

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

**Einfluss des Komplementsystems und der
neuartigen Meningokokken-Vakzine 4CMenB auf
cni-Meningokokken**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Markus Sebastian Jördens
aus Marktheidenfeld
Würzburg, Juli 2016**

Referent/Referentin: Professor Dr. med. Ulrich Vogel

Korreferent/Korreferentin: Professor Dr. rer. nat. Thomas Herrmann

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2017

Der Promovend ist Arzt

1. Einleitung	1
1.1. Meningokokken	1
1.2. Das Kapselpolysaccharid von Neisseria meningitidis und die Gruppe der capsule null locus Meningokokken	2
1.3. Die Entwicklung der Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) für die Charakterisierung und Eingruppierung von Meningokokken	6
1.4. Das Komplementsystem	7
1.4.1. Aktivierung und Wirkmechanismus des Komplements	7
1.4.2. Die Regulation der Komplementaktivierung	9
1.4.3. Faktor H	10
1.4.4. C4bp	11
1.5. Komplementevasion von Mikroorganismen	11
1.5.1. Bindung von Faktor H	12
1.5.2. Bindung von C4bp	12
1.6. Meningokokken und Komplement	13
1.7. Impfstoffe gegen Meningokokken	14
2. Zielsetzung	19
3. Material und Methoden	20
3.1. Material	20
3.1.1. Geräte	20
3.1.2. Verbrauchsmaterial	23
3.1.3. Chemikalien, Reaktionskits, Enzyme	23
3.1.4. Antikörper	25
3.1.5. Primer	26
3.1.6. Antibiotikum	26

3.1.7.	Bakteriennährmedien	26
3.1.8.	Puffer und Lösungen	27
3.1.9.	Bakterienstämme	31
3.2.	Methoden	32
3.2.1.	Kulturbedingungen	32
3.2.2.	PCR	33
3.2.3.	Gelelektrophorese zur DNA-Auftrennung	34
3.2.4.	DNA-Aufreinigung mit kommerziellen Reaktionskits	35
3.2.5.	Sequenzierung	35
3.2.6.	DNA-Hybridisierung	35
3.2.6.1.	Herstellung von Digoxogenin markierten Sonden	35
3.2.7.	Colony Blot-Hybridisierung	36
3.2.8.	Southern Blot	37
3.2.8.1.	Restriktionsverdau	37
3.2.8.2.	Blot	37
3.2.8.3.	Hybridisierung mit DIG markierten Sonden	37
3.2.8.4.	DIG-Nachweis mit CSPD®	38
3.2.9.	Klonierung	38
3.2.9.1.	Ligation	38
3.2.9.2.	Phenolieren und Etherisieren	39

3.2.9.3.	Elektroporation	40
3.2.10.	Western Blot	40
3.2.10.1.	SDS PAGE	40
3.2.10.2.	Darstellung der Antikörperbindung	41
3.2.11.	Durchflusszytometrie	42
3.2.11.1.	Faktor H-Bindung	42
3.2.11.2.	C4bp-Bindung	43
3.2.12.	Serum killing assays	44
4.	Ergebnisse	45
4.1.	Typisierung von cnl-Meningokokken	45
4.1.1.	Stammauswahl auf der Basis von MLST	45
4.1.2.	Sequenztypisierung von PorA, PorB und FetA	45
4.1.3.	Nachweis von opc	46
4.1.4.	Nachweis und Typisierung der in Bexsero® verwendeten Antigene FHbp, NHBA und NadA	47
4.1.5.	Bestimmung der Expression der fHbp-Varianten	49
4.2.	Cnl-Meningokokken binden keinen Faktor H	51
4.3.	Cnl-Meningokokken binden kein C4bp	52
4.4.	Serumresistenz von cnl-Meningokokken	53
5.	Diskussion	55
6.	Zusammenfassung	61
7.	Abkürzungsverzeichnis	63
8.	Bibliografie	65

1. Einleitung

1.1. Meningokokken

Neisseria meningitidis ist ein gram-negatives Bakterium, das vor allem als Erreger der gefährlichen bakteriellen Meningitis und Sepsis bekannt ist. Die bakterielle oder eitrige Meningitis und die Meningokokkensepsis sind auch nach der Entwicklung von wirksamen Antibiotika lebensgefährliche Erkrankungen. Trotz maximaler intensivmedizinischer Versorgung versterben immer noch bis zu 30% der Patienten mit schweren Verlaufsformen und viele Überlebende tragen trotz Behandlung Langzeitschäden wie neurologische Beeinträchtigungen oder Extremitätenverlust davon (1-3).

Invasive Stämme zeichnen sich in der Regel durch das Vorhandensein einer Polysaccharidkapsel aus, von der bisher zwölf verschiedene Serogruppen bekannt sind (4). Betrachtet man die Erkrankungsisolate genauer, stellt man fest, dass beinahe alle Infektionen von fünf dieser Serogruppen verursacht werden, nämlich von A, B, C, W-135 und Y (5).

Mehr als die Hälfte aller Meningitis-Erkrankungsfälle treten im so genannten Meningitisgürtel in Zentralafrika auf (Abbildung 1). Vorherrschend ist hier die Serogruppe A, die seit Jahrzehnten für Epidemien verantwortlich ist. In unseren Breiten hingegen verursacht Serogruppe B die meisten Erkrankungen (1,6-8). Durch die Anwendung der Multilokus Enzymelektrophorese (MLEE) und heutzutage der Multilokus Sequenztypisierung (MLST) zeigte sich, dass die Erkrankungsisolate nur wenigen sogenannten klonalen Komplexen und ihren zugehörigen Sequenztypen zugeordnet werden können (9). Invasive Stämme sind auf Grund des klinischen Interesses an Erkrankungsisolaten in den Stammsammlungen überrepräsentiert.

Schon vor vielen Jahren wurde deutlich, dass *Neisseria meningitidis* nicht nur als Krankheitserreger v.a. bei Kindern und Jugendlichen auftritt, sondern auch häufig als Kommensale im Rachen von bis zu 40% der Bevölkerung zu finden ist (10,11). Diese Trägerisolate zeigen eine wesentlich breitere genetische Diversität als die Erkrankungsisolate. Deshalb richtete sich in den letzten

Jahren vermehrt auch ein Fokus auf eben diese Trägerisolate, um bessere Informationen über die Populationsgenetik der Meningokokken zu bekommen (12-14).

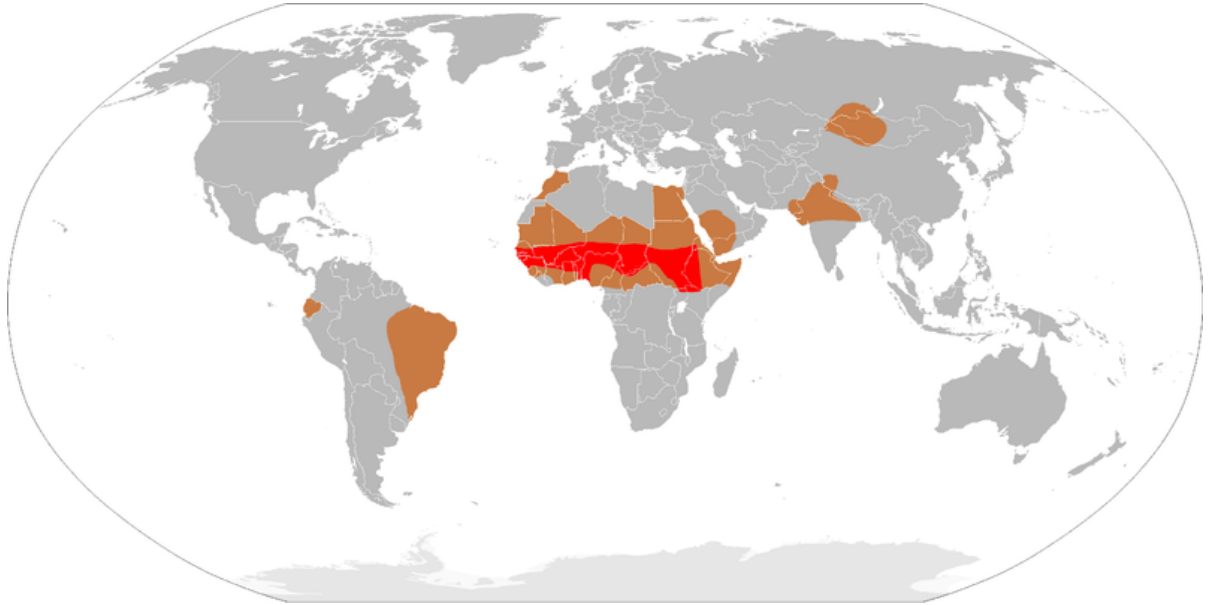


Abbildung 1: Meningitisgürtel; rot: häufig von Meningokokken-Epidemien, v.a durch Serogruppe A, betroffene Regionen

(Karte von <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Meningitis-Epedemics-World-Map.png&filetimestamp=20090306161331>, svg map

en:Image:BlankMap-World3.svg, ursprünglich aus CIA World Factbook)

1.2. Das Kapselpolysaccharid von *Neisseria meningitidis* und die Gruppe der capsule null locus Meningokokken

In einer Trägerstudie wurden zwischen November 1999 und März 2000 8000 Rachenabstriche von Kindern und Jugendlichen in Deutschland untersucht (15). Dabei konnten 830 verschiedene Meningokokkenstämme isoliert werden, von denen 302 keine Kapsel synthetisieren (16). Bei 136 dieser Isolate sind Teile des Kapselsyntheseclusters durch eine nichtkodierende Region ersetzt. Diese werden capsule null locus (cni) Meningokokken genannt (13).

Die Polysaccharidkapsel von Meningokokken ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor, der dem Bakterium erhöhte Serumresistenz durch Schutz

vor Opsonophagozytose und Komplementsystem verleiht (17,18). Weiterhin wird diskutiert, ob sie ebenfalls Schutz vor Austrocknung während der Transmission über Aerosole bietet (19). Der für die Kapselsynthese der Meningokokken verantwortliche Gencluster besteht aus fünf verschiedenen Regionen mit verschiedenen Aufgaben (Tabelle 1) (20). Bei cni-Meningokokken sind die Regionen A und C durch eine 113 oder 114 Basenpaar (bp) lange nichtkodierende Region ersetzt (13). Im Moment sind zwei Anordnungen der verschiedenen Regionen des Genclusters bekannt: B - D´ - E - C - A - D oder B - D - A - C - E - D´ (1,21). Die in cni-Meningokokken vorhandenen Regionen D und E findet man auch in *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria lactamica*, die ebenfalls keine Kapseln synthetisieren (22).

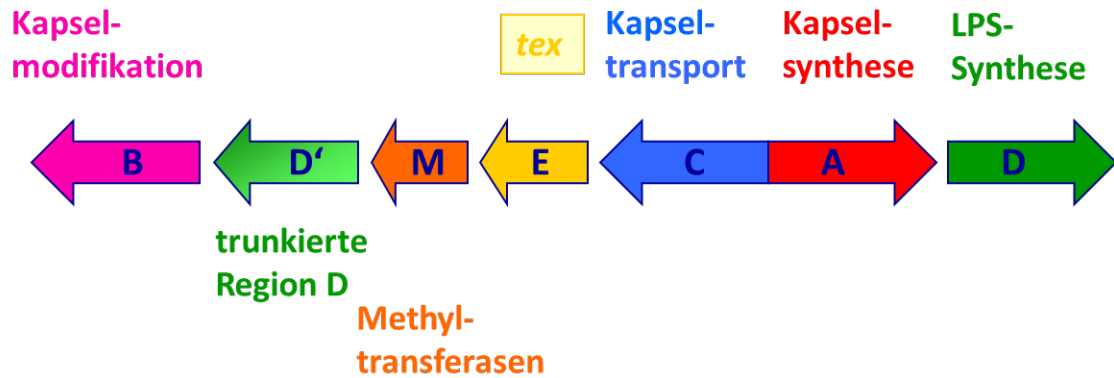
Tabelle 1: Die verschiedenen Regionen des Kapselsyntheseclusters von Meningokokken und deren Aufgaben (22-29)

Region	Aufgabe
A	Polysaccharidsynthese (23, 24)
B	Lipidmodifikation (25, 26)
C	Polysaccharidtransport (27, 28)
D	Lipopolysaccharidsynthese (29)
D´	trunkierte Duplikation von D (22)
E	tex Gen

Die Entdeckung der kapsellosen Meningokokken, die insbesondere als Kommensale im Nasenrachenraum zu finden sind, führte dazu, diese Stämme mit Erkrankungsisolaten zu vergleichen, um Unterschiede und damit auch die wichtigen Pathogenitätsfaktoren der invasiven Stämme herauszufinden. Die Gruppe um Schoen verglich daher die gesamten Genome von invasiven Meningokokken, cni-Meningokokken, Gonokokken und *Neisseria lactamica*

(30). Überraschenderweise zeigten die Ergebnisse des Vergleichs, dass zuvor vermutete Pathogenitätsgene gleichermaßen im untersuchten unbekapselten Isolat wie auch im invasiven Stamm zu finden sind (1). Lediglich ein Gen - NMA2123 - wurde ausschließlich in allen Erkrankungsisolaten gefunden. Ähnliche Gene sind aber auch in dem Trägerisolat vorhanden. Im phylogenetischen Vergleich findet sich das cnl-Isolat α 14 auf demselben „Ast“ mit *N. lactamica* und *N. gonorrhoeae*. Es besteht daher die Hypothese, dass bekapselte Meningokokken ursprünglich aus cnl-Meningokokken entstanden sind und durch horizontalen Gentransfer die Gene zur Kapselsynthese erworben haben. Möglicherweise gelang dies durch Austausch von chromosomalen Genen mit anderen Kommensalen im Nasenrachenraum (21,31). Die weitere Untersuchung der cnl-Meningokokken könnte Aufschluss über die evolutionäre Entwicklung der Meningokokken geben, da sie ein wichtiges Bindeglied in dieser Hypothese sein könnten (21).

cps-locus von *Neisseria meningitidis*



N. cinerea, *N. lactamica*
N. meningitidis
 capsule null locus (**cnl**)
 (ST-53, 198, 845, 1117, 1136)

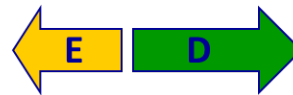


Abbildung 2: Kapselsynthesecoluster von Meningokokken. Bei *cnl*-Meningokokken - wie auch bei *N. cinerea* und *N. lactamica* - fehlen die Regionen A, B und C (32,33)

Somit bleibt die Kapsel als ein mit dem Ausmaß der Pathogenität von Meningokokken verbundenes Merkmal bestehen (34). Trotz Fehlens der Kapsel sind aber mittlerweile auch mindestens drei Erkrankungsfälle durch *cnl*-Meningokokken bekannt. Zum einen wurde ein Erkrankungsfall durch *cnl*-Meningokokken bei einem nicht immungeschwächten Patienten in Burkina Faso publiziert. Weitere *cnl*-Stämme konnten bei anderen gesunden Einwohnern desselben Dorfes gewonnen werden. Der Erkrankungstamm sowie zwei Kontrollstämme wurden auch in unsere Experimente mit einbezogen (35). Weiterhin konnte sowohl in Kanada als auch in Deutschland ein erkrankungserregender *cnl*-Stamm isoliert werden. In Kanada verstarb ein immungesundes 13-jähriges Kind an der Erkrankung (36). Die erste Beschreibung einer Erkrankung durch einen Meningokokkenstamm mit dem

cnl-Lokus war ein Fall aus Deutschland. Im Gegensatz zu den Fällen in Burkina Faso und Kanada war der Patient mit invasiver Erkrankung durch einen cnl-Stamm nach allogener Stammzelltransplantation immungeschwächt (37). Der klinische Zustand des Patienten besserte sich nach Gabe systemischer Antibiotika.

1.3. Die Entwicklung der Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) für die Charakterisierung und Eingruppierung von Meningokokken

Die Einteilung der Meningokokken durch Bestimmung der Polysaccharidkapsel-Variante ist wichtig, reicht aber für eine genaue Charakterisierung der Stämme nicht aus (4). Man versuchte daher Methoden zu entwickeln, um die verschiedenen Isolate charakterisieren, vergleichen und verschiedenen Gruppen zuordnen zu können. Die erste Technik, die die Differenzierung der Pathogene anhand der Untersuchung der Produkte mehrerer Gen-Loki vornahm, war die MLEE (38). Hierbei werden Unterschiede in der elektrophoretischen Beweglichkeit verschiedener definierter metabolischer Enzyme untersucht. Wie bereits erwähnt, konnte gezeigt werden, dass viele gesunde Personen genetisch sehr verschiedene Meningokokkenstämme im Nasenrachenraum tragen, demgegenüber aber nur einige wenige hyperinvasive Stämme für den Großteil der invasiven Erkrankungen verantwortlich sind (39-41). Doch mit der MLEE ist es schwierig, Testergebnisse zwischen einzelnen Laboratorien zu vergleichen. Daher wurde zur Meningokokken-Typisierung die MLST entwickelt, die die Unterschiede der Stämme direkt auf der DNA-Ebene anhand von verschiedenen Allelen definierter Gen-Loki (*housekeeping* Gene) zeigen kann (9,42). Hierbei wird die Variabilität 400-500 Basenpaare langer Nukleotidsequenzen untersucht. Mittels Untersuchung von 7 Loci kann eine genaue Stammbestimmung durchgeführt werden (43). Auch dies ist ein Vorteil gegenüber der MLEE, bei der bis zu 20 Loci betrachtet werden mussten. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse weiter zu verbessern, können die MLST-

Daten aus einer Datenbank im Internet abgerufen werden (<http://pubmlst.org/neisseria/>). Es wurden weitere Methoden auf DNA-Ebene entwickelt, wie z.B. „random amplified polymorphic DNA“ (RAPD), „fluorescent amplified-fragment length polymorphism“ (AFLP) oder „multiple-locus variable-number tandem repeat analysis“ (MLVA) (44-46). Diese Methoden haben aber alle Nachteile im Bereich der einfachen Anwendung und der Vergleichbarkeit der Resultate zwischen einzelnen Laboratorien.

1.4. Das Komplementsystem

Der menschliche Körper verfügt über eine Vielzahl von Möglichkeiten, um sich gegen Angriffe von Mikroorganismen zu schützen. Grob kann man die Immunität in angeborene, d.h. sofort verfügbare, und erworbene, d.h. erst nach einem Aktivierungsprozess verfügbare, unterteilen. Das Komplementsystem mit mehr als 20 Proteinen ist ein wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems, dient aber zugleich auch als Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunität (47-49). Die Aktivierung des Komplements bewirkt einerseits die direkte Zerstörung des identifizierten Pathogens durch Lyse, andererseits die Aktivierung des Immunsystems durch Opsonierung, Chemotaxis und Aktivierung von B-Zellen durch C3d (50).

1.4.1. Aktivierung und Wirkmechanismus des Komplements

Grundsätzlich kann man drei Aktivierungswege unterscheiden, die alle zur Anlagerung des Komplementfaktors C3b an die Oberfläche des Pathogens und folglich zur Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) führen: den klassischen Weg, den Lectin-Weg und den alternativen Weg.

Der klassische Weg der Komplementaktivierung beginnt mit der Bindung des Komplementfaktors C1q an den Fc-Teil von Immunglobulinen oder Immunkomplexen, die sich an der Oberfläche von Mikroorganismen angelagert haben (51,52). Daraufhin können C1r und C1s binden und sowohl C4 als auch

C2 spalten, wodurch die C3-Konvertase C4b2a entsteht (53,54). Diese kann C3 in C3a und C3b spalten (55).

Der Lectin-Weg ähnelt dem klassischen Weg sehr. Die initiale Bindung geschieht durch Mannan bindendes Lectin (MBL) an N-Acetyl-Glucosamin oder Mannose auf der Oberfläche von Mikroorganismen und nicht durch Bindung des Komplementfaktors C1q (56). Als Endpunkt findet sich wieder die C3-Konvertase aus C4b2a.

Bei der Aktivierung des alternativen Weges wird initial durch spontane Hydrolyse von C3 zu C3(H₂O) eine vorläufige C3-Konvertase gebildet (57).

Diese C3-Konvertase spaltet C3 im Plasma zu C3a, das dann als Anaphylotoxin zu Chemotaxis von Makrophagen führt, und C3b, das sich kurzfristig kovalent an Hydroxyl- und Aminogruppen der Zielstrukturen anlagern kann (58,59). Oberflächengebundenes C3b kann Faktor B binden, der wiederum durch Faktor D gespalten wird (60). So entsteht die endgültige oberflächengebundene C3-Konvertase C3bBb, die in der Lage ist, kontinuierlich freies C3 zu spalten (61,62).

Sowohl der klassische/MBL als auch der alternative Weg der Komplementaktivierung enden mit der Spaltung von C3 - dem Dreh- und Angelpunkt des Komplementsystems - sowie der Aktivierung des terminalen Wegs des Komplements durch Bildung der C5-Konvertase (63). Diese besteht beim klassischen Weg aus C4b2a und C3b, beim alternativen Weg aus C3bBb (64-66). Nach der Spaltung bleibt C5b an C3b gebunden. Nach Bindung von C6 und C7 an C5b ist der C5-7 Komplex kurzfristig in der Lage, an Lipidmembranen zu haften, bevor er durch Vitronectin inaktiviert wird. C8 kann daraufhin an den Komplex binden und initiiert die Polymerisation von C9, sodass eine stabile Pore in der Zellmembran des Zieles entsteht (67,68). Die während der Komplementaktivierung entstehenden Spaltprodukte C3a, C4a und C5a wirken als Anaphylotoxine und führen zu Chemotaxis von Makrophagen (69-71).

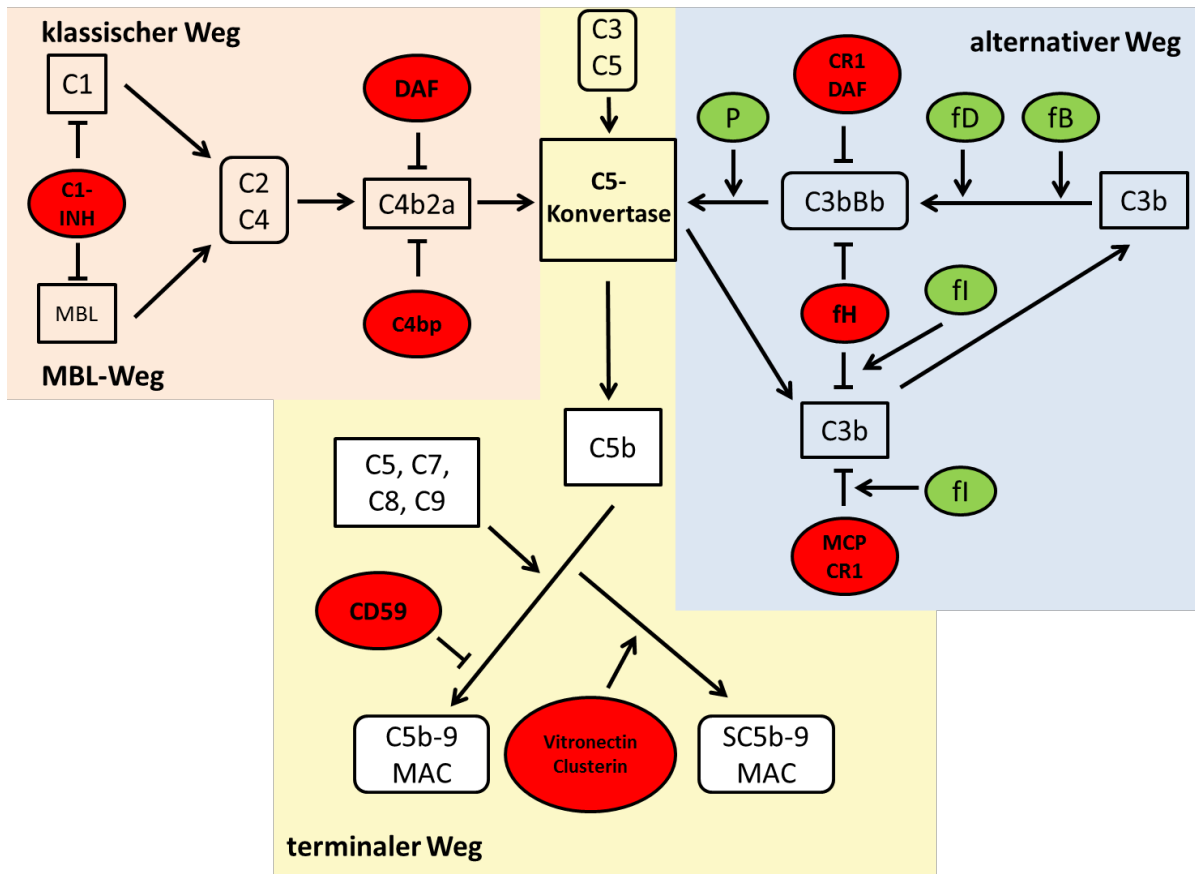


Abbildung 3: Übersicht über das Komplementsystem und dessen Regulation
 C1 - C9: Faktoren des Komplementsystems; MBL: Mannan-bindendes Lectin;
 MAC: *membrane attack complex*; Inhibitoren des Komplementsystems sind rot hinterlegt. C1-INH: Komplementfaktor 1 Inhibitor; C4bp: Komplementfaktor 4 bindendes Protein; DAF: *decay accelerating factor*; CR1: Komplementrezeptor 1; fH: Faktor H; MCP: *membrane cofactor protein*, CD59, Clusterin, Vitronectin. Coenzyme für enzymatische Reaktionen und essentielle Faktoren für die Komplementaktivierung sind grün hinterlegt. fB: Faktor B; fD: Faktor D; P: Properdin; fI: Faktor I

1.4.2. Die Regulation der Komplementaktivierung

Um zu gewährleisten, dass körpereigene Zellen von der Komplementkaskade verschont bleiben, sind mehrere Kontrollmechanismen in die verschiedenen Aktivierungsphasen eingebaut. Im Moment sind fünf membrangebundene und

sechs lösliche Regulatoren des Komplementsystems bekannt. Komplement Rezeptor 1 (CR1), membrane cofactor protein (MCP), decay-accelerating factor (DAF) und complement receptor of the immunoglobulin family (CRIg) regulieren auf Ebene der C3-Konvertase, CD59 (Protectin) hemmt die Bildung des Membranangriffskomplexes (48,72,73).

Faktor H und FHL-1 (factor H-like protein 1) regulieren den alternativen, C1-Inhibitor (C1-INH) und Komplementfaktor 4 bindendes Protein (C4bp) den klassischen, Clusterin und Vitronectin den terminalen Weg (74-79).

Für den Abbau von C3b als Schlüsselpunkt der Komplementaktivierung wird Faktor I benötigt, der C3b an drei Stellen spalten kann. Als Kofaktoren für die Spaltung dienen fH, CR1 und MCP (80-82).

1.4.3. Faktor H

Faktor H (fH), der Hauptregulator des alternativen Weges der Komplementaktivierung, wurde 1965 identifiziert (83). Er besteht aus 20 sich wiederholenden Einheiten, sogenannten short consensus repeats (SCRs). FH wirkt als Kofaktor von Faktor I (fI) beim Abbau von C3b, beschleunigt den Abbau von C3bBb und dient als kompetitiver Inhibitor von Faktor B bei der C3b Bindung (84-87). Neben Faktor H gibt es eine Reihe von struktur- und funktionsähnlichen Proteinen: factor H like protein 1 (FHL-1) sowie die factor H related proteins (FHR) 1 - 4. FHL-1 entsteht durch alternatives Splicing aus dem fH Gen und hat dieselben sieben N-terminalen SCRs wie fH (88). Neben seiner regulativen Aufgabe für das Komplement bindet es mit seiner Heparinbindungsstelle in SCR 7 das antiphagozytotische M-Protein von *Streptococcus pyogenes* und dient als Adhäsionsprotein (89-91). FHRs bestehen nur aus SCRs homolog zu fH (reviewed in (92)). FHR 3 und 4 binden ebenfalls C3b und das Abbauprodukt C3d, die Relevanz dieser Interaktion ist jedoch noch unklar (93).

1.4.4. C4bp

C4bp ist ein Inhibitor des klassischen und des Lectin-Weges des Komplements, der unter physiologischen Bedingungen in einer Konzentration von ungefähr 200 - 300 µg/ml im menschlichen Serum vorkommt (94). Seine Hauptaufgabe besteht in der Inaktivierung der C3- und C5-Konvertasen C4bC2a und C4b2a3b. Weiterhin verhindert es die Bildung dieser Konvertasen auf Oberflächen und beschleunigt den Abbau von C4b als Kofaktor von Faktor I (95). Fast die Hälfte des im Plasma vorhandenen C4bp ist an das antikoagulative Protein S gebunden (96). Da Protein S an negativ geladene Lipidmembranen bindet, scheint C4bp ebenfalls Lipide im Plasma oder eigene Zellen im Falle einer Verletzung vor der Komplementaktivierung schützen zu können (47).

1.5. Komplementevasion von Mikroorganismen

Dem Komplementsystem zu entgehen, ist ein wichtiger Schritt für Krankheitserreger, um im menschlichen Körper überleben und sich vermehren zu können. Zur Vermeidung der Komplementaktivierung findet man daher viele verschiedene Mechanismen (49,97,98). Zum einen schützt die dicke Peptidoglycanschicht gram-positiver Bakterien zumeist vor der lytischen Wirkung des MAC, zum anderen können Seitenketten der Lipopolysaccharide (LPS) gram-negativer Bakterien die Beladung der Zellmembranen mit C3b sterisch behindern. Des Weiteren sind einige Pathogene in der Lage, die Antikörperbindung und somit die Aktivierung des klassischen Weges durch antigenetische Variation ihrer Oberflächenproteine zu verhindern oder durch spezifische Proteasen bereits gebundene Antikörper zu inaktivieren (99). Viele Bakterien und andere Mikroorganismen nutzen aber auch die körpereigenen Regulatoren des Komplementsystems, um dieser ersten Barriere des Immunsystems zu entgehen. Vor allem die Regulatoren der Hauptaktivierungswege Faktor H und C4bp werden dazu genutzt, aber auch

Vitronectin, um den terminalen Weg des Komplementsystems zu hemmen (79,92).

1.5.1. Bindung von Faktor H

Viele Pathogene haben die Fähigkeit akquiriert, Faktor H zu rekrutieren und damit dem alternativen Weg des Komplementsystems zu entkommen (reviewed in (49,97)). Einige besonders interessante Beispiele seien im Folgenden genannt. Das M-Protein von *Streptococcus pyogenes* ist in der Lage, fH in SCR7 zu binden (91), was die fH-Aktivität nicht behindert und damit den alternativen Weg der Komplementaktivierung inhibiert (100).

Auch Por1A - ein äußeres Membranprotein von *Neisseria gonorrhoeae* - kann fH unabhängig von Lipooligosaccharide (LOS) binden und so den alternativen Weg blockieren (101). Diesen Abwehrmechanismus findet man auch bei einigen Stämmen von *Borrelia burgdorferi* und *afzelii* durch deren OspE und Bba68/CRASP-1 Proteine (102-104).

Nicht nur Bakterien nutzen diese Strategie, auch bei *Candida albicans*, *Onchocerca volvulus* und *Echinococcus* beobachtete man fH Bindung und damit Verhinderung der Komplementaktivierung zum Eigenschutz (105-107).

1.5.2. Bindung von C4bp

Thern und Kollegen zeigten bereits 1995, dass *Streptococcus pyogenes* neben fH auch C4bp, den Hauptregulator des klassischen Weges der Komplementaktivierung, binden und zur Inhibition des klassischen Komplementweges nutzen kann. Als Zielstruktur für die C4bp-Bindung wurde durch Mutationsexperimente Arp4, ein Mitglied der M-Protein-Familie, ausgemacht (108,109).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Por1A von *N. gonorrhoeae* nicht nur fH an seiner fünften Außenmembrandomäne bindet, sondern auch C4bp an der ersten Domäne. Einige Por1B Varianten sind dazu ebenfalls in der Lage. In

derselben Studie wurde gleichfalls ein direkter Zusammenhang zwischen C4bp-Bindung und gesteigerter Serumresistenz deutlich (110,111).

Für *Bordetella pertussis* scheint das filamentöse Hämagglutinin entscheidend für die C4bp-Bindung zu sein, 2008 konnte auch für *Yersinia enterocolitica* die C4bp-Verwendung gezeigt werden (112,113).

1.6. Meningokokken und Komplement

Wie wichtig ein gut funktionierendes Komplementsystem ist, zeigt die Tatsache, dass eine genetisch bedingte Komplementdefizienz mit einer deutlich erhöhten Zahl von Meningokokkeninfektionen einhergeht (114). Vor allem Defekte von Komplementkomponenten des MAC sind hierbei hervorzuheben (115,116). Allerdings scheinen diese Defekte auf der anderen Seite zu deutlich schwächer verlaufenden Infektionen zu führen. Dies ist wahrscheinlich durch die verminderten LPS-Freisetzung bei verringerter lytischer Aktivität des Serums aufgrund des Komplementdefektes zu erklären (117,118). Auch eine MBL-Defizienz, ein weit verbreiteter Immundefekt, führt nachgewiesenermaßen zu gehäuften Infektionen mit Meningokokken (119). MBL als Startpunkt des Lectin-Weges erkennt als wichtiges Opsonin auf Meningokokken v.a. Opas und PorB als Zielstrukturen (120). Eine verminderte Aktivität der MBLs führt zu schlechterer und verzögerter Pathogenerkennung und dadurch leichter zu disseminierten Infektionen, da die Reaktionszeit des Immunsystems wegen der MBL-Defizienz verzögert ist.

Neisseria meningitidis hat sich die ausgeprägte Nutzung von körpereigenen Regulatoren des Komplementsystems angeeignet, um bei immunkompetenten Personen die Immunabwehr zu umgehen und eine Infektion auszulösen. Das betrifft sowohl die Akquisition von fH als auch von C4bp, die für bekapselte Serogruppen nachgewiesen wurde (94,121).

Für die fH-Bindung konnte das factor H binding protein (fHbp) (GNA1870 oder auch Lipoprotein 2086) als Zielstruktur bei Meningokokken identifiziert werden (121). Es existieren zwei Klassifikationen für verschiedene fHbp-Subtypen. Bei der einen Klassifikation wird fHbp in Varianten 1 - 3 eingeteilt, in der anderen

Klassifikation wird es in Subfamilien A und B untergliedert, die wiederum in Untergruppen unterteilt sind (122,123). Madico und Kollegen konnten 2006 zeigen, dass fHbp und nicht PorB3, das dem Por1A von Gonokokken strukturell ähnlich ist, die Bindestelle für fH ist (101). Der Nachweis der Bindung gelang bei bekapselten Stämmen aller wichtigen Serogruppen mit Ausnahme eines Serogruppe Y Stammes. Y2220 besitzt zwar den genetischen Hintergrund für fHbp, scheint es aber in so geringem Ausmaß zu exprimieren, dass keine nennenswerte fH-Bindung stattfindet (121). Erst kürzlich konnte auch für das neisserial surface protein A (NspA) fH-Bindung gezeigt werden (124).

Die Bindung von C4bp bei *Neisseria meningitidis* wird durch das Membranprotein PorA vermittelt (94). Dennoch scheint PorA nicht die alleinige C4bp-Bindestelle zu sein, da z.B. der kapsellose Stamm H44/76 ohne PorA immer noch ähnlich viel C4bp binden konnten wie der bekapselte Stamm H44/76 mit PorA (94). Die Kapsel vermag einen Teil der C4bp-Bindung zu verhindern, denn unbekapselte Mutanten mehrerer Meningokokkenstämme der Serogruppen A und B zeigten eine deutlich stärkere C4bp-Bindung als die bekapselten Wildtypen. Die Kapsel könnte so z.B. in manchen Fällen die C4bp-Bindung sterisch behindern.

1.7. Impfstoffe gegen Meningokokken

Häufige Epidemien im afrikanischen Meningitisgürtel mit hohen Mortalitäts- und Morbiditätszahlen sowie die Tatsache, dass insbesondere Kinder und Jugendliche erkranken und versterben, haben zur Entwicklung mehrerer mono- und polyvalenter reiner Polysaccharidimpfstoffe geführt. Die später entwickelten wirksameren Konjugatimpfstoffe, wurden bisher aus Kostengründen in den afrikanischen Ländern nicht eingesetzt. Diese Impfstoffe wirken nur gegen die Serogruppen A, C, W135 und Y und nicht gegen die in unseren Breiten dominante Serogruppe B. In einer aktuellen Studie des Robert-Koch-Instituts wurden 127 verschiedene Krankheitserreger in Bezug auf ihre Wichtigkeit für die nationale Überwachung und Epidemiologie eingeteilt. Wichtigstes Kriterium für die Einteilung war die Letalität. Meningokokken wurde hierbei in die Gruppe

mit der höchsten Priorität eingestuft, was zeigt, wie wichtig eine Überwachung von Infektionen und eine Entwicklung von Impfstoffen auch für Serogruppe B-Meningokokken wäre (125).

Nach der Entwicklung des kostengünstigen Konjugatimpfstoffs MenAfriVa® für afrikanische Staaten, der gegen Stämme der Serogruppe A gerichtet ist, und intensiven Impfprogrammen, besteht die Hoffnung, Epidemien durch Serogruppe A im afrikanischen Meningitis-Gürtel zu verhindern oder abzuschwächen. Erste Untersuchungen dazu zeigen positive Resultate bezüglich der Abdeckung der Bevölkerung und Immunogenität (126-130).

Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen B-Meningokokken gestaltet sich indes schwieriger. Die Polysaccharidkapsel bestehend aus α 2-8 N-acetyl Neuraminsäure-Homopolymeren ist weit weniger immunogen als bei den anderen Serogruppen und auch Konjugation der Polysaccharide an Proteine erbrachte keine ausreichende Steigerung der Immunantwort (131-134).

Weiterhin finden sich α 2-8 N-acetyl Neuraminsäure-Homopolymere an humanen neuronalen Zelladhäsionsmolekülen, sodass beim Nutzen der Polysaccharide als Antigen neben der schlechten Immunogenität auch Kreuzreaktionen befürchtet werden müssten (135,136).

Um die Problematik der Polysaccharidkapsel zu umgehen, richtete sich das Interesse nun darauf, konstitutiv exprimierte Proteine der Meningokokken als Zielstrukturen zu nutzen, was auch bei anderen Bakterien in den Fokus der Impfstoffentwicklung rückte (Tabelle 2) (reviewed 98).

Tabelle 2: Übersicht über mikrobielle Inhibitoren des Komplementsystems und ihr Potential als Impfstofftargets. (Tabelle nach Meri et al., Vaccine 2008 (98))

Mikrobe	interagierendes Protein	Zielstruktur	Variabilität	Impfstoffpotential
GAS	M-protein	fH, C4bp	+++	++
<i>S. pneumoniae</i>	PspC	fH	+++	+++
<i>B. burgdorferi</i>	OspE Bba68	fH fH	+++ +	+ +

Mikrobe	interagierendes Protein	Zielstruktur	Variabilität	Impfstoffpotential
<i>B. pertussis</i>	FHA	C4bp	+	++
<i>N. meningitidis</i>	fHbp PorA	fH C4bp	++ ++	++ +
<i>N. gonorrhoeae</i>	Por1A Por1B	fH, C4bp C4bp	+ +	+ +

Bei Meningokokken zunächst vor allem in Form von äußeren Membranvesikeln (OMV). Dabei handelt es sich um Vesikel der äußeren Bakterienmembran, die von gram-negativen Bakterien sekretiert werden und die u.a. Bakterienproteine enthalten. Diese Entwicklung wurde v.a. aufgrund von lokalen Epidemien durch B-Meningokokken vorangetrieben und führte in mehreren Ländern dazu, stammspezifische OMV-Impfstoffe herzustellen, um die Neuinfektionen einzudämmen. So stellten Norwegen, Chile, Brasilien, Kuba und Neuseeland eigene OMV-Impfstoffe her und führten ausgedehnte Effizienzstudien durch (137-142).

Nachdem seit 1974 in Norwegen die Inzidenz für Erkrankungen durch Meningokokken der Serogruppe B deutlich angestiegen war, wurde versucht, einen Impfstoff speziell gegen einen B-Meningokokkenstamm herzustellen, der für eine aktuelle Epidemie verantwortlich war. Dafür wurden OMVs aus Stamm H44/76 gewonnen und an das Adjuvanz Aluminiumhydroxid adsorbiert (138). Der Impfstoff bot aber nur ca. 57% der Impflinge Schutz, sodass ein Nutzen für eine flächendeckende Impfung nicht gegeben war (137).

Die kubanische Vakzine hingegen war ein Erfolg. Studien zeigten bei guter Verträglichkeit des Impfstoffes einen Impfschutz von weit über 80%, sodass das kubanische Gesundheitsministerium alle Kinder zwischen 3 Monaten und 6 Jahren in den von Erkrankungsausbrüchen am stärksten betroffenen Gebieten von 1987 bis 1989 impfen ließ (139). Allerdings zeigten sich die Schwächen dieser stammspezifischen Vakzine, als man versuchte, Meningitis-Ausbrüche durch Serogruppe B-Stämme in Brasilien mit der kubanischen Vakzine unter

Kontrolle zu bringen. Hier bot die Impfung nur noch einen Schutz von 37% bei Kindern unter 2 Jahren, 47% bei Kindern zwischen 2 und 4 Jahren sowie 74% bei Kindern älter als 4 Jahre (140). Die Schutzwirkung gegenüber dem kubanischen Stamm, für den der Impfstoff spezifisch hergestellt wurde, war zufriedenstellend, jedoch war die Übertragung der Immunprotektion auf andere Stämme derselben Serogruppe ungenügend. Sobald man es mit einem anderen Serotyp zu tun hat, findet man eine andere Zusammensetzung der Außenmembranproteine, gegen die der stammspezifische Impfstoff keine ausreichende protektive Immunreaktion hervorrufen kann. Insbesondere bei kleinen Kindern war daher keine Kreuzimmunität nachweisbar.

Auch in Chile versuchte man, einen Impfstoff aus OMVs eines Serogruppe B-Stammes herzustellen. Über 40000 Freiwillige zwischen 1 und 21 Jahren wurden mit 2 Dosen geimpft. Über einen Zeitraum von 20 Monaten wurde das Studienkollektiv beobachtet. Es zeigte sich, dass der Impfstoff bei Impfungen ab 5 Jahren ca. 70% Schutz vor Meningokokken der Serogruppe B bot, Kleinkinder unter 5 Jahren aber praktisch ungeschützt blieben (141).

Nach Epidemien zu Beginn des Jahrtausends in Neuseeland durch Serogruppe B-Meningokokken versuchte man 2004 mit einer stammspezifischen OMV-Vakzine der Lage Herr zu werden (142,143). Phase 1 und 2 Studien zeigten ausreichende Immunogenität und Sicherheit. Geimpfte erkrankten 5-6 Mal weniger als Nichtgeimpfte, der Impfschutz lag bei ca. 70% (143-148).

Nachdem Tettelin und Kollegen im Jahr 2000 das komplette Genom eines B-Meningokokken Stammes (MC58) sequenziert hatten, wählte Novartis Vaccines mittels „reverse vaccinology“ fünf Antigene für einen möglichen neuen Impfstoff aus (149-151). Dies waren das fH-bindende Protein fHbp (GNA1870), das Adhäsin NadA und das Heparin-bindende Antigen NHBA (GNA2132) (152,153). Fhbp ist mit GNA2091, NHBA mit GNA1030 fusioniert. Dazu kommen noch OMVs der neuseeländischen Vakzine gegen B-Meningokokken und Aluminiumhydroxid als Adjuvanz (154). Die Zugabe von OMVs der neuseeländischen Vakzine erhöhte die breite Abdeckung, zumal eine Variante von PorA - das C4bp bindende Protein - in den OMVs vorhanden ist. Mehrere Antigentargets zu verwenden ist aufgrund der Variabilität der einzelnen

Antigene – welche auch in unserer Studie gezeigt werden konnte - notwendig, um eine breite Abdeckung zu erhalten (155). Studien zu diesem aus vier Komponenten bestehenden Impfstoffes - daher der Name 4CMenB - bestätigen sowohl die Sicherheit des Impfstoffes als auch eine gute Schutzfunktion (156-158). Problematisch könnte die Variabilität von fHbp sein, da nur ein Subtyp im Impfstoff vorhanden ist (159). Weiterhin fehlt NadA bei vielen Stämmen, sodass dies zu einer verminderten Impfstoffwirkung führen könnte.

Der Impfstoff 4CMenB ist mittlerweile seit Dezember 2013 in Deutschland unter dem Handelsnamen „Bexsero[®]“ zur Immunisierung gegen Meningokokken der Serogruppe B verfügbar. Weiterhin läuft seit September 2015 in England ein Routineimpfprogramm mit diesem Impfstoff für Säuglinge (160,161). GSK hat mittlerweile diese Sparte von Novartis übernommen, sodass der Impfstoff nun durch GSK vermarktet wird.

Pfizer nutzt im Gegensatz zu Novartis (jetzt GSK) zwei Subfamilien der fHbp. Durchgeführte Studien zeigen gute Resultate, insbesondere konnte eine ausreichende Immunogenität der fHbp und Antikörperbildung gegen sie gezeigt werden (123,162). Der Impfstoff ist seit 2014 in den USA unter dem Handelsnamen „Trumenba[®]“ für die Immunisierung von Personen zwischen 10 und 25 Jahren zugelassen (163).

2. Zielsetzung

Folgende Fragestellungen sollten in der vorliegenden Dissertation bearbeitet werden:

1. Wie interagieren cnl-Meningokokken als unbekapselte Erreger mit dem Serumkomplementsystem? Besonderer Schwerpunkt sollte auf die Bindung der Komplementregulatoren Faktor H und C4bp gelegt werden.
2. Welche Allel-Varianten der in Bexsero[®] verwendeten Antigene finden sich in cnl-Meningokokken? Sollte Bexsero[®] hohe mukosale Antikörperspiegel aufbauen, könnten cnl-Meningokokken gegebenenfalls eradiziert werden. Dies könnte sich neben der Schutzwirkung des Impfstoffes auch nachteilig auswirken, da cnl-Meningokokken mutmaßlich zur Entwicklung der natürlichen Immunität beitragen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Blottingkammer für Western Blot:

- Mini Trans-Blot (Bio-Rad, München)

Brutschränke:

- KB 500 (Heraeus, Hanau)
- B5060 E-CO₂ (Heraeus, Hanau)

DNA-Sequenziergerät:

- ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt)

Durchflusszytometer:

- FACS Calibur Becton-Dickinson, Heidelberg)

Elektroporationsgerät:

- Pulse Controller (Bio-Rad, München)

Energieversorgung für Western Blot und Gelelektrophorese:

- X3000 (Bio-Rad, München)

Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme:

- Curix (Agfa)

Gel-Dokumentationssystem:

- UVT-28 MP (Herolab, Wiesloch)

Gelkammern für Agarose-Gele:

- Subcell-GT (Bio-Rad, München)
- H6 (Herolab, Wiesloch)

Gelkammern für SDS-PAGE:

- Minigel-Twin (Biometra, Göttingen)

Heizblöcke:

- BT1 und BT3 (Grant Instruments, Cambridge, UK)

Hybridisierungsöfen:

- DUO-Therm OV5 (Biometra, Göttingen)

Magnetische Heizplatte:

- IKAMAG® RH (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik)

Mikrobiologische Sicherheitswerkbank:

- Gelaire (Mailand, Italien)

Mikrowelle:

- MWS 1820 Duo (Bauknecht, Schorndorf)

Pipetten:

- Reference Serie (Eppendorf, Hamburg)

Rotationsschüttler:

- Phero-Shaker (Biotec-Fischer)

Schüttelinkubatoren:

- Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
- G25 (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA)

Thermocycler:

- TRIO (Biometra, Göttingen)
- Primus 96 Plus (MWG Biotech, Ebersberg)

UV-Crosslinker:

- UV Stratalinker® 1800 (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

UV-Illuminator:

- UVT-20 LP (Herolab, Wiesloch)

Vakuüm-Zentrifuge:

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

Vortex:

- Reax 1 (Heidolph Elektro KG)

Waage:

- ME 13034 (Mettler, Greifensee, Schweiz)

Wasserbäder

- SW 20 (JULABO Labortechnik, Seelbach)
- Basis (FALC Instruments, Lurano, Italien)

Zentrifugen:

- Biofuge 15 (Heraeus, Hanau)
- Biofuge 15R (Heraeus, Hanau)
- Omnifuge 2.0 RS (Heraeus, Hanau)
- Mini-Zentrifuge Sprout™ (HS)

3.1.2. Verbrauchsmaterial

- Elektroporationsküvette (Eurogentec, Seraing, Belgien)
- 5 ml FACS-Reaktionsgefäße (Becton-Dickinson)
- Falcon-Röhrchen, 15 ml, 50 ml (Sarstedt, Nürmbrecht)
- dickes und dünnes Filterpapier, GB 40, GB 46 (Hartenstein, Würzburg)
- Nylonmembranen (Macherey & Nagel, Düren)
- Nitrozellulose-Membranen: BA-85 (Schleicher & Schüll, Dassel)
- PCR single cap 8er Streifen 0,2 ml (Biozym scientific GmbH, Oldendorf)
- Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Sarstedt, Nürmbrecht)
- Röntgenfilme (Fuji, Düsseldorf)
- Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Sarstedt, Nürmbrecht)

3.1.3. Chemikalien, Reaktionskits, Enzyme

- von AppliChem, Darmstadt:
 - Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
 - BSA (Albumin fraction V pH 7,0)
- von BioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich:
 - PolyViteX
- von Eurogentec, Köln:
 - SmartLadder (200-10000 bp)
- von Finnzyme:
 - Phusion-Taq
- von Merck, Darmstadt:
 - Tween 20

- von New England Biolabs (NEB), Frankfurt a.M.:
 Restriktionsenzyme: Eco R V, Spe I
 calf intestine phosphate (CIP)
 T4-DNA-Polymerase und T4-DNA-Ligase
 Taq DNA-Polymerase
 ColorPlus prestained protein marker broad range (7-175 kDa)

- von Qiagen, Hilden:
 QIAquick PCR purification kit
 MinElute gel extraction kit
 QIAamp DNA Mini Kit
 QIAprep Spin Miniprep Kit

- von Roche, Mannheim:
 DIG-markierte DNA-Molekulargewichtsmarker III und VII
 Blockierungsreagenz
 CSPD (Dinatrium-3-(4-methoxyspiro-1,2-dioxetane-3,2-(5-chloro)tricyclo

 [3.3.1.13,7]-decan-4-yl)phenylphosphat)
 Klenow DNA-Polymerase
 Hexanukleotidgemisch
 DIG-Markierungsreagenz

- von PeqLab, Erlangen:
 dNTPs

- von Roth, Karlsruhe:
 Agarose
 Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid, Bisacrylamid)
 Formaldehyd 37 %

- von Heirler Cenovis, Radolfzell:

Magermilchpulver

- von Invitrogen, Groningen, Niederlande:
 - HBSS[™]
 - PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline)
 - LB broth base
 - LB Agar

- von Quidel, San Diego, USA:
 - purified human complement protein factor H

- von Sigma, München:
 - gepooltes Humanserum

- von Becton-Dickinson (BD), Heidelberg:
 - Difco[®] GC-Medium
 - Bacto[®] Proteosepepton

- von Fluka:
 - lösliche Stärke

3.1.4. Antikörper

- on Invitrogen:
 - Alexa Fluor 488[®] goat anti-mouse

- von Quidel:
 - murine monoclonal anti-human factor H
 - murine monoclonal anti-human C4bp

- von Jackson ImmunoResearch:
 - Pox goat anti-mouse IgG
 - Pox goat anti-rabbit IgG

- von Novartis:
 - rabbit anti-V2 (fHbp)
 - rabbit anti-V3 (fHbp)

- von Sarkari und Achtman (164)
 - mabB306 mouse anti-Opc

3.1.5. Primer

- von Sigma:
 - alle verwendeten Primer (siehe Primerliste 3.2.2)

3.1.6. Antibiotikum

Ampicillin (AppliChem)

3.1.7. Bakteriennährmedien

Stammlösung für PPM	20% KH ₂ PO ₄ 5% K ₂ HPO ₄ in aqua dest.
PPM	20ml Stammlösung 1,5% Proteose Pepton 0,5% NaCl 0,05% Stärke pH 7,5 mit 6 M KOH ad 1000ml mit aqua dest

PPM ⁺ (supplementiertes PPM)	1% PolyViteX 0,5% 8,4% NaHCO ₃ 0,5% 2 M MgCl ₂ ad 100 ml mit PPM
LB-Flüssigmedium	2% LB broth base (20g/l) in aqua dest.
SOC-Medium	Hefeextrakt 0,5 % (5 g/l) Trypton 2 % (20 g/l) Natriumchlorid 10 mM Kaliumchlorid 2,5 mM Magnesiumchlorid 10 mM Magnesiumsulfat 10 mM Glucose 20mM

3.1.8. Puffer und Lösungen

Allgemein

PBS-Gebrauchslösung (1x)	10mM Na ₂ PO ₄ /Na/KH ₂ PO ₄ - 140mM NaCl
TBE-Puffer (1x)	100mM Tris-Base 100mM Borsäure 2,5mM EDTA
GEBS	20% Glycerin 50mM EDTA 0,5% N-Lauroylsarkosin 0,05% Bromphenolblau
SSC-Puffer (1x)	0,15M NaCl 0,015M Na-Citrat Einstellung mit HCl auf pH 7,0
SSPE (1x)	0,18M NaCl 5mM Na ₂ HPO ₄ 1mM EDTA
VBS	5mM Barbital 145mM NaCl

VBS ⁺⁺ /BSA	VBS 0,1% MgCl ₂ 0,015% CaCl ₂ 0,5% BSA
------------------------	---

CSPD-Nachweis

Maleinsäurepuffer (1x)	0,1M Maleinsäure 0,15M NaCl Einstellung mit NaOH auf pH 7,5
Waschpuffer	0,3% Tween 20 in Maleinsäurepuffer
Puffer 2 – Blockierungslösung	1% Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer
Antikörperlösung	10µl Anti-DIG-AP-Antikörper ad 100ml Puffer 2
Puffer 3 – Detektionspuffer	0,1M Tris-HCl, pH 9,5 0,1M NaCl

Colony Blot und Hybridisierung

High-SDS-Hybridisierungslösung	7% SDS 50% Formamid 5x SSC 50mM Na-Phosphat, pH 7,0 0,1% N-Lauroylsarkosin 2% Blockierungsreagenz
Colony Blot Lösungen	1. 10% SDS 2. 0,5M NaOH, 1,5M NaCl 3. 1,5M NaCl, 0,5M TRIS 4. 2x SSPE

Lösung zur Entfernung von Bakterienresten	1mM EDTA 0,5% SDS 5x SSC
Waschpuffer	1. 0,1% SDS, 2x SSC 2. 0,1% SDS, 0,1x SSC

Southern Blot

Depurinierungslösung	0,25M HCl
Denaturierungslösung	0,5M NaOH 1,5M NaCl
Neutralisierungslösung	1M Tris-HCl 3M NaCl
Transferpuffer	10x SSPE

SDS-PAGE

Sample Solution	5% β -Mercaptoethanol 2% SDS 12,5% Glycerin Bromphenolblau 0,5M Tris-HCl (, pH 6,8)
Upper Tris Puffer pH 6,8	6,06% Tris 0,4% SDS mit HCl ad pH 6,8
Lower Tris Puffer pH 8,8	18,17% Tris 0,4% SDS mit HCl ad pH 8,8

Western Blot

Elektrophorese-Puffer	0,3% Tris-Base 1,44% Glycin 0,5% SDS
Blot-Puffer, 10x Stock	3% TRIS 14,4% Glycin
Blot-Puffer, 1x	200 ml Methanol 100ml 10x Stock ad 1l mit Aqua dest.
Waschpuffer	0,1% Tween 20 1x PBS
Blockierungspuffer	0,1% Tween 20 1x PBS 5% Magermilchpulver
Puffer für Antikörper	0,1% Tween 20 1x PBS 1% Magermilchpulver

ECL

ECL-Lösung A	200ml 0,1M Tris-HCl (pH 8,6) 50mg Luminol
ECL-Lösung B	11mg para-Hydroxycoumarinsäure 10ml Dimethylsulfoxid (DMSO)
ECL-Reagenz	4ml Lösung A 0,4ml Lösung B 1,2µl H ₂ O ₂ (30%)

FACS

HBSS ⁺⁺ /BSA = Waschpuffer	0,1% MgCl ₂ 0,015% CaCl ₂ 1% BSA In HBSS ⁻
Fixierungslösung	1% Formaldehyd in PBS

3.1.9. Bakterienstämme

17 Meningokokkenstämme, die die genetische Vielfalt der capsule null locus (cni) Stämme repräsentieren, wurden für diese Studie ausgesucht. 14 stammen aus der bayerischen Meningokokkenträgerstudie (13), ein Erkrankungsisolat und zwei Trägerisolate aus Burkina Faso (10,35). Die Stämme aus Burkina Faso wurden freundlicherweise von Dr. Ray Borrow, *Vaccine Evaluation Unit, Public Health England* (Manchester), zur Verfügung gestellt. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Stämme und deren Isolationsort.

Als Kontrollstämme dienten WUE2220 (Nm Serogruppe Y), WUE2425 (Nm MC58 cps⁻), WUE4171 (Nm MC58 cps⁻, Ist⁻, fHbp⁻), FA1090 (*Neisseria gonorrhoeae*)

Tabelle 3: Stammauswahl der cni-Stämme und geographische Verteilung, ST: Sequenztyp nach multi locus sequence typing (MLST), CC: klonaler Komplex (10,35)

Stammnummer	ST	CC	Isolationsort	Isolationsjahr
α14	53	53	Volkach	1999
α76	53	53	Roth	1999
α180	53	53	Coburg	1999
α88	822	198	Roth	1999

Stammnummer	ST	CC	Isolationsort	Isolationsjahr
α134	198	198	Würzburg	1999
α217	198	198	Kempton	1999
α524	39	198	Ingolstadt	2000
α30	845	-	Volkach	2000
α62	845	-	Bayreuth	2000
α634	845	-	Sonthofen	2000
α133	1117	1117	Würzburg	2000
α380	1117	1117	Pfarrkirchen	2000
α797	1117	1117	München	2000
α227	1136	1136	Sonthofen	2000
M03 0240924	192	-	Burkina Faso	2003
M04 0241028	192	-	Burkina Faso	2003
M04 0241043	192	-	Burkina Faso	2003

3.2. Methoden

3.2.1. Kulturbedingungen

Soweit nicht anders beschrieben werden die Bakterien aus einer Gefrierkultur auf Kochblutagar angeimpft und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank bebrütet.

3.2.2. PCR

Die verschiedenen cni-Stämme wurden mittels PCR und konsekutiver DNA-Sequenzierung für verschiedene Gene typisiert. Die genutzten Oligonukleotide für die verschiedenen Loci sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Oligonukleotide für PCRs

Lokus	Primer
fetA	S13-2 (5' - CATACCCAAATCACCCTCG - 3'), S15 (5' - TTGCAGCGCGTCRTACAGGCG - 3')
porA	BS1 (5' - CGTATCCGCTTCACCGCC - 3'), VR2-R (5' - CGTCAGGCGGTGTACCTG - 3')
porB	A1 (5' - TAAATGCAAAGCTAAGCGGCTTG - 3'), S4 (5' - GGAGAATCGTAGCGTACGGA - 3') und S3 (5' - TCCGTACGCTACGATTCTCC - 3'), A2-G (5' - TTTGTTGATACCAATCTTTGCAG - 3')
nadA	NadA A-3 (5' - GTSGACGTMCTCGAYTACGAAGG - 3'), NadA B2 (5' - CGAGGCGATTZGTCAAACCGTTC - 3')
nhba	2132 F (5' - GGCGTTCAGACGGCATATTTTTACA - 3'), 2132 R (5' - GGTTTATCAACTGATGCGGACTTGA - 3') und zur Klonierung MJ2 (5'- GCGCGGATATCTCAATCCTGCTCTTTTTTGCCGGCAAAC - 3') MJ7 (5'- GCGCGCACTAGTTGAAGGAGATGATGATGTTTAAACG - 3')
fHbp	GNA1870 F (5' - TGACCTGCCTGCCTCATTGATGC - 3'), GNA1870 R (5' -CGGTAAATTATCGTGTTCCGGACGGC - 3')

Die meisten Reaktionen wurden mit der NEB-Taq-Polymerase und zugehörigem Puffer durchgeführt; Abweichungen sind in Tabelle 5 angegeben. Die Primer lagen in einer Konzentration von 20 µM und die dNTPs von je 2 mM vor. Als Template für die Reaktionen dienten 5 µl extrahierte Bakterien-DNA. Bei der Colony-PCR werden anstelle extrahierter Bakterien-DNA vollständige Bakterien als Template genutzt. Dazu werden mit einem Zahnstocher vorsichtig einige Bakterien von der Agar-Platte in das PCR-Reaktionsgefäß übertragen. Der weitere Ablauf unterscheidet sich nicht von der normalen PCR mit extrahierter Bakterien-DNA. Die verschiedenen PCR-Bedingungen für Primer-Anlagerung und Extension sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: PCR-Bedingungen für die verschiedenen untersuchten Loci

Lokus	Anlagerung/Extension	Besonderheiten
fetA	58°C, 1 Minute/ 72°C, 30 Sekunden	
porA	61°C, 1 Minute/ 72°C, 1 Minute	
porB	60°C, 1 Minute/ 72°C, 45 Sekunden bzw. 60°C, 1 Minute/ 72°C, 2 Minuten	
nadA	58°C, 30 Sekunden/ 68°C, 1 Minute	10x AccuPrime PCR Puffer 2 (mit MgCl ₂ und dNTPs), AccuPrime Taq
nhba	62°C, 1 Minute/ 72°C, 2 Minuten	Puffer I, Bioline Taq
fHbp	58°C, 30 Sekunden/ 68°C, 1 Minute	10x AccuPrime PCR Puffer 2, AccuPrime Taq

3.2.3. Gelelektrophorese zur DNA-Auftrennung

us Agarose-Pulver und 1 x TBE-Puffer wird ein Gel hergestellt. Dabei eignet sich ein 1,5% Gel vor allem für kleinere DNA-Fragmente unter 2kb. Die zu

untersuchenden Proben werden mit GEBS gemischt und auf die Geltaschen aufgetragen. Ein Größenmarker mit definierten DNA-Mengen (SmartLadder) dient als Referenz. Die Auftrennung erfolgt in einer mit 1 x TBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer bei 180V.

3.2.4. DNA-Aufreinigung mit kommerziellen Reaktionskits

Je nach Bedarf wurden verschiedene Systeme der Firma Qiagen verwendet und laut den Protokollen des Herstellers gebraucht:

- QIAquick PCR Purification Kit zur Aufreinigung von PCR Produkten
- MiniElute Gel Extraction Kit zur DNA-Extraktion aus Agarosegelen
- QIAprep Spin Miniprep Kit zur Präparation von Plasmid-DNA
- QIAamp DNA Mini Kit zur Präparation chromosomaler DNA

3.2.5. Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte im Bereich Molekularbiologie des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg nach der Didesoxy-Methode mit dem ABI3130 Genetic Analyzer.

3.2.6. DNA-Hybridisierung

Die DNA-Hybridisierung ist ein sensitives Nachweisverfahren für DNA-Abschnitte mittels spezifischer komplementärer Sonden.

3.2.6.1. Herstellung von Digoxogenin markierten Sonden

PCR-Produkte, welche der gesuchten DNA entsprechen, werden über eine Säule aufgereinigt und bei 95°C denaturiert. Der denaturierten DNA (15µl)

werden 2 µl Hexanukleotid-Gemisch, 2 µl DIG-Markierungsgemisch und 1 µl DNA-Polymerase (Klenow) zugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wird die Reaktion mit EDTA-Lösung gestoppt und die DNA mit Na-Acetat und eiskaltem Ethanol gefällt. Die DNA wird in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50µl TE 10:1 gelöst. Die Sonde kann bei -20°C gelagert und mehrfach benutzt werden.

Die Quantifizierung der Ausbeute an DIG-DNA erfolgt im Dot Blot auf einer Nylonmembran. Durch eine Verdünnungsreihe der markierten DNA in Zehnerschritten (je 1 µl) in Gegenüberstellung zu definierten Mengen einer Kontroll-DNA kann man nach DIG-Nachweis mittels CSPD die Signalstärke von markierter DNA und Kontroll-DNA visuell vergleichen.

3.2.7. Colony Blot-Hybridisierung

Der Colony Blot ist ein Screening-Verfahren, um Bakterienkolonien auf das Vorhandensein eines spezifischen DNA-Fragments zu untersuchen.

Auf einer Agar-Platte gewachsene Bakterienkolonien werden direkt mit einer Nylonmembran abgezogen und getrocknet. Die Bakterien werden in 10 % SDS lysiert, danach die DNA fünf Minuten in Lösung 1 denaturiert. Nach Neutralisierung in Lösung 2 wird der Blot zuletzt fünf Minuten mit 2 x SSPE behandelt. Die Nylonmembran wird bei Raumtemperatur getrocknet, die DNA durch UV-Vernetzung (sog. UV-Crosslinking) auf die Membran fixiert. Nach 20-minütiger Inkubation in Lösung 3 bei 57°C werden letzte Zellreste von der Membran abgewischt, die Membran bei Raumtemperatur getrocknet und ein weiteres Mal mit UV-Licht behandelt. Der Blot ist nun für die Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden vorbereitet. Zur genauen Zusammensetzung der genutzten Lösungen siehe 3.1.8.

3.2.8. Southern Blot

Der Southern Blot umfasst den Transfer von mit Restriktionsenzymen gespaltener DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran und die anschließende DNA-Hybridisierung zum Nachweis eines spezifischen DNA-Abschnittes.

3.2.8.1. Restriktionsverdau

Aufgereinigte chromosomale DNA wird über Nacht bei 37°C mit geeigneten Restriktionsenzymen und entsprechenden Puffern desselben Herstellers verdaut. Die verdaute DNA wird in einem 0,8% Agarose-Gel aufgetrennt. DIG markierte Größenmarker dienen als Referenz.

3.2.8.2. Blot

Zunächst wird durch einen Depurinierungsschritt die DNA fragmentiert, was die Effizienz des folgenden DNA-Transfers erhöht. Nach je 30-minütiger Denaturierung und Neutralisierung wird das sogenannte „transfer sandwich“ zum Blotten aufgebaut. Das Gel wird auf eine Nylonmembran gelegt. Den Boden bilden Papiertücher als Flüssigkeitsakzeptor, das Dach in 10x SSPE getränktes Filterpapier als Flüssigkeitsdonor. Durch die Kapillarkräfte wird die DNA vom Gel auf die Membran transferiert. Nach Trocknung wird die DNA mittels UV-Vernetzung auf der Nylonmembran fixiert. Es kann sich die Hybridisierung mit DIG markierten Sonden anschließen.

3.2.8.3. Hybridisierung mit DIG markierten Sonden

DNA-Fragmente, die durch UV-Vernetzung auf Nylonmembranen fixiert sind, können durch DIG markierte Sonden nachgewiesen werden.

Die Membranen werden zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen eine Stunde bei 42°C im Hybridisierungssofen mit high SDS-Puffer vorhybridisiert. Währenddessen werden 10 ng/ml der DIG-markierten Sonde in 10 ml high SDS-Puffer aufgekocht und auf Eis abgekühlt. Über Nacht werden die Membranen bei 42°C mit der Sonde hybridisiert. Es folgen zwei Waschschrirte mit 2 x SSC/ 0,1% SDS bei Raumtemperatur und 0,1 SSC/ 0,1 % SDS bei 68°C, um überschüssige und unspezifisch gebundene DNA-Sonden zu entfernen. Nun erfolgt der Bindungsnachweis mittels CSPD®.

3.2.8.4. DIG-Nachweis mit CSPD®

DIG-markierte Sonden kann man mit Hilfe eines Antikörpers nachweisen, an den alkalische Phosphatase gekoppelt ist, die das Chemilumineszenz-Substrat CSPD® umsetzt.

Die Nylonmembranen mit den hybridisierten Sonden werden mit Waschpuffer gewaschen, 30 Minuten in Blockierungslösung abgesättigt und mit dem anti-DIG-Antikörper in der Verdünnung 1:10000 für 30 Minuten bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Es schließen sich zwei Waschschrirte, die Inkubation in Nachweispufter und zuletzt für fünf Minuten in CSPD®-Lösung (1:100 im Nachweispufter) an. Die Membranen werden für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und ein Röntgenfilm für ca. 20 Minuten aufgelegt. Es können mehrere Expositionen mit unterschiedlicher Auflagezeit notwendig sein, um ein optimales Bildergebnis zu erzielen. Die Filme werden in der Filmentwicklungsmaschine entwickelt.

3.2.9. Klonierung

3.2.9.1. Ligation

Zunächst wird der zu klonierende DNA-Abschnitt, der durch Southern Blot Hybridisierung ermittelt wurde aus einem 0,8% Agarose-Gel ausgeschnitten.

Die Gelbande wird mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Der Vektor pBluescript (pBS), in den der zu klonierende DNA-Abschnitt ligiert werden soll, wird mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut, in einem 0,8% Agarose-Gel aufgetrennt und aufgereinigt. Um eine erfolgreiche Ligation zu gewährleisten, sollte sich im Ligationsansatz im molekularen Verhältnis mindestens dreimal so viel Insert, also zu klonierende DNA, befinden wie Vektor. Zusätzlich werden 1 µl T4 Ligase und 1,5 µl Ligasepuffer zum Ansatz gegeben, dessen Gesamtvolumen 15 µl ist. Der Ansatz wird über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.2.9.2. Phenolieren und Etherisieren

Der Ligationsansatz wird nun mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit 250 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt. Der Ansatz wird zur Phasentrennung zentrifugiert, die obere Phase, in der sich die DNA befindet, abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die untere Phase wird mit weiteren 50µl destilliertem Wasser gemischt und zentrifugiert. Die obere Phase wird wieder abgenommen. Um das restliche Phenol zu extrahieren, werden 150µl Ether hinzugegeben. Nach Zentrifugation wird die obere Phase verworfen, der Rest-Ether im Heizblock bei 37°C verdampft. Der Ansatz wird mit 15 µl Acrylamid (200 µg/ml), 15 µl 5 M NaCl und 540 µl 100 % Ethanol (-20°C) aufgefüllt. Die DNA wird 30 Minuten bei -80°C gefällt, bei 4°C abzentrifugiert, mit 1 ml 70% Ethanol (4°C) gewaschen und erneut bei 4°C zentrifugiert. Der Alkohol wird abgossen, das Pellet in der Speedvac getrocknet und in 5 µl ddH₂O resuspendiert. Nun kann der entionisierte Ligationsansatz für die Elektroporation genutzt werden.

3.2.9.3. Elektroporation

Mithilfe der Elektroporation wird die Zellwand kompetenter E. coli-Bakterien für DNA durchlässig gemacht.

40 µl kompetenter Bakterien werden auf Eis aufgetaut. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß werden die Bakterien mit 1-2 µl des Ligationsansatzes vermischt und auf Eis inkubiert. Der Ansatz wird luftblasenfrei in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette übertragen. Im Elektroporationsgerät (Widerstand 400 Ω, Kapazität 25 µF, Spannung 2,5 KV, Zeit: automatisch) wird ein einmaliger Stromimpuls ausgeübt, die Bakterien sofort in 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium gegeben und bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Bakteriensuspension fraktioniert auf LB-Platten mit passendem Antibiotikum (hier: Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Es wachsen nur Klone, die den Ligationsansatz mit Antibiotikaresistenz aufgenommen haben.

3.2.10. Western Blot

3.2.10.1. SDS PAGE

Zunächst wird ein Polyacrylamidgel bestehend aus oberem Sammelgel und unterem Trenngel gegossen. Je nach Größe der zu bestimmenden Proteine wählt man Trenngele zwischen 7,5% und 15% Polyacrylamid (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Trenngel: Pipettierschema für ein Gel

	7,5%	10%	12,5%	15%
30 % PAA	1,5 ml	2 ml	2,5 ml	3 ml
Aqua	3 ml	2,5 ml	2 ml	1,5 ml
lower Tris	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
10 % APS	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

Das Gel wird in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Laufpuffer vollständig bedeckt.

Die über Nacht auf GC-Agar gewachsenen Bakterien werden in PBS suspendiert, eine OD600 von 0,2 wird eingestellt. Nach Zentrifugation wird das Pellet mit sample solution resuspendiert. Für die Elektrophorese werden 10 µl der Proben für 10 Minuten gekocht und auf die Geltaschen aufgetragen. Zudem wird ein gefärbter Größenmarker aufgetragen. Während Proben und Marker im Sammelgel laufen, wird ein Strom von 10 mA, im Trenngel dann 20 mA je Gel angelegt.

Nach der SGS-PAGE wird das Gel auf Nitrozellulose gelegt, in die Western Blot Kammer eingesetzt und mit Laufpuffer bedeckt. Die im Gel aufgetrennten Proteine werden bei 300 mA für eine Stunde auf die Nitrozellulose geblottet.

3.2.10.2. Darstellung der Antikörperbindung

Die folgenden Inkubationsschritte finden alle auf einem Schüttler statt.

Die Nitrozellulose wird für eine Stunde in 1 x PBS/0,1% Tween 20/5% Magermilch gegeben, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Es folgen Inkubationen mit dem ersten Antikörper in 1 x PBS/0,1% Tween 20/1% Magermilch bei 4°C über Nacht und mit dem zweiten peroxidasegekoppelten

Antikörper in 1 x PBS/0,1%Tween 20 für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zwischen den Inkubationsschritten finden Waschschriffe mit Waschpuffer statt. Die Nitrozellulose wird luftblasenfrei auf eine Glasplatte aufgelegt und mit ECL-Reagenz (*enhanced chemoluminescent*) bedeckt. Die Peroxidase setzt das Substrat um, und die Chemilumineszenz wird mithilfe eines Röntgenfilmes detektiert, der auf den Blot gelegt wird.

3.2.11. Durchflusszytometrie

3.2.11.1. Faktor H-Bindung

Die Bakterien wachsen über Nacht auf Kochblutagar, werden mit einem Wattetupfer von der Agarplatte genommen und in 1 ml Waschpuffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 11000 rpm für 5 Minuten und einem Waschschriff wird eine OD₆₀₀ von 0,1 in Waschpuffer eingestellt. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 50 µl Reaktionslösung bestehend aus 47,5 µl Waschpuffer und 2,5 µl Faktor H - bzw. 50 µl Waschpuffer als Negativkontrolle - resuspendiert. Der Ansatz wird für 30 Minuten bei 37 °C und 700 rpm im Thermomixer inkubiert. Nach einem Waschschriff werden die Bakterien mit 50 µl anti-Faktor H-Antikörper (1:50 in Waschpuffer verdünnt) für 30 Minuten bei 37 °C und 700 rpm im Thermomixer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff werden die Bakterien in 50 µl des 2. Antikörpers (1:200 in Waschpuffer verdünnt) bei 37 °C und 700 rpm für 30 Minuten im Thermomixer inkubiert. Es schließt sich ein letzter Waschschriff an, die Bakterien werden danach mit 1 ml 1 % Formaldehyd in 1 x PBS mindestens 1 Stunde fixiert. Nach Zentrifugation wird das Pellet in 500 µl 1 x PBS aufgenommen und in 5 ml FACS-Reaktionsgefäße transferiert. Es erfolgt die Messung im FACS. Um Zelldebris und agglutinierte Bakterien von der Messung auszuschließen, wird ein passendes *Gate* gesetzt und 20000 Ereignisse in diesem *Gate* gemessen. Die Einstellungen bei der Messung sind die folgenden: P1: FSC: E02: 3,50 A, lin; P2: SSC: 350 V, log; P3: FL1: 750 V, log.

Als Positivkontrolle wird der Stamm WUE2425 (MC58 siaD-), eine isogen unbekapselte Mutante, verwendet, als Negativkontrolle dient die fHbp-negative Variante WUE4171 (MC58 siaD-/fHbp-/lst-).

3.2.11.2. C4bp-Bindung

Die Bakterien wachsen über Nacht auf Kochblutagar, werden mit einem Wattetupfer von der Agarplatte genommen und in 1 ml Waschpuffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 11000 rpm für 5 Minuten und einem Waschschrift wird eine OD₆₀₀ von 0,1 in Waschpuffer eingestellt. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 50 µl Reaktionslösung bestehend aus 10% HIS in Waschpuffer - bzw. 50 µl Waschpuffer ohne HIS als Negativkontrolle - resuspendiert. HIS dient hier als C4bp-Quelle. Der Ansatz wird für 30 Minuten bei 37 °C und 700 rpm im Thermomixer inkubiert. Nach einem Waschschrift werden die Bakterien mit 50 µl anti-C4bp-Antikörper (1:50 in Waschpuffer verdünnt) für 30 Minuten bei 37 °C und 700 rpm im Thermomixer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift werden die Bakterien in 50 µl des 2. Antikörpers (1:200 in Waschpuffer verdünnt) bei 37 °C und 700 rpm für 30 Minuten im Thermomixer inkubiert. Es folgt ein dritter Waschschrift, die Bakterien werden mit 1 ml 1 % Formaldehyd in 1 x PBS mindestens 1 Stunde fixiert. Die Bakteriensuspension wird erneut zentrifugiert und das Pellet danach in 500 µl 1 x PBS aufgenommen und in 5 ml FACS-Reaktionsgefäße transferiert. Es erfolgt die Messung im FACS. Um Zelldebris und agglutinierte Bakterien von der Messung auszuschließen, wird ein passendes *Gate* gesetzt und 20000 Ereignisse in diesem *Gate* gemessen. Die Einstellungen bei der Messung sind die folgenden: P1: FSC: E02: 3,50 A, lin; P2: SSC: 350 V, log; P3: FL1: 650 V, log. Als Positivkontrolle dient WUE2220 (Serogruppe Y), der C4bp stark bindet, als Negativkontrolle wird FA1090 verwendet, ein Gonokokkenstamm, der C4bp nicht binden kann.

3.2.12. Serum killing assays

Über Nacht auf Kochblutagar gewachsene Bakterien werden in 1 ml VBS⁺⁺/BSA suspendiert. Eine Suspension mit OD₆₀₀ = 0,1 wird hergestellt, was in etwa 1 x 10⁸ cfu/ml entspricht. Eine Verdünnungsreihe in VBS⁺⁺/BSA wird auf Eis angelegt, um 10⁶ cfu/ml zu erreichen.

Tabelle 6: Pipettierschema für Serumbakterizidietest

	HIS als Kontrolle	10% NHS
VBS ⁺⁺ /BSA	200 µl	200 µl
NHS	-	25µl
HIS	25 µl	-
Bakterien (10 ⁶ /ml)	25 µl	25 µl
Gesamtvolumen	250 µl	250 µl

50 µl der Proben werden sofort zur Bestimmung der Ausgangs-cfu mit 950 µl sterilem PBS verdünnt, 100 µl davon werden auf Blutagar ausgestrichen und über Nacht bebrütet.

Der Rest der Proben wird 5 Minuten bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wird die Reaktion auf Eis gestoppt, 50 µl dieser Suspension mit 950 µl sterilem PBS verdünnt und eine Verdünnungsreihe davon auf Blutagar ausplattiert und über Nacht bebrütet.

Am nächsten Tag können die Kolonien gezählt werden.

4. Ergebnisse

4.1. Typisierung von cnl-Meningokokken

4.1.1. Stammauswahl auf der Basis von MLST

Um ein möglichst gutes Abbild verschiedener klonaler Komplexe oder Sequenztypen von cnl-Meningokokken zu bekommen, wurden 14 repräsentative Stämme der bayerischen Meningokokkenstudie und 3 cnl-Stämme aus Burkina Faso ausgesucht (10,35). Insgesamt wurden die ausgewählten Stämme 8 verschiedenen Sequenztypen und 2 klonalen Komplexen zugeordnet (Tabelle 7), was die genetische Diversität der cnl-Meningokokken gut widerspiegelt (13).

4.1.2. Sequenztypisierung von PorA, PorB und FetA

Zunächst wurde mittels PCR die Gegenwart der Gene *porA*, *porB*, *fetA*, *opc*, *fHbp*, *nhba* und *nadA* überprüft. Durch DNA-Sequenzierung wurde anschließend die jeweilige Allelvariante bestimmt.

PorA ist ein Membranprotein mit mehreren extrazellulären Loops, von denen drei als hypervariabel gelten und zur Typisierung dienen können. Die Sequenzierung von PorA zeigte für die variable Region 1 eine häufige Zugehörigkeit zur Allel-Familie 18 bei den untersuchten Stämme. Bei der variablen Region 2 von PorA wurden größere Sequenzunterschiede deutlich. Mit Ausnahme von $\alpha 217$ bestätigte sich jedoch auch hier die genetische Ähnlichkeit der Stämme der verschiedenen Sequenztypen (Tabelle 7). Für PorB, ein weiteres Membranprotein, ließen sich ebenfalls ähnliche genetische Varianten für die Stämme eines Sequenztyps nachweisen. Diese Ergebnisse finden sich auch bei FetA, wobei sich hier $\alpha 14$ mit einer anderen genetischen Variante von den anderen untersuchten Stämmen des

Sequenztyps 53 unterscheidet. Sonst hatten die Stämme desselben Sequenztyps auch immer dieselbe FetA-Variante. Bei den Isolaten aus Burkina Faso konnte kein FetA nachgewiesen werden (35).

4.1.3. Nachweis von *opc*

Die *opc*-Expression wurde im Western Blot untersucht, als Antikörper diente der monoklonale Antikörper B306 gegen Opc (7,164). Opc wurde untersucht, da es über Vitronectin Serumresistenz vermittelt (165). Opc konnte in der PCR in den untersuchten Stämmen des ST-198cc und des ST-845 gefunden werden. Auf Proteinebene wird es aber nur von den ST-845 Stämmen exprimiert, da es lediglich bei diesen im Western Blot nachgewiesen werden konnte. Die Bande bei ca. 30 kDa von α 227 ist sehr schwach und könnte Ausdruck einer unspezifischen Antikörperreaktion sein, da in der PCR bei diesem Stamm kein *opc* nachgewiesen werden konnte und daher die genetische Grundlage einer Expression fehlen sollte.

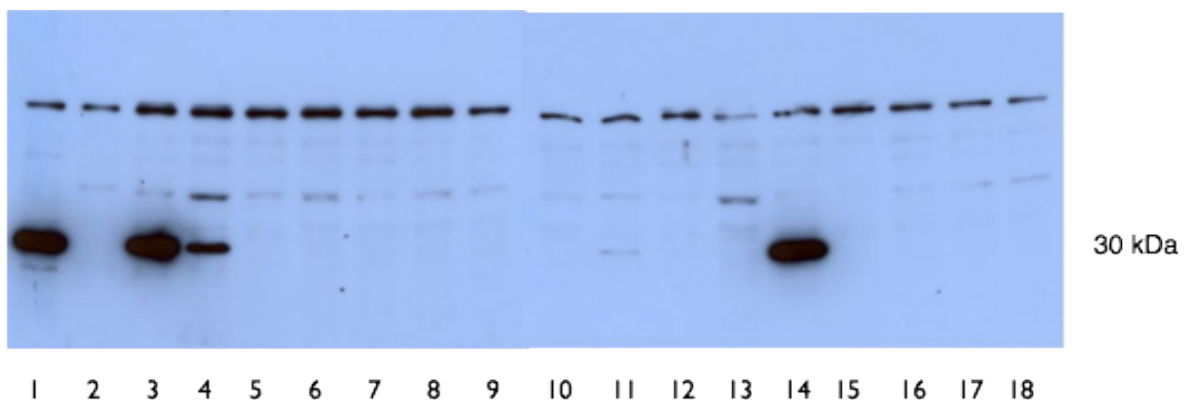


Abbildung 4: Expression von Opc : Western Blot mit mab B306 (mouse anti-*opc* (164)). 1: WUE2135, 2: α 14, 3: α 30, 4: α 62, 5: α 76, 6: α 88, 7: α 133, 8: α 134, 9: α 180, 10: α 217, 11: α 227, 12: α 380, 13: α 524, 14: α 634, 15: α 797, 16: 240924, 17: 241028, 18: 241043; auf der Y-Achse ist die Proteingröße angegeben

4.1.4. Nachweis und Typisierung der in Bexsero[®] verwendeten Antigene FHbp, NHBA und NadA

Die Hauptantigene, die in Bexsero[®] vorhanden sind, wurden typisiert, um zu sehen, ob ebenfalls eine klonale Zugehörigkeit der Varianten zu einzelnen Sequenztypen der *cnI*-Meningokokken zu sehen ist. Für fHbp zeigte sich eine eindeutige Zugehörigkeit verschiedener Varianten zu den einzelnen Sequenztypen. So fand sich z.B. Variante 102 von fHbp nur in den Stämmen des ST 53.

Bei den Stämmen $\alpha 88$, $\alpha 134$, $\alpha 217$, $\alpha 227$ und $\alpha 524$ war mit den Standard-Primern für fHbp zunächst kein PCR-Produkt erzielt worden, daher wurde mittels Southern Blot bei diesen Stämmen der endgültige Nachweis des Vorhandenseins von fHbp erbracht. Die Sonde dafür wurde aus aufgereinigten fHbp Varianten anderer *cnI*-Stämme hergestellt. Auch bei diesen Stämmen des ST-198cc und ST-1136 wurde eine einheitliche Variante, nämlich 91, von fHbp gefunden.

Das NHBA ist ebenfalls ein Bestandteil der Vakzine. Die von uns untersuchten *cnI*-Meningokokken zeigten alle das Vorhandensein des kodierenden Gens. Die PCR-Produkte der *cnI*-Stämme unterschieden sich in ihrer Sequenz und konnten daher von uns in fünf neue Gruppen eingeteilt werden, die sich vom Vergleichsstamm WUE2135 unterschieden und ebenfalls den einzelnen Sequenztypen zugeordnet werden konnten.

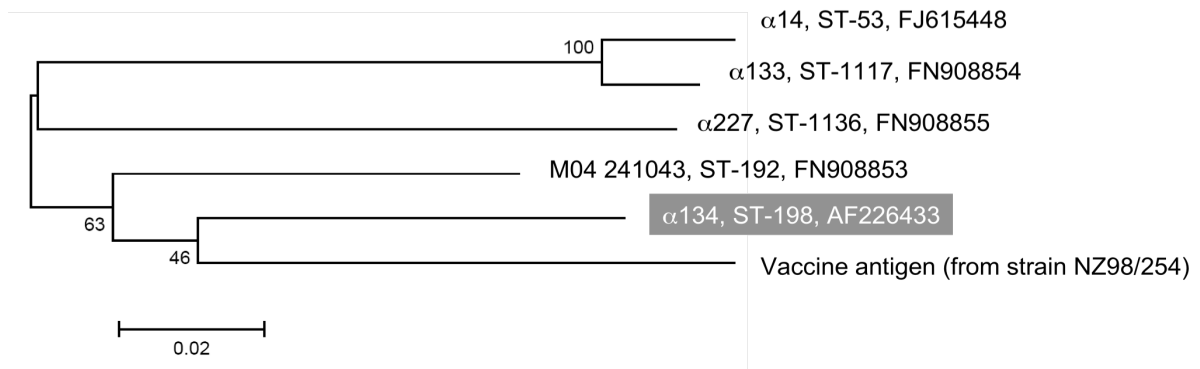


Abbildung 5: Neighbor joining tree von NHBA Aminosäuresequenzen der getesteten cnl-Meningokokken; als Referenz dient das Impfstoffantigen des 4CMenB-Impfstoffes (151); in grau die NHBA Aminosäuresequenz des Stammes α 134 als Vertreter des ST 198 in naher Verwandtschaft zum Kontrollstamm

Das Adhäsın NadA ist Teil des neuen Novartis Impfstoffes Bexsero[®]. Aus diesem Grund wurden alle verwendeten cnl-Stämme auf das Vorhandensein des Gens untersucht. Nach PCR mit den entsprechenden Primern findet sich ein 433bp großes Produkt, das die Abwesenheit von NadA zeigt (152).

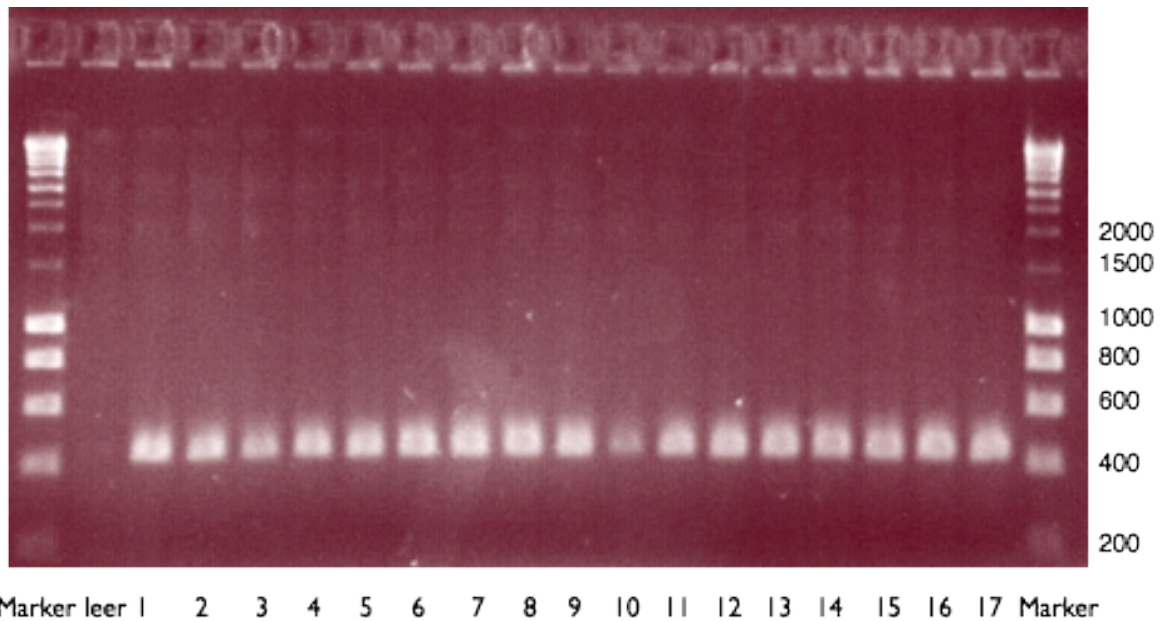


Abbildung 6: Vorhandensein des Adhäsins NadA bei cnl-Meningokokken. Das PCR-Produkt mit einer Größe von 433 bp entspricht dem eines NadA-negativen Stammes.

Marker: Smart ladder, 1: α 14, 2: α 30, 3: α 62, 4: α 76, 5: α 88, 6: α 133, 7: α 134, 8: α 180, 9: α 217, 10: α 227, 11: α 380, 12: α 524, 13: α 634, 14: α 797, 15: 240924, 16: 241028, 17: 241043. Größenangaben für den Marker in bp.

4.1.5. Bestimmung der Expression der fHbp-Varianten

Das fHbp kann in 3 verschiedene Varianten unterteilt werden. Um zu untersuchen, welche Varianten von den cnl-Meningokokken exprimiert werden, führten wir eine Analyse mittels PCR und Western Blot durch. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die untersuchten cnl-Stämme Variante 2 oder 3 von fHbp haben. Als erster Antikörper dienten rabbit anti-V2 und V3 GNA1870, Verdünnung 1:2500 (die Antikörper wurden dankenswerterweise von Novartis Vaccines and Diagnostics bereitgestellt). Als Kontrollstamm wurde WUE2425 verwendet. Es trat Kreuzreaktivität zwischen V2 und V3 auf.

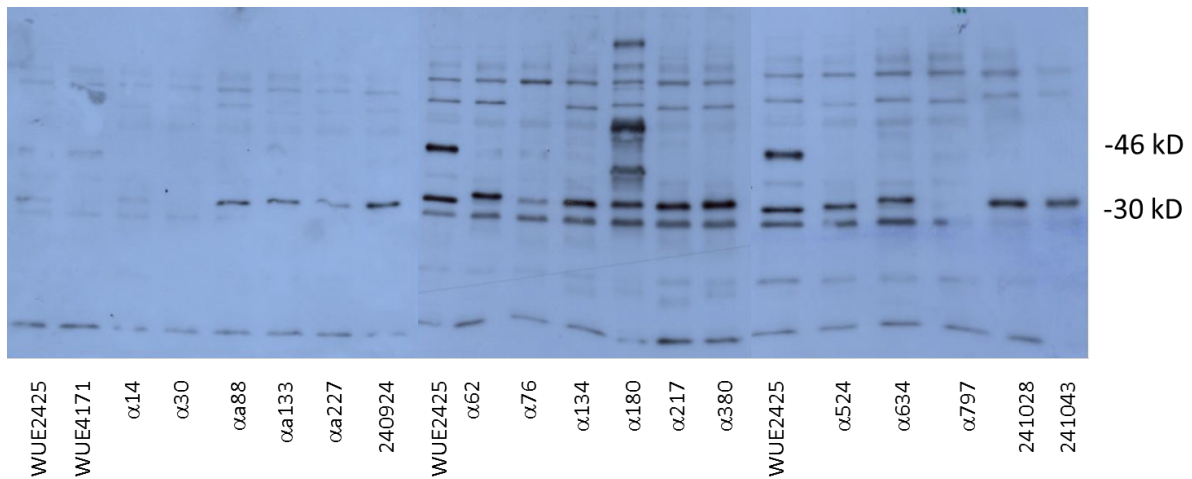


Abbildung 7: Western Blot Analyse der fHbp-Variante in cni-Meningokokken. Nachweis von Variante 2 mit rabbit anti-V2-GNA1870 bei ca. 36kD. Als Vergleichsstämme dienten WUE2425 (Positivkontrolle) und WUE4171 (Negativkontrolle).

Tabelle 7: Typisierung der untersuchten cni-Stämme: ST: Sequenztyp, CC: klonaler Komplex, VR1: Variable Region 1 von porA, VR2: Variable Region 2 von porA, fHbp: Faktor H bindendes Protein, nhba: Neisseria Heparin binding protein, opc PCR, opc WB

Stamm	ST	CC	porA VR1	porA VR2	porB	FetA	opc PCR	opc WB	fHbp	nhbp	NadA	fH-binding	C4bp-binding
α14	53	53	7	30-3	3-64	F5-5	-	-	2.102	FJ615448	-	-	-
α76	53	53	7	30	3-64	F1-2	-	-	2.102	FJ615448	-	-	-
α180	53	53	7	30-2	3-64	F1-2	-	-	2.102	FJ615448	-	-	-
α88	822	198	18-20	25-1	3-37	F5-5	+	-	3.94	AF226433	-	-	-
α134	198	198	18	25-1	3-37	F5-5	+	-	3.94	AF226433	-	-	-
α217	198	198	19	13-1	3-84	F5-5	+	-	3.94	AF226433	-	-	-
α524	39	198	18	25-1	3-37	F5-5	+	-	3.94	AF226433	-	-	-
α30	845		18	25	3-84	F5-2	+	+	2.334	AF226433	-	-	-
α62	845		18	25-19	3-84	F5-2	+	+	2.334	AF226433	-	-	-
α634	845		18	25	3-84	F5-2	+	+	2.334	AF226433	-	-	-
α133	1117	1117	18-1	30-2	3-37	F3-7	-	-	2.21	FN908854	-	-	-
α380	1117	1117	18-1	30	3-64	F3-7	-	-	2.21	FN908854	-	-	-
α797	1117	1117	18-1	30-9	3-64	F3-7	-	-	2.21	FN908854	-	-	-
α227	1136	1136	18-4	25-24	3-84	F4-1	-	-	3.94	FN908855	-	-	-
M03 240924	192		18-11	42	3-244	-	-	-	3.111	FN908853	-	-	-
M04 241028	192		18-11	42-1	3-244	-	-	-	3.111	FN908853	-	-	-
M04 241043	192		18-11	42-3	3-244	-	-	-	3.111	FN908853	-	-	-

4.2. Cnl-Meningokokken binden keinen Faktor H

Die Bindung des körpereigenen Komplementinhibitors Faktor H ist ein wichtiger Pathogenitätsmechanismus vieler Bakterien, um dem Immunsystem zu entgehen. Bei Meningokokken wurde fHbp als Faktor H bindendes Protein identifiziert (121).

Alle untersuchten cnl-Meningokokken zeigten in der PCR das Vorhandensein des fHbp-Gens. Mittels Durchflusszytometrie wurde daher das Ausmaß der fH-Bindung im Vergleich zu einem unbekapselten Kontrollstamm der Serogruppe B (WUE2425) gemessen. Als Negativkontrolle diente die Mutante WUE4171, bei der fHbp deletiert ist (166). Nach Fixierung der Bakterien wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz gemessen. Es stellte sich heraus, dass die fH-Bindung aller cnl-Stämme mit der der verwendeten Negativkontrolle vergleichbar war, während die Positivkontrolle zehnfach stärker band (Abbildung 9).

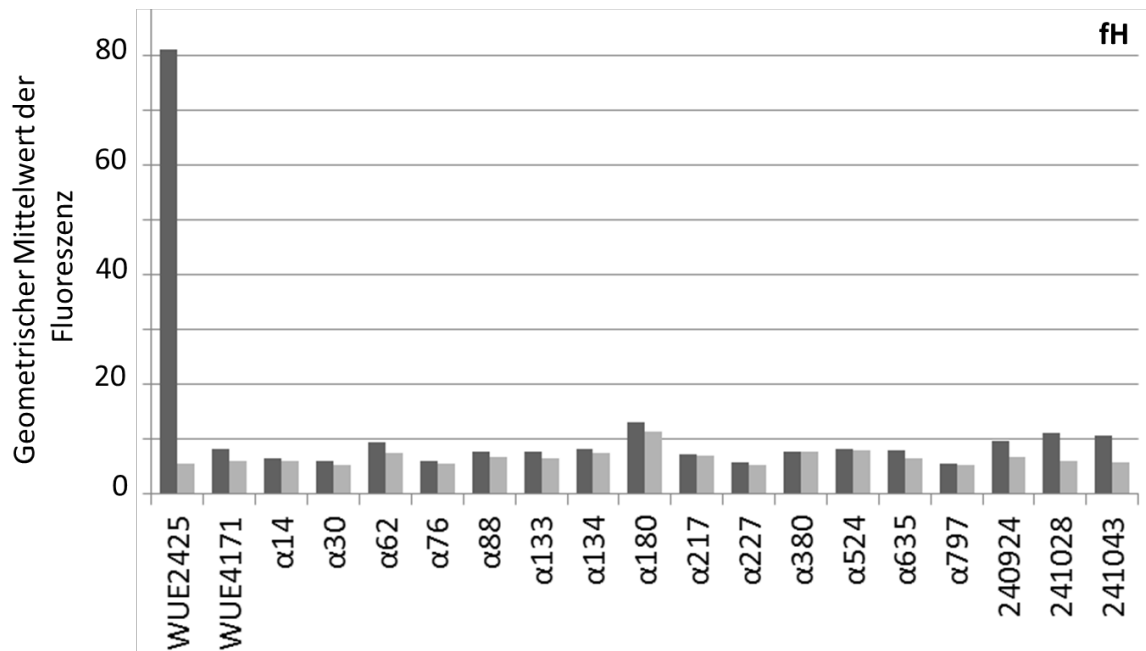


Abbildung 9: Faktor H-Bindung von cni-Meningokokken. Aus zwei unabhängigen Experimenten wurde der durchschnittliche geometrische Mittelwert der Fluoreszenz ermittelt; dunkelgrau: mit fH inkubierte Bakterien; hellgrau: Kontrollexperiment ohne fH; als Positivkontrolle diente WUE2425, als Negativkontrolle diente WUE4171.

4.3. Cni-Meningokokken binden kein C4bp

Die Bindung der cni-Stämme an den wichtigsten Regulator des klassischen Weges des Komplementsystems wurde ebenfalls mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Als Referenzstämme dienen FA1090 und WUE2220. Die Bakterien wurden mit 10% HIS als C4bp-Quelle inkubiert, als primärer Antikörper diente ein monoklonaler anti-humaner C4bp-Antikörper. Auch hier konnte in der Durchflusszytometrie keine signifikant höhere C4bp-Bindung der cni-Stämme als bei der Negativkontrolle festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 zu sehen.

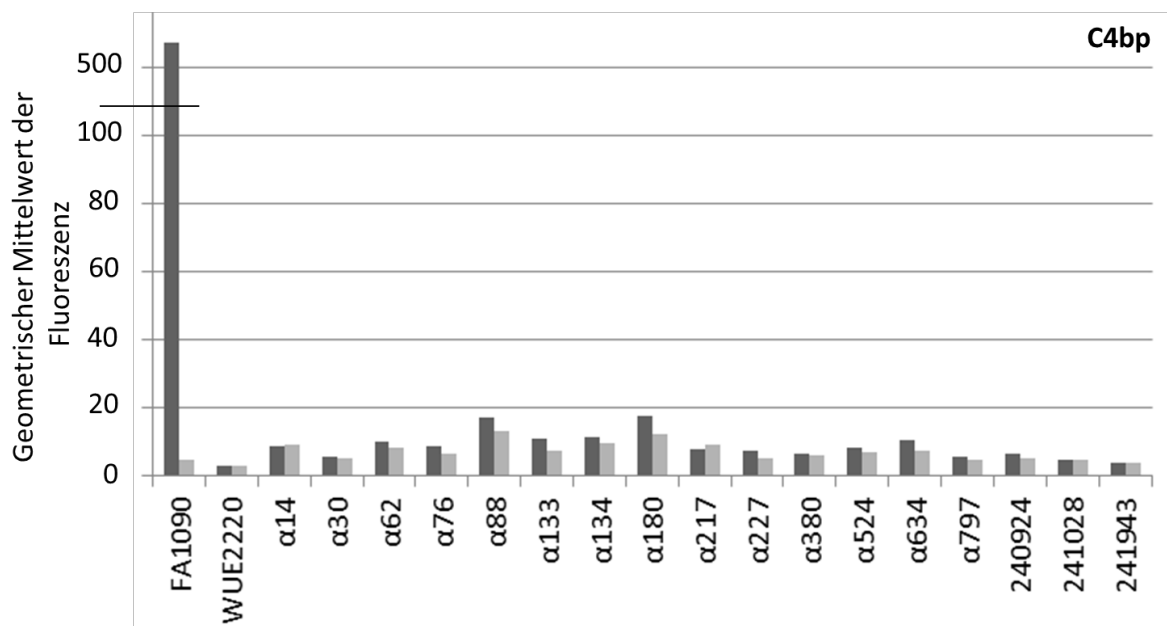


Abbildung 10: C4bp-Bindung von cni-Meningokokken. Aus zwei unabhängigen Experimenten wurde der durchschnittliche geometrische Mittelwert der Fluoreszenz ermittelt; dunkelgrau ist der Wert mit HIS als C4bp-Quelle, hellgrau die Negativkontrolle ohne HIS; als Referenzstämmen dienten der Gonokokkenstamm FA1090 (Positivkontrolle) und der MenY Stamm WUE2220 (Negativkontrolle).

4.4. Serumresistenz von cni-Meningokokken

Es ist bekannt, dass bekapselte Meningokokken deutlich serumresistenter sind als unbekapselte. Auch Akquisition der Komplementregulatoren fH und C4bp führt zu erhöhtem Überleben im Serum. Mit allen cni-Stämmen wurden Serumbakterizidietests durchgeführt, um zu sehen, in welchem Ausmaß cni-Meningokokken trotz fehlender Kapsel und *in vitro* fehlender fH- und C4bp-Bindung im Serum überleben und somit zur Erkrankung führen können. Dazu wurden die Bakterien mit 10% NHS bzw. 10% HIS als Negativkontrolle für 5 Minuten bei 37 C inkubiert. Als Kontrollen dienten die Stämme WUE 2425 (Serogruppe B) und WUE2220 (Serogruppe Y), der keine fH-Bindung aufweist. Während bei den Kontrollstämmen vollständiges Überleben nach 5 Minuten zu

sehen war, überlebte bei den cnl-Stämmen bereits nach dieser kurzen Zeit ein Großteil der Bakterien nicht. Ein etwas besseres Überleben von ca. 10% zeigten die Isolate aus Burkina Faso und einige deutsche cnl-Stämme, wie z.B. a88. Ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Sequenztypen scheint nicht ersichtlich. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 zu sehen. Insgesamt lässt sich aus den Bakterizidietests schließen, dass die Serumresistenz der cnl-Meningokokken unabhängig von der klonalen Linie *in vitro* äußerst gering ist.

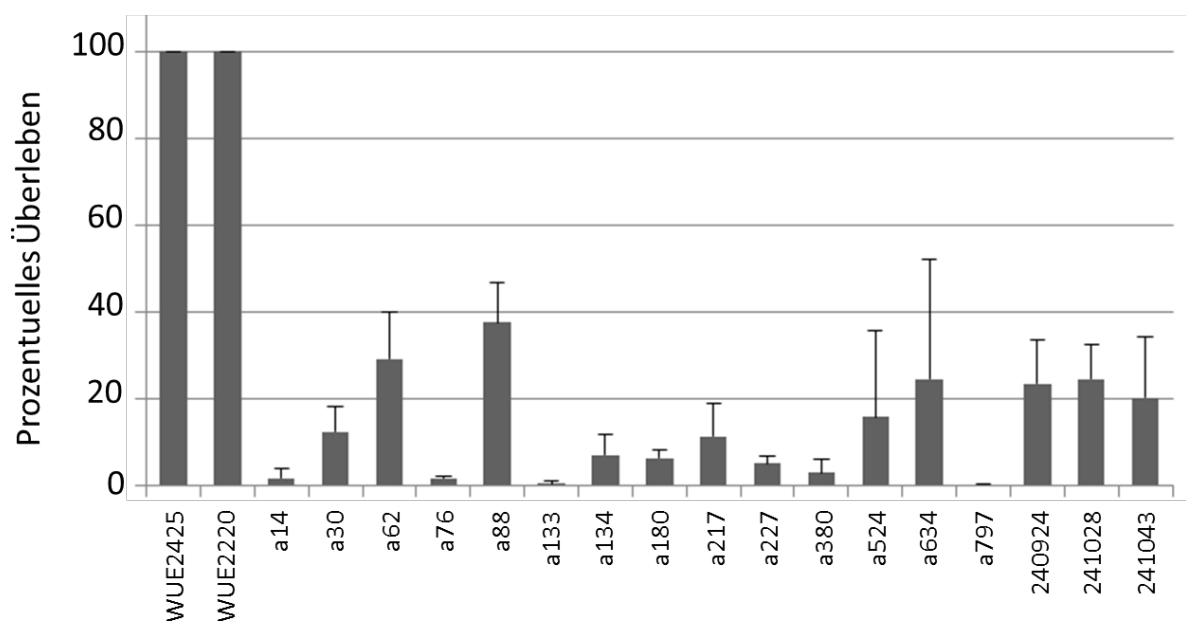


Abbildung 11: Bestimmung der Serumresistenz von cnl-Meningokokken. Die Bakterien wurden 5 Minuten in 10% NHS inkubiert. Gezeigt wird das durchschnittliche prozentuale Überleben aus zwei Experimenten; WUE2425 (MC58 *siaD*-) und WUE2220 als Kontrolle.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Serumresistenz der cnl-Meningokokken deutlich geringer ist als die der bekapselten Kontrollstämmen. Das mag zum einen an der Kapsel liegen, zum anderen sicherlich an der Unfähigkeit, die wichtigsten Komplementregulatoren zu binden und somit die erste Stufe des Immunsystems zu überwinden.

5. Diskussion

Meningokokken sind häufige Kolonisatoren des menschlichen Nasenrachenraumes, doch nur in seltenen Fällen resultiert daraus eine invasive Erkrankung.

Es ist bekannt, dass Menschen, die über niedrige natürliche Antikörpertiter gegen Meningokokken verfügen, häufiger an invasiven Meningokokken-Infektionen erkranken (167). Weiterhin konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass Kleinkinder auf Grund einer niedrigen Trägerrate in diesem Alter nur geringe Titer protektiver Antikörpertiter gegen Meningokokken haben. Vermehrte Erkrankungsfälle im Jugendalter trotz höherer Antikörpertiter resultieren aus gesteigerten Transmissionsraten (168). Es konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass durch Impfung gegen *N. lactamica*, einem engen Verwandten der Meningokokken, protektive Antikörper gegen Meningokokken evoziert werden konnten, was die Vermutung aufwirft, dass durch Besiedelung mit apathogenen Neisserien auch beim Menschen durch Antikörperbildung ein Schutz vor invasiven Stämmen entstehen kann (169). Die Wahrscheinlichkeit, eine invasive Erkrankung zu entwickeln, ist bei Erstkontakt zu einem virulenten Stamm am höchsten (170). Daraus kann man schließen, dass durch repetitiven Kontakt z.B. zu cni-Meningokokken als Kommensale im Nasenrachenraum protektive Antikörper gegen Meningokokken im Allgemeinen hervorgerufen werden können. Eine Verhinderung der Kolonisation und damit des Primings des Immunsystems mithilfe von Kommutanten Meningokokken durch die Vakzine Bexsero[®] könnte daher zur Verminderung der natürlichen Immunität und auch der Herdenimmunität gegen invasive Meningokokken führen.

Daher war es ein Ziel dieser Studie, konstitutiv unbekapselte Isolate genau zu typisieren und herauszufinden, ob diese die in der neuen Vakzine Bexsero[®] verwendeten Antigene besitzen und von dem Impfstoff erfasst werden. Zum einen konnte gezeigt werden, dass für alle untersuchten Gen-Loci eine Zuteilung der gefundenen Allelvarianten zu den einzelnen Sequenztypen oder klonalen Komplexen ersichtlich ist. Zum anderen konnten einige der in

Bexsero[®] vorhandenen Antigene wie fHbp und NHBA auch in den untersuchten cnl-Meningokokken nachgewiesen werden. Das trifft nicht für das Adhäsion NadA zu. Das Fehlen von NadA in den cnl-Meningokokken könnte zu einer schlechteren Wirkung des Impfstoffes gegen diese Stämme führen. Da auch einige bekapselte invasive Stämme kein NadA besitzen, kann dies ein Problem für die generelle Wirksamkeit der Vakzine auch gegen Serogruppe B-Meningokokken sein (171,172).

In der Vakzine Bexsero[®] sind OMVs von NZ98/254, einem Stamm der Serogruppe B, enthalten. Darin befinden sich verschiedene Oberflächenproteine, deren Vorkommen und Allelvarianten wir auch in den cnl-Meningokokken untersucht haben. Für PorA mit den variablen Regionen 1 und 2 findet sich mit der Kombination 7-2,4 der Vakzine eine Variante, die in keinem der untersuchten cnl-Stämme vorhanden war. Die FetA-Variante F1-5 der Vakzine ist ebenfalls nicht in den cnl-Meningokokken zu finden. Den Stämmen aus Burkina Faso fehlt wie bereits beschrieben das FetA-Gen sogar vollständig. PorB ist ein weiteres Oberflächenprotein, das auch in den OMVs der Vakzine enthalten ist. Die cnl-Meningokokken besitzen alle ein PorB der Klasse 3, nämlich 3-37, 3-64, 3-84 oder 3-244. Die OMVs der Vakzine aus Stamm NZ98/254 enthalten ebenfalls ein PorB der Klasse 3, allerdings 3-1, das sich von denen der untersuchten cnl-Meningokokken unterscheidet (155).

Insgesamt ist es fraglich, ob Antikörper gegen die OMVs der Vakzine auch die Oberflächenproteine der cnl-Stämme erkennen, da hier doch deutliche Unterschiede zum Vakzine-Stamm erkennbar sind.

Für das NHBA lässt sich wiederum eine Zuteilung der verschiedenen gefundenen Varianten zu den einzelnen Sequenztypen der cnl-Meningokokken machen. In einer neuen Studie unserer Arbeitsgruppe wurde der direkte Einfluss von Bexsero[®] auf cnl-Meningokokken mittels MATS ELISA untersucht (155). MATS (*meningococcal antigen typing system*) ist eine Kombination aus einem ELISA, der die Vakzineantigene NadA, Fhbp und NHBA detektiert, und einer Genotypisierung für das Oberflächenantigen PorA. Er wurde speziell zur Testung von Bexsero[®] entwickelt, um aufwendige Serumbakterizidietests vermeiden zu können. Sobald ein Stamm im ELISA für nur eines der Antigene

eine positive Reaktivität zeigt, beträgt die Wahrscheinlichkeit ca. 80%, im Serumbakterizidietest getötet zu werden. Eine Reaktivität mit zwei Antigenen steigert die Rate auf 96% (173). Mit diesem Experiment wurde für NHBA deutlich, dass zumindest die Stämme des ST-198cc und ST-845 direkt von dem Impfstoff erfasst werden könnten, da sie die größten Mengen an NHBA exprimieren (155).

Nachdem mittels PCR, Southern Blot und Western Blot festgestellt werden konnte, dass die in die Studie eingeschlossenen cnl-Meningokokken das fHbp besitzen und exprimieren, sollte im Anschluss auch die Funktionalität der fH-Bindung überprüft werden. Allerdings konnte mittels durchflusszytometrischer Analyse verdeutlicht werden, dass die cnl-Meningokokken nicht in signifikantem Maße fH akquirieren können. Die genauere Typisierung des fHbp-Gens zeigte, dass die in die Studie eingeschlossenen cnl-Meningokokken nur die Varianten 2 und 3 des fHbp besitzen, während viele der invasiven Stämme Variante 1 tragen (122). Allerdings zeigen neuere Daten zu cnl-Meningokokken, dass andere Stämme aus z.B. dem ST-198cc auch die in der Vakzine enthaltene Variante 1 von fHbp haben können (155). Diese Beobachtung schließt daher nicht aus, dass zumindest ST-198cc -Stämme von den durch den Impfstoff evozierten Antikörpern betroffen sein könnten.

Nach Untersuchungen von Madico und Kollegen aus dem Jahre 2006 gilt für bekapselte Stämme, dass nicht die Aminosäuresequenz, sondern die unterschiedlich starke Expression von fHbp für die Unterschiede der fH-Bindung verantwortlich ist (121). Weiterhin konnte fH-Bindung zu Variante 2- und 3-Stämmen mittels ELISA nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde vermutet, dass bereits geringe fH-Bindung - unterhalb der Sensitivität der Durchflusszytometrie - vor Komplement vermittelter Opsonophagozytose und Lyse schützt. Die starke Serumsensitivität der von uns getesteten cnl-Meningokokken lässt allerdings bezweifeln, ob hier überhaupt eine fH-Bindung und damit Schutz vor der Aktivierung des alternativen Wegs des Komplementsystems stattfindet.

Nach der Testung für fH-Akquisition über das in der Vakzine vorhandene fHbp sollte ebenfalls untersucht werden, ob andere Mechanismen der Komplementregulation eine Rolle für cnl-Meningokokken spielen. Insbesondere

die Regulation des MBL- oder des klassischen Aktivierungswegs über Bindung von C4bp war hierbei von Interesse. Bei der Typisierung der *cnl*-Meningokokken konnte bereits das Vorhandensein des Genes für das Bindeprotein PorA und die vorhandene Variante in den Stämmen identifiziert werden. Allerdings ließ sich auch hier mittels Durchflusszytometrie zeigen, dass keine C4bp-Bindung durch die getesteten *cnl*-Meningokokken erfolgte. Daher stellt sich die Frage, ob PorA unter den hier getesteten Bedingungen nicht exprimiert wird und daher keine Bindung von C4bp stattfindet oder ob die Bindung bei den in der Studie einbezogenen Stämmen zu einem funktionslosen Komplex führt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass - wie bereits für fH beschrieben - keine erhöhte Serumresistenz der Stämme festzustellen ist, die man bei einer suffizienten Bindung von C4bp und damit Ausschalten des klassischen und MBL-Weges des Komplementsystems erwarten würde. Interessanterweise zeigte eine andere Studie für die unkapselte Mutante des Stammes H44/76 der Serogruppe B sogar eine Intensivierung der C4bp-Bindung um 76% im Vergleich zum bekapselten Wildtyp, was in diesem Falle dafür spricht, dass die Kapsel sogar die Bindung behindern kann (94). Dies steht im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten *cnl*-Stämmen, die trotz fehlender Kapsel keine nachweisbare C4bp-Bindung haben. Hierzu muss man allerdings anmerken, dass sich *cnl*-Meningokokken nicht nur durch das Fehlen der Kapsel von den invasiven Stämmen unterscheiden, sondern auch durch weitere Faktoren, wie z.B. die unterschiedlichen Allele der C4bp-Bindungsproteine, und damit die Funktionalität der Bindung eine Rolle spielt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Serumbakterizidietests zeigten, dass die untersuchten *cnl*-Meningokokken schon bei einer Serumkonzentration von 10% *in vitro* nach 5 Minuten kaum überleben, die bekapselten Vergleichsstämme WUE2425 (Serogruppe B) und WUE2220 (Serogruppe Y) im Gegensatz dazu jedoch vollständig. Den Stellenwert der Kapsel für die Serumresistenz verdeutlicht der Fakt, dass WUE2220 weder fH noch C4bp in signifikanter Menge akquirieren kann und dennoch im Vergleich zu den *cnl*-Stämmen ein deutlich besseres Überleben zeigt (121). Einzelne *cnl*-Stämme, wie die Isolate aus Burkina Faso oder $\alpha 88$, weisen eventuell eine tendentiell

bessere Serumresistenz bei 10% Serum auf. Diese ist allerdings im Vergleich zu den bekapselten Stämmen noch so gering, dass sie nicht ausreichend erklärt, wie diese Bakterien bei immunkompetenten Personen eine invasive Erkrankung - wie es im Falle eines Stammes aus Burkina Faso der Fall war – verursachen können. Die hier gezeigten Serumbakterizidie-Ergebnisse des invasiven Stammes aus Burkina Faso stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Findlow und Kollegen, bei denen die invasiven Stämme eine vergleichbare Serumresistenz mit dem bekapselten Serogruppe B-Stamm MC58 hatten und eine signifikant höhere Serumresistenz im Vergleich zu den Trägerisolaten (35). Zusammenfassend lassen die fehlende Hemmung der Komplementaktivierung über Nutzung von fH oder C4bp sowie schwache Serumresistenz *in vitro* darauf schließen, dass *in vivo* andere Mechanismen einen entscheidenden Teil zum Überleben der cni-Meningokokken im oberen Respirationstrakt (ORT) beitragen oder dass eine erhöhte Serumresistenz dort nicht vonnöten ist.

Es konnte aber auch gezeigt werden, dass gerade der Verlust der Kapsel Vorteile für Adhäsion und damit Kolonisation bringt, weshalb viele Stämme mit cps-Lokus aus Trägerabstrichen unbekapselt sind (16,174,175). Daher scheint auch die Kapsel nicht der ausschlaggebende Faktor zum Überleben im ORT zu sein.

Es drängt sich die Frage auf, welche anderen Mechanismen dafür verantwortlich sein könnten, dass cni-Meningokokken im ORT überleben, während sie *in vitro* bereits geringen Serumkonzentrationen nicht standhalten und auch *in vivo* äußerst selten aus Blutkulturen isoliert werden können. Eine Möglichkeit wäre das Zusammenlagern zu multizellulären Aggregaten (176). Eine Studie stellte fest, dass durch normale Abstriche aus dem ORT lediglich ein Viertel der dort vorhandenen Stämme isoliert werden konnte, die man nach Tonsillektomie nachweisen konnte. Viele Bakterien lagen hierbei als Aggregate unterhalb der Mukosa vor. Leider wurde in der Studie nicht beschrieben, ob diese Stämme bekapselt oder unbekapselt waren. Diese multizellulären Kolonien oder Aggregate könnten die Grundlage für Biofilme sein (177,178). Biofilmbildung scheint v.a. bei kapsellosen Meningokokken aufzutreten. Ein

Grund dafür ist sicherlich, dass - wie bereits beschrieben - die Kapsel Aggregationsprozesse behindern kann (179,180). *In vitro*-Studien z.B. mittels Schlauchsystemen haben zudem gezeigt, dass die oft unbekapselten Trägerisolate eher in der Lage sind, Biofilme zu bilden als die fast ausschließlich bekapselten Krankheitsisolate (180,181). Dieser Zustand könnte den unbekapselten Stämmen einen Kolonisationsvorteil verschaffen. Die *in vitro*-Studien mit cnl-Meningokokken haben keine signifikante fH- oder C4bp-Bindung gezeigt und es wurde ebenfalls eine hohe Serumsensitivität der Bakterien festgestellt. Allerdings besitzen alle getesteten Bakterien den genetischen Hintergrund, um sowohl fH als auch C4bp zu binden, und dadurch die theoretische Fähigkeit, auf diese Weise eine gesteigerte Serumresistenz zu erhalten. Auch das Vorhandensein der Varianten 2 und 3 von fHbp scheint - wie bereits erwähnt - kein Nachteil für die fH-Bindung zu sein (121). Deshalb könnte ein mögliches Szenario sein, dass cnl-Meningokokken in Biofilmen auf Grund veränderter Genexpression die Gene für fH und C4bp-Bindung hochregulieren und so durch Kontrolle der Komplementaktivierung - neben dem Schutz durch die Organisation als Biofilm an sich - bessere Serumresistenz erhalten. Die neuen Impfstoffe gegen B-Meningokokken nutzen nicht mehr Polysaccharide, sondern bakterielle Proteine als Antigene. Konjugatimpfstoffe gegen Meningokokken der Serogruppe C induzieren immunogene Antikörper, die die Meningokokken aus der Zirkulation verdrängen können. Diesen Wirkmechanismus kann man sich auch für die neuartigen Impfstoffe vorstellen. Daher war es interessant zu sehen, ob auch cnl-Meningokokken von diesen Impfstoffen - und im Speziellen dem neuen 4-Komponenten-Impfstoff Bexsero[®] - erfasst werden, da eine Verdrängung von cnl-Meningokokken eventuell den Verlust des natürlichen Primings und der späteren Immunität gegenüber Meningokokken bedeuten könnte.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Vakzine-relevante Oberflächenantigene von cnl-Meningokokken typisiert und die Interaktion von cnl-Meningokokken mit dem Komplementsystem, v.a. mit dessen Hauptregulatoren fH und C4bp, analysiert. Mit den gewonnenen Daten sollten Schlussfolgerungen bzgl. der erwarteten Wirkung von 4CMenB, einem 2013 in Deutschland eingeführten und auf Meningokokken der Serogruppe B abzielenden Impfstoff, auf cnl-Meningokokken gezogen werden. Des Weiteren sollte die Interaktion der natürlicherweise unbekapselten cnl-Meningokokken, die als apathogen und möglicherweise günstig für die Entwicklung einer natürlichen Immunität eingeschätzt werden, untersucht werden.

Eine Auswahl von cnl-Meningokokken-Stämmen, die die genetische Variabilität dieser Bakterienpopulation abbilden, wurde mittels PCR (*porA*, *porB*, *fetA*, *opc*, *fHbp*, *nhba* und *nadA*) oder Western Blot-Analyse (*Opc*) typisiert. Hierbei konnte eine deutliche Assoziation einzelner Allele zu klonalen Komplexen gezeigt werden. Allerdings lässt die Analyse bezweifeln, dass cnl-Meningokokken durch Bexsero-induzierte Antikörper erkannt werden, da ihr Antigenmuster stark von den Vakzineantigenen abweicht. Unklarheit herrscht lediglich bzgl. des Antigens *NhbA*.

In der Folge wurde die fH- und C4bp-Bindung bei cnl-Meningokokken mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass im Vergleich zu fH bzw. C4bp bindenden Kontrollstämmen die Bindung der Hauptregulatoren des Komplementsystems an cnl-Meningokokken sehr gering ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass cnl-Meningokokken eine sehr geringe Serumresistenz *in vitro* haben, was ebenfalls für eine schwache Akquirierung der Komplementregulatoren spricht. Dieser Befund unterstreicht die apathogene Natur der Bakterien. Er zeigt aber auch, dass mit herkömmlichen Methoden wie dem Serumbakterizidietest, der bei bekapselten Stämmen angewendet wird, funktionelle Aussagen bzgl. der Wirkung

bakterizider Antikörper, die durch Impfstoffe auf Proteinbasis induziert werden, nur schwer zu tätigen sein werden. Sehr geringe Komplementmengen müssten eingesetzt werden oder alternative Verfahren wie die Opsonophagozytose Anwendung finden.

7. Abkürzungsverzeichnis

p	Basenpaare
C	Komplementfaktor
C4bp	Komplementfaktor 4 Bindungsprotein
CC	klonaler Komplex
cnl	capsule null locus
E.	Escherichia
ECL	enhanced chemoluminescent
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
fH	Komplementfaktor H
FHA	Filamentäres Hämagglutinin
fHbp	factor H binding protein
FHL	Faktor H like Protein
FHR	Faktor H related Protein
GAS	Gruppe A Streptokokken
GBS	Gruppe B Streptokokken
GNA	genome-derived neisserial antigen
HIS	Hitzeinaktiviertes Serum
LOS	Lipooligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Membranangriffskomplex
MATS	meningococcal antigen typing system
MLEE	Multilokus Enzymelektrophorese
MLST	Multilokus Sequenztypisierung
NHBA	neisserial heparin binding antigen
NHS	Normal human serum
NMA	<i>Neisseria meningitidis</i> A
OMV	outer membrane vesicle
ospE	Outer surface protein E
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Por	Porin

SCR

short consensus repeat

ST

Sequenztyp

8. Bibliografie

- 1 Frosch, M. & Maiden, M. C. Handbook of meningococcal disease. (Wiley-VCH, 2006).
- 2 Sabra, A. & Bengler, J. Meningococcal disease in children: a clinical review. *Turk J Pediatr* 53, 477-488 (2011).
- 3 Brandtzaeg, P. & van Deuren, M. Classification and pathogenesis of meningococcal infections. *Methods Mol Biol* 799, 21-35, doi:10.1007/978-1-61779-346-2_2 (2012).
- 4 Vedros, N. A. Evolution of meningococcal disease. pp. 33-37 (CRC Press, 1987).
- 5 Peltola, H. Meningococcal disease: still with us. *Rev Infect Dis* 5, 71-91 (1983).
- 6 Salih, M. A. et al. Characterization of epidemic and nonepidemic *Neisseria meningitidis* serogroup A strains from Sudan and Sweden. *J Clin Microbiol* 28, 1711-1719 (1990).
- 7 Achtman, M. et al. A comparison of the variable antigens expressed by clone IV-1 and subgroup III of *Neisseria meningitidis* serogroup A. *J Infect Dis* 165, 53-68 (1992).
- 8 Wang, J. F. et al. Clonal and antigenic analysis of serogroup A *Neisseria meningitidis* with particular reference to epidemiological features of epidemic meningitis in the People's Republic of China. *Infect Immun* 60, 5267-5282 (1992).
- 9 Maiden, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3140-3145 (1998).
- 10 Claus, H. et al. Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis* 191, 1263-1271, doi:JID33437 [pii] 10.1086/428590 (2005).
- 11 Maiden, M. C. et al. Impact of meningococcal serogroup C conjugate vaccines on carriage and herd immunity. *J Infect Dis* 197, 737-743, doi:10.1086/527401 (2008).

- 12 Jolley, K. A. et al. Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. *J Clin Microbiol* 38, 4492-4498 (2000).
- 13 Claus, H., Maiden, M. C., Maag, R., Frosch, M. & Vogel, U. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology* 148, 1813-1819 (2002).
- 14 Buckee, C. O., Gupta, S., Kriz, P., Maiden, M. C. & Jolley, K. A. Long-term evolution of antigen repertoires among carried meningococci. *Proc Biol Sci* 277, 1635-1641, doi:rsbp.2009.2033 [pii] 10.1098/rsbp.2009.2033 (2010).
- 15 Alber, D. et al. Genetic diversity of *Neisseria lactamica* strains from epidemiologically defined carriers. *J Clin Microbiol* 39, 1710-1715, doi:10.1128/JCM.39.5.1710-1715.2001 (2001).
- 16 Weber, M. V., Claus, H., Maiden, M. C., Frosch, M. & Vogel, U. Genetic mechanisms for loss of encapsulation in polysialyltransferase-gene-positive meningococci isolated from healthy carriers. *Int J Med Microbiol* 296, 475-484, doi:S1438-4221(06)00167-6 [pii] 10.1016/j.ijmm.2006.05.004 (2006).
- 17 Kahler, C. M. et al. The (α 2 \rightarrow 8)-linked polysialic acid capsule and lipooligosaccharide structure both contribute to the ability of serogroup B *Neisseria meningitidis* to resist the bactericidal activity of normal human serum. *Infect Immun* 66, 5939-5947 (1998).
- 18 Vogel, U. & Frosch, M. Mechanisms of neisserial serum resistance. *Mol Microbiol* 32, 1133-1139, doi:mmi1469 [pii] (1999).
- 19 Virji, M. Meningococcal disease: epidemiology and pathogenesis. *Trends Microbiol* 4, 466-469; discussion 469-470, doi:S0966842X97829058 [pii] (1996).
- 20 Frosch, M., Weisgerber, C. & Meyer, T. F. Molecular characterization and expression in *Escherichia coli* of the gene complex encoding the polysaccharide capsule of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1669-1673 (1989).
- 21 Vogel, U. & Claus, H. The evolution of human pathogens: examples and clinical implications. *Int J Med Microbiol* 290, 511-518 (2000).
- 22 Petering, H. et al. Genes associated with meningococcal capsule complex are also found in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 178, 3342-3345 (1996).

- 23 Frosch, M., Edwards, U., Bousset, K., Krausse, B. & Weisgerber, C. Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. *Mol Microbiol* 5, 1251-1263 (1991).
- 24 Frosch, M., Muller, D., Bousset, K. & Muller, A. Conserved outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in capsule expression. *Infect Immun* 60, 798-803 (1992).
- 25 Frosch, M. & Muller, A. Phospholipid substitution of capsular polysaccharides and mechanisms of capsule formation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 8, 483-493 (1993).
- 26 Edwards, U., Muller, A., Hammerschmidt, S., Gerardy-Schahn, R. & Frosch, M. Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the alpha-2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Mol Microbiol* 14, 141-149 (1994).
- 27 Hammerschmidt, S. et al. Contribution of genes from the capsule gene complex (cps) to lipooligosaccharide biosynthesis and serum resistance in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 11, 885-896 (1994).
- 28 Swartley, J. S. et al. Characterization of the gene cassette required for biosynthesis of the (alpha1-->6)-linked N-acetyl-D-mannosamine-1-phosphate capsule of serogroup A *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 180, 1533-1539 (1998).
- 29 Tzeng, Y. L. et al. Cationic antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 187, 5387-5396, doi:187/15/5387-a [pii] 10.1128/JB.187.15.5387-5396.2005 (2005).
- 30 Schoen, C. et al. Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3473-3478, doi:0800151105 [pii] 10.1073/pnas.0800151105 (2008).
- 31 Kroll, J. S., Wilks, K. E., Farrant, J. L. & Langford, P. R. Natural genetic exchange between *Haemophilus* and *Neisseria*: intergeneric transfer of chromosomal genes between major human pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12381-12385 (1998).

- 32 Schoen, C., Tettelin, H., Parkhill, J. & Frosch, M. Genome flexibility in *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 27 Suppl 2, B103-111, doi:10.1016/j.vaccine.2009.04.064 (2009).
- 33 Harrison, O. B. et al. Description and nomenclature of *Neisseria meningitidis* capsule locus. *Emerg Infect Dis* 19, 566-573, doi:10.3201/eid1904.111799 (2013).
- 34 Elias, J. et al. Spatiotemporal analysis of invasive meningococcal disease, Germany. *Emerg Infect Dis* 12, 1689-1695 (2006).
- 35 Findlow, H. et al. Three cases of invasive meningococcal disease caused by a capsule null locus strain circulating among healthy carriers in Burkina Faso. *J Infect Dis* 195, 1071-1077, doi:JID37269 [pii] 10.1086/512084 (2007).
- 36 Hoang, L. M. et al. Rapid and fatal meningococcal disease due to a strain of *Neisseria meningitidis* containing the capsule null locus. *Clin Infect Dis* 40, e38-42, doi:CID35047 [pii] 10.1086/427875 (2005).
- 37 Vogel, U. et al. Bacteremia in an immunocompromised patient caused by a commensal *Neisseria meningitidis* strain harboring the capsule null locus (cni). *J Clin Microbiol* 42, 2898-2901, doi:10.1128/JCM.42.7.2898-2901.2004 42/7/2898 [pii] (2004).
- 38 Selander, R. K. et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 51, 873-884 (1986).
- 39 Caugant, D. A. et al. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J Bacteriol* 169, 2781-2792 (1987).
- 40 Caugant, D. A. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS* 106, 505-525 (1998).
- 41 Urwin, R. et al. Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococci: implications for vaccine design. *Infect Immun* 72, 5955-5962, doi:10.1128/IAI.72.10.5955-5962.2004 (2004).
- 42 Brehony, C., Jolley, K. A. & Maiden, M. C. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol Rev* 31, 15-26, doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00056.x (2007).

- 43 Holmes, E. C., Urwin, R. & Maiden, M. C. The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol* 16, 741-749 (1999).
- 44 Woods, J. P., Kersulyte, D., Tolan, R. W., Jr., Berg, C. M. & Berg, D. E. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction analysis to type disease and carrier strains of *Neisseria meningitidis* isolated during a university outbreak. *J Infect Dis* 169, 1384-1389 (1994).
- 45 Goulding, J. N. et al. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism genotyping of *Neisseria meningitidis* identifies clones associated with invasive disease. *J Clin Microbiol* 38, 4580-4585 (2000).
- 46 Schouls, L. M., van der Ende, A., Damen, M. & van de Pol, I. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Neisseria meningitidis* yields groupings similar to those obtained by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 44, 1509-1518, doi:10.1128/JCM.44.4.1509-1518.2006 (2006).
- 47 Jokiranta, S. T. Target discrimination during initiation of complement activation academic dissertation for the PhD degree thesis, University of Helsinki, (1999).
- 48 Walport, M. J. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344, 1058-1066, doi:10.1056/NEJM200104053441406 (2001).
- 49 Lambris, J. D., Ricklin, D. & Geisbrecht, B. V. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol* 6, 132-142, doi:nrmicro1824 [pii] 10.1038/nrmicro1824 (2008).
- 50 Dempsey, P. W., Allison, M. E., Akkaraju, S., Goodnow, C. C. & Fearon, D. T. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 271, 348-350 (1996).
- 51 Hughes-Jones, N. C. & Gardner, B. Reaction between the isolated globular sub-units of the complement component C1q and IgG-complexes. *Mol Immunol* 16, 697-701 (1979).
- 52 Burton, D. R. Immunoglobulin G: functional sites. *Mol Immunol* 22, 161-206 (1985).

- 53 Muller-Eberhard, H. J., Polley, M. J. & Calcott, M. A. Formation and functional significance of a molecular complex derived from the second and the fourth component of human complement. *J Exp Med* 125, 359-380 (1967).
- 54 Matsumoto, M. et al. Probing the C4-binding site on C1s with monoclonal antibodies. Evidence for a C4/C4b-binding site on the gamma-domain. *J Immunol* 142, 2743-2750 (1989).
- 55 Cooper, N. R. Enzymatic activity of the second component of complement. *Biochemistry* 14, 4245-4251 (1975).
- 56 Sheriff, S., Chang, C. Y. & Ezekowitz, R. A. Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. *Nat Struct Biol* 1, 789-794 (1994).
- 57 Pangburn, M. K., Schreiber, R. D. & Muller-Eberhard, H. J. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med* 154, 856-867 (1981).
- 58 Pangburn, M. K. & Muller-Eberhard, H. J. Relation of putative thioester bond in C3 to activation of the alternative pathway and the binding of C3b to biological targets of complement. *J Exp Med* 152, 1102-1114 (1980).
- 59 Fishelson, Z., Pangburn, M. K. & Muller-Eberhard, H. J. Characterization of the initial C3 convertase of the alternative pathway of human complement. *J Immunol* 132, 1430-1434 (1984).
- 60 Fishelson, Z. & Muller-Eberhard, H. J. The C3/C5 convertase of the alternative pathway of complement: stabilization and restriction of control by lanthanide ions. *Mol Immunol* 20, 309-315 (1983).
- 61 Muller-Eberhard, H. J. & Gotze, O. C3 proactivator convertase and its mode of action. *J Exp Med* 135, 1003-1008 (1972).
- 62 Pangburn, M. K. & Muller-Eberhard, H. J. Complement C3 convertase: cell surface restriction of beta1H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2416-2420 (1978).
- 63 Schreiber, R. D. & Muller-Eberhard, H. J. Assembly of the cytolytic alternative pathway of complement from 11 isolated plasma proteins. *J Exp Med* 148, 1722-1727 (1978).

- 64 Vogt, W., Schmidt, G., Von Buttlar, B. & Dieminger, L. A new function of the activated third component of complement: binding to C5, an essential step for C5 activation. *Immunology* 34, 29-40 (1978).
- 65 Kinoshita, T. et al. C5 convertase of the alternative complement pathway: covalent linkage between two C3b molecules within the trimolecular complex enzyme. *J Immunol* 141, 3895-3901 (1988).
- 66 Rawal, N. & Pangburn, M. K. C5 convertase of the alternative pathway of complement. Kinetic analysis of the free and surface-bound forms of the enzyme. *J Biol Chem* 273, 16828-16835 (1998).
- 67 Podack, E. R. & Tschopp, J. Circular polymerization of the ninth component of complement. Ring closure of the tubular complex confers resistance to detergent dissociation and to proteolytic degradation. *J Biol Chem* 257, 15204-15212 (1982).
- 68 Tschopp, J., Podack, E. R. & Muller-Eberhard, H. J. The membrane attack complex of complement: C5b-8 complex as accelerator of C9 polymerization. *J Immunol* 134, 495-499 (1985).
- 69 Hugli, T. E. & Muller-Eberhard, H. J. Anaphylatoxins: C3a and C5a. *Adv Immunol* 26, 1-53 (1978).
- 70 Gorski, J. P., Hugli, T. E. & Muller-Eberhard, H. J. C4a: the third anaphylatoxin of the human complement system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 5299-5302 (1979).
- 71 Hugli, T. E. The structural basis for anaphylatoxin and chemotactic functions of C3a, C4a, and C5a. *Crit Rev Immunol* 1, 321-366 (1981).
- 72 Walport, M. J. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 344, 1140-1144, doi:10.1056/NEJM200104123441506 (2001).
- 73 He, J. Q., Wiesmann, C. & van Lookeren Campagne, M. A role of macrophage complement receptor CR1g in immune clearance and inflammation. *Mol Immunol* 45, 4041-4047, doi:S0161-5890(08)00285-X [pii] 10.1016/j.molimm.2008.07.011 (2008).
- 74 Ratnoff, O. D., Pensky, J., Ogston, D. & Naff, G. B. The inhibition of plasmin, plasma kallikrein, plasma permeability factor, and the C'1r

subcomponent of the first component of complement by serum C'1 esterase inhibitor. *J Exp Med* 129, 315-331 (1969).

75 Podack, E. R. & Muller-Eberhard, H. J. Binding of desoxycholate, phosphatidylcholine vesicles, lipoprotein and of the S-protein to complexes of terminal complement components. *J Immunol* 121, 1025-1030 (1978).

76 Podack, E. R. & Muller-Eberhard, H. J. Isolation of human S-protein, an inhibitor of the membrane attack complex of complement. *J Biol Chem* 254, 9808-9814 (1979).

77 Ziccardi, R. J. & Cooper, N. R. Active disassembly of the first complement component, C-1, by C-1 inactivator. *J Immunol* 123, 788-792 (1979).

78 Grosskinsky, S. et al. Human complement regulators C4b-binding protein and C1 esterase inhibitor interact with a novel outer surface protein of *Borrelia recurrentis*. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e698, doi:10.1371/journal.pntd.0000698 (2010).

79 Singh, B., Su, Y. C. & Riesbeck, K. Vitronectin in bacterial pathogenesis: a host protein used in complement escape and cellular invasion. *Mol Microbiol* 78, 545-560, doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07373.x (2010).

80 Harrison, R. A. & Lachmann, P. J. The physiological breakdown of the third component of human complement. *Mol Immunol* 17, 9-20 (1980).

81 Medof, M. E., Iida, K., Mold, C. & Nussenzweig, V. Unique role of the complement receptor CR1 in the degradation of C3b associated with immune complexes. *J Exp Med* 156, 1739-1754 (1982).

82 Seya, T. & Atkinson, J. P. Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem J* 264, 581-588 (1989).

83 Nilsson, U. R. & Mueller-Eberhard, H. J. Isolation of Beta 1f-Globulin from Human Serum and Its Characterization as the Fifth Component of Complement. *J Exp Med* 122, 277-298 (1965).

84 Whaley, K. & Ruddy, S. Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J Exp Med* 144, 1147-1163 (1976).

85 Pangburn, M. K., Schreiber, R. D. & Muller-Eberhard, H. J. Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of

an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J Exp Med* 146, 257-270 (1977).

86 Farries, T. C., Seya, T., Harrison, R. A. & Atkinson, J. P. Competition for binding sites on C3b by CR1, CR2, MCP, factor B and Factor H. *Complement Inflamm* 7, 30-41 (1990).

87 Vik, D. P. & Wong, W. W. Structure of the gene for the F allele of complement receptor type 1 and sequence of the coding region unique to the S allele. *J Immunol* 151, 6214-6224 (1993).

88 Sim, R. B., Kolble, K., McAleer, M. A., Dominguez, O. & Dee, V. M. Genetics and deficiencies of the soluble regulatory proteins of the complement system. *Int Rev Immunol* 10, 65-86 (1993).

89 Hellwage, J., Kuhn, S. & Zipfel, P. F. The human complement regulatory factor-H-like protein 1, which represents a truncated form of factor H, displays cell-attachment activity. *Biochem J* 326 (Pt 2), 321-327 (1997).

90 Johnsson, E. et al. Role of the hypervariable region in streptococcal M proteins: binding of a human complement inhibitor. *J Immunol* 161, 4894-4901 (1998).

91 Kotarsky, H. et al. Identification of a domain in human factor H and factor H-like protein-1 required for the interaction with streptococcal M proteins. *J Immunol* 160, 3349-3354 (1998).

92 Zipfel, P. F., Jokiranta, T. S., Hellwage, J., Koistinen, V. & Meri, S. The factor H protein family. *Immunopharmacology* 42, 53-60 (1999).

93 Hellwage, J. et al. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett* 462, 345-352, doi:S0014-5793(99)01554-9 [pii] (1999).

94 Jarva, H., Ram, S., Vogel, U., Blom, A. M. & Meri, S. Binding of the complement inhibitor C4bp to serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* 174, 6299-6307, doi:174/10/6299 [pii] (2005).

95 Gigli, I., Fujita, T. & Nussenzweig, V. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 6596-6600 (1979).

- 96 Dahlback, B., Smith, C. A. & Muller-Eberhard, H. J. Visualization of human C4b-binding protein and its complexes with vitamin K-dependent protein S and complement protein C4b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3461-3465 (1983).
- 97 Rautemaa, R. & Meri, S. Complement-resistance mechanisms of bacteria. *Microbes Infect* 1, 785-794, doi:S1286-4579(99)80081-1 [pii] (1999).
- 98 Meri, S., Jordens, M. & Jarva, H. Microbial complement inhibitors as vaccines. *Vaccine* 26 Suppl 8, I113-117 (2008).
- 99 Apicella, M. A. et al. Modification by sialic acid of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide epitope expression in human urethral exudates: an immunoelectron microscopic analysis. *J Infect Dis* 162, 506-512 (1990).
- 100 Horstmann, R. D., Sievertsen, H. J., Knobloch, J. & Fischetti, V. A. Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 1657-1661 (1988).
- 101 Ram, S. et al. Binding of complement factor H to loop 5 of porin protein 1A: a molecular mechanism of serum resistance of nonsialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* 188, 671-680 (1998).
- 102 Alitalo, A. et al. Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation. *Infect Immun* 69, 3685-3691, doi:10.1128/IAI.69.6.3685-3691.2001 (2001).
- 103 Hellwage, J. et al. The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem* 276, 8427-8435, doi:10.1074/jbc.M007994200 M007994200 [pii] (2001).
- 104 Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V. & Zipfel, P. F. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H. *Eur J Immunol* 31, 1674-1684, doi:10.1002/1521-4141(200106)31:6<1674::AID-IMMU1674>3.0.CO;2-2 [pii] 10.1002/1521-4141(200106)31:6<1674::AID-IMMU1674>3.0.CO;2-2 (2001).

- 105 Diaz, A., Ferreira, A. & Sim, R. B. Complement evasion by *Echinococcus granulosus*: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall. *J Immunol* 158, 3779-3786 (1997).
- 106 Meri, T. et al. The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1. *Infect Immun* 70, 5185-5192 (2002).
- 107 Meri, T. et al. *Onchocerca volvulus* microfilariae avoid complement attack by direct binding of factor H. *J Infect Dis* 185, 1786-1793, doi:JID011061 [pii] 10.1086/340649 (2002).
- 108 Lindahl, G. Cell surface proteins of a group A streptococcus type M4: the IgA receptor and a receptor related to M proteins are coded for by closely linked genes. *Mol Gen Genet* 216, 372-379 (1989).
- 109 Thern, A., Stenberg, L., Dahlback, B. & Lindahl, G. Ig-binding surface proteins of *Streptococcus pyogenes* also bind human C4b-binding protein (C4BP), a regulatory component of the complement system. *J Immunol* 154, 375-386 (1995).
- 110 Ram, S. et al. C4bp binding to porin mediates stable serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *Int Immunopharmacol* 1, 423-432, doi:S1567-5769(00)00037-0 [pii] (2001).
- 111 Ram, S. et al. Binding of C4b-binding protein to porin: a molecular mechanism of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* 193, 281-295 (2001).
- 112 Berggard, K., Johnsson, E., Mooi, F. R. & Lindahl, G. *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous hemagglutinin. *Infect Immun* 65, 3638-3643 (1997).
- 113 Kirjavainen, V. et al. *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog* 4, e1000140, doi:10.1371/journal.ppat.1000140 (2008).
- 114 Figueroa, J., Andreoni, J. & Densen, P. Complement deficiency states and meningococcal disease. *Immunol Res* 12, 295-311 (1993).
- 115 Lehner, P. J. et al. Meningococcal septicaemia in a C6-deficient patient and effects of plasma transfusion on lipopolysaccharide release. *Lancet* 340, 1379-1381 (1992).

- 116 Rosa, D. D., Pasqualotto, A. C., de Quadros, M. & Prezzi, S. H. Deficiency of the eighth component of complement associated with recurrent meningococcal meningitis--case report and literature review. *Braz J Infect Dis* 8, 328-330, doi:S1413-86702004000400010 [pii] /S1413-86702004000400010 (2004).
- 117 Brandtzaeg, P. et al. Meningococcal endotoxin in lethal septic shock plasma studied by gas chromatography, mass-spectrometry, ultracentrifugation, and electron microscopy. *J Clin Invest* 89, 816-823, doi:10.1172/JCI115660 (1992).
- 118 Bax, W. A. et al. Association of familial deficiency of mannose-binding lectin and meningococcal disease. *Lancet* 354, 1094-1095, doi:S0140673699025635 [pii] (1999).
- 119 Hibberd, M. L., Sumiya, M., Summerfield, J. A., Booy, R. & Levin, M. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. Meningococcal Research Group. *Lancet* 353, 1049-1053, doi:S0140673698083500 [pii] (1999).
- 120 Estabrook, M. M., Jack, D. L., Klein, N. J. & Jarvis, G. A. Mannose-binding lectin binds to two major outer membrane proteins, opacity protein and porin, of *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* 172, 3784-3792 (2004).
- 121 Madico, G. et al. The meningococcal vaccine candidate GNA1870 binds the complement regulatory protein factor H and enhances serum resistance. *J Immunol* 177, 501-510, doi:177/1/501 [pii] (2006).
- 122 Massignani, V. et al. Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein GNA1870. *J Exp Med* 197, 789-799, doi:10.1084/jem.20021911 jem.20021911 [pii] (2003).
- 123 Fletcher, L. D. et al. Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein. *Infect Immun* 72, 2088-2100 (2004).
- 124 Lewis, L. A. et al. The meningococcal vaccine candidate neisserial surface protein A (NspA) binds to factor H and enhances meningococcal resistance to complement. *PLoS Pathog* 6, e1001027, doi:10.1371/journal.ppat.1001027 (2010).

- 125 Balabanova, Y. et al. Communicable diseases prioritized for surveillance and epidemiological research: results of a standardized prioritization procedure in Germany, 2011. *PLoS One* 6, e25691, doi:10.1371/journal.pone.0025691 PONE-D-11-14518 [pii] (2011).
- 126 Olyhoek, T., Crowe, B. A. & Achtman, M. Clonal population structure of *Neisseria meningitidis* serogroup A isolated from epidemics and pandemics between 1915 and 1983. *Rev Infect Dis* 9, 665-692 (1987).
- 127 Lee, C. H. et al. Preparation and characterization of an immunogenic meningococcal group A conjugate vaccine for use in Africa. *Vaccine* 27, 726-732, doi:S0264-410X(08)01547-8 [pii] 10.1016/j.vaccine.2008.11.065 (2009).
- 128 Centers for Disease, C. & Prevention. Serogroup A meningococcal conjugate vaccine coverage after the first national mass immunization campaign-Burkina Faso, 2011. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 61, 1022-1024 (2012).
- 129 Caini, S. et al. From Agadez to Zinder: estimating coverage of the MenAfriVac conjugate vaccine against meningococcal serogroup A in Niger, September 2010 - January 2012. *Vaccine* 31, 1597-1603, doi:10.1016/j.vaccine.2013.01.015 (2013).
- 130 Daugla, D. M. et al. Effect of a serogroup A meningococcal conjugate vaccine (PsA-TT) on serogroup A meningococcal meningitis and carriage in Chad: a community study [corrected]. *Lancet* 383, 40-47, doi:10.1016/S0140-6736(13)61612-8 (2014).
- 131 Gotschlich, E. C., Liu, T. Y. & Artenstein, M. S. Human immunity to the meningococcus. 3. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. *J Exp Med* 129, 1349-1365 (1969).
- 132 Wyle, F. A. et al. Immunologic response of man to group B meningococcal polysaccharide vaccines. *J Infect Dis* 126, 514-521 (1972).
- 133 Jennings, H. J. & Lugowski, C. Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. *J Immunol* 127, 1011-1018 (1981).

- 134 Mandrell, R. E. & Zollinger, W. D. Measurement of antibodies to meningococcal group B polysaccharide: low avidity binding and equilibrium binding constants. *J Immunol* 129, 2172-2178 (1982).
- 135 Finne, J., Leinonen, M. & Makela, P. H. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* 2, 355-357, doi:S0140-6736(83)90340-9 [pii] (1983).
- 136 Finne, J., Bitter-Suermann, D., Goridis, C. & Finne, U. An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J Immunol* 138, 4402-4407 (1987).
- 137 Bjune, G. et al. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet* 338, 1093-1096 (1991).
- 138 Fredriksen, J. H. et al. Production, characterization and control of MenB-vaccine "Folkehelse": an outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease. *NIPH Ann* 14, 67-79; discussion 79-80 (1991).
- 139 Sierra, G. V. et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann* 14, 195-207; discussion 208-110 (1991).
- 140 de Moraes, J. C. et al. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet* 340, 1074-1078 (1992).
- 141 Boslego, J. et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of a meningococcal group B (15:P1.3) outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. Chilean National Committee for Meningococcal Disease. *Vaccine* 13, 821-829, doi:0264410X9400037N [pii] (1995).
- 142 Jackson, C. et al. Phase II meningococcal B vesicle vaccine trial in New Zealand infants. *Arch Dis Child* 94, 745-751, doi:adc.2007.132571 [pii] 10.1136/adc.2007.132571 (2009).
- 143 Oster, P. et al. MeNZB: a safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand *Neisseria meningitidis* serogroup B disease epidemic strain. *Vaccine* 23, 2191-2196, doi:S0264-410X(05)00069-1 [pii] 10.1016/j.vaccine.2005.01.063 (2005).

- 144 Thornton, V. et al. Safety and immunogenicity of New Zealand strain meningococcal serogroup B OMV vaccine in healthy adults: beginning of epidemic control. *Vaccine* 24, 1395-1400, doi:S0264-410X(05)01008-X [pii] 10.1016/j.vaccine.2005.09.043 (2006).
- 145 Oster, P. et al. Immunogenicity and safety of a strain-specific MenB OMV vaccine delivered to under 5-year olds in New Zealand. *Vaccine* 25, 3075-3079, doi:S0264-410X(07)00044-8 [pii] 10.1016/j.vaccine.2007.01.023 (2007).
- 146 Wong, S. et al. New zealand epidemic strain meningococcal B outer membrane vesicle vaccine in children aged 16-24 months. *Pediatr Infect Dis J* 26, 345-350, doi:10.1097/01.inf.0000258697.05341.2c 00006454-200704000-00015 [pii] (2007).
- 147 Galloway, Y., Stehr-Green, P., McNicholas, A. & O'Hallahan, J. Use of an observational cohort study to estimate the effectiveness of the New Zealand group B meningococcal vaccine in children aged under 5 years. *Int J Epidemiol* 38, 413-418, doi:dyn228 [pii] 10.1093/ije/dyn228 (2009).
- 148 Arnold, R., Galloway, Y., McNicholas, A. & O'Hallahan, J. Effectiveness of a vaccination programme for an epidemic of meningococcal B in New Zealand. *Vaccine* 29, 7100-7106, doi:10.1016/j.vaccine.2011.06.120 (2011).
- 149 Tettelin, H. et al. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* 287, 1809-1815, doi:8338 [pii] (2000).
- 150 Rappuoli, R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine* 19, 2688-2691, doi:S0264410X00005545 [pii] (2001).
- 151 Giuliani, M. M. et al. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10834-10839, doi:0603940103 [pii] 10.1073/pnas.0603940103 (2006).
- 152 Comanducci, M. et al. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* 195, 1445-1454 (2002).
- 153 Serruto, D. et al. *Neisseria meningitidis* GNA2132, a heparin-binding protein that induces protective immunity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3770-3775, doi:0915162107 [pii] 10.1073/pnas.0915162107 (2010).

- 154 Panatto, D., Amicizia, D., Lai, P. L. & Gasparini, R. *Neisseria meningitidis* B vaccines. *Expert Rev Vaccines* 10, 1337-1351, doi:10.1586/erv.11.103 (2011).
- 155 Claus, H. et al. Capsule null locus meningococci: Typing of antigens used in an investigational multicomponent meningococcus serogroup B vaccine. *Vaccine*, doi:S0264-410X(11)01835-4 [pii] 10.1016/j.vaccine.2011.11.050 (2011).
- 156 Findlow, J. et al. Multicenter, open-label, randomized phase II controlled trial of an investigational recombinant Meningococcal serogroup B vaccine with and without outer membrane vesicles, administered in infancy. *Clin Infect Dis* 51, 1127-1137, doi:10.1086/656741 (2010).
- 157 Toneatto, D. et al. The first use of an investigational multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) in humans. *Hum Vaccin* 7, 646-653, doi:15482 [pii] (2011).
- 158 Toneatto, D. et al. Early clinical experience with a candidate meningococcal B recombinant vaccine (rMenB) in healthy adults. *Hum Vaccin* 7, 781-791, doi:15997 [pii] 10.4161/hv.7.7.15997 (2011).
- 159 Vogel, U. et al. Predicted strain coverage of a meningococcal multicomponent vaccine (4CMenB) in Europe: a qualitative and quantitative assessment. *Lancet Infect Dis* 13, 416-425, doi:10.1016/S1473-3099(13)70006-9 (2013).
- 160 Wise, J. Meningitis B vaccine to be introduced in UK after U turn on its cost effectiveness. *BMJ* 348, g2327, doi:10.1136/bmj.g2327 (2014).
- 161 Sarfatti, A., Martinon-Torres, F. & Nadel, S. Vaccine evaluation: lessons from a meningococcal B vaccine. *Arch Dis Child* 100, 514-516, doi:10.1136/archdischild-2014-306030 (2015).
- 162 Ostergaard, L. et al. A phase 3, randomized, active-controlled study to assess the safety and tolerability of meningococcal serogroup B vaccine bivalent rLP2086 in healthy adolescents and young adults. *Vaccine* 34, 1465-1471, doi:10.1016/j.vaccine.2016.01.044 (2016).
- 163 Folaranmi, T. et al. Use of Serogroup B Meningococcal Vaccines in Persons Aged ≥ 10 Years at Increased Risk for Serogroup B Meningococcal

- Disease: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2015. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 64, 608-612 (2015).
- 164 Sarkari, J., Pandit, N., Moxon, E. R. & Achtman, M. Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine. *Mol Microbiol* 13, 207-217 (1994).
- 165 Griffiths, N. J. et al. Meningococcal surface fibril (Msf) binds to activated vitronectin and inhibits the terminal complement pathway to increase serum resistance. *Mol Microbiol* 82, 1129-1149, doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07876.x (2011).
- 166 Hubert, K. et al. Opc expression, LPS immunotype switch and pilin conversion contribute to serum resistance of unencapsulated meningococci. *PLoS One* 7, e45132, doi:10.1371/journal.pone.0045132 (2012).
- 167 Goldschneider, I., Gotschlich, E. C. & Artenstein, M. S. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* 129, 1307-1326 (1969).
- 168 Trotter, C. L., Gay, N. J. & Edmunds, W. J. The natural history of meningococcal carriage and disease. *Epidemiol Infect* 134, 556-566, doi:10.1017/S0950268805005339 (2006).
- 169 Oliver, K. J. et al. *Neisseria lactamica* protects against experimental meningococcal infection. *Infect Immun* 70, 3621-3626 (2002).
- 170 Guzzetta, G., Manfredi, P., Gasparini, R., Panatto, D. & Edmunds, W. J. On the relationship between meningococcal transmission dynamics and disease: remarks on humoral immunity. *Vaccine* 27, 3429-3434, doi:10.1016/j.vaccine.2009.01.092 (2009).
- 171 Comanducci, M. et al. NadA diversity and carriage in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 72, 4217-4223, doi:10.1128/IAI.72.7.4217-4223.2004 (2004).
- 172 Lucidarme, J. et al. Characterization of fHbp, nhba (gna2132), nadA, porA, sequence type (ST), and genomic presence of IS1301 in group B

meningococcal ST269 clonal complex isolates from England and Wales. *J Clin Microbiol* 47, 3577-3585, doi:10.1128/JCM.00936-09 (2009).

173 Donnelly, J. et al. Qualitative and quantitative assessment of meningococcal antigens to evaluate the potential strain coverage of protein-based vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19490-19495, doi:10.1073/pnas.1013758107 (2010).

174 Stephens, D. S., Spellman, P. A. & Swartley, J. S. Effect of the (α 2-->8)-linked polysialic acid capsule on adherence of *Neisseria meningitidis* to human mucosal cells. *J Infect Dis* 167, 475-479 (1993).

175 Hammerschmidt, S. et al. Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol* 20, 1211-1220 (1996).

176 Sim, R. J., Harrison, M. M., Moxon, E. R. & Tang, C. M. Underestimation of meningococci in tonsillar tissue by nasopharyngeal swabbing. *Lancet* 356, 1653-1654, doi:S0140673600031627 [pii] (2000).

177 Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49, 711-745, doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.003431 (1995).

178 Lappann, M. & Vogel, U. Biofilm formation by the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Med Microbiol Immunol* 199, 173-183, doi:10.1007/s00430-010-0149-y (2010).

179 Deghmane, A. E., Giorgini, D., Larribe, M., Alonso, J. M. & Taha, M. K. Down-regulation of pili and capsule of *Neisseria meningitidis* upon contact with epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein. *Mol Microbiol* 43, 1555-1564, doi:2838 [pii] (2002).

180 Lappann, M., Haagensen, J. A., Claus, H., Vogel, U. & Molin, S. Meningococcal biofilm formation: structure, development and phenotypes in a standardized continuous flow system. *Mol Microbiol* 62, 1292-1309, doi:MMI5448 [pii] 10.1111/j.1365-2958.2006.05448.x (2006).

181 Yi, K., Rasmussen, A. W., Gudlavalleti, S. K., Stephens, D. S. & Stojiljkovic, I. Biofilm formation by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 72, 6132-6138, doi:10.1128/IAI.72.10.6132-6138.2004 72/10/6132 [pii] (2004).

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Capsule null locus meningococci: typing of antigens used in an investigational multicomponent meningococcus serogroup B vaccine.

Claus H, Jördens MS, Kriz P, Musilek M, Jarva H, Pawlik MC, Meri S, Vogel U. Vaccine. 2012 Jan 5;30(2):155-60

Microbial complement inhibitors as vaccines.

Meri S, Jördens M, Jarva H.

Vaccine. 2008 Dec 30;26 Suppl 8:1113-7.

Danksagung:

Zunächst gilt mein Dank Herrn Professor Dr. med M. Frosch, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Institut zu promovieren. Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. med Ulrich Vogel für die gute und geduldige Betreuung der Arbeit. Für die großartige Hilfe im Labor selbst möchte ich mich bei Frau PD. Dr. rer. nat. Heike Claus bedanken. Weiterhin gilt mein Dank auch dem Rest der Arbeitsgruppe für Rat und Tat während der Arbeit und gute Gespräche danach. Zusätzlich geht mein Dank an Herrn Professor Seppo Meri und Frau Dr. Hanna Jarva, die mir einen Auslandsaufenthalt in ihren Laboratorien am Haartman Institut in Helsinki ermöglichten. Zum Schluss möchte ich mich noch besonders bei meiner Familie, insbesondere meiner Mutter Marita und meiner Freundin Victoria bedanken, die zu jeder Zeit für mich da waren und mich immer wieder motivieren konnten.