

Populationsbiologische  
und  
pathogenetische Aspekte  
von  
*Neisseria meningitidis*

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Martin V.R.H. WEBER  
aus Wuppertal

Würzburg, 2007

Eingereicht am:

---

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. Müller

Gutachter 1: Prof. Dr. M. Frosch

Gutachter 2: Prof. Dr. J. Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:

---

Doktorurkunde ausgehändigt am:

---

## Danksagung

Ich herzliches Dankeschön an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. M. Frosch, für die Gelegenheit, meine Dissertation bei ihm am Institut für Hygiene und Mikrobiologie anfertigen zu dürfen. Vielen Dank an Dr. Heike Claus und Prof. Dr. U. Vogel, die mich bei meinem ersten Projekt betreut haben. Für die Betreuung zu Beginn meines zweiten Projektes ein Danke an Dr. Andreas Knaust. Dr. Oliver Kurzai danke ich von ganzem Herzen für eine sehr gute und konstruktive Betreuung während des letzten Jahres meiner Dissertation und das Korrekturlesen der schriftlichen Arbeit. Vielen Dank für Deine Unterstützung, die guten Diskussionen und Deine Zeit!

Herrn Prof. Dr. J. Kreft danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Vielen lieben Dank an Nina Trzeciak, Andrea Bauer und Nicole Rexhäuser, die mir bei so manchen Großansätzen den Tag gerettet haben. Nina Trzeciak, Andrea Villwock, Halina Sxiderek, Johannes Elias und Martin Lappann möchte ich ganz herzlich für viele gemeinsam im Labor verbrachte Stunden mit guten Gesprächen danken. Sie standen mir immer Rat und Tat zur Seite, haben meine Laborarbeit konstruktiv unterstützt und hatten immer ein paar aufbauende Worte für mich übrig.

Selbstverständlich ein ganz herzliches Dankeschön an alle nichtgenannten Mitglieder der AG Kurzai, der AG Vogel und des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie, die mir hilfreiche und freundliche Auskünfte auf zahlreiche Fragen gegeben haben und die im allgemeinen für ein sehr angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben.

Danke an Dr. Tobias Ölschläger für gute Gespräche, gemeinsame Aktivitäten und seine Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Meiner lieben Frau Christiane danke ich aus tiefstem Herzen: Du hast mir immer mit schier unendlicher Geduld zur Seite gestanden; mich beraten, mir den Rücken gestärkt, mich aufgebaut und mich wieder zurück auf den Boden geholt, je nachdem was nötig war. Du warst einfach immer für mich da und bist mit hauptverantwortlich dafür, dass ich diese Arbeit zu Ende geführt habe. DANKE!

Last but not Least ein ganz herzliches Dankeschön an meine gesamte Familie. Danke, dass ihr mich und meine Entscheidungen immer unterstützt habt und zu mir gestanden habt!

|  |    |
|--|----|
| Zusammenfassung .....  | 1  |
| Summary .....  | 3  |
| 1 Einleitung.....  | 5  |
| 1.1 Das Bakterium <i>Neisseria meningitidis</i> .....  | 5  |
| 1.2 Epidemiologie von <i>Neisseria meningitidis</i> .....  | 6  |
| 1.2.1 Typisierung .....  | 6  |
| 1.2.2 Bayerische Meningokokken - Trägerstudie .....  | 8  |
| 1.3 Pathobiologie von <i>Neisseria meningitidis</i> .....  | 9  |
| 1.3.1 Infektionsweg und Pathogenese.....   | 9  |
| 1.3.2 Meningokokken - Infektion .....  | 10 |
| 1.3.3 Virulenzfaktoren von <i>Neisseria meningitidis</i> .....   | 10 |
| 1.3.3.1 Rolle der Virulenzfaktoren bei der Infektion.....  | 10 |
| 1.3.3.2 Kapsel .....   | 12 |
| 1.3.3.3 Aufbau der Kapsel .....  | 12 |
| 1.3.3.4 Genetik und Synthese der Kapsel .....  | 13 |
| 1.3.3.5 Variation der Kapselexpression .....   | 15 |
| 1.4 Interaktion von Meningokokken mit Serumfaktoren.....   | 17 |
| 1.4.1 Das Fibrinolyse -System .....  | 18 |
| 1.4.2 Plasminogen / Plasmin.....   | 18 |
| 1.4.3 Regulation von Plasmin .....   | 19 |
| 1.4.4 Wirkung von Plasmin .....  | 20 |
| 1.4.5 Interaktionen von humanpathogenen Erregern mit Plasminogen.....                                      | 21 |
| 1.4.6 Interaktionen von <i>Neisseria meningitidis</i> mit Plasminogen .....                                | 22 |
| 1.5 Zielsetzung der Arbeit .....   | 23 |
| 2 Ergebnisse.....  | 24 |
| 2.1 Teil I – Mechanismen des Kapselverlustes bei Polysialyltransferasegen-<br>positiven Meningokokken..... | 24 |
| 2.1.1 PCR-Analyse der Regionen A, B und C.....   | 24 |
| 2.1.2 Insertionselemente .....   | 26 |
| 2.1.3 Analyse der intergenischen Region zwischen Region A und C .....                                      | 28 |
| 2.1.4 Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen.....  | 29 |
| 2.1.5 Irreversible Mutationen.....   | 30 |
| 2.1.6 Nicht-synonyme Mutationen in der Region A.....   | 32 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.1.7   | Zusammenhang zwischen Mechanismen für den Kapselverlust und klonalen Linien .....                      | 35 |
| 2.1.8   | Zusammenfassung .....  | 36 |
| 2.2     | Teil II – Interaktionen von <i>Neisseria meningitidis</i> mit Komponenten des Fibrinolyse-Systems..... | 37 |
| 2.2.1   | Bindung von Plasminogen und Plasmin durch Meningokokken.....   | 37 |
| 2.2.1.1 | Identifizierung möglicher Plasminogen Rezeptoren von <i>Neisseria meningitidis</i> .....               | 37 |
| 2.2.1.2 | Herstellung von rekombinanten Rezeptormolekülen und spezifischen Antikörpern gegen diese Proteine..... | 39 |
| 2.2.1.3 | Extrazelluläre Lokalisation und Quantifizierung der Plasminogen-Rezeptoren .....                       | 40 |
| 2.2.1.4 | Kompetitive Inhibierung der Plasminogenbindung durch rekombinante Rezeptor-Proteine .....              | 44 |
| 2.2.1.5 | Deletions-Mutanten für die Plasminogen-Rezeptor Moleküle .....   | 45 |
| 2.2.1.6 | Untersuchung der Bindemotive .....   | 46 |
| 2.2.2   | Funktionelle Aspekte der Plasminogenbindung durch <i>Neisseria meningitidis</i> .....                  | 51 |
| 2.2.2.1 | Einfluss des Lipooligosaccharids (LOS) auf die Plasminogenbindung und die Plasminaktivität.....        | 51 |
| 2.2.2.2 | Einfluss der Kapsel auf die Plasminogenbindung und die Plasminaktivität .....                          | 53 |
| 2.2.2.3 | Bindung und Aktivität von Plasmin.....   | 54 |
| 2.2.2.4 | Bindung von Plasminogen aus Serum .....  | 55 |
| 2.2.2.5 | Degradation von ECM-Komponenten durch an Meningokokken gebundenes Plasmin.....                         | 57 |
| 2.2.2.6 | Schutz von gebundenem Plasmin vor Inaktivierung .....  | 59 |
| 2.2.2.7 | Bindung und Aktivität von uPA an Meningokokken .....   | 61 |
| 3       | Diskussion.....  | 63 |
| 3.1     | Teil I – Ursachen für den Kapselverlust bei Polysialyltransferasegenpositiven Meningokokken.....       | 63 |
| 3.2     | Teil II – Interaktionen von <i>Neisseria meningitidis</i> mit Komponenten des Fibrinolyse-Systems..... | 68 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.2.1  | Identifizierung von drei Plasminogen-Rezeptoren von <i>Neisseria meningitidis</i> .....                                | 68 |
| 3.2.2  | Einfluss von Faktoren der Meningokokken auf die Bindung von Plasminogen und die Aktivität des gebundenen Plasmins..... | 72 |
| 3.2.3  | Funktionelle Aspekte der Plasminogenbindung an Meningokokken .....   | 73 |
| 3.2.4  | Analyse der Interaktionen von Meningokokken mit uPA .....  | 74 |
| 3.2.5  | Aussichten.....  | 75 |
| 4      | Methoden .....   | 77 |
| 4.1    | DNA-technische Methoden .....  | 77 |
| 4.1.1  | Präparation von Plasmid DNA .....  | 77 |
| 4.1.2  | Präparation von chromosomaler DNA .....  | 77 |
| 4.1.3  | PCR – Polymerase Ketten Reaktion .....   | 77 |
| 4.1.4  | Aufreinigung von PCR-Produkten.....  | 77 |
| 4.1.5  | Agarose-Gel-Elektrophorese .....   | 77 |
| 4.1.6  | Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen.....  | 77 |
| 4.1.7  | Bestimmen der DNA-Menge .....  | 77 |
| 4.1.8  | Southern Blot .....  | 77 |
| 4.1.9  | DNA-Dot Blot.....  | 78 |
| 4.1.10 | DNA-Colony Blot.....   | 78 |
| 4.1.11 | Hybridisierung mit DNA-Sonden.....   | 78 |
| 4.1.12 | Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden.....   | 79 |
| 4.1.13 | Strippen von DNA Blots.....  | 79 |
| 4.1.14 | Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen und Ligation von DNA-Fragmenten .....  | 79 |
| 4.1.15 | Fällung von DNA.....   | 79 |
| 4.1.16 | DNA-Sequenzierung.....   | 79 |
| 4.2    | Protein-chemischen Methoden .....  | 80 |
| 4.2.1  | Herstellung von Meningokokken Zelllysaten.....   | 80 |
| 4.2.2  | LPS Präparation .....  | 80 |
| 4.2.3  | Aufreinigung von Außenmembranproteinen von Meningokokken.....  | 80 |
| 4.2.4  | SDS- Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....   | 80 |
| 4.2.5  | Tricin Gel .....   | 81 |
| 4.2.6  | Coomassie-Färbung .....  | 81 |
| 4.2.7  | Silber-Färbung .....   | 81 |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 4.2.8    | LPS Silber-Färbung .....  | 82 |
| 4.2.9    | Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....                                  | 82 |
| 4.2.10   | Herstellung von Antikörpern gegen rekombinante Proteine .....   | 82 |
| 4.2.11   | Messung des Proteingehaltes von Lösungen .....  | 82 |
| 4.2.12   | Substrat Assay-Experimente .....  | 82 |
| 4.2.12.1 | Substrat Assay zur Bestimmung der Aktivität von Plasmin .....   | 82 |
| 4.2.12.2 | Substrat Assay zur Bestimmung der Plasminaktivität von Plasminogen .....                                    | 83 |
| 4.2.12.3 | Substrat Assay zur Bestimmung der uPA-Aktivität .....   | 83 |
| 4.2.12.4 | Substrat Assay zur Bestimmung der gebundenen Plasminaktivität aus Humanserum .....                          | 83 |
| 4.2.12.5 | Substrat Assay zur Bestimmung des Einflusses von $\alpha$ 2-Antiplasmin auf die Aktivität von Plasmin ..... | 83 |
| 4.2.13   | Degradation von Fibrinogen .....  | 83 |
| 4.2.13.1 | Degradation von Fibrinogen durch gebundenes Plasmin .....   | 83 |
| 4.2.13.2 | Degradation von Fibrinogen durch gebundenes Plasminogen .....   | 84 |
| 4.2.13.3 | Degradation von Fibrinogen durch Plasminogen / Plasmin unter Einfluss von $\alpha$ 2-Antiplasmin .....      | 84 |
| 4.2.14   | Hitzeinaktivierung von Serum .....  | 84 |
| 4.2.15   | Aufreinigung der IgG-Fraktion aus Antiseren .....   | 84 |
| 4.3      | Immunologische Nachweismethoden .....   | 84 |
| 4.3.1    | Western Blot .....  | 84 |
| 4.3.2    | Overlay Assays .....  | 85 |
| 4.3.3    | ELISA-Experimente .....   | 85 |
| 4.3.3.1  | ELISA zur Bestimmung des Kapselstatus von Meningokokken .....   | 85 |
| 4.3.3.2  | ELISA zur Bestimmung der gebundenen Plasmin- oder Plasminogenmenge .....                                    | 85 |
| 4.3.3.3  | ELISA zur Bestimmung der gebundenen uPA-Menge .....   | 85 |
| 4.3.3.4  | ELISA zur Bestimmung der gebundenen Plasminogenmenge aus Humanserum .....                                   | 85 |
| 4.3.3.5  | ELISA zur Bestimmung der kompetitiven Inhibierung .....   | 86 |
| 4.3.3.6  | ELISA zur Bestimmung der oberflächenassoziierten Plasminogen-Rezeptormoleküle .....                         | 86 |
| 4.3.4    | Flow Zytometrie (FACS) .....  | 86 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 4.3.5   | Colony Blot.....  | 87 |
| 4.4     | Bakterienkultur .....                                   | 87 |
| 4.4.1   | Bakterienkultur mit <i>Neisseria meningitidis</i> ..... | 87 |
| 4.4.2   | Transformation von Meningokokken .....                  | 87 |
| 4.4.3   | Bakterienkulturen mit <i>Escherichia coli</i> .....     | 87 |
| 4.4.4   | Transformation von <i>E. coli</i> .....                 | 88 |
| 4.4.5   | Herstellung von Glycerinkulturen .....                  | 88 |
| 4.5     | Bildgebende Verfahren .....                             | 88 |
| 4.5.1   | Immunfluoreszenz .....                                  | 88 |
| 4.5.2   | Konfokale Laserscanning Mikroskopie .....               | 88 |
| 4.5.3   | Transmissionselektronenmikroskopie .....                | 88 |
| 5       | Material.....   | 89 |
| 5.1     | Bakterienstämme .....                                   | 89 |
| 5.1.1   | Teil I.....   | 89 |
| 5.1.2   | Teil II .....   | 90 |
| 5.2     | DNA-technische Materialien .....                        | 91 |
| 5.2.1   | Oligonukleotide .....                                   | 91 |
| 5.2.1.1 | Teil I.....   | 91 |
| 5.2.1.2 | Teil II .....   | 92 |
| 5.2.2   | Plasmide.....   | 93 |
| 5.3     | Allgemeine Materialien .....                            | 93 |
| 5.3.1   | Chemikalien.....  | 93 |
| 5.3.2   | Lösungen und Puffer.....                                | 93 |
| 5.3.3   | Verwendete Kits .....                                   | 95 |
| 5.3.4   | Verbrauchsmaterialien .....                             | 95 |
| 5.3.5   | Sonstige Substanzen .....                               | 96 |
| 5.3.6   | Proteine .....  | 96 |
| 5.3.7   | Antikörper.....   | 96 |
| 5.3.8   | Enzyme .....  | 96 |
| 5.3.8.1 | Proteasen.....  | 96 |
| 5.3.8.2 | Protease-Inhibitoren.....                               | 97 |
| 5.3.8.3 | Endonukleasen .....                                     | 97 |
| 5.3.8.4 | Weitere Enzyme.....                                     | 97 |
| 5.3.9   | Seren .....   | 97 |



|          |   |     |
|----------|---|-----|
| 5.3.10   | Verwendete Marker .....   | 97  |
| 5.3.10.1 | DNA-Marker.....   | 97  |
| 5.3.10.2 | Protein-Marker.....   | 97  |
| 5.4      | Geräteliste .....   | 97  |
| 6        | Anhang.....   | 99  |
| 6.1      | Unbekapselte, Polysialyltransferasegen-positive Stämme der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie..... | 99  |
| 6.2      | Verzeichnis der Abkürzungen .....   | 103 |
| 6.3      | Erklärung .....   | 104 |
| 6.4      | Publikationsliste.....  | 105 |
| 6.5      | Lebenslauf.....   | 106 |
| 7        | Literatur .....   | 107 |

## Zusammenfassung

Meningokokken sind nach wie vor eine wichtige Ursache für Gehirnhautentzündungen und Sepsen weltweit, vor allem bei Kindern und Jugendlichen. Weil viele Pathomechanismen dieses Erregers bislang noch unvollständig verstanden sind, wurden im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit populationsbiologische und pathogenetische Aspekte von *Neisseria meningitidis* untersucht.

Die Kapsel ist der hauptsächliche Pathogenitätsfaktor von Meningokokken und wichtig für die Besiedelung von neuen Wirten. Isolate von symptomfreien Trägern sind allerdings häufig unkapselt. Um Ursachen oder Mechanismen für den Verlust der Kapselexpression aufzudecken, wurden insgesamt 166 Isolate der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie untersucht. Alle Isolate besaßen sämtliche zur Kapselsynthese notwendigen Gene, exprimierten aber keine Kapsel. Bei 39 Isolaten fanden sich Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen (slipped strand mispairing, SSM) in den Genen *siaA* und *siaD*. 46 Isolate enthielten Insertionselemente (IS1301, IS1016 und IS1106) in den Genen der Kapselsynthese. Irreversible Mutationen (Deletionen, Insertionen, Basensubstitutionen) wurden bei 47 Isolaten gefunden. Veränderungen der Promotorregion schienen keine Rolle zu spielen. Es wurden bei insgesamt sechs Isolaten zwei nicht-synonyme Mutationen in unmittelbarer Nähe zum putativen aktiven Zentrum der UDP-N-Acetylglukosamin-2-Epimerase entdeckt, die einen Verlust der Kapselsynthese erklären könnten. Insgesamt wurden keine Akkumulationen von Mutationen in defekten Genen gefunden und es gab auch keine Korrelationen zwischen den verschiedenen Ursachen und bestimmten klonalen Linien. Die erhaltenen Ergebnisse legen nahe, dass die meisten der zur Blockierung der Kapselexpression führenden Ereignisse erst im aktuellen Wirt aufgetreten sind und dass zumindest bei bestimmten klonalen Linien die Verbreitung von der Expression einer Kapsel abhängig ist.

Viele pathogene Bakterien nutzen zur Infektion des Menschen die ubiquitär im Körper vorkommende Protease Plasmin. Dazu binden diese Plasmin oder das Proenzym Plasminogen. Auch Meningokokken interagieren mit Plasmin und Plasminogen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten drei Rezeptormoleküle für Plasminogen identifiziert werden. Die drei Proteine Enolase, DnaK und Peroxiredoxin konnten mit verschiedenen Methoden auf der Oberfläche der Erreger nachgewiesen werden. Die

Bindung des Plasminogens ist bei Meningokokken ausschließlich über Lysinreste der Rezeptoren vermittelt, die C-terminalen Lysinreste der hier identifizierten Rezeptormoleküle spielen aber, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle. Die Bindung von Plasminogen war durch rekombinante Rezeptorproteine konzentrationsabhängig inhibierbar. Plasminogen konnte von Meningokokken auch aus dem Serum rekrutiert werden. Gebundenes Plasminogen war mit uPA (Urokinase Plasminogen Aktivator) aktivierbar und physiologisch aktiv, was durch die Degradation von Fibrinogen nachgewiesen wurde. Das gebundene Plasmin wurde durch die Bakterien vor der Desaktivierung durch  $\alpha_2$ -Antiplasmin geschützt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Meningokokken auch mit weiteren Faktoren des Fibrinolyse-Systems (uPA) interagieren. Sie rekrutierten uPA an ihre Oberfläche und gebundenes uPA war physiologisch aktiv. Die erhaltenen Ergebnisse bestärken die These, dass Meningokokken die Faktoren des Fibrinolyse-Systems für ihre Pathogenese nutzen.

## Summary

Meningococci remain to be one of the major causes for meningitis and septicaemia worldwide, especially in children and young adults. Because many of the pathogen's pathomechanisms still remain unresolved, in the present doctoral thesis population biology and pathogenetic aspects of *Neisseria meningitidis* were investigated.

The capsule is the major virulence-factor of meningococci and important for the dispersal to new hosts. However, isolates extracted from healthy carriers are frequently unencapsulated. To reveal the causes or mechanisms underlying this loss of encapsulation 166 strains of the Bavarian Meningococci Carriage Study were analysed. All these strains possessed all the genes responsible for capsule expression but were acapsulate. Slipped strand mispairing was demonstrated for 39 isolates in the genes *siaA* and *siaD*. The insertion elements *IS1016*, *IS1106* and *IS1301* were responsible for the loss of encapsulation in other 46 strains and 47 isolates showed irreversible mutations (deletions, insertions and base exchanges) in capsule genes. Sequence alterations in the promoter region seemed not to be responsible for the loss of encapsulation. In close vicinity to the putative active site of the UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase two non-synonymous mutations were detected in altogether six strains. Altogether there was no accumulation of mutations in the uncovered defective genes and no correlation between state of encapsulation and specific clonal lineages could be revealed. The obtained results portray a scenario, where the loss of encapsulation happens in the recent host and where at least some clonal lineages are dependent on the capsule for dissemination.

Many bacteria use the protease plasmin for their pathogenesis. For this they recruit plasmin or its precursor plasminogen to their surface. Meningococci were shown to interact with plasminogen, too. In the present thesis three meningococcal receptors for plasminogen were identified. The three receptor proteins enolase, DnaK and peroxiredoxin were shown to be localised extracellularly on the bacterial cell surface by diverse techniques. Binding of plasminogen was demonstrated to occur exclusively to lysine residues of the receptor molecules, but the C-terminal lysine residues of the newly identified receptors were not involved in this process. Recruitment of plasminogen to the bacterial surface could be inhibited by soluble, recombinant receptor proteins in a concentration dependent manner. Furthermore, meningococci were shown

to be able to recruit plasminogen from human serum. Receptor bound plasminogen could be activated by uPA (urokinase plasminogen activator) and was physiologically active as demonstrated by degradation of fibrinogen. The bound plasmin was also protected from deactivation by  $\alpha$ 2-antiplasmin. In addition, *Neisseria meningitidis* was shown to interact with other components of the fibrinolytic system. The bacteria attached uPA to their surface and the bound uPA was physiologically active. These data provide further evidence for recruitment and usage of factors of the fibrinolytic system in pathogenesis of meningococci.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Bakterium *Neisseria meningitidis*

24 Bakterienarten gehören zu der Gattung *Neisseria*, die eine Gruppe von eng verwandten, unbeweglichen, streng aeroben und gram-negativen Diplokokken darstellt. Mitglieder der Gattung *Neisseria* sind Katalase- und Zytochromoxidase-positiv (Mahon, 1995; Singer, 2005). Hauptsächliche Erreger von Infektionen beim Menschen sind der Verursacher der Gonorrhö (Tripper, *N. gonorrhoeae*) sowie das Bakterium *Neisseria meningitidis* (Feder and Garibaldi, 1984; Mahon, 1995; Snyder and Saunders, 2006).

Bei *Neisseria meningitidis* handelt es sich um kleine (Durchmesser  $\sim 1\mu\text{m}$ ), „semelförmige“ Diplokokken. Als Unterschied zu den Gonokokken Meningokokken können eine Polysaccharidkapsel exprimieren (Frosch *et al.*, 1989; Mahon, 1995; Singer, 2005). Der Mensch stellt das einzige bekannte Reservoir für *N. meningitidis*, wo sie ihr Habitat im Nasopharynx haben (Johansson *et al.*, 2003; Stephens *et al.*, 1983). Dort leben sie als Kommensale bei 10 – 20% der Bevölkerung (Cartwright *et al.*, 1987; Claus *et al.*, 2005; Stephens, 1999; van Deuren *et al.*, 2000). Die Bakterien werden aerogen von Mensch zu Mensch übertragen und können als Krankheitserreger schwere invasive Infektionen auslösen. Dazu kommt es aber nur in seltenen Fällen, in der Regel innerhalb weniger Tage nach einer Neubesiedelung des Wirtes (Ala'Aldeen *et al.*, 2000; Stephens, 1999; van Deuren *et al.*, 2000).

Bereits aus der Antike gibt es Beschreibungen von Erkrankungen, die denen einer Meningokokken-Infektion ähneln. Die erste eindeutige Beschreibung eines Ausbruchs, der durch Meningokokken verursacht wurde, stammt jedoch aus dem Jahr 1805 (Vieusseux, 1806). Möglicherweise haben Meningokokken erst im 18. oder 19. Jahrhundert die Fähigkeit zu einer invasiven Infektion durch Akquirierung verschiedener Pathogenitätsfaktoren erworben (Claus *et al.*, 2002; Dolan-Livengood *et al.*, 2003), da es erst danach eine Vielzahl von Epidemien und Pandemien durch Meningokokken gab (Cartwright, 2006; Greenwood, 1999).

In geschlossenen Gruppen kann der Anteil der asymptomatischen Träger auf bis zu 100% ansteigen (Andersen *et al.*, 1998; Claus *et al.*, 2005). Während Kleinkinder nur zu 1 – 2 % besiedelt sind, steigt der Prozentsatz der Besiedelung bis zur Altersgruppe der 15 – 20 jährigen auf durchschnittlich 25% an. Danach pendelt er sich bei 10% ein (Cartwright *et al.*, 1987; Claus *et al.*, 2005; Jones and Mallard, 1993; Stephens, 1999).

Bei den Erkrankungsfällen zeigt sich ein anderes Bild: Es gibt eine Spitze der Erkrankungszahlen pro 100.000 bei den 15 – 20 jährigen mit 5 Fällen und eine in der Gruppe der Kleinkinder bis 12 Monate mit bis zu 50 Fällen pro 100.000. Bei den übrigen Altersgruppen liegt die Inzidenz durchschnittlich je nach Region zwischen eins und drei Erkrankungen (Cartwright *et al.*, 1987; Claus *et al.*, 2005; Jones and Mallard, 1993; Stephens, 1999), während bei großen Ausbrüchen mehr als 500 Erkrankungsfälle pro 100.000 Einwohner erreicht werden können (Lapeyssonnie, 1963; Schwartz *et al.*, 1989). Als Risikofaktoren für eine Infektion mit *Neisseria meningitidis* zählen neben der Altersgruppe folgende Faktoren: Winter oder trockene Jahreszeiten (Greenwood, 1987), enger Kontakt zu Trägern oder Erkrankten (De Wals *et al.*, 1981), beengte Lebensverhältnisse (Baker *et al.*, 2000; Moodley *et al.*, 1999), Umzug in eine neue Gemeinschaft (Berild and Gedde-Dahl, 1980; Neal *et al.*, 1999), Aktiv- oder Passivrauchen (Fischer *et al.*, 1997; Yusuf *et al.*, 1999) und Exposition gegenüber Erregern, die Atemwegserkrankungen verursachen (Cartwright *et al.*, 1991; Moodley *et al.*, 1999). In Deutschland gab es in den Jahren 2004 und 2005 jedes Jahr etwa 600 Meningokokken-Erkrankungen, was einer Inzidenz von ungefähr 0,7 entspricht (RKI, 2006). Es bleibt noch zu erwähnen, dass Epidemien mit Meningokokken weltweit auftreten (Caugant, 1998; Schwartz *et al.*, 1989).

## **1.2 Epidemiologie von *Neisseria meningitidis***

### **1.2.1 Typisierung**

Primär werden Meningokokken auf Grund ihrer unterschiedlichen Kapselpolysaccharide in Serogruppen eingeteilt. Seit Anfang des letzten Jahrhunderts wurden bis zu 13 verschiedene Serogruppen unterschieden (Vedros, 1987). Auch weitere Oberflächenmarker der Meningokokken werden zur Typisierung benutzt, wie Außenmembranproteine oder das Lipooligosaccharid (LOS) (Jolley *et al.*, 2006). Bei der Serotypisierung unterscheidet man 20 verschiedene Klasse 2 (PorB1) und Klasse 3 (PorB2) Außenmembranproteine (OMP) (Sacchi *et al.*, 1998), bei der Serosubtypisierung zehn verschiedene Typen der Klasse 1 (PorA) OMP (Manchanda *et al.*, 2006). 13 verschiedene LOS-Typen unterscheidet man bei der Immunotypisierung (Abdillahi and Poolman, 1988; Scholten *et al.*, 1994). Inzwischen finden die Typisierungen nach Serogruppe und den OMP auf genetischer Ebene mittels Sequenzierungen statt (McGuinness *et al.*, 1990; Suker *et al.*, 1996). Diese Bestimmung

der Sero-Genogruppe bietet die Möglichkeit auch solche Isolate bestimmten Serogruppen zuzuordnen, die reversibel ihre Kapselexpression deaktiviert haben (Borrow *et al.*, 1997; Claus *et al.*, 2002). Teilweise werden noch weitere Proteine wie das Meningokokken-Antigen FetA untersucht, welche durch Veränderungen in variablen Regionen Aufschluss über Verwandtschaftsverhältnisse geben können (Thompson *et al.*, 2003; Urwin *et al.*, 2004).

Um die Verwandtschaftsverhältnisse der Meningokokken unabhängig von ihren Antigenen untersuchen zu können, wurde die Multilokus Enzym Elektrophorese (MLEE) entwickelt (Boerlin and Piffaretti, 1995; Selander *et al.*, 1986). Dabei wird die Mobilität von bis zu 25 verschiedenen und konservierten Stoffwechsellzymen in einer Stärkegel-Elektrophorese untersucht (Caugant, 2001). Jedes individuelle Bandenmuster wird einem sogenannten Elektrophoresetyp (ET) zugeordnet. Damit war es erstmals möglich während eines Ausbruches die Verwandtschaftsverhältnisse von verschiedenen Isolaten zu bestimmen (Caugant *et al.*, 1987b). Die MLEE ist aber zunehmend von der sogenannten Multilokus Sequenz Typisierung (MLST) verdrängt worden, da diese durch die Sequenzanalyse eine höhere Genauigkeit und eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Laboratorien bietet. Bei der MLST werden die Sequenzen von sieben Stoffwechsel-Genen auf Unterschiede untersucht (Maiden *et al.*, 1998; Urwin and Maiden, 2003). Jede Sequenzvariante eines Gens wird fortlaufend als neues Allel nummeriert und jede neue Allelkombination als neuer Sequenztyp (ST) registriert (Jolley *et al.*, 2004).

Untersuchungen von apathogenen und pathogenen Meningokokken haben gezeigt, dass die apathogenen Vertreter eine sehr hohe Biodiversität aufweisen, die pathogenen sich hingegen nur in wenige klonale Komplexe aufteilen (Caugant, 1998, 2001; Maiden *et al.*, 1998; Yazdankhah *et al.*, 2004). Klonale Komplexe stellen eine Häufung von Sequenztypen dar, welche alle sehr nahe miteinander verwandt sind (Caugant *et al.*, 1987b). Per Definition müssen die unterschiedlichen Isolate eines klonalen Komplexes mindestens vier gleiche Allele miteinander teilen (Jolley *et al.*, 2006; Urwin *et al.*, 2004). Mit klonalen Komplexen sind oftmals phänotypische Eigenschaften, wie zum Beispiel die Serogruppe (Urwin *et al.*, 2004) oder auch der Kapsel-Null-Lokus (cnl), assoziiert (Claus *et al.*, 2002; Claus *et al.*, 2005). Die wenigen mit Erkrankungen assoziierten klonalen Komplexe bezeichnet man auch als hypervirulent (Yazdankhah *et al.*, 2004). Beispiele sind die ST-1, ST-4 und ST-5-Komplexe, welche ausschließlich der Serogruppe A zuzuordnen sind und unter anderen für die großen Ausbrüche im



Meningokokken-Gürtel in Afrika und einige Pandemien verantwortlich sind (Achtman *et al.*, 2001; Crowe *et al.*, 1988; Nicolas *et al.*, 2001). Der klonalen Komplex ST-11, dem überwiegend Stämme der Serogruppen C und W-135 angehören, war ebenfalls für eine Vielzahl von Epidemien und Pandemien verantwortlich (Caugant, 2001; Decosas and Koama, 2002; Taha *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1992). Weiterhin sind die beiden klonalen Komplexe ST-32 (ET-5) und ST-41/44 zu nennen (Bygraves *et al.*, 1999; Caugant *et al.*, 1987a; Dyet *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 1998; Oster *et al.*, 2005). Letzterer verursacht derzeit einen großen Teil der Serogruppe B assoziierten Infektionen in Europa (Connolly and Noah, 1999; Fischer and Perkins, 1997; Maiden and Caugant, 2006).

### 1.2.2 Bayerische Meningokokken - Trägerstudie

Im Rahmen der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie wurden vom November 1999 bis zum März 2000 bei 8000 Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen (3 – 25 Jahre) Abstriche des Nasopharynx gemacht. Aus 830 dieser Abstriche konnten Neisserien isoliert werden, von denen 822 Isolate Sequenz-typisierbar waren (Claus *et al.*, 2005). 545 Isolate hatten einen Kapsel-Genloкус der Serogruppen B, C, W-135 oder Y. Isolate der Serogruppe A waren nicht vertreten. Von den 545 Stämmen zeigten 166 Isolate keine Kapselexpression (1.2.2 Tabelle 1) (Claus *et al.*, 2005).

1.2.2 Tab.1: Genotypisierbare Isolate der Trägerstudie.

| Serogruppe   | Genotyp [%] |          | Ohne Kapselexpression |          |
|--------------|-------------|----------|-----------------------|----------|
| <b>B</b>     | 334         | (40,24%) | 72                    | (26,45%) |
| <b>C</b>     | 58          | (6,99%)  | 36                    | (63,79%) |
| <b>W-135</b> | 32          | (3,86%)  | 8                     | (30,3%)  |
| <b>Y</b>     | 121         | (14,54%) | 50                    | (42,98%) |
| <b>NG</b>    | 285         | (34,34%) | -                     |          |
| <b>Σ</b>     | 830         |          | 166                   | (20%)    |

NG: nicht gruppierbar.

285 Stämme waren keiner der Krankheits-assoziierten Serogruppen zuzuordnen (Claus *et al.*, 2005). Davon enthielten 149 Isolate Kapselsynthese Gene anderer Serogruppen und 136 Isolate hatten den Kapsel-Null-Lokus (cni), hatten also überhaupt keine Kapselsynthese Gene (Claus *et al.*, 2002; Claus *et al.*, 2005).

### 1.3 Pathobiologie von *Neisseria meningitidis*

#### 1.3.1 Infektionsweg und Pathogenese

Im Rahmen der normalen Kolonisation des Nasopharynx lagern sich die Meningokokken an die dortigen Epithelzellen an. Beginnen die Bakterien zu proliferieren, kommt es zu Veränderungen der Morphologie des Epithels (Read and Goodwin, 2001; Stephens and Farley, 1991) und zur Erreger-induzierten und rezeptorvermittelten Transzytose durch die Epithelzellbarriere in Vakuolen (Stephens *et al.*, 1983; Stephens and Farley, 1991) (vgl. 1.3.1 Abbildung 1). Wie die Meningokokken die darunter liegende Basallamina überwinden ist noch ungeklärt, lediglich ihr Vorkommen in der Submucosa ist beschrieben (Read and Goodwin, 2001). Ungeklärt ist auch die Passage der Erreger in den Blutstrom (Brandtzaeg, 2006). Mit der Vermehrung der Erreger im Blut kommt es zu ersten klinischen Symptomen, bis hin zur Sepsis und zum toxischen Schock (vgl. 1.3.2). Die Symptome werden hauptsächlich durch den endotoxischen Bestandteil des LOS, das Lipid A, verursacht (Brandtzaeg *et al.*, 2001; Brandtzaeg and van Deuren, 2002; Brandtzaeg, 2003; Kolb-Maurer *et al.*, 2001). Das LOS stammt hauptsächlich aus Membranvesikeln, die zu über 50% daraus bestehen, aber auch Kapselpolysaccharide und Außenmembranproteine enthalten. Die Membranvesikel werden in großer Menge von den Meningokokken produziert und führen zu einer starken Zytokinproduktion der Wirtes, zur Aktivierung des Komplementsystems (Bjerre *et al.*, 2000; Rosenstein *et al.*, 2001) und zum Anstieg der Körpertemperatur (Dinarello, 2004). Der Verlauf der Infektion und die Schwere der Symptome sind direkt proportional zur Menge des LOS im Serum (Brandtzaeg *et al.*, 2001), welche mit der Menge an Meningokokken korreliert (Ovstebo *et al.*, 2004).

Im Verlauf der Infektion können Meningokokken auch die Meningen infizieren. Wie sie die Blut-Hirn-Schranke im Detail überwinden, ist bislang unklar. Bekannt ist, dass sie an die Endothelien binden, welche die Blutgefäße im Gehirn auskleiden (Pron *et al.*, 1997; Unkmeir *et al.*, 2002b; Virji *et al.*, 1994; Virji *et al.*, 1995) und auch Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke sind (Pron *et al.*, 1997; Rubin *et al.*, 1991). Möglich wäre ein ähnlicher Mechanismus wie bei der Überwindung der Epithelbarriere (Nassif *et al.*, 2002; Unkmeir *et al.*, 2002b). Im Subarachnoidal-Spalt proliferieren die Bakterien und verursachen, maßgeblich durch das in den Membranvesikel enthaltene LOS, die Symptome der Meningitis (Halstensen *et al.*, 1993; Spanaus *et al.*, 1997; Waage *et al.*, 1989).

### 1.3.2 Meningokokken - Infektion

Bei rund 30 – 50% der Patienten manifestiert sich die Infektion alleine durch eine Meningitis, 7 – 10% dagegen zeigen nur die Symptome einer Sepsis und 40% der Erkrankten bilden Symptome beider Krankheitsbilder aus (Havens *et al.*, 1989; Kirsch *et al.*, 1996). Die Hauptsymptome für eine Meningitis sind Kopfschmerzen, Fieber ( $> 38^{\circ}\text{C}$ ), Übelkeit und Erbrechen, Lichtscheueheit, Nackensteifigkeit, Lethargie und bei 20% der Betroffenen auch Krampfanfälle. Die Meningokokken-Sepsis äußert sich dagegen hauptsächlich durch Fieber ( $> 38^{\circ}\text{C}$ ) und hämorrhagische Hauteinblutungen (Petechien). Zusätzlich können diese Patienten einen Schock entwickeln, der sich in Symptomen wie Tachykardie, Zentralisierung, Tachypnoe, Oligurie, Verwirrheitszuständen und schließlich Hypotonie manifestieren kann (Bigham *et al.*, 2001; Pollard and Nadel, 2006; Rosenstein *et al.*, 1999).

Die Letalität beträgt trotz moderner Medizin etwa 10% und der Tod kann innerhalb weniger Stunden nach dem ersten Auftreten der Symptome eintreten (Brandtzaeg, 1995; Rosenstein and Perkins, 2000). Bei Patienten mit einer Sepsis beträgt die Letalität bis zu 40%. Von den Überlebenden behalten 10 – 20% Spätfolgen, wie z.B. Hörverlust, neurologische Schäden zurück oder erleiden Amputationen (Brandtzaeg, 1995; Kirsch *et al.*, 1996).

### 1.3.3 Virulenzfaktoren von *Neisseria meningitidis*

#### 1.3.3.1 Rolle der Virulenzfaktoren bei der Infektion

Für den Erreger *Neisseria meningitidis* ist eine Vielzahl von Virulenzfaktoren beschrieben.

Typ IV Pili stellen den ersten Kontakt mit dem Epithel im Nasen-Rachenraum her. Essentiell für diesen Kontakt ist das Protein PilC1, das mit den Pili assoziiert ist, aber auch Außenmembran-assoziiert vorkommt (Rahman *et al.*, 1997; Rudel *et al.*, 1995). Das Pili-Protein PilT sorgt dann dafür, dass die Pili retrahiert werden und membranständige Adhäsine mit den Zellen interagieren können. Nach wenigen Stunden bilden die Meningokokken Mikrokolonien, die keine Pilus-Expression mehr zeigen, sich direkt an die Zellen anlagern (Pujol *et al.*, 1999) und das führt zu der nachfolgenden Aufnahme über die Hauptadhäsine und –invasine Opa und Opc (Derrick *et al.*, 2006).

Entscheidend für die intrazelluläre Vermehrung und Transzytose der Meningokokken ist ihre Fähigkeit die Degradation von Ferritin in den Zellen zu beschleunigen und das freigesetzte Eisen zu rekrutieren (Bonnah *et al.*, 2000; Larson *et al.*, 2004). Die IgA Protease kann außerdem das Oberflächenprotein Lamp1 degradieren (Ayala *et al.*, 2001; Hauck and Meyer, 1997; Lin *et al.*, 1997), wodurch ein für die Bakterien günstiges Lysosomenmilieu entsteht (Ayala *et al.*, 1998; Hopper *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1997). In den Vakuolen erreichen die Erreger dann 18 – 40 Stunden post infectionem die baso-laterale Seite der Epithelbarriere (Merz and So, 2000).

Wie sie die Basallamina überwinden und in das Kreislaufsystem gelangen ist bislang noch unklar (Brandtzaeg, 2006; Read and Goodwin, 2001). Beschrieben ist die Bindung der Erreger an Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) und Basallamina (BL), darunter Laminin, Fibronectin und verschiedene Kollagene. Opa und Opc sowie weitere, bislang unbekannte Adhäsine sind an dieser Bindung beteiligt (Bourdoulous and Nassif, 2006; Eberhard *et al.*, 1998).

Die Kapsel und das Lipooligosaccharid (LOS) der Meningokokken sind für das Überleben der Erreger im Blutstrom essentiell. Diese beiden Strukturen bieten den Erreger eine gewisse Serumresistenz, ohne die sie schnell durch das Komplementsystem des Wirtes zerstört würden (Jarvis and Vedros, 1987; Kahler *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 1999). Des Weiteren schützen sie die Bakterien durch molekulare Mimikry vor verschiedenen Faktoren des Immunsystems: Zum Einen ahmt das Kapselpolysaccharid der Serogruppe B mit seiner  $\alpha 2 \rightarrow 8$  Polysialinsäure Zuckerstrukturen auf Zelladhäsionsmolekülen, wie n-CAM, nach (Giardina and Apicella, 1999; Kypta, 2002). Zum Zweiten entsprechen auch die terminalen vier Zucker der LOS  $\alpha$ -Kette des Immunotyps L3, 7, 9 ( $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ ) dem körpereigenen Zucker Lacto-N-Neotetraose (Giardina and Apicella, 1999; Ram *et al.*, 1999; Tsai, 2001). Im sialylierten Zustand bietet das LOS außerdem Schutz vor bakteriziden Antikörpern (de Vries *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1999). Zusammen schützen Kapsel und LOS die Bakterien auch vor der Phagozytose durch Immunzellen (de Vries *et al.*, 1996).

Auch extrazellulär sind die Bakterien in der Lage Eisen sowohl aus Eisenspeichermolekülen (Transferrin, Lactoferrin) (Bonnah *et al.*, 1995; Schryvers and Morris, 1988) als auch aus Häm-Gruppen des Wirtes zu rekrutieren (Dyer *et al.*, 1987; Lewis and Dyer, 1995; Stojiljkovic *et al.*, 1995), was auch hier ihr Überleben und ihre Fähigkeit zu proliferieren sichert (Archibald and DeVoe, 1979; Mickelsen *et al.*, 1982).

Um eine Meningitis auslösen zu können, müssen die Erreger ins Gehirn gelangen. Nach der hämatogenen Ausbreitung adhärieren sie wahrscheinlich über einen ähnlichen Mechanismus an die Endothelzellen, wie bei der primären Besiedelung des Nasopharynx an die Epithelzellen: Die hauptsächlichsten Unterschiede zeigen sich in der Bildung eines kortikalen Plaques in den Zellen (Eugene *et al.*, 2002; Merz *et al.*, 1999) und in der dadurch induzierten Ausbildung Mikrovilli-ähnlicher Strukturen (Eugene *et al.*, 2002; Mangeat *et al.*, 1999; Nassif *et al.*, 2002; Yonemura *et al.*, 1999). Für das Überleben und die Vermehrung im Liquor nutzen die Bakterien dieselben Mechanismen wie für das Überdauern im Blutkreislauf.

### **1.3.3.2 Kapsel**

Die Kapsel gilt als der Hauptvirulenzfaktor für *Neisseria meningitidis* (Frosch and Vogel, 2006). Das Kapselpolysaccharid ist auf Grund seiner Ladung stark hydratisiert (Costerton *et al.*, 1981) und schützt dadurch wahrscheinlich bekapselte Stämme während der Übertragung auf einen neuen Wirt vor Austrocknung (Musher, 2003). Während der Infektion schützt die Kapsel die Bakterien vor der Erkennung und vor der Phagozytose durch Immunzellen des Wirtes (de Vries *et al.*, 1996; Estabrook *et al.*, 1998; Kolb-Maurer *et al.*, 2001; Unkmeir *et al.*, 2002a).

### **1.3.3.3 Aufbau der Kapsel**

Pathogene Meningokokken sind obligat bekapselt. Von den 13 verschiedenen Serogruppen, die sich durch den Aufbau ihres Kapselpolysaccharids voneinander unterscheiden (Vedros, 1987), sind nur fünf regelmäßig mit Erkrankungen assoziiert: Serogruppe A, B, C, W-135 und Y (Frasch *et al.*, 1985; Peltola, 1983). Bestimmte Serogruppen kommen in manchen Regionen deutlich häufiger vor als andere: Serogruppe A Meningokokken verursachen vor allem im so genannten afrikanischen Meningitis-Gürtel immer wieder große, überregionale Epidemien, spielen aber für Erkrankungen in den Industrieländern nur eine untergeordnete Rolle. Dort werden 30 – 70% der Erkrankungen durch Erreger der Serogruppe B verursacht (McEllistrem *et al.*, 2004; Rosenstein *et al.*, 1999).

Die unterschiedlichen Kapselpolysaccharide von *Neisseria meningitidis* sind aus durchschnittlich um die 200 Zuckerresten aufgebaut (Frosch and Edwards, 1993) und bestehen entweder aus homopolymeren oder aus heteropolymeren Zuckerketten

(Jennings *et al.*, 1977; Jennings, 1983; Jones and Lemercinier, 2002). Die Kapseln der Serogruppen B, C, W-135 und Y enthalten Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure) (Bhattacharjee *et al.*, 1975, 1976): Die Kapsel der Serogruppen B und C sind homopolymere Zuckerketten aus Sialinsäure (Bhattacharjee *et al.*, 1975), die der Serogruppen W-135 und Y bestehen aus heteropolymeren Zuckerketten in denen Sialinsäure alternierend mit Galaktose oder Glukose verknüpft ist (Bhattacharjee *et al.*, 1976) (vgl. 1.3.3.3 Tabelle 1).

**1.3.3.3 Tab. 1:** Zusammensetzung der verschiedenen Kapselpolysaccharide und die kodierenden Gene.

| Serogruppe | Kapselzusammensetzung   | Kapselsynthese-Gene              |
|------------|---|----------------------------------|
| B          | N-Acetylneuraminsäure<br>( $\alpha$ 2→8 verknüpft)                  | <i>siaA-siaD<sub>B</sub></i>     |
| C          | N-Acetylneuraminsäure<br>( $\alpha$ 2→9 verknüpft)                  | <i>siaA-siaD<sub>C</sub></i>     |
| W-135      | N-Acetylneuraminsäure, Galaktose (1:1)<br>( $\alpha$ 1→4 verknüpft) | <i>siaA-siaD<sub>W-135</sub></i> |
| Y          | N-Acetylneuraminsäure, Glukose (1:1)<br>( $\alpha$ 1→4 verknüpft)   | <i>siaA-siaD<sub>Y</sub></i>     |

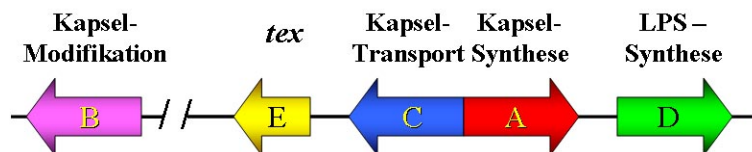
Die Kapseln der Serogruppen C, W-135 und Y können auch in O-acetylierter Form vorliegen (Jennings *et al.*, 1977; Lemercinier and Jones, 1996). Bislang gibt es keine Ergebnisse, die auf eine O-Acetylierung der Serogruppe B-Kapsel schließen ließen (Frosch and Vogel, 2006). Über die Relevanz der O-Acetylierung der Kapsel bei Meningokokken ist noch nichts bekannt (Claus *et al.*, 2004; Frosch and Vogel, 2006), aber die Acetylierung steigert die Immunogenität des Kapselpolysaccharids der Serogruppe A (Berry *et al.*, 2002; Richmond *et al.*, 2001). und senkt die Immunogenität der Serogruppe C-Kapsel (Claus *et al.*, 2004; Fusco *et al.*, 2007).

#### 1.3.3.4 Genetik und Synthese der Kapsel

Alle Gene zur Synthese der Kapsel sind in dem Kapsel-Lokus (*cps*-Lokus) lokalisiert (Frosch *et al.*, 1989). Mit einem AT-Gehalt von 70% liegt der *cps*-Lokus deutlich über dem des restlichen Meningokokken-Genoms, was die Vermutung nahe legt, dass diese Gene von den Meningokokken akquiriert worden sind (Claus *et al.*, 1997; Claus *et al.*, 2004; Frosch *et al.*, 1991). Der Kapselsynthese-Apparat von Meningokokken ist in drei unterschiedlichen Regionen kodiert, den Regionen A, B und C, und umfasst 24kb

(Frosch *et al.*, 1989; Frosch and Edwards, 1993). Die Region A codiert für die Gene *siaA – D*, deren Produkte für die Synthese der Kapsel verantwortlich sind. Die Gene der Region B, *lipA* und *lipB*, codieren für Proteine, welche die Kapsel im Zellinneren modifizieren damit anschließend durch die Genprodukte der Region C, *ctrA – D*, die Kapselpolysaccharide zur Außenmembran der Bakterien transloziert werden können (1.3.3.4 Abbildung 1 + 3) (Boulnois *et al.*, 1987; Boulnois and Roberts, 1990; Frosch and Edwards, 1993; Roberts *et al.*, 1988).

1.3.3.4 Abb. 1: *cps*-Lokus von *Neisseria meningitidis*.

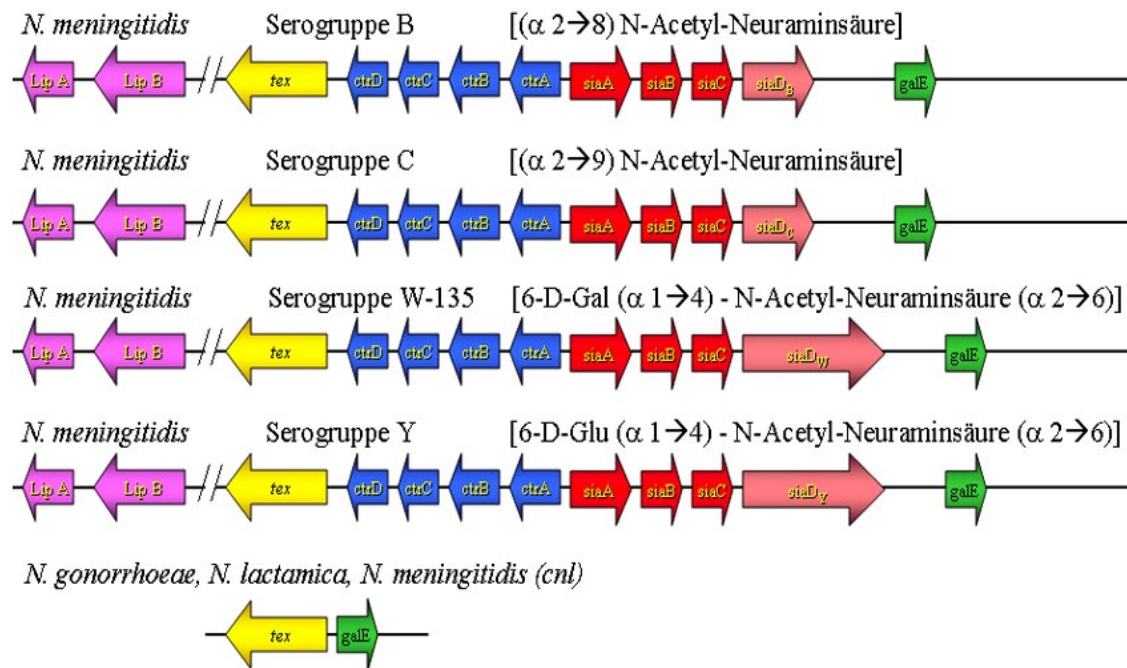


Dargestellt ist der *cps*-Lokus des Meningokokkenstammes MC58. Die Pfeile stellen die Regionen mit Leserichtung dar; die Buchstaben benennen die jeweilige Region (Claus *et al.*, 1997; Claus *et al.*, 2002; Dolan-Livengood *et al.*, 2003; Swartley *et al.*, 1996).

Die Kapselsynthese-Gene der Serogruppen B, C, W-135 und Y unterscheiden sich nur in ihrem Polysialyltransferase-Gen (*siaD*), welches dem entsprechend noch mit der Kennung der jeweiligen Serogruppe versehen wird (Claus *et al.*, 1997). Die restlichen Gene der Region A und die Regionen B und C sind bei diesen Serogruppen hochkonserviert (vgl. 1.3.3.4 Abbildung 2) (Claus *et al.*, 1997; Roberts, 1996).

Die in der Region A codierten Proteine stellen in vier Schritten aus N-Acetylglukosamin-6-Phosphat, einem Zwischenprodukt der Glycolyse, Polysialinsäure her (Frosch and Edwards, 1993): Das Protein SiaA, die N-Acetylglukosamin-6-Phosphatpimerase, stellt aus dem Ausgangssubstrat N-Acetylmannosamin-6-Phosphat her. Das Protein SiaC, das N-Acetylneuraminsäure kondensierende Enzym, stellt daraus und aus Pyruvat N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) her. Das Protein SiaB, die CMP-N-Acetylneuraminsäuresynthetase, aktiviert die Sialinsäure-Reste durch Anbindung von CMP. Die aktivierten Monomere werden durch das Protein SiaD, die Polysialyltransferase, miteinander verbunden (Frosch and Edwards, 1993).

1.3.3.4 Abb. 2: cps-Lokus verschiedener Serogruppen.



Dargestellt sind die cps-Loci von verschiedenen Serogruppen und der Unterschied zu apathogenen Meningokokken und anderen Neisserien. Region A: *siaA* – *D*; Region B: *lipA* + *B*; Region C: *ctrA* – *D* (Claus *et al.*, 1997; Claus *et al.*, 2002; Edwards *et al.*, 1994; Frosch *et al.*, 1989; Swartley *et al.*, 1996)

Das synthetisierte Kapselpolysaccharid ist an ein Undecaprenol gebunden und wird von den Proteinen LipA und LipB von diesem auf ein Phospholipid übertragen und damit in der Innenmembran verankert (Frosch and Müller, 1993).

Die membrangebundene Zuckerkette wird nun durch einen ABC-Transporter, der aus den Proteinen CtrA – D besteht, aus der Zelle transportiert und in der Außenmembran lokalisiert (Frosch and Müller, 1993; Paulsen *et al.*, 1997).

### 1.3.3.5 Variation der Kapselexpression

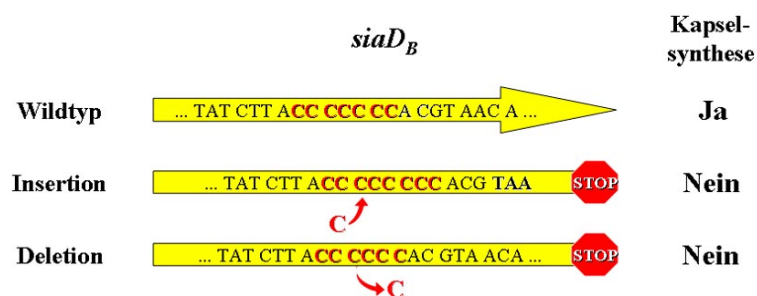
Nicht alle Meningokokken sind bekapselt. Einige der kapsellosen Stämme besitzen den Kapsel-Null-Locus (cni), das heißt, sie besitzen keine der für die Kapselsynthese benötigten Gene (Claus *et al.*, 2002) (vgl. 1.3.3.4 Abbildung 2). Von den Erregern mit vollständigem Kapsellokus sind einige dauerhaft unbekapselt, andere nur vorübergehend. Durch Mutationen wie Basensubstitutionen, Deletionen oder Insertionen kann die Kapselsynthese auf Dauer deaktiviert werden (Sadler *et al.*, 2003).

Die Kapselsynthese der Meningokokken ist zudem phasenvariabel reguliert (Frosch and Vogel, 2006; Hammerschmidt *et al.*, 1996a; Hammerschmidt *et al.*, 1996b). Zwei Arten



solcher Mechanismen sind bisher beschrieben: Beim ersten Mechanismus inseriert das Insertionselement *IS1301* in die Region A und inhibiert damit die Synthese der Kapselbestandteile (Hammerschmidt *et al.*, 1996a; Hilse *et al.*, 1996). Die Exsisionsfrequenz für die von Hammerschmidt *et al.* (1996a) beschriebene IS-Insertion beträgt  $1 \times 10^{-4}$ . Der zweite Mechanismus sind Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen in den Genen der Region A (Hammerschmidt *et al.*, 1996b; Lavitola *et al.*, 1999). Diese entstehen durch „Schreibfehler“ der DNA-Polymerase, sind reversibel und können die Kapselsynthese an- und ausschalten (1.3.3.3 Abbildung 1). Die Reversionsrate bei der von Hammerschmidt *et al.* (1996b) beschriebenen Sequenz beträgt  $3 \times 10^{-4}$ . Diesen zweiten Mechanismus bezeichnet man als „slipped-strand mispairing“ (SSM) (Hammerschmidt *et al.*, 1996b; Power and Moxon, 2006).

1.3.3.5 Abb. 1: Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen bei Meningokokken.



Darstellung des SSM im Gen *siaD<sub>B</sub>* vom Stamm B1940. Längenvariationen in diesem Poly-C Bereich (Position 3219-3225 bezüglich M95053) führen zum Verlust der Kapselexpression (Dolan-Livengood *et al.*, 2003; Hammerschmidt *et al.*, 1996b).

Zur Evaluierung der beschriebenen Mechanismen und zur Bestimmung der Häufigkeit bei Trägerisolaten wurden bisher zwei populationsbasierte Studien durchgeführt (Dolan-Livengood *et al.*, 2003; Sadler *et al.*, 2003). Bei der ersten Studie aus den USA wurde bei 31 kapsellosen Isolaten von asymptomatischen Trägern der Mechanismus des Kapselverlustes untersucht (Dolan-Livengood *et al.*, 2003). Zehn der Isolate waren Polysialyltransferase-Gen positiv und waren auf Grund von SSM und Punktmutationen unbekapselt. Elf Isolate hatten ihre Kapsel durch Insertions- oder Exzissionsereignisse von Insertionselementen (*IS1301*, *IS1016*-like) verloren. Die Insertionselemente verursachten große Deletionen und Insertionen von Fremd-DNA in der Region A (vgl. 1.3.3.5 Tabelle 1). Bei den restlichen zehn Isolaten war der Verlust der Kapselexpression auf den Kapsel-Null-Lokus (*cnl*) zurückzuführen.

1.3.3.5 Tab 1: Isolate mit Kapselverlust durch IS-Elemente nach Dolan-Livengood *et al.* (2003).

| Anzahl<br>(n) | Insertionen |             | Ort der<br>Insertion | Deletionen         |
|---------------|-------------|-------------|----------------------|--------------------|
|               | IS-Element  | Fremd-DNA   |                      |                    |
| 3             | IS1301      | <i>tagD</i> | <i>siaA</i>          | <i>siaA - D</i>    |
| 1             |             | <i>tagD</i> | <i>siaA</i>          | <i>siaA - D</i>    |
| 3             | IS1301      |             | <i>siaA</i>          | <i>siaA - D</i>    |
| 1             | IS1301      |             | <i>siaA</i>          |                    |
| 1             | IS1016      |             | <i>siaC</i>          |                    |
| 1             | IS1016      |             | <i>siaD</i>          |                    |
| 1             |             |             |                      | <i>ctrB - siaD</i> |

Bei der zweiten Studie aus England wurden 89 Isolate von asymptomatischen Trägern untersucht (Sadler *et al.*, 2003). Bei diesen Isolaten handelte es sich um Meningokokken, die durch Antiseren keiner der Serogruppen A, B, C, W-135 und Y zugeordnet werden konnten. Eine Zuordnung konnte über das Polysialyltransferasegen nur bei 31 der Isolate erfolgen. Als Mechanismen für den Kapselverlust gaben die Autoren bei einem Isolat ein Insertionselement (IS1301) an, bei vier Isolaten SSM und bei sechs die Deletion des *siaA*-Gens. Bei den restlichen Isolaten vermuteten die Autoren Deletionen und andere Mutationen als Ursache für den Verlust der Kapselexpression.

#### 1.4 Interaktion von Meningokokken mit Serumfaktoren

*Neisseria meningitidis* ist in der Lage mit einer Vielzahl von Serumfaktoren zu interagieren. So können Meningokokken zum Beispiel mit Hilfe von Opc die Proteine Vitronectin und Fibronectin aus dem Serum rekrutieren. Über diese Glykoproteine können sie an entsprechende Rezeptoren von Endothelzellen binden (Unkmeir *et al.*, 2002b; Virji *et al.*, 1994; Virji *et al.*, 1995). Wie Opc kann auch Opa als Rezeptor für Komponenten der extrazellulären Matrix und Serumfaktoren dienen (Derrick *et al.*, 2006; Eberhard *et al.*, 1998). Gebundene Faktoren sind zum Beispiel Laminin, verschiedene Kollagene, Heparin und Heparansulphat (Eberhard *et al.*, 1998; Scarselli *et al.*, 2006). Aber auch Faktoren des Komplementsystems werden von Meningokokken gebunden, wie der Faktor H oder das Faktor C4b bindende Protein (Jarva *et al.*, 2005; Ram and Vogel, 2006). Die Interaktionen mit Faktoren des Fibrinolyse-Systems haben sich für verschiedene pathogene Mikroorganismen als essentiell für deren Pathogenese herausgestellt.

### 1.4.1 Das Fibrinolyse-System

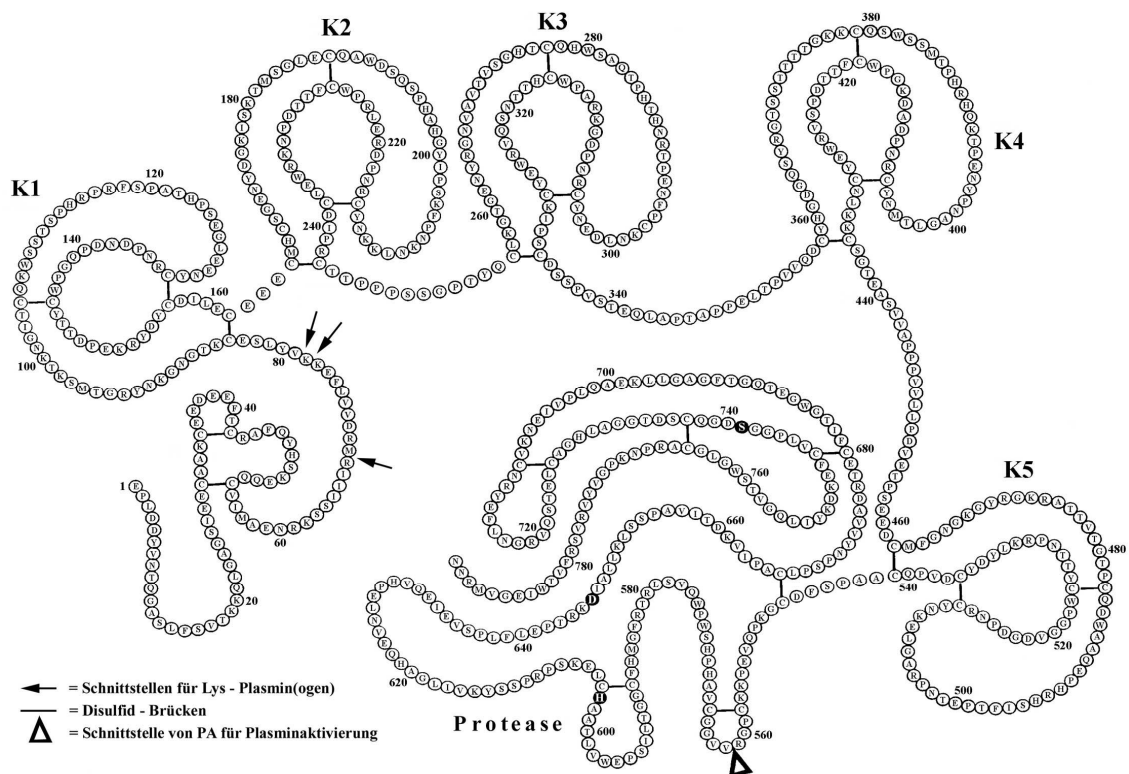
Eines der wichtigen regulatorischen Systeme im Menschen ist das Fibrinolyse-System (Plow *et al.*, 1995) mit seinen zwei Hauptaufgaben: Zum Einen wird durch strikte Kontrolle und Interaktionen der Systeme für Fibrinolyse und Blutgerinnung die Zirkulation in Blutgefäßen aufrecht erhalten (Degen, 2001; Esmon *et al.*, 1999; Kolev and Machovich, 2003).

Zum Zweiten sorgt das Fibrinolyse-System dafür, dass Körperzellen Barrieren, wie Basallaminae und Extrazelluläre Matrices degradieren können und ermöglicht damit die Migration der Zellen (Lijnen and Collen, 1995; Mignatti and Rifkin, 1993; Plow *et al.*, 1999; Vassalli *et al.*, 1991; Werb *et al.*, 1977). Im Zusammenspiel mit anderen extrazellulären Proteasen ist es damit Immunzellen möglich, schnell zu Infektionsherden zu gelangen (Brownstein *et al.*, 2004; Murphy and Gavrilovic, 1999). Durch proteolytische Aktivierung von Wachstumsfaktoren, Stimulation der Proliferation von Endothelzellen und durch die Degradation von Extrazellulärer Matrix trägt das Fibrinolyse-System zur Heilung verletzter Blutgefäße und zur Bildung neuer Blutgefäße bei (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Garcia-Touchard *et al.*, 2005).

### 1.4.2 Plasminogen / Plasmin

Die Serin-Protease Plasmin ist der alleinige Effektor des Fibrinolyse-Systems und wird durch proteolytische Spaltung aus Plasminogen erzeugt (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Lahteenmaki *et al.*, 2001; Saksela, 1985). Plasminogen wird in der Leber hergestellt und ist im Serum in hoher Konzentration vorhanden ( $\sim 180 \mu\text{g/ml}$ ,  $2 \mu\text{M}$ ) (Brandtzaeg *et al.*, 1990; Collen and Verstraete, 1975; Hajjar, 2003; Lahteenmaki *et al.*, 2005; Pollanen *et al.*, 1991). Wie die anderen Faktoren des Fibrinolyse-Systems kommt es in allen Geweben vor. Plasmin(ogen) besteht aus zwei Domänen, der leichten und der schweren Kette. Die schwere Kette enthält die fünf Lysin-Bindedomänen, die „Kringel“-Domänen genannt werden (Forsgren *et al.*, 1987). Über diese Lysin-Bindedomänen bindet Plasmin(ogen) sowohl an C-terminale Lysinreste, wie auch an lysinreiche Domänen in Proteinen (Hajjar *et al.*, 1986; Miles *et al.*, 1988; Plow *et al.*, 1991; Wistedt *et al.*, 1998). Die leichte Kette enthält die Protease-Domäne (1.4.1 Abbildung 1) (Castellino and Powell, 1981; Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Parry *et al.*, 2000; Saksela, 1985).

1.4.1 Abb. 1: Schematische Darstellung von humanem Plasmin / Plasminogen



Aminosäuren 1 – 562 entsprechen der schweren Kette (Binde-Domäne), Aminosäuren 563 – 791 entsprechen der leichten Kette (Protease-Domäne); K1 – K5: Kringle-Domänen 1 – 5; die schwarz hinterlegten Aminosäuren in der leichten Kette stellen das aktive Zentrum der Protease Plasmin dar.

### 1.4.3 Regulation von Plasmin

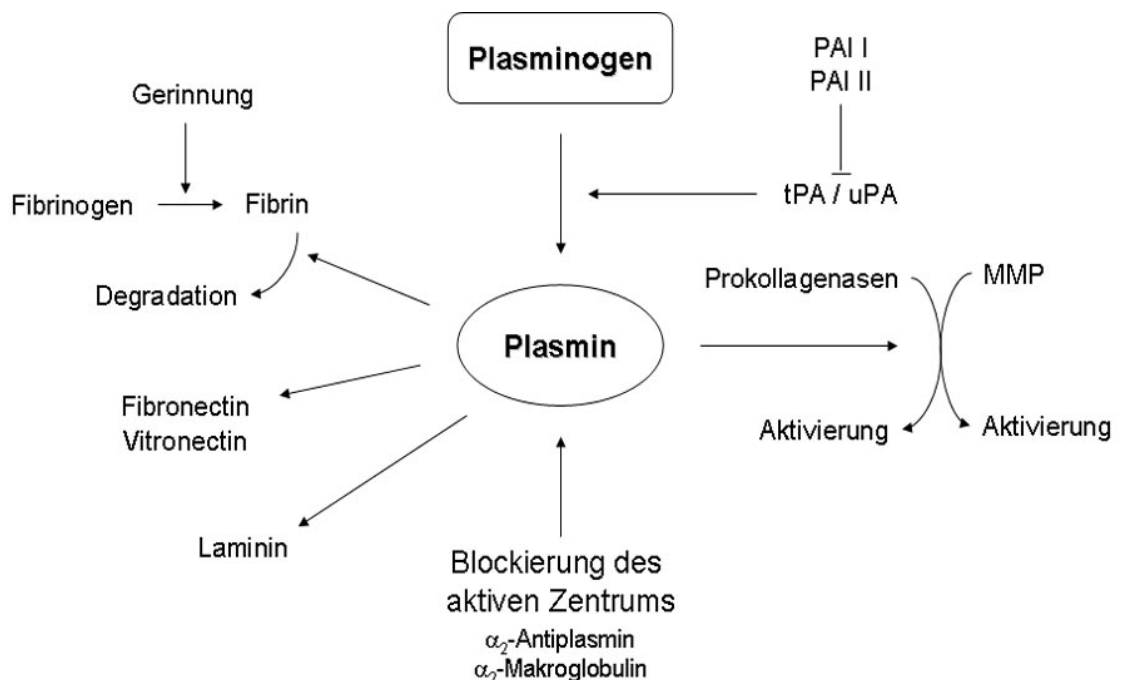
Das Plasminogen kann durch zwei unterschiedliche Plasmin-Aktivatoren zu Plasmin gespalten werden: durch den „Tissue-Type“ Plasminogen Aktivator (tPA) und durch den Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA). Der Aktivator tPA wird von Endothelzellen in den Blutgefäßen hergestellt und ist für die Aktivierung des Plasmins zur Aufrechterhaltung der Zirkulation in den Gefäßen verantwortlich (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Mosesson, 2005; Plow *et al.*, 1995). Die Urokinase wird von einer Vielzahl von Zell- und Gewebetypen hergestellt und dient der Aktivierung von Plasmin für die Zellmigration (Murphy and Gavrilovic, 1999; Murphy *et al.*, 1999; Plow *et al.*, 1999). Die Plasminogen-Aktivatoren werden durch die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren PAI I und PAI II reguliert (Rijken, 1995; Saksela and Rifkin, 1988). Freies Plasmin wird im Organismus durch  $\alpha$ 2-Antiplasmin und  $\alpha$ 2-Makroglobulin sehr schnell inaktiviert (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Lahteenmaki *et al.*, 2001; Lijnen and Collen, 1995; Travis and Salvesen, 1983). Die Inhibitoren binden kovalent an das aktive Zentrum der Protease (tPA, uPA, Plasmin) (Lawrence, 1997; Wilczynska *et al.*, 1997).

Rezeptorgebundenes Plasminogen wird leichter zu Plasmin aktiviert, weist eine höhere proteolytische Aktivität auf und ist vor Inaktivierung geschützt (Brownstein *et al.*, 2004; Murphy and Gavrilovic, 1999; Ranby, 1982; Travis and Salvesen, 1983; Wiman and Collen, 1979; Wiman *et al.*, 1979). Migratorische Zellen können sich dadurch mit lang anhaltender proteolytischer Aktivität ausstatten (Brownstein *et al.*, 2004; Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Lahteenmaki *et al.*, 2001; Plow *et al.*, 1995).

#### 1.4.4 Wirkung von Plasmin

Zu den Hauptsubstraten von Plasmin gehören Fibrin, das den größten Bestandteil von Blutgerinnseln ausmacht, aber auch Komponenten der Basalmembranen und extrazellulären Matrices (ECM) (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Lijnen and Collen, 1995; Mosesson, 2005). Als Bestandteil der ECM und der Basalmembranen kann Plasmin unter anderem Fibronectin (Salonen *et al.*, 1985), Vitronectin (Kost *et al.*, 1996; Preissner, 1990) und Laminin degradieren (Salonen *et al.*, 1984).

1.4.4 Abb. 1: Plasmin(ogen) Regulation und Wirkung.



Dargestellt ist die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch tPA und uPA, die Wirkweise in der Fibrinolyse und weitere Substrate der aktivierten Breitspektrumprotease Plasmin und die Regulation von Plasmin und den Plasmin Aktivatoren.

PAI: Plasminogen-Aktivator Inhibitor 1 + 2; tPA: „tissue type“ Plasminogen Aktivator; uPA: Urokinase Plasminogen Aktivator; MMP: Matrix Metalloproteasen.

Plasmin kann aber nicht nur direkt die ECM abbauen, sondern die Degradation auch indirekt aktivieren. Durch Aktivierung verschiedener weiterer Proteasen, wie Prokollagenasen und Matrix-Metalloproteasen, werden auch die Bestandteile der ECM und Basalmembranen abgebaut, die Plasmin nicht direkt spalten kann (Chapman and Stone, 1984; Mazzieri *et al.*, 1997; Mignatti and Rifkin, 1993; Murphy *et al.*, 1999).

#### **1.4.5 Interaktionen von humanpathogenen Erregern mit Plasminogen**

Für eine Vielzahl von pathogenen Mikroorganismen ist beschrieben, dass sie mit Faktoren des Fibrinolyse-Systems interagieren (Lahteenmaki *et al.*, 2001; Lottenberg *et al.*, 1994; Lottenberg, 1997). Der Erreger der Lyme-Borreliose, *Borrelia burgdorferi*, benötigt aus humanem Blut rekrutierte Plasminaktivität um sich in dem Vektor, den Zecken, ausbreiten zu können und in die Speicheldrüsen zu gelangen, um neue Wirte zu besiedeln (Coleman *et al.*, 1997). Borrelien, die Plasmin gebunden haben, können Endothelbarrieren *in vitro* schneller überwinden, was eine erhöhte Bakterienlast im Blut infizierter Mäuse bestätigt (Coleman *et al.*, 1995; Coleman *et al.*, 1997). Borrelien sind dabei für die Aktivierung vom Plasminogen auf die Faktoren des Wirtes angewiesen (Coleman *et al.*, 1997).

Andere Erreger haben eigene Plasminogen-Aktivatoren, wie z.B. *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* oder *Yersinia pestis* (Lahteenmaki *et al.*, 2001; Parry *et al.*, 2000). Für den Erreger der Pest, das Bakterium *Y. pestis*, ist der Plasminogen-Aktivator Pla einer der Hauptfaktoren um systemische Infektionen hervorzurufen. Stämme ohne Pla können keine Gewebsbarrieren überwinden und keine invasiven Infektionen auslösen (Sodeinde *et al.*, 1992). Auch bei Gruppe A Streptokokken spielt der eigene Plasminogen-Aktivator, die Streptokinase, eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese (Khil *et al.*, 2003; Li *et al.*, 1999). Darüber hinaus ist die Streptokinase hochspezifisch für humanes Plasminogen und damit wahrscheinlich verantwortlich für die Wirtsspezifität von Gruppe A Streptokokken (Sun *et al.*, 2004). Bei anderen Spezies, wie z.B. *B. burgdorferi*, *H. influenzae* oder *S. pneumoniae*, konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Plasminogen und die Aktivierung zu Plasmin zu einer Degradation der extrazellulären Matrix führt (Bergmann *et al.*, 2005; Coleman *et al.*, 1999; Eberhard *et al.*, 1999; Virkola *et al.*, 1996).

Für einige Erreger ist die Fähigkeit zur Bindung von Plasminogen und Plasmin untersucht worden. Ein breites Spektrum von Plasminogen-Rezeptoren ist bei den unterschiedlichen Erregern identifiziert worden. So binden zum Beispiel *Salmonella*

*spec.* und *Escherichia coli* Plasminogen an Flagellen und Fimbrien (Kukkonen *et al.*, 1998; Lahteenmaki *et al.*, 1993; Lahteenmaki *et al.*, 2001), Borellien und Streptokokken dagegen an Adhäsine und andere Oberflächen-assoziierte Proteine (Fenno *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 1997; Lahteenmaki *et al.*, 2001; Wistedt *et al.*, 1998). Auch eigentlich cytoplasmatische Proteine sind als Oberflächen-assoziierte Plasminogen-Rezeptoren beschrieben worden, wie das Stoffwechselprotein Aspartase bei *Haemophilus influenzae* oder die Glycolyseproteine  $\alpha$ -Enolase und Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase bei Streptokokken und Pneumokokken (Bergmann *et al.*, 2001; Bergmann *et al.*, 2004; Pancholi and Fischetti, 1992; Pancholi and Fischetti, 1998; Sjostrom *et al.*, 1997).

#### **1.4.6 Interaktionen von *Neisseria meningitidis* mit Plasminogen**

Bei Infektionen mit *Neisseria meningitidis* zeigen einige Patienten erhöhte Werte für die Faktoren des Fibrinolyse-Systems (Brandtzaeg *et al.*, 1990; Kornelisse *et al.*, 1996). Auch die Symptome der Verbrauchs-Coagulopathie und des „Capillary Leak“-Syndroms können als Ursache eine Entgleisung des Fibrinolyse-Systems haben (Brandtzaeg *et al.*, 1990; Harrison *et al.*, 2002; Hazelzet *et al.*, 1996). Deswegen sind Untersuchungen zur Plasminogenbindung von *Neisseria meningitidis* durchgeführt worden. Es konnte gezeigt werden, dass Meningokokken in der Lage sind Plasminogen zu binden (Ullberg *et al.*, 1992). Dabei gab es keine Unterschiede zwischen pathogenen und apathogenen Isolaten. Die Bakterien konnten das Plasminogen nicht selbst aktivieren, aber gebundenes Plasminogen von den körpereigenen Aktivatoren tPA und uPA aktivieren lassen. Gebundenes Plasmin war enzymatisch aktiv, das heißt, es konnte ein synthetisches Substrat spalten. Die Bindung von Plasminogen an die Bakterien konnte durch Zugabe von  $\epsilon$ -Aminocapronsäure (EACA) unterbunden werden. EACA ist ein Lysin-Analogon und kann die Lysin-Bindestellen des Plasminogens absättigen. Die Bindung von Plasminogen an Meningokokken erfolgte demnach ausschließlich über diese Lysin-Bindedomänen. Scatchart-Analysen der Plasminogenbindung an die Erreger haben ergeben, dass Meningokokken mindestens zwei unterschiedliche Rezeptoren für Plasminogen besitzen und diese in einer Gesamtzahl von 13.000 – 26.000 pro Bakterienzelle vorliegen (Ullberg *et al.*, 1992).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen populationsbiologische und pathogenetische Aspekte von *Neisseria meningitidis* untersucht werden.

Dazu sollen

- die Mechanismen des Kapselverlustes bei Polysialyltransferasegen-positiven Meningokokken der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie untersucht,
- Rezeptoren der Bakterien für die Bindung von Plasminogen und Plasmin charakterisiert,
- funktionelle Aspekte der Plasminogenbindung und -Aktivität analysiert und
- Bindung und Aktivität von Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) an Meningokokken charakterisiert werden.



## 2 Ergebnisse

### 2.1 Teil I – Mechanismen des Kapselverlustes bei Polysialyltransferasegen-positiven Meningokokken

Untersuchungsobjekte dieses Projektes waren 166 Stämme der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie, bei denen zwar das *siaD*-Gen durch Hybridisierung nachgewiesen wurde, die sich aber in ELISA-Untersuchungen als unkapselt herausstellten (vgl. Kapitel 1.2.2). Die Untersuchungen sollten aufdecken, durch welche Mechanismen die Fähigkeit zur Kapselsynthese in dieser repräsentativen Gruppe von Trägerisolaten verloren gegangen ist.

Bei jedem einzelnen Stamm wurden bis zu dem Punkt Untersuchungen durchgeführt, bis ein Mechanismus gefunden wurde, der den Verlust der Kapselexpression erklärt. Zuerst wurden die Regionen A, B und C des Kapselsynthese-Genclusters einer PCR-Analyse unterzogen. Bei Meningokokkenstämmen mit großen Deletionen und Insertionen ist versucht worden die Mutation zu analysieren. Bei Stämmen, deren PCR-Produkte denen der Referenz-Proben glichen, die also weder deutliche Deletionen oder Insertionen aufwiesen, wurde die Region A im Folgenden durch Sequenzierung einer Analyse der Basensequenz unterzogen. Zunächst wurden die Promotorregionen der Region A und C zwischen den Genen *ctrA* und *siaA* untersucht. Nachfolgend wurden der Reihe nach die Gene *siaA*, *siaB*, *siaC* und *siaD* mit den dazu gehörigen intergenischen Bereichen sequenziert. Für einige der untersuchten Stämme bleibt auch nach den durchgeführten Untersuchungen der Mechanismus für den Verlust der Kapselexpression unklar.

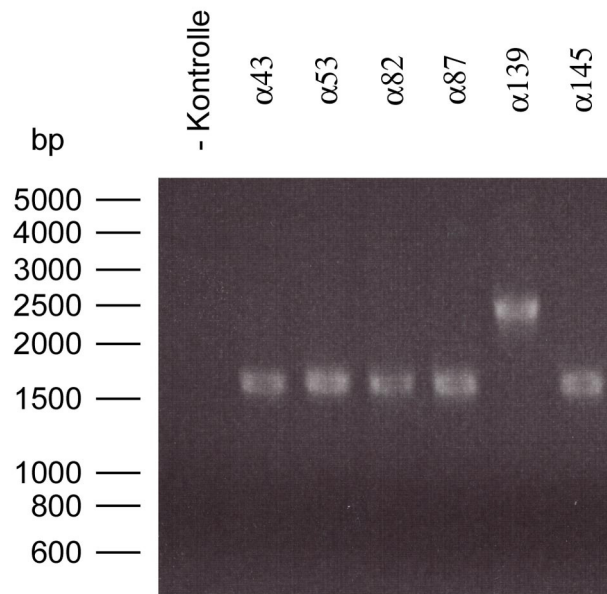
Die in Klammern stehenden Prozentangaben der folgenden Kapitel beziehen sich auf die Gesamtzahl der 166 untersuchten Stämme.

#### 2.1.1 PCR-Analyse der Regionen A, B und C

Die drei funktionellen Regionen A, B und C des *cps*-Genclusters wurden mittels PCR-Analyse auf große Insertionen und Deletionen untersucht (zur Orientierung siehe Kapitel 1.3.3.4). Dazu wurde jedes dieser Gene bei jedem einzelnen Stamm mit verschiedenen PCR-Ansätzen überprüft. Angefangen wurde mit den Genen der Region A, dann wurden die Region C und schließlich die Region B untersucht (Primerlisteliste siehe Tabelle im Kapitel 5.2.1.1) Diese PCR-Analysen wurden bei jedem Stamm

solange durchgeführt, bis eine Insertion, eine Deletion oder kein Unterschied in den untersuchten Regionen zur Referenzsequenz gefunden wurden.

2.1.1 Abb. 1: Beispiel für eine PCR-Analyse



Agarose-Gel-Elektrophorese von KB11/UE31-PCR-Produkten. Das PCR-Produkt umfasst den 5'-Bereich des Gens *ctrA*, die intergenische Region zwischen *ctrA* und *siaA* und das gesamte Gen *siaA* und weist eine Größe von 1,6kb auf.

Insgesamt 59 der 166 Isolate (36%) zeigten Insertionen oder Deletionen bei der PCR-Analyse. Bei 45 Stämmen (27%) war das PCR-Produkt größer als das zu erwartende Fragment (vgl. 2.1.1 Abbildung 1). 14 Stämme wiesen ein verkleinertes oder teilweise gar kein PCR-Produkt auf.

2.1.1 Tab. 1: Auflistung der durch die PCR-Analyse gefundenen Deletionen.

| Stämme           | Mutationen   | Bereich                      |
|------------------|--|------------------------------|
| α818             | ca. 200 bp vom <i>siaD</i> 5'-Ende fehlen                        | Deletion in Region A         |
| α160             | Deletion von 114 bp im <i>siaD</i> (3053-3167)                   | Deletion in Region A         |
| α360 & α520      | Deletion von 383bp im <i>ctrA</i> und in Region A (bis Pos. 132) | Deletion in Regionen A und C |
| α748             | Deletion von <i>ctrA</i> und <i>siaA</i>                         | Deletion in Regionen A und C |
| α197, α201, α202 | Deletion von <i>ctrA, B</i> & <i>siaA, B, C</i>                  | Deletion in Regionen A und C |
| α629             | Deletion von <i>ctrA, B</i> and <i>siaA</i>                      | Deletion in Regionen A und C |
| α173, α174, α194 | Deletion von <i>siaA</i>   | Deletion in Region A         |
| α827             | Deletion von <i>siaB</i> & <i>siaC</i>                           | Deletion in Region A         |
| α451             | Deletion von <i>siaA, B, C</i> & Insertion von IS1301            | Deletion in Region A         |

Auflistung der 14 Stämme mit Deletionen, die während der PCR-Analyse entdeckt und weiter charakterisiert wurden.

PCR-Fragmente mit vom Wildtyp abweichenden Größen wurden sequenziert. Bei den Insertionen handelt es sich in allen Fällen um Insertionselemente (siehe Kapitel 2.1.2). Die Deletionen haben sich nach der anschließenden Sequenzierungen wie in Tabelle 1 dargestellt präsentiert (2.1.1 Tabelle 1).

### 2.1.2 Insertionselemente

Die 46 Isolate, bei denen durch die PCR-Analyse Insertionen festgestellt worden sind, wurden weiter untersucht, um die Mutationen genauer zu charakterisieren. Dazu wurden die vergrößerten PCR-Produkte dieser Stämme sequenziert. Bei allen Stämmen wurden Insertionselemente (IS-Elemente) als Ursache für die vergrößerten PCR-Produkte ausgemacht.

Die Untersuchungen der 46 Insertionsmutanten ergab, dass 41 (91%) das Insertionselement *IS1301* beherbergten, vier Stämme (8,9%) das *IS1016* ähnliche-Element (im Folgenden nur *IS1016* genannt) und ein Stamm das Insertionselement *IS1106*. Dieses letzte Insertionselement wurde bisher in Meningokokken noch nicht im Zusammenhang mit der Regulation der Kapselsynthese beschrieben (Knight *et al.*, 1992).

Von den 41 entdeckten *IS1301*-Insertionen liegen 19 (42%) an derselben Stelle im Gen *siaA*, die auch schon von Hammerschmidt *et al.* (1996a) beschrieben wurde. Ein weiterer Locus für die Insertion dieses Insertionselements lag in der Promotorregion des *sia*-Operons, welches die Region A darstellt. Dort wurden fünf der 41 *IS1301*-Insertionen gefunden. Von den restlichen 17 *IS1301*-Insertionen liegen acht weitere in dem Gen *siaA*, eine in dem Gen *siaC* und acht im Gen *siaD*, alle an bislang noch nicht beschriebenen Insertionsstellen. Des Weiteren wurden zu den bereits bekannten Insertionssequenzen (ATTAG & ATTAC) drei weitere, noch nicht beschriebene Insertionssequenzen vom *IS1301* entdeckt: ACTAA, ACTAG und GATAA (Hilse *et al.*, 1996).

Die Phasenvariabilität der neu entdeckten Insertionsstellen wurde exemplarisch am Stamm  $\alpha$ 315, Serogenotyp W-135, untersucht. Dieser Stamm enthielt das Insertionselement *IS1301* im Gen *siaA* an der vormals noch nicht beschriebenen Position: 847 (bezüglich der Referenzsequenz M95053). Dieses Insertionselement zeigte eine Exsissionsrate von  $9 \times 10^{-4}$ , welche in etwa der für das Insertionselement *IS1301* bekannten Rate von  $1 \times 10^{-4}$  entspricht (Hammerschmidt *et al.*, 1996a).

2.1.2 Tab. 1: IS – Elemente in der Region A des Kapsellokus

| IS-Element <sup>a</sup> | Anzahl (n) | Ziel-Gen     | Position | Referenz <sup>b</sup> | Insertions-Richtung <sup>c</sup> | Konsensus-Sequenz / Verdopplung | Stämme   |
|-------------------------|------------|--------------|----------|-----------------------|----------------------------------|---------------------------------|--|
| IS 1016                 | 1          | <i>sia A</i> | 924      | M95053                | 3' - 5'                          | Unbekannt / TTATTAA             | α192   |
| IS 1016                 | 1          | <i>sia A</i> | 924      | M95053                | 5' - 3'                          | Unbekannt / TTATTAA             | α293   |
| IS 1016                 | 1          | <i>sia D</i> | 937      | Y13970                | 3' - 5'                          | Unbekannt / TAAAGAT             | α754   |
| IS 1016                 | 1          | <i>sia D</i> | 1968     | Y13969                | 3' - 5'                          | Unbekannt / TTATTAA             | α141   |
| IS 1106                 | 1          | <i>sia A</i> | 240      | M95053                | 3' - 5'                          | Unbekannt / Unbekannt           | α683   |
| IS 1301                 | 5          | <i>sia A</i> | 120      | M95053                | 3' - 5'                          | ATTAG / TA                      | α034, α119, α146, α222, α541   |
| IS 1301                 | 13         | <i>sia A</i> | 587      | M95053                | 3' - 5'                          | ATTAG / TA                      | α022, α063, α077, α109, α139, α193, α196, α224, α263, α279, α284, α374, α619 |
| IS 1301                 | 6          | <i>sia A</i> | 587      | M95053                | 5' - 3'                          | ATTAG / TA                      | α304, α332, α420, α501, α674, α734   |
| IS 1301                 | 2          | <i>sia A</i> | 847      | M95053                | 3' - 5'                          | ATTAG / TA                      | α096, α315   |
| IS 1301                 | 2          | <i>sia A</i> | 982      | M95053                | 3' - 5'                          | TTTAG / TA                      | α357, α725   |
| IS 1301                 | 1          | <i>sia A</i> | 1000     | M95053                | 3' - 5'                          | GATAA / TA                      | α086   |
| IS 1301                 | 1          | <i>sia A</i> | 1034     | M95053                | 5' - 3'                          | ATTAG / TA                      | α557   |
| IS 1301                 | 2          | <i>sia A</i> | 1132     | M95053                | 5' - 3'                          | ACTAA / TA                      | α655, α809   |
| IS 1301                 | 1          | <i>sia C</i> | 3038     | M95053                | 5' - 3'                          | GATAT / TA                      | α451   |
| IS 1301                 | 1          | <i>sia D</i> | 1600     | Y13970                | 5' - 3'                          | ACTAA / TA                      | α444   |
| IS 1301                 | 2          | <i>sia D</i> | 3317     | M95053                | 5' - 3'                          | ACTAG / TA                      | α589, α822   |
| IS 1301                 | 3          | <i>sia D</i> | 3317     | M95053                | 3' - 5'                          | ACTAG / TA                      | α161, α248, α760   |
| IS 1301                 | 1          | <i>sia D</i> | 3546     | M95053                | 5' - 3'                          | ATTAG / TA                      | α685   |
| IS 1301                 | 1          | <i>sia D</i> | 3562     | M95053                | 5' - 3'                          | AATAT / TA                      | α050   |

Auflistung der Insertionselemente nach Anzahl, Zielgen und Insertionsrichtung.

<sup>a</sup> „Accession numbers“ der Insertionselemente: IS1016 (AY289932), IS1106 (Z11857), IS 1301 (Z49092).

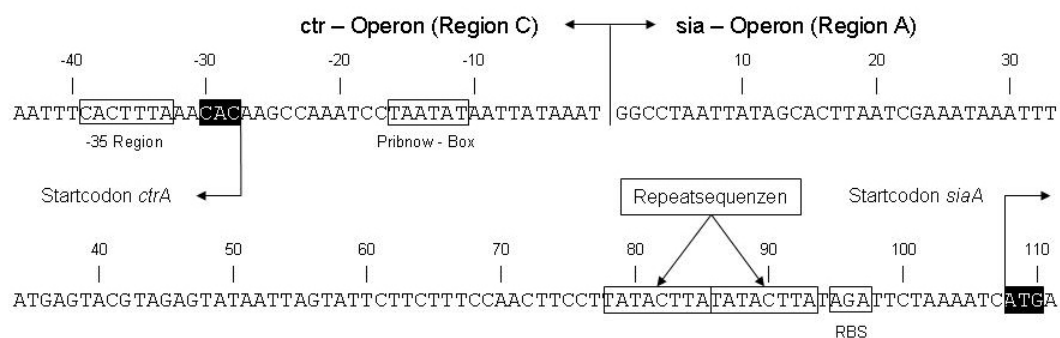
<sup>b</sup> Die Positionen beziehen sich auf die „Accession number“.

<sup>c</sup> Die Insertionsrichtung bezieht sich auf die Leserichtung des Gens, in das das IS-Element inseriert ist.

### 2.1.3 Analyse der intergenischen Region zwischen Region A und C

Zur weiteren Analyse möglicher Ursachen des Kapselverlustes wurde von 81 Stämmen der intergenische Bereich zwischen den Genen *ctrA* und *siaA* und damit den Regionen C und A analysiert. Dieser Bereich ist 134bp lang und enthält die Promotoren für die Gene *ctrA* und *siaA*. Von der Position 78 bis 93 vom Transkript des *sia*-Operons (vgl. Abb. 2.1.3 Abbildung 1) erstreckt sich eine doppelte Wiederholungssequenz mit der Basenabfolge TATACTTA. Bei dieser Wiederholungssequenz kann es unterschiedliche Anzahlen von Wiederholungen oder verschiedene Variationen geben (Swartley *et al.*, 1996; Von Loewenich *et al.*, 2001). Die von Loewenich *et al.* (2001) beschriebenen Sequenzen haben keinen Einfluss auf die Transskription des *Sia*-Operons.

2.1.3 Abb. 1: Intergenischer Bereich zwischen *ctrA* und *siaA*.



Intergenischer Bereich zwischen dem *ctr*-Operon (Region C) und dem *sia*-Operon (Region A) mit den Startcodons (schwarze Boxen) und Teilen der Gene *ctrA* und *siaA*. Die Nummerierung der Basen bezieht sich auf das Transkript des *sia*-Operons. Die putativen -10 (Pribnow-Box) und -35 Regionen sind für das *sia*-Operon in Kästen angegeben, genauso wie die Ribosomen-Bindestelle (RBS) für die Translation des Genes *siaA*. Von der Position 78 bis zur Position 93 erstreckt sich die Repeatsequenz des Referenzstammes B1940. (Von Loewenich *et al.*, 2001)

Bei der Analyse der Wiederholungssequenzen wurden einer (n=7), zweier (n=40), dreier (n=11) und fünfer (n=1) Repeats der Sequenz gefunden. Es sind auch insgesamt drei unterschiedliche Variationen eines 1x Repeats gefunden worden (n=17) und zwei unterschiedliche Varianten eines 2x Repeats (n=2).

2.1.3 Tab. 1: Varianten der Repeatsequenz im intergenischen Bereich zwischen den Regionen A und C

| Anzahl (n) | Stämme  | Anzahl Repeats   | Repeatsequenz     |
|------------|---|------------------|-------------------|
| 40         | MC58, B1940, $\alpha$ 43, $\alpha$ 52, $\alpha$ 61, $\alpha$ 87, $\alpha$ 104, $\alpha$ 141, $\alpha$ 152, $\alpha$ 164, $\alpha$ 192, $\alpha$ 205, $\alpha$ 207, $\alpha$ 214, $\alpha$ 222, $\alpha$ 231, $\alpha$ 259, $\alpha$ 269, $\alpha$ 291, $\alpha$ 293, $\alpha$ 311, $\alpha$ 405, $\alpha$ 408, $\alpha$ 441, $\alpha$ 517, $\alpha$ 525, $\alpha$ 562, $\alpha$ 573, $\alpha$ 593, $\alpha$ 617, $\alpha$ 618, $\alpha$ 622, $\alpha$ 688, $\alpha$ 715, $\alpha$ 727, $\alpha$ 767, $\alpha$ 771, $\alpha$ 775, $\alpha$ 796, $\alpha$ 806, $\alpha$ 812, $\alpha$ 818 | 2 <sup>a,b</sup> | TATACTTA          |
| 7          | $\alpha$ 126, $\alpha$ 262, $\alpha$ 281, $\alpha$ 315, $\alpha$ 326, $\alpha$ 343, $\alpha$ 584  | 1 <sup>b</sup>   | TATACTTA          |
| 11         | $\alpha$ 53, $\alpha$ 63, $\alpha$ 255, $\alpha$ 422, $\alpha$ 439, $\alpha$ 462, $\alpha$ 491, $\alpha$ 498, $\alpha$ 652, $\alpha$ 666, $\alpha$ 814  | 3 <sup>b</sup>   | TATACTTA          |
| 1          | $\alpha$ 637  | 5                | TATACTTA          |
| 9          | $\alpha$ 69, $\alpha$ 82, $\alpha$ 100, $\alpha$ 145, $\alpha$ 543, $\alpha$ 579, $\alpha$ 698, $\alpha$ 737, $\alpha$ 766,   | 1 <sup>a,b</sup> | TATGCTTA          |
| 7          | $\alpha$ 128, $\alpha$ 475, $\alpha$ 560, $\alpha$ 639, $\alpha$ 819, $\alpha$ 589, $\alpha$ 640  | 1 <sup>b</sup>   | CTATGCTTA         |
| 1          | $\alpha$ 50   | 1                | TCTACTTA          |
| 1          | $\alpha$ 657  | 2                | TTACTTA TATACTTA  |
| 1          | $\alpha$ 356  | 2                | TATACTTA TATACTTA |

Die Referenzsequenzen (B1940 und MC58) besitzen einen Doppel-Repeat an der Position 78-93bp im *sia*-Operon Transkript (vgl. 2.1.4 Abb. 1). Bei den Varianten sind die Unterschiede zur Referenzsequenz als schwarze Kästen mit weißer Schrift dargestellt.

<sup>a</sup>: beschrieben von Swartley *et al.* (1996)

<sup>b</sup>: beschrieben von Löwenich *et al.* (2001)

## 2.1.4 Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen

Bei allen Stämmen, für die keine Ursache gefunden wurde, die den Verlust der Kapselexpression erklärt, wurden weitere Untersuchungen angestellt, indem von gesamten Region A sukzessive die Basensequenz analysiert wurde. Bei 39 von 107 Isolaten wurden ein oder zwei homopolymere Regionen gefunden, in denen sich Längenvariationen zeigten. Dieser Mechanismus wird „slipped-strand mispairing“ genannt (Hammerschmidt *et al.*, 1996b). Diese homopolymeren Regionen stellen einen phasenvariablen Mechanismus zur reversiblen Variation der Kapselexpression dar. Eine dieser Regionen wurde bereits im Polysialyltransferasegen von Serogruppe B-Meningokokken beschrieben. Bei den 39 Stämmen zeigten sich für den Kapselverlust verantwortliche homopolymere Sequenzen in den Polysialyltransferase-Genen der Serogruppen B, W-135 und Y und im *siaA*-Gen (vgl. 2.1.4 Tabelle 1).

Der phasenvariable Charakter einiger der homopolymeren Sequenzen wurde mit Hilfe von Colony Blots unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern zur Kontrolle der Kapselexpression untersucht. Getestet wurde die Phasenvariationsfrequenz zweier Isolate,  $\alpha$ 230 (ST-800, ST-32-Komplex) und  $\alpha$ 323 (ST-801, ST-32-Komplex), welche eine als phasenvariabel beschriebene homopolymere Sequenz in ihrem Polysialyltransferase-Gen (Serogruppe B) aufwiesen (Hammerschmidt *et al.*, 1996b).

2.1.4 Tab. 1: Homopolymere Sequenzen in der Region A des Kapsellokus

| Anzahl<br>(n) | Genotyp  | Gen                        | Nukleotid | Verhältnis der |             | Referenz | Stämme   |
|---------------|----------|----------------------------|-----------|----------------|-------------|----------|--|
|               |          |                            |           | Basen zu der   | Position    |          |  |
| 11            | B        | <i>siaD<sub>B</sub></i>    | C         | + 1            | 3219 – 3225 | M95053   | $\alpha$ 11, $\alpha$ 75, $\alpha$ 230, $\alpha$ 236, $\alpha$ 262,<br>$\alpha$ 286, $\alpha$ 323, $\alpha$ 370, $\alpha$ 461, $\alpha$ 523,<br>$\alpha$ 540 |
| 9             | B        | <i>siaD<sub>B</sub></i>    | C         | - 1            | 3219 – 3225 | M95053   | $\alpha$ 100*, $\alpha$ 347, $\alpha$ 376, $\alpha$ 381,<br>$\alpha$ 386, $\alpha$ 502, $\alpha$ 531, $\alpha$ 560, $\alpha$ 667                             |
| 8             | B        | <i>siaD<sub>B</sub></i>    | A         | + 1            | 3553 – 3561 | M95053   | $\alpha$ 100*, $\alpha$ 126, $\alpha$ 249, $\alpha$ 343, $\alpha$ 455,<br>$\alpha$ 602, $\alpha$ 653, $\alpha$ 709   |
| 3             | W-135, Y | <i>siaD<sub>W, Y</sub></i> | C         | + 1            | 301 – 306   | Y13970   | $\alpha$ 104, $\alpha$ 269, $\alpha$ 720   |
| 2             | C        | <i>siaD<sub>C</sub></i>    | A         | + 1            | 423 – 430   | U75650   | $\alpha$ 291, $\alpha$ 806   |
| 1             | B        | <i>siaD<sub>B</sub></i>    | A         | - 1            | 3553 – 3561 | M95053   | $\alpha$ 488   |
| 1             | C        | <i>siaD<sub>C</sub></i>    | A         | - 1            | 309 – 315   | U75650   | $\alpha$ 205   |
| 1             | C        | <i>siaD<sub>C</sub></i>    | A         | - 1            | 423 – 430   | U75650   | $\alpha$ 715*  |
| 1             | C        | <i>siaD<sub>C</sub></i>    | A         | - 1            | 604 – 610   | U75650   | $\alpha$ 87  |
| 1             | C        | <i>siaA</i>                | A         | - 1            | 655 – 660   | M95053   | $\alpha$ 422   |
| 1             | C        | <i>siaD<sub>C</sub></i>    | T         | + 1            | 1449 – 1455 | U75650   | $\alpha$ 715*  |
| 1             | Y        | <i>siaD<sub>Y</sub></i>    | A         | - 1            | 756 – 763   | Y13969   | $\alpha$ 666   |
| 1             | Y        | <i>siaD<sub>Y</sub></i>    | A         | - 1            | 1213 – 1220 | Y13969   | $\alpha$ 164   |

Auflistung der in 39 Stämmen gefundenen 41 SSM's.

\*: Stämme mit mehr als einer homopolymeren Wiederholungssequenz.

Diese Poly-(C)-Sequenz (Position 3220-3226, bezüglich M95053) zeigte eine Frequenz von  $5 \times 10^{-5}$ . Eine vergleichbare Phasenvariationsfrequenz von  $3 \times 10^{-5}$  zeigte eine weitere homopolymere Sequenz (Poly-A) im Polysialyltransferase-Gen der Serogruppe B (Position 3553-3561, bezüglich M95053) des Isolates  $\alpha$ 249 (ST-872, ST-32-Komplex). Eine andere noch nicht beschriebene homopolymere Sequenz (Poly-C) im *siaD*-Gen (Position 302-307, bezüglich Y13970) der Serogruppe W-135 des Stammes  $\alpha$ 104 (ST-22) zeigte eine Frequenz der Phasenvariation von  $4 \times 10^{-4}$ .

### 2.1.5 Irreversible Mutationen

Bei der Sequenzierung der Region A des Kapsellokus sind nicht nur die längenvariablen homopolymeren Sequenzen gefunden worden, sondern es wurden auch insgesamt 47 (36%) relevante Punktmutationen entdeckt. Bei diesen Punktmutationen handelt es sich um Basendeletionen, –insertionen und –substitutionen, die alle als irreversible angesehen werden können. Jede dieser Mutationen führte entweder durch die Veränderung des Leserasters oder zu einem Abbruch der Transkription. Das führt damit

auch durch nicht funktionsfähige Proteine zum irreversiblen Verlust der Fähigkeit zur Kapselsynthese.

Diese Stämme wurden weiter unterteilt in die Gruppen I bis IV: Gruppe I mit großen Deletionen, die schon während der PCR-Analyse entdeckt wurden (vgl. 2.1.1), Gruppe II mit kleinen Deletionen (ein Basenpaar), Gruppe III mit kleinen Insertionen (1-34 Basenpaare) und Gruppe IV mit Basensubstitutionen, die direkt zu einem StOpocodon führten.

2.1.5 Tab. 1: Irreversible Mutationen der Gruppen 2, 3, und 4

| Gruppe | Gen                     | Mutation                 | Position    | Stamm                      |
|--------|-------------------------|--------------------------|-------------|----------------------------|
| 2      | <i>siaA</i>             | A – Deletion             | 734         | $\alpha$ 525, $\alpha$ 562 |
| 2      | <i>siaA</i>             | C – Deletion             | 706         | $\alpha$ 590               |
| 2      | <i>siaA</i>             | G - Deletion             | 918         | $\alpha$ 767               |
| 2      | <i>siaA</i>             | T – Deletion             | 1061        | $\alpha$ 259               |
| 2      | <i>siaD<sub>B</sub></i> | G – Deletion             | 3546        | $\alpha$ 10                |
| 3      | RBS Reg A               | Verdopplung von 11 Basen | 162 – 173   | $\alpha$ 617, $\alpha$ 618 |
| 3      | <i>siaA</i>             | T – Insertion            | 225         | $\alpha$ 408               |
| 3      | <i>siaA</i>             | T – Insertion            | 237         | $\alpha$ 814               |
| 3      | <i>siaA</i>             | T – Insertion            | 368         | $\alpha$ 657               |
| 3      | <i>siaA</i>             | C – Insertion            | 535         | $\alpha$ 69                |
| 3      | <i>siaA</i>             | T – Insertion            | 588         | $\alpha$ 613               |
| 3      | <i>siaA</i>             | C – Insertion            | 683         | $\alpha$ 61                |
| 3      | <i>siaA</i>             | T – Insertion            | 710         | $\alpha$ 812               |
| 3      | <i>siaA</i>             | A – Insertion            | 851         | $\alpha$ 688               |
| 3      | <i>siaA</i>             | G – Insertion            | 1130        | $\alpha$ 498               |
| 3      | <i>siaA</i>             | C – Insertion            | 1146        | $\alpha$ 329, $\alpha$ 326 |
| 3      | <i>siaA</i>             | T – Insertion            | 1200        | $\alpha$ 819               |
| 3      | <i>siaA</i>             | Verdopplung von 34 Basen | 269 – 313   | $\alpha$ 775               |
| 3      | <i>siaA</i>             | Verdopplung von 5 Basen  | 364 – 368   | $\alpha$ 439, $\alpha$ 462 |
| 3      | <i>siaA</i>             | Verdopplung von 5 Basen  | 538 – 542   | $\alpha$ 82                |
| 3      | <i>siaC</i>             | T – Insertion            | 2451        | $\alpha$ 727               |
| 3      | <i>siaC</i>             | Verdopplung von 22 Basen | 2417 – 2438 | $\alpha$ 145               |
| 3      | <i>siaD<sub>B</sub></i> | Verdopplung von 2 Basen  | 3328 – 3329 | $\alpha$ 91                |
| 3      | <i>siaD<sub>B</sub></i> | Verdopplung von 4 Basen  | 3826 – 3829 | $\alpha$ 221, $\alpha$ 239 |
| 4      | <i>siaA</i>             | Basensubstitution C → T  | 966         | $\alpha$ 543, $\alpha$ 214 |
| 4      | <i>siaC</i>             | Basensubstitution C → T  | 2781        | $\alpha$ 771               |
| 4      | <i>siaD<sub>W</sub></i> | Basensubstitution G → A  | 2748*       | $\alpha$ 231               |

Die Positionen der Mutationen beziehen sich auf die Accession number M95053; RBS: Ribosomen Bindestelle im intergenischen Bereich vor dem Gen *siaA*.

\*: Die Position bezieht sich auf das Gen *siaD* der Serogruppe W mit der Accession number Y13970.



14 Stämme (8%) sind der Gruppe I zuzuordnen (2.1.1 Tabelle 1), sechs Stämme (3,6%) der Gruppe II, 23 Stämme (14%) der Gruppe III und vier Stämme (2,4%) der Gruppe IV (2.1.5 Tabelle 1).

Bei Genen, die bereits durch eine Mutation die Fähigkeit zur Kapselsynthese verloren hatten, sollte anschließend untersucht werden, ob es zu einer Akkumulation von Mutationen gekommen ist. Das wäre ein Hinweis dafür, dass der entsprechende Stamm schon länger in der Population existiert, sonst hätten sich keine Mutationen ansammeln können. Von 26 Stämmen mit irreversiblen Mutationen der Gruppen II, III und IV, wurden die kompletten Sequenzen der „defekten“ Gene auf weitere Mutationen ( $\alpha 61$ ,  $\alpha 69$ ,  $\alpha 82$ ,  $\alpha 145$ ,  $\alpha 214$ ,  $\alpha 231$ ,  $\alpha 259$ ,  $\alpha 326$ ,  $\alpha 329$ ,  $\alpha 439$ ,  $\alpha 462$ ,  $\alpha 498$ ,  $\alpha 525$ ,  $\alpha 543$ ,  $\alpha 562$ ,  $\alpha 590$ ,  $\alpha 613$ ,  $\alpha 617$ ,  $\alpha 618$ ,  $\alpha 657$ ,  $\alpha 688$ ,  $\alpha 727$ ,  $\alpha 767$ ,  $\alpha 771$ ,  $\alpha 812$ ,  $\alpha 819$ ). Bei keinem einzigen dieser Isolate wurde eine zweite Mutation im „defekten“ Gen gefunden und somit auch keine Akkumulation.

### 2.1.6 Nicht-synonyme Mutationen in der Region A

Durch die Sequenzierungen sind in zwei Genen synonyme und nicht-synonyme Basensubstitutionen entdeckt worden. Zum einen im Gen *siaA* an sieben verschiedenen Positionen. Im Gen *siaA* wurden ausschließlich nicht-synonyme Mutationen gefunden. Anhand der Mutationen ergeben sich für diesen Bereich im Gen *siaA* zehn verschiedene Genotypen (2.1.6 Abbildung 1).

2.1.6 Abb. 1: nicht-synonyme Mutationen in *siaA*

|                          | 2        | 3        | 4        | 4        | 5        | 5        | 5        |
|--------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                          | 5        | 2        | 1        | 9        | 0        | 5        | 5        |
|                          | 6        | 0        | 9        | 8        | 1        | 3        | 5        |
| Genotyp 1 (MC58, B1940)  | C        | A        | T        | G        | G        | C        | G        |
| Genotyp 2                | C        | A        | T        | G        | G        | C        | <b>A</b> |
| Genotyp 3                | C        | A        | T        | G        | G        | <b>T</b> | G        |
| Genotyp 4                | C        | A        | T        | <b>A</b> | <b>A</b> | C        | G        |
| Genotyp 5                | C        | A        | T        | <b>A</b> | <b>A</b> | <b>T</b> | G        |
| Genotyp 6                | C        | A        | <b>A</b> | <b>A</b> | G        | <b>T</b> | G        |
| Genotyp 7                | C        | <b>G</b> | T        | G        | G        | C        | G        |
| Genotyp 8                | C        | <b>G</b> | T        | <b>A</b> | G        | C        | G        |
| Genotyp 9                | C        | <b>G</b> | T        | <b>A</b> | G        | <b>T</b> | G        |
| Genotyp 10               | <b>T</b> | <b>G</b> | T        | <b>A</b> | G        | C        | G        |
| AS-Sequenz (Genotyp1)    | P        | Y        | F        | A        | V        | S        | G        |
| AS-Sequenz (Variationen) | L        | C        | L        | T        | I        | F        | S        |

Die Angaben zu den Positionen beziehen sich auf die *Accession number* M95053.

Von 53 untersuchten Stämmen wiesen 26 Sequenzvariationen im *siaA*-Gen auf (2.1.6 Tabelle 1). Um die Relevanz der einzelnen Sequenzvariationen zu bewerten, wurde von insgesamt 18 bekapselten Stämmen ( $\alpha 16$ ,  $\alpha 17$ ,  $\alpha 18$ ,  $\alpha 28$ ,  $\alpha 264$ ,  $\alpha 272$ ,  $\alpha 275$ ,  $\alpha 296$ ,  $\alpha 297$ ,  $\alpha 302$ ,  $\alpha 305$ ,  $\alpha 306$ ,  $\alpha 308$ ,  $\alpha 322$ ,  $\alpha 324$ ,  $\alpha 355$ ,  $\alpha 369$ ,  $\alpha 375$ ) der Serogruppen B, C, W-135 und Y das Gen *siaA* sequenziert. Die erste Sequenzvariation bei Position 256 (alle Positionen bezogen auf M95053) zeigte sich bei einem der bekapselten Stämme ( $\alpha 272$ ). Die zweite Sequenzvariation bei Position 320 zeigte sich bei vier der bekapselten Kontrollstämme ( $\alpha 18$ ,  $\alpha 296$ ,  $\alpha 306$ ,  $\alpha 272$ ). Sequenzvariation 3 an Position 419 wurde nur bei den unbekapselten Isolaten gefunden. Die beiden folgenden Sequenzvariationen 4 und 5 an den Positionen 498 und 501 wurden bei acht, bzw. drei der bekapselten Kontrollstämme gefunden (Position 4:  $\alpha 18$ ,  $\alpha 264$ ,  $\alpha 272$ ,  $\alpha 296$ ,  $\alpha 297$ ,  $\alpha 302$ ,  $\alpha 305$ ,  $\alpha 306$ ; Position 5:  $\alpha 264$ ,  $\alpha 297$ ,  $\alpha 305$ ). Keine der beiden letzten Sequenzvariationen, Positionen 553 und 555, wurden bei bekapselten Stämmen gefunden.

2.1.6 Tab. 1: Untersuchte Stämme mit Sequenzvariationen in *siaA*.

| Anzahl<br>(n) | Art des Genotyps | Ausgetauschte Basen<br>(n) | Stämme   |
|---------------|------------------|----------------------------|--|
| 27            | Genotyp 1        | 0                          | $\alpha 38$ , $\alpha 43$ , $\alpha 52$ , $\alpha 53$ , $\alpha 152$ , $\alpha 164$ , $\alpha 205$ ,<br>$\alpha 207$ , $\alpha 214$ , $\alpha 231$ , $\alpha 255$ , $\alpha 343$ , $\alpha 356$ ,<br>$\alpha 441$ , $\alpha 443$ , $\alpha 491$ , $\alpha 517$ , $\alpha 560$ , $\alpha 573$ ,<br>$\alpha 584$ , $\alpha 622$ , $\alpha 639$ , $\alpha 652$ , $\alpha 715$ , $\alpha 806$ ,<br>$\alpha 818$ , $\alpha 827$ |
| 1             | Genotyp 2        | 1                          | $\alpha 666$   |
| 1             | Genotyp 3        | 1                          | $\alpha 405$   |
| 8             | Genotyp 4        | 2                          | $\alpha 126$ , $\alpha 475$ , $\alpha 543$ , $\alpha 579$ , $\alpha 617$ , $\alpha 618$ ,<br>$\alpha 698$ , $\alpha 737$   |
| 1             | Genotyp 5        | 3                          | $\alpha 766$   |
| 2             | Genotyp 6        | 2                          | $\alpha 281$ , $\alpha 637$  |
| 1             | Genotyp 7        | 1                          | $\alpha 311$   |
| 7             | Genotyp 8        | 2                          | $\alpha 87$ , $\alpha 100$ , $\alpha 128$ , $\alpha 269$ , $\alpha 291$ , $\alpha 593$ , $\alpha 771$ ,  |
| 1             | Genotyp 9        | 3                          | $\alpha 796$   |
| 4             | Genotyp 10       | 3                          | $\alpha 262$ , $\alpha 640$ , $\alpha 720$ , $\alpha 819$  |

Die letzten beiden Polymorphismen liegen in einer konservierten Region des Gens *siaA*, die für die richtige Funktion des Genproduktes, die UDP-N-Acetylglukosamin 2-Epimerase, wichtig ist. Untersuchungen von Murkin *et al.* haben ergeben, dass Veränderungen von Aminosäuren, die benachbart zu den uns beobachteten

Sequenzvarianten lokalisiert sind, zum Verlust oder starker Reduktion der Enzymaktivität und damit zum Verlust der Fähigkeit zur Kapselsynthese führen (Murkin *et al.*, 2004) (2.1.6 Tabelle 2).

Dieser Mechanismus würde die Genotypen 2, 3, 5, 6 und 9 erklären. Diese Genotypen umfassen insgesamt 6 Stämme (2.1.6 Tabelle 2), von denen für fünf Stämme noch kein Mechanismus für den Kapselverlust entdeckt worden ist.

**2.1.6 Tabelle 2:** Vergleich eines Teils der Aminosäuresequenz der UDP-N-Acetylglukosamin-2-Epimerase mit der Darstellung von zwei der nicht-synonymen Mutationen, die ausschließlich bei nicht bekapselten Isolaten gefunden wurden.

| UDP-N-Acetylglukosamin 2-Epimerase <sup>a</sup>          | Position <sup>b</sup> , Sequenz                       |   |   |    |   |
|--|---|---|---|----|---|
|  |   | c | c | dd | c |
|  |   | 1 | 1 | 11 | 1 |
|  |   | 0 | 2 | 22 | 3 |
|  |   | 0 | 2 | 78 | 1 |
| AAA20475.1; <i>Neisseria meningitidis</i>                | DMVMIHGDRLEALAGAIVGALSSRLVCHIEGG-ELSGTVDDSIKLS        |   |   |    |   |
| AAV81363.1; <i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR            | DVIVVHGDRVEAMAGAIIVGSLNNILVAHIEGG-EVSGTIDELIRHSISKMA  |   |   |    |   |
| ABB40049.1; <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20       | DMIIVVHGDRVEALAGSIVGSLRNILVAHVEGG-ELSGTIDELIRHAVSKMA  |   |   |    |   |
| ZP_01058927.1; <i>Flavobacterium</i> sp. MED217          | DLIIVVHGDRVEALAGAIVGSLNNILVGHIEGG-ELSGTVDELIRHSVSKLS  |   |   |    |   |
| ZP_00236341.1; <i>Bacillus cereus</i> G9241              | DMIVIHGDRLESLAGAIIVGAFNNIKVAHIEGG-EKSGTIDESIRHAITKFS  |   |   |    |   |
| AAK73185.1; <i>Campylobacter jejuni</i>                  | DLIVVHGDRVEPLAAAIVGSLNNILVAHIEGG-ELSGTIDESLRHAISKLA   |   |   |    |   |
| ZP_01003958.1; <i>Loktanella vestfoldensis</i> SKA53     | DLVVIHGDRVEALATALVCATNYIRCAHVEGG-EVSGTIDEIYRHCNSKLA   |   |   |    |   |
| ZP_00562103.1; <i>Methanococcoides burtonii</i> DSM 6242 | DILVLVLDGRGEMLATTIAGIYMNI PVAHLHGG-EVSGTVDESIRHAITKLS |   |   |    |   |
| YP_485156.1; <i>Rhodopseudomonas palustris</i> HaA2      | DVVLTVGDRFETMATTLAAAYMNI PVAHTMGG-EVSGTIDESIRHAVTKFA  |   |   |    |   |
| EAN08847.1; <i>Enterococcus faecium</i> DO               | DFVLLLDGRGEMLAAAIACLYLGIKTAHIEGG-EVSGTVDESIRHAITKIA   |   |   |    |   |
| ZP_00875905.1; <i>Streptococcus suis</i> 89/1591         | DLVLILGDRYEMLPVANAALLYNIPICHIEGGKTMGNFDESIRHAITKMS    |   |   |    |   |
| ZP_01139790.1; <i>Geobacter uraniumreducens</i> Rf4      | EIIIVLLGDRFEMLAAAQAALVGRIPVAHIAGGDTTEGAFDEAIRHSITKMS  |   |   |    |   |
| AAS59259.1; <i>Homo sapiens</i>                          | DIMIVVHGDRFDALALATSAAALMNRILHIEGG-EVSGTIDDSIRHAITKLA  |   |   |    |   |
| CAB36908.1; <i>Mus musculus</i>                          | DIMIVVHGDRFDALALATSAAALMNRILHIEGG-EVSGTIDDSIRHAITKLA  |   |   |    |   |
| NP_001026603.1; <i>Gallus gallus</i>                     | DIMIVVHGDRFDALALATSAAALMNRILHIEGG-EVSGTIDDSIRHAITKLA  |   |   |    |   |
| Clustal W consensus                                      | ::: ** : : : * ** * .*: **: :*::                      |   |   |    |   |

<sup>a</sup>: Bei den Säugetierproteinen handelt sich um UDP-N-Acetylglukosamin 2-Epimerasen / N-Acetylmannosamin Kinasen.

<sup>b</sup>: Die Angaben der Positionen beziehen sich auf die Aminosäuresequenz des SiaA von *Neisseria meningitidis*.

<sup>c</sup>: Die Mutationen D100N, E122Q und D131N sind essentiell für die Funktion des Proteins SiaA (Murkin *et al.*, 2004).

<sup>d</sup>: Nicht-synonyme Mutationen S127F und G128S, die nur bei unbekapselten Isolaten der Bayerischen Meningokokkensträgerstudie gefunden wurden (Positionen 553 und 555 bezogen auf die Genomsequenz M95053).

Im Gen *siaD* der Serogruppe Y wurden an elf verschiedenen Positionen Basensubstitutionen durch die Sequenzierungen entdeckt. Bei den Sequenzvariationen im Gen *siaD<sub>Y</sub>* handelt es sich sowohl um synonyme, wie auch um nicht-synonyme Mutationen. Gefunden wurden diese Sequenzvariationen bei fünf Stämmen ( $\alpha$ 534,  $\alpha$ 573,  $\alpha$ 652,  $\alpha$ 666,  $\alpha$ 720). Diese haben sich in zwei verschiedenen Genotypen präsentiert (2.1.6 Abbildung 2).

Um den Einfluss dieser Mutationen bewerten zu können, wurde das *siaD<sub>Y</sub>*-Gen von 19 kapselexprimierenden Stämmen der Serogruppe Y sequenziert. Die folgenden Stämme wurden dazu verwendet:  $\alpha$ 177,  $\alpha$ 178,  $\alpha$ 186,  $\alpha$ 188,  $\alpha$ 195,  $\alpha$ 213,  $\alpha$ 237,  $\alpha$ 240,  $\alpha$ 246,  $\alpha$ 254,  $\alpha$ 267,  $\alpha$ 272,  $\alpha$ 276,  $\alpha$ 300,  $\alpha$ 322,  $\alpha$ 335,  $\alpha$ 369,  $\alpha$ 375. Bei 17 der sequenzierten

Stämmen wurde der Genotyp 2 gefunden und bei zwei der Genotyp 1. Damit sind diese Sequenzvariationen im *siaD*-Gen kein Ausschlusskriterium für die Kapselproduktion.

2.1.6 Abb. 2: Mutationen in *siaD<sub>v</sub>*

|                       |           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------------------|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                       |           | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 |
|                       |           | 4 | 3 | 5 | 7 | 8 | 3 | 9 | 9 | 1 | 3 | 9 |
|                       |           | 9 | 9 | 5 | 6 | 2 | 2 | 4 | 9 | 4 | 8 | 5 |
| Genotyp 1             | (Wildtyp) | A | C | T | T | T | C | G | C | A | T | C |
| Genotyp 2             |           | C | T | C | C | C | A | A | T | G | C | T |
| Synonyme Mutation     |           | - | - | + | + | + | - | - | + | + | + | + |
| AS-Sequenz (Genotyp1) |           | Y | T | - | - | - | A | D | - | - | - | - |
| AS-Sequenz (Genotyp2) |           | S | I | - | - | - | E | N | - | - | - | - |

Die Angaben zu den Positionen beziehen sich auf die Accession number Y13969.

### 2.1.7 Zusammenhang zwischen Mechanismen für den Kapselverlust und klonalen Linien

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen bestimmten Mechanismen zum Verlust der Fähigkeit zur Kapselproduktion und klonalen Komplexen aufzudecken, wurden klonale Komplexe, die durch mehr als sechs Stämme repräsentiert werden, auf eine Häufung eines bestimmten Mechanismus untersucht. Untersucht wurden die Mechanismen der IS-Insertionen, Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen und irreversible Mutationen (2.1.8 Tabelle 1). Für keinen der einzelnen klonalen Komplexe ergibt sich eine signifikante Häufung von bestimmten Mechanismen zum Verlust der Fähigkeit zur Kapselproduktion.

2.1.7 Tab. 1: Untersuchung von klonalen Komplexen (&gt;6 Stämmen) auf Häufung von Mechanismen zum Kapselverlust.

| Klonaler Komplex | Anzahl Stämme (n) | Serogentyp | IS – Elemente (n) | Homopolymere Sequenzen (n) | Irreversible Mutationen (n) | Unklarer Mechanismus (n) |
|------------------|-------------------|------------|-------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 22               | 8                 | W-135      | 3                 | 1                          | 3                           | 1                        |
| 23               | 20                | Y          | 8                 | 2                          | 5                           | 5                        |
| 32               | 9                 | B          | 2                 | 6                          | 1                           | -                        |
| 35               | 7                 | B          | -                 | 4                          | 3                           | -                        |
| 35               | 9                 | C          | 2                 | 1                          | -                           | 6                        |
| 44               | 20                | B          | 4                 | 7                          | 2                           | 7                        |
| 44               | 8                 | C          | -                 | -                          | 3                           | 5                        |
| 162              | 8                 | B          | -                 | 5                          | 3                           | -                        |
| 167              | 7                 | Y          | 3                 | -                          | 3                           | 2                        |
| 939              | 12                | C          | 2                 | 2                          | 8                           | -                        |
| 949              | 7                 | Y          | 2                 | 1                          | 4                           | -                        |

### 2.1.8 Zusammenfassung

Für 131 Stämme (79%) der 166 untersuchten Stämme der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie wurde eine Ursache für den Verlust der Kapselexpression gefunden: Bei 46 Stämmen (27,7%) fand sich ein Insertionselement im Kapselsynthese-Gencluster und bei 39 Stämmen (23,5%) war die Kapselsynthese auf Grund von Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen abgeschaltet. Damit war bei über der Hälfte der untersuchten Isolate die Kapselsynthese reversibel deaktiviert. Bei 47 Isolaten (28,3%) war die Kapselsynthese durch große Deletionen in den Regionen C und A und durch Mutationen wie Deletionen, Insertionen und Basensubstitutionen in der Region A irreversibel deaktiviert. Für 35 Isolate (21,1%) konnten mit Hilfe der durchgeführten Untersuchungen keine Ursachen für den Verlust der Kapselexpression gefunden werden (2.1.8 Tabelle 1).

**2.1.8 Tab. 1:** Zusammenfassung der genetischen Mechanismen, die zum Verlust der Kapselexpression führen.

| Mechanismus                                     |                                      | Anzahl<br>(n)   | Prozent <sup>a</sup> |
|---|--------------------------------------|-----------------|----------------------|
| IS - Elemente                                   | <i>IS1301</i>                        | 41 <sup>b</sup> | 24,7                 |
|   | <i>IS1016</i>                        | 4               | 2,4                  |
|   | <i>IS1106</i>                        | 1               | 0,6                  |
| Längenvariationen in<br>homopolymeren Sequenzen |                                      | 39              | 23,5                 |
| Irreversible Mutationen                         | Große Deletionen                     | 14 <sup>b</sup> | 8,4                  |
|   | Kleine Deletionen (1bp) <sup>c</sup> | 6               | 3,6                  |
|   | Insertionen (1-34bp) <sup>c</sup>    | 23              | 13,9                 |
|   | Basensubstitutionen <sup>c</sup>     | 4               | 2,4                  |
| Unbekannter Mechanismus                         |                                      | 35              | 21,1                 |

<sup>a</sup>: Prozentualer Anteil an den 166 Stämmen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

<sup>b</sup>: Eine der Insertion eines IS-Elementes ist mit einer großen Deletion assoziiert.

<sup>c</sup>: Diese Mutationen führten alle zu verfrühten Abbrüchen der Transskription und damit zu fehlenden oder fehlerhaften Proteinen.

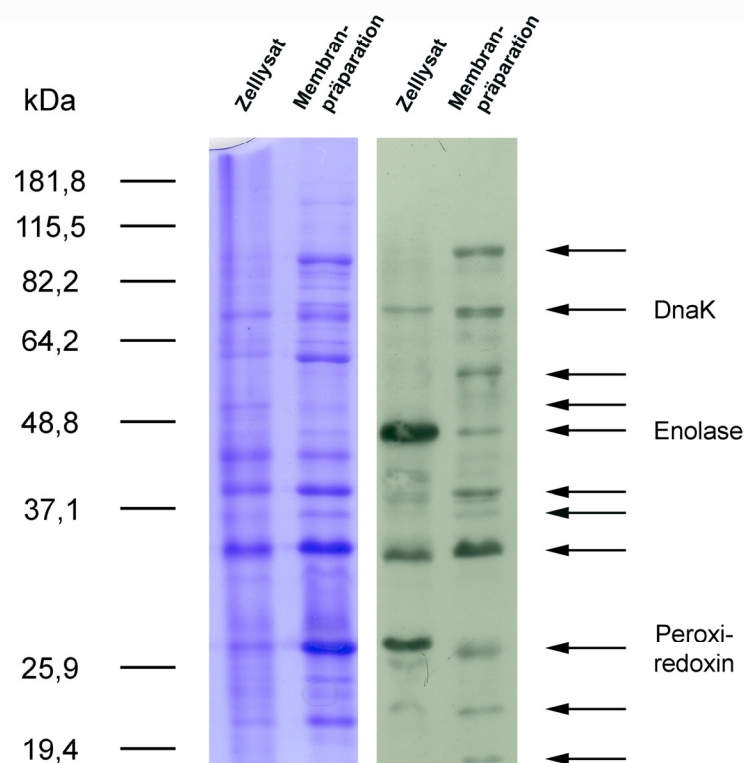
## 2.2 Teil II – Interaktionen von *Neisseria meningitidis* mit Komponenten des Fibrinolyse-Systems

### 2.2.1 Bindung von Plasminogen und Plasmin durch Meningokokken

#### 2.2.1.1 Identifizierung möglicher Plasminogen Rezeptoren von *Neisseria meningitidis*

Die Etablierung eines Plasminogen-Overlay Assays diente der Identifizierung bakterieller Plasminogen-Rezeptoren. Hierzu wurden Zelllysate und Außenmembranaufreinigungen von Meningokokken in einer SDS-PAGE aufgetrennt und dann auf eine Nylonmembran transferiert. Nach der Inkubation der Membranen mit Plasminogen erfolgte der Nachweis des gebundenen Proteins mit spezifischen Antikörpern gegen Plasminogen.

2.2.1.1 Abb. 1: Identifizierung möglicher Plasminogen-Rezeptoren von Meningokokken



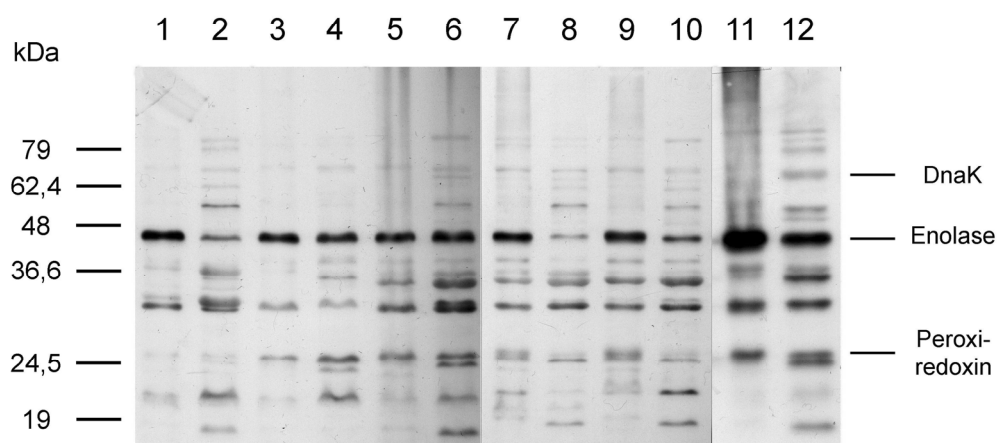
Die linken zwei Spuren zeigen ein Coomassie-Gel von Komplett-Zelllysat und von einer Membranpräparation vom Stamm MC58. Die rechten zwei Spuren zeigen einen Plasminogen-Overlay Assay vom Zelllysat und der Membranaufreinigung vom Stamm MC58. Die Pfeile zeigen die Proteinbanden, die zur Proteinidentifizierung weggegeben worden sind. Die Proteinennamen neben den Pfeilen benennen die identifizierten Proteine an den dazugehörigen Proteinbanden.

Von Interesse waren insbesondere Proteine, die eine hohe Affinität für Plasminogen besaßen. Demnach stand die Identifikation von Proteine aus elf Banden an (vgl. 2.2.1.1 Abbildung 1). Dazu wurden die Banden zunächst aus Coomassie-Gelen und teilweise aus den Blots ausgeschnitten und anschließend durch N-terminale Proteinsequenzierung und Massenspektrometrie analysiert.

Von den elf untersuchten Proben konnte bei drei Proben eine eindeutige Zuordnung getroffen werden: die Proteine DnaK (NMB0554), Enolase (NMB1285) und Peroxiredoxin (NMB0946). Enolase ist bereits bei anderen humanpathogenen Erregern als Plasminogen-Rezeptor bekannt (Bergmann *et al.*, 2001; Lahteenmaki *et al.*, 2001). Auch das Chaperon DnaK wurde bereits als Oberflächen-assoziiertes Plasminogen-Rezeptor bei *Listeria monocytogenes* beschrieben (Schaumburg *et al.*, 2004). Das Protein Peroxiredoxin dagegen ist im Zusammenhang mit der Bindung von Plasminogen bisher noch nicht bekannt.

Um zu überprüfen, ob die identifizierten Rezeptorproteine stammspezifisch sind oder bei Meningokokken generell vorhanden sind, wurden Zelllysate und Membranaufreinigungen von Vertretern der pathogenen Serogruppen A, B, C, W-135 und Y und einem kapsellosen Trägerisolat in einem Plasminogen-Overlay Assay untersucht (2.2.1.1 Abbildung 2). Die einzelnen Bakterien zeigen ein hochkonserviertes Bandenmuster für die Plasminogenbindung.

2.2.1.1 Abb. 2: Vergleich der Plasminogen-Overlay Assays von verschiedenen Meningokokkenstämmen

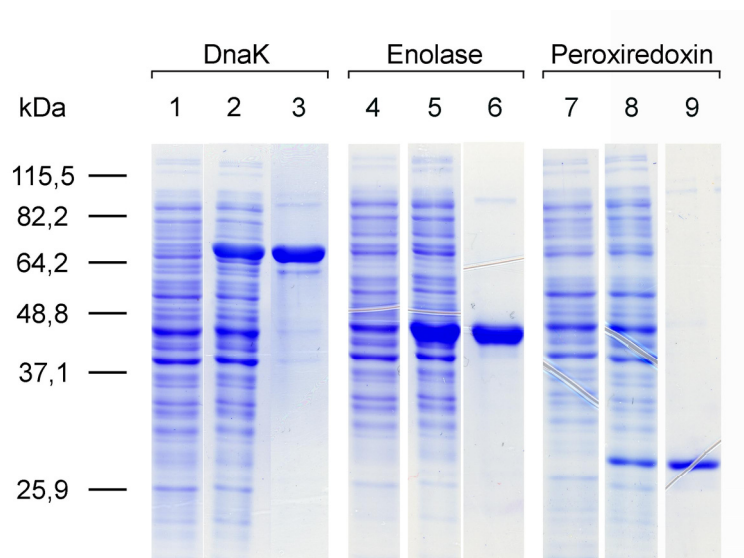


Gerade Spuren stellen Komplett-Zelllysate und ungerade Spuren stellen Membran-Aufreinigungen verschiedener Meningokokkenstämmen dar. Spuren 1+2: Z2491 (Serogruppe A); Spuren 3+4: MC58 (Serogruppe B); Spuren 5+6: #2120 (Serogruppe C); Spuren 7+8: #171 (Serogruppe W – 135); Spuren 9+10: #172 (Serogruppe Y); Spuren 11+12:  $\alpha$ -14 (unkapselt).

### 2.2.1.2 Herstellung von rekombinanten Rezeptormolekülen und spezifischen Antikörpern gegen diese Proteine

Die für DnaK, Enolase und Peroxiredoxin kodierenden Gene wurden in His-Tag Expressionsvektoren pQE32 (DnaK, Peroxiredoxin) und pQE60 (Enolase) kloniert und in einem Expressionsstamm (*E. coli* M15 pRep4) exprimiert. Nach der Induktion wurden die rekombinanten Rezeptorproteine aufgereinigt (2.2.1.2 Abbildung 1).

2.2.1.2 Abb. 1: Protein-Induktion von den rekombinanten Proteinen DnaK, Enolase und Peroxiredoxin.



Die Spuren 1, 4 und 7 entsprechen Komplett-Zelllysate der jeweiligen Expressionsstämme (*E. coli* M15 pRep4) vor der Induktion. Die Spuren 2, 5 und 8 entsprechen Komplett-Zelllysate der jeweiligen Expressionsstämme (*E. coli* M15 pRep4) 5 h nach der Induktion. Die Spuren 3, 6 und 9 entsprechen den aufgereinigten rekombinanten Proteinen.

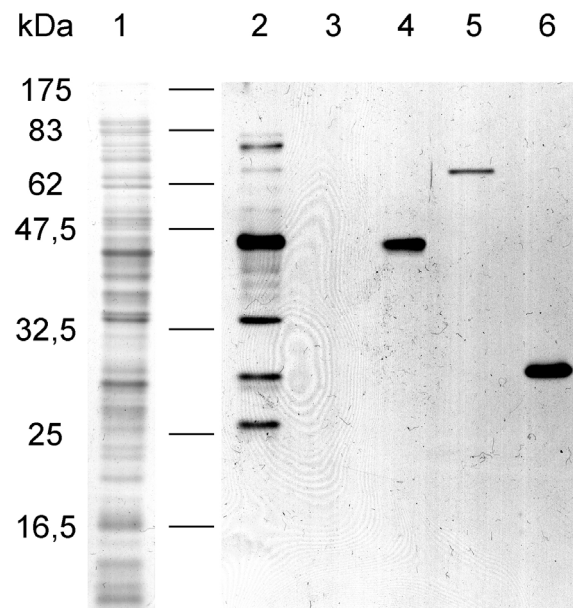
Die rekombinanten Proteine entsprachen in ihrer molekularen Größe den aus der DNA-Sequenz abgeleiteten hypothetischen Meningokokkenproteinen DnaK, Enolase und Peroxiredoxin.

Für die weitere Analyse der Rezeptoren wurden Antiseren gegen die rekombinanten Proteine hergestellt. Dafür immunisierte man Kaninchen mit je 1mg der rekombinanten Proteine und verabreichte man nach vier Wochen den Kaninchen erneut je 1mg Antigen um die Immunantwort zu verstärken. Nach weiteren vier Wochen wurden dann die Seren aus den Kaninchen gewonnen.

Die gewonnenen Antiseren detektierten die rekombinanten Proteine. Des Weiteren detektierten die Antiseren aus Zelllysaten und Außenmembran-aufreinigungen von Meningokokken spezifisch einzelne Proteine im Western Blot, welche in ihrer Größe den identifizierten Plasminogen-Rezeptoren entsprachen (2.2.1.2 Abbildung 2).



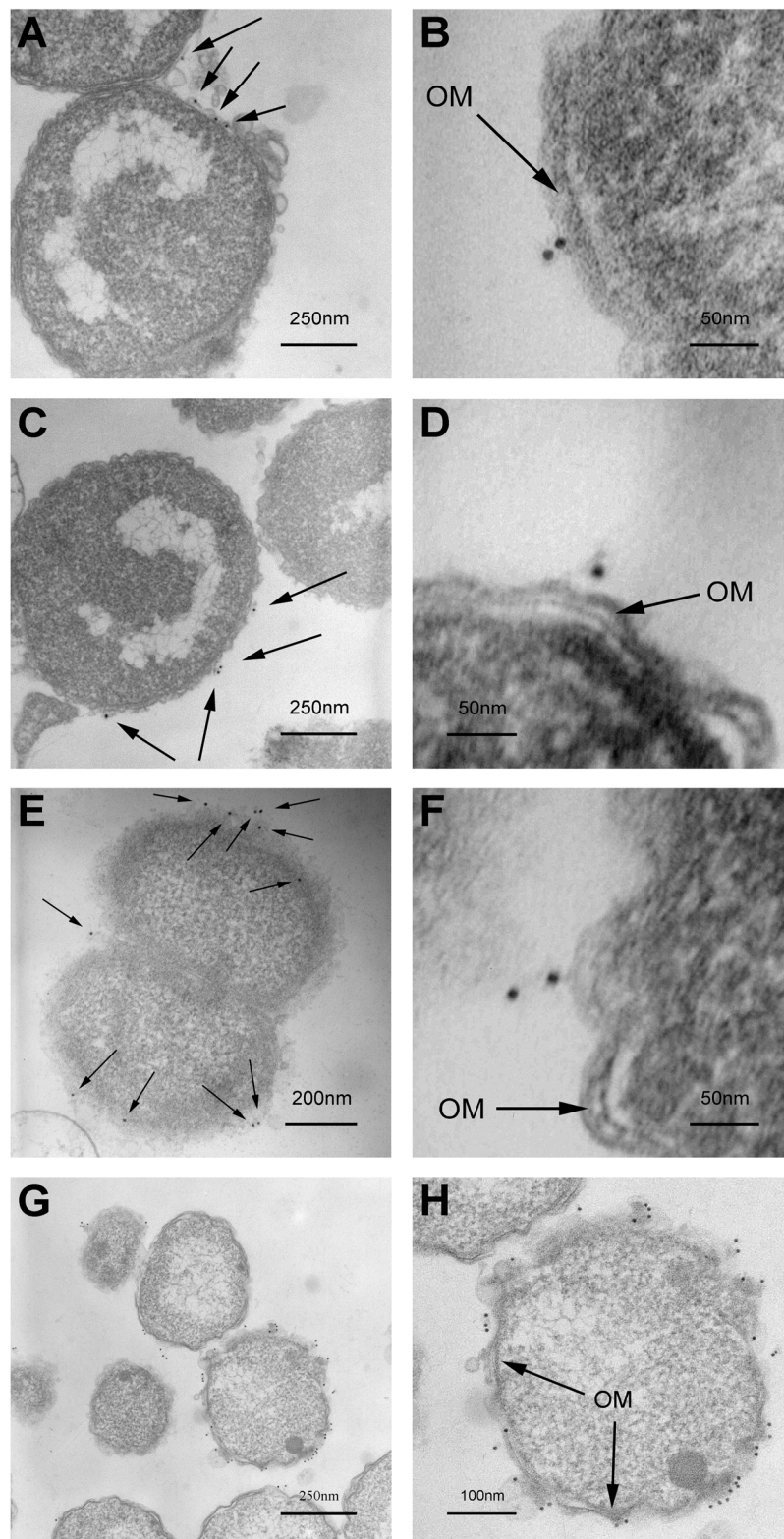
2.2.1.2. **Abb. 2:** Die Antiseren erkennen die Plasminogen-Bindeproteine Enolase, DnaK und Peroxiredoxin.



Spur 1: Silberfärbung von Komplet – Zellysate vom Stamm MC58; Spur 2: ein repräsentativer Plasminogen – Overlay Assay von Komplet – Zellysate vom Stamm MC58; Spur 3: Plasminogen – Overlay Assay ohne Plasminogen von Komplet – Zellysate vom Stamm MC58; Spuren 4 – 6: Western Blots von rekombinanten Proteinen mit den jeweiligen Antiseren: Spur 4: rekombinantes Protein Enolase; Spur 5: rekombinantes Protein DnaK; Spur 6: rekombinantes Protein Peroxiredoxin.

### 2.2.1.3 Extrazelluläre Lokalisation und Quantifizierung der Plasminogen-Rezeptoren

Um zu einer Plasminogenrekrutierung an der bakteriellen Oberfläche beitragen zu können, müssen die Plasminogen-Rezeptoren von außen zugänglich sein. Daher wurde die extrazelluläre Lokalisation der Plasminogen-Rezeptoren von Meningokokken mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Zu diesem Zweck wurden der Stamm MC58 und die unbekapselte Mutante MC58 $\Delta$ siaD mit den Antiseren gegen Enolase, DnaK, Peroxiredoxin und Gold-markierten Sekundärantikörpern inkubiert (2.2.1.3 Abbildung 1). Durch die Fixiermethode mit Formaldehyd wurde ausgeschlossen, dass für die Antikörper intrazelluläre Epitope zugänglich waren. Dementsprechend war in der Transmissions-elektronenmikroskopie keine intrazelluläre Markierung von Epitopen zu beobachten. Die Darstellung der äußeren Membran wurde durch osmotische Quellung des periplasmatischen Spaltes vor der Fixierung erleichtert. Zur Kontrolle wurden mit Plasminogen inkubierte Meningokokken mit einem anti-Plasminogen Antikörper und einem Gold-markierten Sekundärantikörper für die Elektronenmikroskopie präpariert (2.2.1.3 Abbildung 1, Bilder G+H).

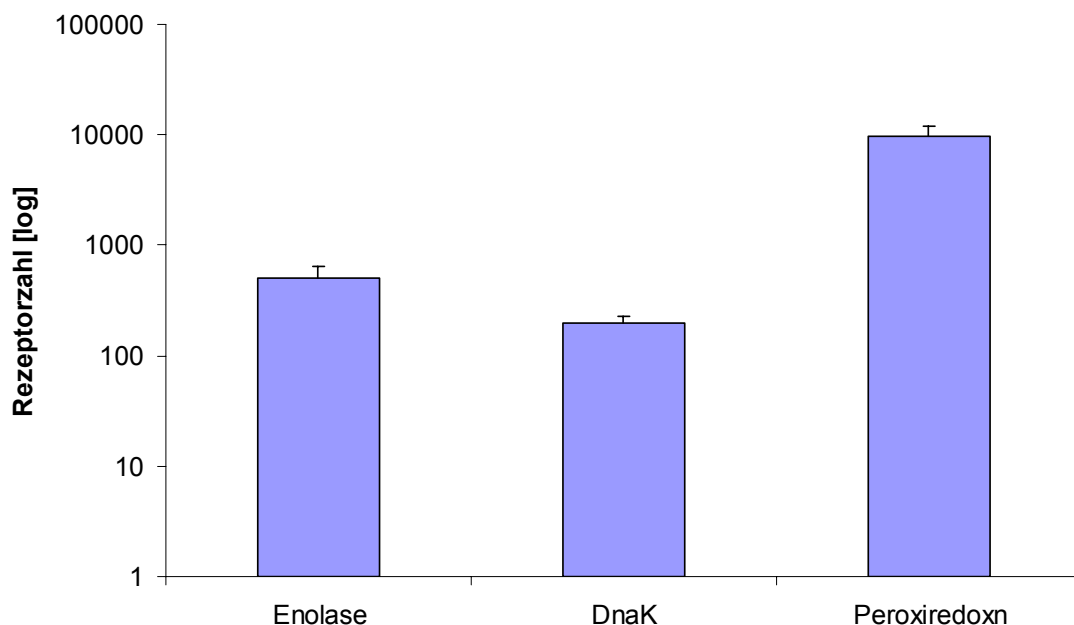
2.2.1.3 **Abb. 1:** Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der Plasminogen-Rezeptoren von Meningokokken.

TEM – Aufnahmen vom Meningokokkenstamm #3240 (MC58  $\Delta$ siaD) mit verschiedenen Antikörpern. Die Detektion geschah immer mit einem Gold-gekoppelten 2. Antikörper. Bilder A+B: Enolase-Antiserum; Bilder C+D: DnaK-Antiserum; Bilder E+F: Peroxiredoxin-Antiserum; Bilder G+H: Bakterien die primär mit Plasminogen inkubiert wurden und bei denen dann das gebundene Plasminogen mit einem spezifischen Primäntikörper detektiert wurde; OM: Die Pfeile in der rechten Reihe zeigen Stellen an denen die äußere Membran (OM) über dem periplasmatischen Spalt zu erkennen ist.

Die Rezeptormoleküle DnaK, Enolase und Peroxiredoxin waren auf der Bakterienoberfläche detektierbar. Bei der Markierung von oberflächenassoziiertem Plasminogen zeigten sich mehr Bindungsstellen als bei DnaK, Enolase und Peroxiredoxin zusammen. Eine Quantifizierung ist mit der Methode der Transmissionselektronenmikroskopie jedoch nicht möglich. Da jedoch auch mit den initialen Plasminogen-Overlay Assays mehr als die identifizierten Rezeptoren detektiert wurden, ist es wahrscheinlich, dass mehr als drei Proteine zur Plasminogenrekrutierung von *Neisseria meningitidis* beitragen. Bei Kontrollansätzen ohne Primärantikörper wurden keine gebundenen Sekundärantikörper entdeckt.

Zur Quantifizierung der an die Außenmembran der Meningokokken assoziierten Rezeptormoleküle wurde ein ELISA durchgeführt. Zusammen mit einer Verdünnungsreihe des jeweiligen rekombinanten Proteins wurde eine definierte Anzahl Bakterien (pro Ansatz  $1 \times 10^7$ ) mit den Antisera inkubiert (2.2.1.3 Abbildung 2).

2.2.1.3 Abb. 2: ELISA zur Bestimmung der Rezeptorzahl auf Meningokokken

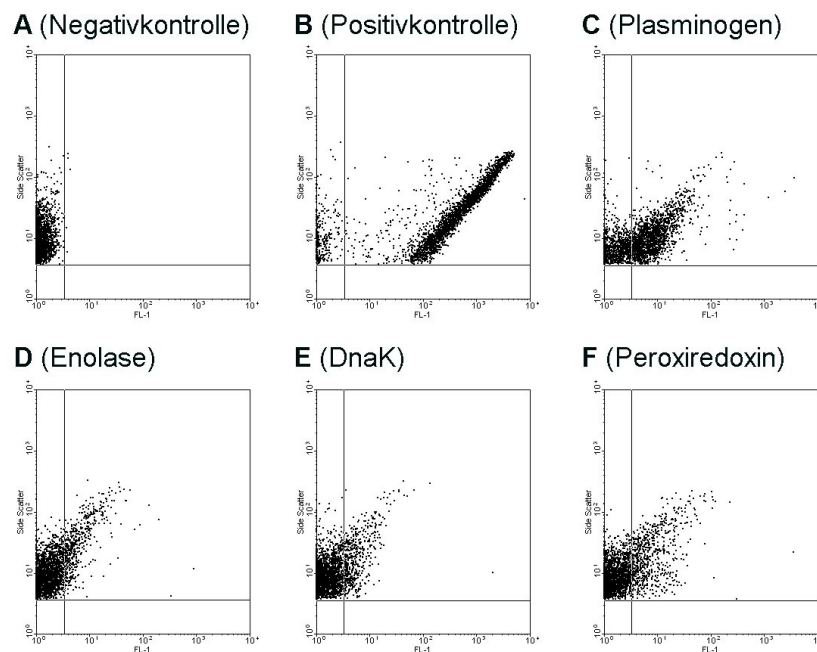


Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen ELISA-Experimenten mit dem kapsellosen Stamm MC58 AsiaD. Enolase ( $502 \pm 139$ ); DnaK ( $199 \pm 31$ ); Peroxiredoxin ( $9560 \pm 2322$ ).

Zusammengenommen ergab sich eine Zahl von etwa 10.000 Rezeptormolekülen pro Bakterienzelle. Ullberg *et al.* (1992) berechnete basierend auf Scatchard Analysen 13.000 – 26.000 Rezeptormoleküle pro Bakterienzelle für *Neisseria meningitidis*. Die offene Differenz lässt sich mit den restlichen, nicht identifizierten Rezeptoren erklären.

Zur Bestätigung der Daten aus der Transmissions Elektronenmikroskopie und dem ELISA wurden Versuche mit der Durchfluss-Zytometrie (FACS) durchgeführt (2.2.1.3 Abbildung 3). Zu diesem Zweck wurden die IgG-Fractionen der Antiseren gegen die Meningokokkenproteine Enolase, DnaK und Peroxiredoxin aufgereinigt. Als Postivkontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das auf Meningokokken in großer Menge exprimierte Protein Opc verwendet worden und als Negativkontrolle dienten Ansätze, bei denen die Bakterien nur mit sekundären Antikörper inkubiert worden waren.

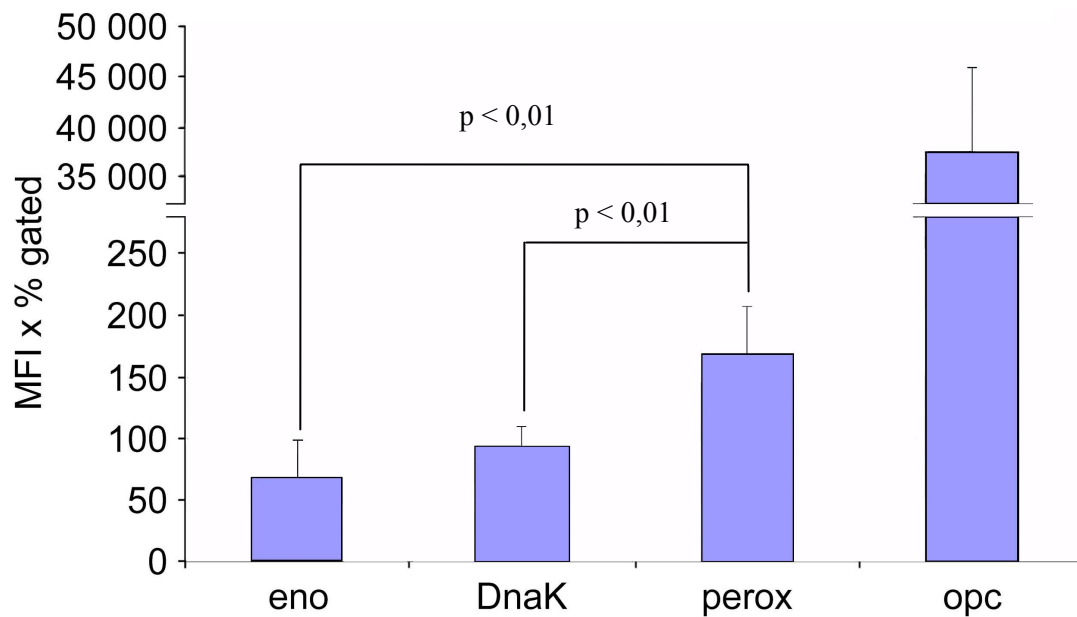
2.2.1.3: **Abbildung 3:** FACS – Diagramme zum Nachweis von Plasminogen-Rezeptoren.



Dargestellt sind die Diagramme eines repräsentativen FACScan Versuchs. Die Versuche wurden mit dem unbekapselten Meningokokkenstamm MC58 $\Delta$ asiaD durchgeführt. Bei der FACScan Analyse wurden 5000 Events gezählt und dargestellt. A: Leerwertkontrolle, Bakterien ohne Primärantikörper; B: Positivkontrolle, Nachweis des in hoher Anzahl vorkommenden Oberflächenproteins Opc; C: Plasminogen; D: Enolase; E: DnaK; F: Peroxiredoxin.

Die Ergebnisse der FACScan-Analyse bestätigten die Daten aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Die drei Plasminogen-Rezeptoren Enolase, DnaK und Peroxiredoxin sind an der äußeren Membran lokalisiert, wenn auch nur in geringer Menge (2.2.1.3 Abbildung 4). Kontrollen mit den Präimmunsereen zeigten deutlich geringere Signale und sind bei den Daten von Abbildung 4 als „Nullwerte“ von den erhaltenen Werten abgezogen worden.

2.2.1.3 Abb. 4: Auswertung der FACScan Daten zu den Plasminogen – Rezeptoren von Meningokokken.



Aufgetragen sind Mittelwerte der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) mal der Prozentsatz der gewerteten (gated) Bakterien von drei unabhängigen Experimenten mit dem unbekapselten Meningokokkenstamm MC58 *AsiaD*. Bei der FACScan Analyse wurden 5000 Events gezählt und anschließend ausgewertet. eno: Enolase; perox: Peroxiredoxin; opc: Opc.

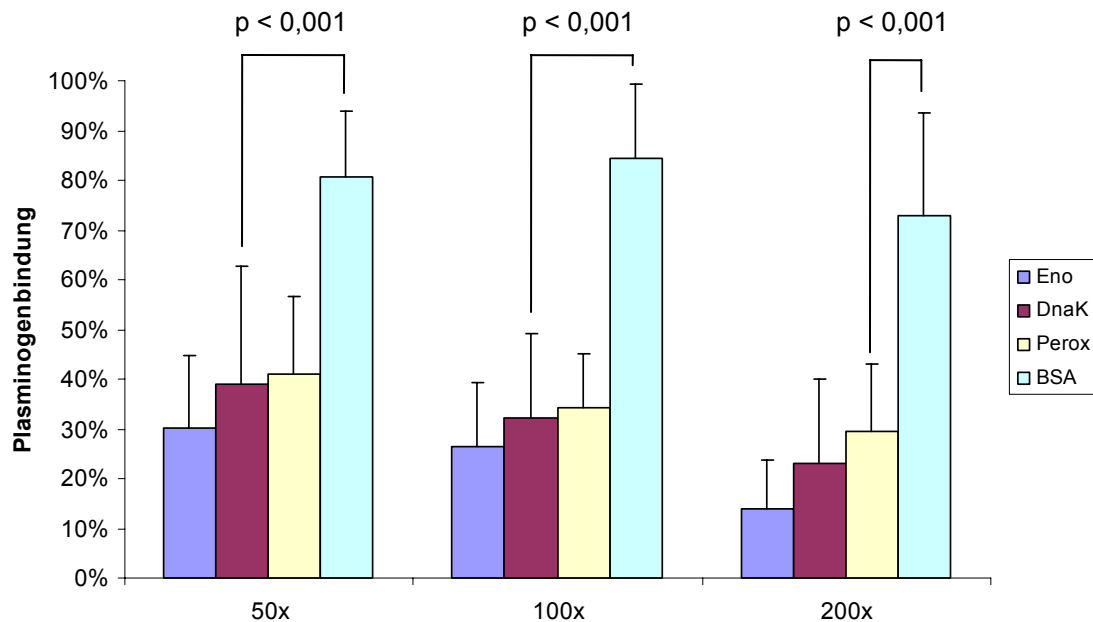
#### 2.2.1.4 Kompetitive Inhibierung der Plasminogenbindung durch rekombinante Rezeptor-Proteine

Um die Spezifität der Plasminogenbindung der Rezeptormoleküle Enolase, DnaK und Peroxiredoxin zu testen, wurden Plasminogen-Bindeversuche in Gegenwart von unterschiedlichen molaren Konzentrationen der rekombinanten Proteine durchgeführt (2.2.1.4 Abbildung 1).

Jeder einzelne der drei löslichen, rekombinanten Rezeptoren Enolase, DnaK und Peroxiredoxin konnte die Plasminogenbindung an Meningokokken effektiv inhibieren. Bei einem 50-fachen molaren Überschuss der rekombinanten Enolase betrug die Bindung des Plasminogens  $30,18 \pm 14,4\%$  der Kontrolle, beim 100-fachen Überschuss  $26,38 \pm 12,8$  und beim 200-fachen Überschuss  $13,77 \pm 10,0\%$ . Bei einem 50-fachen molaren Überschuss des rekombinanten DnaK betrug die Bindung  $38,92 \pm 23,7\%$ , beim 100-fachen Überschuss  $32,07 \pm 17,1\%$  und beim 200-fachen Überschuss  $23,08 \pm 17,1\%$ . Bei einem 50-fachen molaren Überschuss des rekombinanten Peroxiredoxin betrug die Bindung  $41,08 \pm 15,6\%$ , beim 100-fachen Überschuss  $34,31 \pm 10,9$  und beim 200-fachen Überschuss  $29,41 \pm 13,5\%$ . Als Kontrolle für den inhibitorischen Effekt wurde Rinderserumalbumin (BSA) mitgeführt. BSA, ein Protein, das eine breite aber unspezifische Bindekapazität besitzt, bewirkte bei äquivalenten molaren Mengen wie

die Plasminogen-Rezeptoren keinen oder kaum inhibitorischen Effekt. Damit konnte gezeigt werden, dass die putativen Plasminogen- Rezeptoren spezifisch an Plasminogen binden.

2.2.1.4 Abb. 1: Plasminogen- Bindeversuche zur kompetitiven Inhibierung der rekombinanten Plasminogen- Rezeptoren .



Dargestellt sind die Mittelwerte aus sieben unabhängig von einander durchgeführten ELISA- Experimenten mit dem kapsellosen Meningokokkenstamm MC58AsiaD. Die gebundene Plasminogenmenge ohne Zusatz anderer Proteine wurde gleich 100% gesetzt. Die rekombinanten Proteine und das Kontrollprotein BSA wurden in 50-fachem (50x), 100-fachem (100x) und 200-fachem (200x) molaren Überschuss im Verhältnis zum Plasminogen dazugegeben. Eno: Enolase; Perox: Peroxiredoxin.

### 2.2.1.5 Deletions-Mutanten für die Plasminogen-Rezeptor Moleküle

Um den Beitrag der einzelnen Rezeptormoleküle zur Bindung von Plasminogen durch *N. meningitidis* definitiv bewerten zu können, wurde versucht, Deletions-Mutanten für die einzelnen Rezeptor-Proteine herzustellen.

Für die beiden Rezeptoren Enolase und DnaK ist es nicht gelungen solche Mutanten herzustellen, was darauf zurückgeführt werden kann, dass es sich bei diesen beiden Proteinen um essentielle Faktoren des Stoffwechsels und der Proteinbiosynthese handelt. Eine Deletions-Mutante für Peroxiredoxin wurde hergestellt, indem eine Kanamycin-Resistenzkassette zusammen mit einer Deletion von 43 Basen in das Gen der Peroxiredoxin eingefügt worden ist.

Bei der Bindung von Plasminogen gab es zwischen dem Parentalstamm und der *Δperox*-Mutante keinen Unterschied. Auch in der Durchfluss-Zytometrie (FACS) war kein Unterschied der Plasminogenbindung zwischen den beiden Stämmen zu erkennen.

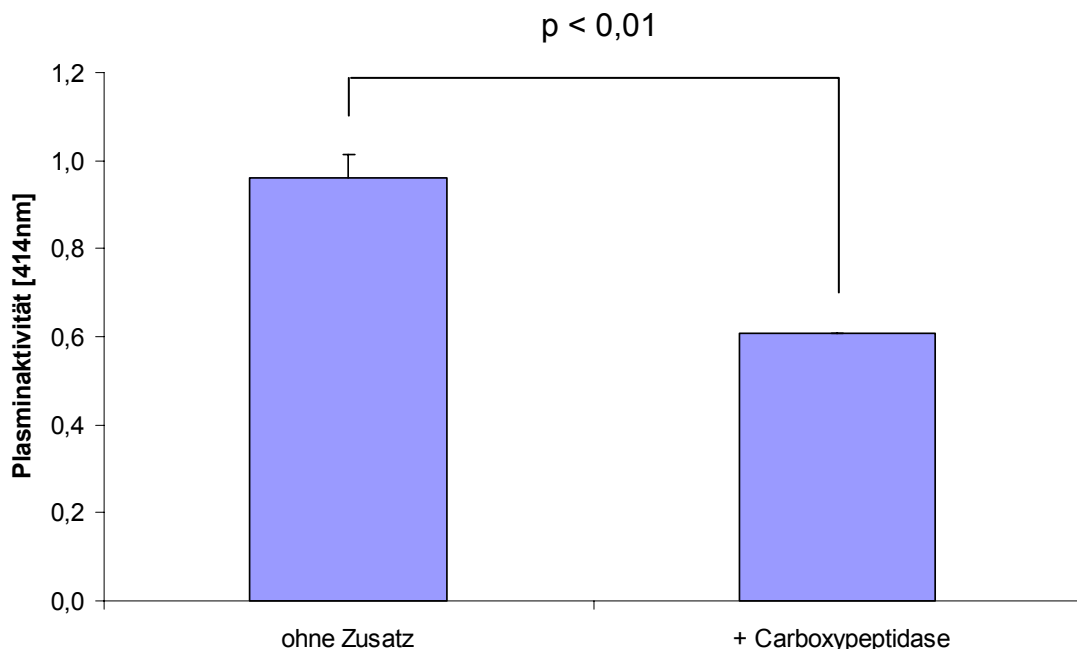
Um den Einfluss des fehlenden Peroxiredoxins auf die gebundene Plasminaktivität zu messen, wurden Plasmin Aktivitätsversuche durchgeführt.

Auch bei der gebundenen Plasminaktivität zeigte sich kein Unterschied zwischen dem Parentalstamm und der  $\Delta$ *perox*-Mutante. Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass Peroxiredoxin alleine kein essentieller Rezeptor für Plasminogen von *Neisseria meningitidis* ist.

### 2.2.1.6 Untersuchung der Bindemotive

Es ist schon seit längerem bekannt, dass Plasminogen über C-terminale Reste von Proteinen, vor allem endständige Lysine und Asparagine, gebunden wird (Bergmann *et al.*, 2003; Bergmann *et al.*, 2005; Ehinger *et al.*, 2004). Um diese These zu überprüfen, wurden Meningokokken mit Carboxypeptidase B behandelt und anschließend mit einem Substrat-Assay die Plasminogenbindung überprüft (2.2.1.6 Abbildung 1). Carboxypeptidase B ist eine Protease, die C-terminale Aminosäuren von Proteinen abspaltet.

2.2.1.6 Abb. 1: Einfluss der C-terminalen Proteinreste der Rezeptoren von Meningokokken auf die Plasminogenbindung.



Dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Versuches zur Messung des Einflusses der C-terminalen Proteinreste der Meningokokken-Oberflächenproteine auf die Plasminogenbindung beim Meningokokkenstamm MC58. Das gebundene Plasminogen wurde zu Plasmin aktiviert und die Aktivität des gebundenen Plasmin photometrisch bestimmt, wobei die Plasminaktivität direkt proportional zur gebundenen Plasminogenmenge ist.

Die gebundene Plasminaktivität ohne Zusatz betrug bei dem Stamm MC58  $0,959 \pm 0,053$ , und mit Zusatz der Carboxypeptidase  $0,607 \pm 0,01$ . Die Plasminogenbindung nahm um  $36,73 \pm 6,0\%$  ab. Um die Rolle der C-terminalen Lysinreste bei den Meningokokken-Rezeptorproteinen identifizieren zu können, wurden bei den rekombinanten Proteinen die Lysinreste gegen Alaninreste ausgetauscht (2.2.1.6 Tabelle 1).

2.2.1.6 Tab. 1: Sequenzen der Basenaustausche bei den Lysin – Mutanten.

| Protein                        | Abkürzung  | C – terminale Sequenz<br>(5 Aminosäuren) |
|--------------------------------|------------|--|
| Enolase                        | Eno        | YQLGK                                    |
| Enolase Lys <sup>-</sup>       | Eno lys-   | YQLG <b>A</b>                            |
| DnaK                           | DnaK       | KDDKK                                    |
| DnaK Lys <sup>-</sup>          | DnaK lys-  | KDD <b>AA</b>                            |
| Peroxiredoxin                  | Perox      | YLAKN                                    |
| Peroxiredoxin Lys <sup>-</sup> | Perox lys- | YLA <b>AA</b>                            |

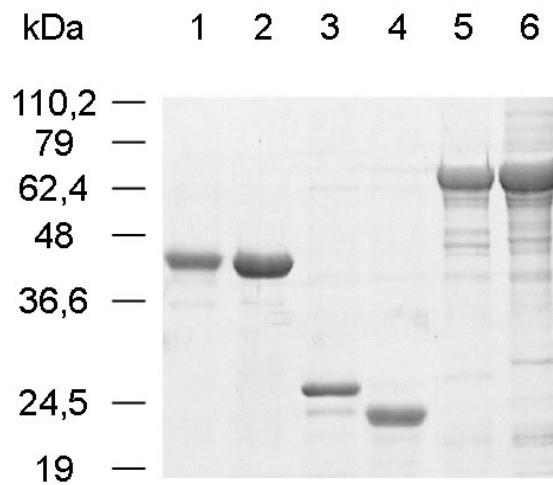
Dargestellt sind die C – terminalen Sequenzen der rekombinanten Proteine und ihrer Lysin – Mutanten. Enolase: Q9JZ53, Position 424 – 428, Austausch des terminalen Lysins gegen ein Alanin; DnaK: Q9K0N4, Position 638 – 642, Austausch der 2 terminalen Lysine gegen 2 Alanine; Peroxiredoxin: Q9JQS4, Position 241 – 245, Austausch des terminalen Asparagens und des Lysins gegen 2 Alanine; „K“ und „Lys“: Lysin; „N“: Asparagin; „A“: Alanin.

Die Lysin-Mutanten wurden anschließend mit SDS-PAGE und Western Blot auf Unterschiede zu den normalen rekombinanten Proteinen untersucht (2.2.1.6 Abbildung 2). Bei einem Coomassie-gefärbten Gel sind deutliche Unterschiede zwischen den wildtypischen und den Lysin-Austausch Proteinen bei der Enolase und bei Peroxiredoxin zu erkennen. Bei der Lysin Mutante des Peroxiredoxin gab es teilweise ein im Molekulargewicht abweichendes Protein (~0,5kDa). Diese Variante kommt auch beim nativen Peroxiredoxin vor, aber nur in geringer Menge (vgl. 2.2.1.7 Abbildung 2). Auf Grund welcher Modifikationen oder Prozesse dieses Protein entsteht und warum nur gelegentlich, konnte nicht geklärt werden. Die Modifikationen hatten aber keinerlei Einfluss auf die Interaktion des Rezeptorproteins mit den Meningokokken oder Plasminogen. Im Western Blot liefen die Banden der Proteine auf derselben Höhe und die Lysin-Austausch Proteine waren mit Ausnahme des Peroxiredoxins nicht von den Normalen zu unterscheiden (Daten nicht gezeigt).

Um eventuelle Unterschiede in der Fähigkeit der Lysin-Austausch Proteine im Gegensatz zu den wildtypischen rekombinanten Proteinen aufzudecken, wurden Plasminogen-Overlay Assays durchgeführt. Dafür wurden sowohl von denaturierten Proteinen, wie auch von nativen Proteinen Overlay Assays angefertigt.



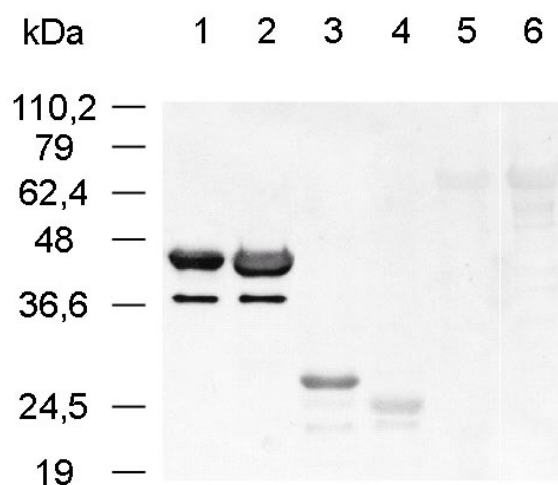
**2.2.1.6 Abb. 2:** In der Coomassie-Färbung gibt es Unterschiede zwischen Lysin-Austausch und normalen Plasminogen-Rezeptorproteinen.



Dargestellt sind durch eine SDS-PAGE aufgetrennte rekombinante Proteine, nach einer Coomassie-Färbung. Geradzahlige Banden stellen die wildtypischen rekombinanten Proteine dar. Ungeradzahlige Banden stellen die Lysin-Austausch rekombinanten Proteine dar. Banden 1+2: Enolase; Banden 3+4: Peroxiredoxin; Banden 5+6: DnaK.

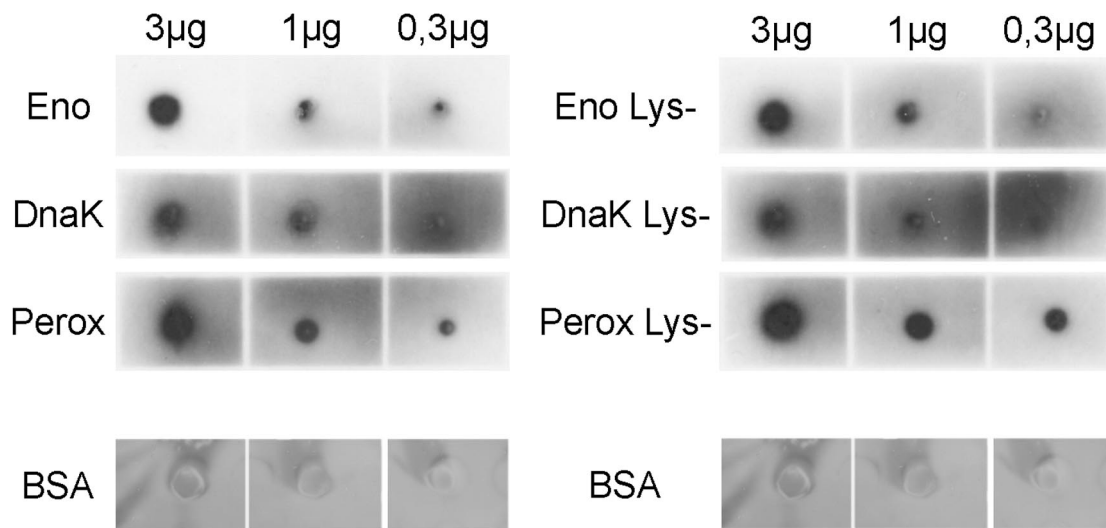
Bei den wildtypischen Plasminogen-Overlay Assays liegen die Proteine durch die Auftrennung in der SDS-PAGE denaturiert vor (Abbildung 2.2.1.6 Abb. 3). Um die Bindung der Proteine an Plasminogen auch im nativen Zustand untersuchen zu können, wurden dafür die Proteine auf Nitrocellulose-Membranen getropft (gedottet). Diese Dot Blots wurden dann genauso für einen Plasminogen-Overlay Assay verwendet, wie sonst die Western Blots (2.2.1.6 Abbildung 4).

**2.2.1.6 Abb. 3:** Im denaturierten Zustand gibt es Unterschiede in der Plasminogenbindung von Lysin-Austausch und wildtypischen Meningokokken-Rezeptorproteinen



Dargestellt sind die durch eine SDS-PAGE aufgetrennten rekombinanten Proteine und einem anschließenden Plasminogen- Overlay Assay. Geradzahlige Banden stellen die „normalen“ rekombinanten Proteine dar. Ungeradzahlige Banden stellen die Lysin - Austausch rekombinanten Proteine dar. Banden 1+2: Enolase; Banden 3+4: Peroxiredoxin; Banden 5+6: DnaK.

2.2.1.6 Abb. 4: Im nativen Zustand binden Lysin-Austausch und normale Rezeptorproteine von Meningokokken gleichgut Plasminogen.



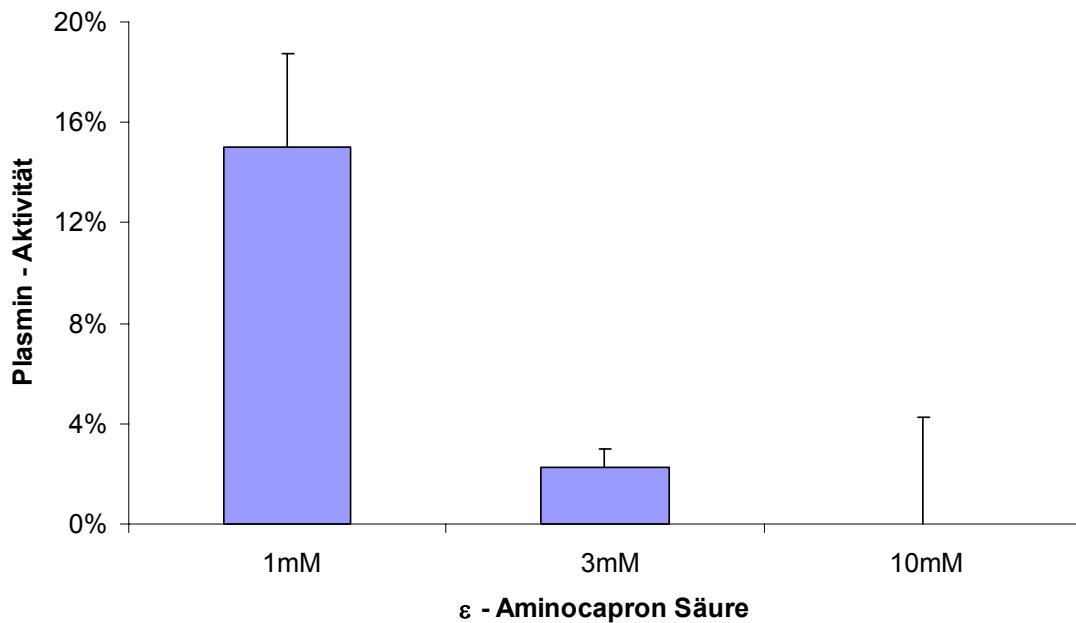
Dargestellt sind rekombinante Proteine, links die normalen und rechts die Lysin-Austausch Proteine, die jeweils in drei verschiedenen Mengen im nativen Zustand auf Nitrozellulose-Membranen aufgetropft worden sind. Als Kontrolle wurde BSA benutzt.

Bei den denaturierten Proteinen zeigten keine Unterschiede zwischen der Lys<sup>-</sup> Variante und der wildtypischen Enolase in ihrer Fähigkeit Plasminogen zu binden. Bei Peroxiredoxin band das wildtypische Protein mehr Plasminogen als die Lys<sup>-</sup> Variante. DnaK band in der wildtypischen als auch in der Lys<sup>-</sup> Variante im denaturierten Zustand nur schlecht Plasminogen. Dieser Effekt fiel auch schon früher bei verschiedenen Plasminogen-Overlay Assays mit denaturiertem DnaK auf.

Im Gegensatz dazu zeigte sich unter nicht denaturierenden Bedingungen kein Unterschied in der Plasminogenbindungskapazität zwischen den wildtypischen Rezeptorproteinen und ihren Lys<sup>-</sup> Varianten. Das zur Kontrolle benutzte Protein BSA zeigte im nativen Zustand keine Bindung von Plasminogen.

Die  $\epsilon$ -Aminocapron Säure, auch bekannt als 6-Hexansäure, dient als Analogon für die freien Reste der Aminosäure Lysin und kann die spezifische Bindungen über Lysin-Bindedomänen effektiv inhibieren. Durch Zugabe von  $\epsilon$ -Aminocapron (EACA) Säure bei der Plasminogen-Inkubation von Meningokokken konnte die Bindung von Plasminogen an die Bakterien konzentrationsabhängig inhibiert werden (1mM:  $15,00 \pm 3,7\%$ ; 3mM:  $2,25 \pm 0,7\%$ ; 10mM:  $0,00 \pm 4,2\%$ ) (2.2.1.6 Abbildung 5).

2.2.1.6: **Abb. 5:**  $\epsilon$ -Aminocapron Säure behindert die Bindung von Plasminogen an Meningokokken.



Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Versuchen zur Bestimmung des Einflusses von  $\epsilon$ -Aminocapron Säure (EACA) auf die Bindung von Plasminogen an den Meningokokkenstamm MC58. Ein Ansatz ohne Zusatz von EACA ist gleich 100% gesetzt worden. 1mM EACA: 15,00%  $\pm$  0,037; 3mM EACA: 2,25%  $\pm$  0,007; 10mM EACA: 0,00%  $\pm$  0,042.

Bei bakteriellen Plasminogen-Rezeptoren wurden auch interne Plasminogen-Bindemotive beschrieben (Bergmann *et al.*, 2003; Bergmann *et al.*, 2005; Ehinger *et al.*, 2004). So ist bei Pneumokokken für den hauptsächlichen Plasminogen-Rezeptor, die  $\alpha$ -Enolase, ein Lysin-reiches, internes Bindemotiv (FYDKERKVY) von neun Aminosäuren Länge beschrieben worden. Untersuchungen zur Struktur dieser Enolase haben ergeben, dass dieses Motiv in der nativen Faltung gut für das Plasminogen erreichbar ist, während die C-terminalen Reste nicht zugänglich sind (Bergmann *et al.*, 2003; Bergmann *et al.*, 2005; Ehinger *et al.*, 2004). Daher wurde untersucht, ob die putativen Plasminogen-Rezeptoren der Meningokokken auch Sequenzen enthalten, die dem Bindemotiv der Pneumokokken-Enolase ähnlich sind (2.2.1.6 Tabelle2). Drei sehr kurze, ähnliche Motive zeigten sich bei der Meningokokken Enolase, ebenfalls drei beim DnaK und zwei ähnliche Sequenzen auch beim Peroxiredoxin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Bindung von Plasminogen an Meningokokken über die drei identifizierten Rezeptormoleküle die C-terminalen Lysinreste nur eine untergeordnete Rolle spielen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass ausschließlich Lysin-Reste für die Bindung von Plasminogen an Meningokokken verantwortlich sind. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass für die identifizierten Rezeptoren interne Lysin-reiche Domänen auf der Meningokokken-Oberfläche die

Bindung vermitteln. Initiale Versuche mit der Carboxypeptidase B deuten darauf hin dass C-terminale Lysinreste bei weiteren Plasminogenrezeptoren von *N. meningitidis* eine wichtige Rolle spielen dürften.

2.2.1.6 Tab. 2: Homologe Gensequenzen zum internen Plasminogen – Bindemotiv bei den Meningokokken – Rezeptoren.

| Bakterium                       | Gen <sup>a</sup> | Match <sup>c</sup> /<br>Sequenz | Position <sup>b</sup> |
|---------------------------------|------------------|---------------------------------|-----------------------|
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Enolase          | FYDKERKVV                       | 248 – 256             |
| <i>Neisseria meningitidis</i>   | Enolase          | :: :                            | 55 – 58               |
|                                 |                  | DKSR                            |                       |
|                                 | Enolase          | ::<br>FY                        | 248 – 249; 423 – 424  |
|                                 | DnaK             | . . . . .<br>NKDRKV             | 186 – 191             |
|                                 | DnaK             | : : : :<br>FEDKE                | 77 – 81               |
|                                 | DnaK             | : : . . . .<br>FNDSQRQ          | 146 – 152             |
|                                 | Peroxiredoxin    | : : . : .<br>FKGKKVVVF          | 31 – 41               |
|                                 | Peroxiredoxin    | : . :<br>FIEPE                  | 142 – 146             |

<sup>a</sup>: Die Sequenzen der einzelnen Proteine sind unter den folgenden „Accession numbers“ zu bekommen: *Streptococcus pneumoniae* Enolase: Q97QS2; *Neisseria meningitidis* Enolase: Q9JZ53; *Neisseria meningitidis* DnaK: Q9K0N4; *Neisseria meningitidis* Peroxiredoxin: Q9JQS4.

<sup>b</sup>: Die Positionen beziehen sich auf die Aminosäuresequenz der jeweiligen Proteine.

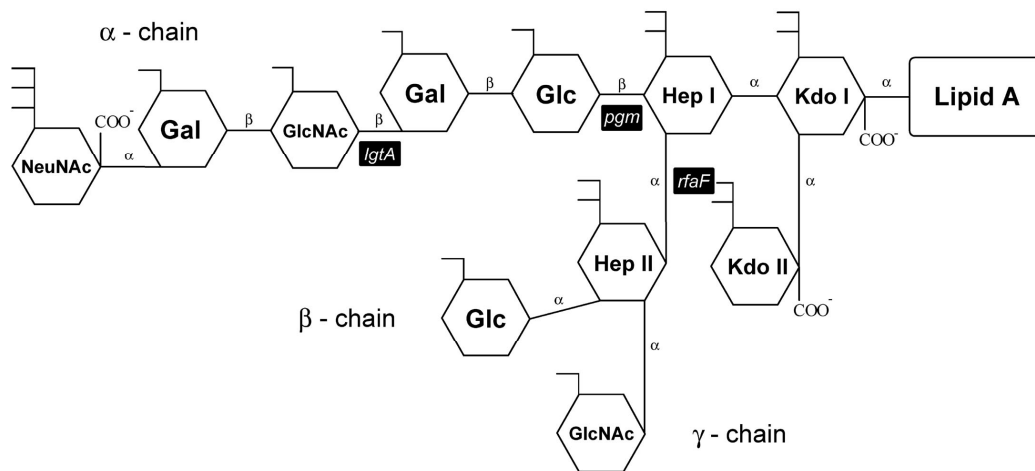
<sup>c</sup>: „Match“ bezieht sich auf die Referenzsequenz (Pneumokokken – Enolase). „Doppelpunkt“: identische Aminosäure an derselben Position innerhalb der Sequenz; „Punkt“: strukturell ähnliche Aminosäuren an derselben Position.

## 2.2.2 Funktionelle Aspekte der Plasminogenbindung durch *Neisseria meningitidis*

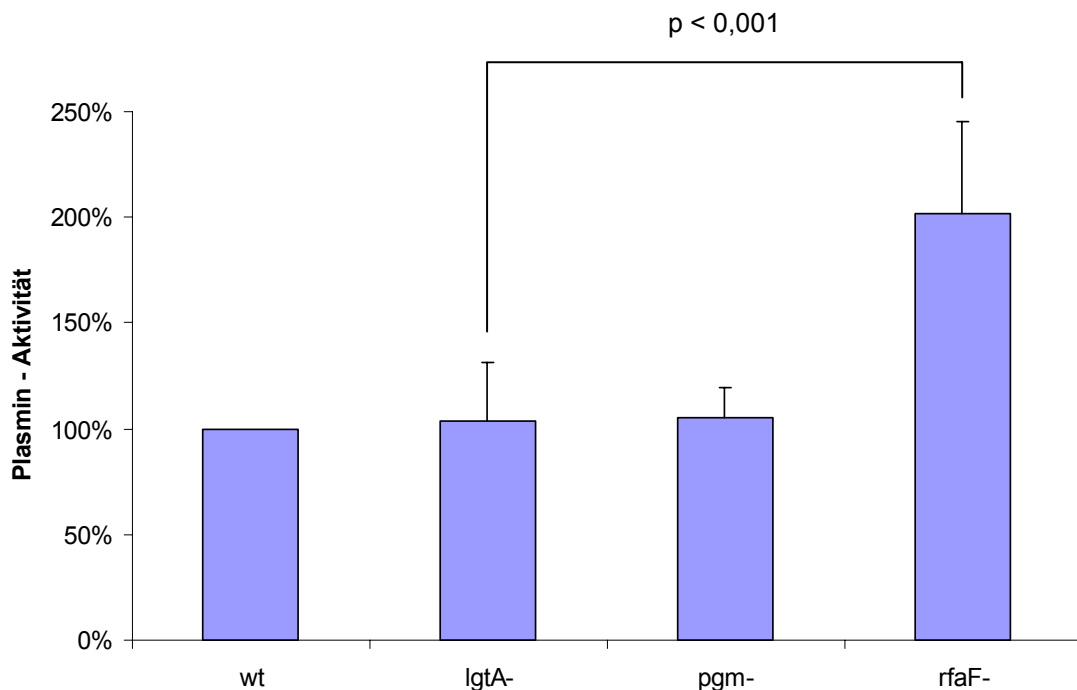
### 2.2.2.1 Einfluss des Lipooligosaccharids (LOS) auf die Plasminogenbindung und die Plasminaktivität

Für verschiedene Enterobakterien, wie *Yersinia pestis* und *Salmonella enterica*, wurde gezeigt, dass das O-Antigen ihres LPS die Interaktionen mit Plasminogen beeinflusst. So konnten O-Antigen exprimierende Varianten kein Plasminogen zu Plasmin aktivieren (Kukkonen *et al.*, 2004). Für *N. meningitidis* ist beschrieben, dass durch das LOS die Bindung von Liganden an membranständige Rezeptoren der Meningokokken erschwert ist (Jones *et al.*, 1992).

2.2.2.1 Abb. 1: Darstellung des Meningokokken LOS.



Dargestellt ist ein Schema des Meningokokken-LOS des Immunotyps L3, 7, 9. Kdo: 2-Keto-3-Deoxy-Oktulonsäure; Hep: L-Glycerin-D-Mannin-Heptopyranosid; Glc: Glukose; GlcNAc: N-Acetylglukosamin; Gal: Galaktose; NeuNAc: N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure).

2.2.2.1 Abb. 2: Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Seitenketten des LOS behindern die Bindung von Plasminogen an Meningokokken.

Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Versuchen zur Bestimmung des Einflusses vom LOS auf die Bindung von Plasminogen an den Meningokokkenstamm MC58 $\Delta$ asiaD und die daraus resultierende, gebundene Plasminaktivität. Die Werte des Stammes MC58 $\Delta$ asiaD wurden gleich 100% gesetzt. wt: MC58 $\Delta$ asiaD; lgtA-: MC58 $\Delta$ asiaD,  $\Delta$ lgtA; pgm-: MC58 $\Delta$ asiaD,  $\Delta$ pgm; rfaF-: MC58 $\Delta$ asiaD,  $\Delta$ rfaF.

Zur Untersuchung welchen Einfluss das LOS auf die Bindung von Plasminogen an Meningokokken hat wurden Versuche mit bekapselten und unbekapselten Mutanten durchgeführt. Dazu wurden drei verschiedene LOS-Mutanten benutzt: eine  $\Delta$ lgtA-

Mutante (verkürzten  $\alpha$ -Kette), eine  $\Delta pgm$ -Mutante (fehlende  $\alpha$ -Kette) und eine  $\Delta rfaF$ -Mutante (fehlende  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette) (vgl. 2.2.2.1 Abbildung 1).

Bei den Untersuchungen zur Bindung von Plasminogen an die Bakterien wurde unabhängig vom Kapselstatus für keine der LOS-Mutanten ein signifikanter Unterschied zu den Parentalstämmen festgestellt.

Bei Untersuchungen zu der gebundenen Plasminaktivität an die LOS-Mutanten wurde bei den bekapselten LOS-Mutanten ebenfalls kein Unterschied zu dem Parentalstamm MC58 gefunden. Bei den unbekapselten Mutanten zeigte die  $\Delta rfaF$ -Mutante eine doppelt so hohe gebundene Plasminaktivität wie der Parentalstamm MC58 $\Delta siaD$  ( $202,01 \pm 43,2\%$ ,  $p < 0,001$ ) (vgl. 2.2.2.1 Abbildung 2).

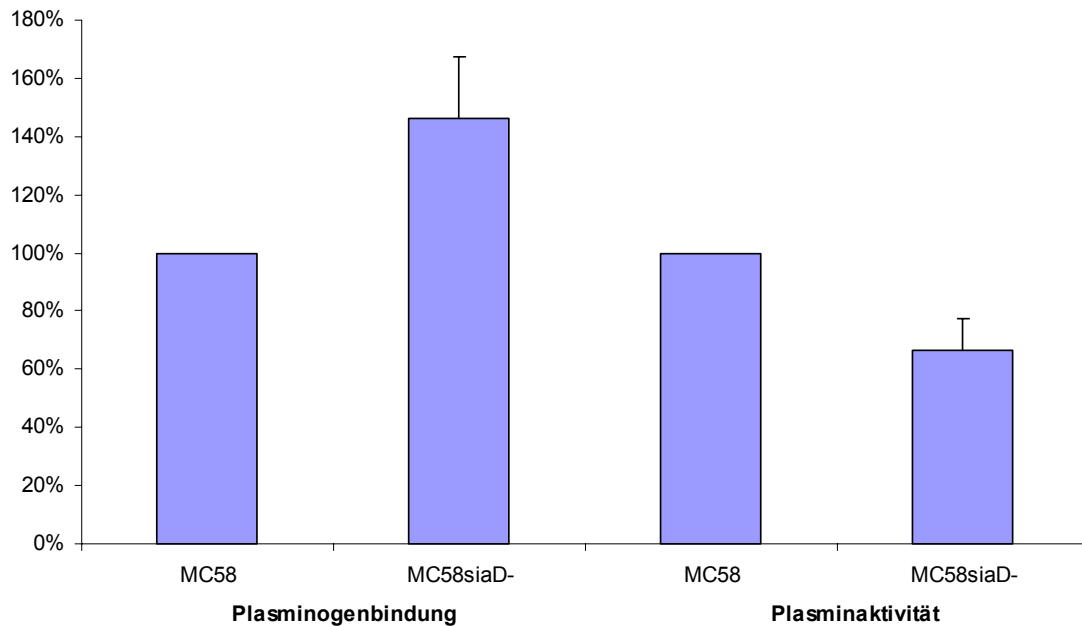
#### **2.2.2.2 Einfluss der Kapsel auf die Plasminogenbindung und die Plasminaktivität**

Die bisherigen Versuche zur Interaktion von Meningokokken mit Plasminogen wurden mit dem Serogruppe B Stamm MC58 und der unbekapselten Mutante MC58  $\Delta siaD$  durchgeführt. Ergebnisse aus den initialen Plasminogen-Bindeversuchen haben gezeigt, dass auch Meningokokken anderer Serogruppen in der Lage sind Plasminogen zu binden (vgl. Kapitel 2.2.1.1).

Um die Interaktion von Plasminogen mit Meningokokken der fünf mit Erkrankungen assoziierten Serogruppen charakterisieren zu können, wurden Plasminogen-Bindeversuche und Plasminaktivitätsversuche durchgeführt. Verwendet wurden zum einen Wildtypstämme der Serogruppen A (#2554), B (MC58), C (#2120), W-135 (#171) und Y (#2220) und isogene kapsellose Mutanten dieser Stämme. Die Plasminogen-Bindeversuche ergaben weder unter den bekapselten, noch unter den unbekapselten Stämmen signifikanten Unterschiede zwischen den Serogruppen. Auch die Untersuchungen zur gebundenen Plasminaktivität ergaben keine Unterschiede zwischen den einzelnen Serogruppen (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob die Kapsel einen Einfluss auf die Bindung von Plasminogen und die Aktivität des gebundenen Plasmins hat, wurde der bekapselte Serogruppe B-Stamm MC58 mit der isogenen unbekapselten Mutante MC58 $\Delta siaD$  verglichen (2.2.2.2 Abbildung 1).

**2.2.2.2 Abb. 1:** Kapsellose Meningokokken binden mehr Plasminogen, aber bekapselte Meningokokken haben die größere Oberflächen-assoziierte Plasminaktivität.



Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches zur Plasminogenbindung und von drei Versuchen zur gebundenen Plasminaktivität. Die Versuche wurden alle mit dem bekapselten Stamm MC58 und der kapsellosen Mutante MC58 $\Delta$ siaD (MC58siaD-) durchgeführt.

Die kapsellose Mutante akquirierte ein Drittel mehr Plasminogen ( $133,01 \pm 6,5\%$ ) als der bekapselte Parentalstamm. Im Gegensatz dazu war die gebundene Plasminaktivität beim bekapselten Parentalstamm MC58 höher als bei der unbekapselten Mutante MC58 $\Delta$ siaD. ( $66,64 \pm 10,6\%$ ).

Zur Klärung der Fragestellung, ob diese Effekte auch bei anderen Serogruppen auftreten, wurden Versuche zur Bindung von Plasminogen und zur gebundenen Plasminaktivität mit Stämmen der Serogruppen A, C, W-135 und Y durchgeführt. Bei den Serogruppe C, W-135 und Y zeigten sich dieselben Effekte, wie bei den Serogruppe B-Stämmen. Im Gegensatz dazu gab es bei dem Serogruppe A Stamm weder bei der Bindung von Plasminogen, noch bei der Plasminaktivität einen signifikanten Unterschied zwischen der bekapselten und der isogenen kapsellosen Variante.

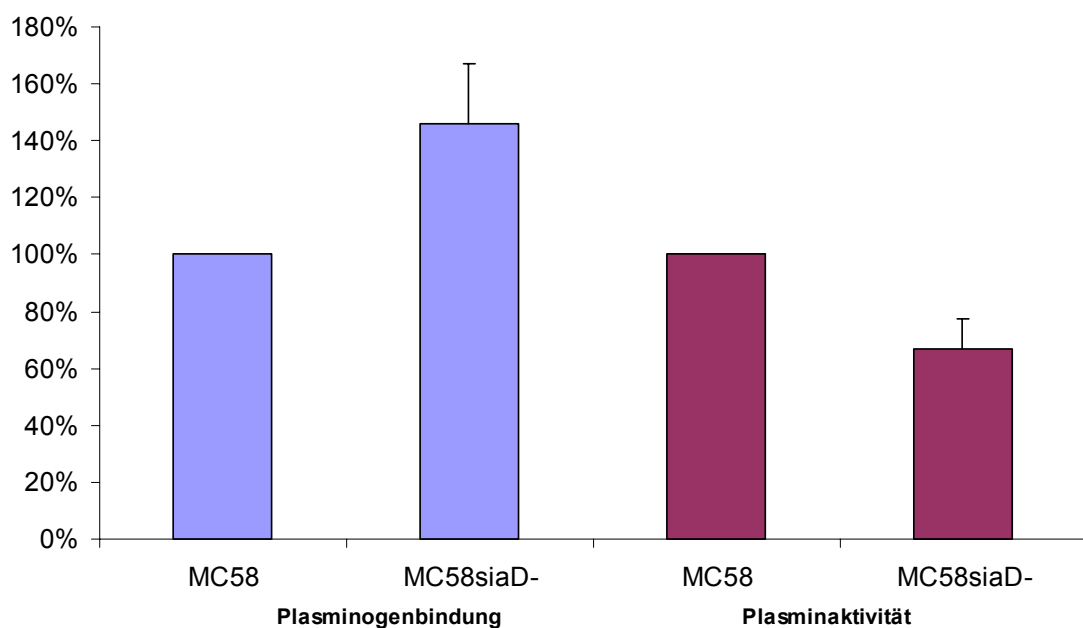
### 2.2.2.3 Bindung und Aktivität von Plasmin

Im Laufe der Infektion ist es möglich, dass Meningokokken nicht nur mit Plasminogen, sondern auch mit aktiviertem Plasmin in Kontakt kommen. Um zu testen, ob auch dieses rekrutiert werden kann, wurden bekapselte und unbekapselte Meningokokken der

Serogruppe B mit gleichen Mengen von Plasminogen oder Plasmin inkubiert und anschließend die Menge des gebundenen Proteins mit einem ELISA gemessen. Es zeigte sich unabhängig vom Kapselstatus kein Unterschied zwischen der Bindung von Plasmin und Plasminogen.

Auch bei der gemessenen Plasminaktivität gab es keinen Unterschied (2.2.2.3 Abbildung 1). Meningokokken können also als Plasminogen und Plasmin an ihre Oberfläche binden.

2.2.2.3 **Abb. 1:** Für das Verhältnis der gebundenen Plasminaktivität spielt es zwischen bekapselten und unbekapselten Meningokokken keine Rolle, ob sie Plasmin oder Plasminogen binden.



Dargestellt sind die Mittelwerte von drei voneinander unabhängigen Versuchen zur Bestimmung der Plasminaktivität nach der Bindung von Plasmin oder Plasminogen an bekapselte oder kapsellose Meningokokken. MC58ΔsiaD: MC58ΔsiaD.

#### 2.2.2.4 Bindung von Plasminogen aus Serum

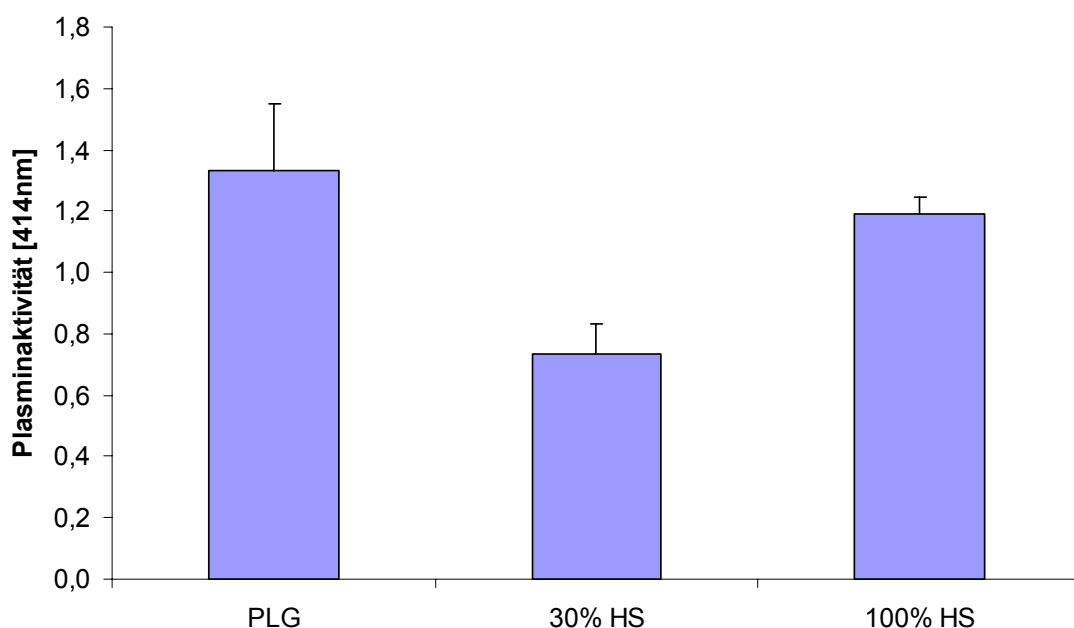
Die Fähigkeit der Meningokokken Plasminogen aus humanem Serum zu binden wurde mit bekapselten (MC58) und kapsellosen Meningokokken (MC58ΔsiaD) durch Inkubation in hitzeinaktiviertem Serum untersucht. Um zu überprüfen, ob die Erreger äquivalente Mengen Plasminogen aus dem Serum und aus PBS binden können, wurden die kapsellosen und die bekapselten Meningokokken mit Humanserum (100-200μg/ml, 2μM) (Brandtzaeg *et al.*, 1990; Hajjar, 2003; Pollanen *et al.*, 1991) und mit Plasminogen in PBS (100μg/ml) inkubiert.



Aus beiden Ansätzen konnten die Meningokokken unabhängig von ihrem Kapselstatus Plasminogen rekrutieren. Die gebundene Menge an Plasminogen war aus PBS etwas höher.

Zur Bestimmung der Aktivität des gebundenen Plasmins wurden unkapselte Meningokokken (*MC58 $\Delta$ siaD*) mit 30%igen Humanserum in PBS, mit unverdünntem Humanserum und mit Plasminogen in PBS (100 $\mu$ g/ml) inkubiert. Das gebundene Plasminogen wurde anschließend durch Zugabe von uPA zu allen Ansätzen zu Plasmin aktiviert (2.2.2.4 Abbildung 1).

2.2.2.4 Abb. 1: Meningokokken können Plasminaktivität aus Humanserum rekrutieren.



Dargestellt sind die Mittelwerte von einem repräsentativen Versuch zur Bestimmung der gebundenen Plasminaktivität aus Humanserum an kapsellose Meningokokken (*MC58 $\Delta$ siaD*). Die Messung des Substratumsatzes erfolgte bei 414nm im ELISA-Reader. PLG: Plasminogen in PBS [100 $\mu$ g/ml]; 30% HS: 30% hitzeinaktiviertes Humanserum in PBS; 100% HS: reines hitzeinaktiviertes Humanserum.

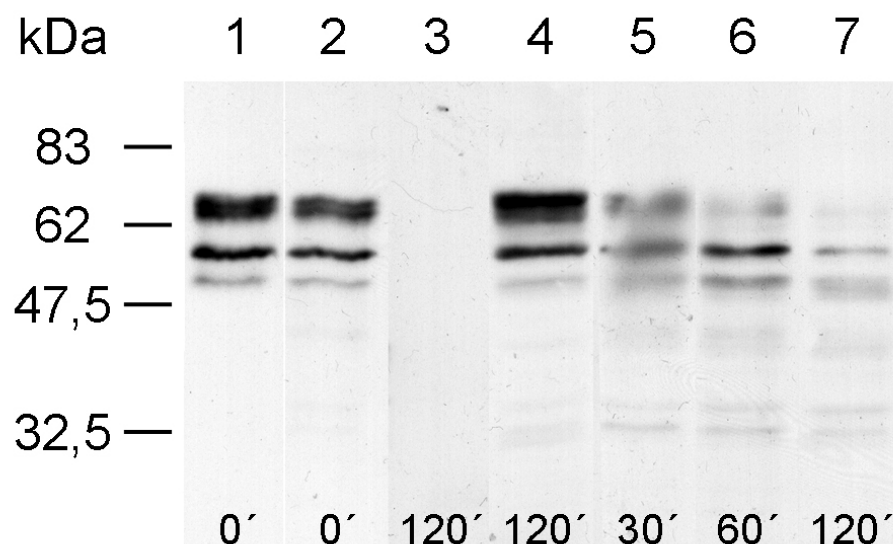
Die Meningokokken waren in der Lage Plasminaktivität durch Inkubation mit Humanserum zu akquirieren. Bakterien, die Plasminogen aus PBS gebunden haben, zeigten eine Aktivität von  $1,330 \pm 0,219$ . Solche, die mit 30% Humanserum in PBS inkubiert wurden, zeigten eine Aktivität von  $0,732 \pm 0,098$  und Meningokokken, die Plasminogen aus reinem Humanserum rekrutierten, zeigten Werte von  $1,191 \pm 0,057$ . Damit gab es zwischen den Werten von Plasminogen in PBS und von reinem Humanserum keinen signifikanten Unterschied.

Zur Bestimmung einer etwaigen Speziespezifität der Plasmin- und Plasminogen-Rekrutierung wurden Versuche zur Bindung und Aktivität von Plasminogen mit Seren anderer Spezies durchgeführt. Die Meningokokken konnten Plasminogen aus den Seren von Rindern, Pferden und Ratten binden. Das gebundene Plasminogen aus diesen Spezies konnte aktiviert werden und die Aktivitäten lagen alle in dem Bereich des humanen Plasmins.

### 2.2.2.5 Degradation von ECM-Komponenten durch an Meningokokken gebundenes Plasmin

Untersuchungen, ob an Meningokokken gebundenes Plasmin auch in der Lage ist, Polypeptide zu spalten, wurden mit Fibrinogen durchgeführt. Das an Bakterien gebundene Plasminogen war in einer Versuchsreihe durch uPA aktiviert worden und in einer zweiten Versuchsreihe nicht. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt und die Ansätze wurden mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Fibrinogen wurde im Western Blot nachgewiesen (2.2.2.5 Abbildung 1).

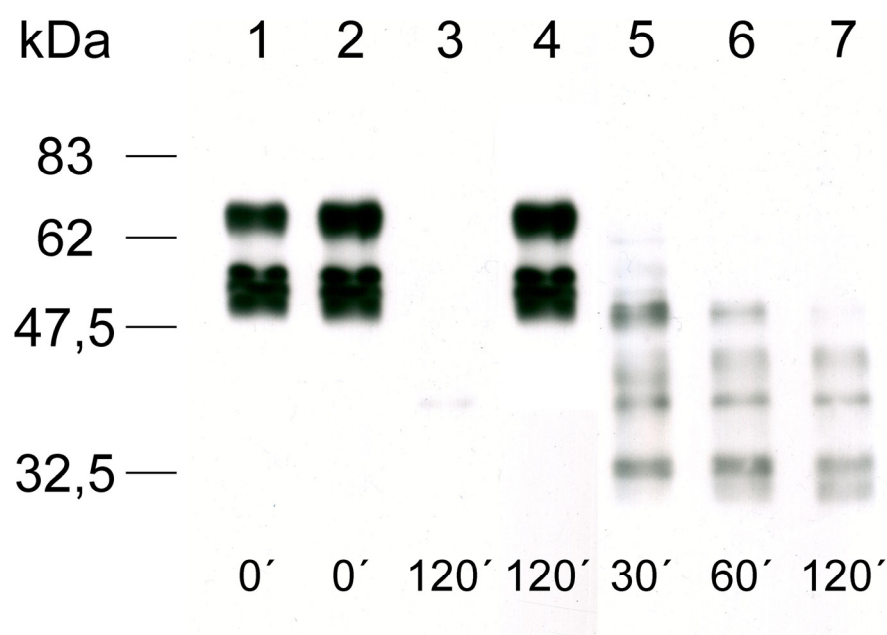
2.2.2.5 Abb. 1: Unbekapselte Meningokokken können mit gebundenem Plasmin Fibrinogen degradieren.



Dargestellt ist die Degradation von Fibrinogen durch an kapsellose Meningokokken (*MC58 $\Delta$ siaD*) gebundenes Plasmin. Zu mit Plasmin gecoateten Bakterien wurde Fibrinogen gegeben und nach bestimmten Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach einem Western Blot auf eine Nitrozellulose-Membran wurde das restliche Fibrinogen immunogen nachgewiesen. Spur 1: Nur Fibrinogen; Spuren 2 +3: Fibrinogen + Plasmin zu den Zeitpunkten  $t = 0$  (Spur 2) und  $t = 120\text{min}$  (Spur 3); Spur 4: Fibrinogen und an Bakterien gebundenes Plasminogen (nicht aktiviert!); Spuren 5 – 7: Fibrinogen und an Bakterien gebundenes Plasmin zu den Zeitpunkten  $t = 30\text{min}$  (Spur 5),  $t = 60\text{min}$  (Spur 6) und  $t = 120\text{min}$  (Spur 7).

Die Bindung des anti-Fibrinogen Antikörpers wird nicht durch die Bakterien oder das Plasmin beeinflusst (Abbildung 1, Spuren 1, 2 & 4). Fibrinogen alleine degradiert nicht im Untersuchungszeitraum und wird auch nicht durch Bakterien degradiert, die nicht aktiviertes Plasminogen gebunden haben (Abbildung 1, Spur 4). Freies aktives Plasmin degradiert das Fibrinogen innerhalb von zwei Stunden vollständig (Abbildung 1, Spuren 3 & 4). An Meningokokken gebundenes Plasmin degradiert Fibrinogen, aber innerhalb von zwei Stunden nicht vollständig (Abbildung 1, Spuren 5 – 7).

2.2.2.5 **Abb. 2:** Bekapselte Meningokokken können mit gebundenem Plasmin Fibrinogen degradieren.



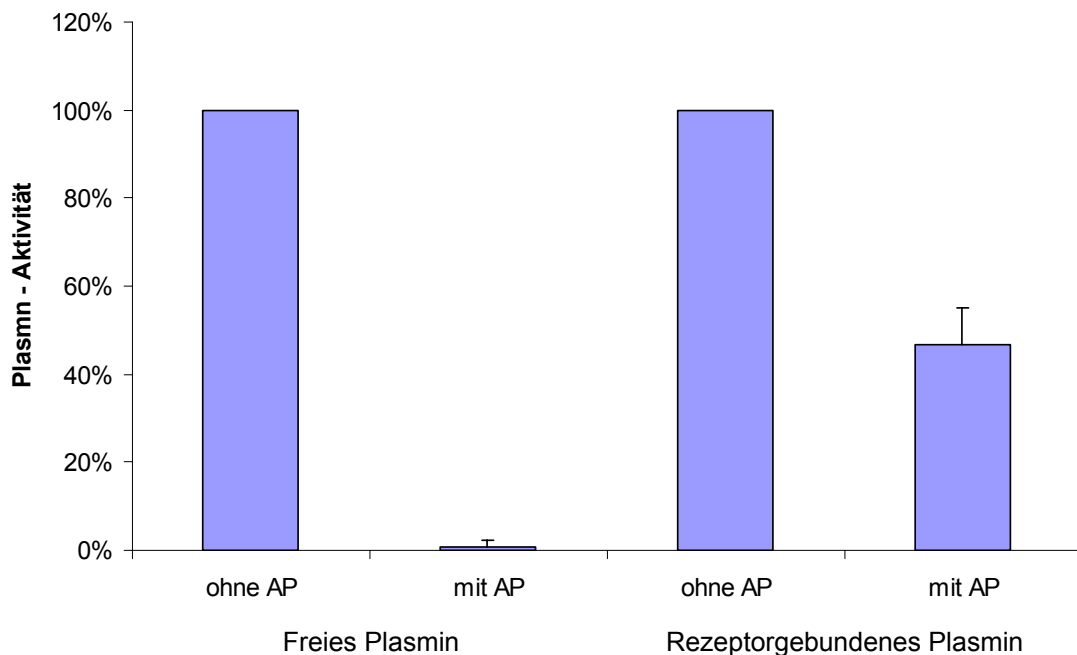
Dargestellt ist die Degradation von Fibrinogen durch an bekapselten Meningokokken (MC58) gebundenes Plasmin. Zu mit Plasmin gecoateten Bakterien wurde Fibrinogen gegeben und nach bestimmten Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach einem Western Blot auf eine Nitrozellulose-Membran wurde das restliche Fibrinogen immunogen nachgewiesen. Spur 1: Nur Fibrinogen; Spuren 2 +3: Fibrinogen + Plasmin zu den Zeitpunkten  $t = 0$  (Spur 2) und  $t = 120\text{min}$  (Spur 3); Spur 4: Fibrinogen und an Bakterien gebundenes Plasminogen (nicht aktiviert!); Spuren 5 – 7: Fibrinogen und an Bakterien gebundenes Plasmin zu den Zeitpunkten  $t = 30\text{min}$  (Spur 5),  $t = 60\text{min}$  (Spur 6) und  $t = 120\text{min}$  (Spur 7).

Die Ergebnisse der Versuche mit bekapselten Meningokokken stimmen mit den Ergebnissen der kapsellosen überein (2.2.2.5 Abbildung 2). An Meningokokken gebundenes Plasminogen ist also funktionell aktiv, wenn es durch einen extrinsischen Aktivator zu Plasmin aktiviert wird.

### 2.2.2.6 Schutz von gebundenem Plasmin vor Inaktivierung

Freies Plasmin wird im Körper rasch von  $\alpha$ 2-Antiplasmin desaktiviert (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Lahteenmaki *et al.*, 2001). Demgegenüber besitzt rezeptorgebundenen Plasmin eine gewisse Resistenz gegen  $\alpha$ 2-Antiplasmin (Ranby, 1982; Travis and Salvesen, 1983; Wiman and Collen, 1979; Wiman *et al.*, 1979). Um den Einfluss von  $\alpha$ 2-Antiplasmin auf Plasmin zu untersuchen, das an Meningokokken-Rezeptoren gebunden ist, wurden Plasminaktivitätsversuche durchgeführt. Dabei wurde zum einen freies Plasmin mit und ohne Gegenwart von  $\alpha$ 2-Antiplasmin inkubiert und zum anderen an kapsellose Meningokokken (MC58 $\Delta$ asiaD) gebundenes Plasmin mit und ohne  $\alpha$ 2-Antiplasmin inkubiert. Die Werte der Ansätze ohne den Inhibitor wurden jeweils gleich 100% gesetzt (2.2.2.6 Abbildung 1).

2.2.2.6 Abb. 1: An Meningokokken-Rezeptoren gebundenes Plasmin ist vor der Inaktivierung durch  $\alpha$ 2-Antiplasmin geschützt.



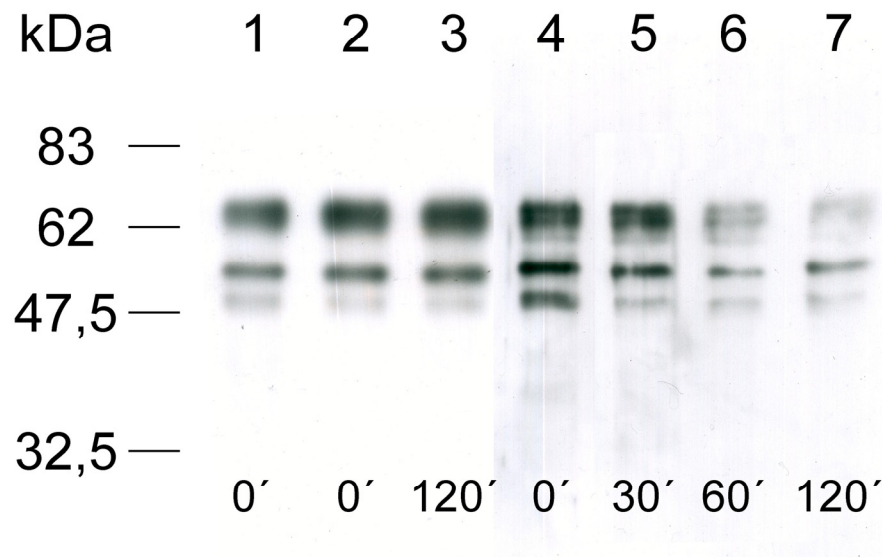
Dargestellt sind die Mittelwerte von Versuchen zur Bestimmung der Plasminaktivität von freiem und von Rezeptorgebundenem Plasmin unter Einfluss von  $\alpha$ 2-Antiplasmin mit kapsellosen Meningokokken (MC58 $\Delta$ asiaD). Um die einzelnen Versuche miteinander vergleichen zu können wurden die Ergebnisse der Kontrollansätze (ohne  $\alpha$ 2-Antiplasmin) gleich 100% gesetzt. AP:  $\alpha$ 2-Antiplasmin.

An Rezeptoren von Meningokokken gebundenes Plasminogen wird teilweise vor der Inaktivierung durch  $\alpha$ 2-Antiplasmin geschützt, wohingegen freies Plasmin fast vollständig deaktiviert wird. Die Aktivität des gebundenen Plasmins sinkt auf einen

Wert von  $46,66 \pm 8,3\%$  und die des freien Plasmins auf  $0,87 \pm 1,6$ . Versuche mit dem isogenen, bekapselten Stamm MC58 zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Zur Kontrolle, ob das gebundene Plasmin unter Einwirkung des Inhibitors nicht nur das synthetische Oligopeptid spalten kann, wurden Versuche zur Degradation von Fibrinogen durchgeführt (2.2.2.6 Abbildung 2).

2.2.2.6 Abb. 2: Rezeptor-gebundenes Plasmin kann in Gegenwart von  $\alpha 2$ -Antiplasmin Fibrinogen degradieren.



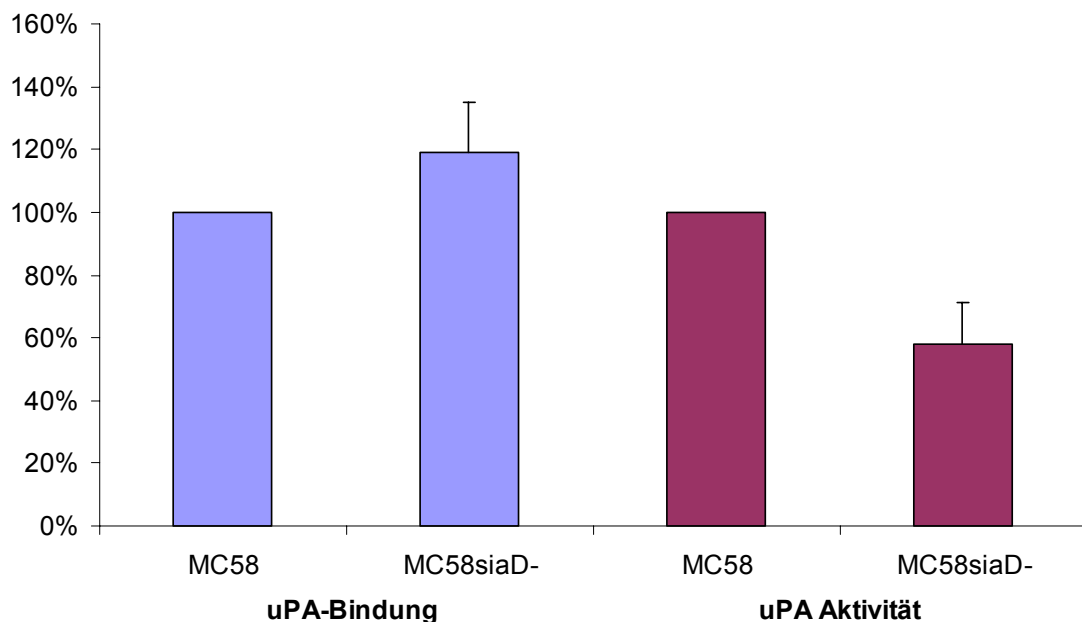
Dargestellt ist die Degradation von Fibrinogen durch rezeptorgebundenes Plasmin (an MC58) unter Einfluss von  $\alpha 2$ -Antiplasmin. Mir Plasmin gecoatete Bakterien wurden mit Fibrinogen unter Einfluss von  $\alpha 2$ -Antiplasmin inkubiert. Nach bestimmten Zeitpunkten wird die Reaktion gestoppt und die Proben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Western Blot auf eine Nitrozellulose-Membran wurde das restliche Fibrinogen immunogen nachgewiesen. Spur 1: Nur Fibrinogen; Spuren 2 +3: Fibrinogen, Plasmin und  $\alpha 2$ -Antiplasmin zu den Zeitpunkten  $t = 0$  (Spur 2) und  $t = 120\text{min}$  (Spur 3); Spuren 4 – 7: Fibrinogen, an Bakterien gebundenes Plasmin und  $\alpha 2$ -Antiplasmin zu den Zeitpunkten  $t = 0$  (Spur 4),  $t = 30\text{min}$  (Spur 5),  $t = 60\text{min}$  (Spur 6) und  $t = 120\text{min}$  (Spur 7).

Beim freien, aktivierten Plasmin konnte in Gegenwart von  $\alpha 2$ -Antiplasmin keine Degradation von Fibrinogen während des Untersuchungszeitraumes entdeckt werden (Abbildung 2, Spuren 2 & 3). Dagegen konnte bakteriengebundenes Plasmin in Anwesenheit des Inhibitors Fibrinogen degradieren (Abbildung 2, Spuren 4 – 7). Damit ist an Meningokokken-Rezeptoren gebundenes Plasmin gegen die Inaktivierung durch  $\alpha 2$ -Antiplasmin geschützt.

### 2.2.2.7 Bindung und Aktivität von uPA an Meningokokken

Für eukaryontische Zellen ist bekannt, dass sie den Plasminogen-Aktivator uPA binden und damit stärkere Aktivierung des rezeptorgebundenen Plasminogens erreichen. Um zu untersuchen, ob es einen vergleichbaren Mechanismus bei Meningokokken gibt, wurden die Meningokokken in einer ELISA-Platte immobilisiert und mit uPA inkubiert. Das gebundene uPA wurde dann immunogen nachgewiesen (2.2.2.7 Abbildung 1).

2.2.2.7 Abb. 1: Bekapselte und kapsellose Meningokokken binden uPA und besitzen Oberflächen-assoziierte uPA-Aktivität.



Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils drei unabhängigen Versuchen uPA-Bindung und zur Aktivität von gebundeneuPA. Die Versuche wurden alle mit dem bekapselten Stamm MC58 und der kapsellosen Mutante MC58 $\Delta$ siaD (MC58siaD-) durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl bekapselte wie auch kapsellose Meningokokken uPA binden. Vergleichbar mit der Plasminogenbindung bindet die unbekapselte Variante mehr Protein als der bekapselte Parentalstamm. Ein Overlay Assay mit uPA deutet auf bis zu sechs potentielle uPA-Rezeptoren bei Meningokokken hin.

Um die Aktivität des gebundenen uPA zu kontrollieren wurden Versuche mit einem spezifischen Substrat für uPA durchgeführt. Dafür wurden kapsellose (MC58 $\Delta$ siaD) und bekapselte Meningokokken (MC58) mit uPA inkubiert und die gebundene uPA-Aktivität wurde durch den Umsatz des synthetischen Substrates gemessen (2.2.2.7 Abbildung 1).

Das an die Meningokokken gebundene uPA ist aktiv und spaltet das Substrat. Die gemessene uPA-Aktivität wurde für den bekapselten Stamm gleich 100% gesetzt. Die

Aktivität des kapsellosen Stammes beträgt im Verhältnis dazu  $57,75 \pm 13,4\%$ . Der unkapselte Stamm besitzt damit eine geringere uPA-Aktivität, als der bekapselte, isogene Parentalstamm.

Durch Versuche, bei denen Meningokokken zuerst mit uPA und dann mit Plasminogen inkubiert wurden, konnte gezeigt werden, dass das gebundene uPA auch Plasminogen zu Plasmin aktivieren kann. Im Vergleich zu Versuchen, bei denen die Bakterien zuerst mit Plasminogen inkubiert wurden und dann mit uPA, konnte gezeigt werden, dass bei beiden Versuchsaufbauten vergleichbare Mengen Plasminogen und uPA gebunden werden. Auch die akquirierte Menge an Plasmin- und uPA-Aktivität war dabei vergleichbar. Bei einer Koinkubation von Meningokokken mit Plasminogen und uPA zeigte sich, dass von beiden Proteinen keine geringeren Mengen gebunden wurden. Das heißt, dass sich Plasminogen und uPA nicht gegenseitig bei der Bindung an die Bakterien behindern und dass sie unterschiedliche Rezeptoren benutzen. Bei der uPA-Aktivität konnte kein Zusammenhang zwischen erhöhter Aktivität und Colominsäure hergestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Meningokokken zwar im Gegensatz zu anderen Bakterien Plasminogen nicht selbstständig aktivieren können, aber sie haben die Möglichkeit uPA zu rekrutieren. Mit diesem gebundenen uPA sind sie in der Lage Plasminogen zu Plasmin aktivieren.

## 3 Diskussion

### 3.1 Teil I – Ursachen für den Kapselverlust bei Polysialyltransferasegen-positiven Meningokokken

Für die Pathogenese von *Neisseria meningitidis* ist ihr Kapselpolysaccharid essentiell: Die Kapsel ist notwendig für das Überleben der Erreger während der Infektion und bietet wahrscheinlich schon bei der Transmission auf einen neuen Wirt Vorteile. Bei bestimmten Schritten während der Kolonisation und der Infektionen kann die Kapsel aber auch stören, da die Adhäsion der Bakterien an Zellen des Wirtes behindert (vgl. Kapitel 1.3.3.2). Für die Besiedelung des Nasopharynx scheint die Kapsel auch nicht unbedingt von Nöten zu sein, da viele Isolate von asymptomatischen Trägern unbekapselt sind. Für eine erfolgreiche Besiedelung und Infektion ist es für die Erreger also von Vorteil zwischen dem bekapselten und dem unbekapselten Zustand wechseln zu können.

Von den 13 bekannten Serogruppen sind nur fünf regelmäßig mit Krankheitsgeschehen im Menschen assoziiert; vier davon tragen ein für die Kapselexpression essentielles Polysialyltransferasegen (vgl. Kapitel 1.3.3.4). In der vorliegenden Arbeit wurden 166 Isolate der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie analysiert. Die Isolate waren alle Polysialyltransferasegen-positiv, exprimierten aber keine Kapsel (vgl. Kapitel 1.2.2). Ziel der Untersuchungen war es, Ursachen und Mechanismen aufzudecken, welche zum Verlust der Kapselexpression geführt haben.

Unbekapselte Trägerisolate werden nach Dolan-Livengood *et al.* (2003) in drei verschiedene Gruppen eingeteilt: Die erste Gruppe bilden Isolate, die zwar einen vollständigen Kapsellokus besitzen, aber auf Grund von Punktmutationen die Fähigkeit zur Kapselsynthese verloren haben. Bei 23,5% der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Stämme konnte ein reversibler Mechanismus in Form von Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen (SSM) nachgewiesen werden. Dieser phasenvariable Mechanismus ermöglicht den Meningokokken mit einer bestimmten Frequenz von bekapselten Varianten zu kapsellosen Varianten zu wechseln und bringt ihnen so einen großen Vorteil bei der Anpassung an die jeweiligen Umgebungsbedingungen. Während der Analyse der zu untersuchenden Stämme der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie konnten die bereits beschriebenen



homopolymeren Wiederholungssequenzen (Hammerschmidt *et al.*, 1996b) bestätigt und eine Vielzahl neuer homopolymerer Wiederholungssequenzen in den Genen *siaA* und *siaD* beschrieben werden. Der phasenvariable Charakter dieser homopolymeren Sequenzen wurde exemplarisch belegt. Neben dem reversiblen Mechanismus des SSM war bei 47 Isolaten (36%) die Ursache des Kapselverlustes irreversibel. Dabei ist die Unterteilung nach Dolan-Livengood (2003) nicht vollständig: Sie beschreibt hier nur Punktmutationen als Ursache. Deswegen wurden in der Arbeit weitere Gruppen definiert (vgl. Kapitel 2.1.5). Zusätzlich zu Replikationsfehlern und transponablen Elementen scheint es also noch weitere Ursachen für den irreversiblen Kapselverlust zu geben, die aber im Rahmen der Arbeit nicht weiter untersucht wurden. Bei keinem der 26 Isolate, bei denen das defekte Gen vollständig sequenziert wurde, zeigte sich eine Akkumulation weiterer Mutationen. Das unterstreicht die Bedeutung des Polysialyltransferasegens und damit der Kapsel für die Verbreitung und das Überleben der Meningokokken: Die Mutationen bestehen noch nicht lange und die entsprechenden Stämme scheinen nicht dauerhaft in der Population zu verweilen.

28% der unersuchten Isolate ließen sich der zweiten Gruppe der Unterteilung von Dolan-Livengood *et al.* (2003) zuordnen, bei denen der Verlust der Kapselsynthese im Zusammenhang mit Insertionselementen und deren Rekombination steht. IS-Elemente sind mobile genetische Einheiten, die sich bei bestimmten, spezifischen Gensequenzen reversibel in das Genom integrieren können. Hammerschmidt *et al.* (1996a) haben das Insertionselement *IS1301* im Gen *siaA* des Kapselsyntheselokus entdeckt und auch die Frequenz der Rekombination beschrieben. Ein weiteres Insertionselement, das *IS1016*-ähnliche Insertionselement, wurde kürzlich im Kapsellokus beschrieben (Sadler *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte ein weiteres IS-Element, *IS1106*, im Kapsellokus beschrieben werden, dass bislang noch nicht in Zusammenhang mit der Regulation der Kapselsynthese gebracht wurde. Für die drei unterschiedlichen IS-Elemente zeigten sich eine Vielzahl von verschiedenen neuen Insertionsstellen. Zusätzlich wurden für das *IS1301* drei neue Insertionssequenzen gefunden. Der phasenvariable Charakter konnte auch für die neuen Insertionsstellen exemplarisch nachgewiesen werden. Auch dieser reversible Mechanismus zur Abschaltung der Kapselsynthese bietet den Meningokokken einen Vorteil bei der Adaption an verschiedene Lebensbedingungen.

Von 14 Isolaten mit großen, per PCR-Analyse detektierten Deletionen war nur eines der Gruppe 2 zuzuordnen ( $\alpha$ 451), da bei diesem die Deletionen in Zusammenhang mit Rekombinationen von IS-Elementen erfolgt waren. Die restlichen großen Deletionen

waren wahrscheinlich Folge von Rekombinationen und sind daher bereits im Rahmen der Gruppe 1 beschrieben.

Die Gruppe 3 der Einteilung nach Dolan-Livengood *et al.* (2003) besteht aus Meningokokken, die den Kapsel-Null-Lokus besitzen (vgl. Kapitel 1.3.3.4 und 1.3.3.5). Die Isolate der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie mit einem solchen Locus wurden bereits von Claus *et al.* (2002) beschrieben und befinden sich nicht unter den 166 hier beschriebenen Isolaten.

Als eine weitere Ursache für den Verlust der Kapselexpression synonyme und nicht-synonyme Mutationen in den Genen *siaA* und *siaD* untersucht. Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Mutationen führen diese weder zu einem verfrühten Transkriptionsabbruch, noch zu einer Verschiebung des Leserasters. Bei der Analyse der Sequenz des Genes *siaA* wurde bei Vertretern von allen Serogruppen insgesamt sieben nicht-synonyme Mutationen gefunden. Vergleichende Untersuchungen mit bekapselten Isolaten der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie deckten vier Mutationen auf, die ausschließlich bei den unbekapselten Isolaten vorkamen und daher potentiell relevant für den Kapselverlust sind. Besonders auffällig sind dabei zwei dieser Mutationen (Positionen 553 und 555 bezogen auf die Genomsequenz M95053), da sie in einer hochkonservierten Region des Proteins SiaA liegen (Murkin *et al.*, 2004). Sequenzvariationen im Gen *siaD* zeigten sich nur bei Vertretern der Serogruppe Y und diese waren wahrscheinlich nicht von funktioneller Bedeutung, da bei vergleichenden Untersuchungen alle Mutationen auch in den kapselexprimierenden Isolaten zu finden waren.

Die beschriebenen Ergebnisse stellen ein gutes Beispiel dafür dar, wie die Analyse von natürlich vorkommenden Mutationen Thesen zur Molekularbiologie der Enzyme und ihrer Funktion beeinflussen können.

Um weitere Ursachen für den Verlust der Kapselexpression aufzudecken, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch die Promotorregion und die Ribosomen-Bindestelle des Kapselsyntheseoperons analysiert. Diese nicht kodierende Region zwischen dem Kapselsyntheseoperon und dem Kapseltransportoperon ist bei den Serogruppen B, C, W-135 und Y gleich (Edwards *et al.*, 1994; Swartley *et al.*, 1996). In ihr befindet sich eine acht Basenpaar lange Wiederholungssequenz (vgl. 2.1.3 Abbildung 1) (Swartley *et al.*, 1996; Von Loewenich *et al.*, 2001), für welche in der Analyse der

untersuchten 166 Isolate neue Sequenzvariationen und Wiederholungsfrequenzen gefunden wurden. Die von Von Loewenich *et al.* (2001) untersuchten Wiederholungssequenzen und Sequenzvariationen hatten in Expressionsstudien keinen Einfluss auf die Expression der Kapselsynthese-Gene. Auf Grund der Ähnlichkeit mit den bereits bekannten Sequenzen, ist es naheliegend, dass dies auch für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu gefundenen Sequenzen gilt, weshalb sie nicht weiter untersucht wurden. In einem Isolat ( $\alpha 637$ ) lag eine fünffache Wiederholung der Sequenz vor, welche durch ihre Länge Auswirkungen auf die Expression haben könnte. Zusätzlich brachte die Analyse der intergenischen Region bei zwei der Isolaten ( $\alpha 617$ ,  $\alpha 618$ ) eine Insertion von 11 Basenpaaren zwischen der Ribosomen-Binde-Stelle und dem Startcodon hervor. Inwieweit diese Einfluss auf die Expression der Kapselsynthese-Gene nimmt, ist nicht bekannt. Sonst haben sich keine weiteren Besonderheiten in diesem Bereich gezeigt.

Insgesamt konnte in Rahmen dieser Arbeit für 131 Stämme (79%) der 166 untersuchten Isolate der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie eine Ursache oder ein Mechanismus für den Verlust der Kapselexpression beschrieben werden. Für fünf weitere Stämme (3%) könnten die Sequenzvariationen im Gen *siaA* eine mögliche Ursache für den Verlust der Kapselexpression darstellen. Damit bliebe für nur 30 Meningokokkenstämme (18%) die Ursache für den Verlust der Kapsel unklar. Da die Basensequenzen der Regionen B und C nicht untersucht wurden, lässt sich eine Erklärung für den Verlust zur Fähigkeit der Kapselsynthese für die restlichen Stämme möglicherweise dort finden. Festzustellen bleibt, dass bei etwa 80% der untersuchten Isolate die Ursache für den Kapselverlust in der Region A zu finden ist. Diese Region kodiert die Gene für die Kapselsynthese.

Allgemein können diese Ergebnisse folgendermaßen gedeutet werden: Nach der Besiedelung eines neuen Wirtes bringt jede Möglichkeit, die Kapselsynthese zu inaktivieren dem jeweiligen Stamm einen Vorteil. Aber nur Meningokokken, die in der Lage sind ihre Kapselsynthese wieder anzuschalten, können invasiv werden. Außerdem scheint die Reaktivierung der Kapsel auch für die Übertragung auf neue Wirte einen Vorteil zu bieten. Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Untersuchungen legen nahe, dass die irreversible Inaktivierung der Kapselsynthese bei Meningokokken zwar regelmäßig vorkommt (28,3% der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Isolate, 7% aller Isolate der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie), diese Stämme aber

überwiegend nicht lange in der Population verweilen. Eine Besonderheit bilden die wenigen klonalen Komplexe, die auch ohne Kapsel effizient auf neue Wirte übertragen werden, obwohl sie den Kapsel-Null-Lokus besitzen. Mit Ausnahme des von Claus *et al.* (2002) beschriebenen Kapsel-Null-Lokus, konnte keine Ursache und kein Mechanismus zum Verlust der Kapselexpression der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate mit einem bestimmten klonalen Komplexen in Verbindung gebracht werden.

Die vorliegenden Ergebnisse bieten einen populationsbasierten Überblick über die Ursachen und Mechanismen, mit denen Meningokokken ihre Kapselsynthese reversibel und irreversibel deaktivieren. Auch Aussagen zu den jeweiligen Frequenzen können getroffen werden. Dass einige klonale Linien bestimmte Mechanismen zur Kontrolle der Kapselsynthese bevorzugt benutzen, konnte im Rahmen dieser Studien weder belegt noch widerlegt werden. Weitere Studien wie die vorliegende sind von Nöten, um die Ökologie der Erreger zu verstehen und damit bessere Möglichkeiten zur Infektionsprävention und –Kontrolle entwickeln zu können.

## 3.2 Teil II – Interaktionen von *Neisseria meningitidis* mit Komponenten des Fibrinolyse-Systems

### 3.2.1 Identifizierung von drei Plasminogen-Rezeptoren von *Neisseria meningitidis*

Wie viele andere humanpathogene Bakterien sind Meningokokken in der Lage Plasminogen zu rekrutieren (Ullberg *et al.*, 1992). Im Gegensatz aber zu vielen anderen Mikroorganismen waren die Rezeptormoleküle für die Plasminogenbindung bei *Neisseria meningitidis* bislang nicht bekannt. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Plasminogenrezeptoren von *Neisseria meningitidis* zu identifizieren und zu charakterisieren.

Zunächst wurden Plasminogen-Overlay Assays mit dem Zelllysate verschiedener Meningokokkenstämme durchgeführt, die elf Plasminogen-bindende Proteine bei Vertretern aller untersuchten Serogruppen (vgl. Kapitel 2.2.1.1) aufdeckten. Drei dieser Proteine konnten durch proteinanalytische Methoden als mögliche Plasminogen-Rezeptoren identifiziert werden: Enolase, DnaK und Peroxiredoxin. Die restlichen Proteine konnten keinen bekannten Meningokokkenproteinen zugeordnet werden oder lieferten, eventuell auf Grund von hohen Proteinkonzentrationen, unspezifische Signale. Die angewandte Methode ermöglichte nur die ein-dimensionale Auftrennung der Bakterienproteine in der SDS-Gelelektrophorese. Ein deutlicher Nachteil dieser Methode ist die ungenügende Auftrennung der Meningokokkenproteine, wodurch die Detektion einzelner Proteine teilweise unmöglich wird. Die Auftrennung der Proteine mit einer zwei-dimensionalen Gelelektrophorese oder die weitere Aufreinigung von Proteinen der ausgeschnittenen Banden zum Beispiel über chromatographische Methoden wären Alternativen. Deutlicher Vorteil der angewandten Methode ist jedoch die hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, sowie die einfache und schnelle Durchführung der Versuche, weshalb die Methode verwendet wurde.

Während Enolase und DnaK bekannte Stoffwechselproteine sind, die auf Grund ihrer Funktionen überwiegend cytoplasmatisch vorliegen, handelt es sich bei Peroxiredoxin um ein bisher nicht beschriebenes Protein der Meningokokken mit unbekannter Funktion.

Die Enolase (46kDa) ist ein bei Pro- und Eukaryonten hochkonserviertes Protein, dessen Hauptaufgabe in der Glycolyse liegt. Als 2-Phospho-D-Glycerat Hydrolyase wandelt sie im vorletzten Schritt der Glycolyse 2-Phosphatglycerat unter Abspaltung

von Wasser in Phosphoenolpyruvat um (Berg *et al.*, 2003). Sie kommt bei beiden auch oberflächenassoziiert vor und spielt bei den verschiedensten Organismen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Plasminogen: Für verschiedene Bakterienspezies ist Enolase ein wichtiger Rezeptor für Plasminogen (Bergmann *et al.*, 2001; Lahteenmaki *et al.*, 2001; Pancholi and Fischetti, 1998). Der humanpathogene Pilz *Candida albicans* benutzt die Enolase ebenso als Plasminogenrezeptor (Crowe *et al.*, 2003) wie eine Vielzahl verschiedener humaner Zelltypen (Miles *et al.*, 1991; Pancholi, 2001). Bei einigen humanen Zelltypen kann Plasminogen sogar die Expression von Enolase induzieren (Sousa *et al.*, 2005).

Auch DnaK (67kDa) ist ein in Pro- und Eukaryonten hochkonserviertes Protein. Es dient als Chaperon der HSP70-Familie der korrekten Faltung und dem Transport von Proteinen (Bukau and Horwich, 1998). DnaK ist bei *Haemophilus influenzae* (Hartmann *et al.*, 2001) und bei *Listeria monocytogenes* (Schaumburg *et al.*, 2004) bereits als oberflächenassoziiertes Rezeptormolekül beschrieben worden. Bei *L. monocytogenes* konnte DnaK sogar als Rezeptor für Plasminogen identifiziert werden (Schaumburg *et al.*, 2004).

Peroxiredoxin konnte in der vorliegenden Arbeit als ein 24kDa großes Protein, das sowohl eine Peroxidase- als auch eine Redoxin-Domäne enthält (Pfam-Domänen: Glutaredoxin, AhpC-TSA), beschrieben werden. Sequenzanalysen und Hydrophobizitätsprofile legen nahe, dass Peroxiredoxin eine Transmembrandomäne enthält und damit als Oberflächenprotein angesehen werden kann. Auch ein Homolog von *Escherichia coli* ist wahrscheinlich oberflächenassoziiert (Bayer *et al.*, 1987; Nygren *et al.*, 1981).

Für Enolase und DnaK ist beschrieben, dass sie sich in Außenmembranvesikeln von Serogruppe-B-Meningokokken befinden, die während der Infektion in großen Mengen freigesetzt werden (Ferrari *et al.*, 2006). Mittels ELISA, Durchfluss-Zytometrie und Transmissionselektronenmikroskopie konnte in dieser Arbeit die Oberflächenlokalisierung aller drei Plasminogen-Rezeptoren bestätigt werden. Jedoch ist für keines der Proteine bislang ein Exportsignal oder ein Exportmechanismus identifiziert worden (Miles *et al.*, 1991), und es ist vollkommen unklar, wie sie nach außen gelangen. Für die Pneumokokken-Enolase ist ein Mechanismus beschrieben, nach dem die cytoplasmatischen Proteine durch Autolyse der Bakterien freigesetzt werden und dann an die Oberflächen von lebenden Pneumokokken reassoziieren (Bergmann *et al.*, 2001). Für *N. meningitidis* konnte dieser Mechanismus nicht bestätigt

werden. Bei der Enolase des Pilzes *Saccharomyces cerevisiae* wurde ein bislang unbekanntes Exportsignal in den ersten 169 Aminosäuren beschrieben (Lopez-Villar *et al.*, 2006). Möglicherweise gibt es ein bislang unbekanntes Exportsignal oder einen Exportweg für Proteine, der über die gesamte Evolution hinweg erhalten geblieben ist (Pancholi, 2001). Bei Meningokokken konnte ein vergleichbares Signal aber nicht gefunden werden, was aber auch nicht verwundern muss, da die beiden Organismen zwei unterschiedlichen Reichen angehören. Auch scheinen proteolytische Modifikationen der Enolase für den Exportvorgang keine Rolle zu spielen, da weder bei Eu- noch bei Prokaryonten über das N-terminale Methionin hinaus weitere Aminosäuren abgespalten werden (Lopez-Villar *et al.*, 2006; Schaumburg *et al.*, 2004). Die Analysen der vorliegenden Arbeit zeigten aber auch dass die identifizierten Rezeptormoleküle nur in geringen Mengen an der Zelloberfläche vorkommen. Da Plasminogen aber in relativ hohen Konzentrationen im Serum und den restlichen Körperflüssigkeiten vorliegt (~180µg/ml, 2µM) (Brandtzaeg *et al.*, 1990; Collen and Verstraete, 1975; Hajjar, 2003; Lahteenmaki *et al.*, 2005; Pollanen *et al.*, 1991), scheint die geringe Menge an Rezeptormolekülen ausreichend. Dies wird durch Ergebnisse von Untersuchungen an Pneumokokken gestützt, die ebenfalls nur eine geringe Menge an Plasminogen-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren (Kolberg *et al.*, 2006). Die Gesamtmenge der identifizierten drei Rezeptoren beträgt in etwa 10 000 Moleküle pro Bakterienzelle und entspricht damit der Menge des Pneumokokken Hauptrezeptors für Plasminogen (Enolase) (Kolberg *et al.*, 2006). Einige Aspekte, wie die Polymerisation der Proteinmoleküle *in vivo* konnte in die Berechnungen nicht mit einbezogen werden. Dennoch steht die Rezeptorzahl mit den von Ullberg *et al.* berechneten Werten von 13 000 bis 26 000 Rezeptormolekülen pro Bakterienzelle etwa im Einklang (Ullberg *et al.*, 1992), da nur drei von elf möglichen Plasminogen-Rezeptoren charakterisiert und untersucht werden konnten. Möglicherweise gibt es noch zusätzliche Plasminogen-Rezeptoren bei *Neisseria meningitidis*. In Wettbewerbsversuchen mit rekombinanten Rezeptorproteinen konnte die Spezifität der Plasminogenbindung für die drei untersuchten Rezeptor-Moleküle bestätigt werden.

Diese Bindung von Plasminogen an Meningokokken wurde im Folgenden näher charakterisiert. Ziel war es, mögliche Bindemotive und -domänen der Rezeptormoleküle auszumachen. Plasminogen bindet mit seinen Kringle-Domänen vorwiegend über Lysinreste, in erster Linie C-terminale Lysinreste, an Rezeptormoleküle (Bergmann *et al.*, 2001). Versuche mit ε-Aminocaprinsäure, einem

Lysin-Analogen, bestätigten, dass die Bindung von Plasminogen an die Meningokokken über Lysinreste der Rezeptoren vermittelt ist. Durch Behandlung der Bakterien mit Carboxypeptidase B, welche C-terminale Aminosäuren von membranständigen Proteinen abspaltet, konnte jedoch gezeigt werden, dass die endständigen Lysinreste für die Bindung von Plasminogen nicht essentiell sind. Das bestätigten auch Versuche, in denen C-terminale Lysinreste aller drei Rezeptorproteine gegen Alaninreste ausgetauscht wurden.

Vergleichbare Ergebnisse gibt es auch für den Plasminogen-Hauptrezeptor der Pneumokokken, die Enolase. Diese enthält ein internes lysinreiches Bindemotiv (FYDKERKVY), das für die Bindung von Plasminogen an die Pneumokokken essentiell ist (Bergmann et al., 2003). Bei den Meningokokken-Rezeptoren konnte kein solches Bindemotiv gefunden werden. Es gab ausschließlich schwache Homologien und einige lysinreiche Abschnitte, die aber nicht weiter charakterisiert wurden. Möglicherweise könnten hier Strukturanalysen näheren Aufschluss bringen.

Wenn man die nicht identifizierbaren Proteine aus den Plasminogen-Overlay Assays mit einbezieht ergibt sich daraus, dass Meningokokken Plasminogen über eine Vielzahl von Rezeptormolekülen an die Oberfläche rekrutieren können. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass noch weitere Proteine an der Bindung von Plasminogen beteiligt sind. Ein Hauptrezeptor, wie er zum Beispiel für die Pneumokokken beschrieben ist, wurde nicht identifiziert. Welchen Vorteil die Meningokokken davon haben mehr als einen Rezeptor zur Bindung von Plasminogen zu benutzen, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Um diese offenen Fragen zu beantworten, wird es nötig sein die restlichen Plasminogen-Rezeptoren von *Neisseria meningitidis* zu identifizieren. Da dies mit der angewandten Methode wiederholt gescheitert ist, wird man andere Methoden heranziehen müssen. Eine Möglichkeit wäre die Benutzung einer 2D-Gelelektrophorese zur besseren Auftrennung der Proteine vor dem Plasminogen-Overlay Assay. Des Weiteren könnten potentielle Rezeptoren mittels Immunpräzipitation mit Plasminogen aus einem Zelllysate isoliert und im Folgenden analysiert werden. Aufwändig wären Versuche mit Phagenbanken, bei denen jedes einzelne Meningokokkenprotein exprimiert und auf seine mögliche Interaktion mit Plasminogen untersucht werden könnte.



### 3.2.2 Einfluss von Faktoren der Meningokokken auf die Bindung von Plasminogen und die Aktivität des gebundenen Plasmins

Von dem Bakterium *Yersinia pestis* ist bekannt, dass sie kein Plasminogen zu Plasmin aktivieren können, wenn sie das O-Antigen des Lipopolysaccharids exprimieren (Kukkonen *et al.*, 2004). Für das Lipooligosaccharid (LOS) von *Neisseria meningitidis* ist beschrieben, dass durch verschiedene Immuntypen die Funktion von Adhäsinen und Rezeptoren beeinflusst werden kann (Virji and Hill, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte bei unkapselten Meningokokken nach einer vollkommenen Trunkierung des LOS eine signifikante Zunahme der gebundenen Plasminaktivität beobachtet werden. Natürlich vorkommende, phasenvariable LOS-Kürzungen der  $\alpha$ -Kette wie bei der *lgtA*-Mutante hatten jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung von Plasminogen und die Aktivität des gebundenen Plasmins. Damit sind Meningokokken im Gegensatz zu Yersinien oder Salmonellen in der Lage, Plasminogen in Gegenwart von LOS zu binden und zu Plasmin zu aktivieren.

Beim Vergleich der Plasminogenbindung und der gebundenen Plasminaktivität der untersuchten Serogruppen A, B, C, W-135 und Y zeigten sich weder bei bekapselten noch bei kapsellosen, isogenen Varianten signifikante Unterschiede zueinander. Das deutet darauf hin, dass alle Meningokokken in der Lage sind, Plasmin zu rekrutieren. Unbekapselte Stämme haben dabei etwa ein Drittel mehr Plasminogen gebunden, als die isogenen bekapselten Varianten. Das lässt sich zum Beispiel mit einer sterischen Blockierung der Plasminogen-Rezeptoren auf der Meningokokken-Oberfläche erklären. Dieser Effekt wurde für Meningokokken auch während der Infektion beschrieben, wenn bekapselte Isolate schlechter an Zielzellen binden, weil die membranständigen Adhäsine teilweise durch das Kapselpolysaccharid verdeckt sind (Bradley *et al.*, 2005; Giardina and Apicella, 1999; Tsai, 2001).

Ein umgekehrtes Bild zeigte sich bei der Aktivität des gebundenen Plasmins. Die bekapselten Meningokokken wiesen in etwa ein Drittel mehr Plasminaktivität auf als ihre kapsellosen Varianten. Da es sich bei den kapsellosen Varianten um isogene Mutanten der bekapselten Wildtypstämme handelt, liegt es nahe, dass für die signifikant höhere Plasminaktivität nur das Kapselpolysaccharid in Frage kommt. Ähnlich wie bei den Pneumokokken hat also die Kapsel keinen inhibitorischen Effekt auf die Akquirierung von oberflächengebundener Plasminaktivität (Bergmann *et al.*, 2001).

### 3.2.3 Funktionelle Aspekte der Plasminogenbindung an Meningokokken

Im Verlauf einer Infektion ist entscheidend, ob Meningokokken Plasminogen auch aus den Körperflüssigkeiten des Wirtes rekrutieren können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt, dass die Erreger in der Lage sind Plasminogen aus humanem Serum zu gewinnen.

Versuche mit Seren verschiedener Spezies (Mensch, Ratte, Pferd und Rind) haben ergeben, dass die Bindung von Plasminogen bei Meningokokken kein Mechanismus ist, der die Wirtsspezifität dieser Erreger erklären könnte. Die Bakterien konnten das Plasminogen der getesteten anderen Spezies genauso gut binden wie humanes Plasminogen.

Da Meningokokken während der Infektion auch mit bereits aktiviertem Plasmin in Berührung kommen können, wurde untersucht, ob sie dieses auch akquirieren können. Es konnte gezeigt werden, dass die Erreger aktiviertes Plasmin unabhängig von ihrem Kapselstatus vergleichbar gut binden. Auch die Aktivität von bereits aktiviertem und dann gebundenem Plasmin war mit jener vergleichbar, die zuerst gebundenes und dann aktiviertes Plasmin hatte.

Um die Protease Plasmin effektiv nutzen zu können, muss sie vor der Deaktivierung durch die körpereigenen Plasmin-Inhibitoren geschützt werden. Plasminaktivität ist im Körper streng reguliert und die Plasmin-Inhibitoren deaktivieren im Körper freies Plasmin sehr schnell. Die hauptsächlichen Plasmin-Inhibitoren sind das  $\alpha_2$ -Antiplasmin und das  $\alpha_2$ -Macroglobulin. Diese beiden zur Serpin-Familie gehörenden Proteine funktionieren, indem sie kovalent an das aktive Zentrum des Plasmins binden und die Protease damit dauerhaft deaktivieren (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Lahteenmaki *et al.*, 2001; Lijnen and Collen, 1995; Travis and Salvesen, 1983). Meningokokken schützen gebundenes Plasmin vor der Inaktivierung durch das  $\alpha_2$ -Antiplasmin. Während freies Plasmin sehr rasch durch den Plasmin-Inhibitor deaktiviert wurde, zeigte an Meningokokken gebundenes Plasmin nach Behandlung mit  $\alpha_2$ -Antiplasmin weiterhin Plasminaktivität. Nach diesen Ergebnissen sind Meningokokken nicht nur in die Lage, proteolytische Aktivität durch Bindung von Plasmin aus dem Serum zu akquirieren, sondern auch das gebundene Plasmin vor der Deaktivierung durch die körpereigenen Regulationssysteme zu schützen und damit lang anhaltende proteolytische Aktivität auf ihrer Oberfläche zu akkumulieren.

Die Fähigkeit auf Grund der gebundenen Plasminaktivität Komponenten von Extrazellulären Matrices und Basalmembranen degradieren zu können, könnte eine

wichtige Rolle bei der Besiedelung des Nasopharynx, wie auch bei der Pathogenese der Meningokokken spielen. Aber nicht nur die direkte Degradation von Komponenten ist mit der gebundenen Plasminaktivität möglich, sondern auch die Aktivierung von weiteren Proteasen. Diese Proteasen, zum Beispiel Collagenase, Elastase und Matrix-Metalloproteasen, beschleunigen und vervollständigen die Degradation der Extrazellulären Matrices und der Basalmembranen. Im Nasopharynx könnten die Meningokokken mit Hilfe der gebundenen Plasminaktivität die Mucosa degradieren und damit zum Beispiel die Krypten der Mandeln besiedeln. Für den Pilz *Candida albicans* wird genau dieser Mechanismus vermutet (Crowe *et al.*, 2003). Bei der Pathogenese müssen die Erreger bei der Überwindung der Epithel- oder der Endothelbarrieren die Basalmembranen und die extrazellulären Matrices durchdringen, die alle Gewebsbarrieren im Körper stützen und verstärken, bevor sie zu den Blutgefäßen bzw. ins Gehirn gelangen. Bisher ist nicht bekannt, wie Meningokokken diese Barrieren überwinden können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob das an Meningokokken gebundene Plasmin auch physiologische Aktivität besitzt und Substrate wie Fibrinogen spalten kann. Die Erreger waren in der Lage Fibrinogen zu degradieren, wobei es keinen Unterschied zwischen bekapselten und kapsellosen Meningokokken gab. Auch in Gegenwart von  $\alpha$ 2-Antiplasmin konnten die Bakterien nach Inkubation mit Plasmin Fibrinogen degradieren, während freies Plasmin schnell durch das  $\alpha$ 2-Antiplasmin inaktiviert wurde und es keine Spaltung von Fibrinogen gab.

Um die Beteiligung der Bindung von Plasmin an der Pathogenese von *Neisseria meningitidis* weiter zu untersuchen, sollten Versuche mit weiteren Komponenten von Basalmembranen und extrazellulären Matrices durchgeführt werden. Auch die Degradation von Modellsystemen für Basalmembranen oder Extrazelluläre Matrices sollte überprüft werden.

### **3.2.4 Analyse der Interaktionen von Meningokokken mit uPA**

Für humane Zellen ist beschrieben, dass sie nicht nur Plasminogen binden und aktivieren lassen können, sondern dass sie auch den Hauptaktivator von Plasminogen im Gewebe uPA binden können. Durch diese gleichzeitige Bindung von Plasminogen und Aktivator wird eine schnellere Aktivierung des Plasminogens erreicht. Als Rezeptor auf den Zellen dient ein eigener uPA-Rezeptor: uPAR oder auch CD87 genannt (Murphy and Gavrilovic, 1999; Murphy *et al.*, 1999; Plow *et al.*, 1999). Da

Meningokokken nicht in der Lage sind selbst Plasminogen zu aktivieren, wurde untersucht, ob sie mit uPA interagieren, mit dem Ergebnis, dass Meningokokken uPA binden können. Ähnlich wie bei der Plasminogenbindung, binden bekapselte Stämme weniger uPA als die unbekapselten, isogenen Varianten.

Das gebundene uPA war enzymatisch aktiv und konnte Plasminogen zu Plasmin aktivieren. Wieder analog zu der gebundenen Plasminaktivität zeigten die bekapselten Stämme eine höhere uPA-Aktivität als die unbekapselten isogenen Varianten. Bei der uPA-Aktivität konnte aber im Gegensatz zur Plasminaktivität kein Zusammenhang zwischen dem Kapselpolysaccharid und der erhöhten Aktivität hergestellt werden. Weitere Versuche sollten der Identifizierung und Analyse der uPA-Rezeptoren auf Meningokokken dienen. Wie viele uPA-Rezeptoren Meningokokken besitzen und ob es einen Hauptrezeptor gibt, bleiben zu klärende Fragen. Eine weitere zentrale Fragestellung ist, ob und welche Bedeutung die Interaktion der Bakterien mit uPA für die Pathogenese der Erreger hat, erst recht im Zusammenhang mit der Interaktion von *Neisseria meningitidis* mit Plasminogen.

### 3.2.5 Aussichten

Die Bindung von Plasminogen an Meningokokken könnte einer der bislang noch ungeklärten Mechanismen sein, mit denen die Bakterien zum Einen neue Wirte effektiv besiedeln können und zum Anderen während der Pathogenese in den Wirt vordringen. Die Fähigkeit durch die rekrutierten Komponenten des Fibrinolyse-Systems in der Lage zu sein, extrazelluläre Matrices und Basalmembranen zu degradieren gewinnt dadurch besondere Bedeutung, weil *N. meningitidis* auch an diese Strukturen adhären kann (Eberhard *et al.*, 1998). Die akquirierte proteolytische Aktivität der Meningokokken könnte zudem einen Schutz vor bakteriziden Antikörpern bringen und Faktoren des Komplementsystems degradieren um das Überleben der Erreger im Körper zu erleichtern. Oberflächen-assoziierte Plasminaktivität kann auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung der für eine Meningokokken-Infektion typischen Symptome sein, da Außenmembranvesikel, die in großer Anzahl von den Erregern freigesetzt werden, mindestens zwei der Plasminogen-Rezeptoren enthalten (Ferrari *et al.*, 2006). Die Bindung des Plasminogen-Aktivators uPA an Meningokokken hebt die Bedeutung der Interaktion mit Plasminogen weiter hervor. Um die Relevanz der Rekrutierung von Faktoren des Fibrinolyse-Systems auf die Kolonisation und die Pathogenese von *N.*

*meningitidis* weiter zu untersuchen, müssen neben den bereits erwähnten Ansätzen Zellkulturmodelle etabliert werden.

Komplexe Modellsysteme in denen die Mucosa und Epithel- sowie Endothelbarrieren mit Basalmembranen und Extrazellulären Matrices lebensnah dargestellt sind, sollten den nächsten Schritt in der weiteren Erforschung dieser Fragestellung darstellen.

## 4 Methoden

### 4.1 DNA-technische Methoden

#### 4.1.1 Präparation von Plasmid DNA

Die Aufreinigung von Plasmid DNA wurde mit dem „QIAGEN Plasmid Mini Kit“ nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

(Protokoll unter <http://www1.qiagen.com>)

#### 4.1.2 Präparation von chromosomaler DNA

Die Aufreinigung von chromosomaler DNA wurde mit dem „QIAamp DNA Mini Kit“ von QIAGEN nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

(Protokoll unter <http://www1.qiagen.com>)

#### 4.1.3 PCR – Polymerase Ketten Reaktion

Diese Methode dient zur Amplifikation von definierten DNA-Segmenten mit Hilfe von zwei Oligonukleotiden, die je die Anfangspunkte auf den entsprechenden Einzelsträngen definieren und einer hitzestabilen DNA-Polymerase.

Die Standardreaktionsansätze bestanden aus folgenden Komponenten: dH<sub>2</sub>O: 37,8µl; 10x Puffer:5µl; dNTP's [2mM]: 5µl; je Oligonukleotid [100µM]: 0,5µl; DNA-Polymerase [5 Units/µl]: 0,2µl; DNA-Template: 1µl. Je nach verwendetem PCR-Gerät wurden die Proben teilweise mit Mineralöl überschichtet.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion besteht aus einzelnen Zyklen, die sich in drei Teile untergliedern: der Denaturierung (94°C, 1min), dem Annealing (1min) und der Extension (72°C). Die Temperatur beim Annealing und die Zeit bei der Extension richten sich nach dem gewollten PCR-Produkt. Für die PCR's dieser Arbeit wurden jeweils 36 Zyklen gefahren.

#### 4.1.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ von QIAGEN nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

(Protokoll unter <http://www1.qiagen.com>)

#### 4.1.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Kontrolle von DNA-Fragmenten und Plasmiden nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau wurde die DNA mittels Elektrophorese in Agarose-Gelen aufgetrennt und durch eine Ethidiumbromidfärbung dargestellt.

#### 4.1.6 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen wurde mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ von QIAGEN nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

(Protokoll unter <http://www1.qiagen.com>)

#### 4.1.7 Bestimmen der DNA-Menge

Die DNA-Menge wurde bei 260nm in einem Photometer nach Angaben des Herstellers bestimmt oder sie wurde in einer Gel-Elektrophorese gegen einen Standard gemessen. Als Standard diente ein Marker, dessen DNA-Mengen pro Bande bekannt waren.

#### 4.1.8 Southern Blot

1. Depurinieren: zu blottendes Agarosegel in Puffer1 für 20min schütteln (Bromphenol → gelb).
2. Denaturieren: Gel in Puffer2 für 30min schütteln.

3. Neutralisieren: Gel in Puffer3 für 30min schütteln.
4. Transfer auf die Nylonmembran
5. Nylonmembran für 30 – 60min lufttrocknen lassen.
6. DNA auf der Membran durch UV-crosslinking fixieren.

#### 4.1.9 DNA-Dot Blot

Um Meningokokkenstämme auf bestimmte Gene zu untersuchen wurden DNA-Dot Blots mit entsprechenden DNA-Sonden durchgeführt.

1. Chromosomale DNA (1µg DNA) auf eine Nylonmembran auftropfen.
2. Membranen für 30 – 60min lufttrocknen lassen.
3. DNA auf der Membran durch UV-crosslinking fixieren.

#### 4.1.10 DNA-Colony Blot

Ähnlich wie beim DNA-Dot Blot wird beim DNA-Colony Blot die chromosomale DNA von Bakterien untersucht. Bei dieser Methode wird die DNA aber nicht vorher aus den Bakterien extrahiert.

1. Die zu untersuchenden Meningokokkenstämme werden am Abend zuvor auf Agarplatten ausplattiert. Dazu werden je 100µl Bakteriensuspension ( $OD_{600}$ : 0,1) gleichmäßig auf den Platten verteilt und o/n bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.
2. Am nächsten Morgen werden runde Filter (Nylon) auf den Agar gelegt und anschließend die Bakterienkolonien abgezogen. Die Lage des Filters auf Platte wird markiert.
3. Die Membranen lufttrocknen lassen.

Die Inkubationen der Schritte 4 – 7 finden auf Filterpapieren statt, die mit den entsprechenden Lösungen getränkt sind.

4. Membranen für 3min in Puffer 1 inkubieren.
5. Membranen für 5min mit Puffer 2 inkubieren.
6. Membranen für 5min mit Puffer 3 inkubieren.
7. Membranen mit 2x SSC oder 2x SSPE inkubieren.
8. Membranen für 30 – 60min lufttrocknen lassen.
9. DNA auf der Membran durch UV-crosslinking fixieren.
10. Membranen für 20min in Puffer 4 bei 57°C schütteln.
11. Membranen mit Papiertuch abwischen und anschließend für 30 – 60min lufttrocknen lassen.
12. DNA nochmals auf der Membran durch UV-crosslinking fixieren.
13. weiter mit der Hybridisierung (siehe Kapitel 4.1.11).

#### 4.1.11 Hybridisierung mit DNA-Sonden

Vorhybridisierung:

Zur Blockierung der unspezifischen Bindestellen: Membranen mit 10ml Vorhybridisierungs-Lsg. für 30 – 60min bei 42°C schütteln, danach Lsg. abkippen.

Hybridisierung:

Die Hybridisierung und Entwicklung wurde nach einem modifizierten Protokoll des „DIG Luminescent Detection Kit“ von Boehringer Mannheim durchgeführt.

1. 10ml DIG-markierte DNA-Sonde für 5min aufkochen und dann auf Eis abkühlen.
1. Zugabe der Sonde zu der Membran und schüttelnde Inkubation bei 42°C o/n.
2. Membran 5min mit 2x SSC, 0,1% SDS bei RT waschen.
3. Punkt 3 wiederholen.
4. Membran 15min mit 0,1 SSC, 0,1% SDS bei 68°C schütteln.
5. Punkt 5 wiederholen.

Entwicklung:

Nachweis der Digoxigenin-markierten DNA mit CSPD bei RT.

1. Membran 5min mit Waschpuffer waschen.
2. Membran 30min in Puffer 2 schütteln.
3. Membran 30min in Antikörper-Lsg. inkubieren.
4. Membran 15min mit Waschpuffer waschen.
5. Punkt 4 wiederholen.
6. Membran 2 – 5min in Puffer3 schütteln, danach Puffer verwerfen.

7. Zugabe von CSPD in Puffer3 (1:100) für 5min.
8. Membran abtropfen lassen und in Frischhaltefolie einwickeln. Für 15min bei 37°C im Brutschrank inkubieren.
9. Röntgenfilm für 20min – 1h auflegen und anschließend entwickeln.

#### 4.1.12 Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden

Für die Hybridisierung und den anschließenden Nachweis werden mit Digoxigenin-markierte DNA-Sonden benötigt.

1. Zur Markierung werden 10ng – 3µg aufgereinigtes DNA-Fragment verwendet.
2. DNA in insgesamt 15µl dH<sub>2</sub>O aufnehmen.
3. DNA für 10min bei 95°C denaturieren und anschließend auf Eis abkühlen.
4. Markierungsreaktion:

|   |     |                           |
|---|-----|---------------------------|
|   |     | denaturierte DNA          |
| + | 2µl | Hexanukleotid-Gemisch     |
| + | 2µl | dNTP – Markierungsgemisch |
| + | 1µl | Dilnow - Enzym            |

Ansatz für mind. 1h, besser o/n bei 37°C inkubieren.

5. Zugabe von 2µl 0,2M EDTA (pH 8,0) um die Reaktion zu stoppen.
6. Zugabe von 2,5µl Natriumacetat (3M, pH 4,5) und 75µl eiskaltem Ethanol. Inkubation mind. 30min bei -70°C.
7. Ansatz zentrifugieren (12.000rpm, 1min, 4°C), Überstand verwerfen.
8. Niederschlag mit 1ml 70% Ethanol (4°C) waschen.
9. Punkt 7 wiederholen.
10. Pellet unter Vakuum trocknen lassen.
11. DNA in TE-Puffer lösen.
12. Quantifizierung der DIG-DNA mittels DNA-Dot Blot: verschiedene Verdünnungen gegen eine Verdünnungsreihe einer Kontroll-DNA auftropfen (je 1µl) und weiter nach Protokoll (siehe Protokoll 4.1.9).
13. Zugabe von ~ 100mg markierter DNA zu 10ml Hybridisierungslösung.

#### 4.1.13 Strippen von DNA Blots

Sowohl DNA-Dot Blots, wie auch Southern Blots oder DNA-Colony Blots können nach einer Hybridisierung aufbereitet werden, um sie wieder für weitere Sonden benutzen zu können. Dafür müssen die „alten“ Sonden entfernt werden.

1. Membranen für 15min in 0,2M NaOH / 0,1% SDS bei 37°C schütteln.
2. Punkt 1 wiederholen.
3. Membranen in 2x SSC waschen.
4. Die Membranen können von nun an für mehrere Monate in 2x SSC oder 2x SSPE gelagert werden.

#### 4.1.14 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen und Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-modifizierende Enzyme (NEB) wurden nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### 4.1.15 Fällung von DNA

Die DNA wurde mit Natriumacetat (3M, pH 4,5) gefällt, mit Ethanol gereinigt und nach dem Trocknen in TE-Puffer wieder aufgenommen

#### 4.1.16 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung des Inserts basierte auf der „Kettenabbruch“-Methode von Sanger (Sanger, 1975). Die Sequenzreaktionen wurden unter Verwendung von BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kits (Applied Biosystems) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Als Template diente Insert-tragende (200-500 ng) Plasmid-DNA oder PCR-Fragmente (100 ng). Dazu wurden 10 pmol des jeweiligen Sequenzierprimers gegeben und mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 8 µl aufgefüllt. Die Sequenzierung auf



dem ABI Prism 377 DNA-Sequenzierautomat wurde vom DNA-Labor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie durchgeführt.

## 4.2 Protein-chemischen Methoden

### 4.2.1 Herstellung von Meningokokken Zelllysaten

1. Die jeweiligen Bakterienstämme werden über Nacht auf Agar-Platten inkubiert (siehe Bakterienkultur).
2. Bakterien am nächsten Tag mit einem Wattetupfer von der Platte nehmen und in 1x PBS einreiben.
3. Die Optische Dichte ( $OD_{600}$ ) pro Stamm auf einen Wert von 1 in 1ml 1x PBS einstellen.
4. Die Bakteriensuspension für 10min bei 100°C aufkochen.
5. Die Zelllysate bei -20°C lagern.

### 4.2.2 LPS Präparation

1. Die jeweiligen Bakterienstämme werden über Nacht auf Agar-Platten inkubiert (siehe Bakterienkultur).
2. Bakterien am nächsten Tag mit einem Wattetupfer von der Platte nehmen und in 1x PBS einreiben.
3.  $OD_{600}$  bestimmen und in 1ml eiskaltem 1x PBS auf 0,6 einstellen.
4. Bakterien zentrifugieren (2min, 12.000rpm), Überstand verwerfen.
5. Pellet in 50 $\mu$ l Lysepuffer aufnehmen.
6. Ansatz für 10min bei 100°C kochen und für weitere 10min in einem 60°C Wasserbad abkühlen lassen.
7. Zugabe von 125 $\mu$ g Proteinase K pro Ansatz und Inkubation für 1h bei 60°C.
8. Proben bei -20°C lagern, zur Kontrolle 5 $\mu$ l, 2 $\mu$ l und 1 $\mu$ l Probe auf ein Tricin-Gel auftragen und hinterher mit Silbernitrat färben.

### 4.2.3 Aufreinigung von Außenmembranproteinen von Meningokokken

1. Die jeweiligen Bakterienstämme werden über Nacht auf Agar-Platten inkubiert (siehe Bakterienkultur).
2. Die kompletten Bakterien am nächsten Tag mit einem Wattetupfer von der Platte nehmen und in 11 PPM<sup>+</sup> einreiben.
3. Bakterien für 4h bei 37°C und 200rpm inkubieren.
4. Zentrifugenbecher leer wiegen und Gewicht notieren.
5. Bakterien zentrifugieren (15min, 12.000g, 4°C), Überstand verwerfen.
6. Bakterien wiegen und Gewicht notieren.
7. Pellet für mind. 30min unter Flow trocknen lassen.
8. 10g Bakterien (Nassgewicht) in 200ml LiCl / Li-Acetat resuspendieren.
9. Zugabe von 20ml Glasperlen und 2h bei 45°C und 200rpm in einem Glaskolben inkubieren.
10. Überstand abnehmen und zentrifugieren (15min, 12.000g, 4°C).
11. Überstand abnehmen und in „Quick Seal tubes“ umfüllen und gut austarieren.
12. Ultrazentrifugieren (2h, 260.000g, 4°C), Überstand verwerfen.
13. Pellets in 1x PBS aufnehmen und poolen (Gesamtmenge 2 – 3ml).
14. Proben bei -20°C lagern, zur Kontrolle Proteinmengenbestimmung und Reinheitskontrolle mit einem 12,5% SDS-Gel.

### 4.2.4 SDS- Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Vorbereitung werden die Glasplatten zusammengebaut und dann das Trenngel und anschließend das Sammelgel gegossen. Nach dem Aushärten der Gele werden diese in die Laufkammer eingespannt und die Kammer mit dem Laufpuffer befüllt. Vor dem Auftragen der Proben werden noch alle Luftblasen unter den Gelen beseitigt und die Taschen gespült. Die Proben werden mit Probenpuffer vermischt und aufgekocht. Die Proben werden auf das Gel aufgetragen und das Gel an die Stromversorgung angeschlossen. Für das Sammelgel werden 10mA und für das Trenngel werden 20mA pro Gel angelegt. Nachdem die Proben durch das Gel gelaufen sind, können die Gele entweder direkt gefärbt werden (Coomassie- oder Silber-Färbung), für einen Western Blot verwendet werden und bestimmte Proteine

können aus den Gelen aufgereinigt werden. Für native Gele wurde im Gel das SDS weggelassen und im Probenpuffer das SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol. Das restliche Procedere war gleich.

#### 4.2.5 Tricin Gel

Herstellung der Gele:

1. Die Gele werden ähnlich wie für die SDS-Gel-Elektrophorese gegossen. Für Gele zur Aufreinigung von LPS sollten die Platten zuvor mit konz. Salpetersäure gereinigt werden um Kontaminationen mit Proteinen zu vermeiden. Die Glasplatten müssen gründlich vor dem Einsatz gespült werden.
2. Anschließend werden die Platten zusammengesetzt wie bei den SDS-Gelen.
3. Die Lösungen für die Tricin-Gele werden angesetzt:

| Einzelne<br>Komponenten | Zusammensetzung je nach Gel |                    |                   |
|-------------------------|-----------------------------|--------------------|-------------------|
|                         | Trenngel<br>(16,5%)         | Spacergel<br>(10%) | Sammelgel<br>(4%) |
| Acrylamid-Lsg. 1        | 2,5ml                       |                    |                   |
| Acrylamid-Lsg. 2        |                             | 0,6ml              | 0,25ml            |
| dH <sub>2</sub> O       | 1,5ml                       | 1,4ml              | 2,1ml             |
| Gelpuffer               | 2,5ml                       | 1ml                | 0,78ml            |
| Glycerin 87%            | 1ml                         |                    |                   |
| APS 10%                 | 75 $\mu$ l                  | 30 $\mu$ l         | 30 $\mu$ l        |
| TEMED                   | 7,5 $\mu$ l                 | 3 $\mu$ l          | 3 $\mu$ l         |

4. Vor dem Überschichten des Trenngels mit Butanol wird dieses mit ca. 500 $\mu$ l Spacergel überschichtet.
5. Die weiteren Vorbereitungen laufen analog zur SDS-Gel-Elektrophorese (vgl. Kapitel 4.2.4). Als weitere Unterschied wird in der mittleren Kammer Kathodenpuffer eingefüllt und in den äußeren Kammern Anodenpuffer.

Gel-Elektrophorese:

1. Die Proteinproben ( $\sim 1\mu$ g Protein) werden mit Tricin-Gel-Probenpuffer vermischt und auf ein Gesamtvolumen von 10 – 15 $\mu$ l gebracht.
2. Die Proteinproben werden für 5min bei 100°C aufgeköcht, auf Eis abgekühlt und anschließend kurz zentrifugiert (15sec, 12.000rpm).
3. Pro Tasche des vorbereiteten SDS-Gels werden 10 – 15 $\mu$ l der Proben gegeben.
4. Die Gelkammer wird an die Stromversorgung angeschlossen und die Elektrophorese wird gestartet:
5. Für jedes Gel gilt kumulativ:
  - a. Sammelgel : 10mA
  - b. Trenngel: 20 – 40mA; 70 – 100V

#### 4.2.6 Coomassie-Färbung

1. Sammelgele aus der SDS-Gel-Elektrophorese entfernen und verwerfen.
2. Die Trenngele für 1 – 2h in Coomassie-Lsg. schütteln. Die Coomassie-Lsg. kann danach wiederverwendet werden.
3. Gele in dH<sub>2</sub>O waschen und anschließend entfärben (Entfärberlösung)

#### 4.2.7 Silber-Färbung

1. Sammelgele von den SDS-Gelen entfernen.
2. Gele für 1 – 2h in Fixierer schütteln
3. Gele für 10min in 50% Ethanol schütteln.
4. Schritt 3 2x wiederholen.
5. Gele kurz mit dH<sub>2</sub>O spülen.
6. Gele für 1min mit Lsg. 1 inkubieren.
7. Gele kurz mit dH<sub>2</sub>O spülen.
8. Gele für 20min in Lsg. 2 schütteln.
9. Gele kurz mit dH<sub>2</sub>O spülen.
10. Gele in Lsg. 3 inkubieren bis die Banden sichtbar werden.

11. Reaktion mit Fixierer stoppen.
12. Die Gele können nun dokumentiert oder getrocknet werden.

#### 4.2.8 LPS Silber-Färbung

Diese Silberfärbung wird für Tricin-Gele verwendet. Da diese Methode sehr empfindlich ist, sollten ausschließlich Einmalartikel für die Lösungen und die eigentliche Reaktion verwendet werden. Das Tragen von Handschuhen ist obligat.

1. Sammel- und Spacergel vorsichtig entfernen.
2. Gele für mind. 1h oder o/n bei RT in Fixierer schütteln.
3. Gele für 5 – 10min in Oxidierer schütteln.
4. Gele 15min in jeweils einer neuen Schale in dH<sub>2</sub>O waschen.
5. Schritt 4 2x wiederholen.
6. Gele für 10min mit frisch zubereiteter Silbernitratlösung inkubieren.
7. Gele 10min in jeweils einer neuen Schale in dH<sub>2</sub>O waschen.
8. Schritt 7 2x wiederholen.
9. Gele mit ~ 100µl Entwickler unter leichtem schütteln inkubieren bis die Banden gut sichtbar sind, dann Entwickler abkippen.
10. Reaktion durch Zugabe von 5% Essigsäure abstoppen. Gele mit 5% Essigsäure und dH<sub>2</sub>O spülen.
11. Trocknen der Gele: Gele in Trockenlsg. schrumpfen lassen und dann in dieser Lösung mit Einmachfolie auf Rahmen aufziehen. o/n lufttrocknen lassen.

#### 4.2.9 Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Produktion der rekombinanten Proteine wurde nach dem „QIAexpressionist“ (5. Auflage, 2003) von QIAGEN nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. (Protokolle unter <http://www1.qiagen.com>)

Die Induktion der rekombinanten Proteine wurde nach Protokoll 6 durchgeführt.

Die Aufreinigung der 6x His-tag Proteine wurde nach Protokoll 17 durchgeführt.

#### 4.2.10 Herstellung von Antikörpern gegen rekombinante Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Antikörper gegen die Meningokokken-Proteine Enolase, DnaK und Peroxiredoxin hergestellt. Dafür wurden Kaninchen mit den entsprechenden Proteinen immunisiert. Die Immunisierung der Tiere wurde von der Firma ImmunoGlobe Antikörpertechnik (Himmelstadt, Deutschland) durchgeführt.

Die erhaltenen Antiseren wurden anschließend im Western Blot auf ihre Spezifität und Sensitivität getestet.

#### 4.2.11 Messung des Proteingehaltes von Lösungen

Die Bestimmung der Proteinmenge wurde mit dem „BCA Protein Assay Reagent Kit“ von Pierce nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde immer das Protokoll für den „microplate assay“ verwendet.

#### 4.2.12 Substrat Assay-Experimente

##### 4.2.12.1 Substrat Assay zur Bestimmung der Aktivität von Plasmin

1. Nach dem Anwachsen der Bakterien in PPM<sup>+</sup> die OD<sub>600</sub> auf 0,1 – 0,2 in 5 – 10ml frischem PPM<sup>+</sup> einstellen und Bakterien für 1 – 2h bei 37°C und 200rpm inkubieren (bis OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,7).
2. OD bestimmen und Bakterienzahl auf 5x 10<sup>8</sup> pro Ansatz einstellen (≈OD<sub>600</sub> von 0,5 in 1ml).
3. Bakterien pelletieren (5min, 3.000g, RT), Überstand verwerfen.
4. Pellet in 100µl PBS/T mit 5µg Plasmin resuspendieren.
5. Bakterien für 30min bei 37°C und 200rpm inkubieren.
6. Ansätze zentrifugieren (5min, 3.000g, RT), Überstand verwerfen.

7. Pellet mit 500µl PBS/T waschen.
8. Schritte 8 & 9 1x wiederholen.
9. Pellet in 100µl PBS/T resuspendieren.
10. Zugabe von 100µl Substrat-Lsg. (100µg Substrat S-2251) pro Ansatz.
11. Bakterien für 1h bei 37°C und 200rpm inkubieren. (Ab diesem Schritt Kontrollen mit 5µg Pln + 100µg Substrat als Positivkontrolle und nur Substrat als Negativkontrolle mitlaufen lassen)
12. Ansätze zentrifugieren (5min, 3.000g, RT).
13. Vom Überstand eines jeden Ansatzes 150µl abnehmen und in eine Mikrotiterplatte überführen.
14. Die Mikrotiterplatte in einem ELISA-Reader bei 405nm auswerten.

#### 4.2.12.2 Substrat Assay zur Bestimmung der Plasminaktivität von Plasminogen

Analog zu Protokoll 4.2.12.1 mit folgenden Änderungen:

1. Bei Punkt 4 werden 5µg Plasminogen verwendet.
2. Bei Punkt 9 das Pellet in 100µl PBS/T mit 1,5 – 1,7U uPA resuspendieren und die Bakterien anschließend für 30min bei 37°C und 200rpm inkubieren. Dann weiter mit Punkt 10.

#### 4.2.12.3 Substrat Assay zur Bestimmung der uPA-Aktivität

Analog zu Protokoll 4.2.12.1 mit folgenden Änderungen:

1. Bei Punkt 4 Pellet in 100µl PBS/T mit 20U uPA resuspendieren.
2. weiter ab Punkt 5 wie in Kapitel 4.2.12.1. Als Substrat wird bei Versuchen mit uPA S-2444 in derselben Konzentration verwendet.

#### 4.2.12.4 Substrat Assay zur Bestimmung der gebundenen Plasminaktivität aus Humanserum

Analog zu dem Versuchsprotokoll in Kapitel 4.2.12.2, nur dass bei Punkt 4 die Bakterien mit 100µl hitzeinaktiviertem Humanserum inkubiert werden.

#### 4.2.12.5 Substrat Assay zur Bestimmung des Einflusses von $\alpha$ 2-Antiplasmin auf die Aktivität von Plasmin

Analog zu dem Versuchsprotokoll in Kapitel 4.2.12.1, nur dass bei der Zugabe vom Substrat 1U  $\alpha$ 2-antiplasmin dazugegeben wurde.

### 4.2.13 Degradation von Fibrinogen

#### 4.2.13.1 Degradation von Fibrinogen durch gebundenes Plasmin

1. Nach dem Anwachsen der Bakterien in PPM<sup>+</sup> die OD<sub>600</sub> auf 0,1 – 0,2 in 5 – 10ml frischem PPM<sup>+</sup> einstellen und Bakterien für 1 – 2h bei 37°C und 200rpm inkubieren (bis OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,7).
2. OD bestimmen und Bakterienzahl auf  $1 \times 10^8$  pro Ansatz einstellen ( $\approx$ OD<sub>600</sub> von 0,1 in 1ml).
3. Bakterien pelletieren (5min, 3.000g, RT), Überstand verwerfen.
4. Pellet in 100µl PBS/T mit 5µg Plasmin resuspendieren.
5. Bakterien für 30min bei 37°C und 200rpm inkubieren.
6. Ansätze zentrifugieren (5min, 3.000g, RT), Überstand verwerfen.
7. Pellet mit 500µl PBS/T waschen.
8. Schritte 8 & 9 1x wiederholen.
9. Pellet in 100µl PBS/T mit 10µg Fibrinogen resuspendieren.
10. Vier verschiedene Ansatzreihen:
  - Fibrinogen
  - Fibrinogen + Plasmin
  - Fibrinogen + Bakterien
  - Fibrinogen + Bakterien + Plasmin
11. Ansätze für bis zu 2h bei 37°C und 200rpm inkubieren. Sofort nach dem ansetzen, nach 30min, nach 60min und nach 120min Ansätze entnehmen und die Reaktion durch Zugabe von 20µl 5x SDS-Probenpuffer stoppen.
12. Von jedem Ansatz 15µl auf ein SDS-Gel auftragen und durch die Elektrophorese auftrennen.
13. Die Proteine durch einen Western Blot auf Nitrocellulose-Membranen übertragen.

14. Das Fibrinogen wurde mit einem Anti-Fibrinogen Antikörper (1:2500) und einem Anti-Ziege-Pox Sekundärantikörper (1:7500) in PBS/T detektiert.
15. Nachweis mittels ECL.

#### 4.2.13.2 Degradation von Fibrinogen durch gebundenes Plasminogen

Analog zu Protokoll 4.2.13.1 mit folgenden Änderungen:

1. Bei Punkt 4 werden 5µg Plasminogen verwendet.
2. Bei Punkt 9 das Pellet in 100µl PBS/T mit 10µg Fibrinogen und 1,5 – 1,7U uPA resuspendieren und die Bakterien anschließend für 30min bei 37°C und 200rpm inkubieren. Dann weiter mit Punkt 10.

#### 4.2.13.3 Degradation von Fibrinogen durch Plasminogen / Plasmin unter Einfluss von $\alpha$ 2-Antiplasmin

Analog zu den Protokollen in den Kapiteln 4.2.13.1 & 4.2.12.2, nur dass zu zum Fibrinogen noch 1U  $\alpha$ 2-Antiplasmin dazugegeben wurde. Auch die vier Anstzreihen waren anders:

- Fibrinogen + Plasmin
- Fibrinogen + Plasmin +  $\alpha$ 2-Antiplasmin
- Fibrinogen + Bakterien + Plasmin
- Fibrinogen + Bakterien + Plasmin +  $\alpha$ 2-Antiplasmin

#### 4.2.14 Hitzeinaktivierung von Serum

Das Serum wird für 30min bei 57°C in einem Wasserbad inkubiert und danach bei -20°C gelagert.

#### 4.2.15 Aufreinigung der IgG-Fraktion aus Antiseren

Für die FACS-Analysen muß die IgG-Fraktion aufgereinigt sein, um das Hintergrundsignal so gering wie möglich zu halten.

1. ProteinA-Sepharose mit Puffer A für 1 – 2h einquellen lassen, dann in die Säulen (250µl pro Säule) füllen.
2. Säulen mit 5ml Puffer A spülen.
3. 500µl Antiserum über die Säule geben.
4. Säulen mit 5ml Puffer A spülen.
5. Die gebundenen Antikörper mit 750µl Puffer B eluieren.
6. Die Säulen wieder mit 5ml Puffer A äquilibrieren und bei 4°C lagern.
7. Die Eluate auf pH 7 einstellen und auf Eis lagern.

### 4.3 Immunologische Nachweismethoden

#### 4.3.1 Western Blot

1. Vor dem Western Blot wurden von den Gelen die Sammelgele entfernt und verworfen.
2. Den Transfer für 1h mit 300mA laufen lassen.
3. Alternativ kann die Membran jetzt mit Ponceau S gefärbt werden, um den Transfer zu überprüfen. Anschließend den Blot mit dH<sub>2</sub>O spülen.
4. Den Blot o/n in PBS/T mit 5% Magermilch bei 4°C auf dem Schüttler absättigen.
5. Die Membran mit dem Primärantikörper in PBS/T für 1h schütteln und anschließend 3x 5min mit PBS/T waschen.
6. Die Membran mit dem Sekundärantikörper in PBS/T für 45min schütteln und anschließend 3x 5min mit PBS/T waschen.
7. Membranen auf Glasplatten legen und mit ECL-Reagenz überschichten (Für einen Western Blot ~2ml). Original-Reagenz für 1min inkubieren, selbstangesetztes Reagenz für 2min inkubieren.
8. Blots in Frischhaltefolie einpacken und Röntgenfilme im Dunkeln auflegen (15sec, 30sec, 1min, etc.)

### 4.3.2 Overlay Assays

Die Overlay Assays bestehen aus gewöhnlichen SDS-Gel-Elektrophoresen und einem abgeänderten Western Blot.

Abwandlungen zum Western Blot (vgl. Kapitel 4.3.1):

1. Bis Punkt 4 läuft es analog zum normalen Western Blot.
2. Für den Plasminogen-Overlay Assay wird der Blot für 1h mit 8µg Plasminogen / ml (5ml) und für den uPA-Overlay Assay mit 50U uPA / ml in PBS/T bei 37°C und schütteln inkubiert.
3. Die Membran wird 2x mit PBS/T gewaschen.
4. Danach geht es weiter mit Punkt 5 vom Western Blot-Protokoll. Als Primäntikörper wird entweder der Ziegen Anti-Plasminogen Antikörper (1:1500) oder der Maus Anti-uPA Antikörper (1:500) verwendet.

### 4.3.3 ELISA-Experimente

#### 4.3.3.1 ELISA zur Bestimmung des Kapselstatus von Meningokokken

1. Die Näpfe der Mikrotiterplatte werden vor Gebrauch mit 50µl einer Poly-D-Lysin Lsg. (25µg/ml) für 30min bei 37°C vorbehandelt und anschließend 3x mit PBS gewaschen.
2. Nach dem Anwachsen der Bakterien in PPM<sup>+</sup> die OD<sub>600</sub> auf 0,2 in 1ml 1x PBS einstellen.
3. Von dieser Suspension werden 25µl (5x 10<sup>6</sup> Bakterien) pro Napf einer Mikrotiterplatte verteilt und die Bakterien 1h bei 37°C anlagern lassen.
4. Zugabe von 100µl 0,05% Glutaraldehyd in 1x PBS für 10min bei 37°C um die Bakterien zu fixieren.
5. 3x mit 1x PBS waschen.
6. Die Näpfe mit 100µl 1% BSA in 1x PBS für 30min bei 37°C blockieren.
7. 3x mit 1xPBS waschen.
8. Zugabe von 20µl der Primäntikörperlösung für 1h bei 37°C.
9. 3x mit 1xPBS waschen.
10. Zugabe von 20µl der Sekundäntikörperlösung für 45min bei 37°C
11. 3x mit 1xPBS waschen.
12. Zugabe von 20µl der ABTS-Substrat-Lsg. (1mg/ml) in PBS und Inkubation bei 37°C
13. Nach 10 und 20min wurde die Adsorption bei 414nm in einem ELISA-Reader gemessen.

#### 4.3.3.2 ELISA zur Bestimmung der gebundenen Plasmin- oder Plasminogenmenge

1. Analog zu Protokoll 4.3.3.1 Punkte 2 bis 7.
2. Zugabe von 25µl Plasminogen-Lsg. (80µl Plg/ml in PBS/T) für 30min bei 37°C.
3. 3x mit 1xPBS waschen.
4. Zugabe von 25µl der Primäntikörperlösung (Ziege α-Plasminogen; 1:500) für 1h bei 37°C.
5. 3x mit 1xPBS waschen.
6. Zugabe von 25µl der Sekundäntikörperlösung (Anti-Ziege-Pox; 1:7500) für 45min bei 37°C
7. 3x mit 1xPBS waschen.
8. Zugabe von 20 – 25µl der ABTS-Substrat-Lsg. (1mg/ml) und Inkubation bei 37°C
9. Nach 10 und 20min auslesen der Reaktion in einem ELISA-Reader bei 414nm.
10. Als Negativkontrolle dient ein Ansatz ohne Plasminogen.

#### 4.3.3.3 ELISA zur Bestimmung der gebundenen uPA-Menge

Analog zum Protokoll von Kapitel 4.3.4.2 mit folgenden Änderungen:

1. Bei Punkt 2 werden 25µl uPA-Lsg. (10U uPA/ml PBS/T) eingesetzt.
2. Der Primäntikörper (Maus α-uPA; 1:200) und Sekundäntikörper (Anti-Maus-Pox; 1:1250) sind auch andere.
3. Als Negativkontrolle dient ein Ansatz ohne uPA.

#### 4.3.3.4 ELISA zur Bestimmung der gebundenen Plasminogenmenge aus Humanserum

Analog zum Protokoll von Kapitel 4.3.4.2 mit folgende Änderungen:

1. Bei Punkt 2 werden 25µl Humanserum eingesetzt.
2. Als Negativkontrolle dient ein Ansatz ohne HS

#### 4.3.3.5 ELISA zur Bestimmung der kompetitiven Inhibierung

Analog zum Protokoll von Kapitel 4.3.4.2 mit folgende Änderungen:

1. Bei Punkt 2 werden 25µl Plasminogen-Lsg. (2µgPlg/ml in PBS/T) mit einem 50, 100 oder 200fachen molaren Überschuss eines rekombinanten Proteins eingesetzt.
2. Als Kontrollen dienen ein Ansatz ohne rekombinante Proteine (Positivkontrolle) und ein Ansatz ohne Plg und rekombinante Proteine (Negativkontrolle).

#### 4.3.3.6 ELISA zur Bestimmung der oberflächenassoziierten Plasminogen-Rezeptormoleküle

1. Nach dem Anwachsen der Bakterien in PPM<sup>+</sup> die OD<sub>600</sub> auf 0,1 – 0,2 in 10ml frischem PPM<sup>+</sup> einstellen und Bakterien für 1 – 2h bei 37°C und 200rpm inkubieren (bis OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,7).
2. OD bestimmen und Bakterienzahl auf 2x 10<sup>8</sup> in PPM<sup>+</sup> einstellen (≈OD<sub>600</sub> von 0,2 in 1ml).
3. 50µl dieser Suspension pro Napf auf eine Mikrotiterplatte geben und für 3h bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubieren.
4. Parallel einen Standard von 1pmol, 0,3pmol, 0,1pmol, 30fmol, 10fmol und 3fmol des zu testenden Proteins erstellen.
5. Zugabe von 100µl 3,7% Formaldehyd in PBS pro Napf für 5min bei RT.
6. 3x mit 1x PBS waschen.
7. Zugabe von 50µl 5% Magermilch in PBS/0,5% Tween<sub>20</sub> für 30min bei 37°C zum Blockieren.
8. Zugabe der Antiseren (1:200) in 5% Magermilch in PBS/0,5% Tween<sub>20</sub> für 1,5h bei 37°C.
9. 2x mit PBS/0,5% Tween<sub>20</sub> waschen.
10. Zugabe des Sekundäntikörpers (Anti-Kaninchen-Pox, 1:7500) in 5% Magermilch in PBS/0,5% Tween<sub>20</sub> für 1h bei 37°C.
11. 3x mit PBS/0,5% Tween<sub>20</sub> waschen.
12. 2x mit 1x PBS waschen.
13. Zugabe von 50ml ABTS Substrat-Lsg. und Inkubation bei 37°C.
14. Die Adsorption wurde nach 5, 10 und 15min bei 414nm in einem ELISA-Reader gemessen.

#### 4.3.4 Flow Zytometrie (FACS)

1. Nach dem Anwachsen der Bakterien in PPM<sup>+</sup> die OD<sub>600</sub> auf 0,1 – 0,2 in 10ml frischem PPM<sup>+</sup> einstellen und Bakterien für 1 – 2h bei 37°C und 200rpm inkubieren (bis OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,7).
2. OD bestimmen und Bakterienzahl auf 5x 10<sup>7</sup> pro Ansatz einstellen (≈OD<sub>600</sub> von 0,05 in 1ml).
3. Bakterien pelletieren (5min, 3.000g, RT), Überstand verwerfen.

Für Plasminogen-Inkubation:

4. Pellet in 100µl PBS/T mit 5µg Plasminogen resuspendieren.
5. Bakterien für 30min bei 37°C und 200rpm inkubieren.
6. Ansätze zentrifugieren (5min, 3.000g, RT), Überstand verwerfen.
7. Pellet mit 500µl PBS waschen.
8. Schritte 8 & 9 1x wiederholen.
9. Pellet in 100µl PBS/BSA resuspendieren und für 10min bei 37°C und 200rpm inkubieren.
10. Ansätze zentrifugieren (5min, 3.000g, RT), Überstand verwerfen
11. Pellets in 100µl PBS/BSA mit Anti-Plasmin Antikörper (2mg/ml) aufnehmen und für 45min bei 37°C und 200rpm inkubieren.
12. Bakterien mit 500µl PBS waschen.
13. Pellets in 100µl PBS/BSA mit Anti-Ziege-FITC Antikörper (1:100) aufnehmen und im dunklen für 45min bei 37°C und 200rpm inkubieren.
14. Pellets 2x mit 500µl PBS waschen.
15. Pellets in 200µl 3,7% Formaldehyd in PBS aufnehmen und für mind. 20min bei 4°C inkubieren.

Für Oberflächen-assoziierte Proteine:

6. Pellet in 100µl PBS/BSA resuspendieren und für 10min bei 37°C und 200rpm inkubieren.
7. Ansätze zentrifugieren (5min, 3.000g, RT), Überstand verwerfen
8. Pellets in 100µl PBS/BSA mit gereinigten IgG-Fraktionen (2mg/ml) aufnehmen und für 45min bei 37°C und 200rpm inkubieren.
9. Bakterien mit 500µl PBS waschen.
10. Pellets in 100µl PBS/BSA mit Anti-Maus-FITC Antikörper (1:100) oder Anti-Kaninchen-FITC Antikörper (1:150) aufnehmen und im dunklen für 45min bei 37°C und 200rpm inkubieren.

11. Pellets 2x mit 500µl PBS waschen.
12. Pellets in 200µl 3,7% Formaldehyd in PBS aufnehmen und für mind. 20min bei 4°C inkubieren.

### FACS-Analyse:

Zur Auswertung wurden je 5.000 Events gezählt. Das Gate wurde entsprechend einer Kontrolle ohne Fluoreszenz-Markierung gesetzt. Die erhaltenen Daten wurden ausgewertet, indem die mittlere Fluoreszenz Intensität mit dem Prozentsatz der gewerteten Ereignisse multipliziert wurde. Dadurch ließen sich die Werte untereinander vergleichen.

### 4.3.5 Colony Blot

1. Die zu untersuchenden Meningokokkenstämme werden am Abend auf Agarplatten ausplattiert. Dazu werden je 100µl Bakteriensuspension ( $OD_{600}$ : 0,1) gleichmäßig auf den Platten verteilt und o/n bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.
2. Am folgenden Morgen werden runde Nitrozellulose-Membranen auf den Agar gelegt und anschließend die Bakterienkolonien abgezogen. Die Lage des Filters auf der Platte wird markiert.
3. Die Membranen lufttrocknen lassen.
4. Die Inkubationen der Schritte 4 – 7 finden auf Filterpapieren statt, die mit den entsprechenden Lösungen getränkt sind. Die Kolonien auf den Filtern sind dabei immer oben!
5. Membranen für 5min in 0,5M NaOH inkubieren.
6. Membranen 2x für 5min mit 1,5M NaCl / 0,5M Tris, pH 7,5 inkubieren.
7. Membranen für 5min mit 2x SSC oder 2x SSPE inkubieren.
8. Membranen für 5min mit 70% Ethanol inkubieren.
9. Membranen für 10min lufttrocknen lassen.
10. Blots für 1h bei RT in PBS/T mit 5% Magermilch auf dem Schüttler absättigen.
11. Membranen für 1h bei RT oder o/n bei 4°C in PBS/T mit 1% Magermilch und dem Primärantikörper inkubieren.
12. Blots 10min mit PBS/T waschen
13. Schritt 12 2x wiederholen.
14. Membranen für 1h in PBS/T mit dem Sekundärantikörper inkubieren.
15. Blots 10min mit PBS/T waschen
16. Schritt 15 2x wiederholen.
17. Blots wie den Western Blot (vgl. Kapitel 4.3.1) mit dem ECL-System entwickeln.

## 4.4 Bakterienkultur

### 4.4.1 Bakterienkultur mit *Neisseria meningitidis*

Auf GC-Agarplatten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. In Flüssigkultur (PPM<sup>+</sup>) bei 37°C.

### 4.4.2 Transformation von Meningokokken

1. Nach dem Anwachsen der Bakterien in PPM<sup>+</sup> die  $OD_{600}$  auf 0,2 -0,5 in frischem PPM<sup>+</sup> einstellen und für 1h bei 37°C und 200rpm inkubieren.
2. Die OD messen und auf 0,1 in 1ml PPM<sup>+</sup> für jeden Ansatz einstellen.
3. Zugabe von 100 – 200ng Plasmid zu einem 1ml Bakterienansatz und für 5 -6h bei 37°C und 200rpm inkubieren.
4. Bakterien abzentrifugieren (5min, 3.000g, RT) oder (15min, 4.000g, RT für Greiner Röhrchen), Überstand verwerfen.
5. Peller in 300µl PPM<sup>+</sup> resuspendieren.
6. 200µl und 100µl auf je einer GC-Agarplatte mit Antibiotikum o/n bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubieren.

### 4.4.3 Bakterienkulturen mit *Escherichia coli*

Auf LB-Agarplatten und in LB-Flüssigmedium bei 37°C.



#### 4.4.4 Transformation von *E. coli*

Protokoll zur Transformation chemo-kompetenter Kolibakterien.

1. Kompetente Bakterien in Eiswasser auftauen.
2. Zugabe von 10µl (die Hälfte des Ligationsansatzes, in der Regel ~0,5µg DNA) Plasmid-DNA zu 100µl kompetenten Bakterien und für 5min Inkubation in Eiswasser.
3. Danach für 5min Inkubation bei 37°C.
4. Parallel anwärmen von 1ml SOC-Medium auf 37°C.
5. Zugabe von 1ml vorgewärmtem SOC-Medium zu dem Transformationsansatz und Inkubation bei 37°C für 60min und 200rpm.
6. Ausplattieren von 10, 100 und 900µl auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika und Inkubation o/n bei 37°C.

#### 4.4.5 Herstellung von Glycerinkulturen

1. Die Bakterien (Meningokokken und *E. coli*) werden o/n auf Agar-Platten inkubiert.
2. Die kompletten Bakterien mit einem Wattetupfer von der Platte nehmen und in 0,5 – 1ml Einfriermedium in einem Einfrierrohrchen einreiben.
3. Bakterien bei -80°C lagern.

### 4.5 Bildgebende Verfahren

#### 4.5.1 Immunfluoreszenz

1. Nach dem Anwachsen der Bakterien in PPM<sup>+</sup> die OD<sub>600</sub> auf 0,1 in 1x PBS mit 0,2 NYS einstellen.
2. 10µl der Bakteriensuspension (1x 10<sup>6</sup> Bakterien) pro Napf eines 12 Kammer-Objektträgers geben und unter der Flow lufttrocknen lassen.
3. Slides mit 3,7% Formaldehyd in 1x PBS für 10min fixieren.
4. Inkubation mit dem ersten Antikörper in PBS/T für 45min bei RT und schütteln.
5. Slides zweimal in 1x PBS waschen.
6. Inkubation mit dem Sekundäantikörper (Fluoreszenz-markiert) in PBS/T für 45min bei RT und schütteln (im Dunkeln). Slides 2x mit 1x PBS und 1x mit dH<sub>2</sub>O spülen und trocknen lassen.
7. Mit Fluoprep eindeckeln und o/n im Dunkeln trocknen lassen.

#### 4.5.2 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

1. 100µl einer Bakteriensuspension (OD<sub>600</sub>=1 in 1x PBS) werden mit der Cytospin auf rundes Glasslide zentrifugiert.
2. Fixierung mit 3,7% Formaldehyd in 1x PBS für 30min bei RT. Nicht austrocknen lassen!
3. Slides 2x mit 1x PBS für 3min waschen.
4. Slides für 5min mit 0,5%BSA in 1x PBS (BSA/PBS) blockieren.
5. Inkubation mit dem Primäantikörper in BSA/PBS (~50µl) für 45min im Feuchten bei RT.
6. Slides 3x mit 1x PBS für 5min waschen.
7. Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten Sekundäantikörper (1:200) in BSA/PBS für 30min im Feuchten bei RT. (Im Dunkeln!)
8. Slides 3x mit 1x PBS für 5min waschen und mit Fluoprep eindeckeln und o/n trocknen lassen.

#### 4.5.3 Transmissionselektronenmikroskopie

1. Analog zu Protokoll 4.5.2 Punkte 1 bis 6. Slides dürfen zu keinem Zeitpunkt austrocknen!
2. Inkubation mit dem Gold-markierten (12nm-Goldpartikel) Sekundäantikörper (1:20) in BSA/PBS für 60min im Feuchten bei RT.
3. Slides 3x mit 1x PBS für 5min waschen.
4. Nachfixieren mit 2,5% Glutaraldehyd in 1x PBS (250µl) für 40min bei 4°C.
5. Proben in diesem Puffer in EM-Serviceabteilung des Theodor Boveri Instituts bringen. Dort werden die Proben Entwässert, Eingebettet, Geschnitten und Kontrastiert.

## 5 Material

### 5.1 Bakterienstämme

#### 5.1.1 Teil I

Die untersuchten, unbekapselten Polysialyltransferasegen-positiven Stämme der Bayerischen Meningokokkensträgerstudie sind im Anhang (siehe Kapitel 6.1) zusammen mit den Ergebnissen der Untersuchungen zu sehen.

Die weiteren in diesem Teil dieser Arbeit verwendeten Stämme werden im Folgenden aufgelistet:

Bekapselte Stämme der Bayerischen Meningokokkensträgerstudie:

| Stamm-No. | ST   | Komplex | Serogruppe |
|-----------|------|---------|------------|
| α 16      | 41   | 41/44   | B          |
| α 17      | 32   | 32      | B          |
| α 18      | 756  | 162     | B          |
| α 28      | 798  | 269     | B          |
| α 297     | 337  | 41/44   | C          |
| α 302     | 180  | 41/44   | C          |
| α 305     | 939  |         | C          |
| α 308     | 11   | 11      | C          |
| α 324     | 11   | 11      | C          |
| α 264     | 22   |         | W-135      |
| α 275     | 22   | 22      | W-135      |
| α 296     | 1106 | 22      | W-135      |
| α 306     | 11   | 11      | W-135      |
| α 177     | 950  | 949     | Y          |
| α 178     | 23   | 23      | Y          |
| α 186     | 23   | 23      | Y          |
| α 188     | 784  | 92      | Y          |
| α 195     | 23   | 23      | Y          |
| α 213     | 767  | 167     | Y          |
| α 237     | 23   | 23      | Y          |
| α 240     | 129  | 92      | Y          |
| α 246     | 913  | 60      | Y          |
| α 254     | 1124 | 167     | Y          |
| α 267     | 23   | 23      | Y          |
| α 272     | 92   | 92      | Y          |
| α 276     | 850  | 175     | Y          |
| α 300     | 23   | 23      | Y          |
| α 322     | 850  | 175     | Y          |
| α 335     | 23   | 23      | Y          |
| α 369     | 168  | 167     | Y          |
| α 375     | 849  | 175     | Y          |

Weitere Meningokokkenstämme:

| Stamm | Parental-Stamm | Genotyp       | Serogruppe | Referenz                           |
|-------|----------------|---------------|------------|------------------------------------|
| #171  |                | Wt            | W – 135    | (Claus <i>et al.</i> , 1997)       |
| #172  |                | Wt            | Y          | (Claus <i>et al.</i> , 1997)       |
| #2120 |                | Wt            | C          | (Vogel <i>et al.</i> , 1998)       |
| #2135 |                | Wt (MC58)     | B          | (Dunn <i>et al.</i> , 1995)        |
| #2344 | MC58           | $\Delta$ lst  | B          | (Vogel <i>et al.</i> , 1999)       |
| #2425 | MC58           | $\Delta$ siaD | B          | (Kolb-Maurer <i>et al.</i> , 2001) |

## 5.1.2 Teil II

| <i>Neisseria meningitidis</i> |                    |                               |           |        |                               |
|-------------------------------|--------------------|-------------------------------|-----------|--------|-------------------------------|
| Stamm                         | Parentalstamm      | Genotyp                       | Resistenz | Kapsel | Referenz                      |
| MC58                          | -                  | Wt                            | -         | B      | (Dunn <i>et al.</i> , 1995)   |
| #2535                         | MC58               | $\Delta$ lgtA                 | Kan       | B      | (Ram <i>et al.</i> , 2003)    |
| #2419                         | MC58               | $\Delta$ pgm                  | CM        | B      | (Ram <i>et al.</i> , 2003)    |
| #3198                         | MC58               | $\Delta$ rfaF                 | Kan       | B      | (Kurzai <i>et al.</i> , 2005) |
| #3240                         | MC58               | $\Delta$ siaD                 | CM        | -      | (Kurzai <i>et al.</i> , 2005) |
| #3697                         | #3240              | $\Delta$ siaD, $\Delta$ perox | CM, Kan   | -      | Diese Arbeit                  |
| #3077                         | MC58 $\Delta$ siaD | $\Delta$ siaD, $\Delta$ lgtA  | CM, Kan   | -      | (Ram <i>et al.</i> , 2003)    |
| #3272                         | #3240              | $\Delta$ siaD, $\Delta$ pgm   | CM, Kan   | -      | (Kurzai <i>et al.</i> , 2005) |
| #3604                         | #3240              | $\Delta$ siaD, $\Delta$ rfaF  | CM, Kan   | -      | (Kurzai <i>et al.</i> , 2005) |
| H44/76                        | -                  | Wt                            | -         | B      | (Holten, 1979)                |
| Z2491                         | -                  | Wt                            | -         | A      | (Perrin <i>et al.</i> , 1999) |
| #2594                         | -                  | Wt                            | -         | A      | (Ram <i>et al.</i> , 2003)    |
| #2668                         | #2594              | $\Delta$ sacD                 | CM        | -      | (Ram <i>et al.</i> , 2003)    |
| #2120                         | -                  | Wt                            | -         | C      | (Vogel <i>et al.</i> , 1998)  |
| #2517                         | #2120              | $\Delta$ siaD                 | -         | -      | (Claus <i>et al.</i> , 1997)  |
| #2948                         | #2120              | $\Delta$ oac                  | -         | C      | (Claus <i>et al.</i> , 2004)  |
| #2950                         | #2948              | $\Delta$ oac + oac            | -         | C      | (Claus <i>et al.</i> , 2004)  |
| #171                          | -                  | Wt                            | -         | W-135  | (Claus <i>et al.</i> , 1997)  |
| #2661                         | #171               | $\Delta$ siaD                 | CM        | -      | (Ram <i>et al.</i> , 2003)    |
| #2144                         | -                  | Wt                            | -         | W-135  | (Claus <i>et al.</i> , 2004)  |
| #3149                         | #2144              | $\Delta$ oac                  | -         | W-135  | (Claus <i>et al.</i> , 2004)  |
| #172                          | -                  | Wt                            | -         | Y      | (Claus <i>et al.</i> , 1997)  |
| #3073                         | #172               | $\Delta$ oac                  | -         | Y      | (Claus <i>et al.</i> , 2004)  |
| #2220                         | -                  | Wt                            | -         | Y      | (Ram <i>et al.</i> , 2003)    |
| #2662                         | #2220              | $\Delta$ siaD                 | CM        | -      | (Ram <i>et al.</i> , 2003)    |
| $\alpha$ 14                   | -                  | Wt                            | -         | -(cnl) | (Claus <i>et al.</i> , 2002)  |

| <i>Escherichia coli</i> |               |               |           |                 |
|-------------------------|---------------|---------------|-----------|-----------------|
| Stamm                   | Parentalstamm | Plasmid       | Resistenz | Referenz        |
| DH5 $\alpha$            | -             |               |           | (Hanahan, 1993) |
| M15pRep4                | -             | pRep4         | Kan       | QIAGEN          |
| ST 1                    | DH5 $\alpha$  | pMW1          | Amp       | Diese Arbeit    |
| ST 2                    | DH5 $\alpha$  | pMW2          | Amp       | Diese Arbeit    |
| ST 3                    | DH5 $\alpha$  | pMW3          | Amp       | Diese Arbeit    |
| ST 4                    | M15pRep4      | pMW1 + pRep4  | Amp, Kan  | Diese Arbeit    |
| ST 5                    | M15pRep4      | pMW2 + pRep4  | Amp, Kan  | Diese Arbeit    |
| ST 6                    | M15pRep4      | pMW3 + pRep4  | Amp, Kan  | Diese Arbeit    |
| ST 7                    | DH5 $\alpha$  | pMW4          | Amp       | Diese Arbeit    |
| ST 8                    | DH5 $\alpha$  | pMW5          | Amp       | Diese Arbeit    |
| ST 9                    | DH5 $\alpha$  | pMW6          | Amp       | Diese Arbeit    |
| ST 10                   | DH5 $\alpha$  | pMW7          | Amp       | Diese Arbeit    |
| ST 11                   | DH5 $\alpha$  | pMW8          | Amp       | Diese Arbeit    |
| ST 12                   | DH5 $\alpha$  | pMW9          | Amp       | Diese Arbeit    |
| ST 13                   | DH5 $\alpha$  | pMW10         | Amp       | Diese Arbeit    |
| ST 14                   | DH5 $\alpha$  | pMW11         | Amp       | Diese Arbeit    |
| ST 15                   | DH5 $\alpha$  | pMW12         | Amp       | Diese Arbeit    |
| ST 16                   | DH5 $\alpha$  | pMW13         | Amp       | Diese Arbeit    |
| ST 17                   | M15pRep4      | pMW11 + pRep4 | Amp, Kan  | Diese Arbeit    |
| ST 18                   | M15pRep4      | pMW12 + pRep4 | Amp, Kan  | Diese Arbeit    |
| ST 19                   | M15pRep4      | pMW13 + pRep4 | Amp, Kan  | Diese Arbeit    |

Kan: Kanamycin-Resistenz; Amp: Ampicillin-Resistenz; CM: Choramphenicol-Resistenz

## 5.2 DNA-technische Materialien

### 5.2.1 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma Ark, bzw. Sigma Genosys bezogen.

#### 5.2.1.1 Teil I

| Oligo-nukleotid | Sequenz [5'→3']                         | Region  | Target                    | Position bezügl. Referenznummer            | Referenz-Nummer * | Sequenzier Primer | PCR - Primer |
|-----------------|---|---------|---------------------------|--|-------------------|-------------------|--------------|
| MW2             | TAA TAT ATT AAT GAA GAT GCT TCG         | IS 1016 | IS 1016                   | 355-336                                    | AY289932          | x                 |              |
| HC59            | ATT TCT CTA AAC TTT TGC TCT G           | IS 1016 | IS 1016                   | 4093-4072                                  | Y13969            | x                 |              |
| NB10r           | GAT GTG TTT GAA CCT GTT GAA             | IS 1106 | IS 1106                   | 1056-1076                                  | NMB0991           | x                 | x            |
| NB10            | TTC AAC AGG TTC AAA CAC ATC             | IS 1106 | IS 1106                   | 1076-1056                                  | NMB0991           | x                 | x            |
| NB9             | ATG ATT GCC AAA CAC ATC GAC             | IS 1106 | IS 1106                   | 34-54                                      | NMB0991           | x                 | x            |
| NB9r            | GTC GAT GTG TTT GGC AAT CAT             | IS 1106 | IS 1106                   | 54-34                                      | NMB0991           | x                 | x            |
| RH1             | TCT TCC ATT GAT GAC AGC CG              | IS 1301 | IS 1301                   | 143-162                                    | Z49092            | x                 |              |
| RH2             | ATT ACG CCA CTT AGT CGA GA              | IS 1301 | IS 1301                   | 695-714                                    | Z49092            | x                 |              |
| UE31            | TTA AAG ATT CAA ATC GAT AA              | Reg A   | <i>siaA</i>               | 1306-1287                                  | M95053            | x                 | x            |
| UE43            | ATG AAA AGA ATT CTT TGC ATT ACA GGT ACC | Reg A   | <i>siaA</i>               | 173-202                                    | M95053            | x                 | x            |
| UE28            | ACC ACC TTC GAT ATG GC                  | Reg A   | <i>siaA</i>               | 544-528                                    | M95053            | x                 |              |
| SH39            | ATA TCA TTA GCA TCT ACC                 | Reg A   | <i>siaA</i>               | 865-882                                    | M95053            | x                 | x            |
| UE32            | GCG CGA ATT CAT GGA AAA ACA AAA TAT GC  | Reg A   | <i>siaB</i>               | 1310-1329                                  | M95053            | x                 | x            |
| UE33            | TTA GCT TTC CTT GTG ATT AA              | Reg A   | <i>siaB</i>               | 1997-1978                                  | M95053            | x                 | x            |
| UE34            | ATG CAA AAC AAC AAC GAA TT              | Reg A   | <i>siaC</i>               | 1998-2017                                  | M95053            | x                 | x            |
| MW5r            | GAC GAA ATG TCT GAT GAG GC              | Reg A   | <i>siaC</i>               | 2178-2197                                  | M95053            | x                 |              |
| MW5             | GCC TCA TCA GAC ATT TCG TC              | Reg A   | <i>siaC</i>               | 2197-2178                                  | M95053            | x                 |              |
| UE16            | CGG ACA AGA GTT CTC CT                  | Reg A   | <i>siaC</i>               | 2916-2900                                  | M95053            |                   | x            |
| MW1r            | CGC AAA GGT GCT CAA ATC                 | Reg A   | <i>siaC</i>               | 3009-3026                                  | M95053            | x                 | x            |
| MW1             | GAT TTG AGC ACC TTT GCG                 | Reg A   | <i>siaC</i>               | 3026-3009                                  | M95053            | x                 | x            |
| UE11            | TTA ATG AGA ATT AGC TA                  | Reg A   | <i>siaC<sub>B</sub></i>   | 3112-3096                                  | M95053            |                   | x            |
| UE12            | CGC CTT TGC ATC TGT CGT AGC             | Reg A   | <i>siaD<sub>B</sub></i>   | 2861-2881                                  | M95053            | x                 | x            |
| UE8.1           | TTA TTC CTC CAG CAT GG                  | Reg A   | <i>siaD<sub>B</sub></i>   | 3791-3775                                  | M95053            | x                 |              |
| UE13            | GGA GAT CAG AAG TCA TAG TA              | Reg A   | <i>siaD<sub>B</sub></i>   | 4641-4622                                  | M95053            | x                 | x            |
| HC379           | TGA TTG ATT CGA TAC ACC ATA C           | Reg A   | <i>siaD<sub>C</sub></i>   | 1049-1070                                  | U75650            | x                 |              |
| HC6             | AAC CGC AAC CTA TGC C                   | Reg A   | <i>siaD<sub>C</sub></i>   | 462-477                                    | U75650            | x                 |              |
| HC5             | TTG TTA CCC ACA AAA A                   | Reg A   | <i>siaD<sub>C</sub></i>   | 539-524                                    | U75650            | x                 |              |
| HC4             | GGA GAT TTG TTT AGC T                   | Reg A   | <i>siaD<sub>C</sub></i>   | 546-531                                    | AJ243686          | x                 | x            |
| HC52            | GAT TTT AGT GCA ATT GCT TTG             | Reg A   | <i>siaD<sub>C</sub></i>   | 672-652                                    | AJ243686          |                   | x            |
| HC7             | AAC GCT ATC CTG TTT C                   | Reg A   | <i>siaD<sub>C</sub></i>   | 734-749                                    | U75650            | x                 |              |
| HC2             | AAA TCT ATA AAT TGA CTC                 | Reg A   | <i>siaD<sub>C</sub></i>   | 80-62 upstream von <i>siaD<sub>C</sub></i> | nicht publiziert  | x                 | x            |
| GH81            | TTT TGA TGA TTT TGC TTC CTA AGC         | Reg A   | <i>siaD<sub>W</sub></i>   | 3989-4012                                  | Y13969            | x                 | x            |
| HC54            | CAT TCC AGA AAT ATC ACC AG              | Reg A   | <i>siaD<sub>W,Y</sub></i> | 1210-1191                                  | Y13969            | x                 | x            |
| HC41            | CTT TTT CTA TTG AAG ATT CTA ATG         | Reg A   | <i>siaD<sub>W,Y</sub></i> | 1400-1423                                  | Y13969            | x                 |              |
| HC32f           | ATT TGT TAA CGG AAT TCG                 | Reg A   | <i>siaD<sub>W,Y</sub></i> | 166-183                                    | Y13969            | x                 | x            |
| HC45            | CAG ATA TAT CGG ATA TTA TCG             | Reg A   | <i>siaD<sub>W,Y</sub></i> | 2034-2054                                  | Y13969            | x                 |              |
| HC49            | GCA GTC ATT CAG TGA AAA                 | Reg A   | <i>siaD<sub>W,Y</sub></i> | 2331-2348                                  | Y13969            | x                 |              |
| HC53            | CAT TAC TCC TTA TCA TCC TG              | Reg A   | <i>siaD<sub>W,Y</sub></i> | 2816-2835                                  | Y13969            | x                 | x            |
| HC65            | CGA GAT TCA TTG ATG CCT TG              | Reg A   | <i>siaD<sub>W,Y</sub></i> | 3045-3026                                  | Y13969            |                   | x            |
| HC56            | TTG ATG ATT TTG CTT CCT AAG             | Reg A   | <i>siaD<sub>W,Y</sub></i> | 3444-3424                                  | Y13969            |                   | x            |
| HC37r           | ATT TCC AGT TGA AGA GGA TGA             | Reg A   | <i>siaD<sub>W,Y</sub></i> | 676-656                                    | Y13969            | x                 |              |
| GH79            | ATC AGA ACC TTA TTT CAA CTA TTA C       | Reg A   | <i>siaD<sub>W,Y</sub></i> | 85-109                                     | Y13969            |                   | x            |
| HC91            | ACC GTA TCT TAT TCA AAG GTG             | Reg A   | <i>siaD<sub>W,Y</sub></i> | 991-1010                                   | Y13969            | x                 | x            |
| AS17            | CGG GGT GGA TGT AGT CGG GAT AGT         | Reg B   | <i>ds LipB</i>            | 3021-3006                                  | z13995            |                   | x            |
| HE6             | GTC TGC YCC GCC ATA TTG                 | Reg B   | <i>LipA</i>               | 1633-1616                                  | z13995            |                   | x            |
| HC288           | TCT GCT TTG GCG ACA CAC G               | Reg B   | <i>LipA</i>               | 3586-3604                                  | z13995            |                   | x            |

| Oligo-nukleotid | Sequenz [ 5' -> 3' ]          | Region    | Target          | Position bezügl. Referenznummer | Referenz-Nummer * | Sequenzier Primer | PCR - Primer |
|-----------------|-------------------------------|-----------|-----------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|--------------|
| GH52            | CAG CTT CCG CAT AAC CTT G     | Reg B     | <i>LipA</i>     | 6699-6681                       | AE002367          |                   | x            |
| GH59            | CAT ACG CCA AGA GAA TTA ACG   | Reg B     | <i>LipB</i>     | 3259-3239                       | z13995            | x                 | x            |
| GH55            | GAT TCC AAA ATT CTG CCA AGG   | Reg B     | <i>LipB</i>     | 4431-4411                       | z13995            |                   | x            |
| DM2             | CTT AAT TAC TCA CAT TAA TT    | Reg C     | <i>ctrA</i>     | 1332-1313                       | M57677            | x                 | x            |
| DM1             | GTG TTT AAA GTG AAA TTT TA    | Reg C     | <i>ctrA</i>     | 143-161                         | M57677            | x                 | x            |
| KB11            | CTT AGT TTG ATG CGC AC        | Reg C     | <i>ctrA</i>     | 502-486                         | M57677            | x                 | x            |
| MF22            | ATG TCT GAG CAA CTT CCT GT    | Reg C     | <i>ctrB</i>     | 1333-1353                       | M57677            |                   | x            |
| MF23            | GTT TTT ATG CTC ACG AAT GC    | Reg C     | <i>ctrB</i>     | 2493-2474                       | M57677            |                   | x            |
| MF24            | ATG AAA GCC TTG CAT AAA AC    | Reg C     | <i>ctrC</i>     | 2496-2515                       | M57677            |                   | x            |
| MF25            | CAT CGC TGC CAA AAT ATC CG    | Reg C     | <i>ctrC</i>     | 3186-3167                       | M57677            |                   | x            |
| MF26            | ATG ATT TCG GTT GAA CAT GT    | Reg C     | <i>ctrD</i>     | 3290-3309                       | M57677            |                   | x            |
| MF27            | AAG GCA GCG AAT TAT AAT ATT   | Reg C     | <i>ctrD</i>     | 3938-3918                       | M57677            |                   | x            |
| HE16            | CCC GGA TCG CCA TAA ACC GTC   | Reg D     | <i>galE</i>     | 425-405                         | NMB0064           | x                 | x            |
| GH72            | GTT TTG GGA GAC GCG GCG G     | Reg D, D' | <i>rfbC, C'</i> | 6879-6897                       | L09189            |                   | x            |
| MW3             | GGC TTT TTT ATG GAA ACC TTC C | Reg D, D' | <i>rfbC, C'</i> | 8131-8292                       | AE002365          | x                 | x            |

\*: Die Genomsequenz von *Neisseria meningitidis* MC58 ist unter <http://www.tigr.org> nach zu lesen.

### 5.2.1.2 Teil II

| Oligo-nukleotid | Sequenz [ 5' -> 3' ] <sup>1</sup>   | Position <sup>2</sup> | Target        | Referenz-nummer | Schnittstellen <sup>3</sup> |
|-----------------|---|-----------------------|---------------|-----------------|-----------------------------|
| 329             | ACC ATG ATT ACG CCA AGC   | 813 - 796             | 3' from MCS   | pBSII-vector    | -                           |
| QE-F            | CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG  | 69 - 88 (pQE32)       | 5' from MCS   | pQE-vectors     | -                           |
| QE-R            | GTT CTG AGG TCA TTA CTG G   | 244-226 (pQE32)       | 3' from MCS   | pQE-vectors     | -                           |
| KB9             | AAT ACG ACT CAC TAT AG  | 627 - 643             | 5' from MCS   | pBSII-vector    | -                           |
| MW 6            | gac <u>tg</u> <u>atc</u> cCA AAA GTA ATC GGT ATC GAC TTA G                    | 8629 - 8606           | Enolase       | NMB0554         | <i>Bam</i> H I              |
| MW 7            | agt <u>act</u> <u>gca</u> <u>g</u> TA TTT TTT GTC GTC TTT TAC TTC TTC         | 6706 - 6731           | Enolase       | NMB0554         | <i>Pst</i> I                |
| MW 8            | cga <u>tc</u> <u>cat</u> <u>gg</u> G CGC AAT CGT TGA TAT TTT CG               | 1861 - 1879           | DnaK          | NMB1285         | <i>Nco</i> I                |
| MW 9            | tcg acg <u>aga</u> <u>tct</u> TTT GCC CAG TTG GTA GAA TGC GG                  | 3136 - 3116           | DnaK          | NMB1285         | <i>Bgl</i> I                |
| MW 10           | agt <u>agg</u> <u>atc</u> cCT TTG CAA GAT CGT ACC GGT C                       | 9851 - 9869           | Peroxiredoxin | NMB0946         | <i>Bam</i> H I              |
| MW 11           | agt <u>ac</u> T <u>GCA</u> GTT TTT AGC CAA GTA AGC TTC                        | 10577 - 10559         | Peroxiredoxin | NMB0946         | <i>Pst</i> I                |
| MW 16           | GCA GAC CGC CTT CAT TCC   | 9424 - 9497           | DnaK          | NMB0554         | -                           |
| MW 17           | CCT GAC AGT AAC CGT AGC   | 5841 - 5858           | DnaK          | NMB0554         | -                           |
| MW 18           | CCA AAT CGC CCA AGC CCT C   | 333 - 351             | Enolase       | pMW1            | -                           |
| MW 19           | CCC ATA TCA CCA GCT CAC CG  | 1838 - 1819           | Enolase       | pMW1            | -                           |
| MW 22           | CGG CGA CAA ACT CGA CGC   | 1809 - 1826           | DnaK          | pMW2            | -                           |
| MW 23           | CCA TAT CAC CAG CTC ACC G   | 2497 - 2479           | DnaK          | pMW2            | -                           |
| MW 24           | GAA GAA GTA AAA GAC GAC <u>gca</u> <u>gca</u> TAA TGC AGC CAA GC              | 2050 - 2087           | DnaK          | pMW2            | -                           |
| MW 25           | GCT TGG CTG CAT TAT <u>gct</u> <u>gc</u> G TCG TCT TTT ACT TCT TC             | 2087 - 2050           | DnaK          | pMW2            | -                           |
| MW 30           | GGA AGC TTA CTT GGC <u>Tgc</u> <u>gac</u> CTa <u>a</u> AG CCA AGC TTA ATT AGC | 801 -842              | Peroxiredoxin | pMW3            | -                           |
| MW 31           | GCT AAT TAA GCT TGG CT <u>l</u> AG <u>gca</u> <u>gca</u> GCC AAG TAA GCT TCC  | 842 - 801             | Peroxiredoxin | pMW3            | -                           |
| MW 32           | CAC CAT CAC CAT CAC CAT GGG   | 127 - 147             | Peroxiredoxin | pMW3            | -                           |
| MW 37           | CCC ATA TCA CCA GCT CAC CG  | 1244 - 1225           | Peroxiredoxin | pMW3            | -                           |
| MW 40           | CCA ACT GGG <u>Cgc</u> <u>a</u> AG ATC TCA TCA CCA TCA CC                     | 1386 - 1417           | Enolase       | pMW1            | -                           |
| MW 41           | GGT GAT GGT GAT GAG ATC <u>Ttq</u> <u>c</u> GC CCA GTT GG                     | 1417 - 1386           | Enolase       | pMW1            | -                           |
| MW 44           | act <u>ccg</u> <u>aat</u> <u>t</u> CT TTG CAA GAT CGT ACC GGT C               | 9849 - 9869           | Peroxiredoxin | NMB0946         | <i>Eco</i> R I              |
| MW 45           | tcc <u>agg</u> <u>gat</u> <u>cc</u> T CCA AAT CTT CGC TGC CGC C               | 10560 - 10541         | Peroxiredoxin | NMB0946         | <i>Bam</i> H I              |
| MW 46           | gtt <u>ggc</u> <u>tc</u> <u>a</u> GC TTC GGT AAA CGC TCT TGG                  | 10206 - 10225         | Peroxiredoxin | NMB0946         | <i>Pst</i> I                |
| MW 47           | ctg <u>tcg</u> <u>tc</u> <u>ag</u> T TCG CCG TTG CCG TCA GG                   | 10162 - 10145         | Peroxiredoxin | NMB0946         | <i>Pst</i> I                |
| MW 48           | cat <u>ccg</u> <u>aat</u> <u>tc</u> G CGA CAT CGC ACC TGC ACC                 | 7252 - 7234           | DnaK          | NMB0554         | <i>Eco</i> R I              |
| MW 49           | atc <u>ggg</u> <u>aat</u> <u>tc</u> A ATC AGG TCT TCA ACC AGG C               | 7692 - 7711           | DnaK          | NMB0554         | <i>Eco</i> R I              |
| MW 50           | CCT TGC AGT ACG TGG ATG G   | 1478 - 1460           | DnaK          | pMW2            | -                           |
| MW 51           | CAA TTC GAA GTA TTG GCA ACC   | 793 - 813             | DnaK          | pMW2            | -                           |

Die Oligonukleotide 329 und KB9 entsprechen der Sequenz der Firma Invitrogen; die Oligonukleotide QE-F und QE-R sind von der Firma QIAGEN. Alle weiteren Oligonukleotide sind im Verlauf dieser Arbeit entstanden.

- 1: Großbuchstaben stehen für komplementäre Sequenzen zur Ziel-DNA; kleine Buchstaben stehen für nicht-komplementäre Sequenzen; unterstrichene Sequenzen markieren die Einführung von Schnittstellen für Restriktionsenzyme in die DNA, und bei den Primern MW24/25 für den Austausch von zwei Lysinen zu zwei Alanine, bei MW30/31 für den Austausch von einem Lysin und einem Asparagin gegen zwei Lysine und bei MW40/41 für den Austausch eines Lysins gegen ein Alanin.
- 2: Die Positionsangaben beziehen sich auf die angegebenen Referenznummern.
- 3: Die angegebenen Schnittstellen wurden mittels PCR-Mutagenese in die Produkte eingefügt.

## 5.2.2 Plasmide

| Name   | Beschreibung   | Herkunft     |
|--------|--|--------------|
| pBS II | pBluescript II SK (-) – Klonierungsvektor  | Stratagene   |
| pQE32  | Expressions-Vektor (N-terminales His-tag)  | Qiagen       |
| pQE60  | Expressions-Vektor C-terminales His-tag)   | Qiagen       |
| pUC4K  | Vektor mit einer Kanamycin-Resistenzkassette   | GE Healthcar |
| pMW1   | pQE60 mit <i>Enolase</i> (Fragment MW8/9) zwischen den Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BglII</i>   |              |
| pMW2   | pQE32 mit <i>DnaK</i> (Fragment MW6/7) zwischen den Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>PstI</i>  |              |
| pMW3   | pQE32 mit <i>Perox</i> (Fragment MW10/11) zwischen den Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>PstI</i>   |              |
| pMW4   | pBS II mit <i>DnaK</i> (Fragment MW16/17) zwischen den Schnittstellen <i>PstI</i> und <i>HindIII</i>   |              |
| pMW5   | Insertion einer <i>EcoRI</i> - Schnittstelle in <i>DnaK</i> (Fragments MW49/KB9 & MW48/329) zwischen den Schnittstellen <i>HindIII</i> und <i>PstI</i> |              |
| pMW6   | <i>KanR</i> zwischen die <i>EcoRI</i> – Schnittstellen von <i>DnaK</i> in pMW5   |              |
| pMW7   | pBS II mit <i>Perox</i> (Fragment MW10/11) zwischen den Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>PstI</i>  |              |
| pMW8   | pBS II mit <i>Perox</i> (Fragment MW44/45) zwischen den Schnittstellen <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i>   |              |
| pMW9   | Insertion einer <i>PstI</i> - Schnittstelle in <i>Perox</i> (Fragments MW44/47 & MW45/46) zwischen den Schnittstellen <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i>    |              |
| pMW10  | <i>KanR</i> zwischen die <i>PstI</i> – Schnittstellen von <i>Perox</i> in pMW9   |              |
| pMW11  | pQE60 mit <i>Enolase</i> (Fragments 1. PCR MW18/41, MW19/40; 2. PCR MW18/19) zwischen den Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BglII</i>                  |              |
| pMW12  | pQE32 mit <i>DnaK</i> (Fragments 1. PCR MW22/25, MW23/24; 2. PCR MW22/24) zwischen den Schnittstellen <i>Clal</i> und <i>BspEI</i>                     |              |
| pMW13  | pQE32 mit <i>Perox</i> (Fragments 1. PCR MW31/32, MW30/37; 2. PCR MW32/37) zwischen den Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>BspEI</i>                   |              |

KanR: Kanamycin-Resistenzkassette.

## 5.3 Allgemeine Materialien

### 5.3.1 Chemikalien

Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt von den Firmen Applichem, Merck, MP Biomedicals, Roth, Serva und Sigma bezogen.

### 5.3.2 Lösungen und Puffer

|                            |  |
|----------------------------|--|
| ABTS – Lösung              | 5ml 10x Pufferkonzentrat (Roche), 1 Tabl. Substrat (50mg, Roche), 45ml Aqua dest.                                |
| Acetatlg. (Proteinfällung) | 3M NaCH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> , pH 4,5   |
| Antibiotika                | Die verwendeten Antibiotika wurden alle von der Firma Sigma bezogen und in folgenden Konzentrationen eingesetzt: |

| Antibiotikum    | Konzentration        |                | Lösungsmittel     |
|-----------------|----------------------|----------------|-------------------|
|                 | <i>N. meningitis</i> | <i>E. coli</i> |                   |
| Ampicillin      | /                    | 100µg/ml       | dH <sub>2</sub> O |
| Kanamycin       | 100µg/ml             | 30µg/ml        | dH <sub>2</sub> O |
| Chloramphenicol | 7µg/ml               | 30µg/ml        | 70% Ethanol       |
| Erythromycin    | 7µg/ml               | 250µg/ml       | 70% Ethanol       |
| Spectinomycin   | 125µg/ml             | 75µg/ml        | dH <sub>2</sub> O |
| Tetracyclin     | /                    | 12µg/ml        | dH <sub>2</sub> O |

|                           |  |
|---------------------------|--|
| Aufreinigung IgG Lösung A | 50mM Tris, pH 7,5, 0,5M NaCl, 0,1% Tween <sub>20</sub> |
| Aufreinigung IgG Lösung B | 10mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl, 0,1% Tween <sub>20</sub> |
| Blockierungsreagenz       | 10% Blockierungsreagenz (Roche) in Maleinsäurepuffer   |

|   |   |
|---|---|
| BSA/PBS                                 | 1% BSA in PBS   |
| Coomassie – Färbelsg.                   | 50% Methanol, 10% Essigsäure (96%), Coomassie Brilliant Blue (1 Spatelspitze), Lösung vor Gebrauch filtrieren                   |
| Coomassie – Entfärber                   | 20% Methanol, 10% Essigsäure (96%)  |
| DNA-Colony Blot Puffer 1                | 10% SDS   |
| DNA-Colony Blot Puffer 2                | 0,5M NaOH, 1,5M NaCl  |
| DNA-Colony Blot Puffer 3                | 1,5M NaCl, 0,5M Tris, pH 8,0  |
| DNA-Colony Blot Puffer 4                | 5x SSC, 0,5% SDS, 1mM EDTA  |
| DNA-Probenpuffer (GEBS)                 | 20% Glycerin, 0,5% Sarkosyl, 50mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, pH 8,0  |
| 0,2M EDTA                               | pH 8,0  |
| ECL – Reagenz                           | 1ml SA, 0,3µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%), 100µl SB   |
| Einfriermedium                          | 20% Glycerin in Standard I – Medium   |
| Ethanol (70%)                           |   |
| Ethanol (100%)                          |   |
| Essigsäure (5%)                         |   |
| Essigsäure (96%)                        |   |
| GC-Agar                                 | GC-Agar (Becton Dickonson), Supplement “Polyvitex” (BioMerieux)   |
| Glutaraldehyd-Lösung                    | 0,05% Glutaraldehyd in 1x PBS   |
| Hybridisierung Puffer „High SDS“        | 10,5g SDS, 75ml Formamid, 37,5ml 20x SSC, 7,5ml 1M NaPO <sub>4</sub> , pH 7,0, 1,5ml 10% Sarkosyl, 30ml 10% Blockierungsreagenz |
| Hybridisierung Puffer 2                 | 1% Blockierungsreagenz (Roche) in Maleinsäurepuffer   |
| Hybridisierung Puffer 3                 | 0,1M Tris, pH 9,5, 0,1M NaCl  |
| 1x Laufpuffer (SDS-PAGE)                | 30g Tris, 155g Glycin, 50ml 20% SDS-Lsg., ad 10Liter mit Aqua dest.   |
| LB – Agar                               | LB – Agar (Becton Dickonson)  |
| LB - Medium                             | LB – Medium (Becton Dickonson)  |
| Lithiumchlorid / Lithiumacetat – Puffer | 0,2M Lithiumchlorid, 0,1M Lithiumacetat   |
| LPS- Entwickler                         | 50mg Zitronensäure, 0,5ml Formaldehyd (37%) in 200ml Aqua dest.   |
| LPS-Silberfärbung Fixierer              | 50% Ethanol, 5% Essigsäure (96%)  |
| LPS-Silberfärbung Oxidierer             | 40% Ethanol, 5% Essigsäure (96%), 0,7% Periodsäure  |
| LPS-Silbernitratlösung                  | 28ml 0,1M NaOH, 2ml 33% NH <sub>3</sub> , 5ml 20% AgNO <sub>3</sub> ad 150ml Aqua dest.   |
| LPS-Trockenlösung                       | 65% Methanol, 5% Glycerin   |
| Lysepuffer (LPS-Präp.)                  | 2% SDS, 4% β-Mercaptoethanol, 10% Glycerin, Bromphenolblau (1 Spatelspitze) in 1M Tris, pH 6,8                                  |
| Maleinsäurepuffer                       | 0,1M Maleinsäure, 0,15M NaCl  |
| 1,5M NaCl / 0,5M Tris, pH 7,5           |   |
| 0,2M NaOH                               |   |
| 0,5M NaOH                               |   |
| 10x PBS                                 | 1 Flasche PBS Dulbecco (Biochrom AG)  |
| 1x PBS                                  | 10% 10x PBS in Aqua dest.   |
| PBS/T                                   | 0,1% Tween <sub>20</sub> in 1x PBS  |
| PBS/T mit 5% Magermilch                 |   |
| Poly-D-Lysin Lösung                     | 25µg/ml Poly-D-Lysin in 1x PBS  |
| Ponceau S – Lösung (Stock)              | 20g Ponceau S in 100ml Trichloressigsäure   |
| Ponceau S – Lösung (Gebrauchslsg)       | 2% Stocklösung in Aqua dest.  |
| PPM – Medium                            | 1,5% Proteose – Pepton, 0,5% NaCl, 0,05% Stärke, 2% Stammlösung   |
| PPM <sup>+</sup> - Medium               | 100ml PPM – Medium, 250µl 2M MgCl <sub>2</sub> , 250µl 8,4% NaHCO <sub>3</sub> , 500µl Polyvitex (BioMerieux)                   |
| Proteinase K – Puffer (LPS-Präp)        | Proteinase K (2,5mg/ml) in Lysepuffer (LPS-Präp)  |
| SA (ECL)                                | 200ml 0,1M, pH 8,5, 50mg Luminol (bei 4°C lagern)   |
| SB (ECL)                                | 11mg para-Hydroxyconmarinsäure (Cumarc acid) in 10ml DMSO (im Dunkeln lagern)   |
| 20% SDS – Lösung                        |   |

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| SDS – Probenpuffer (1x)         | 4% $\beta$ -Mercaptoethanol, 2% SDS, 12% Glycerin, Bromphenolblau (1 Spatelspitze) in 0,5M Tris pH 6,8         |
| SDS – Probenpuffer (5x)         | 20% $\beta$ -Mercaptoethanol, 10% SDS, 60% Glycerin, Bromphenolblau in 2,5M Tris pH 6,8                        |
| Silberfärbung Fixierer          | 50% Ethanol, 12% Essigsäure (96%), 500 $\mu$ l Formaldehyd (37%), ad 1L mit Aqua dest.                         |
| Silberfärbung Lösung A          | 0,43g Natrium-Thioisulphat in 5ml Aqua dest.   |
| Silberfärbung Lösung 1          | 450 $\mu$ l Lsg A in 300ml Aqua dest.  |
| Silberfärbung Lösung 2          | 0,6g AgNO <sub>3</sub> , 225 $\mu$ l Formaldehyd (37%) in 300ml Aqua dest.                                     |
| Silberfärbung Lösung 3          | 30g NaCO <sub>3</sub> , 25 $\mu$ l Lsg A, 250 $\mu$ l Formaldehyd (37%) in 500ml Aqua dest.                    |
| SOB – Medium                    | 2% Bacto – Trytone, 0,5% Hefe – Extrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl  |
| SOC – Medium                    | 20mM Glukose in SOB – Medium   |
| Southern Blot Puffer 1          | 0,25M HCl  |
| Southern Blot Puffer 2          | 0,5M NaOH, 1,5M NaCl   |
| Southern Blot Puffer 2          | 1M Tris, pH 8,0 ; 3m NaCl  |
| Southern Blot Transferpuffer    | 10X SSPE   |
| 20x SSC                         | 3M NaCl, 0,3M Na-citrat, pH 7,0  |
| 2x SSC                          | 10% 20x SSC in Aqua dest.  |
| 0,1 SSC, 0,1% SDS               |  |
| 20x SSPE                        | 100mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 20mM EDTA (500mM), 100mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 3,6 M NaI |
| 2x SSPE                         | 10% 20x SSPE in Aqua dest.   |
| 0,1 SSPE, 0,1% SDS              |  |
| Stammlösung (PPM <sup>+</sup> ) | 20% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 5% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                       |
| 10x TBE-Puffer (Laufpuffer)     | 1M Tris, 1M Borsäure, 25mM EDTA  |
| 1x TBE-Puffer (Laufpuffer)      | 10% 10x TBE-Puffer in Aqua dest.   |
| Tricin Gel Anodenpuffer         | 0,2M Tris, pH 8,9  |
| Tricin Gel Kathodenpuffer       | 0,1M Tris, pH 8,25, 0,1M Tricin, 0,1% SDS  |
| Tricin Gel Probenpuffer (1x)    | 4% $\beta$ -Mercaptoethanol, 2% SDS, 12% Glycerin, Serva Blue G (1 Spatelspitze) in 50mM Tris pH 6,8           |
| Tricin Gel Probenpuffer (5x)    | 20% $\beta$ -Mercaptoethanol, 10% SDS, 60% Glycerin, Serva Blue G in 0,25M Tris pH 6,8                         |
| Vorhybridisierungslösung        | 10ml High-SDS Lösung, 100 $\mu$ l denaturierte Fischspermien   |
| Western Blotpuffer (10x)        | 30g Tris, 144g Glycin ad 1L Aqua dest.   |
| Western Blotpuffer (1x)         | 10% 10x Blotpuffer, 20% Ethanol  |

### 5.3.3 Verwendete Kits

Firma Qiagen:

- QIAGEN Plasmid Mini Kit
- QIAamp DNA Mini Kit
- QIAquick PCR Purification Kit
- QIAquick Gel Extraction Kit
- The QIA Expressionist

Firma Pierce

- BCA Protein Assay Reagent Kit
- ECL Kit

### 5.3.4 Verbrauchsmaterialien

- Plastikartikel  
Einmalplastikartikel wurden überwiegend von den Firmen Eppendorf, Greiner Bio-one, Sarstedt bezogen.
- Membranen
  - Nitrozellose – Membranen
    - Protan BA 85 (Schleicher & Schüll, Dassel)
    - Nitrocellulose Blotting Membrane (Sartorius, Göttingen)
  - Nylon – Membranen



- Nytran ® 0,2 (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Porablot NY Plus (Macherey-Nagel, Düren)
- Blotting Papier
  - Dicke Bögen: GB40 (Hartenstein, Würzburg)
  - Dünne Bögen: GB002 (Schleicher & Schüll, Dassel)

### 5.3.5 Sonstige Substanzen

|                            |        |                        |
|----------------------------|--------|------------------------|
| ε – Aminocaprinsäure       | (EACA) | Merck                  |
| Colominsäure               | (CA)   | Sigma, Biochemika      |
| Glukose                    |        | Merck                  |
| Peptidoglykan (Staph. au.) |        | Fluka                  |
| Mureinsäure                |        | Biochemika             |
| Chromogene Substrate       |        |                        |
| ○ S-2251 (Plasmin)         |        | Haemochrom Diagnostika |
| ○ S-2444 (uPA)             |        | Haemochrom Diagnostika |

### 5.3.6 Proteine

|                           |                |
|---------------------------|----------------|
| Protein A – Sepharose     | Roche          |
| Protein G-Agarose         | Roche          |
| Poly – D – Lysin          | Sigma          |
| Fibronectin               | Sigma          |
| Fibrinogen (Plasmin-frei) | Calbiochem     |
| ECM (from human placenta) | BD Biosciences |

### 5.3.7 Antikörper

| Nummer | Antikörper                         | Organismus | Eingesetzte Verdünnung |           |           |              |
|--------|------------------------------------|------------|------------------------|-----------|-----------|--------------|
|        |                                    |            | WB                     | ELISA     | EM        | FACS         |
| 1      | Anti MC - Enolase                  | Kanninchen | 1 : 20 000             | 1 : 200   | 1 : 2 000 | 2µg / Ansatz |
| 2      | Anti MC - DnaK                     | Kanninchen | 1 : 20 000             | 1 : 200   | 1 : 2 000 | 2µg / Ansatz |
| 3      | Anti MC – Peroxiredoxin            | Kanninchen | 1 : 20 000             | 1 : 200   | 1 : 2 000 | 2µg / Ansatz |
| 4      | Anti humanes Plasminogen [2mg/ml]  | Ziege      | 1 : 1 500              | 1 : 500   | 1 : 150   | 2µg / Ansatz |
| 5      | Anti MC – Pili                     | Maus       | 1 : 4 000              |           |           |              |
| 6      | Anti MC – Opc [1mg/ml]             | Maus       | 1 : 5 000              |           |           | 2µg / Ansatz |
| 7      | Anti MC - OpA                      | Maus       | 1 : 1 000              |           |           |              |
| 8      | Anti MC - Serum                    | Kanninchen | 1 : 1 000              |           |           |              |
| 9      | Anti MC – Serogruppe B             | Maus       |                        | 1 : 4 000 |           |              |
| 10     | Anti humanes uPA                   | Maus       | 1 : 500                |           |           |              |
| 11     | Anti Ziege / Schaf IgG – POX       | Maus       | 1 : 30 000             | 1 : 7 500 |           |              |
| 12     | Anti Kanninchen IgG – POX          | Ziege      | 1 : 15 000             | 1 : 7 500 |           |              |
| 13     | Anti Maus IgG – POX                | Ziege      | 1 : 5 000              |           |           |              |
| 14     | Anti Ziege / Schaf IgG – 12nm Gold | Ziege      |                        |           | 1 : 20    |              |
| 15     | Anti Kanninchen IgG – 12nm Gold    | Ziege      |                        |           | 1 : 20    |              |
| 16     | Anti Kanninchen IgG – FITC         | Schwein    |                        |           |           | 1 : 150      |
| 17     | Anti Ziege IgG – FITC              | Kanninchen |                        |           |           | 1 : 100      |
| 18     | Anti Maus IgG - FITC               | Kanninchen |                        |           |           | 1 : 100      |

MC: Meningokokken; Antikörper 1 – 3: Immunoglobulin Antikörpertechnik GmbH, Himmelstadt, Deutschland; 4: Affinity Biologicals, Ancaster, Canada; 5: M. Virji, Bristol, UK; 6 + 7: M. Achtmann, Berlin, Deutschland; 8 + 9: Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg, Deutschland; 10: Calbiochem, Darmstadt, Deutschland; 11: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland; 12 – 15: Dianova, Hamburg, Deutschland; 16: DAKO, Hamburg, Deutschland; 17 – 18: Dianova, Hamburg, Deutschland.

### 5.3.8 Enzyme

#### 5.3.8.1 Proteasen

|                    |                        |
|--------------------|------------------------|
| Carboxypeptidase C | Sigma                  |
| Plasmin            | Haemochrom Diagnostika |
| Plasminogen        | Haemochrom Diagnostika |
| Thrombin           | MP Biomedicals         |
| Urokinase (uPA)    | American Diagnostica   |

**5.3.8.2 Protease-Inhibitoren**

|                         |            |
|-------------------------|------------|
| $\alpha_2$ -Antiplasmin | Calbiochem |
| Aprotenin               | Sigma      |
| Complete                | Roche      |

**5.3.8.3 Endonukleasen**

Endonukleasen wurden von der Firma NEB bezogen.

**5.3.8.4 Weitere Enzyme**

|   |       |
|---|-------|
| DNase   | Sigma |
| Polymerasen: Polymerasen wurden von den Firmen NEB, Ampligene und Biomol bezogen. |       |
| T4-Ligase   | NEB   |
| CIP   | NEB   |
| Klenow-Enzym  | Roche |

**5.3.9 Seren**

- |               |   |
|---------------|---|
| • Humanserum  | individuelle Spender  |
| • Rattenserum | Tierstall des Institutes für Molekulare Infektionsforschung |
| • Rinderserum | Sigma   |
| • Pferdeserum | Sigma   |

**5.3.10 Verwendete Marker****5.3.10.1 DNA-Marker**

- |   |            |
|---|------------|
| • Smart – Ladder                              | Eurogentec |
| • 1kb Ladder                                  | Gibco BRL  |
| • H & L Marker                                | BioRad     |
| • DNA Molecular Weight Marker III & VII (DIG) | Roche      |

**5.3.10.2 Protein-Marker**

- |                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| • Benchmark Prestained Protein Ladder | Invitrogen |
| • Prestained Protein Ladder           | NEB        |

**5.4 Geräteliste**

| <b>Gerät</b>                         | <b>Hersteller (Modell)</b>        |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Analysewaagen                        | Mettler                           |
| Automatikpipetten                    | Eppendorf                         |
| Blotkammer für PAA-Gele              | BioRad                            |
| Brutschrank                          | Heraeus Instruments (BB 6220)     |
| DNA-Sequenzierer                     | Applied Biosystems ABI377         |
| Elektrophoresekammer für Agarosegele | BioRad; MWG Biotech               |
| Elektrophoresekammer für PAA-Gele    | BioRad                            |
| ELISA-Reader                         | ThermoLabsystems (Multi Scan Ex)  |
| Entwicklungsmaschine                 | AGFA (Carix 60)                   |
| Feinwaage                            | Sartorius (R 160 P)               |
| Fluoreszenzmikroskop                 | Carl Zeiss Jena (Zeiss Imager Z1) |
| Geldokumentationsanlage              | Herolab (UVT 28 MP)               |
| Hybridisierungsöfen                  | Biometra (OV5)                    |
| Konfokales Laser Scanning Mikroskop  | Carl Zeiss Jena (Zeiss LSM510)    |
| Kühlzentrifugen                      | Sorvall (RC5B und RC5B Plus)      |
| Magnetrührer                         | Janke und Kunkel (IKAMAG®RH)      |
| Mikrowelle                           | Bauknecht (MWS 1820 Duo)          |

---

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| pH-Meter                    | WTW (pH530)   |
| Pipettierhilfen, elektrisch |   |
| Photometer                  | Hitachi (U-2000)  |
| Schüttelinkubator           | Certomat <sup>®</sup> H, New Brunswick Scientific (innova 4300)   |
| Spannungsgeräte             | Biometra (Standard Power Pack P25)                                |
| Thermoblock                 | Eppendorf (Thermomixer 5436)                                      |
| Thermocycler                | MWG Biotech Primus 96plus, Biometra TRIO-Thermoblock <sup>™</sup> |
| Tischzentrifuge             | Heraeus (Biofuge 15)  |
| Ultrazentrifuge             |   |
| UV-Lampe                    | Heraeus (UVT-20LP)  |
| UV-Stratalinker             | Stratagene (Stratalinker 1800)                                    |
| Vakuumverdampfer            | Savant (SpeedVac Plus SC110A)                                     |
| Vortexer                    | Scientific Industries (Vortex Genie 2), Hartenstein Mixer         |
| Wasserbad                   | Julabo (SW20)   |

## 6 Anhang

### 6.1 Unbekapselte, Polysialyltransferasegen-positive Stämme der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie

| No  | ST   | Genotyp | IS - Insertionen | Mutationen  | Mechanismus                 | Kategorie            |
|-----|------|---------|------------------|---|-----------------------------|----------------------|
| 525 | 35   | B       |                  | A - Deletion in siaA (734)                                  | „Frameshift“ in siaA        | 1 bp Deletionen      |
| 562 | 35   | B       |                  | A - Deletion in siaA (734)                                  | „Frameshift“ in siaA        | 1 bp Deletionen      |
| 590 | 337  | C       |                  | C - Deletion in siaA (706)                                  | „Frameshift“ in siaA        | 1 bp Deletionen      |
| 767 | 785  | Y       |                  | G - Deletion in siaA (918)                                  | „Frameshift“ in siaC        | 1 bp Deletionen      |
| 10  | 813  | B       |                  | G - Deletion in siaD (3546)                                 | „Frameshift“ in siaD        | 1 bp Deletionen      |
| 259 | 768  | Y       |                  | T - Deletion in siaA (1061)                                 | „Frameshift“ in siaA        | 1 bp Deletionen      |
| 818 | 758  | Y       |                  | Fehlen von ca. 200 bp<br>5' von siaD                        | Deletion in Region A        | Große Deletionen     |
| 160 | 881  | B       |                  | Deletion von 114 bp in siaD<br>(3053-3167)                  | Deletion in siaD            | Große Deletionen     |
| 520 | 162  | B       |                  | Deletion von 383bp im ctrA<br>und region A (bis Pos. 132)   | Deletion der Promoterregion | Große Deletionen     |
| 360 | 162  | B       |                  | Deletion von 383bp im ctrA<br>und region A (bis Pos. 132)   | Deletion der Promoterregion | Große Deletionen     |
| 748 | 865  | B       |                  | Deletion of ctrA und siaA                                   | Deletion in Region A & C    | Große Deletionen     |
| 197 | 939  | C       |                  | Deletion von ctrA, B<br>& siaA, B, C                        | Deletion in Region A & C    | Große Deletionen     |
| 201 | 939  | C       |                  | Deletion von ctrA, B<br>& siaA, B, C                        | Deletion in Region A & C    | Große Deletionen     |
| 202 | 939  | C       |                  | Deletion von ctrA, B<br>& siaA, B, C                        | Deletion in Region A & C    | Große Deletionen     |
| 629 | 948  | B       |                  | Deletion von ctrA, B<br>und siaA                            | Deletion in Region A & C    | Große Deletionen     |
| 173 | 949  | Y       |                  | Deletion von siaA   | Deletion in Region A        | Große Deletionen     |
| 174 | 949  | Y       |                  | Deletion von siaA   | Deletion in Region A        | Große Deletionen     |
| 194 | 949  | Y       |                  | Deletion von siaA   | Deletion in Region A        | Große Deletionen     |
| 827 | 23   | Y       |                  | Deletion von siaB & siaC                                    | Deletion in Region A        | Große Deletionen     |
| 329 | 800  | B       |                  | C - Insertion in siaA (1146)                                | „Frameshift“ in siaA        | Insertionen (1-34bp) |
| 688 | 337  | C       |                  | A - Insertion in siaA (851)                                 | „Frameshift“ in siaA        | Insertionen (1-34bp) |
| 326 | 112  | B       |                  | A-Deletion vorm ctrA (41) /<br>C - Insertion in siaA (1146) | „Frameshift“ in siaA        | Insertionen (1-34bp) |
| 69  | 22   | W       |                  | C - Insertion in siaA (535)                                 | „Frameshift“ in siaA        | Insertionen (1-34bp) |
| 61  | 966  | B       |                  | C - Insertion in siaA (683)                                 | „Frameshift“ in siaA        | Insertionen (1-34bp) |
| 221 | 976  | B       |                  | Verdopplung von (AATA)<br>Pos 3826-3829 in siaD             | „Frameshift“ in siaD        | Insertionen (1-34bp) |
| 145 | 1125 | C       |                  | Verdopplung von 22 bp<br>(2417-2438) in siaC                | „Frameshift“ in siaC        | Insertionen (1-34bp) |
| 775 | 952  | Y       |                  | Verdopplung von 34 bp<br>(269-313) in siaA                  | „Frameshift“ in siaA        | Insertionen (1-34bp) |
| 82  | 939  | C       |                  | Verdopplung von (AAGGT),<br>Pos 538-542 in siaA             | „Frameshift“ in siaA        | Insertionen (1-34bp) |
| 239 | 976  | B       |                  | Verdopplung von (AATA)<br>Pos 3826-3829 in siaD             | „Frameshift“ in siaD        | Insertionen (1-34bp) |
| 462 | 23   | Y       |                  | Verdopplung von (CAAAAT)<br>Pos364-368 in siaA              | „Frameshift“ in siaA        | Insertionen (1-34bp) |
| 439 | 23   | Y       |                  | Verdopplung von (CAAAAT)<br>Pos364-368 in siaA              | „Frameshift“ in siaA        | Insertionen (1-34bp) |
| 91  | 162  | B       |                  | Verdopplung von (TA),<br>Pos 3328-3329 in siaD              | „Frameshift“ in siaD        | Insertionen (1-34bp) |

| No  | ST   | Genotyp | IS - Insertionen   | Mutationen                      | Mechanismus   | Kategorie            |
|-----|------|---------|--------------------|---------------------------------|---|----------------------|
| 617 | 937  | C       |                    | Verdopplung von 11 bp (162-173) | Defekt in Shine-Dalgarno Sequenz                        | Insertionen (1-34bp) |
| 618 | 937  | C       |                    | Verdopplung von 11 bp (162-173) | Defekt in Shine-Dalgarno Sequenz                        | Insertionen (1-34bp) |
| 498 | 23   | Y       |                    | G - Insertion in siaA (1130)    | „Frameshift“ in siaA                                    | Insertionen (1-34bp) |
| 657 | 939  | C       |                    | T - Insertion in sia A (368)    | „Frameshift“ in siaA                                    | Insertionen (1-34bp) |
| 727 | 337  | C       |                    | T - Insertion in sia C (2451)   | „Frameshift“ in siaC                                    | Insertionen (1-34bp) |
| 819 | 842  | B       |                    | T - Insertion in siaA (1200)    | „Frameshift“ in siaA                                    | Insertionen (1-34bp) |
| 408 | 22   | W       |                    | T - Insertion in siaA (225)     | „Frameshift“ in siaA                                    | Insertionen (1-34bp) |
| 814 | 892  | Y       |                    | T - Insertion in siaA (237)     | „Frameshift“ in siaA                                    | Insertionen (1-34bp) |
| 613 | 836  | B       |                    | T - Insertion in siaA (588)     | „Frameshift“ in siaA                                    | Insertionen (1-34bp) |
| 812 | 889  | C       |                    | T - Insertion in siaA (710)     | „Frameshift“ in siaA                                    | Insertionen (1-34bp) |
| 754 | 22   | W       | IS1016 siaD(937)   |                                 | IS1016 in siaD  | IS1016               |
| 192 | 23   | Y       | IS1016 siaA(921)   |                                 | IS1016 in siaA  | IS1016               |
| 293 | 23   | Y       | IS1016 siaA(927)   |                                 | IS1016 in siaA  | IS1016               |
| 141 | 23   | Y       | IS1016 siaD(1968)  |                                 | IS1016 in siaD  | IS1016               |
| 683 | 1125 | B       | IS1106 siaA (240)  |                                 | IS1106 in siaA  | IS1106               |
| 451 | 762  | Y       | IS1301 siaC(3038)  | Deletion von siaA, B & C        | IS1301 hat siaA, siaB und die 5' Region of siaC ersetzt | IS1301               |
| 284 | 32   | B       | IS1301 siaA(587)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 725 | 44   | B       | IS1301 siaA(982)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 146 | 805  | B       | IS1301 siaA(120)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 619 | 798  | B       | IS1301 siaA(587)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 193 | 799  | B       | IS1301 siaA(587)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 196 | 799  | B       | IS1301 siaA(587)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 34  | 863  | B       | IS1301 siaA(120)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 541 | 1120 | B       | IS1301 siaA(120)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 248 | 1131 | B       | IS1301 siaD (3315) |                                 | IS1301 in siaD  | IS1301               |
| 50  | 44   | B       | IS1301 siaD (3565) |                                 | IS1301 in siaD  | IS1301               |
| 589 | 136  | B       | IS1301 siaD (3315) |                                 | IS1301 in siaD  | IS1301               |
| 822 | 957  | B       | IS1301 siaD (3315) |                                 | IS1301 in siaD  | IS1301               |
| 685 | 819  | B       | IS1301 siaD (3544) |                                 | IS1301 in siaD  | IS1301               |
| 760 | 939  | B       | IS1301 siaD (3315) |                                 | IS1301 in siaD  | IS1301               |
| 161 | 974  | B       | IS1301 siaD (3315) |                                 | IS1301 in siaD  | IS1301               |
| 279 | 278  | C       | IS1301 siaA(587)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 501 | 810  | C       | IS1301 siaA(587)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 139 | 798  | C       | IS1301 siaA(587)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 263 | 940  | C       | IS1301 siaA(587)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 222 | 814  | C       | IS1301 siaA(120)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 315 | 22   | W       | IS1301 siaA(847)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 444 | 22   | W       | IS1301 siaD(1599)  |                                 | IS1301 in siaD  | IS1301               |
| 63  | 23   | Y       | IS1301 siaA(587)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 77  | 23   | Y       | IS1301 siaA(587)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 96  | 23   | Y       | IS1301 siaA(847)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 119 | 23   | Y       | IS1301 siaA(120)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 577 | 23   | Y       | IS1301 siaA(1034)  |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 674 | 837  | Y       | IS1301 siaA(587)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 224 | 92   | Y       | IS1301 siaA(587)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 420 | 784  | Y       | IS1301 siaA(587)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 304 | 896  | Y       | IS1301 siaA(587)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 86  | 967  | Y       | IS1301 siaA(1000)  |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |
| 22  | 1123 | Y       | IS1301 siaA(587)   |                                 | IS1301 in siaA  | IS1301               |

| No  | ST   | Genotyp | IS - Insertionen  | Mutationen   | Mechanismus           | Kategorie                                    |
|-----|------|---------|-------------------|--|-----------------------|--|
| 109 | 766  | Y       | IS1301 siaA(587)  |  | IS1301 in siaA        | IS1301                                       |
| 332 | 849  | Y       | IS1301 siaA(587)  |  | IS1301 in siaA        | IS1301                                       |
| 655 | 850  | Y       | IS1301 siaA(1132) |  | IS1301 in siaA        | IS1301                                       |
| 809 | 850  | Y       | IS1301 siaA(1132) |  | IS1301 in siaA        | IS1301                                       |
| 374 | 949  | Y       | IS1301 siaA(587)  |  | IS1301 in siaA        | IS1301                                       |
| 734 | 951  | Y       | IS1301 siaA(587)  |  | IS1301 in siaA        | IS1301                                       |
| 357 | 828  | Y       | IS1301 siaA(982)  |  | IS1301 in siaA        | IS1301                                       |
| 205 | 457  | C       |                   | A - Deletion in siaD (315)                         | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 87  | 816  | C       |                   | A - Deletion in siaD (610)                         | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 422 | 1134 | C       |                   | A - Deletion in siaA (660)                         | SSM in siaA           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 164 | 894  | Y       |                   | A - Deletion in siaD (1220)                        | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 488 | 835  | B       |                   | A - Deletion in siaD (3560)                        | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 666 | 23   | Y       |                   | A - Deletion in siaD (763)                         | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 455 | 44   | B       |                   | A - Insertion in siaD (3562)                       | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 249 | 872  | B       |                   | A - Insertion in siaD (3562)                       | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 602 | 873  | B       |                   | A - Insertion in siaD (3562)                       | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 126 | 808  | B       |                   | A - Insertion in siaD (3562)                       | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 343 | 41   | B       |                   | A - Insertion in siaD (3562)                       | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 653 | 973  | B       |                   | A - Insertion in siaD (3562)                       | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 709 | 879  | B       |                   | A - Insertion in siaD (3562)                       | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 291 | 939  | C       |                   | A - Insertion in siaD (431)                        | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 806 | 922  | C       |                   | A - Insertion in siaD (431)                        | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 100 | 886  | B       |                   | C - Deletion (3225) / A - Insertion (3562) in siaD | Doppelter SSM im siaD | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 376 | 32   | B       |                   | C - Deletion in siaD (3225)                        | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 531 | 812  | B       |                   | C - Deletion in siaD (3225)                        | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 560 | 782  | B       |                   | C - Deletion in siaD (3225)                        | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 347 | 755  | B       |                   | C - Deletion in siaD (3225)                        | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 381 | 755  | B       |                   | C - Deletion in siaD (3225)                        | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 386 | 755  | B       |                   | C - Deletion in siaD (3225)                        | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 502 | 1144 | B       |                   | C - Deletion in siaD (3225)                        | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 667 | 759  | B       |                   | C - Deletion in siaD (3225)                        | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 104 | 22   | W       |                   | C - Insertion in siaD (307)                        | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 720 | 92   | Y       |                   | C - Insertion in siaD (307)                        | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 269 | 949  | Y       |                   | C - Insertion in siaD (307)                        | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |

| No  | ST  | Genotyp | IS - Insertionen | Mutationen  | Mechanismus           | Kategorie                                    |
|-----|-----|---------|------------------|---|-----------------------|--|
| 230 | 800 | B       |                  | C - Insertion in siaD (3227)                                  | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 323 | 801 | B       |                  | C - Insertion in siaD (3227)                                  | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 370 | 800 | B       |                  | C - Insertion in siaD (3227)                                  | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 262 | 35  | B       |                  | C - Insertion in siaD (3227)                                  | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 461 | 809 | B       |                  | C - Insertion in siaD (3227)                                  | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 523 | 170 | B       |                  | C - Insertion in siaD (3227)                                  | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 75  | 162 | B       |                  | C - Insertion in siaD (3227)                                  | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 540 | 755 | B       |                  | C - Insertion in siaD (3227)                                  | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 11  | 804 | B       |                  | C - Insertion in siaD (3227)                                  | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 236 | 461 | B       |                  | C - Insertion in siaD (3227)                                  | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 286 | 955 | B       |                  | C - Insertion in siaD (3227)                                  | SSM in siaD           | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 715 | 941 | C       |                  | T - Insertion in siaD (1455) /<br>A - Deletion in sia D (430) | Doppelter SSM im siaD | Längenvariationen in homopolymeren Sequenzen |
| 543 | 884 | Y       |                  | Basenaustausch C->T<br>in siaA (966)                          | Verfrühtes Stoppcodon | Verfrühtes Stoppcodon                        |
| 214 | 949 | Y       |                  | Basenaustausch C->T<br>in siaA (966)                          | Verfrühtes Stoppcodon | Verfrühtes Stoppcodon                        |
| 771 | 945 | C       |                  | Basenaustausch C->T<br>in siaC (2781)                         | Verfrühtes Stoppcodon | Verfrühtes Stoppcodon                        |
| 231 | 22  | W       |                  | Basenaustausch G->A<br>in siaD (2748)                         | Verfrühtes Stoppcodon | Verfrühtes Stoppcodon                        |
| 639 | 924 | B       |                  |   |                       |  |
| 38  | 44  | B       |                  |   |                       |  |
| 128 | 921 | B       |                  |   |                       |  |
| 356 | 41  | B       |                  |   |                       |  |
| 384 | 835 | B       |                  |   |                       |  |
| 569 | 41  | B       |                  |   |                       |  |
| 646 | 44  | B       |                  |   |                       |  |
| 650 | 41  | B       |                  |   |                       |  |
| 475 | 793 | B       |                  |   |                       |  |
| 52  | 965 | B       |                  |   |                       |  |
| 584 | 960 | B       |                  |   |                       |  |
| 637 | 919 | B       |                  |   |                       |  |
| 737 | 11  | C       |                  |   |                       |  |
| 43  | 806 | C       |                  |   |                       |  |
| 53  | 35  | C       |                  |   |                       |  |
| 255 | 278 | C       |                  |   |                       |  |
| 622 | 813 | C       |                  |   |                       |  |
| 714 | 813 | C       |                  |   |                       |  |
| 766 | 813 | C       |                  |   |                       |  |
| 207 | 477 | C       |                  |   |                       |  |
| 311 | 883 | C       |                  |   |                       |  |
| 579 | 337 | C       |                  |   |                       |  |
| 640 | 337 | C       |                  |   |                       |  |
| 698 | 337 | C       |                  |   |                       |  |
| 281 | 22  | W       |                  |   |                       |  |
| 652 | 23  | Y       |                  |   |                       |  |

| No  | ST  | Genotyp | IS - Insertionen | Mutationen | Mechanismus | Kategorie |
|-----|-----|---------|------------------|------------|-------------|-----------|
| 152 | 894 | Y       |                  |            |             |           |
| 405 | 23  | Y       |                  |            |             |           |
| 491 | 23  | Y       |                  |            |             |           |
| 573 | 23  | Y       |                  |            |             |           |
| 441 | 785 | Y       |                  |            |             |           |
| 443 | 785 | Y       |                  |            |             |           |
| 517 | 167 | Y       |                  |            |             |           |
| 796 | 763 | Y       |                  |            |             |           |
| 593 | 911 | Y       |                  |            |             |           |

No: Bezeichnet die Stammnummer.

## 6.2 Verzeichnis der Abkürzungen

|        |  |
|--------|--|
| AP     | $\alpha$ 2-Antiplasmin                     |
| BL     | Basallamina                                |
| CA     | Colominsäure                               |
| CD     | „Cluster of differentiation“               |
| cps    | Kapsel („capsule“)                         |
| EACA   | $\epsilon$ -Aminocaprinsäure               |
| ECM    | Extrazelluläre Matrix                      |
| Eno    | Enolase                                    |
| ET     | Elektrophoresetyp                          |
| Gal    | Galaktose                                  |
| Glc    | Glukose                                    |
| GlcNAc | N-Acetyl-Glukosamin                        |
| Hep    | Heptose                                    |
| HS     | Humanserum                                 |
| IS     | Insertionselement                          |
| KDO    | Keto-Desoxyoktonat                         |
| LOS    | Lipooligosaccharid                         |
| LPS    | Lipopolysaccharid                          |
| ManNAc | N-Acetyl-Mannosamin                        |
| MLEE   | Multilokus Enzym Elektrophorese            |
| MLST   | Multilokus Sequenz Typisierung             |
| MMP    | Matrix-Metalloproteasen                    |
| n-CAM  | Neuronale Zelladhäsionsmoleküle            |
| NeuNAc | N-Acetyl-Neuraminsäure (Sialinsäure)       |
| NMB    | <i>Neisseria meningitidis</i> Serogruppe B |
| OM     | Äußere Membran                             |
| PAI    | Plasmin-Aktivator-Inhibitor                |
| Perox  | Peroxiredoxin                              |
| PLG    | Plasminogen                                |
| PLN    | Plasmin                                    |
| Sg     | Serogruppe                                 |
| SSM    | „slipped strand mispairing“                |
| ST     | Sequenztyp                                 |
| tPA    | Tissue-type Plasminogen-Aktivator          |
| uPA    | Urokinase Plasminogen-Aktivator            |
| uPAR   | uPA-Rezeptor                               |



### **6.3 Erklärung**

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade (neben dem Diplom in Biologie) erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, Juli 2007

Martin Weber

## 6.4 Publikationsliste

Hertzig T, Weber M, Greiffenberg L, Holthausen BS, Goebel W, Kim KS and Kuhn M. (2003). Antibodies present in normal human serum inhibit invasion of human brain microvascular endothelial cells by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.*; **71**: 95-100.

Weber MV\*, Claus H\*, Maiden MC, Frosch M and Vogel U. (2006). Genetic mechanisms for loss of encapsulation in polysialyltransferase-gene-positive meningococci isolated from healthy carriers. *Int J Med Microbiol.*; **296**: 475-84.

Knaust A\*, Weber MV\*, Hammerschmidt S, Bergmann S, Frosch M and Kurzai O. (2007). Cytosolic proteins contribute to surface plasminogen recruitment of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.*; **189**: 3246-55.

\*: Diese Autoren sind gleichberechtigt.

## 6.5 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Martin, Volkmar, Rudolf, Hermann Weber  
Geburtsdatum: 23. Januar 1975  
Geburtsort: Wuppertal

### Wissenschaftliche Anstellung:

Feb. 03 – Dez. 06 Promotion am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg bei Herrn Prof. Dr. M. Frosch.  
Thema der Promotionsarbeit: „Populationsbiologische und pathogenetische Aspekte von *Neisseria meningitidis*“.

### Studium:

Apr. 96 – Sep. 02 Diplomstudium der Biologie an der Universität Würzburg.  
Studienschwerpunkte: Mikrobiologie (Hauptfach), Biochemie und Zell- und Entwicklungsbiologie.  
Diplomarbeit: „Endothelzellen als Zielzellen für invasive Listerien“, durchgeführt am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von PD Dr. M. Kuhn.

### Wehrdienst:

Jul. 95 – Apr. 96 Wehrdienst mit Grundausbildung in Roth und anschließender Tätigkeit als Flugbetriebsspezialist in der 1. Staffel des JaboG 32 (Lagerlechfeld).

### Schulbildung:

1981 – 1983 Besuch der Schiller-Grundschule, Schweinfurt.  
1983 – 1986 Besuch der Deutschen Schule Brüssel, Belgien.  
1986 – 1995 Besuch des Alexander-von-Humboldt-Gymnasiums, Schweinfurt.  
Jun. 1995 Abschluss: Abitur

## 7 Literatur

- Abdillahi, H., and Poolman, J. (1988) Typing of group-B *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies in the whole-cell ELISA. *J Med Microbiol* **26**: 177-180.
- Achtman, M., van der Ende, A., Zhu, P., Koroleva, I.S., Kusecek, B., Morelli, G., Schuurman, I.G., Brieske, N., Zurth, K., Kostyukova, N.N., and Platonov, A.E. (2001) Molecular epidemiology of serogroup a meningitis in Moscow, 1969 to 1997. *Emerg Infect Dis* **7**: 420-427.
- Ala'Aldeen, D.A., Neal, K., Ait-Tahar, K., Nguyen-Van-Tam, J.S., English, A., and Falla, T.J. (2000) Dynamics of meningococcal long-term carriage among university students and their implications for mass vaccination. *J Clin Microbiol* **38**: 2311-2316.
- Andersen, J., Berthelsen, L., Bech Jensen, B., and Lind, I. (1998) Dynamics of the meningococcal carrier state and characteristics of the carrier strains: a longitudinal study within three cohorts of military recruits. *Epidemiol Infect* **121**: 85-94.
- Archibald, F.S., and DeVoe, I.W. (1979) Removal of iron from human transferrin by *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Lett* **6**: 159-162.
- Ayala, B.P., Vasquez, B., Clary, S., Tainer, J.A., Rodland, K., and So, M. (2001) The pilus-induced Ca<sup>2+</sup> flux triggers lysosome exocytosis and increases the amount of Lamp1 accessible to *Neisseria IgA1* protease. *Cell Microbiol* **3**: 265-275.
- Ayala, P., Lin, L., Hopper, S., Fukuda, M., and So, M. (1998) Infection of Epithelial Cells by Pathogenic *Neisseriae* Reduces the Levels of Multiple Lysosomal Constituents. *Infect. Immun.* **66**: 5001-5007.
- Baker, M., McNicholas, A., Garrett, N., Jones, N., Stewart, J., Koberstein, V., and Lennon, D. (2000) Household crowding a major risk factor for epidemic meningococcal disease in Auckland children. *Pediatr Infect Dis J* **19**: 983-990.
- Bayer, M.E., Bayer, M.H., Lunn, C.A., and Pigiet, V. (1987) Association of thioredoxin with the inner membrane and adhesion sites in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**: 2659-2666.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2003) Glykolyse und Gluconeogenese. In *Biochemie*. Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L. (eds). Heidelberg - Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, pp. 465-508.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S., and Hammerschmidt, S. (2001) alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Molecular Microbiology* **40**: 1273-1287.
- Bergmann, S., Wild, D., Diekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G.S., and Hammerschmidt, S. (2003) Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* **49**: 411-423.
- Bergmann, S., Rohde, M., and Hammerschmidt, S. (2004) Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* Is a Surface-Displayed Plasminogen-Binding Protein. *Infect. Immun.* **72**: 2416-2419.
- Bergmann, S., Rohde, M., Preissner, K.T., and Hammerschmidt, S. (2005) The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. *Thromb Haemost* **94**: 304-311.
- Berild, D., and Gedde-Dahl, T.W. (1980) Meningococcal disease in the Norwegian armed forces 1967 - 1979. Some epidemiological aspects. *NIPH Ann* **3**: 23-30.

- Berry, D.S., Lynn, F., Lee, C.-H., Frasch, C.E., and Bash, M.C. (2002) Effect of O Acetylation of *Neisseria meningitidis* Serogroup A Capsular Polysaccharide on Development of Functional Immune Responses. *Infect. Immun.* **70**: 3707-3713.
- Bhattacharjee, A.K., Jennings, H.J., Kenny, C.P., Martin, A., and Smith, I.C.P. (1975) Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C carbon 13 nuclear magnetic resonance. *J Biol Chem* **250**: 1926-1932.
- Bhattacharjee, A.K., Jennings, H.J., Kenny, C.P., Martin, A., and Smith, I.C.P. (1976) Structural determination of the polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups Y, W-135, and BO1. *Can J Biochem* **54**: 1-8.
- Bigham, J.M., Hutcheon, M.E., Patrick, D.M., and Pollard, A.J. (2001) Death from invasive meningococcal disease following close contact with a case of primary meningococcal conjunctivitis - Langley, British Columbia, 1999. *Can Commun Dis Rep* **27**: 13-18.
- Bjerre, A., Brusletto, B., Rosenqvist, E., Namork, E., Kierulf, P., Ovstebo, R., Joo, G.B., and Brandtzaeg, P. (2000) Cellular activating properties and morphology of membrane-bound and purified meningococcal lipopolysaccharide. *Journal of Endotoxin Research* **6**: 437-445.
- Boerlin, P., and Piffaretti, J.C. (1995) Multilocus enzyme electrophoresis. *Methods Mol Biol* **46**: 63-78.
- Bonnah, R.A., Yu, R.-H., and Schryvers, A.B. (1995) Biochemical analysis of lactoferrin receptors in neisseriaceae: identification of a second bacterial lactoferrin receptor protein. *Microbial Pathogenesis* **19**: 285-297.
- Bonnah, R.A., Lee, S.W., Vasquez, B., Enns, C., and So, M. (2000) Alteration of epithelial cell transferrin-iron homeostasis by *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Cell Microbiol* **2**: 207-218.
- Borrow, R., Claus, H., Guiver, M., Smart, L., Jones, D.M., Kaczmarski, E.B., Frosch, M., and Fox, A.J. (1997) Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B and C infection by a sialyltransferase (siaD) PCR ELISA. *Epidemiol Infect* **118**: 111-117.
- Boulnois, G.J., Roberts, I.S., Hodge, R., Hardy, K.R., Jann, K.B., and Timmis, K.N. (1987) Analysis of the K1 capsule biosynthesis genes of *Escherichia coli*: definition of three functional regions for capsule production. *Mol Gen Genet* **208**: 242-246.
- Boulnois, G.J., and Roberts, I.S. (1990) Genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* **150**: 1-18.
- Bourdoulous, S., and Nassif, X. (2006) Mechanisms of Attachment and Invasion. In *Handbook of Meningococcal Disease. Infection Biology, Vaccination, Clinical Management*. Frosch, M. and Maiden, M.C.J. (eds). Weinheim, Germany: WILEY-VCH, pp. 257-272.
- Bradley, C.J., Griffiths, N.J., Rowe, H.A., Heyderman, R.S., and Virji, M. (2005) Critical determinants of the interactions of capsule-expressing *Neisseria meningitidis* with host cells: the role of receptor density in increased cellular targeting via the outer membrane Opa proteins. *Cellular Microbiology* **7**: 1490-1503.
- Brandtzaeg, P., Joo, G.B., Brusletto, B., and Kierulf, P. (1990) Plasminogen activator inhibitor 1 and 2, alpha-2-antiplasmin, plasminogen, and endotoxin levels in systemic meningococcal disease. *Thromb Res* **57**: 271-278.
- Brandtzaeg, P. (1995) Pathogenesis of meningococcal infections. In *Meningococcal Disease*. Cartwright, K. (ed). Chichester, England: John Wiley, pp. 71-114.

- Brandtzaeg, P., Bjerre, A., Ovstebo, R., Brusletto, B., Joo, G.B., and Kierulf, P. (2001) Neisseria meningitidis lipopolysaccharides in human pathology. *J Endotoxin Res* **7**: 401-420.
- Brandtzaeg, P., and van Deuren, M. (2002) Current concepts in the role of the host response in Neisseria meningitidis septic shock. *Curr Opin Infect Dis* **15**: 247-252.
- Brandtzaeg, P. (2003) Host response to Neisseria meningitidis lacking lipopolysaccharides. *Expert Rev Anti Infect Ther* **1**: 589-596.
- Brandtzaeg, P. (2006) Pathogenesis and Pathophysiology of Invasive Meningococcal Disease. In *Handbook of Meningococcal Disease*. Frosch, M. and Maiden, M.C.J. (eds). Weinheim, Germany: WILEY-VCH.
- Brownstein, C., Deora, A.B., Jacovina, A.T., Weintraub, R., Gertler, M., Khan, K.M.F., Falcone, D.J., and Hajjar, K.A. (2004) Annexin II mediates plasminogen-dependent matrix invasion by human monocytes: enhanced expression by macrophages. *Blood* **103**: 317-324.
- Bukau, B., and Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and the Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351-366.
- Bygraves, J.A., Urwin, R., Fox, A.J., Gray, S.J., Russell, J.E., Feavers, I.M., and Maiden, M.C.J. (1999) Population Genetic and Evolutionary Approaches to Analysis of Neisseria meningitidis Isolates Belonging to the ET-5 Complex. *J Bacteriol.* **181**: 5551-5556.
- Cartwright, K. (2006) Historical Aspects. In *Handbook of Meningococcal Disease - Infection Biology, Vaccination, Clinical Management*. Frosch, M. and Maiden, M.C.J. (eds). Weinheim, Germany: WILEY-VCH, pp. 1-11.
- Cartwright, K.A., Stuart, J.M., Jones, D.M., and Noah, N.D. (1987) The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and Neisseria lactamica. *Epidemiol Infect* **99**: 591-601.
- Cartwright, K.A., Jones, D.M., Smith, A.J., Stuart, J.M., Kaczmarek, E.B., and Palmer, S.R. (1991) Influenza A and meningococcal disease. *Lancet* **338**: 554-557.
- Castellino, F.J., and Powell, J.R. (1981) Human plasminogen. *Methods Enzymol* **80**: 365-378.
- Caugant, D.A., Froholm, L.O., Bovre, K., Holten, E., Frasch, C.E., Mocca, L.F., Zollinger, W.D., and Selander, R.K. (1987a) Intercontinental spread of Neisseria meningitidis clones of the ET-5 complex. *Antonie Van Leeuwenhoek* **53**: 389-394.
- Caugant, D.A., Mocca, L.F., Frasch, C.E., Froholm, L.O., Zollinger, W.D., and Selander, R.K. (1987b) Genetic structure of Neisseria meningitidis populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J Bacteriol* **169**: 2781-2792.
- Caugant, D.A. (1998) Population genetics and molecular epidemiology of Neisseria meningitidis. *APMIS* **106**: 505-525.
- Caugant, D.A. (2001) Global trends in meningococcal disease. In *Meningococcal Disease, Methods and Protocols*. Pollard, A.J. and Maiden, M.C.J. (eds). Totowa, N.J.: Humana Press, pp. 273-294.
- Cesarman-Maus, G., and Hajjar, K.A. (2005) Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology* **129**: 307-321.
- Chapman, H.A.J., and Stone, O.L. (1984) Co-operation between plasmin and elastase in elastin degradation by intact murine macrophages. *Biochem J* **222**: 721-728.
- Claus, H., Vogel, U., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., and Frosch, M. (1997) Molecular divergence of the sia locus in different serogroups of Neisseria meningitidis expressing polysialic acid capsules. *Mol Gen Genet* **257**: 28-34.

- Claus, H., Maiden, M.C.J., Maag, R., Frosch, M., and Vogel, U. (2002) Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology* **148**: 1813-1819.
- Claus, H., Borrow, R., Achtman, M., Morelli, G., Kantelberg, C., Longworth, E., Frosch, M., and Vogel, U. (2004) Genetics of capsule O-acetylation in serogroup C, W-135 and Y meningococci. *Molecular Microbiology* **51**: 227-239.
- Claus, H., Maiden, M.C.J., Wilson, D.J., Jolley, K.A., Hessler, F., Frosch, M., and Vogel, U. (2005) Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis* **191**: 1263-1271.
- Coleman, J., Sellati, T., Testa, J., Kew, R., Furie, M., and Benach, J. (1995) *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. *Infect. Immun.* **63**: 2478-2484.
- Coleman, J.L., Gebbia, J.A., Piesman, J., Degen, J.L., Bugge, T.H., and Benach, J.L. (1997) Plasminogen Is Required for Efficient Dissemination of *B. burgdorferi* in Ticks and for Enhancement of Spirochetemia in Mice. *Cell* **89**: 1111-1119.
- Coleman, J.L., Roemer, E.J., and Benach, J.L. (1999) Plasmin-Coated *Borrelia burgdorferi* Degrades Soluble and Insoluble Components of the Mammalian Extracellular Matrix. *Infect. Immun.* **67**: 3929-3936.
- Collen, D., and Verstraete, M. (1975) Molecular biology of human plasminogen. II. Metabolism in physiological and some pathological conditions in man. *Thromb Diath Haemorrh* **34**: 403-408.
- Connolly, M., and Noah, N.D. (1999) Is group C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993-1996. *Epidemiol Infect* **122**: 41-49.
- Costerton, J.W., Irvin, R.T., and Cheng, K.J. (1981) The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**: 299-324.
- Crowe, B.A., Abdillahi, H., Poolman, J., and Achtman, M. (1988) Correlation of serological typing and clonal typing methods for *Neisseria meningitidis* serogroup A. *J Med Microbiol* **26**: 183-187.
- Crowe, J.D., Sievwright, I.K., Auld, G.C., Moore, N.R., Gow, N.A.R., and Booth, N.A. (2003) *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Molecular Microbiology* **47**: 1637-1651.
- de Vries, F.P., van der Ende, A., van Putten, J., and Dankert, J. (1996) Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. *Infect Immun* **64**: 2998-3006.
- De Wals, P., Hertoghe, L., Borlee-Grimee, I., De Maeyer-Cleempoel, S., Reginster-Haneuse, G., and Dachy, A. (1981) Meningococcal disease in Belgium. Secondary attack rate among household, day-care nursery and pre-elementary school contacts. *J Infect Dis* **3**: 53-61.
- Decosas, J., and Koama, J.-B.T. (2002) Chronicle of an outbreak foretold: meningococcal meningitis W135 in Burkina Faso. *The Lancet Infectious Diseases* **2**: 763-765.
- Degen, J.L. (2001) Genetic interactions between the coagulation and fibrinolytic systems. *Thromb Haemost* **86**: 130-137.
- Derrik, J., Heckels, J., and Virji, M. (2006) Major Outer Membrane Proteins of Meningococci. In *Handbook of Meningococcal Disease. Infection Biology, Vaccination, Clinical Management*. Frosch, M. and Maiden, M.C.J. (eds). Weinheim, Germany: WILEY-VCH, pp. 181-216.
- Dinarello, C.A. (2004) Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogenes: some concepts have changed. *J Endotoxin Res* **10**: 201-222.

- Dolan-Livengood, J.M., Miller, Y.K., Martin, L.E., Urwin, R., and Stephens, D.S. (2003) Genetic basis for nongroupable *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* **187**: 1616-1628.
- Dunn, K.L.R., Virji, M., and Moxon, E.R. (1995) Investigations into the molecular basis of meningococcal toxicity for human endothelial and epithelial cells: the synergistic effect of LPS and pili. *Microbial Pathogenesis* **18**: 81-96.
- Dyer, D.W., West, E.P., and Sparling, P.F. (1987) Effect of serum carrier proteins on the growth of pathogenic neisseriaceae with heme-bound iron. *Infect Immun* **55**: 2171-2175.
- Dyet, K., Devoy, A., McDowell, R., and Martin, D. (2005) New Zealand's epidemic of meningococcal disease described using molecular analysis: implications for vaccine delivery. *Vaccine* *Vaccines and Immunisation. Based on the Fourth World Congress on Vaccines and Immunisation* **23**: 2228-2230.
- Eberhard, T., Virkola, R., Korhonen, T.K., Kronvall, G., and Ullberg, M. (1998) Binding to Human Extracellular Matrix by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **66**: 1791-1794.
- Eberhard, T., Kronvall, G., and Ullberg, M. (1999) Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. *Microbial Pathogenesis* **26**: 175-181.
- Edwards, U., Müller, A., Hammerschmidt, S., Gerardy-Schahn, R., and Frosch, M. (1994) Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the alpha-2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Mol Microbiol* **14**: 141-149.
- Ehinger, S., Schubert, W.-D., Bergmann, S., Hammerschmidt, S., and Heinz, D.W. (2004) Plasmin(ogen)-binding [alpha]-Enolase from *Streptococcus pneumoniae*: Crystal Structure and Evaluation of Plasmin(ogen)-binding Sites. *Journal of Molecular Biology* **343**: 997-1005.
- Esmon, C.T., Fukudome, K., Mather, T., Bode, W., Regan, L.M., Stearns-Kurosawa, D.J., and Kurosawa, S. (1999) Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica* **84**: 254-259.
- Estabrook, M., Zhou, D., and Apicella, M. (1998) Nonopsonic phagocytosis of group C *Neisseria meningitidis* by human neutrophils. *Infect Immun* **66**: 1028-1036.
- Eugene, E., Hoffmann, I., Pujol, C., Couraud, P.-O., Bourdoulous, S., and Nassif, X. (2002) Microvilli-like structures are associated with the internalization of virulent capsulated *Neisseria meningitidis* into vascular endothelial cells. *J Cell Sci* **115**: 1231-1241.
- Feder, H.J., and Garibaldi, R. (1984) The significance of nongonococcal, nonmeningococcal *Neisseria* isolates from blood cultures. *Rev Infect Dis* **6**: 181-188.
- Fenno, J.C., Tamura, M., Hannam, P.M., Wong, G.W.K., Chan, R.A., and McBride, B.C. (2000) Identification of a *Treponema denticola* OppA Homologue That Binds Host Proteins Present in the Subgingival Environment. *Infect. Immun.* **68**: 1884-1892.
- Ferrari, G., Garaguso, I., Adu-Bobie, J., Doro, F., Taddei, A.R., Biolchi, A., Brunelli, B., Giuliani, M.M., Pizza, M., Norais, N., and Grandi, G. (2006) Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis* delta *gna33* mutant: proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles. *PROTEOMICS* **6**: 1856-1866.
- Fischer, M., Hedberg, K., Cardosi, P., Plikaytis, B.D., Hoesly, F.C., Steingart, K.R., Bell, T.A., Fleming, D.W., Wenger, J.D., and Perkins, B.A. (1997) Tobacco



- smoke as a risk factor for meningococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* **19**: 979-983.
- Fischer, M., and Perkins, B.A. (1997) Neisseria meningitidis serogroup B: emergence of the ET-5 complex. *Semin Pediatr Infect Dis* **8**: 50-56.
- Forsgren, M., Raden, B., Israelsson, M., Larsson, K., and Heden, L.-O. (1987) Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen. *FEBS Letters* **213**: 254-260.
- Frasch, C.E., Zollinger, W.D., and Poolman, J. (1985) Serotype antigens of Neisseria meningitidis and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis* **7**: 504-510.
- Frosch, M., Weisgerber, C., and Meyer, T.F. (1989) Molecular Characterization and Expression in Escherichia coli of the Gene Complex Encoding the Polysaccharide Capsule of Neisseria meningitidis Group B. *PNAS* **86**: 1669-1673.
- Frosch, M., Edwards, U., Bousset, K., Krause, B., and Weisgerber, C. (1991) Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. *Mol Microbiol* **5**: 1251-1263.
- Frosch, M., and Edwards, U. (1993) Molecular Mechanisms of capsule expression in Neisseria meningitidis serogroup B. In *Polysialic acid*. Roth, J., Rutishauser, U. and Troy II, F.A. (eds). Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag, pp. 49 - 57.
- Frosch, M., and Müller, A. (1993) Phospholipid substitution of capsular polysaccharides and mechanisms of capsule formation in Neisseria meningitidis. *Mol Microbiol* **8**: 483-493.
- Frosch, M., and Vogel, U. (2006) Structure and Genetics of the Meningococcal Capsule. In *Handbook of Meningococcal Disease. Infection Biology, Vaccination, Clinical Management*. Frosch, M. and Maiden, M.C.J. (eds). Weinheim, Germany: WILEY-VCH, pp. 145-162.
- Fusco, P.C., Farley, E.K., Huang, C.-H., Moore, S., and Michon, F. (2007) Protective Meningococcal Capsular Polysaccharide Epitopes and the Role of O Acetylation 10.1128/CVI.00009-07. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**: 577-584.
- Garcia-Touchard, A., Henry, T.D., Sangiorgi, G., Spagnoli, L.G., Mauriello, A., Conover, C., and Schwartz, R.S. (2005) Extracellular Proteases in Atherosclerosis and Restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**: 1119-1127.
- Giardina, P.C., and Apicella, M. (1999) Antigenic mimics in neisseria species. In *Endotoxin in Health and Disease*. Brade, H., Opal, S.M., Vogel, S.N. and Morrison, D.C. (eds). New York: Mercel Dekker, pp. 55-65.
- Greenwood, B. (1987) The epidemiology of acute bacterial meningitis in tropical Africa. In *Bacterial Meningitis*. London: Academic Press, pp. 61-91.
- Greenwood, B. (1999) Manson Lecture. Meningococcal meningitis in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **93**: 341-353.
- Hajjar, K., Harpel, P., Jaffe, E., and Nachman, R. (1986) Binding of plasminogen to cultured human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **261**: 11656-11662.
- Hajjar, K.A. (2003) The molecular basis of Fibrinolysis. In *Hematology of Infancy and Childhood*. Nathan, D.G., Orkin, S.H., Ginsburg, D. and Look, A.T. (eds). Philadelphia, USA: W.B. Saunders Co., pp. 1497-1514.
- Halstensen, A., Ceska, M., Brandtzaeg, P., Redl, H., Naess, A., and Waage, A. (1993) Interleukin-8 in serum and cerebrospinal fluid from patients with meningococcal disease. *J Infect Dis* **167**: 471-475.

- Hammerschmidt, S., Hilse, R., van Putten, J.P., Gerardy-Schahn, R., Unkmeir, A., and Frosch, M. (1996a) Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *Embo J* **15**: 192-198.
- Hammerschmidt, S., Muller, A., Sillmann, H., Muhlenhoff, M., Borrow, R., Fox, A., van Putten, J., Zollinger, W.D., Gerardy-Schahn, R., and Frosch, M. (1996b) Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol* **20**: 1211-1220.
- Hanahan, D. (1993) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Harrison, O.B., Robertson, B.D., Faust, S.N., Jepson, M.A., Goldin, R.D., Levin, M., and Heyderman, R.S. (2002) Analysis of Pathogen-Host Cell Interactions in *Purpura Fulminans*: Expression of Capsule, Type IV Pili, and PorA by *Neisseria meningitidis* In Vivo. *Infect. Immun.* **70**: 5193-5201.
- Hartmann, E., Lingwood, C.A., and Reidl, J. (2001) Heat-Inducible Surface Stress Protein (Hsp70) Mediates Sulfatide Recognition of the Respiratory Pathogen *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **69**: 3438-3441.
- Hauck, C.R., and Meyer, T.F. (1997) The lysosomal/phagosomal membrane protein h-lamp-1 is a target of the IgA1 protease of *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS Letters* **405**: 86-90.
- Havens, P.L., Garland, J.S., Brook, M.M., Dewitz, B.A., Stremski, E.S., and Troshynski, T.J. (1989) Trends in mortality in children hospitalized with meningococcal infections, 1957 - 1987. *Pediatr Infect Dis J* **8**: 8-11.
- Hazelzet, J.A., Risseuw-Appel, I.M., Kornelisse, R.F., Hop, W.C., Dekker, I., Joosten, K.F., de Groot, R., and Hack, C.E. (1996) Age-related differences in outcome and severity of DIC in children with septic shock and purpura. *Thromb Haemost* **76**: 932-938.
- Hilse, R., Hammerschmidt, S., Bautsch, W., and Frosch, M. (1996) Site-specific insertion of IS1301 and distribution in *Neisseria meningitidis* strains. *J Bacteriol* **178**: 2527-2532.
- Holten, E. (1979) Serotypes of *Neisseria meningitidis* isolated from patients in Norway during the first six months of 1978. *J Clin Microbiol* **9**: 186-188.
- Hopper, S., Vasquez, B., Merz, A., Clary, S., Wilbur, J.S., and So, M. (2000) Effects of the Immunoglobulin A1 Protease on *Neisseria gonorrhoeae* Trafficking across Polarized T84 Epithelial Monolayers. *Infect. Immun.* **68**: 906-911.
- Hu, L., Pratt, S., Perides, G., Katz, L., Rogers, R., and Klempner, M. (1997) Isolation, cloning, and expression of a 70-kilodalton plasminogen binding protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **65**: 4989-4995.
- Jarva, H., Ram, S., Vogel, U., Blom, A.M., and Meri, S. (2005) Binding of the Complement Inhibitor C4bp to Serogroup B *Neisseria meningitidis* *J Immunol* **174**: 6299-6307.
- Jarvis, G.A., and Vedros, N.A. (1987) Sialic acid of group B *Neisseria meningitidis* regulates alternative complement pathway activation. *Infect Immun* **55**: 174-180.
- Jennings, H.J., Bhattacharjee, A.K., Bundle, D.R., Kenny, C.P., Martin, A., and Smith, I.C. (1977) Structures of the capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* as determined by <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Infect Dis* **136**[Suppl.]: S78-S83.
- Jennings, H.J. (1983) Capsular polysaccharides as human vaccines. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* **41**: 155-208.

- Johansson, L.A., Rytönen, A., Bergman, P., Albinger, B., Kallstrom, H., Hokfelt, T., Agerberth, B., Cattaneo, R., and Jonsson, A.B. (2003) CD46 in meningococcal disease. *Science* **301**: 373-375.
- Jolley, K., Chan, M.-S., and Maiden, M. (2004) mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* **5**: 86.
- Jolley, K.A., Gray, S.J., Suker, J., and Urwin, R. (2006) Methods for Typing of Meningococci. In *Handbook of Meningococcal Disease*. Frosch, M. and Maiden, M.C.J. (eds). Weinheim, Germany: WILEY-VCH.
- Jones, C., and Lemercinier, X. (2002) Use and validation of NMR assays for the identity and O-acetyl content of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine manufacture. *J Pharm Biomed Anal* **30**: 1233-1247.
- Jones, D.M., Borrow, R., Fox, A.J., Gray, S.J., Cartwright, K.A., and Poolman, J.T. (1992) The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. *Microbial Pathogenesis* **13**: 219-224.
- Jones, D.M., and Mallard, R.H. (1993) Age incidence of meningococcal infection England and Wales, 1984-1991. *Journal of Infection* **27**: 83-88.
- Kahler, C.M., Martin, L.E., Shih, G.C., Rahman, M.M., Carlson, R.W., and Stephens, D.S. (1998) The (alpha 28)-linked polysialic acid capsule and liposaccharide structure both contribute to the ability of serogroup B *Neisseria meningitidis* to resist the bactericidal activity of normal human serum. *Infect Immun* **66**: 5939-5947.
- Khil, J., Im, M., Heath, A., Ringdahl, U., Mundada, L., Cary Engleberg, N., and Fay, W.P. (2003) Plasminogen enhances virulence of group A streptococci by streptokinase-dependent and streptokinase-independent mechanisms. *J Infect Dis* **188**: 497-505.
- Kirsch, E.A., Barton, R.P., Kitchen, L., and Giroir, B.P. (1996) Pathophysiology, treatment and outcome of meningococemia: a review and recent experience. *Pediatr Infect Dis J* **15**: 967-979.
- Knight, A.I., Ni, H., Cartwright, K.A., and McFadden, J.J. (1992) Identification and characterization of a novel insertion sequence, IS1106, downstream of the porA gene in B15 *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **6**: 1565-1573.
- Kolberg, J., Aase, A., Bergmann, S., Herstad, T.K., Rodal, G., Frank, R., Rohde, M., and Hammerschmidt, S. (2006) Streptococcus pneumoniae enolase is important for plasminogen binding despite low abundance of enolase protein on the bacterial cell surface. *Microbiology* **152**: 1307-1317.
- Kolb-Maurer, A., Unkmeir, A., Kammerer, U., Hubner, C., Leimbach, T., Stade, A., Kampgen, E., Frosch, M., and Dietrich, G. (2001) Interaction of *Neisseria meningitidis* with Human Dendritic Cells. *Infect. Immun.* **69**: 6912-6922.
- Koley, K., and Machovich, R. (2003) Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* **89**: 610-621.
- Kornelisse, R.F., Hazelzet, J.A., Savelkoul, H.F., Hop, W.C., Suur, M.H., Borsboom, A.N., Risseuw-Appel, I.M., van der Vort, E., and de Groot, R. (1996) The relationship between plasminogen activator inhibitor-1 and proinflammatory and counterinflammatory mediators in children with meningococcal septic shock. *J Infect Dis* **173**: 1148-1156.
- Kost, C., Benner, K., Stockmann, A., Linder, D., and Preissner, K.T. (1996) Limited plasmin proteolysis of vitronectin. *Eur J Biochem* **236**: 682-688.
- Kukkonen, M., Saarela, S., Lahteenmaki, K., Hynönen, U., Westerlund-Wikström, B., Rhen, M., and Korhonen, T.K. (1998) Identification of two laminin-binding fimbriae, the type-1 fimbria of *Salmonella enteritica* serovar typhimurium and

- the G fimbria of *Escherichia coli*, as plasminogen receptors. *Infect Immun* **66**: 4965-4970.
- Kukkonen, M., Suomalainen, M., Kyllonen, P., Lahteenmaki, K., Lang, H., Virkola, R., Helander, I.M., Holst, O., and Korhonen, T.K. (2004) Lack of O-antigen is essential for plasminogen activation by *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology* **51**: 215-225.
- Kurzai, O., Schmitt, C., Claus, H., Vogel, U., Frosch, M., and Kolb-Maurer, A. (2005) Carbohydrate composition of meningococcal lipopolysaccharide modulates the interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Cellular Microbiology* **7**: 1319-1334.
- Kypta, R. (2002) Chapter 19: Cell Junctions, Cell Adhesion, and the Extracellular Matrix. In *Molecular Biology of The Cell*. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Keith, R. and Walter, P. (eds). New York: Garland Sciences, pp. 1065-1126.
- Lahteenmaki, K., Westerlund, B., Kuusela, P., and Korhonen, T.K. (1993) Immobilization of plasminogen on *Escherichia coli* flagella. *FEMS Microbiol Lett* **106**: 309-314.
- Lahteenmaki, K., Kuusela, P., and Korhonen, T.K. (2001) Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 531-552.
- Lahteenmaki, K., Edelman, S., and Korhonen, T.K. (2005) Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends in Microbiology* **13**: 79-85.
- Lapeyssonnie, L. (1963) La meningite cerebro-spinale en Afrique. *Bull WHO* **28**: 3-114.
- Larson, J.A., Howie, H.L., and So, M. (2004) *Neisseria meningitidis* accelerates ferritin degradation in host epithelial cells to yield an essential iron source. *Mol Microbiol* **53**: 807-820.
- Lavitola, A., Bucci, C., Salvatore, P., Maresca, G., Bruni, C.B., and Alifano, P. (1999) Intracistronic transscription termination in polysialyltransferase gene (siaD) affects phase variation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **33**: 119-127.
- Lawrence, D.A. (1997) The serpin-proteinase-complex revealed. *Nature Struct Biol* **4**: 339-341.
- Lemercinier, X., and Jones, C. (1996) Full <sup>1</sup>H NMR assignement and detailed O-acetylation patterns of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine production. *Carbohydr Res* **296**: 83-96.
- Lewis, L.A., and Dyer, D.W. (1995) Identification of an iron-regulated outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in the utilization of hemoglobin complexes in haptoglobin. *J Bacteriol* **177**: 1299-1306.
- Li, Z., Ploplis, V.A., French, E.L., and Boyle, M. (1999) Interaction between group A streptococci and the plasmin(ogen) system promotes virulence in a mouse skin infection model. *J Infect Dis* **179**: 907-914.
- Lijnen, H.R., and Collen, D. (1995) Mechanisms of physiological fibrinolysis. *Baillieres Clin Haematol* **8**: 277-290.
- Lin, L., Ayala, P., Larson, J., Mulks, M., Fukuda, M., Carlson, S.R., Enns, C., and So, M. (1997) The *Neisseria* type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells. *Mol Microbiol* **24**: 1083-1094.
- Lopez-Villar, E., Monteoliva, L., Larsen, M.R., Sachon, E., Shabaz, M., Pardo, M., Pla, J., Gil, C., Roepstorff, P., and Nombela, C. (2006) Genetic and proteomic evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface. *PROTEOMICS* **6 Suppl 1**: S107-118.
- Lottenberg, R., Minning-Wenz, D., and Boyle, M. (1994) Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends in Microbiology* **2**: 20-24.

- Lottenberg, R. (1997) A novel approach to explore the role of plasminogen in bacterial pathogenesis. *Trends in Microbiology* **5**: 466-467.
- Mahon, C.R. (1995) Chapter 14: Neisseria. In *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Mahon, C.R. and Manuselis, G.J. (eds). Philadelphia: W.B. Saunders.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., and Spratt, B.G. (1998) Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *PNAS* **95**: 3140-3145.
- Maiden, M.C.J., and Caugant, D.A. (2006) The Population Biology of Neisseria meningitidis: Implications for Meningococcal Disease, Epidemiology and Control. In *Handbook of Meningococcal Disease*. Frosch, M. and Maiden, M.C.J. (eds). Weilheim, Germany: Wiley-VCH, pp. 17-36.
- Manchanda, V., Gupta, S., and Bhalla, P. (2006) Meningococcal disease: History, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention. *Indian Journal of Medical Microbiology* **24**: 7-19.
- Mangeat, P., Roy, C., and Martin, M. (1999) ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends in Cell Biology* **9**: 187-192.
- Martin, D.R., Walker, S.J., Baker, M., and Lennon, D. (1998) New Zealand epidemic of meningococcal disease identified by a strain with phenotype B:4:P1.4. *J Infect Dis* **177**: 497-500.
- Mazzieri, R., Masiero, L., Zanetta, L., Monea, S., Onisto, M., Garbisa, S., and Mignatti, P. (1997) Control of Tye IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactents. *Embo J* **16**: 2319-2332.
- McEllistrem, M.C., Kolano, J.A., Pass, M.A., Caugant, D.A., Mendelsohn, A.B., Fonseca Pacheco, A.G., Shutt, K.A., Razeq, J., Harrison, L.H., and Program, M.E.I. (2004) Correlating epidemiologic trends with the genotypes causing meningococcal disease, Maryland. *Emerg Infect Dis* **10**: 451-456.
- McGuinness, B., Barlow, A., Clarke, I., Farley, J., Anilionis, A., Poolman, J., and Heckels, J. (1990) Deduced amino acid sequences of class 1 protein (PorA) from three strains of Neisseria meningitidis. Synthetic peptides define the epitopes responsible for serosubtype specificity. *J. Exp. Med.* **171**: 1871-1882.
- Merz, A.J., Enns, C.A., and So, M. (1999) Type IV pili of pathogenic Neisseriae elicit cortical plaque formation in epithelial cells. *Molecular Microbiology* **32**: 1316-1332.
- Merz, A.J., and So, M. (2000) Interaction of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 423-457.
- Mickelsen, P.A., Blackman, E., and Sparling, P.F. (1982) Ability of *Neisseria gonorrhoe*, *Neisseria meningitidis*, commensal Neisseria species to obtain iron from lactoferrin. *Infect Immun* **35**: 915-920.
- Mignatti, P., and Rifkin, D.B. (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.* **73**: 161-195.
- Miles, L., Dahlberg, C., and Plow, E. (1988) The cell-binding domains of plasminogen and their function in plasma. *J. Biol. Chem.* **263**: 11928-11934.
- Miles, L., Dahlberg, C., Plescia, J., Felez, J., Kato, K., and Plow, E.F. (1991) Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* **30**: 1682-1691.
- Moodley, J.R., Coetze, N., and Hussey, G. (1999) Risk factors for meningococcal disease in Cape Town. *S Afr Med J* **89**: 56-59.

- Mosesson, M.W. (2005) Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **3**: 1894-1904.
- Murkin, A.S., Chou, W.K., Wakarchuk, W.W., and Tanner, M.E. (2004) Identification and Mechanism of a Bacterial Hydrolyzing UDP-N-Acetylglucosamine 2-Epimerase. *Biochemistry* **43**: 14290-14298.
- Murphy, G., and Gavrilovic, J. (1999) Proteolysis and cell migration: creating a path? *Current Opinion in Cell Biology* **11**: 614-621.
- Murphy, G., Stanton, H., Cowell, S., Butler, G., Knauper, V., Atkinson, S., and Gavrilovic, J. (1999) Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* **107**: 38-44.
- Musher, D.M. (2003) How Contagious Are Common Respiratory Tract Infections? *N Engl J Med* **348**: 1256-1266.
- Nassif, X., Bourdoulous, S., Eugene, E., and Couraud, P.-O. (2002) How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier? *Trends in Microbiology* **10**: 227-232.
- Neal, K.R., Nguyen-Van-Tam, J.S., Monk, P., O'Brian, S.J., Stuart, J.M., and Ramsay, M. (1999) Invasive meningococcal disease among university undergraduates: association with universities providing relatively large amounts of catered hall accommodation. *Epidemiol Infect* **122**.
- Nicolas, P., Decousset, L., Riglet, V., Castelli, P., Stor, R., and Blanchet, G. (2001) Clonal expansion of sequence type (ST-)5 and emergence of ST-7 in serogroup A meningococci, Africa. *Emerg Infect Dis* **7**: 849-854.
- Nygren, H., Rozell, B., Holmgren, A., and Hansson, H.A. (1981) Immunoelectron microscopic localization of glutaredoxin and thioredoxin in *Escherichia coli* cells. *FEBS Lett.* **133**: 145-150.
- Oster, P., Lennon, D., O'Hallahan, J., Mulholland, K., Reid, S., and Martin, D. (2005) MeNZB(TM): a safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand Neisseria meningitidis serogroup B disease epidemic strain. *Vaccine*
- Vaccines and Immunisation. Based on the Fourth World Congress on Vaccines and Immunisation* **23**: 2191-2196.
- Ovstebo, R., Brandtzaeg, P., Brusletto, B., Haug, K.B.F., Lande, K., Hoiby, E.A., and Kierulf, P. (2004) Use of Robotized DNA Isolation and Real-Time PCR To Quantify and Identify Close Correlation between Levels of Neisseria meningitidis DNA and Lipopolysaccharides in Plasma and Cerebrospinal Fluid from Patients with Systemic Meningococcal Disease. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 2980-2987.
- Pancholi, V., and Fischetti, V. (1992) A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3- phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.* **176**: 415-426.
- Pancholi, V., and Fischetti, V.A. (1998) alpha -Enolase, a Novel Strong Plasmin(ogen) Binding Protein on the Surface of Pathogenic Streptococci. *J. Biol. Chem.* **273**: 14503-14515.
- Pancholi, V. (2001) Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* **58**: 902-920.
- Parry, M.A.A., Zhang, X.C., and Bode, W. (2000) Molecular mechanisms of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues. *Trends Biochem Sci* **25**: 53-59.
- Paulsen, I.T., Beness, A.M., and Saier, M.H.J. (1997) Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria. *Microbiology* **143**: 2685-2699.

- Peltola, H. (1983) Meningococcal disease: still with us. *Rev Infect Dis* **5**: 71-91.
- Perrin, A., Nassif, X., and Tinsley, C. (1999) Identification of Regions of the Chromosome of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* Which Are Specific to the Pathogenic *Neisseria* Species. *Infect. Immun.* **67**: 6119-6129.
- Plow, E., Herren, T., Redlitz, A., Miles, L., and Hoover-Plow, J. (1995) The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J.* **9**: 939-945.
- Plow, E.F., Felez, J., and Miles, L. (1991) Cellular regulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* **66**: 32-36.
- Plow, E.F., Ploplis, V.A., Carmeliet, P., and Collen, D. (1999) Plasminogen and cell migration in vivo. *Fibrinolysis and Proteolysis State-of-the-Art XIVth International Congress on Fibrinolysis and Thrombolysis* **13**: 49-53.
- Pollanen, J., Stephens, R.W., and Vaheri, A. (1991) Directed plasminogen activation at the surface of normal and malignant cells. *Adv Cancer REss* **57**: 273-328.
- Pollard, A.J., and Nadel, S. (2006) Course of Disease and Clinical Management. In *Handbook of Meningococcal Disease*. Frosch, M. and Maiden, M.C.J. (eds). Weinheim, Germany: WILEY-VCH, pp. 481-518.
- Power, P.M., and Moxon, E.R. (2006) Phase Variation and Adaptive Strategies of *N. meningitidis*: Insights into the Biology of a Commensal and Pathogen. In *Handbook of Meningococcal Disease: Infection Biology, Vaccination, Clinical Management*. Frosch, M. and Maiden, M.C.J. (eds). Weinheim, Germany: WILEY-VCH, pp. 99-118.
- Preissner, K.T. (1990) Specific binding of plasminogen to vitronectin. *Biochem Biophys Res Commun* **168**: 966-971.
- Pron, B., Taha, M.-K., Rambaud, C., Fournet, J.C., Pattey, N., Monnet, J.P., Musilek, M., Beretti, J.L., and Nassif, X. (1997) Interaction of *Neisseria meningitidis* with the components of the blood-brain barrier correlates with an increased expression of PilC. *J Infect Dis* **176**: 1285-1292.
- Pujol, C., Eugene, E., Marceau, M., and Nassif, X. (1999) The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated adhesion. *PNAS* **96**: 4017-4022.
- Rahman, M.M., Kallstrom, H., Normark, S., and Jonsson, A.-B. (1997) PilC of pathogenic *Neisseria* is associated with the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* **25**: 11-25.
- Ram, S., Mackinnon, F.G., Gulati, S., McQuillen, D.P., Vogel, U., Frosch, M., Elkins, C., Guttormsen, H.K., Wetzler, L.M., Oppermann, M., Pangburn, M.K., and Rice, P.A. (1999) The contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. *Mol Immun* **36**: 915-928.
- Ram, S., Cox, A.D., Wright, J.C., Vogel, U., Getzlaff, S., Boden, R., Li, J., Plested, J.S., Meri, S., Gulati, S., Stein, D.C., Richards, J.C., Moxon, E.R., and Rice, P.A. (2003) *Neisseria* Lipooligosaccharide Is a Target for Complement Component C4b: INNER CORE PHOSPHOETHANOLAMINE RESIDUES DEFINE C4b LINKAGE SPECIFICITY  
10.1074/jbc.M308364200. *J. Biol. Chem.* **278**: 50853-50862.
- Ram, S., and Vogel, U. (2006) Role of Complement in Defense Against Meningococcal Infection. In *Handbook of Meningococcal Disease. Infection Biology, Vaccination, Clinical Management*. Frosch, M. and Maiden, M.C.J. (eds). Weinheim, Germany: WILEY-VCH, pp. 273-293.
- Ranby, M. (1982) Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **704**: 461-469.

- Read, R.C., and Goodwin, L. (2001) Experimental nasopharyngeal colonization by *Neisseria meningitidis* using explant organ culture. In *Methods in Molecular Medicine: Meningococcal Disease*. Pollard, A.J. and Maiden, M.C.J. (eds). Totowa, N.J.: Humana Press, pp. 621-633.
- Richmond, P., Borrow, R., Goldblatt, D., Findlow, J., Martin, S., Morris, R., Cartwright, K., and Miller, E. (2001) Ability of 3 different meningococcal C conjugate vaccines to induce immunologic memory after a single dose in UK toddlers. *J Infect Dis* **183**: 160-163.
- Rijken, D.C. (1995) Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin Haematol* **8**: 291-312.
- RKI (2006) Veröffentlichung der Meldedaten gemäß IfSG. *Epidemiologisches Bulletin* **13**: 99-106.
- Roberts, I.S., Mountford, R., Hodge, R., Jann, K.B., and Boulnois, G.J. (1988) Common organization of gene clusters for production of different capsular polysaccharides (K antigens) in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 1305-1310.
- Roberts, I.S. (1996) The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**: 285-315.
- Rosenstein, N.E., Perkins, B.A., Stephens, D.S., Lefkowitz, L., Cartter, M.L., Danila, R., Cieslak, P., Shutt, K.A., Popovic, T., Schuchat, A., Harrison, L.H., Reingold, A.L., and Team, t.A.B.C.S. (1999) The Changing Epidemiology of Meningococcal Disease in the United States, 1992–1996. *J Infect Dis* **180**: 1894-1901.
- Rosenstein, N.E., and Perkins, B.A. (2000) Update on *Haemophilus influenzae* serotype b and meningococcal vaccines. *Pediatr Clin North Am* **47**: 337-352.
- Rosenstein, N.E., Perkins, B.A., Stephens, D.S., Popovic, T., and Hughes, J.M. (2001) Meningococcal Disease. *N Engl J Med* **344**: 1378-1388.
- Rubin, L., Hall, D., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H., Janatpour, M., Liaw, C., Manning, K., and Morales, J. (1991) A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* **115**: 1725-1735.
- Rudel, T., Scheuerpflug, I., and Meyer, T.F. (1995) *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin **373**: 357-359.
- Sacchi, C.T., Lemos, A.P.S., Whitney, A.M., Solari, C.A., Brandt, M.E., Melles, C.E.A., Frasch, C.E., and Mayer, L.W. (1998) Correlation between Serological and Sequencing Analyses of the PorB Outer Membrane Protein in the *Neisseria meningitidis* Serotyping System. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**: 348-354.
- Sadler, F., Fox, A., Neal, K., Dawson, M., Cartwright, K., and Borrow, R. (2003) Genetic analysis of capsular status of meningococcal carrier isolates. *Epidemiol Infect* **130**: 59-70.
- Saksela, O. (1985) Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **823**: 35-65.
- Saksela, O., and Rifkin, D.B. (1988) Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu Rev Biol* **4**: 93-126.
- Salonen, E.-M., Zitting, A., and Vaheri, A. (1984) Laminin interacts with plasminogen and its tissue-type activator. *FEBS Lett.* **172**: 29-32.
- Salonen, E.-M., Saksela, O., Vartio, T., Vaheri, A., Nielsen, L.S., and Zeuthen, J. (1985) Plasminogen and tissue-type plasminogen activator bind to immobilized fibronectin. *J Biol Chem* **260**: 12302-12307.
- Sanger, F. (1975) The Croonian Lecture, 1975. Nucleotide sequences in DNA. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **191**: 317-333.
- Scarselli, M., Serruto, D., Montanari, P., Capecchi, B., Adu-Bobie, J., Veggi, D., Rappuoli, R., Pizza, M., and Arico, B. (2006) *Neisseria meningitidis* NhhA is a



- multifunctional trimeric autotransporter adhesin. *Molecular Microbiology* **61**: 631-644.
- Schaumburg, J., Diekmann, O., Hagendorff, P., Bergmann, S., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Jänsch, L., Wehland, J., and Kärst, U. (2004) The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. *PROTEOMICS* **4**: 2991-3006.
- Scholten, R.J., Kuipers, B., Valkenburg, H.A., Dankert, J., Zollinger, W.D., and Poolman, J. (1994) Lipo-oligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies. *J Med Microbiol* **41**: 236-243.
- Schryvers, A.B., and Morris, L.J. (1988) Identification and characterisation of the human lactoferrin-binding protein from *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **56**: 1144-1149.
- Schwartz, B., Moore, P.S., and Broome, C.V. (1989) Global epidemiology of meningococcal disease. *Clin Microbiol Rev* **2**: 118-124.
- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N., and Whittam, T.S. (1986) Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* **51**: 873-884.
- Singer, C.J. (2005) Molekulare Identifizierung von Neisseriaceae und Mxaxellae mittels ribosomaler DNASequenzierung. In *Fakultät für Medizin der Universität Würzburg: Bayerische Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg*, pp. 66.
- Sjostrom, I., Grondahl, H., Falk, G., Kronvall, G., and Ullberg, M. (1997) Purification and characterisation of a plasminogen-binding protein from *Haemophilus influenzae*. Sequence determination reveals identity with aspartase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1324**: 182-190.
- Snyder, L.A., and Saunders, N.J. (2006) The majority of genes in the pathogenic *Neisseria* species are present in non-pathogenic *Neisseria lactamica*, including those designated as 'virulence genes'. *BMC Genomics* **7**: 128.
- Sodeinde, O., Subrahmanyam, Y., Stark, K., Quan, T., Bao, Y., and Goquen, J. (1992) A surface protease and the invasive character of plague. *Science* **258**: 1004-1007.
- Sousa, L.P., Silva, B.M., Brasil, B.S.A.F., Nogueira, S.V., Ferreira, P.C.P., Kroon, E.G., Kato, K., and Bonjardim, C.A. (2005) Plasminogen/plasmin regulates alpha-enolase expression through the MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **337**: 1065-1071.
- Spanaus, K., Nadal, D., Pfister, H., Seebach, J., Widmer, U., Frei, K., Gloor, S., and Fontana, A. (1997) C-X-C and C-C chemokines are expressed in the cerebrospinal fluid in bacterial meningitis and mediate chemotactic activity on peripheral blood-derived polymorphonuclear and mononuclear cells in vitro. *J Immunol* **158**: 1956-1964.
- Stephens, D.S., Hoffmann, L.H., and McGee, Z.A. (1983) Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis* **148**: 369-376.
- Stephens, D.S., and Farley, M.M. (1991) Pathogenic events during infection of the human nasopharynx with *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*. *Rev Infect Dis* **13**: 23-33.
- Stephens, D.S. (1999) Uncloaking the meningococcus: dynamics of carriage and disease. *Lancet* **353**: 941-942.
- Stojiljkovic, I., Hwa, V., de Saint Martin, L., O'Garra, P., Nassif, X., Heffron, F., and So, M. (1995) The *Neisseria meningitidis* hemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol Microbiol* **15**.

- Suker, J., Feavers, I.M., and Maiden, M.C.J. (1996) Monoclonal antibody recognition of members of the meningococcal P1.10 variable region family: implications for serological typing and vaccine design. *Microbiology* **142**: 63-69.
- Sun, H., Ringdahl, U., Homeister, J.W., Fay, W.P., Engleberg, N.C., Yang, A.Y., Rozek, L.S., Wang, X., Sjobring, U., and Ginsburg, D. (2004) Plasminogen Is a Critical Host Pathogenicity Factor for Group A Streptococcal Infection. *Science* **305**: 1283-1286.
- Swartley, J.S., Ahn, J.H., Liu, L.J., Kahler, C.M., and Stephens, D.S. (1996) Expression of sialic acid and polysialic acid in serogroup B *Neisseria meningitidis*: divergent transcription of biosynthesis and transport operons through a common promoter region. *J Bacteriol* **178**: 4052-4059.
- Taha, M.-K., Achtman, M., Alonso, J.-M., Greenwood, B., Ramsay, M., Fox, A., Gray, S., and Kaczmarski, E. (2000) Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. *The Lancet* **356**: 2159.
- Thompson, E.A.L., Feavers, I.M., and Maiden, M.C.J. (2003) Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. *Microbiology* **149**: 1849-1858.
- Travis, J., and Salvesen, G.S. (1983) Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem* **52**: 655-709.
- Tsai, C.M. (2001) Molecular mimicry of host structures by lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis*: characterisation sialylated and nonsialylated lacto-N-tetraose (Galbeta1-4GlcNacbeta1-3Galbeta1-4Glc) structures in lipooligosaccharides using monoclonal antibodies and specific lectins. *Adv Exp Med Biol* **491**: 525-542.
- Ullberg, M., Kuusela, P., Kristiansen, B.-E., and Kronvall, G. (1992) Binding of plasminogen to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* and formation of surface-associated plasmin. *J Infect Dis.* **166**: 1329-1334.
- Unkmeir, A., Kammerer, U., Stade, A., Hubner, C., Haller, S., Kolb-Maurer, A., Frosch, M., and Dietrich, G. (2002a) Lipooligosaccharide and Polysaccharide Capsule: Virulence Factors of *Neisseria meningitidis* That Determine Meningococcal Interaction with Human Dendritic Cells. *Infect. Immun.* **70**: 2454-2462.
- Unkmeir, A., Latsch, K., Dietrich, G., Wintermeyer, E., Schinke, B., Schwender, S., Kim, K.S., Eigenthaler, M., and Frosch, M. (2002b) Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Molecular Microbiology* **46**: 933-946.
- Urwin, R., and Maiden, M.C.J. (2003) Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology* **11**: 479-487.
- Urwin, R., Russell, J.E., Thompson, E.A.L., Holmes, E.C., Feavers, I.M., and Maiden, M.C.J. (2004) Distribution of Surface Protein Variants among Hyperinvasive Meningococci: Implications for Vaccine Design. *Infect. Immun.* **72**: 5955-5962.
- van Deuren, M., Brandtzaeg, P., and van der Meer, J.W. (2000) Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* **13**: 144-166.
- Vassalli, J.D., Sappino, A.P., and Belin, D. (1991) The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* **88**: 1067-1072.
- Vedros, N.A. (1987) Development of meningococcal serogroups. In *Evolution of meningococcal disease*. Vedros, N.A. (ed). Boca Raton: CRC Press, pp. 33-37.
- Vieusseux, M. (1806) Memoire sur la maladie qui a régné à Genève au printemps de 1805. *J Med Chir Pharmacol* **11**: 163-182.
- Virji, M., Makepeace, K., and 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**: 173-184.
- Virji, M., Makepeace, K., Peak, I.R., Ferguson, D.J., Jennings, M.P., and Moxon, E.R. (1995) Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol Microbiol* **18**: 741-754.
- Virji, M., and Hill, D.J. (2003) In vitro models of infection II--human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) system. *Methods Mol Med* **71**: 297-314.
- Virkola, R., Lahteenmaki, K., Eberhard, T., Kuusela, P., van Alphen, L., Ullberg, M., and Korhonen, T.K. (1996) Interaction of Haemophilus influenzae with the mammalian extracellular matrix. *J Infect Dis* **173**: 1137-1147.
- Vogel, U., Weinberger, A., Frank, R., M.A., Köhl, J., Atkinson, J.P., and Frosch, M. (1997) Complement factor C3 deposition and serum resistance in isogenic capsule and liposaccharide sialic acid mutants of serogroup B Neisseria meningitidis. *Infect Immun* **65**: 4022-4029.
- Vogel, U., Morelli, G., Zurth, K., Claus, H., Kriener, E., Achtman, M., and Frosch, M. (1998) Necessity of Molecular Techniques To Distinguish between Neisseria meningitidis Strains Isolated from Patients with Meningococcal Disease and from Their Healthy Contacts. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2465-2470.
- Vogel, U., Claus, H., Heinze, G., and Frosch, M. (1999) Role of lipopolysaccharide sialylation in serum resistance of serogroup B and C meningococcal meningococcal disease isolates. *Infect Immun* **67**: 954-957.
- Von Loewenich, F.D., Wintermeyer, E., Dumig, M., and Frosch, M. (2001) Analysis of transcriptional control mechanisms of capsule expression in Neisseria meningitidis. *Int J Med Microbiol* **291**: 361-369.
- Waage, A., Halstensen, A., Shalaby, R., Brandtzaeg, P., Kierulf, P., and 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**: 1859-1867.
- Wang, J.-F., Caugant, D.A., Li, X., Hu, X., Poolman, J., Crowe, B.A., and Achtman, M. (1992) Clonal and antigenic analysis of serogroup A Neisseria meningitidis with particular reference to epidemiological features of epidemic meningitis in the People's Republic of China. *Infect Immun* **60**: 5267-5282.
- Werb, Z., Mainardi, C., Vater, C.A., and Harris, E.D. (1977) Endogenous activation of latent procollagenases by rheumatoid synovial cells. Evidence for a role of plasminogen activator. *N Engl J Med* **296**: 1017-1023.
- Wilczynska, M., Fa, M., Karolin, J., Ohlsson, P.-I., Johansson, L.A., and Ny, T. (1997) Structural insights into serpin-protease complexes reveal the inhibitory mechanisms of serpins. *Nature Struct Biol* **4**: 354-357.
- Wiman, B., and Collen, D. (1979) On the mechanisms of the reaction between human  $\alpha$ 2-antiplasmin and plasmin. *J Biol Chem* **254**: 9291-9297.
- Wiman, B., Lijnen, H.R., and Collen, D. (1979) On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in  $\alpha$ 2-antiplasmin and in fibrinogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **579**: 142-154.
- Wistedt, A.C., Kotarsky, H., Marti, D., Ringdahl, U., Castellino, F.J., Schaller, J., and Sjöbring, U. (1998) Kringle 2 Mediates High Affinity Binding of Plasminogen to an Internal Sequence in Streptococcal Surface Protein PAM. *J. Biol. Chem.* **273**: 24420-24424.
- Yazdankhah, S.P., Kriz, P., Tzanakaki, G., Kremastinou, J., Kalmusova, J., Musilek, M., Alvestad, T., Jolley, K.A., Wilson, D.J., McCarthy, N.D., Caugant, D.A.,

- and Maiden, M.C.J. (2004) Distribution of Serogroups and Genotypes among Disease-Associated and Carried Isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 5146-5153.
- Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1999) Direct Involvement of Ezrin/Radixin/Moesin (ERM)-binding Membrane Proteins in the Organization of Microvilli in Collaboration with Activated ERM Proteins. *J. Cell Biol.* **145**: 1497-1509.
- Yusuf, H.R., Rochat, R.W., Baughman, W.S., Garqullo, P.M., Perkins, B.A., Brantley, M.D., and Stephens, D.S. (1999) Maternal cigarette smoking and invasive meningococcal disease: a cohort study among young children in metropolitan Atlanta, 1989-1996. *Am J Public Health* **89**: 712-717.