

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. M. Frosch

**Konstruktion und Charakterisierung von
Lebendvakzine-Kandidaten auf der Basis von
siaD-Deletionsmutanten von
Neisseria meningitidis Serogruppe B**

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Thomas Leimbach
aus Schweinfurt

Würzburg, März 2004

Referent: Professor Dr. med. M. Frosch

Koreferent: Professor Dr. med. H. W. Kreth

Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2005

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Impfstofftypen	1
1.2. Attenuierte Lebendimpfstoffe.....	2
1.3. Epidemiologie von <i>Neisseria meningitidis</i>	3
1.4. Trägerstatus	4
1.5. Morphologie der Neisserien	5
1.5.1. Zellwand	5
1.5.2. Kapsel	5
1.5.3. Pili.....	7
1.5.4. Proteine der äußeren Membran (outer membrane proteins, OMP)	8
1.5.5. Lipooligosaccharid (LOS)	10
1.5.6. IgA ₁ -Protease.....	11
1.6. Variabilität der Neisserien	11
1.6.1. Transformationsmechanismus	12
1.6.2. RecA	12
1.6.3. Bedeutung der antigenen Variation	13
1.7. Pathogenese der Meningokokken-Infektion.....	13
1.7.1. Invasionsablauf.....	14
1.7.2. Schutz vor dem Immunsystem	14
1.7.3. Immundefekt.....	15
1.8. Chemoprophylaxe.....	15
1.9. Impfungen gegen Meningokokken.....	15
1.9.1. Polysaccharidvakzine	15
1.9.2. Konjugatvakzine.....	16
1.10. Neue Vakzinierungsstrategien.....	17
1.10.1. Probleme mit Serogruppe B	17
1.10.2. Natürliche Immunität.....	17
1.10.3. Outer membrane vesicles (OMV).....	18
1.10.4. Gewinnung bakterizider Antikörper ohne Auslösung einer Autoimmunreaktion	19
1.10.5. OMP	20
1.10.6. Genomanalyse	20
1.10.7. Lebendvakzine.....	21
2. Ergebnisse	23
2.1. Stammauswahl.....	23
2.1.1. Transformation der Wildtypen	24
2.1.2. Auswahlkriterien für die Selektion des Vakzine-Kandidatenstamms	26
2.2. Konstruktion des <i>siaD</i> -Deletionsvektors.....	30
2.3. Deletion von <i>siaD</i> im Stamm H44/76 mit pTL3	33
2.3.1. Vorgehen	33
2.3.2. Nachweis der <i>siaD</i> -Deletion mittels Southernblot (Southern, 1975).....	34

2.4.	Phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutante H44/76 <i>siaD</i> ⁻	36
2.4.1.	Nachweis der Kapselexpression	36
2.4.2.	Wachstum von Wildtyp und den <i>siaD</i> -Mutanten in Proteose-Pepton-Medium	37
2.4.3.	Adhäsion an Hep-2 Epithelzellen	37
2.4.4.	Adhäsion an HBMEC Endothelzellen	39
2.4.5.	Adhäsion und Phagozytose an Dendritischen Zellen	39
2.4.6.	Analyse der Expression von <i>N. meningitidis</i> -Oberflächenmarkern im Westernblot	42
2.5.	Konstruktion des <i>recA</i> -Deletionsvektors	43
2.6.	Versuch der Deletion von <i>recA</i>	46
2.6.1.	Transformation von MC58 und H44/76 mit pTL6	46
2.6.2.	Suche nach positiven Klonen mittels Kolonieblot	48
3.	Diskussion	49
3.1.	Stammauswahl und Deletion des <i>siaD</i> -Gens	49
3.2.	Charakterisierung der <i>siaD</i> -Mutanten	50
3.3.	Interaktion zwischen <i>N. meningitidis</i> und Dendritischen Zellen	51
3.4.	Unterschiede zwischen den <i>siaD</i> -Mutanten	53
3.5.	Deletion des <i>recA</i> -Gens	54
3.6.	Sicherheitskriterien für Lebendimpfstoffe	57
3.7.	Weitere Ansätze zur Impfstoffentwicklung	58
3.8.	Vorteile eines Lebendimpfstoffs gegen <i>N. meningitidis</i>	59
4.	Zusammenfassung	61
5.	Material und Methoden	62
5.1.	Geräte	62
5.2.	Verbrauchsmaterial	62
5.3.	Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme	63
5.4.	Puffer und Lösungen	65
5.5.	Antikörper	66
5.6.	Bakterienkulturen	67
5.6.1.	<i>E. coli</i> -Stämme	67
5.6.2.	Neisserienstämme	67
5.6.3.	Nährmedien	67
5.6.4.	Kulturbedingungen	68
5.6.5.	Antibiotikazusätze	68
5.7.	Zellkultur	68
5.7.1.	Hep-2 Larynxkarzinomzellen	68
5.7.2.	HBMEC-Endothelzellen	69
5.7.3.	Dendritische Zellen	69
5.8.	Plasmide	70
5.9.	Oligonukleotide	70

5.10.	DNA-Präparationen.....	72
5.10.1.	Präparation chromosomaler DNA aus Bakterien (Stern <i>et al.</i> , 1984).....	72
5.10.2.	Präparation chromosomaler DNA aus Bakterien mit dem QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen.....	72
5.10.3.	Schnellmethode zur Plasmid-DNA-Isolierung.....	73
5.10.4.	Midi-/ Maxi-Präparation von Plasmid-DNA.....	74
5.10.5.	Phenolisierung und Ethanol-fällung von DNA.....	75
5.10.6.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen und aus PCR-Ansätzen.....	75
5.11.	Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung.....	76
5.12.	Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).....	76
5.13.	Klonierungsmethoden.....	77
5.13.1.	Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	77
5.13.2.	Herstellung von doppelsträngigen Linkern aus Oligonukleotiden.....	77
5.13.3.	DNA-Ligation.....	77
5.14.	Transformation von Bakterien.....	77
5.14.1.	Transformation von Meningokokken.....	78
5.14.2.	Transformation von Meningokokken zur <i>siaD</i> - bzw. <i>recA</i> -Deletion.....	78
5.14.3.	Herstellung kompetenter Zellen von <i>E. coli</i> (Nishimura <i>et al.</i> , 1990).....	78
5.14.4.	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA (Cosloy und Oishi, 1973; Dagert und Ehrlich, 1979).....	79
5.15.	Automatisierte DNA-Sequenzierung.....	80
5.16.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki <i>et al.</i> , 1988).....	81
5.16.1.	Gewinnung von Template DNA für die PCR aus Bakterienkolonien.....	81
5.16.2.	PCR mit der AmpliTaq [®] -DNA-Polymerase.....	82
5.17.	DNA-Hybridisierungen.....	82
5.17.1.	Markierung spezifischer DNA-Sonden mit Digoxigenin.....	83
5.17.2.	Southernblot (Southern, 1975).....	83
5.17.3.	Kolonieblot (Grunstein und Hogness, 1975).....	84
5.17.4.	DNA-DNA-Hybridisierung.....	84
5.17.5.	Immunologischer Digoxigenin-Nachweis mit CSPD [®]	85
5.18.	Westernblot.....	86
5.18.1.	Präparation der Gesamtzellproteine von <i>Neisseria meningitidis</i>	86
5.18.2.	Herstellen von SDS-Polyacrylamidgelen.....	86
5.18.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Lämmli, 1970).....	87
5.18.4.	Immunoblot (Westernblot; Towbin <i>et al.</i> , 1979).....	87
5.18.5.	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blue (Fazekas de St. Groth <i>et al.</i> , 1963).....	89
5.19.	Kapselpolysaccharid-ELISA.....	89
5.20.	Sequenzanalysen.....	90
5.21.	Assays zur Analyse der Interaktion von Neisserien mit humanen Zellen.....	90
5.21.1.	Adhäsionsassays an Hep-2 Epithelzellen.....	90
5.21.2.	Adhäsionsassays an HBMEC-Zellen.....	90
5.21.3.	Adhäsions- und Phagozytose-Assays an Dendritischen Zellen.....	91

6. Literaturverzeichnis	92
7. Abkürzungsverzeichnis	111

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

Jährlich sterben ca. 17 Millionen Menschen - vor allem Kinder - an Krankheiten, die durch Bakterien, Viren oder Parasiten verursacht werden (WHO-Report, 2003). Damit sind Infektionskrankheiten nach wie vor die weltweit häufigste Todesursache. Die hohe Zahl an tödlich verlaufenden Infektionen wird insbesondere in den Entwicklungsländern durch häufig unzureichende hygienische Zustände und schlecht ausgebaute Gesundheitssysteme begünstigt. Die kosteneffektivste Maßnahme zur Lösung dieser Probleme ist die Prävention von Infektionskrankheiten durch Impfungen. Bei der Impfung wird durch ein ungefährliches Immunogen eine Immunantwort hervorgerufen, die entweder eindringende Keime eliminiert oder alternativ nachteilige Folgen einer Wirtsinvasion durch einen Keim neutralisieren kann.

1.1. Impfstofftypen

Ein idealer Impfstoff sollte mukosal verabreichbar sein, um den natürlichen Infektionsweg nachzuahmen und so eine mukosale Immunität zu induzieren und zu einer raschen, protektiven und lang anhaltenden Immunantwort führen. Dabei sollte gegen extrazelluläre Keime vor allem eine humorale, gegen intrazelluläre Keime hingegen eine zelluläre Immunantwort induziert werden. Weiterhin sind günstige Produktionskosten und die Möglichkeit einer Lagerung bei höheren Temperaturen wichtige Kriterien. Nicht zuletzt sollte der Impfstoff risikofrei sein und keine unerwünschten Nebenwirkungen verursachen. Momentan gibt es fünf verschiedene Möglichkeiten für die Entwicklung eines Impfstoffes (zusammengefasst aus Rappuoli *et al.*, 1996):

1. Abgetötete Ganzkeime: verschiedene weit verbreitete Impfstoffe basieren auf abgetöteten Keimen, wie z.B. Vakzine gegen Kinderlähmung und Keuchhusten, wobei allerdings wegen der besseren Wirkung oder Verträglichkeit vermehrt attenuierte Lebendkeime oder Einzelbestandteile der Krankheitserreger eingesetzt werden.
2. Attenuierte Lebendimpfstoffe: gegen manche Krankheiten kann eine Protektion nur durch einen starken Immunstimulus erzielt werden, daher ist eine Impfung mit attenuierten, lebenden Keimen notwendig. Solche attenuierten Keime sind dahingehend abgeschwächt, dass sie zwar keine oder nur schwache Krankheitssymptome verursachen, aber dennoch die für eine Protektion erforderlichen Antigene tragen. Zahlreiche virale

Impfstoffe sowie der Tuberkulose- und der orale Typhus-Impfstoff basieren auf attenuierten Keimen.

3. Einzelbestandteile eines Krankheitserregers: um Komplikationen zu vermeiden, die durch abgetötete Ganzkeime verursacht werden können, werden teilweise nur einzelne Untereinheiten eines Krankheitserregers verabreicht. Gegen Keuchhusten oder *Neisseria meningitidis* Serogruppe A und C werden gereinigte Einzelbestandteile eingesetzt, gegen Tetanus und Diphtherie inaktivierte Toxine. Neuerdings sind auch Impfstoffe aus Einzelbestandteilen eines Krankheitserregers erhältlich, die verändert oder in heterologen Systemen exprimiert werden, wie die neuen Keuchhusten- und Hepatitis B-Impfstoffe. Manche Einzelbestandteile von Krankheitserregern, wie z.B. Polysaccharide, wirken allerdings nur dann immunogen oder vermitteln lang anhaltende Protektion, wenn sie zusammen mit Adjuvantien oder als Konjugatimpfstoffe an Proteine gekoppelt verabreicht werden. Die Verkapselung von Antigenen beispielsweise in Polymerkügelchen erlaubt eine langsame Antigenfreisetzung und könnte ebenfalls zu einer lang anhaltenden Immunantwort führen.

4. Rekombinante Lebendimpfstoffe: die Expression heterologer Antigene in attenuierten Bakterien oder Viren wie Salmonellen oder Vakziniaviren erlaubt eine gleichzeitige Impfung gegen den Vektororganismus und den heterologen Krankheitserreger.

5. DNA-Impfstoffe: Plasmid-DNA, die unter Kontrolle eines eukaryontischen Promotors für ein heterologes Antigen kodiert, führt nach dem Einbringen in einen lebenden Organismus zumeist zu sehr starken Immunantworten.

Derzeit sind nur attenuierte oder abgetötete Keime sowie Einzelbestandteile von Krankheitserregern als Impfstoffe erhältlich (Rappuoli *et al.*, 1996). Zumeist induzieren diese Impfstoffe vor allem eine humorale, B-zellvermittelte Immunantwort. Für die Protektion gegen intrazelluläre Keime ist jedoch die zelluläre Immunantwort bedeutsam (Kaufmann, 1993), die mit diesen herkömmlichen Impfstoffen kaum erzielt werden kann.

1.2. Attenuierte Lebendimpfstoffe

Bei attenuierten Keimen als Lebendimpfstoff muss eine Balance zwischen ausreichend sicherer Attenuierung und genügender Immunogenität gefunden werden. Die durch den Impfstoff ausgelöste Immunantwort sollte protektiv sein, über längere Zeit anhalten und ein immunologisches Gedächtnis ausbilden. Die Sicherheit des Impfstoffs muss durch

mindestens zwei unabhängige attenuierende Deletionen garantiert werden. Diese sollen verhindern, dass der Impfstoff virulent ist oder zum virulenten Wildtyp revertiert. Außerdem darf er sich nicht selbständig vom Impfling auf andere Menschen ausbreiten oder in der Umwelt überleben. Der Impfstoff muss sich reproduzierbar vermehren lassen, um seine Qualität zu garantieren. Wegen der noch nicht vollständig verstandenen Gefahr, die von der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) ausgeht, sollte die Züchtung in Medien stattfinden, die keine tierischen Bestandteile enthalten (Shapiro, 2002). Ein idealer Lebendimpfstoff sollte sich mukosal applizieren lassen und auch eine mukosale Immunantwort hervorrufen, da die Schleimhäute die Eintrittspforte für die meisten Krankheitserreger sind. Bisherige Lebendimpfstoffe wie BCG gegen Tuberkulose (Calmette *et al.*, 1927), *Vibrio cholerae* CVD103-HgR gegen Cholera (Levine und Kaper, 1993) oder *Salmonella typhi* Ty21a (Levine *et al.* 1987) gegen Typhus zeigen, dass eine Impfung mit Lebendimpfstoffen eine schützende Immunität im Impfling hervorruft und wenige Nebenwirkungen verursacht (Hormaeche und Khan, 1996; Lindberg, 1998).

Das Ziel der hier vorliegenden Dissertation war es, die Grundlagen für einen attenuierten Lebendimpfstoff gegen *Neisseria meningitidis* durch Ausschaltung des *siaD*-Gens (Kapselbiosynthese; Edwards *et al.*, 1994) und des *recA*-Gens (homologe Rekombination; Koomey und Falkow, 1987; Miller und Kokjohn, 1990) zu legen.

1.3. Epidemiologie von *Neisseria meningitidis*

Den ersten Nachweis der humanpathogenen Meningokokken erbrachte Weichselbaum 1887 (Weichselbaum, 1887). Heute sind die Meningokokken weltweit die häufigsten Meningitiserreger. In den Industriestaaten sind die Serogruppen B und C mit einer Häufigkeit von 1-3 Erkrankten/100.000 Einwohner mit einer Zunahme in den Wintermonaten endemisch. Im Meningitis-Gürtel, zu dem der Mittlere Osten, Südamerika und Afrika südlich der Sahara gehören, ist die Serogruppe A der häufigste Grund für Meningitisepidemien, bei denen über 500 Menschen/100.000 Einwohner erkranken können (Achtman, 1995a). Obwohl die Serogruppe A Anfang des 20. Jahrhunderts auch in den Industriestaaten häufig Ausbrüche verursachte, sind diese Erkrankungen seit dem zweiten Weltkrieg selten. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt. Wahrscheinlich liegt dies an einer veränderten Immunität der Menschen, an der Einführung neuer Neisse-

rienstämme oder an einer durch kreuzreagierende Bakterien, wie z.B. *Bacillus pumilus*, induzierten Immunität (Filice *et al.*, 1985).

Die Übertragung von *N. meningitidis* erfolgt bei nahem Kontakt durch Tröpfcheninfektion (Nelson, 1996). Trotz adäquater Therapie versterben 9 bis 12 % der Infizierten und bei 11 bis 19 % verbleiben Folgeschäden wie neurologische Defizite (Kirsch *et al.*, 1996). Obwohl eine große Vielfalt an Stämmen existiert, wird die Mehrzahl der Erkrankungen durch wenige hypervirulente Stämme verursacht (Maiden *et al.*, 1998). V.a. Stämme aus dem ET-37 und dem ET-5 Komplex sind zurzeit Auslöser von Meningokokken-bedingten Erkrankungen in den Industrieländern (Wang *et al.*, 1993, Achtman, 1995a). 74 % der Meningitiden in Deutschland werden durch Serogruppe B und 21 % durch Serogruppe C ausgelöst. Bei Serogruppe B überwiegen die Phänotypen B:15 und B:4, bei der Serogruppe C die Serotypen 2a (meist ET-37 Komplex) und 2b. In den westlichen Ländern erkranken am häufigsten Kinder im Alter unter 4 Jahren an einer Meningitis, in den Entwicklungsländern Kinder im frühen Schulalter (Epidemiologisches Bulletin, 2000; Achtman, 1995a). Säuglinge werden durch maternale Antikörper vor einer Infektion geschützt. Bei Absinken des Titers steigt die Gefahr einer Infektion, bis es zu einer erworbenen Immunität, eventuell durch Besiedlung mit *Neisseria lactamica*, einer apathogenen Neisserienspezies, kommt (Virji, 1996b).

1.4. Trägerstatus

Bei Meningokokken gibt es einen asymptomatischen Trägerstatus an der Mukosa des Nasopharynx, der über Monate bestehen kann, nur selten zu Krankheit führt und sogar vor dieser schützt. Die Trägerrate von *N. meningitidis* in Rachenabstrichen steigt von unter 1 % im Alter von 4 Jahren auf über 20 % im Alter von 20 Jahren, um dann langsam wieder abzufallen (Caugant, 1994). Diesen Anstieg erklärt man sich durch Zigarettenrauchen oder Menschenansammlungen, wodurch es zu einer verstärkten Übertragung kommt (Stuart *et al.*, 1989; Epidemiologisches Bulletin, 2000). Während einer Epidemie kann die Zahl der Meningokokkenträger auf 100 % ansteigen (DeVoe, 1982). Die Trägerrate von *N. lactamica* verhält sich umgekehrt. Nach einem Anstieg in den ersten Lebensmonaten auf 21 % im ersten Lebensjahr, sinkt sie anschließend auf unter 5 % ab (Cartwright *et al.*, 1987).

Die Neisserien werden als Kommensalen des Nasopharynx angesehen, die nur bei einer Störung des Erreger-Wirt-Gleichgewichts zu einer Erkrankung führen (Virji, 1996b). Die meisten Erkrankungen entstehen also nach einer frischen Infektion mit Meningokokken, da der Wirtsorganismus noch keine spezielle, durch längeres Tragen von Neisserien induzierte, Immunität besitzt (Vogel und Frosch, 1996). Allerdings schützt das Tragen eines Stammes nicht immer vor einer Infektion durch einen homologen oder heterologen Stamm (Ala'Aldeen, 2000). Weshalb manche Menschen erkranken und andere nur asymptomatische Träger werden oder weshalb die Erkrankungen saisonal gehäuft auftreten, ist noch nicht völlig erforscht. Man geht davon aus, dass dies von der Virulenz des Stamms, der Abwehrlage des Wirts, einer Koinfektion mit Viren oder einem Zusammenspiel dieser Faktoren abhängt (Achtman, 1995b).

1.5. Morphologie der Neisserien

Um Gründe für die unterschiedlichen Verläufe nach Übertragung von Meningokokken zu finden, muss man den Aufbau der Neisserien und ihre hohe genetische Variabilität genauer betrachten. Die Virulenzfaktoren machen das Bakterium nicht nur gefährlich, sondern schützen es auch vor dem menschlichen Immunsystem. Die hohe Variabilität trägt dazu bei, sich vor dem Immunsystem zu tarnen und schnell an neue Umweltbedingungen anzupassen.

1.5.1. Zellwand

Die Neisserien spp. sind gramnegative Diplokokken. Wie alle gramnegativen Bakterien enthalten sie eine innere, zytoplasmatische Membran, eine dünne Peptidoglykanschicht und eine äußere Membran, die Proteine, Phospholipide und das Lipooligosaccharid (LOS) enthält.

1.5.2. Kapsel

Die Zellwand der Meningokokken ist von einer Kapsel aus sauren Polysacchariden umgeben, die sie vor dem Immunsystem des Wirtsorganismus und eventuell vor Austrocknung, während der Übertragungsphase auf einen anderen Wirt, schützt. Alle anderen Neisserien spp. bilden keine Kapsel. Mit Antikörpern gegen die Kapsel lassen sich die Meningokokken in mindestens 12 Serogruppen (A, B, C, 29E, H, I, K, L, W-135, X, Y, und Z) einteilen. Nur die Serogruppen A, B, C, W-135 und Y sind pathogen. Die Kapsel der Serogruppe A enthält N-Acetylmannosamin, die der Serogruppen B, C, W-135 und

Y Polysialinsäure (Vedros, 1987). Die polysialinsäurehaltige Kapsel schützt *N. meningitidis* vor Phagozytose und vor Abtötung durch das Komplementsystem (McNeil *et al.*, 1994; Hammerschmidt *et al.*, 1994; Jarvis 1995; Vogel *et al.*, 1997; Kahler *et al.*, 1998; Kolb-Mäurer *et al.*, 2001; Unkmeir *et al.*, 2002a). Die Kapsel der Serogruppe B löst keine Immunreaktion im Wirt aus, da sie, wie die Kapsel von *E. coli* K1, aus α -2,8 verknüpfter Polysialinsäure aufgebaut ist, die auch in Zelladhäsionsmolekülen von Neuronen (N-CAM) vorkommt und so durch molekulares Mimikry vom Immunsystem toleriert wird (Kasper *et al.*, 1973; Finne *et al.*, 1983, 1987; Troy, 1992).

Der Kapselgenkomplex (*cps*) der Serogruppe B ist insgesamt 24 Kilobasen lang und in fünf Regionen eingeteilt. Region A enthält vier offene Leserahmen (englisch: open reading frame, ORF; ORF1 bis ORF4) und kodiert alle Enzyme (SiaA, SiaB, SiaC und SiaD), die an der Biosynthese beteiligt sind. Region B und C steuern den Transport der Polysialinsäure durch Membran und Zellwand. Die Gene der Region B führen zu einer Modifikation des Kapselpolysaccharids mit einem Phospholipid und die Gene der Region C kodieren für vier Transportproteine CtrA, CtrB, CtrC und CtrD. Die Region D enthält Gene, die die Modifizierung des Lipooligosaccharids regeln. Über die Funktion der Region E als Regulationselement wird noch spekuliert (Frosch *et al.*, 1989). Die vier ORFs der Region A liegen von nur kurzen Sequenzen getrennt in gleicher Leserichtung hintereinander und werden gemeinsam transkribiert, so dass eine mRNA von 5 kb Länge entsteht. Diese vier ORFs kodieren die für die Kapselbiosynthese wichtigen Enzyme. *SiaA* (ORF1) kodiert wahrscheinlich für eine Epimerase, die die Umwandlung von N-Acetylglucosamin in N-Acetylmannosamin steuert, *siaC* (ORF3) für das NeuNAc-condensing Enzym (NeuNAc: N-Acetylneuraminsäure), das N-Acetylneuraminsäure aus N-Acetylmannosamin und Phosphoenolpyruvat synthetisiert, *siaB* (ORF2) für die CMP-NeuNAc-Synthetase, die NeuNAc durch Bildung von CMP-NeuNAc aktiviert und *siaD* (ORF4, nur in Serogruppe B) für die α -2,8 Polysialyltransferase, die CMP-NeuNAc Monomere zu α -2,8 Polysialylsäure polymerisiert (Edwards *et al.*, 1994). Die Deletion von *siaD* (Polysialyltransferase) verhindert die Ausbildung einer Kapsel (Hammerschmidt *et al.*, 1994).

Die Kapselexpression ist einer Phasenvariabilität (bekapselt/nicht bekapselt) mit einer Frequenz von 10^{-3} bis 10^{-4} unterworfen. Diese Phasenvariation wird über verschiedene Mechanismen reguliert. (i) *SiaA* kann durch reversibles Einfügen des natürlich vor-

kommenden Insertionselement *IS1301* an- und abgeschaltet werden (Hammerschmidt *et al.*, 1996a). (ii) Durch Insertion oder Deletion eines Cytidin in einem (dC)₇ Strang in *siaD* (also nur in Serogruppe B) wird die Polysialyltransferase durch Verschiebung des Leserasters und daraus resultierendem Translationsstopp *recA*-unabhängig gesteuert (Hammerschmidt *et al.*, 1996b). (iii) Die Transkription der mRNA mit verschobenem Leseraster wird außerdem durch einen Rho Faktor terminiert (Lavitola, 1999). (iv) Eine intergenische Sequenz zwischen den *ctrABCD*- und *siaABCD*-Operons steuert auf transkriptioneller Ebene die Expression des Kapselpolysaccharids (Swartley *et al.*, 1996). (v) Das *crgA*-Gen reprimiert die Kapselexpression bei Adhäsion an Epithelzellen (Deghmane, 2000). Die Phasenvariation und genaue Regulation der Kapselexpression bringt den Meningokokken einen Überlebensvorteil, da sie ohne Kapsel den Nasopharynx besiedeln können, ohne eine Erkrankung auszulösen, oder mit Kapsel die Übertragung auf andere Menschen sicherstellen (Vogel und Frosch, 1996).

Die Meningokokken besitzen auch die Möglichkeit, ihre Serogruppe durch Wechsel des Polysaccharids zu ändern. Dies wurde *in vitro* (Frosch *et al.*, 1992) und *in vivo* anhand von Isolaten aus Epidemien nachgewiesen (Swartley *et al.*, 1997; Kertesz *et al.*, 1998, Vogel *et al.*, 2000). Der vermutete Mechanismus beruht auf dem Austausch des Gens für die Sialinsäurepolymerase, kann also nur zwischen den Sialinsäure-bildenden Serogruppen B, C, W-135 und Y stattfinden. *In vivo* müssen dabei Neisserien zweier unterschiedlicher Serogruppen den Nasopharynx eines Menschen gleichzeitig besiedeln. Anscheinend ist dieser Serogruppenwechsel nicht ungewöhnlich. Er bringt den Meningokokken den Vorteil, Antikörpern zu entgehen, die gegen das Kapselpolysaccharid gerichtet sind (Swartley *et al.*, 1997).

1.5.3. Pili

Pili sind fädige Strukturen, die durch die Kapsel der Meningokokken nach außen reichen. Bei *N. meningitidis* gibt es zwei Pilusklassen, die sich strukturell und antigenisch unterscheiden (Virji *et al.*, 1992). Pili sind hauptsächlich aus identischen Pile-Untereinheiten aufgebaut (Meyer *et al.*, 1984; Parge *et al.* 1995). Die Pilusspitze wird durch das PilC-Protein gebildet, das als eigentliches Adhäsion angesehen wird (Jonsson *et al.*, 1991). Pili dienen der Interaktion der Neisserien untereinander und der primären Adhäsion von Neisserien an Epithel- und Endothelzellen, da sie die elektrostatische Barriere zwischen den Bakterien und dem Epithel oder Endothel überwinden (Heckels

et al., 1976; Nassif *et al.*, 1999). Außerdem bedingt das PilC-Protein durch Bindung an Rezeptoren, wie den Membrankofaktor CD46, zusammen mit den Opa-Proteinen die Spezifität der pathogenen Neisserien für den menschlichen Wirt (Rudel *et al.*, 1995a; Kallstrom *et al.*, 1997). Auch für die natürliche Transformationsfähigkeit ist die Produktion von Pili essentiell (Gibbs *et al.*, 1989; Rudel *et al.*, 1995b).

Die Pili können sowohl in ihrer Phase (piliert/nicht-piliert) als auch antigenisch variiert werden, was bei *Neisseria gonorrhoeae* sehr gut untersucht ist. Die Phasenvariation kommt durch drei Mechanismen zustande. (i) Die Pilus Proteine können an zwei Stellen prozessiert und dadurch eine veränderte Pile Untereinheit, die nur sezerniert wird, produziert werden (Haas *et al.*, 1987), (ii) eine ungleiche Anzahl an Minikassetten (s. u.) kann zwischen stillen und exprimierten Loci ausgetauscht werden und führt zu längeren (L-) Pilinmolekülen, die keine Pili bilden (Haas *et al.*, 1987) und (iii) das Leseraster der PilC-Untereinheit kann durch Insertionen oder Deletionen in einem Polyguanin-Abschnitt verändert werden, so dass es zu PilC⁻-Pili kommt, die nicht ausreifen. Die Frequenz der Phasenvariation ist mit 10^{-2} bis 10^{-4} hoch (Jonsson *et al.*, 1991). Die antigenische Variation kann mit einer Häufigkeit von 10^{-3} durch homologe Rekombination innerhalb des Genoms oder auch durch Transformation mit externer DNA geschehen. Der *pil*-Genkomplex enthält inkomplette Sequenzen, so genannte stille Loci (*pilS*), die keinen Promoter enthalten, und die mit dem aktiven, Pilin-exprimierenden Gen (*pilE*) *recA*-abhängig rekombinieren können. Dabei werden zwischen den stillen Loci und dem exprimierten Locus eine oder mehrere von sechs Minikassetten ausgetauscht. Die Minikassetten sind hochvariable Regionen im *pil*-Gen und bedingen die antigenische Vielfalt des Pilins (Hagblom *et al.*, 1985; Haas und Meyer, 1986; Perry *et al.*, 1987). Man vermutet den gleichen Mechanismus auch bei den Meningokokken (Perry *et al.*, 1988; Potts und Saunders, 1988). Die *recA*-abhängige Transformation mit externer DNA erhöht die antigenische Vielfalt der Pili noch um ein Vielfaches (Gibbs *et al.*, 1989).

1.5.4. Proteine der äußeren Membran (outer membrane proteins, OMP)

Verschiedene Proteine der äußeren Membran von Meningokokken stellen sowohl wichtige Virulenzfaktoren als auch bedeutende Antigene, die eine protektive Immunantwort induzieren können, dar.

Eine wichtige Gruppe sind die Porine, die Poren für den Nährstofftransport in der äußeren Membran bilden (Tommassen *et al.*, 1990). *N. meningitidis* kann drei Klassen von

Porinen bilden. Ein Klasse 1 Protein (PorA) und ein Klasse 2 und 3 Protein (beide PorB). Sowohl PorA als auch PorB können gleichzeitig auf einem Bakterium exprimiert werden. Anhand der Klasse 2 und 3 OMP werden die Meningokokken in 20 Serotypen und durch die Klasse 1 OMP in 10 Serosubtypen eingeteilt (Frasch *et al.*, 1985). Bei *N. gonorrhoeae* tragen die Porine zur Serumresistenz bei (Ram *et al.*, 1998). Ob dies bei den Meningokokken auch so ist, ist noch unklar. PorB kann sich in Zellmembranen eukaryontischer Zellen einlagern und so die Zellfunktion, wie z.B. die Phagozytose beeinflussen (Bjerknes *et al.*, 1995; Rudel *et al.*, 1996). PorA unterliegt einer Phasenvariation (exprimiert/nicht exprimiert) durch Insertionen und Deletionen in einem Polyguanidin Abschnitt des Promoters (van der Ende *et al.*, 1995) und enthält zwei variable Regionen (VR1 und VR2), welche die antigenische Variabilität zum größten Teil determinieren (Maiden, 1991).

Eine zweite Gruppe an OMP besteht aus hochvariablen Klasse 5 Proteinen, die v.a. bei unbekapselten Meningokokken der festen Adhäsion an Zielzellen dienen und die Aufnahme in diese beeinflussen. Sie bedingen ebenso wie die Pili den Wirtszelltropismus der Neisserien. Es sind 5 Typen bekannt, die alle gleichzeitig in einem Stamm exprimiert werden können (Aho *et al.*, 1987; Stern und Meyer, 1987). Ein Typ wird Opc oder 5C, die anderen vier Opa (von „opacity protein“) genannt, da sie bei *N. gonorrhoeae* durch die Bindung von Opa an das Lipooligosaccharid der Nachbarzelle zu einer Aggregation der Bakterien und so zu einer opaquen Koloniemorphologie auf Agar führen (Swanson, 1982; Blake *et al.*, 1995). Alle Gene der Klasse 5 Proteine tragen unterschiedliche, aber im Gegensatz zu den *pil*-Genen, vollständige Sequenzen, die konstitutiv transkribiert werden. Dies wird bei Opa durch die Anzahl an CTCTT-Pentameren, bei Opc durch die Anzahl an Cytidinbasen gesteuert, die zu einer *recA*-unabhängigen Verschiebung des Leserasters führen (Murphy *et al.*, 1989; Sarkari *et al.*, 1994). So können sie einzeln an- und abgeschaltet werden (Connell *et al.*, 1988; Stern *et al.*, 1986). Die antigenische Variation bei Opc ist wesentlich geringer als bei den Opa Proteinen, die durch Rekombination zwischen den *opa*-Genen und durch Transformation die Sequenz zweier hypervariabler Regionen (HV1 und HV2) stark variieren (Connell *et al.*, 1988; Stern *et al.*, 1986; Robertson und Meyer, 1992). Opc bindet Bestandteile des Serums und der extrazellulären Matrix, z.B. Integrinrezeptoren, auf Epithel- und Endothelzellen. Zur Bindung dieser Rezeptoren auf Endothel ist Vitronectin als Brückenmo-

lekül nötig (Virji *et al.*, 1994). Opa bindet ebenfalls Matrixbestandteile, wie Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) oder CD66 Rezeptoren auf Epithelzellen und schwächer auch auf Endothelzellen (Virji *et al.*, 1993). Sowohl die Bindung über Opa als auch Opc führt zur Aufnahme in die Zielzelle (Virji *et al.*, 1996a; de Vries *et al.*, 1998).

Die Neisserien sind auch auf eine ausreichende Versorgung mit Eisen angewiesen. Dazu synthetisieren sie die OMP Transferrin-bindendes Protein (Tbp) und Lactoferrin-bindendes Protein (Lbp). Beide entziehen ihrem entsprechenden Zielmolekül Eisen und sorgen für ausreichenden Nachschub an Eisen für die Meningokokken (Cornelissen und Sparling, 1994; Wooldridge und Williams, 1993). Weitere Eisenaufnahmesysteme wie HmbR und HpuB dienen der Aufnahme von Häm- und Hämoglobin-gebundenem Eisen (Schryvers und Stojilkovic, 1999).

1.5.5. Lipooligosaccharid (LOS)

Durch das LOS werden Meningokokken in 12 Immunotypen eingeteilt (Scholten *et al.*, 1994). Ungefähr 50 % der äußeren Membran bestehen aus LOS. LOS ist wie das Lipopolysaccharid (LPS) anderer gramnegativer Bakterien aus Lipid A, der Verankerung in der Membran, und einer Oligosaccharidkette, die nach außen ragt, aufgebaut. Nur ist diese Zuckerkette im LOS kürzer als im LPS. Lipid A ist der toxische Anteil des Endotoxins gramnegativer Bakterien. Die Neisserienmembran gibt ständig Vesikel ab, die viel LOS und somit Lipid A enthalten. Diese werden für die Auslösung des septischen Schocks verantwortlich gemacht, wenn *N. meningitidis* die Blutbahn erreicht. Die Oligosaccharidkette besteht aus einem inneren Anteil, der hochkonserviert ist, und einem äußeren, der einer starken antigenischen Variation unterliegt (Griffiss *et al.*, 1988; Swanson *et al.*, 1992). Auch das LOS kann von den Serogruppen, die Sialinsäure bilden können (Serogruppe B, C, W-135 und Y), terminal sialyliert werden und schützt so vor einem Angriff des menschlichen Komplementsystems (Mandrell *et al.*, 1991, Hammer-schmidt *et al.*, 1994; Estabrook *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 1997; Kahler *et al.*, 1998). Die Bedeutung der Kapsel im Schutz vor dem Komplementsystem ist zwar größer (Vogel und Frosch, 1999b), aber nicht alle Stämme können mit ihrer Kapsel allein das Komplementsystem abwehren (Vogel *et al.*, 1997). Ähnlich der Kapsel von Serogruppe B Meningokokken kommt es auch hier zu einem molekularen Mimikry, da das terminale Lacto-N-neotetraose (LNnt) Epitop der Immunotypen L2, L3, L5, L7 und L9 Oberflächenantigenen von menschlichen Erythrozyten, Granulozyten und Lymphozyten ent-

spricht. Die klinische Bedeutung des molekularen Mimikry zeigt sich darin, dass genau diese Immuntypen häufig krankheitsassoziiert sind (Tsai und Civin, 1991). Auch das LOS unterliegt einer Phasenvariation durch die Änderung der Nukleotidanzahl im *IgtA*-Gen (Jennings *et al.*, 1995; Erwin *et al.*, 1996). Durch die Insertion von *IS1301* in *siaA* (siehe Kapsel) kann die endogene Sialylierung abgeschaltet werden (Hammerschmidt *et al.*, 1996a).

1.5.6. IgA₁-Protease

Ein weiterer Resistenzfaktor der Meningokokken gegen das Immunsystem ist die IgA₁-Protease. Sie wird bei Kontakt mit menschlichem Nasopharynxepithel, aber nicht mit dem Endothel der Blut-Hirn-Schranke, hochreguliert. Dieses Enzym spaltet humanes Immunglobulin A₁ (IgA₁) sowohl im Serum als auch auf dem Epithel des Atemtrakts an der Gelenkregion (Plaut *et al.*, 1975) und verhindert dabei die IgA₁-vermittelte Inhibition der Adhärenz an Epithel und durch Bildung von F(ab)₂ IgA Fragmenten die Bindung von opsonisierenden IgM oder IgG (Jarvis *et al.*, 1991). Außerdem ruft die IgA₁-Protease eine starke Entzündungsreaktion in humanen Monozyten hervor, die zur Pathogenese der Meningokokken-Infektion beitragen könnte (Lorenzen *et al.*, 1999). Bei IgA₁-Protease-defizienten Mutanten in *N. gonorrhoeae* wurde eine Verzögerung der Transzytose durch einschichtiges Epithel nachgewiesen (Hopper *et al.*, 2000).

1.6. Variabilität der Neisserien

Wie oben beschrieben beruht die Variabilität der Neisserienoberfläche auf zwei unterschiedlichen Mechanismen. Zum einen können die Bakterien die Expression von Oberflächenproteinen an- und abschalten (Phasenvariation), zum anderen können sie die Antigene ihrer Oberflächenproteine verändern. Bei der Sequenzierung des Genoms zeigte sich, dass eine größere Anzahl an Genen als bisher angenommen der Phasenvariation unterliegt (Tettelin *et al.*, 2000). Die antigenische Variation entsteht entweder durch homologe Rekombination innerhalb des Neisseriengenoms (siehe Pili) oder durch Aufnahme von Fremd-DNA von außen und homologe Rekombination ins Neisseriengenom (Transformation). Beide Mechanismen sind *recA*-abhängig (Gibbs *et al.*, 1989). Transduktion oder Konjugation sind bei Neisserien nicht beschrieben.

1.6.1. Transformationsmechanismus

Sparling zeigte schon 1966, dass *N. gonorrhoeae* die Fähigkeit zur natürlichen Transformation besitzt (Sparling, 1966). Dies lässt sich auch *in vivo* anhand von Mosaikgenen wie der IgA₁-Protease, die Sequenzen verschiedener Stämme beinhaltet, nachweisen und beweist das Vorkommen von horizontalem Gentransfer (Halter *et al.*, 1989). Dieser Vorgang wird durch verschiedene Proteine gesteuert. Zuerst wird die DNA von den Pilusproteinen aufgenommen und durch die Außenmembran transloziert, dabei ist die Erkennung der „Neisseria-uptake-sequence“ (NUS) wichtig. Hierbei handelt es sich um eine Sequenz aus 10 Basenpaaren mit der Folge 5'-GCCGTCTGAA-3', die der Erkennung von Neisserien-spezifischer DNA dient und die Aufnahme in das Bakterium erleichtert (Goodman und Scocca, 1988; Elkins *et al.*, 1991). Für die Aufnahme reicht bereits eine NUS aus (Goodman und Scocca, 1988; Stein, 1991). Doppelsträngige Plasmid-DNA wird während der Aufnahme durch ein noch unbekanntes Enzym linearisiert (Biswas *et al.*, 1986). Außerdem konvertieren die Pilusproteine linearisierte DNA in eine DNase-resistente Form (Rudel *et al.*, 1995b; Fussenegger *et al.*, 1997). Der Transport durch die Peptidoglykanschicht erfolgt durch ComL und Tpc, die durch ihre Hydrolaseaktivität eine vorübergehende Öffnung des Peptidoglykans bedingen und so den Transport durch die Peptidoglykanschicht erleichtern (Fussenegger *et al.*, 1996a, 1996b und 1997). ComA transportiert die Fremd-DNA dann durch die Zytoplasmamembran (Facijs und Meyer, 1993; Fussenegger *et al.*, 1996a). Im Bakterium wird die DNA mit der genomischen DNA abgeglichen und bei Vorhandensein genügend großer Sequenzhomologien von mindestens 50 Basenpaaren (Singer *et al.*, 1982) unter Kontrolle der *rec*-Gene rekombiniert. Dabei erfolgt der Austausch homologer Abschnitte durch doppeltes Crossing-over (Kooimey und Falkow, 1987). Die DNA-Aufnahme und Rekombination kann innerhalb nur weniger Minuten erfolgen (Frosch und Meyer, 1992).

1.6.2. RecA

Die Funktion von *recA* bei der homologen Rekombination zeigten Clark und Margulies 1965 an *E. coli*. Später entdeckte man, dass *recA* auch zur DNA Reparatur fähig ist und als Koprotease wirkt. *RecA⁻ E. coli* zeigen keine homologe Rekombination mehr und sind empfindlich gegenüber UV-Strahlung und DNA schädigenden Substanzen (Miller und Kokjohn, 1990). 1987 deletierten Kooimey und Falkow das *recA*-Gen in *N. go-*

norrhoeae und zeigten, dass die *recA*⁻ Mutanten nicht mehr transformierbar waren. Die *recA*⁻ Neisserien waren analog der *E. coli* Mutanten sensitiver gegenüber UV-Strahlung als ihr *recA*⁺ Wildtyp (Kooimey und Falkow, 1987). Durch die *recA*-Deletion wurde auch die Frequenz der Phasen- und antigenischen Variation der Pili stark verringert (Kooimey und Falkow, 1987; Seifert, 1997). Weiterhin werden für die Transformation Gene des RecBCD- und RecF-Mechanismus benötigt (Mehr und Seifert, 1998). Kürzlich wurde entdeckt, dass auch das RdgC Protein eine Rolle in der antigenischen Variation der Pili spielt (Mehr *et al.*, 2000).

1.6.3. Bedeutung der antigenen Variation

Die durch diese Mechanismen hohe Variabilität der Oberflächenantigene ermöglicht es den Meningokokken, sich ideal an ihre ökologische Nische anzupassen und auf Umwelteinflüsse zu reagieren. So erlaubt z.B. die Phasenvariation der Kapsel die Invasion in die Blutbahn. Nur unbekapselte Neisserien können das Nasopharynxepithel durchdringen, werden aber in der Blutbahn durch das Komplementsystem abgetötet. Deshalb muss dort wieder eine Kapsel ausgebildet werden (Hammerschmidt *et al.*, 1996b). Durch die hohe antigenische Variation der Pili, der Opa-Proteine oder des LOS, entgehen die Neisserien dem Immunsystem, das auf die sich verändernden Oberflächenantigene reagieren muss. Die Abtötung vieler Neisserien bietet den überlebenden Bakterien die Chance, dem Immunsystem durch Transformation mit der frei werdenden Neisserien-DNA und Veränderung der Oberflächenantigene zu entgehen. Durch Transformation können auch Virulenzfaktoren zwischen Neisserien übertragen werden (Frosch und Meyer, 1992).

1.7. Pathogenese der Meningokokken-Infektion

Nach einer Tröpfcheninfektion des Nasopharynxepithels werden die Meningokokken entweder durch das Immunsystem abgetötet oder sie überleben und es entsteht so eine Besiedlung der Schleimhaut mit einem Trägerstatus oder eine Invasion in die Blutbahn mit Sepsis oder Meningitis (Virji, 1996b). Interessanterweise kann der gleiche Stamm sowohl zu einem Trägerstatus wie auch zu Krankheit führen, was die Bedeutung des Wirtsimmunsystems aufzeigt. Welche Faktoren den Verlauf beeinflussen, ist noch nicht genau bekannt. Im Nasopharynx von Langzeit-Trägern findet man gehäuft unbekapsel-

te, unsialylierte Meningokokken, was darauf hindeutet, dass diese Bakterien in den Wirtszellen überleben und so dem Immunsystem entgehen (Virji, 1996b).

1.7.1. Invasionsablauf

Man stellt sich die Invasion so vor, dass es zuerst über die Pili zu einer losen Adhärenz an die Mikrovilli von zilienfreiem Säulenepithel kommt (Stephens *et al.*, 1983). Dabei liegen die Meningokokken erst in Klumpen und verteilen sich dann so, dass sie einen Bakterienrasen auf dem Epithel bilden. Man beobachtet zugleich eine Herunterregulation der Pilus-expression. Anschließend entsteht eine festere Bindung über die Klasse 5 Proteine Opa und Opc. Dann werden durch die Porine Poren in der Zellmembran des Epithels erzeugt und anschließend das Zytoskelett der Zelle über Calmodulin so verändert, dass die Bakterien endozytiert und durch die Zelle transportiert werden (Pujol *et al.*, 2000). Allerdings stellt die Kapsel ein Hindernis für die Adhäsion und Invasion dar, so dass überwiegend unbekapselte Neisserien in die Epithelzellen gelangen (Hammerschmidt *et al.*, 1996b). Diese Erkenntnisse stützen sich darauf, dass invasive Bakterien zumeist unbekapselt und nicht piliert sind und ein unsialysiertes, verkürztes LOS exprimieren (de Vries *et al.*, 1996). Im subepithelialen Raum dringen sie dann in Blutgefäße ein und werden so im Körper verteilt. Im Blut überleben nur bekapselte Neisserien, weil sie durch ihre Kapsel vor dem Angriff von Monozyten, Leukozyten, Antikörpern und Komplement geschützt werden (McNeil *et al.*, 1994; Hammerschmidt *et al.*, 1994; Jarvis 1995; Vogel *et al.*, 1997; Kahler *et al.*, 1998; Kolb-Mäurer *et al.*, 2001; Unkmeir *et al.*, 2002a). Dort können sie sich vermehren, in den Subarachnoidalraum eindringen und die Meningen befallen. Wie sie in den Subarachnoidalraum gelangen, wird bisher nur spekuliert. Man erwartet drei mögliche Eintrittspforten. Parazellulär oder transzellulär durch das Endothel des Plexus choroideus oder innerhalb zirkulierender Leukozyten (Tunkel und Scheld, 1993).

1.7.2. Schutz vor dem Immunsystem

Bei jedem Invasionsschritt müssen sich die Meningokokken vor der Zerstörung durch das Immunsystem schützen. Dies geschieht, wie oben beschrieben, direkt durch die Kapsel, das LOS und die IgA₁-Protease und indirekt durch die häufige Variation der Phasen der Kapsel und der Antigene und Phasen der Pili, des LOS und der OMP. Auch durch andere Mikroorganismen, wie z.B. *E. coli* K1, hervorgerufene, kreuzreagierende

IgA können in Konkurrenz zu den opsonisierenden IgG und IgM treten und so die Phagozytose behindern (Goldschneider *et al.*, 1969; Griffiss, 1982).

1.7.3. Immundefekt

Bei Menschen mit erblichen Defekten im Komplementsystem besteht je nach Art des Defekts ein mildes (z.B. bei Störung der Bildung des „membrane attack complex“ MAC) bis großes Risiko (z.B. bei Defekt im Properdin) an einer schwer verlaufenden, invasiven Meningokokken-Infektion zu erkranken (Figuroa und Densen, 1991). Auch Patienten nach Splenektomie tragen ein erhöhtes Risiko (Davidson und Wall, 2001).

1.8. Chemoprophylaxe

Nachdem die Gefährlichkeit der Meningokokken beschrieben und begründet wurde, soll jetzt auf Möglichkeiten eingegangen werden, sich vor einer Infektion mit diesen Bakterien zu schützen. Prinzipiell gibt es heute zwei Präventionswege. Man kann Kontaktpersonen eine Chemoprophylaxe mit Antibiotika verabreichen oder Risikopersonen impfen. Als Chemoprophylaxe kommen v.a. Antibiotika in Betracht, die in hoher Konzentration im Nasopharynx sezerniert werden. Breite Anwendung finden Rifampicin und Gyrasehemmer, die aber teratogen wirken können. In der Schwangerschaft werden deshalb Cephalosporine verabreicht. Mit diesen Antibiotika sind 70 bis 95 % der Träger nach 2 Tagen frei von Neisserien (Schwartz *et al.*, 1988; Darouiche *et al.*, 1990; Schaad *et al.*, 1995).

1.9. Impfungen gegen Meningokokken

1.9.1. Polysaccharidvakzine

Ein weiterer Weg, die Ausbreitung einer Endemie oder Epidemie zu verhindern, ist der Schutz der Bevölkerung durch Impfstoffe. Im Einsatz befinden sich derzeit Polysaccharidvakzine, die aus Kapselpolysacchariden der Serogruppen A, C, W-135 und Y bestehen, und Konjugatvakzine gegen Serogruppe C. Weiterhin werden Konjugatimpfstoffe gegen die Serogruppen A, Y und W-135 entwickelt. B-Polysaccharidvakzine erzeugten in Erwachsenen nur eine kurzdauernde IgM Antwort und die erzeugten Antikörper waren von geringer Avidität (Zollinger, 1979; Mandrell und Zollinger, 1982). Außerdem bestehen Sicherheitsbedenken wegen der Gefahr, eine Autoimmunerkrankung auszulösen (Kasper *et al.*, 1973; Finne *et al.*, 1983, 1987; Troy, 1992). Polysaccharidvakzinen

haben den Nachteil, dass sie nur eine T-zellunabhängige Immunität hervorrufen. Somit ist die Wirkungsdauer der Impfstoffe kurz und die B-Zellantwort zeigt keinen Booster-effekt. Außerdem ist die Immunantwort stark altersabhängig. So bewirkt z.B. der Serogruppe C Polysaccharidimpfstoff in Kindern unter 18 Monaten, der gegen Serogruppe A in Kindern unter 3 Monaten keine Immunreaktion (Lepow *et al.*, 1977; Reingold *et al.*, 1985; King *et al.*, 1996). Außerdem kann der Impfling trotzdem Träger werden (Epidemiologisches Bulletin, 2000). Deshalb eignen sich diese Impfstoffe nur zum Schutz der Bevölkerung in Epidemiegebieten und von Reisenden in solche Gebiete. Vor Verabreichung sollte allerdings die verursachende Serogruppe genau bekannt sein (Frosch, 1999). In einigen Fällen wurde bei der zweiten Impfung eine Hyporeaktivität gegen die Neisserienkapselpolysaccharide festgestellt (Artenstein *et al.*, 1975; MacDonald, 1998).

1.9.2. Konjugatvakzine

Durch die Kopplung der Polysaccharide der Serogruppen A und C an Diphtherie- oder Tetanustoxoid konnte eine T-zellabhängige Immunität ausgelöst werden, die durch Bildung eines immunologischen Gedächtnisses länger vorhält, einen Boostereffekt mit Wechsel der IgM- zur IgG-Klasse aufweist und auch bei Säuglingen eine Immunreaktion auslöst. Durch Kopplung von Polysaccharid der Serogruppe B konnte nur eine schwache Immunreaktion hervorgerufen werden (Jennings und Lugowski, 1981; Twumasi *et al.*, 1995; Fairley *et al.*, 1996). Die Gefahr dieser neuen Impfstoffe besteht darin, dass sie der ohnehin schon vorherrschenden Serogruppe B durch das Zurückdrängen der Serogruppen A und C die Möglichkeit geben, sich noch stärker auszubreiten (Frosch, 1999). Die Kopplung des B-Polysaccharids induzierte in Tiermodellen zwar bakterizide Antikörper, allerdings gegen ein synthetisches, durch die Kopplung entstandenes Epitop und nicht gegen das B-Polysaccharid selbst (Bartoloni *et al.*, 1995). Die Serogruppe C Konjugatimpfstoffe wurden jetzt in England in einer breit angelegten Impfkampagne mehreren Tausend Kleinkindern und Jugendlichen verabreicht. Dabei zeigte sich, dass in Kleinkindern die konjugierten Polysaccharidimpfstoffe die unkonjugierten deutlich in ihrer Immunogenität übertreffen. Die Inzidenz an Serogruppe C Erkrankungen sank um 92 % bei Kleinkindern. Leider wurde ein Anstieg von Serogruppe B-bedingten Erkrankungen registriert. Die Verabreichung der Serogruppe C Konjugatvakzine wird nur bei Ausbrüchen, Populationen mit hoher Inzidenz (>3 Fälle pro

100.000 Einwohner) und Risikopersonen wie Menschen mit Komplementdefekten oder Menschen mit nahem Kontakt zu Erkrankten empfohlen (Cartwright *et al.*, 2001; Ramsay *et al.*; 2001). Ein weiteres Problem stellen die hohen Herstellungskosten dar, die eine breite Anwendung in Entwicklungsländern, z.B. des Meningitisgürtels, erschweren.

1.10. Neue Vakzinierungsstrategien

1.10.1. Probleme mit Serogruppe B

Vor den Serogruppen A, C, W-135 und Y bestehen relativ gute Schutzmöglichkeiten. Nur vor der Serogruppe B, die in den westlichen Ländern die häufigste Erkrankungursache durch Meningokokken ist (Achtman, 1995a; Epidemiologisches Bulletin, 2000), ist noch immer kein Schutz möglich. Die Suche nach einem wirksamen Impfstoff gegen Serogruppe B ist deshalb umso wichtiger, als es durch die Eindämmung der anderen Serogruppen mit Impfstoffen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts und zu einer Zunahme der Infektionen mit Serogruppe B kommen könnte (Frosch, 1999; Vogel *et al.*, 1999a). Außerdem besitzen die Meningokokken die Möglichkeit, ihre Serogruppe zu wechseln und so den Impfstoffen durch einen Wechsel in Serogruppe B zu entgehen (Swartley *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 2000). Um die Bevölkerung wirksam gegen eine Neisserienepidemie zu schützen, muss man also auch gegen Serogruppe B eine wirksame Vakzine entwickeln. Auch die Evaluation der Wirkung eines Serogruppe B Impfstoffs bereitet Probleme, da die Immunabwehr nicht unbedingt durch bakterizide Antikörper, sondern auch durch opsonisierende Antikörper und unspezifische Abwehr vermittelt werden kann. Dies wird allerdings von den heute zur Effektivitätsmessung verwendeten Serum Bakterizidie Assays (SBA) nicht erfasst (Ison *et al.*, 1999).

1.10.2. Natürliche Immunität

Der beste Schutz vor einer Infektion mit Serogruppe B ist heute immer noch die natürliche Immunität. Wie diese zustande kommt, ist nach wie vor nicht vollständig verstanden. Sie richtet sich gegen viele verschiedene Epitope und unterscheidet sich dadurch von der durch Impfung hervorgerufenen Immunität, bei der nur gegen ein Antigen Immunität induziert wird (Pollard und Frasch, 2001). In epidemiologischen Studien wurde festgestellt, dass die Trägerrate von *N. meningitidis* mit dem Alter ansteigt, während gleichzeitig die Trägerrate des apathogenen Kommensalen *N. lactamica* abnimmt. Die höchste Inzidenz an Meningokokken Erkrankungen liegt dabei im Alter zwischen 0 und

4 Jahren, wenn der Titer von maternalen Antikörpern im Blut des Kindes abgesunken ist, und das Kind noch keine eigene Immunität erworben hat (Cartwright *et al.*, 1987; Virji, 1996b). Gleichzeitig ist die Trägerrate von *N. lactamica* in Regionen mit häufigen *N. meningitidis* Infektionen geringer. Man vermutet deshalb einen Schutz vor *N. meningitidis* durch Induktion bakterizider Antikörpern bei Trägern von *N. lactamica* und durch Besetzung der ökologischen Nische der Meningokokken durch *N. lactamica*. Auf welchen Antigenen dieser Schutz beruht, ist nicht bekannt. Allerdings hat man Antigene in der äußeren Membran der Bakterien entdeckt, die sowohl von *N. meningitidis* als auch von *N. lactamica* gebildet werden. Auch mathematische Modelle sprechen für einen Schutz durch *N. lactamica* (Gold *et al.*, 1978; Cartwright *et al.*, 1987; Olsen *et al.*, 1991; Simmons *et al.*, 2000; Troncoso *et al.*, 2000; Coen *et al.*, 2000). In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass die Besiedlung mit *N. lactamica* vor einer Infektion mit *N. meningitidis* schützt und dass die Seren dieser Versuchstiere Neisserien abtöten (Oliver *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2002). Vielleicht lässt sich also auch ein Schutz vor einer Infektion mit Meningokokken der Serogruppe B durch Besiedlung mit *N. lactamica* erreichen (Gorringe *et al.*, 1999). Ein weiterer Grund für die Altersabhängigkeit der Infektionen könnte die Reife des menschlichen Immunsystems sein, denn bei Neugeborenen ist der Schutz vor Infektionen durch Antikörper, durch das Komplementsystem und durch Phagozytose durch Leukozyten oder Monozyten noch geringer. Bei nicht immunen Menschen wird der Schutz vor Meningokokken vor allem durch den alternativen Weg des Komplementsystems und Opsonisierung, bei immunen durch spezifische Antikörper und den klassischen Weg des Komplementsystems vermittelt. Dabei spielt bei Serogruppe B die Opsonophagozytose eine größere Rolle als bei den anderen pathogenen Serogruppen (Pollard und Frasch, 2001). Die Induktion von Antikörpern kommt eventuell auch durch den Meningokokken antigenisch ähnlichen Bakterien, wie *E. coli* K1 zustande, die zur Bildung kreuzreagierender Antikörper führen (Goldschneider *et al.*, 1969).

1.10.3. Outer membrane vesicles (OMV)

Einer der ersten Impfungs-Ansätze war die Verabreichung von „outer membrane vesicles“ (OMV) als Vakzine. Diese Membranvesikel, die ständig von den Neisserien abgegeben werden, wirken v.a. durch PorA immunogen. PorA weist eine hohe antigenische Variabilität auf, weshalb diese Impfstoffe nur serosubtypenspezifisch wirken (Bjune *et*

al., 1991; Sierra *et al.*, 1991; De Moraes *et al.*, 1992). Dies beschränkt die Wirksamkeit des Impfstoffs auf bestimmte Regionen der Erde und stellt eine große Herausforderung für den Hersteller dar, da er für jede Region der Erde einen passenden Impfstoff herstellen müsste. 1999 entdeckten van der Ende *et al.* bei einem Meningitispatienten einen PorA negativen Neisserienstamm, was den Einsatz der OMV noch weiter limitiert (van der Ende *et al.*, 1999). Diese OMV-Vakzine wurden in Norwegen, Kuba, Brasilien und Chile angewandt, da dort ein PorA Typ vorherrschte, und der Impfstoff eine Immunität gegen diesen PorA Typ induzierte. Die Effizienz lag zwischen ca. 50 % und 83 %, allerdings mit einer starken Altersabhängigkeit und keinem Schutz von Kindern unter zwei Jahren (Bjune *et al.*, 1991; Sierra *et al.*, 1991; De Moraes *et al.*, 1992). Dabei wurde erstmalig gezeigt, dass auch durch Komponenten der bakteriellen äußeren Membran eine Induktion bakterizider Antikörper möglich ist (Frosch, 1999). Die strenge Serosubtypenspezifität versucht man nun zu umgehen, indem man hexavalente OMV verwendet, die die sechs in 80 % der Erkrankungsfälle vorkommenden PorA-Varianten enthalten. Wahrscheinlich würden jedoch durch den von diesen OMV ausgeübten Selektionsdruck andere PorA Typen bevorzugt und die Vakzine nicht mehr gegen die richtigen PorA Typen wirken (Claassen *et al.*, 1996; Rouppe van der Voort *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000; Morley und Pollard, 2001).

1.10.4. Gewinnung bakterizider Antikörper ohne Auslösung einer

Autoimmunreaktion

Um bakterizide Antikörper gegen Serogruppe B zu induzieren hat man das α -2,8-N-Acetyl-Neuraminsäure-Polymer des Kapselpolysaccharids in eine Poly- α -2,8-N-propionyl-neuraminsäure umgewandelt. Eine Autoimmunitätsreaktion wurde dabei in Tierversuchen zwar nicht nachgewiesen, jedoch kann man diese Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragen (Pon *et al.*, 1997; Fusco *et al.*, 1997). Auch erste Versuche an Erwachsenen erzeugten keine Autoimmunität (Danve *et al.*, 1996). Dennoch ist man zurückhaltend mit dem Einsatz als Impfstoff. Man sucht jetzt bei bakteriziden Antikörpern, die *in vitro* keine Autoimmunität hervorrufen, nach spezifischen Epitopen im Kapselpolysaccharid der Serogruppe B, um neue Vakzinekandidaten zu finden (Granoff *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 2001).

1.10.5. OMP

Auf der Suche nach weiteren immunogen wirkenden und konservierten Antigenen hat man verschiedene Proteine gefunden. So wurde z.B. die Immunogenität eines Epitops im inneren des LOS (Plested *et al.*, 1999), AutotransporterA (Ait-Tahar *et al.*, 2000), TspA (Kizil *et al.*, 1999), NspA (neisserial surface protein A; Martin *et al.*, 1997) oder TbpB (Transferrin-binding protein B; Rokbi *et al.*, 1997) untersucht. Dabei traten verschiedene Probleme auf. TbpB erwies sich in ersten klinischen Studien als nur schwach immunogen und man fand verschiedene Allele (Danve *et al.*, 1998). NspA hingegen erwies sich als hochkonserviert, trotzdem erzeugte es in Tierversuchen in rund 35 % keine Immunität. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass das recht kleine Molekül von der Kapsel maskiert wird und deshalb keine Immunität erzeugt (Moe *et al.*, 1999). Die Suche nach dem universalen Antigen könnte sich als sehr schwierig erweisen, da alle Oberflächenproteine entweder einer hohen Variation unterliegen oder dem Immunsystem nicht zugänglich sind und so nur in reiner Form eine Immunreaktion hervorrufen. Alle Meningokokkenstämme, die dem Immunsystem aktivierende Antigene präsentieren, wurden wahrscheinlich bereits durch den Evolutionsdruck selektioniert.

1.10.6. Genomanalyse

Durch die Sequenzierung des Genoms von *N. meningitidis* besteht jetzt die Möglichkeit auf DNA-Ebene nach weiteren Virulenz-bestimmenden Genen zu suchen. So haben Pizza *et al.* 350 durch Genomanalyse entdeckte, potentiell oberflächenexponierte Antigene in *E. coli* kloniert und exprimiert. Sieben dieser Antigene waren konserviert und induzierten als Subunit-Vakzine bakterizide Antikörper im Mausmodell (Pizza *et al.*, 2000; Tettelin *et al.*, 2000). Die Antikörpertiter waren jedoch geringer als nach Impfung mit OMV (Giuliani *et al.*, 2000).

Sun *et al.* haben eine Möglichkeit zur funktionellen Analyse von Virulenzfaktoren entwickelt, indem sie verschiedene Mutationen im Neisseriengenom durch Signature-tagged-mutagenesis einführten und die Mutanten auf ihre Virulenz untersuchten (Sun *et al.*, 2000). Durch diese Methode könnte es gelingen, *in vivo* essentielle Proteine zu identifizieren, die - falls konserviert und immunogen - ideale Vakzinekandidaten darstellen sollten.

1.10.7. Lebendvakzine

In dieser Doktorarbeit ist ein weiterer Ansatz, nämlich die Verwendung von attenuierten Serogruppe B Stämmen als Lebendimpfstoff, verfolgt worden. Bisher lizenzierte Lebendimpfstoffe wie BCG gegen Tuberkulose (Calmette *et al.*, 1927), *Vibrio cholerae* CVD103-HgR gegen Cholera (Levine und Kaper, 1993) oder *Salmonella typhi* Ty21a (Levine *et al.* 1987) gegen Typhus zeigen, dass eine Impfung mit Lebendimpfstoffen eine schützende Immunität im Impfling hervorruft und wenige Nebenwirkungen verursacht (Hormaeche und Khan, 1996; Lindberg, 1998). Durch gezielte Ausschaltung von Virulenzgenen, haben Levine und Mitarbeiter 1992 einen Salmonellenstamm entwickelt, der sich in ersten klinischen Tests als wirkungsvoll und sicher erwiesen hat (Hone *et al.*, 1992; Tacket *et al.*, 1992).

Durch gezielte Attenuierung von Serogruppe B Stämmen von *N. meningitidis* sollte es also möglich sein, einen sicheren Impfstoff zu entwickeln, der keinerlei Erkrankungen im Impfling auslöst und nicht die Fähigkeit besitzt, in einen virulenten Stamm zu revertieren, aber dennoch zu einer protektiven und lang anhaltenden Immunität führt.

Da der Lebensraum und die Eintrittspforte der Meningokokken in die Blutbahn der menschliche Nasopharynx ist, sollte ein Lebendimpfstoff gegen Meningokokken nasal applizierbar sein, durch das Nasopharynxepithel in die Blutbahn übertreten können und so eine starke mukosale und systemische Immunantwort hervorrufen. Wie sich an Versuchen mit anderen Lebendvakzinen, wie z.B. CVD103-HgR, Ty21a, Adenovirusvakzine, SIV-Vakzine oder auch an Totvakzinen, wie die OMV-Vakzine gegen *N. meningitidis* oder eine Influenza-Vakzine, gezeigt hat, kann eine mukosale Applikation durchaus eine systemische und mukosale Immunreaktion hervorrufen (Saunders *et al.*, 1999; Glück *et al.*, 1999; Ada, 2001; Dietrich *et al.*, 2003a). In der Blutbahn sollte die Lebendvakzine dann vom menschlichen Immunsystem abgetötet werden, um eine Vermehrung im Blut oder ein Durchtreten der Blut-Hirn-Schranke zu verhindern. Um eine starke Immunantwort hervorzurufen, sollte sie mit Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) sowohl im Nasopharynx als auch im Blut interagieren und diese zur Induktion einer T-zellabhängigen Immunantwort mit Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses stimulieren. Die Deletion der Kapselexpression würde sowohl die Adhärenz und Invasion am Nasopharynxepithel und die Interaktion mit APZ erhöhen als auch eine Abtötung im Blut durch das menschliche Immunsystem garantieren. Außerdem

sollte die DNA-Rekombination bei natürlich kompetenten Bakterien, wie den Neisserien, durch z.B. *recA*-Deletion inhibiert werden, um eine Reversion in den virulenten Wildtyp und die Variation der Oberflächenantigene zu verhindern. Der Lebendimpfstoff sollte weiterhin den Vorteil haben, dass er sich im Nasopharynx vermehrt und so seine Antigene länger, in nativer Form und in größerer Vielfalt präsentiert. Manche Antigene, die nur während der Vermehrung im Wirt exprimiert werden, würden so dem Immunsystem angeboten. Die lokale Verabreichung und die mukosale Immunität sollten eine Besiedlung mit pathogenen Neisserien verhindern und so die Trägerrate in der Bevölkerung senken. Durch die Vielzahl an präsentierten Antigenen sollte eine breite Immunreaktion gegen die meisten Serogruppe B Stämme und eventuell auch andere Serogruppen von *N. meningitidis* möglich sein (Tang *et al.*, 1999). Außerdem ist ein Überleben in der Umwelt durch die Restriktion der Meningokokken auf den Menschen als den einzigen Wirt ausgeschlossen.

2. Ergebnisse

2.1. Stammauswahl

Der erste Schritt bei der Entwicklung eines Lebendimpfstoffs gegen Meningokokken Serogruppe B war die Identifikation eines geeigneten Neisserienstamms. Dabei waren unsere Auswahlkriterien die gute und reproduzierbare Anzüchtbarkeit des Stamms unter *in vitro*-Bedingungen und die starke Adhärenz an das menschliche Nasopharynxepithel, um eine gute Besiedlung und das Hervorrufen einer protektiven Immunreaktion im Impfling sicherzustellen. Außerdem sollte er in seinen antigenischen Eigenschaften möglichst den im europäischen Raum als Krankheitserreger relevanten epidemiologischen Linien entsprechen.

Zunächst wurden zehn verschiedene Wildtypen der Serogruppe B aus dem ST-32 Komplex, vor allem aus dem europäischen Raum, ausgewählt und charakterisiert. Diese Stämme stammen aus der Stammsammlung des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg und wurden dankenswerterweise von Herrn Professor Dr. U. Vogel für unsere Untersuchungen zur Verfügung gestellt (siehe Tabelle 1).

Stammnummer	Ursprüngliche Bezeichnung	Herkunft	Referenz
517	PB 24	Norwegen	The National Institute of Public Health, Oslo, Norway
519	M0 080	Norwegen	The National Institute of Public Health, Oslo, Norway
521	144/82	Norwegen	The National Institute of Public Health, Oslo, Norway
2021	BZ 83	Niederlande	Caugant, Folkehelsa, Oslo, Achtman
2063	8680	Chile	Caugant, Folkehelsa, Oslo, Achtman
2514	H44/76	Norwegen	Holten, 1979
2614	Va 10232/99	BRD	Index Bamberg 6/99
ID 106		Volkach, BRD	Patientenisolat
ID 110		Volkach, BRD	Patientenisolat
ID 112		Volkach, BRD	Patientenisolat

Tab. 1: Ausgewählte Serogruppe B ST-32 Komplex Stämme mit den Stammmummern des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, den offiziellen Bezeichnungen (sofern vorhanden) und ihrer Herkunft.

2.1.1. Transformation der Wildtypen

Ein wesentliches attenuierendes Prinzip bei der Entwicklung des Neisserien-Lebendimpfstoffs sollte die Ausschaltung des *siaD*-Gens sein. Dieses Gen kodiert für die Polysialyltransferase (Edwards *et al.*, 1994) und ist für die Kapselpolysaccharid-Biosynthese der Serogruppe B mitverantwortlich. Durch eine Ausschaltung von *siaD* ließe sich eine kapsellose Mutante schaffen, die vom Komplementsystem des Menschen inaktiviert werden kann und somit apathogen sein sollte. Weiterhin sollte eine bessere Kolonisierung des Nasopharynxepithels und somit eine verbesserte Immunantwort zu erwarten sein. Um aus den Wildtypstämmen denjenigen auszuwählen, der später eine optimal attenuierte und stark adhärente *siaD*-negative Deletionsmutante ergibt, wurden in einem ersten Schritt Insertionsmutanten aller ausgewählten Stämme hergestellt. Zu diesem Zweck wurde in das *siaD*-Gen jedes dieser Wildtypstämmen mit dem Plasmid pGH15 eine Chloramphenicol-Resistenzkassette (Cm^{R}) inseriert und so *siaD* ausgeschaltet. Die *siaD*-negativen Mutanten wurden dann durch Passage auf Cm-haltigen Nährböden isoliert.

Die Transformation wurde mittels PCR mit den Primern UE12 und UE13 bzw. SiaDF und SiaDR nachgewiesen. Beide Paare binden jeweils upstream bzw. downstream von *siaD*. Die PCR-Produkte der Mutanten zeigten eine geringere Mobilität in der Agarose-Gelelektrophorese, da der *siaD*-Bereich noch um die Cm-Resistenzkassette verlängert wurde. Die *siaD*-negativen und Cm-resistenten Mutanten wurden mit dem Anhang *siaDCm* bezeichnet (siehe Tabelle 2).

Wildtyp	Cm-resistente, kapsellose Mutante
517	517 <i>siaDCm</i>
519	519 <i>siaDCm</i>
521	521 <i>siaDCm</i>
2021	2021 <i>siaDCm</i>
2063	2063 <i>siaDCm</i>
2514	2514 <i>siaDCm</i>
2614	2614 <i>siaDCm</i>
ID 106	ID 106 <i>siaDCm</i>
ID 110	ID 110 <i>siaDCm</i>
ID 112	ID 112 <i>siaDCm</i>

Tab. 2: Stammnamen des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg und Bezeichnung der zugehörigen kapsellosen, Cm-resistenten Mutante.

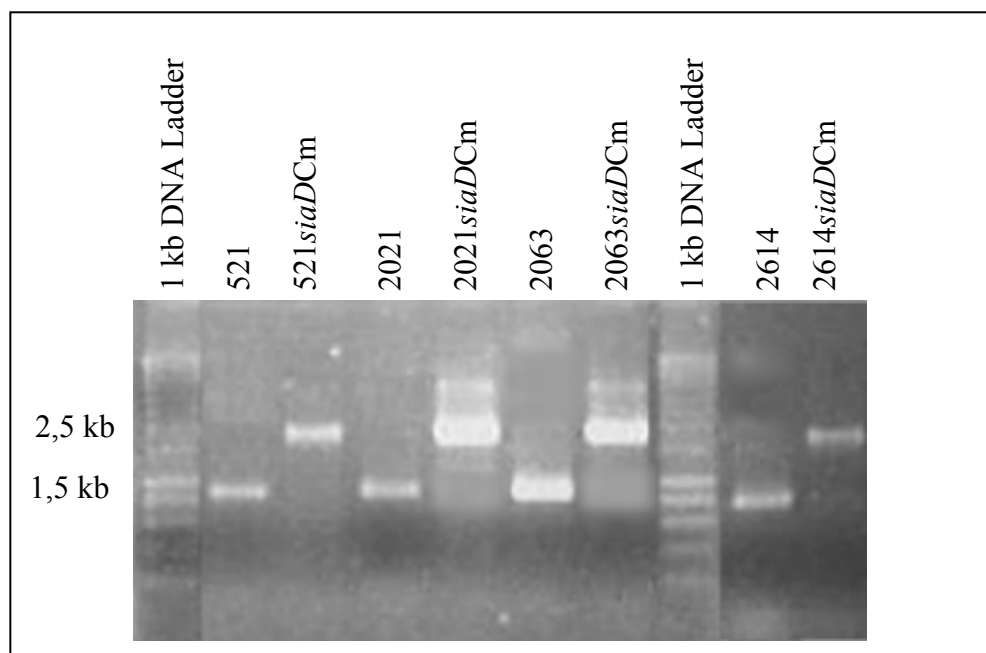


Abb. 1: Nachweis der Cm-Insertion durch PCR mit den Primern UE12 und UE13. Die Insertionsmutanten zeigen eine geringere Mobilität in der Agarosegelelektrophorese.

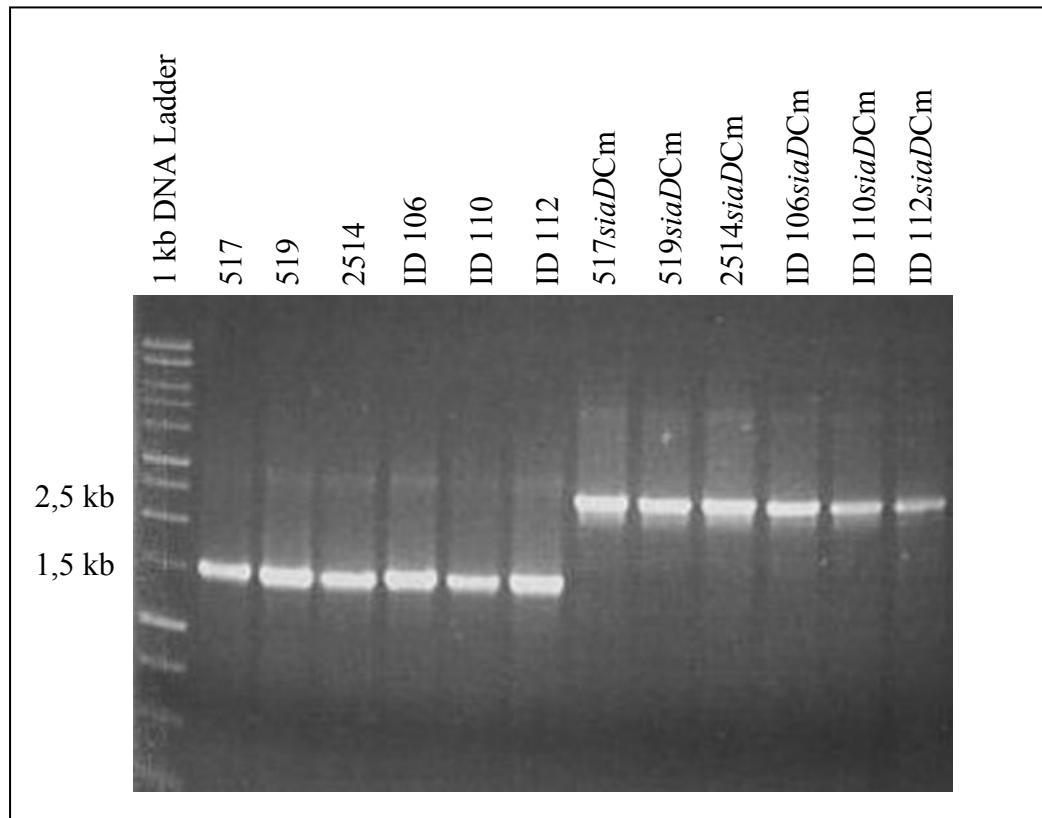


Abb. 2: Nachweis der Cm-Insertion durch PCR mit den Primern SiaDF und SiaDR. Die Insertionsmutanten zeigen eine geringere Mobilität in der Agarosegelelektrophorese.

2.1.2. Auswahlkriterien für die Selektion des Vakzine-Kandidatenstamms

Als nächster Schritt wurden die *siaD*-Mutanten auf die verschiedenen Auswahlkriterien hin überprüft. Die Adhäsion am menschlichen Nasopharynxepithel wurde in einem *in vitro*-Zellkulturmodell mit Adhäsionsassays an Hep-2 Epithelzellen analysiert. Die Anzuchtbarkeit wurde mittels Wachstumskurven überprüft. Weiterhin wurde die Bildung von Aggregaten durch mikroskopische Analyse untersucht. Der phänotypisch zum Einsatzort passendste Stamm wurde schon durch die Auswahl nach dem Isolationsort der Stämme festgelegt.

Bei den mehrfach durchgeführten Adhäsionsassays stellte sich heraus, dass die Mutanten in unterschiedlicher Stärke an die Hep-2 Epithelzellen adhärirten. Bei diesen Experimenten bewiesen vor allem die Stämme 2063 und 2514 eine starke Adhärenz, die sich durch Zugabe von FCS (fötales Kälberserum) verringerte.

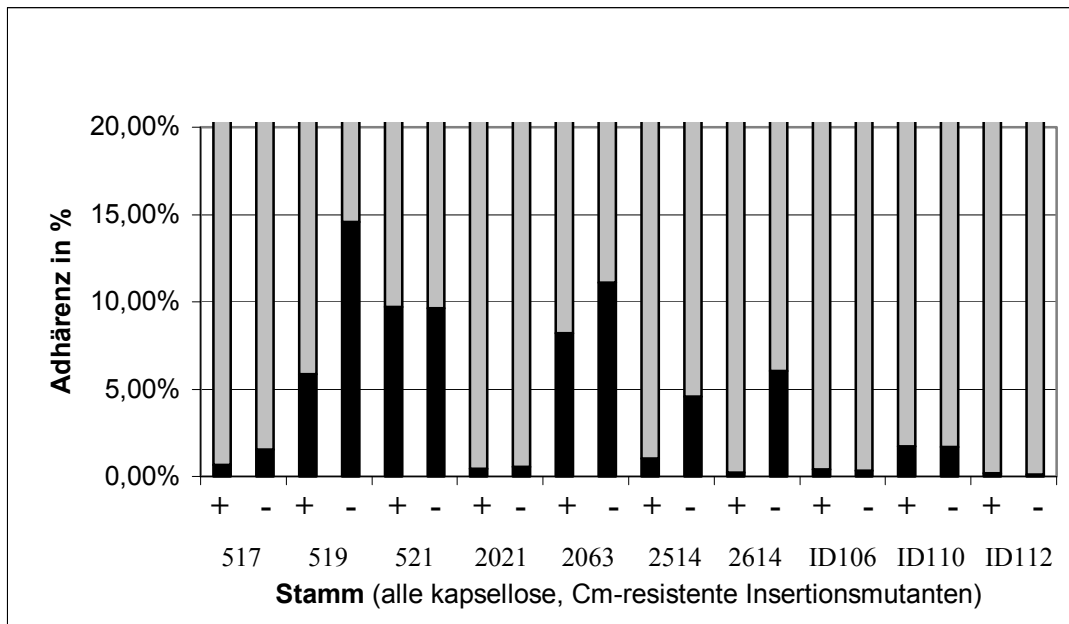


Abb. 3: Prozentualer Anteil der kapsellosen und Cm-resistenten *siaD*-Insertionsmutanten, die nach zwei Stunden bei einer „Multiplicity of Infection“ (MOI) von 10 in PPM⁺ an Hep-2 Epithelzellen adhäreren. Jeder Stamm wird zweimal gezeigt. Der + Balken zeigt den Versuch mit Zugabe von FCS (fötales Kälberserum), der - Balken ohne FCS. Verhältnis der Anzahl adhärenter Bakterien zur Gesamtzahl der Bakterien (schwarzer Balken), Verhältnis der Anzahl der Bakterien im Überstand zur Gesamtzahl der Bakterien (grauer Balken).

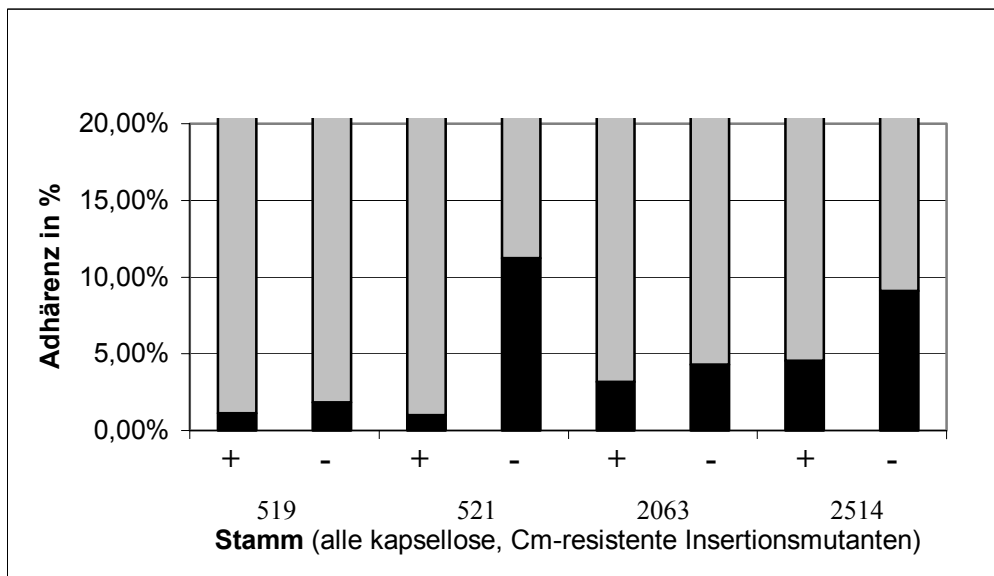


Abb. 4: Prozentualer Anteil der kapsellosen und Cm-resistenten *siaD*-Mutanten, die nach zwei Stunden bei einer MOI von 10 in PPM⁺ an Hep-2 Epithelzellen adhäreren. Jeder Stamm wird zweimal gezeigt. Der + Balken zeigt den Versuch mit Zugabe von FCS, der - Balken ohne FCS. Verhältnis der Anzahl adhärenter Bakterien zur Gesamtzahl der Bakterien (schwarzer Balken), Verhältnis der Anzahl der Bakterien im Überstand zur Gesamtzahl der Bakterien (grauer Balken).

Um die Wachstumskurven und -charakteristika der am besten adhärierenden Stämme 519*siaDCm*, 521*siaDCm*, 2063*siaDCm* und 2514*siaDCm* zu untersuchen, wurden die Stämme über zwei Stunden bei 37 °C in 10 ml PPM⁺ in 15 ml Greiner-Röhrchen schüttelnd inkubiert. Der Stamm 2514*siaDCm* zeigte dabei den stärksten Anstieg in der OD_{600nm} und somit die höchste Teilungsrate (Abb. 5).

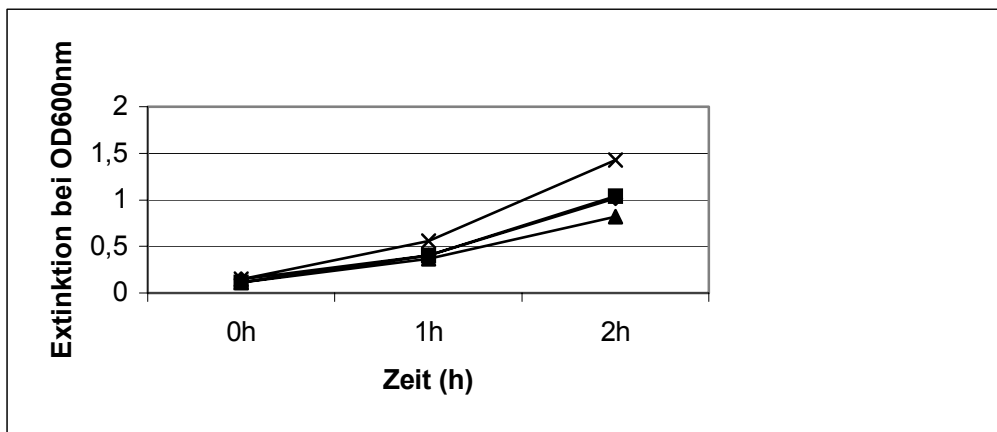


Abb. 5: Wachstumskurve der kapsellosen, Cm-resistenten Mutanten von einer OD_{600nm} von 0,1 beginnend über zwei Stunden in PPM⁺ bei 37 °C. 519*siaDCm* (♦), 521*siaDCm* (■), 2063*siaDCm* (▲), 2514*siaDCm* (x).

Auch die Lebendkeimzahl/ml nach Ausplattieren einer Neisseriensuspension bei einer OD_{600nm} von ca. 1,0 war beim Stamm 2514*siaDCm* am höchsten (Abb. 6). Dies weist darauf hin, dass die anderen Stämme in der Flüssigkultur in Proteose-Pepton-Medium stärker als 2514*siaDCm* Aggregate bilden.

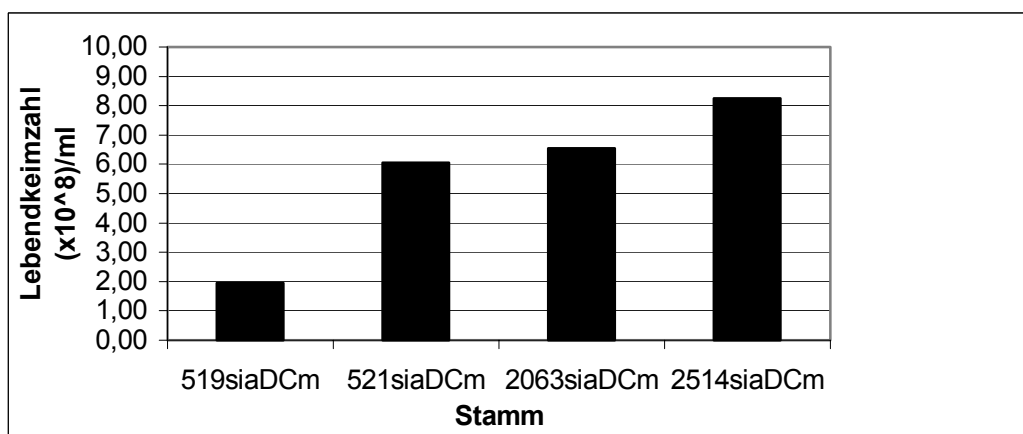


Abb. 6: Anzahl der Lebendkeime (x10⁸) pro ml der kapsellosen, Cm-resistenten Mutanten nach Ausplattieren einer Kultur in PPM⁺ mit einer OD_{600nm} von ca. 1,0 auf GC-Agar.

Um die Aggregatbildung zu überprüfen, wurden Flüssigkulturen der einzelnen Stämme bei einer OD_{600nm} von ca. 1,0 lichtmikroskopisch analysiert. Der Stamm 2514*siaDCm* zeigte in der lichtmikroskopischen Analyse der Flüssigkulturen die geringste Aggregatbildung.

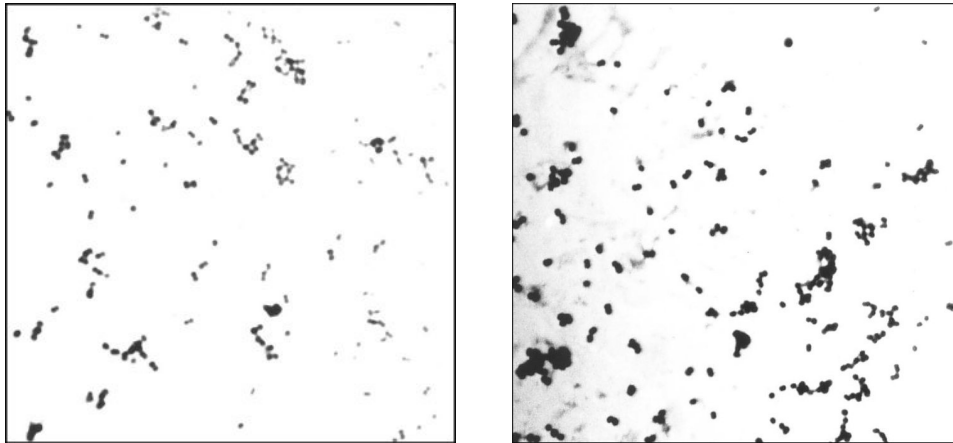


Abb. 7: Lichtmikroskopische Analyse des Aggregationsverhaltens Gram-gefärbter Ausstriche von *N. meningitidis* 2514*siaDCm* (links) und 2063*siaDCm* (rechts).

2514*siaDCm* erfüllte am besten die oben genannten Impfstoffkriterien, d.h. eine gute Adhäsion am humanen Nasopharynxepithel und gute Wachstumscharakteristika. Durch seine Herkunft aus Norwegen sollte sein Antigen-Profil gut für die Impfung im europäischen Raum geeignet sein. Daher wurde für die weiteren Studien der Wildtyp von 2514*siaDCm* ausgewählt. Es handelt sich dabei um ein norwegisches Patientenisolat, den Stamm H44/76 aus dem ST-32 Komplex (im folgenden H44/76 genannt).

2.2. Konstruktion des *siaD*-Deletionsvektors

In einem nächsten Schritt sollte zur Attenuierung des Stammes H44/76 der gesamte offene Leserahmen (ORF) des *siaD*-Gens ohne Einbau einer Antibiotikumsresistenzkassette chromosomal deletiert werden, da ein Lebendimpfstoff keine Antibiotikaresistenzen enthalten darf. Dazu musste ein Vektor, der eine optimale Aufnahme in Meningokokken-Zellen gewährleistet, konstruiert und in diesen Vektor die flankierenden Sequenzen des *siaD*-Gens eingebaut werden.

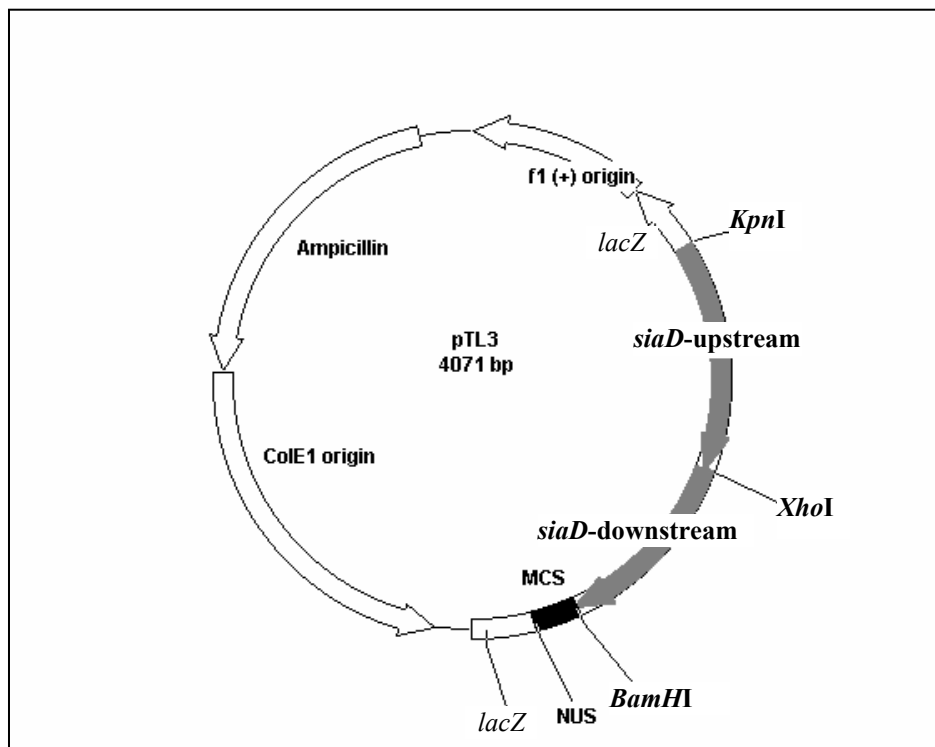


Abb. 8: Der *siaD*-Deletionsvektor pTL3. Eingezeichnet sind die Neisseria-uptake-sequence (NUS), der *siaD*-upstream und *siaD*-downstream Bereich und die Multiple Cloning Site (MCS).

Die NUS, eine kurze Sequenz mit der Folge 5'-GCCGTCTGAA-3', erhöht die Aufnahme von Fremd-DNA in die Neisserien (Transformation; Goodman und Scocca, 1988; Elkins *et al.*, 1991). Zuerst wurde aus den beiden Primern NUS-F und NUS-R ein doppelsträngiger Linker (5'-GCCGTCTGAAGAGCT-3') mit der NUS (fett) synthetisiert.

Dann wurde der Linker in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pBluescript II SK+ an der *Sac* I Schnittstelle (GAGCTC) eingebaut, wobei sich die folgende Sequenz ergab: 5'-GAGCTG**CCGTCTGAAGAGCTC**-3' (NUS fett). Der so entstandene Vektor pTL1 wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

Mit pTL1 als Ausgangsvektor sollte nun *siaD* deletiert werden. Dazu wurden die *siaD*-upstream und -downstream Bereiche aneinander liegend in den Vektor eingebaut, um eine Rekombination im Neisseriengenom mit Entfernung von *siaD* zu ermöglichen. Als Template DNA für die Amplifikation des *siaD*-upstream Bereichs wurde die genomische DNA des Neisserienstamms MC58, ebenfalls ein Serogruppe B ST-32 Komplex-Stamm, verwendet, da dessen Genomsequenz genau bekannt ist (Tettelin *et al.*, 2000). Der upstream Bereich wurde mittels der Primer *SiaD*-upstreamF und *SiaD*-upstreamR amplifiziert, was zu einem PCR-Produkt von ca. 600 bp Länge führte.

Zum Einbau des PCR-Produkts in pTL1 wurde das PCR-Produkt mit *Kpn*I und *Xho*I geschnitten und in den *Kpn*I- und *Xho*I-verdauten Vektor pTL1 inseriert. Der so resultierende Vektor wurde als pTL2 bezeichnet. Der korrekte Einbau des *siaD*-upstream Bereichs wurde durch Restriktionsverdau mit *Kpn*I und *Xho*I und Sequenzierung verifiziert.

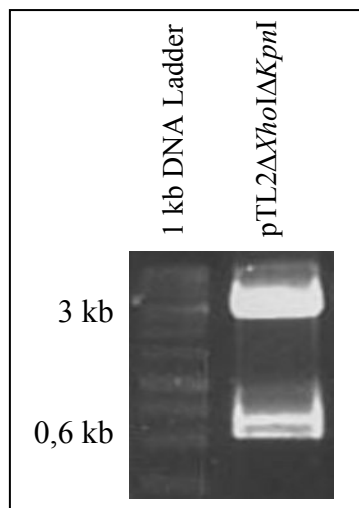


Abb. 9: Restriktionsverdau von pTL2 mit *Xho*I und *Kpn*I. Hierdurch wird der *siaD*-upstream Bereich aus pTL2 ausgeschnitten.

Der *siaD*-downstream Bereich wurde analog zum *siaD*-upstream Bereich amplifiziert. Die PCR mit den Primern SiaD-downstreamF und SiaD-downstreamR und MC58 genomischer DNA als Template führte zu einem PCR-Produkt von ca. 600 bp Länge. Das PCR-Produkt wurde mit *Bam*HI und *Xho*I verdaut und in den *Bam*HI-, *Xho*I-geschnittenen Vektor pTL2 inseriert, was im Vektor pTL3 resultierte. Der korrekte Einbau des *siaD*-downstream Bereichs wurde mittels Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Xho*I bzw. *Kpn*I und *Not*I (*Kpn*I und *Not*I schneiden den gesamten *siaD*-upstream und -downstream Bereich aus) und Sequenzierung verifiziert.

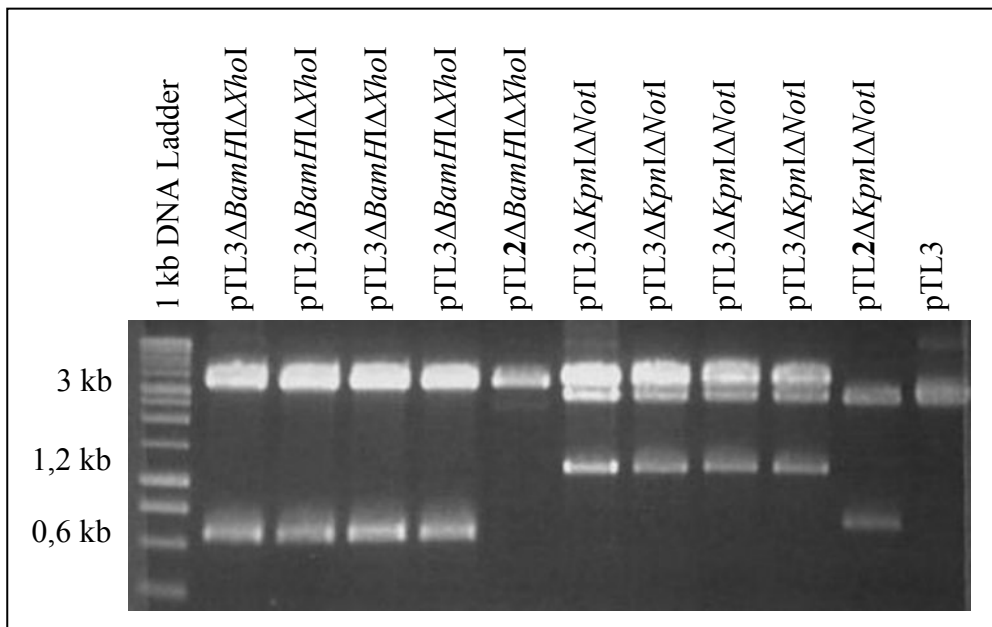


Abb. 10: Restriktionsverdau von pTL3 mit *Bam*HI und *Xho*I, welche *siaD*-downstream ausschneiden bzw. mit *Kpn*I und *Not*I, welche den *siaD*-upstream und *siaD*-downstream Block insgesamt ausschneiden.

2.3. Deletion von *siaD* im Stamm H44/76 mit pTL3

2.3.1. Vorgehen

Der Vektor pTL3 wurde dazu eingesetzt, im vorher ausgewählten Wildtyp H44/76 das *siaD*-Gen zu deletieren. Hierzu wurde in dieser Dissertation erstmalig eine neue Transformationsmethode verwendet (modifiziert nach Gunn und Stein; Gunn und Stein, 1996). Es wurden ca. 10, 100 oder 1000 Bakterien von H44/76 mit 0,1 bzw. 0,5 μg pTL3 in 10 μl PPM⁺ bei 37 °C für drei Stunden inkubiert und verschiedene Verdünnungsstufen auf GC-Agar ausplattiert. Klone mit einer Deletion des *siaD*-Gens wurden mittels Kolonie-PCR mit den Primern SiaD-upstreamF und SiaD-downstreamR identifiziert. Diese Primer amplifizieren den gesamten *siaD*-upstream, *siaD* und *siaD*-downstream Bereich, so dass das PCR-Produkt bei erfolgreicher Deletion von *siaD* eine höhere Mobilität in der Gelelektrophorese zeigt. Zweitens wurde mit SiaD-fusionoverlap und SiaD-insertcontrol die Vereinigung der up- und downstream Bereiche überprüft, weil SiaD-fusionoverlap nur bei einer Vereinigung beider Bereiche bindet. Die Deletionsrate lag bei ca. 10^{-2} /CFU (colony forming units), d.h. von 100 analysierten Kolonien zeigte 1 die Deletion des *siaD* Gens. Der *siaD* negative Klon wurde H44/76*siaD*⁻ genannt.

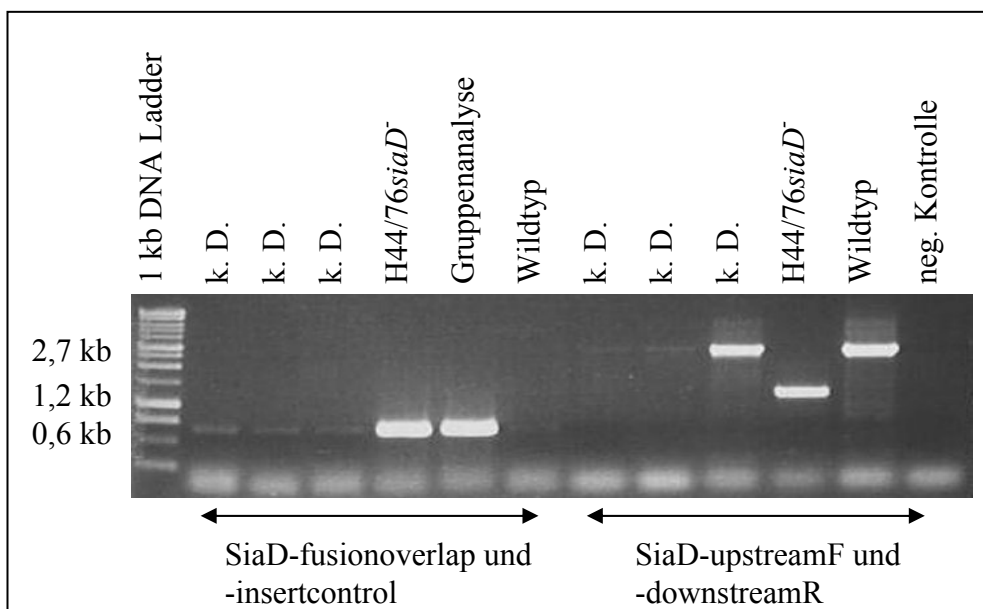


Abb. 11: PCR-Analyse der *siaD*-Deletion in H44/76 mit den Primern SiaD-fusionoverlap und SiaD-insertcontrol bzw. SiaD-upstreamF und SiaD-downstreamR. k. D. steht für „keine Deletion“, Gruppenanalyse bedeutet eine PCR mit mehreren Kolonien als Template zugleich.

2.3.2. Nachweis der *siaD*-Deletion mittels Southernblot (Southern, 1975)

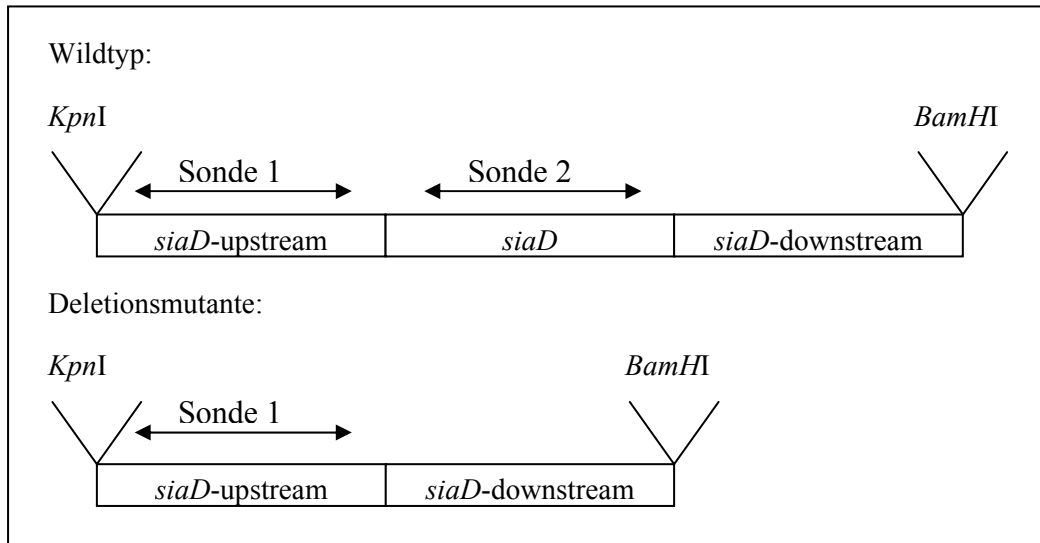


Abb. 12: Darstellung der *siaD*-Genbereiche in Wildtyp und Mutante. Sonde 1 bindet spezifisch für *siaD*-upstream in Wildtyp und Mutante, Sonde 2 für *siaD*, jedoch nur im Wildtyp.

Um die *siaD*-Deletion in H44/76*siaD*⁻ genotypisch sicher nachzuweisen, wurden zwei Southernblots durchgeführt. Dazu musste zuerst die aus H44/76*siaD*⁻ isolierte DNA entweder mit dem Restriktionsenzym *KpnI* allein oder mit *KpnI* und *BamHI* verdaut werden (siehe Abb. 12). Die geschnittenen genomischen DNAs wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, auf Nylonmembran geblottet und anschließend hybridisiert. Dabei kamen zwei Hybridisierungssonden zum Einsatz: eine für *siaD* spezifische Sonde (Sonde 2) sowie eine Sonde, die spezifisch für den *siaD*-upstream Bereich ist (Sonde 1). Bei der *siaD*-Sonde zeigte sich weder bei der mit *KpnI*, noch bei der mit *KpnI* und *BamHI* verdauten DNA eine hybridisierende Bande beim Stamm H44/76*siaD*⁻. Beim Wildtyp hingegen konnte das *siaD*-Gen sehr gut im Southernblot in der erwarteten Größe nachgewiesen werden. Die *siaD*-upstream-Sonde hybridisierte mit einer Bande mit größerer Mobilität beim Stamm H44/76*siaD*⁻ als beim Wildtyp in beiden Verdauungen. Der Größenunterschied betrug ca. 1400 bp. Dies zeigt, dass beim Stamm H44/76*siaD*⁻ ein Fragment von der Größe des *siaD*-Gens deletiert wurde.

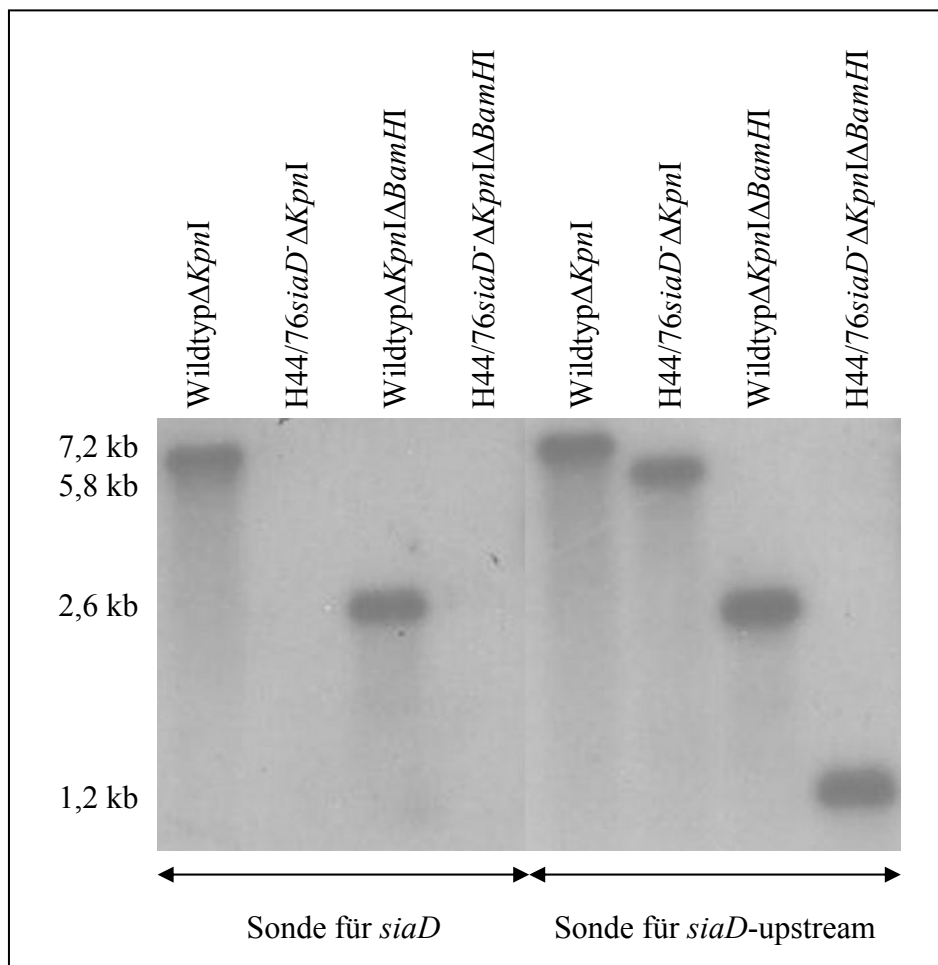


Abb. 13: Southernblot der Deletionsmutante H44/76*siaD*⁻ und des Wildtyps H44/76. Die genomischen DNAs wurden mit *KpnI* bzw. mit *KpnI* und *BamHI* verdaut. Die Hybridisierungen erfolgten mit Sonden die spezifisch sind für *siaD* bzw. den *siaD*-upstream Bereich.

Um sicherzustellen, dass die *siaD*-Deletion ohne Basenfehler stattfand, wurden die Übergänge vom ursprünglichen Genom auf die *siaD*-Deletionsstelle sequenziert. Die Sequenzierung zeigte, dass sowohl die Übergänge vom Genom auf die *siaD*-Deletionsstelle als auch der Übergang vom *siaD*-upstream Bereich auf den *siaD*-downstream Bereich ohne Basenfehler waren.

2.4. Phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutante

H44/76*siaD*⁻

Die Deletionsmutante sollte dann phänotypisch charakterisiert werden. Dabei wurde sie jeweils mit ihrem bekapselten Wildtyp H44/76 und der kapsellosen Cm-Insertionsmutante H44/76*siaDCm* verglichen.

2.4.1. Nachweis der Kapselexpression

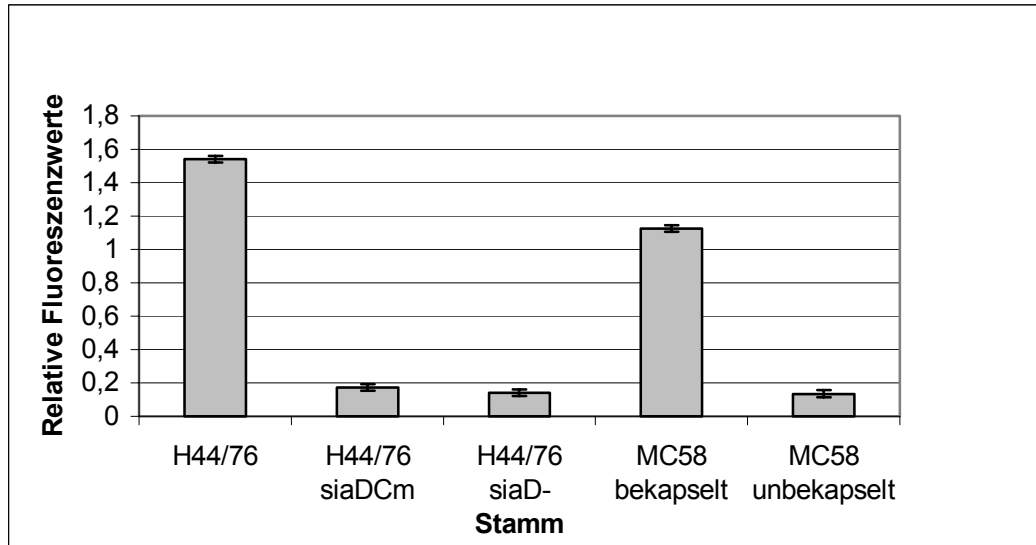


Abb. 14: Elisa mit Serogruppe B-kapselspezifischem Antikörper mAb735. Relative Fluoreszenzwerte bei 414 nm 10 min nach Substratzugabe. Die Daten zeigen den Mittelwert zweier unabhängiger Versuche.

Der phänotypische Nachweis der fehlenden Kapselexpression wurde mittels ELISA mit Serogruppe B-kapselspezifischen Antikörpern durchgeführt. Es zeigte sich dabei, dass sowohl die Deletionsmutante H44/76*siaD*⁻ wie auch die Cm-Insertionsmutante H44/76*siaDCm* im Gegensatz zum Wildtyp H44/76 keine Kapsel mehr bilden. Ähnliche Ergebnisse wurden mit den Kontrollstämmen MC58 und seiner unbekapselten Mutante erzielt.

2.4.2. Wachstum von Wildtyp und den *siaD*-Mutanten in Proteose-Pepton-Medium

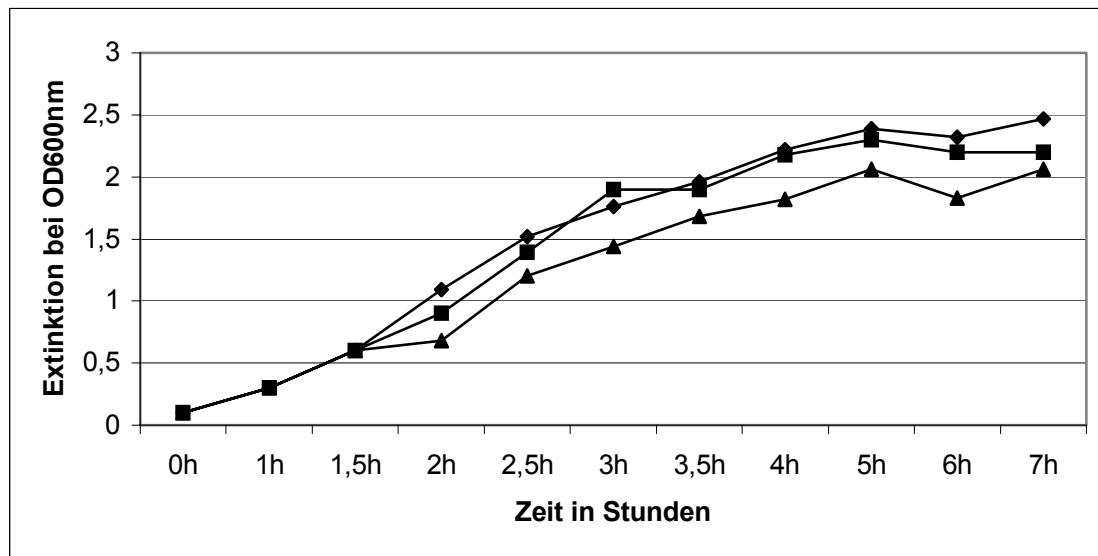


Abb. 15: Wachstumskurven von H44/76, H44/76*siaD*⁻ und H44/76*siaDCm* von einer OD_{600nm} von 0,1 beginnend über sieben Stunden in PPM⁺ bei 37 °C. H44/76 (♦), H44/76*siaDCm* (■), H44/76*siaD*⁻ (▲).

Um die Wachstumskurven und -charakteristika des Wildtyps und der beiden *siaD*-Mutanten zu untersuchen, wurden die Stämme bei einer OD_{600nm} von 0,1 beginnend über sieben Stunden bei 37 °C in 10 ml PPM⁺ in 15 ml Greiner-Röhrchen schüttelnd inkubiert. Die Wachstumsgeschwindigkeit in PPM⁺ war bei allen drei Stämmen annähernd gleich.

2.4.3. Adhäsion an Hep-2 Epithelzellen

Da die Haupteintrittspforte in den menschlichen Blutkreislauf das Nasopharynxepithel ist, wurden die Stämme in ihrem Adhäsionsverhalten an Hep-2 Epithelzellen nach zwei und sechs Stunden Infektionsdauer verglichen. Es zeigten sich dabei unerwartete Unterschiede zwischen den kapsellosen Mutanten.

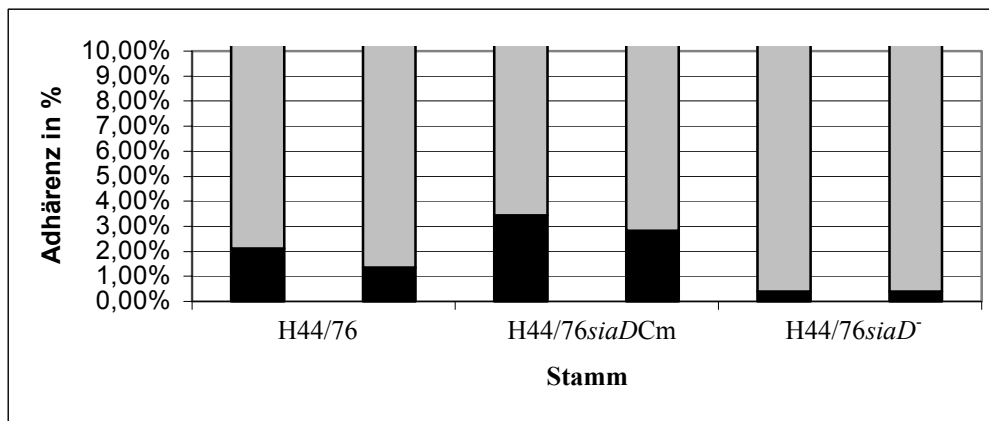


Abb. 16: Prozentualer Anteil der Bakterien des bekapselten Wildtyps und der kapsellosen *siaD*-Mutanten, die nach **zwei** Stunden bei einer MOI von 10 in PPM⁺ **ohne** FCS an Hep-2 Epithelzellen adhäreren. Für jeden Stamm werden zwei unabhängige Versuche unter identischen Bedingungen gezeigt. Verhältnis der Anzahl adhärenter Bakterien zur Gesamtzahl der Bakterien (schwarzer Balken), Verhältnis der Anzahl der Bakterien im Überstand zur Gesamtzahl der Bakterien (grauer Balken).

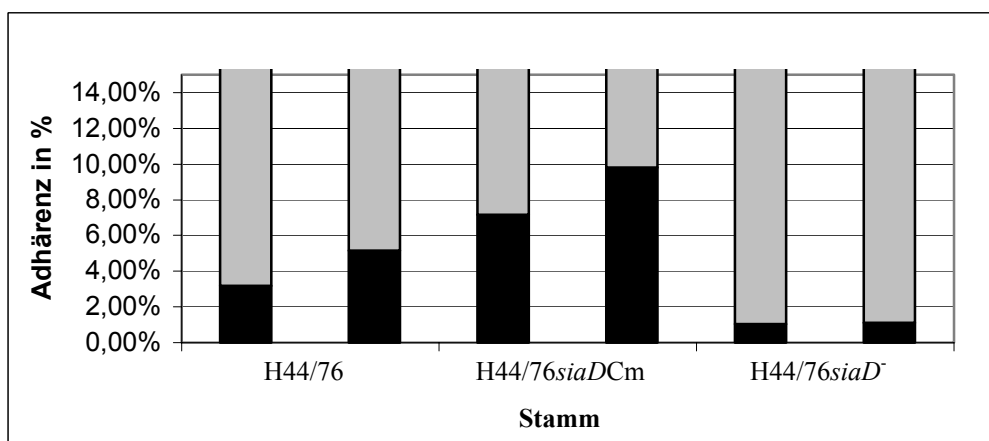


Abb. 17: Prozentualer Anteil der Bakterien des bekapselten Wildtyps und der kapsellosen *siaD*-Mutanten, die nach **sechs** Stunden bei einer MOI von 10 in PPM⁺ **mit** FCS an Hep-2 Epithelzellen adhäreren. Für jeden Stamm werden zwei Versuche unter gleichen Bedingungen gezeigt. Verhältnis der Anzahl adhärenter Bakterien zur Gesamtzahl der Bakterien (schwarzer Balken), Verhältnis der Anzahl der Bakterien im Überstand zur Gesamtzahl der Bakterien (grauer Balken).

Die Versuche wurden mit einer Infektionsdauer von zwei (Abb. 16) bzw. sechs Stunden (Abb. 17) durchgeführt und zeigten, dass die Cm-Insertionsmutante unabhängig von der Infektionsdauer und der Zugabe von FCS am stärksten an Hep-2 Epithelzellen adhärerte, der Wildtyp weniger und am schwächsten die Deletionsmutante. Von H44/76siaDCm waren etwa 3,1 % der Neisserien pro Vertiefung nach zwei Stunden adhären, nach sechs Stunden ca. 8,5 %. Bei H44/76siaD- nur ca. 0,4 % nach zwei bzw. 1,1 % nach sechs Stunden.

2.4.4. Adhäsion an HBMEC Endothelzellen

Weiterhin wurden die Stämme in ihren Adhäsionseigenschaften an HBMEC Endothelzellen verglichen.

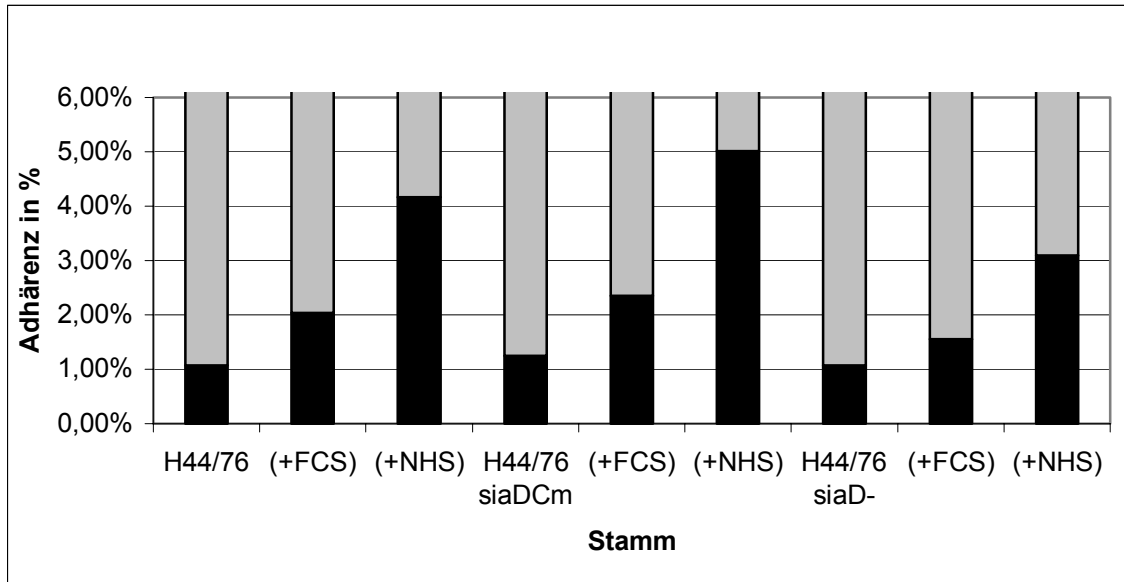


Abb. 18: Prozentualer Anteil der Bakterien des bekapselten Wildtyps und der kapsellosen *siaD*-Mutanten, die nach sieben Stunden bei einer MOI von 100 an HBMEC Endothelzellen adhäreren. Jeder Stamm wird dreimal gezeigt. Der erste Balken zeigt die Adhärenzrate mit RPMI-Medium allein, der zweite mit Zugabe von FCS zum RPMI-Medium und der dritte mit Zugabe von NHS (Humanserum) anstelle des FCS. Verhältnis der Anzahl adhärenter Bakterien zur Gesamtzahl der Bakterien (schwarzer Balken), Verhältnis der Anzahl der Bakterien im Überstand zur Gesamtzahl der Bakterien (grauer Balken).

Auch hier zeigten sich Unterschiede zwischen allen drei Stämmen. Die Versuche wurden mit einer Infektionsdauer von sieben Stunden in RPMI Medium durchgeführt, dem im zweiten Ansatz FCS und im dritten Ansatz NHS (Humanserum) statt FCS zugefügt wurde. Die Adhäsionsrate stieg bei allen Stämmen durch Zugabe von FCS und mehr noch durch NHS. Auch hier hatte H44/76*siaDCm* die größte Adhärenz von ca. 1,2 % bei RPMI, 2,3 % bei RPMI mit FCS und 5,0 % bei RPMI mit NHS. H44/76*siaD*⁻ zeigte eine Adhärenzrate von 1,1 % bei RPMI, 1,5 % bei RPMI mit FCS und 3,1 % bei RPMI mit NHS. H44/76 lag dazwischen.

2.4.5. Adhäsion und Phagozytose an Dendritischen Zellen

Während ihres Verweilens im Blut müssen sich die Neisserien ständig gegen das Immunsystem zur Wehr setzen. Ein entscheidender Bestandteil des Immunsystems sind dabei die Dendritischen Zellen. Sie gehören als Antigen-präsentierende Zellen (APZ)

dem Monozyten-Phagozyten-System (MPS), einem Teil des unspezifischen Immunsystems, an. Sie können Neisserien phagozytieren, prozessieren und die Antigene an, z.B. CD4⁺ T-Zellen präsentieren (Banchereau und Steinmann, 1998).

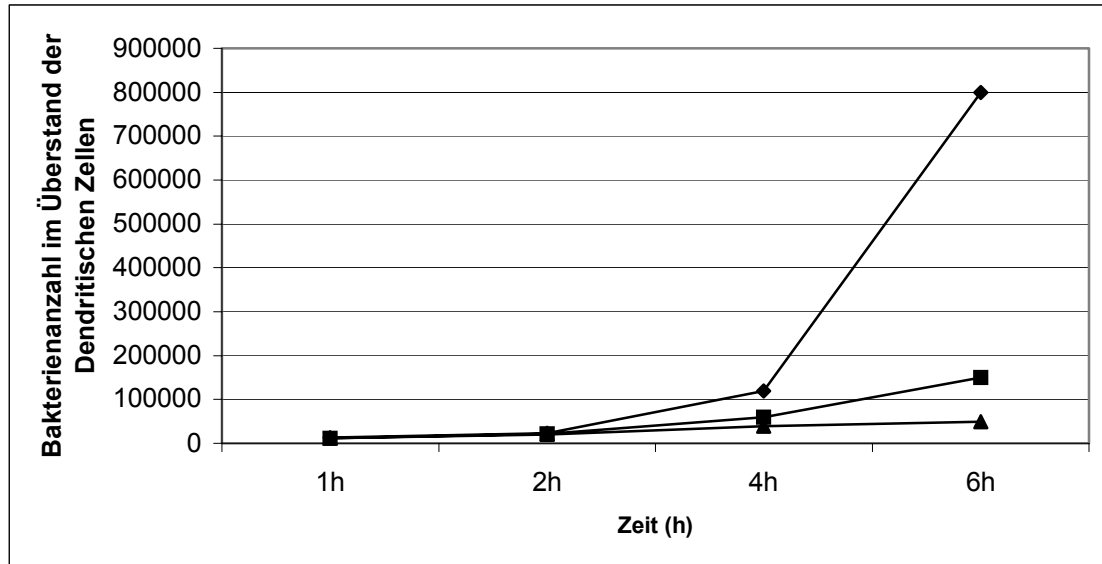


Abb. 19: Zahl der CFU (colony forming units) pro Vertiefung während des sechsständigen Wachstum des Wildtyps und der *siaD*-Mutanten im Überstand der Dendritischen Zellen in RPMI-Medium mit 1 % autologem Plasma bei einer MOI von 1. H44/76 (◆), H44/76siaDCm (■), H44/76siaD⁻ (▲).

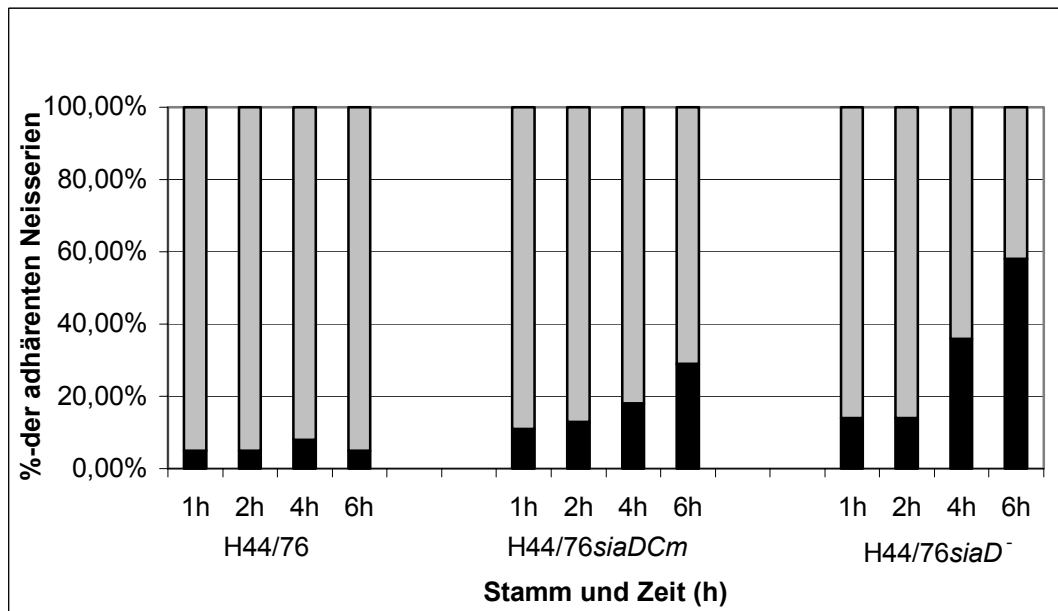


Abb. 20: Prozentualer Anteil an adhärenenten Bakterien des Wildtyps und der *siaD*-Mutanten an Dendritischen Zellen nach einer, zwei, vier und sechs Stunden bezogen auf die Gesamtzahl der Bakterien in RPMI-Medium mit 1 % autologem Plasma bei einer MOI von 1. Verhältnis der Anzahl adhärenenten Bakterien zur Gesamtzahl der Bakterien (schwarzer Balken), Verhältnis der Anzahl der Bakterien im Überstand zur Gesamtzahl der Bakterien (grauer Balken).

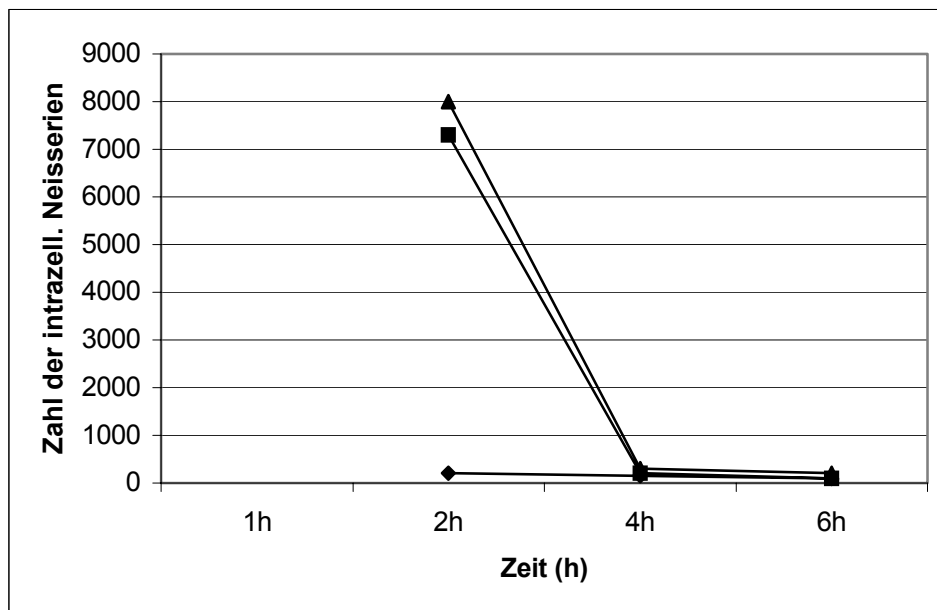


Abb. 21: Zahl der intrazellulären Neisserien pro Vertiefung nach zwei, vier und sechs Stunden Infektionsdauer an Dendritischen Zellen in RPMI-Medium mit 1 % autologem Plasma bei einer MOI von 1. H44/76 (◆), H44/76siaDCm (■), H44/76siaD⁻ (▲).

Die Stämme wurden untereinander in Adhäsions- und Phagozytose-Assays an Dendritischen Zellen verglichen. Dabei zeigte sich über eine Infektionsdauer von sechs Stunden, dass sich die Bakterienzahl des bekapselten H44/76 im Überstand ungefähr verzehnfachte, hingegen erhöhte sich die der kapsellosen H44/76siaDCm und H44/76siaD⁻ kaum (Abb. 19). Während dieser sechs Stunden stieg die Adhärenz der kapsellosen Stämme von ca. 10 % auf jeweils über 30 % an, bei H44/76 blieb die Adhärenz bei ca. 5 %. Allerdings zeigte der Stamm H44/76siaD⁻ eine etwas stärkere Adhärenz als der Stamm H44/76siaDCm. (Abb. 20). Die Zahl der phagozytierten Bakterien war bei den kapsellosen Stämmen nach zwei Stunden etwa um das Zehnfache höher als die des Wildtyps, sank dann aber auf das niedrige Niveau des Wildtyps ab (Abb. 21). Diese Ergebnisse zeigten, dass der Wildtyp H44/76 durch seine Kapsel vor einer Phagozytose durch die Dendritischen Zellen geschützt wird und sich deshalb im Überstand stärker vermehren kann als die Mutanten, die stärker phagozytiert werden. Die Abnahme der intrazellulären Neisserien in den Dendritischen Zellen zeigt die Abtötung durch die Dendritischen Zellen an. Der Unterschied zwischen H44/76siaDCm und H44/76siaD⁻ verhielt sich analog. H44/76siaDCm adhärte schwächer, wurde weniger phagozytiert und konnte sich so im Überstand stärker vermehren als H44/76siaD⁻.

2.4.6. Analyse der Expression von *N. meningitidis*-Oberflächenmarkern im Westernblot

Um die Ursache für die Unterschiede in der Zellinteraktion der kapsellosen Mutanten zu finden, wurde im Westernblot die Expression der Oberflächenantigene Pili, Opa und Opc untersucht. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den beiden Mutanten in der Expression von Pili und Opc (Abb. 22). Bei der Analyse der Expression der Opa-Proteine stellte sich jedoch heraus, dass der Stamm H44/76*siaD*⁻ nur zwei Opa-Proteine exprimiert, wohingegen Wildtyp und Insertionsmutante drei Opa-Varianten exprimierten. Dies kann durch die phasenvariable Expression der Opa-Oberflächenproteine bedingt sein (Aho *et al.*, 1987; Murphy *et al.*, 1989). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Unterschiede in der Zellinteraktion der kapsellosen H44/76-Mutanten wahrscheinlich durch eine unterschiedliche Opa-Expression hervorgerufen wurden und stehen im Einklang mit der Rolle der Opa-Proteine für die Zellinteraktion von *N. meningitidis* (Virji *et al.*, 1993, 1995). Diese Ergebnisse zeigten weiterhin, welche Bedeutung der Kontrolle der variablen antigenischen Eigenschaften bei der Konstruktion eines Meningokokken-Lebendimpfstoffs zukommt.

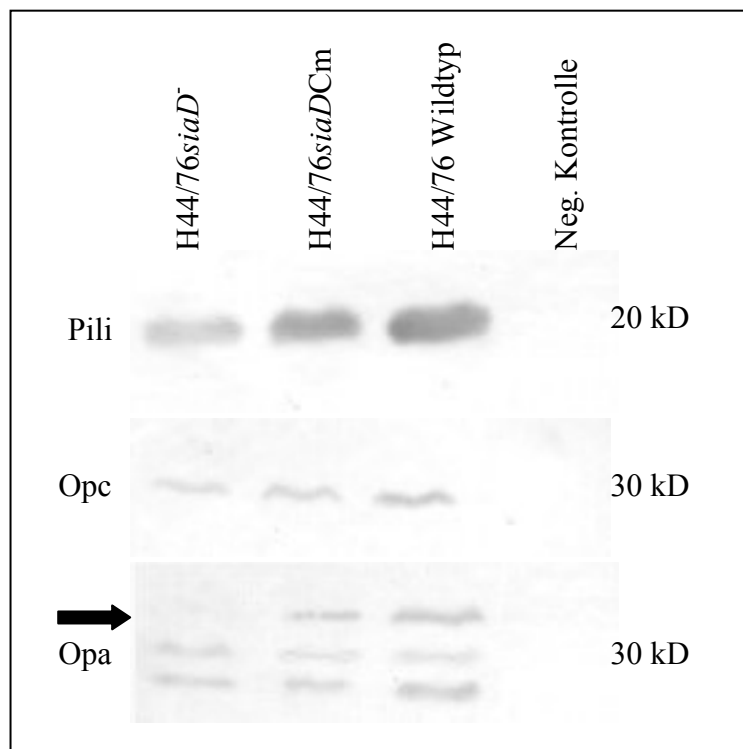


Abb. 22: Westernblots des Wildtyps und der *siaD*-Mutanten mit Antikörpern gegen die Pili-, Opc- und Opa-Antigene. Der Pfeil weist auf die fehlende Opa-Bande in H44/76*siaD*⁻ hin.

2.5. Konstruktion des *recA*-Deletionsvektors

Neisserien sind natürlich kompetente Bakterien (Sparling, 1966). Um die Variabilität der Oberflächenantigene von Meningokokken zu verringern und eine Reversion eines attenuierten Neisserienstammes zum virulenten Wildtyp auszuschließen, muss daher die homologe Rekombination verhindert werden. Dies sollte durch Deletion des *recA*-Gens erreicht werden. *RecA* lenkt die homologe Rekombination von DNA ins Neisseriengenom, wirkt als Koprotease und hat eine Reparaturfunktion an der DNA (Miller und Kokjohn, 1990). Bei der Konstruktion des *recA*-Deletionsvektors wurde analog dem *siaD*-Deletionsvektor vorgegangen und die *recA*-upstream und –downstream Sequenzen aneinander liegend in den Ausgangsvektor pTL1 eingebaut (siehe Abb. 23).

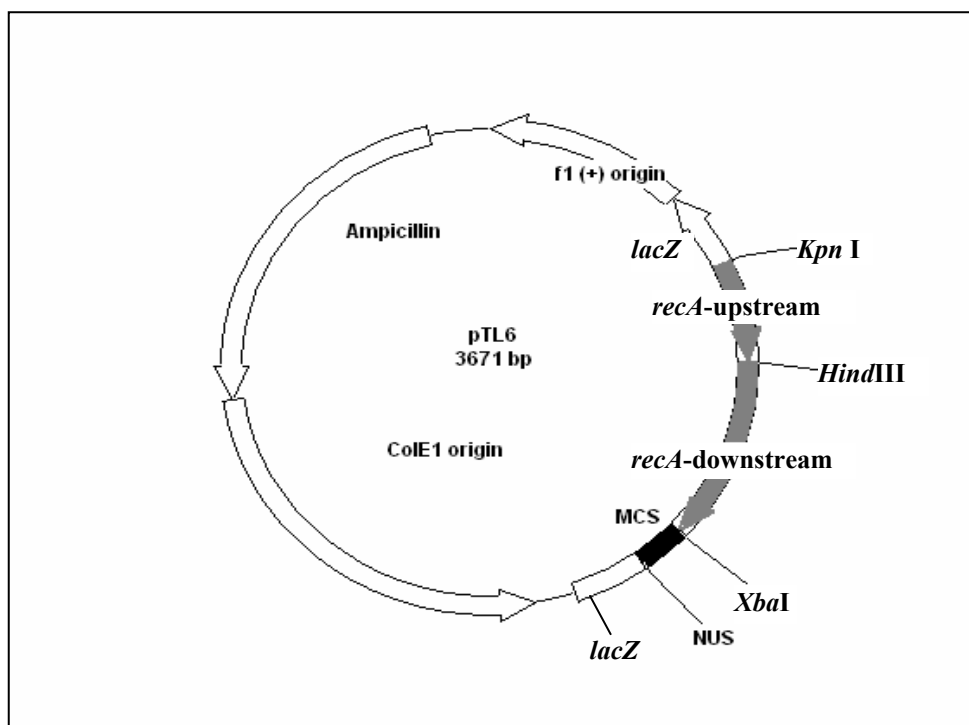


Abb. 23: Der *recA*-Deletionsvektor pTL6. Eingezeichnet sind die Neisseria-uptake-sequence (NUS), der *recA*-upstream und *recA*-downstream Bereich und die Multiple Cloning Site (MCS).

Wiederum von MC58 als Template ausgehend wurde die *recA*-upstream Sequenz mittels der Primer RecA-upstreamF und –R vervielfältigt. RecA-upstreamF führt eine *KpnI* (GGTACC) und RecA-upstreamR eine *HindIII* (AAGCTT) Schnittstelle ein. Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 240 bp.

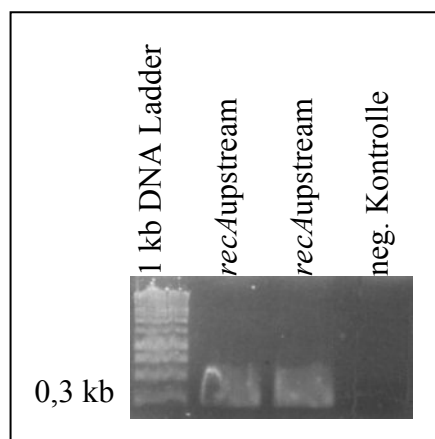


Abb. 24: PCR des *recA*-upstream Bereichs

Der Einbau von *recA*-upstream erfolgte analog zum Vorgehen bei *siaD* in pTL1. Die PCR-Produkte wurden mit *KpnI* und *HindIII* geschnitten und in den *KpnI*- und *HindIII*-verdauten pTL1 eingebaut. Der so entstandene Vektor heißt pTL4. PTL4 wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

Die *recA*-downstream Sequenz wurde mittels der Primer RecA-downstreamF und –R von der MC58 Template-DNA vervielfältigt. RecA-downstreamF führt eine *HindIII* Schnittstelle ein und RecA-downstreamR enthält eine *XbaI* (TCTAGA) Schnittstelle. Die PCR ergab auch unter stark stringenten Bedingungen neben der Hauptbande bei 0,5 kb unspezifische Nebenbanden, da der Primer RecA-downstreamR an verschiedenen Stellen des Genoms vollständig bindet. Deswegen wurde das PCR-Produkt mit der korrekten Länge von 450 bp von den unspezifischen Nebenprodukten durch eine Gel-extraktion getrennt.

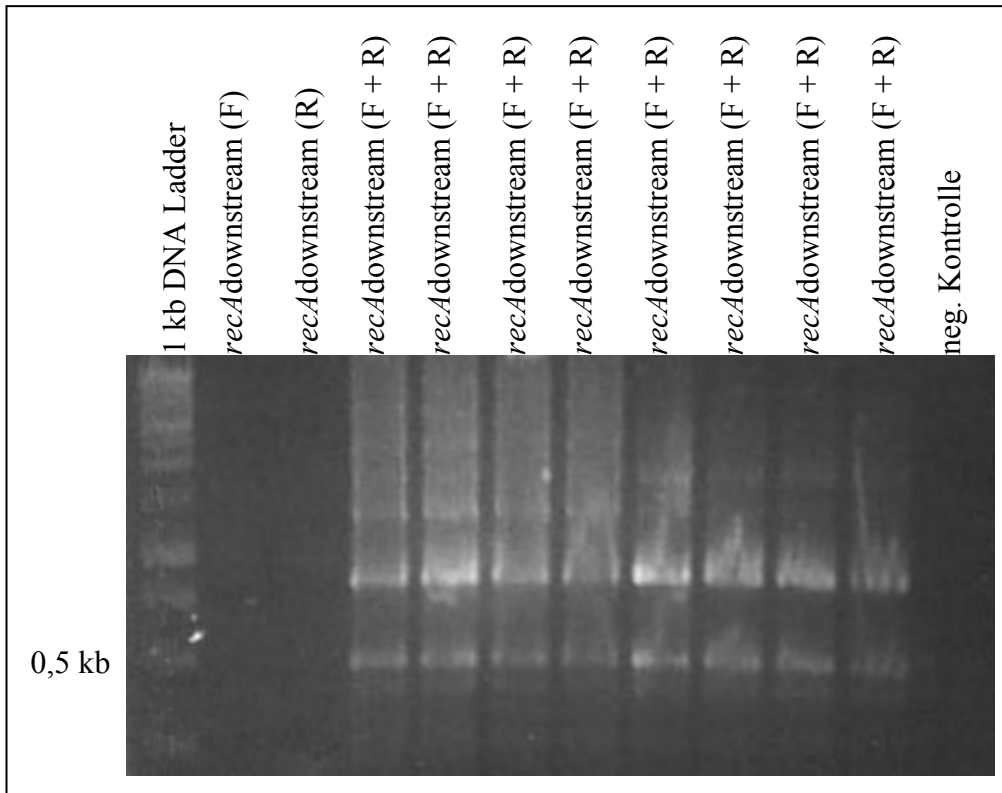


Abb. 25: PCR des *recA*-downstream Bereichs mit beiden oder nur je einem Primer. F: Primer *RecA*-downstreamF, R: Primer *RecA*-downstreamR.



Abb. 26: Gelextraktion des *recA*-downstream Bereichs

PTL4 und die PCR-Produkte aus der Gelextraktion wurden mit *Xba*I und *Hind*III geschnitten und dann die PCR-Produkte in pTL4 inseriert, was zu pTL6 führte. Um pTL6 zu überprüfen, wurde der Vektor mit *Kpn*I und *Xba*I verdaut und durch Sequenzierung überprüft. Das erhaltene Fragment und die Sequenz bewiesen den korrekten Einbau der *recA*-upstream und -downstream Sequenz.

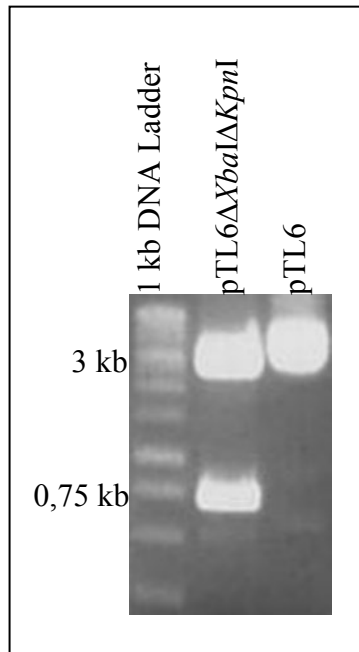


Abb. 27: Restriktionsverdau von pTL6 mit *Xba*I und *Kpn*I. Die Bande bei 750 bp entspricht der *recA*-up- und -downstream-Sequenz.

2.6. Versuch der Deletion von *recA*

2.6.1. Transformation von MC58 und H44/76 mit pTL6

Nach der Konstruktion von pTL6 sollte nun *recA* in den Wildtypen MC58 und H44/76 und in der *siaD*-Deletionsmutante H44/76*siaD*⁻ deletiert werden. Dabei wurde wiederum die schon bei der *siaD*-Deletion erfolgreich verwendete Transformationsmethode ohne Einsatz eines Selektionsmarkers unter verschiedenen Bedingungen zum Einsatz gebracht und insgesamt 1500 Kolonien aus fünf unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Transformationen durch PCR-Analyse bzw. Kolonieblotting analysiert. Es wurden jedoch keine *recA*-deletierten Mutanten gefunden.

In den ersten vier Transformationen wurden zur Identifikation *recA*-deletierter Mutanten PCR-Analysen mit den Primern RecA-insertcontrolF und RecA-insertcontrolR bzw. RecA-fusion1 und RecA-insertcontrolF durchgeführt. RecA-insertcontrolF und RecA-

insertcontrolR binden sowohl im Wildtyp als auch in der *recA*-deletierten Mutante. Jedoch unterscheiden sich Wildtyp und *recA*⁻-Mutante durch die Länge der PCR-Produkte, weil beim Wildtyp das *recA*-Gen noch vorhanden ist. RecA-fusion1 und RecA-insertcontrolF ergeben nur dann PCR-Produkte, wenn die *recA*-upstream und -downstream Bereiche, wie in den *recA*⁻-Mutanten, aneinander liegen. Dies verhindert, dass die PCR Ergebnisse durch die Bildung von zwei Banden verfälscht werden, was bei den Primern RecA-insertcontrolF und RecA-insertcontrolR möglich ist, da sowohl im Wildtyp als auch in den Mutanten ein PCR-Produkt entsteht. Zusätzlich wurden die Transformationen mit unterschiedlichen Versuchsbedingungen durchgeführt: (i) es wurden sowohl die bekapselten Meningokokkenstämme H44/76 und MC58 als auch die unbekapselte Mutante H44/76*siaD*⁻ verwendet. (ii) Die Anzahl der Bakterien im Ansatz wurde zwischen 10, 100 und 1000 variiert. (iii) Zu jedem Stamm und jeder Bakterienanzahl wurde eine unterschiedliche Menge (0,1 µg, 0,5 µg oder 1,0 µg) des Deletionsvektors pTL6 hinzugefügt. (iv) Die Inkubationszeit wurde zwischen 15, 30, 60, 150 oder 180 min variiert. Alle Versuche fanden in 10 µl PPM⁺ bei 37 °C statt.

Trotz der Analyse von insgesamt 260 Kolonien aus den vier Transformationen konnte keine *recA*⁻-Mutante gefunden werden.

2.6.2. Suche nach positiven Klonen mittels Kolonieblot

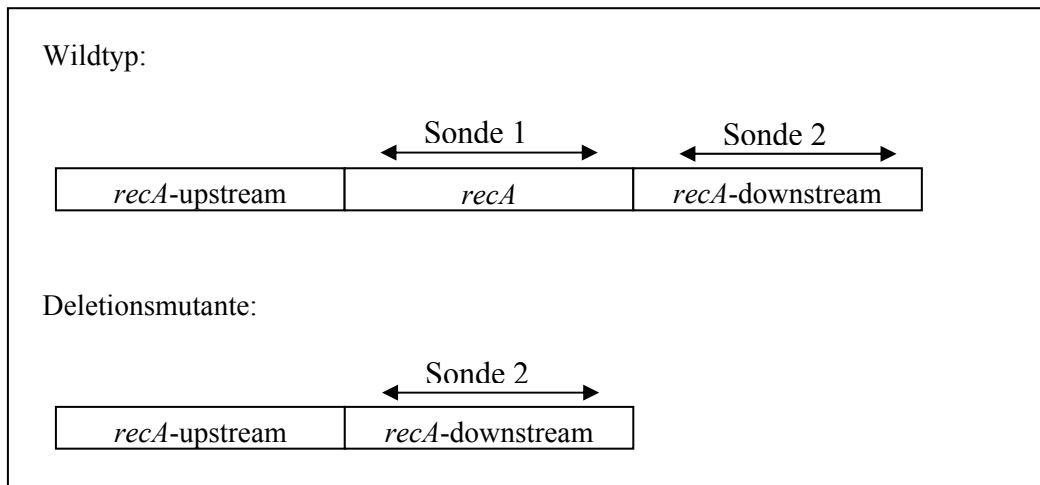


Abb. 33: Darstellung der *recA*-Genbereiche in Wildtyp und Mutante. Sonde 1 bindet spezifisch für *recA* im Wildtyp, Sonde 2 für *recA*-downstream, jedoch in Wildtyp und Mutante.

Da durch die mehrfachen PCR-Analysen wahrscheinlich deshalb keine positiven Kolonien gefunden wurden, weil die Transformationsereignisse so selten waren, sollten bei der fünften Transformation 1200 Kolonien gleichzeitig analysiert werden. Dazu wurde ein Kolonieblot mit einer *recA*-spezifischen (Sonde 1) und einer *recA*-downstream spezifischen Sonde (Sonde 2) verwendet. *RecA*-downstream lag sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante vor, *recA* nur im Wildtyp. Dies ermöglichte, durch einen Vergleich der Kolonieblots mit *recA* und *recA*-downstream Sonden, den Wildtyp von den Mutanten zu unterscheiden.

Je 10, 100 oder 1000 Bakterien von H44/76*siaD*⁻ wurden in dieser Transformation mit 0,1 µg, 0,5 µg oder 2 µg pTL6 in 10 µl PPM⁺ bei 37 °C für eine Stunde inkubiert und dann auf GC-Agar ausplattiert. Der Kolonieblot der Agarplatten zeigte einige Kolonien, die eventuell *recA* deletiert waren. Jedoch ergab eine zweite Kontrolle dieser Kolonien mittels PCR mit den Primern, die auch in der vierten Transformation verwendet wurden, keine Deletion des *recA*-Gens. Damit lag die Deletionsrate unter 7×10^{-4} / CFU und war damit für den Nachweis mittels der hier verwendeten Analysemethoden zu gering.

3. Diskussion

Bei attenuierten Meningokokken als Lebendimpfstoff muss eine Balance zwischen ausreichend sicherer Attenuierung und genügender Immunogenität gefunden werden. Die Sicherheit des Impfstoffs sollte durch mindestens zwei unabhängige Deletionen garantiert werden, die die Virulenz des Impfstamms beseitigen. Weiterhin muss sichergestellt werden, dass der Impfstamm nicht in den virulenten Wildtyp revertieren kann (Shapiro, 2002). Gleichzeitig muss der Impfstamm eine protektive und lang anhaltende Immunität hervorrufen können. Um diese und die in der Einleitung aufgestellten Forderungen an einen Lebendimpfstoff zu erfüllen, sollten in der vorliegenden Dissertation zunächst ein geeigneter Impfstamm der Serogruppe B gefunden und in diesem dann sowohl Virulenzgene als auch Gene, die die homologe Rekombination bedingen, deletiert werden. Aus diesen beiden Kategorien wurde je ein Gen ausgewählt. Durch Deletion des *siaD*-Gens (α -2,8-Polysialyltransferase; Edwards *et al.*, 1994), das für die Biosynthese des wichtigsten Virulenzfaktors, die Kapsel, kodiert und des *recA*-Gens, das die homologe Rekombination ermöglicht (Kooimey und Falkow, 1987; Miller und Kokjohn, 1990), sollte der Impfstamm attenuiert und ein sicherer und genetisch stabiler Lebendimpfstoff-Kandidat gegen Meningokokken der Serogruppe B produziert werden.

3.1. Stammauswahl und Deletion des *siaD*-Gens

Die ersten Schritte auf dem Weg zu einem Lebendimpfstoff wurden erfolgreich begangen. Zuerst musste aus zehn Isolaten des ST-32 Komplexes der für einen Lebendimpfstoff geeignetste herausgefunden werden. Als wichtige Kriterien für die Auswahl des Kandidatenstamms wurden festgelegt: er sollte stark am Nasopharynxepithel adhären, sich gut und reproduzierbar *in vitro* anzüchten lassen und in seinen antigenischen Eigenschaften dem europäischen Raum entsprechen. Da der spätere Impfstamm kapsellos sein sollte, wurde vor der Stammauswahl die Kapselexpression durch Herstellung von *siaD*-Insertionsmutanten ausgeschaltet. Dann wurden die Auswahlkriterien in den kapsellosen Insertionsmutanten analysiert. Bei der Stammauswahl zeigten sich zwischen den einzelnen kapsellosen *siaD*-Insertionsmutanten deutliche Unterschiede in der Adhärenz an Hep-2 Epithelzellen, im Wachstum in Proteose-Pepton-Medium und in der Pili-vermittelten Aggregatbildung. Die *siaD*-Insertionsmutante des Stammes H44/76 erfüllte die Auswahlkriterien am besten. Sie adhärierte in den Adhäsionsassays stark an

Hep-2 Zellen, wuchs in PPM⁺ am schnellsten und reproduzierbarsten und bildete in Flüssigkultur am wenigsten Aggregate aus. Zudem wurde ihr Wildtyp H44/76 in Norwegen isoliert (Holten, 1979) und sollte also in seinem Antigen-Profil den im europäischen Raum prävalenten epidemiologischen Linien entsprechen. Im Wildtyp H44/76 wurde dann das *siaD*-Gen ohne Einfügen einer Antibiotikumsresistenzkassette deletiert. Hierzu wurde eine neue Deletionsstrategie verfolgt, die in der vorliegenden Arbeit erstmals Verwendung fand (modifiziert nach Gunn und Stein, 1996). Die Deletion sollte in einem einzigen Schritt ohne zwischenzeitlichen Einbau eines Markers durchgeführt werden und zu einer in-frame Deletion des kompletten offenen Leserahmens von *siaD* führen. Dazu wurde der Vektor pTL1 mit der Neisseria-uptake-sequence konstruiert (Goodman und Scocca, 1988; Elkins *et al.*, 1991) und in pTL1 die Bereiche upstream und downstream von *siaD* aneinander liegend eingefügt. Der so entstandene Vektor pTL3 wurde erfolgreich zur Deletion des *siaD*-Gens im Stamm H44/76 verwendet. Die Deletionsrate lag bei dieser Vorgehensweise bei 10^{-2} /CFU. Die Deletionsmutante wurde H44/76*siaD*⁻ genannt. Der korrekte Genotyp wurde mittels Southernblot und der kapsellose Phänotyp mittels ELISA überprüft. H44/76*siaD*⁻ enthielt weder das *siaD*-Gen, noch bildete er eine Kapsel aus. Die Sequenz der Randbereiche des *siaD*-Gens bewies, dass *siaD* entfernt worden war, ohne die angrenzenden Sequenzen zu beeinflussen.

3.2. Charakterisierung der *siaD*-Mutanten

Ein idealer Neisserien-Lebendimpfstoff sollte in der Lage sein, das Nasopharynxepithel zu kolonisieren, dieses zu durchtreten und stark mit Antigen-präsentierenden Zellen zu interagieren. Er sollte nicht die Blut-Hirn-Schranke durchdringen können, wobei dies bei der in dieser Arbeit verfolgten Strategie verhindert wird, da der kapsellose Phänotyp nicht zu einem Überleben in der Blutbahn fähig ist (Vogel und Frosch, 1999). Die *siaD*-deletierte Mutante H44/76*siaD*⁻ wurde dementsprechend zur genaueren Charakterisierung in ihrem Wachstum in PPM⁺, Adhärenzverhalten an Hep-2 Epithelzellen und HBMEC Endothelzellen und ihrem Adhärenz- und Invasionsverhalten an Dendritischen Zellen mit ihrem Wildtyp H44/76 und der Cm-resistenten Insertionsmutante H44/76*siaD*Cm verglichen. Die Wachstumsgeschwindigkeit *in vitro* war bei allen drei Stämmen annähernd gleich. Jedoch im Adhärenzverhalten an Hep-2- und HBMEC-Zellen zeigten sich unerwartete Unterschiede zwischen den kapsellosen Mutanten

H44/76*siaDCm* und H44/76*siaD⁻*. Die Adhärenz kapselloser Neisserien an Epithel- und Endothelzellen sollte größer sein, als die bekapselter Bakterien, da die Kapsel sowie das sialylierte LOS die Opa- und Opc-vermittelte, nicht aber die Pilus-vermittelte Adhärenz, behindert. Dies geschieht durch Maskierung von Opa und Opc durch die Kapsel und das sialylierte LOS (Virji *et al.*, 1993, 1995). Wie erwartet, adhärierte die kapsellose Insertionsmutante H44/76*siaDCm* auch besser als der bekapselte Wildtyp H44/76 an Hep-2 Epithelzellen, aber H44/76*siaD⁻* adhärierte schwächer als der Wildtyp. An HBMEC Endothelzellen konnte bei den drei Stämmen die Adhärenz-verstärkende Wirkung von Serumfaktoren (FCS und NHS), die über Opc vermittelt wird, nachgewiesen werden (Virji *et al.*, 1994). Durch Zugabe von FCS zum RPMI-Medium und mehr noch durch NHS wurde die Adhärenz verstärkt. H44/76*siaD⁻* adhärierte wiederum schwächer an HBMEC als der Wildtyp und H44/76*siaDCm*, der die stärkste Adhärenz aufwies.

3.3. Interaktion zwischen *N. meningitidis* und Dendritischen Zellen

Auch in den Adhäsions- und Phagozytose-Versuchen mit Dendritischen Zellen unterschieden sich die kapsellosen Mutanten. Die kapsellosen Mutanten adhärierten stärker an Dendritischen Zellen, wurden stärker von den Dendritischen Zellen phagozytiert und vermehrten sich folglich weniger im Überstand der Dendritischen Zellen als ihr Wildtyp. In den Dendritischen Zellen wurden die phagozytierten Neisserien rasch abgetötet. H44/76*siaD⁻* adhärierte jedoch besser als H44/76*siaDCm* und wurde folglich auch stärker phagozytiert. Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung der Kapselexpression für die Interaktion von *Neisseria meningitidis* mit humanen Dendritischen Zellen, denn durch die Kapsel werden die Meningokokken vor der Phagozytose durch Dendritische Zellen geschützt (McNeil *et al.*, 1994; Read *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1997; Vogel und Frosch, 1999; Kolb-Mäurer *et al.*, 2001, Unkmeir *et al.*, 2002a).

Die Dendritischen Zellen sind Antigen-präsentierende Zellen, die dem Monozyten-Phagozyten-System (MPS), einem Teil des unspezifischen Immunsystems, angehören. Sie bilden also eine spezialisierte Klasse der Monozyten. Mit ihrer Fähigkeit, Neisserien zu phagozytieren, die Antigene zu prozessieren und den CD4⁺-Lymphozyten zu präsentieren, können sie das spezifische Immunsystem aktivieren (Banchereau und Steinmann, 1998). Die Interaktion eines Neisserien-Lebendimpfstoffs mit Antigen-präsentierenden Zellen wie Dendritischen Zellen stellt ein wichtiges Charakteristikum dar.

Idealerweise sollte ein solcher Impfstoff stark mit APZ interagieren, was durch die Deletion der Kapselexpression signifikant verbessert wird. Die Kapsel der Meningokokken schützt nicht nur vor dem Komplementsystem des Menschen, sondern auch vor Phagozytose durch Abwehrzellen der unspezifischen Immunabwehr, wie den Dendritischen Zellen (McNeil *et al.*, 1994; Read *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1997; Vogel und Frosch, 1999; Kolb-Mäurer *et al.*, 2001, Unkmeir *et al.*, 2002a). Die Rolle der Neisserienkapsel in der Interaktion zwischen Meningokokken und humanen Makrophagen wurde schon untersucht. Die Kapsel der Serogruppe A hemmt sowohl die Adhärenz als auch die Phagozytose durch Makrophagen (McNeil *et al.*, 1994). Auch bei Serogruppe B hemmt die Kapsel die Adhärenz, jedoch nicht die Phagozytose durch Makrophagen, wenn die Adhärenzrate zwischen kapsellosen und bekapselten Stämmen durch Zugabe unterschiedlicher Serumkonzentrationen angeglichen wurde. Jedoch werden insgesamt weniger bekapselte als kapsellose Serogruppe B Stämme phagozytiert, da die Kapsel die Adhärenz verringert (Read *et al.*, 1996). Bei der Phagozytose durch Makrophagen spielt die Opsonisierung durch Komplement eine wichtige Rolle (Read *et al.*, 1996), bei der Phagozytose durch Dendritische Zellen wirkt eine Opsonisierung hingegen eher inhibierend, da die Zugabe von humanem Serum (NHS) oder Kälberserum (FCS) zu Dendritischen Zellen die Adhärenz verringerte und nicht, wie bei Opsonisierung zu erwarten, erhöhte (Kolb-Mäurer *et al.*, 2001). Auch zwischen Serogruppe A und humanen Monozyten (McNeil *et al.*, 1994), Serogruppe B und humanen Makrophagen (Read *et al.*, 1996) und Serogruppe C und humanen neutrophilen Leukozyten (Estabrook *et al.*, 1998) wurde eine Phagozytose ohne vorherige Opsonisierung der Meningokokken beobachtet. Die Serogruppe B Kapsel behindert also die Phagozytose ohne Opsonisierung durch Reduktion der Adhäsion (Read *et al.*, 1996; Kolb-Mäurer *et al.*, 2001; Unkmeir *et al.*, 2002a) sowie die Komplementaktivierung (Vogel und Frosch, 1999) und stellt damit den wichtigsten Virulenzfaktor in der Abwehr des unspezifischen Immunsystems dar. Außerdem verringert die Kapsel der Serogruppe B die Abtötung der Meningokokken im Phagosom in den Dendritischen Zellen. Neben der Kapsel inhibiert die Sialylierung des LOS die Phagozytose in Dendritischen Zellen (Kolb-Mäurer *et al.*, 2001; Unkmeir *et al.*, 2002a). Bei der Interaktion mit humanen neutrophilen Granulozyten oder Monozyten (wie den Dendritischen Zellen) und Meningokokken spielen im Unterschied zu Epithel- und Endothelzellen die Pili kaum eine Rolle, die Opa und Opc Prote-

ine sehr wohl. So sind für die Adhäsion an Granulozyten die Opa Proteine wichtiger als Opc, für die Adhäsion an Monozyten sind die Opc Proteine wichtiger (McNeil und Virji, 1997). Die Kapsel scheint diese Adhärenzfaktoren zu maskieren und so vor Phagozytose zu schützen. Die Strategie, einen Neisserien-basierten Lebendimpfstoff auf der Basis kapseldefizienter Meningokokken zu entwickeln, ist also aus zwei Gründen eine geeignete Vorgehensweise. Erstens führt die Kapseldeletion zum attenuierten Phänotyp und zweitens können kapsellose Mutanten stärker an mukosale Zellen des Nasopharynx adhären und zeigen eine effizientere Interaktion mit APZ wie Dendritischen Zellen, was eine stärkere Immunogenität erwarten lässt.

Außerdem wurde in weiteren Arbeiten mit Dendritischen Zellen entdeckt, dass die kapsellose Mutante H44/76*siaDCm* auch eine stärkere Zytokinsekretion, wie z.B. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6) oder IL-8, durch die Dendritischen Zellen bewirkt. Diese Zytokine sind für die Immunantwort bedeutend. Somit verbessert die Kapseldeletion erstens die Phagozytose und die Abtötung der Neisserien durch die Dendritischen Zellen und führt somit wahrscheinlich zu einer verbesserten Antigen-Präsentation. Zweitens wird bei kapsellosen Mutanten ein verbessertes Immunstimulierendes Zytokinmilieu gebildet (Kolb-Mäurer *et al.*, 2001; Unkmeir *et al.*, 2002a).

3.4. Unterschiede zwischen den *siaD*-Mutanten

Um die Unterschiede in der Interaktion mit Epithel-, Endothelzellen und Dendritischen Zellen zwischen den kapsellosen Mutanten aufzuklären, wurde ein Westernblot mit Antikörpern gegen die für die Adhärenz wichtigen Oberflächenstrukturen Pili, Opa und Opc durchgeführt. In der Expression von Opc und Pili zeigten Wildtyp und Mutanten keine Unterschiede. Bei der Analyse der Expression der Opa-Proteine jedoch wurde gefunden, dass der Stamm H44/76*siaD*⁻ nur zwei Opa-Proteine exprimiert, wohingegen Wildtyp und Insertionsmutante drei Opa-Varianten exprimierten. Meningokokken können bis zu vier Opa-Proteine gleichzeitig exprimieren und diese einzeln durch Insertion oder Deletion von CTCTT-Pentameren und Verschiebung des Leserahmens abschalten (Aho *et al.*, 1987; Murphy *et al.*, 1989). Also wurde eines der drei im Wildtyp exprimierten Opa-Proteine im H44/76*siaD*⁻ abgeschaltet. Dies erklärt die schwächere Adhärenz von H44/76*siaD*⁻ im Vergleich zu H44/76*siaDCm* an Epithel- und Endothelzellen,

da Opa wichtig für die Adhärenz an diese Zellen ist (Virji *et al.*, 1993, 1995). Die Invasion in HBMEC-Endothelzellen, die hier nicht untersucht wurde, wird vor allem durch Opc bedingt (Unkmeir *et al.*, 2003b). Bei der Interaktion mit Monozyten sind die Opc-Proteine wichtiger als die Opa-Proteine (McNeil und Virji, 1997). Dies könnte erklären, warum die Deletionsmutante keine schwächere Adhärenz an den Dendritischen Zellen zeigte als die Insertionsmutante.

Diese Ergebnisse machten deutlich, dass für die reproduzierbare Produktion eines Lebendimpfstoffs auf Neisserienbasis eine Kontrolle der genetischen Stabilität und der Expression der Oberflächenmarker eine wichtige Rolle spielt. Weiterhin sollte versucht werden, neue *siaD*-Deletionsmutanten herzustellen und diese bezüglich der in dieser Arbeit angewandten Kriterien zu charakterisieren, um einen optimalen Kandidatenstamm zu entwickeln, der durch die Inaktivierung der Kapselexpression sowohl sicher, als auch immunogen ist.

3.5. Deletion des *recA*-Gens

Neben der Attenuierung durch Deletion des *siaD*-Gens sollte die genetische Stabilität des Stammes durch Deletion von *recA* sichergestellt werden (Miller und Kokjohn, 1990). Bei der Deletion von *recA* wurde die für *siaD* erfolgreich angewandte Deletionsstrategie erneut angewandt. Analog zum *siaD*-Deletionsvektor pTL3 wurden die upstream und downstream Sequenzen des *recA*-Gens aneinander liegend in pTL1 eingefügt. Der so entstandene Vektor pTL6 sollte dann zur Deletion von *recA* in H44/76 verwendet werden. Jedoch gelang der Nachweis einer *recA*-Deletion trotz mehrfacher Versuche mit insgesamt 1500 Kolonien unter verschiedenen Bedingungen nicht. Die Deletionsrate lag hiermit unter 7×10^{-4} / CFU, so dass für die Detektion einer erfolgreichen Deletionsmutante noch mehr Kolonien gleichzeitig untersucht werden müssten. Über die Gründe für das Misslingen kann hier nur spekuliert werden. Dass die Deletion von *recA* in Neisserien möglich ist, wurde bereits bei *Neisseria gonorrhoeae* bewiesen. Dabei erfolgte die Deletion sowohl durch Insertion einer Antibiotikumsresistenzkassette in *recA* als auch durch Insertion eines kurzen Linkers, der den Leserahmen verschob (Kooimey und Falkow, 1987; Seifert, 1997). Der Einbau einer Antibiotikumsresistenzkassette mit nachfolgender Selektion der *recA* Klone durch entsprechende Antibiotikahaltige Nährböden kam hier nicht in Frage, da die Resistenzkassette nach Deletion von

recA und Wegfall der Möglichkeit zur homologen Rekombination nicht mehr entfernt werden kann und der Impfstamm auf keinen Fall Resistenzen tragen darf. Bei *Neisseria gonorrhoeae* wurde die Selektion von *recA*⁻ Klonen nach Insertion des Linkers elegant gelöst. Die *recA*⁺-Kolonien von *Neisseria gonorrhoeae* unterschieden sich nach 36-48-stündigem Wachstum auf Agar in ihrer Koloniemorphologie von den *recA*⁻ Mutanten, da ihre Pili der *recA*-abhängigen Phasenvariation unterliegen. Die Pili bedingen die Adhärenz zwischen den Bakterien und beeinflussen so die Koloniemorphologie. Eine Phasenvarianz der Pili gibt es bei den *recA*⁻ Klonen nur sehr selten. Die Unterschiede in der Koloniemorphologie wurden ausgenutzt, die *recA*⁻ Klone von den *recA*⁺ zu unterscheiden (Seifert, 1997; Nassif *et al.*, 1999). Leider gibt es dieses Unterscheidungsmerkmal bei den Meningokokken nicht. Eine Arbeitsgruppe um Blake hat zwar Unterschiede in der Koloniemorphologie der Meningokokken nach Abschaltung der Piliexpression während kurzer Inkubation von 8 - 10 Stunden in 37 °C mit 5 - 10 % CO₂ beschrieben, andere Arbeitsgruppen haben dies aber nicht beschrieben (Blake *et al.*, 1989).

Das Misslingen der *recA* Deletion kann sowohl an einem Fehler in der Transformationsmethodik als auch in einer für unsere Analysenmethoden zu geringen Transformationsrate liegen. Die Transformationsfähigkeit hängt von drei Faktoren ab: (i) einem Vektor, der die Aufnahme und homologe Rekombination sicherstellt, (ii) einem Neisserienstamm, der die Fähigkeit zur Transformation besitzt und nach der *recA*-Deletion überlebt und (iii) von geeigneten Transformationsbedingungen.

(i) Entscheidend für die Erkennung von Fremd-DNA als Neisserien-spezifische DNA ist das Vorhandensein der Neisseria-uptake-sequence (NUS). Nach Goodman und Scocca sollte eine NUS für die Transformation genügen. Mehrere NUS erhöhen jedoch die Transformationswahrscheinlichkeit (Goodman und Scocca, 1988; Stein, 1991). Vielleicht hätte durch den Einbau mehrerer NUS die Transformationsrate verbessert werden können. Für die homologe Rekombination sind Sequenzhomologien von mindestens 50 bp nötig (Singer *et al.*, 1982). In pTL6 umfassen die *recA* flankierenden Bereiche mehr als 200 bp, sollten also für die Rekombination ausreichen.

(ii) Neisserien benötigen für die Transformation verschiedene Proteine, zu denen, wie in der Einleitung beschrieben, das Pilin gehört (Gibbs *et al.*, 1989; Rudel *et al.*, 1995b). Auch die Opa Proteine verbessern die Transformationsfähigkeit (Hill, 2000). Durch den Nachweis von Pili und Opa im Westernblot wurde sichergestellt, dass die mangelnde

Rekombinationsfähigkeit nicht auf einen Mangel an Pilin oder Opa im Stamm H44/76 zurückzuführen ist. Außerdem wurden zusätzlich Versuche mit dem Stamm MC58 durchgeführt, um sicherzugehen, dass die negativen Ergebnisse der Versuche nicht vom Neisserienstamm abhängen. Nach einer Deletion von *recA* sind die Bakterien empfindlich gegenüber UV-Strahlen und DNA-toxischen Substanzen wie Methylmethansulfonat (MMS) (Koohey und Falkow, 1987). Möglicherweise sind also die *recA*⁻ Klone durch UV-Strahlung abgetötet worden. Die Bakterien wurden jedoch durch Aluminiumfolie vom Licht abgeschirmt. Außerdem wurden bei der *recA*-Deletion in *N. gonorrhoeae* derartige Probleme nicht beschrieben. *RecA* erfüllt auch Reparaturfunktionen an der DNA. Vielleicht überlebten die *recA*⁻ Neisserien während der DNA-Replikation aufgetretene Mutationen nicht. Dagegen spricht, dass die *recA*-Deletion bei *N. gonorrhoeae* möglich war und keine Probleme durch DNA Schäden auftraten (Koohey und Falkow, 1987; Seifert, 1997).

(iii) Als letzte Ursache für das Misslingen kommen die Transformationsbedingungen in Frage. Vielleicht wären andere Bedingungen als bei der *siaD*-Deletion nötig gewesen, da es sich um ein anderes Gen und einen anderen Vektor handelt. Jedoch sind bei *N. gonorrhoeae* keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Deletion von *recA* und anderen Genen beschrieben worden (Koohey und Falkow, 1987; Seifert, 1997). Es wurden zwar verschiedene Inkubationszeiten, Plasmid- und Bakterienkonzentrationen gewählt, jedoch ohne Erfolg. Die höchste Transformationsrate erreichen die Neisserien in der logarithmischen Wachstumsphase (Sparling, 1966). Also sollten sich die Neisserien während des Versuchs vermehren. Die Vermehrung erkannte man beim Ausplattieren der Ansätze auf GC-Agar, denn die Lebendkeimzahlen waren nach dem Versuch wesentlich höher als vorher. Eventuell könnte man die Transformationsrate noch durch Inkubation in einem Eisenmangelmedium erhöhen (Serkin und Seifert, 2000).

Wahrscheinlich gab es doch vereinzelte *recA*⁻ Klone, die nicht mit den hier angewandten Analysemethoden entdeckt wurden. Bei der hier verwendeten Methode müssen mindestens 10^4 Kolonien analysiert werden, um eine *recA*⁻ Mutante zu finden. Die Arbeitsgruppe um Seifert gibt eine Transformationsrate für *recA* von 10^{-5} bis 10^{-2} /CFU an (Seifert, 1997). Da weder Antibiotikaresistenzen noch Morphologieunterschiede zur Selektion verwendet werden konnten, blieb nur die genotypische Suche. Dazu wurden sowohl durch PCR-Analysen als auch durch einen Kolonieblot der auf GC-Agar ge-

züchteten Neisserien 1500 Kolonien analysiert. Durch keine dieser Methoden konnte eine *recA*⁻ Mutante identifiziert werden. Eine zweite Kopie des *recA*-Gens würde diese Analysenmethoden zwar beeinflussen, das *recA*-Gen kommt aber nur einmal im Neisseriengenom vor (Koomey und Falkow, 1987; Tettelin *et al.*, 2000).

Auf der Basis der hier gewählten Deletionsstrategie wurde von Frau S. Haller eine Kanamycin-Resistenzkassette zwischen die *recA*-up- und -downstream Bereiche im pTL6 eingebaut. Mit diesem neuen Vektor gelang die Ausschaltung des *recA*-Gens im Stamm H44/76 mit einer Transformationsrate von 10^{-5} /CFU. Dies zeigt, dass die *recA*-Deletion im Stamm H44/76 mit pTL6 möglich und die Transformationsrate für die hier gewählten Analysenmethoden zu gering ist.

Eine Alternative zum Einbau eines Selektionsmarkers auf Antibiotikumsresistenzbasis könnte z.B. die Verwendung einer Quecksilberresistenz darstellen (Levine und Kaper, 1993). Die Ausschaltung der Rekombinationsfähigkeit der Meningokokken könnte neben der *recA*-Deletion auch durch eine Inhibition der natürlichen Kompetenz über Deletion der DNA-Aufnahmegene, wie z.B. ComA, geschehen (Facijs und Meyer, 1993; Fussenegger *et al.*, 1996a). Idealerweise sollte für eine optimale genetische Stabilität eines Meningokokken-Lebendimpfstoffs eine Strategie verfolgt werden, die sowohl die Rekombination durch Deletion von *recA* verhindert, als auch die natürliche Kompetenz und DNA-Aufnahme durch Deletion von z.B. *comA* ausschließt.

3.6. Sicherheitskriterien für Lebendimpfstoffe

Bevor ein bakterieller Lebendimpfstoff zugelassen werden kann, muss er verschiedene Sicherheitskriterien erfüllen (Dietrich *et al.*, 2003b). Dabei müssen die Sicherheit für den Impfling und die Umwelt separat betrachtet und in Sicherheitsstudien muss das Potential zur genetischen Reversion des Lebendimpfstoffes in einen virulenten Meningokokken-Stamm untersucht werden. In einigen Fällen wurde dieses Problem durch die Einführung von zumindest zwei unabhängigen attenuierenden Deletionen in den Impfstamm umgangen. Im Falle der Reversion eines der attenuierten Gene in den Wildtyp-Zustand bleibt der Lebendimpfstoff sicher und kann keine Krankheit auslösen (Tacket *et al.*, 1997). Auch wurden Mutationen identifiziert, die zu Impfstämmen führten, die auch bei immunsupprimierten Menschen sicher sind (van Cott *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 1999). Weiterhin muss eine vollständige genetische Analyse der modifizierten Re-

gionen mittels Southernblot und DNA-Sequenzierung durchgeführt werden. Es dürfen keine DNA-Sequenzen des Vektors mehr im Impfstamm vorhanden sein und die genetische Stabilität der modifizierten Loci muss bewiesen werden. Das letztere ist sowohl *in vitro* durch Kultivierung vieler Generationen des Lebendimpfstoffes als auch *in vivo* durch Impfung und anschließende Isolation des Lebendimpfstoffs von Impfungen nachzuweisen (Favre *et al.*, 1996). Im weiteren Verlauf des Validierungsvorganges müssen diese Sicherheitskontrollen in allen Produktionsschritten bis hin zur Massenfertigung durchgeführt werden. Zusätzlich muss man die Gefahr eines DNA-Transfers zur mukosalen Bakterienflora des Wirtes untersuchen (Kaper *et al.*, 1994).

Da eine Freisetzung des Lebendimpfstoffes durch den Impfling in die Umwelt für einige Tage bis Wochen möglich sein kann, müssen auch Aspekte der Umweltsicherheit in einer umfassenden Risikoanalyse adressiert werden. Dies beinhaltet die Untersuchung der Dauer und Rate der Impfstofffreisetzung durch den Impfling, das Überleben des Lebendimpfstoffes in der Umwelt und die Fähigkeit des Lebendimpfstoffes, genetisches Material an Umweltkeime abzugeben oder von diesen zu akquirieren. Hier zeigen sich jedoch klare Vorteile für eine Vakzinierungsstrategie auf der Basis attenuierter Meningokokken auf, da diese Bakterien obligat humanpathogen sind und in der Umwelt nur sehr kurz überleben. Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Übertragung der Impfstoffe vom geimpften auf nicht geimpfte Kontaktpersonen, die wahrscheinlich nicht ausgeschlossen werden kann.

3.7. Weitere Ansätze zur Impfstoffentwicklung

Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit angewandten Vorgehensweise der gezielten Deletion von Genen wurden bei der Entwicklung klassischer bakterielle Lebendimpfstoffe andere Methoden eingesetzt: Diese Methoden, die schon beim BCG- (Bacille Calmette Guérin) Impfstoff gegen *Mycobacterium tuberculosis* oder beim Ty21a-Impfstoff gegen *Salmonella typhi* eingesetzt wurden, sind die wiederholte Passage des Impfstamms auf Nährböden, bis er seine Virulenz verliert oder die Erzeugung zufälliger Mutationen mit Chemikalien wie Nitrosoguanidin (Calmette *et al.*, 1927; Levine *et al.*, 1997). So wurde z.B. *Mycobacterium bovis* durch 231 aufeinander folgende Passagen in Gallensalzen attenuiert und so der BCG-Impfstamm entwickelt (Calmette *et al.*, 1927). Dabei wurden 129 ORFs deletiert (Cole *et al.*, 1998; Behr *et al.*, 1999). Jedoch erlauben diese Metho-

den keine gezielte Attenuierung, und es lässt sich somit nur schwer die Sicherheit des Impfstamms einschätzen. Heutzutage werden moderne genetische Methoden zur gezielten Deletion von Virulenz- oder Stoffwechselgenen eingesetzt. Die Deletion des für die A-Untereinheit des Cholera-toxins kodierenden *ctxA* Gens bei *Vibrio cholerae* führte zum attenuierten Impfstamm CVD103-HgR, der als Impfstoff gegen Cholera registriert ist (Dietrich *et al.*, 2003a). Alternativ wurde durch Deletion von Stoffwechselgenen, die für die Synthese aromatischer Aminosäuren verantwortlich sind, eine Reihe an attenuierten Salmonella-Stämmen entwickelt, die als Vakzinekandidaten getestet werden (Tacket *et al.*, 1992). Die Identifikation von *in vivo* essentiellen Genen von *Neisseria meningitidis* mit der Signature-tagged-mutagenesis Methode nach Sun (Sun *et al.*, 2000) könnte nicht nur der Identifizierung von Antigenen, sondern auch der Identifikation potentiell attenuierender Gene dienen. Auch die Identifikation von Genen, die bei der Interaktion mit humanem Serum oder humanen Wirtszellen aktiviert werden (Kurz *et al.*, 2003), könnte die Grundlage für die Entwicklung attenuierter Kandidatenstämme bilden.

3.8. Vorteile eines Lebendimpfstoffs gegen *N. meningitidis*

Die Produktion eines Lebendimpfstoffes hätte bei Meningokokken trotz der in dieser Arbeit angetroffenen Probleme große Vorteile. Er bietet im Gegensatz zu den Totimpfstoffen die einzige Möglichkeit, den Nasopharynx mit dem Impfstoff zu besiedeln und so die natürliche Nische der pathogenen Meningokokken zu besetzen und eine große Vielfalt an Antigenen gleichzeitig über einen längeren Zeitraum zu präsentieren und dadurch eine Kreuzreaktivität gegen andere Neisserienstämme oder variierende Oberflächenantigene, wie z.B. die Pili, hervorzurufen (Tang *et al.*, 1999). Durch die mukosale Applikation sollte sowohl eine lokale wie auch eine systemische Immunantwort auslösbar sein (Saunders *et al.*, 1999; Glück *et al.*, 1999; Ada, 2001, Dietrich *et al.*, 2003a). Der Lebendimpfstoff könnte dem natürlichen Infektionsweg der Meningokokken folgen und durch das Nasopharynxepithel in die Blutbahn eindringen, wo er dann von Zellen des Monozyten-Phagozyten-Systems und dem Komplementsystem abgetötet werden würde, da er keine Kapsel ausbildet (McNeil *et al.*, 1994; Read *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1997; Vogel und Frosch, 1999). Auf diesem Weg könnte er von mukosalen und im Blut zirkulierenden Antigen-präsentierenden Zellen phagozytiert werden. Diese

würden die Antigene prozessieren und in den sekundären lymphatischen Organen den CD4⁺ T-Lymphozyten präsentieren (Banchereau und Steinmann, 1998). Dies würde sowohl eine starke humorale, wie auch zelluläre Immunabwehr mit der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (Kaufmann, 1993) gegen eine Vielzahl an Antigenen induzieren. Somit wäre im Gegensatz zu den bereits erhältlichen Subunit-Vakzinen gegen Meningokokken eventuell nicht nur die Vermeidung der Krankheit, sondern bereits die Inhibition der Infektion und Besiedlung möglich. Damit könnte auch ein günstiger epidemiologischer Effekt erzielt werden, da die Besiedlungsrate in der Bevölkerung reduziert werden könnte. Weiterhin haben Lebendimpfstoffe gegenüber Subunit-Vakzinen klare Vorteile durch kostengünstigere und einfachere Produktion und vereinfachte Applikation. Berücksichtigt werden müssen jedoch die mit Lebendimpfstoffen im allgemeinen und Meningokokken im besonderen verbundenen Sicherheitsaspekte des Impfstammes für den Impfling und die Umwelt, die abgeklärt werden müssen, bevor erste klinische Tests durchgeführt werden können.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde für die Entwicklung eines Lebendimpfstoffs zum Schutz vor Infektionen durch *Neisseria meningitidis* Serogruppe B zunächst ein geeigneter Impfstamm aus mehreren Neisserienstämmen der Serogruppe B, ST-32 Komplex, ausgewählt. In diesem sollte anschließend die Sicherheit für den Impfstoff-Empfänger durch die unabhängige Deletion sowohl eines Virulenzgens als auch eines Gens, das die homologe Rekombination der Neisserien bedingt, garantiert werden.

Als Virulenzgen wurde *siaD* deletiert, das für ein essentielles Enzym der Kapselbiosynthese kodiert (Edwards *et al.*, 1994). Dabei wurde eine neue Transformationsmethode eingesetzt (modifiziert nach Gunn und Stein; Gunn und Stein, 1996). Die kapsellose *siaD*-Deletionsmutante wurde dann genotypisch und phänotypisch anhand verschiedener Adhärenz- und Invasionsassays an humanen Epithel-, Endothel- und Dendritischen Zellen geprüft. Dabei fanden sich Unterschiede im Adhärenz und Invasionsverhalten im Vergleich zu einer anderen *siaD*-Mutante des gleichen Wildtyps. Diese Unterschiede wurden durch eine im Westernblot nachgewiesene, bei beiden *siaD*-Mutanten unterschiedliche Opa-Expression begründet, da das Opa-Protein als Protein der äußeren Bakterienmembran Oberflächenproteine von humanen Epithel- und Endothelzellen bindet und so zur Adhärenz an die Zielzellen führt (Virji *et al.*, 1993, 1995).

Weiterhin sollte in der *siaD*-Deletionsmutante das für die homologe Rekombination essentielle *recA*-Gen deletiert werden (Kooimey und Falkow, 1987; Miller und Kokjohn, 1990). Der Nachweis einer *recA*-Deletion gelang trotz mehrfacher Ansätze mit der neuen Transformationsmethode nicht, da die Deletionsrate von *recA* wahrscheinlich unter der Sensitivität der hier verwendeten Analysemethoden lag.

5. Material und Methoden

5.1. Geräte

Brutschränke: Kb 500 (Heraeus, Hanau)

B5060 E-CO₂ (Heraeus, Hanau)

Elektrophoresekammern: DNA Subcell™ (BioRad, München)

Wide Mini-Subcell™ (BioRad, München)

ELISA-Gerät: Titertek Multiscan MCC/340 (Titertek, Huntsville, AL, USA)

Heizblöcke: BT1 und BT3 (Grant Instruments, Cambridge, UK)

Hybridisierungsöfen: DUO-Therm OV5 (Biometra, Göttingen)

Schüttelinkubatoren: G25 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)

KS 10 (Bühler, Tübingen)

Sequenziergerät: ABI Prism™ Sequencer 377 (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Spannungsgeräte: Gene Power Supply GPS 200/400 (Pharmacia, Freiburg)

Power Supply 3000Xi (BioRad, München)

Speed Vac® Plus SC110A (Savant, New York, USA)

Spektrophotometer: U-2000 (Hitachi, San Jose, CA, USA)

Thermocycler: TRIO (Biometra, Göttingen)

Personal Cycler (Biometra, Göttingen)

UV *Crosslinker*: Stratalinker® 1800 (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande)

Wasserbäder verschiedener Hersteller

Zentrifugen: Biofuge 15 (Heraeus, Hanau)

Biofuge 15R (Heraeus, Hanau)

Omnifuge 2.0 RS (Heraeus, Hanau)

Kühlzentrifuge RC-5B (Sorvall Heraeus, Hanau)

Ultrazentrifuge L7 (Beckman, München)

Tisch-Ultrazentrifuge TL-100 (Beckman, München)

5.2. Verbrauchsmaterial

Dialyseschläuche 3/4" (Life Technologies, Karlsruhe)

dickes und dünnes Blotting-Papier, 58 cm x 58 cm (Schleicher & Schüll, Dassel)

Nitrocellulose (Schleicher & Schüll, Dassel)

positiv geladene Nylonmembran *porablot NY plus* (Macherey & Nagel, Düren)

amphotere Nylonmembran *porablot NY amp* (Macherey & Nagel, Düren)

PS-Mikrotiterplatte 96 K (Greiner, Nürtingen)

0,5-ml-, 1,5-ml- und 2,0-ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht)

15-ml-Röhrchen, steril (Greiner, Nürtingen)

Röntgenfilm Hyperfilm™-MP (Amersham, Braunschweig)

Spritzen und Kanülen (Braun Melsungen AG, Melsungen)

Whatman-Papier (Schleicher & Schüll, Dassel)

15-ml- und 50-ml-Zentrifugengefäße *Falcon* (Heidelberg)

Quickseal™ Zentrifugengefäße, 25 x 89 mm (Beckman, München)

Polyallomer Zentrifugengefäße, 13 x 51 mm (Beckman, München)

5.3. Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme

AppliChem, Heidelberg: Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)

X-Gal

Bayer, Leverkusen: Ampicillin (Binotal®)

Becton Dickinson, Heidelberg: Nu Serum IV

Boehringer, Mannheim: ABTS

Poly-D-Lysin, Lyophilisat, steril

Biochrom, Berlin: Heparin

L-Glutamin

Natriumpyruvat

MEM-Vitaminsupplement

bioMérieux, Nürtingen: PolyVitex (Vitaminlösung für Flüssigmedien)

Biomol, Hamburg: p-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)

Cell Systems Clonetics, St. Katharinen: Endothel Zellwachstum Supplement (ECGS)

Dianova, Hamburg: Alkalische-Phosphatase-markierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper

Peroxidase-markierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper

Difco Laboratories, Augsburg: Bacto-Trypton

GC-Medium Base

Hefeextrakt

Proteose-Pepton

Epicentre Technologies, Madison, WI, USA: Fast Link Ligation Kit

Falcon Labware, Oxnard, CA, USA: Gewebekultur-Schalen (3003)

Gibco Life Technologies, Karlsruhe: BenchMark™ Prestained Protein Ladder

Cäsiumchlorid ultraPURE™

DNA-Längenstandard (*one-kb-ladder*)

Fötale Kälberserum (FCS)

Gentamicin

LB Agar (Lennox L Agar)

LB Broth Base (Lennox L Broth Base)

RPMI 1640 Medium

MWG Biotech AG, Ebersberg: Oligonukleotide

NEB, Schwalbach: Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme

Noras, Würzburg: T75 Flaschen

Nycomed, Oslo, Norwegen: Lymphoprep Dichtegradienten-Zentrifugation

PBH, Hannover: rhIL-4

Perkin Elmer, Weiterstadt: *AmpliTaq*®

BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready-Reaction Kit

Polysciences Inc., Washington, USA: 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)

Promega, Mannheim: Taq-Polymerase

Qiagen, Hilden: Qiagen Plasmid Midi/Maxi Kit

QIAamp DNA Mini Kit

QIAprep Spin Miniprep Kit

QIAprep 8 Miniprep Kit

QIAquick PCR Purification Kit

QIAquick Gel Extraction Kit

Roche, Mannheim: DNA-Molekulargewichtsmarker II und III, DIG-markiert

DIG DNA Labeling Kit

DIG Luminescent Detection Kit

DIG Oligonucleotide Tailing Kit

Lysozym

Roth, Karlsruhe: Agarose NEEO

dNTPs, lyophilisiert

Sandoz, Basel, Schweiz: rhGM-CSF (Leukomax)

Sigma, Deisenhofen: Antibiotika

DMF

N-Lauroylsarkosin

Paraffin-Mineralöl

RNase A aus Rinderpankreas

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.a. Qualität von Merck, Darmstadt, Serva, Heidelberg oder Promega, Mannheim bezogen

5.4. Puffer und Lösungen

GEBS: 20 % Glycerin

50 mM EDTA

0,05 % Bromphenolblau

0,5 % N-Lauroylsarkosin

pH 8,0

NTE: 100 mM NaCl

20 mM Tris-HCl, pH 8,0

10 mM EDTA, pH 8,0

PBS: 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4

140 mM NaCl

oder

PBS Dulbecco ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} (Biochrom, Berlin)

20 x SSC: 3 M NaCl

0,3 M Na-Citrat

pH 7,0

20 x SSPE: 3,6 M NaCl

100 mM Na₂HPO₄

20 mM EDTA

STE: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

100 mM NaCl

STET-Lysepuffer: 8 % Saccharose

5 % Triton®-X-100

50 mM EDTA

50 mM Tris-HCl, pH 7,2

1 x TBE: 100 mM Tris-HCl

100 mM Borsäure

2,5 mM EDTA

pH 8,3

TE (10/1): 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

5.5. Antikörper

Für Westernblot: Opa-Antikörper 4B12/C11 (freundlicherweise von M. Achtman zur Verfügung gestellt)

Opc-Antikörper B306 (freundlicherweise von M. Achtman zur Verfügung gestellt, Achtman *et al.*, 1988)

Pili-Antikörper SM-1 (freundlicherweise von M. Virji zur Verfügung gestellt, Virji und Heckels, 1983)

Für ELISA: Serogruppe B Kapselpolysaccharid-Antikörper mAb 735 (Frosch *et al.*, 1985)

5.6. Bakterienkulturen

5.6.1. *E. coli*-Stämme

E. coli DH5 α (Hanahan, 1983): F⁻ *endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁻) *supE44 thi-1 λ - recA1 gyrA*

relA1 Δ (*lacIZYA-argF*)U169, *deoR* Φ 80*dlacZ* Δ M15

E. coli XL1-Blue MRF' (Stratagene): Δ (*mcrA*) 183 Δ (*mcrBC-hsdSMR-mrr*) 173 *en-*

dA1supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'

proAB lacI^q*Z* Δ M15 Tn5(Kan^R)]

5.6.2. Neisserienstämme

N. meningitidis MC58: klinisches Isolat aus Großbritannien, 1985, von E. R. Moxon, Oxford; B:15:P1.7,16; ST-32 Komplex

Impfstoffkandidaten, alle Serogruppe B, ST-32 Komplex:

Stammnummer ¹	Ursprüngliche Bezeichnung	Herkunft	Referenz
517	PB 24	Norwegen	The National Institute of Public Health, Oslo, Norway
519	M0 080	Norwegen	The National Institute of Public Health, Oslo, Norway
521	144/82	Norwegen	The National Institute of Public Health, Oslo, Norway
2021	BZ 83	Niederlande	Caugant, Folkehelsa, Oslo, Achtman
2063	8680	Chile	Caugant, Folkehelsa, Oslo, Achtman
2514	H44/76	Norwegen	Holten, 1979
2614	Va 10232/99	BRD	Index Bamberg 6/99
ID 106 ²		Volkach, BRD	Patientenisolat
ID 110 ²		Volkach, BRD	Patientenisolat
ID 112 ²		Volkach, BRD	Patientenisolat

¹Stammsammlungsnummer des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg

²isoliert von Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg

5.6.3. Nährmedien

GC-Agar: 1,5 % Proteose-Pepton

0,1 % Stärke

0,4 % K-Phosphat

0,5 % NaCl

1,0 % Bacto-Agar

pH 7,2

Luria-Broth-Medium (LB-Medium): 1,0 % Bacto- Trypton
0,5 % Hefeextrakt
1,0 % NaCl
pH 7,5

LB-Agar: LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar

Proteose-Pepton-Medium (PPM): 1,5 % Proteose-Pepton
0,5 % NaCl
0,05 % Stärke
0,4 % KH_2PO_4
0,1 % K_2HPO_4
pH 7,8 (mit KOH)

Proteose-Pepton-Medium, supplementiert (PPM⁺): PPM + 0,01 M MgCl_2
+ 0,042 % NaHCO_3
+ 1 % (v/v) PolyVitex

5.6.4. Kulturbedingungen

Alle Inkubationen finden bei 37 °C statt. Neisserien-Kulturen werden auf mit Faktor VX supplementiertem GC-Agar oder Schokoladen-Agar in einem CO_2 -Brutschrank (5 % CO_2 -Atmosphäre) inkubiert. *E. coli* wird auf LB-Agar inkubiert. Bei rekombinanten Bakterienstämmen werden dem Medium die zur Selektion notwendigen Antibiotika zugesetzt.

5.6.5. Antibiotikazusätze

Bei Zusatz von Antibiotika werden folgende Konzentrationen verwendet:

Ampicillin	100 µg/ml für <i>E. coli</i>
Chloramphenicol	30 µg/ml für <i>E. coli</i>
Chloramphenicol	7 µg/ml für Neisserien

5.7. Zellkultur

5.7.1. Hep-2 Larynxkarzinomzellen

Hep-2 humane Larynxkarzinomzellen (freundlicherweise von A. E. Moore zur Verfügung gestellt) wurden in RPMI 1640 Medium plus 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Die hier verwendeten Hep-2 Zellen wurden als iden-

tisch zu HeLa-Zellen identifiziert (American Type Culture Collection, ATCC catalogue, ATCC, Manassas, VA, USA). Um Verwirrung zu vermeiden, wurde die Bezeichnung Hep-2 beibehalten.

5.7.2. HBMEC-Endothelzellen

Mikrovaskuläre Endothelzellen aus Humanhirn (HBMEC, Stins *et al.*, 1997) wurden in T75 Flaschen in HBMEC-Medium kultiviert. Die Flaschen wurden mit 0,2 % Gelatine bedeckt, um die Zelladhärenz zu ermöglichen. Die HBMEC-Zellen wurden freundlicherweise von K. S. Kim zur Verfügung gestellt.

HBMEC-Medium (100 ml): RPMI 1640

10 % FCS

10 % Nu-Serum IV

30 µg/ml ECGS

5 U/ml Heparin

2 mM L-Glutamin

1 mM Na-Pyruvat

1 % MEM-Vitamine

Beide Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ bei hoher Luftfeuchtigkeit bebrütet.

5.7.3. Dendritische Zellen

Zur Generierung humaner Dendritischer Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes (PBMC, Romani *et al.*, 1994) wurden PBMC aus dem heparinisierten und Leukozytenangereicherten Buffy-coat gesunder Spender mit Lymphoprep (1,077 g/ml) Dichtegradienten-Zentrifugation bei 400 x g bei Raumtemperatur isoliert. Die PBMC wurden dann auf Gewebekultur-Schalen mit einer Dichte von 5 x 10⁶ Zellen/ml in RPMI 1640 Medium, das mit 2 mM L-Glutamin, 1 % autologem Humanplasma und 100 U/ml Granulozyten Makrophagen-Kolonien stimulierendem Faktor (GM-CSF) supplementiert wurde, für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nicht adhärente Zellen wurden mit PBS abgewaschen. Die adhärennten Zellen wurden für 7 Tage ohne Antibiotika in RPMI 1640 Medium, das mit 1 % autologem Humanplasma, 2 mM L-Glutamin, 1000 U/ml rhIL-4 und 800 U/ml rhGM-CSF (Leukomax) supplementiert war, kultiviert. Die Zytokine wurden täglich erneuert.

5.8. Plasmide

pBluescript[®]II SK(+) (Stratagene/*accession no.* X52328):

Derivat des pUC19; *f1 ori*, *ColE1 ori*, *lacZ*, multiple Klonierungsregion (*MCS*) flankiert von T3- und T7-RNA-Promotoren, Amp^R

pGH15:

Derivat des pAT153 (Sambrook *et al.*, 1989); *ColE1 ori*, „relaxed“; Amp^R, Tet^R; enthält das PCR-Produkt der Primer UE12 und UE13 (siehe unten), in das an der *Spe* I-Schnittstelle eine Cm^R-Kassette eingefügt wurde

5.9. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von MWG Biotech AG, Ebersberg bezogen.

Primer für den Vektor pBluescript[®] II SK(+)

329	5'-ACCATGATTACGCCAAGC-3'	5'-Ende der <i>MCS</i>
KB9	5'-AATACGACTCACTATAGGGC-3'	3'-Ende der <i>MCS</i>

Primer für den *siaD* Nachweis in den CM-Insertionsmutanten

UE12	5'-CGCCTTTGCATCTGTCGTAGC-3'	300 bp upstream <i>siaD</i>
UE13	5'-GGAGATCAGAAGTCATAGTA-3'	10 bp downstream <i>siaD</i>
SiaDF	5'-AAGAGATACAATAATGCTAAAGA-3'	10 bp upstream <i>siaD</i>
SiaDR	5'-TTATCTATCTCTACCAATTC-3'	<i>siaD</i> 3'-Ende

Primer zur Amplifikation des *siaD*-upstream Bereichs

SiaD-upstreamF	5'-GTCGGTAGAAATTATTCGAGA-3'	600 bp upstream <i>siaD</i> upstream von <i>Kpn</i> I-Schnittstelle
SiaD-upstreamR	5'TTAAAAATTCTCGAGAATTAGCTATATGTA ATAGC-3'	10 bp upstream <i>siaD</i> führt <i>Xho</i> I-Schnittstelle ein

Primer zur Amplifikation des *siaD*-downstream Bereichs

SiaD-downstreamF	5'CAATAGAATTGGTAGACTCGAGTAAAAA TACTATGACTTC-3'	<i>siaD</i> 3'-Ende führt <i>Xho</i> I-Schnittstelle ein
SiaD-downstreamR	5'TTAAAAAGTTAATTAGGGATCCTAAAAA GT-3'	500 bp downstream <i>siaD</i> enthält <i>Bam</i> HI Schnittstelle

Primer zur Suche nach den *siaD*-Deletionsklonen

SiaD- fusionoverlap	5'-ATAGCTAATTCTCGAGTAAAAA-3'	10 bp upstream <i>siaD</i> , 3'-Ende im <i>siaD</i> -downstream Bereich enthält <i>XhoI</i> Schnittstelle
SiaD-insertcontrol	5'-GAATAGTATAGAATCAACTAAAAC-3'	600 bp downstream <i>siaD</i>

Primer zur Erstellung der *siaD* Southernblot Sonden

SiaD-start	5'-ATGCTAAAGAAAATAAAAAAAGCTC-3'	<i>siaD</i> 5'-Ende
SiaD-stop	5'-ACCAATTCTATTGTCGGCGG-3'	<i>siaD</i> 3'-Ende

Primer zur Amplifikation des *recA*-upstream Bereichs

RecA- upstreamF	5'-CACATAAACAGGTACCCACAGAAAAA-3'	250 bp upstream <i>recA</i> führt <i>KpnI</i> Schnittstelle ein
RecA- upstreamR	5'-GTCTGACATTAAGCTTACTCCGGAACA-3'	10 bp upstream <i>recA</i> führt <i>HindIII</i> Schnittstelle ein

Primer zum Nachweis des *recA*-upstream Einbaus in pTL1

RecA- upscreen	5'-GGTACCCACAGAAAAACAGC-3'	250 bp upstream <i>recA</i> enthält <i>KpnI</i> Schnittstelle
-------------------	----------------------------	--

Primer zur Amplifikation des *recA*-downstream Bereichs

RecA- downstreamF	5'-CGAAGAATAAAAGCTTAAATCCCGATAA A-3'	<i>recA</i> 3'-Ende führt <i>HindIII</i> Schnittstelle ein
RecA- downstreamR	5'-CGCGGGAATCTAGAACGTAGAAT-3'	450 bp downstream <i>recA</i> enthält <i>XbaI</i> Schnittstelle

Primer zum Nachweis des *recA*-downstream Einbaus in pTL1

RecA-downscreen	5'-TCTAGAACGTAGAATCTGAGAAA-3'	450 bp downstream <i>recA</i> enthält <i>XbaI</i> Schnittstelle
-----------------	-------------------------------	--

Primer zur Suche nach den *recA*-Deletionsklonen

RecA- insertcontrolF	5'-CGCTCCGATAACGGTATTT-3'	300 bp upstream <i>recA</i>
RecA- insertcontrolR	5'-GTCGTTGAATTTTGTTTCAGCA-3'	400 bp downstream <i>recA</i>
RecA-fusion1	5'-TTTATCGGGATTTAAGCTTACT-3'	10 bp downstream <i>recA</i> , 3'- Ende im <i>recA</i> -upstream Be- reich enthält <i>HindIII</i> Schnittstelle

Primer zur Erstellung der *recA* Kolonieblot Sonden

RecA-SondeF	5'-ATGTCAGACGACAAAAGCAAA-3'	<i>recA</i> 5'-Ende
RecA-SondeR	5'-CGTTCGCCGTCGGTTTCG-3'	<i>recA</i> 3'-Ende

5.10. DNA-Präparationen

5.10.1. Präparation chromosomaler DNA aus Bakterien (Stern *et al.*, 1984)

Bakterien von drei dicht bewachsenen Agarplatten werden in 10 ml NTE-Lösung suspendiert und nach Zusatz von einer Spatelspitze Lysozym für 10 min auf Eis gestellt. Zum Erzielen einer vollständigen Zelllyse wird die Mischung nach Zugabe von 0,5 ml 20 % Triton[®]-X-100 sowie von 1 ml 10 % N-Lauroylsarkosin für eine Stunde bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und anschließend bei $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Zur Proteinolyse wird der Mischung eine Spatelspitze Proteinase K zugesetzt und der Ansatz bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu 2 h inkubiert. Der DNA-Lösung wird anschließend Cäsiumchlorid zugesetzt (Endkonzentration 1 g/ml), das unter Erwärmen gelöst wird. Nach dem Einfüllen der gesamten Lösung in ein *Quickseal*-Röhrchen werden 0,4 ml Ethidiumbromidlösung (1 %) auf die DNA-Lösung gegeben und nach dem Verschließen des Röhrchens vorsichtig durchmischt. Die Zentrifugation erfolgt in der Ultrazentrifuge L7 bei $186.000 \times g$ (Rotor 70.1 Ti, 45.000 UpM) und $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 36 h. Die durch das interkalierte Ethidiumbromid rot gefärbte DNA-Bande wird mit einer Spritze aus dem Röhrchen entnommen und mit dem gleichen Volumen Isoamylalkohol versetzt, um das Ethidiumbromid auszuschüteln. Abschließend erfolgt eine ausgiebige Dialyse der DNA-Lösung gegen TE zur Entfernung des Salzes.

5.10.2. Präparation chromosomaler DNA aus Bakterien mit dem QIAamp DNA

Mini Kit von Qiagen

Eine Kultur der Neisserien auf GC-Agar wird nach 16 Stunden abgeerntet und in 1,25 ml 1 x PBS bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von ca. 2 resuspendiert. Der Ansatz wird 5 min bei $8.000 \times g$ zentrifugiert (Tischzentrifuge), der Überstand verworfen und das Sediment in 180 μl ATL-Puffer und 20 μl Proteinase K aufgenommen und anschließend für 2-3 h bei $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Heizblock inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation werden 20 μl RNase A (20 mg/ml) zugefügt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden 200 μl AL-Puffer hinzugefügt und bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Heizblock für 10 min inkubiert. Anschließend werden 200 μl Ethanol abs. zugefügt, der Ansatz gemischt und auf eine QIAamp Säule pipettiert. Die Säule wird 1 min bei $8.000 \times g$ zentrifugiert und das Eluat verworfen. Nach Zufügen von 500 μl AW1-Puffer wird erneut 1 min bei $8.000 \times g$ zentrifugiert und das Eluat verworfen. Dann werden 500 μl AW2-Puffer auf die Säule

pipettiert und 3 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Das Eluat wird wiederum verworfen und die Säule erneut für 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Zuletzt wird auf die Säule 200 µl H₂O gegeben, 1 min gewartet und dann für 1 min bei 8.000 x g zentrifugiert. Der letzte Schritt wird wiederholt und das Eluat bei 4 °C aufbewahrt.

5.10.3. Schnellmethode zur Plasmid-DNA-Isolierung

(Birnboim und Doly, 1979)

Diese Plasmid-Isolierung dient vor allem der schnellen Überprüfung rekombinanter *E. coli*-Kolonien im Anschluss an eine Transformation.

Lösung A: 50 mM Glucose

10 mM EDTA

25 mM Tris-HCl

pH 8,0

Lösung B: 200 mM NaOH

1 % SDS

Lösung C: 3 M Kaliumacetat

2 M Essigsäure

5 ml LB-Selektivmedium werden mit einer *E. coli*-Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Bakterienzellen von 1,5 ml dieser Kultur werden 2 min bei 15.000 x g abzentrifugiert (Biofuge 15) und in 100 µl mit Lysozym versetzter Lösung A 10 min im Schüttelblock resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 µl frisch angesetzter Lösung B sowie anschließend von 150 µl Lösung C wird der Ansatz jeweils vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung von Membranfragmenten, Protein-SDS-Komplexen, aggregierter chromosomaler DNA und hochmolekularer RNA wird wiederum 5 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird mit 250 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und wiederum 5 min zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand zur Fällung der DNA mit dem doppelten Volumen 100%igem Ethanol versetzt, 30 min bei -70 °C gefällt und 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wird mit 70%igem Ethanol gewaschen, in der Speedvac getrocknet und in 20 µl TE (30 µg/ml RNase) aufgenommen.

Menge und Qualität der Plasmid-DNA werden auf einem Agarosegel überprüft.

5.10.4. Midi-/ Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Für präparative Arbeiten und Sequenzierungen ist die Reinheit und Menge der aus der Schnellpräparation gewonnenen Plasmid-DNA meist nicht ausreichend, so dass hierfür eine Präparationsmethode verwendet wird, bei der die DNA über spezielle Silicagel-Anionenaustauschersäulen aufgereinigt wird. Die Plasmidpräparation wird mit dem QIAGEN Plasmid-DNA-Isolierungskit von Qiagen durchgeführt (Angaben für Maxi-Präparation in Klammern).

Der Kit enthält folgende Lösungen:

P1 (Resuspendierungspuffer): 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

10 mM EDTA

100 µg/ml RNase

P2 (Lysepuffer): 200 mM NaOH

1 % SDS

P3 (Neutralisierungspuffer): 3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5

QBT (Äquilibrierungspuffer): 750 mM NaCl

50 mM MOPS, pH 7,0

15 % Ethanol

0,15 % Triton[®]X-100

QC (Waschpuffer): 1 M NaCl

50 mM MOPS, pH 7,0

15 % Ethanol

QF (Elutionspuffer): 1,25 M NaCl

50 mM Tris-HCl, pH 8,5

15 % Ethanol

100 ml (500 ml) Übernachtskultur des Plasmid-tragenden Bakterienstammes werden bei 5.500 x g (RC-5B, Rotor SLA1500) 15 min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden zunächst in 4 ml (10 ml) Puffer P1 resuspendiert und anschließend mit der gleichen Menge Puffer P2 versetzt, vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 4 ml (10 ml) Puffer P3, erneutem Mischen sowie 15 minütiger Inkubation auf Eis werden die ausgefallenen Zellbestandteile für 30 min bei 30.000 x g (RC-5B, Rotor SS34) bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird abge-

nommen und erneut für 15 min wie oben zentrifugiert. Das so erhaltene klare Lysat wird auf eine mit Puffer QBT äquilibrierte QIAGEN-tip 100 (QIAGEN-tip 500)-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit 2 x 10 ml (3 x 10 ml) Puffer QC wird die DNA mit 5 ml (15 ml) Puffer QF eluiert. Zum Fällern der DNA wird das Eluat mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, 30 min bei 15.000 x g zentrifugiert (RC-5B, Rotor HB-6) und das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wird das DNA-Sediment ca. 10 min bei 37 °C getrocknet und dann in TE aufgenommen. Die DNA-Ausbeute wird mittels Messung im Spektralphotometer bestimmt. Anschließend werden Menge und Qualität der Plasmid-DNA zusätzlich auf einem Agarosegel überprüft.

5.10.5. Phenolisierung und Ethanol-fällung von DNA

Um aus DNA-haltigen Reaktionsansätzen für nachfolgende Reaktionen störende Proteine (Enzyme), Primer und Puffer zu entfernen, werden die entsprechenden Proben phenolisiert und die DNA anschließend präzipitiert.

Das Ausgangsvolumen wird mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gründlich gemischt und zur Phasentrennung 2 min bei 15.000 x g in der Biofuge 15 zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgenommen, mit 6 µl 5 M NaCl versetzt und die DNA nach Zugabe des doppelten Volumens 100%igem Ethanol 30 min bei -70 °C gefällt. Nach 20 minütiger Zentrifugation (15.000 x g, 4 °C) wird der Überstand verworfen, das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das resultierende DNA-Sediment wird Vakuum-getrocknet und in TE oder ddH₂O aufgenommen.

5.10.6. Isolierung von DNA aus Agarosegelen und aus PCR-Ansätzen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) durchgeführt. Die Isolierung amplifizierter DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen erfolgt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Beide Verfahren basieren auf der selektiven Bindung der DNA an Silikagel-Membranen in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Bezüglich der Zusammensetzung der Lösungen werden vom Hersteller keine Angaben gemacht.

5.11. Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentrationen sowie der Reinheit von DNA- und RNA-Lösungen werden photometrische Messungen geeigneter Verdünnungen der Lösungen bei 260 und 280 nm in 1-ml-Quarzküvetten durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Eine OD_{260nm} von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA 50 $\mu\text{g/ml}$, bei einzelsträngiger DNA und RNA 40 $\mu\text{g/ml}$ und bei Oligonukleotiden 30 $\mu\text{g/ml}$. Das Verhältnis OD_{260nm} zu OD_{280nm} gibt Aufschluss über die Reinheit der Präparation bezüglich der Kontamination mit Proteinen und sollte 1,8-2,0 betragen. Sind größere Proteinmengen in der Lösung vorhanden, steigt die OD_{280nm} und das Verhältnis wird kleiner. Eine weniger genaue Konzentrationsbestimmung erfolgt im Anschluss an die Gelelektrophorese durch eine visuelle Beurteilung der Intensität der Nukleinsäure-Banden im Vergleich zu *Marker*-Banden mit einer definierten Auftragsmenge.

5.12. Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989)

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgt in Agarosegelen, wobei die Agarosekonzentration in Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente gewählt wird; z.B.:

0,8 % Agarose für 0,8 - 12 kb

1 % Agarose für 0,5 - 10 kb

1,5 % Agarose für 0,2 - 3 kb

Die jeweilige Agarosemenge wird in 1x TBE unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C in horizontale Gelträger gegossen. Die zu analysierenden DNA-Lösungen werden vor dem Auftragen mit GEBS verdünnt, wobei das in GEBS enthaltene Bromphenolblau als Marker für die Lauffront dient. Als DNA-Größenstandard wird die 1-kb-DNA-Ladder verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei 100 - 200 V bei Raumtemperatur. Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, werden die Gele 10 min in eine Ethidiumbromidlösung (2 mg/l) gelegt und anschließend unter UV-Licht (302 nm) betrachtet. Aufgrund der konstanten Menge an Größenmarker, die verwendet wird, lässt sich die Menge der zu analysierenden DNA-Fragmente abschätzen.

5.13. Klonierungsmethoden

5.13.1. Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen werden in den vom Hersteller beigefügten Puffern eingesetzt. Es werden 1 - 2 Units Enzym pro μg DNA eingesetzt, um 1 μg DNA in einer Stunde zu schneiden. In der Regel wird der Ansatz in einem Reaktionsvolumen von 10 μl für 1 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von GEBS gestoppt. Zur Spaltung chromosomaler DNA werden 2 – 3 μg mit 30 - 40 Units Enzym pro μg DNA über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es ist darauf zu achten, dass nur 1 μl Enzym pro 10 μl -Ansatz eingesetzt wird, damit die inhibitorische Wirkung des Glycerins im Enzympuffer vernachlässigbar bleibt.

5.13.2. Herstellung von doppelsträngigen Linkern aus Oligonukleotiden

Die beiden Oligonukleotide werden in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 10 μl ddH₂O aufgenommen und vereinigt. Zur Denaturierung wird der Ansatz dann für 10 min bei 70 °C im Heizblock erhitzt und anschließend zur Renaturierung zum doppelsträngigen Linker für 3 h bei 37 °C im Heizblock abgekühlt.

5.13.3. DNA-Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren erfolgt mit Hilfe der T4-DNA Ligase und unter Zusatz von ATP. Das Enzym katalysiert die Verknüpfung zwischen einer 3'-Hydroxyl- und einer 5'-Phosphatgruppe zu einer Phosphodiesterbindung. Die Ligation in 1 x Ligase-Puffer wird über Nacht bei 16 °C in einem Reaktionsvolumen von 10 – 20 μl mit 1 μl (400 U/ μl) T4-Ligase durchgeführt. Die Mengen von Vektor und zu ligierendem DNA-Fragment sollten dabei 50 – 100 ng betragen. Für Ligationen mit kohäsiven komplementären Enden (*sticky-end*-Ligationen) wird ein äquimolares Verhältnis von Vektor zu klonierendem DNA-Fragment gewählt, für stumpfendige (*blunt-end*) Ligationen ein molares Verhältnis von 1:3.

5.14. Transformation von Bakterien

Als Transformationskompetenz wird die Fähigkeit von Bakterien bezeichnet, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Neben Bakterien mit natürlicher Transformationskompetenz (z.B. Neisserien, Pneumokokken, *Bacillus*) gibt es als inkompetent geltende

Bakterien wie z.B. *E. coli*, die jedoch durch Modifikationen der Zelloberfläche kompetent gemacht werden können.

5.14.1. Transformation von Meningokokken

Meningokokken weisen eine natürliche Transformationskompetenz auf, die sie befähigt, Fremd-DNA in jeder Wachstumsphase aus dem extrazellulären Medium aufzunehmen. Der Einbau der Fremd-DNA in die genomische DNA erfolgt durch homologe Rekombination.

Zur Transformation werden Meningokokken einer frischen Übernachtskultur vom Agar abgeerntet, in 5 ml PPM⁺ resuspendiert und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wird die OD_{600nm} auf 0,1 eingestellt und 1 ml der Bakteriensuspension mit 100 – 500 ng Plasmid-DNA versetzt. Der Transformationsansatz wird für 6 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert und anschließend auf Antibiotika-haltigem GC-Agar ausplattiert. Die Inkubationszeit bei 37 °C in 5 % CO₂-Atmosphäre beträgt 24 h.

5.14.2. Transformation von Meningokokken zur *siaD*- bzw. *recA*-Deletion

Um das *siaD*- bzw. *recA*-Gen in *N. meningitidis* zu deletieren wurde eine andere, hier erstmalig eingesetzte Transformationsmethode verwendet (modifiziert nach Gunn und Stein; Gunn und Stein, 1996). Die Neisserien werden über Nacht auf GC-Agar angezüchtet, am nächsten Tag in 5 ml PPM⁺ resuspendiert und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Dann wird die OD_{600nm} in 2 ml PPM⁺ auf 0,1 eingestellt und die Neisserien bis zu einer OD_{600nm} von 1,0 bei 37 °C geschüttelt. Dies entspricht einer Neisserienzahl von ca. 10⁹ Bakterien/ml. Aus einer Verdünnungsreihe werden anschließend 10, 100 oder 1000 Neisserien in 10 µl PPM⁺ gegeben und mit 0,1 µg (1. Ansatz) oder 0,5 µg (2. Ansatz) Plasmid-DNA versetzt. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C in 5 % CO₂-Atmosphäre werden die Ansätze dann mit PPM⁺ auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und aus einer Verdünnungsreihe ca. 1000 Neisserien auf einer GC Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C in 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert.

5.14.3. Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* (Nishimura *et al.*, 1990)

Eine Übernachtskultur des betreffenden *E. coli*-Stammes wird in 50 ml Medium A 1:100 verdünnt und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Wenn diese Kultur eine OD_{600nm} von knapp < 0,5 und somit die Mitte der exponentiellen Wachstumsphase erreicht hat, wird sie 10 min bei 4 °C inkubiert. Danach wird die Kultur 10 min bei 4 °C mit 1.500 x g

abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wird in 0,5 ml eiskaltem Medium A resuspendiert, es werden 2,5 ml eiskaltes Medium B zugegeben und vorsichtig gemischt. Die kompetenten Zellen werden in Aliquots von 100 µl aufgeteilt und können bis zur Weiterverwendung bei -70 °C aufbewahrt werden.

Medium A: LB-Medium

10,0 mM MgSO₄

0,2 % Glucose

Medium B: LB-Medium

10,0 mM MgSO₄

36 % Glyzerin

12 % PEG (MW 7500)

Nach Mischen der einzelnen Komponenten wird das Medium sterilfiltriert.

5.14.4. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA (Cosloy und Oishi, 1973; Dargert und Ehrlich, 1979)

100 µl kompetente Zellen eines *E. coli*-Stammes werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 0,1 - 1,0 µg Plasmid-DNA bzw. der entsprechenden Menge eines Ligationsansatzes (bis zu 20 µl) versetzt. Der Ansatz wird gut durchgemischt und dann für 15-30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Suspension für 60 sec bei 42 °C inkubiert (Hitzeschock) und danach noch einmal für 1 - 2 min auf Eis abgekühlt (Kälteschock). Der Transformationsansatz wird hierauf mit 1 ml LB-Medium versetzt und zur Zwischenzüchtung der transformierten Zellen 45 - 60 min bei 37 °C inkubiert. Danach wird der Transformationsansatz für 30 sec in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl verworfen. Die sedimentierten Zellen werden schließlich in den verbleibenden 100 µl Überstand resuspendiert und je 1 µl, 10 µl und 90 µl auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert. Die Platten werden dann über Nacht bei 37 °C bebrütet.

5.15. Automatisierte DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgt mit dem automatischen Sequenzierungsgerät ABI Prism™ Sequencer 377 nach der Kettenabbruch- oder Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Nach der Denaturierung der zu sequenzierenden doppelsträngigen DNA wird zur Initiation der DNA-Synthese durch die *Taq*-DNA-Polymerase ein Primer an den zu sequenzierenden Einzelstrang angelagert. Um den Kettenabbruch bei der Synthese zu erzielen, werden dem Reaktionsansatz außer den vier Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) geringe Mengen der 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugefügt, die jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die ddNTPs werden zwar von der Polymerase als Substrate verwendet, ermöglichen aber aufgrund des Fehlens einer Hydroxylgruppe am 3'-Ende keine Kettenverlängerung. Somit wird die DNA-Synthese nach dem Einbau eines ddNTPs an einer beliebigen Stelle gestoppt, und es entsteht eine Mischung partiell doppelsträngiger DNA-Moleküle, die alle das gleiche 5'-Ende besitzen, aber am 3'-Ende in der Länge variieren und basenspezifisch terminiert sind.

Sequenzieransatz: 0,4 µg Plasmid-DNA oder
0,1 µg PCR-Produkt
5 – 10 pmol Primer
2 µl Sequenzier-Mix
ddH₂O ad 10 µl

Die *Taq Cycle*-DNA-Sequenzierung gliedert sich in folgende Schritte:

- Denaturierung: 10 sec bei 96 °C
- *Primer*-Hybridisierung: 5 sec bei der Temperatur entsprechend der *Primer*-Zusammensetzung (4 + 2-Regel – 5 °C)
- DNA-Synthese mit gleichzeitiger Markierung und Termination: 4 min bei 60 °C

Im Anschluss an die Markierungsreaktion werden die Reaktionsansätze gefällt, in Probenpuffer aufgenommen und für 2 min bei 90 °C Hitze denaturiert. Danach erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzieransätze im Polyacrylamidgel. Das emittierte Fluoreszenzlicht der eingebauten Didesoxynukleotide ermöglicht die Detektion der verschieden langen DNA-Moleküle mittels eines Laserscanners, der in das Sequenziergerät integriert ist.

5.16. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion können definierte DNA-Abschnitte mit spezifischen Oligonukleotiden (Primern) unter Verwendung der thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* amplifiziert werden. Die Primer werden so gewählt, dass sie antiparallel zueinander an den beiden Stränge der DNA hybridisieren und der gewünschte DNA-Abschnitt vervielfältigt werden kann. Die *in-vitro*-Vervielfältigung der DNA-Abschnitte wird im *Thermocycler* durchgeführt und beinhaltet die Denaturierung der DNA, das Anlagern der Primer (Annealing) und die Polymerase-Reaktion.

Reaktionsablauf im *Thermocycler*:

1. Denaturierung 300 – 600 sec bei 94 °C
2. Hybridisierung 60 sec bei der Annealing-Temperatur
3. Polymerase-Reaktion 90 sec bei 72 °C
4. Denaturierung 60 sec bei 94 °C
5. Hybridisierung 60 sec bei der Annealing-Temperatur
6. Polymerase-Reaktion 600 sec bei 72 °C (abschließende Auffüllreaktion)

Die Hybridisierungstemperatur der Primer richtet sich nach dem A/T- und G/C-Gehalt der Oligonukleotide. Sie wird 4 °C unterhalb der nach der 2 + 4-Regel (2 °C pro AT-bp, 4 °C pro GC-bp) berechneten Schmelztemperatur gewählt. So kann eine Anlagerung an unspezifische DNA-Abschnitte verhindert werden und es erfolgt keine Amplifikation unspezifischer DNA-Fragmente. Die Dauer der Polymerase-Reaktion richtet sich nach der Länge des DNA-Fragmentes, das amplifiziert werden soll. Innerhalb einer Minute erfolgt ein Einbau von ca. 1000 Nukleotiden. Die Schritte 2 - 5 werden 36 x durchlaufen.

Die PCR-Produkte werden vor ihrer weiteren Verwendung als Klonierungsfragment oder Hybridisierungssonde durch eine Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit von den Primern getrennt.

5.16.1. Gewinnung von Template DNA für die PCR aus Bakterienkolonien

Um *E. coli*- oder Neisserienkolonien nach einer Transformation zu analysieren, werden Kolonien einer 16 Stunden inkubierten Kultur auf Agar entweder einzeln (Einzelanalyse) oder bis zu vier gemeinsam (Gruppenanalyse) in 50 µl ddH₂O resuspendiert. Diese Suspensionen werden dann 7 min bei 110 °C im Heizblock erhitzt, anschließend kurz

bei 4.000 x g abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Aus dem Überstand wurden 3 µl als Template für einen 100 µl PCR-Ansatz verwendet.

5.16.2. PCR mit der *AmpliTaq*[®] DNA-Polymerase

10 x PCR-Puffer: 500 mM KCl

100 mM Tris-HCl, pH 8,3

25 mM MgCl₂

10 x Nukleotid-Mix: je 2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP

AmpliTaq[®] DNA-Polymerase (5 U/µl)

Primer (0,2 mM)

Jeder PCR-Ansatz wird nach folgendem Schema angesetzt:

10 – 20 ng Plasmid-DNA bzw. chromosomale DNA als Template

10 µl 10 x PCR-Puffer

6 µl MgCl₂ (Endkonzentration 1,5 mM)

10 µl dNTP (dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einer Endkonzentration von je 20 µM)

1 µl Primer A (Endkonzentration 2 µM)

1 µl Primer B (Endkonzentration 2 µM)

0,2 µl *Taq*-DNA-Polymerase

ddH₂O ad 100 µl

Der Reaktionsansatz wird zum Schutz vor Verdunstung mit Mineralöl überschichtet.

5.17. DNA-Hybridisierungen

Hybridisierungsreaktionen erfolgen aufgrund der Basenpaarungswchselwirkungen zwischen zwei einzelsträngigen Nukleinsäureketten, wenn sie komplementäre Nukleotidsequenzen aufweisen (DNA:DNA, RNA:RNA, DNA:RNA). Durch die hohe Sensitivität und Selektivität der Hybridisierung ist es möglich, mit DNA-Sonden komplementäre Sequenzen nachzuweisen, deren Konzentration nur ein Molekül pro Zelle beträgt. Zur Identifizierung spezifischer DNA-Fragmente wurden Methoden entwickelt, bei denen eine Hybridisierung erfolgt, nachdem die DNA aus den Zellen isoliert und aufgereinigt worden ist (Southernblot; Southern, 1975). Mittlerweile ist auch die Hybridisierung von DNA-Sequenzen in transformierten Kolonien mit markierten Nukleinsäure-

sonden eine gängige Methode (Kolonieblot; Grunstein und Hogness, 1975). Hierdurch ist schnell feststellbar, in welcher Kolonie die gesuchte Sequenz vorkommt.

5.17.1. Markierung spezifischer DNA-Sonden mit Digoxigenin

Die nicht-radioaktive Markierung aufgereinigter und linearisierter DNA wird mit dem DIG-DNA Labeling Kit-random primed durchgeführt.

- 10 x Hexanukleotidgemisch
- 10 x dNTP-Markierungsgemisch: 1 mM dATP
1 mM dCTP
1 mM dGTP
0,65 mM dTTP
0,35 mM Dig-11-dUTP
- Klenow-Enzym (2 U/ μ l)

Pro Standardreaktion können 10 ng bis 3 μ g lineare DNA markiert werden. Zunächst wird die DNA (15 μ l) durch 10minütiges Erhitzen auf 95 °C und schnelles Abkühlen im Eisbad denaturiert. Nach Zugabe von jeweils 2 μ l Hexanukleotid- sowie dNTP-Markierungsgemisch und 1 μ l Klenow-Enzym wird die Mischung über Nacht bei 37 °C inkubiert, so dass DIG-11-dUTP in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird. Zum Stoppen der Reaktion wird der Ansatz mit 2 μ l EDTA (0,2 M, pH 8,0) gemischt und anschließend die DNA durch Zugabe von 3 μ l 3 M Na-Acetat und 75 μ l eiskaltem 100%igem Ethanol 30 min bei -70 °C präzipitiert. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 4 °C (15.000 x g, Biofuge 15R) wird das Sediment mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 50 μ l TE aufgenommen. Die DIG-markierte DNA wird bei -20 °C gelagert und kann bis zu sechsmal verwendet werden.

Die Ausbeute der Markierungsreaktion wird mittels Dot Blot und DIG-Luminescent Detection Kit im Vergleich zu einer mitgelieferten DIG-markierten Kontroll-DNA ermittelt.

5.17.2. Southernblot (Southern, 1975)

Die durch Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA wird elektrophoretisch in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Durch 20minütige Inkubation in 0,25 M HCl wird die DNA depurinert und anschließend durch 20minütige Inkubation in 0,4 M NaOH denaturiert. Der Kapillar-Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran erfolgt mit 0,4 M NaOH innerhalb von 2,5 h bei RT. Danach

wird die Membran zweimal 10 min in 2 x SSC gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die DNA wird durch UV-Vernetzung (100 mJ) auf die Membran fixiert.

5.17.3. Kolonieblot (Grunstein und Hogness, 1975)

Lösung 1: 0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

Lösung 2: 1,5 M NaCl

0,5 M Tris-HCl, pH 8,0

Lösung 3: 5 x SSC

0,5 % SDS

1 mM EDTA

Auf Übernachtskulturen von transformierten Bakterienzellen werden amphotere Nylonmembranen gelegt, um Replika der Kolonien abzuziehen. Die Agarplatten werden anschließend bei Raumtemperatur oder 37 °C inkubiert, damit die Kolonien nachwachsen können. Eine weitere Variante des Kolonie Blottes ist das Dot Blot-Verfahren: 2 x 10 μ l einer Suspension aus abgetöteten Bakterien ($OD_{600nm} = 10$) werden auf die Nylonmembran getropft. Nachdem jeweils die Membran getrocknet ist, erfolgt die Lyse der Bakterien durch Auflegen der Membran für 3 min auf ein mit 10 % SDS getränktes, dickes Filterpapier. Die freigesetzte DNA wird mit Lösung 1 für 5 min denaturiert und anschließend mit Lösung 2 für 5 min neutralisiert. Nach einem Waschschrift mit 2 x SSPE (wie die vorhergehenden Schritte auf Filterpapier) wird die Membran bei RT getrocknet. Die DNA wird durch UV-Vernetzung (100 mJ) auf die Membran fixiert. Um die restlichen Zellbestandteile zu entfernen und unspezifischen Reaktionen entgegenzuwirken, wird die Membran in Lösung 3 für 20 min bei 57 °C schüttelnd inkubiert und anschließend mit Papiertüchern gut abgewischt. Nach dem Trocknen der Membran erfolgt eine weitere UV-Vernetzung der DNA und es schließt sich die Hybridisierung an.

5.17.4. DNA-DNA-Hybridisierung

high SDS-Hybridisierungspuffer: 50 % Formamid, deionisiert

7 % SDS

2 % Blockierungsreagenz

0,1 % N-Lauroylsarkosin

50 mM Na-Phosphat, pH 7,0

5 x SSC

Die auf Nylonmembranen durch UV-Vernetzung fixierte DNA wird für 30 – 60 min bei 42 °C in 10 ml Prähybridisierungslösung (*high* SDS-Puffer) im Hybridisierungssofen inkubiert, um freie Bindungsstellen der Membranen abzusättigen. Anschließend wird diese Lösung durch 10 ml *high* SDS-Puffer mit hitzedenaturierter DIG-markierter DNA-Sonde (ca. 100 nmol) ersetzt und die Membran damit über Nacht bei 42 °C inkubiert. Die Membran wird hinterher zweimal 5 min in 2 x SSC, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur und zweimal 15 min in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 68 °C gewaschen. Es schließt sich der immunologische Nachweis der hybridisierten Sonde an.

5.17.5. Immunologischer Digoxigenin-Nachweis mit CSPD®

Der Nachweis der Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden wird mit Hilfe des DIG Luminescent Detection Kit durchgeführt. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran erfolgt die Bindung eines hochaffinen Anti-Digoxigenin-Antikörpers an die markierte DNA, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Die enzymatische Dephosphorylierung des Chemilumineszenz-Substrates CSPD® durch die alkalische Phosphatase führt zu einer Lichtemission mit einem Maximum bei 477 nm, die durch 15 - 30minütiges Auflegen eines Röntgenfilmes detektiert wird. Da die maximale Lichtemission von CSPD® nach sechs Stunden erfolgt, verkürzt sich die Expositionszeit, wenn der Film nicht gleich nach Zugabe des Substrates aufgelegt wird. Das langlebige Chemilumineszenz-Signal bleibt mehrere Tage auf Nylon-Membranen erhalten und ermöglicht mehrfache Filmexpositionen.

Maleinsäurepuffer: 0,1 M Maleinsäure, pH 7,5

0,15 M NaCl

Waschpuffer: Maleinsäurepuffer mit 0,3 % Tween®20

Blockierungslösung: 1 % Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer

Nachweispuffer: 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5

0,1 M NaCl

Nach der Hybridisierung mit DIG-markierter Sonde und stringentem Waschen wird die Membran kurz im Waschpuffer und anschließend für 30 min in der Blockierungslösung schüttelnd inkubiert. Der Anti-DIG-AP-Antikörper wird 1:10.000 in der Blockierungslösung verdünnt und ebenfalls für 30 min inkubiert. Nach zwei 15minütigen Waschschritten wird die Membran kurz im Nachweispuffer äquilibriert und dann 5 min mit der

CSPD[®]-Lösung (CSPD[®]1:100 verdünnt im Nachweispuffer) inkubiert. Abschließend wird die Membran in Frischhaltefolie eingewickelt, 15 min bei 37 °C inkubiert und bei Raumtemperatur auf einen Film gelegt.

5.18. Westernblot

5.18.1. Präparation der Gesamtzellproteine von *Neisseria meningitidis*

Zur Gewinnung der Antigene werden Bakterien aus einer 16 Stunden inkubierten Kultur auf Agar in 1 ml PBS resuspendiert. Um vergleichbare Mengen an Protein zu erhalten, wird die OD_{600nm} bestimmt und die Ansätze auf eine OD_{600nm} von 1,0 in PBS eingestellt. Nach 2 min Zentrifugieren bei 16.000 x g werden die ÜS abgenommen und die Neisserien in 100 µl PBS und 25 µl 5 x Lämmli-Puffer resuspendiert. Dann werden die Suspensionen 10 min bei 100 °C im Heizblock erhitzt und auf Eis gestellt.

Lämmli-Puffer: 62,5 mM Tris-HCl

2 % SDS

10 % Glycerin

5 % 2-Mercaptoethanol

0,001 % Bromphenolblau

5.18.2. Herstellen von SDS-Polyacrylamidgelen

Für die Auftrennung von Proteinen werden in der Regel 10%ige und 12,5%ige diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Solche Gele bestehen aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Zuerst wird das Trenngel in den ca. 1,5 mm breiten Spalt zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wird oben das Sammelgel aufgegossen und der Gelkamm in das noch nicht polymerisierte Gel gesteckt. Nach dem Polymerisieren des Sammelgels wird der Gelkamm entfernt.

Acrylamid-Stammlösung: 38 % (w/v) Acrylamid

2 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

Ammoniumperoxidsulfatlösung (APS): 16 mg/ml Ammoniumperoxidsulfat in H₂O

4%iges Sammelgel (10 ml): 6,1 ml H₂O

2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH, 6,8

0,1 ml 10 % SDS

1,3 ml 30 % Acrylamid/Bis

50,0 µl 10 % APS

10,0 µl TEMED

12,5%iges Trenngel (60 ml): 19,08 ml H₂O

15 ml Tris-HCl, pH 8,8

0,6 ml 10%iges SDS

25,02 ml 30%iges Acrylamid/Bis

0,3 ml 10%iges APS

30,0 µl TEMED

5.18.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Lämmli, 1970)

Zum Auftrennen von Proteinen verwendet man eine vertikale Gelapparatur. Die Proteinproben werden in 4%igen Sammel- und 12,5%igen Trenngelen aufgetrennt.

Die in Lämmli-Puffer hitzedenaturierten Proteinproben wurden 90 – 120 min bei 150 mA aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker wurde BenchMark™ Prestained Protein Ladder verwendet.

5.18.4. Immunoblot (Westernblot; Towbin *et al.*, 1979)

Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Semi-Dry-Blotting)

Die Graphitplatten der Blot-Kammer werden mit ddH₂O gespült. Danach geht man wie folgt vor: zunächst tränkt man 6 Lagen Whatman-Papier in Anodenpuffer I und legt sie auf die Anodenplatte der Blot-Kammer. Hierauf werden 3 weitere Lagen Whatman-Papier, die mit Anodenpuffer II getränkt sind, gelegt. Eine entsprechend große Nitrozellulosemembran wird mit ddH₂O befeuchtet und auf die Filterpapierlagen aufgezogen. Dann wird das SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran aufgebracht. Schließlich bedeckt man das Gel mit 9 Lagen in Kathodenpuffer getränkten Whatman-Filterpapiers. Nun setzt man das Oberteil der Blot-Kammer mit der Kathodenplatte auf und schließt die Apparatur an das Netzgerät an. Der Proteintransfer wird mit 0,9 mA/cm² 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt.

Anodenpuffer I: 300 mM Tris, pH=8,0

20 % Methanol

Anodenpuffer II: 25,0 mM Tris, pH=8,0

20 % Methanol

Kathodenpuffer: 25,0 mM Tris, pH=8,0

40,0 mM ϵ -Amino-n-Caprinsäure

20 % Methanol

Entwicklung des Immunoblots mit Antikörpern (Ak.)

Erste Antikörper: Opa-Ak. 4B17/C11 1:1.000

Opc-Ak. B306 1:1.000

Pili-Ak. SM-1 1:100

in 1 x PBS mit 0,1 % Tween und 1 % Magermilch

Zweiter Antikörper: Alkalische-Phosphatase-markierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper

1:100 in 1 x PBS und 0,1 % Tween

Nach Entnahme der Nitrozellulosemembran werden noch freie Bindungsstellen auf der Membran durch einstündiges Schütteln in PBS/BSA (2%ige)-Lösung abgesättigt. Anschließend wird die Membran in PBS/BSA mit dem entsprechenden ersten Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem, je 5minütigem Waschen der Membran mit PBS/BSA (2 %) inkubiert man die Membran 1 h in PBS/BSA (2 %) mit dem Alkalische-Phosphatase-gekoppelten sekundären Antikörper. Die Nitrozellulosemembran wird nachfolgend 3 x 5 min mit PBS/BSA (2 %) gewaschen und dann 20 min in der Entwicklerlösung entwickelt. Die Färbereaktion wird durch Waschen mit ddH₂O unterbrochen.

1 x PBS: 150 mM NaCl

16,0 mM Na₂HPO₄

4,0 mM NaH₂PO₄

pH 7,3

PBS/BSA: 1 x PBS

2,0 % BSA (Fraktion V)

Entwicklerlösung: 9 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 9,6

20 µl 2 M MgCl₂

1 ml NBT (1 mg NBT in 1 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 9,6)

100 µl BCIP (5 mg BCIP in 1 ml 0,1M Tris-HCl, pH 9,6)

5.18.5. Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blue (Fazekas de St. Groth *et al.*, 1963)

Nach Beendigung der Elektrophorese und des Blots auf Nitrozellulose werden die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine 30 min in Coomassie-Blue fixiert und angefärbt und anschließend das Gel 2 – 10 h in 10%iger Essigsäure entfärbt.

Coomassie-Blue-Färbelösung: 2,0 g Coomassie brilliant blue R 250

0,5 g Coomassie brilliant blue G 250

425 ml EtOH abs.

50 ml Methanol

100 ml konz. Essigsäure

425 ml H₂O

5.19. Kapselpolysaccharid-ELISA

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte werden je 50 µl Poly-D-Lysin pipettiert. Nach 30 min bei Raumtemperatur werden die Vertiefungen 3 x mit je 200 µl PBS gewaschen. Zur Antigenanlagerung werden Neisserien einer 16 Stunden inkubierten Kultur auf GC-Agar in 1 x PBS resuspendiert, die Suspension auf eine OD_{600nm} von 0,15 eingestellt (entspricht 2 x 10⁸ Bakterien/ml) und die Bakterien 10 min bei 110 °C im Heizblock abgetötet. Je 20 µl der Bakteriensuspension werden in 1 Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Dann wird wiederum 3 x mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend werden die Antigene bei 37 °C mit 150 µl 1 % BSA/PBS geblockt. Nach 30 min wird 3 x mit 1 x PBS gewaschen. Dann werden 20 µl des ersten Antikörpers mAb 735 (1:4.000 in 1 % BSA/PBS) zugegeben. Nach 1 h bei 37 °C wird 3 x mit 1 x PBS gewaschen und 20 µl des Peroxidase-markierten Ziege-Anti-Maus-Antikörper (1:2.500 in 1 % BSA/PBS) dazu pipettiert. Nach 45 min bei 37 °C wird 3 x mit 1 x PBS gewaschen und das Substrat ABTS (1 mg/ml) zugegeben. Die photometrische Messung erfolgt bei 414 nm 10 und 20 min nach Substratzugabe. Bei jedem Schritt wird die Mikrotiterplatte zum Schutz vor Verdunstung abgedeckt. Als Negativkontrolle wird pro

getestetem Neisserienstamm die Zugabe des ersten Antikörpers, des zweiten und von beiden ausgelassen.

5.20. Sequenzanalysen

Die ermittelten DNA-Sequenzen wurden mit den Sequenzen auf dem BLAST-Server des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI; Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) und der Neisseriendatenbank am „The Institute for Genomic Research“ (TIGR; Rockville, USA, <http://www.tigr.org>) verglichen. *N. meningitidis*-spezifische Oligonucleotide wurden anhand der Genomsequenz des Serogruppe B Stammes MC58 (Tettelin *et al.*, 2000) erstellt, die ebenfalls bei <http://www.tigr.org> abgerufen wurde.

5.21. Assays zur Analyse der Interaktion von Neisserien mit humanen Zellen

5.21.1. Adhäsionsassays an Hep-2 Epithelzellen

Zwei Tage vor dem Assay werden 10^5 Hep-2 Zellen pro Vertiefung in einer 24-Loch Platte ausgesät und in RPMI 1640 Medium bei 37 °C inkubiert. Die Infektion mit *N. meningitidis* erfolgt mit einer MOI (Multiplicity of Infection) von 10 in RPMI 1640 Medium mit oder ohne 10 % FCS. Nach 2 h oder 6 h Inkubationszeit werden die Überstände aus den Vertiefungen in PBS verdünnt und auf GC-Agar ausplattiert. Nach Abnahme der Überstände werden die Hep-2 Zellen mit den daran haftenden Neisserien 3 x mit PBS gewaschen, dann 5 min bei Raumtemperatur mit 1 % Saponin inkubiert, um die Hep-2 Zellen zu lysieren und Verdünnungsreihen auf GC-Agar ausplattiert. Die Agarplatten werden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre inkubiert. Am nächsten Tag wird die Koloniezahl auf den Platten ausgezählt und so die Zahl der adhärenen Neisserien und der Neisserien im Überstand bestimmt. Die Experimente wurden zumindest zweimal durchgeführt.

5.21.2. Adhäsionsassays an HBMEC-Zellen

Drei Tage vor dem Versuch werden 10^5 HBMEC-Zellen in ein mit 0,2 % Gelatine bedeckte Vertiefung einer 24-Loch Platte ausgesät. Die Zellen werden dann bei 37 °C in HBMEC-Medium inkubiert, bis sie konfluent gewachsen sind. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium, RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS oder RPMI 1640 Medium mit

10 % NHS mit einer MOI von 100 für 7 – 9 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, die Überstände nach 7 – 9 h abgenommen, in PBS verdünnt und die Verdünnungsreihen auf GC-Agar ausplattiert. Die HBMEC-Zellen mit den adhärenen Neisserien werden dann dreimal mit RPMI-Medium gewaschen, für 5 min mit 1 % Saponin lysiert, in PBS verdünnt und die Verdünnungsreihen auf GC-Agar ausplattiert. Anschließend werden die Agarplatten über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre inkubiert. Am nächsten Tag wird die Koloniezahl auf den Platten ausgezählt und so die Zahl der adhärenen Neisserien und der Neisserien im Überstand bestimmt. Die Experimente wurden zumindest zweimal durchgeführt.

5.21.3. Adhäsions- und Phagozytose-Assays an Dendritischen Zellen

Die Dendritischen Zellen werden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml und Vertiefung in 24-Loch Platten ausgesät. Die Infektion erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 1 % autologem Plasma mit einer MOI von 1. Die Kulturen werden bei 37 °C für unterschiedliche Dauer inkubiert, bevor die Zahl der adhärenen und invasiven Neisserien bestimmt wird. Die Anzahl der nicht-adhärenen Neisserien wird durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen aus den Überständen der Dendritischen Zellen auf GC Agar und über Nacht Bebrütung bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre festgestellt. Um die Zahl der invasiven Bakterien zu erhalten, werden die Dendritischen Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 1 h in RPMI-Medium mit 100 µg/ml Gentamicin und 2 % autologem Humanplasma inkubiert. Die Dendritischen Zellen werden dann dreimal mit PBS gewaschen, gefolgt von 1 % Saponin in PBS, um die Zellen zu lysieren. CFU werden durch Ausplattieren von geeigneten Verdünnungsstufen der Lysate auf GC-Agar ermittelt. Um die adhärenen Bakterien (adhärent und invasiv) zu bestimmen, wird der Assay wie oben durchgeführt, aber ohne Zugabe von Gentamicin. Alle Proben wurden dreifach getestet und die Experimente zumindest zweimal durchgeführt.

6. Literaturverzeichnis

- Achtman M. Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*. *Trends Microbiol.* 1995b May;3(5):186-92. Review.
- Achtman M. Global epidemiology of meningococcal disease. In: Cartwright K (ed). *Meningococcal disease*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England. 1995a;159-175.
- Achtman M, Neibert M, Crowe BA, Strittmatter W, Kusecek B, Weyse E, Walsh MJ, Slawig B, Morelli G, Moll A, et al. Purification and characterization of eight class 5 outer membrane protein variants from a clone of *Neisseria meningitidis* serogroup A. *J Exp Med.* 1988 Aug 1;168(2):507-25.
- Ada G. Vaccines and vaccination. *N Engl J Med.* 2001 Oct 4;345(14):1042-53. Review.
- Aho EL, Murphy GL, Cannon JG. Distribution of specific DNA sequences among pathogenic and commensal *Neisseria* species. *Infect Immun.* 1987 Apr;55(4):1009-13.
- Ait-Tahar K, Wooldridge KG, Turner DP, Atta M, Todd I, Ala'Aldeen DA. Auto-transporter A protein of *Neisseria meningitidis*: a potent CD4+ T-cell and B-cell stimulating antigen detected by expression cloning. *Mol Microbiol.* 2000 Sep;37(5):1094-105.
- Ala'Aldeen DA, Neal KR, Ait-Tahar K, Nguyen-Van-Tam JS, English A, Falla TJ, Hawkey PM, Slack RC. Dynamics of meningococcal long-term carriage among university students and their implications for mass vaccination. *J Clin Microbiol.* 2000 Jun;38(6):2311-6.
- Artenstein MS, Brandt BL. Immunologic hyporesponsiveness in man to group C meningococcal polysaccharide. *J Immunol.* 1975 Jul;115(1):5-7.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998 Mar 19;392(6673):245-52. Review.
- Bartoloni A, Norelli F, Ceccarini C, Rappuoli R, Costantino P. Immunogenicity of meningococcal B polysaccharide conjugated to tetanus toxoid or CRM197 via adipic acid dihydrazide. *Vaccine.* 1995 Apr;13(5):463-70.
- Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science.* 1999;284:1520-1523.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513-23.
- Biswas GD, Burnstein KL, Sparling PF. Linearization of donor DNA during plasmid transformation in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* 1986 Nov;168(2):756-61.

- Bjerknes R, Guttormsen HK, Solberg CO, Wetzler LM. Neisserial porins inhibit human neutrophil actin polymerization, degranulation, opsonin receptor expression, and phagocytosis but prime the neutrophils to increase their oxidative burst. *Infect Immun*. 1995 Jan;63(1):160-7.
- Bjune G, Hoiby EA, Gronnesby JK, Arnesen O, Fredriksen JH, Halstensen A, Holten E, Lindbak AK, Nokleby H, Rosenqvist E, et al. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet*. 1991 Nov 2;338(8775):1093-6.
- Blake MS, Blake CM, Apicella MA, Mandrell RE. Gonococcal opacity: lectin-like interactions between Opa proteins and lipooligosaccharide. *Infect Immun*. 1995 Apr;63(4):1434-9.
- Blake MS, MacDonald CM, Klugman KP. Colony morphology of piliated *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med*. 1989 Nov 1;170(5):1727-36.
- Calmette A, Guerin C, Negre L, Bocquet A. Sur la vaccination préventive des enfants nouveau-nés contre la tuberculose par le BCG. *Ann Inst Pasteur*. 1927;3:201.
- Cartwright K, Noah N, Peltola H. Meningococcal disease in Europe: epidemiology, mortality, and prevention with conjugate vaccines. Report of a European advisory board meeting Vienna, Austria, 6-8 October, 2000. *Vaccine*. 2001 Aug 14;19(31):4347-56.
- Cartwright KA, Stuart JM, Jones DM, Noah ND. The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect*. 1987 Dec;99(3):591-601.
- Caugant DA, Hoiby EA, Magnus P, Scheel O, Hoel T, Bjune G, Wedege E, Eng J, Froholm LO. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J Clin Microbiol*. 1994 Feb;32(2):323-30.
- Claassen I, Meylis J, van der Ley P, Peeters C, Brons H, Robert J, Borsboom D, van der Ark A, van Straaten I, Roholl P, Kuipers B, Poolman J. Production, characterization and control of a *Neisseria meningitidis* hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. *Vaccine*. 1996 Jul;14(10):1001-8.
- Coen PG, Cartwright K, Stuart J. Mathematical modelling of infection and disease due to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*. *Int J Epidemiol*. 2000 Feb;29(1):180-8.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaiia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393:537-544.

- Connell TD, Black WJ, Kawula TH, Barritt DS, Dempsey JA, Kverneland K Jr, Stephenson A, Schepart BS, Murphy GL, Cannon JG. Recombination among protein II genes of *Neisseria gonorrhoeae* generates new coding sequences and increases structural variability in the protein II family. *Mol Microbiol.* 1988 Mar;2(2):227-36.
- Cornelissen CN, Sparling PF. Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol Microbiol.* 1994 Dec;14(5):843-50. Review.
- Cosloy SD, Oishi M. Genetic transformation in *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973 Jan;70(1):84-7.
- Dagert M, Ehrlich SD. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene.* 1979 May;6(1):23-8.
- Danve B, Bruge J, Bouveret-Le Cam N, et al. Safety and immunogenicity of an N-propionylated group B meningococcal polysaccharide conjugate vaccine in adult volunteers. In: Zollinger WD, Frasch CE, Deal CD (eds). *Proceedings of the 10th International Pathogenic Neisseria Conference*, Baltimore, MD. 1996;225.
- Danve B, Lissolo L, Guinet F, et al. Safety and immunogenicity of a *Neisseria meningitidis* group B transferrin binding protein vaccine in adults. *Proceedings of the 11th International Pathogenic Neisseria Conference*, EDK, Paris. 1998;53.
- Darouiche R, Perkins B, Musher D, Hamill R, Tsai S. Levels of rifampin and ciprofloxacin in nasal secretions: correlation with MIC90 and eradication of nasopharyngeal carriage of bacteria. *J Infect Dis.* 1990 Nov;162(5):1124-7.
- Davidson RN, Wall RA. Prevention and management of infections in patients without a spleen. *Clin Microbiol Infect.* 2001 Dec;7(12):657-60.
- de Moraes JC, Perkins BA, Camargo MC, Hidalgo NT, Barbosa HA, Sacchi CT, Landgraf IM, Gattas VL, Vasconcelos Hde G, Gral IM, et al. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet.* 1992 Oct 31;340(8827):1074-8.
- de Vries FP, Cole R, Dankert J, Frosch M, van Putten JP. *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Mol Microbiol.* 1998 Mar;27(6):1203-12.
- de Vries FP, van Der Ende A, van Putten JP, Dankert J. Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. *Infect Immun.* 1996 Aug;64(8):2998-3006.
- Deghmane AE, Petit S, Topilko A, Pereira Y, Giorgini D, Larribe M, Taha MK. Intimate adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells is under the control of the *crgA* gene, a novel LysR-type transcriptional regulator. *EMBO J.* 2000 Mar 1;19(5):1068-78.
- DeVoe IW. The meningococcus and mechanisms of pathogenicity. *Microbiol Rev.* 1982 Jun;46(2):162-90. Review.

- Dietrich G, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Lang AB, Viret JF. Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine*. 2003a Jan 30;21(7-8):678-83. Review.
- Dietrich G, Spreng S, Favre D, Viret JF, Guzman CA. Live attenuated bacteria as vectors to deliver plasmid DNA vaccines. *Curr Opin Mol Ther*. 2003b Feb;5(1):10-9. Review.
- Edwards U, Muller A, Hammerschmidt S, Gerardy-Schahn R, Frosch M. Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the alpha-2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Mol Microbiol*. 1994 Oct;14(1):141-9.
- Elkins C, Thomas CE, Seifert HS, Sparling PF. Species-specific uptake of DNA by gonococci is mediated by a 10-base-pair sequence. *J Bacteriol*. 1991 Jun;173(12):3911-3.
- Epidemiologisches Bulletin. Robert Koch Institut. 2000 Sep;35:279-83.
- Erwin AL, Haynes PA, Rice PA, Gotschlich EC. Conservation of the lipooligosaccharide synthesis locus *lgt* among strains of *Neisseria gonorrhoeae*: requirement for *lgtE* in synthesis of the 2C7 epitope and of the beta chain of strain 15253. *J Exp Med*. 1996 Oct 1;184(4):1233-41.
- Estabrook MM, Griffiss JM, Jarvis GA. Sialylation of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-N-neotetraose. *Infect Immun*. 1997 Nov;65(11):4436-44.
- Estabrook MM, Zhou D, Apicella MA. Nonopsonic phagocytosis of group C *Neisseria meningitidis* by human neutrophils. *Infect Immun*. 1998 Mar;66(3):1028-36.
- Facijs D, Meyer TF. A novel determinant (*comA*) essential for natural transformation competence in *Neisseria gonorrhoeae* and the effect of a *comA* defect on pilin variation. *Mol Microbiol*. 1993 Nov;10(4):699-712.
- Fairley CK, Begg N, Borrow R, Fox AJ, Jones DM, Cartwright K. Conjugate meningococcal serogroup A and C vaccine: reactogenicity and immunogenicity in United Kingdom infants. *J Infect Dis*. 1996 Dec;174(6):1360-3.
- Favre D, Struck MM, Cryz SJ Jr, Viret JF. Further molecular characterization and stability of the live oral attenuated cholera vaccine strain CVD103-HgR. *Vaccine*. 1996 Apr;14(6):526-31.
- Fazekas de St Groth S, Webster RG, Datyner A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochem Biophys Acta*. 1963;71:377-391
- Figuroa JE, Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev*. 1991 Jul;4(3):359-95. Review.
- Filice GA, Hayes PS, Counts GW, Griffiss JM, Fraser DW. Risk of group A meningococcal disease: bacterial interference and cross-reactive bacteria among mucosal flora. *J Clin Microbiol*. 1985 Aug;22(2):152-6.

- Finne J, Bitter-Suermann D, Goridis C, Finne U. An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J Immunol.* 1987 Jun 15;138(12):4402-7.
- Finne J, Leinonen M, Makela PH. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet.* 1983 Aug 13;2(8346):355-7.
- Frasch CE, Zollinger WD, Poolman JT. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis.* 1985 Jul-Aug;7(4):504-10. Review.
- Frosch M, Gorgen I, Boulnois GJ, Timmis KN, Bitter-Suermann D. NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of *Escherichia coli* K1 and group B meningococci. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Feb;82(4):1194-8.
- Frosch M, Meyer TF. Transformation-mediated exchange of virulence determinants by co-cultivation of pathogenic *Neisseriae*. *FEMS Microbiol Lett.* 1992 Dec 15;79(1-3):345-9.
- Frosch M, Weisgerber C, Meyer TF. Molecular characterization and expression in *Escherichia coli* of the gene complex encoding the polysaccharide capsule of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Mar;86(5):1669-73.
- Frosch M. Meningokokken-Impfstoffe, aktueller Stand und zukünftige Entwicklungen. *Dt Ärztebl.* 1999;96:3306-08.
- Fusco PC, Michon F, Tai JY, Blake MS. Preclinical evaluation of a novel group B meningococcal conjugate vaccine that elicits bactericidal activity in both mice and non-human primates. *J Infect Dis.* 1997 Feb;175(2):364-72.
- Fussenegger M, Facius D, Meier J, Meyer TF. A novel peptidoglycan-linked lipoprotein (ComL) that functions in natural transformation competence of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol.* 1996a Mar;19(5):1095-105.
- Fussenegger M, Kahrs AF, Facius D, Meyer TF. Tetrapac (tpc), a novel genotype of *Neisseria gonorrhoeae* affecting epithelial cell invasion, natural transformation competence and cell separation. *Mol Microbiol.* 1996b Mar;19(6):1357-72.
- Fussenegger M, Rudel T, Barten R, Ryll R, Meyer TF. Transformation competence and type-4 pilus biogenesis in *Neisseria gonorrhoeae*--a review. *Gene.* 1997 Jun 11;192(1):125-34. Review.
- Galen JE, Gomez-Duarte OG, Losonsky GA, Halpern JL, Lauderbaugh CS, Kaintuck S, Reymann MK, Levine MM. A murine model of intranasal immunization to assess the immunogenicity of attenuated *Salmonella typhi* live vector vaccines in stimulating serum antibody responses to expressed foreign antigens. *Vaccine.* 1997 Apr-May;15(6-7):700-8.

- Georgiou G, Stathopoulos C, Daugherty PS, Nayak AR, Iverson BL, Curtiss R 3rd. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat Biotechnol.* 1997 Jan;15(1):29-34. Review.
- Germanier R, Fuer E. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J Infect Dis.* 1975 May;131(5):553-8.
- Gibbs CP, Reimann BY, Schultz E, Kaufmann A, Haas R, Meyer TF. Reassortment of pilin genes in *Neisseria gonorrhoeae* occurs by two distinct mechanisms. *Nature.* 1989 Apr 20;338(6217):651-2.
- Giuliani MM, Pizza M, Santini L, et al. Immunogenicity and bactericidal activity of conserved *N. meningitidis* serogroup B antigens. In: Rice P, Sparling F, Shafer W (eds). *Proceedings of the 12th International Pathogenic Neisseria Conference*, Health Care Communications Inc, Galveston. 2000;22
- Glück U, Gebbers JO, Glück R. Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without *Escherichia coli* heat-labile toxin in adult volunteers. *J Virol.* 1999;73(9):7780-7786.
- Gold R, Goldschneider I, Lepow ML, Draper TF, Randolph M. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. *J Infect Dis.* 1978 Feb;137(2):112-21.
- Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med.* 1969 Jun 1;129(6):1307-26.
- Goodman SD, Scocca JJ. Identification and arrangement of the DNA sequence recognized in specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Sep;85(18):6982-6.
- Gorringe AR, Bracegirdle P, Oliver K, Reddin K, Cartwright K, Feavers I, et al. *Neisseria lactamica* as a vaccine against meningococcal disease. In: *Abstracts of the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. San Francisco: American Society for Microbiology. 1999:362.
- Granoff DM, Bartoloni A, Ricci S, Gallo E, Rosa D, Ravenscroft N, Guarnieri V, Seid RC, Shan A, Usinger WR, Tan S, McHugh YE, Moe GR. Bactericidal monoclonal antibodies that define unique meningococcal B polysaccharide epitopes that do not cross-react with human polysialic acid. *J Immunol.* 1998 May 15;160(10):5028-36.
- Griffiss JM, Schneider H, Mandrell RE, Yamasaki R, Jarvis GA, Kim JJ, Gibson BW, Hamadeh R, Apicella MA. Lipooligosaccharides: the principal glycolipids of the neisserial outer membrane. *Rev Infect Dis.* 1988 Jul-Aug;10 Suppl 2:S287-95. Review.
- Griffiss JM. Serum IgA: modulation of complement activation and induction of susceptibility to bacterial dissemination. *Infection.* 1982;10(4):246-51.

- Grunstein M, Hogness DS. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Oct;72(10):3961-5.
- Gunn JS, Stein DC. Use of a non-selective transformation technique to construct a multiply restriction/modification-deficient mutant of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Gen Genet*. 1996 Jul 19;251(5):509-17.
- Haas R, Meyer TF. The repertoire of silent pilus genes in *Neisseria gonorrhoeae*: evidence for gene conversion. *Cell*. 1986 Jan 17;44(1):107-15.
- Haas R, Schwarz H, Meyer TF. Release of soluble pilin antigen coupled with gene conversion in *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Dec;84(24):9079-83.
- Hagblom P, Segal E, Billyard E, So M. Intragenic recombination leads to pilus antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature*. 1985 May 9-15;315(6015):156-8.
- Halter R, Pohlner J, Meyer TF. Mosaic-like organization of IgA protease genes in *Neisseria gonorrhoeae* generated by horizontal genetic exchange in vivo. *EMBO J*. 1989 Sep;8(9):2737-44.
- Hammerschmidt S, Birkholz C, Zahringer U, Robertson BD, van Putten J, Ebeling O, Frosch M. Contribution of genes from the capsule gene complex (cps) to lipooligosaccharide biosynthesis and serum resistance in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*. 1994 Mar;11(5):885-96.
- Hammerschmidt S, Hilse R, van Putten JP, Gerardy-Schahn R, Unkmeir A, Frosch M. Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO J*. 1996a Jan 2;15(1):192-8.
- Hammerschmidt S, Muller A, Sillmann H, Muhlenhoff M, Borrow R, Fox A, van Putten J, Zollinger WD, Gerardy-Schahn R, Frosch M. 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*. 1996b Jun;20(6):1211-20.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983 Jun 5;166(4):557-80.
- Heckels JE, Blackett B, Everson JS, Ward ME. The influence of surface charge on the attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to human cells. *J Gen Microbiol*. 1976 Oct;96(2):359-64.
- Hill SA. Opa expression correlates with elevated transformation rates in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*. 2000 Jan;182(1):171-8.
- Holten E. Serotypes of *Neisseria meningitidis* isolated from patients in Norway during the first six months of 1978. *J Clin Microbiol*. 1979 Feb;9(2):186-8.

- Hone DM, Tacket CO, Harris AM, Kay B, Losonsky G, Levine MM. Evaluation in volunteers of a candidate live oral attenuated *Salmonella typhi* vector vaccine. *J Clin Invest.* 1992 Aug;90(2):412-20.
- Hopper S, Vasquez B, Merz A, Clary S, Wilbur JS, So M. Effects of the immunoglobulin A1 protease on *Neisseria gonorrhoeae* trafficking across polarized T84 epithelial monolayers. *Infect Immun.* 2000 Feb;68(2):906-11.
- Hormaeche C, Khan C. Recombinant bacteria as vaccine carriers of heterologous antigens. In: Kaufmann, SH (ed). *Concept in Vaccine Development*. Walter de Gruyter, Berlin and New York. 1996:327-349.
- Imaoka K, Miller CJ, Kubota M, McChesney MB, Lohman B, Yamamoto M, Fujihashi K, Someya K, Honda M, McGhee JR, Kiyono H. Nasal immunization of nonhuman primates with simian immunodeficiency virus p55gag and cholera toxin adjuvant induces Th1/Th2 help for virus-specific immune responses in reproductive tissues. *J Immunol.* 1998 Dec 1;161(11):5952-8.
- Ison CA, Anwar N, Cole MJ, Galassini R, Heyderman RS, Klein NJ, West J, Pollard AJ, Morley S, Levin and the Meningococcal R. Assessment of immune response to meningococcal disease: comparison of a whole-blood assay and the serum bactericidal assay. *Microb Pathog.* 1999 Oct;27(4):207-14.
- Ivler D, Leedom JM, Mathies AW Jr, Fremont JC, Thrupp LD, Portnoy B, Wehrle PF. Correlates of sulfadiazine resistance in meningococci isolated from civilians. *Antimicrobial Agents Chemother.* 1965;5:358-65.
- Jarvis GA, Griffiss JM. Human IgA1 blockade of IgG-initiated lysis of *Neisseria meningitidis* is a function of antigen-binding fragment binding to the polysaccharide capsule. *J Immunol.* 1991 Sep 15;147(6):1962-7.
- Jarvis GA. Recognition and control of neisserial infection by antibody and complement. *Trends Microbiol.* 1995 May;3(5):198-201. Review.
- Jennings HJ, Lugowski C. Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. *J Immunol.* 1981 Sep;127(3):1011-8.
- Jennings MP, Hood DW, Peak IR, Virji M, Moxon ER. Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 1995 Nov;18(4):729-40.
- Jonsson AB, Nyberg G, Normark S. Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in pilC, a novel gene for pilus assembly. *EMBO J.* 1991 Feb;10(2):477-88.
- Kahler CM, Martin LE, Shih GC, Rahman MM, Carlson RW, Stephens DS. The (alpha2-->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.* 1998 Dec;66(12):5939-47.

- Kallstrom H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB. Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol.* 1997 Aug;25(4):639-47.
- Kaper JB, Michalski J, Ketley JM, Levine MM. Potential for reacquisition of cholera enterotoxin genes by attenuated *Vibrio cholerae* vaccine strain CVD 103-HgR. *Infect Immun.* 1994 Apr;62(4):1480-3.
- Kasper DL, Winkelhake JL, Brandt BL, Artenstein MS. Antigenic specificity of bactericidal antibodies in antisera to *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis.* 1973 Apr;127(4):378-87.
- Kaufmann SHE. Immunity against intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:129-163.
- Kertesz DA, Coulthart MB, Ryan JA, Johnson WM, Ashton FE. Serogroup B, electrophoretic type 15 *Neisseria meningitidis* in Canada. *J Infect Dis.* 1998 Jun;177(6):1754-7.
- King WJ, MacDonald NE, Wells G, Huang J, Allen U, Chan F, Ferris W, Diaz-Mitoma F, Ashton F. Total and functional antibody response to a quadrivalent meningococcal polysaccharide vaccine among children. *J Pediatr.* 1996 Feb;128(2):196-202.
- Kirsch EA, Barton RP, Kitchen L, Giroir BP. Pathophysiology, treatment and outcome of meningococemia: a review and recent experience. *Pediatr Infect Dis J.* 1996 Nov;15(11):967-78. Review.
- Kizil G, Todd I, Atta M, Borriello SP, Ait-Tahar K, Ala'Aldeen DA. Identification and characterization of TspA, a major CD4(+) T-cell- and B-cell-stimulating *Neisseria*-specific antigen. *Infect Immun.* 1999 Jul;67(7):3533-41.
- Kolb-Mäurer A, Unkmeir A, Kämmerer U, Hübner C, Leimbach T, Stade A, Kämpgen E, Frosch M, Dietrich G. Interaction of *Neisseria meningitidis* with Human Dendritic Cells. *Infect Immun.* 2001;69:6912-6922
- Koomey JM, Falkow S. Cloning of the *recA* gene of *Neisseria gonorrhoeae* and construction of gonococcal *recA* mutants. *J Bacteriol.* 1987 Feb;169(2):790-5.
- Kurz S, Hubner C, Aepinus C, Theiss S, Guckenberger M, Panzner U, Weber J, Frosch M, Dietrich G. Transcriptome-based antigen identification for *Neisseria meningitidis*. *Vaccine.* 2003 Jan 30;21(7-8):768-75.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(259):680-5.
- Lavitola A, Bucci C, Salvatore P, Maresca G, Bruni CB, Alifano P. Intracistronic transcription termination in polysialyltransferase gene (*siaD*) affects phase variation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 1999 Jul;33(1):119-27.

- Lepow ML, Goldschneider I, Gold R, Randolph M, Gotschlich EC. Persistence of antibody following immunization of children with groups A and C meningococcal polysaccharide vaccines. *Pediatrics*. 1977 Nov;60(5):673-80.
- Levine MM, Ferreccio C, Black RE, Germanier R. Large-scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. *Lancet*. 1987 May 9;1(8541):1049-52.
- Levine MM, Galen J, Barry E, Noriega F, Tacket C, Sztein M, Chatfield S, Dougan G, Losonsky G, Kotloff K. Attenuated *Salmonella typhi* and *Shigella* as live oral vaccines and as live vectors. *Behring Inst Mitt*. 1997 Feb;(98):120-3. Review.
- Levine MM, Galen J, Barry E, Noriega F, Tacket C, Sztein M, Chatfield S, Dougan G, Losonsky G, Kotloff K. Attenuated *Salmonella typhi* and *Shigella* as live oral vaccines and as live vectors. *Behring Inst Mitt*. 1997 Feb;(98):120-3. Review.
- Levine MM, Kaper JB. Live oral vaccines against cholera: an update. *Vaccine*. 1993;11(2):207-12. Review.
- Lindberg AA. Vaccination against enteric pathogens: from science to vaccine trials. *Curr Opin Microbiol*. 1998;(1):116-124.
- Lorenzen DR, Dux F, Wölk U, Tsirpouchtsidis A, Haas G, Meyer TF. Immunoglobulin A1 protease, an exoenzyme of pathogenic *Neisseriae*, is a potent inducer of proinflammatory cytokines. *J Exp Med*. 1999;(190):1049-1058
- MacDonald NE, Halperin SA, Law BJ, Forrest B, Danzig LE, Granoff DM. Induction of immunologic memory by conjugated vs plain meningococcal C polysaccharide vaccine in toddlers: a randomized controlled trial. *JAMA*. 1998 Nov 18;280(19):1685-9.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 17;95(6):3140-5.
- Maiden MC, Suker J, McKenna AJ, Bygraves JA, Feavers IM. Comparison of the class 1 outer membrane proteins of eight serological reference strains of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*. 1991 Mar;5(3):727-36.
- Mandrell RE, Kim JJ, John CM, Gibson BW, Sugai JV, Apicella MA, Griffiss JM, Yamasaki R. Endogenous sialylation of the lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol*. 1991 May;173(9):2823-32.
- Mandrell RE, Zollinger WD. Measurement of antibodies to meningococcal group B polysaccharide: low avidity binding and equilibrium binding constants. *J Immunol*. 1982 Nov;129(5):2172-8.
- Martin D, Cadieux N, Hamel J, Brodeur BR. Highly conserved *Neisseria meningitidis* surface protein confers protection against experimental infection. *J Exp Med*. 1997 Apr 7;185(7):1173-83.

- Martin SL, Borrow R, van der Ley P, Dawson M, Fox AJ, Cartwright KA. Effect of sequence variation in meningococcal PorA outer membrane protein on the effectiveness of a hexavalent PorA outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine*. 2000 May 22;18(23):2476-81.
- McNeil G, Virji M, Moxon ER. Interactions of *Neisseria meningitidis* with human monocytes. *Microb Pathog*. 1994 Feb;16(2):153-63.
- McNeil G, Virji M. Phenotypic variants of meningococci and their potential in phagocytic interactions: the influence of opacity proteins, pili, PilC and surface sialic acids. *Microb Pathog*. 1997 May;22(5):295-304.
- Medina E, Paglia P, Nikolaus T, Muller A, Hensel M, Guzman CA. Pathogenicity island 2 mutants of *Salmonella typhimurium* are efficient carriers for heterologous antigens and enable modulation of immune responses. *Infect Immun*. 1999 Mar;67(3):1093-9.
- Mehr IJ, Long CD, Serkin CD, Seifert HS. A homologue of the recombination-dependent growth gene, *rdgC*, is involved in gonococcal pilin antigenic variation. *Genetics*. 2000 Feb;154(2):523-32.
- Mehr IJ, Seifert HS. Differential roles of homologous recombination pathways in *Neisseria gonorrhoeae* pilin antigenic variation, DNA transformation and DNA repair. *Mol Microbiol*. 1998 Nov;30(4):697-710.
- Mel DM, Arsic BL, Nikolic BD, Radovanic ML. Studies on vaccination against bacillary dysentery. 4. Oral immunization with live monotypic and combined vaccines. *Bull World Health Organ*. 1968;39(3):375-80.
- Meyer TF, Billyard E, Haas R, Storzbach S, So M. Pilus genes of *Neisseria gonorrhoeae*: chromosomal organization and DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Oct;81(19):6110-4.
- Miller RV, Kokjohn TA. General microbiology of *recA*: environmental and evolutionary significance. *Annu Rev Microbiol*. 1990;44:365-94. Review.
- Moe GR, Tan S, Granoff DM. Differences in surface expression of NspA among *Neisseria meningitidis* group B strains. *Infect Immun*. 1999 Nov;67(11):5664-75.
- Morley SL, Pollard AJ. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? *Vaccine*. 2001 Dec 12;20(5-6):666-87.
- Murphy GL, Connell TD, Barritt DS, Koomey M, Cannon JG. Phase variation of gonococcal protein II: regulation of gene expression by slipped-strand mispairing of a repetitive DNA sequence. *Cell*. 1989 Feb 24;56(4):539-47.
- Nassif X, Pujol C, Morand P, Eugene E. Interactions of pathogenic *Neisseria* with host cells. Is it possible to assemble the puzzle? *Mol Microbiol*. 1999 Jun;32(6):1124-32. Review.

- Nelson JD. Jails, microbes, and the three-foot barrier. *N Engl J Med*. 1996 Sep 19;335(12):885-6.
- Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res*. 1990 Oct 25;18(20):6169.
- Oliver KJ, Reddin KM, Bracegirdle P, Hudson MJ, Borrow R, Feavers IM, Robinson A, Cartwright K, Gorringer AR. *Neisseria lactamica* protects against experimental meningococcal infection. *Infect Immun* 2002 Jul;70(7):3621-6.
- Olsen SF, Djurhuus B, Rasmussen K, Joensen HD, Larsen SO, Zoffman H, Lind I. Pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in households with infants within areas with high and low incidences of meningococcal disease. *Epidemiol Infect*. 1991 Jun;106(3):445-57.
- Parge HE, Forest KT, Hickey MJ, Christensen DA, Getzoff ED, Tainer JA. Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. *Nature*. 1995 Nov 2;378(6552):32-8.
- Perry AC, Nicolson IJ, Saunders JR. *Neisseria meningitidis* C114 contains silent, truncated pilin genes that are homologous to *Neisseria gonorrhoeae* pil sequences. *J Bacteriol*. 1988 Apr;170(4):1691-7.
- Perry AC, Nicolson IJ, Saunders JR. Structural analysis of the pilE region of *Neisseria gonorrhoeae* P9. *Gene*. 1987;60(1):85-92.
- Pizza M, Scarlato V, Massignani V, Giuliani MM, Arico B, Comanducci M, Jennings GT, Baldi L, Bartolini E, Capecchi B, Galeotti CL, Luzzi E, Manetti R, Marchetti E, Mora M, Nuti S, Ratti G, Santini L, Savino S, Scarselli M, Storni E, Zuo P, Broeker M, Hundt E, Knapp B, Blair E, Mason T, Tettelin H, Hood DW, Jeffries AC, Saunders NJ, Granoff DM, Venter JC, Moxon ER, Grandi G, Rappuoli R. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*. 2000 Mar 10;287(5459):1816-20.
- Plaut AG, Gilbert JV, Artenstein MS, Capra JD. *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: extracellular enzyme cleaves human immunoglobulin A. *Science*. 1975;(190):1103-1105.
- Plested JS, Makepeace K, Jennings MP, Gidney MA, Lacelle S, Brisson J, Cox AD, Martin A, Bird AG, Tang CM, Mackinnon FM, Richards JC, Moxon ER. Conservation and accessibility of an inner core lipopolysaccharide epitope of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*. 1999 Oct;67(10):5417-26.
- Pollard AJ, Frasch C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*. 2001 Jan 8;19(11-12):1327-46. Review.
- Pon RA, Lussier M, Yang QL, Jennings HJ. N-Propionylated group B meningococcal polysaccharide mimics a unique bactericidal capsular epitope in group B *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med*. 1997 Jun 2;185(11):1929-38.

- Potts WJ, Saunders JR. Nucleotide sequence of the structural gene for class I pilin from *Neisseria meningitidis*: homologies with the pilE locus of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol.* 1988 Sep;2(5):647-53.
- Pujol C, Eugene E, Morand P, Nassif X. Do pathogenic neisseriae need several ways to modify the host cell cytoskeleton? *Microbes Infect.* 2000 Jun;2(7):821-7. Review.
- Ram S, McQuillen DP, Gulati S, Elkins C, Pangburn MK, Rice PA. Binding of complement factor H to loop 5 of porin protein 1A: a molecular mechanism of serum resistance of nonsialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med.* 1998 Aug 17;188(4):671-80.
- Ramsay ME, Andrews N, Kaczmarski EB, Miller E. Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. *Lancet.* 2001 Jan 20;357(9251):195-6.
- Rappuoli R, Abrignani S, Grandi G. Impfstoffe: die Medikamente der Zukunft. *Spektrum der Wissenschaft. Spezial: Pharmaforschung.* 1996:60-69.
- Read RC, Goodwin L, Parsons MA, Silcocks P, Kaczmarski EB, Parker A, Baldwin TJ. Coinfection with influenza B virus does not affect association of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa in organ culture. *Infect Immun.* 1999 Jun;67(6):3082-6.
- Read RC, Zimmerli S, Broaddus C, Sanan DA, Stephens DS, Ernst JD. The (alpha2-->8)-linked polysialic acid capsule of group B *Neisseria meningitidis* modifies multiple steps during interaction with human macrophages. *Infect Immun.* 1996 Aug;64(8):3210-7.
- Reingold AL, Broome CV, Hightower AW, Ajello GW, Bolan GA, Adamsbaum C, Jones EE, Phillips C, Tiendrebeogo H, Yada A. Age-specific differences in duration of clinical protection after vaccination with meningococcal polysaccharide A vaccine. *Lancet.* 1985 Jul 20;2(8447):114-8.
- Robertson BD, Meyer TF. Genetic variation in pathogenic bacteria. *Trends Genet.* 1992 Dec;8(12):422-7. Review.
- Rokbi B, Mignon M, Maitre-Wilmotte G, Lissolo L, Danve B, Caugant DA, Quentin-Millet MJ. Evaluation of recombinant transferrin-binding protein B variants from *Neisseria meningitidis* for their ability to induce cross-reactive and bactericidal antibodies against a genetically diverse collection of serogroup B strains. *Infect Immun.* 1997 Jan;65(1):55-63.
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994 Jul 1;180(1):83-93.

- Roupe van der Voort E, Schuller M, Holst J, de Vries P, van der Ley P, van den Dobbelsteen G, Poolman J. Immunogenicity studies with a genetically engineered hexavalent PorA and a wild-type meningococcal group B outer membrane vesicle vaccine in infant cynomolgus monkeys. *Vaccine*. 2000 Jan 31;18(14):1334-43.
- Rudel T, Facius D, Barten R, Scheuerpflug I, Nonnenmacher E, Meyer TF. Role of pili and the phase-variable PilC protein in natural competence for transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995b Aug 15;92(17):7986-90.
- Rudel T, Scheuerpflug I, Meyer TF. *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin. *Nature*. 1995a Jan 26;373(6512):357-9.
- Rudel T, Schmid A, Benz R, Kolb HA, Lang F, Meyer TF. Modulation of *Neisseria* porin (PorB) by cytosolic ATP/GTP of target cells: parallels between pathogen accommodation and mitochondrial endosymbiosis. *Cell*. 1996 May 3;85(3):391-402.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988 Jan 29;239(4839):487-91.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, New York, 1989.
- Sanchez S, Troncoso G, Criado MT, Ferreiros C. In vitro induction of memory-driven responses against *Neisseria meningitidis* by priming with *Neisseria lactamica*. *Vaccine* 2002 Jul 26;20(23-24):2957-63.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.
- Sarkari J, Pandit N, Moxon ER, Achtman M. Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine. *Mol Microbiol*. 1994 Jul;13(2):207-17.
- Saunders NB, Shoemaker DR, Brandt BL, Moran EE, Larsen T, Zollinger WD. Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles in mice. *Infect Immun*. 1999 Jan;67(1):113-9.
- Schaad UB, abdu Salam M, Aujard Y, Dagan R, Green SD, Peltola H, Rubio TT, Smith AL, Adam D. Use of fluoroquinolones in pediatrics: consensus report of an International Society of Chemotherapy commission. *Pediatr Infect Dis J*. 1995 Jan;14(1):1-9. Review.
- Scholten RJ, Kuipers B, Valkenburg HA, Dankert J, Zollinger WD, Poolman JT. Lipooligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies. *J Med Microbiol*. 1994 Oct;41(4):236-43.
- Schryvers AB, Stojiljkovic I. Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol*. 1999;(36):1117-1123.

- Schwartz B, Al-Tobaiqi A, Al-Ruwais A, Fontaine RE, A'ashi J, Hightower AW, Broome CV, Music SI. Comparative efficacy of ceftriaxone and rifampicin in eradicating pharyngeal carriage of group A *Neisseria meningitidis*. *Lancet*. 1988 Jun 4;1(8597):1239-42.
- Seifert HS. Insertionally inactivated and inducible *recA* alleles for use in *Neisseria*. *Gene*. 1997 Apr 1;188(2):215-20.
- Serkin CD, Seifert HS. Iron availability regulates DNA recombination in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol*. 2000 Sep;37(5):1075-86.
- Shapiro SZ. The HIV/AIDS vaccine researchers' orientation to the process of preparing a US FDA application for an investigational new drug (IND): what it is all about and how you start by preparing for your pre-IND meeting. *Vaccine*. 2002 Jan 31;20(9-10):1261-80.
- Shin JS, Lin JS, Anderson PW, Insel RA, Nahm MH. Monoclonal antibodies specific for *Neisseria meningitidis* group B polysaccharide and their peptide mimotopes. *Infect Immun*. 2001 May;69(5):3335-42.
- Sierra GV, Campa HC, Varcacel NM, Garcia IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF, Casanueva GV, Rico CO, Rodriguez CR, Terry MH. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann*. 1991 Dec;14(2):195-207; discussion 208-10.
- Simmons G, Martin D, Stewart J, Bremner D. Carriage of *N. lactamica* in a population at high risk of meningococcal disease. *Epidemiol Infect*. 2000 Aug;125(1):99-104.
- Singer BS, Gold L, Gauss P, Doherty DH. Determination of the amount of homology required for recombination in bacteriophage T4. *Cell*. 1982 Nov;31(1):25-33.
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 1975;98:503-517
- Sparling PF. Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to streptomycin resistance. *J Bacteriol*. 1966 Nov;92(5):1364-71.
- Stein DC. Transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: physical requirements of the transforming DNA. *Can J Microbiol*. 1991 May;37(5):345-9.
- Stephens DS, Hoffman LH, McGee ZA. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis*. 1983 Sep;148(3):369-76.
- Stern A, Nickel P, Meyer TF, So M. Opacity determinants of *Neisseria gonorrhoeae*: gene expression and chromosomal linkage to the gonococcal pilus gene. *Cell*. 1984 Jun;37(2):447-56.
- Stern A, Brown M, Nickel P, Meyer TF. Opacity genes in *Neisseria gonorrhoeae*: control of phase and antigenic variation. *Cell*. 1986 Oct 10;47(1):61-71.

- Stern A, Meyer TF. Common mechanism controlling phase and antigenic variation in pathogenic neisseriae. *Mol Microbiol.* 1987 Jul;1(1):5-12.
- Stins MF, Gilles F, Kim KS. Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 1997 Jun;76(1-2):81-90.
- Stuart JM, Cartwright KA, Robinson PM, Noah ND. Effect of smoking on meningococcal carriage. *Lancet.* 1989 Sep 23;2(8665):723-5.
- Sun YH, Bakshi S, Chalmers R, Tang CM. Functional genomics of *Neisseria meningitidis* pathogenesis. *Nat Med.* 2000 Nov;6(11):1269-73.
- Swanson J, Belland RJ, Hill SA. Neisserial surface variation: how and why? *Curr Opin Genet Dev.* 1992 Oct;2(5):805-11. Review.
- Swanson J. Colony opacity and protein II compositions of gonococci. *Infect Immun.* 1982 Jul;37(1):359-68.
- Swartley JS, Ahn JH, Liu LJ, Kahler CM, Stephens DS. Expression of sialic acid and polysialic acid in serogroup B *Neisseria meningitidis*: divergent transcription of biosynthesis and transport operons through a common promoter region. *J Bacteriol.* 1996 Jul;178(14):4052-9.
- Swartley JS, Marfin AA, Edupuganti S, Liu LJ, Cieslak P, Perkins B, Wenger JD, Stephens DS. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jan 7;94(1):271-6.
- Tacket CO, Hone DM, Curtiss R 3rd, Kelly SM, Losonsky G, Guers L, Harris AM, Edelman R, Levine MM. Comparison of the safety and immunogenicity of delta aroC delta aroD and delta cya delta crp *Salmonella typhi* strains in adult volunteers. *Infect Immun.* 1992 Feb;60(2):536-41.
- Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, Wasserman SS, Nataro JP, Edelman R, Pickard D, Dougan G, Chatfield SN, Levine MM. Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in htrA and aroC aroD and immune response in humans. *Infect Immun.* 1997 Feb;65(2):452-6.
- Tang C, Moxon R, Levine MM. For discussion: live attenuated vaccines for group B meningococcus. *Vaccine.* 1999 Jan;17(2):114-7. Review.
- Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE, Eisen JA, Ketchum KA, Hood DW, Peden JF, Dodson RJ, Nelson WC, Gwinn ML, DeBoy R, Peterson JD, Hickey EK, Haft DH, Salzberg SL, White O, Fleischmann RD, Dougherty BA, Mason T, Ciecko A, Parksey DS, Blair E, Cittone H, Clark EB, Cotton MD, Utterback TR, Khouri H, Qin H, Vamathevan J, Gill J, Scarlato V, Maignani V, Pizza M, Grandi G, Sun L, Smith HO, Fraser CM, Moxon ER, Rappuoli R, Venter JC. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science.* 2000 Mar 10;287(5459):1809-15.

- Tommassen J, Vermeij P, Struyve M, Benz R, Poolman JT. Isolation of *Neisseria meningitidis* mutants deficient in class 1 (*porA*) and class 3 (*porB*) outer membrane proteins. *Infect Immun*. 1990 May;58(5):1355-9.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4.
- Troncoso G, Sanchez S, Moreda M, Criado MT, Ferreiros CM. Antigenic cross-reactivity between outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000 Feb;27(2):103-9.
- Troy FA 2nd. Polysialylation: from bacteria to brains. *Glycobiology*. 1992 Feb;2(1):5-23. Review.
- Tsai CM, Civin CI. Eight lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis* react with a monoclonal antibody which binds lacto-N-neotetraose (Gal beta 1-4GlcNAc beta 1-3Gal beta 1-4Glc). *Infect Immun*. 1991 Oct;59(10):3604-9.
- Tunkel AR, Scheld WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Annu Rev Med*. 1993;44:103-20. Review.
- Twumasi PA Jr, Kumah S, Leach A, O'Dempsey TJ, Ceesay SJ, Todd J, Broome CV, Carlone GM, Pais LB, Holder PK, et al. A trial of a group A plus group C meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine in African infants. *J Infect Dis*. 1995 Mar;171(3):632-8.
- Unkmeir A, Kämmerer U, Stade A, Hübner C, Haller S, Kolb-Mäurer A, Frosch M, and Dietrich G. Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human Dendritic Cells. *Infect Immun*. 2002a May;70(5):2454-62
- Unkmeir A, Latsch K, Dietrich G, Wintermeyer E, Schinke B, Schwender S, Kim KS, Eigenthaler M, Frosch M. Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol Microbiol*. 2002b Nov;46(4):933-46.
- VanCott JL, Chatfield SN, Roberts M, Hone DM, Hohmann EL, Pascual DW, Yamamoto M, Kiyono H, McGhee JR. Regulation of host immune responses by modification of *Salmonella* virulence genes. *Nat Med*. 1998 Nov;4(11):1247-52.
- van der Ende A, Hopman CT, Dankert J. Deletion of *porA* by recombination between clusters of repetitive extragenic palindromic sequences in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*. 1999 Jun;67(6):2928-34.
- van der Ende A, Hopman CT, Zaat S, Essink BB, Berkhout B, Dankert J. Variable expression of class 1 outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by variation in the spacing between the -10 and -35 regions of the promoter. *J Bacteriol*. 1995 May;177(9):2475-80.

- Vedros NA. Development of meningococcal serogroups. In: Vedros NA (ed). Evolution of meningococcal disease. CRC Press, INC, Boca Raton, FL. 1987;33-8.
- Virji M, Alexandrescu C, Ferguson DJ, Saunders JR, Moxon ER. Variations in the expression of pili: the effect on adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol.* 1992 May;6(10):1271-9.
- Virji M, Heckels JE. Antigenic cross-reactivity of *Neisseria pili*: investigations with type- and species-specific monoclonal antibodies. *J Gen Microbiol.* 1983 Sep;129 (Pt 9):2761-8.
- Virji M, Makepeace K, Ferguson DJ, Achtman M, Moxon ER. Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol.* 1993 Nov;10(3):499-510.
- Virji M, Makepeace K, Ferguson DJ, Watt SM. Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic neisseriae. *Mol Microbiol.* 1996a Dec;22(5):941-50.
- Virji M, Makepeace K, Moxon ER. Distinct mechanisms of interactions of Opc-expressing meningococci at apical and basolateral surfaces of human endothelial cells; the role of integrins in apical interactions. *Mol Microbiol.* 1994 Oct;14(1):173-84.
- Virji M, Makepeace K, Peak IR, Ferguson DJ, Jennings MP, Moxon ER. Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol Microbiol.* 1995 Nov;18(4):741-54.
- Virji M. Meningococcal disease: epidemiology and pathogenesis. *Trends Microbiol.* 1996b Dec;4(12):466-9; discussion 469-70.
- Vogel U, Achtman M, Frosch M. Epidemiologie der Meningokokken-Meningitis. Weltweite Ausbreitung eines neuen, virulenten Serogruppe-C-Stammes. *Dt Arztebl.* 1999a;96:3302-05.
- Vogel U, Claus H, Frosch M. Rapid serogroup switching in *Neisseria meningitidis*. *N Engl J Med.* 2000 Jan 20;342(3):219-20.
- Vogel U, Frosch M. Discussion of: Virji M. Meningococcal disease: epidemiology and pathogenesis. *Trends Microbiol.* 1996 Dec;4(12):466-9; discussion 469-70.
- Vogel U, Frosch M. Mechanisms of neisserial serum resistance. *Mol Microbiol.* 1999b Jun;32(6):1133-9. Review.
- Vogel U, Weinberger A, Frank R, Muller A, Kohl J, Atkinson JP, Frosch M. Complement factor C3 deposition and serum resistance in isogenic capsule and lipooligosaccharide sialic acid mutants of serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* 1997 Oct;65(10):4022-9.

- Wang JF, Caugant DA, Morelli G, Koumare B, Achtman M. Antigenic and epidemiologic properties of the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis*. 1993 Jun;167(6):1320-9.
- Weichselbaum A. Über die Ätiologie der aktuen Meningitis cerebrospinalis. *Fortschr Med* 1887;5:573-83.
- Wooldridge KG, Williams PH. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 1993 Nov;12(4):325-48. Review.
- Zollinger WD, Mandrell RE, Griffiss JM, Altieri P, Berman S. Complex of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man. *J Clin Invest*. 1979 May;63(5):836-48.

7. Abkürzungsverzeichnis

Ab	Antikörper
Ak	Antikörper
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CFU	Colony forming unit
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
<i>cps</i>	Kapselgenkomplex von <i>N. meningitidis</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dendritische Zellen
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMF	N,N'-Dimethylformamid
dNTP	Mischung der Desoxynukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	Elektrophoretischer Typ
FCS	Fötale Kälberserum
IgA ₁	Immunglobulin A ₁
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
MCS	Multiple cloning site

MOI	multiplicity of infection
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
NBT	p-Nitroblautetrazoliumchlorid
NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>N. lactamica</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
NUS	Neisseria-uptake-sequence
OD _{xxx}	Optische Dichte bei xxx nm
OMP	Outer membrane proteins
OMV	Outer membrane vesicles
ORF	Offenes Leserahmen (open reading frame)
ori	Replikationsstartpunkt (origin of replication)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PPM ⁺	Proteose-Pepton-Medium, supplementiert
SDS	Natriumdodecylsulfat
spp.	Spezies
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-HCl/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. M. Frosch bedanke ich mich für das interessante Dissertationsthema, die nette Einführung in das Institut für Hygiene und Mikrobiologie und die freundliche Betreuung während meiner Dissertation.

Herrn Dr. rer.-nat. G. Dietrich danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, seine hervorragende Anleitung und seinen großen Einsatz. Er ist für mich ein Freund und Vorbild geworden.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Leimbach, Thomas
Geburtstag: 26.01.1977 in Würzburg
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Hauptbahnhofstrasse 22
97424 Schweinfurt
Deutschland
Telefonnummer: +49-9721-86705
E-Mail: thomas.leimbach@gmx.de

Hochschulausbildung:

05/97 bis 10/03: Medizinstudent der Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Studium im Oktober 2003 erfolgreich abgeschlossen

Dissertation:

05/00 bis 12/00: Durchführung des praktischen Teils der hier vorliegenden Disser-
tation

Militärdienst:

07/96 bis 04/97: Militärdienst in Rotenburg an der Fulda

Schulausbildung:

1987 bis 1996: Alexander-von-Humboldt Gymnasium Schweinfurt, Abschluss:
Abitur
1983 bis 1987: Grundschule Schweinfurt