C. (in revision, re-submitted). **Invasion of the choroid plexus epithelium by *Neisseria meningitidis* is differently mediated by dynamin and Arp2/3 signaling dependent on the presence of the capsule.** Pathogens and Disease

Herold, R., Scholtysik R., Moroniak S., Weiss C., Ishikawa H., Schrotten H. und Schwerk C. (submitted). **Capsule-dependent impact of MAPK signaling on host cell invasion and immune response during infection of the choroid plexus epithelium by *Neisseria meningitidis*.**

Muranyi W., Herold R., Schwerk C., Stump-Guthier C., Lampe M., Fallier-Becker P., Ishikawa H. und Schrotten H. (submitted) **Immortalized human choroid plexus endothelial cells recapitulate the endothelial-epithelial choroid plexus convolute in a two-cell type in vitro model.**

## 9 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Horst Schroten, Leiter der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsmedizin Mannheim bedanken für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas sowie bei der großzügigen Unterstützung der Erstellung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Michael Lanzer für die Betreuung der TAC-Meetings und Übernahme des Erstgutachtens.

Besonders möchte ich außerdem bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christian Schwerk als Betreuer dieser Doktorarbeit bedanken sowie für die Unterstützung und konstruktiven Anregungen und der allzeit vorhandenen Bereitschaft zur Diskussion und Klärung auftretender Fragen oder Probleme.

Ich möchte ganz besonders Selina, Carolin, Svenja, Walter und Ulrike für die große Unterstützung, Hilfsbereitschaft sowie Beratung bei experimentellen Fragen danken.

Natürlich möchte ich auch meine Doktorandenkolleginnen Lea, Alexa, Marie und meinem Doktorandenkollegen Franjo für die gegenseitige Unterstützung und Erheiterung während der gesamten Zeit danken. Besunners Lea will ich fer die viele luschdische Schdunde un Noehilfe im Pälzer Dialegd donkschee sage.

Auch möchte ich Camilla und Gina sowie der gesamten Arbeitsgruppe für die tolle Zusammenarbeit und die erheiternden Mittagspausen danken.

Aus meinem Freundeskreis möchte ich ganz besonders Vanessa danken die, solange ich sie kenne, eine durch und durch positive, unterstützende und wundervolle Freundin ist. Weiter möchte ich natürlich auch Anna, Janine, Melanie und Michelle danken.

Vor allem aber möchte ich meiner Familie danken, die mich zu jeder Zeit unterstützt und inspiriert hat mein Bestes zu geben, allen voran meinen Eltern, die immer für mich da sind und meiner Patentante, die tapfer diese Doktorarbeit gegengelesen hat und mich immer unterstützt.

Ganz besonders möchte ich meinem Großeltern danken, die mich immer gefördert und unterstützt haben, sowie auch meiner Urgroßtante und meinem Urgroßonkel, die mich mit ihrer Weltoffenheit, Wissbegierde und ihrem Scharfsinn beeindruckt und inspiriert haben. Obwohl sie nicht mehr bei mir sind, weiß ich, dass sie stolz auf mich wären.