

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

**Die Bedeutung der LPS-Sialylierung
für die Interaktion von *Neisseria meningitidis*
mit humanen Wirtszellen**

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

vorgelegt von
Anne-Kathrin Stade
aus Erfurt

Würzburg, November 2006

Referent: Prof. Dr. med. Matthias Frosch
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. Annette Kolb-Mäurer
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29. März 2007

Die Promovendin ist Ärztin

meiner Familie und Matthias gewidmet

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG	1
I.1 NEISSERIA MENINGITIDIS – CHARAKTERISIERUNG DES BAKTERIUMS	1
I.1.1 ALLGEMEINES	1
I.1.2 AUFBAU	1
I.1.3 PATHOGENESE	4
I.1.4 KLINIK	6
I.1.5 EPIDEMIOLOGIE	7
I.2 ERWARTUNGEN AN EINE LST-DELETIONSMUTANTE	8
I.3 BEDEUTUNG VON DENDRITISCHEN ZELLEN FÜR DIE IMMUNANTWORT	11
I.4 BESCHREIBUNG DES PROJEKTS	13
II. MATERIAL UND METHODEN	14
II.1 MATERIAL	14
II.1.1 GERÄTE	14
II.1.2 VERBRAUCHSMATERIAL	15
II.1.3 CHEMIKALIEN, REAKTIONSKITS UND ENZYME	15
II.1.4 PUFFER UND LÖSUNGEN	17
II.1.5 ANTIKÖRPER	18
II.1.6 OLIGONUKLEOTIDE	18
II.1.7 PLASMIDE	19
II.1.8 BAKTERIENKULTUREN	19
II.1.8.1 <i>E. coli</i> -Stämme	19
II.1.8.2 Neisserien-Stämme	19
II.1.8.3 Nährmedien	20
II.1.8.4 Kulturbedingungen	21
II.1.8.5 Antibiotikazusätze	21
II.1.9 ZELLKULTUR	21
II.1.9.1 Hep-2 Larynxkarzinomzellen	21
II.1.9.1.1 Auftauen von Zellen	21
II.1.9.1.2 Aussäen von Zellen für den Infektionsversuch	22
II.1.9.2 Hbmec-Endothelzellen	22
II.1.9.2.1 Auftauen von Zellen	22

II.1.9.2.2	Aussäen von Zellen für den Infektionsversuch	23
II.1.9.3	Dendritische Zellen (DC)	23
II.2	METHODEN	24
II.2.1	DNA-PRÄPARATIONEN	24
II.2.1.1	Präparation chromosomaler und Plasmid-DNA, Isolierung von DNA aus Agarosegelen und aus PCR-Ansätzen	24
II.2.1.2	Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung	24
II.2.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
II.2.1.3.1	Reaktionsablauf im Thermocycler	25
II.2.1.3.2	Gewinnung von Template-DNA für die PCR aus Bakterienkolonien	25
II.2.1.3.3	PCR mit der AmpliTaq [®] -DNA-Polymerase	26
II.2.1.4	Gelelektrophoresen	27
II.2.1.4.1	Agarosegele	27
II.2.1.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gele	27
II.2.1.4.2.1	Herstellen von SDS-Polyacrylamidgelen und SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
II.2.1.4.2.2	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blue	28
II.2.1.4.3	LPS-Gel	29
II.2.1.4.3.1	LPS-Schnellpräparation	29
II.2.1.4.3.2	Tricin-Gelelektrophorese	29
II.2.1.4.3.2.1	Gele	29
II.2.1.4.3.2.2	Puffer	30
II.2.1.4.3.3	Silberfärbung	31
II.2.1.5	Klonierungsmethoden	31
II.2.1.5.1	Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen	31
II.2.1.5.2	Herstellung von doppelsträngigen Linkern aus Oligonukleotiden	32
II.2.1.5.3	DNA-Ligation mit Fast-Link Ligase	32
II.2.1.5.4	Transformation von Bakterien	32
II.2.1.5.4.1	Transformation von Meningokokken	32
II.2.1.5.4.2	Transformation von <i>E. coli</i>	33
II.2.1.5.4.2.1	Herstellung kompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	33
II.2.1.5.4.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	33
II.2.1.5.4.2.3	Blue/White-Screening von <i>E. coli</i> -Klonen	34
II.2.1.5.5	Automatisierte DNA-Sequenzierung	34
II.2.1.6	Anlegen von Meningokokken-Gefrierkulturen	35
II.2.1.7	Southern Blot – alkalischer Transfer	35

II.2.1.7.1	Gelelektrophorese	36
II.2.1.7.2	Alkalischer Transfer	36
II.2.1.7.3	Markierung spezifischer DNA-Sonden mit Digoxigenin	36
II.2.1.7.4	Hybridisierung mit einer DIG-DNA-Sonde und DIG-Nachweis mit CSPD37	
II.2.1.8	Western Blot (Immunoblot)	39
II.2.1.8.1	Präparation der Gesamtzellproteine von <i>Neisseria meningitidis</i>	39
II.2.1.8.1.1	SDS-Page	39
II.2.1.8.1.2	Immunoblot	39
II.2.1.8.1.2.1	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Semi-Dry-Blotting)	39
II.2.1.8.1.2.2	Entwicklung des Immunoblots mit Antikörpern	40
II.2.2	ASSAYS	41
II.2.2.1	Bakterien-Wachstumskurve	41
II.2.2.2	Bakterizidie-Assay	41
II.2.2.3	Versuche mit Hep-2 Epithelzellen	42
II.2.2.3.1	Infektion von Hep2-Zellen mit <i>N. meningitidis</i> -Stämmen	42
II.2.2.3.2	Adhäsionsassay	42
II.2.2.3.3	Invasionsassay	42
II.2.2.4	Versuche mit Hbmec-Zellen	43
II.2.2.5	Versuche mit Dendritischen Zellen (DC-s)	43
II.2.2.5.1	Infektion von DC-s mit <i>N. meningitidis</i> -Stämmen	43
II.2.2.5.2	Assay zur Detektion antibakteriell wirksamer Substanzen	43
II.2.2.5.3	Zytokin-ELISA	44
II.2.2.5.4	Flow-Zytometrie	45

III. ERGEBNISSE **46**

III.1	HERSTELLUNG DER LST-DELETIONSMUTANTE UND NACHWEIS DER DELETION	46
III.1.1	EINZELSCREEN-PCR MIT INSERT- UND GENKONTROLLE	47
III.1.2	SOUTHERN BLOT	49
III.1.3	TRICIN-GEL	50
III.1.4	CHARAKTERISIERUNG DER MUTANTE	51
III.1.4.1	Überprüfen der Oberflächenproteine mittels Westernblot	51
III.1.4.2	Wachstumskurve	52
III.1.4.3	Bakterizidie-Assay	53
III.1.4.4	Interaktion mit Epithelzellen	55
III.1.4.5	Interaktion mit Endothelzellen	58

III.1.4.6 Interaktion mit dendritischen Zellen	60
III.1.5 WACHSTUM VON MENINGOKOKKEN VERSCHIEDENER SEROGRUPPEN NACH KONTAKT MIT DENDRITISCHEN ZELLEN	61
III.1.6 ÜBERPRÜFEN VON DC-ÜBERSTÄNDEN AUF ANTIBAKTERIELL WIRKSAME SUBSTANZEN	62
III.1.7 ADHÄRENZ- UND INVASIONSVERHALTEN VERSCHIEDENER <i>N. MENINGITIDIS</i> - STÄMME NACH KONTAKT MIT DC-S	64
III.1.8 REIFUNG VON DENDRITISCHEN ZELLEN NACH KONTAKT MIT <i>N. MENINGITIDIS</i>	67
III.1.9 ÜBERPRÜFEN VON DC-ÜBERSTÄNDEN AUF ZYTOKINE	69
IV. DISKUSSION	74
V. ZUSAMMENFASSUNG	82
VI. ABKÜRZUNGEN	84
VII. LITERATUR	87

I. EINLEITUNG

I.1 Neisseria meningitidis – Charakterisierung des Bakteriums

I.1.1 Allgemeines

Im Jahre 1879 beobachtete Albert Neisser intraleukozytäre Diplokokken in Urethralabstrichen von Patienten mit Gonorrhoe. Damit hatte er den ersten Vertreter des später nach ihm benannten Genus der Neisserien, nämlich *N. gonorrhoeae*, entdeckt (Sotto, M.N. et al., 1976; Argenbright, L.W. und Barton, R.W., 1992). Zu den wichtigsten Spezies im Genus Neisseria zählen die pathogenen Keime *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae*, welche sich in ihrem Aufbau und den Eigenschaften sehr ähnlich sind, und die apathogene Art *N. lactamica*. Allen Neisserien gemeinsam ist die kaffeebohnenähnliche Form und die meist paarweise Lagerung (Diplokokken).

I.1.2 Aufbau

Meningokokken gehören zu den gramnegativen Bakterien, d.h. ihre Zellwand besteht aus einer inneren Zytoplasmamembran, einer im Gegensatz zu grampositiven Bakterien nur dünnen Peptidoglykanschicht (Murein) und einer äußeren Membran, die Proteine, Phospholipide und Lipooligosaccharid (LOS) enthält (Dankert, J., 1999).

In der inneren zytoplasmatischen Membran der Bakterien verankert sind die Pili, die haarähnlich über die Oberfläche hinausragen (Abbildung 1). Pili können die elektrostatische Barriere zwischen Wirts- und Bakterienzelle, welche beide negativ geladen sind, überwinden (Heckels, J.E. et al., 1976). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion an Epithel- und Endothelzellen. Weiterhin initiieren Pili die DNA-Aufnahme aus der Umgebung (Rudel, T. et al., 1995). Auch eine vermehrte Autoagglutination der Bakterien und Hämagglutination ist zu beobachten. Schließlich wurde eine pilusvermittelte Motilität (twitching motility) beschrieben (Nassif, X. et al., 1999)

Die äußere Membran besteht etwa zur Hälfte aus Lipooligosaccharid (LOS) (Abbildung 1). Dieses ist aus Lipid A und einer kurzen Zuckerkette von 8 – 12 Saccharid-Untereinheiten aufgebaut. Lipid A verankert das LOS in der Membran und wirkt gleichzeitig als Endotoxin-Komponente. Vesikel, die permanent von der äußeren

Membran abgegeben werden (blebbing), enthalten unter anderem LOS und somit Lipid A. Gelangen diese Vesikel in großen Mengen in die Zirkulation des Wirtes, kommt es zum Schock (Dankert, J., 1999). LOS unterliegt einer Phasenvariation: In Studien wurde gezeigt, dass 70% der Meningokokken, die bei asymptomatischen Trägern gefunden wurden, ein kurzes LOS besaßen (Broome, C.V., 1986), während invasive Bakterien aus Patientenisolaten ein langes LOS mit zusätzlichen Carbohydraten und Sialinsäure exprimierten (Jones, D.M. et al., 1992). Die äußere Zuckerkette weist eine starke Antigenvariation auf, die das LOS für die Immunotypisierung von *N. meningitidis* wichtig macht (Swanson, J. et al., 1992). Isolate von Patienten mit einer invasiven Meningokokkenerkrankung weisen meist die eng verwandten Immunotypen L3, L7 oder L9 auf (Jones, D.M. et al., 1992).

Porine (Abbildung 1) sind wichtige Vertreter der Außenmembranproteine (OMPs). Sie bilden selektive Transportkanäle für Ionen und Nährstoffe (Benz, R., 1988; Tommassen, J. et al., 1990). In *N. meningitidis* können zwei verschiedene Klassen gleichzeitig exprimiert werden: PorB – ein Klasse 2- oder Klasse 3-Protein (Unterschiede im Aufbau führen zur Serotypisierung) und PorA – ein Klasse 1-Protein (danach können die Meningokokken weiter in Serosubtypen unterteilt werden) (Dankert, J., 1999).

Weitere integrale OMPs sind die hochvariablen Klasse 5-Proteine (Abbildung 1). Es sind heute fünf verschiedene Varianten bekannt. Eine dieser Varianten heißt 5C- oder Opc-Protein, die anderen bezeichnet man als Opacity-Proteine (Opa's) (Dankert, J., 1999). Ihren Namen verdanken sie der Fähigkeit, an das LOS benachbarter Bakterien zu binden und somit die interbakterielle Aggregation zu erhöhen (Blake, M.S. et al., 1995). Swanson beobachtete auf Grund dessen eine veränderte Farbe und verringerte Durchsichtigkeit (opacity) von Gonokokkenkolonien (Swanson, J., 1978). Über die Opa-Proteine binden Meningokokken an CD66-Moleküle auf der Oberfläche von Epithelzellen, polymorphkernigen Leukozyten und Endothelzellen, in die sie daraufhin internalisiert werden (Virji, M. et al., 1996 (a); Virji, M. et al., 1996 (b)). Opc kann nur von einigen Meningokokkenstämmen gebildet werden. Auch sie sorgen für die Aufnahme von *N. meningitidis* in Epithelzellen (über Proteoglykane) (de Vries, F.P. et al., 1998) und Endothelzellen (über Fibronectin und Integrin) (Virji, M. et al., 1994; Unkmeir, A. et al., 2002 (b)). Opacity-Proteine wirken allerdings nur, wenn sie nicht

beispielsweise durch die Bakterien-Kapsel maskiert werden (Virji, M. et al., 1992; Virji, M. et al., 1993; de Vries, F.P. et al., 1998).

Die Zellwand der Meningokokken kann von einer Polysaccharidkapsel (Abbildung 1) umhüllt werden (Dankert, J., 1999). Die Kapsel verleiht dem Bakterium Resistenz gegen Phagozytose (McNeil, G. et al., 1994) und komplement-induzierte Lyse (Mackinnon, F.G. et al., 1993; Vogel, U. et al., 1996; Kahler, C.M. et al., 1998). Außerdem schützt sie in gewissem Grad gegen schädigende Umwelteinflüsse. Aufgrund struktureller Unterschiede im Polysaccharid werden die Meningokokken in 13 Serogruppen (A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y, Z) eingeteilt. In Patientenisolaten findet man allerdings praktisch ausschließlich Meningokokken der Serogruppen A, B, C, W135 und Y (Morley, S.L. und Pollard, A.J., 2001). Die Polysaccharidkapsel ist immunogen, d.h., es werden spezifische Antikörper gegen sie gebildet (Dankert, J., 1999). Eine Ausnahme bildet die Kapselstruktur der B-Meningokokken: Ihre α -2,8-vernetzte N-acetyl-Neuraminsäure ist antigenetisch identisch mit den Polysialyl-Glykopeptiden menschlicher neuronaler Zelladhäsionsmoleküle (N-CAM) (Finne, J. et al., 1983; Finne, J. et al., 1987). Es gibt neben bekapselten Meningokokken auch sogenannte Kapsel-Null-Locus (*cnl*)-Stämme, denen die Gene für die Synthese der Kapsel fehlen. In einer Studie mit 830 gesunden Trägerisolaten von *N. meningitidis*-Stämmen aus Bayern wurde bei 16,4 % eine *cnl*-Sequenz gefunden (Claus, H. et al., 2002). 2004 wurde ein *cnl*-tragender Stamm erstmalig auch im Patientenisolat eines Mannes mit akuter lymphatischer Leukämie gefunden (Vogel, U. et al., 2004). Lange war man der Ansicht, dass bei immunkompetenten Patienten ausschließlich bekapselte Stämme zu einer Erkrankung führen können. Kürzlich wurde jedoch von einem Krankheitsfall bei einem 13-jährigen immunkompetenten Kind mit einem *cnl*-Stamm berichtet (Hoang, L.M. et al., 2005). Somit scheint nicht nur das Überleben sondern auch die Vermehrung von Meningokokken in menschlichem Serum allein aufgrund kapselunabhängiger Virulenzfaktoren möglich zu sein.

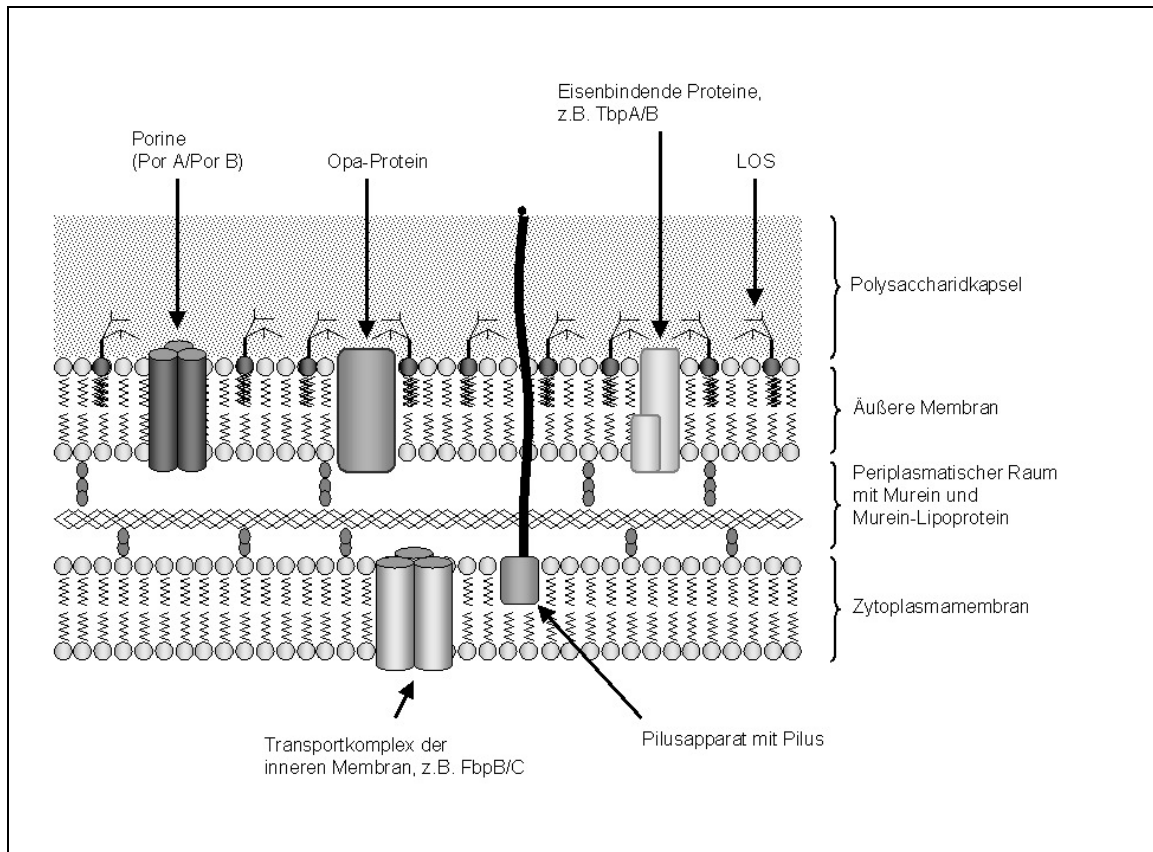


Abbildung 1: Schematischer Wandbau von *Neisseria meningitidis*

I.1.3 Pathogenese

Wie Meningokokken die menschlichen Infektionsbarrieren überwinden und die verschiedenen Krankheitssymptome auslösen können ist bis heute nicht vollständig geklärt. Der primäre Kontakt zum Epithel des Nasopharynx wird über die Pili hergestellt (van Deuren, M. et al., 2000). Die Adhärenz erfolgt zunächst nur lokalisiert, es bilden sich an einigen Stellen Bakterienaggregate. Dann allerdings breiten sich die Neisserien auf der Oberfläche der Epithelzellen aus. Man ist heute der Ansicht, dass der feste Kontakt über Opa's und Opc vermittelt wird. Allerdings sprechen einige Beobachtungen gegen diese Hypothese, so zum Beispiel, dass auch Opa-negative Varianten von *Neisseria meningitidis* fest an der Epithelzelloberfläche anhaften können (Nassif, X. et al., 1999).

Zu welchem Zeitpunkt die Epitheldurchwanderung erfolgt und welche Voraussetzungen hierfür im Einzelfall gegeben sein müssen, ist bisher kaum verstanden. Im In-vitro-Modell mit menschlichen Nasopharyngealzellen exprimierten invasive Meningokokken wenig oder keine Kapselsubstanz, besaßen keine Pili und ihr Lipooligosaccharid war

nicht sialyliert. Man geht daher davon aus, dass diese Modifikationen der Oberflächenstrukturen von großer Bedeutung für die Durchwanderung der Epithelzellschicht sind (de Vries, F.P. et al., 1996).

Die Endothelschicht der Kapillaren überwinden die Neisserien wahrscheinlich über erweiterte Interzellulärräume (Tunkel, A.R. und Scheld, W.M., 1993). Im Blutstrom sind die Meningokokken einer starken Abwehrreaktion ausgesetzt. Deshalb wird hier normalerweise Kapselsubstanz und sialinsäurebindendes LOS gebildet. Überleben die Meningokokken im Blut, können Endothelzellen zerstört werden, die Gefäßwände entzünden sich und es kommt zu einer erhöhten Kapillarpermeabilität, einem erniedrigten Gefäßtonus sowie intravaskulären Mikrothromben. Die Schwere der Erkrankung korreliert mit der LOS-Konzentration im Blut (Brandtzaeg, P., 1996). LOS aktiviert Zymogene des Komplement- und des Kallikrein-Bradikinin-Systems, wodurch die Anaphylatoxine C3a und C5a und Bradikinin freigesetzt werden. Neutrophile schütten Elastase und andere lysosomale Proteinasen aus. Desweiteren wird durch Endotoxin die Produktion von Gewebethromboplastin, Gewebe-Plasminogenaktivator und proinflammatorischen (z.B. Tumornekrose-Faktor (TNF), Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, Interferon (IFN)- γ) sowie regulatorischen Zytokinen (z.B. IL-10, IL-12) gefördert (van Deuren, M. et al., 1995; van Deuren, M. et al., 2000).

Auf dem Blutweg gelangen die Neisserien in verschiedene Organe (Tunkel, A.R. und Scheld, W.M., 1993). Dort rufen sie lokale Entzündungen hervor. Um in den Subarachnoidalraum zu gelangen, muss der Erreger die Blut-Hirn-Schranke überwinden oder die Lamina cribrosa durchqueren (Hahn, H. und Meyer, T.F., 1999). Zu diesem Zeitpunkt sind Meningokokken bekapselt und tragen Pili (Nassif, X. et al., 1999). Im Subarachnoidalraum angekommen, tritt den Meningokokken nur noch eine schwache Abwehr entgegen: die Konzentration von Immunglobulinen und Komplementfaktoren ist in der Zerebrospinalflüssigkeit sehr gering, außerdem gibt es kaum Phagozyten. Auch hier kommt es zu einer Entzündungsreaktion. Ausgelöst wird diese durch das intakte Bakterium oder bestimmte Bestandteile wie LOS oder Peptidoglykan. Von Astrozyten, Makrophagen und Endothelzellen werden TNF- α und IL-1 freigesetzt, welche die Expression von Adhäsinen, Selektinen und Integrinen fördern. Granulozyten wandern ein und beginnen, Proteasen, freie Sauerstoffradikale und Arachnoidensäure freizusetzen. Dies führt zur Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke und zum Fortschreiten der Entzündung (Hahn, H. und Meyer, T.F., 1999).

Den ersten Schutzwall des Wirtsorganismus gegen Meningokokken bildet die Mukosa des Nasopharynx. Durch ihre Ladung und Hydrophobizität hat sie Einfluss auf die Adhäsion (Criado, M.T. et al., 1985). Außerdem befinden sich im Nasopharyngealsekret Antikörper, die wahrscheinlich die wichtigste Rolle bei der Verhinderung von Kolonisation und Invasion spielen (Brandtzaeg, P., 1992) und die durch wiederholte Besiedlung des Wirtes mit *N. meningitidis* (Reller, L.B. et al., 1973), aber auch mit apathogenen Stämmen wie *N. lactamica*, *E. coli K1* und *E. coli K92* gebildet werden (Glode, M.P. et al., 1977).

I.1.4 Klinik

Die Inkubationszeit für eine invasive Meningokokkenerkrankung beträgt wenige Tage. Während dieser Zeit treten bei der Hälfte der Patienten Infektionen der oberen Luftwege auf, wie beispielsweise eine Pharyngitis (Hahn, H. und Meyer, T.F., 1999). Erreichen die Meningokokken den Blutstrom, können sie entweder spontan eliminiert werden oder aber führen zu einer fulminanten Meningokokken-Sepsis mit Schock und diffuser intravaskulärer Koagulation und/oder zu einer Meningitis mit den klinischen Symptomen Fieber, Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit, Photophobie, Erbrechen und Bewußtseinsverlust (Baldwin, L.N. et al., 1993).

Neben diesen Hauptmanifestationen kann eine invasive Meningokokken-Erkrankung auch als Arthritis, Perikarditis, Zellulitis, Endophthalmitis, Konjunktivitis, Sialadenitis, Adnexitis, Entzündung des Beckens und v.a. bei älteren Patienten als Pneumonie in Erscheinung treten.

Unbehandelt beträgt die Letalität durch Meningokokkenerkrankungen beinahe 100%. Die wichtigste Säule der Therapie sind Antibiotika wie Ceftriaxon als kalkulierte Initialtherapie und Penicillin G nach Keimidentifikation.

Aufgrund der äußerst schweren Verlaufsformen von Meningokokkenerkrankungen ist die Prophylaxe von großer Bedeutung. Um eine Ausbreitung zu vermeiden, ist die Isolierung des Patienten bis 24 Stunden nach Therapiebeginn wichtig (Hahn, H. und Meyer, T.F., 1999). Personen, die engen Kontakt zum Patienten hatten, erhalten eine Chemoprophylaxe (z.B. Rifampicin) (Jones, D.M., 1989). Für einige Serogruppen der Meningokokken sind auch Impfstoffe erhältlich. Leider wurde bisher noch kein universeller Impfstoff gegen Meningokokken aller Serogruppen gefunden. Dies liegt v.a. an der hohen antigenetischen Vielfalt dieser Bakterien, die durch horizontalen

Genaustausch und sogenanntes slipped-strand mispairing zustande kommt (Meyer, T.F. et al., 1990; Saunders, N.J. et al., 2000). Die in Europa vorherrschenden B-Meningokokken stellen wegen der bereits erwähnten fehlenden Immunogenität des Kapsel-Polysaccharids eine besondere Hürde bei der Impfstoffsuche dar.

I.1.5 Epidemiologie

Die Inzidenz von Meningokokken-Erkrankungen beträgt in den Industriestaaten 1-3/100.000, wobei diese meist durch *N. meningitidis* der Serogruppen B und C hervorgerufen werden. Neben sporadischen Fällen - vor allem in den Wintermonaten - kann es auch zu lokalisierten Ausbrüchen kommen (Dankert, J., 1999). In der Bundesrepublik Deutschland lag die Inzidenz für Meningokokkenerkrankungen im Jahre 2005 bei 0,76/100.000 Einwohner. Die gemeldeten Fälle wurden vor allem durch die Serogruppen B (74,1%) und C (20,1%) verursacht. Es gab zwei altersbedingte Inzidenzpeaks: Kinder in den ersten fünf Lebensjahren und Jugendliche zwischen dem 15. und 19. Lebensjahr. Die Letalität betrug 7,1% (RKI, 2006). Bestehen Defekte in der Abwehr des Wirtes, kann es leichter zu invasiven Erkrankungen durch *N. meningitidis* kommen. Bei einer Schädigung der terminalen Komplementfaktoren kommt es zu einem bis zu 6000-fachen Anstieg der Erkrankungswahrscheinlichkeit (Fijen, C.A. et al., 1994). Nach einer Splenektomie scheint die fehlende Filterung von bekapselten Bakterien, die verminderte Opsoninbildung und geringere Juxtaposition von Immunzellen die Suszeptibilität gegenüber Meningokokken zu steigern (Loggie, B.W. und Hinchey, E.J., 1986). Schließlich sind auch immunsuppressive Medikamente und Autoimmunerkrankungen wie der systemische Lupus erythematoses Risikofaktoren (Mitchell, S.R. et al., 1990).

In einigen afrikanischen Ländern ist die Inzidenz mit 10-25/100.000 weitaus höher, was sowohl in der Virulenz der jeweiligen Meningokokken-Stämme, als auch in sozioökonomischen und klimatischen Verhältnissen begründet liegt. In Patientenisolaten findet man hier vor allem die Serogruppe A vor. Ein besonderes Problem stellen die Meningokokken im sogenannten Meningitisgürtel südlich der Sahara dar. Gegen Ende der Trockenzeit kommt es hier immer wieder zu Epidemien mit Erkrankungszahlen von bis zu 1.000/100.000.

I.2 Erwartungen an eine *lst*-Deletionsmutante

Das *lst*-Gen kodiert für die α -2,3-Sialyltransferase, ein Enzym, das die Anbindung von Sialinsäure an das terminale Ende der Lacto-N-Neotetraose (LNnt)-Seitenkette von LOS katalysiert. Es besteht aus 1113 bp und befindet sich zwischen Genen, die für die Isocitratdehydrogenase und das Cytochrom c kodieren, also nicht in die LOS-Synthese involviert sind (Jennings, M.P. et al., 1995). Gilbert et al. konnten das *lst*-Gen erstmals 1996 in *E. coli* klonieren (Gilbert, M. et al., 1996). Die Basensequenz unterscheidet sich von der der Säugetier- α -2,3-Sialyltransferase und der Bakterien- α -2,8-Sialyltransferase. Erst kürzlich konnten Shell et al nachweisen, dass sich das kodierte Protein auf der Oberfläche der äußeren Membran befindet (Shell, D.M. et al., 2002). Als Substrat benutzt die Sialyltransferase entweder exogen gewonnene oder endogen hergestellte 5'-Cytidinmonophosphat-N-acetylneuraminsäure (CMP-NANA). CMP-NANA findet sich in humanem Serum sowie in menschlichen Ausscheidungen (Nairn, C.A. et al., 1988). Meningokokken der Serogruppen B, C, W135 und Y, welche eine sialinsäurehaltige Kapsel exprimieren, können CMP-NANA auch endogen über die Genprodukte von *siaA* - *siaC* herstellen und zur Sialylierung nutzen (Mandrell, R.E. et al., 1991). Zusätzliche N-acetylneuraminsäuren (NeuNAc) können nur Lipooligosaccharide der Immunotypen L2, L3, L5, L7 und L9 aufnehmen. Diese nämlich besitzen ein LNnt-Epitop (Galactose- β 1,4-N-acetyl-glucosamin- β 1,3-galactose- β 1.4-glucose), welches über die Heptose I an das LOS gebunden ist. Die terminale Galactose kann in α 2,3-Position sialyliert werden, wodurch das Molekulargewicht der Lipooligosaccharide jedoch nur unwesentlich verändert wird (Mandrell, R.E. et al., 1991; Tsai, C.M. et al., 2002). Meist ist das LOS dieser Immunotypen teilweise sialyliert (Tsai, C.M. und Civin, C.I., 1991).

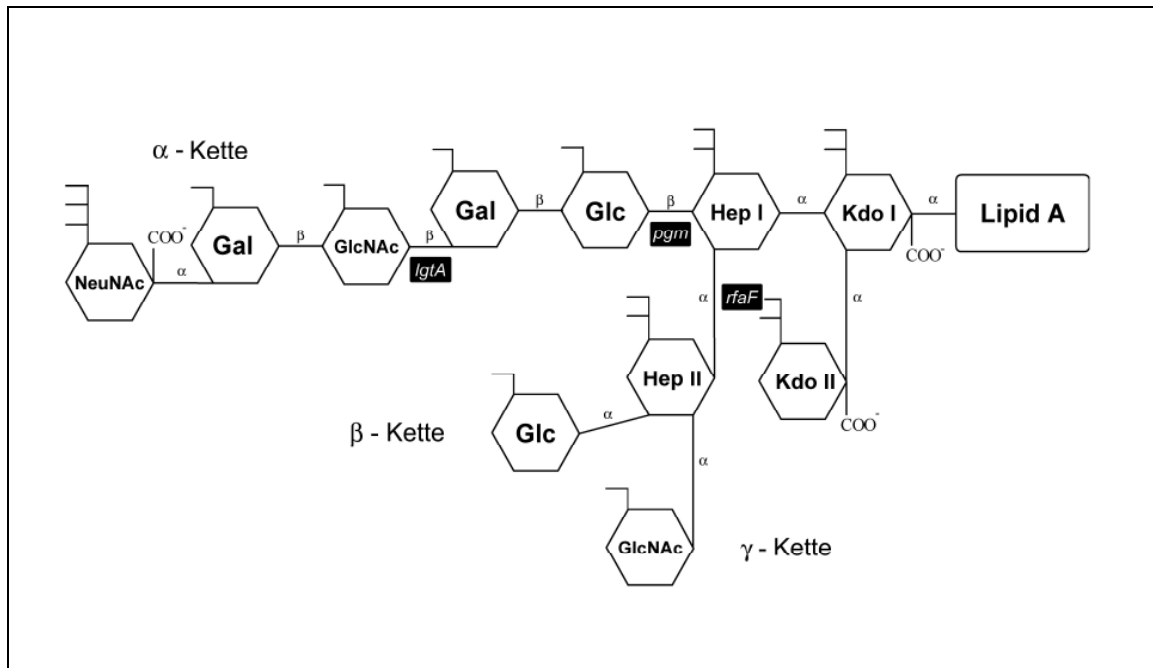


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des LOS von *Neisseria meningitidis* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von O. Kurzai, Universität Würzburg)

Die α -Kette variiert je nach Immunotyp. L2, L3, L4, L5, L7 und L9 tragen Lacto-N-neotetraose, bei L6 fehlt die letzte Galactose von LNnT, L1 weist die Trisaccharidverbindung Gal α 1-Gal β 1-Glc auf und L8 enthält ein Lactosyl-Disaccharid.

Kdo: 3-Desoxy-D-manno-octulosonsäure, Hep: Heptose, Glc: Glucose, Gal: Galactose, GlcNAc: N-Acetyl-glucosamin, PEA: Phosphoethanolamin, Ac: Acetyl-Rest.

Untersuchungen haben ergeben, dass die Sialylierung des Lipooligosaccharids einen protektiven Effekt v.a. für Gonokokken, aber auch für Meningokokken hat. Hinweise dafür ergaben sich bereits aus der Tatsache, dass LOS-Immunotypen, die sialyliert werden können, überwiegend aus dem Blut von erkrankten Personen isoliert, während solche, die nicht zur Bindung befähigt sind, v.a. im Nasopharynx von Trägern gefunden wurden (Jones, D.M. et al., 1992).

Ein Grund für diesen schützenden Effekt könnte eine verminderte Stimulation des Immunsystems aufgrund einer sogenannten molekularen Mimikry sowohl durch Lacto-N-Neotetraose als auch durch die Sialinsäure selbst sein. Die LNnt-Struktur findet sich auch im Glycosphingolipid Paraglobosid von Säugern, welches ein Vorläufer der ABH-Antigene auf menschlichen Erythrozyten ist (Vogel, U. und Frosch, M., 1999). Oligosaccharide von Säugetieren können auch N-acetylneuraminsäurereste enthalten. Diese spielen eine wichtige Rolle als Rezeptoren für Lektine, Toxine und bestimmte Viren (Harduin-Lepers, A. et al., 1995).

Estabrook et al. untersuchten die Wirkung von Kapsel und LOS-Sialylierung bestimmter C-Meningokokkenstämme auf die Opsonophagozytose und konnten eine erhöhte, allerdings stammabhängige Resistenz gegen die Abtötung durch Neutrophile in Anwesenheit von Kapsel und sialyliertem LOS feststellen (Estabrook, M.M. et al., 1992). Eine kürzlich von Jones et al. veröffentlichte Arbeit weist hingegen auf eine stärkere Phagozytose von Meningokokkenstämmen mit sialyliertem LOS über sogenannte siglecs (sialinsäurebindende Ig-ähnliche Lektine) hin. Ob die phagozytierten Meningokokken tatsächlich abgetötet werden oder ob sie die Phagozyten nutzen, um Epithel- oder Endothelbarrieren zu überwinden, müssen weitere Untersuchungen zeigen (Jones, C. et al., 2003)

Die LOS-Sialylierung hat auch einen Einfluss auf die Adhärenz an und die Invasion in Epithel- und Endothelzellen via Opa und Opc. Meningokokken mit sialyliertem LOS zeigten eine verringerte Interaktion mit solchen Zellen (Virji, M. et al., 1992; Virji, M. et al., 1993; de Vries, F.P. et al., 1998).

Für die Komplementaktivierung spielt sialyliertes LOS eine besondere, wenn auch noch eine nicht in allen Einzelheiten verstandene Rolle. Für Gonokokken konnte gezeigt werden, dass die Sialylierung eine höhere Affinität von Faktor H zu C3b bedingt, was den Anteil an inhibiertem C3b erhöht und somit die Bildung des MAC über den alternativen Weg vermindert. Derartige Untersuchungen fehlen allerdings bisher für Meningokokken (Vogel, U. und Frosch, M., 1999). Estabrook et al. berichteten 1997, dass nicht die Menge von Sialinsäure an sich, sondern der Anteil an freier LNnt eine entscheidende Rolle für die Serumresistenz spiele. Sie untersuchten verschiedene C-Meningokokkenstämme und fanden heraus, dass Stämme, die mehr freie LNnt besaßen, eine höhere Empfindlichkeit gegenüber humanem Serum aufwiesen. Dies führten sie darauf zurück, dass die Galactose, welche der terminale Zucker von LNnt ist und eine starke Affinität zu C3 besitzt, durch die fehlende Sialylierung zur Bindung freisteht (Estabrook, M.M. et al., 1997). Auch Kahler et al. stellten bei bekapselten B-Meningokokken eine vermehrte Serumsensibilität nach Verlust der LOS-Sialylierung fest (Kahler, C.M. et al., 1998). Bei Untersuchungen mit *lst*-Knockout-Mutanten von B- und C-Meningokokkenstämmen konnten Vogel et al. diese Ergebnisse nur für hohe Serumkonzentrationen bestätigen (Vogel, U. et al., 1999).

Ein Bericht von Jack et al. legt nahe, dass die Sialylierung von LOS auch eine wichtige Rolle spielt für den Angriff von MBL, welches durch Spaltung von C2 und C4 eine C3-

Konvertase generiert und somit die Komplementkaskade in Gang setzt. Die Aktivierung von C4 und damit auch des MAC war auf C-Meningokokken mit sialyliertem LOS deutlich verspätet (Jack, D.L. et al., 2001).

I.3 Bedeutung von dendritischen Zellen für die Immunantwort

Für die Initiierung einer spezifischen Immunantwort gegen Bakterien sind die Phagozytose, Prozessierung und Präsentation bakterieller Antigene von entscheidender Bedeutung. Dies geschieht über sogenannte Antigen-präsentierende Zellen (APC-s), zu denen u.a. Makrophagen und B-Lymphozyten gehören. Die potentesten, derzeit bekannten APC-s jedoch stellen die Dendritischen Zellen (DC-s) dar. Diese sind unregelmäßig geformt mit baumartigen Fortsätzen und können z.T. einen Durchmesser von mehr als 10 µm erreichen (Banchereau, J. und Steinman, R.M., 1998). Außerdem besitzen DC-s eine hohe Motilität. Dendritische Zellen weisen kein spezifisches Antigen auf, typischerweise sind allerdings CD (Cluster of differentiation) 4, CD11b und c, CD13, CD33, MHC (Haupthistokompatibilitäts-komplex) I und II zu finden (Burmester, G.R., 1998). DC-s kommen in lymphatischem Gewebe, nicht-lymphatischem Gewebe und Körperflüssigkeiten vor. Sie besiedeln als interdigitierende Zellen die T-Zell-Bereiche sekundärer Lymphgewebe und die Medulla des Thymus, außerdem als Marginalzonen-DC-s die Milz. In nicht-lymphatischen Geweben treten sie v.a. in Haut (Langerhans-Zellen) und Schleimhaut, aber auch in Herz, Niere und Lunge (interstitielle DC-s) in Erscheinung. Auch in der afferenten Lymphe (Schleierzellen) und im peripheren Blut (Blut-DC-s) sind dendritische Zellen anzutreffen (Austyn, J.M. und Wood, K.J., 1993 (a); Austyn, J.M. und Wood, K.J., 1993 (b)). Vorläuferzellen der DC-s entstehen im Knochenmark. Von dort treten sie in den Blutstrom über und besiedeln als unreife DC-s extralymphatische Organe. Erst wenn sie aktiviert werden, wandeln sie sich in reife DC-s um und wandern über Blut oder Lymphe in sekundäre lymphatische Organe (Austyn, J.M., 1996). Im unreifen Status sind dendritische Zellen besonders gut für die Aufnahme von Antigenen via Phagozytose, Makropinozytose oder Rezeptor-gesteuerte Endozytose geeignet (Sallusto, F. und Lanzavecchia, A., 1994; Lutz, M.B. et al., 1996; Werling, D. et al., 1999). Schon Antigenkonzentrationen im Picomol- bzw. Nanomolbereich können erkannt werden (Sallusto, F. et al., 1995). Für diese Aufgabe exprimieren unreife DC-s viele Rezeptoren, wie die Fcγ- und Fcε-Rezeptoren (Sallusto, F. und Lanzavecchia, A., 1994), C-Typ-Lektin-Rezeptoren

(Sallusto, F. et al., 1995) und Toll-like Rezeptoren (TLR's) (Muzio, M. et al., 2000). TLR's erkennen spezielle antigenetische Muster von Pathogenen, die in höher entwickelten Eukaryonten nicht vorkommen, sogenannte PAMP-s (pathogen-associated molecular patterns) (Ulevitch, R.J., 1999). Dies können z.B. LPS, Peptidoglykane oder bakterielle DNS sein (Schwandner, R. et al., 1999). Für die Interaktion mit Meningokokken scheinen TLR2 und der wahrscheinlich LPS- und LOS-selektive TLR4 von besonderer Bedeutung zu sein. (Pridmore, A.C. et al., 2001; Kolb-Mäurer, A. et al., 2003). Kostimulierende Moleküle für die T-Zell-Aktivierung sind im unreifen Zustand der dendritischen Zellen herunterreguliert und der MHC II befindet sich v.a. intrazellulär (Banchereau, J. und Steinman, R.M., 1998). In diesem sogenannten steady state können DC-s jedoch auch Immuntoleranz vermitteln. Über bestimmte Rezeptoren werden Proteine und apoptotische Zellen erkannt und über MHC I oder II präsentiert. Daraufhin erfolgt beispielsweise die Ausschaltung autoreagierender T-Zellen oder die Generierung regulatorischer T-Zellen (Finkelman, F.D. et al., 1996; Hawiger, D. et al., 2001; Bonifaz, L. et al., 2002; Steinman, R.M. et al., 2003).

Dendritische Zellen können durch intakte Bakterien (Winzler, C. et al., 1997) oder deren Produkte (Sallusto, F. et al., 1995) bzw. durch Zytokine (Jonuleit, H. et al., 1997) zur Ausreifung angeregt werden. Reife DC-s exprimieren v.a. den DC-Reife-Marker CD83, MHC II und kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD54 und CD86 an ihrer Oberfläche; Rezeptoren für die Antigenaufnahme fehlen weitgehend. So ausgestattet sind die DC-s prädestiniert für die Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung (Banchereau, J. und Steinman, R.M., 1998). Ausgereifte dendritische Zellen können im drainierenden Lymphknoten unterschiedliche Signale übermitteln, je nachdem durch welche Art von Mikroorganismen sie aktiviert wurden. Wurden beispielsweise Viren, intrazelluläre Bakterien oder Hefepilze erkannt, erfolgt über IL-12 eine Th1-Zell-Differenzierung (Rescigno, M., 2002). Extrazelluläre Pathogene wie Parasiten oder Fadenpilze führen hingegen zu einer Aktivierung von Th2-Zellen (de Jong, E.C. et al., 2002). DC-s vermitteln in bestimmten Fällen zudem die Stimulation regulatorischer T-Zellen über IL-10 (Chow, J.C. et al., 1999) oder einen Ig-Klassenswitch von B-Lymphozyten (Akbari, O. et al., 2001).

DC-s sind darüber hinaus eine wichtige Quelle für die Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 (Caux, C. et al., 1994; Josien, R. et al., 1999; Romani, N. et al., 1999), die zu Gewebestrukturierungen und chronischer Entzündung führen (Austyn, J.M. und Wood,

K.J., 1993 (a); Austyn, J.M. und Wood, K.J., 1993 (b)). Die Überproduktion dieser Zytokine spielt eine wichtige Rolle für den fatalen Ausgang einer Meningokokken-Infektion (van Deuren, M. et al., 1995), wobei hohe Konzentrationen bei einer Meningitis in der Zerebrospinalflüssigkeit und bei einer Sepsis im Serum gefunden werden (Waage, A. et al., 1989; Brandtzaeg, P. et al., 1992). Daher ist die Untersuchung des Zusammenspiels zwischen Meningokokken und dendritischen Zellen interessant für das Verständnis der Pathogenese von Meningokokken-Erkrankungen.

I.4 Beschreibung des Projekts

Für die Untersuchungen zur Bedeutung der LOS-Sialylierung für die bakterielle Virulenz wurden bereits *lst*-Knockout-Mutanten verwendet. Deletionsmutanten sind jedoch beispielsweise für die Entwicklung von Lebendimpfstoffen obligat. Das Vorhaben dieses Projekts war es, eine solche Deletionsmutante herzustellen, die Deletion zu beweisen und die Mutante bezüglich der Serumsensitivität und der Interaktion mit Epithel-, Endothel- bzw. dendritischen Zellen zu charakterisieren.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1 Material

II.1.1 Geräte

- Blotkammer für Westernblot	- BioRad, München
- Brutschränke	- Kb 500 (Heraeus, Hanau) - B5060 E-CO ₂ (Heraeus, Hanau)
- Elektrophoresekammern	- DNA Subcell™ (BioRad, München) - Wide Mini-Subcell™ (BioRad, München)
- Heizblöcke	- BT1 und BT3 (Grant Instruments, Cambridge, UK)
- Hybridisierungsöfen	- DUO-Therm OV5 (Biometra, Göttingen)
- Schnelltrocknungsgerät	- Speed Vac® Plus SC110A (Savant, New York, USA)
- Schüttelinkubatoren	- G25 (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA) - KS 10 (Bühler, Tübingen)
- Sequenziergerät	- ABI Prism™ Sequencer 377 (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- Spannungsgeräte	- Gene Power Supply GPS 200/400 (Pharmacia, Freiburg) - Power Supply 3000Xi (BioRad, München)
- Spektrophotometer	- U-2000 (Hitachi, San Jose, CA, USA)
- Thermocycler	- TRIO (Biometra, Göttingen) - Personal Cycler (Biometra, Göttingen)
- UV <i>Crosslinker</i>	- Stratalinker® 1800 (Stratagene Europe, Amsterdam, NL)
- Wasserbäder	- Verschiedene Hersteller
- Zentrifugen	- Biofuge 15 (Heraeus, Hanau) - Biofuge 15R (Heraeus, Hanau) - Kühlzentrifuge RC-5B (Sorvall Heraeus, Hanau) - Omnifuge2.0 RS (Heraeus, Hanau) - Tisch-Ultrazentrifuge TL-100 (Beckman, München) - Ultrazentrifuge L7 (Beckman, München)

II.1.2 Verbrauchsmaterial

- Blotting-Papier, dickes und dünnes, 58 cm x 58 cm (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Dialyseschläuche ¾“ (Life Technologies, Karlsruhe)
- Nitrocellulose (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Nylonmembran (amphoter) *porablot NY amp* (Macherey & Nagel, Düren)
- Nylonmembran (positiv geladen) *porablot NY plus* (Macherey & Nagel, Düren)
- PS-Mikrotiterplatte 96 K (Greiner, Nürtingen)
- Quarzküvetten (Sarstedt, Nümbrecht)
- Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml, (Sarstedt, Nümbrecht)
- Röhrchen 15 ml, steril (Greiner, Nürtingen)
- Röntgenfilm *Hyperfilm™-MP* (Amersham, Braunschweig)
- Spritzen und Kanülen (Braun Melsungen AG, Melsungen)
- Whatman-Papier (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Zellkulturflaschen (Nunc/Noras, Würzburg)
- Zellkulturplatten (3003, Falcon Labware, Oxnard, CA, USA)
- Zentrifugengefäße (Polyallomer), 13 x 51 mm (Beckman, München)
- Zentrifugengefäße, 15 ml und 50 ml, (Falcon, Heidelberg)
- Zentrifugengefäße, 25 x 89 mm, *Quickseal™* (Beckman, München)

II.1.3 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme

- AppliChem, Heidelberg	- Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG)
	- Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)
	- X-Gal
- Bayer, Leverkusen	- Ampicillin (Binotal®)
- Biochrom, Berlin	- Gentamycin
	- Streptomycin
	- Penicillin
- bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich	- PolyVitex (Vitaminlösung für Flüssigmedien)
- Biomol, Hamburg	- P-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)

- Boehringer, Mannheim	- Poly-D-Lysin, Lyophilisat, steril
- Difco Laboratories, Augsburg	- Bacto-Trypton
	- GC-Medium Base
	- Hefeextrakt
	- Proteose-Pepton
- Epicentre Technologies, Madison, WI, USA	- Fast Link Ligation Kit
- Eurogentec, Seraing, Belgien	- Smartladder (DNA-Längenstandard)
- Fresenius-Kabi, Bad Homburg	- Ampuwa
- Gibco Life Technologies, Karlsruhe	- LB Agar (Lennox L Agar)
	- LB Broth Base (Lennox L Broth Base)
	- DNA-Längenstandard (<i>one-kb-ladder</i>)
	- BenchMark™ Prestained Protein Ladder
	- RPMI 1640 Medium
	- Trypsin-EDTA
	- Gentamycin
- Merck, Darmstadt	- Ethidiumbromid
	- Ammoniumperoxidsulfat
	- Mercaptoethanol
	- Bromphenolblau
	- Proteinase K
- Merck-Schuchard, München	- Tween
- NEB, Schwalbach	- Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme
- Perkin Elmer, Weiterstadt	- AmpliTaq®
	- BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready-Reaction Kit
- Polysciences Inc., Washington, USA	- 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)
- Promega, Mannheim	- Taq-Polymerase
	- DdNTPs
- Qiagen, Hilden	- Qiagen Plasmid Midi/Maxi Kit
	- QIAprep Spin Miniprep Kit
	- QIAquick PCR Purification Kit
	- QIAquick Gel Extraction Kit
	- QIAamp DNA Mini Kit

- Roche, Mannheim	- DNA-Molekulargewichtsmarker II und III, DIG-markiert
	- DIG DNA Labeling Kit
	- DIG Luminescent Detection Kit
	- DIG Oligonucleotide Tailing Kit
- Roth, Karlsruhe	- Agarose NEEO
	- DNTPs, lyophilisiert
	- TEMED
	- Acrylamid
	- N,N-Methylenbisacrylamid
- Sigma, Deisenhofen	- Antibiotika
	- RNase A aus Rinderpankreas
	- Paraffin-Mineralöl
	- Phenol
	- Chloroform
	- Formamid
	- BSA (bovine serum albumine)
- Serva, Heidelberg	- Coomassie-brilliant blue
	- Saponin

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

II.1.4 Puffer und Lösungen

- GEBS:	- 20 % Glycerin
	- 50 mM EDTA
	- 0,05 % Bromphenolblau
	- 0,5 % N-Lauroylsarkosin
	- pH 8,0
- PBS:	- 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4
	- 140 mM NaCl
	- oder PBS Dulbecco ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (Biochrom, Berlin)
- 20 x SSC:	- 3M NaCl
	- 0,3 M Na-Citrat
	pH 7,0

- Stop-Puffer:	- 200 mM Tris-HCl, pH 8,0 - 20 mM EDTA - 20 mM Na-Azid
- 1 x TBE:	- 100 mM Tris-HCl - 100 mM Borsäure - 2,5 mM EDTA - pH 8,3
- TE (10/1):	- 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 - 1 mM EDTA, pH 8,0

II.1.5 Antikörper

- ELISA:	- OptEIA Sets für humane Zytokine (BD Pharmingen, Heidelberg)
- Westernblots:	- Alkalische-Phosphatase-markierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper (Dianova, Hamburg) - Opa-Antikörper 4B17/C11 (Giovanna Morelli, Max-Planck-Institut, Berlin) - Opc-Antikörper B306 (Giovanna Morelli, Max-Planck-Institut, Berlin) - Pili-Antikörper SM-1 (M. Virji, Department of Pathology and Microbiology, Bristol, UK)

II.1.6 Oligonukleotide

(MWG Biotech AG, Ebersberg)

- IstupstreamF:	- 5'-TTT TTG AGT CAT AGG TAC CTT CTC TTG TAG GTT-3'
- IstupstreamR:	- 5'-ATA TCC CTA AAA CTC GAG TCC GAC AAA TTG AAC-3'
- IstdownstreamF:	- 5'-GAC GAT AAA AAT CTC GAG CAT AGC AAA TCA AAA T-3'
- IstdownstreamR:	- 5'-GAT GCC CGA ATT CAC ACG CAT GGG CA-3'
- IstupscreenR:	- 5'-CAA ATT GAA CAT ACG CCC CG-3'
- IstdownscreenF:	- 5'-ATG GCG GAG TGC GTG GGG-3'
- Istunderdown:	- 5'-CGT TCA AAT CCA TGA TGC CC-3'
- IstgeneF:	- 5'-ATG GGC TTG AAA AAG GCT TGT-3'
- IstgeneR:	- 5'-ATT TTT ATC GTC AAA TGT CAA AAT C-3'
- Istdelationcontrol	- 5'-AAT TTG TCG GAA TGG AGC ATA G-3'

- 329:	- 5'-ACC ATG ATT ACG CCA AGC G-3'
- KB9:	- 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC-3'

II.1.7 Plasmide

- Derivat des pAT153 (Sambrook, J. et al., 1989)	- ColE1 <i>ori</i> , „relaxed“; Amp ^R , Tet ^R ; enthält das PCR-Produkt der Primer UE12 und UE13, in das an der <i>SpeI</i> -Schnittstelle eine Cm ^R -Kassette eingefügt wurde (Leimbach, T., 2004)
- pBluescript [®] II SK(+) (Stratagene/ <i>accession no.</i> X52328)	- Derivat des pUC19; <i>f1 ori</i> , ColE1 <i>ori</i> , <i>lacZ</i> , multiple Klonierungsregion (<i>MCS</i>) flankiert von T3- und T7-RNA-Promotoren, Amp ^R
- pGH15:	- Chloramphenicol-Resistenz-Kassette in <i>siaD</i> (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gabi Heinze, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg)
- pLAK33:	- Kanamycin-Resistenz-Kassette in BstEII von <i>lpxA</i> auf dem Plasmid pLA21 (pUC18 mit <i>lpxD-fabZ-lpxA</i> -Insert, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Steeghs et al., RIVM, Niederlande)
- pMF121:	- Erythromycin-Resistenz-Kassette in Region E, B von <i>cps</i>
- pTL1:	- pBluescript mit Neisseria uptake sequence in <i>SacI</i> (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thomas Leimbach, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg)

II.1.8 Bakterienkulturen

II.1.8.1 *E. coli*-Stämme

- <i>E. coli</i> DH5 α (Hanahan, D., 1983):	- F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁻) <i>supE44 thi-1 λ-recA1 gyrA relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169, deoR Φ80dlacZΔM15</i>
--	--

II.1.8.2 Neisserien-Stämme

<i>N. meningitidis</i> A	A2044:	klonale Subgruppe II/III, Immunotyp L3,7,9 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von U. Berger, Institut für Hygiene, Heidelberg)
	A2044 <i>cps</i> ⁻ :	Insertionsmutante (Transformation mit pMF121; Ery ^R in <i>cps</i>)
<i>N. meningitidis</i> B	MC58:	Patientenisolat UK 1985 (Virji, M. et al., 1991); B:15:P1.7,16; Immunotyp L3; ET-5

<i>N. meningitidis</i> C	MC58 <i>siaD</i> ⁻ :	Insertionsmutante (Transformation mit pGH15; CM ^R in <i>siaD</i>)
	H44/76:	Patientenisolat Norwegen 1978 (Holten, E., 1979); B:15:P1.7,16; Immunotyp L3; ET-5
	H44/76 <i>siaD</i> ⁻ :	Insertionsmutante (Transformation mit pGH15; CM ^R in <i>siaD</i>)
	H44/76 <i>lpx</i> ⁻ :	Insertionsmutante (Transformation mit pLAK33; Kana ^R in <i>lpxA</i> , freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Steeghs et al., RIVM, Niederlande)
	C1701:	Immunotyp L2, ET-37 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von U. Berger, Institut für Hygiene, Heidelberg)
	C1701 <i>cps</i> ⁻ :	Insertionsmutante (Transformation mit pMF121; Ery ^R in <i>cps</i>)

II.1.8.3 Nährmedien

- GC-Agar:	<ul style="list-style-type: none"> - 1,5 % Proteose-Pepton - 0,1 % Stärke - 0,4 % K-Phosphat - 0,5 % NaCl - 1,0 % Bacto-Agar - pH 7,2
- Luria-Broth-Medium (LB-Medium):	<ul style="list-style-type: none"> - 1,0 % Bacto- Trypton - 0,5 % Hefeextrakt - 1,0 % NaCl - pH 7,5
- LB-Agar:	<ul style="list-style-type: none"> - LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar
- LB-AIX-Agar:	<ul style="list-style-type: none"> - LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar - 100µg/ml Ampicillin - 0,1mM/ml IPTG - 2ml einer 2% Lösung/1Liter Agar (Lösungsmittel: DMF) X-Galactosid
- Proteose-Pepton-Medium (PPM):	<ul style="list-style-type: none"> - 1,5 % Proteose-Pepton - 0,5 % NaCl - 0,05 % Stärke - 0,4 % KH₂PO₄ - 0,1 % K₂HPO₄

- Proteose-Pepton-Medium, supplementiert (PPM+):	- pH 7,8 (mit KOH)
- Schokoladen-Agar	- PPM + 0,01 M MgCl ₂
	- + 0,042 % NaHCO ₃
	- + 1 % (v/v) PolyVitex
	- Kochblut-Agar mit IsoVitaleX® (Becton-Dickinson, Heidelberg)

II.1.8.4 Kulturbedingungen

Neisserien-Kulturen wurden auf GC-Agar (mit Faktor VX supplementiert) in 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. *E. coli* wurde auf LB-Agar inkubiert. Rekombinante Bakterienstämme wurden über Antibiotika-Zusätze selektiert. Die Inkubationstemperatur lag bei 37°C.

II.1.8.5 Antibiotikazusätze

Bei Zusatz von Antibiotika wurden folgende Konzentrationen verwendet:

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

II.1.9 Zellkultur

II.1.9.1 Hep-2 Larynxkarzinomzellen

Hep-2 humane Larynxkarzinomzellen (freundlicherweise von A.E. Moore zur Verfügung gestellt)

Kulturmedium:

RPMI 1640 Medium plus (Gibco Life Technologies, Karlsruhe)

10 % fetales Kälberserum (FCS) (Gibco Life Technologies, Karlsruhe)

2 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin)

II.1.9.1.1 Auftauen von Zellen

Die Epithelzellen werden in 70%igem eisgekühltem Ethanol aufgetaut. Sie werden mit 2 ml 10%igem FCS gemischt. Nach Zugabe von 10 ml RPMI 1640 wird die Suspension 15 min. bei 1300 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird in 2 ml RPMI 1640 mit 10% FCS resuspendiert und die Zellen werden in der Neubauer-Kammer gezählt.

Schließlich werden die Epithelzellen auf 2 Zellkultur-Flaschen mit je 5 ml RPMI 1640-Medium, 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin aufgeteilt und bei 37°C bebrütet, bis sich ein geschlossener Zellrasen gebildet hat.

II.1.9.1.2 Aussäen von Zellen für den Infektionsversuch

Zwei Tage vor dem Assay werden 1×10^5 Hep-2 Zellen pro Well ausgesät. Dazu werden die Zellen aus dem Brutschrank mikroskopisch auf die Zelldichte und etwaige Verunreinigungen hin überprüft. Danach wird das Medium abgenommen und Trypsin/EDTA hinzugefügt. Nach kurzer Inkubation lösen sich die Zellen makroskopisch erkennbar vom Flaschenboden ab. Der Zellrasen wird abgeklopft und die Zellen werden in 5 ml RPMI 1640 resuspendiert.

Anschließend wird die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Kammer bestimmt, auf 1×10^5 Hep-2 Zellen/ml RPMI-Medium verdünnt, auf die Wells verteilt und bei 5% CO₂, hoher Luftfeuchte und 37°C bebrütet.

II.1.9.2 Hbmec-Endothelzellen

Mikrovaskuläre Endothelzellen aus humanem Gehirn (Hbmec) (isoliert aus dem Gehirn eines verstorbenen Kindes von Kwang Sik, Kim: Los Angeles, 1996)

Hbmec-Medium (100 ml):

- RPMI 1640 (Gibco Life Technologies, Karlsruhe)
- 10 % FCS (Gibco Life Technologies, Karlsruhe)
- 10 % Nu-Serum IV (Becton Dickinson, Bedford, MA, USA)
- 30 µg/ml ECGS Endothel Zellwachstum Supplement (Cell Systems Clonetics, St. Katharinen)
- 5 U/ml Heparin (Biochrom, Berlin)
- 2 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin)
- 1 mM Na-Pyruvat (Biochrom, Berlin)
- 1 % MEM-Vitamine (Biochrom, Berlin)

II.1.9.2.1 Auftauen von Zellen

Die Zellen aus dem Stickstofftank werden schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und zu 2 ml FCS (Raumtemperatur) hinzupipettiert. Hierzu werden noch einmal 5-6 ml Hbmec-Medium hinzugefügt. Anschließend werden die Zellen 10 Minuten lang bei

1350 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen werden in 2ml Hbmec-Medium mit PenG/Strep (1:100) resuspendiert und auf zwei Flaschen aufgeteilt. Jede der Flaschen wird mit Hbmec-Medium + PenG/Strep auf ca. 7 ml Endvolumen aufgefüllt. Schließlich werden die Zellen mikroskopiert und bei 37°C bebrütet

II.1.9.2.2 Aussäen von Zellen für den Infektionsversuch

24-well-plates werden folgendermaßen mit 0,2%iger Gelatine ge-coated: In jede Vertiefung werden 0,5 ml Gelatine pipettiert. Die Platte wird danach kurz über eine Flamme gezogen und nach Absaugen der Gelatine trocken gelassen.

Die Zellen aus dem Brutschrank werden mikroskopisch auf die Zelldichte und etwaige Verunreinigungen hin überprüft. Danach wird das Medium abgenommen und Trypsin/EDTA hinzugefügt. Nach kurzer Inkubation lösen sich die Zellen makroskopisch erkennbar vom Flaschenboden ab. Die Zellen werden nun in 5 ml Hbmec-Medium aufgenommen, 5 min. bei 1350 rpm abzentrifugiert und wiederum in 5 ml Hbmec-Medium resuspendiert.

Anschließend wird die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Kammer bestimmt. Je nach gewünschter Zellzahl/Well werden die Zellen in einem bestimmten Volumen Hbmec-Medium aufgenommen und auf die Wells verteilt.

Die Zellen werden etwa 2-3 Tage bis zur konfluenten Phase bei 37°C, 5% CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit bebrütet.

II.1.9.3 Dendritische Zellen (DC)

PBMC-s von gesunden Spendern werden aus Citrat-gepufferten, Leukozyten-angereicherten Buffy coats durch Histopaque (1,077 g/ml; Sigma, Deisenhofen) Dichtegradient-Zentrifugation bei 400 x g und Raumtemperatur isoliert. Danach werden die verbleibenden Monozyten mit einer Dichte von 5×10^6 / Platte in RPMI 1640 (Gibco Life Technologies, Karlsruhe) mit L-Glutamin (2 mM) (Biochrom, Berlin) und 1% autologem humanem Plasma auf Zellkulturplatten (3003, Falcon Labware, Oxnard, CA, USA) aufgebracht und 60 min. bei 37°C bebrütet. Danach werden nicht adhärenente Zellen durch Waschen mit PBS entfernt. Die adhärenente Zellen werden sieben Tage in RPMI 1640 mit 10% FCS (PAN Biotech, Aidenbach), 2 mM L-Glutamin, 1000 U/ml rekombinatem humanen IL-4 (PBH, Hannover) und 800 U/ml humanem rekombinanten

Granulozyten Makrophagen-Kolonien stimulierenden Faktor (GM-CSF) (Leukomax, Sandoz, Basel, Schweiz) gezüchtet. Jeden zweiten Tag werden die Zytokine erneuert (Romani, N. et al., 1994).

II.2 Methoden

II.2.1 DNA-Präparationen

II.2.1.1 Präparation chromosomaler und Plasmid-DNA, Isolierung von DNA aus Agarosegelen und aus PCR-Ansätzen

Hierzu wurden folgende Kits (alle Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben verwendet:

- QIAamp DNA Mini Kit
- Qiagen Plasmid-DNA-Isolierungskit
- Qiaprep Spin Miniprep Kit
- QIAquick Gel Extraction Kit
- QIAquick PCR Purification Kit

II.2.1.2 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung von Konzentrationen und Reinheit der DNA- und RNA-Lösungen erfolgt durch photometrische Messungen geeigneter Verdünnungen der Lösungen bei 260 und 280 nm in 1-ml-Quarzküvetten (Neu:(Sambrook, J. et al., 1989)). Eine OD_{260nm} von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA 50 $\mu\text{g/ml}$, bei einzelsträngiger DNA und RNA 40 $\mu\text{g/ml}$ und bei Oligonukleotiden 30 $\mu\text{g/ml}$.

Eine andere, jedoch weniger genaue Methode der Konzentrationsbestimmung ist die visuelle Beurteilung der Intensität der Nukleinsäure-Banden im Elektrophorese-Gel im Vergleich zu *Marker*-Banden mit einer definierten Auftragsmenge.

Die Reinheit der Präparation wird über das Verhältnis OD_{260nm} zu OD_{280nm} ermittelt. Es sollte 1,8-2,0 betragen. Größere Proteinmengen in der Lösung haben einen Anstieg der OD_{280nm} zur Folge. Somit wird das Verhältnis kleiner.

II.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient zur *in-vitro*-Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte. Hierzu werden spezifische Oligonukleotide (Primer), ein Nukleotid-Mix und die thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet. Die Primer hybridisieren antiparallel zueinander an die DNA-Stränge. Somit kann der gewünschte DNA-Abschnitt amplifiziert werden. Die PCR wird im *Thermocycler* durchgeführt. Sie beinhaltet die Denaturierung der DNA, das Anlagern der Primer (Annealing) und die Polymerase-Reaktion (Saiki, R.K. et al., 1988).

II.2.1.3.1 Reaktionsablauf im Thermocycler

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

Die Hybridisierungstemperatur der Primer richtet sich nach ihrem A/T- und G/C-Gehalt. Hierzu wird zunächst die Schmelztemperatur nach der 2 + 4-Regel (2 °C pro AT-bp, 4 °C pro GC-bp) berechnet. Die Hybridisierungstemperatur liegt 4 °C unter der Schmelztemperatur. So kann eine Anlagerung an unspezifische DNA-Abschnitte verhindert werden. Die Dauer der Polymerase-Reaktion richtet sich nach der Länge des DNA-Fragments. Innerhalb einer Minute können ca. 1000 Nukleotide eingebaut werden. Die Schritte 2 - 5 werden 36 x durchlaufen.

Die Trennung der Primer vom PCR-Produkt erfolgt durch eine Aufreinigung mit dem *QIAquick PCR Purification Kit*.

II.2.1.3.2 Gewinnung von Template-DNA für die PCR aus Bakterienkolonien

Bakterienkolonien (*E. coli* oder Neisserien) aus einer ÜN-Kultur auf Agar werden einzeln oder in Gruppen in 50 µl H₂O resuspendiert. Danach erfolgt das Erhitzen dieser

Suspensionen für 7 min bei 110 °C im Heizblock. Anschließend werden die Lösungen kurz bei 4.000 x g abzentrifugiert und auf Eis gestellt.

Aus dem Überstand werden 3 µl als Template für einen 100 µl PCR-Ansatz verwendet.

II.2.1.3.3 PCR mit der AmpliTaq[®] DNA-Polymerase

- 10 x PCR-Puffer:	- 500 mM KCl
	- 100 mM Tris-HCl, pH 8,3
	- 25 mM MgCl ₂
- 10 x Nukleotid-Mix	- je 2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
- AmpliTaq [®] DNA-Polymerase (5 U/µl)	
- Primer (0,2 mM)	

PCR-Ansatz:

- 10 – 20 ng Plasmid-DNA bzw. chromosomale DNA als Template
- 10 µl 10 x PCR-Puffer
- 6 µl MgCl₂ (Endkonzentration 1,5 mM)
- 10 µl dNTP (dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einer Endkonzentration von je 20 µM)
- 1 µl Primer A (Endkonzentration 2 µM)
- 1 µl Primer B (Endkonzentration 2 µM)
- 0,2 µl *Taq*-DNA-Polymerase
- ddH₂O ad 100 µl

Der Reaktionsansatz wird bei offenen Thermocyclern zum Schutz vor Verdunstung mit Mineralöl überschichtet

II.2.1.4 Gelelektrophoresen

II.2.1.4.1 Agarosegele

Die Auftrennung von DNA erfolgt über Elektrophorese in Agarosegelen. Die Konzentration der Agarose wird dabei in Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente gewählt; z. B.

- 0,8 % Agarose für 0,8 - 12 kb
- 1,0 % Agarose für 0,5 - 10 kb
- 1,5 % Agarose für 0,2 - 3 kb

Die abgewogene Agarosemenge wird in 1x TBE gelöst. Dabei wird der Ansatz in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wird die Lösung in horizontale Gelträger mit Gelkamm gegossen. Die DNA-Lösungen werden vor dem Auftragen mit GEBS verdünnt. GEBS enthält Bromphenolblau, das als Marker für die Lauffront dient. Als Größenstandard dient z.B. die *Smart-Ladder*. Die Elektrophorese erfolgt bei 100 - 200 V und RT. Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, werden die Gele ca. 10 min in eine Ethidiumbromidlösung (2 mg/l) gelegt und danach unter UV-Licht (302 nm) betrachtet und fotografiert. Aufgrund der konstanten Menge des verwendeten Größenmarkers kann die Menge der zu analysierenden DNA-Fragmente abgeschätzt werden.

II.2.1.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gele

II.2.1.4.2.1 Herstellen von SDS-Polyacrylamidgelen und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen werden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele in einer vertikalen Gelapparatur verwendet. Das Trenngel wird zunächst in den ca. 1,5 mm breiten Spalt zwischen zwei Glasplatten gegossen und anschließend mit Butanol überschichtet. Daraufhin polymerisiert das Trenngel und das Butanol kann wieder verworfen werden. Anschließend wird das Sammelgel oben aufgegossen und der Gelkamm eingesteckt. Nach dem Polymerisieren des Sammelgels wird der Gelkamm entfernt (Laemmli, U.K. et al., 1970).

MATERIAL UND METHODEN

<ul style="list-style-type: none"> - Acrylamid-Stammlösung - Ammoniumperoxidsulfatlösung (APS): - 4%iges Sammelgel (10 ml): - 12,5%iges Trenngel (60 ml): 	<ul style="list-style-type: none"> - 38 % (w/v) Acrylamid - 2 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid - 16 mg/ml Ammoniumperoxidsulfat in H₂O - 6,1 ml H₂O - 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH, 6,8 - 0,1 ml 10 % Natrium Dodecyl Sulfat - 1,3 ml 30 % Acrylamid/Bis - 50,0 µl 10 % APS - 10,0 µl TEMED - 19,08 ml H₂O - 15 ml Tris-HCl, pH 8,8 - 0,6 ml 10%iges SDS - 25,02 ml 30%iges Acrylamid/Bis - 0,3 ml 10%iges APS - 30,0 µl TEMED
---	---

Die Auftrennung der Proteinproben (je 10 µl Probe und 10 µl Marker pro Geltasche) erfolgt bis zum Ende des Sammelgels bei 10 mA, danach bei 20 mA. Als Molekulargewichtsmarker eignet sich die BenchMark™ Prestained Protein Ladder (Gibco Life Technologies, Karlsruhe).

II.2.1.4.2.2 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blue

Die aufgetrennten Proteine werden nach der Elektrophorese 30 min in Coomassie-Blue fixiert und angefärbt und anschließend das Gel 2 – 10 h in 10%iger Essigsäure wieder entfärbt (Ziltener, H.J. et al., 1988).

<ul style="list-style-type: none"> - Coomassie-Blue-Färbelösung 	<ul style="list-style-type: none"> - 2,0 g Coomassie brilliant blue R 250 - 0,5 g Coomassie brilliant blue G 250 - 425 ml EtOH abs. - 50 ml Methanol - 100 ml konz. Essigsäure - 425 ml H₂O
--	--

II.2.1.4.3 LPS-Gel

Im LPS- oder Tricin-Gel können Lipopolysaccharide unterschiedlicher Größe getrennt werden. Hierzu muss die LPS zunächst mittels Proteinase-K-Verdau aus den Bakterien herauspräpariert werden:

II.2.1.4.3.1 LPS-Schnellpräparation

Aus einer Übernachtskultur von Meningokokken auf GC-Agar (wobei die Hälfte der Agarplatten ca. 2 h vor dem Ausstreichen der Bakterien mit einer Lösung aus 500 µg 5'-CMP-NANA in 100 µl sterilem PBS behandelt wurde) werden die Kolonien der dritten Fraktion mit einem feuchten Tupfer abgenommen und in 1 ml 1x PBS eingerieben. Diese Suspension wird mit 1x PBS 1:10 verdünnt und die OD₆₀₀ gegen 1 x PBS gemessen. Danach wird eine OD₆₀₀ von 0,6 in 1 ml eiskaltem 1x PBS eingestellt. Die Bakterien werden nun 2 min. bei 13000 rpm und Raumtemperatur pelletiert und das Pellet in 50 µl Lysis-Puffer resuspendiert. Nach zehnmütigem Kochen bei 110°C wird die Suspension zum Abkühlen für weitere 10 min. in ein 60°C warmes Wasserbad gestellt. Zu einem Ansatz von 10 µl Suspension werden 25 µg Proteinase K hinzugegeben und 1 h bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Der fertige Verdau sollte danach sofort bei -20°C weggefroren werden (Hitchcock, P.J. und Brown, T.M., 1983).

- Lysis-Puffer:	- 2% SDS - 4% 2-Mercaptoethanol - 10% Glycerol - 1M Tris-HCl, pH=6,8 - Bromphenolblau
-----------------	---

II.2.1.4.3.2 Tricin-Gelelektrophorese

II.2.1.4.3.2.1 Gele

- Trenngel:	- 16,5%T/6%C - 2,5 ml AA/BA 49,5%T/6%C (≅ 46,5% - Acrylamid, 3,0% Bisacrylamid) - 1,5 ml Ampuwa
-------------	--

- Sammelgel:	<ul style="list-style-type: none"> - 2,5 ml Gelpuffer - 1,0 ml Glycerin 87% - 7,5 µl TEMED - 75 µl 10% APS - 4%T/3%C - 0,25 ml AA/BA 49,5%T/3%C (≅ 48,0% - Acrylamid, 1,5% Bisacrylamid) - 2,1 ml Ampuwa - 0,78 ml Gelpuffer - 3 µl TEMED - 30 µl 10% APS
--------------	--

II.2.1.4.3.2.2 Puffer

- Anodenpuffer:	- 0,2 M Tris HCl, pH=8,9
- Kathodenpuffer:	<ul style="list-style-type: none"> - 0,1 M Tris-HCl - 0,1 M Tricin, pH= 8,45 - 0,1% SDS
- Gelpuffer:	<ul style="list-style-type: none"> - 3,0 M Tris-HCl, pH=8,45 - 0,3% SDS
- Probenpuffer:	<ul style="list-style-type: none"> - 4% SDS - 12% Glycerin - 50 mM Tris-Base - 2% Mercaptoethanol - 0,01% Coomassie Blau

Die Gele werden wie für ein SDS-Page gegossen (s.o.). Um Proteinkontaminationen zu vermeiden, müssen die Glasplatten hier allerdings mit konz. Salpetersäure gereinigt und mit destilliertem Wasser nachgespült werden. Der Probenauftrag (Probe + Probenpuffer) erfolgt im Kathodenpuffer, d.h. zwischen den Glasplatten, außen wird der Anodenpuffer eingefüllt. Anschließend läßt man das Gel bei 30-50 V (10 mA) bis zum Sammelgel laufen und erhöht dann die Spannung auf 70-100 V (20-40 mA). Die Gesamtdauer beträgt ca. 4-6 h, bis der Farbmärker ausläuft (mod. nach (Schagger, H. und von-Jagow, G., 1987)).

II.2.1.4.3.3 Silberfärbung

Nach der Fixierung der Gele über Nacht und dreimaligem Waschen in 30% Ethanol werden sie für 5 min. in Oxidierer und dann für weitere 10 min. in Silberfärbelösung gelegt. Anschließend werden die Gele 3 x 10 min. mit Ampuwa gewaschen. Nun legt man die Gele solange in Formaldehydentwickler bis alle Banden sichtbar sind und stoppt die Reaktion dann mit 7 %iger Essigsäure ab. Wichtig ist, dass für jeden einzelnen dieser Schritte eine neue Schale verwendet wird.

- Fixierlösung:	- 50% Methanol
	- 12% Essigsäure
- Oxidierlösung:	- 150 µl 1,73 M Na ₂ S ₂ O ₃
	- 200 µl 37% Formaldehyd
	- ad 300 ml mit Ampuwa
- Silberfärbelösung:	- 200 µl 37% Formaldehyd
	- 12 mM AgNO ₃
	- ad 300 ml mit Ampuwa
- Formaldehydentwickler:	- 150 µl 37% Formaldehyd
	- 3 µl 1,73 M Na ₂ S ₂ O ₃
	- 0,57 M Na ₂ CO ₃
	- ad 300 ml mit Ampuwa

Die Gele werden nach Beendigung der Silberfärbung in 65% Methanol/ 5% Glycerin (87%) in Ampuwa getrocknet und schließlich in Einmachfolie fixiert.

II.2.1.5 Klonierungsmethoden

II.2.1.5.1 Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von DNA werden Restriktionsendonukleasen mit den dazugehörigen Puffern verwendet. Pro µg DNA, die in einer Stunde geschnitten werden soll, werden 1 - 2 Units Enzym eingesetzt. Zunächst wird der Ansatz in einem Reaktionsvolumen von normalerweise 10 µl für 1 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Um störende Einflüsse des Glycerins im Enzym zu vermeiden, sollte nicht mehr als 1 µl Enzym pro 10 µl-Ansatz eingesetzt werden. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von GEBS gestoppt.

Soll chromosomale DNA geschnitten werden, versetzt man 2 – 3 µg DNA mit 30 - 40 Units Enzym pro µg DNA und inkubiert diese über Nacht bei 37 °C.

II.2.1.5.2 Herstellung von doppelsträngigen Linkern aus Oligonukleotiden

Die gewünschten zwei Oligonukleotide werden in einer Konzentration von 1 µg/µl in 10 µl H₂O aufgenommen. Die Denaturierung erfolgt durch Erhitzen des Ansatzes für 10 min bei 70 °C im Heizblock. Zur Renaturierung zum doppelsträngigen Linker wird die Probe für 3 h bei 37 °C im Heizblock abgekühlt.

II.2.1.5.3 DNA-Ligation mit Fast-Link Ligase

Eine schnelle Ligation ermöglicht die Fast-Link Ligase (Fast Link Ligation Kit). Die Ligation findet in einem 15 µl Ansatz statt. Dieser enthält 1,5 µl ATP, 1,5 µl Reaktionspuffer und 1 µl Fast-Link Ligase (alle Reagenzien Epicentre Technologies). Die restlichen 11 µl werden auf Vektor und Insert aufgeteilt. Die Mengen von Vektor und zu ligierendem DNA-Fragment sollten dabei 50 – 100 ng betragen. Für Ligationen mit kohäsiven komplementären Enden (*sticky-end*-Ligationen) wird ein äquimolares Verhältnis von Vektor zu klonierendem DNA-Fragment gewählt, für stumpfendige (*blunt-end*) Ligationen ein molares Verhältnis von 1:3.

Die Ligationsreaktion findet für 15 min bei RT statt, dann wird der Ansatz für 15 min auf 70 °C erhitzt, um die Ligase zu inaktivieren.

II.2.1.5.4 Transformation von Bakterien

Die Fähigkeit von Bakterien, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen, bezeichnet man als Transformationskompetenz. Neben Bakterien mit natürlicher Transformationskompetenz (z. B. Neisserien, Pneumokokken, *Bacillus*) gibt es nicht-kompetente Bakterien (z. B. *E. coli*). Durch Veränderungen an der Zelloberfläche kann jedoch eine Kompetenz erreicht werden.

II.2.1.5.4.1 Transformation von Meningokokken

Meningokokken gehören zu den Bakterien mit natürlicher Kompetenz. Durch homologe Rekombination wird Fremd-DNA in die genomische DNA eingebaut.

Zur in-vitro-Transformation von Meningokokken wird eine Übernachtskultur auf GC-Agar angelegt. Anschließend werden die Kolonien abgeerntet, in 5 ml PPM⁺ resuspendiert und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die OD_{600nm} der Suspension wird auf 0,1 eingestellt. Der Transformationsansatz wird aus 1 ml dieser Verdünnung und 100 – 500 ng Plasmid-DNA hergestellt und für 6 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgt die Pelletierung durch Zentrifugation bei 6000 rpm über 5 min. und die Resuspension in 100 µl PPM⁺. Diese Suspension wird schließlich auf Antibiotika-haltigem GC-Agar ausplattiert und 24h bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert.

II.2.1.5.4.2 Transformation von *E. coli*

II.2.1.5.4.2.1 Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli*

Zunächst wird eine Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes angelegt. Diese wird in 50 ml Medium A 1:100 verdünnt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Hat diese Kultur die Mitte der exponentiellen Wachstumsphase erreicht (OD_{600nm} knapp unter 0,5), wird sie weitere 10 min bei 4 °C inkubiert. Danach wird die Kultur 10 min bei 4°C mit 1.500 x g abzentrifugiert. Das gewonnene Pellet wird anschließend in 0,5 ml eiskaltem Medium A resuspendiert, danach werden 2,5 ml eiskaltes Medium B zugegeben und vorsichtig gemischt. In Aliquots (z.B. 100 µl) können die kompetenten Zellen bei -70°C bis zur Weiterverwendung aufbewahrt werden (Fujisaki, S. et al., 1990).

- Medium A:	- LB-Medium
	- 10 mM MgSO ₄
	- 0,2% Glucose
- Medium B:	- LB-Medium
	- 10 mM MgSO ₄
	- 36% Glycerin
	- 12% PEG 7500

II.2.1.5.4.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Hierzu werden 100 µl kompetente Zellen eines *E. coli*-Stammes mit 0,1 - 1,0 µg Plasmid-DNA bzw. der entsprechenden Menge eines Ligationsansatzes (bis zu 20 µl)

gut vermischt und dann für 15-30 min auf Eis gestellt. Anschließend wird der Ansatz für 60 sec bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und für 1 – 2 min auf Eis abgekühlt (Kälteschock). Danach erfolgt die Zwischenzüchtung der transformierten Zellen für 45 – 60 min bei 37°C nach Versetzen mit 1 ml LB-Medium. Anschließend wird der Transformationsansatz für 30 sec in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl abpipettiert. Nach Resuspension der sedimentierten Zellen im verbleibenden 100 µl Überstand werden je 1 µl, 10 µl und 90 µl auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Platten werden dann über Nacht bei 37°C bebrütet (Cosloy, S.D. und Oishi, M., 1973).

II.2.1.5.4.2.3 Blue/White-Screening von *E. coli*-Klonen

Zur Selektion des richtigen Klons werden die Transformationsprodukte auf verschiedene LB-AIX-Platten (Ampicillin, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), X-Galactosid) ausgestrichen und über Nacht bebrütet. Nur *E. coli*, die das mit einer Ampicillin-Resistenz-Kassette ausgestattete Plasmid aufgenommen haben, können auf diesem Agar überleben. IPTG aktiviert den ebenfalls im Vektor vorhandenen lac-Promotor, der wiederum das *lacZ*-Gen anschaltet, welches für die β-Galactosidase kodiert. Die β-Galactosidase wandelt X-Gal in ein farbiges Produkt um. Durch den Einbau des Inserts in die Multiple cloning site des Vektors kann das *lacZ*-Gen nicht mehr abgelesen werden. Kolonien, in denen sich Klone befinden, die das richtige Plasmid eingebaut haben, bleiben daher weiß, während solche ohne dieses Plasmid eine blaue Farbe annehmen.

II.2.1.5.5 Automatisierte DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung kann mit dem automatischen Sequenzierungsgerät ABI Prism™ Sequencer 377 (Perkin Elmer) nach der Kettenabbruch- oder Didesoxy-Methode (Sanger, F. et al., 1977) mit Fluorochrom-markierter Didesoxy-Nukleinsäure erfolgen.

- Sequenzieransatz:	<ul style="list-style-type: none"> - 0,4 µg Plasmid-DNA oder 0,1 µg PCR-Produkt - 5 – 10 pmol Primer - 2 µl Sequenzier-Mix - ddH₂O ad 10 µl
---------------------	--

Reaktionsschritte der *Taq Cycle*-DNA-Sequenzierung:

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

Sind diese Schritte erfolgt, werden die Reaktionsansätze gefällt, in Probenpuffer aufgenommen und für 2 min bei 90°C hitzedenaturiert. Im Anschluss daran werden die Sequenzieransätze im Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe eines Laserscanners, der in das Sequenziergerät integriert ist, können nun das von den eingebauten Didesoxynukleotiden emittierte Fluoreszenzlicht und damit die verschieden langen DNA-Moleküle detektiert werden.

II.2.1.6 Anlegen von Meningokokken-Gefrierkulturen

Eine Flüssigkultur (PPM⁺) wird nach Bebrütung im Schüttler bei 37°C über Nacht auf eine OD_{600nm} von 0,1 verdünnt und anschließend wieder bis zu einer OD_{600nm} von 0,7 wachsen gelassen. Von dieser Kultur wird 1 ml abgenommen und 5 min. bei 6000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird in 700 µl PPM⁺ mit 300 µl Glycerin resuspendiert und anschließend bei -20°C weggefroren.

Eine zweite Möglichkeit ist das Einfrieren von Bakterien direkt von einer Agarplatte. Hierbei werden von einer Übernachtskultur auf GC-Agar mit einem Tupfer Kolonien aus der dritten Fraktion abgenommen, in 700µl PPM⁺ mit 300µl Glycerin resuspendiert.

II.2.1.7 Southern Blot – alkalischer Transfer

Der Southern Blot gehört zu den Hybridisierungsmethoden. Diese wurden zur Identifizierung spezifischer DNA- (Southern-Technik) oder RNA- (Northern-Technik) Fragmente entwickelt. Nachdem die DNA/ RNA aus den Zellen isoliert und aufgereinigt worden ist, erfolgt hierbei eine Hybridisierung mittels spezifischer Sonden, d.h. komplementäre Nukleotidsequenzen (DNA:DNA, RNA:RNA, DNA:RNA) treten

aufgrund der Wasserstoffbrückenbindungen miteinander in Kontakt. Hierdurch weisen die Methoden eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität auf. (Southern, E.M., 1975)).

II.2.1.7.1 Gelelektrophorese

Die durch Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA wird elektrophoretisch in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt.

II.2.1.7.2 Alkalischer Transfer

Durch 15minütige Inkubation in 0,25 M HCl wird die DNA denaturiert und anschließend durch 15minütige Inkubation in 0,4 M NaOH equilibriert. Der Kapillar-Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran erfolgt mit 0,4 M NaOH innerhalb von 2,5 h bei RT. Dabei verwendet man folgenden Aufbau: Auf einen Stapel Papierhandtücher werden 3 mit Plastikfolie umwickelte dünne Filter in der Größe des Geles gelegt. Nun folgt die ebenfalls in Gelgröße geschnittene Nylonmembran, auf die möglichst sorgfältig und luftblasenfrei das Gel gelegt werden sollte. Auf das Gel werden nochmals zwei dünne Filter geschichtet. Den Abschluss bildet eine Brücke aus dickem Filterpapier in der Breite des Gels, deren Enden in zwei Schalen mit Transferpuffer (0,4 N NaOH) reichen und die mit einer Glasplatte beschwert wird. Wichtig ist, dass alle Filterpapiere und die Nylonmembran vor der Verwendung in 0,4 N NaOH getränkt werden.

Nach dem Blotten werden die Taschen auf der Nylonmembran markiert, die Membran wird zweimal 10 min in 2 x SSC gewaschen und anschliessend luftgetrocknet. Die DNA wird durch UV-Vernetzung (100 mJ) (UV-Linker) auf die Membran fixiert.

II.2.1.7.3 Markierung spezifischer DNA-Sonden mit Digoxigenin

Eine Möglichkeit der nicht-radioaktiven Markierung aufgereinigter und linearisierter DNA ist die Digoxigenin-Markierung mit dem *DIG-DNA Labeling Kit-random primed* (Roche).

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

Es können jeweils 10 ng bis 3 μg lineare DNA markiert werden. Hierfür wird die DNA (15 μl) zunächst durch 10minütiges Erhitzen auf 95°C und schnelles Abkühlen im Eisbad denaturiert. Danach erfolgt die Zugabe von 2 μl Hexanukleotid-, 2 μl dNTP-Markierungsgemisch sowie 1 μl Klenow-Enzym. Der Ansatz wird bei 37°C über Nacht inkubiert. In dieser Zeit wird DIG-11-dUTP in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Anschließend wird die Reaktion mit 2 μl EDTA (0,2 M, pH 8,0) gestoppt und die DNA durch Zugabe von 3 μl 3 M Na-Acetat und 75 μl eiskaltem 100%igem Ethanol 30 min bei -70°C präzipitiert. Im Anschluss erfolgt eine 30minütige Zentrifugation bei 4°C (15.000 x g, Biofuge 15R), das Auswaschen des Sediments mit kaltem 70%igem Ethanol und die Vakuumtrocknung. Schließlich wird das Pellet in 50 μl TE resuspendiert. Wird die markierte DNA bei -20 °C aufbewahrt, kann sie bis zu bis zu sechsmal als Sonde verwendet werden.

Der Vergleich mit einer DIG-markierten Kontroll-DNA ermöglicht mittels Dot Blot und *DIG-Luminescent Detection Kit* eine Abschätzung der Reaktionsausbeute.

II.2.1.7.4 Hybridisierung mit einer DIG-DNA-Sonde und DIG-Nachweis mit CSPD

Zunächst wird die Nylonmembran 1 h bei 42°C in High SDS buffer vorhybridisiert. Danach erfolgt die Hybridisierung mit der vorbereiteten DNA-Sonde über Nacht bei 42°C. Nach dem Abgießen werden Reste der Sonde 2 x 5 min. bei Raumtemperatur mit 2,0 x SSC + 0,1% SDS und weitere 2 x 15 min. bei 68°C mit 0,1 x SSC + 0,1% SDS abgewaschen.

Nun folgt eine Reihe von Entwicklungsschritten zum DIG-Nachweis:

1. Waschpuffer:	1-5 min
2. Puffer 2:	30 min
3. Anti-DIG-AP in Puffer 2 (1:10.000):	30 min
4. Waschpuffer:	2 x 15 min
5. Puffer 3:	2 x 5 min
6. CSPD in Puffer 3 (1:100):	5 min

Anschließend wird der Blot in Plastikfolie gewickelt und ca. 15 min. bei 37°C inkubiert. Zum Schluss wird ein Röntgenfilm je nach Alter der CSPD-Lösung 1-30 min. bei RT aufgelegt und entwickelt (Southern, E.M., 1975).

- High SDS buffer	- 10,50 g SDS	
	- 75,00 ml Formamid	
	- 37,50 ml 20 x SSC	
	- 7,50 ml Na ₃ PO ₄ 1 M pH 7,0	
	- 1,50 ml 10% N-Lauroylsarkosin	
	- 30,00 ml 10% Blocking-Reagenz	
- Puffer 1	- 0,1 M Maleinsäure	pH 7,5
	- 0,15 M NaCl	
- Puffer 2	- Puffer 1	
	- 1% Blockingreagenz	
- Puffer 3	- 0,1 M NaCl	pH 9,5
	- 0,1 M Tris	
- Waschpuffer	- Puffer 1	
	- 0,3% Tween	

II.2.1.8 Western Blot (Immunoblot)

Beim Westernblot können gelelektrophoretisch aufgetrennte und auf eine Trägermembran transferierte Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert werden.

II.2.1.8.1 Präparation der Gesamtzellproteine von *Neisseria meningitidis*

Zur Proteingewinnung werden Bakterien aus einer ÜN-Kultur auf GC-Agar in 1 ml PBS eingerieben und auf eine OD_{600nm} von 1,0 eingestellt. Im Anschluss daran werden die Ansätze 2 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Nach Abnahme der Überstände werden die Neisserien in 100 µl PBS und 25 µl 5 x Lämmli-Puffer resuspendiert, 10 min bei 100 °C im Heizblock erhitzt und dann sofort auf Eis gestellt.

II.2.1.8.1.1 SDS-Page

Zur Auftrennung der Proteine verwendet man eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Um die Banden später sichtbar zu machen, wird ein Gel mit Coomassie Blue gefärbt (Vorgehen SDS-Page und Färbung s.o.).

II.2.1.8.1.2 Immunoblot

II.2.1.8.1.2.1 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Semi-Dry-Blotting)

Zunächst werden die Graphitplatten der Blot-Kammer mit H₂O gespült. Danach werden 6 Lagen Whatmanpapier in Anodenpuffer I getränkt und auf die Anodenplatte der Blot-Kammer gelegt. Drei weitere Lagen Whatman-Papier werden mit Anodenpuffer II getränkt und darüber gelegt. Anschließend wird eine entsprechend große Nitrozellulosemembran zugeschnitten, mit Wasser befeuchtet und auf die Filterpapierlagen aufgezogen. Dann wird das SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran aufgebracht, wobei darauf zu achten ist, dass keine Luftblasen entstehen. Abschließend wird das Gel mit 9 Lagen in Kathodenpuffer getränktem Whatman-Filterpapier bedeckt und die Blot-Kammer mit der obenliegenden Kathodenplatte geschlossen. Der Proteintransfer wird mit 0,9 mA/cm² 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt (Western-Blot (Towbin, H. et al., 1979)).

- Anodenpuffer I:	- 300 mM Tris, pH=8,0 - 20 % Methanol
- Anodenpuffer II:	- 25,0 mM Tris, pH=8,0 - 20 % Methanol
- Kathodenpuffer:	- 25,0 mM Tris, pH=8,0 - 40,0 mM ϵ -Amino-n-Caprinsäure - 20 % Methanol

II.2.1.8.1.2.2 Entwicklung des Immunoblots mit Antikörpern

Antikörper:

- Erste Antikörper:	- Opa-Ak. 4B17/C11 1:1.000 - Opc-Ak. B306 1:1.000 - Pili-Ak. SM-1 1:100 - In 1 x PBS mit 0,1 % Tween und 1 % Magermilch
- Zweiter Antikörper:	- Alkalische-Phosphatase-markierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper 1:1000 in 1 x PBS und 0,1 % Tween

Nach Abschluss des Proteintransfers und Entnahme der Membran werden noch freie Bindungsstellen durch einstündiges Schütteln in einer PBS/BSA (2 %ige)-Lösung abgesättigt. Anschließend erfolgt die Inkubation der Membran in PBS/BSA mit dem ersten Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wird die Membran dreimal je 5 Minuten mit PBS/BSA (2 %) gewaschen und schließlich 1 h in PBS/BSA (2 %) mit dem Alkalische-Phosphatase-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Nach nochmaligem Waschen (3 x 5 min mit PBS/BSA (2 %)) erfolgt für 20 min die Färbung der markierten Proteine in Entwicklerlösung. Die Färbereaktion wird durch Waschen mit H₂O unterbrochen.

- 1 x PBS:	- 50 mM NaCl - 16,0 mM Na ₂ HPO ₄ - 4,0 mM NaH ₂ PO ₄ - pH 7,3
- PBS/BSA:	- 1 x PBS - 2,0 % BSA (Fraktion V)
- Entwicklerlösung:	- 9 ml 0,1 M Tris-HCl, pH=9,6 - 20 µl 2 M MgCl ₂ - 1 ml NBT (Nitroblau Tetrazolium (1 mg NBT in 1 ml 0,1 M Tris-HCl, pH=9,6)) - 100 µl BCIP (5-Brom-4-Chlor-3 Indolylphosphat (5 mg BCIP in 1 ml 0,1M Tris-HCl, pH=9,6))

II.2.2 Assays

II.2.2.1 Bakterien-Wachstumskurve

Die Erstellung einer Wachstumskurve dient der vergleichenden Darstellung der Wachstumspotenz von Wildtyp-Bakterien und genetisch veränderten Mutanten. Die zu testenden *N. meningitidis*-Stämme werden in 5 ml PPM⁺ angeimpft und im Schüttler bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von ca. 1,0 wachsen gelassen. Danach werden die Kulturen auf eine OD_{600nm} von 0,1 in 5ml PPM⁺ verdünnt und weiter inkubiert, wobei in gleichmäßigen Zeitabständen die OD_{600nm} gemessen wird.

II.2.2.2 Bakterizidie-Assay

Im Bakterizidie-Assay können Wildtyp-Bakterien und Mutanten hinsichtlich ihrer Resistenz gegen erschwerte Umweltbedingungen (wie durch Zugabe von humanem Serum) verglichen werden. Die gewünschten *N. meningitidis*-Stämme werden in 5 ml PPM⁺ mit 5 µg/ml CMP-NANA eingerieben und im Schüttler bei 37°C so lange inkubiert, bis sie eine OD_{600nm} von ungefähr 1,0 aufweisen. Danach werden die Kulturen auf 1 x 10⁶ Bakterien/ml verdünnt. In 3 verschiedene Tubes werden jeweils 100 µl Kultur pipettiert. Dazu werden unterschiedliche Mengen an humanem Serum gegeben und mit PPM⁺ und CMP NANA (Konz. s.o.) auf ein Volumen von 1 ml

aufgefüllt. Zu den Zeitpunkten 0, 30 und 60 min. werden jeweils 100 µl aus jedem Tube abpipettiert und auf GC-Agar ausplattiert. Weitere 100 µl werden für eine Verdünnungsreihe (in PBS) mit Verdünnungen von 10^{-1} und 10^{-2} verwendet, von denen ebenfalls jeweils 100 µl ausplattiert werden. Die Agarplatten werden über Nacht bei 37°C bebrütet und die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

II.2.2.3 Versuche mit Hep-2 Epithelzellen

II.2.2.3.1 Infektion von Hep2-Zellen mit *N. meningitidis*-Stämmen

Die Zellen werden für den Infektionsversuch mit einer Dichte von 1×10^5 pro Well ausgesät (s.o.). Nach zwei Tagen ist die Zellzahl in den Wells ca. 5×10^5 . Die Infektion mit *N. meningitidis* erfolgt mit einer MOI (Multiplicity of Infection) von 1,0 in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS. Von der Bakterienkultur wird durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen auf GC-Agar die CFU bestimmt.

II.2.2.3.2 Adhäsionsassay

Nach einer geeigneten Inkubationszeit werden die Überstände aus den wells in PBS verdünnt und auf GC-Agar ausplattiert. Nach Abnahme der Überstände werden die Hep-2 Zellen mit den daran haftenden Neisserien 3 x mit PBS gewaschen, dann 5 min bei RT mit 1 % Saponin inkubiert, um die Hep-2 Zellen zu lysieren und Verdünnungsreihen auf GC-Agar ausplattiert

II.2.2.3.3 Invasionsassay

Nach einer geeigneten Inkubationszeit werden die für den Invasionsversuch vorgesehenen wells mit 1 ml RPMI 1640 und 100 µg/ml Gentamycin versetzt, um alle extrazellulären Bakterien abzutöten. Nach einer weiteren Stunde werden die Überstände abgesaugt und verworfen, die Zellen dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen, für 1 min mit 1 % Saponin lysiert, in PBS verdünnt und die Verdünnungsreihen auf GC-Agar ausplattiert.

Die Agarplatten werden ÜN bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre inkubiert. Am nächsten Tag wird die Koloniezahl auf den Platten ausgezählt und so die Zahl der adhärenenten Neisserien, der Neisserien im Überstand und der invasiven Neisserien bestimmt. Die Experimente wurden zumindest zweimal durchgeführt.

II.2.2.4 Versuche mit Hbmec-Zellen

Die Zellen werden für den Infektionsversuch mit einer Dichte von 1×10^5 pro Well ausgesät (s.o.). Nach zwei Tagen ist die Zellzahl in den Wells ca. 5×10^5 . Die Endothelzellen werden gewaschen und zu RPMI-1640 mit 10 % NHS (nach 30 minütiger Hitzeinaktivierung bei 56°C) gegeben. Danach werden sie mit einer MOI von 1 infiziert. Die Platten werden nun für 6 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Von der Bakterienkultur wird durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen auf GC-Agar die CFU bestimmt.

Adhäsions- und Invasionsassays wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

II.2.2.5 Versuche mit Dendritischen Zellen (DC-s)

II.2.2.5.1 Infektion von DC-s mit *N. meningitidis*-Stämmen

Die DC-s werden in einer Dichte von 3 bzw. 5×10^5 Zellen/ml und Well in 24 Well plates ausgesät. Die Infektion erfolgt in RPMI-1640-Medium mit 1 % autologem Plasma (30 min. bei 56°C inaktiviert) mit einer MOI von 1. Die Kulturen werden bei 37°C für 6 h inkubiert, bevor die Zahl der adhärenenten und invasiven Neisserien bestimmt wird. Die Anzahl der nicht-adhärenenten Neisserien wird durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen aus den Überständen der DC auf GC Agar und ÜN-Bebrütung bei 37°C und 5 % CO_2 Atmosphäre festgestellt (Unkmeir, A. et al., 2002 (a)).

Adhäsions- und Invasionsassays wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

II.2.2.5.2 Assay zur Detektion antibakteriell wirksamer Substanzen

Dieser Versuch dient dem Nachweis von eventuell durch die DC-s gebildeten antibakteriell wirksamen Substanzen und deren Einfluss auf das Bakterienwachstum.

DC-s werden mit einer Zelldichte von 5×10^5 /well in RPMI 1640 und 1% autologem humanem Plasma kultiviert. Ein Teil der DC-s wird mit wildtypischen bzw. kapseldefizienten Stämmen von *N. meningitidis* infiziert. Nach einer Inkubation von 8 h werden die Überstände abgenommen und zur Entfernung von DC-s und Meningokokken zentrifugiert. Überstände der dendritischen Zellen, die mit Meningokokken infiziert waren, werden außerdem drei Zyklen von Gefrieren bei -70°C und Auftauen bei 37°C unterzogen, um noch vorhandene Meningokokken abzutöten.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Abtötung aller Meningokokken wird ein Teil der Überstände auf GC-Agar ausplattiert.

Von einer Übernachtskultur von Wildtyp und kapseldefizientem Meningokokkenstamm auf GC-Agar werden mit einem Tupfer Kolonien abgenommen und in 5 ml PPM⁺ resuspendiert. Im Schüttler lässt man die Bakterien bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von ca. 1,0 wachsen und verdünnt sie dann bis zu einer OD_{600nm} von 0,1 in folgenden Nährmedien:

- Überstand (Wildtyp) + PPM⁺ (50/50)
- Überstand (Mutante) + PPM⁺ (50/50)
- Überstand (nicht infizierte DC-s) + PPM⁺ (50/50)
- RPMI 1640 + PPM⁺ (50/50)
- PPM⁺ (Kontrolle)

Die Kulturen werden weiter im Schüttler inkubiert. Nach Die OD_{600nm} wird zum Zeitpunkt 0 und nach 50, 100, 150 und 200 min. gemessen.

II.2.2.5.3 Zytokin-ELISA

Um die von den DC-s nach Infektion mit *N. meningitidis* in die Überstände abgegebenen Zytokine und Chemokine quantifizieren zu können, verwendet man einen ELISA. Die Überstände werden 6 h und 20 h nach Infektion abgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C aufbewahrt. Bei den Überständen, die nach 20 h abgenommen werden, ist zu beachten, dass bereits nach 6 h 1% Penicillin-Streptomycin-Gemisch zu den wells hinzugefügt wird, um ein unkontrolliertes Wachstum der Bakterien und damit die Lyse der DC-s zu vermeiden.

Für die Konzentrationsbestimmung von TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 wurden die OptEIA human cytokine sets (BD Pharmingen, Heidelberg) verwendet. Test-Sets wurden gemäß den Herstellerangaben mit einer Sensitivität von 4 pg/ml etabliert. Für alle ELISA-Systeme wurde das TMB Substrat Reagenz Set (BD Pharmingen, Heidelberg) benutzt, um die Horseradish-peroxidase-reaction nachzuweisen. Alle Überstände wurden zweimal getestet. Die Quantifizierung der Zytokine mittels ELISA

wurde von Ulrike Kämmerer et al., Universitätsklinik für Frauenheilkunde, Würzburg durchgeführt.

II.2.2.5.4 Flow-Zytometrie

Zur Detektion der Expression von DC-Reifemarkern in nicht infizierten und infizierten dendritischen Zellen kann die Flow-Zytometrie verwendet werden. Die Versuche wurden von Annette Kolb-Mäurer et al., Lehrstuhl für Mikrobiologie, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg durchgeführt. Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden monoklonale Maus-Antikörper benutzt und durch Phycoerythrin-beladene Anti-Maus-Immunglobuline detektierbar gemacht. Folgende primäre Antikörper wurden benutzt: Anti-MHC-II-DR (L243), Anti-MHC-II-DR/DQ (9.3F10) (ATCC, Manassas, Va.), CD 25 (Klon MA251, Pharmigen, Hamburg), CD 80 (Pharmigen), CD 83 (HB15a, Immunotech, Hamburg), CD 86 (IT2.2, Pharmigen). Die markierten Zellen wurden mit EPICS XL-MCL (Coulter Immunotech Diagnostics, Krefeld) analysiert.

III. ERGEBNISSE

III.1 Herstellung der *lst*-Deletionsmutante und Nachweis der Deletion

Für die Herstellung der *lst*-Deletionsmutante von *N. meningitidis* war es notwendig, den up- und downstream-Bereich des zu deletierenden Gens direkt nebeneinander in die Multiple cloning site (MCS) eines Plasmids mit einer *N. meningitidis* uptake sequence zu klonieren. Danach konnte die Transformation dieses Plasmids in *N. meningitidis* erfolgen. Durch den reziproken Austausch des Gens und seiner angrenzenden Bereiche mit dem up- und downstream-Bereich im Plasmid sollte das Bakterium dieses Gen verlieren.

Zu diesem Zweck wurde zunächst sowohl der up- als auch der downstream-Bereich des *lst*-Gens mit den Primerpaaren *lstupstreamF* und *lstupstreamR* für den upstream-Bereich sowie *lstdownstreamF* und *lstdownstreamR* für den downstream-Bereich amplifiziert. Als Template wurde genomische DNA des *N. meningitidis* B-Stammes MC58 verwendet. Das PCR-Produkt des downstream-Bereichs und der Vektor pTL1 wurden danach jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XhoI* gespalten. Daraufhin erfolgte die Ligation des *lst*-downstream-Inserts in die MCS von pTL1. Sowohl das fertige Plasmid als auch eine Ligationskontrolle ohne Insert wurden jeweils in den *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert. Klone, die das gewünschte Plasmid aufgenommen hatten, wurden mittels Blue/White-Screening selektiert. Der fehlerlose Einbau wurde durch eine Sequenzierung mit den Primern KB9 bzw. 329 überprüft.

Aus Klon P5, der sich als korrekt erwies, wurde die Plasmid-DNA isoliert und als Vektor für den Einbau des upstream-Inserts verwendet. Der upstream-Bereich des *lst*-Gens und das Plasmid P5 wurden zuerst mit *XhoI*, dann mit *KpnI* geschnitten.

Die Transformation des neuen Plasmids erfolgte wiederum in die kompetenten DH5 α -Bakterien. Ein Blue/White-Screening zur Klonselktion war nun nicht mehr möglich. Daher wurden die gewünschten Klone mittels Gruppen- und Einzelscreen-PCR mit den Primerpaaren *lstupscreenR* und KB9 (upstream-Bereich) sowie *lstdownscreenF* und 329 (downstream-Bereich) identifiziert.

Nach der Plasmidextraktion wurden die in Frage kommenden Plasmide zum einen mit *EcoRI* und *KpnI*, zum anderen mit *XhoI* und *KpnI* geschnitten und die Größe als

weiterer Hinweis auf die Richtigkeit der Klone im Agarosegel beurteilt. Endgültige Sicherheit brachte auch hier die Sequenzierung mit dem Primer KB9, die eine 100%ige Sequenzhomologie nachwies.

Für die Transformation der Neisserien arbeiteten wir mit dem Plasmid pAS7 (A7) weiter. Die Transformation erfolgte in drei verschiedenen Kulturmedien: PPM⁺, PPM⁺ + 1% MgSO₄ und PPM⁺ + 1% Glucose. Auch hier wurden die richtigen Klone zunächst mittels Gruppenscreen-PCR vorselektiert (Primer Istdelationcontrol und Istunderdown) (Abbildung 3).

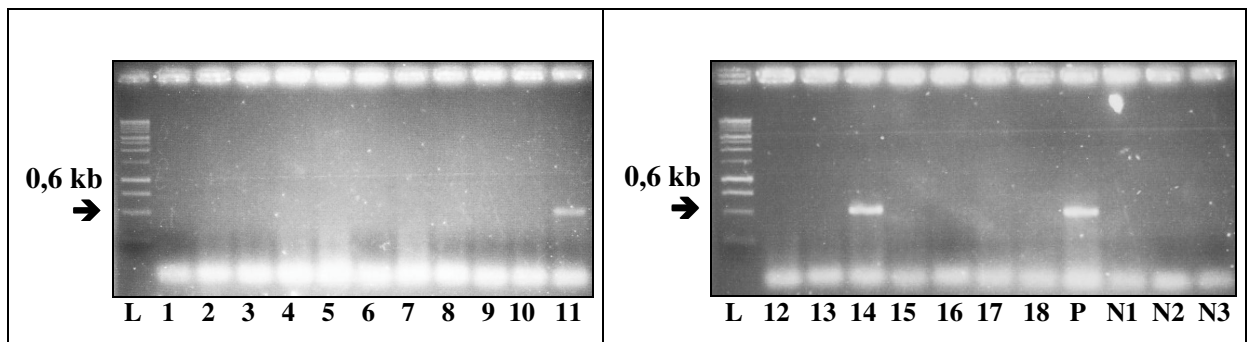


Abbildung 3: Gruppenscreen-PCR zum Auffinden der *Ist*-Deletionsmutante.

Klone 1-55.

Von links nach rechts:

Klone 56-90, Positivkontrolle, 3 Negativkontrollen,

Von links nach rechts:

L	Smartladder	L	Smartladder
1	1-5	12	56-60 PPM ⁺ 6h
2	6-10 PPM ⁺ 3h	13	61-65
3	11-15	14	66-70 MgSO ₄ 6h
4	16-20	15	71-75
5	21-25 MgSO ₄ 3h	16	76-80
6	26-30	17	81-85 Glc 6h
7	31-35	18	86-90
8	36-40 Glc 3h	P	Positiv = Lysat von in früheren PCRs positiv getestetem Klon
9	41-45	N	Negativ 1 = Lysat MC58 WT
10	46-50 PPM ⁺ 6h	N	Negativ 2 = genom. DNA MC58 WT
11	51-55	N	Negativ 3 = H ₂ O

III.1.1 Einzelscreen-PCR mit Insert- und Genkontrolle

Der erste Deletionsnachweis wurde mittels PCR geführt, was gleichzeitig zur Identifizierung der richtigen Mutante direkt nach der Transformation diente. Jeder einzelne Klon aus den in Frage kommenden Gruppen 11 und 14 wurde auf den Einbau

des Inserts überprüft. Die Herstellung der Template-DNA erfolgte wie beim Gruppenscreen. Als Primer wurden wiederum *Istdeletioncontrol* und *Istunderdown* benutzt. Bei einer Transformationsfrequenz von 6,7% konnten wir zwei voneinander unabhängige Deletionsmutanten 55 und 70 ermitteln. Danach sollte eine zweite PCR verifizieren, dass das *lst*-Gen bei der Transformation tatsächlich deletiert wurde. Als Primer dienten hierfür *IstgeneF* und *IstgeneR*, durch die beim Wildtyp das *lst*-Gen amplifiziert werden kann. Bei den Klonen 55 und 70 konnten keine Banden nachgewiesen werden (Abbildung 4).

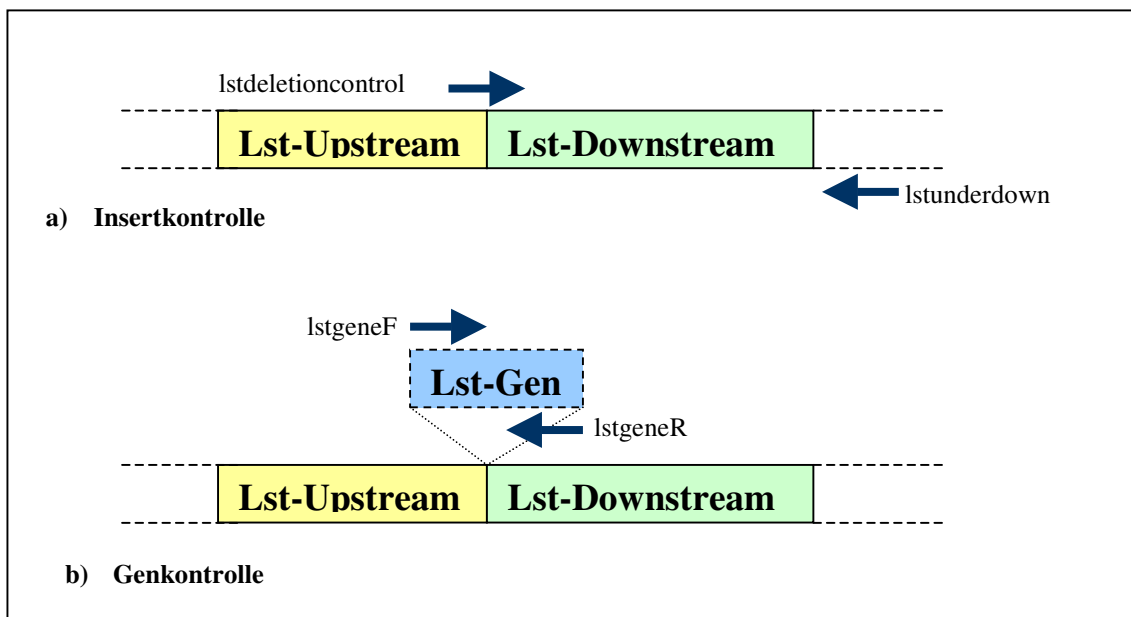


Abbildung 4: Angriffspunkte der Primer zur Insertkontrolle und Genkontrolle

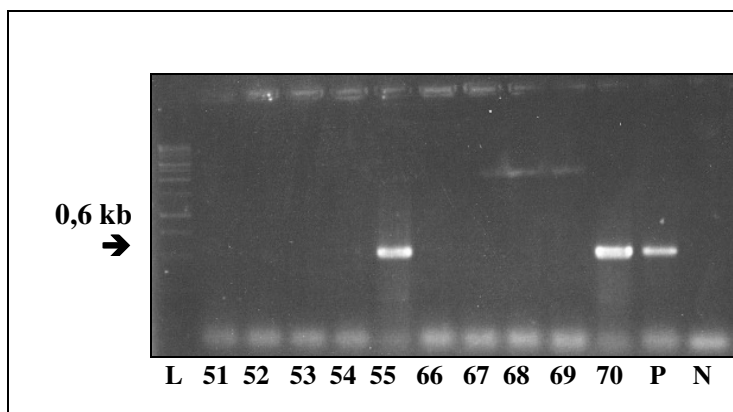


Abbildung 5: Einzelscreen-PCR zur Kontrolle des Inserts. Die Klone der im Gruppenscreen positiven Gruppen 11 (51-55) und 14 (66-70) wurden einzeln geprüft. Von links nach rechts: Smartladder, 51, 52, 53, 54, 55, 66, 67, 68, 69, 70, Positivkontrolle (Lysat von in früheren PCRs positiv getestetem Klon), Negativkontrolle (H₂O)

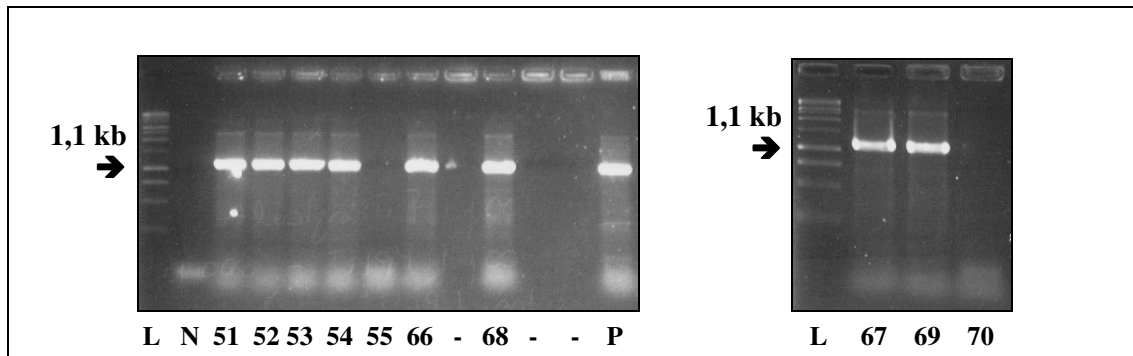


Abbildung 6: Einzelscreen-PCR zur Kontrolle des Gens.

Die Klone der im Gruppenscreen positiven Gruppen 11 (51-55) und 14 (66-70) wurden einzeln geprüft.

Von links nach rechts:

Smartladder, Negativkontrolle (H₂O), 51, 52, 53, 54, 55, 66, leer, 68, leer, leer, Positivkontrolle (Lysat von in früheren PCRs positiv getestetem Klon), 1kB-Ladder, 67, 69, 70

Für die weiteren Versuche stellten wir zusätzlich eine kapsellose Insertionsmutante unseres Klons 55 her. Dazu wurde eine Chloramphenicol-Resistenzkassette in *siaD* (kodiert für die α -2,8-Polysialyltransferase) von MC58 *lst*(55) transformiert (Plasmid pGH15).

III.1.2 Southern Blot

Eine weitere Möglichkeit, die Deletion eines Gens nachzuweisen, ist der Southern Blot. Mit Hilfe von spezifischen DNA-Sonden können hiermit bestimmte Abschnitte im Genom markiert und auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Für den Blot verwendeten wir jeweils eine Sonde für das *lst*-Gen und eine für den downstream-Bereich von *lst*. Zur Herstellung der Sonden fertigten wir die PCR-Produkte aus der genomischen DNA von MC58 und den Primern *lst*geneF und -R für das *lst*-Gen bzw. *lst*downstreamF und -R für den *lst*-downstream-Bereich an. Die DNA wurde danach mittels des DIG-DNA Labeling Kits mit Digoxigenin-dNTP-s markiert.

Nach der Isolierung der genomischen DNA wurde die DNA des Wildtyps MC58 und der beiden Mutanten 55 und 70 mit *Eco*RI geschnitten und die entstandenen Stücke in einem Ethidiumbromidgel aufgetrennt. Als Größenmarker wurde der DNA-Molekulargewichtsmarker II, DIG-markiert, (DIG II) verwendet. Die DNA wurde dann auf Nitrozellulose geblottet und mit den vorbereiteten Sonden markiert. Anschließend erfolgte die Aktivierung des Digoxigenin mit CSPD.

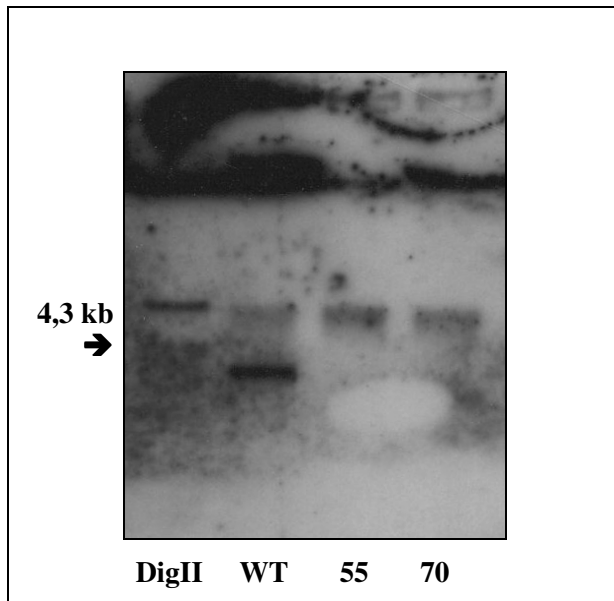


Abbildung 7: Southernblot mit der *lst*-Gen-Sonde.
 Von links nach rechts:
 Dig II-Marker, MC58 Wildtyp, *lst*- Deletionsmutanten
 55 und 70

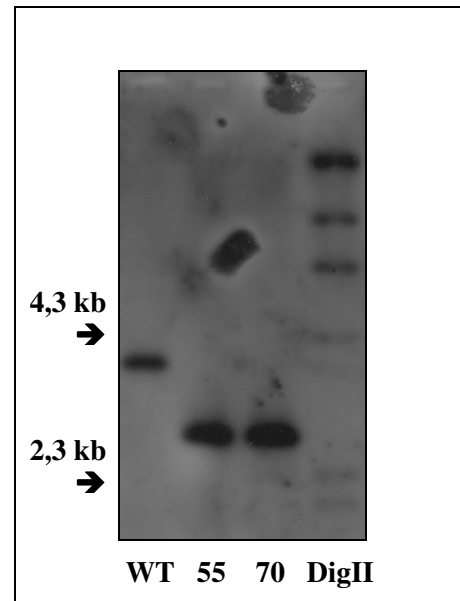


Abbildung 8: Southernblot mit der
 Sonde für den *lst*-downstream-Bereich.
 Von links nach rechts:
 MC58 Wildtyp, *lst*- Deletionsmutanten
 55 und 70, Dig II-Marker

In Abbildung 7 kann man deutlich erkennen, dass bei dem mit der *lst*-Gen-Sonde behandelten Blot nur beim Wildtyp MC58 eine Bande erscheint, was zeigt, dass nur hier noch das *lst*-Gen vorhanden ist. In

Abbildung 8 hingegen sind bei allen drei *N. meningitidis*-Stämmen Banden zu erkennen, da der *lst*-downstream-Bereich überall vorhanden ist. Allerdings laufen die durch Spaltung mit *EcoRI* entstandenen DNA-Stücke im Gel mit unterschiedlichen Banden des Größenmarkers. Die Klone 55 und 70 sind demnach um ungefähr 1,5 kB kleiner, was sich durch den Verlust des *lst*-Gens erklären lässt.

III.1.3 Tricin-Gel

Da *N. meningitidis* durch den Verlust des *lst*-Gens seine Fähigkeit zur Sialylierung des LOS einbüßt, ist der Nachweis der Deletion auch durch die Untersuchung von Wildtyp und Mutanten auf ihre LOS-Sialylierungsfähigkeit möglich. Dieser Deletionsbeweis wurde mit Hilfe eines Tricin-Gels erbracht. Der Wildtyp MC58, die beiden *lst*-Deletionsmutanten 55 und 70 sowie die durch den Einbau einer Chloramphenicol-Resistenzkassette in *siaD* von Klon 55 entstandene kapsellose Mutante wurden jeweils auf GC-Agar mit und ohne Zugabe von CMP-NANA (als Substrat für die LOS-

Sialylierung) ausgestrichen und über Nacht bebrütet. Zwar sind Meningokokken der Serogruppe B auch in der Lage, CMP-NANA über *siaA* - *siaC* endogen herzustellen (Mandrell, R.E. et al., 1991), allerdings können Veränderungen im Gel nach Wachstum der Stämme auf mit CMP-NANA versetztem Nähragar besonders gut sichtbar gemacht werden. Die Lipooligosaccharide wurden mittels LPS-Schnellpräparation aus den Bakterien herausgelöst und auf ein Tricin-Gel gebracht. Nach der Fixierung des Gels wurden die Banden schließlich durch eine Silberfärbung kenntlich gemacht.

Abbildung 9 zeigt das silbergefärbte Tricingel:

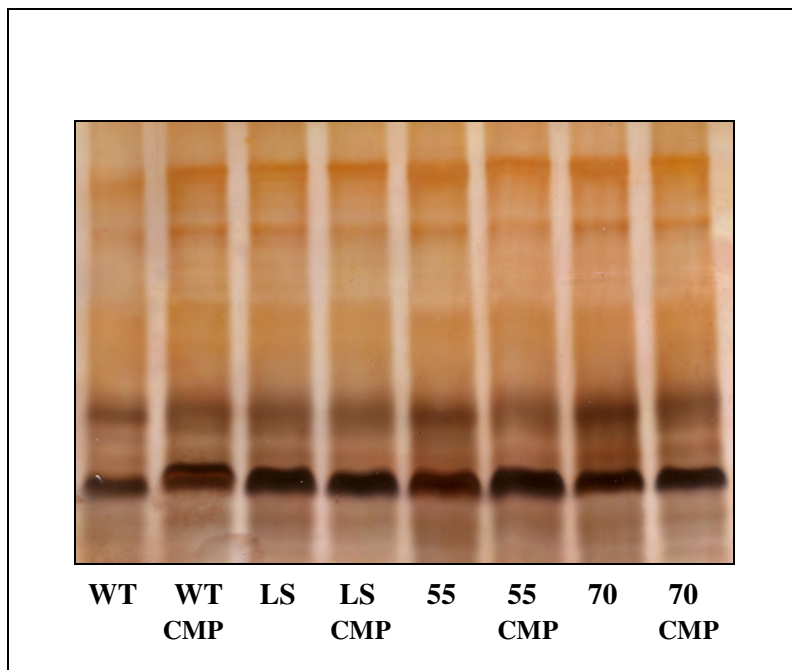


Abbildung 9: Tricingel

Von links nach rechts:
 MC58 Wildtyp (WT);
 MC58 WT+ CMP-NANA
 (WT CMP); MC58 *siaD*⁻,
lst⁻ (LS); MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻
 +CMP-NANA (LS CMP),
 MC58 *lst*⁻ (55); MC58 *lst*⁻
 (55)+ CMP-NANA (55
 CMP); MC58 *lst*⁻ (70);
 MC58 *lst*⁻ (70)+ CMP-
 NANA (70 CMP)

Es ist deutlich zu erkennen, dass es ausschließlich beim Wildtyp nach CMP-NANA-Behandlung zu einem sogenannten Bandenshift, also zum Auftreten zweier, nahe beieinander liegender Banden kommt. Dies ist dadurch zu erklären, dass ein erheblicher Teil des LOS sialyliert und damit schwerer ist. Dieser Teil des LOS läuft im Gel dann nicht so weit wie das darüber hinaus noch vorhandene nicht sialylierte LOS.

III.1.4 Charakterisierung der Mutante

III.1.4.1 Überprüfen der Oberflächenproteine mittels Westernblot

Ob die wesentlichen Oberflächenproteine in ihrer ursprünglichen Form nach der Transformation erhalten geblieben waren, sollte ein Westernblot zeigen. Dafür wurden der Wildtyp MC58 (MC58 WT), die *lst*-Deletionsmutanten 55 und 70 (MC58 *lst*⁻ 55

und 70) und die oben bereits erwähnte, aus dem Klon 55 hervorgegangene kapsellose Mutante (MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻) über Nacht auf GC-Agar bebrütet und dann einer Präparation der Gesamtzellproteine unterzogen. Nach der Auftrennung der Proteine in einem SDS-Polyacrylamid-Gel und dem Blotten auf Nitrocellulose wurden die Antikörper gegen Opa, Opc und Pili jeweils zu einer Membran gegeben. Die alkalische Phosphatase des hinzugefügten zweiten Antikörpers (Alkalische-Phosphatase-markierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper) wandelte das BCIP der Entwicklerlösung in die dephosphorylierte Form (blau) um und reduzierte NBT, so dass ein schwerlöslicher violetter Niederschlag entstand. Dies führte zu einer blauviolettten Färbung der Antikörper-markierten Banden. Es zeigte sich, dass die *lst*-defizienten *N. meningitidis*-Mutanten sowohl Opa und Opc als auch die Pili in identischer Menge wie der Parentalstamm besaßen. Die übrigen Untersuchungen erfolgten ausschließlich mit der *lst*-Deletionsmutante 55 (MC58 *lst*⁻).

III.1.4.2 Wachstumskurve

In einem weiteren Versuch sollte das Wachstumsverhalten von MC58 Wildtyp mit dem der Mutanten MC58 *siaD*⁻, MC58 *lst*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻ verglichen werden. Die Stämme wurden hierfür in 5 ml PPM⁺ bei 37°C schüttelnd inkubiert. Der Ausgangswert der mit der Bakterienzahl korrelierenden OD_{600nm} betrug ≈0,1. Die OD_{600nm} wurde in Abständen von jeweils 50 min weitere viermal gemessen. Da die optische Dichte mit der Bakterienzahl korreliert, konnte daraus eine Wachstumskurve erstellt werden.

Das Diagramm 1 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs:

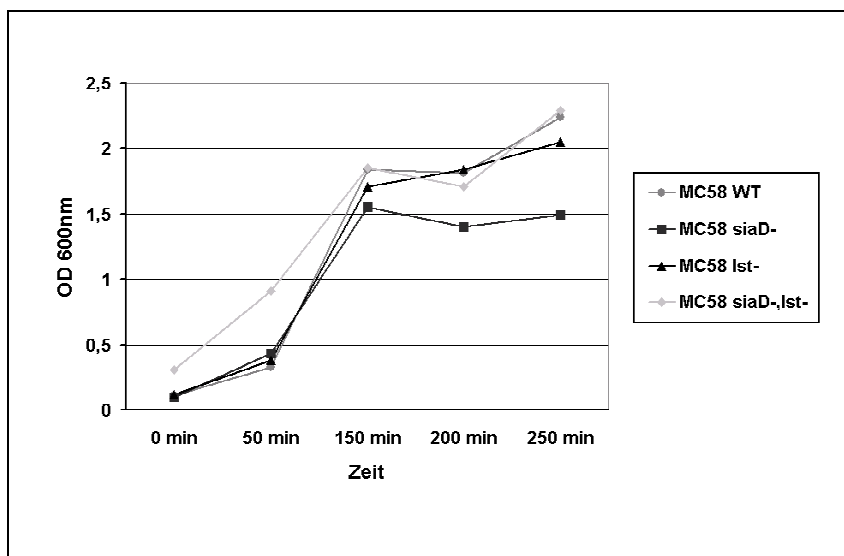


Diagramm 1:
Wachstumskurve von
MC58 WT, MC58 *lst*⁻,
MC58 *siaD*⁻ und
MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻ in
PPM⁺

Die kapsellosen *N. meningitidis*-Stämme MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻ zeigen gegenüber den kapseltragenden (MC58 WT, MC58 *lst*⁻) ein unbeeinträchtigtes Wachstumsverhalten. Die fehlende Sialylierungsfähigkeit von LOS scheint ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf das Bakterienwachstum in einem stressfreien Milieu zu haben.

III.1.4.3 Bakterizidie-Assay

Der nächste Versuch sollte die Überlebensfähigkeit der *lst*-defizienten Mutante in humanem Serum testen. Verglichen wurden der MC58 Wildtyp und der kapsellose MC58-Stamm mit der jeweils dazugehörigen *lst*-Deletionsmutante MC58 *lst*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻. Die Stämme wurden mit einer Initialkonzentration von 1×10^6 Bakterien/ml in verschiedenen Serumkonzentrationen bebrütet. MC58 WT und MC58 *lst*⁻ wurden Konzentrationen von 0, 50 und 80% ausgesetzt. Für MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻ hingegen wurden lediglich Serumkonzentrationen von 0, 5, und 10% verwendet, da der Verlust der Kapsel die Meningokokken außerordentlich suszeptibel für humanes Serum macht (Kahler, C.M. et al., 1998) und daher bei höheren Serumanteilen keine verwertbaren Ergebnisse mehr zu erwarten gewesen wären.

Nach 0, 30, und 60 min (MC58 WT und MC58 *lst*⁻) bzw. 0, 10 und 20 min (MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻) wurden jeweils Verdünnungsreihen angefertigt, von denen die Verdünnungsstufen 0, 10^{-1} und 10^{-2} auf GC-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet wurden.

Das Auszählen der auf den Platten gewachsenen Kolonien brachte folgende Ergebnisse. Diagramm 2 und Diagramm 3 zeigen das Wachstum von MC58 WT und MC58 *lst*⁻:

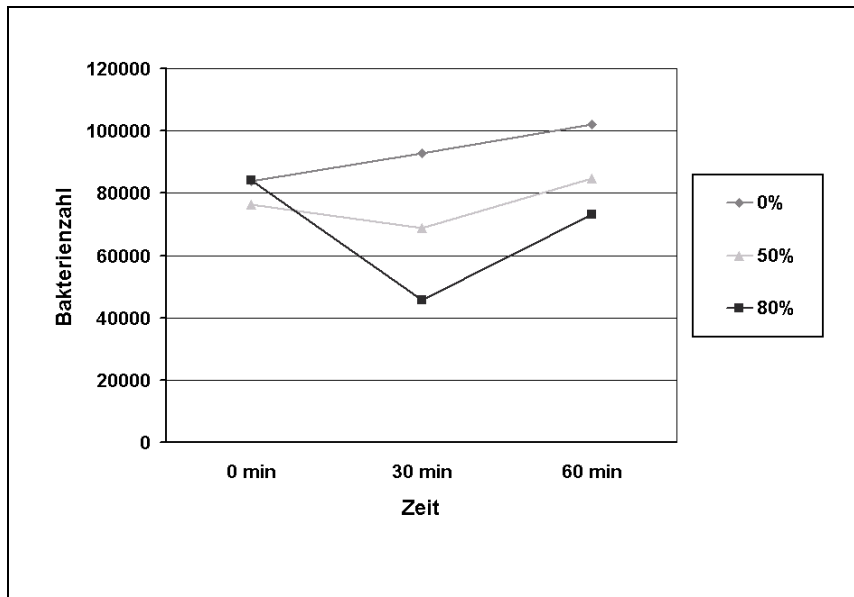


Diagramm 2:
Wachstumskurve von
MC58 Wildtyp in
verschiedenen
Serumkonzentrationen

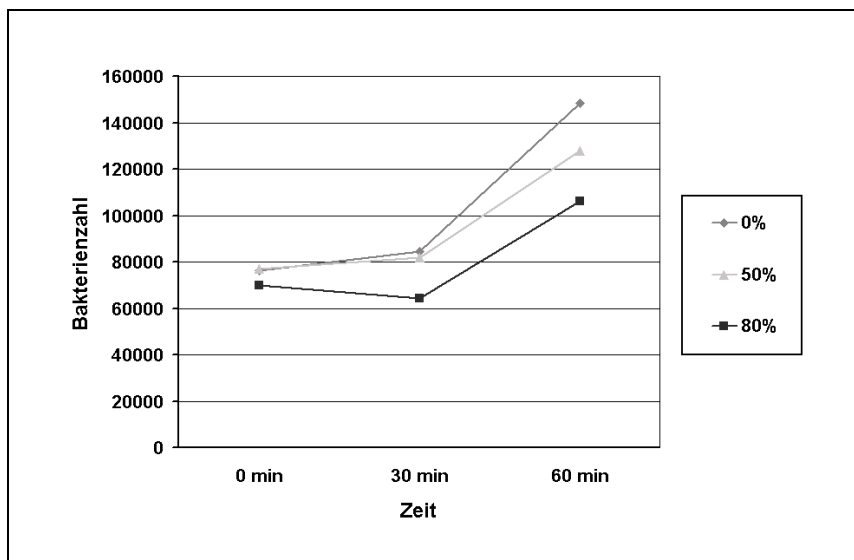


Diagramm 3:
Wachstumskurve von
MC58 *lst*⁻ in
verschiedenen
Serumkonzentrationen

Es ist zu erkennen, dass das Wachstum der bekapselten Meningokokken durch Serumkonzentrationen von 50% etwas, bei 80% deutlicher beeinträchtigt wird. Der Verlust des *lst*-Gens scheint keine negativen Auswirkungen auf den Schutz der Meningokokken gegen humanes Serum zu haben. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der starke Einfluss der äußeren Polysaccharidkapsel sein, die das Bakterium umschließt und damit den geringeren Einfluss der LOS-Sialylierung verdeckt. Diese Annahme wird jedoch durch die Ergebnisse des Bakterizidie-Assays der kapsellosen Mutanten nicht unterstützt.

Diagramm 4 und Diagramm 5 zeigen die Ergebnisse für MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*:

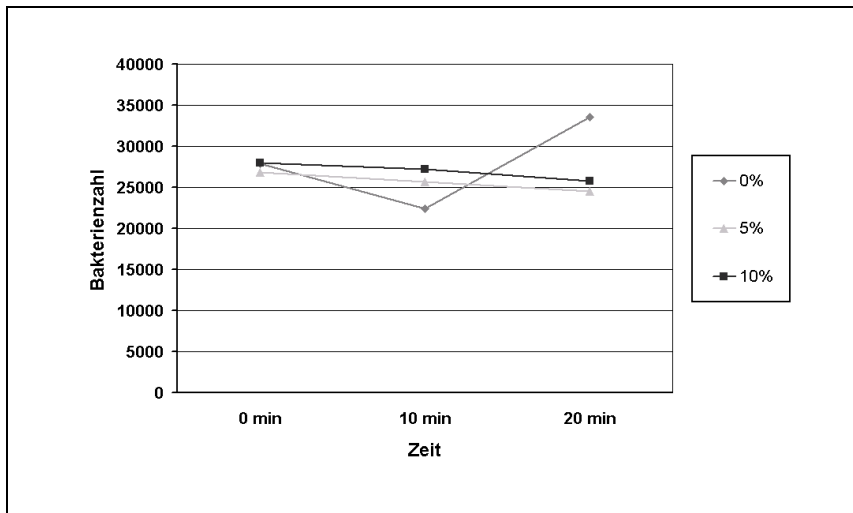


Diagramm 4:
Wachstumskurve von
MC58 *siaD*⁻ in
verschiedenen
Serumkonzentrationen

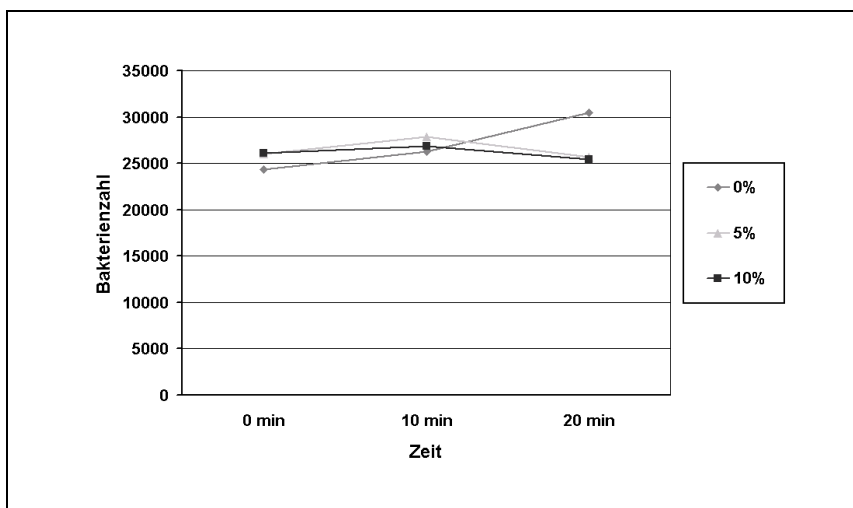


Diagramm 5:
Wachstumskurve von
MC58 *siaD*⁻, *lst* in
verschiedenen
Serumkonzentrationen

Zwar wird deutlich, dass mit zunehmender Konzentration an humanem Serum auch das Wachstum von MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst* in steigendem Maße beeinträchtigt wird. Allerdings sind auch hier keine Unterschiede im Ausmaß der Wachstumseinschränkung zwischen der das *lst*-Gen tragenden und der Deletionsmutante festzustellen.

III.1.4.4 Interaktion mit Epithelzellen

Als nächstes war von Interesse, wie die *lst*-Deletionsmutanten mit Zellen des menschlichen Körpers, die bei der Infektion überwunden werden müssen, reagieren. Die erste Barriere beim Eindringen von *N. meningitidis* in den Organismus stellen, wie oben

bereits erwähnt, die nasopharygealen Epithelzellen dar. Um die Interaktion von Meningokokken mit diesen Zellen zu untersuchen, wurden Hep2-Larynxkarzinom-Zellen benutzt. Die Infektion erfolgte mit den Stämmen MC58 WT, MC58 *lst*, MC58 *siaD* und MC58 *siaD*, *lst* (MOI=1), wobei für jeden Stamm vier Wells mit Epithelzellen vorgesehen waren, jeweils eines für den Adhäsions- und den Invasionsversuch nach 2h und 5h. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde durch Abnahme und Ausplattieren der Überstände festgestellt, wie viele Neisserien sich außerhalb der Zellen im Überstand befanden. Die Anzahl der bereits an die Epithelzellen angedockten Bakterien wurde durch Lyse der Hep2-Zellen mit Saponin ermittelt. Durch das Abtöten extrazellulärer Bakterien mit Gentamycin und nachfolgende Lyse der Epithelzellen konnte bestimmt werden, wie groß der Anteil der intrazellulären vitalen Meningokokken war. Außerdem wurde über die CFU zu Anfang des Versuchs und Summe der adhärenenten und der Bakterien im Überstand nach 2h und 5h näherungsweise die Wachstumskurve der vier *N. meningitidis*-Stämme ermittelt. Die invasiven Bakterien konnten hier vernachlässigt werden, da deren Zahl um mehrere Zehnerpotenzen unter der der adhärenenten bzw. der Bakterien im Überstand lag.

Das Diagramm 6 zeigt diese Wachstumskurve. Man kann deutlich erkennen, dass die kapsellosen Stämme erheblich schlechter wachsen als die kapseltragenden, wobei die Unterschiede je Zeitintervall zunehmen.

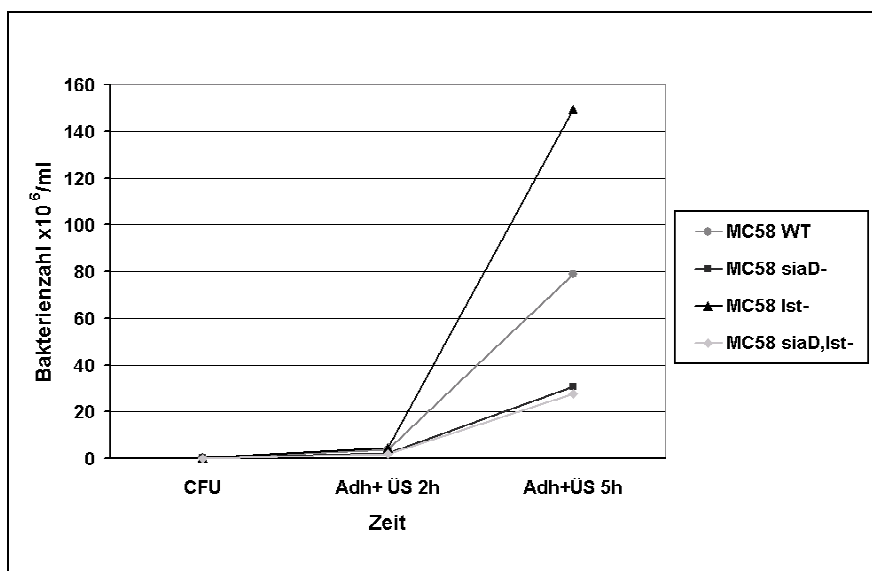


Diagramm 6: Wachstumskurve von MC58 WT, MC58 *lst*, MC58 *siaD* und MC58 *siaD*, *lst* nach Infektion von Epithelzellen. CFU zu Anfang des Versuchs und Summe der adhärenenten und der Bakterien im Überstand nach 2h und 5h

Das Diagramm 7 zeigt das Verhältnis der Meningokokken im Zellüberstand zu den adhärenenten Bakterien nach 2h und 5h. Auch hier sieht man deutliche Unterschiede

zwischen den bekapselten und nicht bekapselten Stämmen. Unbekapselte Stämme können viel besser an menschliche Epithelzellen andocken als Meningokokken, die eine Kapsel ausbilden. Nach 5 Stunden haben sogar die meisten der kapsellosen Bakterien an die Zellen gebunden und nur 4,7% der MC58 *siaD*⁻-Bakterien und 3,8% von MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻ befinden sich noch im Überstand. Im Gegensatz dazu sind 98,4% der Wildtyp-Bakterien und 99,6% der *lst*-Deletionsmutanten auch nach 5 Stunden ungebunden. Diese Unterschiede können wahrscheinlich auf die Maskierung der für die Adhärenz wichtigen Strukturen wie Pili, Opa und Opc durch die Kapselsubstanz zurückgeführt werden. Die *lst*-Deletionsmutanten MC58 *lst*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻ zeigen gegenüber dem jeweils *lst*-tragenden Pendant MC58 WT bzw. MC58 *siaD*⁻ keine einheitlich positive oder negative Tendenz in Bezug auf ihre Adhärenz an Epithelzellen.

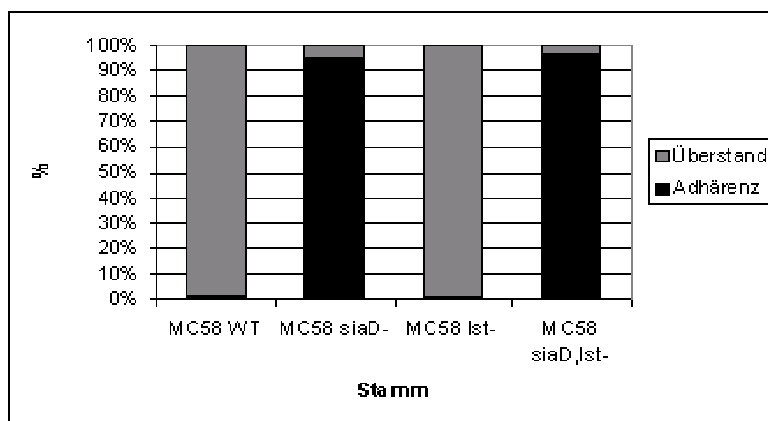


Diagramm 7: Verhältnis von adhärennten Bakterien zu Bakterien im Überstand nach 5stündiger Infektion der Epithelzellen. Stämme: MC58 WT, MC58 *lst*⁻, MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻

Anders hingegen sind die Ergebnisse für die Invasion in Epithelzellen (Diagramm 8). Auch hier ist die Zahl der intrazellulären Bakterien bei den kapsellosen Mutanten deutlich höher. Allerdings macht sich hier auch der Verlust des *lst*-Gens dahingehend bemerkbar, dass mehr Bakterien intrazellulär gefunden werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die für die Invasion notwendigen Oberflächenproteine durch die fehlende LOS-Sialylierung besser zugänglich sind. Diesen Invasionsunterschied nach der Deletion des *lst*-Gens konnten wir allerdings nur bei den kapsellosen Stämmen MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻ beobachten. Auch hier liegt eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung im starken Einfluss der äußeren, das Bakterium umschließenden Polysaccharidkapsel, die den geringeren Einfluss der LOS-Sialylierung verdeckt.

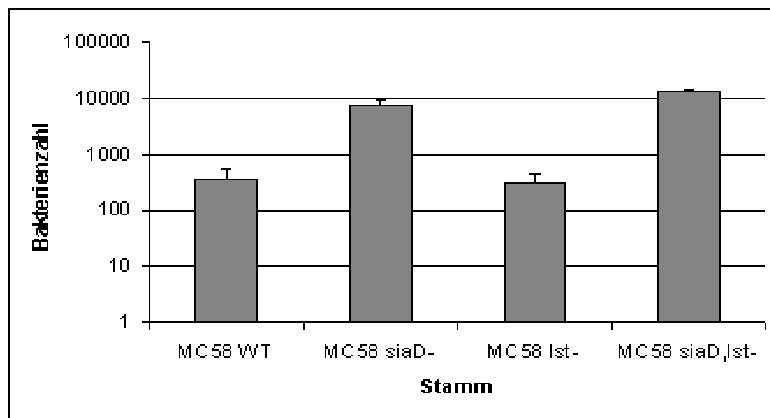


Diagramm 8: Invasion nach 5stündiger Infektion der Epithelzellen mit den Stämmen : MC58 WT, MC58 *lst*-, MC58 *siaD*- und MC58 *siaD*-, *lst*-

III.1.4.5 Interaktion mit Endothelzellen

Haben die Meningokokken den Blutstrom erreicht, können sie sich im gesamten menschlichen Körper ausbreiten. Für die Entwicklung einer Meningitis müssen die Neisserien aber noch die Blut-Hirn-Schranke und damit die Hirnendothelzellen überwinden. Daher war es wichtig zu wissen, wie die *lst*-Deletionsmutante mit diesen Zellen reagiert. Für den Aufbau eines Modells der Endothelzellschicht wurden Human brain microvascular endothelial cells (HbmeC) verwendet. Der Versuchsaufbau war ähnlich dem der Epithelzellen. Allerdings wurden die Adhärenz und die Invasion erst nach einer 6stündigen Inkubationszeit bestimmt, da für die Invasion zu einem früheren Zeitpunkt keine verwertbaren Ergebnisse zu erwarten gewesen wären.

Das Diagramm 9 zeigt zunächst das Wachstum der Meningokokken nach Infektion der HbmeC-s. Auch hier bestätigen sich die früheren Beobachtungen, dass kapsellose Stämme deutlich schlechter wachsen als bekapselte.

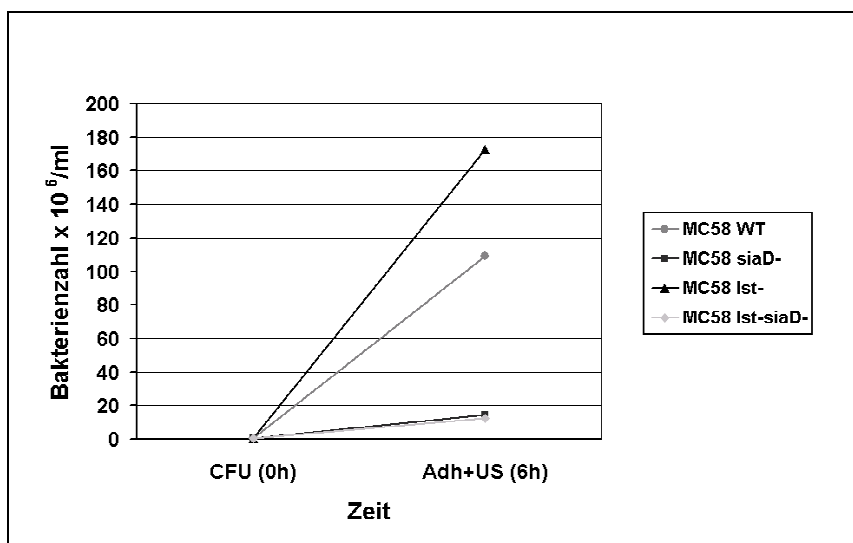


Diagramm 9: Wachstumskurve von MC58 WT, MC58 *lst*-, MC58 *siaD*- und MC58 *siaD*-, *lst*- nach Infektion von Endothelzellen. CFU zu Anfang des Versuchs und Summe der adhärenenten und der Bakterien im Überstand nach 6h.

Im Diagramm 10 wird wiederum die Menge der Bakterien im Überstand mit der der adhärenen Bakterien verglichen. Demnach docken auch hier kapsellose Meningokokken besser an Endothelzellen an als kapseltragende. Nach sechs Stunden Inkubation sind 80,2% bzw. 87,7% der kapseltragenden Stämme und 95,1% - 99,9% kapseldefizienten Bakterien adhären. Die Deletion des *lst*-Gens hat, wie bei den Epithelzellversuchen, keine signifikanten Auswirkungen auf die Adhärenz an Endothelzellen.

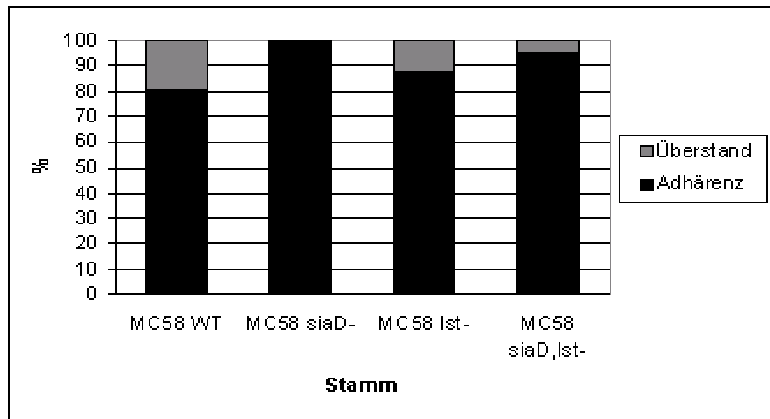


Diagramm 10: Verhältnis von adhärenen Bakterien zu Bakterien im Überstand nach 6stündiger Infektion der Endothelzellen. Stämme: MC58 WT, MC58 *lst*⁻, MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻

Das Invasionsverhalten der Meningokokken in Endothelzellen (Diagramm 11) entspricht qualitativ dem in Epithelzellen. Stämme ohne Kapsel können um ein Vielfaches besser in HbmeC-s eindringen als Stämme, die eine Kapsel ausbilden (MC58 *siaD*⁻ = 62 x MC58 WT und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻ = 20 x MC58 *lst*⁻). Gesteigert wird die Invasivität wiederum durch die fehlende LOS-Sialylierung nach *lst*-Deletion, wobei der Unterschied zwischen MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻ besonders deutlich hervortritt. Die Ergebnisse eines weiteren Versuchs waren qualitativ gleich.

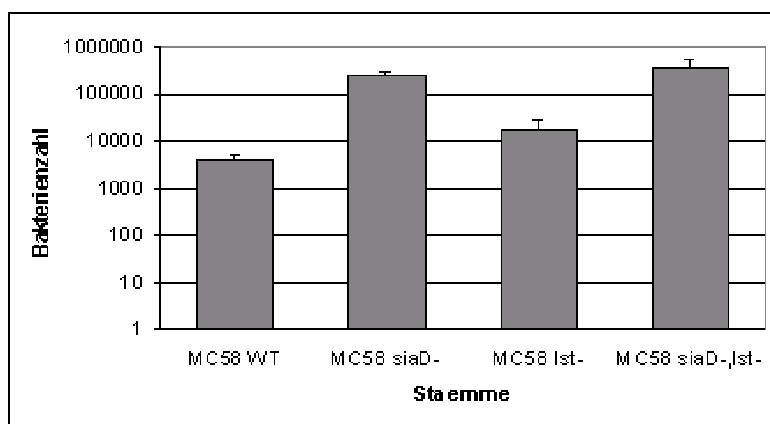


Diagramm 11: Invasion nach 6stündiger Infektion der Endothelzellen mit den Stämmen: MC58 WT, MC58 *lst*⁻, MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻

III.1.4.6 Interaktion mit dendritischen Zellen

Die dendritischen Zellen spielen für die Initiierung der Immunantwort eine entscheidende Rolle als potenteste, derzeit bekannte APC-s (Banchereau, J. und Steinman, R.M., 1998). Für einen Impfstoffkandidaten ist es wichtig, von diesen Zellen erkannt und aufgenommen werden zu können. Daher wurde das Zusammenspiel von *lst*-Deletionsmutanten mit DC-s im Vergleich mit den zur LOS-Sialylierung befähigten Meningokokken untersucht. Die dendritischen Zellen wurden mit den Stämmen MC58 WT, MC58 *lst*⁻, MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻ infiziert und in RPMI 1640-Medium mit 1% autologem humanem Plasma und 2 µg/ml CMP-NANA 6 Stunden inkubiert. Das exogen hinzugefügte CMP-NANA sorgte für eine optimale Sialylierung der *lst*-tragenden Stämme, während die Deletionsmutanten auch unter Zugabe von diesem Substrat kein sialyliertes LOS bilden konnten.

Nach diesen 6 Stunden zeigten sich folgende Ergebnisse:

Im Diagramm 12 ist zunächst das Wachstumsverhalten der vier Meningokokken-Stämme dargestellt. Ähnlich den früheren Versuchen war auch hier das Wachstum der kapsellosen Mutanten um ein Vielfaches schlechter als das der bekapselten Stämme.

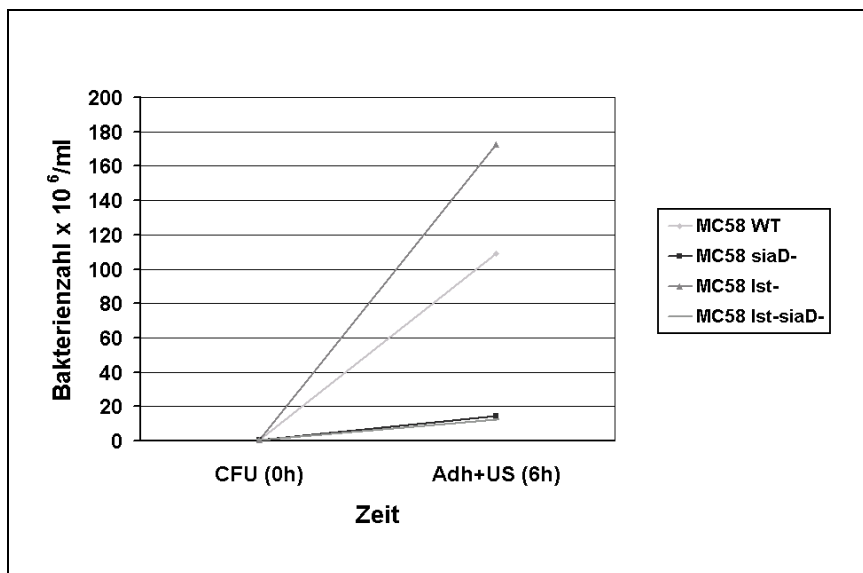


Diagramm 12: Wachstumskurve von MC58 WT, MC58 *lst*⁻, MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻ nach Infektion von dendritischen Zellen. CFU zu Anfang des Versuchs und Summe der adhärenenten und der Bakterien im Überstand nach 6h

Im Adhäsionsverhalten (Diagramm 13) waren die kapsellosen Bakterien den kapseltragenden hingegen deutlich überlegen. Während sich beispielsweise beim MC58 WT nach 6 Stunden beinahe alle Bakterien (98%) im Überstand befanden, waren bei

MC58 *siaD*⁻ fast ebenso viele (89%) adhären. Ein spezifischer Einfluss des *lst*-Gens auf die Adhärenz konnte auch in diesem Versuch nicht beobachtet werden.

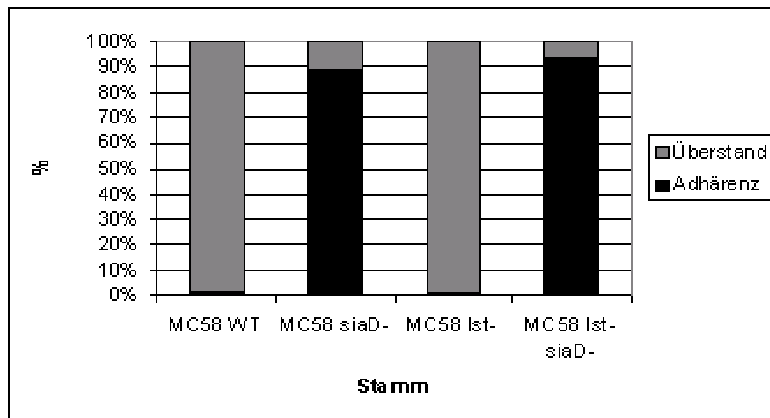


Diagramm 13: Verhältnis von adhärenen Bakterien zu Bakterien im Überstand nach 6stündiger Infektion der dendritischen Zellen. Stämme: MC58 WT, MC58 *lst*⁻, MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻.

Anders war dies jedoch erneut bei der Invasion in die dendritischen Zellen (Diagramm 14). Stämme ohne das *lst*-Gen wurden viel leichter in die DC-s aufgenommen als das gentragende Gegenstück. Die Zahl der intrazellulären Bakterien wurde jeweils mehr als verdoppelt. Dies könnte sich für einen Impfstoffkandidaten dahingehend positiv auswirken, dass dieser leicht vom Immunsystem erkannt und eine Immunantwort ausgelöst wird. Neisserien ohne Kapsel waren, wie in den Versuchen zuvor, ebenfalls bedeutend invasiver als kapseltragende Meningokokken.

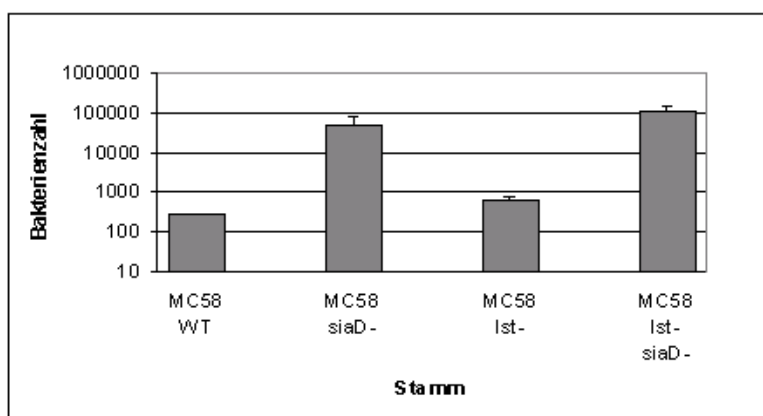


Diagramm 14: Invasion nach 6stündiger Infektion der dendritischen Zellen mit den Stämmen: MC58 WT, MC58 *lst*⁻, MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻.

III.1.5 Wachstum von Meningokokken verschiedener Serogruppen nach Kontakt mit dendritischen Zellen

Zunächst war für das Projekt von Interesse, in wie weit verschiedene *N. meningitidis*-Stämme in Gegenwart von dendritischen Zellen überleben können. Dazu wurden

jeweils der Wildtyp und die kapsellose Mutante von Meningokokken der Serogruppen A (A2044), B (MC58) und C (C1701) mit einer MOI=1 zu 3×10^5 DC-s gegeben und 6 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Die Bakterien im Überstand und die adhärenenten Meningokokken wurden separat bestimmt und addiert.

Die Ergebnisse zeigt das Diagramm 15. Das Wachstum der meisten kapsellosen Stämme war wiederum erheblich schlechter als das der bekapselten Neisserien. Dies könnte auf die stärkere Phagozytose und Abtötung durch dendritische Zellen zurückzuführen sein. Ein weiterer möglicher Grund für diese Beobachtung könnte allerdings auch die Absonderung bakterizider Substanzen sein. Ein geringeres Wachstum auch der bekapselten Stämme in Gegenwart der DC-s wurde allerdings nicht festgestellt.

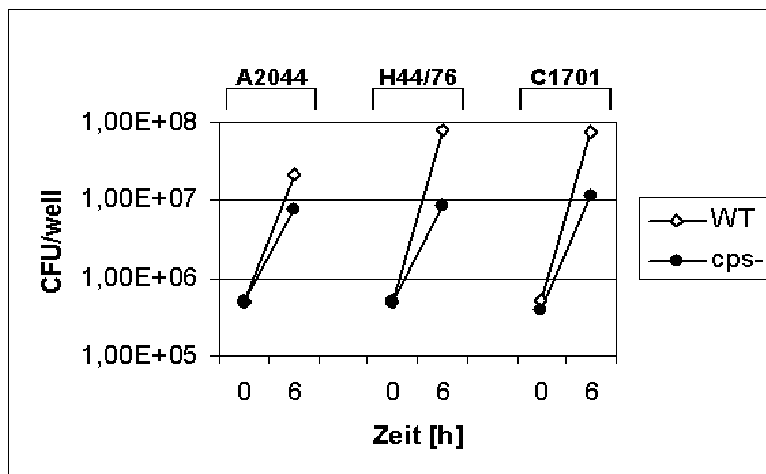


Diagramm 15: Vergleich des Wachstums von Wildtyp und kapselloser Mutante von *N. meningitidis* verschiedener Serogruppen nach 6stündiger Infektion dendritischer Zellen. Stämme: A2044 WT, A2044 *cps*⁻, H44/76 WT, H44/76 *cps*⁻, C1701 WT, C1701 *cps*⁻. CFU zu Anfang des Versuchs und Summe der adhärenenten und der Bakterien im Überstand nach 6h.

III.1.6 Überprüfen von DC-Überständen auf antibakteriell wirksame Substanzen

Um diesen Sachverhalt genauer zu überprüfen, wurden die Überstände der dendritischen Zellen auf antibakteriell wirksame Substanzen getestet. MC58 WT und MC58 *siaD*⁻ wurden in fünf verschiedenen Nährmedien mit einer Ausgangs-OD_{600nm} ≈ 0,15 bei 37°C inkubiert. Das Nährmedium 1 bestand aus 50% Überstand von mit MC58 WT infizierten DC-s und 50% PPM⁺-Medium. Das Nährmedium 2 setzte sich ebenfalls zur Hälfte aus PPM⁺, zur anderen Hälfte aus dem Überstand von dendritischen Zellen, die mit MC58 *siaD*⁻ infiziert waren, zusammen. Im dritten Nährmedium befanden sich wiederum 50% PPM⁺ und 50% Überstand von nicht infizierten DC-s. Als Vergleichsmedien wurden zum einen RPMI 1640 mit PPM⁺

(50%/50%), zum anderen 100% PPM⁺ herangezogen. Die OD_{600nm} wurde zu Beginn und nach 50 sowie 100 min gemessen. Aus den ermittelten Werten wurde schließlich eine Wachstumskurve erstellt.

Das Diagramm 16 zeigt das Ergebnis für MC58 WT. Man kann einen beinahe linearen Anstieg der optischen Dichte bei allen Versuchsanordnungen erkennen. Die Unterschiede der Wachstumsgeschwindigkeit in den einzelnen Nährmedien sind marginal und lassen keinen Rückschluss auf wachstumshemmende Faktoren in bestimmten Medien zu.

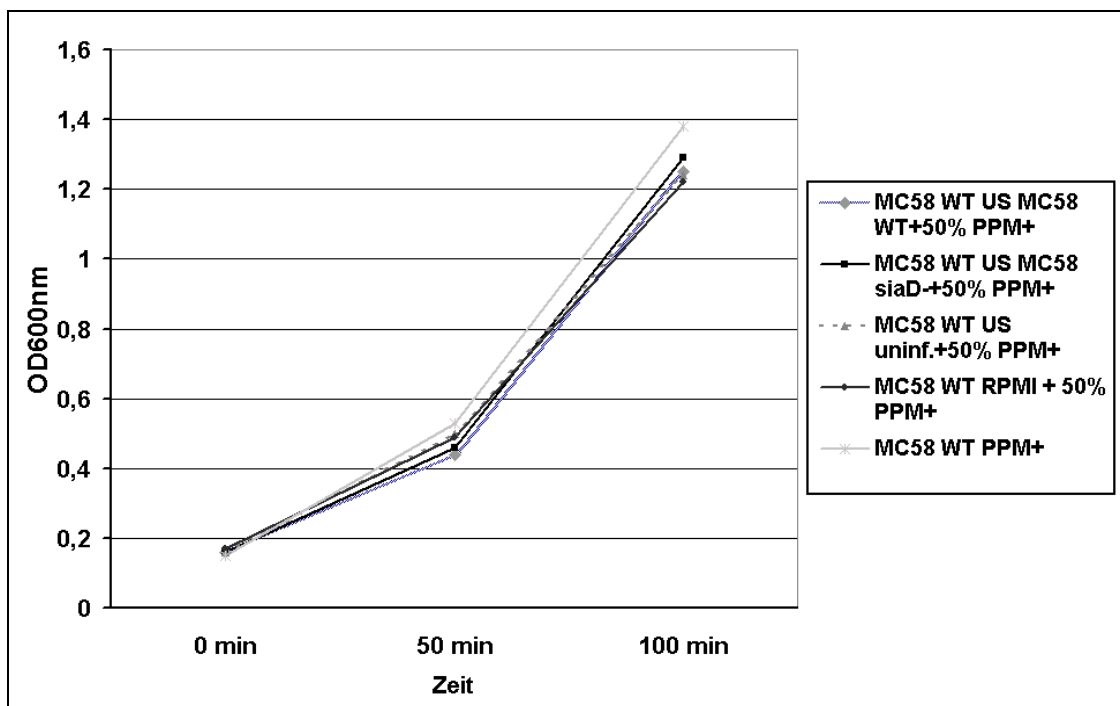


Diagramm 16: Wachstum von MC58 WT verschiedenen DC-Überständen.

Ähnlich ist dies bei der kapsellosen Mutante MC58 *siaD*⁻ (Diagramm 17). Zwar zeigt sich in den späten Messungen eine Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit, allerdings ist dies bei der Kultivierung von MC58 *siaD*⁻ in allen fünf Nährmedien gleichermaßen der Fall. Auch die quantitativen Unterschiede sind außerordentlich gering.

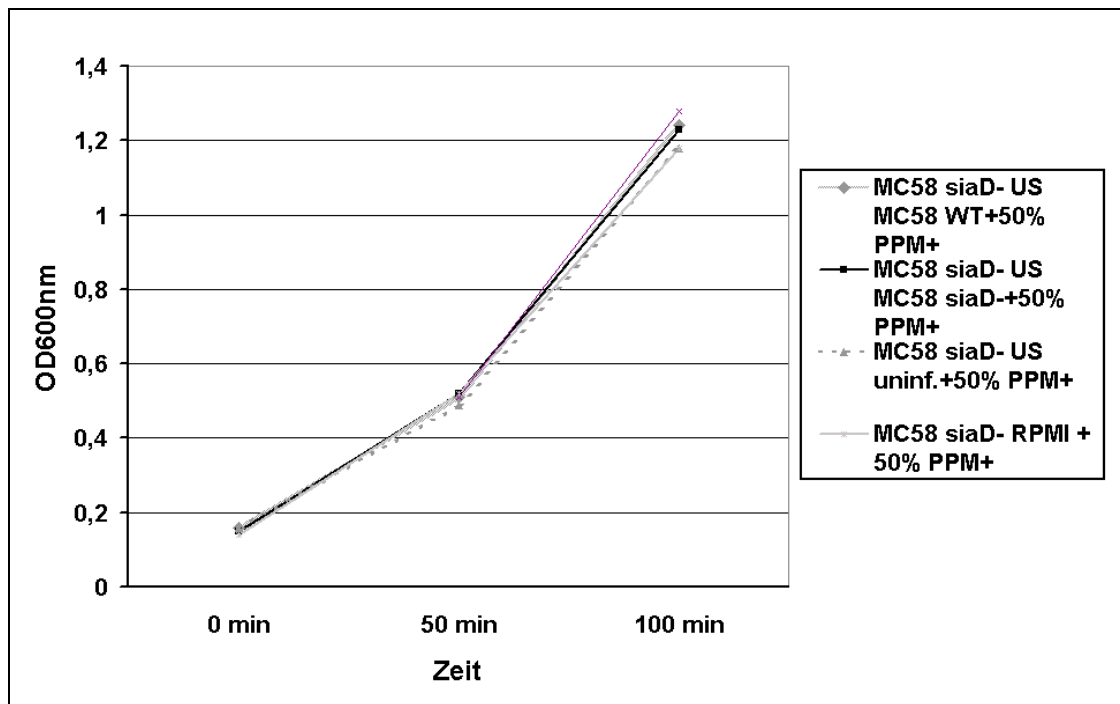


Diagramm 17: Wachstum von MC58 *siaD*⁻ verschiedenen DC-Überständen.

In einem zweiten Versuch konnten wir ähnliche Beobachtungen machen. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass dendritische Zellen keine antimikrobiellen Wirkstoffe, die gegen Meningokokken gerichtet sind, aussenden. Allerdings konnten sehr instabile Substanzen mit diesem Versuch nicht erfasst werden, da die Verarbeitung Überstände nicht unmittelbar erfolgte.

III.1.7 Adhärenz- und Invasionsverhalten verschiedener *N. meningitidis*-Stämme nach Kontakt mit DC-s

Als nächstes wurde untersucht, ob sich die verschiedenen Serogruppen von *N. meningitidis* im Adhärenz- und Invasionsverhalten unterscheiden. Für unsere Versuche verwendeten wir Stämme der Serogruppen A (A2044), B (H44/76) und C (C682). Besonderes Augenmerk legten wir hierbei auf den Einfluss der Kapsel. Daher wurde von allen Serogruppen ein Wildtyp- und ein kapselloser Stamm getestet. Außerdem überprüften wir einen LPS-defizienten Serogruppe B-Stamm (H44/76 *lpx*⁻; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Steeghs et al., RIVM, Niederlande) auf seine Interaktion mit dendritischen Zellen.

Die Bakterien wurden mit einer MOI=1 zu den unreifen DC-s gegeben und 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach diesem Zeitraum zeigte sich folgendes Ergebnis:

Die Anbindung an dendritische Zellen (Diagramm 18) erfolgte bei den unbekapselten Stämmen in einem viel höheren Ausmaß (88,6-97,6%) als bei bekapselten Neisserien (0,2-0,9%). Die Zugabe von 2% hitzeinaktiviertem autologem Plasma (Diagramm 19) erbrachte eine nur geringfügig erhöhte Rate an adhärenenten Bakterien bei den wildtypischen Stämmen. Die Adhärenz der kapsellosen Mutanten konnte hierdurch ebenfalls nicht erhöht werden, verringerte sich statt dessen sogar bei der Serogruppe A und C.

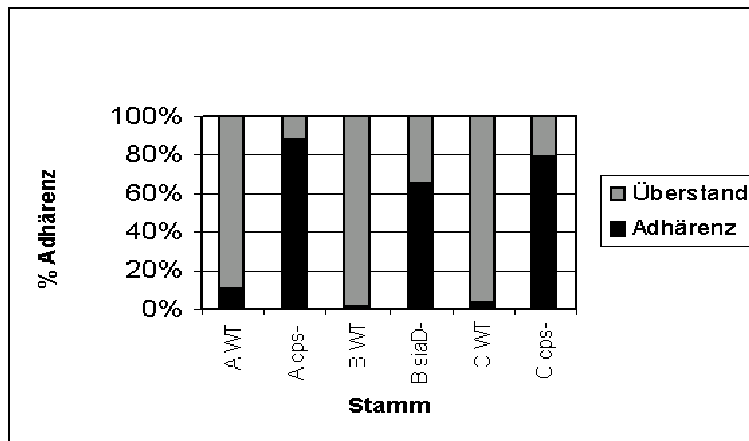


Diagramm 18: Verhältnis von adhärenenten Bakterien zu Bakterien im Überstand nach 6stündiger Infektion der dendritischen Zellen. Stämme: A2044 WT, A2044 *cps*⁻, H44/76 WT, H44/76 *siaD*⁻, C1701 WT, C1701 *cps*⁻

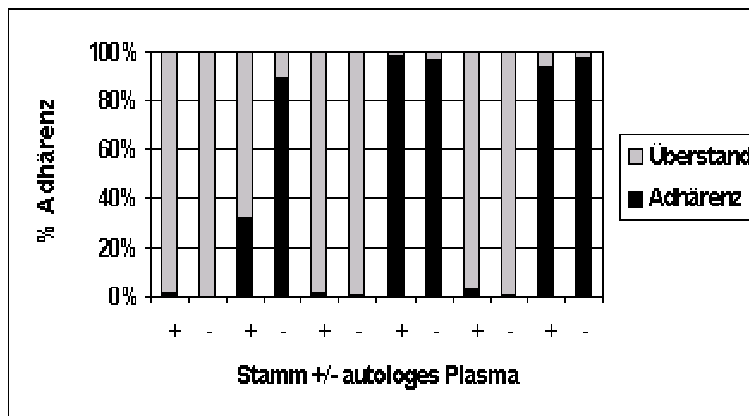


Diagramm 19: Verhältnis von adhärenenten Bakterien zu Bakterien im Überstand nach 6stündiger Infektion der dendritischen Zellen. Stämme: A2044 (A) WT, A2044 (A) *cps*⁻, H44/76 (B) WT, H44/76 (B) *siaD*⁻, C1701 (C) WT, C1701 (C) *cps*⁻. Vergleich zwischen Kultivierung ohne Plasma (-) und unter Zugabe von 2% autologem humanem Plasma (+)

Das Fehlen von LOS (Diagramm 20) wirkte sich negativ auf das Adhärenzverhalten der Bakterien aus. Während der Wildtyp eine Adhärenz von 4% aufwies, waren bei H44/76 *lpx*⁻ nur 2% an DC-s gebunden.

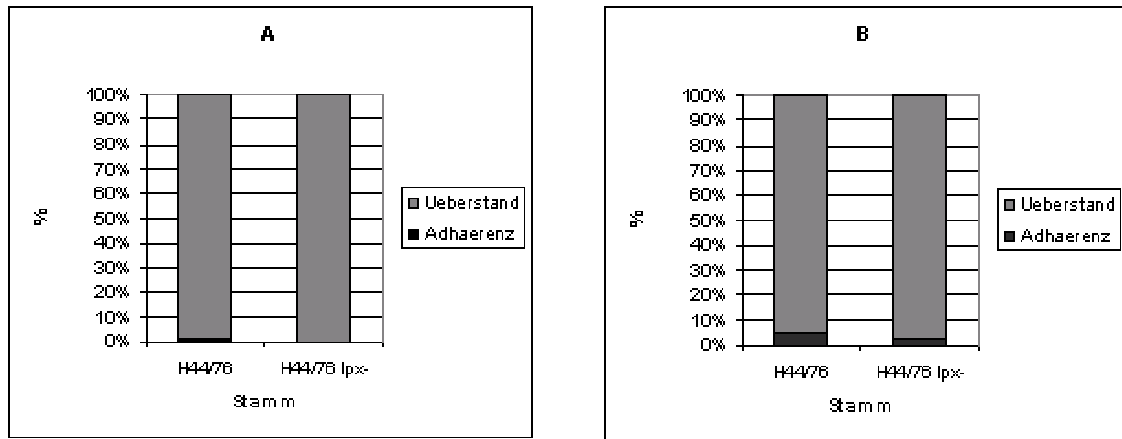


Diagramm 20: Verhältnis von adhärennten Bakterien zu Bakterien im Überstand nach 6stündiger Infektion der dendritischen Zellen. Vergleich zwischen H44/76 WT und H44/76 *lpx*⁻ (Spender A und B).

Die Zahl der lebenden intrazellulären Bakterien wurde, wie schon in den Versuchen zuvor, durch die Abtötung aller extrazellulären Bakterien mit Gentamycin ermittelt. Die Invasion war bei den kapseldefizienten Stämmen erheblich höher als bei den kapseltragenden Wildtyp-Stämmen. Die Zugabe von 2% autologem Plasma führte auch hier zu keiner signifikanten Änderung der phagozytierten Bakterien (Diagramm 21).

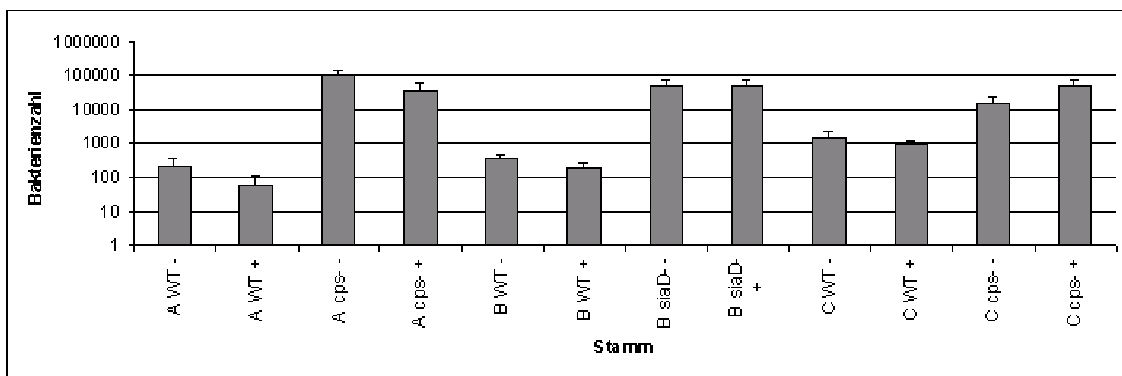


Diagramm 21: Invasion nach 6stündiger Infektion der dendritischen Zellen. Stämme: A2044 (A) WT, A2044 (A) *cps*⁻, H44/76 (B) WT, H44/76 (B) *siaD*⁻, C1701 (C) WT, C1701 (C) *cps*⁻. Vergleich zwischen Kultivierung ohne Plasma (-) und unter Zugabe von 2% autologem humanem Plasma (+)

Beim Stamm H44/76 *lpx*⁻ konnten überhaupt keine intrazellulären Bakterien nachgewiesen werden. Allerdings weist die LOS-defiziente Mutante auch eine außerordentlich geringe Replikationsrate auf. Möglicherweise wurden viele der Bakterien phagozytiert und intrazellulär schnell abgetötet. Da mit Hilfe des

Gentamycin-Assays nur lebende Bakterien erfasst werden können, bleiben die etwaigen bereits abgetöteten Bakterien unberücksichtigt. Kolb-Mäurer et al. haben die Gesamtzahl intrazellulärer Meningokokken elektronenmikroskopisch mittels Giemsa-Färbung bestimmt (Kolb-Mäurer, A. et al., 2001). Die auf diese Weise ermittelte Anzahl intrazellulärer Bakterien der Serogruppen A-C lag erheblich höher als die durch den Gentamycin-Assay festgestellte. Dies galt besonders für die kapsellosen Varianten, was nahelegt, dass diese in der dendritischen Zelle gut abgetötet wurden. Versuche mit der *lpx*-defizienten Mutante könnten möglicherweise ähnliche Ergebnisse bringen.

III.1.8 Reifung von Dendritischen Zellen nach Kontakt mit *N. meningitidis*

Die Reifung von DC's nach Kontakt mit Serogruppe-B-Meningokokken wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Annette Kolb-Mäurer am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg mittels Flow-Zytometrie untersucht.

Anhand der Oberflächenmarkerprofile konnte gezeigt werden, dass sowohl die Infektion mit bekapselten als auch mit unbekapselten MC58-Stämmen zu einer Reifung der DC's führte. Der Oberflächenmarker CD83 wurde auf 95% der dendritischen Zellen nach Infektion exprimiert. Aber auch CD80, CD86, CD25 und MHC II wurden deutlich hochreguliert (Diagramm 22). Diese Ergebnisse konnten mit einem anderen *N. meningitidis*-Stamm der Serogruppe B, H44/76, reproduziert werden. Dendritische Zellen können demnach durch die Infektion mit Serogruppe-B-Meningokokken zur Ausreifung angeregt werden, unabhängig davon, um welchen Stamm es sich handelt und ob dieser bekapselt ist oder nicht.

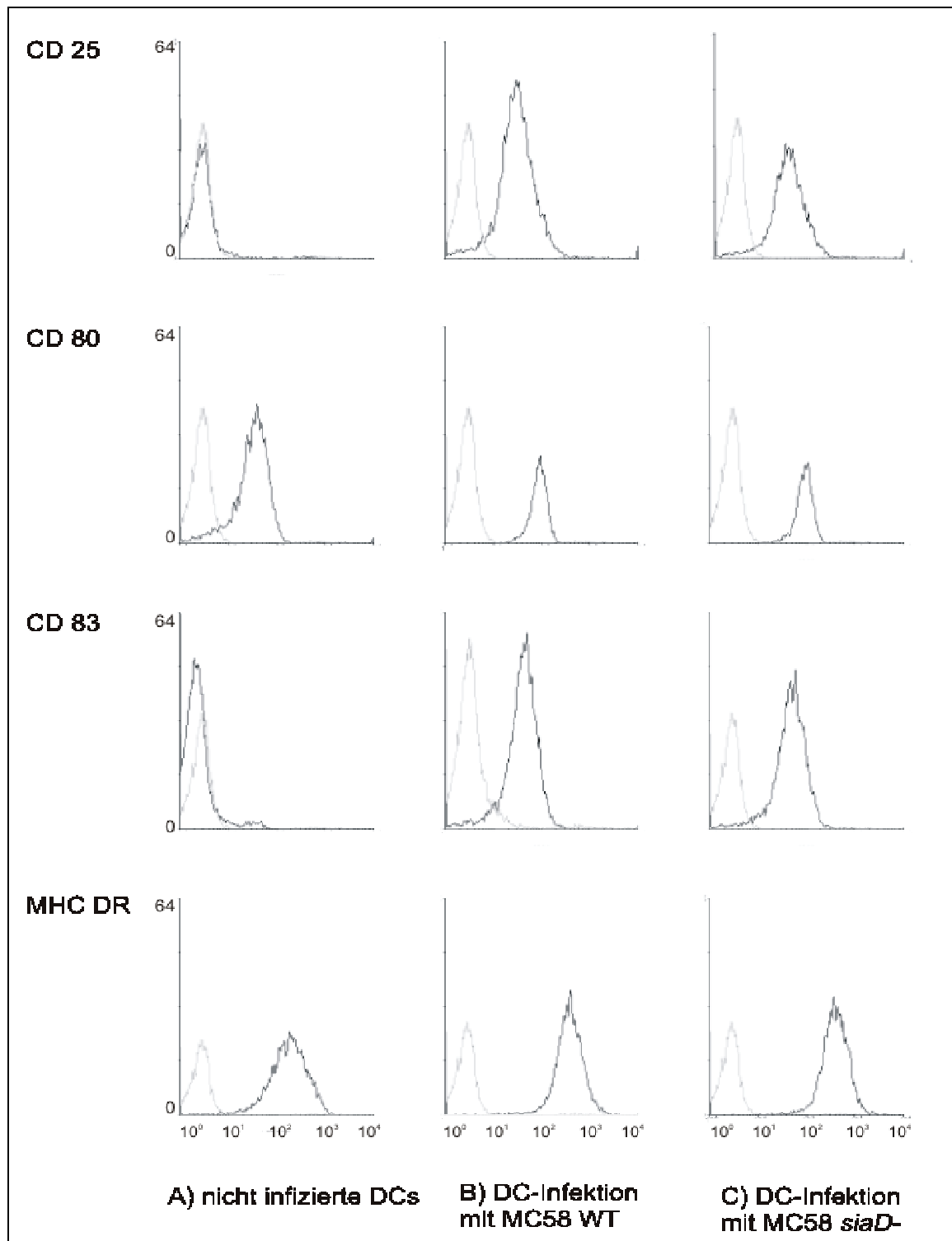


Diagramm 22: DC-Reifung nach Infektion mit *N. meningitidis* der Serogruppe B. Flow-Zytometrie-Profile der Oberflächenmarker-Expression von CD25, CD80, CD83 und MHC DR auf humanen DC's. A) nicht infizierte DC's, B) 24 Stunden nach Infektion mit MC58 WT, C) 24 Stunden nach Infektion mit MC58 *siaD*-. Die dendritischen Zellen wurden mit einer MOI von 1 infiziert. X-Achse: Intensität der Fluoreszenz. Y-Achse: relative Zellzahl. Die grauen Histogramme zeigen das Anfärben mit korrelierenden Isotyp Antikörpern

III.1.9 Überprüfen von DC-Überständen auf Zytokine

Die Pathogenese schwerer Meningokokken-Infektionen ist eng mit der Ausschüttung von Zytokinen verbunden (Hahn, H. und Meyer, T.F., 1999). TNF- α beispielweise ist ein starker Entzündungsmediator und aktiviert zusätzlich Makrophagen. IL-6 trägt zur B-Zellreifung bei und über IL-8 werden verschiedene Entzündungszellen angelockt (Chemotaxis) (Austyn, J.M. und Wood, K.J., 1993 (b)). Die Ausschüttung dieser drei Zytokine durch dendritische Zellen nach Infektion mit bestimmten Meningokokkenstämmen war daher von besonderem Interesse. Außerdem sollte geklärt werden, welche Rolle das LOS bei der Induktion der Zytokinausschüttung spielt.

Um die durch infizierte DC-s produzierte Zytokinmenge zu quantifizieren, wurden zu unreifen DC-s zunächst jeweils der Wildtyp und die kapsellose Mutante von Meningokokken der Serogruppen A (A2044), B (H44/76) und C (C1701) gegeben (MOI=1). Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden wurden die Überstände abgenommen. Aus diesen Überständen wurde die Menge an TNF- α , IL-6 und IL-8 mit Hilfe von ELISA-s ermittelt. Die Durchführung der ELISA-s wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Ulrike Kämmerer et al. (Universitätsklinik für Frauenheilkunde, Würzburg) übernommen.

Es zeigte sich, dass die Infektion mit Meningokokken aller drei Serogruppen einen starken Reiz für die Ausschüttung der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-8 darstellte (Diagramm 23-25). Die Überstände der kapsellosen Varianten enthielten sogar noch größere Zytokinmengen als die der wildtypischen Bakterien. Möglicherweise kommt dies durch die bessere Anbindung an die dendritischen Zellen zustande. Gegenüber dem Wert für nicht infizierte DC-s war bei TNF- α ein Anstieg z.T. um das 3000fache, bei IL-6 sogar um das 4000fache zu verzeichnen; die Menge an IL-8 lag immerhin 40fach über dem Ausgangswert.

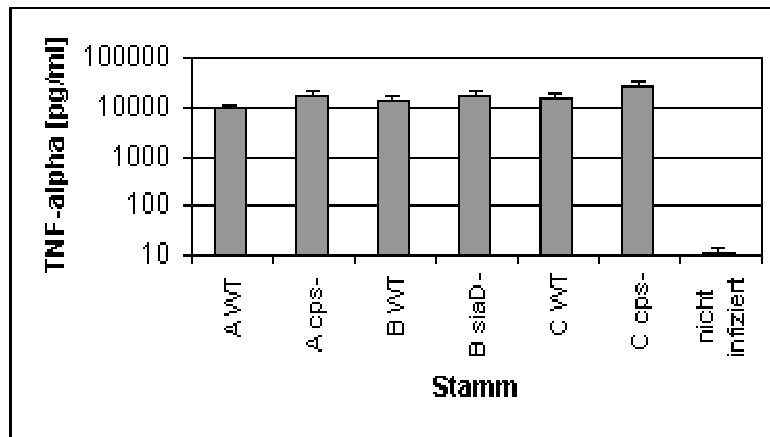


Diagramm 23: TNF- α -Ausschüttung nach 6stündiger Infektion von DC-s mit den Stämmen A2044 (A) WT, A2044 (A) *cps*⁻, H44/76 (B) WT, H44/76 (B) *siaD*⁻, C1701 (C) WT, C1701 (C) *cps*⁻.

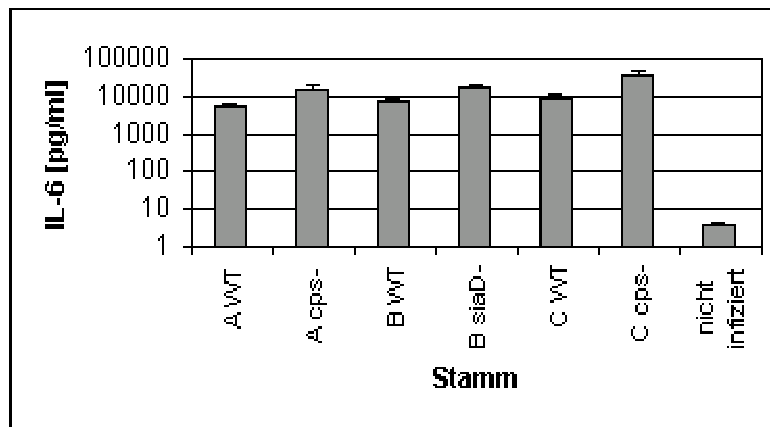


Diagramm 24: IL-6-Ausschüttung nach 6stündiger Infektion von DC-s mit den Stämmen A2044 (A) WT, A2044 (A) *cps*⁻, H44/76 (B) WT, H44/76 (B) *siaD*⁻, C1701 (C) WT, C1701 (C) *cps*⁻.

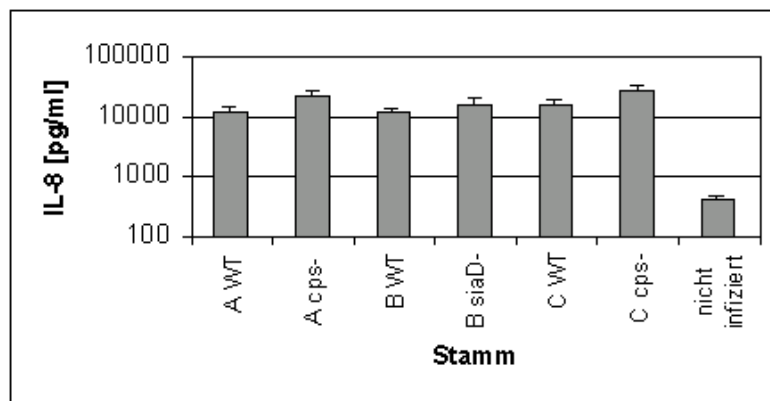


Diagramm 25: IL-8-Ausschüttung nach 6stündiger Infektion von DC-s mit den Stämmen A2044 (A) WT, A2044 (A) *cps*⁻, H44/76 (B) WT, H44/76 (B) *siaD*⁻, C1701 (C) WT, C1701 (C) *cps*⁻.

Um den Einfluß von humanem Plasma auf die Zytokinausschüttung zu untersuchen, wurde der Versuch unter Zugabe von 2% autologem humanem Plasma wiederholt. Durch diese Maßnahme konnte die Produktion von TNF- α (\varnothing 2 fach), IL-6 (\varnothing 8 fach) und IL-8 (\varnothing 6,5 fach) gesteigert werden (Diagramm 26-28). Das verwendete Plasma war zuvor auf das Vorhandensein von Zytokinen überprüft worden. Die gefundenen Mengen waren jedoch außerordentlich gering. Daher kann der Zytokinanstieg gegenüber den nicht mit Plasma behandelten DC-Überständen als unabhängig von etwaigen bereits im Vorfeld vorhandenen Zytokinmengen betrachtet werden.

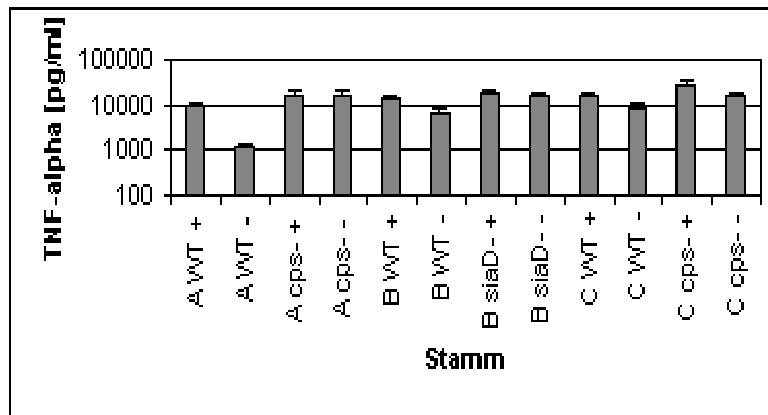


Diagramm 26: TNF- α -Ausschüttung nach 6stündiger Infektion von DC-s mit den Stämmen A2044 (A) WT, A2044 (A) *cps*⁻, H44/76 (B) WT, H44/76 (B) *siaD*⁻, C1701 (C) WT, C1701 (C) *cps*⁻. Vergleich zwischen Kultivierung ohne Plasma (-) und unter Zugabe von 2% autologem humanem Plasma (+)

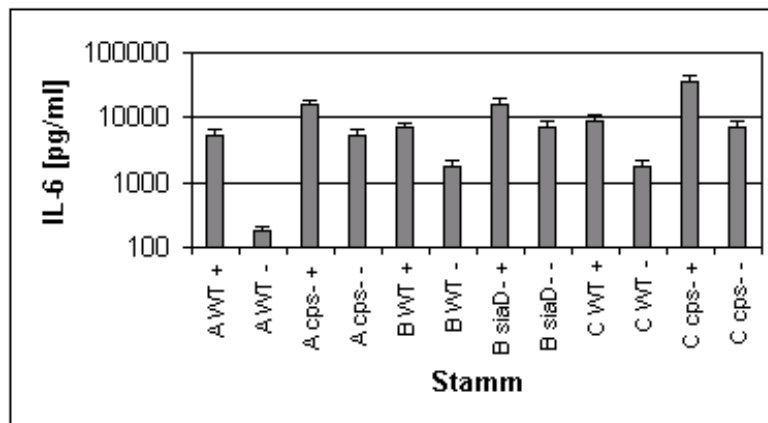


Diagramm 27: IL-6-Ausschüttung nach 6stündiger Infektion von DC-s mit den Stämmen A2044 (A) WT, A2044 (A) *cps*⁻, H44/76 (B) WT, H44/76 (B) *siaD*⁻, C1701 (C) WT, C1701 (C) *cps*⁻. Vergleich zwischen Kultivierung ohne Plasma (-) und unter Zugabe von 2% autologem humanem Plasma (+)

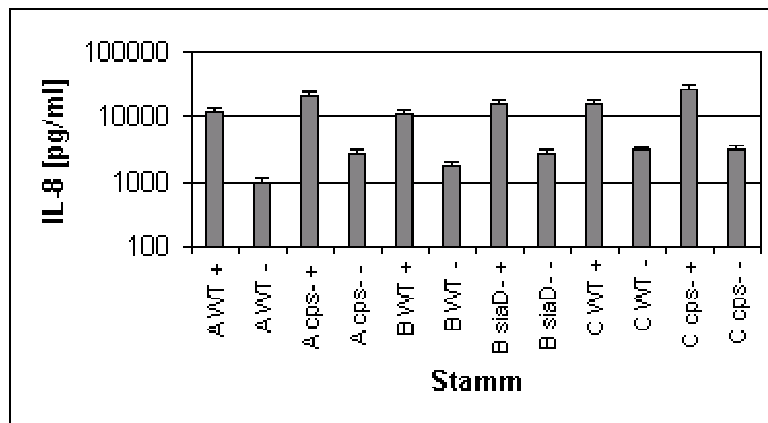


Diagramm 28: IL-8-Ausschüttung nach 6stündiger Infektion von DC-s mit den Stämmen A2044 (A) WT, A2044 (A) *cps*⁻, H44/76 (B) WT, H44/76 (B) *siaD*⁻, C1701 (C) WT, C1701 (C) *cps*⁻. Vergleich zwischen Kultivierung ohne Plasma (-) und unter Zugabe von 2% autologem humanem Plasma (+)

Als nächstes sollte getestet werden, in wie weit das LOS die Zytokinausschüttung induziert. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden unreife DC-s mit Meningokokken der Stämme H44/76 WT und H44/76 *lpx*⁻ infiziert bzw. in einem zweiten Versuch mit je 100 ng/ml LOS aus Neisserien und LPS aus Salmonellen versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden wurden auch hier die Zytokinmengen im Überstand mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass nach Infektion mit dem Wildtyp-Bakterium erheblich größere Mengen an Zytokinen ausgeschüttet wurden als bei der *lpx*-defizienten Mutante (Diagramm 29).

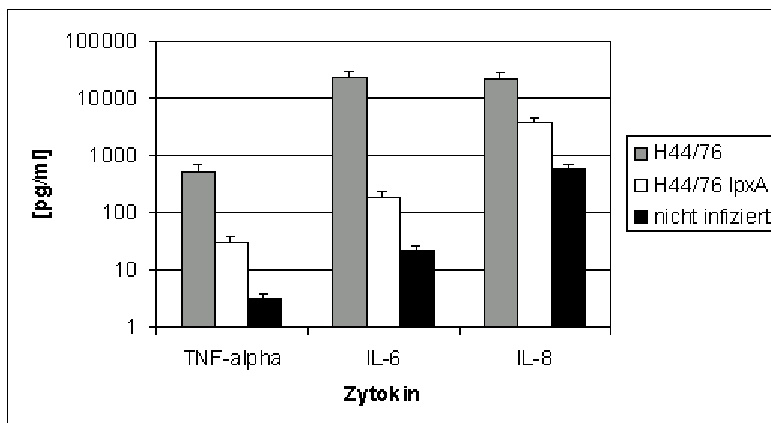


Diagramm 29: Vergleich der Ausschüttung von TNF- α , IL-6 und IL-8 durch dendritische Zellen nach 6stündiger Infektion mit H44/76 WT und H44/76 *lpx*⁻

Auch die Behandlung der DC-s mit *N. meningitidis*-LOS und *Salmonella*-LPS stellte einen starken Reiz zur Zytokinausschüttung dar. Je nach Spender lag nach der Behandlung mit LOS die Menge an TNF- α - 300-800fach, an IL-6 130-1600fach und an IL-8 25-75fach höher als bei unbehandelten DC's (Diagramm 30). Ähnliche Werte wurden für mit *Salmonella*-LPS versetzte DC-Überstände gefunden. Interessant ist, dass die ausgeschüttete Zytokinmenge der mit H44/76 *lpx*⁻ infizierten DC-s deutlich über der der nicht infizierten Zellen lag. Dies bedeutet, dass neben LPS noch andere bakterielle Strukturen die Zytokinproduktion induzieren können.

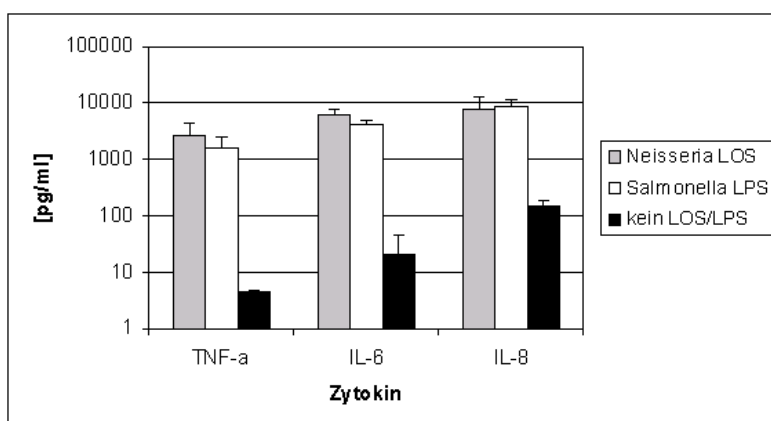


Diagramm 30: Vergleich der Ausschüttung von TNF- α , IL-6 und IL-8 durch dendritische Zellen (3×10^5 /Well) nach 6stündiger Behandlung mit 100ng/ml *N.*-LOS bzw. *Salmonella*-LPS in 1% humanem autologem Plasma.

Ob die Sialylierung des LOS ebenfalls einen Einfluss auf die Zytokinausschüttung durch dendritische Zellen hat, sollte ein weiterer Versuch klären. Hierbei wurden die Stämme MC58 WT, MC58 *lst*⁻, MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻ verwendet. Die

Infektion der DC-s erfolgte in RPMI 1640 mit 1 % autologem humanem Plasma und 2µg/ml CMP-NANA. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden wurde die Zytokinmenge mittels ELISA bestimmt. Wie in den Vorversuchen zeigte sich, dass die kapsellosen Mutanten die Zytokinproduktion stärker induzierten als bekapselte Stämme (Diagramm 31, Diagramm 32). Die Deletion des *lst*-Gens jedoch veränderte die Ausschüttung von TNF-α, IL-6 und IL-8 nur marginal und mit uneinheitlicher Tendenz. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Zellen eines anderen PBMC-Spenders erzielt.

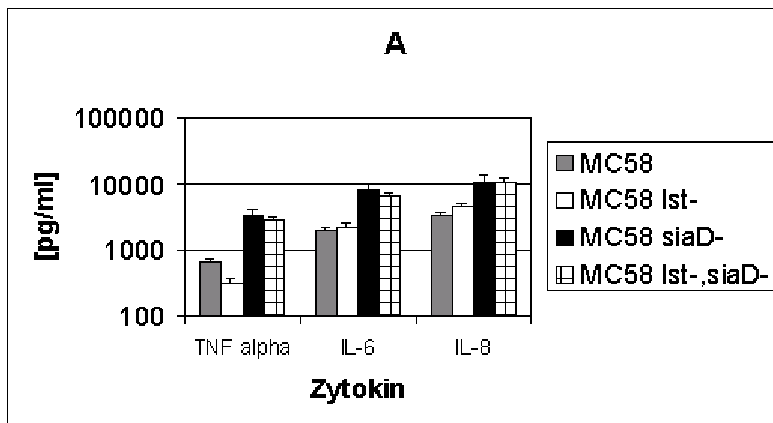


Diagramm 31: Vergleich der der Ausschüttung von TNF-α, IL-6 und IL-8 durch dendritische Zellen (3×10^5 /Well) nach 6stündiger Infektion mit MC58 WT, MC58 *lst*⁻, MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst* in 2% humanem autologem Plasma von Spender A.

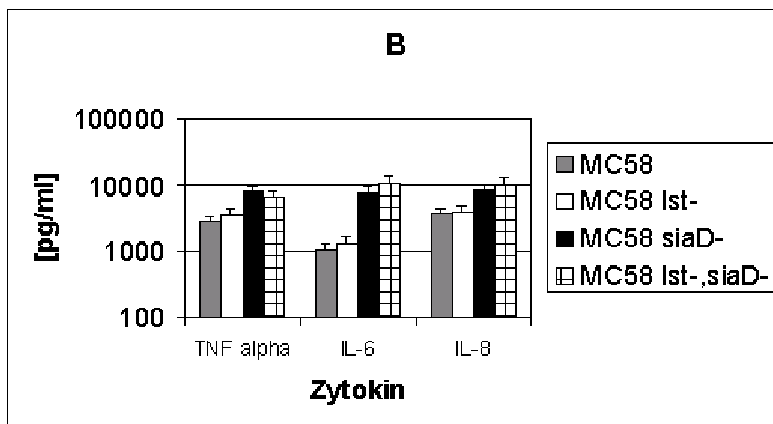


Diagramm 32: Vergleich der der Ausschüttung von TNF-α, IL-6 und IL-8 durch dendritische Zellen (3×10^5 /Well) nach 6stündiger Infektion mit MC58 WT, MC58 *lst*⁻, MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst* in 2% humanem autologem Plasma von Spender B.

Die LOS-Sialylierung scheint also keinen Einfluss auf die Zytokin-Produktion zu haben.

IV. DISKUSSION

Bisher wurden Studien zur LOS-Sialylierung mit Träger- bzw. Patientenisolaten oder *lst*-Insertionsmutanten durchgeführt (Estabrook, M.M. et al., 1992; Estabrook, M.M. et al., 1997; Vogel, U. et al., 1997; Kahler, C.M. et al., 1998; Vogel, U. et al., 1999). Die Frage, welche Rolle die Sialylierung der Lipooligosaccharide in der Pathogenese von Meningokokkenerkrankungen spielt, wurde zum Teil kontrovers diskutiert (Estabrook, M.M. et al., 1997; Vogel, U. et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine *lst*-Deletionsmutante des Serogruppe-B-Meningokokkenstammes MC58 konstruiert und diese auf ihre Wachstumseigenschaften, die Resistenz gegen humanes Serum, und die Interaktion mit menschlichen Zellen überprüft.

Das Wachstum der *lst*-defizienten Mutante in normalem PPM⁺-Medium unterschied sich nicht vom dem des Wildtypstammes. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da mit der Deletion des *lst*-Gens kein Eingriff in lebenswichtige Stoffwechselprozesse stattgefunden hatte und die Meningokokken im PPM⁺-Medium keinem Umweltstress ausgesetzt waren.

Um zu ermitteln, ob und wie sich das Wachstumsverhalten der Mutante unter Einwirkung von Umweltstress ändern würde, wurde ein Bakterizidie-Assay mit humanem Serum durchgeführt. Auch bei einer Serumkonzentration von 80 % zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *lst*⁻-Mutante. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Vogel et al., die *lst*-Knockoutmutanten der B- und C-Stämme B1940, MC58 und 2120 auf ihre Serumresistenz testeten (Vogel, U. et al., 1999). Erst bei hohen Konzentrationen (50%) waren dort die *lst*-Mutanten der Stämme B1940 und 2120 im Nachteil gegenüber dem jeweiligen Wildtyp. Bei MC58 wurde sogar ein 90%iger Serumanteil von der Mutante ebenso gut toleriert wie vom Wildtypstamm. Auch Kahler et al., die Bakterizidie-Assays mit einer *lst*-Insertionsmutante des B-Meningokokken-Stammes NMB durchführten, konnten eine höhere Sensitivität der Mutante gegenüber dem ursprünglichen Stamm erst bei Serumkonzentrationen von 50% feststellen (Kahler, C.M. et al., 1998).

Ein stärkerer Einfluss der LOS-Sialylierung auf die Serumresistenz war auch bei kapsellosen Varianten MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻ nicht zu verzeichnen. Die kapsellosen Mutanten wuchsen bei 5% und 10% Serum im Nährmedium zwar schlechter als ohne Serumzugabe, zwischen MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻ zeigte

sich jedoch kein Wachstumsunterschied. Ähnliche Beobachtungen machten auch Kahler et al., allerdings mit einer Insertionsmutante (Kahler, C.M. et al., 1998).

Unsere Ergebnisse bestätigen also frühere Hinweise darauf, dass die LOS-Sialylierung für *Neisseria meningitidis*, im Gegensatz zu Gonokokken (Elkins, C. et al., 1992; Wetzler, L.M. et al., 1992; Frangipane, J.V. und Rest, R.F., 1993; de-la-Paz, H. et al., 1995), kaum einen Einfluss auf die Serumresistenz hat.

Andere Resultate jedoch erhielten Estabrook et al., als sie verschiedene C-Meningokokken-Stämme von Trägern und Patienten auf ihre Sensibilität gegenüber humanem Serum überprüften (Estabrook, M.M. et al., 1997). Die Stämme waren in unterschiedlichem Maße endogen sialyliert. Ihre Serumresistenz konnte durch zusätzliche exogene Sialylierung deutlich gesteigert werden. Allerdings korrelierte die Resistenz nicht direkt mit der Gesamtmenge der gebundenen Sialinsäure, wohl aber mit dem Anteil an freier Lacto-N-Neotetraose (LNnT). Estabrook et al. kamen also zu dem Schluss, dass die LOS-Sialylierung insofern die Serumresistenz steigern könne, dass sie den Anteil freier LNnT verringere und damit das Angreifen von C3 erschwere.

Die Ursache dieser Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von Studien verschiedener Wissenschaftler liegt möglicherweise in der Verwendung unterschiedlicher Stämme und Methoden. Vielleicht ist der Angriff von Komplementfaktoren bei einigen *N. meningitidis*-Stämmen, wie beispielsweise MC58, per se erschwert (u.U. durch den Aufbau oder die sterische Struktur der Lipooligosaccharide) und die Serumresistenz dieser Stämme ist dadurch unabhängig von der Blockade der Komplementbindungsstellen durch Sialylsäuren.

Bei unseren Versuchen zur Interaktion der *lst*-defizienten Mutante mit Hep2-Epithelzellen wurde deutlich, dass die LOS-Sialylierung die Invasion hemmt. Die *lst*-Deletionsmutanten konnten signifikant besser in die Epithelzellen eindringen als Stämme, die zur Sialylierung befähigt waren. Dies zeigte sich allerdings nur bei den kapsellosen Stämmen MC58 *siaD*⁻ und MC58 *siaD*⁻, *lst*⁻. Stärker als die LOS-Sialylierung beeinflusste die Kapsel das Eindringen der Bakterien. Die bekapselten Stämme MC58 WT und MC58 *lst*⁻ befanden sich auch nach 5 Stunden beinahe ausschließlich extrazellulär (~ 40fach geringere Invasion als bei kapsellosen Varianten). Diesen stark hemmenden Einfluss der Kapsel konnten wir auch bei der Adhärenz der Neisserien an Hep2-Zellen beobachten. Der Grund hierfür ist sicherlich die Maskierung

von für die Adhärenz und Invasion wichtigen Oberflächenproteinen, wie Opa und Opc. Die fehlende Sialylierungsfähigkeit der *lst*-defizienten Stämme spielte für die Adhärenz jedoch kaum eine Rolle. Die Adhärenz von Meningokokken wird zwar mit hoher Wahrscheinlichkeit über die Oberflächenproteine Opa und Opc vermittelt, es scheinen aber noch andere Faktoren mitzuwirken, da auch Opa-negative Varianten von *N. meningitidis* fest an der Epithelzelloberfläche anhaften können (Nassif, X. et al., 1999). Möglicherweise kann die gegenüber der Kapsel eher geringe Maskierung dieser OMP-s durch sialyliertes LOS die Adhärenz deshalb nicht behindern.

Für die Interaktion mit Epithelzellen sind also die Kapsel und in geringerem Maße auch die LOS-Sialylierung blockierende Faktoren.

Hammerschmidt et al. kamen bei ihren Untersuchungen mit den Stämmen B1940 *siaD*⁻ und B1940 *siaD*⁻, *galE*⁻ zu ähnlichen Ergebnissen (Hammerschmidt, S. et al., 1996). Auch sie sahen eine deutliche Hemmung von Adhärenz und Invasion durch die Kapsel der Meningokokken. Allerdings zeigte sich bei ihren Versuchen der blockierende Einfluss der LOS-Sialylierung auch bei der Adhärenz der Bakterien. Der Unterschied zu unseren Beobachtungen könnte in der Verwendung einer *galE*-Mutante, die in einem insgesamt deutlich verkürztem LOS resultiert, begründet sein. Mit hoher Wahrscheinlichkeit führt diese Verkürzung des LOS zu einer weiteren Demaskierung von Oberflächenproteinen.

Zum Einfluss der LOS-Sialylierung auf die Interaktion von *N. meningitidis* mit Endothelzellen (HbmeC) lagen bisher keine Daten vor. Da Meningokokken während der Pathogenese in den Blutstrom eindringen und zum Teil die Blut-Hirn-Schranke überwinden, war es wichtig zu wissen, wie sich der Verlust der LOS-Sialylierungsfähigkeit von MC58 auf die Adhärenz an und die Invasion in Endothelzellen auswirkt. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit denen der Epithelzellen. Bekapselte Bakterien waren kaum adhärenz und nur wenige Neisserien befanden sich nach 6 Stunden in den Endothelzellen. Die fehlende LOS-Sialylierung wirkte sich wiederum positiv auf die Invasivität der Meningokokken aus, nicht jedoch auf die Adhärenz.

Da die Interaktion von Neisserien mit Endothelzellen auch über Oberflächenproteine reguliert wird, könnten diese Ergebnisse ebenfalls über die Maskierung dieser Proteine sowohl durch die Kapsel als auch durch die Sialylgruppen des LOS erklärt werden.

Desweiteren wurde die Wirkung der LOS-Sialylierung auf Zellen der unspezifischen Immunabwehr bisher kaum untersucht. Estabrook et al. benutzten Träger- und Patientenisolate, um den Einfluss der Sialylierung auf Neutrophile zu analysieren (Estabrook, M.M. et al., 1992; Estabrook, M.M. et al., 1998). Ihre Daten geben einen Hinweis darauf, dass sialyliertes LOS neben anderen Mechanismen die Phagozytose der Neisserien durch neutrophile Granulozyten erschwert.

Unsere Untersuchungen mit der *lst*-Deletionsmutante und dendritischen Zellen ergaben ähnliche Ergebnisse. Zwar hatte die Deletion des Gens keinen Einfluss auf die Adhärenz, die Phagozytose jedoch wurde ohne die Sialylierung des LOS deutlich gesteigert. Eine *lst*-defiziente Mutante könnte in vivo also möglicherweise besser von dendritischen Zellen aufgenommen und den T-Lymphozyten präsentiert werden und somit eine stärkere spezifische Immunantwort auslösen.

Es ist schon seit längerem bekannt, dass dendritische Zellen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr des menschlichen Körpers spielen. Einerseits liegt dies in ihrer Fähigkeit begründet, Fremdkörper wie Bakterien aufzunehmen, zu verarbeiten und den T-Zellen zu präsentieren (Austyn, J.M., 1987; Metlay, J.P. et al., 1989; Steinman, R.M., 1991; Banchereau, J. und Steinman, R.M., 1998). Andererseits setzen DC-s auf bestimmte Reize hin auch eine Reihe von proinflammatorischen bzw. chemotaktisch wirksamen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 und IL-6 frei (Dixon, G.L. et al., 2001), die, wenn sie in zu großen Mengen ausgeschüttet werden, den Krankheitsverlauf durch eine überschießende Entzündungsreaktion erheblich verschlechtern können (Waage, A. et al., 1987; Waage, A. und Espevik, T., 1988). Daher wurden in der Vergangenheit schon einige Bakterien auf ihr Zusammenspiel mit dendritischen Zellen hin untersucht. Unter anderem waren dies *Escherichia coli* (Schoppet, M. et al., 2000), *Salmonella typhimurium* (Schoppet, M. et al., 2000; Yrlid, U. et al., 2000), *Chlamydia species* (Ojcius, D.M. et al., 1998) und *Bordetella bronchiseptica* (Guzman, C.A. et al., 1994). In unserer Studie haben wir die Interaktion von DC-s mit lebenden *N. meningitidis*-Stämmen verschiedener Serogruppen überprüft. Bis dato war lediglich die Reaktion von menschlichen Monozyten und Makrophagen auf die Infektion mit lebenden Meningokokken getestet worden (McNeil, G. et al., 1994; Read, R.C. et al., 1996; Lorenzen, D.R. et al., 1999; Pridmore, A.C. et al., 2001).

Die Neisserien der getesteten Serogruppen A-C konnten gut an dendritische Zellen adhäreren. Große Unterschiede zeigten sich allerdings zwischen den bekapselten und

unbekapselten Bakterien. Während bekapselte Stämme kaum adhärent waren (bis 0,9%), konnten bis zu 98% der kapseldefizienten Meningokokken an DC-s binden. Ähnliche Ergebnisse ergaben frühere Untersuchungen von Neisserien der Serogruppen A (McNeil, G. et al., 1994) und B (Read, R.C. et al., 1996) mit Makrophagen. Die Ursache für diese Beobachtungen ist wohl die Maskierung von für die Adhärenz wichtigen Oberflächenproteinen durch die Kapsel.

Da solche Oberflächenproteine auch für die Invasion bzw. Phagozytose von *Neisseria meningitidis* wichtig sind, lag die Vermutung nahe, dass besonders kapsellose Stämme phagozytiert werden. Diese Vermutung bestätigte sich in unseren Versuchen. Bei der Infektion von dendritischen Zellen mit unbekapselten Neisserien wurden nach 6 Stunden bis zu 435 mal mehr lebende intrazelluläre Bakterien als bei bekapselten Meningokokken gefunden.

In Versuchen anderer Mitarbeiter der Arbeitsgruppe wurde die Gesamtzahl der intrazellulären Bakterien mittels Elektronenmikroskopie bestimmt (Kolb-Mäurer, A. et al., 2001). Die Ergebnisse zeigten eine deutlich höhere Anzahl intrazellulärer Bakterien als bei unseren Gentamycin-Assays ermittelt wurden. Dies bedeutet, dass die von den DC-s phagozytierten Bakterien intrazellulär schnell abgetötet werden. Auch hier scheint die Kapsel einen gewissen Schutz zu bieten, da zum Zeitpunkt der Auswertung ca. 0,1% der bekapselten intrazellulären Bakterien am Leben waren, während nur 0,01% der unbekapselten Meningokokken überlebt hatten.

Diese Resultate könnten auch die deutlich schlechtere Wachstumsrate der unbekapselten Meningokokken-Stämme nach der Infektion der dendritischen Zellen erklären, das heißt die Zahl der lebenden nicht bekapselten Bakterien wird durch die starke Adhärenz, Phagozytose und nachfolgende Abtötung gering gehalten. Hinweise auf mögliche, durch die DC-s ausgeschüttete antibakteriell wirksame Substanzen, die eine Verschlechterung des Wachstums der Neisserien erklären könnten, fanden wir in unseren Versuchen nicht.

Die Zugabe von 2% autologem Humanserum hatte weder auf die Adhärenz noch auf die Phagozytose der Bakterien einen signifikant positiven oder negativen Einfluss. Dies legt nahe, dass dendritische Zellen Neisserien ohne vorherige Opsonierung phagozytieren. Anders waren die Ergebnisse von Read et al. bei ihrer Untersuchung der Interaktion von *Neisseria meningitidis* B mit menschlichen Makrophagen. Hier verstärkte die Zugabe

von Serum die Anbindung von B-Meningokokken an Makrophagen (Read, R.C. et al., 1996).

Es konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen sowohl durch bekapselte als auch durch unbekapselte Meningokokken zur Ausreifung angeregt werden. Nach Infektion wurden CD25, CD80, CD83 und MHC II an der Oberfläche der DC's exprimiert (Sallusto, F. et al., 1995; Winzler, C. et al., 1997).

Außerdem induziert die Infektion der dendritischen Zellen mit Meningokokken der Serogruppen A-C eine starke Ausschüttung der Zytokine TNF-alpha, IL-6 und IL-8.

Interessanterweise besteht auch hier ein Unterschied zwischen den bekapselten und unbekapselten Stämmen. Nach der Infektion der DC-s mit kapseldefizienten Meningokokken wird eine bis zu 30x höhere Zytokinmenge ausgeschüttet als bei kapseltragenden Neisserien. Da unbekapselte *N. meningitidis*-Stämme besser an dendritische Zellen binden, könnte der bessere Kontakt mit Zytokin-induzierenden Substanzen wie LOS die Ursache für die verstärkte Zytokinausschüttung sein. Möglicherweise bewirkt aber auch die Kapsel eine Maskierung des LOS.

Die Zytokininduktion konnte in den Versuchen durch die Zugabe von 2% autologem Plasma zusätzlich gesteigert werden. Da eine erhöhte Adhärenz bzw. Phagozytose in plasmahaltigem Milieu nicht zu verzeichnen war, muss der Anstieg der Zytokinproduktion auf andere Faktoren zurückzuführen sein. Ein möglicher Grund könnte eine erhöhte Vitalität der dendritischen Zellen im Plasma sein.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LOS ein starker Induktor der Zytokinproduktion ist, da die Infektion der dendritischen Zellen mit einer *lpx*-defizienten Mutante von H44/76 die Ausschüttung der Botenstoffe erheblich verringerte, die Zugabe von gereinigtem LOS allerdings eine starke Zytokinausschüttung bewirkte. Es zeigte sich aber auch, dass das LOS nicht die einzige Substanz sein kann, die die DC-s zur Produktion von TNF-alpha, IL-6 und IL-8 anregt, denn die Überstände der *lpx*-defizienten Mutante enthielten ebenfalls deutlich mehr Zytokine als Überstände von uninfizierten dendritischen Zellen. Zum gleichen Ergebnis kamen Dixon und Kollegen (Dixon, G.L. et al., 2001), die jedoch mit abgetöteten Meningokokken-Stämmen arbeiteten und neben TNF- α und IL-6 die Produktion von IL-1 α und IL-12 statt IL-8 überprüften. Auch die kürzlich veröffentlichte Arbeit von

Al-Bader et al. (Al-Bader, T. et al., 2003) deutet auf weitere DC-aktivierende Faktoren in der äußeren Membran von *Neisseria meningitidis* hin.

Einen signifikanten Einfluss der LOS-Sialylierung auf die Zytokinausschüttung konnten wir nicht feststellen. Dies liegt sicherlich in der Tatsache begründet, dass der Endotoxineffekt des LOS vom Lipid A-Anteil ausgeht, die Sialylketten aber an die O-Polysaccharidketten angehängt sind. Wie oben beschrieben, werden allerdings Neisserien, die nicht-sialyliertes LPS aufweisen, besser phagozytiert als Wildtyp-Bakterien.

Schließlich stellte sich uns die Frage, ob eine *lst*-Deletions-Mutante für die Herstellung eines Lebendimpfstoffes gegen Serogruppe-B-Meningokokken von Nutzen sein könnte. Impfstoffe erzeugen eine antigenspezifische Immunantwort mit einem immunologischen Gedächtnis. Die Immunisierung durch Impfstoffe ist die derzeit effektivste und kostengünstigste Möglichkeit der Krankheitsprophylaxe. Trotz intensiver Bemühungen, die bis an den Anfang des 20. Jahrhunderts zurückreichen, wurde bisher noch kein universaler Impfstoff gegen Meningokokken aller Serogruppen gefunden. Für *N. meningitidis* der Serogruppe B gestaltet sich die Suche nach einem Impfstoff, wie bereits erwähnt, besonders schwierig, da die Polysaccharidkapsel nicht immunogen wirkt.

Bei der Impfung mit Lebendvakzinen werden abgeschwächte Krankheitserreger verwendet, d. h. Keime, die zwar durch ihre Antigene eine schützende Immunreaktion im Organismus hervorrufen, aber keine krankheitsauslösende Potenz mehr besitzen. Lebendvakzinen werden bereits seit geraumer Zeit zur Krankheitsprophylaxe eingesetzt. Bekannte Beispiele für bakterielle Lebendvakzinen sind der *Mycobacterium bovis*-Stamm Bacille Calmette-Guerin (BCG), der der Verhinderung von bestimmten Tuberkuloseformen dient, *Salmonella typhi* Typ 21, ein oraler Impfstoff gegen Typhus, der in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts durch chemische Mutagenese hergestellt wurde und *Vibrio cholerae* CVD 103 HgR, der gegen die Cholera immunisiert und in den 80er Jahren durch molekularbiologische Methoden konstruiert wurde. Diese Impfstoffe haben sich millionenfach bewährt und gelten als sehr sicher (Dietrich, G. et al., 2003).

Es ist bekannt, dass die Entwicklung der Immunität gegen Meningokokkeninfektionen eng verknüpft ist mit der Besiedlung des Nasopharynx mit nicht-pathogenen Stämmen wie *Neisseria lactamica* (Frosch, 1999). Ein intranasal applizierter attenuierter

Neisseria meningitidis-Stamm könnte diesen Weg der Immunisierung imitieren. Somit würde eine Lebendvakzine also eine weitere Alternative für die Prophylaxe von Serogruppe B-Erkrankungen darstellen.

Allerdings müssten Risiken für die Sicherheit einer solchen Vakzine bedacht und beseitigt werden. Zum einen ist eine ausreichende Attenuierung eines Neisserien-Lebendimpfstoffs unabdingbar. Bereits in vorklinischen Tests sollte am Modell sichergestellt werden, dass der potenzielle Impfstamm keine krankheitsauslösende Virulenz mehr besitzt.

Ein weiteres Sicherheitsproblem stellt die natürliche Kompetenz von *N. meningitidis* dar, d. h. die Möglichkeit, DNA aus der Umgebung aufzunehmen und in das eigene Genom zu integrieren. Auf Grund dessen sind Rückmutationen in ein virulentes Bakterium möglich. Daher sollte der Impfstoff mehrere unabhängige Mutationen nicht nur im Bereich der Stoffwechselwege des Bakteriums, sondern auch im DNA-Uptake- und Rekombinationsbereich enthalten, um eine solche Rückmutation zu verhindern (Tang, C. et al., 1999).

Von einem *lst*-defizienten Impfstoffkandidaten könnte man eine gewisse Attenuierung der Virulenz erwarten. Die Mutante wäre fähig, den Nasopharynx zu kolonisieren, könnte die Mukosa-Barriere durch die erhöhte Invasivität in Epithelzellen leichter als der sialylierte Wildtyp überwinden und würde durch erleichterte Invasion in Endothelzellen rasch den Blutstrom erreichen. Dort angekommen könnte sie von APC's wie dendritischen Zellen besser phagozytiert werden als der Wildtyp und daraufhin eine spezifische Immunantwort auslösen. Es ist jedoch nicht abschließend geklärt, ob die durch die *lst*-Deletion erreichte Attenuierung für einen Einsatz als Lebendvakzine ausreichend ist. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen könnten darauf hinweisen, dass weitergehende LPS-Trunkierungen die Konstruktion einer Lebendvakzine ermöglichen (Li, Y. et al., 2004).

V. ZUSAMMENFASSUNG

Neisseria meningitidis kann rasch tödlich verlaufende Erkrankungen wie die Meningokokken-Meningitis und –Sepsis hervorrufen. In den Industriestaaten werden diese Infektionen meist durch Meningokokken der Serogruppen B und C hervorgerufen. Während für die Serogruppe C bereits ein suffizienter Polysaccharidimpfstoff existiert, konnte ein solcher für Stämme der Serogruppe B aufgrund der Immuntoleranz gegen deren N-acetylneuraminsäure noch nicht gefunden werden. Eine Lebendvakzine könnte dieses Problem lösen, da hier viele verschiedene Antigene, welche eine Immunantwort im menschlichen Körper induzieren, zur Verfügung stünden. Die Voraussetzung für eine Lebendvakzine ist Attenuierung eines B-Meningokokken-Stammes durch die Deletion verschiedener Gene. In früheren Untersuchungen ergaben sich Hinweise darauf, dass die LOS-Sialylierung einen Virulenzfaktor darstellt. Das *lst*-Gen codiert für die α -2,3-Sialyltransferase, deren Aufgabe es ist, die Sialinsäurereste an die Lacto-N-Neotetraose des LOS zu binden.

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass eine *lst*-Deletionsmutante des Serogruppe-B-Stammes MC58 herstellbar ist. Das Wachstumsverhalten der Mutante in PPM⁺-Medium unterschied sich nicht von dem des Wildtyps. Auch die Resistenz der Bakterien gegenüber humanem Serum (bis 80%) blieb von der Deletion des *lst*-Gens unbeeinflusst.

Bei der Interaktion mit Epithel- und Endothelzellen allerdings zeigte sich bei der Mutante eine erhöhte Invasivität. Da die Invasion durch Oberflächenproteine wie Opa und Opc vermittelt wird, wäre eine mögliche Begründung für diese Veränderung die bessere Zugänglichkeit dieser Proteine durch das Fehlen der LOS-Sialylierung. Meningokokken mit nicht sialyliertem LOS wurden außerdem von dendritischen Zellen signifikant besser phagozytiert als Wildtyp-Bakterien. Besonders deutlich zeigte sich dies bei fehlender Kapsel. Auch hier ist sicherlich die Maskierung von Bindungsstellen durch Sialinsäuregruppen ein Grund für diese Beobachtung.

Weiterhin wurde die Interaktion von Meningokokken verschiedener Serogruppen mit dendritischen Zellen unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses der Polysaccharidkapsel untersucht. Die Meningokokken der untersuchten Serogruppen A, B und C wurden von dendritischen Zellen gut phagozytiert und abgetötet. Allerdings waren sowohl die Adhärenz als auch die Phagozytose bei Vorhandensein einer

Polysaccharidkapsel stark inhibiert. *Neisseria meningitidis*-Stämme aller drei getesteten Serogruppen induzierten eine starke Ausschüttung der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-8. Als ein Induktor dieser Substanzen erwiesen sich die Lipooligosaccharide der Meningokokken. Allerdings zeigte sich in den Versuchen auch, dass noch weitere Bakterienbestandteile eine Zytokinausschüttung hervorrufen können. Die Sialylierung der Lipooligosaccharide hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Menge der produzierten Zytokine.

Mit dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass dendritische Zellen mit der Ausschüttung von Zytokinen und der Phagozytose von Bakterien eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Erkrankungen durch Meningokokken spielen könnten. Auch beim Zusammenspiel mit DC-s wirkt die Kapsel als Schutzfaktor vor dem Angriff des menschlichen Immunsystems. Dieser Schutz kann durch die LOS-Sialylierung zusätzlich gesteigert werden. Die Deletion des *lst*-Gens könnte also als ein Baustein für die Konstruktion eines attenuierten Lebendvakzine-Stammes fungieren.

VI. ABKÜRZUNGEN

<u>A</u>	APC	Antibody presenting cell (Antikörper-präsentierende Zelle)
	APS	Ammoniumperoxidsulfat
	ATP	Adenosintriphosphat
<u>B</u>	BCIP	Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
	Bp	Basenpaare
	BSA	Bovine serum albumine (Rinderserum-Albumin)
<u>C</u>	CD	Cluster of differentiation (Differenzierungsantigen)
	CFU	Colony forming units (Kolonie-bildende Einheiten-KBE)
	CMP-NANA	Cytidinmonophospho-N-acetylneuraminsäure
	CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro(1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo{3,3,1.1 ^{3,7} }decan)-4-yl) phenyl phosphate
<u>D</u>	dATP	Desoxyadenosintriphosphat
	DC	Dendritic cell (Dendritische Zelle)
	dCTP	Desoxycytidintriphosphat
	ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
	DIG	Digoxigenin
	DNA	Desoxyribonukleinacid (Desoxyribonukleinsäure)
	dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
	dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<u>E</u>	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid (Äthylendiamintetraessigsäure)
	ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay (heterogener Enzym-Immunassay)
	ET	Electrophoretic type (elektrophoretischer Typ)
	EtOH	Ethanol
<u>F</u>	Fc	Fragment crystallizable (leicht kristallisierendes Fragment)
	FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
<u>G</u>	Gal	Galactose
	GC-Agar	Glutamin-Cocarboxylase-Agar

GEBS	Glycerin/ EDTA/ Bromphenolblau/ N-Lauroylsarkosin
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor)
<u>H</u>	
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
Hbmec	Human brain
Hep	Heptose
Hep2	human laryngeal epithelial cell (humane Larynxkarzinomzellen)
<u>I</u>	
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Ampicillin, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
<u>K</u>	
kB	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
Kdo	3-Desoxy-D-manno-octulosonsäure
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
<u>L</u>	
LB-Agar	Luria-Broth-Agar
LB-AIX-Agar	Luria-Broth-Agar mit Ampicillin, IPTG, X-Gal
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
<u>M</u>	
MAC	Membrane attack complex
MBL	Mannose-binding-lectin (Mannose bindendes Lektin)
MCS	Multiple cloning site (multiple Klonierungsregion)
MHC	Major histocompatibility complex (Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex)
MOI	Multiplicity of infection (Infektionsfaktor)
<u>N</u>	
<i>N.m.</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
NBT	Nitroblau Tetrazolium
NeuNAc	N-acetylneuraminsäure
<u>O</u>	
OD	Optische Dichte
Opa	Opacity protein

<u>P</u>	PBMC	Peripheral blood monocytes (periphere Blut-Monozyten)
	PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepuffertes Salz)
	PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
	PPM (+)	Proteose-Pepton-Medium (+Supplement)
<u>R</u>	RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (Institut für Gesundheit und Umwelt, Niederlande)
	Rnase	Ribonuklease
	RPMI-Medium	„Roswell Park Memorial Institute“-Medium
	RT	Raumtemperatur
<u>S</u>	SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
	SSC	Saline–Sodium Citrate (Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung)
	ST	Sequenztyp
	Strep	Streptomycin
<u>T</u>	Taq	Termophilus aquaticus
	TBE	Tris/Borsäure/EDTA
	TLR	Toll-like-Rezeptor
	TNF	Tumornekrose-Faktor
<u>U</u>	ÜN	über Nacht
<u>W</u>	WT	Wildtyp
<u>X</u>	X-Gal	X-Galactosid

VII. LITERATUR

Akbari, O., DeKruyff, R. H., Umetsu, D. T. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol*, 2 [8], Seite 725-31

Al-Bader, T., Christodoulides, M., Heckels, J. E., Holloway, J., Semper, A. E., Friedmann, P. S. 2003. Activation of human dendritic cells is modulated by components of the outer membranes of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 71 [10], Seite 5590-7

Argenbright, L. W., Barton, R. W. 1992. Interactions of leukocyte integrins with intercellular adhesion molecule 1 in the production of inflammatory vascular injury in vivo. The Shwartzman reaction revisited. *J Clin Invest*, 89 [1], Seite 259-72.

Austyn, J. M. 1987. Lymphoid dendritic cells. *Immunology*, 62 [2], Seite 161-70

Austyn, J. M. 1996. New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med*, 183 [4], Seite 1287-92.

Austyn, J. M., Wood, K. J. 1993 (a). Dendritic cells. In: *Principles of cellular and molecular immunology*. Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press, Seite 161-176

Austyn, J. M., Wood, K. J. 1993 (b). Cytokines mediating inflammatory and effector functions. In: *Principles of cellular and molecular immunology*. Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press, Seite 559-572

Baldwin, L. N., Henderson, A., Thomas, P., Wright, M. 1993. Acute bacterial meningitis in young adults mistaken for substance abuse. *British Medical Journal*, 306 [6880], Seite 775-6.

Banchereau, J., Steinman, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392 [6673], Seite 245-52.

Benz, R. 1988. Structure and function of porins from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 42, Seite 359-93

Blake, M. S., Blake, C. M., Apicella, M. A., Mandrell, R. E. 1995. Gonococcal opacity: lectin-like interactions between Opa proteins and lipooligosaccharide. *Infect Immun*, 63 [4], Seite 1434-9.

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M. C., Steinman, R. M. 2002. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med*, 196 [12], Seite 1627-38

Brandtzaeg, P. 1992. Humoral immune response patterns of human mucosae: induction and relation to bacterial respiratory tract infections. *J Infect Dis*, 165 Suppl 1 , Seite S167-76

Brandtzaeg, P. 1996. Systemic meningococcal disease: clinical pictures and pathophysiological background. *Rev Med Microbiol*, [7], Seite 63-72

Brandtzaeg, P., Ovstebo, R., Kierulf, P. 1992. Compartmentalization of lipopolysaccharide production correlates with clinical presentation in meningococcal disease. *J Infect Dis*, 166 [3], Seite 650-2.

Broome, C. V. 1986. The carrier state: *Neisseria meningitidis*. *J Antimicrob Chemother*, 18 Suppl A , Seite 25-34.

Burmester, G. R. 1998. Taschenatlas der Immunologie, , Stuttgart, Thieme

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., Banchereau, J. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*, 180 [4], Seite 1263-72

Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J., Gusovsky, F. 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*, 274 [16], Seite 10689-92

Claus, H., Maiden, M. C., Maag, R., Frosch, M., Vogel, U. 2002. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology*, 148 [Pt 6], Seite 1813-9

Cosloy, S. D., Oishi, M. 1973. The nature of the transformation process in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet*, 124 [1], Seite 1-10

- Criado, M. T., Ferreiros, C. M., Sainz, V.** 1985. Adherence and hydrophobicity in *Neisseria meningitidis* and their relationship with surface charge. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 174 [3], Seite 151-6
- Dankert, J.** 1999. *Neisseria*. In: *Infectious Diseases*. Armstrong, C. London, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Tokyo, Mosby, 2,
- de Jong, E. C., Vieira, P. L., Kalinski, P., Schuitemaker, J. H., Tanaka, Y., Wierenga, E. A., Yazdanbakhsh, M., Kapsenberg, M. L.** 2002. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol*, 168 [4], Seite 1704-9
- de Vries, F. P., Cole, R., Dankert, J., Frosch, M., van Putten, J. P.** 1998. *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Mol Microbiol*, 27 [6], Seite 1203-12.
- de Vries, F. P., van Der Ende, A., van Putten, J. P., Dankert, J.** 1996. Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. *Infect Immun*, 64 [8], Seite 2998-3006.
- de-la-Paz, H., Cooke, S. J., Heckels, J. E.** 1995. Effect of sialylation of lipopolysaccharide of *Neisseria gonorrhoeae* on recognition and complement-mediated killing by monoclonal antibodies directed against different outer-membrane antigens. *Microbiology*, 141 [Pt 4], Seite 913-20
- Dietrich, G., Griot-Wenk, M., Metcalfe, I. C., Lang, A. B., Viret, J. F.** 2003. Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine*, 21 [7-8], Seite 678-83
- Dixon, G. L., Newton, P. J., Chain, B. M., Katz, D., Andersen, S. R., Wong, S., van der-Ley, P., Klein, N., Callard, R. E.** 2001. Dendritic cell activation and cytokine production induced by group B *Neisseria meningitidis*: interleukin-12 production depends on lipopolysaccharide expression in intact bacteria. *Infect Immun*, 69 [7], Seite 4351-7
- Elkins, C., Carbonetti, N. H., Varela, V. A., Stirewalt, D., Klapper, D. G., Sparling, P. F.** 1992. Antibodies to N-terminal peptides of gonococcal porin are bactericidal when gonococcal lipopolysaccharide is not sialylated. *Mol Microbiol*, 6 [18], Seite 2617-28

Estabrook, M. M., Christopher, N. C., Griffiss, J. M., Baker, C. J., Mandrell, R. E. 1992. Sialylation and human neutrophil killing of group C *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis*, 166 [5], Seite 1079-88.

Estabrook, M. M., Griffiss, J. M., Jarvis, G. A. 1997. Sialylation of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-N-neotetraose. *Infect Immun*, 65 [11], Seite 4436-44.

Estabrook, M. M., Zhou, D., Apicella, M. A. 1998. Nonopsonic phagocytosis of group C *Neisseria meningitidis* by human neutrophils. *Infect Immun*, 66 [3], Seite 1028-36

Fijen, C. A., Kuijper, E. J., Tjia, H. G., Daha, M. R., Dankert, J. 1994. Complement deficiency predisposes for meningitis due to nongroupable meningococci and *Neisseria*-related bacteria. *Clin Infect Dis*, 18 [5], Seite 780-4.

Finkelman, F. D., Lees, A., Birnbaum, R., Gause, W. C., Morris, S. C. 1996. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J Immunol*, 157 [4], Seite 1406-14

Finne, J., Bitter-Suermann, D., Goridis, C., Finne, U. 1987. 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 [12], Seite 4402-7

Finne, J., Leinonen, M., Makela, P. H. 1983. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet*, 2 [8346], Seite 355-7

Frangipane, J. V., Rest, R. F. 1993. Anaerobic growth and cytidine 5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid act synergistically to induce high-level serum resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*, 61 [5], Seite 1657-66

Frosch. 1999. Meningokokken-Impfstoffe: Aktueller Stand und zukünftige Entwicklungen. *Dt Ärztebl*, 96 [51-52], Seite A-3306-08

Fujisaki, S., Hara, H., Nishimura, Y., Horiuchi, K., Nishino, T. 1990. Cloning and nucleotide sequence of the *ispA* gene responsible for farnesyl diphosphate synthase activity in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)*, 108 [6], Seite 995-1000

Gilbert, M., Watson, D. C., Cunningham, A. M., Jennings, M. P., Young, N. M., Wakarchuk, W. W. 1996. Cloning of the lipooligosaccharide alpha-2,3-sialyltransferase from the bacterial pathogens *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Biol Chem*, 271 [45], Seite 28271-6.

Glode, M. P., Robbins, J. B., Liu, T. Y., Gotschlich, E. C., Orskov, I., Orskov, F. 1977. Cross-antigenicity and immunogenicity between capsular polysaccharides of group C *Neisseria meningitidis* and of *Escherichia coli* K92. *J Infect Dis*, 135 [1], Seite 94-104

Guzman, C. A., Rohde, M., Bock, M., Timmis, K. N. 1994. Invasion and intracellular survival of *Bordetella bronchiseptica* in mouse dendritic cells. *Infect Immun*, 62 [12], Seite 5528-37

Hahn, H., Meyer, T. F. 1999. Neisserien. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* von P.Klein. Hahn, Falke, Kaufmann, Ullmann. Berlin, Springer-Verlag, Seite 238-249

Hammerschmidt, S., Hilse, R., van-Putten, J. P., Gerardy-Schahn, R., Unkmeir, A., Frosch, M. 1996. Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO J*, 15 [1], Seite 192-8

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166 [4], Seite 557-80

Harduin-Lepers, A., Recchi, M. A., Delannoy, P. 1995. 1994, the year of sialyltransferases. *Glycobiology*, 5 [8], Seite 741-58.

Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V., Steinman, R. M., Nussenzweig, M. C. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*, 194 [6], Seite 769-79

Heckels, J. E., Blackett, B., Everson, J. S., Ward, M. E. 1976. The influence of surface charge on the attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to human cells. *J Gen Microbiol*, 96 [2], Seite 359-64.

Hitchcock, P. J., Brown, T. M. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol*, 154 [1], Seite 269-77

Hoang, L. M., Thomas, E., Tyler, S., Pollard, A. J., Stephens, G., Gustafson, L., McNabb, A., Pocock, I., Tsang, R., Tan, R. 2005. Rapid and fatal meningococcal disease due to a strain of *Neisseria meningitidis* containing the capsule null locus. *Clin Infect Dis*, 40 [5], Seite 38-42

Holten, E. 1979. Serotypes of *Neisseria meningitidis* isolated from patients in Norway during the first six months of 1978. *J Clin Microbiol*, 9 [2], Seite 186-8

Jack, D. L., Jarvis, G. A., Booth, C. L., Turner, M. W., Klein, N. J. 2001. Mannose-binding lectin accelerates complement activation and increases serum killing of *Neisseria meningitidis* serogroup C. *J Infect Dis*, 184 [7], Seite 836-45.

Jennings, M. P., Hood, D. W., Peak, I. R., Virji, M., Moxon, E. R. 1995. Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*, 18 [4], Seite 729-40

Jones, C., Virji, M., Crocker, P. R. 2003. Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. *Mol Microbiol*, 49 [5], Seite 1213-25

Jones, D. M. 1989. Control of meningococcal disease. *British Medical Journal*, 298 [6673], Seite 542-3.

Jones, D. M., Borrow, R., Fox, A. J., Gray, S., Cartwright, K. A., Poolman, J. T. 1992. The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. *Microb Pathog*, 13 [3], Seite 219-24.

Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., Enk, A. H. 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol*, 27 [12], Seite 3135-42

Josien, R., Wong, B. R., Li, H. L., Steinman, R. M., Choi, Y. 1999. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J Immunol*, 162 [5], Seite 2562-8

Kahler, C. M., Martin, L. E., Shih, G. C., Rahman, M. M., Carlson, R. W., Stephens, D. S. 1998. 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 [12], Seite 5939-47

Kolb-Mäurer, A., Kurzai, O., Goebel, W., Frosch, M. 2003. The role of human dendritic cells in meningococcal and listerial meningitis. *Int J Med Microbiol*, 293 [4], Seite 241-9

Kolb-Mäurer, A., Unkmeir, A., Kämmerer, U., Hübner, C., Leimbach, T., Stade, A., Kampgen, E., Frosch, M., Dietrich, G. 2001. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Infect Immun*, 69 [11], Seite 6912-22

Laemmler, U. K., Beguin, F., Gujer-Kellenberger, G. 1970. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol*, 47 [1], Seite 69-85

Li, Y., Sun, Y. H., Ison, C., Levine, M. M., Tang, C. M. 2004. Vaccination with attenuated *Neisseria meningitidis* strains protects against challenge with live Meningococci. *Infect Immun*, 72 [1], Seite 345-51

Loggie, B. W., Hinchey, E. J. 1986. Does splenectomy predispose to meningococcal sepsis? An experimental study and clinical review. *J Pediatr Surg*, 21 [4], Seite 326-30.

Lorenzen, D. R., Dux, F., Wolk, U., Tsirpouchtsidis, A., Haas, G., Meyer, T. F. 1999. Immunoglobulin A1 protease, an exoenzyme of pathogenic *Neisseriae*, is a potent inducer of proinflammatory cytokines. *J Exp Med*, 190 [8], Seite 1049-58.

Lutz, M. B., Girolomoni, G., Ricciardi Castagnoli, P. 1996. The role of cytokines in functional regulation and differentiation of dendritic cells. *Immunobiology*, 195 [4-5], Seite 431-55

Mackinnon, F. G., Borrow, R., Gorrington, A. R., Fox, A. J., Jones, D. M., Robinson, A. 1993. Demonstration of lipooligosaccharide immunotype and capsule as virulence factors for *Neisseria meningitidis* using an infant mouse intranasal infection model. *Microb Pathog*, 15 [5], Seite 359-66

Mandrell, R. E., Kim, J. J., John, C. M., Gibson, B. W., Sugai, J. V., Apicella, M. A., Griffiss, J. M., Yamasaki, R. 1991. Endogenous sialylation of the lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol*, 173 [9], Seite 2823-32.

McNeil, G., Virji, M., Moxon, E. R. 1994. Interactions of *Neisseria meningitidis* with human monocytes. *Microb Pathog*, 16 [2], Seite 153-63

- Metlay, J. P., Pure, E., Steinman, R. M.** 1989. Control of the immune response at the level of antigen-presenting cells: a comparison of the function of dendritic cells and B lymphocytes. *Adv Immunol*, 47 , Seite 45-116
- Meyer, T. F., Gibbs, C. P., Haas, R.** 1990. Variation and control of protein expression in *Neisseria*. *Annu Rev Microbiol*, 44 , Seite 451-77
- Mitchell, S. R., Nguyen, P. Q., Katz, P.** 1990. Increased risk of neisserial infections in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*, 20 [3], Seite 174-84.
- Morley, S. L., Pollard, A. J.** 2001. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? *Vaccine*, 20 [5-6], Seite 666-87
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P., Mantovani, A.** 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*, 164 [11], Seite 5998-6004
- Nairn, C. A., Cole, J. A., Patel, P. V., Parsons, N. J., Fox, J. E., Smith, H.** 1988. Cytidine 5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid or a related compound is the low Mr factor from human red blood cells which induces gonococcal resistance to killing by human serum. *J Gen Microbiol*, 134 [Pt 12], Seite 3295-306.
- Nassif, X., Pujol, C., Morand, P., Eugene, E.** 1999. Interactions of pathogenic *Neisseria* with host cells. Is it possible to assemble the puzzle? *Mol Microbiol*, 32 [6], Seite 1124-32.
- Ojcius, D. M., Bravo-de-Alba, Y., Kanellopoulos, J. M., Hawkins, R. A., Kelly, K. A., Rank, R. G., Dautry-Varsat, A.** 1998. Internalization of *Chlamydia* by dendritic cells and stimulation of *Chlamydia*-specific T cells. *J Immunol*, 160 [3], Seite 1297-303
- Pridmore, A. C., Wyllie, D. H., Abdillahi, F., Steeghs, L., van der Ley, P., Dower, S. K., Read, R. C.** 2001. A lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis* elicits attenuated cytokine release by human macrophages and signals via toll-like receptor (TLR) 2 but not via TLR4/MD2. *J Infect Dis*, 183 [1], Seite 89-96
- Pridmore, A. C., Wyllie, D. H., Abdillahi, F., Steeghs, L., van-der-Ley, P., Dower, S. K., Read, R. C.** 2001. A lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis* elicits attenuated cytokine release by human macrophages and signals via toll-like receptor (TLR) 2 but not via TLR4/MD2. *J Infect Dis*, 183 [1], Seite 89-96

Read, R. C., Zimmerli, S., Broaddus, C., Sanan, D. A., Stephens, D. S., Ernst, J. D. 1996. The (α 2 \rightarrow 8)-linked polysialic acid capsule of group B *Neisseria meningitidis* modifies multiple steps during interaction with human macrophages. *Infect Immun*, 64 [8], Seite 3210-7

Reller, L. B., MacGregor, R. R., Beaty, H. N. 1973. Bactericidal antibody after colonization with *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis*, 127 [1], Seite 56-62

Rescigno, M. 2002. Dendritic cells and the complexity of microbial infection. *Trends Microbiol*, 10 [9], Seite 425-61

RKI; 2006. Zur Situation bei ausgewählten Infektionskrankheiten in Deutschland: Invasive Meningokokken-Erkrankungen im Jahr 2005. Berlin, Robert Koch Institut, Seite 281-290

Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M., Schuler, G. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*, 180 [1], Seite 83-93

Romani, N., Koch, F., Heufler, C., Kämpgen, E., Schuler, G. 1999. Dendritic cells as donors and recipients of cytokine signals. In: *Dendritic Cells: Biology and Clinical Applications*. Lotze, M. T., Thomson, A. W. San Diego, CA: Academic Press, Seite 653-672

Rudel, T., Facius, D., Barten, R., Scheuerpflug, I., Nonnenmacher, E., Meyer, T. F. 1995. Role of pili and the phase-variable PilC protein in natural competence for transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 [17], Seite 7986-90.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 [4839], Seite 487-91

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*, 182 [2], Seite 389-400.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-

stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, 179 [4], Seite 1109-18.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74 [12], Seite 5463-7

Saunders, N. J., Jeffries, A. C., Peden, J. F., Hood, D. W., Tettelin, H., Rappuoli, R., Moxon, E. R. 2000. Repeat-associated phase variable genes in the complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* strain MC58. *Mol Microbiol*, 37 [1], Seite 207-15

Schagger, H., von-Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166 [2], Seite 368-79

Schoppet, M., Huppertz, H. I., Simm, A., Bubert, A. 2000. Infection of dendritic cells by enterobacteriaceae. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 188 [4], Seite 191-6

Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., Kirschning, C. J. 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*, 274 [25], Seite 17406-9

Shell, D. M., Chiles, L., Judd, R. C., Seal, S., Rest, R. F. 2002. The *Neisseria* lipooligosaccharide-specific alpha-2,3-sialyltransferase is a surface-exposed outer membrane protein. *Infect Immun*, 70 [7], Seite 3744-51

Sotto, M. N., Langer, B., Hoshino-Shimizu, S., de Brito, T. 1976. Pathogenesis of cutaneous lesions in acute meningococemia in humans: light, immunofluorescent, and electron microscopic studies of skin biopsy specimens. *J Infect Dis*, 133 [5], Seite 506-14.

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98 [3], Seite 503-17

Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*, 9, Seite 271-96

- Steinman, R. M., Hawiger, D., Nussenzweig, M. C.** 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 21 , Seite 685-711
- Swanson, J.** 1978. Studies on gonococcus infection. XIV. Cell wall protein differences among color/opacity colony variants of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*, 21 [1], Seite 292-302.
- Swanson, J., Belland, R. J., Hill, S. A.** 1992. Neisserial surface variation: how and why? *Curr Opin Genet Dev*, 2 [5], Seite 805-11.
- Tang, C., Moxon, R., Levine, M. M.** 1999. For discussion: live attenuated vaccines for group B meningococcus. *Vaccine*, 17 [2], Seite 114-7.
- Tommassen, J., Vermeij, P., Struyve, M., Benz, R., Poolman, J. T.** 1990. Isolation of *Neisseria meningitidis* mutants deficient in class 1 (porA) and class 3 (porB) outer membrane proteins. *Infect Immun*, 58 [5], Seite 1355-9.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76 [9], Seite 4350-4
- Tsai, C. M., Civin, C. I.** 1991. Eight lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis* react with a monoclonal antibody which binds lacto-N-neotetraose (Gal beta 1-4GlcNAc beta 1-3Gal beta 1-4Glc). *Infect Immun*, 59 [10], Seite 3604-9
- Tsai, C. M., Kao, G., Zhu, P.** 2002. Influence of the length of the lipooligosaccharide alpha chain on its sialylation in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 70 [1], Seite 407-11
- Tunkel, A. R., Scheld, W. M.** 1993. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Annu Rev Med*, 44 , Seite 103-20
- Ulevitch, R. J.** 1999. Toll gates for pathogen selection. *Nature*, 401 [6755], Seite 755-6
- Unkmeir, A., Kammerer, U., Stade, A., Hübner, C., Haller, S., Kolb-Mäurer, A., Frosch, M., Dietrich, G.** 2002 (a). Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human dendritic cells. *Infect Immun*, 70 [5], Seite 2454-62
- Unkmeir, A., Latsch, K., Dietrich, G., Wintermeyer, E., Schinke, B., Schwender, S., Kim, K. S., Eigenthaler, M., Frosch, M.** 2002 (b). Fibronectin mediates Opc-

dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol Microbiol*, 46 [4], Seite 933-46

van Deuren, M., Brandtzaeg, P., van der Meer, J. W. 2000. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev*, 13 [1], Seite 144-66, table of contents.

van Deuren, M., van der Ven-Jongekrijg, J., Bartelink, A. K., van Dalen, R., Sauerwein, R. W., van der Meer, J. W. 1995. Correlation between proinflammatory cytokines and antiinflammatory mediators and the severity of disease in meningococcal infections. *J Infect Dis*, 172 [2], Seite 433-9.

Virji, M., Kayhty, H., Ferguson, D. J., Alexandrescu, C., Heckels, J. E., Moxon, E. R. 1991. The role of pili in the interactions of pathogenic *Neisseria* with cultured human endothelial cells. *Mol Microbiol*, 5 [8], Seite 1831-41

Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D. J., Achtman, M., Moxon, E. R. 1993. Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol*, 10 [3], Seite 499-510.

Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D. J., Achtman, M., Sarkari, J., Moxon, E. R. 1992. Expression of the Opc protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*, 6 [19], Seite 2785-95.

Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D. J., Watt, S. M. 1996 (b). Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic neisseriae. *Mol Microbiol*, 22 [5], Seite 941-50.

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

Virji, M., Watt, S. M., Barker, S., Makepeace, K., Doyonnas, R. 1996 (a). The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol*, 22 [5], Seite 929-39.

Vogel, U., Claus, H., Heinze, G., Frosch, M. 1997. Functional characterization of an isogenic meningococcal alpha-2,3-sialyltransferase mutant: the role of lipooligosaccharide sialylation for serum resistance in serogroup B meningococci. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 186 [2-3], Seite 159-66

Vogel, U., Claus, H., Heinze, G., Frosch, M. 1999. Role of lipopolysaccharide sialylation in serum resistance of serogroup B and C meningococcal disease isolates. *Infect Immun*, 67 [2], Seite 954-7.

Vogel, U., Claus, H., von Muller, L., Bunjes, D., Elias, J., Frosch, M. 2004. Bacteremia in an immunocompromised patient caused by a commensal *Neisseria meningitidis* strain harboring the capsule null locus (cn1). *J Clin Microbiol*, 42 [7], Seite 2898-901

Vogel, U., Frosch, M. 1999. Mechanisms of neisserial serum resistance. *Mol Microbiol*, 32 [6], Seite 1133-9.

Vogel, U., Hammerschmidt, S., Frosch, M. 1996. Sialic acids of both the capsule and the sialylated lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup B are prerequisites for virulence of meningococci in the infant rat. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 185 [2], Seite 81-7

Waage, A., Espevik, T. 1988. Interleukin 1 potentiates the lethal effect of tumor necrosis factor alpha/cachectin in mice. *J Exp Med*, 167 [6], Seite 1987-92

Waage, A., Halstensen, A., Espevik, T. 1987. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet*, 1 [8529], Seite 355-7

Waage, A., Halstensen, A., Shalaby, R., Brandtzaeg, P., Kierulf, P., Espevik, T. 1989. Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J Exp Med*, 170 [6], Seite 1859-67.

Werling, D., Hope, J. C., Chaplin, P., Collins, R. A., Taylor, G., Howard, C. J. 1999. Involvement of caveolae in the uptake of respiratory syncytial virus antigen by dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 66 [1], Seite 50-8

Wetzler, L. M., Barry, K., Blake, M. S., Gotschlich, E. C. 1992. Gonococcal lipooligosaccharide sialylation prevents complement-dependent killing by immune sera. *Infect Immun*, 60 [1], Seite 39-43

Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V. S., Davoust, J., Ricciardi-Castagnoli, P. 1997. Maturation stages of

mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med*, 185 [2], Seite 317-28.

Yrlid, U., Svensson, M., Johansson, C., Wick, M. J. 2000. Salmonella infection of bone marrow-derived macrophages and dendritic cells: influence on antigen presentation and initiating an immune response. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 27 [4], Seite 313-20

Ziltener, H. J., Fazekas-de-St-Groth, B., Leslie, K. B., Schrader, J. W. 1988. Multiple glycosylated forms of T cell-derived interleukin 3 (IL-3). Heterogeneity of IL-3 from physiological and nonphysiological sources. *J Biol Chem*, 263 [28], Seite 14511-7

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Menschen herzlich bedanken, die mich auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben, um diese Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Zunächst gilt mein Dank der Arbeitsgruppe „Neisserien“ am Institut für Hygiene und Mikrobiologie in Würzburg. Claudia Hübner, Michaela Dümig und Ursula Panzner haben mich engagiert und geduldig mit den mikrobiologischen Arbeitstechniken vertraut gemacht und standen mir bei meinen Versuchsreihen stets mit Rat und Tat zur Seite.

Mit Freude habe ich mit Sabine Haller in einigen Bereichen der Arbeit eng zusammengearbeitet. Danken möchte ich auch Dr. med. Sebastian Kurz, dessen konstruktive Gespräche mir immer Motivation waren.

Von Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir habe ich vor allem für das Gebiet der dendritischen Zellen Unterstützung erhalten.

Ganz besonders danken möchte ich natürlich meinem Betreuer Dr. Guido Dietrich, der mir viel Geduld und Vertrauen entgegengebracht und mich in schwierigen Situationen mit seinen wertvollen Ratschlägen zum Weitermachen motiviert hat.

Selbstverständlich gilt mein Dank auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg, die mich bereitwillig in das Team integriert und mir stets ihre Hilfsbereitschaft entgegengebracht haben.

Herrn Prof. Dr. Frosch möchte für dafür danken, dass er mir die Gelegenheit gegeben hat, diese Arbeit am Institut für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg durchzuführen.

Frau PD Dr. Dr. Annette Kolb-Mäurer gilt mein Dank nicht nur für die Übernahme des Zweitgutachtens, sondern auch für die Zusammenarbeit im Bereich „Dendritische Zellen“.

Auch Dr. med. Ulrike Kämmerer danke ich für die unkomplizierte Kooperation auf diesem Gebiet.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und meinem Freund Matthias danken, die immer an mich geglaubt und mich in meinem beruflichen Werdegang bestärkt haben. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

Lebenslauf

Name	Anne-Kathrin Stade
Geburtsdatum	20.09.1976
Geburtsort	Erfurt
Schulbildung	
1983 – 1991	Polytechnische Oberschule 17, Erfurt
1991 – 1992	Häßler – Gymnasium, Erfurt
1992 – 1996	Apian – Gymnasium, Ingolstadt
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Studium	
1997 – 2003	Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2003 – 2004	Humanmedizin an der Technischen Universität München
Abschluss	3. Staatsexamen
Berufliche Tätigkeit	Weiterbildung Frauenheilkunde



Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

1. Kolb-Mäurer, A., Unkmeir, A., Kammerer, U., Hübner, C., Leimbach, T., Stade, A., Kämpgen, E., Frosch, M., Dietrich, G. 2001. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Infect Immun*, 69 (11), Seite 6912-22
2. Unkmeir, A., Kammerer, U., Stade, A., Hübner, C., Haller, S., Kolb-Mäurer, A., Frosch, M., Dietrich, G. 2002 (a). Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human dendritic cells. *Infect Immun*, 70 (5), Seite 2454-62