

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

**Untersuchungen zu intrazellulären Folgereaktionen von  
*Neisseria meningitidis* und *Escherichia coli* K1 in  
HBMEC (*human brain microvascular endothelial cells*)**

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

vorgelegt von  
**Joanna Nikulin**  
aus Helsinki

Würzburg, Juni 2005

Referent: Prof. Dr. med. M. Frosch

Koreferent: Prof. Dr. med. P. Rieckmann

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 23.12.2005

Die Promovendin ist Ärztin

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Meningokokken-Meningitis: Eine globale Perspektive .....	1
1.2	Infektionsweg von <i>Neisseria meningitidis</i> .....	4
1.2.1	Von der Kolonisation zur Invasion .....	4
1.2.2	Dissemination über den Blutkreislauf .....	4
1.2.3	Überwindung der Blut-Hirn/Liquor-Schranke .....	5
1.2.4	Intrazelluläre Vesikelreifung .....	6
1.3	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	9
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>10</b>
2.1	Material .....	10
2.1.1	Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Reaktionskits, Enzyme, Puffer und Lösungen .....	10
2.1.2	Kultur von Bakterien .....	15
2.1.3	Zellkultur .....	17
2.1.4	Plasmidvektoren .....	18
2.1.5	Oligonukleotide .....	19
2.1.6	Antikörper .....	19
2.2	Methoden .....	21
2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	21
2.2.2	Agarosegel-Elektrophorese .....	22
2.2.3	DNA-Präparation .....	22
2.2.4	RNA-Präparation .....	24
2.2.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	25
2.2.6	Klonierungsmethoden .....	26
2.2.7	Transformation von Bakterien .....	27
2.2.8	DNA-Hybridisierung .....	28
2.2.9	Automatisierte DNA-Sequenzierung .....	30
2.2.10	Quantifizierung von Proteinen und Polysacchariden .....	31
2.2.11	Kultur von Zellen .....	33
2.2.12	Infektionsversuche in Zellkulturen .....	35
2.3	Dreifacher Immunfluoreszenz-Tests (IFT-III) .....	37

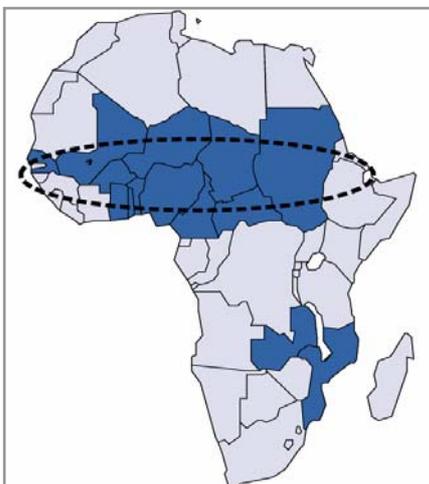
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
3.1	Das <i>narE</i> Gen .....	41
3.1.1	Konstruktion der <i>narE</i> Mutante.....	41
3.1.2	Charakterisierung der <i>narE</i> Mutante .....	43
3.1.3	<i>NarE</i> und Signaltransduktion.....	46
3.2	Intrazelluläre Folgereaktionen von <i>N. meningitidis</i> und <i>E. coli</i> K1 in HBMEC ..	48
3.2.1	Intrazelluläre Replikation von <i>N. meningitidis</i> in HBMEC .....	48
3.2.2	Acetylierung der <i>E. coli</i> K1 Polysaccharidkapsel .....	51
3.2.3	Dreifacher Immunfluoreszenz-Test an <i>N. meningitidis</i> und HBMEC.....	53
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>59</b>
4.1	Bedeutung des <i>narE</i> Gens für die Signaltransduktion .....	59
4.2	Intrazelluläre Folgereaktionen von <i>N. meningitidis</i> und <i>E. coli</i> K1 in HBMEC ..	61
4.2.1	Intrazelluläre Replikation von <i>N. meningitidis</i> in HBMEC .....	61
4.2.2	Rolle der Acetylierung der <i>E. coli</i> K1 Kapsel.....	63
4.2.3	Intrazelluläre Vesikelreifung der NCV ( <i>Neisseria containing vacuole</i> ) .....	65
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>76</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	76
7.2	Tabellenverzeichnis .....	78
7.3	Abbildungsverzeichnis .....	78

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Meningokokken-Meningitis: Eine globale Perspektive

Eine Entzündung der weichen Hirnhäute, Meningitis, kann durch zahlreiche bakterielle und virale Erreger verursacht werden. *Neisseria meningitidis* ist einer der wichtigsten Erreger einer bakteriellen Meningitis und gefürchtet für das Potential, große Epidemien auszulösen. Als eigenständiges Krankheitsbild wurde die Meningokokken-Meningitis zum ersten Mal 1805 während einer Epidemie in Genf beschrieben [Vieusseux 1806]. Die Identifizierung des Erregers gelang jedoch erst 1884 durch Marchiafava und Celli und die Isolierung des Bakteriums aus dem Liquor schließlich im Jahr 1887 [Weichselbaum 1887]. Bisher sind 13 Serogruppen unterschiedlicher Kapselantigenität bekannt, wovon fünf (A, B, C, W-135 und Y) mit Meningokokken-Infektionen und -Epidemien assoziiert sind. *N. meningitidis* infiziert ausschließlich Menschen. Der Erreger ist altersabhängig bei 5-25% der Bevölkerung als Kommensaler der nasopharyngealen Mukosa anzutreffen, von wo die durch einen räumlich engen Kontakt begünstigte Übertragung als Tröpfcheninfektion erfolgt.

Große Epidemien der Meningokokken-Meningitis sind vor allem im afrikanischen Meningitis-Gürtel zu beobachten (Abb.1.1). Diese werden durch klimatische Faktoren (Trockenheit, Staub, Kälte) sowie durch soziale Verhaltensweisen der Menschen (enge Wohnräume, Pilgerreisen, große traditionelle Märkte) begünstigt [Sultan *et al.* 2005]. In diesem sich von Senegal nach Äthiopien erstreckenden Gebiet leben 300 Millionen Menschen, die in Abständen von 5-10 Jahren Epidemien der Meningokokken-Meningitis ausgesetzt sind.



**Abbildung 1.1: Der Meningitis-Gürtel.**

Der afrikanische Meningitis-Gürtel ist mit einer Strichlinie markiert; blau dargestellt sind Länder mit mehr als 15/100.000/Jahr Meningokokken-Infektionen und einer gemeldeten Epidemie im Zeitraum Januar 1995 - Oktober 1999 [[www.who.int](http://www.who.int)].

Diese Epidemien werden hauptsächlich durch die Serogruppen A und C verursacht und überdauern 2-3 Trockenperioden. Der bisher größte schriftlich belegte Ausbruch einer Meningitis-Epidemie war eine 1996 durch Serogruppe A verursachte Epidemie mit über 250.000 registrierten Erkrankten und 25.000 Todesfällen [Greenwood 1999]. In den vergangenen Jahren ist zusätzlich zu einer geographischen Ausdehnung des Meningitis-Gürtels in Richtung Süden eine Erweiterung des Erregerspektrums der Epidemien durch die Serogruppe W-135 beobachtet worden, die die Weltgesundheitsorganisation (WHO) zur Änderung derzeitiger Impfstrategien zwingt [World Health Organization 2003].

Polysaccharid-Impfstoffe gegen die Serogruppen A und C wurden bereits vor 30 Jahren entwickelt. Diese sind jedoch unwirksam bei Kindern unter zwei Jahren, hinterlassen in anderen Altersgruppen auch keine lang anhaltende Immunität und sind folglich für Routineimpfungen ungeeignet [Danzig 2004]. Zur Eindämmung bereits ausgebrochener Epidemien werden in betroffenen Gebieten des afrikanischen Meningitis-Gürtels Massenimpfungen mit einem bivalenten Polysaccharid-Impfstoff A+C durchgeführt. Impfstoffe aus internationalen Vorräten werden von der *International Coordinating Group on Vaccine Provision for Epidemic Meningitis* für die Länder und Regionen zur Verfügung gestellt. Zunehmende Epidemien durch die Serogruppe W-135 haben zur Entwicklung eines trivalenten ACW-135 Polysaccharid-Impfstoffes und dessen Einführung in die Impfstrategien geführt [World Health Organization 2003].

Durch die steigende Mobilität des modernen Menschen sind Infektionskrankheiten von einem „Dritte-Welt-Problem“ zu einer zunehmend internationalen Angelegenheit geworden. 2 Millionen Pilger aus über 140 Ländern sammeln sich jährlich in den heiligen Städten des Islams Mekka und Medina in Saudi-Arabien. Im Jahr 1987 ist eine Serogruppe-A-Epidemie während des *Haj* aufgetreten und heimgekehrte Pilger haben dieses aus Südasien stammende Isolat weltweit verbreitet [Moore *et al.* 1989]. Daraufhin wurde eine Immunisierung mit bivalentem A+C Impfstoff zur Einreisebedingung für Pilger nach Saudi-Arabien. Im Jahr 2000 und 2001 kam es wieder durch heimgekehrte Pilger zur Ausbreitung von Meningokokken-Infektionen, diesmal verursacht hauptsächlich durch die Serogruppe W-135 [Taha *et al.* 2000]. Zahlreiche Erkrankte und Todesfälle wurden aus Europa (Frankreich, Großbritannien, Niederlanden, Norwegen, Dänemark), den USA, Asien (Singapur, Indonesien), Afrika (Zentralafrikanische Republik, Marokko) und dem Nahen Osten (Iran, Oman, Kuwait, Saudi-Arabien) an die WHO gemeldet [World Health Organization 2000, 2001]. Daraufhin wurden die Vorschriften zur Einreise überarbeitet, so dass heute von moslemischen Pilgern zur *Haj* und *Ramadan Omra* ein Nachweis einer tetravalente ACW135Y-Impfung spätestens 10 Tage vor der Einreise verlangt wird [Memish 2002].

---

Anders als im afrikanischen Meningitis-Gürtel sind in Europa Meningokokken der Serogruppe B für ca. 70% der Meningokokken-Infektionen verantwortlich. Multilokussequenztypisierung zeigt eine Dominanz durch vier klonale Linien (ST-32, ST-41/44, ST-11 und ST-8 Komplex), wobei sich die Verhältnisse zwischen den einzelnen Linien von Land zu Land unterscheiden [Vogel *et al.* 2004]. Durch Meningokokken der Serogruppe B ausgelöste Epidemien unterscheiden sich von denen der Serogruppen A und C durch einen langsameren Beginn, niedrigere Infektionsraten aber auch durch zeitlich deutlich längere Epidemien, die 5-10 Jahren oder noch länger fort dauern können. Dies konnte bereits in Norwegen, Kuba und Chile beobachtet werden. Seit 1991 wird in Neuseeland ebenfalls ein bedeutender Anstieg der Serogruppe-B-Erkrankungen beobachtet. Die Inzidenz stieg von 1,6/100.000/Jahr (1990 vor Beginn der Epidemie) auf einem Höchstwert von 16,9/100.000/Jahr (1997) und ist auf diesem hohen Niveau geblieben [Baker *et al.* 2001]. Aufgrund der schwachen Immunogenität der Serogruppe B Polysaccharidkapsel existieren bis heute keine zur Routineimpfung geeigneten Impfstoffe.

## 1.2 Infektionsweg von *Neisseria meningitidis*

Für eine erfolgreiche Impfstoffentwicklung sind exakte Kenntnisse der Pathogenese und Erreger-Wirt-Interaktionen erforderlich. In der Pathogenese der *N. meningitidis*-Infektion ist der erste Schritt die asymptomatische nasopharyngeale Kolonisation des gesunden Trägers. Gelegentlich kommt es zur Invasion der Erreger durch die Epithelzellbarriere des Nasopharynx in den Blutkreislauf und die Folge kann eine Meningokokken-Sepsis bzw. nach dem Überqueren der Blut-Hirn/Liquor-Schranke eine Entzündung der weichen Hirnhäute sein. Der Mensch ist das einzige Reservoir für *N. meningitidis* und die strikte Wirtsspezifität verhindert die Erforschung des Infektionsablaufs *in vivo* in einem geeigneten Tiermodell. Folglich beruhen derzeitige noch unvollständige Erkenntnisse der *N. meningitidis*-Infektion auf Beobachtungen von asymptomatischen Trägern bzw. Erkrankten oder auf Erforschung der Erreger-Wirt-Interaktionen *in vitro* in unterschiedlichen Zellkulturmodellen.

### 1.2.1 Von der Kolonisation zur Invasion

Meningokokken sind in der Lage *in vitro* an humane Epithelzellen zu adhären, diese zu invadieren und zu durchqueren [Merz und So 2000]. Der pilusvermittelten, initialen Adhäsion folgt eine Ausbreitung der Erreger entlang der Zelloberfläche, Reduktion der Pili, intime Anhaftung der Erreger mit kolokalisierten Veränderungen an der Zellmembran bzw. am Zytoskelett [Pujol *et al.* 1997]. Die Kapsel wird herunter reguliert und der Erreger wird, vermittelt durch verschiedene Oberflächenproteine wie Opa, Opc und Rezeptoren der Zelloberfläche, internalisiert [Merz und So 2000, Nassif *et al.* 1999, Virji *et al.* 1993, Vries *et al.* 1996]. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist erkennbar, dass sich intrazellulär in Epithelzellen befindende Meningokokken in phagosomenähnlichen membranumgebenen Vakuolen lokalisiert sind [Pujol *et al.* 1997, Stephens *et al.* 1983]. Während der intrazellulären Passage durch die Zelle kommt es zur Replikation des Erregers [Larson *et al.* 2002].

### 1.2.2 Dissemination über den Blutkreislauf

Nach Überwindung der nasopharyngealen Mukosa gelangt *N. meningitidis* in den Blutkreislauf, wo es zur weiteren Replikation und zur Dissemination des Erregers kommt. Im Gegensatz zu den aus dem Nasopharynx isolierten, meist unbekapselten Meningokokken, den Trägerisolaten, findet man im Blut und Liquor fast ausschließlich bekapselte Erreger [Nassif 1999]. Die Kapsel der Meningokokken der Serogruppen B, C, W-135 und Y besteht, analog zur Kapsel des Erregers neonataler Meningitis *E. coli* K1,

aus N-Acetyl-Neuraminsäure, die bei *E. coli* K1 und Serogruppe B Meningokokken  $\alpha$ -2,8-glykosidisch verknüpft ist [Bhattacharjee *et al.* 1975, Claus *et al.* 2004]. Das Polysaccharid kann durch verschiedene Substituenten wie Acetyl-, Methyl-, Lactyl-, Sulfat- und Phosphatgruppen Änderungen in Kapseleigenschaften erzielen. Am häufigsten sind eine oder mehrere Hydroxylgruppen durch Acetylgruppen ersetzt. Die O-Acetylierung beeinflusst sowohl die molekularen Eigenschaften des Polysaccharids wie Größe und Ladung als auch die biologischen Eigenschaften wie Immunogenität und Virulenz [Claus *et al.* 2004, Frasa *et al.* 1993, Lewis *et al.* 2004, Orskov *et al.* 1979, Torensma *et al.* 1991]. Dennoch ist die biologische Relevanz der O-Acetylierung der *E. coli* K1 Kapsel bzw. der Kapsel von Meningokokken der Serogruppe C, W-135 und Y während der intravasalen und transzellulären Passage größtenteils noch unklar.

### 1.2.3 Überwindung der Blut-Hirn/Liquor-Schranke

Um eine Meningitis auslösen zu können, müssen Meningokokken nach intravasaler Replikation und Dissemination in der Lage sein, eine der dichtesten Barrieren des menschlichen Körpers, die Blut-Hirn/Liquor-Schranke, zu überwinden. Die Blut-Hirn/Liquor-Schranke besteht aus zwei mit *tight junctions* ausgestatteten Komponenten, dem Endothel der Gehirnkapillare und dem Epithel des *Plexus choroideus*. Für das Verständnis der Pathogenese der Meningokokken-Meningitis ist es erforderlich die Erreger-Wirt-Interaktionen dieser Schlüsselstelle zu charakterisieren. Die strenge Wirtsspezifität von *N. meningitidis* ermöglicht keine *in vivo* Untersuchungen am Tiermodell und die exakte Durchtrittsstelle der Erreger vom Blut in den Liquorraum ist weiterhin nicht bekannt. Bei einem an fulminanter Meningokokken-Sepsis vor Therapiebeginn verstorbenen Patienten konnten mikroskopisch adhärente Erreger sowohl an meningealen als auch am choroidalen Endothel *in vivo* beobachtet werden, adhärente Erreger an choroidalen Epithelzellen wurden jedoch nicht entdeckt [Pron *et al.* 1997].

Ob der Erreger die Blut-Hirn/Liquor-Schranke über den trans- oder parazellulären Weg passiert, ist ebenfalls bis heute ungeklärt. Nach Infektion von HUVECs (*human umbilical vein-derived endothelial cells*) mit Meningokokken konnte bereits nach einigen Stunden Inkubation einen Verlust der Kontinuität des Zellrasens beobachtet werden [Virji *et al.* 1991]. In Transwell-Studien mit polarisierten *tight junctions* bildenden Kolonepithelzellen (T84) durchquerten Meningokokken die Zellbarriere jedoch ohne Degradation der *tight junctions* [Merz *et al.* 1996, Pujol *et al.* 1997]. Um Wirt-Erreger-Interaktionen authentischer während der bakteriellen Überquerung der Blut-Hirn-Schranke untersuchen zu können, wurde ein Zellkulturmodell durch Isolierung und

Immortalisierung von *human brain microvascular endothelial cells* (HBMECs) etabliert [Stins *et al.* 1997]. HBMEC-Zellen sind bereits bei zahlreichen Erregern einer bakteriellen Meningitis zur Untersuchung der Interaktion mit der Blut-Hirn-Schranke verwendet worden [Badger *et al.* 1999, Nizet *et al.* 1997, Prasadarao *et al.* 1999, Ring *et al.* 1998, Stins *et al.* 2001, Unkmeir *et al.* 2002b].

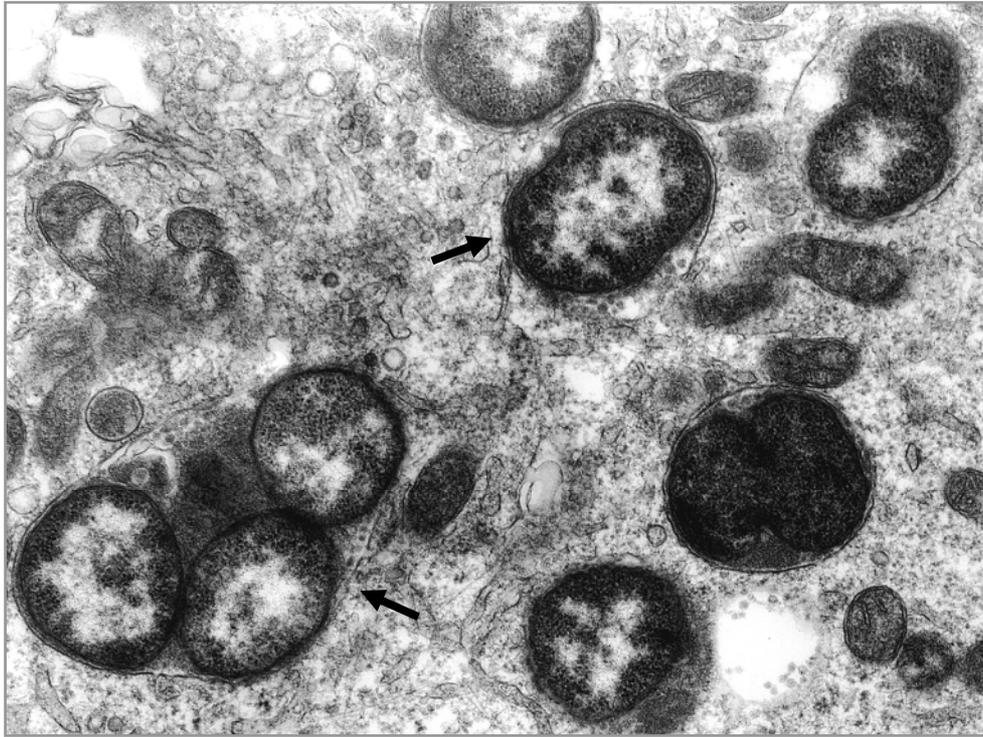
Eine Vielzahl von Faktoren, die in Adhärenz und Invasion der *N. meningitidis* an bzw. in Endothelzellen involviert sind - wie Pili, Opa, Opc, Fibronectin, Vitronectin und Integrine - wurden bereits identifiziert und charakterisiert [Nassif 1999, Unkmeir *et al.* 2002b, Virji *et al.* 1992, 1993, 1994, 1995]. Die durch den initialen Kontakt des Erregers in der Endothelzelle ausgelöste Signalkaskaden und deren Folgereaktionen wie Veränderungen des Zytoskeletts sind noch wenig erforscht. Bei den am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführten Microarray-Studien sind eine Vielzahl nach Kontakt mit Endothel bzw. Epithelzellen transkriptionell aktivierte Neisserien-Gene identifiziert worden [Dietrich *et al.* 2003, Hübner 2004, Kurz *et al.* 2003]. Es konnte u.a. eine Hochregulierung des für eine ADP-Ribosyltransferase kodierenden *narE* Gens (ORF NMB1343) festgestellt werden. Bakterielle Mono-ADP-Ribosyltransferasen spielen häufig als Toxine eine wichtige Rolle in der Pathogenese. Die ADP-Ribosyltransferase NarE zeigt strukturelle Homologien mit hitzelabilem *E. coli* Enterotoxin und Cholera toxin und katalysiert den Transfer von ADP-Ribose auf Arginin-Reste [Massignani *et al.* 2003]. Die Rolle des *narE* Gens in der Pathogenese und die mögliche Bedeutung in der Aktivierung von Signaltransduktionsmechanismen wird diskutiert. In der Literatur ist eine Aktivierung von mitogen-aktivierten Protein(MAP)-Kinasen während der Invasion verschiedener pathogener Erreger in Wirtszellen beschrieben worden [Sokolova *et al.* 2004].

#### **1.2.4 Intrazelluläre Vesikelreifung**

Zahlreiche bakterielle Erreger sind in der Lage, eine einzigartige Form von Phagozytose in nicht professionellen Phagozyten wie Endothel- und Epithelzellen zu induzieren und folglich den entscheidenden Schritt in Richtung Krankheit durch Überwindung protektiver Barrieren des menschlichen Organismus zu erreichen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass *N. meningitidis* sowohl in professionellen als auch in nicht professionellen Phagozyten in einer vesikulären Struktur internalisiert wird [Kolb-Maurer *et al.* 2001, Merz und So 2000, Pujol *et al.* 1997, Stephens *et al.* 1983, Virji *et al.* 1991, Frosch 2003; Schubert-Unkmeir und Krohne, persönliche Mitteilung]. Kenntnisse über das weitere intrazelluläre Schicksal der Meningokokken sind noch sehr gering.

Untersuchungen zu *Citrobacter freundii* haben gezeigt, dass dieser fakultativ pathogene Erreger neonataler Meningitis in der Lage ist, in HBMEC zu invadieren, intrazellulär in einer Vakuole zu überleben und sich dort zu replizieren [Badger *et al.* 1999]. Bei anderen Meningitiserregern wie *E. coli* K1, Streptokokken der Gruppe B und *Streptococcus pneumoniae* ist eine Invasion in Endothel- bzw. Epithelzellen ebenfalls in der Literatur beschrieben worden, eine intrazelluläre Replikation wurde dennoch bisher nicht beobachtet [Gibson *et al.* 1993, Kim 2001, Meier *et al.* 1996, Prasadarao *et al.* 1999, Rubens *et al.* 1992, Ring *et al.* 1998, Xie *et al.* 2004].

Der intrazelluläre Erreger *Salmonella typhimurium* befindet sich in Epithelzellen ebenfalls in einer vesikulären Struktur. Dieses dynamische Organell, *Salmonella containing vacuole* (SCV), akquiriert selektiv spezifische Marker des Endozytosewegs vom frühen Endosom bis zu lysosomalen Glykoproteinen, ohne jedoch direkt mit Lysosomen zu fusionieren [Meresse *et al.* 1999, Steele-Mortimer *et al.* 1999]. Dieses Phänomen ist nicht nur auf intrazelluläre Erreger beschränkt, sondern konnte auch bereits bei dem extrazellulären Pathogen und Erreger neonataler Meningitiden *E. coli* K1 in humanen mikrovaskulären Gehirn-endothelzellen gezeigt werden [Kim *et al.* 2003]. Ob die Vakuole, in der *N. meningitidis* sich intrazellulär befindet, eine ähnliche Reifung durchmacht und ob der Erreger in der Lage ist, den Maturationsprozess aktiv zu modifizieren, ist bislang nicht untersucht worden. Ebenso bleibt noch zu erforschen, ob das Vorhandensein mehrerer Erreger in einer Vakuole Resultat einer simultanen Phagozytose, Verschmelzung der Vesikel oder intravesikulärer Replikation ist (Abb.1.2).



**Abbildung 1.2: Invasive Meningokokken in einer HBMEC-Zelle.**

Meningokokken werden in die HBMEC (*human brain microvascular endothelial cell*) aufgenommen und befinden sich intrazellulär einzeln oder zu mehreren in membranumgebenen phagosomenähnlichen Strukturen (Elektronenmikroskopische Aufnahme von N. Heppel, Dr. A. Schubert-Unkmeir, Prof. Dr. G. Krohne, Würzburg).

### 1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen zwei Fragestellungen. Einerseits sollte die Bedeutung des *narE* Gens in der Pathogenese einer Meningokokken-Infektion erforscht und andererseits das weitere Schicksal der sich intrazellulär befindenden Meningokokken untersucht werden.

In Microarray-Studien konnte eine transkriptionelle Aktivierung des ORF NMB1343 (*narE*) nach Zellkontakt beobachtet werden [Hübner 2004]. Um die Bedeutung dieses für eine ADP-Ribosyltransferase kodierenden *narE* Gens auf Signaltransduktionsmechanismen zu untersuchen, wurden folgende Arbeiten geplant:

- Herstellung und Charakterisierung einer *narE* Insertionsmutante
- Untersuchungen zur Aktivierung von der zu MAP-Kinasen gehörenden *extracellular signal regulated kinase* (ERK) in HBMEC während der Infektionsassays

Die Fähigkeit von *N. meningitidis* an Epithel- und Endothelzellen zu adhären, diese zu invadieren und zu durchqueren deutet auf eine transzelluläre Passage des Erregers durch die Barrieren des menschlichen Körpers hin. Welche intrazelluläre Nische nutzt der Erreger, um ohne Degradation durch die Zelle zu passieren? Es ist zu untersuchen, ob und unter welchen Bedingungen *N. meningitidis* in der Lage ist, in zerebralen Endothelzellen zu überleben und sich möglicherweise zu replizieren. Die biologische Bedeutung der sowohl bei Meningokokken wie bei *E. coli* K1 beobachteten O-Acetylierung des Kapselpolysaccharids ist zum größten Teil ebenfalls noch unklar. Intrazellulär befinden sich Meningokokken in einer membranumgebenen Vakuole. Ist der Erreger in der Lage, die Maturation der *Neisseria containing vacuole* (NCV) zu modifizieren und durch eine selektive Akquirierung von endosomalen Markerproteinen an die NCV in das eigene intrazelluläre Schicksal aktiv einzugreifen?

Um diese Fragen zu beantworten wurden folgende Arbeiten geplant:

- Infektionsversuche zur intrazellulären Replikation der Meningokokken in Epithel- bzw. Endothelzellen in Abhängigkeit der Kapselexpression
- Infektionsversuche zur Untersuchung der Adhärenz und Invasion sowie der intrazellulären Replikation der *E. coli* K1 in Abhängigkeit der O-Acetylierung des Kapselpolysaccharids
- Erforschung der Reifungsprozesse der *Neisseria containing vacuole* (NCV) durch Kolokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Reaktionskits, Enzyme, Puffer und Lösungen

In den Tabellen 2.1 - 2.4 sind die für die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit benötigten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Reaktionskits, Enzyme, Puffer und Lösungen aufgelistet.

**Tabelle 2.1: Geräte.**

Brutschränke	B 5060 EC-CO <sub>2</sub> (Heraeus, Hanau) B 6200 (Heraeus, Hanau)
Elektrophoresekammern	Mini / Maxi Elektrophoresekammer (Roth, Karlsruhe) Sub-Cell <sup>®</sup> GT (Bio-Rad, München)
Elektroporation	Gene Pulser <sup>™</sup> (Bio-Rad, München) Pulse Controller <sup>™</sup> (Bio-Rad, München)
ELISA-Reader	Titertek Multiskan <sup>®</sup> MCC/340 (Labsystems, Vantaa, Finnland)
Filmentwickler	Curix 60 (Agfa, Mortsels, Belgien)
Filmkassette	Kodak X-Omatic regular (Kodak, Rochester, NY, USA)
Gel-Dokumentationsystem	CDM-1002 Monacor (Inter-Mercador, Bremen) Herolab E.A.S.Y 429 K / ICU-1 / UVT-28 MP / RH-5 (Herolab GmbH, Wiesloch) P93E (Mitsubishi, Kyoto, Japan)
Gelkammer (SDS-PAGE)	Minigel-Twin (Biometra, Göttingen) Noras Röntgen- und Medizintechnik (Noras, Würzburg)
Heizblöcke	2099-DA (Liebisch, Bielefeld) BT3 (Grant Instruments Ltd., Cambridge, UK)
Hybridisierungsöfen	DUO-Therm OV5 (Biometra, Göttingen)
Koloniezähler	Colony Counter (Bio, Kobe, Japan)
Magnetrührer	MR 3001 (Heidolph, Schwabach)
Mikroskope / Software	Axio Imager.Z1 mit ApoTome / AxioVision (Carl Zeiss, Göttingen) DM 6000 B / FW 4000 (Leica, Bensheim) TCS-4D / Scanware (Leica, Bensheim) Wilovert <sup>®</sup> (Will-Wetzlar GmbH, Wetzlar)
PCR-Gerät	T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen)
pH-Meter	pH 530 (WTW, Weilheim i. OB)
Photometer	RNA/DNA Calculator GeneQuant pro (Biochrom, Cambridge, UK) U-2000 Spectrophotometer (Hitachi, San Jose, CA, USA)
Pipettierhilfe	Pipetus <sup>®</sup> -Akku (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)

Schüttelinkubatoren	Certomat <sup>®</sup> H / R / U (B. Braun Biotech, Melsungen) G25 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
Schüttler	Duomax 1030 (Heidolph, Schwabach) Phero-Shaker (Biotech Fischer GmbH, Reiskirchen)
Sequenziergerät	ABI Prism <sup>®</sup> 377 DNA Sequencer (AB Applied Biosystems, Perkin Elmer, Weiterstadt)
Spannungsgeräte	Power Supply 1000/500 (Bio-Rad, München) Power Supply 3000Xi (Bio-Rad, München) PowerPac 300 (Bio-Rad, München)
UV Crosslinker	UV Stratalinker <sup>®</sup> 1800 (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande)
Vakuumentrifuge	Speed Vac <sup>®</sup> Plus SC 110 A (Savant, Holbrook, NY, USA)
Vortexer	REAX 2000 (Heidolph, Schwabach)
Waagen	P-1200 (Mettler, Gießen) Sartorius portable (Sartorius, Göttingen)
Waschgerät (ELISA)	Nunc-Immuno Wash I2 (Nunc, Wiesbaden)
Wasserbäder	GFL 1003 (Gesellschaft für Labortechnik, Hannover) WB 22 (Mettler, Schwabach)
Werkbänke	Gelaire <sup>®</sup> BSB 6A (Flow Laboratories, Meckenheim) HERA safe (Heraeus, Hanau)
Western Blot Kammern	Mini Trans-Blot <sup>®</sup> Cell (Bio-Rad, München) Trans-Blot <sup>®</sup> Cell (Bio-Rad, München)
Zählkammer	Neubauer (Brand, Wertheim)
Zellaufschlussgerät	Fast Prep <sup>™</sup> FP120 (Savant, Holbrook, NY, USA)
Zentrifugen	Biofuge fresco (Heraeus, Hanau) Biofuge 15 (Heraeus Hanau) Megafuge 1.0 (Heraeus, Hanau) Megafuge 1.0 R (Heraeus, Hanau) Omnifuge 2.0 RS (Heraeus, Hanau)

**Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien.**

Ambion <sup>®</sup> Inc. RNA Company (Austin, TX, USA)	RNase-Free 1,5 ml Microfuge Tubes
Amersham Biosciences (Freiburg)	Hyperfilm <sup>™</sup> MP Röntgenfilm Quarzküvette GeneQuant (70 µl / 10 mm)
Applied Biosystem (Foster City, CA, USA)	Sequenzierungsgefäße (200 µl)
B. Braun Melsungen AG (Melsungen)	Einmalspritzen und Kanülen
BIO 101 Inc. (La Jolla, CA, USA)	FastRNA Blue Röhrchen
Eppendorf (Hamburg)	0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml Reaktionsgefäße
Eurogentec (Seraing, Belgien)	Elektroporationsküvetten
Greiner (Frickenhausen)	1 ml / 2 ml / 5 ml / 10 ml / 50 ml Pipetten 15 ml / 50 ml Zentrifugenröhrchen
Knittel Gläser (Braunschweig)	Objekträger und Deckgläser
Nunc (Wiesbaden)	Immunoplate Maxisorp U 96 Well Platten Nunclon <sup>™</sup> 24 Well Multischalen Nunclon <sup>™</sup> 75cm <sup>3</sup> Zellkulturflaschen
PALL Gelman Laboratory (Portsmouth, UK)	Biodyne B / Plus Nylon Membrane
Pechiney Plastic Packaging (Darmstadt)	Parafilm "M"
Sarstedt (Nümbrecht)	Halbmikroküvetten
Schleicher & Schuell (Dassel)	Faltenfilter Ø185 mm Gebrauchsfertige Sterilfiltereinheiten Gel-Blotting-Papier Protran <sup>®</sup> Nitrocellulose Transfer Membrane

**Tabelle 2.3: Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme.**

Alle in dieser Tabelle nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.a. Qualität von Merck, AppliChem (Darmstadt) oder Becton Dickinson (Heidelberg) bezogen.

Amersham Biosciences (Freiburg)	ECL Western Blotting Detection System
AppliChem (Darmstadt)	Dimethylsulfoxid (DMSO) Isopropyl-1-thio-β-D-galaktosid (IPTG) X-Gal
Becton Dickinson (Heidelberg)	Bacto <sup>™</sup> Proteose Peptone
Biochrom AG (Berlin)	Instamed PBS Dulbecco (ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> ) Trypsin/EDTA-Lösung in PBS (ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )
bioMérieux (Marcy l'Etoile, Frankreich)	Fluoprep Polyvitex
Bio-Rad (München)	Magermilchpulver
Epicentre Biotechnologies (Madison, WI, USA)	Fast-Link <sup>™</sup> Ligation Kit
Eurogentec (Seraing, Belgien)	SmartLadder
ICN Biochemicals (Cleveland, OH, USA)	2-Mercaptoethanol

Invitrogen (Groningen, Niederlande)	dNTP für cDNA Synthese (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) LB Broth Base (Lennox L Broth Base) Random Primer RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor (recomb.) Superscript II™ RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase TOPO TA Cloning® Kit
Merck (Darmstadt)	Ethidiumbromid Paraformaldehyd
Merck-Schuchhardt (Hohenbrunn)	Tween® 20
MP Biomedicals (Eschwege)	Sodium Dodecyl Sulfate, Ultra Pure (SDS)
New England Biolabs (Frankfurt/Main)	Alkalische Phosphatase (CIP) Bovines Serumalbumin (BSA) Prestained Protein Marker, Broad Range Restriktionsendonukleasen: <i>SspI</i> / <i>EcoRI</i> / <i>StuI</i> T4 DNA-Ligase <i>Taq</i> DNA Polymerase
Promega (Madison, WI, USA)	DNA-Polymerase I Large (Klenow) Fragment dNTP für PCR (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
QIAGEN (Hilden)	QIAGEN® Genomic-tip 100 QIAGEN® Plasmid Midi Kit QIAprep® Spin Miniprep Kit QIAquick® Gel Extraction Kit QIAquick® PCR Purification Kit RNeasy® Mini Kit
Riedel-de Haën (Seelze)	Triton® X-100
Roche Diagnostics (Mannheim)	ABTS Tabletten DIG DNA Labeling Kit DIG Luminescent Detection Kit DNA Molecular Weight Marker III (DIG-labeled) DNase I, RNase-free
Roth, Carl GmbH (Karlsruhe)	Agarose NEEQ Ultra-Qualität Ammoniumperoxodisulfat (APS) Glycerin Glycin Polyacrylamid 30% TEMED
SERVA (Heidelberg)	Gelatine Lysozym Saponin
Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)	Glutaraldehyd Poly-D-Lysin Trizma® base

**Tabelle 2.4 Puffer und Lösungen.**

DEPC-H <sub>2</sub> O (RNase-freies Wasser)	250 ml H <sub>2</sub> O 250 µl DEPC Inkubation über Nacht bei 37°C 2x autoklavieren
Elektrophoresepuffer (SDS-Acrylamidgel-Elektrophorese)	4,8 g Tris 11,6 g Glycin 8 ml 10% SDS 800 ml H <sub>2</sub> O
10 x Gelladungspuffer (Agarosegel-Elektrophorese)	50 % Glycerin 1 mM EDTA 0,4 % Bromphenolblau
10 x MOPS	0,4 M MOPS 0,1 M Natriumacetat 10 mM EDTA (pH 8,0) pH 7,0 (Einstellung mit NaOH) Lagerung lichtgeschützt
5 x RNA Gelladungspuffer	5 ml 50% Formamid 1,65 ml 2,2 M Formaldehyd 500 µl 1 x MOPS 1 ml 1/10 Volumen Ficoll 1-10% 2 ml 0,02% Bromphenolblau
3 x SDS-Stopp-Puffer	200 mM Tris/HCl (pH 6,7) 15 % Glycerin 6 % SDS 0,03 % Bromphenolblau 10 % 2-Mercaptoethanol
20 x SSC (pH 7,0)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
10 x TAE	400 mM Tris/HCl (pH 8,0) 200 mM Natriumacetat 20 mM EDTA (pH 8,0)
1 x TBS	50 mM Tris (pH 8,0) 150 mM NaCl
1 x TE	10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0)
Western Blot Puffer	9,1 g Tris 43,5 g Glycin 2400 ml H <sub>2</sub> O 600 ml Methanol

## 2.1.2 Kultur von Bakterien

### 2.1.2.1 Bakterienstämme

#### *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

F<sup>-</sup> *endA1 hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>-</sup>) *supE44 thi-1  $\lambda$ <sup>-</sup> recA1 gyrA1 relA1  $\Delta$ (lacIZYA-argF)* U169 *deoR*  $\Phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15

#### *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene)

$\Delta$ (*mcrA*) 183  $\Delta$ (*mcrBC-hsdSMR-mrr*) 173 *endA1supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proAB lac<sup>f</sup>Z* $\Delta$ M15 Tn5(Kan<sup>R</sup>)]

#### *Escherichia coli* A247

Der phasenvariable *E. coli* A247 (ST-95) ist ein klinisches Isolat (Appendizitis) aus Schweden (1943), klassifiziert O18 : H7 : K1 und zur Verfügung gestellt von M. Achtman (MPI für Infektionsbiologie, Berlin).

#### *Escherichia coli* A160

Der nicht acetylierte *E. coli* A160 (ST-141) ist ein klinisches Isolat (Harnwegsinfektion) aus Finnland, klassifiziert O2 : H6 : K1 und zur Verfügung gestellt von M. Achtman (MPI für Infektionsbiologie, Berlin).

#### *Escherichia coli* A160::p4A

A160::p4A ist eine konstitutiv acetylierte Mutante des klinischen Isolats *E. coli* A160, in dem ein *E. coli* K1 Kapsel-O-Acetyltransferase enthaltendes Plasmid kloniert worden ist (institutseigener Stammsammlung, Publikation in Vorbereitung).

#### *Neisseria meningitidis* MC58

MC58 ist ein klinisches Isolat des ST-32 (früher ET-5) Komplexes aus Großbritannien (1983), klassifiziert B : 15 : P1.7,16 und zur Verfügung gestellt von E. R. Moxon (Oxford, UK) [Unkmeir *et al.* 2002b].

#### *Neisseria meningitidis* MC58\*

MC58\* ist eine konstitutiv bekapselte Mutante des klinischen Serogruppe B-Isolats MC58. Der (dC)7 Abschnitt im *siaD* Gen wurde durch die Sequenz CCGCCTC ersetzt, ohne die Aminosäuresequenz der Polysialyltransferase zu verändern. Dies führte zur konstanten Expression der Polysaccharidkapsel [Hammerschmidt *et al.* 1996, Unkmeir *et al.* 2002b].

*Neisseria meningitidis* MC58 *siaD*

MC58 *siaD* ist eine konstitutiv unbekapselte Mutante des klinischen Serogruppe B-Isolats MC58. Die Inaktivierung des für die  $\alpha$ -2,8 Polysialyltransferase kodierenden *siaD* Gens erfolgte durch Insertion einer Antibiotikaresistenzkassette mit Verlust der Fähigkeit zur Kapselexpression [Unkmeir *et al.* 2002b].

**2.1.2.2 Nährmedien**

Zur Bakterienanzucht wurden flüssige und feste Nährmedien unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet (Tabelle 2.5).

**Tabelle 2.5: Nährmedien.**

PPM-Medium (pH 7,8)	1,5 %	Proteose-Pepton
	0,5 %	NaCl
	0,05 %	Stärke
	0,4 %	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,1 %	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PPM <sup>+</sup> (supplementiert)	PPM-Medium plus:	
	0,01 M	MgCl <sub>2</sub>
	0,042 %	NaHCO <sub>3</sub>
	1 %	Polyvitex (v/v)
GC-Agar (pH 7,2)	1,5 %	Proteose-Pepton
	0,1 %	Stärke
	0,4 %	KPO <sub>4</sub>
	0,5 %	NaCl
	1,0 %	Bacto-Agar
LB-Medium (pH 7,5)	1,0 %	Bacto-Trypton
	0,5 %	Hefeextrakt
	1,0 %	NaCl
LB-Agar	LB-Medium plus 1,5% Bacto-Agar	
SOC-Medium	2 %	Bacto-Trypton
	0,5 %	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	20 mM	Glucose
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	MgSO <sub>4</sub>
X-Gal Platten	200 ml	LB-Agar
	200 $\mu$ l	X-Gal
	(8 mg X-Gal auf 200 $\mu$ l Dimethylformamid)	
	100 $\mu$ l	IPTG
	(18 mg IPTG auf 200 $\mu$ l H <sub>2</sub> O)	

Einfriermedium	400	ml	Standard I Nährbouillon
	100	ml	Glycerin

### 2.1.2.3 Kulturbedingungen

Inkubationen erfolgten bei 37°C und einer CO<sub>2</sub> Konzentration von 5%. Neisserien wurden über Nacht auf GC-Agar oder in PPM<sup>+</sup>-Medium, jeweils mit Polyvitex supplementiert, inkubiert. Kulturen von *E. coli* wurden auf LB-Agar oder in LB-Medium angelegt und ebenfalls über Nacht inkubiert. Bei rekombinanten Bakterienstämmen wurde dem jeweiligen Medium das für die Selektion notwendige Antibiotikum zugesetzt. Gefrierkulturen wurden angefertigt und bei -80°C gelagert.

### 2.1.2.4 Zusatz von Antibiotika

Antibiotika wurden den jeweiligen Nährmedien bei Infektionsversuchen und Klonierungen in den in der Tabelle 2.6 verzeichneten Konzentrationen zugesetzt.

**Tabelle 2.6: Zusatz von Antibiotika.**

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>N. meningitidis</i>	<i>gentamicin protection assay</i>
Ampicillin (Grünenthal, Aachen)	100 µg / ml	-	-
Gentamycin (Biochrom, Berlin)	-	-	200 µg / ml
Spectinomycin (Sigma, Steinheim)	40 µg / ml	75 µg / ml	-

## 2.1.3 Zellkultur

### 2.1.3.1 Zelllinien

HBMEC (*human brain microvascular endothelial cells*) sind humane Kapillarendothelzellen, die aus kleinen zerebralen Kortexfragmenten nach chirurgischen Eingriffen isoliert worden sind. Sie zeigen eine selektive Expression von Zelladhäsionsmolekülen, die sich von makrovaskulärer Endothelzellen unterscheidet und sind positiv u.a. für:

- Faktor VIII-Rag
- Carboanhydrase IV
- Ulex Europeus Agglutinin I
- Aufnahme von acetylierten LDL (*low density lipoprotein*)
- Expression von Gammaglutamyl-Transpeptidase (GGTP)

Die HBMEC wurden zur Verlängerung der Lebensdauer und Erhaltung spezifischer Eigenschaften der Gehirndothelzellen mit *simian virus 40 large T antigen* (SV40-LT) transfiziert [Stins *et al.* 2001].

### HEp-2

HEp-2 Zellen sind humane Epithelzellen aus einem epidermoiden Larynxkarzinom [ATCC CCL-23].

#### 2.1.3.2 Nährmedien

HBMEC-Medium:

	RPMI 1640 (mit 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> und L-Glutamin)	(Biochrom, Berlin)
10 %	FCS (fetales Kälberserum)	(Biochrom, Berlin)
10 %	Nu-Serum	(BD, Bedford, USA)
2 mM	L-Glutamin	(Biochrom, Berlin)
5 U/ml	Heparin	(Biochrom, Berlin)
1 mM	Na-Pyruvat	(Biochrom, Berlin)
1 %	MEM-Vitamine	(Biochrom, Berlin)
30 µg/ml	ECGS (Endothelzellwachstumsfaktor)	(CellSystems® Biotechnologie Vertrieb, St. Katharinen)

HEp-2 Medium:

	RPMI 1640 (mit 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> und L-Glutamin)	(Biochrom, Berlin)
10 %	FCS	(Biochrom, Berlin)

2 x Einfriermedium:

	RPMI 1640 (mit 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> und L-Glutamin)	(Biochrom, Berlin)
30 %	FCS	(Biochrom, Berlin)
20 %	DMSO	(AppliChem, Darmstadt)

#### 2.1.4 Plasmidvektoren

pHP45Ω ist ein Derivat von pKTH604, mit dem omega (Ω) Element aus R100.1 und synthetischen Polylinkern von pBR322. Das symmetrische Ω Fragment enthält ein Spectinomycin-Resistenzgen, flankiert von kurzen sich wiederholenden Sequenzen mit Signalen für die Termination der Translation.

pCR®II-TOPO® (Invitrogen) ist ein linearisierter Vektor mit 3'-Thymidin-Überhängen zur Klonierung von PCR-Produkten mit 3'-Adenosin-Überhängen. Charakterisierung des

Vektors: f1 *ori*, pUC *ori*, *lacZ*, multiple Klonierungsregion (MCS) flankiert vom T7-RNA-Promoter und Sp6 Promotor, Amp<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup>.

pTL1 [Unkmeir *et al.*, 2002a] ist ein Derivat des pBluescript Vektors (Invitrogen, Groningen, Niederlande), das über eine *Neisseria uptake* Sequenz (5'- TCG AGA AGT CTG CCG -3') verfügt. Diese ist in die *SacI*-Schnittstelle kloniert und liefert die Voraussetzung für eine erfolgreiche Transformation in Meningokokken. Das im Vektor enthaltene Ampicillin-Resistenzgen ermöglicht eine antibiotische Selektion.

### 2.1.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

Primer für das <i>narE</i> Gen (ORF NMB 1343)		n*	T <sub>m</sub> **	Produktgröße
<i>narE</i> F:	5'- AAA TAA AAC ATC CCT CTC AAG C -3'	22	60°C	549 bp
<i>narE</i> R:	5'- TTT ATA TTG ACC TTT CAA CTT -3'	21	52°C	

Primer für die Spectinomycin-Resistenzkassette aus pHP45Ω		n*	T <sub>m</sub> **	Produktgröße
smr-fwd:	5'- TTA TTT GCC GAC TAC CTT GGT -3'	21	56°C	1011 bp
smr-rev:	5'- ATG CGC TCA CGC AAC TGG T -3'	19	60°C	

Primer für den Vektor pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup>		n*	T <sub>m</sub> **	Produktgröße
M13 F:	5'- GTA AAA CGA CGG CCA G -3'	16	50°C	244 bp
M13 R:	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'	17	50°C	

Primer für den Vektor pTL1		n*	T <sub>m</sub> **	Produktgröße
329:	5'- ACC ATG ATT ACG CCA AGC G -3'	19	58°C	191 bp
KB9:	5'- AAT ACG ACT CAC TAT AGG GC -3'	20	58°C	

\*Länge des Oligonukleotids in Basen

\*\* Die Errechnung der Schmelztemperatur:  $T_m = 4 \times (\text{Anzahl G} + \text{C}) + 2 \times (\text{Anzahl A} + \text{T})$

### 2.1.6 Antikörper

#### 2.1.6.1 Antikörper für Kapselpolysaccharid-ELISA

- mAb 735 monoklonaler IgG<sub>2a</sub> Maus-Antikörper gegen das Kapselpolysaccharid der Serogruppe B Meningokokken [Frosch *et al.* 1985]
- Anti-Maus IgG+M (H+L)-Pox Konjugat (Dianova, Hamburg)

### 2.1.6.2 Antikörper für Western Blot

- Opa: 4B12/C11 IgG<sub>2</sub>-AK (G. Morelli, MPIMG1-Referenzzentrum, Berlin)
- Opc: mAb 306 IgG<sub>1</sub>-AK (G. Morelli, MPIMG1-Referenzzentrum, Berlin)
- Pili: mAb SM1 (M. Virji, Department of Pathology and Microbiology, Bristol, UK)
- Anti-Maus IgG+M (H+L)-AP Konjugat (Dianova, Hamburg)
  
- Mouse IgG<sub>1</sub> ERK1/2 (pT202/pY204) Phospho-Specific
- Mouse IgG<sub>2a</sub> ERK (pan ERK) (BD Biosciences, USA)
- Blotting Grade Affinity Purified Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate (Bio-Rad, München)

### 2.1.6.3 Antikörper für den dreifachen Immunfluoreszenz-Test (IFT-III)

- Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Aussenmembranproteine der Meningokokken (OMP) (Eigenherstellung)
- Ab2900 polyclonal rabbit IgG anti-EEA1 (Early Endosomal Antigen 1) (Abcam Limited, Cambridge, UK)
- Mouse IgG1k anti-human CD107a (Lamp-1) clone H4A3 (Research Diagnostics, Inc., Flanders, New Jersey, USA)
- Mouse IgG<sub>1</sub> anti-human Transferrin Receptor (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, California, USA)
- Rabbit polyclonal antibody Rab-7 (H-50): sc-10767 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)
- MAB 422 Mouse IgG<sub>2b</sub> anti-human Cathepsin-D monoclonal antibody (Chemicon International, Temecula, California, USA)
- Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG (H+L)
- Rhodamine (TRITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti Mouse/Rabbit IgG (H+L)
- Cy<sup>TM</sup>5-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG (H+L) (Dianova / Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA)
- Isotyp-Kontrolle: Purified rabbit IgG isolated from pooled normal rabbit serum (Sigma-Aldrich, Steinheim)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) dient der gezielten Amplifizierung von Nukleinsäureabschnitten. Die Methode nutzt die 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität des hitzestabilen Enzyms *Taq* DNA Polymerase. Die wiederholten Schritte der Denaturierung der Doppelstrang-DNA, Anlagerung der Oligonukleotide und deren Verlängerung an den vorliegenden freien 3'-OH-Enden führen zur exponentiellen Vervielfältigung des gewünschten Abschnittes. Die optimale Annealingtemperatur ist von den verwendeten Primern und die Elongationszeit von der zu erwartenden Produktgröße abhängig. Für die Klonierung der *narE* Mutanten wurden die unter 2.1.5 aufgelisteten Oligonukleotide wie folgt eingesetzt:

Reaktionsansatz (50 µl)	
5,0	µl 10 x ThermoPol Puffer
2,5	µl 4 mM dNTP
0,5	µl Primer <i>forward</i> (100 pmol)
0,5	µl Primer <i>reverse</i> (100 pmol)
0,25	µl <i>Taq</i> DNA Polymerase
40,75	µl H <sub>2</sub> O

Reaktionsablauf:

Schritte	Temperatur	Zeit
1 Initiale Denaturierung	94°C	5 min
2 Denaturierung	94°C	45 s
3 Annealing	$T_m^* - 5^\circ\text{C}$	1 min
4 Elongation	72°C	1 min - 1 min 30 s
5 Finale Elongation	72°C	5 min
6 Abkühlung	4°C	∞

\*Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) wurde nach der folgenden Gleichung errechnet:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G} + \text{C}) + 2 \times (\text{Anzahl A} + \text{T})$$

Anschließend wurden die erhaltenen PCR-Amplifikate zur Überprüfung der Qualität und Quantität auf ein Agarosegel aufgetragen oder für weitere Verwendung mit *QIAquick*<sup>®</sup> *PCR Purification Kit* aufgereinigt.

## 2.2.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe erfolgte mit der horizontalen Agarosegel-Elektrophorese. Je nach Fragmentlänge kam eine Agarosekonzentration von 1-2% zum Einsatz. Zur Herstellung des Gels wurde eine zuvor abgewogene Menge Agarose mit dem entsprechenden Volumen 1 x TAE versetzt, in der Mikrowelle aufgeköcht, in einem horizontalen Gelschlitten gegossen und mit einem Kamm versehen. Die mit 10 x Gelladungspuffer versetzten Proben wurden neben dem Größenmarker (*SmartLadder*) in die Taschen des fest gewordenen Gels aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1 x TAE und die Spannung lag je nach Gelkammer bei 100-200 V. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel für 15-30 Minuten in ein Ethidiumbromid-Bad (350 µl / l H<sub>2</sub>O) gelegt, unter UV-Licht betrachtet und dokumentiert.

## 2.2.3 DNA-Präparation

### 2.2.3.1 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmidisolierung wurde mit *QIAGEN® Plasmid Midi Kit* unter Verwendung der mitgelieferten Pufferlösungen durchgeführt. Die Methode basiert auf modifizierter alkalischer Lyse der Bakterien, Präzipitation und Herausfiltern chromosomaler DNA und selektiver Bindung der Plasmid-DNA an Anionenaustauschersäulen.

Bakterien einer Übernachtskultur wurden 15 min bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands erfolgte die Resuspension des Pellets in 4 ml Puffer P1. Zur Lyse wurden 4 ml Puffer P2 hinzugefügt, durch vorsichtiges Schwenken gemischt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml Puffer P3 und 15 min Inkubation auf Eis bildete sich ein weißer Niederschlag aus präzipitierter zellwandständiger chromosomaler DNA, anderen Zellbestandteilen und denaturierter Proteine. Das Präzipitat wurde durch Filtrieren entfernt und der Durchfluss auf eine mit 4 ml Puffer QBT equilibrierte *QIAGEN-tip 100* Säule gegeben. Die optimale Salzkonzentration und der optimale pH-Wert ermöglichten eine spezifische Bindung der DNA an die Säule, während RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen die Säule passierten und durch 2 x Waschen mit 10 ml Puffer QC vollständig entfernt wurden. Die Eluierung der Plasmid-DNA erfolgte mit 5 ml Puffer QF. Das Eluat wurde mit 3,5 ml Isopropanol gefällt und 30 min bei 15000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und der Isopropanol und die restlichen Salze durch Waschen mit 2 ml 70% Ethanol und 10 min Zentrifugieren bei 15000 x g entfernt. Anschließend wurde das DNA-Pellet in der *Speed Vac* getrocknet und in 100 µl Wasser aufgenommen.

Überprüfung der Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA erfolgte auf einem Agarosegel bzw. mittels Spektrophotometrie (2.2.5).

### 2.2.3.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation geringer Mengen (5-15 µg) Plasmid-DNA wurde das *QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit* verwendet. Nach alkalischer Lyse der Bakterien kommt es zur selektiven vom pH-Wert und Salzkonzentration der Puffer abhängigen Bindung von DNA an Silikagel-Membran der *QIAprep<sup>®</sup> Spin* Säulchen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 18000 x g.

Bakterien aus einer 1-5 ml Übernachtskultur wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Lysispuffer P2, vorsichtigem Mischen, 350 µl Puffer N3 und erneutem Mischen kam es zur Präzipitation genomischer DNA, Proteine und Zelltrümmer. Die Probe wurde 10 min abzentrifugiert und der Überstand mit der Plasmid-DNA auf ein *QIAprep<sup>®</sup> Spin* Säulchen gegeben und 60 s zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 750 µl Puffer PE und Entfernung dessen durch zwei weitere Zentrifugationsschritte erfolgte die Eluierung der Plasmid-DNA mit Wasser. Zur Beurteilung der Quantität und Qualität kamen Agarosegel-Elektrophorese und Spektrophotometrie zum Einsatz.

### 2.2.3.3 Präparation genomischer DNA

Isolierung genomischer DNA aus Meningokokken erfolgte mit *QIAGEN<sup>®</sup> Genomic-tip 100*. Pelletierte Bakterien einer Übernachtskultur wurden vorsichtig mit Hilfe von RNase, Lysozym, Proteinase K, Puffer B1 und B2 lysiert, die RNA verdaut und Proteine denaturiert. Danach folgte die Bindung der chromosomalen DNA an die mit dem Puffer QBT äquilibrierte Anionenaustauschersäule. Waschen, Eluierung und Konzentration der DNA wurden wie bei der Midi-Präparation von Plasmid-DNA durchgeführt (2.2.3.1).

### 2.2.3.4 Isolierung von DNA aus PCR-Ansätzen und aus Agarosegelen

Die Aufreinigung der DNA-Fragmente nach PCR und anderer enzymatischen Reaktionen erfolgte mit dem *QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit*. Für die Isolierung der DNA aus Agarosegelen kam der *QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit* zum Einsatz. Beide Verfahren beruhen ebenfalls auf einer selektiven, vom pH-Wert und Salzkonzentration der Puffer abhängigen Bindung der DNA an eine Silikagel-Membran, während Primer, lose Nukleotide, Enzyme und Salze herausgewaschen werden. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 18000 x g.

PCR-Ansätze wurden mit 5 x Volumen Puffer PB versetzt, gemischt und auf eine *QIAquick* Säule überführt, 60 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach dem Waschen der Säule mit 750 µl Puffer PE und 2 x 60 s Zentrifugation erfolgte die Eluierung mit 50 µl Wasser.

Zur Isolierung von DNA aus einem Agarosegel wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten, mit 3 x Volumen Puffer QC versetzt, 10 min bei 50°C inkubiert, anschließend mit 1 x Volumen Isopropanol gefällt, gut gemischt und ebenfalls auf eine *QIAquick* Säule überführt. Das weitere Vorgehen war identisch mit dem der Aufreinigung von PCR-Ansätzen.

## 2.2.4 RNA-Präparation

### 2.2.4.1 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA aus Meningokokken kam die *RNeasy® Mini Kit* zum Einsatz. Bakterien einer über Nacht bebrüteten Agarplatte wurden in supplementierten PPM-Medium bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bei 37°C und 200 rpm schüttelnd inkubiert. Einem anschließenden Zentrifugationsschritt folgte die Lyse der Bakterienzellen und die Homogenisierung der Probe in *FastRNA Blue* Röhrchen im *FastPrep* Zellaufschlussgerät. Die Anwesenheit von hochdenaturierenden Guanidin-isothiocyanat (GITC) sorgte für die sofortige Inaktivierung der RNasen. Ein Zusatz von Ethanol schaffte optimale Bedingungen für die Bindung von RNA an die *RNeasy mini spin* Säulchen. Diese sind mit Silikagel-Membranen ausgestattet, die RNA spezifisch binden können, während Kontaminationen durch Wasch- und Zentrifugationsschritten eliminiert werden. Die RNA wurde mit RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert und einem DNase-Verdau unterzogen. Die Abwesenheit von DNA wurde durch PCR mit *narE* F/R überprüft und Quantität und Qualität der RNA photometrisch (2.2.5) beziehungsweise mittels denaturierender Agarosegel-Elektrophorese (2.2.4.3) bestimmt.

### 2.2.4.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Ansatz		
2	µg	RNA
6	µl	<i>random primer</i>
8	µl	DEPC-H <sub>2</sub> O

Mastermix 6x		
60	µl	5 mM dNTP
6	µl	0,1 M Dithiothreitol (DTT)
120	µl	Erststrang Puffer
144	µl	DEPC-H <sub>2</sub> O
15	µl	RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor (recomb.)
15	µl	Superscript II™ RNase H <sup>-</sup> Reverse Transkriptase

Bei der reversen Transkription wird aus einer Template-RNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA Polymerase (Reverse Transkriptase) DNA synthetisiert. Um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen, wurde die in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommene RNA für 5 min bei 70°C in Anwesenheit zufälliger Hexamerprimer inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Hybridisierung dieser Hexanukleotide mit der Template-RNA fand während der Abkühlung der Probe statt. Für die anschließende DNA-Synthese wurde die Probe mit Puffer, Nukleotiden, RNase-Inhibitor und Reverse Transkriptase versehen und 2 Stunden bei 42°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch eine Hitzeinaktivierung bei 70°C gestoppt und die cDNA mit *PCR Purification Kit* aufgereinigt. Zur Analyse der konstruierten Mutanten wurde die cDNA als Template für RT-PCR mit den genspezifischen Primern verwendet.

#### 2.2.4.3 Denaturierende Gelelektrophorese

Agarosegel		
1	g	Agarose
72	ml	DEPC-H <sub>2</sub> O
5	ml	10 x MOPS
Kochen und nach dem Abkühlen hinzufügen:		
40	µl	1 M GITC
8,7	ml	DEPC-H <sub>2</sub> O
7,5	µl	Ethidiumbromid

Die elektrophoretische Auftrennung der einzelsträngigen mRNA wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, um die Hybridisierung dieser mit sich selbst zu verhindern. Die RNA-Probe wurde 1:4 mit 5 x RNA Gelladungspuffer versetzt, 15 Minuten bei 65°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS Puffer.

#### 2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Quantifizierung der DNA und RNA erfolgte über die photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Nucleinsäurekonzentration errechnet sich aus der OD<sub>260nm</sub>, der Verdünnung der Probe und einem jeweils für DNA, RNA bzw. Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor. Außerdem erhält man aus dem Verhältnis OD<sub>260nm</sub> / OD<sub>280nm</sub> eine Aussage über die Reinheit der Probe.

Die Quantifizierung sehr geringer Mengen an DNA wurde mit Hilfe von Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Die Abschätzung der DNA-Konzentration erfolgte durch

den visuellen Vergleich der Bandintensitäten der Probe und einem bekannten Größenmarker.

## 2.2.6 Klonierungsmethoden

### 2.2.6.1 Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Einsatz aller verwendeten Restriktionsenzyme erfolgte in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern. Zur Spaltung von Plasmid-DNA wurden 1-2 *Units* Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNA verwendet und der Ansatz in einem Reaktionsvolumen von 30  $\mu\text{l}$  für 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Spaltung chromosomaler DNA wurden 30-40 *Units* pro  $\mu\text{g}$  DNA über Nacht bei 37°C inkubiert. Um die inhibitorischen Wirkung von Glycerin zu minimieren, wurde maximal 1  $\mu\text{l}$  Enzym auf 10  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz eingesetzt. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 10 x Gelladungspuffer beendet.

### 2.2.6.2 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren

Wird ein Plasmidvektor an einer Stelle mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten, entstehen zwei kompatible Enden, die miteinander wieder ligieren können. Um die Selbstligation zu verhindern, wurde im Anschluss an den Verdau, Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestine phosphatase*, CIP) dephosphoryliert und dabei die für die Ligation notwendigen Phosphatreste an den 5'-Enden der DNA-Fragmente entfernt. Die Inaktivierung der CIP erfolgte durch Hitzeinaktivierung für 30 min bei 70°C oder durch Aufreinigung mit dem *PCR Purification Kit*.

### 2.2.6.3 Auffüllen und Abbau überhängender 5'- und 3'-DNA-Enden

Bei Abwesenheit geeigneter Schnittstellen für die Klonierung wurden überhängende Fragmentenden geglättet und so die Ligation in einem beliebigen Vektor mit glatten, dephosphorylierten Enden ermöglicht. Die DNA wurde mit Nukleotiden, Puffer und dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I inkubiert. Das Enzym besitzt neben der 5'-3'-Polymeraseaktivität auch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität und es kommt zum gleichzeitigen Auffüllen bzw. Abbau der 5'- und 3'-Überhänge. Die Reaktion wurde anschließend durch die Aufreinigung mit *PCR Purification Kit* zum Stillstand gebracht.

### 2.2.6.4 Ligation

Der Einbau von DNA-Fragmenten in Vektoren erfolgte mit Hilfe von T4 DNA Ligase unter Zusatz von ATP. Das Enzym katalysiert die Verknüpfung zwischen einer 3'-Hydroxyl- und einer 5'-Phosphatgruppe zu einer Phosphodiesterbindung. Es wurden 200 ng Vektor

eingesetzt und ein äquimolares Verhältnis von Vektor zu klonierendem DNA-Fragment bei Ligationen mit kohäsiven komplementären (*sticky*) Enden gewählt, während es für stumpfendige (*blunt end*) Ligationen 1:3 bzw. 1:5 betrug. Um die Effizienz der *blunt end*-Ligationen zu steigern wurde 5 mM MgCl<sub>2</sub> hinzugefügt, der Ansatz über Nacht bei RT inkubiert und anschließend mit *PCR Purification Kit* aufgereinigt.

Variation 1: Klonierungen mit *TOPO TA Cloning*<sup>®</sup> *Kit* erfolgten durch 10 min Inkubation bei RT und sofortiger Transformation durch Elektroporation.

Variation 2: Für Ligationen in den pTL1-Vektor kam der *Fast Link Ligation Kit* zum Einsatz, die Inkubationszeit betrug 15 Minuten bei RT und die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch 15 min Inkubation bei 70°C.

## **2.2.7 Transformation von Bakterien**

Als Transformationskompetenz wird die Fähigkeit von Bakterien bezeichnet, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Im Gegensatz zu natürlich kompetenten Neisserien gilt *E. coli* als inkompetent. Die Kompetenz lässt sich jedoch kurzzeitig durch elektrische Pulse hoher Feldstärke herstellen (Elektroporation). Diese öffnen Poren in der Plasmamembran, durch die DNA-Moleküle in die Zelle gelangen können.

### **2.2.7.1 Transformation von *Escherichia coli* durch Elektroporation**

Für die Elektroporation wurden 2 µl zuvor aufgereinigter und konzentrierter DNA-Lösung auf 50 µl kompetente Bakterien gegeben und die Mischung in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Einstellungen am Elektroporationsgerät betragen: 400 Ω / 25 µF / 2,5 kV und die resultierende Zeitkonstante zwischen 8 und 9. Die Bakterien wurden sofort in SOC-Medium aufgenommen, für eine Stunde bei 37°C geschüttelt, in geeigneter Verdünnung auf selektive LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert [Dower *et al.* 1988].

### **2.2.7.2 Selektion transformierter Klone**

Zur Selektion von Klonen, die sowohl den Vektor als auch das gewünschte DNA-Fragment beinhalten, wurde die Blau-weiß-Selektion verwendet. Besitzt der Vektor das *lacZ*-Gen, das für das inaktive N-terminale α-Fragment des Enzyms β-Galaktosidase kodiert und exprimiert der Bakterienstamm das ebenfalls inaktive C-terminale ω-Fragment des selben Enzyms, kommt es bei der Transformation zur α-Komplementation und Wiederherstellung der Enzymaktivität. Folglich wandelt das

aktive Enzym  $\beta$ -Galaktosidase das farblose Substrat X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid) in ein blaues Produkt um, das die entsprechenden Kolonien ebenfalls blau anfärbt. Wurde das *lacZ*-Gen durch die Insertion eines DNA-Fragments zerstört, bleiben die Klone nach Inkubation mit X-Gal und IPTG jedoch weiß. Für die effiziente Expression des *lacZ*-Gens wird IPTG (Isopropylthiogalaktosid) als Induktor benötigt.

### 2.2.7.3 Transformation von *Neisseria meningitidis*

Meningokokken weisen eine natürliche Transformationskompetenz auf, die sie befähigt, DNA in jeder Wachstumsphase aus dem extrazellulären Medium aufzunehmen. Der Einbau der Fremd-DNA in die genomische DNA erfolgt durch homologe Rekombination. Bakterien aus einer frischen Übernachtskultur wurden in supplementiertem PPM-Medium für eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die OD<sub>600nm</sub> auf 0,1 eingestellt, 1 ml Bakteriensuspension mit 1  $\mu$ g Plasmid versetzt und der Ansatz für weitere 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden auf selektive GC-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert [Frosch *et al.* 1990].

## 2.2.8 DNA-Hybridisierung

### 2.2.8.1 Markierung spezifischer DNA-Sonden mit Digoxigenin (DIG)

Für die DNA-Hybridisierung wurde eine Digoxigenin markierte Sonde mit *DIG DNA Labeling Kit* hergestellt. Nach der PCR-Amplifizierung und Aufreinigung des gewünschten DNA-Abschnittes erfolgte die Markierung mit der *random priming* Methode. Dabei wird die doppelsträngige Template DNA zuerst hitzedenaturiert und mit zufälligen Hexanukleotiden (*random primers*) hybridisiert. Das sich im Ansatz befindende Klenow Fragment der DNA-Polymerase I benutzt die 3'OH-Enden dieser Zufallshexamere als Primer zur Bildung des Komplementärstranges, wobei es zum Einbau von DIG-11-dUTP kommt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die Reaktion gestoppt, die markierte DNA durch Ethanol-fällung mit Natriumacetat von nicht eingebauten Nukleotiden getrennt, konzentriert und in 1 x TE-Puffer aufgenommen.

Die semi-quantitative Messung der Ausbeute erfolgte mittels *Dot Blot*. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe der Sonde und einer Kontroll-DNA hergestellt, diese auf eine positiv geladene Nylonmembran pipettiert und durch Bestrahlung mit UV-Licht (*UV-crosslinking*) kovalent an die Membran gebunden. Der DIG-Nachweis erfolgte wie unter 2.2.8.4 beschrieben. Die Konzentration der DNA-Sonde im Markierungsansatz konnte durch den visuellen Vergleich der Intensitäten der beiden Verdünnungsreihen ermittelt werden.

### 2.2.8.2 Southern Blot

Ziel des Southern Blots ist es, zuvor elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine Membran zu transferieren, zu fixieren und anschließend diese durch Hybridisierung mit markierten Sonden spezifisch nachzuweisen.

Die DNA wurde zuerst mit Restriktionsendonukleasen verdaut und auf ein 0,8% Agarosegel zusammen mit DIG-markiertem DNA-Größenstandard III aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit 0,25 M HCl vorbehandelt, die eine partielle Depurinierung und Fragmentierung der DNA hervorruft. Danach erfolgte eine Denaturierung mit 0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl und eine Neutralisierung mit 0,5 M Tris HCl pH 7,0 / 1,5 M NaCl.

Der Transferstapel wurde mit einer in den Hochsalzpuffer (10 x SSC) hineinragenden Filterpapierbrücke aufgebaut und anschließend mit einem Gewicht (200-400 g) versehen. Der Transfer durch Kapillarkräfte war nach 2,5 Stunden bei Raumtemperatur abgeschlossen und die Fixierung auf Membran erfolgte mittels *UV-crosslinking* (100 mJ).

### 2.2.8.3 Hybridisierung mit DIG-markierter DNA-Sonde

<i>High SDS Puffer</i>	
10,5 g	SDS
75 ml	Formamid
37,5 ml	20x SDS
7,5 ml	1 M PO <sub>4</sub> ( $\frac{3}{4}$ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und $\frac{1}{4}$ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,5)
1,5 ml	Sarkosin
30 ml	10% Blockingreagenz

Die Nylonmembran mit der darauf fixierten DNA wurde zuerst mit *high* SDS Puffer für eine Stunde bei 42°C vorhybridisiert, um freie Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Anschließend wurde diese Lösung durch *high* SDS Puffer mit hitzedenaturierter DIG-markierter DNA-Sonde ersetzt und die Membran über Nacht im Hybridisierungssofen bei 42°C inkubiert. Um die Spezifität zu erhöhen, wurden vor dem Nachweis der markierten DNA Waschschrte mit 2 x SSC / 0,1% (w/v) SDS bei RT und 0,1% SSC / 0,1% SDS bei 68°C durchgeführt.

#### 2.2.8.4 Immunologischer Nachweis von Digoxigenin mit CSPD®

Maleinsäurepuffer		Waschpuffer	
0,1	M	Maleinsäure (pH 7,5)	Maleinsäurepuffer
0,15	M	NaCl	0,3 % Tween® 20
Blockierungslösung		Nachweispuffer	
		Maleinsäurepuffer	0,1 M Tris/HCl (pH 9,5)
1	%	Blockierungsreagenz	0,1 M NaCl

Die Hybridisierung der DIG-markierten Sonde mit der Ziel-DNA wurde mittels *DIG Luminescent Detection Kit* nachgewiesen. Die Membran wurde für 5 min im Waschpuffer und anschließend für 30 min in der Blockierungslösung schüttelnd inkubiert. Es folgte eine weitere 30 minütige Inkubation mit in Blockierungslösung 1:10.000 verdünntem AP-konjugierten Antikörper gegen Digoxigenin. Nach erneutem 2 x 15 min Waschen wurde die Membran 5 min im Nachweispuffer und 5 min mit 1:100 im Nachweispuffer verdünnten CSPD® inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie gewickelt und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Dephosphorylierung des Chemilumineszenz-Substrates durch die alkalische Phosphatase führt zu einer Lichtemission, die durch das Auflegen eines Röntgenfilmes detektiert und dokumentiert wurde.

#### 2.2.9 Automatisierte DNA-Sequenzierung

Sequenzieransatz	
0,4 µg	Plasmid-DNA oder
0,1 µg	PCR-Produkt
10 pmol	Primer
2 µl	Sequenzier-Mix
ad 10 µl	H <sub>2</sub> O

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem automatischen Sequenzierungsgerät *ABI Prism® 377 DNA Sequencer* nach der Kettenabbruch- oder Didesoxy-Methode. Zuerst wird die Doppelstrang-DNA denaturiert und die DNA-Synthese durch die Anlagerung der Primer initiiert. Dabei benutzt die *Taq* DNA Polymerase bei der DNA-Synthese zusätzlich zu den Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) sich im geringen Mengen im Sequenzier-Mix befindende 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTP).

Diese sind mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Da sie keine Hydroxylgruppe am 3'-Ende besitzen, kommt es nach jedem eingebauten ddNTP zum Kettenabbruch. 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. Im Anschluss an die Markierungsreaktion wurden die Reaktionsansätze gefällt, in Probenpuffer aufgenommen, denaturiert und mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese getrennt. Das Basenspezifische Fluoreszenzlicht wurde mit in einem in das Sequenziergerät integrierten Laserscanner detektiert und die Basenabfolge so ermittelt.

## 2.2.10 Quantifizierung von Proteinen und Polysacchariden

### 2.2.10.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine lassen sich aufgrund ihrer Masse in einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese trennen. Die Probe wird zuerst mit SDS-Stopp-Puffer versetzt. Die SDS-Anionen binden an die Proteine, wobei es zur Bildung negativ geladener Komplexe kommt, deren Ladung der Masse des jeweiligen Proteins proportional ist. Um eine optimale Auftrennung der Proteine zu erhalten verwendet man zweischichtige Gele, die sich in Acrylamidkonzentration und pH-Wert unterscheiden. Die Konzentration an Acrylamid entscheidet über den Trennbereich des Gels und kann zwischen 3-20% betragen. In dieser Arbeit kamen u.a. folgende Gelzusammensetzungen zum Einsatz:

Trenngel (9%)		Sammelgel (3%)	
12,6 ml	H <sub>2</sub> O	8,16 ml	H <sub>2</sub> O
6,75 ml	30% Polyacrylamid	1,125 ml	30% Polyacrylamid
2,82 ml	3 M Tris/HCl (pH 8,9)	1,41 ml	0,5 M Tris/HCl (pH 6,7)
225 µl	10% SDS	112,5 µl	10% SDS
11,25 µl	TEMED	5,625 µl	TEMED
225 µl	10% APS	225 µl	10% APS

Nach dem Gießen des Trenngels zwischen zwei gereinigte Glasplatten wurde dieses luftblasenfrei mit H<sub>2</sub>O-gesättigtem Buthanol überschichtet. Die Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur. Danach wurde das Buthanol unter fließendem Wasser entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet und mit einem Kamm versehen. Die mit SDS-Stopp-Puffer versetzten Proben wurden für 5 min bei 95°C gekocht, auf Eis gestellt und anzentrifugiert. Jeweils 10 µl Probe wurde in die Taschen neben dem ebenfalls aufgekochten Größenmarker aufgetragen. Die Spannung lag bis zum Erreichen des Trenngels bei 80 V und anschließend bei 130 V.

### 2.2.10.2 Western Blot

Der Western Blot dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen. Das bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese erhaltene Proteinmuster wird vom Gel auf eine Membran transferiert und das gesuchte Protein mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und einer enzymatischen Reaktion nachgewiesen.

Mehrere mit Transferpuffer getränkte Lagen wurden in einem Gelhalter von Kathode zur Anode wie folgt aufeinander gelegt: Schwamm, Filter, Gel, Nitrozellulosemembran, Filter, Schwamm. Die Blotkammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und die Spannung für 2 h auf 100 V angelegt. Zur Vermeidung einer Überhitzung wurde der Transfer in einem 4°C Raum vorgenommen. Anschließend wurde die Membran herausgenommen, mit 1 x TBS / 0,05% Tween<sup>®</sup>20 gewaschen und die sich darauf befindenden unspezifischen Bindungsstellen mit 6% Magermilch für 1 h bei RT abgesättigt. Danach folgte die Inkubation mit einem 1:1000 verdünnten Maus-Antikörper gegen phosphospezifische ERK 1/2 (pT202/pY204) über Nacht bei 4°C. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde die Membran mit einem HRP-konjugierten Anti-Maus Antikörper für 45 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde *ECL Western blotting detection reagents* 1+2 (1:1) auf die Membran gegeben, 1 min bei RT inkubiert und die Membran auf einen Röntgenfilm in eine Filmkassette gelegt. In alkalischer Umgebung katalysiert die Peroxidase eine Oxidation des Chemilumineszenz-Substrates Luminol und es kommt zur Lichtemission mit einem Maximum bei 428 nm, detektierbar durch einen Röntgenfilm.

Stripping-Puffer	
6,25 ml	1 M Tris/HCl (pH 6,8)
20 ml	10% SDS
800 µl	2-Mercaptoethanol
ad 100 ml	H <sub>2</sub> O

Nach erfolgter Nachweisreaktion wurde die Membran von Antikörpern durch Inkubation und schwenken mit Stripping-Puffer für 45 min bei 56°C gereinigt. Nach erneutem Waschen und Absättigen der freien Bindungsstellen wurde die Inkubation der Membran mit einem 1:5000 verdünnten Maus-Antikörper gegen ERK (pan ERK) durchgeführt und der Westen Blot dem gleichen Protokoll folgend zu Ende geführt.

Variation: Zum Nachweis von Oberflächenproteinen von *N. meningitidis* erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran für 1 h bei 300 mA in einer mit Kühlelementen versehenen kleinen Blotkammer. Als Waschpuffer diente 1 x PBS / 0,1% Tween<sup>®</sup>20 und

blockiert wurde mit 5% Magermilch. Die Erst- und Zweitantikörper wurden in jeweiligen Verdünnungen eingesetzt (Tab. 2.7). Nach Zugabe des Substrats und Bildung eines sichtbaren grauen Präzipitats auf der Membran wurde die Reaktion mit Wasser abgestoppt.

Substrat		
100	µl	NBT
10	µl	Indolyl
2	µl	2 M MgCl <sub>2</sub>
ad 1000	µl	Tris/HCl (pH 9,6)

**Tabelle 2.7: Antikörper beim Western Blot Nachweis der Meningokokken-Oberflächenproteine.**

1./2. Antikörper	Bezeichnung	Verdünnungsstufe
1. Antikörper gegen Opa	4B12/C11 IgG <sub>2</sub> -Antikörper	1:1000
1. Antikörper gegen Opc	mAb 306 IgG <sub>1</sub> -Antikörper	1:1000
1. Antikörper gegen Pili	mAb SM1	1:4000
2. Antikörper gegen Maus-IgG/IgM	Alkalische Phosphatase IgG / IgM Konjugat	1:2500

### 2.2.10.3 ELISA (*enzyme linked immuno sorbant assay*)

Der ELISA diente zur Überprüfung der Expression von Kapselpolysaccharid von *N. meningitidis* mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Meningokokken aus einer Übernachtskultur wurden auf OD<sub>600nm</sub> = 0,15 in 1 x PBS eingestellt. Die Antigenanlagerung erfolgte für eine Stunde bei 37°C in Poly-D-Lysin beschichteten ELISA-Platten mit hoher Bindungskapazität. Die Bakterien wurden mit Glutardialdehyd fixiert, mehrmals mit 1 x PBS gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mit 1% BSA abgesättigt. Anschließend folgte die Anlagerung des Erstantikörpers gegen die Serogruppe B Kapsel (mAb 735) für eine Stunde bei 37°C. Als Zweitantikörper fungierte ein Peroxidase-konjugierter Antikörper, der in Anwesenheit des Substrats ABTS eine Farbreaktion hervorruft. Die photometrische Messung wurde nach 10-minütiger Inkubation bei 405 nm durchgeführt.

### 2.2.11 Kultur von Zellen

#### 2.2.11.1 Kulturbedingungen

HEp-2 und HBMEC-Zellen wurden in entsprechenden Nährmedien in 75cm<sup>3</sup> Zellkulturflaschen bei 37°C und einer CO<sub>2</sub> Konzentration von 5% kultiviert. Für HBMEC-

Zellen war die Beschichtung der Flaschen mit 0,2% Gelatine notwendig. Gefrierkulturen wurden angefertigt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### **2.2.11.2 Einfrieren von Zellen**

Die einzufrierenden Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer auf  $1 \times 10^7$  Zellen / ml eingestellt. Danach wurde die Zellsuspension mit gleichem Volumen vorgekühltem 2 x Einfriermedium vermischt und in Kryoröhrchen abgefüllt. Um das Medium in die Zellen eindringen zu lassen, wurde eine 15 minütige Inkubation bei 4°C vorgenommen. Für einen langsamen Gefrierprozess erfolgte die Lagerung zuerst in einem Styroporbehälter über Nacht bei -80°C und anschließend im flüssigen Stickstoff.

#### **2.2.11.3 Auftauen von Zellen**

Die im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen wurden rasch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, mit 2 ml vorgewärmtem hitzeinaktiviertem FCS und 6 ml Medium vermischt und 10 min bei 1350 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 2 ml Medium resuspendiert und in eine mit 15 ml Medium vorbereitete, ggf. mit Gelatine beschichtete, Zellkulturflasche überführt. Nach mikroskopischer Kontrolle erfolgte die Kultivierung für 2-3 Tage im Brutschrank bis zur Bildung eines konfluenten Zellrasens.

#### **2.2.11.4 Splitten der Zellen**

Konfluente Zellkulturen wurden nach Abnahme des Mediums mit 3 ml 1 x Trypsin/EDTA gelöst, die Zellen im Verhältnis 1:3(4) auf neue ggf. gelatinebeschichtete Zellkulturflaschen verteilt und bei 37°C weiter kultiviert. Für Versuche mit HBMEC-Zellen wurden Zellen bis zur 25. Passage verwendet.

#### **2.2.11.5 Aussäen von Zellen**

Nach mikroskopischer Kontrolle wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 3 ml 1 x Trypsin/EDTA gelöst, in 6 ml frischem Medium verdünnt und die Zellzahl der Suspension mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Für Infektionsversuche wurden  $1 \times 10^5$  Zellen / Vertiefung einer 24 Well Multischale ausgesät und 2 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Bei HBMEC-Zellen wurden die Vertiefungen vor dem Aussäen mit Gelatine beschichtet.

#### Variation:

Für Untersuchung von ERK (*extracellular signal regulated kinase*) wurden HBMEC-Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA gelöst, 6 ml Medium zugegeben und die Zellsuspension für 5 min bei 1360 rpm und 20°C abzentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands erfolgte die

Resuspension der Zellen in 8 ml Medium, Bestimmung der Zellkonzentration mit Hilfe der Neubauer Zählkammer und das Aussäen von  $5 \times 10^4$  Zellen / Vertiefung einer 24 Well Multischale. Nach 24 h wurde das HBMEC-Medium durch RPMI 1640 + 0,05% FCS ersetzt, um eine falsch positive Aktivierung von ERK durch Zellkultursupplemente zu vermeiden.

## 2.2.12 Infektionsversuche in Zellkulturen

### 2.2.12.1 Bakterienanzucht

Neisserien wurden aus der Gefrierkultur bei  $-80^\circ\text{C}$  auf GC-Agar fraktioniert ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Die dritte Fraktion wurde in 10 ml supplementiertes PPM-Medium überführt und 90 min im Schüttelinkubator bebrütet. *E. coli* wurde auf LB-Agar ausgestrichen, über Nacht inkubiert, in LB-Medium überführt und 45 min schüttelnd inkubiert. Beim *E. coli* A160::p4A kamen LB-Agar und LB-Medium mit Ampicillinzusatz zum Einsatz. Je nach Protokoll unterschied sich sowohl die Zahl der einzusetzenden Bakterien als auch das verwendete Medium (Tabelle 2.8). Die Bakterienzahl wurde mit Hilfe der Spektrophotometrie wie folgt berechnet:  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1 \approx 1 \times 10^9$  Bakterien / ml.

### 2.2.12.2 Infektion der Zellen

Nach mikroskopischer Kontrolle und 3 x waschen mit 1 x PBS bzw. RPMI 1640 wurden Zellen mit Bakterien infiziert (Tabelle 2.8).

**Tabelle 2.8: Zahl der eingesetzten Bakterien, verwendetes Medium und Infektionszeit.**

Experiment	Bakterien / ml	Medium	Infektionszeit
Adhärenz / Invasion: <i>E. coli</i> / HBMEC	$1 \times 10^7$ $1 \times 10^8$	RPMI 1640 RPMI 1640 + 5% FCS RPMI 1640 + 5% HS	30 min, 90 min und 4 h
Intrazelluläre Replikation: <i>E.coli</i> / HBMEC	$1 \times 10^8$	RPMI 1640 RPMI 1640 + 5% FCS	90 min
Intrazelluläre Replikation: <i>N. meningitidis</i> / HBMEC	$1 \times 10^7$	RPMI 1640 RPMI 1640 + 10% HS	12 h
Intrazelluläre Replikation: <i>N. meningitidis</i> / HEp-2	$1 \times 10^7$	RPMI 1640	12 h
ERK: <i>N. meningitidis</i> / HBMEC	$1 \times 10^6$	RPMI 1640 + 10% HS	2, 4, 6 und 8 h

### **2.2.12.3 Bestimmung zellassoziierter Bakterien**

Zur Bestimmung adhärenter und invasiver Bakterien wurde das bakterienhaltige Medium abgenommen und die extrazellulären nicht adhärenenten Erreger durch 3 x waschen mit PBS entfernt. Danach folgte eine 10 minütige Inkubation mit RPMI 1640 + 1% Saponin zur Lyse der Zellen und Freisetzung der intrazellulären Erreger. Die am Boden der Vertiefungen der 24 Well Multischale haftenden Zellen wurden mit der Pipettenspitze abgekratzt, das Bakterien-Zell-Gemisch gut resuspendiert, Verdünnungsreihen in 1 x PBS hergestellt und auf Agarplatten ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Auszählung der koloniebildenden Einheiten (KBE).

### **2.2.12.4 Bestimmung invasiver Bakterien mittels *gentamicin protection assay***

Zur Bestimmung intrazellulärer Bakterien erfolgte die Abtötung extrazellulärer Erreger durch Gentamicin. Der bakterienhaltige Überstand wurde aus den Vertiefungen entfernt und mit gentamicinhaltigem (200 µg/ml) RPMI-Medium ersetzt. Nach 60 min Inkubation wurde die Gentamicinlösung abgesaugt und die Zellen 3 x mit PBS gewaschen. Danach folgte die Inkubation mit saponinhaltigem RPMI 1640 und das Ausplattieren der in PBS hergestellten Verdünnungsreihen (2.2.12.3).

### **2.2.12.5 Intrazelluläre Replikation**

Zur Untersuchung der intrazellulären Replikation erfolgte nach Ablauf der Infektionszeit ebenfalls ein *gentamicin protection assay*. Nach Abtötung extrazellulärer Bakterien wurde das gentamicinhaltige RPMI 1640 entfernt und mit frischem RPMI 1640 ersetzt. Zum Zeitpunkt 0, 2, 4 und 6 h nach der Entfernung des Gentamicins erfolgte die Bestimmung der Zahl intrazellulärer Erreger (2.2.12.4).

### **2.2.12.6 Gewinnung der Proben für Untersuchung von ERK (*extracellular signal regulated kinase*)**

Jeweils 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Infektion wurden Zelllysate für SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Western Blot hergestellt. Nach dem Entfernen des Mediums erfolgte 3 x Waschen der Zellen mit auf 4°C gekühltem 1 x PBS. Anschließend wurden die Zellen mit 85 µl / Well aufgekochten SDS-Stopp-Puffer lysiert und gründlich resuspendiert, erneut 4 min bei 95°C aufgekocht und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.3 Dreifacher Immunfluoreszenz-Tests (IFT-III)

Um die Biogenese der *Neisseria containing vacuole* (NCV) näher zu untersuchen und zu charakterisieren, wurde eine dreifache Immunfluoreszenzfärbung (IFT-III) zur simultanen Darstellung adhärenter bzw. invasiver Erreger und spezifischer Marker des Endozytosewegs an *N. meningitidis* und HBMEC etabliert. Die Entwicklung der Methode erfolgte in Anlehnung an Protokollen zur zweifachen Immunfluoreszenzfärbung und zur Untersuchung von SCV (*Salmonella containing vacuole*) und ECV (*E. coli K1 containing vacuole*) [Heesemann und Laufs 1985, Kim *et al.* 2003, Steele-Mortimer *et al.* 1999].

Die Kultivierung der HBMEC-Zellen erfolgte wie unter 2.2.11 beschrieben. Vor dem Aussäen der Zellen in eine 24 Well Multischale wurden sterile Deckgläser (Ø 13 mm) in die Vertiefungen plaziert und mit Gelatine beschichtet. In der Etablierungsphase variierte die auszusäende Zelldichte zwischen  $0,5-1 \times 10^5$  und die Inkubationszeit betrug 2-3 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend erfolgte die Infektion der Zellen für 1-14 h mit  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^8$  Bakterien / ml RPMI 1640 unter Zugabe von 10% HS oder FCS. Für primäre richtungsweisende Untersuchungen der NCV in HBMEC-Zellen erwies sich eine auszusäende Zelldichte von  $5 \times 10^4$  / ml und eine 12 h Infektion mit  $1 \times 10^7$  Bakterien / ml RPMI 1640 + 10% HS als optimal.

Nach Ablauf der Infektionszeit wurde der Überstand entfernt, extrazelluläre nicht adhärente Bakterien mit PBS abgewaschen und die Zellen einschließlich adhärenter und invasiver Erreger mit 3,7% Paraformaldehyd + 0,1% Glutaraldehyd für 20 min bei RT fixiert. Nach gründlichem Waschen mit PBS begannen die Markierungsschritte mit Antikörpern gegen Aussenmembranproteine von Meningokokken bzw. gegen endosomale und lysosomale Strukturen der Zelle und anschließender Darstellung mit Zweitantikörpern. Alle Erst- und Zweitantikörper wurden im Blockingpuffer (1 x PBS + 2% FCS + 1,5% Magermilch) verdünnt (Tabelle 2.9). Die Zellen und Erreger wurden 20 min bei RT mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert und anschließend 3 x mit PBS gewaschen, um überschüssige nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

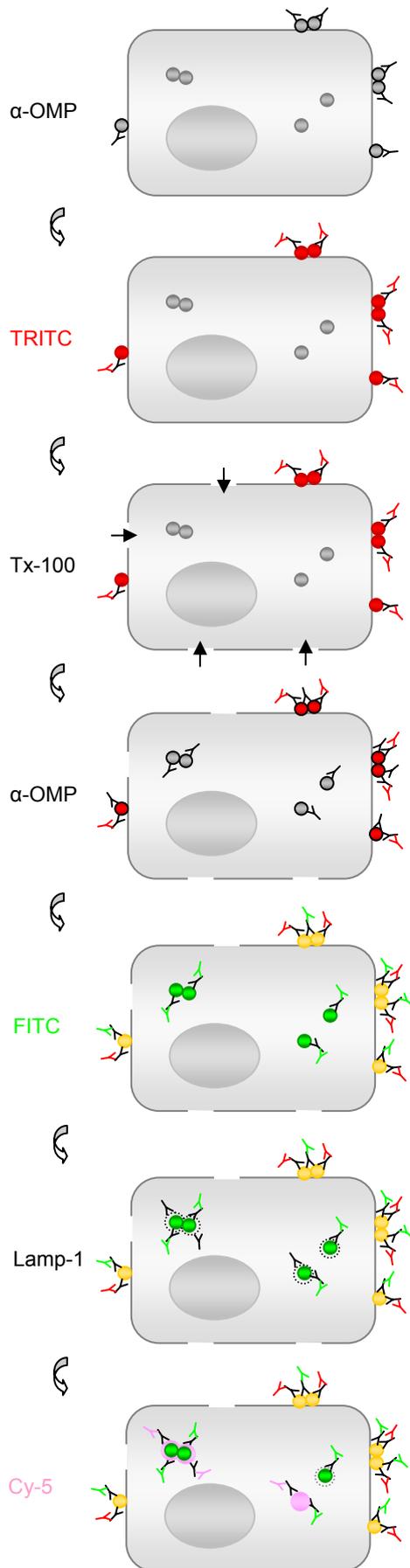
Zur Unterscheidung wurden extra- und intrazelluläre Bakterien in der Doppelimmunfluoreszenz unterschiedlich markiert. Zuerst erfolgte die Markierung zelladhärenter Erreger mit Hilfe von Aussenmembranprotein(OMP)-Antiserum und einem TRITC-konjugierten Sekundär-Antikörper. Danach wurden HBMEC-Zellen für 20 min bei RT mit 0,5% Triton<sup>®</sup> X-100 permeabilisiert und die Markierung der sowohl extra- als auch intrazellulären Erreger mit Hilfe von OMP-Antiserum und FITC-konjugiertem Sekundär-Antikörper durchgeführt. Um Strukturen des frühen bzw. späten Endosoms oder Lysosoms zu färben, folgte eine Inkubation mit einem weiteren Antikörper gegen einen

der spezifischen Marker des Endozytosewegs und Cy<sup>TM</sup>5-konjugiertem Sekundär-Antikörper (Abb.2.1).

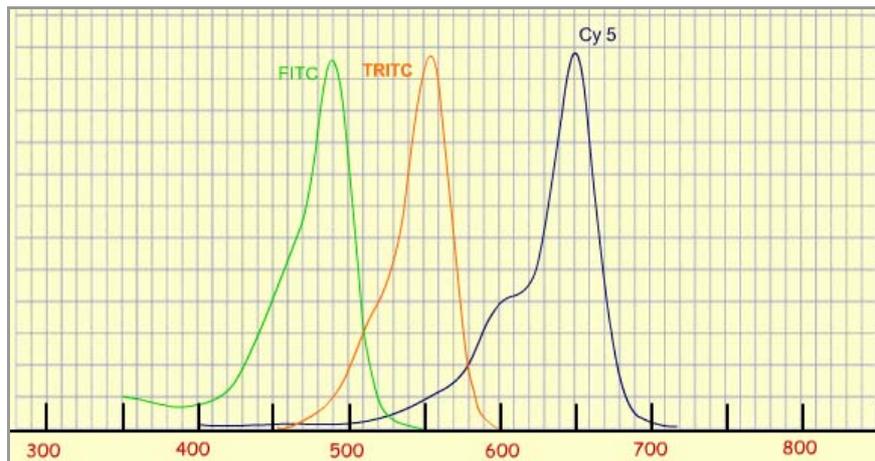
**Tabelle 2.9: Antikörper beim IFT-III.**

Antikörper	Verdünnung
Polyklonale Kaninchen-AK gegen Aussenmembranproteine (OMP) von MC	1:100
Ab2900 polyclonal rabbit IgG anti-EEA1 (Early Endosomal Antigen 1)	1:200
Mouse IgG1k anti-human CD107a (Lamp-1) clone H4A3	1:100
Mouse IgG <sub>1</sub> anti-human Transferrin Receptor	1:200
Rabbit polyclonal antibody Rab-7 (H-50): sc-10767	1:200
MAB 422 Mouse IgG <sub>2b</sub> anti-human Cathepsin-D monoclonal antibody	1:200
Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG (H+L)	1:100
Rhodamine (TRITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti Mouse/Rabbit IgG (H+L)	1:100
Cy <sup>TM</sup> 5-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG (H+L)	1:100
Rabbit IgG Isotyp-Kontrolle	1:133

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Deckgläser aus der 24 Well Multischale herausgenommen, luftgetrocknet und mit Hilfe von Fluoprep auf Objektträger befestigt. Am nächsten Tag erfolgte eine mikroskopische Beurteilung der TRITC- und FITC-markierten adhärenen Erreger, FITC-markierten invasiven Erreger und Cy<sup>TM</sup>5-markierten Endosomstrukturen der HBMEC-Zellen unter Verwendung entsprechender Filter (Abb.2.2-3). Es wurde nach Koloalisationen der invasiven Meningokokken mit Strukturen des frühen oder späten Endosoms bzw. Lysosoms gesucht, diese mit eingebauter Digitalkamera dokumentiert und die einzelnen Bilder am Computer mit Hilfe entsprechender Software überlagert.

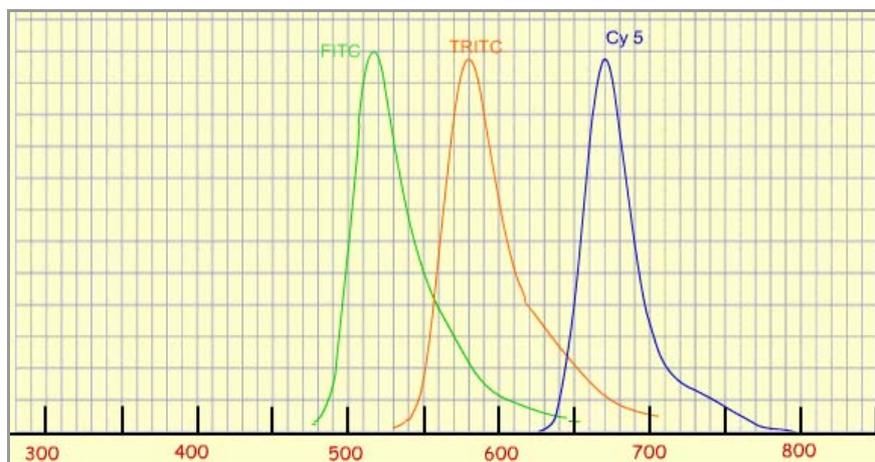
**Abbildung 2.1:****Dreifacher Immunfluoreszenz-Test (IFT-III).**

Die Markierung zelladhärenter Erreger erfolgte mit Aussenmembranprotein(OMP)-Antiserum und einem TRITC-konjugierten Sekundär-Antikörper (rot). Danach wurden HBMEC-Zellen mit 0,5% Triton® X-100 permeabilisiert und die Markierung der sowohl extra- als auch intrazellulären Erreger mit OMP-Antiserum und FITC-konjugiertem Sekundär-Antikörper durchgeführt (grün). Die simultane Markierung adhärenter Meningokokken mit TRITC und FITC kam bei der Überlagerung durch ein gelbes Signal zur Darstellung. Zur Färbung endo-/lysosomaler Strukturen wurde eine Inkubation mit einem gegen spezifische Marker gerichteten Antikörper (z.B. Lamp-1) und Cy<sup>TM</sup>5-konjugiertem Sekundär-Antikörper durchgeführt (rosa). Eine Kolo-kalisation der endosomalen bzw. lysosomalen Marker mit intrazellulären Erreger kommt je nach Ebene durch eine punkt- oder ringförmigen Struktur zur Darstellung.



**Abbildung 2.2: Excitation von TRITC, FITC und Cy5.**

Das Excitationsspektrum von FITC ( $E_{x_{max}} = 495 \text{ nm}$ ), TRITC ( $E_{x_{max}} = 547 \text{ nm}$ ), und Cy5 ( $E_{x_{max}} = 625\text{-}650 \text{ nm}$ ) ist in nm Wellenlänge wiedergegeben [[www.mcb.arizona.edu](http://www.mcb.arizona.edu); [www.fz-borstel.de](http://www.fz-borstel.de)].



**Abbildung 2.3: Emission von TRITC, FITC und Cy5.**

Das Emissionsspektrum von FITC ( $E_{m_{max}} = 519 \text{ nm}$ ), TRITC ( $E_{m_{max}} = 572 \text{ nm}$ ), und Cy5 ( $E_{m_{max}} = 670 \text{ nm}$ ) ist in nm Wellenlänge wiedergegeben [[www.mcb.arizona.edu](http://www.mcb.arizona.edu); [www.fz-borstel.de](http://www.fz-borstel.de)].

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Das *narE* Gen

Im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführte Microarray-Studien haben zur Identifizierung einer Vielzahl von *Neisseria meningitidis* Genen geführt, die möglicherweise in Erreger-Wirt-Interaktionen involviert sind. Aussagen über die Bedeutung des jeweiligen Gens im Infektionsgeschehen bzw. bei Signaltransduktionsmechanismen lassen sich durch vergleichende Untersuchungen von Mutanten mit Ursprungstämmen treffen. U.a. konnte eine transkriptionelle Aktivierung des ORF NMB1343 (*narE*) nach Zellkontakt beobachtet werden und die Rolle dieses 438 bp großen, für eine ADP-Ribosyltransferase (*Neisseria ADP-ribosylating enzyme*) kodierenden Gens in der Pathogenese von *N. meningitidis* wird diskutiert. Folglich wurde zur Klärung der Bedeutung des *narE* Gens für die Interaktion von *N. meningitidis* mit humanen zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (HBMEC) zunächst eine *narE* Insertionsmutante vom Stamm MC58\* hergestellt. Diese wurde anschließend mittels Sequenzierung, Southern Blot, RT-PCR, Western Blot und ELISA charakterisiert.

##### 3.1.1 Konstruktion der *narE* Mutante

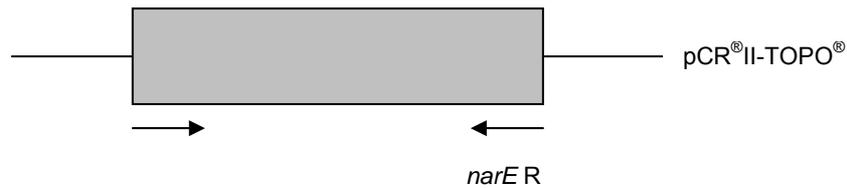
Die Amplifizierung des *narE* Gens (Abb.3.1) erfolgte mit den Primern *narE* F und *narE* R in der PCR. Als Template diente genomische DNA vom Wildtypstamm MC58.



Abbildung 3.1: Gensequenz des ORF NMB1343 (*narE* Gen).

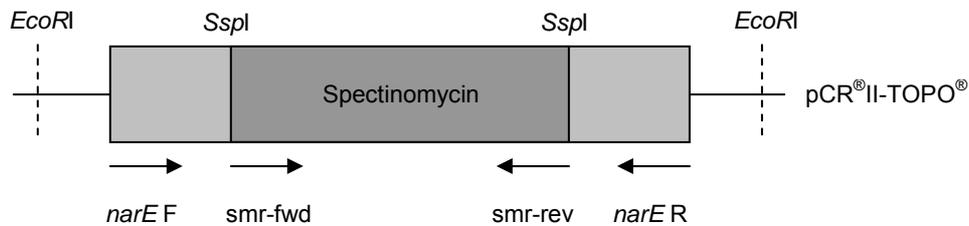
Der 438 bp große ORF NMB1343 (*narE* Gen) ist farbig hinterlegt und die Primer *narE* F (bindet an der Position -94) und *narE* R (bindet an der Position +456) sind fett dargestellt.

Die PCR mit den Primern *narE* F, der an der Position -94, sowie *narE* R, der an Position +456 bindet, führte zu einem 550 bp umfassenden Amplifikat. Das PCR-Produkt wurde in den linearisierten pCR®II-TOPO® -Vektor kloniert. Dies führte zur Entstehung des Plasmids p*Nar*TOP (Abb.3.2). Die Detektion rekombinanter Klone erfolgte durch die Blau-weiß-Selektion. Die sich anschließende Sequenzierung bestätigte den Einbau des 550 bp großen Fragments.



**Abbildung 3.2: Darstellung der Konstruktion des Plasmids p*Nar*TOP.**

Als nächstes wurde eine 1011 bp große Spectinomycin-Resistenzkassette aus dem Plasmid pHP45Ω mit den Primern *smr*-fwd und *smr*-rev in der PCR amplifiziert. Die überhängende Enden des Amplifikats wurden geglättet und das Fragment in die *Ssp*I-Schnittstelle des Vektors p*Nar*TOP kloniert (Abb.3.3).



**Abbildung 3.3: Konstruktion des Plasmids p*Nar*SpecTOP.**

Dargestellt sind die für die Klonierung relevanten Restriktionsschnittstellen und für die Generierung erforderlichen Oligonukleotide.

Der Einbau der Resistenzkassette wurde durch Sequenzierung bestätigt. Das *narE* Gen mit Spectinomycin-Resistenzkassette wurde dann aus dem Plasmid p*Nar*SpecTOP mit der Endonuklease *Eco*RI herausgeschnitten und in die *Eco*RI Schnittstelle des Vektors pTL1 kloniert. Der Vektor pTL1 ist ein Abkömmling des pBluescript Vektors (Invitrogen), der die DNA *uptake* Sequenz (5'- TCG AGA AGT CTG CCG -3') in der *Sac*I

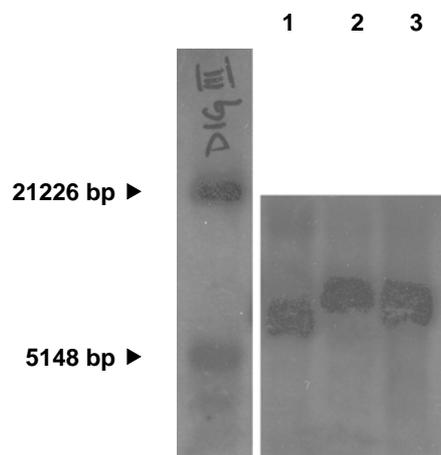
Restriktionsschnittstelle enthält. Der korrekte Einbau wurde durch Sequenzierung bestätigt. Das Plasmid pNarSpecBK wurde anschließend in den *N. meningitidis* Stamm MC58\* transformiert. Die Detektion rekombinanter Klone erfolgte durch das Spectinomycin-Resistenzgen und durch die anschließende PCR mit den Primern *narE* F und *smr*-rev.

### 3.1.2 Charakterisierung der *narE* Mutante

Die phänotypische und genotypische Charakterisierung der ausgesuchten Klone 6 und 7 erfolgte mittels Southern Blot, RT-PCR, Western Blot (Opa, Opc, Pili) und Kapselpolysaccharid-ELISA.

#### 3.1.2.1 Southern Blot

Die Überprüfung der Mutagenese der *narE* Mutanten erfolgte mittels Southern Blot. Dazu wurde chromosomale DNA der Mutanten und des Ursprungsstamms mit *Stu*I verdaut und anschließend mit einer Digoxigenin-markierten spezifischen Sonde, die das *narE* Gen umfasst, hybridisiert. Für die Herstellung der spezifischen Sonde wurde eine PCR mit den Primern *narE* F und *narE* R durchgeführt und das Fragment mit Digoxigenin markiert. Das *Stu*I-Fragment des Ursprungsstamms umfasst 6327 bp. Durch die Insertion der Resistenzkassette sollte ein etwa 1000 bp größeres Fragment resultieren, das im Southern Blot zur Darstellung kam (Abb.3.4).



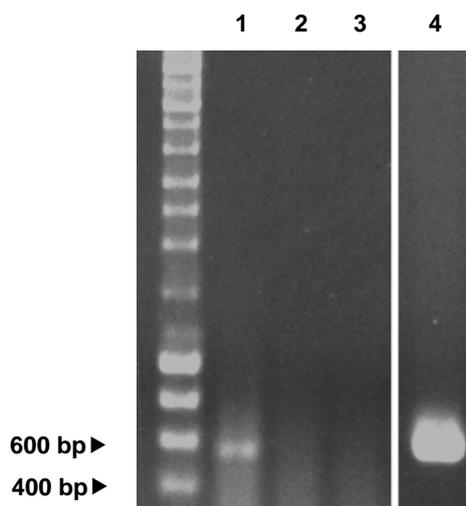
**Abbildung 3.4: Southern Blot.**

Southern Blot chromosomaler DNA von MC58\* (1), von MC58\* *narE* Klon 6 (2) und von MC58\* *narE* Klon 7 (3) nach *Stu*I-Restriktionsverdau.

Zusätzlich wurden Amplifikate chromosomaler DNA mit den Primern *narE* F, *narE* R, *smr*-fwd und *smr*-rev generiert und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte die korrekte Insertion der Spectinomycinkassette in den ORF NMB1343. Die konstruierte Mutante wurde als MC58\* *narE* bezeichnet.

### 3.1.2.2 RT-PCR

Die Unterbrechung des *narE* Gens wurde auf Transkriptionsebene durch Isolierung von RNA und Umschrieb der mRNA in cDNA bestätigt. Die cDNA diente als Template für eine PCR mit den für die Genamplifikation eingesetzten spezifischen Primern *narE* F und *narE* R. Als Positivkontrolle diente genomische DNA des Ursprungsstamms MC58\*. Bei erfolgreicher Insertion der Antibiotikakassette findet eine Transkription des Gens von DNA zur RNA nicht statt, als Folge des fehlenden Templates für den Umschrieb von RNA zur cDNA. Die PCR ist entsprechend negativ (Abb.3.5).

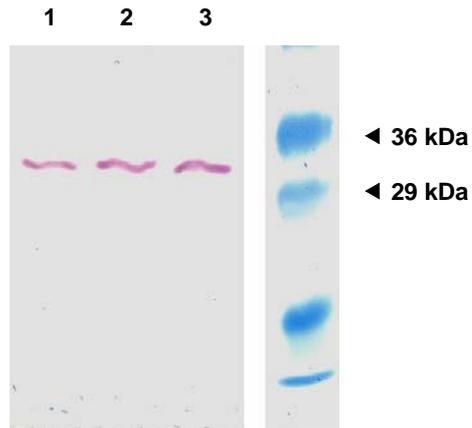


**Abbildung 3.5: RT-PCR.**

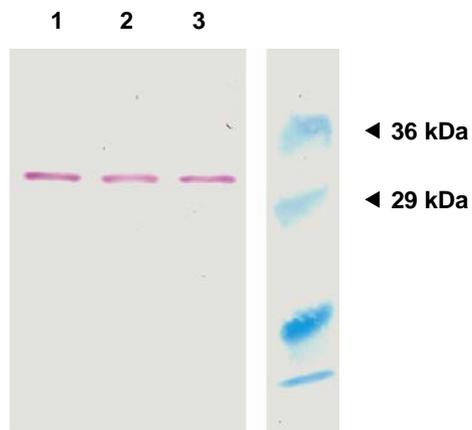
RT-PCR von MC58\* (1), MC58\* *narE* Klon 6 (2), MC58\* *narE* Klon 7 (3), chromosomale DNA MC58\* (4).

### 3.1.2.3 Analyse der Oberflächenstrukturen Opa, Opc und Pili

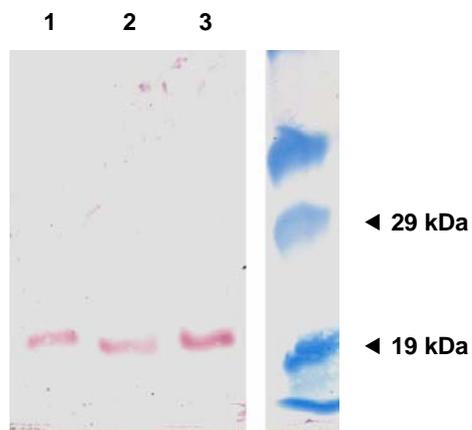
Die phasenvariablen Oberflächenproteine Pili, Opa und Opc spielen im Infektionsgeschehen von *N. meningitidis* für Adhärenz und Invasion an bzw. in Wirtszellen eine wichtige Rolle. MC58\* *narE* Klone wurden phänotypisch im Vergleich zum Ursprungsstamm auf die Expression dieser Oberflächenproteine im Western Blot mit Hilfe von spezifischen Antikörpern untersucht. Bei beiden Klonen ließen sich Opa, Opc und Pili positiv darstellen (Abb.3.6-8).



**Abbildung 3.6: Nachweis des Aussenmembranproteins Opa mit dem spezifischen Antikörper 4B12/C11 IgG<sub>2</sub> im Western Blot.** MC58\* (3), MC58\* *narE* Klon 6 (2), MC58\* *narE* Klon 7 (1).



**Abbildung 3.7: Nachweis des Aussenmembranproteins Opc mit dem spezifischen Antikörper mAb 306 IgG<sub>1</sub> im Western Blot.** MC58\* (3), MC58\* *narE* Klon 6 (2), MC58\* *narE* Klon 7 (1)



**Abbildung 3.8: Nachweis von Pili mit dem spezifischen Antikörper mAb SM1 im Western Blot.** MC58\* (3), MC58\* *narE* Klon 6 (2), MC58\* *narE* Klon 7 (1).

### 3.1.2.4 Kapselpolysaccharid-ELISA

Die *narE* Mutanten wurden im ELISA mit dem gegen das Kapselpolysaccharid der Serogruppe B Meningokokken gerichteten monoklonalen Antikörper mAb 735 auf ihre Fähigkeit zur Kapselexpression untersucht. Es zeigte sich, dass die Unterbrechung des *narE* Gens die Fähigkeit zur Expression der Kapsel nicht beeinträchtigt (Abb.3.9).

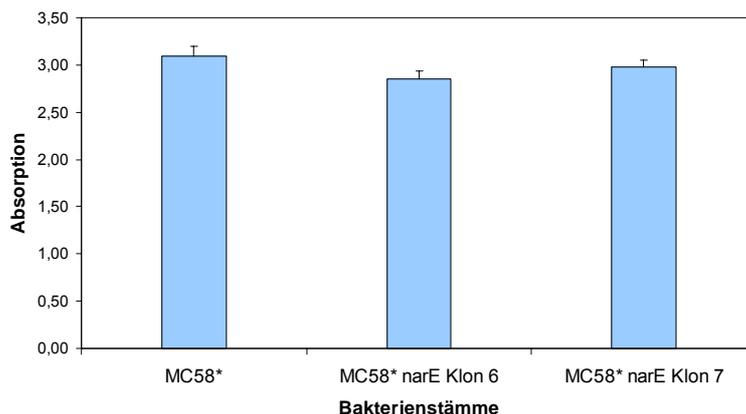
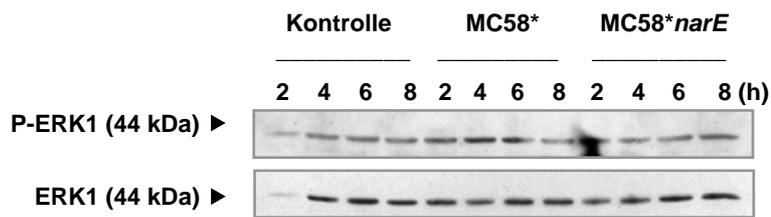


Abbildung 3.9: Kapselpolysaccharid-ELISA. (Die Messung der Absorption erfolgte bei 405 nm)

### 3.1.3 *NarE* und Signaltransduktion

Um die Bedeutung des *narE* Gens in der Aktivierung von Signaltransduktionsmechanismen in HBMEC-Zellen während einer Infektion mit Meningokokken zu untersuchen, wurde die Kinetik der Phosphorylierung von *extracellular signal regulated kinase* (ERK) analysiert. In 24 Well Multischalen ausgesäte HBMEC-Zellen wurden mit der *narE* Mutante und dessen Ursprungsstamm infiziert. In 2, 4, 6 und 8 h nach Infektion präparierten Zelllysaten wurde die Aktivierung von ERK im Western Blot mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern analysiert. Als Kontrolle dienten Zelllysate von uninfizierten HBMEC-Zellen, die ebenfalls in Anwesenheit von humanem Serum inkubiert wurden. Es konnte keine Zu- oder Abnahme in der Phosphorylierung von ERK im Laufe der Infektion weder bei dem Ursprungsstamm MC58\* noch bei der *narE* Mutante festgestellt werden (Abb.3.10).



**Abbildung 3.10: Phosphorylierung von ERK1 im Western Blot dargestellt.**

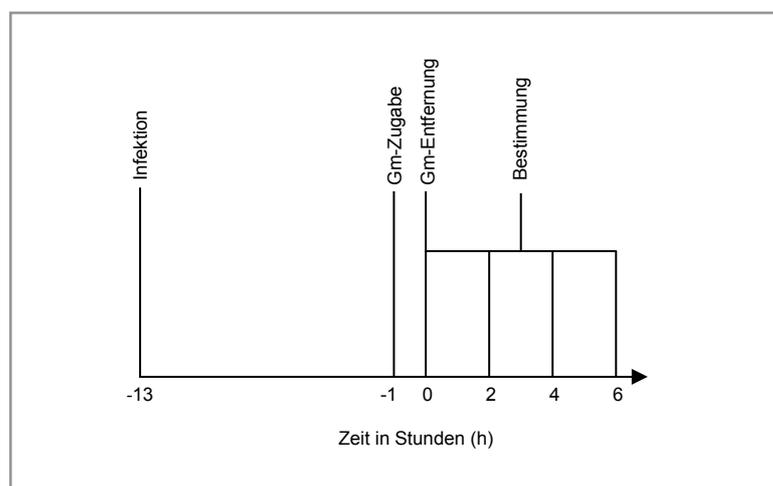
HBMEC-Zellen wurden ohne Bakterien (Kontrolle) bzw. mit MC58\* und MC58\* *narE* für 2, 4, 6 und 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphorylierung von ERK 1 (*extracellular signal regulated kinase*) mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen die phosphorylierte Form im Western Blot dargestellt. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.2 Intrazelluläre Folgereaktionen von *N. meningitidis* und *E. coli* K1 in HBMEC

#### 3.2.1 Intrazelluläre Replikation von *N. meningitidis* in HBMEC

Die Fähigkeit der Meningokokken sich in Endothelzellen zu replizieren, wurde mit Hilfe bereits etablierter Invasionsassays untersucht. Parallel zu Infektionsversuchen mit HBMEC-Zellen, wurden Versuche mit der Epithelzelllinie HEp-2 als Kontrolle durchgeführt, da in früheren Arbeiten gezeigt worden ist, dass *N. meningitidis* sich in Epithelzellen replizieren können. Die Infektion erfolgte mit dem bekapselten Serogruppe B Stamm MC58\* und der isogenen, kapseldefizienten Mutante MC58 *siaD*. Dies erlaubte eine Beurteilung der Abhängigkeit des intrazellulären Überlebens von der Kapselexpression.

$1 \times 10^5$  Zellen wurden auf 24 Well Multischalen ausgesät, zur Konfluenz wachsen gelassen und mit  $1 \times 10^7$  Bakterien infiziert. Nach 12 h Infektion erfolgte die Abtötung extrazellulärer Bakterien durch Inkubation mit Gentamicin. Zur Bestimmung der Zahl intrazellulärer Erreger wurden die Zellen jeweils 0, 2, 4 und 6 h nach Entfernung des Gentamicins lysiert, Verdünnungsreihen hergestellt und diese auf Agarplatten ausplattiert (2.2.12.5, Abb.3.11).

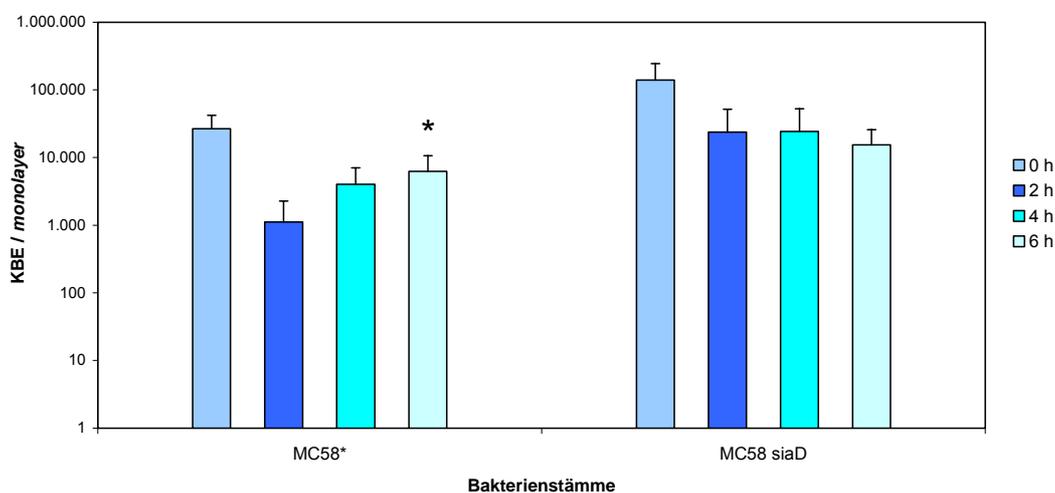


**Abbildung 3.11: Versuchsablauf zur Bestimmung intrazellulärer Replikation.**

Epithel- bzw. Endothelzellen wurden mit MC58\* und MC58 *siaD* infiziert (T = -13 h) und für 12 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgte die Abtötung extrazellulärer Erreger durch Inkubation mit Gentamicin (Gm) (T = -1 h). Anschließend wurde das Gentamicin entfernt (T = 0 h), die Zellen zu jeweiligen Zeitpunkten lysiert und Zahl der intrazellulären Bakterien bestimmt (T = 0 / 2 / 4 / 6 h).

Nach Inkubation über Nacht wurden die koloniebildende Einheiten (KBE) gezählt und die Ergebnisse ausgewertet. Aus drei repräsentativen Versuchen gemittelte und zusammengestellte Daten deuten darauf hin, dass bekapselte Meningokokken in der Lage sind, sich intrazellulär sowohl in HEp-2 Zellen als auch in HBMEC-Zellen zu replizieren.

In HEp-2 Zellen zeigte der unbekapselte MC58 *siaD*, wie erwartet [Kolb-Maurer *et al.* 2001, Unkmeir *et al.* 2002b], eine höhere Invasionsrate als der bekapselte MC58\*. Die Zahl intrazellulärer unbekapselter Erreger betrug zum Zeitpunkt 0 h nach Entfernung des Gentamicins  $1,39 \times 10^5$  ( $\pm 1,05 \times 10^5$ ) KBE pro *monolayer* während der bekapselte MC58\*  $2,66 \times 10^4$  ( $\pm 1,56 \times 10^4$ ) KBE aufwies. Die Anzahl intrazellulärer bekapselter Meningokokken sank während der folgenden 2 h um mehr als eine Potenzstufe, stieg jedoch durch eine intrazelluläre Replikation wieder an. Vier Stunden später konnte, im Vergleich zum Zeitpunkt 2 h, eine fast sechsfache Steigerung intrazellulärer bekapselter Erreger auf  $6,24 \times 10^3$  ( $\pm 4,38 \times 10^3$ ) KBE pro *monolayer* festgestellt werden. Die anfangs deutlich höhere Zahl sich intrazellulär befindender kapselloser Erreger sank langsam aber stetig ab, ohne sich innerhalb der folgenden sechs Stunden ersichtlich zu erholen (Abb.3.12).

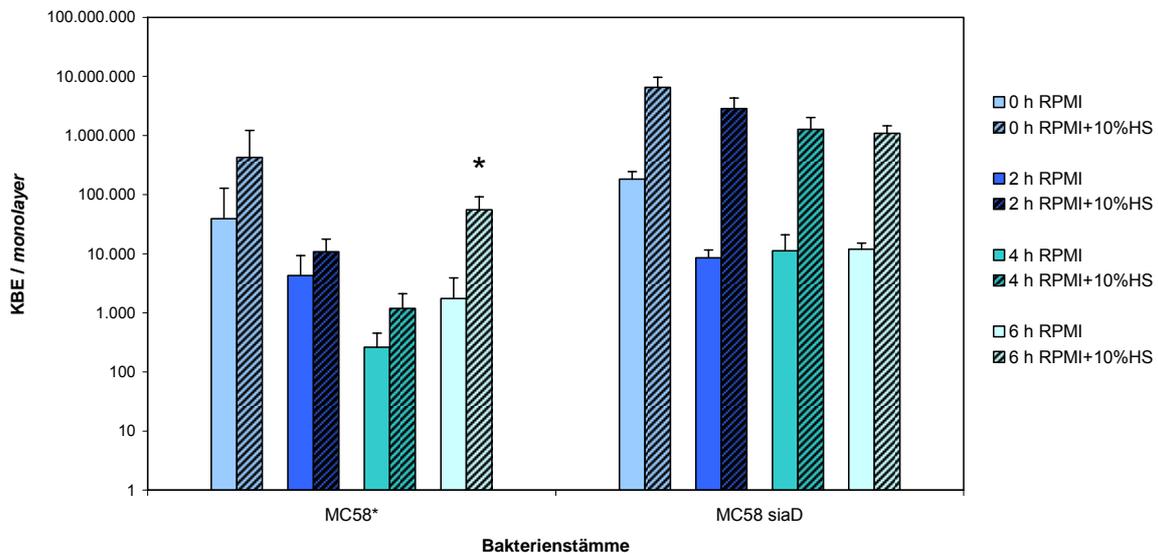


**Abbildung 3.12: Intrazelluläre Replikation von *N. meningitidis* in Epithelzellen (HEp-2).**

$1 \times 10^5$  HEp-2 Zellen wurden in Vertiefungen von 24 Well Multischale ausgesät, zur Konfluenz wachsen gelassen und mit  $1 \times 10^7$  Bakterien in RPMI 1640 infiziert. 12 h nach Infektion erfolgte die Abtötung extrazellulärer Erreger durch 1 h Inkubation mit Gentamicin und Bestimmung der Zahl intrazellulärer Erreger jeweils 0, 2, 4 und 6 h nach Entfernung des Gentamicins. Die Zahl intrazellulärer Erreger ist in koloniebildenden Einheiten (KBE) angegeben resultierend aus den Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichungen

dreier unabhängig in dreifacher Ausführung durchgeführter Experimente. \*  $p < 0,05$  für MC58\* 6 h im Vergleich zu MC58\* 2 h.

Auch in HBMEC zeigte der unbekapselte MC58 *siaD*, wie erwartet [Unkmeir *et al.* 2002b], eine höhere Invasionsrate im Vergleich zum bekapselten Stamm MC58\*. Die Zahl intrazellulärer unbekapselter Erreger betrug zum Zeitpunkt 0 h nach Gentamicin-entfernung und in Anwesenheit von humanem Serum  $6,55 \times 10^6 (\pm 3,08 \times 10^6)$  KBE pro *monolayer* während der bekapselte MC58\* über eine Potenzstufe weniger invasive Erreger aufwies. Die Anzahl intrazellulärer bekapselter Meningokokken sank über einen Zeitraum von 4 h auf  $1,18 \times 10^3 (\pm 9,25 \times 10^2)$  KBE pro *monolayer*, um zwei Stunden später mit  $5,55 \times 10^4 (\pm 3,63 \times 10^4)$  KBE pro *monolayer* eine annähernd 50fach höhere Zahl intrazellulärer Erreger aufzuweisen. Die anfangs deutlich höhere Zahl sich intrazellulär befindender kapselloser Erreger sank, wie bereits bei HEp-2 Zellen beobachtet, langsam aber stetig ab, ohne sich innerhalb der folgenden sechs Stunden ersichtlich zu erholen (Abb.3.13).



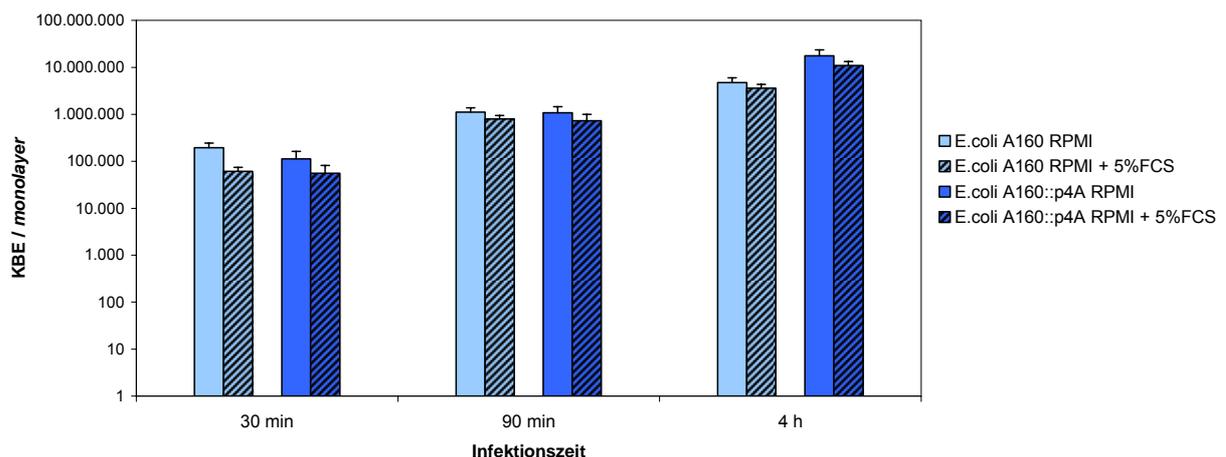
**Abbildung 3.13: Intrazelluläre Replikation von *N. meningitidis* in Endothelzellen (HBMEC).**

$1 \times 10^5$  HBMEC-Zellen wurden in Vertiefungen von 24 Well Multischale ausgesät, zur Konfluenz wachsen gelassen und mit  $1 \times 10^7$  Bakterien in RPMI 1640 bzw. RPMI 1640 + 10% humanem Serum (HS) infiziert. 12 h nach Infektion erfolgte die Abtötung extrazellulärer Erreger durch 1 h Inkubation mit Gentamicin und Bestimmung der Zahl intrazellulärer Erreger jeweils 0, 2, 4 und 6 h nach Entfernung des Gentamicins. Die Zahl intrazellulärer Erreger ist in koloniebildenden Einheiten (KBE) angegeben resultierend aus den Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichungen dreier unabhängig in dreifacher Ausführung durchgeführter Experimente. \*  $p < 0,05$  für MC58\* 6 h im Vergleich zu MC58\* 4 h.

### 3.2.2 Acetylierung der *E. coli* K1 Polysaccharidkapsel

Die Bedeutung der Acetylierung des *E. coli* K1 Kapselpolysaccharids während der intrazellulären Passage wurde mit Hilfe von Infektionsversuchen untersucht. Diese erfolgten mit einem nicht acetylierten *Escherichia coli* K1 Stamm A160 und einer daraus konstruierten konstitutiv acetylierten Mutante A160::p4A.

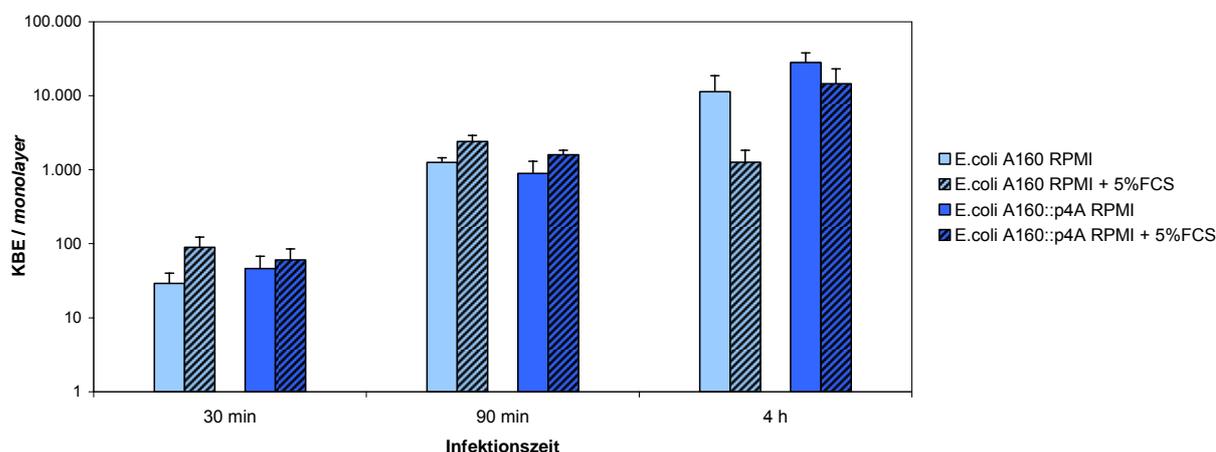
Zuerst wurden umfangreiche Vorversuche zur Adhäsion und Invasion des in der Acetylierung des Polysaccharidkapsel phasenvariablen *E. coli* K1 Stamm A247 durchgeführt, um optimale Bedingungen für spätere Infektionsversuche zu bestimmen. Die Infektion der HBMEC-Zellen erfolgte mit  $1 \times 10^7$  bzw.  $1 \times 10^8$  Bakterien und die Zahl adhärenter und invasiver Erreger wurde jeweils nach einer Infektionszeit von 30 min, 90 min und 4 h bestimmt. In Anwesenheit von 5% FCS konnte eine gesteigerte Invasion gegenüber RPMI 1640 beobachtet werden. Anschließend erfolgten Untersuchungen zur Infektionskinetik von nicht acetyliertem *E. coli* A160 und acetyliertem *E. coli* A160::p4A. HBMEC-Zellen wurden mit jeweils  $1 \times 10^8$  Bakterien in RPMI bzw. RPMI + 5% FCS infiziert und die Zahl adhärenter und invasiver Erreger jeweils nach 30 min, 90 min und 4 h bestimmt. (2.2.12.3-4, Abb.3.14-15). In der Adhärenz der beiden Stämme wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet ( $p > 0,05$ ). Eine effiziente Invasion sowohl der acetylierten als auch der nicht acetylierten *E. coli* Stamm wurde nach 90 min erreicht (Abb.3.15).



**Abbildung 3.14: Adhärenz von nicht acetyliertem und acetyliertem *E. coli* in HBMEC.**

$1 \times 10^5$  HBMEC-Zellen wurden in Vertiefungen von 24 Well Multischale ausgesät, zur Konfluenz wachsen gelassen und mit  $1 \times 10^8$  Bakterien in RPMI 1640 bzw. RPMI 1640 + 5% FCS infiziert. Jeweils 30 min, 90 min

und 4 h nach Infektion wurden nicht zellassoziierte Erreger durch 3 x waschen mit PBS entfernt und die Zahl zellassoziierter Erreger bestimmt. Die Zahl zellassoziierter Erreger ist in koloniebildenden Einheiten (KBE) angegeben resultierend aus den Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichungen dreier unabhängig in zweifacher Ausführung durchgeführter Experimente.



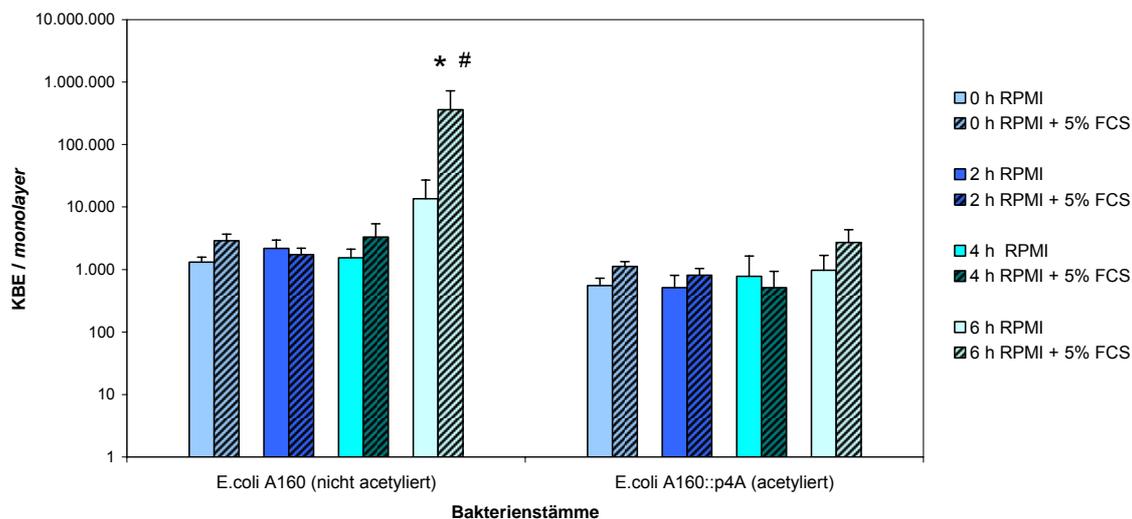
**Abbildung 3.15: Invasion von nicht acetyliertem und acetyliertem *E. coli* in HBMEC.**

$1 \times 10^5$  HBMEC-Zellen wurden in Vertiefungen von 24 Well Multischale ausgesät, zur Konfluenz wachsen gelassen und mit  $1 \times 10^8$  Bakterien in RPMI 1640 bzw. RPMI 1640 + 5% FCS infiziert. Jeweils nach 30 min, 90 min und 4 h erfolgte die Abtötung extrazellulärer Erreger durch 1 h Inkubation mit Gentamicin und Bestimmung der Zahl intrazellulärer Erreger. Die Zahl intrazellulärer Erreger ist in koloniebildenden Einheiten (KBE) angegeben resultierend aus den Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichungen dreier unabhängig in zweifacher Ausführung durchgeführter Experimente.

### 3.2.2.1 Intrazelluläre Replikation

Für Versuche zur intrazellulären Replikation von nicht acetylierten *E. coli* A160 und acetylierten *E. coli* A160::p4A Stämmen wurden  $1 \times 10^5$  HBMEC-Zellen / Well auf 24 Well Multischalen ausgesät, zur Konfluenz wachsen gelassen und mit  $1 \times 10^8$  Bakterien infiziert. Die Infektionszeit betrug 90 min, wie in vorangegangenen Versuchen als optimal für eine effiziente Invasion identifiziert. Analog zu Infektionsversuchen mit Meningokokken erfolgte nach Abtötung der extrazellulären Erreger die Bestimmung der Zahl intrazellulärer Erreger jeweils 0, 2, 4 und 6 h nach Entfernung des Gentamicins. Die Ergebnisse wurden aus drei repräsentativen Versuchen ermittelt und zusammengefasst. In den ersten vier Stunden war kein Absterben oder Vermehrung der Erreger intrazellulär festzustellen. Nach einer Verzögerung von mehreren Stunden begann jedoch der nicht

acetylierte *E. coli* A160 sich intrazellulär zu replizieren, um in Anwesenheit von 5% FCS bei 6 h einen annähernd 125fach höheren Wert im Vergleich zum Zeitpunkt 0 h zu erreichen. Der acetylierte Stamm vermehrte sich auch geringfügig intrazellulär, erreichte aber nach 6 h nur eine Verdoppelung der Zahl intrazellulärer Erreger (Abb.3.16).



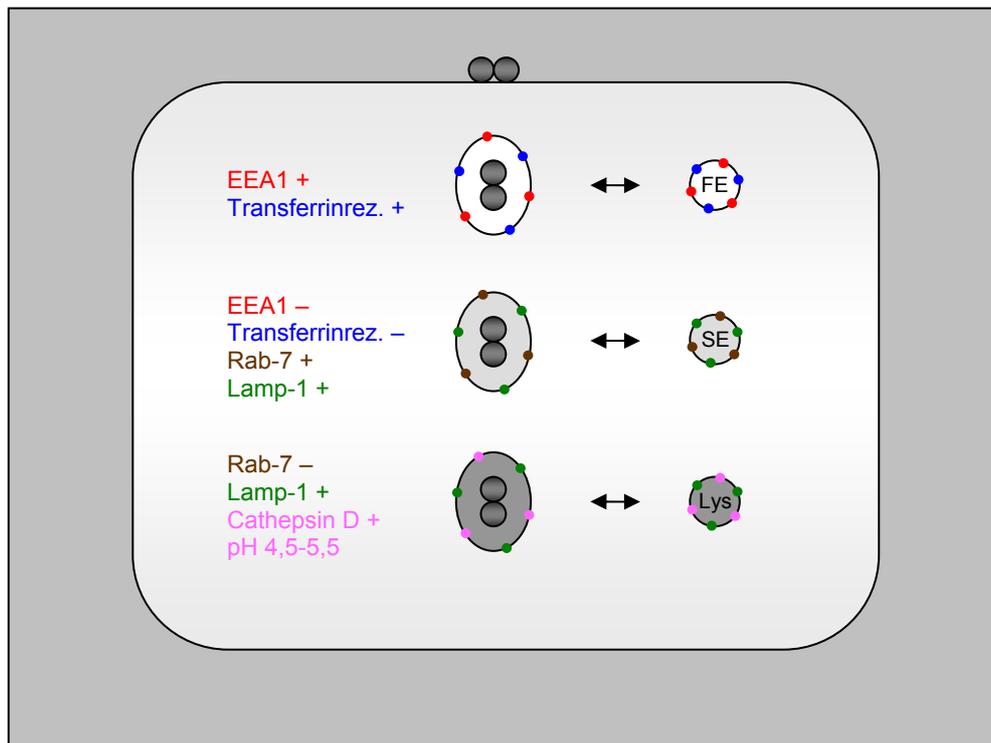
**Abbildung 3.16: Intrazelluläre Replikation von *E.coli* A160 und A160::p4A in Endothelzellen.**

1 x 10<sup>5</sup> HBMEC-Zellen wurden in Vertiefungen von 24 Well Multischale ausgesät, zur Konfluenz wachsen gelassen und mit 1 x 10<sup>8</sup> Bakterien in RPMI 1640 bzw. RPMI 1640 + 5% FCS infiziert. 90 min nach Infektion erfolgte die Abtötung extrazellulärer Erreger durch 1 h Inkubation mit Gentamicin und Bestimmung der Zahl intrazellulärer Erreger jeweils 0, 2, 4 und 6 h nach Entfernung des Gentamicins. Die Zahl intrazellulärer Erreger ist in koloniebildenden Einheiten (KBE) angegeben resultierend aus den Mittelwerten ± Standardabweichungen dreier unabhängig in dreifacher Ausführung durchgeführter Experimente. \* p < 0,05 für *E. coli* A160 6 h im Vergleich zu *E. coli* A160 4 h. # p < 0,05 für *E. coli* A160 6 h im Vergleich zu *E. coli* A160::p4A 6 h.

### 3.2.3 Dreifacher Immunfluoreszenz-Test an *N. meningitidis* und HBMEC

In früheren Arbeiten ist durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt worden, dass *N. meningitidis* sich in Endothelzellen in einer vesikulären Struktur befindet. Anschließend zu den im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen zur intrazellulären Replikation der Meningokokken stellte sich die Frage nach der Biogenese der *Neisseria containing vacuoles* (NCV). Um die Vakuolen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie zu charakterisieren, wurden spezifische Marker des Endozytosewegs verwendet. Die Markierung des frühen Endosoms erfolgte mit Antikörper gegen das *early*

*endosome antigen 1* (EEA1) und den Transferrinrezeptor. Zum Nachweis des späten Endosoms wurden Antikörper gegen Rab7 und das lysosomassoziierte Membranprotein 1 (Lamp-1) verwendet. Zur Markierung des Lysosoms kamen Antikörper gegen Cathepsin D zum Einsatz (Abb.3.17).



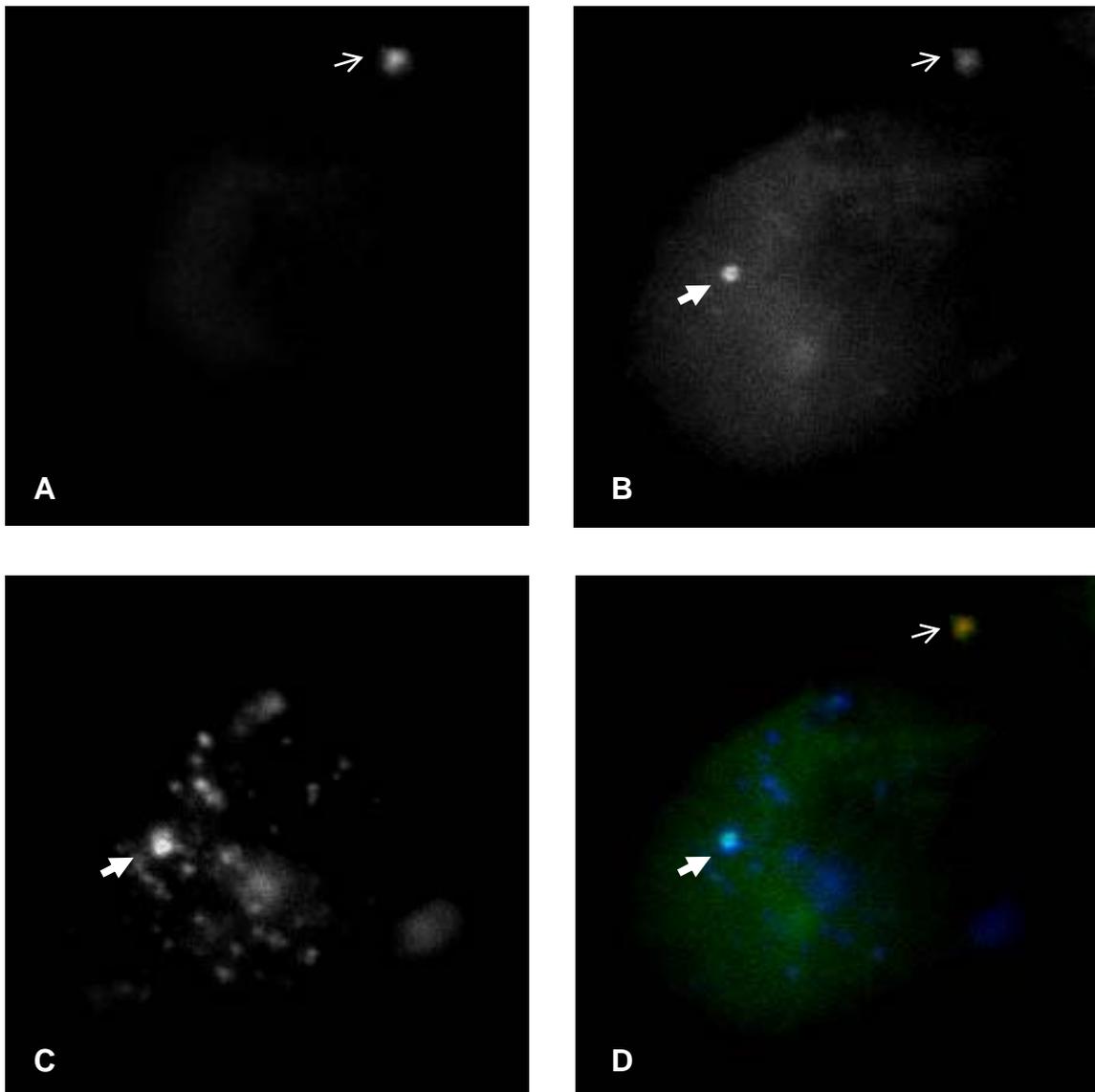
**Abbildung 3.17: Schema Phagosomenreifung.**

Ein Bakterium wird durch Phagozytose aufgenommen und fusioniert mit dem frühen Endosom (FE), nach einigen Minuten mit dem späten Endosom (SE) und schließlich mit dem Lysosom (Lys). Das frühe Endosom ist EEA1 und Transferrinrezeptor positiv, das späte Endosom Rab-7 und Lamp-1 positiv und das Lysosom Lamp-1 und Cathepsin D positiv. Der pH-Wert des Phagolysosoms beträgt 4,5-5,5.

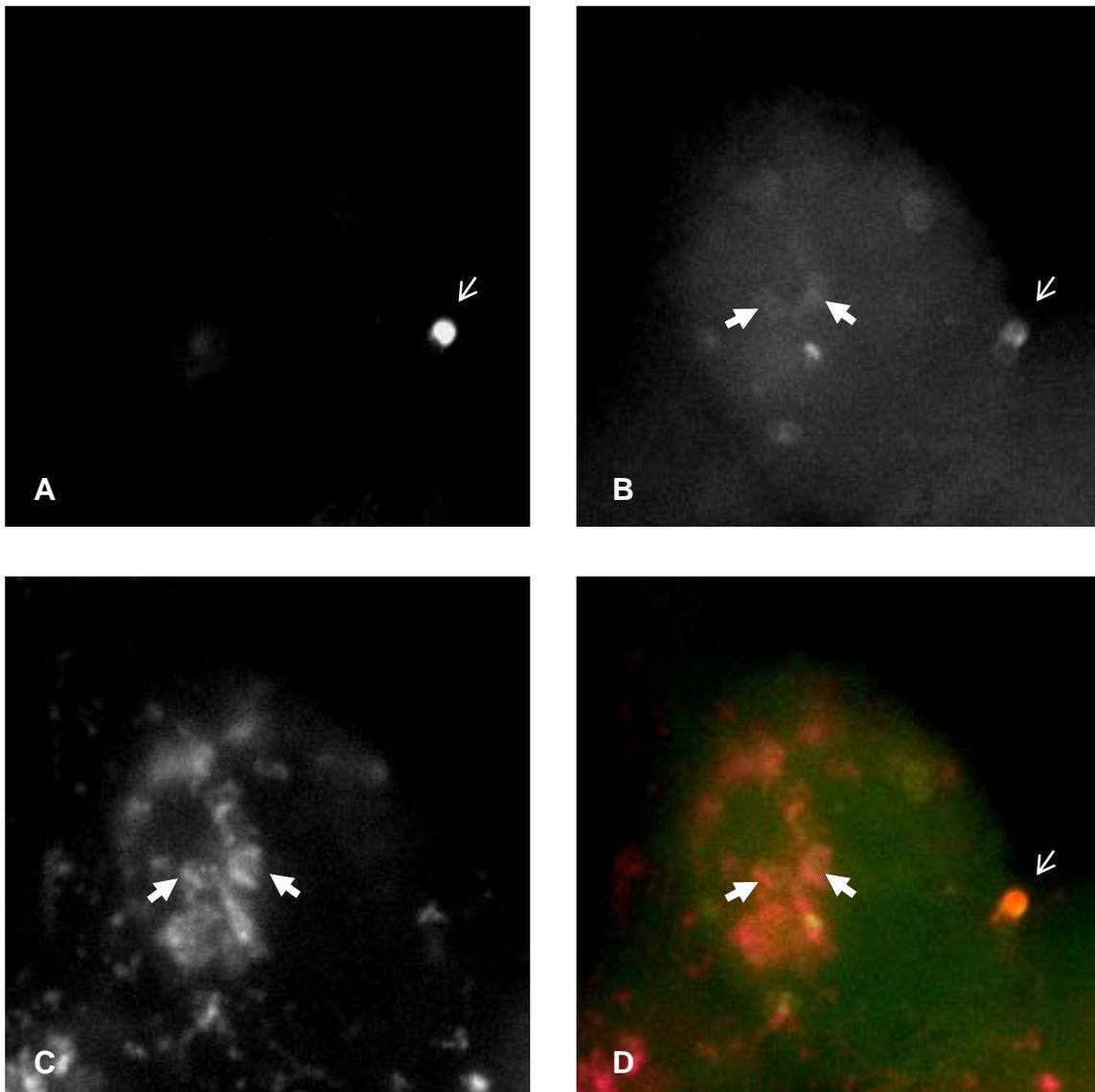
$5 \times 10^4$  HBMEC-Zellen / Well wurden auf in 24 Well Multischalen plazierte Deckgläser ausgesät und 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit den Neisserienstämmen MC58\* und MC58 *siaD* in RPMI + 10% HS. Nach einer Infektionszeit von 12-14 h wurden nicht zellassozierte Bakterien mit PBS herausgewaschen und eine Fixierung mit Paraformaldehyd vorgenommen. Die Markierung extrazellulärer Meningokokken erfolgte mit TRITC und FITC und intrazellulärer Erreger mit FITC. Anschließend erfolgte die Markierung von jeweils einem der spezifischen

Marker des Endozytosewegs mit Cy5. Von dieser dreifachen Färbung wurden Immunfluoreszenzaufnahmen angefertigt zum Nachweis möglicher Kolokalisationen der spezifischen Marker des frühen oder späten Endosoms bzw. des Lysosoms mit den sich intrazellulär befindenden Erregern.

Es konnte beobachtet werden, dass die NCV nach bakterieller Internalisierung mindestens zwei von den untersuchten Marker akquirierte, den Transferrinrezeptor und Lamp-1. Die entdeckten Kolokalisationen mit Lamp-1 und Transferrinrezeptor zeigten sich je nach Ebene als punkt- oder ringförmige Strukturen um die sich in der Zelle befindenden Meningokokken (Abb.3.18-20).

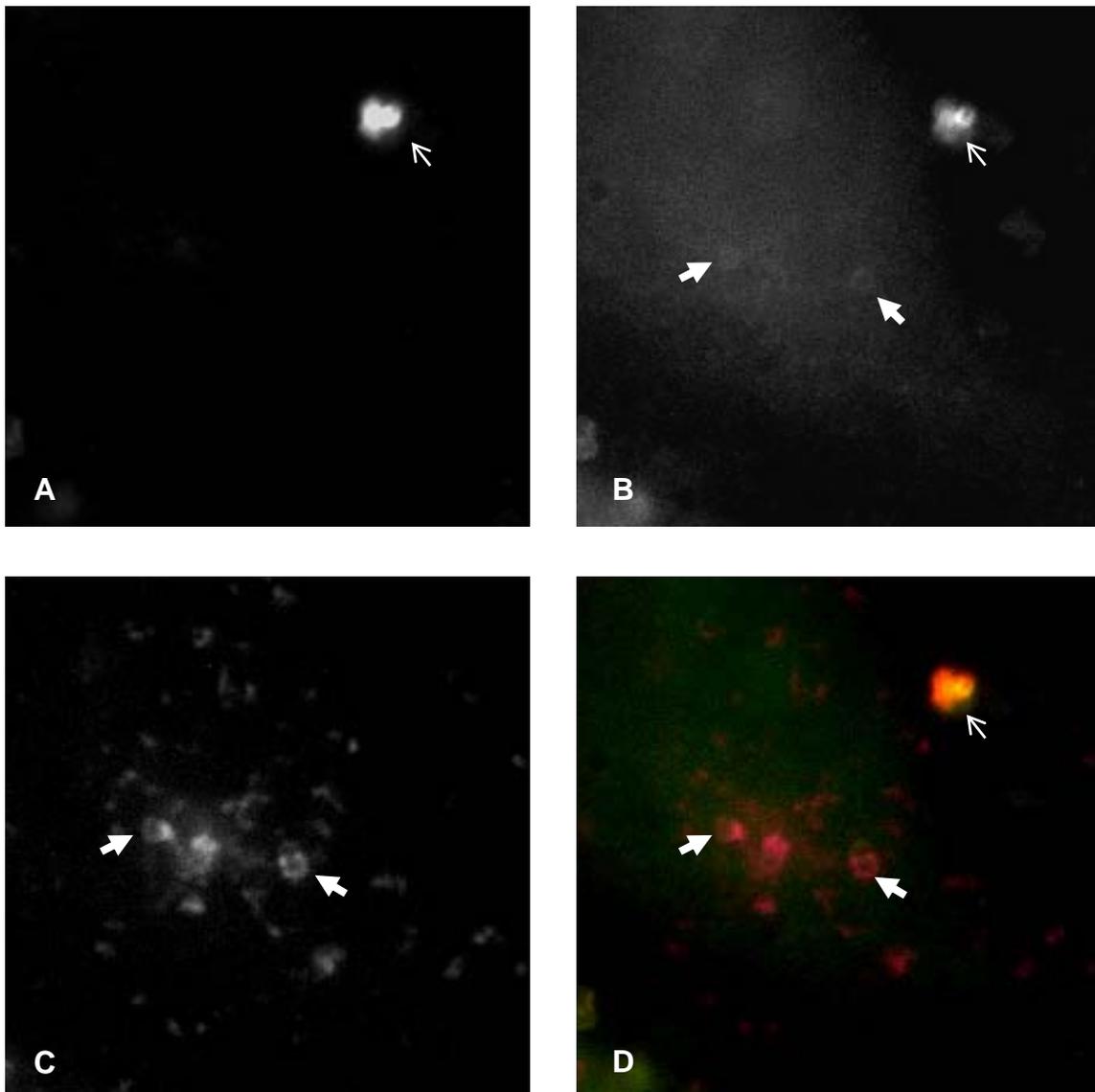


**Abbildung 3.18: Kolokalisation intrazellulärer *N. meningitidis* mit dem Transferrinrezeptor in HBMEC.** HBMEC-Zellen wurden in 24 Well Multischalen auf Deckgläschen ausgesät und mit MC58\* für 14 h infiziert. Nicht zellassoziierte Bakterien wurden herausgewaschen und extrazelluläre Erreger mit OMP + TRITC markiert (Abb.3.18 A), extra- und intrazelluläre Erreger nach Permeabilisierung der Zellen mit OMP + FITC markiert (Abb.3.18 B) und anschließend der Transferrinrezeptor als Marker für das frühe Endosom mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen den humanen Transferrinrezeptor + Cy5 markiert (Abb.3.18 C). Bei der Überlagerung der einzelnen Bilder (Abb.3.18 D) kamen extrazelluläre Erreger gelb (dünner Pfeil), intrazelluläre Erreger grün (dicker Pfeil) und der Transferrinrezeptor blau zur Darstellung. In der Abbildung 3.18 D ist eine punktförmige Kolokalisation eines intrazellulären Erregers mit dem Transferrinrezeptor sichtbar (dicker Pfeil).



**Abbildung 3.19: Kolokalisation intrazellulärer *N. meningitidis* mit Lamp-1 in HBMEC.**

HBMEC-Zellen wurden in 24 Well Multischalen auf Deckgläschen ausgesät und mit MC58\* *siaD* für 12 h infiziert. Nicht zellassoziierte Bakterien wurden herausgewaschen und extrazelluläre Erreger mit OMP + TRITC markiert (Abb.3.19 A), extra- und intrazelluläre Erreger nach Permeabilisierung der Zellen mit OMP + FITC markiert (Abb.3.19 B) und anschließend Lamp-1 (*lysosomal associated membrane protein 1*) als Marker für das späte Endosom mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen humanen CD107a (Lamp-1) Klon H4A3 und Cy5 markiert (Abb.3.19 C). Bei der Überlagerung der einzelnen Bilder (Abb.3.19 D) kamen extrazelluläre Erreger gelb (dünner Pfeil), intrazelluläre Erreger grün (dicke Pfeile) und Lamp-1 rosa zur Darstellung. In der Abbildung 3.19 D sind ringförmige Kolokalisationen intrazellulärer Erreger mit Lamp-1 sichtbar (dicke Pfeile).



**Abbildung 3.20: Kolokalisation intrazellulärer *N. meningitidis* mit Lamp-1 in HBMEC.**

HBMEC-Zellen wurden in 24 Well Multischalen auf Deckgläschen ausgesät und mit MC58\* *siaD* für 12 h infiziert. Nicht zellassoziierte Bakterien wurden herausgewaschen und extrazelluläre Erreger mit OMP + TRITC markiert (Abb.3.20 A), extra- und intrazelluläre Erreger nach Permeabilisierung der Zellen mit OMP + FITC markiert (Abb.3.20 B) und anschließend Lamp-1 (*lysosomal associated membrane protein 1*) als Marker für das späte Endosom mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen humanen CD107a (Lamp-1) Klon H4A3 und Cy5 markiert (Abb.3.20 C). Bei der Überlagerung der einzelnen Bilder (Abb.3.20 D) kamen extrazelluläre Erreger gelb (dünner Pfeil), intrazelluläre Erreger grün (dicke Pfeile) und Lamp-1 rosa zur Darstellung. In der Abbildung 3.20 D sind ringförmige Kolokalisationen intrazellulärer Erreger mit Lamp-1 sichtbar (dicke Pfeile).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Bedeutung des *narE* Gens für die Signaltransduktion

Am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführte Microarray-Studien haben eine transkriptionelle Aktivierung des ORF NMB1343 nach Kontakt von *N. meningitidis* Serogruppe B Stamm MC58 mit humanen Epithelzellen gezeigt [Hübner 2004, C. Hübner persönliche Mitteilung]. Der ORF NMB 1343 kodiert für das Enzym NarE (*Neisseria ADP-ribosylating enzyme*), eine erstmals 2003 entdeckte ADP-Ribosyltransferase. Bakterielle Mono-ADP-Ribosyltransferasen spielen häufig als Toxine eine wichtige Rolle in der Pathogenese. Die ADP-Ribosyltransferase NarE zeigt strukturelle Homologien mit hitzelabilem *E. coli* Enterotoxin und Cholera toxin und katalysiert den Transfer von ADP-Ribose auf Arginin-Reste. Trotz der Abwesenheit eines Signalpeptids wird das Protein in das Periplasma von *N. meningitidis* ausgeschleust [Massignani *et al.* 2003]. Das Gen wurde als 100% konserviert in 23 von 43 von Massignani *et al.* untersuchten Isolaten gefunden, vorhanden in allen hypervirulenten Isolaten des ET-5 und Lineage 3, aber in keinem des ET-37 und Cluster A4. Die Rolle des *narE* Gens in der Pathogenese wird diskutiert und die mögliche Bedeutung in der Aktivierung von Signaltransduktionsmechanismen sollte in Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Zur Klärung der Bedeutung des *narE* Gens für die Interaktion von *N. meningitidis* mit humanen zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (HBMEC) wurde zunächst eine *narE* Insertionsmutante vom *N. meningitidis* Serogruppe B Stamm MC58\* hergestellt und diese phänotypisch und genotypisch charakterisiert. Bei der Internalisierung von Meningokokken in zerebromikrovaskulären Endothelzellen kommt es zur Fibronectin-vermittelten Aufnahme über bakteriellem Opc und zellulärem  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor [Unkmeir *et al.* 2002b]. Diese führt zur Integrin-Aktivierung, die wiederum Signaltransduktionswege aktiviert. Eine Aktivierung von MAP-Kinasen während der Invasion verschiedener pathogener Erreger in Wirtszellen ist in der Literatur beschrieben worden [Sokolova *et al.* 2004]. Zu MAP-Kinasen gehört u.a. die *extracellular signal regulated kinase* (ERK). Die Kinetik der Phosphorylierung von ERK wurde während der Infektion von HBMEC mit der *narE* Insertionsmutante und dem Ursprungstamm MC58\* mittels Western Blot analysiert und so eine mögliche Bedeutung des *narE* Gens in der Aktivierung von Signaltransduktionsmechanismen untersucht. Es konnte, im Vergleich zum Ursprungstamm MC58\*, bei der *narE* Mutante keine Zu- oder Abnahme in der Phosphorylierung von ERK im Laufe der Infektion festgestellt werden.

Die erzielten Ergebnisse werden durch Arbeiten von Sokolova *et al.* [2004] bestätigt, in denen eine Infektion von HBMEC-Zellen mit *N. meningitidis* MC58\* ebenfalls zu keiner

Aktivierung von ERK führte. Dies deutet darauf hin, dass die Stresskinase ERK in Interaktion von *N. meningitidis* mit HBMEC nicht beteiligt ist.

Interessant wären jedoch weiterführende Untersuchungen zu Aktivierungsprofilen anderer MAP-Kinasen, wie der c-Jun N-terminale Kinasen 1 und 2 (JNK1 und JNK2) und p38 mitogen-aktivierten Protein(MAP)-Kinase, durch die *narE* Mutante. Untersuchungen haben auf eine entscheidende Rolle des JNK-Signalwegs im Invasionsprozess von *N. meningitidis* in HBMEC und auf eine Beteiligung von p38 MAPK-Weg in der Zytokinfreisetzung durch die HBMEC-Zelle hingewiesen [Sokolova *et al.* 2004]. Des weiteren wird es von Interesse sein, die infektiobiologische Bedeutung des *narE* Gens, mit Hilfe von Zellkulturversuchen zur Adhärenz und Invasion und zu intrazellulärem Überleben der *narE* Mutanten näher zu untersuchen.

## 4.2 Intrazelluläre Folgereaktionen von *N. meningitidis* und *E. coli* K1 in HBMEC

Um eine Entzündung der weichen Hirnhäute verursachen zu können, muss *N. meningitidis* nach Überwindung der nasopharyngealen Schleimhaut und hämatogener Ausbreitung in den Liquorraum gelangen, dort überleben und sich replizieren können. Um diese besondere Nische des menschlichen Körpers zu erreichen, ist es erforderlich, dass der Erreger in der Lage ist, eine dichte, mit *tight junctions* ausgestattete Endothel- bzw. Epithelzellbarriere, die Blut-Hirn- bzw. Blut-Liquor-Schranke, zu durchdringen. Pron *et al.* [1997] berichten von einem fatal verlaufenem Fall fulminanter Meningokokken-Sepsis, bei dem adhärente Erreger *in vivo* an Endothelzellen sowohl der Meningen als auch der *Plexus choroideus* gesehen wurden. Folglich ist die exakte Eintrittspforte von *N. meningitidis* in den Subarachnoidalraum bis heute noch unbekannt. Die Vorgänge der Adhäsion und Invasion *in vitro* mit Hilfe von Pili, Opa und Opc Proteinen an und in Epithel- bzw. Endothelzellen sind jedoch bereits von zahlreichen Autoren untersucht, charakterisiert und beschrieben worden [Merz und So 2000, Nassif 1999, Pron *et al.* 1997, Pujol *et al.* 1997, Unkmeir *et al.* 2002b, Virji *et al.* 1991, 1992, 1993, 1995, Vries *et al.* 1996]. Ebenfalls konnte *in vitro* mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen mehrfach nachgewiesen werden, dass der Erreger sich intrazellulär sowohl in Epithel- als auch in Endothelzellen in einer membranumgebenen Vakuole befindet [Merz und So 2000, Pujol *et al.* 1997, Stephens *et al.* 1983, Virji *et al.* 1991, Frosch 2003; Schubert-Unkmeir und Krohne, persönliche Mitteilung]. Das weitere intrazelluläre Schicksal von *N. meningitidis*, die Biogenese der *Neisseria containing vacuole* (NCV), und der Migrationsprozess des Erregers durch die Zelle sind jedoch noch wenig erforscht.

### 4.2.1 Intrazelluläre Replikation von *N. meningitidis* in HBMEC

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass das extrazelluläre Bakterium *N. meningitidis* nicht nur in der Lage zur Adhärenz und Invasion an und in Epithel- bzw. Endothelzellen ist, sondern auch fähig ist, über einen verlängerten Zeitraum intrazellulär zu überleben und zu replizieren. Die Expression der Kapsel ist jedoch hierfür essentiell und stellt für den Erreger einen intrazellulären Schutz dar. Wie erwartet wies der bekapselte MC58\* sowohl in HEp-2 als auch in HBMEC-Zellen nach 12 h Infektion und Abtötung extrazellulärer Erreger eine deutlich geringere Zahl invasiver Erreger im Vergleich zur kapseldefizienten isogenen Mutante MC58 *siaD* auf. Die Zahl der bekapselten Meningokokken sank während der folgenden Stunden um mehr als eine Potenzstufe, jedoch erholten sich die Bakterien in beiden Zellen und begannen sich zu replizieren. Die anfangs deutlich höhere Zahl an intrazellulären kapsellosen

Erregern sank sowohl in HEP-2 als auch in HBMEC langsam aber stetig ab ohne sich innerhalb der beobachteten sechs Stunden sichtbar zu erholen (Abb.3.12-13).

Geringere Adhärenz und Invasion der kapsel exprimierenden Meningokokken an bzw. in sowohl professionellen wie nicht-professionellen Phagozyten ist in der Literatur mehrfach beschrieben worden [Kolb-Maurer *et al.* 2001, Merz und So 2000, Unkmeir *et al.* 2002b, Virji *et al.* 1991, 1993, 1995] und konnte in dieser Versuchsreihe bestätigt werden. Eine intrazelluläre Replikation von *N. meningitidis* ist bisher jedoch nur in der humanen Epithelzelllinie A431 gezeigt worden [Larson *et al.* 2002]. Bei anderen Meningitiserregern wie *E. coli* K1, Streptokokken der Gruppe B und *Streptococcus pneumoniae* ist eine Invasion in Epithel- bzw. Endothelzellen in der Literatur ebenfalls von verschiedenen Autoren beschrieben worden, eine intrazelluläre Replikation wurde dennoch bisher nicht beobachtet [Gibson *et al.* 1993, Prasadarao *et al.* 1999, Ring *et al.* 1998, Rubens *et al.* 1992]. Untersuchungen zu *Citrobacter* spp., ein zur Familie *Enterobacteriaceae* gehörendem fakultativ pathogenen Erreger neonataler Meningitis, haben gezeigt, dass *Citrobacter freundii* in der Lage ist, in HBMEC zu invadieren, intrazellulär in einer Vakuole zu überleben und sich dort zu replizieren [Badger *et al.* 1999]. Die hauptsächliche Vermehrung der Erreger fand im Gegensatz zu Meningokokken jedoch nur in den ersten zwei Stunden statt. Bei dem fakultativ intrazellulären Pathogen *Salmonella typhimurium* wurde, wie bei *N. meningitidis* beobachtet, über eine ähnliche Verzögerung bis zum Beginn der intrazellulären Replikation berichtet [Meresse *et al.* 1999]. Dies könnte möglicherweise ein Hinweis auf einen unterschiedlich langen Maturationsprozess der Vakuolen im Vergleich zum *Citrobacter freundii* sein. Dass sich *C. freundii* nach 2 h nicht mehr erwähnenswert in HBMEC vermehrt, könnte jedoch auch auf das eingesetzte antibiotikahaltige Medium zurückgeführt werden. Durch das Gentamicin werden nicht nur extrazelluläre sondern auch sich zuerst intrazellulär befindende Erreger, die die Zelle vor dem nächsten Zeitpunkt verlassen, gleichermaßen abgetötet und folglich nicht berücksichtigt. In Versuchsreihen mit Meningokokken wurde, analog zu Larson *et al.* [2002], das Gentamicin nach einer Stunde entfernt und mit Zellkulturmedium ohne Antibiotikum ersetzt. Folglich wurden alle aus den zum Zeitpunkt 0 intrazellulären Meningokokken stammende Erreger berücksichtigt. Dies könnte zu der Annahme führen, dass die vermeintlich beobachtete intrazelluläre Replikation eine extrazelluläre Replikation der aus HBMEC-Zellen ausgetretenen Erregern ist, jedoch erscheint dies vernachlässigbar in Anbetracht der Tatsache, dass eine Vermehrung nur beim bekapselten MC58\* beobachtet werden konnte.

Es kann zusammengefasst werden, dass *N. meningitidis* in der Lage ist, während des intrazellulären Aufenthaltes in HEP-2 und HBMEC-Zellen nicht nur längere Zeit zu

überleben, sondern auch sich intrazellulär zu replizieren. Die Tatsache, dass die Kapsel hierfür eine entscheidende Rolle zu spielen scheint, steht im Einklang zu Microarray-Daten, die eine Hochregulation von Genen der Kapselsynthese (*siaB*, *siaA*, *ctrC* und *ctrD*) nach Zellkontakt zeigen [Dietrich *et al.* 2003].

#### 4.2.2 Rolle der Acetylierung der *E. coli* K1 Kapsel

Zwischen Kapselproduktion und Virulenz ist bei einer Vielzahl bakterieller Erreger invasiver Erkrankungen eine Korrelation zu beobachten. *E. coli* ist ein häufiger gramnegativer Erreger von Hirnhautentzündung bei Neugeborenen. Die neonatale *E. coli* Meningitis wird zu ca. 80% durch K1 Kapselpolysaccharid exprimierende *E. coli* Stämme verursacht [Glode *et al.* 1977, Xie *et al.* 2004]. Die *E. coli* K1 Kapsel besteht wie die Kapsel der B und C Meningokokken aus Homopolymeren der N-Acetyl-Neuraminsäure, die bei *E. coli* K1 und Serogruppe B Meningokokken  $\alpha$ -2,8-glykosidisch und bei Serogruppe C Meningokokken  $\alpha$ -2,9-glykosidisch verknüpft sind [Bhattacharjee *et al.* 1975, Claus *et al.* 2004]. Die bereits früh erkannte Variation in der Antigenität der K1 Polysaccharid [Orskov *et al.* 1979] resultiert aus verschiedenen Substituenten wie Acetyl-, Methyl-, Lactyl-, Sulfat- und Phosphatgruppen, wobei am häufigsten eine oder mehrere Hydroxylgruppen durch Acetylgruppen ersetzt sind [Claus *et al.* 2004]. Eine Änderung der Kapseleigenschaften u.a. der Größe, Ladung, Immunogenität und Virulenz durch die O-Acetylierung ist in der Literatur mehrfach beschrieben worden [Claus *et al.* 2004, Frasa *et al.* 1993, Lewis *et al.* 2004, Orskov *et al.* 1979, Torensma *et al.* 1991]. Dennoch ist die biologische Relevanz der O-Acetylierung von sowohl *E. coli* K1 Kapsel als auch Meningokokken der Serogruppe C, W-135 und Y zum größten Teil noch unklar. In Rahmen dieser Arbeit sollte nach möglichen Unterschieden in der Pathogenität des nicht acetylierten *E. coli* K1 A160 und der daraus konstruierten konstitutiv acetylierten Mutante *E. coli* A160::p4A durch Infektionsversuche zur Adhärenz und Invasion und des intrazellulären Überlebens in HBMEC-Zellen untersucht werden.

In der Adhärenz und Invasion konnten über den untersuchten Zeitraum (30 min - 4 h nach Infektion) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt werden (Abb 3.14 und 3.15). In Anwesenheit von 5% FCS replizierten und invadierten die Erreger so stark, dass beim Zeitpunkt 4 h ein Ablösen der HBMEC-Zellen zu beobachten war, die die vermeintlich verminderte Invasion in Anwesenheit von FCS erklärt (Abb.3.15). Bei Untersuchungen zur intrazellulären Replikation war nach 90 min Infektion und anschließender Abtötung extrazellulärer Erreger in den ersten vier Stunden kein Absterben und keine Vermehrung einer der beiden *E. coli* Stämme festzustellen. Nach einer Verzögerung von mehreren Stunden begann jedoch der nicht acetylierte

*E. coli* A160 sich intrazellulär zu replizieren, um in Anwesenheit von 5% FCS bei 6 h einen etwa 125fach höheren Wert im Vergleich zum Zeitpunkt 0 zu erreichen. Der acetylierte Stamm vermehrte sich ebenfalls, jedoch nur geringfügig und erreichte bei 6 h eine Verdoppelung der Zahl intrazellulärer Erreger (Abb.3.16).

Die komplexen Prozesse der Entwicklung einer neonatalen *E. coli* K1 Meningitis sind in der Literatur vielfach beschrieben worden. Der mukosalen Kolonisation und Interaktion mit Epithelzellen folgt die Invasion des Erregers in den Blutkreislauf mit anschließender intravasaler Replikation. Nach Erreichen einer ausreichend hohen Bakterämie, kommt es zur Interaktion mit Endothelzellen der Gehirnkapillaren und zur Translokation der Blut-Hirn-Schranke durch Transzytose des Erregers in einer membranumgebene Vakuole ECV (*E. coli* K1 containing vacuole) [Kim 2001, Kim *et al.* 2003, Meier *et al.* 1996, Prasadarao *et al.* 1996, Stins *et al.* 2001, Xie *et al.* 2004]. Eine eindeutige intrazelluläre Replikation von *E. coli* K1 in Epithel- oder Endothelzellen konnte jedoch bisher weder elektronenmikroskopisch noch mit Hilfe *gentamicin protection assays* beobachtet werden. Meier *et al.* [1996] untersuchten das intrazelluläre Überleben und die eventuelle Replikation von *E. coli* K1 in humaner Epithelzelllinie T24 (Harnblase) bis 72 h nach Infektion und konnten nur eine leichte intrazelluläre Vermehrung (11-25%) des Erregers feststellen. Als Positivkontrolle wurden parallel Invasionsassays mit *C. freundii* durchgeführt, die ebenfalls keine signifikante intrazelluläre Replikation ergeben haben. Jedoch berichten Badger *et al.* [1999] über eine intrazelluläre Replikation von *C. freundii* in HBMEC. Dies führt zu der Vermutung, dass die HBMEC-Zelle sowohl *C. freundii* als auch *E. coli* K1 möglicherweise eine günstigere Nische zur intrazellulären Replikation bietet als die Epithelzelllinie T24. Eine erfolgreiche Transzytose und anschließend erfolgte extrazelluläre Replikation von *E. coli* ist dennoch in der verwendeten Versuchsanordnung nicht auszuschließen. Die signifikant stärkere Vermehrung des nicht acetylierten *E. coli* K1 Stamms im Vergleich zu der acetylierten Mutante würde in diesem Fall ein Hinweis auf eine effektivere Transzytose durch die HBMEC-Zelle sein.

Jedoch muss die in der Literatur bisher beschriebene und auch in Rahmen dieser Arbeit verwendete Methodik zur Untersuchung intrazellulärer Replikation kritisch beurteilt werden. Erfolgt die Kultivierung der Zellen über den untersuchten Zeitraum mit antibiotikahaltigem Medium, werden bei einer sehr effektiven Transzytose die aus der Zelle ausgetretenen Erreger, ursprünglich intrazellulärer Herkunft, nicht berücksichtigt. Bei Verwendung von Zellkulturmedium ohne Antibiotikum ist es jedoch nicht auszuschließen, dass es nach erfolgter Transzytose auch zur extrazellulären Replikation kommt. Demnach lassen sich mittels *gentamicin protection assays* nur richtungsweisende Aussagen über eine mögliche intrazelluläre Replikation treffen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die O-Acetylierung der *E. coli* K1 Kapsel keinen Einfluss auf die Adhärenz an und Invasion in HBMEC hat. Der nicht acetylierte *E. coli* K1 Stamm A160 ist in der Lage, sich intrazellulär zu replizieren, jedoch sollte dies durch andere Untersuchungsmethoden bestätigt und die Möglichkeit einer effektiveren Transzytose mit extrazellulärer Replikation ausgeschlossen werden. Um die biologische Bedeutung der bei einer Vielzahl bakterieller Erreger verbreiteten O-Acetylierung des Kapselpolysaccharids zu entschlüsseln, müssen weiterführende Untersuchungen zur Pathogenität des Erregers erfolgen.

#### **4.2.3 Intrazelluläre Vesikelreifung der NCV (*Neisseria containing vacuole*)**

Zahlreiche intrazelluläre Pathogene sind in der Lage, in professionelle Phagozyten, Makrophagen und neutrophile Leukozyten, und in nicht-professionelle Phagozyten wie Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen zu invadieren, in diesen zu überleben und sich intrazellulär zu replizieren. Die verschiedenen Erreger haben unterschiedliche Wege und Strategien entwickelt, um eine passende intrazelluläre Nische zu finden. Shigellen, Listerien und Rickettsien flüchten aus dem Phagosom in das nährstoffreiche Zytoplasma der Wirtszelle. Mykobakterien, Salmonellen, Chlamydien und Legionellen dagegen befinden sich intrazellulär in einer membranumhüllten Vakuole und sind fähig, die Reifung dieser derart zu modifizieren, dass eine Fusion mit dem Lysosom unterbleibt und folglich der Erreger seiner Vernichtung entgeht [Meresse *et al.* 1999]. *Salmonella typhimurium* befindet sich in Epithelzellen in einem dynamischen Organell, in der sogenannten *Salmonella containing vacuole* (SCV), die spezifische Marker des Endozytosewegs von frühem Endosom bis zu lysosomalen Glykoproteinen selektiv akquiriert, ohne jedoch direkt mit Lysosomen zu fusionieren [Steele-Mortimer *et al.* 1999]. Das Phänomen ist nicht nur auf intrazelluläre Erreger beschränkt, sondern konnte auch bereits bei dem extrazellulären Erreger der neonatalen Meningitis *E. coli* K1 in humanen mikrovaskulären Gehirndothelzellen gezeigt werden [Kim *et al.* 2003].

Im Gegensatz zu intrazellulär lebenden Erregern invadiert das extrazelluläre Bakterium *N. meningitidis* humane Gehirndothelzellen, um über den vermutlich transzellulären Weg vom Blutkreislauf in den Liquorraum und weiter zu den weichen Hirnhäuten zu gelangen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, weitere Erkenntnisse über das *intracellular trafficking* der Meningokokken in humanen mikrovaskulären Gehirndothelzellen (HBMEC) zu gewinnen. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass *N. meningitidis* sich in Epithel- und Endothelzellen in einer Vakuole befindet [Merz und So 2000, Pujol *et al.* 1997, Stephens *et al.* 1983, Virji *et al.* 1991, Frosch 2003; Schubert-Unkmeir und Krohne, persönliche Mitteilung] und vorangegangene Ergebnisse dieser Arbeit deuteten

darauf hin, dass bekapselte Meningokokken in der Lage sind, nicht nur intrazellulär zu überleben, sondern sich auch zu replizieren (Abb.3.12-13). Um zu verstehen, wie der Erreger ohne Degradation durch die Zelle passiert, und welche Nische er sich zu Nutze macht für eine weitere Replikation, wurden Untersuchungen zur Biogenese der *Neisseria containing vacuole* (NCV) und zur Interaktion von NCV mit endozytotischen Kompartimenten der HBMEC vorgenommen.

Zuerst war es erforderlich eine Methode zur simultanen Darstellung adhärenter und invasiver Meningokokken mit spezifischen Marker des Endozytosewegs von HBMEC zu entwickeln. Um erste richtungsweisende Ergebnisse zu erhalten, erfolgte die Infektion der HBMEC-Zellen mit dem bekapselten Stamm MC58\* und der isogenen kapseldefizienten Mutante MC58 *siaD* ohne Synchronisierung, d.h. ohne zusätzliche Maßnahmen, die zu einer zeitgleichen Invasion der Bakterien führen würden. Durch die zufällige Internalisierung der Erreger kann man qualitative, jedoch keine quantitativen Aussagen, bzw. Aussagen in Abhängigkeit der Zeit über die Interaktion der intrazellulären Meningokokken mit Strukturen des Endozytosewegs treffen.

Die ersten Ergebnisse zeigten, dass anstatt den Endozytoseweg zu umgehen, Meningokokken sowohl mit frühem als auch mit spätem Endosom interagieren (Abb.3.18-20). Beobachtete Kolokalisationen mit dem Transferrinrezeptor und lysosomassoziiertem Membranprotein 1 (Lamp-1) bestätigen sowohl das Vorhandensein der bereits in der Literatur in HBMEC beschriebenen *trafficking machinery* [Kim *et al.* 2003] als auch die Interaktion von *N. meningitidis* mit frühem und spätem Endosom. Dass Kolokalisationen mit den Markern EEA1 und Rab-7 nicht beobachtet werden konnten, liegt wahrscheinlich an der dynamischen Charakteristik der Ereignisse. Es ist bereits nachgewiesen worden, dass *E. coli K1 containing vacuoles* (ECV) in HBMEC-Zellen mit EEA1 interagieren [Kim *et al.* 2003]. Bei Salmonellen wird EEA1 in der ersten sehr frühen Phase von der *Salmonella containing vacuole* (SCV) akquiriert und ist nach 5 min Infektion bei nahezu 90% der Vakuolen nachweisbar [Steele-Mortimer *et al.* 1999]. Nach weiteren 40 min gelingt der Nachweis nur noch bei ca. 10%. Dies führt zu der Vermutung, dass Meningokokken möglicherweise auch mit dem frühen Endosom interagieren, jedoch kann diese frühe und relativ kurze Interaktion mittels der gewählten Versuchsanordnung nicht erfasst werden.

Die Schwierigkeit in der Methodik liegt unter anderem an der langsamen Invasion und geringen Invasionsraten der Meningokokken, die lange Infektionszeiten erforderlich machen. Zu lange Infektionszeiten führen jedoch zur Apoptose der HBMEC-Zellen [Sokolova und Schubert-Unkmeir, persönliche Mitteilung] und folglich gestaltet sich die Wahl der Infektionszeit als schwierig. Demnach wäre es zweckmäßig, ein System mit

schnellerer und effektiverer Infektion der HBMEC-Zellen durch Meningokokken zu etablieren und dieses nach Möglichkeit zu synchronisieren. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die bakterielle Invasion unter anderem von der Wachstumsphase abhängig ist [Lee und Falkow 1990, Steele-Mortimer *et al.* 1999]. Somit könnte die Infektion durch das genaue Ermitteln der maximalen Invasionseffizienz und Infektion der Zellen exakt in der entsprechenden Wachstumsphase optimiert werden. Andere Autoren erreichten eine Synchronisierung der Infektion durch Zentrifugieren der Erreger auf den Zellrasen bzw. durch eine Kombination aus Zentrifugation und einem Inkubationsschritt bei 4°C [Weinstein *et al.* 1998]. Jedoch müsste genauestens untersucht werden, ob diese Verfahren mit den eher empfindlichen Meningokokken durchführbar wären und ob die Biogenese der NCV durch diese Maßnahmen tatsächlich unbeeinflusst bliebe.

Es konnte beobachtet werden, dass die Markierung intrazellulärer Erreger nach Permeabilisierung der Zelle zu einem relativ schwachen Signal führte. Das Erkennen intrazellulärer Bakterien wurde zusätzlich durch das Hintergrundleuchten von Wirtszellstrukturen erschwert, wie bereits auch von Agerer *et al.* [2004] beschrieben. Schwach gefärbte Bakterien und die unspezifische Färbung der Zelle könnten auch eine Erklärung für die Diskrepanz der Zahl in *gentamicin protection assays* erfassten intrazellulären Erregern gegenüber den mittels Immunfluoreszenzmikroskopie innerhalb der Zelle gefundenen Erregern sein. Folglich wird die Etablierung der Infektion mit kovalent FITC-markierten Bakterien oder Verwendung von *green-fluorescent protein*(GFP)-exprimierender Meningokokkenstämme eine interessante Weiterentwicklung der Methodik sein. Vorab gilt es jedoch zu überprüfen, dass die FITC- bzw. GFP-Markierung keinen Einfluss auf die bakterielle Invasion und Fähigkeit zum intrazellulären Überleben hat. Im weiteren Verlauf wäre es ebenfalls erstrebenswert, die mit der Immunfluoreszenzmikroskopie gewonnenen qualitativen Aussagen durch quantitative Analysen der Kinetik zur Akquirierung von früh- und spätendosomalen spezifischen Markern in der Durchflusszytometrie (Epitop-spezifischen FACS-Analysen) zu bestätigen und zu ergänzen.

Als Ergebnis lässt sich feststellen, dass eine Interaktion von *N. meningitidis* mit dem Endozytoseweg und die Fähigkeit dieses Erregers zum intrazellulären Überleben und zur Replikation in HBMEC-Zellen gezeigt werden konnte. Dies führt zur Schlussfolgerung, dass Meningokokken in der Lage sind, ihr intrazelluläres Schicksal zu beeinflussen und durch Modifizierung der Wirtszellprozesse dem lysosomalen Tod zu entgehen. Sowohl die Dynamik dieses Organells als auch die angedeutete schützende Rolle der Kapsel während der intrazellulären Passage des Erregers bleiben näher zu erforschen und geben Anregungen für weitere Untersuchungen. Eine weitere Charakterisierung der

Interaktionen zwischen *N. meningitidis* und Endothelzellen der humanen Gehirnkapillaren ist zum besseren Verständnis der Pathogenese und zur Entwicklung neuer Präventions- und Therapieansätze der Meningokokken-Meningitis dringend erforderlich.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

*Neisseria meningitidis* ist einer der wichtigsten Erreger bakterieller Meningitiden und gefürchtet für das Potential Epidemien auszulösen. Die Meningokokken-Meningitis bleibt bis heute auch in Industrieländern mit hoher Mortalität verbunden. Um eine Meningitis verursachen zu können, müssen Meningokokken die Blut-Hirn/Liquor-Schranke überqueren. Dies erfolgt vermutlich über den transzellulären Weg durch die Endothelzellbarriere der Gehirnkapillare. Ereignisse unmittelbar vor der bakteriellen Internalisierung sind vielfach untersucht, noch wenig erforscht sind jedoch die in der Endothelzelle durch den initialen Kontakt des Erregers ausgelösten Signalkaskaden. Die Rolle des für eine ADP-Ribosyltransferase kodierenden *narE* Gens in der Pathogenese der Meningokokken-Infektion und die mögliche Bedeutung in der Aktivierung von Signaltransduktionsmechanismen wird diskutiert. Eine *narE* Insertionsmutante wurde hergestellt und charakterisiert. Anschließend wurde die Aktivierung der *extracellular signal regulated kinase* (ERK) im Verlauf von Infektionsassays in HBMEC (*human brain microvascular endothelial cell*) mittels Western Blot untersucht. Eine Zu- oder Abnahme in der Phosphorylierung von ERK und folglich eine Aktivierung oder Deaktivierung der ERK-vermittelten Signalkaskaden in HBMEC konnte jedoch im Laufe der Infektion bei der *narE* Mutante im Vergleich zum Wildtypstamm nicht festgestellt werden.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen Meningokokken intrazellulär einzeln aber auch zu mehreren in phagosomenähnlichen membranumgebenen Strukturen. Die Fähigkeit von *N. meningitidis* sich intrazellulär zu replizieren wurde mittels Infektionsassay untersucht. Bekapselte Meningokokken waren in der Lage, sich sowohl in Epithel- als auch in Endothelzellen zu replizieren, während unbekapselte Erreger intrazellulär abgetötet wurden. Bei Meningokokken wie auch beim Erreger neonataler Meningitiden *E. coli* K1 wird eine O-Acetylierung des Kapselpolysaccharids beobachtet. Die biologische Bedeutung der O-Acetylierung der Sialinsäure wurde in Infektionsassays mit einem nicht acetylierten *E. coli* K1 Stamm und einer isogenen konstitutiv acetylierten Mutante untersucht. In der Adhärenz an und Invasion in HBMEC konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Eine stärker ausgeprägte intrazelluläre Replikation wurde jedoch nach einer Verzögerung von mehreren Stunden bei dem nicht acetylierten Isolat beobachtet.

Um die *Neisseria containing Vacuole* (NCV) näher zu charakterisieren und mögliche Interaktionen mit dem Endozytoseweg in HBMEC zu untersuchen, wurde eine dreifache Immunfluoreszenzfärbung zur simultanen Darstellung intrazellulärer Meningokokken und

spezifischer Marker des frühen bzw. späten Endosoms und Lysosoms etabliert. Eine Akquirierung des Transferrinrezeptors als Marker für das frühe Endosom und des Lamp-1 (*lysosomal associated membrane protein 1*) als Marker für das späte Endosom konnte durch Kolokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden.

## 6 LITERATUR

Agerer F, Waeckerle S, Hauck CR (2004) Microscopic quantification of bacterial invasion by a novel antibody-independent staining method. *J Microbiol Methods* 59(1):23-32

Badger JL, Stins MF, Kim KS (1999) *Citrobacter freundii* invades and replicates in human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* 67(8):4208-15

Baker MG, Martin DR, Kieft CE, Lennon D (2001) A 10-year serogroup B meningococcal disease epidemic in New Zealand: descriptive epidemiology, 1991-2000. *J Paediatr Child Health* 37(5):S13-9

Bhattacharjee AK, Jennings HJ, Kenny CP, Martin A, Smith IC (1975) Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance. *J Biol Chem* 250(5):1926-32

Claus H, Borrow R, Achtman M, Morelli G, Kantelberg C, Longworth E, Frosch M, Vogel U (2004) Genetics of capsule O-acetylation in serogroup C, W-135 and Y meningococci. *Mol Microbiol* 51(1):227-39

Danzig L (2004) Meningococcal vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 23(12 Suppl):S285-92

Dietrich G, Kurz S, Hubner C, Aepinus C, Theiss S, Guckenberger M, Panzner U, Weber J, Frosch M (2003) Transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* during infection. *J Bacteriol* 185(1):155-64

Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16(13):6127-45

Frasa H, Procee J, Torensma R, Verbruggen A, Algra A, Rozenberg-Arska M, Kraaijeveld K, Verhoef J (1993) *Escherichia coli* in bacteremia: O-acetylated K1 strains appear to be more virulent than non-O-acetylated K1 strains. *J Clin Microbiol* 31(12):3174-8

Frosch M (2003) Akute bakterielle Meningitis, Uni-Med Science, Bremen

Frosch M, Gorgen I, Boulnois GJ, Timmis KN, Bitter-Suermann D (1985) 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* 82(4):1194-8

Frosch M, Schultz E, Glenn-Calvo E, Meyer TF (1990) Generation of capsule-deficient *Neisseria meningitidis* strains by homologous recombination. *Mol Microbiol* 4(7):1215-8

Gibson RL, Lee MK, Soderland C, Chi EY, Rubens CE (1993) Group B streptococci invade endothelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion. *Infect Immun* 61(2):478-85

Glode MP, Sutton A, Moxon ER, Robbins JB (1977) Pathogenesis of neonatal *Escherichia coli* meningitis: induction of bacteremia and meningitis in infant rats fed *E. coli* K1. *Infect Immun* 16(1):75-80

Greenwood B (1999) Manson Lecture. Meningococcal meningitis in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93(4):341-53

Hammerschmidt S, Muller A, Sillmann H, Muhlenhoff M, Borrow R, Fox A, Putten J van, Zollinger WD, Gerardy-Schahn R, Frosch M (1996) Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol* 20(6a):1211-20

Heesemann J, Laufs R (1985) Double immunofluorescence microscopic technique for accurate differentiation of extracellularly and intracellularly located bacteria in cell culture. *J Clin Microbiol* 22(2):168-75

Hübner C (2004) Analyse des Transkriptionsprofils von *Neisseria meningitidis* während der Infektion von Epithel- und Endothelzellen unter Verwendung der Mikroarray-technologie. Naturwissenschaftliche Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Kim KJ, Elliott SJ, Di Cello F, Stins MF, Kim KS (2003) The K1 capsule modulates trafficking of *E. coli*-containing vacuoles and enhances intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol* 5(4):245-52

Kim KS (2001) *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. *Infect Immun* 69(9):5217-22 Review

Kolb-Maurer A, Unkmeir A, Kammerer U, Hubner C, Leimbach T, Stade A, Kampgen E, Frosch M, Dietrich G (2001) Interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Infect Immun* 69(11):6912-22

Kurz S, Hubner C, Aepinus C, Theiss S, Guckenberger M, Panzner U, Weber J, Frosch M, Dietrich G (2003) Transcriptome-based antigen identification for *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 21(7-8):768-75

Larson JA, Higashi DL, Stojiljkovic I, So M (2002) Replication of *Neisseria meningitidis* within epithelial cells requires TonB-dependent acquisition of host cell iron. *Infect Immun* 70(3):1461-7

Lee CA, Falkow S (1990) The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(11):4304-8

Lewis AL, Nizet V, Varki A (2004) Discovery and characterization of sialic acid O-acetylation in group B *Streptococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(30):11123-8

Masignani V, Balducci E, Di Marcello F, Savino S, Serruto D, Veggi D, Bambini S, Scarselli M, Arico B, Comanducci M, Adu-Bobie J, Giuliani MM, Rappuoli R, Pizza M (2003) NarE: a novel ADP-ribosyltransferase from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 50(3):1055-67

Meier C, Oelschlaeger TA, Merkert H, Korhonen TK, Hacker J (1996) Ability of *Escherichia coli* isolates that cause meningitis in newborns to invade epithelial and endothelial cells. *Infect Immun* 64(7):2391-9

Memish ZA (2002) Meningococcal disease and travel. *Clin Infect Dis* 34(1):84-90

Meresse S, Steele-Mortimer O, Moreno E, Desjardins M, Finlay B, Gorvel JP (1999) Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nat Cell Biol* 1(7):E183-8 Review

Merz AJ, Rifkenberg DB, Arvidson CG, So M (1996) Traversal of a polarized epithelium by pathogenic *Neisseriae*: facilitation by type IV pili and maintenance of epithelial barrier function. *Mol Med* 2(6):745-54

Merz AJ, So M (2000) Interactions of pathogenic *neisseriae* with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:423-57

Moore PS, Reeves MW, Schwartz B, Gellin BG, Broome CV (1989) Intercontinental spread of an epidemic group A *Neisseria meningitidis* strain. *Lancet* 2(8657):260-3

Nassif X (1999) Interaction mechanisms of encapsulated meningococci with eucaryotic cells: what does this tell us about the crossing of the blood-brain barrier by *Neisseria meningitidis*? *Curr Opin Microbiol* 2(1):71-7

Nassif X, Pujol C, Morand P, Eugene E (1999) Interactions of pathogenic *Neisseria* with host cells. Is it possible to assemble the puzzle? *Mol Microbiol* 32(6):1124-32

Nizet V, Kim KS, Stins M, Jonas M, Chi EY, Nguyen D, Rubens CE (1997) Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. *Infect Immun* 65(12):5074-81.

Orskov F, Orskov I, Sutton A, Schneerson R, Lin W, Egan W, Hoff GE, Robbins JB (1979) Form variation in *Escherichia coli* K1: determined by O-acetylation of the capsular polysaccharide. *J Exp Med* 149(3):669-85

Prasadarao NV, Wass CA, Stins MF, Shimada H, Kim KS (1999) Outer membrane protein A-promoted actin condensation of brain microvascular endothelial cells is required for *Escherichia coli* invasion. *Infect Immun* 67(11):5775-83

Prasadarao NV, Wass CA, Weiser JN, Stins MF, Huang SH, Kim KS (1996) Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* 64(1):146-53

Pron B, Taha MK, Rambaud C, Fournet JC, Pattey N, Monnet JP, Musilek M, Beretti JL, Nassif X (1997) Interaction of *Neisseria meningitidis* with the components of the blood-brain barrier correlates with an increased expression of PiliC. *J Infect Dis* 176(5):1285-92

Pujol C, Eugene E, de Saint Martin L, Nassif X (1997) Interaction of *Neisseria meningitidis* with a polarized monolayer of epithelial cells. *Infect Immun* 65(11):4836-42

Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI (1998) Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* 102(2):347-60

Rubens CE, Smith S, Hulse M, Chi EY, van Belle G (1992) Respiratory epithelial cell invasion by group B streptococci. *Infect Immun* 60(12):5157-63

Sokolova O, Heppel N, Jagerhuber R, Kim KS, Frosch M, Eigenthaler M, Schubert-Unkmeir A (2004) Interaction of *Neisseria meningitidis* with human brain microvascular endothelial cells: role of MAP- and tyrosine kinases in invasion and inflammatory cytokine release. *Cell Microbiol* 6(12):1153-66

Steele-Mortimer O, Meresse S, Gorvel JP, Toh BH, Finlay BB (1999) Biogenesis of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol* 1(1):33-49

Stephens DS, Hoffman LH, McGee ZA (1983) Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis* 148(3):369-76

Stins MF, Badger J, Kim KS (2001) Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog* 30(1):19-28

Stins MF, Gilles F, Kim KS (1997) Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol* 76(1-2):81-90

Sultan B, Labadi K, Guegan JF, Janicot S (2005) Climate Drives the Meningitis Epidemics Onset in West Africa. *PLoS Med* 2(1):e6

Taha MK, Achtman M, Alonso JM, Greenwood B, Ramsay M, Fox A, Gray S, Kaczmarek E (2000) Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. *Lancet* 2000 356(9248):2159

Torensma R, van Wijk A, Visser MJ, Bouter A, Rozenberg-Arska M, Verhoef J (1991) Monoclonal antibodies specific for the phase-variant O-acetylated K1 capsule of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 29(7):1356-8

Unkmeir A, Kammerer U, Stade A, Hubner C, Haller S, Kolb-Maurer A, Frosch M, Dietrich G (2002a) Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human dendritic cells. *Infect Immun* 70(5):2454-62

Unkmeir A, Latsch K, Dietrich G, Wintermeyer E, Schinke B, Schwender S, Kim KS, Eigenthaler M, Frosch M (2002b) Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol Microbiol* 46(4):933-46

Vieusseux M (1806) Mémoire sur la maladie qui a régné à Genève au printemps de 1805. *J Méd Chir Pharmacol* 11:163-182

Virji M, Kayhty H, Ferguson DJ, Alexandrescu C, Heckels JE, Moxon ER (1991) The role of pili in the interactions of pathogenic *Neisseria* with cultured human endothelial cells. *Mol Microbiol* 5(8):1831-41

Virji M, Makepeace K, Ferguson DJ, Achtman M, Moxon ER (1993) Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol* 10(3):499-510

Virji M, Makepeace K, Ferguson DJ, Achtman M, Sarkari J, Moxon ER (1992) Expression of the Opc protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 6(19):2785-95

Virji M, Makepeace K, Moxon ER (1994) Distinct mechanisms of interactions of Opc-expressing meningococci at apical and basolateral surfaces of human endothelial cells; the role of integrins in apical interactions. *Mol Microbiol* 14(1):173-84

Virji M, Makepeace K, Peak IR, Ferguson DJ, Jennings MP, Moxon ER (1995) Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol Microbiol* 18(4):741-54

Vogel U, Elias J, Claus H, Hessler F, Frosch M (2004) Epidemiologie invasiver Infektionen durch *Neisseria meningitidis*. *Monatsschrift Kinderheilkd* 152:371-381

Vries FP de, van Der Ende A, van Putten JP, Dankert J (1996) Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. *Infect Immun* 64(8):2998-3006

Weichselbaum A (1887) Über die Ätiologie der akuten Meningitis cerebro-spinalis. *Fortschr Med* 5:573-583, 620-626

Weinstein DL, O'Neill BL, Hone DM, Metcalf ES (1998) Differential early interactions between *Salmonella enterica* serovar Typhi and two other pathogenic *Salmonella* serovars with intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 66(5):2310-8

World Health Organization (2000) Communicable Disease Surveillance and Response (CSR), Disease Outbreak News, Meningococcal Disease. [http://www.who.int/disease-outbreak-news/disease\\_indices/men\\_index.html](http://www.who.int/disease-outbreak-news/disease_indices/men_index.html)

World Health Organization (2001) Communicable Disease Surveillance and Response (CSR), Disease Outbreak News, Meningococcal Disease. [http://www.who.int/disease-outbreak-news/disease\\_indices/men\\_index.html](http://www.who.int/disease-outbreak-news/disease_indices/men_index.html)

World Health Organization (2003) The use of polysaccharide trivalent ACW vaccine for the control of epidemic meningococcal disease outbreaks in countries of the African meningitis belt. WHO/CDS/CSR/GAR/2003.14

Xie Y, Kim KJ, Kim KS (2004) Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocation of the blood-brain barrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42(3):271-9

## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
CSPD <sup>®</sup>	Dinatrium 3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan}-4-yl)phenylphosphat
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Deoxyguanidintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Deoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECGS	<i>endothelial cell growth supplement</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	<i>early endosome antigen 1</i>
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbant assay</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
FCS	fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
g	Erdbeschleunigung ( <i>gravity</i> )
G	Guanin
GC-Agar	Gonokokken-Agar ( <i>gonococcal complex agar</i> )
GITC	Guanidinisoithiocyanat
HBMEC	<i>human brain microvascular endothelial cell</i>
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horse radish peroxidase</i> )
HS	humanes Serum

---

IFT	Immunfluoreszenz-Test
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktosid
KBE	koloniebildende Einheit
Lamp-1	<i>lysosomal associated membrane protein 1</i>
LB	<i>Luria Bertani</i>
mA	Milli-Ampere
MAB	<i>mouse antibody</i>
MC	Meningokokken
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>narE</i>	<i>Neisseria ADP-ribosylating enzyme</i>
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	optische Dichte
OMP	Aussenmembranproteine ( <i>outer membran proteins</i> )
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PPM	Proteose-Pepton-Medium
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
$T_m$	Schmelztemperatur ( <i>melting temperature</i> )
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	<i>Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen ( <i>weight/volume</i> )
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Geräte .....	10
Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien.....	12
Tabelle 2.3: Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme.....	12
Tabelle 2.4 Puffer und Lösungen.....	14
Tabelle 2.5: Nährmedien.....	16
Tabelle 2.6: Zusatz von Antibiotika.....	17
Tabelle 2.7: Antikörper beim Western Blot Nachweis der Meningokokken-Oberflächenproteine.....	33
Tabelle 2.8: Zahl der eingesetzten Bakterien, verwendetes Medium und Infektionszeit.....	35
Tabelle 2.9: Antikörper beim IFT-III.....	38

## 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Der Meningitis-Gürtel.....	1
Abbildung 1.2: Invasive Meningokokken in einer HBMEC-Zelle.....	8
Abbildung 2.1: Dreifacher Immunfluoreszenz-Test (IFT-III).....	39
Abbildung 2.2: Excitation von TRITC, FITC und Cy5.....	40
Abbildung 2.3: Emission von TRITC, FITC und Cy5.....	40
Abbildung 3.1: Gensequenz des ORF NMB1343 ( <i>narE</i> Gen).....	41
Abbildung 3.2: Darstellung der Konstruktion des Plasmids p <i>Nar</i> TOP.....	42
Abbildung 3.3: Konstruktion des Plasmids p <i>Nar</i> SpecTOP.....	42
Abbildung 3.4: Southern Blot.....	43
Abbildung 3.5: RT-PCR.....	44
Abbildung 3.6: Nachweis des Aussenmembranproteins Opa.....	45
Abbildung 3.7: Nachweis des Aussenmembranproteins Opc.....	45
Abbildung 3.8: Nachweis von Pili.....	45
Abbildung 3.9: Kapselpolysaccharid-ELISA.....	46
Abbildung 3.10: Phosphorylierung von ERK1 im Western Blot dargestellt.....	47
Abbildung 3.11: Versuchsablauf zur Bestimmung intrazellulärer Replikation.....	48
Abbildung 3.12: Intrazelluläre Replikation von <i>N. meningitidis</i> in Epithelzellen (HEp-2).....	49
Abbildung 3.13: Intrazelluläre Replikation von <i>N. meningitidis</i> in Endothelzellen (HBMEC).....	50
Abbildung 3.14: Adhärenz von nicht acetyliertem und acetyliertem <i>E. coli</i> in HBMEC.....	51
Abbildung 3.15: Invasion von nicht acetyliertem und acetyliertem <i>E. coli</i> in HBMEC.....	52
Abbildung 3.16: Intrazelluläre Replikation von <i>E.coli</i> A160 und A160::p4A in Endothelzellen.....	53
Abbildung 3.17: Schema Phagosomenreifung.....	54
Abbildung 3.18: Kolokalisation intrazellulärer <i>N. meningitidis</i> mit dem Transferrinrezeptor in HBMEC.....	56
Abbildung 3.19: Kolokalisation intrazellulärer <i>N. meningitidis</i> mit Lamp-1 in HBMEC.....	57
Abbildung 3.20: Kolokalisation intrazellulärer <i>N. meningitidis</i> mit Lamp-1 in HBMEC.....	58

## **DANKSAGUNG**

Ein großes Dankeschön an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Vorrangig möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Matthias Frosch, für seine Worte: „...aber eine Promotion muss her“ bedanken und damit nicht nur für das Ermöglichen dieser Arbeit, sondern auch für das Erwecken meiner Neugierde für die Welt der mikrobiologischen Forschung. Später, in den doch so unvermeidbaren Momenten der Frustration, war es für mich von großem Wert, dass er an mich und meine Fähigkeiten geglaubt hat. Meiner Betreuerin Dr. Alexandra Schubert-Unkmeir möchte ich herzlich danken, vor allem für die kreativen Ideen und für die kompetente Regie dieser Arbeit. Ihr unermüdlicher Optimismus, eines Tages einer Kolokalisation zu begegnen, sucht bis heute seinesgleichen.

Ulla „das geht ganz einfach“ Panzner danke ich für Unterstützung aller Art vom Dreisatz bis zu lebensrettenden Maßnahmen. Für ein schönes Leben braucht man einfach eine Diplokokke. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Claudia Hübner, die während meiner ersten, gelegentlich eher wackeligen Gehversuche im Laboralltag eine wichtige Rolle spielte. Mit ihrer Ruhe und Gutmütigkeit hat sie es geschafft, meine beiden linken Hände in ein funktionsfähiges Team zu verwandeln. Florian Czapek kam erst gegen Ende dazu, bewährte sich jedoch gleich als exzellenter Kurier.

Prof. Dr. Ulrich Vogel danke ich für die Anregung der interessanten Kooperation. Seine Mitarbeiterinnen, Dr. Heike Claus und Gabi Heinze, die immer ein offenes Ohr und Zeit für jede vorstellbare Frage hatten und meist auch noch die Antwort dazu parat, habe ich ebenfalls sehr schätzen gelernt.

Erwähnen möchte ich an dieser Stelle noch Michael, Manfred und Kurt, die, ohne es zu wissen, doch essentiell zum Ergebnis beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt der AG „Kaffee ist fertig“ Reidl, die nicht nur meine Kaffeepausen versüßt hat, sondern das Laborleben im 305 zu einem doch recht spritzigen Abenteuer transformierte. Nach etwa 16 Monaten habe ich sogar langsam das Gefühl, in den geschlossenen Kreis der Casinobesucher aufgenommen worden zu sein.

**K I I T O S !**

## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

Name: Joanna Nikulin  
Geburtsdatum: 01. April 1973  
Geburtsort: Helsinki, Finnland  
Staatsangehörigkeit: finnisch

### BERUFSTÄTIGKEIT

10/04 - jetzt                      Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
02/04 - 09/04                    Ärztin im Praktikum  
    Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg

07/03 - 12/03                    Volontariat im Cardiovascular Disease Programme  
    Department of Noncommunicable Diseases and Mental Health  
    World Health Organization (WHO) Headquarters, Genf, Schweiz

### HOCHSCHULAUSBILDUNG

10/04                                Approbation als Ärztin

11/02                                Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
09/00                                Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/98 - 11/02                    Studium der Humanmedizin  
    Humboldt-Universität zu Berlin

03/98                                Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
08/96                                Ärztliche Vorprüfung  
10/94 - 03/98                    Studium der Humanmedizin  
    Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

10/93 - 09/94                    Studiengang Diplom Physik an der Universität Bremen

06/93                                Prüfung zum Nachweis deutscher Sprachkenntnisse (PNdS)  
04/93 - 06/93                    Studium im Fach Deutsch als Fremdsprache  
    Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg

### SCHULAUSBILDUNG

05/92                                Allgemeine Hochschulreife: Ylioppilastutkinto  
08/88 - 05/92                    Gymnasium: Vuosaaren lukio, Helsinki  
08/89 - 06/90                    Escuela Superior de Dr. H. Domenech, Isabela, Puerto Rico

08/85 - 05/88                    Orientierungsstufe: Vuosaaren yläaste, Helsinki  
08/79 - 05/85                    Grundschule: Punakiventien ala-aste, Helsinki

Würzburg, den 8. Juni 2005

