

**Bedeutung des Klasse A Scavenger Rezeptors  
für die Zytokinsekretion  
von humanen dendritischen Zellen  
nach Kontakt mit dem humanen Pathogen  
*Neisseria meningitidis***

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

vorgelegt von

**Andrea Villwock**

aus Böblingen

Würzburg 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: \_\_\_\_\_

Gutachter 1: Prof. Dr. M. Frosch

Gutachter 2: Prof. Dr. J. Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

## **Erklärungen**

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 habe und ich bisher keine akademischen Grade (neben dem Diplom in Biologie) erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, März 2008

Andrea Villwock

---

## Gliederung

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Summary</b>	<b>3</b>
<b>3 Einleitung</b>	<b>5</b>
3.1 <i>Neisseria meningitidis</i>	5
3.2 Pathogenese von <i>Neisseria meningitidis</i>	6
3.3 Virulenzfaktoren von <i>Neisseria meningitidis</i>	7
3.3.1 Meningokokken-Kapsel	7
3.3.1.1 Kapsel-Aufbau, Genetik und Modifikation	7
3.3.1.2 Bedeutung der Kapsel und Kapselmodifikation	9
3.3.2 Meningokokken-Lipopolysaccharid	9
3.3.2.1 Lipopolysaccharid-Aufbau und Genetik	9
3.3.2.2 Bedeutung des Lipopolysaccharids	10
3.4 Typisierung von <i>Neisseria meningitidis</i>	11
3.5 Rezeptoren für die Erkennung von <i>Neisseria meningitidis</i>	12
3.5.1 Scavenger Rezeptor	12
3.5.1.1 Scavenger Rezeptor Klasse A	13
3.5.2 Toll-like-Rezeptor 2 und 4	14
3.6 Zytokinproduktion während der Pathogenese	15
3.7 Dendritische Zellen	16
3.7.1 Unreife DZ und Antigenaufnahme	17
3.7.2 Ausreifung und Migration	18
3.8 Ziel der Arbeit	20
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>21</b>
4.1 Material	21
4.1.1 Geräte, Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterialien	21
4.1.1.1 Geräte	22
4.1.1.2 Chemikalien	22
4.1.1.3 Kits	23
4.1.1.4 Verbrauchsmaterialien	23
4.1.2 Bakterienstämme und Zellkultarten	25
4.1.2.1 Bakterien	25
4.1.2.2 Eukaryontische Zellen	26

---

4.1.3 Medien und Puffer	26
4.1.3.1 Nährmedien und Puffer für Bakterien und Zellkultur	26
4.1.3.1.1 Medien und Platten für Bakterien	26
4.1.3.1.2 Medien und Zusätze für Zellkultur	27
4.1.3.2 Lösungen und Puffer für eukaryontische Zellen	27
4.1.3.3 Mikroskopische Präparate	28
4.1.3.3.1 Fluoreszenzmikroskopie	28
4.1.3.3.2 Elektronenmikroskopie	28
4.1.3.4 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE, Coomassie und Western Blot	29
4.1.3.5 Silberfärbung	30
4.1.3.6 Puffer und Lösungen für ELISA	31
4.1.3.7 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden	32
4.1.4 Oligonukleotide	32
4.1.5 siRNA	33
4.1.6 Inhibitoren	33
4.1.7 Antikörper	34
4.1.7.1 Antikörper für Western Blot	34
4.1.7.2 Antikörper für ELISA (Zytokin-ELISA von Biosource)	34
4.1.7.3 Antikörper für FACS Analyse/Durchflußzytometrie	34
4.1.7.4 Antikörper und Farbstoffe für Fluoreszenzmikroskopie	35
4.2 Methoden	36
4.2.1 Kultivierung von <i>Neisseria meningitidis</i>	36
4.2.1.1 Transformation von <i>Neisseria meningitidis</i> zur Generierung von Mutanten	36
4.2.1.2 Einstellung von Bakterienzahl für Infektionsversuche	36
4.2.2 Kultivierung von Zelllinien und Primärzellen	37
4.2.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) zur Generierung und Kultivierung von unreifen Dendritischen Zellen	37
4.2.2.2 Kultivierung von THP-1 Monozyten	37
4.2.2.3 Kultivierung von THP-1 Monozyten zu Makrophagen	38
4.2.2.4 Auftauen und einfrieren und THP-1 Monozyten	38
4.2.2.5 Bestimmung der Zellzahl	39

---

4.2.3 Zytokinbestimmung	39
4.2.3.1 ELISA (BIOSOURCE)	39
4.2.3.2 LUMINEX (BIOSOURCE)	40
4.2.4 Durchflusszytometrie/FACS	41
4.2.5 Microarray-Analyse des Zytokin-Transkriptionsprofils von DZ infiziert mit <i>Neisseria meningitidis</i>	41
4.2.5.1 DZ Isolierung aus einer Leukapherese	41
4.2.5.2 Infektion	41
4.2.5.3 RNA-Isolierung	42
4.2.5.4 DNA-Verdau und Überprüfung	42
4.2.5.5 Hybridisierung auf Microarrays	44
4.2.5.6. Slide-Präparation	45
4.2.5.6.1 Spotten	45
4.2.5.6.2 Vorhybridisierung der Slides	46
4.2.5.7 Scannen und Auswertung	46
4.2.6 Färbung von Mikroskopiepräparaten	47
4.2.6.1 Färbung von fluoreszenzmikroskopischen Präparaten	47
4.2.6.2 Färbung von elektronenmikroskopischen Präparaten	48
4.2.7 Arbeiten mit Proteinen/ Biochemische Methoden	49
4.2.7.1 SDS-Polyacrylamisgelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
4.2.7.2 Färben von Proteinen in PAA-gelen (Coomassie)	49
4.2.7.3 Silberfärbung (Blum <i>et al.</i> , modifiziert)	50
4.2.7.4 Western Blot	50
4.2.7.5 Immunpräzipitation	51
4.2.8 Probenpräparation für quantitative Real Time PCR	53
4.2.8.1 RNA-Mini-Präparation	53
4.2.8.2 RNA-Umschrieb in cDNA	53
4.2.8.3 Quantitative Real Time PCR	54
4.2.9 RNAi	56
<b>5 Ergebnisse</b>	<b>57</b>
5.1 Meningokokkenkapsel und Zytokinexpression	57
5.1.1 Einfluss der Meningokokkenkapsel auf die Zytokinsekretion	57
5.1.2 Einfluss der $\alpha$ -2,8 Polysialinsäure auf die Zytokinexpression	58
5.2 Kapsel-Modifikation: O-Acetylierung	59

---

5.2.1 Einfluss der Kapsel-Acetylierung auf die Erkennung durch DZ	60
5.2.2 Adhärenznachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie	61
5.2.3 Einfluss der Kapsel-Acetylierung auf die Phagozytose durch DZ	62
5.2.4 Einfluss der Kapsel-Acetylierung auf die Zytokinproduktion von DZ	63
5.2.5 Einfluss der Kapsel-Acetylierung auf die Ausreifung von DZ	64
5.3 Sonderfall $\alpha$ 14	65
5.3.1 Infektionsversuche mit $\alpha$ 14	65
5.3.2 Zytokininduktion durch $\alpha$ 14	66
5.4 Microarray-Analyse des Zytokin-Transkriptionsprofils von DZ nach Kontakt mit Meningokokken	67
5.5 Einfluss der Phagozytose auf die Zytokinproduktion	69
5.5.1 Einfluss der Phagozytose auf die TNF- $\alpha$ Ausschüttung	69
5.5.2 Einfluss der Phagozytose auf die IL-8 Induktion	71
5.6 Scavenger Rezeptor	72
5.6.1 Nachweis von SR-A bei DZ infiziert mit MC58 $\Delta$ <i>siaD</i>	72
5.6.2 Transkriptionsprofil von SR-A nach Infektion mit <i>N. meningitidis</i>	73
5.6.3 Regulation von SR-A nach Infektion mit <i>N. meningitidis</i> auf Proteinebene	74
5.6.4 Einfluss von SR-A auf die Zytokinproduktion	76
5.6.4.1 Einfluss von SR-A auf die TNF- $\alpha$ Ausschüttung	76
5.6.4.2 Einfluss der SR-A auf die IL-8 Produktion	77
5.7 Zytokinproduktion bei $\alpha$ 14	78
5.7.1 TNF- $\alpha$ und IL-8 Induktion unabhängig von SR-A	78
5.7.2 Zytokininduktion durch $\alpha$ 14 über andere Rezeptoren	79
5.8 SR-A Phosphorylierungsstatus	81
5.9 Einfluss der De/Phosphorylierung des SR-A auf die Zytokininduktion	82
5.10 Methodischer Teilaspekt: RNAi	84
5.10.1 Transfektionseffizienz	84
5.10.2 Transfektionseffektivität	85

---

5.10.3 Anwendung von RNAi für den SR-A	86
<b>6 Diskussion</b>	<b>87</b>
6.1 Kapsel-abhängig verminderte Zytokinproduktion	87
6.2 Kapselmodifikation: O-Acetylierung	89
6.3 Einfluss der Phagozytose auf die Zytokinproduktion	91
6.4 Scavenger Rezeptor Klasse A	92
6.4.1 Einfluss des SR-A auf die Zytokinproduktion	93
6.4.2 Dephosphorylierung von SR-A und die Aktivierung von Signalwegen	96
6.5 Fazit	97
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>113</b>
8.1 Abkürzungen	113
8.2 Publikationsliste	115
8.3 Danksagung	116
8.4 Lebenslauf	117

# 1 Zusammenfassung

Meningokokken gehören zu den wichtigsten Erregern bakterieller Sepsis und Meningitis. Der Schweregrad des Krankheitsverlaufs bei Meningokokkenerkrankungen korreliert mit der Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen im Serum. Dendritische Zellen (DZ) bilden die erste Abwehr am humanen Epithel des Nasopharynx, welches die Eingangspforte von *Neisseria meningitidis* darstellt und sind eine wichtige Quelle proinflammatorischer Zytokine. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bekapselte Meningokokken-Stämme bei DZ signifikant weniger proinflammatorische Zytokine als isogene Kapsel-defiziente Stämme oder obligat unbekapselte Stämme induzieren. Dieser Effekt ist unabhängig von der chemischen Zusammensetzung der Kapsel, da aufgereinigtes Kapselpolysaccharid der Serogruppe B nicht den reduzierenden Effekt der Zytokininduktion beeinflusste. Darüber hinaus spielt die Kapsel-O-Acetylierung bei Serogruppe C, W-135 und Y nur eine untergeordnete Rolle bei der Erkennung von Meningokokken durch DZ.

Microarray Versuche zum Transkriptionsprofil von DZ, die mit dem konstitutiv unbekapselten Trägerisolat  $\alpha$  14, dem bekapselten MC58 oder dem isogenen unbekapselten Stamm MC58 $\Delta$ *siaD* durchgeführt wurden, zeigten nach 4 h ein identisches Expressionsprofil von proinflammatorischen Zytokinen. Nur der phagozytierte unbekapselte Stamm MC58 $\Delta$ *siaD* zeigte eine differentielle Regulation von weiteren Zytokinen. Jedoch glich sich das Profil nach 18 h Infektion durch alle drei Stämme an.

Der Scavenger Rezeptor der Klasse A (SR-A) wurde als Hauptrezeptor identifiziert, der die Erkennung und Phagozytose von Meningokokken durch DZ initialisiert. Eine Assoziation phagozytierter Meningokokken mit SR-A konnte mittels Elektronenmikroskopie bestätigt werden. Nach Infektion von THP-1 Makrophagen mit bekapselten Serogruppe B und C Stämmen, den isogenen Kapsel-defizienten Stämmen und dem obligat unbekapselten Stamm  $\alpha$  14 wurde auf Transkriptionsebene keine differentielle Regulation der SR-A nachgewiesen. Lediglich eine minimale Hochregulation des SR-A auf der zellulären Oberfläche konnte nach einer Stunde Infektion verzeichnet werden.

Nach Infektion von DZ oder THP-1 Makrophagen mit MC58 $\Delta$ *siaD* kommt es zur Dephosphorylierung des SR-A. Unter Verwendung von globalen Phagozytose-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass für die maximale Induktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 Phagozytose von *N. meningitidis* benötigt wird; dies ist jedoch für die IL-8 Produktion nicht notwendig. Außerdem konnte gezeigt werden, dass mit dem spezifischen SR-A Inhibitor poly G eine Reduktion von TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 und IL-8 zu verzeichnen war. Folglich ist die Phagozytose über SR-A nötig, um TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 zu induzieren, jedoch nur die Erkennung aber nicht die Phagozytose via SR-A die IL-8 Produktion initiiert. Die Aufnahme von *Neisseria meningitidis* über den SR-A durch DZ ist damit nicht nur für die Phagozytose und Abtötung verantwortlich, sondern auch für die Zytokininduktion wichtig. Es gibt jedoch auch Meningokokken Stämme, die nicht vom SR-A erkannt werden. Mit  $\alpha$  14 konnte erstmals ein Meningokokken-Stamm identifiziert werden, der nicht an SR-A bindet. Die Induktion von Zytokinfreisetzung durch  $\alpha$  14 erfolgt dementsprechend unabhängig von SR-A und nach Kontakt von  $\alpha$  14 mit humanen DZ ist keine Veränderung der Phosphorylierungsstatus dieses Rezeptors zu beobachten. Die erhobenen Daten legen eine zentrale Rolle von SR-A in der Induktion von Immunität gegen *N. meningitidis* nahe.

## 2 Summary

Meningococci belong to the most important pathogens which cause bacterial sepsis and meningitis. The severity and outcome of meningococcal disease correlates with the concentration of proinflammatory cytokines in the serum. Dendritic cells (DC) build a first line of defence within the nasopharyngeal epithelium, which is the port-of-entry for *Neisseria meningitidis* and are an important source of proinflammatory cytokines. Infection of DC with encapsulated meningococcal strains induces *in vitro* significantly lower levels of proinflammatory cytokines than isogenic capsule-deficient mutants or constitutively unencapsulated strains. It could be shown that this effect does not depend on the chemical composition of the meningococcal capsule, because purified capsular polysaccharide of serogroup B is unable to modulate cytokine secretion. O-acetylation of serogroup C, W-135 and Y capsules plays a minor role in the recognition of meningococci by DC.

Microarray studies on the expression of cytokine genes by DC infected with constitutively unencapsulated carrier isolate  $\alpha$  14, encapsulated serogroup B strain MC58 or the isogenic unencapsulated strain MC58 $\Delta$ *siaD* showed an identical pattern for proinflammatory cytokines after 4 h of infection. Only the unencapsulated strain MC58 $\Delta$ *siaD* which is easily phagocytosed induced additional cytokines. However, the cytokine expression profile after 18 h of infection was equal for all three strains.

Scavenger receptor A (SR-A) was identified as the main receptor mediating recognition and phagocytosis of meningococci by DC. Association of phagocytosed meningococci with SR-A was visualized by electron microscopy. Infection of THP-1 macrophages with encapsulated serogroup B und C strains, their isogenic capsule-deficient muntants or the obligatory unencapsulated strain  $\alpha$  14 did not induce differential regulation of SR-A on the transcriptional level and only minor up-regulation of SR-A on cellular surface after one hour of infection. After infection of DC or THP-1 macrophages with MC58 $\Delta$ *siaD* dephosphorylation of SR-A can be detected. Using global phagocytosis inhibitors, it could be determined that the induction of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 require phagocytosis of *N. meningitidis*, whereas

induction of IL-8 does not. In addition, the specific SR-A-inhibitor poly G also leads to a reduction of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 and IL-8 secretion. Taken together these data indicate that phagocytosis via SR-A is necessary for TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 secretion, whereas recognition but not phagocytosis via SR-A enhances IL-8 secretion. Therefore, the uptake of *Neisseria meningitidis* via SR-A is not only important for phagocytosis and killing but also involved in cytokine induction. However, not all meningococcal strains are recognized via SR-A. The cytokine induction by DC infected with  $\alpha$  14 is completely independent of SR-A and after contact of human DC with  $\alpha$  14 no changes in SR-A phosphorylation can be detected. These data suggest that SR-A plays a central role in the induction of immunity against *N. meningitidis*.

## 3 Einleitung

### 3.1 *Neisseria meningitidis*

*Neisseria meningitidis* - Meningokokken - sind Gram-negative Diplokokken. Das natürliche Habitat der Meningokokken ist der Nasopharynx von Menschen (Peltola, 1983; Stephens *et al.*, 1983). Die Besiedelung mit Meningokokken ist altersabhängig. So sind bei Kleinkindern im Alter von 0-5 Jahren ca. 2% Meningokokken-Träger. Diese Trägerrate kann im Alter zwischen 15 und 26 Jahren auf 40% und mehr ansteigen (Claus *et al.*, 2005; Rosenstein *et al.*, 2001; Stephens, 1999; Cartwright *et al.*, 1987; Broome, 1986). Nur in seltenen Fällen kommt es zu einer Invasion der Meningokokken über die Epithelbarriere. Gelangen die Meningokokken in den Blutstrom, kann es zu einer Sepsis kommen oder nach Überwindung der Blut-Hirn-Schranke zu einer Meningitis. Die Inzidenz der invasiven Meningokokkeninfektion ist mit 1/100.000 im Jahr in Deutschland im Vergleich zur Trägerrate jedoch relativ gering. Das asymptomatische Trägertum von kommensalen Meningokokken führt zur natürlich erworbenen Immunität. Die Besiedelung mit Meningokokken induziert eine klonspezifische Immunität. Durch antigenetische Ähnlichkeiten kommt es jedoch auch zu gruppenspezifischen und kreuz-reaktiven Immunisierungsprozessen (Goldschneider *et al.*, 1969a; Goldschneider *et al.*, 1969b). In gesunden Individuen ist die durch Meningokokken verursachte Erkrankungsrate reziprok zum spezifischen Antikörper-Titer. Die höchste Inzidenz liegt somit zwischen dem 6.-24. Monat, wenn der maternale Antikörper-Spiegel sinkt (Goldschneider *et al.*, 1969a; Goldschneider *et al.*, 1969b; Jones & Mallard, 1993). Auch nach dem 2. Lebensjahr kommt es zu invasiven Erkrankungen. Dabei sind Faktoren wie Klima, Kontaktverhalten, fortgeschrittene oder begleitende virale Infektionen und der Immunstatus des Patienten von Bedeutung (Schwartz *et al.*, 1989). Außerdem scheinen genetische Polymorphismen die Suszeptibilität für eine Erkrankung zu beeinflussen (Kwiatkowski, 2000; Sorensen *et al.*, 1998).

### 3.2 Pathogenese von *Neisseria meningitidis*

Die initiale Interaktion von Meningokokken mit dem Epithel ihres Habitats erfolgt zunächst über Typ IV Pili. Auf den Epithelzellen können CD46 aber auch andere zelluläre Rezeptoren als Bindestellen dienen (Kirchner *et al.*, 2005; Nassif & So, 1995). Nach der pilT-abhängigen Retraktion der Pili kommt es zu einer engen Bindung der Meningokokken an das Epithel, die über bakterielle Außenmembranproteine vermittelt wird. Zu den wichtigsten Adhäsinen zählen Opa und Opc, die an die zellulären Oberflächenrezeptoren CD 66 und Heparansulfat-Proteoglykane binden (Dehio *et al.*, 1998; Dehio *et al.*, 2000; (Virji, 1999; Dehio *et al.*, 1998; de Vries *et al.*, 1998; Nassif & So, 1995). Dieser Adhärenz-Prozess wird durch die Kapsel oder sialyliertes-LPS erschwert (Virji *et al.*, 1995; Stephens *et al.*, 1993), so dass die phasenvariable Expression dieser beiden Faktoren eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen. Im Falle einer invasiven Infektion kommt es zur rezeptorvermittelten Aktinpolymerisation gefolgt von Transzytose des Erregers in Vakuolen durch das Epithel (Stephens *et al.*, 1983). Das Überleben der Meningokokken in den Epithelzellen wird durch die meningokokkale IgA Protease begünstigt, indem lysosomal-assoziierte Membranproteine degradiert werden (Ayala *et al.*, 1998). Wenn die Meningokokken die basolaterale Seite des Epithels erreicht haben, müssen sie die Basallamina überwinden, um in den Blutkreislauf zu gelangen. Für das Überleben im Blutstrom ist die Kapselexpression essentiell, da diese vor der komplement-vermittelten Bakterienlyse und der zelleliminierenden Phagozytose schützt (Schneider *et al.*, 2007; Kolb-Maurer *et al.*, 2001; Vogel & Frosch, 1999; Klein *et al.*, 1996). Einhergehend mit der Vermehrung des Keims im Blutstrom sondern Meningokokken Außenmembranvesikel (Blebs) ab, die LPS, OMP und Kapselpolysaccharide besitzen (Namork & Brandtzaeg, 2002; Andersen & Solberg, 1988), die zur Zytokininduktion führen (Rosenstein *et al.*, 2001). Die Konzentration dieser Zytokine korreliert mit dem Schweregrad und dem Ausgang der Sepsis eines Patienten (Brandtzaeg *et al.*, 2001). Um eine Meningitis zu verursachen müssen die Meningokokken über die Blutbahn die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Pron *et al.*, 1997). Für die Interaktion mit den Endothelzellen werden ähnliche Mechanismen postuliert wie bei den

Epithelzellen des Nasopharynx (Unkmeir *et al.*, 2002; Virji *et al.*, 1993a; Virji *et al.*, 1993b).

Entscheidend für die Pathogenese ist die Fähigkeit von *N. meningitidis*, seine Oberflächenstrukturen zu variieren. Verantwortlich dafür sind die phasenvariable Genexpression oder die Insertion von IS-Elementen bei virulenzassoziierten Genen. Diese führen dazu, dass sich die Oberflächenstrukturen bei der Adhärenz, der Invasion und dem Überleben im Blutkreislauf anpassen (Weber *et al.*, 2006; Berrington *et al.*, 2002; Jennings *et al.*, 1999; Hammerschmidt *et al.*, 1996a; Hammerschmidt *et al.*, 1996b; Meyer & van Putten, 1989).

### **3.3 Virulenzfaktoren von *Neisseria meningitidis***

#### **3.3.1 Meningokokken-Kapsel**

##### **3.3.1.1 Kapsel-Aufbau, Genetik und Modifikation**

Die meisten Isolate von Patienten mit invasivem Krankheitsverlauf exprimieren ein Polysaccharid aus den Serogruppen A, B, C, W-135 oder Y (Peltola, 1983). Serogruppe B, C, W-135 und Y exprimieren eine Kapsel, die Sialinsäure (N-acetylneuraminsäure, NANA) entweder als Homo- oder als Hetero-Polymer enthält (Bhattacharjee *et al.*, 1976; Bhattacharjee *et al.*, 1975). Kapseln der Serogruppen B und C sind Homopolymere und die der Serogruppen W-135 und Y sind Heteropolymere, die Sialinsäure mit entweder Galaktose oder Glukose verknüpfen (Tabelle 1). Die Gene, die für die Kapselsynthese der Serogruppen B, C, W-135 und Y wichtig sind, werden von dem Kapsellokus (*cps*) kodiert (Frosch *et al.*, 1989). Dieser wird in Region A bis E unterteilt und umfasst 24 kb. Region A besteht aus einem Operon, das für die Kapselsynthese (*sia*-Operon) kodiert (Swartley *et al.*, 1997). Das *sia*-Operon wiederum kodiert vier Gene *siaA-D*. Für die Sialinsäuresynthese verantwortlich sind *siaA-C*, während *siaD* die Polysialyltransferase kodiert. *siaD* ist verantwortlich für die Verknüpfung der Polysaccharid-Untereinheiten zur Generierung der Kapsel. Dieses Gen

unterscheidet sich bei den Serogruppen B, C, W-135 und Y und führt so zur unterschiedlichen Zusammensetzung der Kapsel und bietet damit die Möglichkeit zur phänotypischen Klassifizierung (Claus *et al.*, 1997). *siaD* aber auch andere Gene, die für die Kapselsynthese wichtig sind, unterliegen reversiblen oder irreversible Mechanismen, die dazu führen, dass keine Kapsel mehr exprimiert werden kann (Weber *et al.*, 2006; Hammerschmidt *et al.*, 1996a; Hammerschmidt *et al.*, 1996b; Hilse *et al.*, 1996). Es gibt auch Stämme, denen die Gene für die Kapselsynthese fehlen. Die Operons, die für die Lipid-Modifikation und den Transport des Kapselpolysaccharids kodieren, werden durch eine nicht-kodierende intergenische Region von 113 oder 114 bp Länge, den sogenannten Kapsel-Null-Lokus (*cnl*), ersetzt (Claus *et al.*, 2002).

Polysaccharide der Serogruppen C, W-135 und Y können auch in O-acetylierter Form vorkommen (Gudlavalleti *et al.*, 2004; Bhattacharjee *et al.*, 1976; Liu *et al.*, 1971a; Liu *et al.*, 1971b) (Tabelle 1). Die Gene, die für die O-Acetylierung der Sialinsäure von Serogruppe C, W-135 und Y verantwortlich sind, liegen downstream von *siaD* und werden mit den *sia* Genen co-transkribiert (Claus *et al.*, 2004). Serogruppe W-135 und Y haben identische O-Acetyltransferase Gene (*oatWY*). Das O-Acetyltransferase-Gen *oatC* der Serogruppe C weist keine Homologie zu *oatWY* auf. Die Acetyltransferasen unterliegen der Phasenvariation durch Slipped-Strand Mispairing.

Serogruppe	Polymer	Saccharid	Verknüpfung	Kapselgene	O-Acetylierung	
					Gen	Position
A	Homo	D-Mannose-aminphosphat	$\alpha$ -2,6	<i>mynA-D</i>	<i>mynC</i>	C3, C4
B	Homo	Sialinsäure	$\alpha$ -2,8	<i>siaA-D<sub>B</sub></i>	-	-
C	Homo	Sialinsäure	$\alpha$ -2,9	<i>siaA-D<sub>C</sub></i>	<i>oatC</i>	C7, C8
W-135	Hetero	Sialinsäure Galaktose	$\alpha$ -1,4	<i>siaA-D<sub>W-135</sub></i>	<i>oatWY</i>	C7
Y	Hetero	Sialinsäure Glukose	$\alpha$ -1,4	<i>siaA-D<sub>Y</sub></i>	<i>oatWY</i>	C7, C9

Tab. 1 Zusammensetzung der Kapselpolysaccharide, deren Modifikation und kodierende Gene.

---

### 3.3.1.2 Bedeutung der Kapsel und Kapselmodifikation

Die Kapsel ist der Hauptvirulenzfaktor von *N. meningitidis*. Die starke Hydrierung der Kapsel schützt vor Austrocknung und ist somit für die Übertragung wichtig (Musher, 2003; Costerton *et al.*, 1981). Auch in der Pathogenese invasiver Infektionen spielt die Kapsel eine entscheidende Rolle. Sie verhindert das Fortschreiten der Komplementkaskade ab der C4-Bindung (Schneider *et al.*, 2007; Vogel & Frosch, 1999) und beeinträchtigt die Erkennung und Phagozytose durch professionelle Phagozyten (Villwock *et al.*, 2007; Unkmeir *et al.*, 2002; Kolb-Maurer *et al.*, 2001; Estabrook *et al.*, 1998; Read *et al.*, 1996; McNeil *et al.*, 1994).

Die genaue Bedeutung der O-Acetylierung der Kapsel ist unklar. Obwohl die Acetyl-Gruppe das Molekulargewicht und folglich die Nettoladung beeinflusst, ist die funktionelle Relevanz der O-Acetylierung der Meningokokkenkapsel nicht bekannt. Jedoch konnte man zeigen, dass die O-Acetylierung die humorale Immunantwort moduliert (Richmond *et al.*, 2001). Der MenC Konjugat-Impfstoff, basierend auf dem Kapselpolysaccharid, wies unterschiedliche Antikörperspezifitäten für O-acetylierte oder nicht-O-acetylierte Stämme auf (Arakere & Frasch, 1991). Eine gesteigerte Immunogenität konnte bei O-acetylierten Kapselpolysacchariden der Serogruppe A festgestellt werden (Berry *et al.*, 2002), jedoch senkt die O-Acetylierung die Immunogenität der Serogruppe C (Fusco *et al.*, 2007).

### 3.3.2 Meningokokken-Lipopolysaccharid

#### 3.3.2.1 Lipopolysaccharid-Aufbau und Genetik

Lipopolysaccharid (LPS) bildet den Hauptbestandteil der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien (Vaara, 1999). Das Lipopolysaccharid von *N. meningitidis* ist ein amphiphatisches Glycolipid, das sich in einen lipophilen, endotoxischen Lipid A-Teil und einen Oligosaccharid-Teil aufteilt. Der Oligosaccharid-Teil variiert stark von Stamm zu Stamm, auf Grund des

---

unterschiedlichen genetischen Repertoires und der phasenvariablen Regulation der Glycosyltransferasen, die für die Biosynthese der Oligosaccharidketten verantwortlich sind. Aufgrund unterschiedlicher antigenetischer Eigenschaften wurden zwölf verschiedene Immunotypen unterschieden (Zhu *et al.*, 2002b; Scholten *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1994). Der Oligosaccharid-Teil des LPS besteht aus einem konservierten Kern und heterogenen äußeren Ketten. Der Kern besteht aus zwei Heptose-Molekülen (Hep I und II), die über ein Keta-Deoxy-Oktulonsäure-Molekül (KDO) mit dem Lipid A-Teil verknüpft sind. Von den Heptosen zweigen die alpha-, beta- und gamma-Ketten ab (Pavliak *et al.*, 1993; Verheul *et al.*, 1993). Die für die Seitenketten codierenden Gene, clustern in drei Regionen, die Lgt-1, -2 und -3 genannt werden (Zhu *et al.*, 2002a). Lgt-1 codiert für die Glycosyltransferasen, die für die Zuckerreste der alpha-Kette zuständig sind und Lgt-2 und -3 für die beta- und gamma-Kette.

### 3.3.2.2 Bedeutung des Lipopolysaccharids

Die LPS-Konzentration im Plasma korreliert mit der klinischen Symptomatik, da LPS ein direkter Induktor proinflammatorischer Zytokine ist. Obwohl auch andere Bestandteile von Meningokokken wie Porin B zu einer Zytokinproduktion führen, ist das LPS hauptverantwortlich für die Induktion von Zytokinen (van der Ley & Steeghs, 2003; Brandtzaeg, 2003). Die Struktur des LPS beeinflusst die Rolle für kommensales oder virulentes Verhalten. Trägerisolate, die aus dem Nasopharynx isoliert wurden, haben äußerst diverse Immunotypen, wobei häufig der L8 Immunotyp isoliert werden konnte (Mackinnon *et al.*, 1993). Bei diesen Stämmen fehlen die letzten beiden Zuckerreste der alpha-Kette aufgrund einer Phasenvariation des *lgtA* Gens (Jennings *et al.*, 1999). Stämme mit vollständiger alpha-Kette (L3, 7, 9 Immunotyp) überwiegen unter den klinischen Isolaten (Jones *et al.*, 1992). Eine vollständige alpha-Kette kann durch Sialylierung modifiziert werden. Es wurde postuliert, dass die sialylierte Form des LPS Schutz vor der komplement-vermittelten Lyse bietet. Die gesteigerte Serumresistenz wird durch Bindung des Komplement Faktor H erreicht (Vogel *et al.*, 1999; Estabrook *et al.*, 1997). Außerdem konnte gezeigt

werden, dass Dendritischen Zellen Meningokokken schlechter erkennen und phagozytieren je länger die alpha-Kette des LPS ist (Kurzai *et al.*, 2005).

### 3.4 Typisierung von *Neisseria meningitidis*

Die Typisierung von Meningokokken erfolgt klassisch nach der Zusammensetzung des Kapselpolysaccharids sowie über antigenetische Variationen der Porine und des LPS (Poolman *et al.*, 1995; Verheul *et al.*, 1993; Vedros, 1987; Frasch *et al.*, 1985; Tsai *et al.*, 1987; Gotschlich *et al.*, 1969) (Tabelle 2). Daneben ist eine molekulare Typisierung möglich. Für die Multilokus Sequenz Typisierung (MLST) werden sieben Stoffwechsel-Gene sequenziert und die Stämme anhand unterschiedlicher Allele verschiedenen Sequenztypen (ST) zugeordnet (Maiden *et al.*, 1998). Durch die Typisierung klinischer Isolate wurde festgestellt, dass es nur sehr wenige hypervirulente, klonale Linien gibt, die Auslöser der meisten invasiven Erkrankungen sind (Caugant, 1998; Maiden *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1993; Caugant *et al.*, 1988). Demgegenüber sind Meningokokkenstämme aus gesunden Trägern (Trägerisolate) sehr divers (Jolley *et al.*, 2005; Caugant *et al.*, 1988).

Klassifizierung	Komponente	Anzahl der Gruppen/Typen	Namen
Serogruppe	Kapselpolysaccharid	13	A, B, C, ..., W-135, Y,...
Serotyp	PorB (Klasse 2/3 OMP)	20	1, 2a, 2b, 2c, ..., 21
Serosubtyp	PorA (Klasse 1 OMP)	10	P1.1, P1.2, ..., P1.16
Immunotyp	LPS	12	L1-12

Tab. 2 Phänotypische Klassifizierung von *Neisseria meningitidis* (nach Verheul 1993)

---

### 3.5 Rezeptoren für die Erkennung von *Neisseria meningitidis*

Das angeborene Immunsystem besitzt eine Reihe von Rezeptoren, sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRRs), die konservierte Strukturen von Mikroorganismen erkennen (Janeway & Medzhitov, 2002). Diese PRRs erkennen unterschiedliche, auch als PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) bezeichnet bakterielle Bestandteile. Zu den bekannten PRRs, die *N. meningitidis* erkennen, gehören der Scavenger Rezeptor und die Toll-like-Rezeptoren.

#### 3.5.1 Scavenger Rezeptor

Als zellulärer Rezeptor für die Erkennung und Phagozytose von *N. meningitidis* konnte der Scavenger Rezeptor identifiziert werden (Kurzai *et al.*, 2005; Peiser *et al.*, 2002). Scavenger Rezeptoren (SRs) gehören zu einer Familie von Membranproteinen, die eine Reihe von Liganden wie modifizierte Lipoproteine, apoptotische Zellen und Pathogene bindet. Diese Familie besteht aus mindestens acht Unterklassen (A-H), die wenig Sequenzhomologie zueinander besitzen, jedoch dieselben Liganden erkennen. Das Charakteristische an den meisten bekannten Liganden ist deren polyanionische Natur (Platt *et al.*, 1998). Insbesondere SRs der Klasse A (SR-A) sind an der Pathogenabwehr beteiligt. SR-As sind wichtig für die Entgiftung von Endotoxinen, und sie scheinen eine wichtige Rolle bei der Stimulierung von proinflammatorischen Ereignissen zu spielen (Hsu *et al.*, 2001; Hampton *et al.*, 1991; Wright, 1991). Zurzeit ist jedoch nicht bekannt, welcher Bestandteil der Meningokokken den Liganden darstellt. Die Kapsel, die Pili und das Oberflächenmolekül Opa konnten bereits ausgeschlossen werden (Peiser *et al.*, 2006).

### 3.5.1.1 Scavenger Rezeptoren Klasse A

Scavenger Rezeptoren der Klasse A (SR-A) gehören zur Familie der Membran-Glykoproteine Typ II und bilden Homotrimere. Zu den SR-A werden fünf Mitglieder gezählt: SR-AI, SR-AII, SR-AIII, MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) und SRCL (SR with C-type lectin). SR-AI bis III resultieren aus drei verschiedenen Splice-Varianten. Im Gegensatz zu SR-AI und II kommt SR-AIII nicht auf der Zelloberfläche vor, sondern verbleibt im Endoplasmatischen Retikulum und ist somit nicht empfänglich für extrazelluläre Signale (Gough *et al.*, 1998). SR-AI und II werden vor allem auf Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, speziellen Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert (Hughes *et al.*, 1995; Geng & Hansson, 1995; Li *et al.*, 1995; Geng *et al.*, 1994; Naito *et al.*, 1992). MARCO hingegen kommt vornehmlich auf Makrophagen in der Milz und den Lymphknoten vor (Elomaa *et al.*, 1995). Neben SR-AI und II konnte auch MARCO als Rezeptor für Meningokokken beschrieben werden (Mukhopadhyay *et al.*, 2006).

Scavenger Rezeptoren der Klasse A I-III bestehen aus sechs unterschiedlichen Domänen, wobei Domäne 1 auf der intrazellulären Seite vorkommt, Domäne 2 den Transmembran-Bereich darstellt und die restlichen vier Domänen (3 bis 6) auf der extrazellulären Seite lokalisiert sind (Resnick *et al.*, 1996):

1. eine N-terminale zytoplasmatische Domäne (AS 1-50)
2. eine einzelne hydrophobe Transmembran-Domäne (AS 51-76)
3. eine Spacer Domäne (AS 77-150)
4. eine alpha-helikale coiled-coil Domäne (AS 151-271)
5. eine Collagen-ähnliche Domäne mit Gly-X-Y-Repeats (AS 272-343)
6. eine isotypen-spezifische C-terminale Domäne genannt SRCR (Scavenger Receptor Cystein-rich)(AS 344-453).

---

Die Collagen-ähnliche, extrazelluläre Domäne ist verantwortlich für die Bindung der negativ geladenen Liganden, wobei auch der Konformationszustand des Rezeptors von Bedeutung ist (Platt & Gordon, 2001; Andersson & Freeman, 1998; Rohrer *et al.*, 1990). Der N-terminale zytoplasmatische Bereich eines Monomers von SR-A besitzt keine Signal-Sequenz oder offensichtliche funktionelle Domäne (Matsumoto *et al.*, 1990). Es wurden jedoch drei hochkonservierte Phosphorylierungsstellen (Ser-21, Thr-30, Ser-49) auf der zytoplasmatischen Seite identifiziert (Ashkenas *et al.*, 1993; Kodama *et al.*, 1990). Diese drei Phosphorylierungsstellen sind an Signalwegen für die Lipidaufnahme bei Artherosklerose beteiligt (Fong & Le, 1999).

### 3.5.2 Toll-like-Rezeptor 2 und 4

Toll-like-Rezeptoren (TLR) gehören zu den signalauslösenden PRRs, die eine Zytokinproduktion induzieren. Die wichtigsten TLR-Rezeptoren bei Kontakt mit Meningokokken sind TLR 2 und 4. Neben einer Expression auf der Zelloberfläche können TLR 2 und 4 bei Dendritischen Zellen auch intrazellulär vorkommen (Uronen-Hansson *et al.*, 2004). TLR 2 und 4 initiieren MyD88-abhängige Signalwege, die zu einer NF- $\kappa$ B-induzierten Produktion von inflammatorischen Zytokinen führt (Takeda & Akira, 2004). LPS von Meningokokken ist ein potenter Agonist des TLR 4-Signalwegs. Vor allem der Lipid A Teil des LPS ist für die maximale Aktivierung des TLR4-Signalwegs verantwortlich, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette spielen eine geringere Rolle bei der Aktivierung (Zughaier *et al.*, 2004). Jedoch ist es möglich auch mit LPS-Mutanten die Zytokinproduktion zu initiieren (Uronen *et al.*, 2000). Die LPS Mutante von *N. meningitidis* vermittelt über TLR 2, aber nicht über TLR 4/MD2 die Zytokinantwort (Pridmore *et al.*, 2001). Dafür wird das neisseriale Porin PorB verantwortlich gemacht. Dieses Membranprotein ist in der Lage, TLR 2 zu aktivieren und DZ zur Ausreifung zu bringen (Singleton *et al.*, 2005).

### 3.6 Zytokinproduktion während der Pathogenese

Während der Infektion mit *Neisseria meningitidis* ist die Zytokinproduktion ein entscheidender Faktor für den Krankheitsverlauf eines Patienten. Grundsätzlich wird zwischen zwei Arten von Zytokinen unterschieden: proinflammatorischen und anti-inflammatorischen. In der Pathogenese der Meningokokkeninfektion spielen die vier proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 und das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 eine wichtige Rolle (van Deuren *et al.*, 1995). Die Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen korreliert mit dem Schweregrad und der Prognose eines an Meningokokken erkrankten Patienten (Gardlund *et al.*, 1995; Waring *et al.*, 1994; Waage *et al.*, 1989a; Waage *et al.*, 1989b).

TNF- $\alpha$  spielt eine zentrale Rolle in der Aktivierung der inflammatorischen Antwort und aktiviert die Zytokinkaskade, bei der IL-1, IL-6 und IL-8 induziert werden (Blackwell & Christman, 1996). Es wirkt eigenständig oder mit IL-1 synergistisch. Experimentelle und klinische Daten haben gezeigt, dass TNF- $\alpha$  und IL-1  $\beta$  die Schlüsselmediatoren bei Meningokokkensepsis sind (de Kleijn *et al.*, 1998; Mertsola, 1991). Die TNF- $\alpha$  Konzentration ist bei allen Patienten mit Meningokokken-Erkrankung erhöht. Untersuchungen von Patienten, die eine Meningokokken-Erkrankung überlebten, haben gezeigt, dass Patienten mit milderem Verlauf eine niedrigere TNF-Antwort hatten als Patienten mit heftigerem, moderatem Verlauf. Bei Patienten mit fulminantem Verlauf wurden wiederum niedrige TNF-Level gemessen. Patienten, die eine Meningokokken-Infektion nicht überlebten, hatten aber dreimal so hohe TNF-Level wie Patienten, die überlebten und einen ähnlich starken klinischen Schweregrad hatten (Westendorp *et al.*, 1995). Die TNF- $\alpha$  Konzentration ist wichtig um eine eliminierende Immunantwort einzuleiten. Zu hohe TNF-Konzentrationen oder viel zu niedrige TNF-Konzentrationen mit anti-inflammatorischem genetischem Hintergrund sind mit einer schlechten Prognose assoziiert. Familien, die eine niedrige TNF- $\alpha$  und eine hohe IL-10 Produktion besitzen, haben das höchste Risiko für einen ungünstigen Ausgang bei einer Meningokokken-Erkrankung (Westendorp *et al.*, 1997a; Westendorp *et al.*, 1997b). Außerdem konnte man zeigen, dass bei Patienten mit septischem Schock signifikant höhere

Konzentrationen von IL-10 im Plasma vorhanden waren, als bei Patienten ohne Schock (van Deuren *et al.*, 1994; Lehmann *et al.*, 1995). IL-8 gehört zur Familie der Chemokine und die Produktion wird durch verschiedene Stimuli wie Endotoxin, IL-1 und TNF- $\alpha$  induziert. Die wichtigste Funktion von IL-8 ist seine aktivierende und chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten (Leonard & Yoshimura, 1990). Hohe Konzentrationen an IL-8 sind mit einem schlechten Ausgang einer Meningokokken-Erkrankung assoziiert (Hackett *et al.*, 2001).

### 3.7 Dendritische Zellen

Dendritischen Zellen (DZ) gehören zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, die mit am effektivsten die Immunantwort initiieren, und außerdem die außerordentliche Fähigkeit haben, naive T-Zellen zu stimulieren. DZ sind potente Produzenten von TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-1. Sowohl das LPS von Meningokokken als auch andere neisseriale Bestandteile induzieren die Zytokinproduktion und bringen DZ zur Ausreifung (Sprong *et al.*, 2001; Dixon *et al.*, 2001).

Man unterscheidet bei DZ zwischen myeloidem und lymphoidem Ursprung. Beide DZ-Linien entstehen aus einer CD34-positiven Vorläuferzelle. Aus den myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich zuerst Monozyten, welche sich wiederum entweder zu Makrophagen, Langerhans Zellen (LZ) oder interstitiellen DZ entwickeln, abhängig vom Zytokinmilieu. Die interstitiellen DZ finden sich in fast allen Organen, LZ kommen in der Haut vor (Hart *et al.*, 1989; Prickett *et al.*, 1988). *In vitro* können aus Monozyten mit GM-CSF und IL-4 myeloide DZ kultiviert werden (Sallusto & Lanzavecchia, 1994).

Da in allen mukosalen Barrieren des Menschen DZ lokalisiert sind findet der erste Kontakt zwischen DZ und Meningokokken bereits am Epithel des Nasopharynx statt. Hier treffen DZ auf Kommensalen und Pathogene, und es wird entschieden, ob eine eliminierende, systemische Immunantwort eingeleitet werden muss. DZ haben die Fähigkeit, einerseits Toleranz gegenüber

harmlosen Mikroben zu induzieren und andererseits eine effiziente Abwehr gegen eindringende Pathogene zu initiieren.

Es gibt drei Stufen der Entwicklung von DZ: Dendritische Vorläufer Zellen patrouillieren durch das Blut, unreife DZ befinden sich in fast allen Geweben und reife DZ in sekundären Lymphorganen (Lymphknoten, Milz, Peyersche Plaques). Während dieses Ausreifungsprozesses verändern DZ ihren Phänotyp und ihre Funktion von antigenaufnehmenden Zellen zu antigenpräsentierenden Zellen (Bell *et al.*, 1999; Banchereau & Steinman, 1998; Hart, 1997; Steinman, 1991).

### **3.7.1 Unreife DZ und Antigenaufnahme**

Unreife DZ sind professionelle Phagozyten. Sie können mittels verschiedener Mechanismen, die unter dem Oberbegriff Endozytose zusammengefasst werden, effektiv Antigene aufnehmen. Der Begriff Endozytose umfasst die Pinozytose und Phagozytose, welche sich über die Größe der aufgenommenen Partikel definieren. Neben der Partikelgröße kann auch zwischen ligandenspezifischer und rezeptorvermittelter oder unselektiver Aufnahme von Partikeln unterschieden werden (Liu & Shapiro, 2003).

Pinozytose beschreibt den vesikulären Transport, um extrazelluläre Flüssigkeit und kleinste Partikel in ca. 0,1  $\mu\text{m}$  großen Vesikeln zu internalisieren (Parton & Richards, 2003). Bei der Pinozytose geht meist eine Liganden-Rezeptor-Bindung voraus. Außerdem läuft dieser Mechanismus aktinunabhängig ab.

Bei der Makropinozytose werden extrazelluläre lösliche Substanzen in Vesikel aufgenommen, die einen Durchmesser von bis zu 5  $\mu\text{m}$  haben können. Dieser Vorgang ist aktinabhängig und bei DZ ein konstitutiv vorkommendes Ereignis ohne exogenen Stimulus (Norbury, 2006).

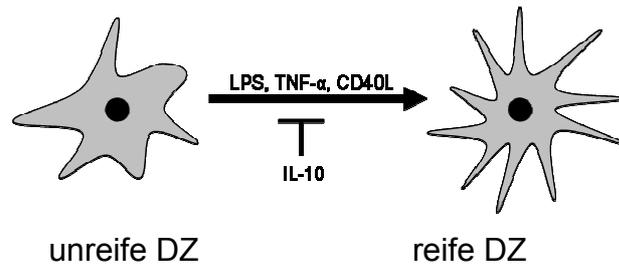
Bei der Phagozytose wird ebenfalls Aktin benötigt. Bei diesem Mechanismus werden größere Partikel ( $>0,5 \mu\text{m}$ ) aufgenommen. Die Bindung an entsprechende Rezeptoren veranlasst die phagozytierende Zelle Pseudopodien auszubilden, welche die Partikel umschließen und somit ein Phagosom ausbilden.

Einige Rezeptoren zirkulieren wieder an die Oberfläche zurück, wodurch ein effektiver Aufnahmemechanismus erhalten wird (Mahnke *et al.*, 2000).

Letztendlich führt jeder dieser Aufnahme-Mechanismen zur zytoplasmatischen Vesikelbildung und kann wiederum zur Fusion mit Lysosomen führen. Exogene Antigene werden in den Lysosomen bei sinkendem pH-Wert von Proteasen in kleine Fragmente gespalten und können dann über MHC-Komplexe den T-Zellen präsentiert werden (Nakagawa & Rudensky, 1999).

### **3.7.2 Ausreifung und Migration**

Die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen oder die Anwesenheit von Zytokinen lösen bei unreifen DZ eine phänotypische und funktionelle Veränderung aus. Die Antigenaufnahme führt letztendlich zum Verlust der Antigenaufnahme-Kapazität. Gleichzeitig kommt es zur Ausreifung der DZ, die durch eine erhöhte Expression von antigenpräsentierenden Molekülen, der zur T-Zell-Aktivierung notwendigen Costimulations- und Adhäsionsmolekülen und Reifungsmarkern gekennzeichnet ist. Der Reifungsprozess hat die Sezernierung verschiedener Zytokine zur Folge (Jonuleit *et al.*, 1996) (Tabelle 3). Außerdem kommt es zur Reorganisation des Zytoskeletts, die der Migration in die Lymphbahnen dienlich ist. Dieser Reifungsprozess kann *in vitro* durch Zugabe von LPS, TNF- $\alpha$  und CD40L ausgelöst, oder durch IL-10 inhibiert werden (Banchereau & Steinman, 1998).



Morphologie	-	verstärkte Dendriten-Bildung
Migration	+	+++
Endozytosekapazität	+++	+
Produktion von Zytokinen	-	+++
Antigenpräsentationsmoleküle		
MHC-Klasse I	++	+++
MHC-Klasse II	intrazellulär	auf der Zelloberfläche
Chemokinrezeptoren (CCRs)	+++	+
Costimulatorischen Moleküle		
CD 40	+	++
CD 80 (B7.1)	+	++
CD 86 (B7.2)	+	++
Adhäsionsmoleküle		
CD 54 (ICAM-1)	+	++
CD 58 (LFA-3)	+	++
Reifungsmarker		
CD 83	-	++
CD 25	-	+

Tab.3 Tabellarische Auflistung der wichtigsten Merkmale, die sich bei der DZ-Reifung ändern

### **3.8 Ziel der Arbeit**

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Zytokinproduktion von Dendritischen Zellen nach Kontakt mit Meningokokken. Dabei liegt ein Schwerpunkt auf der Wechselwirkung mit dem membranständigen Scavenger-Rezeptor Klasse A von DZ nach Kontakt mit Meningokokken.

Untersucht wird der Einfluss von

- der Kapselexpression auf die Zytokinproduktion
- die Kapselmodifikation der Serogruppe C, W-135 und Y auf die Interaktion mit Dendritischen Zellen
- die Phagozytose auf die Zytokinproduktion
- die rezeptorvermittelte Phagozytose über den Scavenger Rezeptor Klasse A auf die Zytokinproduktion

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte, Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterialien

##### 4.1.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller (Modell)
Agarosegelkammer	Roth
Brutschränke	Heraeus
Kammern für PAA-Gele	Biometra
ELISA-Reader	Tecan
Elektroporationsgerät	Dr. L. Fischer, Heidelberg
Entwicklermaschine	AGFA (Curix 60)
FACS	BD (Calibur)
Gel-Dokumentationsanlage	Herolab (UVT 28MP)
Heizblöcke	Grant Instruments
Hybridisierungsöfen	Biometra (OV5)
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	Zeiss (LSM 510 Konfokales Laser Scanning Mikroskop)
Kühlzentrifuge	Heraeus (Megafuge 1.OR)
Magnetrührer	Hartenstein
Mikrowelle	Bauknecht
pH-Meter	WTW (pH530)
Pipetten	Eppendorf
Schüttelinkubatoren	Braun Biotech (Centromat)
Shredder	Bio 101 Savant (Fast Prep FP120)
Spannungsgeräte	Biometra (Standart Power Pack P25)

---

Spektrometer/Photometer	Peqlab (ND-1000) Biochrom (Calculator Gene Quant pro) Hitachi (U200 Spektrometer)
Tank-Blot-Kammer	Biorad
Thermocycler	Roche Diagnostics (Light Cycler) Biometra (T3000)
Tischzentrifugen	Hettrich (Mikrorapid/K)
Vakuumverdampfer	Savant (Speedvac Plus SC110A)
Vortexer	Neolab (7-2020)
Waagen	Sartorius

---

#### 4.1.1.2 Chemikalien

---

Besondere Chemikalien	Firma
Accustain Formalin Solution, 10% Neutral Buffered, 4% Formaldehyd w/v	Sigma Aldrich
Fluorprep	bioMerieux
Polyvitex	bioMerieux
Protein A Sepharose	Invitrogen

---

Die üblichen Chemikalien wurden bei Merck, Sigma Aldrich, Appllichem und Roth erworben.

#### 4.1.1.3 Kits

Kits	Verwendungszweck	Firma
RNeasy Mini	RNA-Isolierung	Qiagen
RNeasy Midi	RNA-Isolierung	Qiagen
QIAamp DNA Mini	Plasmid-Präparation	Qiagen
QuantiTec Reverse Transcriptase	RNA-Umschrieb	Qiagen
Superscript	RNA-Umschrieb	Invitrogen
Luminex Human Innflammatory 5-plex	Luminex	Biosource
ELISA Cytoset: IL1,IL6, IL8, IL10,TNF $\alpha$	ELISA	Biosource
SYBRgreen, Absolute SYBR Capillary	qRT-PCR	ABgene
Western Blot Luminol Reagent	Western Blot	Santa Cruz BT
TMB Substrat: Opt EIA <sup>TM</sup> Substrat A+B	ELISA	BD

#### 4.1.1.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
0,5 ml, 1,5 ml, 2ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
1,5 ml RNase frei Tubes	Ambion, Austin,Texas, USA
12-well Tissue Culture Plate	Nunc, Wiesbaden
24-well Tissue Culture Plate	Sarstedt, Nümbrecht
96-well MaxiSorp Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden
96-well Tissue Culture Plate	Sarstedt, Nümbrecht
15 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Labortechnik, Essen
50 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Labortechnik, Essen
5 ml, 10 ml, 25 ml Plastikpipetten	Sarstedt, Nümbrecht

AutoSeq™ G50 Elutionssäulchen	Amersham Biosciences
Elektroporationsküvetten (4mm)	Eurogentec, Seraing, Belgien
Deckgläschen (24 x 32 mm)	Knittel Gläser, Braunschweig
Deckgläschen (rund)	Hartenstein, Würzburg
Hybridisierungskammer	Corning
Kulturplatten (100 x 20 mm)	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen (20 G) Sterican	Braun, Melsungen
Nitrocellulose Blotting Membran	Macherey&Nagel, Düren
Objektträger (75x25x1 mm)	Hartenstein, Würzburg
Plastikküvetten (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilm Medical X-Ray Film	Fuji, Tokyo
Shredder Tubes Lysin Matrix B	Bio 101 Systems
Shredder Tubes Qiagen	Qiagen, Hilden
S-Monovette/EDTA-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen Injekt Luer Solo 2ml	Braun, Melsungen
Sterilfilter für Spritzen (0,2µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Sterilfilter für Schotflaschen (0,2µm)	Hartenstein, Würzburg
Whatman Paper	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

---

## 4.1.2 Bakterienstämme und Zellkulturarten

### 4.1.2.1 Bakterien

Neisseria meningitidis	Sero- gruppe	Parental- Stamm	Genotyp	Kapsel O-at	LPS
MC58 (2135)	B	-	wt	-	L3
MC58 $\Delta$ <i>siaD</i> (3240)	-	2135	$\Delta$ <i>siaD</i>	-	L3
2120	C	-	wt	+	L3
2120 $\Delta$ <i>siaD</i> (2517)	-	2120	$\Delta$ <i>siaD</i>	-	L3
2948	C	2120	$\Delta$ <i>oatC</i>	-	L3
2948 GFP	C	2948	$\Delta$ <i>oatC</i> , GFP	-	L3
2948 $\Delta$ <i>pgm</i>	C	2948	$\Delta$ <i>oatC</i> , $\Delta$ <i>pgm</i>	-	T
172	W-135	-	wt	+	L3
172 GFP	W-135	172	GFP	+	L3
3073	W-135	172	$\Delta$ <i>oatWY</i>	-	L3
3073 GFP	W-135	3073	$\Delta$ <i>oatWY</i> , GFP	-	L3
3073 $\Delta$ <i>pgm</i>	W-135	3073	$\Delta$ <i>oatWY</i> , $\Delta$ <i>pgm</i>	-	T
2144	Y	-	wt	+	L3
2144 GFP	Y	2144	GFP	+	L3
3149	Y	2144	$\Delta$ <i>oatWY</i>	-	L3
3149 GFP	Y	3149	$\Delta$ <i>oatWY</i> , GFP	-	L3
3149 $\Delta$ <i>pgm</i>	Y	3149	$\Delta$ <i>oatWY</i> , $\Delta$ <i>pgm</i>	-	T
$\alpha$ 14	cnI	TI	-	-	L3
$\alpha$ 570	cnI	TI	-	-	L3
$\alpha$ 710	B	TI	-	-	L3

$\Delta$ *siaD* = Polysialyl-Transferase,  $\Delta$ *oatC/WY* = O-Acetyl-Transferase,  $\Delta$ *pgm* = Phosphoglucomutase, GFP = Grün Fluoreszierendes Protein, TI = Trägerisolat, T = Trunkiert

---

#### 4.1.2.2 Eukaryontische Zellen

- THP-1 Monozyten und Makrophagen (ATCC: TIB-202, DSMZ: ACC16)
- Unreife dendritische Zellen generiert aus PBMC von Frischblut

#### 4.1.3 Medien und Puffer

##### 4.1.3.1 Nährmedien und Puffer für Bakterien und Zellkultur

###### 4.1.3.1.1 Medien und Platten für Bakterien

GC-Agar	1,5% Proteose-Pepton 0,1% Stärke 0,4% K-Phosphat 0,5% NaCl 1,0% Bacto-Agar pH 7,2
PPM Medium	1,5% Proteose-Pepton 0,5% NaCl 0,05% Stärke 0,4% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,1% $\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,8 (Einstellung mit KOH)
PPM <sup>+</sup> Medium (supplementiert)	50 ml PPM 250 $\mu\text{l}$ 2 M $\text{MgCl}_2$ 250 $\mu\text{l}$ 8,4% $\text{NaHCO}_3$ 500 $\mu\text{l}$ Polyvitex

#### 4.1.3.1.2 Medien und Zusätze für Zellkultur

Medium /Zusätze	Firma	Bem./Verw. Konzentration
FCS	Biochrom	deaktiviert 30 min bei 50°C
Gentamicin	Biochrom AG	15 µl pro ml RPMI (75 µg/ml)
GMCSF (Leukine Sargramostim)	Immunex/USA	Stock [ $1 \times 10^5$ U/ml] in RPMI
HBSS	GIBCO	1x
Heparin (Liquemin N25000)	Roche	1 µl pro ml PBS (5 U/ml)
IL4	Strathmann Biotech	25 µg IL4 + 25 ml RPMI + 12,5 µl HSA (20%) → Stock [1 µg/ml]
Lymphoprep	Progen Biotechnik	1,077 g/ml
RPMI 1640 Medium	Biochrom	1x
Trypanblau	Seromed	1:2 verdünnt

#### 4.1.3.2 Lösungen und Puffer für eukaryontische Zellen

TBS (10x)	1,5 M NaCl 0,5 M Tris pH 7,6 ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O
PBS (10x)	1 Päckchen Dulbecco PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O
PBS (1x)	100 ml 10x PBS 900 ml ddH <sub>2</sub> O
PBS-EDTA	500 ml 1x PBS 1 ml 0,5 M EDTA pH 8

PBS-Heparin	500 ml 1x PBS 500 µl Heparin
-------------	---------------------------------

Saponinlösung	1% Saponin in 1x PBS
---------------	----------------------

Einfriermedium	10% DMSO
	20% FCS
	70% RPMI 1640

### 4.1.3.3 Mikroskopische Präparate

#### 4.1.3.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Blocklösung	1,5% Magermilch
	2% FCS
	in 1x PBS

Fixierer	3,7% Formaldehyd in 1x PBS
----------	----------------------------

Permabilisierer	0,5% Triton X in 1x PBS
-----------------	-------------------------

#### 4.1.3.3.2 Elektronenmikroskopie

Fixierer	frisch angesetzt 2% Formaldehyd in 1x PBS
----------	---

Blocklösung	50 mM Ammoniumchlorid in 1x PBS
-------------	---------------------------------

Permeabilisierer	0,05% Triton X in 1x PBS
------------------	--------------------------

Fixierer	2% Glutaraldehyd in 1x PBS
----------	----------------------------

---

**4.1.3.4 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE, Coomassie und Western Blot**

Lower Tris	45,5 g Tris pH 8,8 5 ml 20% SDS ad 250 ml ddH <sub>2</sub> O
Upper Tris	15,1 g Tris pH 6,8 5 ml 20% SDS ad 250 ml ddH <sub>2</sub> O
Elektrophoresepuffer (10x)	60,6 g Tris 287,4 g Glycin 50 ml SDS (20%) ad 2000 ml ddH <sub>2</sub> O
Elektrophoresepuffer (1x)	200 ml 10x Elektrophoresepuffer 1800 ml ddH <sub>2</sub> O
Probenpuffer (1x)	50 mM Tris pH 6,8 10% Glycin 2% SDS 5% beta-Mercaptoethanol
Blottingpuffer	400 ml Methanol 200 ml 10x Lämmli 1400 ml ddH <sub>2</sub> O
Waschpuffer (P/TBST)	PBS oder TBS mit 0,1% Tween
Blockpuffer	PBS oder TBS mit 5% Magermilch

Coomassie-Färbelösung	200 ml Ethanol 160 ml ddH <sub>2</sub> O 40 ml Eisessig 200 mg Coomassie Brilliant Blue R250
Coomassie Entfärber	400 ml Methanol 200 ml Eisessig 1400 ml ddH <sub>2</sub> O
Lämmli-puffer (10x)	60 g Tris 288 g Glycin pH 8,7 ad 2000 ml ddH <sub>2</sub> O

#### 4.1.3.5 Silberfärbung

Fixierer	50% Methanol 12% Essigsäure 500 µl Formaldehyd ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
Lösung A	0,43 g Na-Thiosulfat ad 5 ml H <sub>2</sub> O
Lösung B (Reduktionslösung)	75 µl Lösung A ad 50 ml H <sub>2</sub> O
Lösung C (Silbernitratlösung)	35 µl Formaldehyd 37% 0,1 g AgNO <sub>3</sub> ad 50 ml H <sub>2</sub> O

Lösung D	3 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
(Entwickler)	2,5 µl Lösung A
	25 µl Formaldehyd 37%
	ad 50 ml H <sub>2</sub> O

#### 4.1.3.6 Puffer und Lösungen für ELISA

Probenpuffer	3,2 g NaCl
	0,452 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,08 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,08 g KCl
	2 g Bovine Serum Albumin (Fraktion V)
	0,4 ml Tween 20
	ad 400 ml H <sub>2</sub> O, pH 7,4
Beschichtungspuffer	1,6 g NaCl
	0,226 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,04 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,04 g KCl
	ad 200 ml H <sub>2</sub> O, pH 7,4
Waschpuffer	0,624 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,18 g EDTA*2H <sub>2</sub> O
	0,2 ml Tween 20
	ad 400 ml H <sub>2</sub> O, pH 7,4
Substrat Lösung	Tetramethylbenzidine (TMB) von BD
Stopp Lösung	0,9 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

#### 4.1.3.7 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

TAE (50x)	242 g Tris 37,2 g EDTA 59,5 ml Essigsäure (96%) ad 1000ml ddH <sub>2</sub> O
DEPC-H <sub>2</sub> O	250 ml H <sub>2</sub> O (Ampuwa) 250 µl DEPC (Inkubation über Nacht im 37°C Brutschrank) (2x autoklavieren)
10x MOPS	0,4 M MOPS 0,1 M Natriumacetat 10 mM EDTA pH 8,0 pH 7,0 (Einstellung mit 2N NaOH) * lichtgeschützt lagern
20x SSC	3,0 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat

#### 4.1.4 Oligonukleotide

Gen		Primersequenz [5' → 3']	Amplifikations- größe [bp]	T <sub>m</sub> [°C]
GAPDH	Fwd	GATGACATCAAGAAGGTGGTG	179	62
	Rev	TCATACCAGGAAATGAGCTTG		60
SR-A	Fwd	TGCACTGATTGCCCTTTAC	168	61
	Rev	TCCTCTTCGCTGTCATTTTC		61

#### 4.1.5 siRNA

Gen		Sequenz
MSR1_1	Sense	r(GGGUUGUCAAUAGUAUUAA)dTdT
	Antisense	r(UAAAUACUAUUGACAACCC)dAdT
MSR1_2	Sense	r(CUAUGAAAUCGCUGCUCAA)dTdT
	Antisense	r(UUGAGCAGCGAUUUCAUAG)dTdT

#### 4.1.6 Inhibitoren

Substanz	Inhibitor von	Stammlösung	Endkonz.	Hersteller
Aprotinin	Serinprotease	500 µg/ml in PBS	2 µg/ml	Roche
Complete	Verschiedene Proteasen	50x	1x	Roche
Cytochalasin D	F-Actin	100 µg/ml in RPMI	4 µg/ml	Merck
Mannan	Mannan-Rezeptor	100 mg/ml in RPMI	Variabel	Sigma
Maus α human DC-SIGN	DC-SIGN	500 µg/ml in RPMI	Variabel	R&D
NaF	Ser-/Thr-Phosphatase	1 M in ddH <sub>2</sub> O	5-10 mM	Sigma
Okadasäure	Ser-/Thr-Phosphatase	100 µM in EtOH	50 nM	Sigma
PMSF	Serinprotease	200 mM in EtOH	1 mM	Boehringer
polyC	-	10 mg/ml in RPMI	500 µg/ml	Sigma
polyG	SR-A	10 mg/ml in RPMI	500 µg/ml	Sigma
Staurosporin	Proteinkinase	100 µM in EtOH	50 nM	Sigma
Swinholid A	F-Actin	100 µM in EtOH	500 nM	Merck

## 4.1.7 Antikörper

### 4.1.7.1 Antikörper für Western Blot

Antikörper	Klon-Nr.	Verd.	Firma
Kaninchen $\alpha$ humaner SRA	A2403	1:500	Santa Cruz Biotec.
Ziege $\alpha$ Kaninchen konjugiert mit HRP	B2607	1:5000	Santa Cruz Biotec.
Maus $\alpha$ Phospho-Ser/Thr/Tyr	04230705	1:500	Biomol
Ziege $\alpha$ Maus konjugiert mit HRP	67374	1:5000	Jackson Immuno Research

### 4.1.7.2 Antikörper für ELISA (Zykotin-ELISA von Biosource)

	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-8	IL-10
Beschichtungs-AK in Beschichtungspuffer (BP)	10 $\mu$ l+ 10 ml BP	10 $\mu$ l+ 10 ml BP	10 $\mu$ l+ 10 ml BP	10 $\mu$ l+ 10 ml BP
Detection AK in Probenpuffer (PP)	8 $\mu$ l+ 5 ml PP	4 $\mu$ l+ 5 ml PP	4 $\mu$ l+ 5 ml PP	4 $\mu$ l+ 5 ml PP
Streptavidin in Probenpuffer (PP)	16 $\mu$ l+ 10 ml PP	8 $\mu$ l+ 10 ml PP	2,5 $\mu$ l+ 10 ml PP	4 $\mu$ l+ 10 ml PP
Probenverdünnung	1:500	1:250	1:250	1:10

\*Angaben pro 96-well-Platte

### 4.1.7.3 Antikörper für FACS Analyse/Durchflusszytometrie

Antikörper gegen	Markierung	Klon-Nr.	Firma
Isotypen-Kontrolle Mouse IgG1	PE	MOPC-21	BD
CD40	PE	LOB7/6	Immunotech
CD80	PE	L307.4	BD
CD83	PE	HB15e	BD
CD86	PE	IT2.2	BD

Antikörper gegen	Markierung	Klon-Nr.	Firma
Isotypen-Kontrolle Mouse IgG2a	FITC	G155-178	BD
CD1a	FITC	NAI/34	Dako Cytomation
CD14	FITC	M5E2	BD
CD25	FITC	M-A251	BD
HLA-DR	FITC	Tü39	BD

#### 4.1.7.4 Antikörper und Farbstoffe für Fluoreszenzmikroskopie

Antikörper/Farbstoff	Gegen	Firma	Verdünnung	Inkub.
Alexa Fluor 546 Phalloidin	F-Actin	Invitrogen	Stock 200 U/ml , 1:40	30 min
DAPI	Zellkern	Invitrogen	1:1.000.000 (100 ng/ml)	10 min
α Kaninchen Alexa Fluor 546	Kaninchen IgG	Invitrogen	1:200	1 h

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Kultivierung von *Neisseria meningitidis***

Meningokokkenstämme wurden einen Tag vor der Transformation oder Infektion auf GC-Agarplatten ausplattiert und ÜN bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **4.2.1.1 Transformation von *Neisseria meningitidis* zur Generierung von Mutanten**

Die über Nacht auf Platte angezogenen Meningokokken wurden mit einem Wattebausch in 10 ml frisch angesetztem PPM+-Medium in 50 ml Falcon Tubes eingerieben und für ca. 1 h bei 37°C, 200 rpm inkubiert. Danach wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt und die Keimzahl wurde auf OD<sub>600</sub>=0,1 in 1 ml PPM+ Medium eingestellt. Dann wurden 100 µg vom gewünschten Plasmid zugegeben und für weitere 5 h bei 37°C, 200 rpm inkubiert. Schließlich wurden die Meningokokken abzentrifugiert (5000 rpm RT) und in 300 µl frischem PPM+ resuspendiert und auf zwei selektiv GC-Agarplatten ausgestrichen.

#### **4.2.1.2 Einstellung von Bakterienzahl für Infektionsversuche**

Die über Nacht auf Platte angezogenen Meningokokken wurden mit einem Wattebausch in 10 ml RPMI in 50 ml Falcon Tubes eingerieben und für mindestens 1 ½ h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Danach wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt und die Keimzahl wurde auf eine Multiplicity of Infektion (MOI) von 10 eingestellt.

## 4.2.2 Kultivierung von Zelllinien und Primärzellen

### 4.2.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) zur Generierung und Kultivierung von unreifen Dendritischen Zellen

Die Isolation von PBMCs erfolgte von unterschiedlichen freiwilligen Spendern, deren Frischblut in EDTA-beschichteten Röhrchen (S-Monovette) abgenommen wurde. Das Blut wurde 1:2 mit PBS-Heparin verdünnt. Von dem Blutgemisch wurden jeweils 30 ml langsam auf 10 ml Lymphoprep in 50 ml Zentrifugen-Röhrchen aufgeschichtet. Anschließend wurden die Greiner Röhrchen 30 min bei 350 g (Bremse aus) zentrifugiert. Die Interphase wurde abgenommen und in neue 50 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt und mit vorgekühltem PBS-EDTA aufgefüllt. Die PBMCs wurden pelletiert (7 min, 350 g, 4°C) und der Überstand entfernt. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt und schließlich wurden die PBMC in RPMI resuspendiert und ausgezählt. Um die Monozyten aus den PBMC zu separieren, wurde ihre Adhärenzfähigkeit auf Polystyrol-Platten ausgenutzt. Dazu wurden  $5 \times 10^7$  der aufgereinigten PBMC in 10 ml RPMI/1%FCS/GMCSF (100 U/ml) in eine Kulturschale (100x20 mm) gegeben und für 1 h bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die nicht-adhärennten Zellen durch mehrfaches Abspülen mit vorgewärmtem PBS (37°C) entfernt. Die adhärennten Monozyten wurden innerhalb einer Woche zu unreifen Dendritischen Zellen kultiviert, indem man jede Platte mit 10 ml RPMI mit 10%FCS, GMCSF ( $8 \times 10^3$  U/ml), IL-4 (10 ng/ml) versetzte. Die Zellen wurden alle 2 Tage mit frischem Medium versorgt. Dazu wurde die Hälfte des Mediums pro Platte abgenommen und die Zellen wurden zentrifugiert (7 min, 350 g, RT). Die pelletierten Zellen wurden im selben Volumen frischem RPMI mit 10%FCS, GMCSF ( $8 \times 10^3$  U/ml), IL-4 (5 ng/ml) wieder resuspendiert. Nach einer Woche wurden die unreifen DZ durch Abspülen mit kaltem PBS geerntet.

#### **4.2.2.2 Kultivierung von THP-1 Monozyten**

Die nicht adhärent wachsende humane Monozyten-Zelllinie THP-1 wurde in RPMI1640 Medium mit 10% FCS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen kultiviert. 5x10<sup>5</sup> Zellen werden pro ml Medium ausgesät und alle 3 bis 4 Tage werden die Zellen 1:2 oder 1:3 gesplittet.

#### **4.2.2.3 Kultivierung von THP-1 Monozyten zu Makrophagen**

1x10<sup>6</sup> nicht adhärente THP-1 Zellen wurden in 2 ml serumfreien RPMI-Medium aufgenommen und 20 ng/ml PMA wurden zugegeben, um dadurch direkt die Proteinkinase C zu stimulieren, was zur Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen führt (Asseffa et al., 1993). Die Zellen wurden mindestens 2 h oder über Nacht bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gespült. Die restlichen adhärennten Zellen wurden mit frischem RPMI/10%FCS für weitere zwei bis drei Tage kultiviert, bis zur endgültigen Ausreifung zu Makrophagen.

#### **4.2.2.4 Auftauen und einfrieren von THP-1 Monozyten**

Das Auftauen von THP-1 Zellen musste möglichst schnell geschehen. Dazu wurden die eingefrorenen Zellen in vorgewärmten Medium (37°C) resuspendiert und in ca. 10 ml frisches Medium gegeben. Die Suspension wurde 5 min bei 900 g zentrifugiert und das Pellet wurde zweimal in frischem RPMI Medium gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in frischem Medium mit 20% FCS in Kultur gebracht. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen mit RPMI und 10% FCS subkultiviert.

Das Einfrieren von THP-1 Zellen geschieht, im Vergleich zum Auftauen von THP-1 Zellen, langsam. Hierzu wurde das Einfriermedium auf Eis vorgekühlt. Dann wurden 5x10<sup>6</sup> THP-1 Monozyten in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden für 1-2 Stunden in einer Styroporbox bei -20°C inkubiert und dann über Nacht bei -80°C gekühlt.

Anschließend wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **4.2.2.5 Bestimmung der Zellzahl**

Die zu bestimmende Anzahl an eukaryontischen Zellen wurde in einem definierten Volumen resuspendiert. Die Zellen wurden dann 1:2 in Trypanblau verdünnt, um beim Auszählen gleichzeitig die lebenden Zellen (weiß) von den abgestorbenen (blau) zu unterscheiden. Die Zellzahl wurde durch Auszählen in einer Neubauerkammer ermittelt. Die Zellzahl ließ sich mit folgender Formel errechnen:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Anzahl der Zellen pro Großquadrat (oder 16 Kleinquadrate)} \times 10^4 \\ (\text{Volumen des Großquadrates}) \times 2 \text{ (Verdünnung in Trypanblau)}$$

#### **4.2.3 Zytokinbestimmung**

##### **4.2.3.1 ELISA (BIOSOURCE)**

Zur Analyse von DZ-generierten Zytokin-Überständen, wurden ELISA CytoSet™ für TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6 und IL-10 von Biosource verwendet. Alle verwendeten Lösungen mit den entsprechenden Verdünnungen sind im Materialteil (2.1.6.2) aufgelistet. Zur Analyse der Zytokinüberstände wurden 96-well MaxiSorp Mikrotiterplatten mit entsprechend verdünntem Beschichtungsantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte einmal mit dem Wasch Puffer gewaschen und anschließend wurden 250  $\mu$ l von dem Probenpuffer für 1 h in jedes Well pipettiert um die unspezifischen Bindungsstellen abzublocken. Währenddessen wurden die Zytokinüberstände (Siehe 2.1.6.2) und die Standards (1:2) im Probenpuffer verdünnt. Je 100  $\mu$ l wurden von der Standardreihe (doppelter Ansatz) und von den verdünnten Proben (dreifacher Ansatz) in die Wells pipettiert. Sofort danach wurde 50  $\mu$ l von dem entsprechend verdünnten Nachweisantikörper in

jedes Well gegeben. Anschließend wurde die Platte für 2 h bei kontinuierlichem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Wells dreimal mit Waschpuffer gewaschen und dann 100 µl von entsprechend verdünnter Streptavidin-HRP Lösung (siehe Tabelle 2.1.6.2) in jedes Well gegeben und weitere 30 min kontinuierlich geschüttelt. Danach wurde die Platte wieder dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl von der frisch angesetzten TMB-Lösung in jedes Well pipettiert und ein letztes Mal für 30 min bei kontinuierlichem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurde in jedes Well 100 µl von der Stopp Lösung (0,9 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gegeben. Anschließend (innerhalb von 30 min) wurde die optische Dichte der einzelnen Lösungen bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Bezugswellenlänge von 650 nm bestimmt. Die Durchführung wurde nach Anleitung des Herstellers bearbeitet.

#### **4.2.3.2 LUMINEX (BIOSOURCE)**

Die Luminex Methode erlaubt eine simultane Analyse von mehreren unterschiedlichen Zytokinen aus einer Probe, mit ähnlicher Reproduzierbarkeit zum ELISA.

Eine spezielle 96-well Filter Platte von Biosource musste vorab durch Zugabe von 200 µl Waschlösung pro Well angefeuchtet werden und diese wurde anschließend mit einer speziellen Apparatur abgesaugt. Danach wurde 25 µl von der Bead-Lösung in jedes Well gegeben und zweimal mit 200 µl Waschlösung gewaschen. Dann wurden 50 µl vom Inkubationspuffer in jedes Well gegeben. Für die Standardreihe wurden jeweils 100 µl in die entsprechenden Wells pipettiert. In die Probenwells wurde je 50 µl Assay-Diluent und 50 µl der verdünnten Probe gegeben. Anschließend wurde die Platte für 2 h bei 550 rpm kontinuierlich schüttelnd im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Inhalt der Wells abgesaugt und zweimal mit der Waschlösung gewaschen. Anschließend wurden 100 µl der Biotin-gekoppelte Antikörper in jedes Well gegeben und dann für eine weitere Stunde bei 550 rpm schüttelnd im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde noch zweimal gewaschen und danach wurde 100 µl vom

Streptavidin-Antikörper in jedes Well pipetiert. Weitere 30 min wurde die Platte bei 550 rpm kontinuierlich schüttelnd im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Ein letztes Mal wurde die Platte dreimal gewaschen und der Bead-Zytokin-Komplex in 100 µl Waschlösung resuspendiert indem die Platte 30 sec geschüttelt wurde. Danach erfolgte die Messung mit Luminex und die Auswertung mit MasterPlex QT Software (MiraiBio, Alameda, USA).

#### **4.2.4 Durchflusszytometrie/FACS**

Zur Analyse von zellulären Oberflächenmarkern wurden die zu analysierenden Zellen abgelöst, pelletiert (7 min, 350 g, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 200 µl HBSS/10%FCS (eiskalt) im Reaktionsgefäß resuspendiert. Zu jedem Ansatz wurde 2 µl FACS-Antikörper zugeben, gevortext und dann für 15 min auf Eis (dunkel) inkubiert. Nach der Inkubation wurde je 1 ml HBSS/10%FCS zu jedem Röhrchen gegeben und dann wurde für 5 min bei 450 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Die Zellen wurden schließlich in 500 µl HBSS/10%FCS resuspendiert und anschließend wurden die Zellen mit dem FACScalibur analysiert.

#### **4.2.5 Microarray-Analyse des Zytokin-Transkriptionsprofils von DZ infiziert mit *Neisseria meningitidis***

##### **4.2.5.1 DZ Isolierung aus einer Leukapherese**

Da zur Analyse des Transkriptoms von DZ mittels Microarray kleine Blutmengen nicht ausreichend sind, wurden für diesen Zweck PBMCs aus einer Leukapherese isoliert. Das Leukozyten-Konzentrat wurde wie schon unter 2.2.2.1 beschrieben verarbeitet. Eine Leukapherese ergab knapp  $1 \times 10^{10}$  Zellen.

#### 4.2.5.2 Infektion

Nach Kultivierung der PBMCs zu unreifen DZ, wurden an Tag 6, 7 und 8 die Zellen mit den Meningokokken-Stämmen MC58, MC58 $\Delta$ *siaD* und  $\alpha$  14 infiziert. Pro Ansatz wurden  $2 \times 10^7$  DZ pro Stamm und  $7 \times 10^7$  DZ für die Kontrolle verwendet. Die Infektion mit einer MOI von 10 wurde in T75cm-Zellkulturflaschen ( $1 \times 10^7$  DZ/Flasche) durchgeführt. Die Infektionszeit betrug entweder vier oder 18 Stunden, da kinetische Analysen ergeben haben, dass es nach Infektion von DZ nach vier, 12 und 18 Stunden zu einer gesteigerten Expression der Transkription kommt (Huang et al., 2001). Die Infektions- und Kontrollansätze wurden nur in RPMI Medium ohne weitere Zusätze bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert. Beim Infektionsansatz von 18 Stunden Inkubation wurde nach 4 Stunden Gentamicin zugegeben.

#### 4.2.5.3 RNA-Isolierung

Nach vier bzw. 18 Stunden Infektion wurden die adhärennten DZ zweimal mit PBS gespült. Danach wurde in jede T75-Zellkulturflasche 2 ml RLT-Puffer (mit  $\beta$ -Mercaptoethanol) gegeben und geschwenkt, so dass sich die Zellen von der Flasche lösten. Danach wurde das Zell-RLT-Puffer-Gemisch in Crasher-Tubes überführt und zweimal für 45 Sekunden bei 6,5 g zertrümmert. Sofort danach wurde das Lysat im selben Volumen in kaltem 70%-Ethanol (RNase frei) resuspendiert. Die RNA wurde mittels RNeasy Midi Kit (QIAGEN) aufgereinigt (siehe Handbuch). Im letzten Schritt wurde die RNA zweimal mit 250  $\mu$ l RNase-freiem Wasser eluiert.

#### 4.2.5.4 DNA-Verdau und Überprüfung

Um sicher zu gehen, dass man nach der RNA-Präparation tatsächlich nur RNA in der Probe hat, wurde die Probe für zwei Stunden bei 37°C mit DNase behandelt.

Eluierte RNA	500 µl
Na-Acetat [1 M]	60 µl
MgSO <sub>4</sub> [0,05 M]	60 µl
DNase, RNase-frei (Roche)	12 µl

Nach dem DNA-Verdau wurde die RNA nochmals mit dem RNeasy Kit aufgereinigt. Dazu wurden die ca. 600 µl RNA-Gemisch mit je 2 ml RLT-Puffer und 1,4 ml Ethanol (100%) versetzt und anschließend wie nach Protokollvorschrift präpariert und schließlich zweimal mit 250 µl RNase-freien Wasser eluiert.

Um zu überprüfen, ob sich noch DNA-Reste in der Probe befinden wurde eine Kontrol-PCR für das Gen beta-Actin durchgeführt.

RNA	1 µl
dNTPs [4 mM]	2 µl
fwd Primer [10 µM]	1 µl
rev Primer [10 µM]	1 µl
10x Puffer	5 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
H <sub>2</sub> O	39,75 µl
	Σ50 µl

PCR-Programm:	94°C	10 min	
	94°C	1 min	} x 35
	56°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
	72°C	10 min	

Wenn in dieser PCR kein Produkt nachgewiesen werden konnte, wurde die RNA unter denaturierenden Bedingungen auf ein Agarose-Gel geladen und aufgetrennt, zur visuellen Verdeutlichung der Reinheit des Produktes. Für das Agarose-Gel wurden 100 ml 1x MOPS mit 1 g Agarose in der Mikrowelle erhitzt bis sich die Agarose löste. Nach Abkühlung wurde 40 µl Guanidinthiocyanat [1 M] und 8 µl Ethidiumbromid zugegeben und danach konnte das Gel gegossen werden. Dann wurden 5 µl RNA-Probe mit 5 µl des 2x RNA-

Gelladungspuffer versetzt, und nach kurzer Denaturierung (5 min) bei 65°C auf das Gel geladen und aufgetrennt. Die Qualität der RNA wurde durch Abschätzen der ribosomalen RNA-Banden (18S und 28S, bzw. 1,9 kb und 5,0 kb) bemessen.

Die Quantität und Qualität wurde photometrisch zweimal ermittelt, wobei die Proben in 10 mM Tris-Cl, pH7,5 verdünnt worden sind. Nur Proben deren OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>-Ratio bei über 1,8 und deren OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>-Ratio bei über 2,0 lagen, wurden für Microarray-Versuche verwendet. Das Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad bezüglich Protein-Kontaminationen; und das Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> bestimmt den Grad an Salz-Kontamination. Je mehr Proteine bzw. Salz in der Lösung, umso höher der OD<sub>280</sub>- bzw. der OD<sub>230</sub>-Wert und folglich wird die OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>-Ratio bzw. OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>-Ratio kleiner.

#### 4.2.5.5 Hybridisierung auf Microarrays

Mittels kompetitiver Hybridisierung wurde das Transkriptionsprofil der Proben analysiert. Dazu wurden je 20 µg RNA zu cDNA umgeschrieben und dabei wurde diese mit Cy3 oder Cy5 gelabelt. Dazu wurde die RNA zuerst mit Primern und Standards versetzt:

RNA	20 µg in 15,3 µl H <sub>2</sub> O
Nona-Random Primer [5 µg/µl]	0,5 µl
Oligo dT [2,5 µl/µl]	1 µl
Cy3- oder Cy5-Standard RNA	2 µl
Luciferase RNA [2 µg/µl]	5 µl
	Σ23,8 µl

Die Mixtur wurde zur Denaturierung für 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt und danach kurz abzentrifugiert.

Danach wurden die restlichen Komponenten für die cDNA-Synthese zugegeben:

---

dCTP [10 mM]	0,8 µl
dATP [20 mM]	1 µl
dGTP [20 mM]	1 µl
dTTP [20 mM]	1 µl
DTT [0,1 M]	0,4 µl
5x First Strand Puffer	8 µl
RNase Out	1 µl
Superscript II	1 µl
	Σ14,2 µl

Schließlich wurden noch entweder 2 µl Cy3 oder Cy5 hinzu gegeben, was zu einem Endvolumen von 40 µl führte. Zur Primeranlagerung wurde der Ansatz für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation für 2 h bei 42°C, gefolgt von 15 min Inkubation bei 70°C. Nach Abkühlung der Proben wurde die RNA durch Zugabe von 2 µl RNase (DNase frei) entfernt indem die Probe für 45 min bei 37°C inkubiert wurde. Die Aufreinigung der cDNA erfolgte über G50-Säulchen (Amersham Pharmacia). Danach erfolgte die Probenvereinigung und das Probenvolumen wurde in der Speedvac auf 30 µl reduziert. Bevor die Proben zur Hybridisierung auf die Slides gegeben wurden, wurde noch 6 µl 20x SSC und 4 µl 1% SDS zur Probe zugegeben. Der Ansatz wurde für 3 min bei 95°C gekocht und anschließend auf Eis gestellt. Schließlich wurde die Probe auf die vorhybridisierten Slides aufgetragen und luftblasenfrei ein Deckglas auf den Slide gelegt. Die Hybridisierung erfolgte in einer Hybridisierungskammer bei 68°C über Nacht im Hybridisierungsöfen.

#### **4.2.5.6 Slide-Präparation**

##### **4.2.5.6.1 Spotten**

20 µM von 100 verschiedenen 60-meren Oligos (Oligo GEArray Human Common Cytokines von Superarray) wurden am Institut für Hygiene und Mikrobiologie mit Hilfe des Affymetrix 417 Arrayer (MWG Biotech AG) auf Amino Slides (Quantifoil von Peqlab) gespottet.

#### 4.2.5.6.2 Vorhybridisierung der Slides

Bevor die gelabelten cDNA Proben auf die Slides pipettiert wurden, mussten die Slides vorhybridisiert werden. Dazu konnten zwei verschiedene Puffer-Systeme je nach Slide-Charge verwendet werden:

1. 15 min Aminosolution  
20 sec ddH<sub>2</sub>O mit 1% SDS  
20 sec ddH<sub>2</sub>O

Oder

2. 20 sec ddH<sub>2</sub>O mit 1% SDS  
20 sec ddH<sub>2</sub>O  
45 min ddH<sub>2</sub>O mit 1% SDS, 4x SSC, 1 mg/ml BSA  
20 sec ddH<sub>2</sub>O

Die Slides wurden danach sofort bei 300 g für 3 min getrocknet. Dann konnten die Proben ÜN auf den vorhybridisierten Slides hybridisieren. Am nächsten Tag wurden die Slides gewaschen:

- 10 min 2xSSC, 0,2% SDS
- 10 min 2xSSC
- 10 min 0,2xSSC

Nach dem Waschen wurden die Slides sofort bei 300 g für 3 min getrocknet. Danach wurden die Slides für 10 sec in Dyesaver getaucht, getrocknet und danach gescannt und ausgewertet.

#### 4.2.5.7 Scannen und Auswertung

Das Scannen der hybridisierten Slides erfolgte mit dem Fluoreszenzscanner (Affymetrix 418 Scanner, MWG-Biotech AG). Die durchschnittliche

Signalintensität und die Messung des lokalen Hintergrunds wurden durch die ImaGene, Version 4.0 Software (Biodiscovery Inc., Los Angeles, Kalifornien) für jeden Spot ermittelt. Die beiden Farbkanäle (grün für Cy3 und rot für Cy5) wurden dann normalisiert und anschließend wurden von den normalisierten Werten die Cy3/Cy5 Fluoreszenzverhältnisse berechnet und die durchschnittlichen Signalverhältnisse von allen Oligos ermittelt. Letztere dienten dann zur Berechnung der einzelnen Transkript-Verhältnisse jedes einzelnen ORFs. Die weitere Auswertung erfolgte dann mittels Microsoft Excel von Windows.

## **4.2.6 Färbung von Mikroskopiepräparaten**

### **4.2.6.1 Färbung von fluoreszenzmikroskopischen Präparaten**

Zur Visualisierung von Infektionsversuchen wurden DZ mit GFP-transformierten Meningokokken-Stämmen infiziert. Dafür wurde zunächst sterile Glasplättchen in eine 24-well Platte gelegt und  $1 \times 10^5$  Zellen in 500  $\mu$ l RPMI zugegeben. Dann wurden DZ kurz auf die Glasplättchen anzentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit GFP-transformierten Meningokokken-Stämmen (MOI:10, 500  $\mu$ l, Endvolumen: 1 ml) infiziert. Nach der Inkubation von 3-5 h wurden die nicht adhärenen Bakterien dreimal mit 1x PBS abgewaschen und anschließend für 15 min bei RT oder ÜN bei 4°C in 3,7% Formaldehyd/PBS fixiert. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen für 10 min in 0,5% Triton X 100/PBS inkubiert. Dann wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die folgenden Färbeschritte wurden in frisch angesetzter Blocklösung durchgeführt. Die Actinfilamente wurden mit Alexa Fluor 546-Phalloidin Antikörpern für 30 min bei RT im Dunkeln angefärbt. Die letzten 10 min wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Schließlich wurden die Präparate zweimal mit PBS und einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Proben wurden getrocknet und in Fluorprep eingebettet, um mit dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert zu werden.

#### 4.2.6.2 Färbung von elektronenmikroskopischen Präparaten

Zur Visualisierung des Kontakts zwischen DZ und MC58 $\Delta$ *siaD* und der Lokalisation des Scavenger Rezeptors (SR-A) wurden elektronenmikroskopische Präparate mit Ultrasmall Gold und anschließender Silberverstärkung hergestellt. Dafür wurde zunächst sterile Glasplättchen in eine 24-well Platte gelegt und  $2 \times 10^5$  DZ in 500  $\mu$ l RPMI zugegeben. Dann wurden die DZ kurz auf die Glasplättchen anzentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit MC58 $\Delta$ *siaD* (MOI:10, 500  $\mu$ l, Endvolumen: 1 ml) infiziert. Nach der Inkubation von 3 h wurden die nicht adhärenenten Bakterien dreimal mit PBS abgewaschen und anschließend ÜN bei 4°C in frisch angesetztem 2% Formaldehyd/PBS fixiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate dreimal 5 min gewaschen, gefolgt von einer 15 minütigen Blockierung der freien Aldehydgruppen mit Blockierungspuffer. Nach dreimaliger 5 min Waschung mit PBS wurden die Zellen genau 10 min in 0,05% Triton X 100/PBS permeabilisiert. Dann wurden die Zellen wieder dreimal 5 min mit PBS gewaschen und anschließend wurde mit dem 1. Antikörper gegen SR-A (1:200 in 1x PBS) 1 h gefärbt. Bevor der 2. Antikörper verwendet wurde, wurde sechsmal für 5 min in PBS gewaschen. Der 2. Antikörper (Kit von AURION) wurde 1:20 verdünnt und ebenfalls für 1 h inkubiert. Nach sechsmaligen waschen für 5 min wurden die Präparate in 2% Glutaraldehyd in 1x PBS fixiert für 10 min. Nach viermaligen waschen mit ddH<sub>2</sub>O wurden die ultrakleinen Goldpartikel am Zweitantikörper mit der Silberverstärkungslösung (20 Tropfen Enhancer + 1 Tropfen Developer) für 60-90 min inkubiert. Anschließend wurden die Präparate weitere viermal mit ddH<sub>2</sub>O für jeweils 5 min gewaschen. Dann wurden die Präparate stufenweise für jeweils 5 min mit 50%, 70%, 96% und zweimal 100% Ethanol und zweimal in Propylenoxid entwässert. Schließlich wurden die Präparate in einem Propylen-Epon-Gemisch eingebettet. Die Fertigstellung der geschnittenen Präparate erfolgte in der Arbeitsgruppe für Elektronenmikroskopie.

## 4.2.7 Arbeiten mit Proteinen/Biochemische Methoden

### 4.2.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinen wurde das vertikale Gelsystem von BioRad verwendet. Dazu wurden Polyacrylamidgele (PAA-Gele) mit einer Polyacrylamid-Endkonzentration von 10-12% für Proteine angefertigt. Das Trenngel wurde nach Zugabe von APS und Temed zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit ddH<sub>2</sub>O überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel über das Trenngel gegossen und vor Aushärtung mit einem Kamm versehen. Das vollständig auspolymerisierte Gel wurde nach Entfernen des Kamms in eine Gelkammer gespannt und diese mit Elektrophorese-Puffer befüllt. Die aufgekochten Proteinproben, die mit Probenpuffer versetzt wurden, wurden in die mit Elektrophorese Puffer gespülten Taschen eingefüllt. Die Proteinauftrennung erfolgte für ca. 1-2 h bei 20 mA pro Gel. Die Zusammensetzung der PAA-Gele ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Trenngel	12%	10%	Sammelgel	3,5%
PAA (40%)	2,5 ml	2 ml	PAA(40%)	0,3 ml
ddH <sub>2</sub> O	2 ml	2,5 ml	ddH <sub>2</sub> O	1,6 ml
Lower Tris	1,5 ml	1,5 ml	Upper Tris	0,7 ml
APS (10%)	30 µl	30 µl	APS (10%)	15 µl
Temed	10 µl	10 µl	Temed	10 µl

\*Angaben pro Gel

### 4.2.7.2 Färben von Proteinen in PAA-Gelen (Coomassie)

Die Färbung von Proteinen in PAA-Gelen erfolgte in Coomassie-Färbelösung für mindestens ein Stunde oder ÜN. Anschließend wurden die Gele in Entfärbelösung so lange geschwenkt, bis alle Banden detektierbar wurden.

#### 4.2.7.3 Silberfärbung (Blum *et al.*, modifiziert)

Die Acrylamidgele wurden für ca. ein bis zwei Stunden im Fixierer schüttelnd bei RT inkubiert (oder über Nacht bei 4°C). Anschließend wurden die Gele dreimal für 10 min in 50% Ethanol gewaschen. Danach wurden die Gele kurz dreimal in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgte eine Inkubation von einer Minute in der Reduktionslösung (Lösung B), wiederum gefolgt vom dreimaligen Waschen in ddH<sub>2</sub>O. Die Anfärbung erfolgte für 20 min in einer Silbernitratlösung (Lösung C). Danach wurden die Gele dreimal gut in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. In Entwicklerlösung (Lösung D) wurden die Acrylamidgele so lange inkubiert, bis die Banden sichtbar wurden. Dann wurden die Gele gewaschen und zum Abstoppen des Entwicklungsprozesses nochmals ÜN bei 4°C in die Fixierlösung gelegt. Die untere Tabelle zeigt zusammenfassend die einzelnen Schritte der Silberfärbung.

Schritt	Reagenz	Dauer
Fixierung	Fixierer	1-2 h RT oder ÜN 4°C
Waschen	Ethanol 50%	3 x 10 min
Reduktion	Reduktionslösung (Lsg. B)	1 min
Waschen	ddH <sub>2</sub> O	3 x 20 sec
Färbung	Silbernitratlösung (Lsg. C)	20 min
Waschen	ddH <sub>2</sub> O	3 x 20 sec
Entwicklung	Entwickler (Lsg. D)	bis Banden sichtbar
Waschen	ddH <sub>2</sub> O	3 x 1 min
Abstoppen	Fixierer	ÜN 4°C

#### 4.2.7.4 Western Blot

Der Western Blot dient zum spezifischen Nachweis von Proteinen. Dazu wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und dann über elektrophoretischen Transfer vom PAA-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran

geblottet (mittels Tankblot-Verfahren für 1-1 1/2 h bei 300-350 mA). Anschließend wurde die Membran in 5%-iger Magermilch zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen in TBST inkubiert. Danach folgte die Inkubation mit entsprechendem Erstantikörper (in 5% Magermilch/TBST) für eine Stunde bei RT. Dann erfolgten zwei Waschschrte mit TBST für 5 min bei RT, gefolgt von der Inkubation des Sekundärantikörpers gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (Pox), in TBST für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen (3x in TBST) für 5 min erfolgte der Nachweis mit ECL-Reagenz. Das ECL-Reagenz ist eine Substanz, die nach enzymatischer Spaltung der Meerrettichperoxidase luminesziert. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Inkubation schwankte zwischen 1 min und 1 h. Folgende Tabelle fasst die einzelnen Färbeschrte zusammen.

	Anti-SRA	Anti-Phospho-Ser/Thr/Tyr
Blockierung	5% Magermilch- TBST	5% Magermilch- PBST
1.Antikörper	1:500 in 5% Magermilch- TBST	1:500 in 5% Magermilch- PBST
2.Antikörper	Pox anti rabbit 1:5000 in TBST	Pox anti mouse 1:5000 in PBST

#### 4.2.7.5 Immunpräzipitation

Ein Tag vor Infektion wurde 500 µl Sepharose-gekoppeltes Protein A equilibriert, indem es zweimal mit 1 ml 1% Triton X 100-TBS gewaschen wurden und jeweils für 20 sec bei 14000 rpm zentrifugiert. 500 µl der Beads wurden dann mit 25 µl SR-A Antikörper [200 µg/ml] in 1 ml 1% Triton X 100-TBS ÜN drehend bei 4°C inkubiert, zur Bildung eines Antikörper-Bead-Komplexes. Am nächsten Tag wurden der Komplex noch zweimal mit 1 ml 1% Triton X 100-TBS gewaschen. Die Beads wurden in 1 ml frischem 1% Triton X 100-TBS aufgenommen. Das Endvolumen des Antikörper-Bead-Komplexes ist bei 500 µl Beads ist dann ca. 1,4 ml.

Vorgehensweise bei DZ:

$1 \times 10^6$  DZ wurden in 200  $\mu$ l RPMI in 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit Meningokokken (MOI:10 in 100  $\mu$ l RPMI) infiziert. Nach Infektion wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt und anschließend für 3 min bei 450 g, 4°C zentrifugiert. Das Medium wurde abgezogen und 200  $\mu$ l kaltes TBS in jedes Reaktionsgefäß gegeben.

Vorgehensweise bei THP-1 Makrophagen:

$1 \times 10^6$  THP-1 Makrophagen sind pro Well einer 6-Well-Platte drei Tage vorher ausgesät worden. Am Tag der Infektion wurde das Medium abgezogen, die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und 1 ml frisches RPMI in jedes Well gegeben. Die Zellen wurden mit Meningokokken (MOI:10 in 100  $\mu$ l RPMI) infiziert. Nach der Infektion wurde die 6-Well-Platte auf Eis gestellt und das Medium wurde abgezogen. In jedes Well wurde 1 ml eiskaltes, steriles TBS gegeben und mit einem Zellschaber wurden die Zellen abgelöst und nochmals mit 1 ml TBS nachgespült. Die insgesamt 2 ml Zelllysat wurden für 3 min bei 450 g, 4°C zentrifugiert. Das TBS wurde abgezogen und 200  $\mu$ l kaltes TBS in jedes Reaktionsgefäß gegeben.

Weitere Vorgehensweise bei DZ und Makrophagen:

Die Zellen wurden dann für 10 min bei 100°C inkubiert, danach sofort auf Eis gestellt. Nachdem das Zelllysat abgekühlt war, wurde 200  $\mu$ l zweifach-konzentrierter Lysepuffer mit Inhibitoren (2% Triton X100-TBS, 2mM EDTA, 2mM PMSF, 10 mM NaF, 2x Complete) zu dem Lysat gegeben. Dies führte zusammen mit den 200  $\mu$ l TBS zu einer einfach-konzentrierten Endkonzentration. Danach wurde das Lysat für 30 min auf Eis inkubiert und alle 10 min gevortext. Anschließend wurde das Lysat für 15 min bei 14000 rpm, 4°C zentrifugiert um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand wurden dann 50  $\mu$ l des Antikörper-Bead-Komplexes (gut gevortext) gegeben und ÜN bei 4°C drehend inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Präzipitat zweimal mit frischem 1% Triton X 100-TBS mit Inhibitoren für 10 min auf Eis gewaschen. Nachdem die Beads abzentrifugiert worden sind wurde der Waschpuffer vorsichtig und

vollständig abgezogen, so dass nur noch das Präzipitat im Reaktionsgefäß war. Das Präzipitat wurde dann mit 20 µl 2x Samplesolution versetzt und für 10 min bei 100°C aufgeköcht. Danach wurden 5-10 µl (gut gevortexed) auf ein PAA-Gel aufgetragen.

## **4.2.8 Probenpräparation für quantitative Real Time PCR**

### **4.2.8.1 RNA-Mini-Präparation**

1x10<sup>6</sup> infiziert THP-1 Makrophagen wurden mit PBS gewaschen und für 5 min bei 450 g zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 350 µl RLT-Puffer (mit 1% beta-Mercaptoethanol) resuspendiert. Das Zelllysat wurde in QIAshredder Tubes überführt und bei 14000 rpm für 2 min zentrifugiert. Sofort danach wurde 350 µl eiskaltes 70% Ethanol (RNase frei) zugegeben und gemischt. Dann folgt die RNA Präparation nach RNeasy Mini-Kit Instruktionen. Im letzten Schritt wird die RNA mit 30 µl DEPC-Wasser eluiert. Schließlich wurde die RNA-Konzentration mittels Nano Drop ermittelt.

### **4.2.8.2 RNA-Umschrieb in cDNA**

Die RNA wird mittels QuantiTec-Kit (Qiagen) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 500 ng RNA in 12 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und 2 µl g-Wipeout-Puffer (7x) zugegeben. Der Ansatz wurde für 5 min bei 42°C inkubiert. Zu der nun DNA-freien RNA wurden jetzt 6 µl von dem RT-Mix zugegeben:

RT-Mix:

QuantiTec Reverse Transkriptase	1 µl
Puffer (5x)	4 µl
Primer Mix	1 µl
	∑ 6 µl

Die Probe wurde für 30 min bei 42°C inkubiert. Nach dem Umschrieb wurde die Probe zum Deaktivieren der Enzyme für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend

wurde die Konzentration der cDNA ermittelt und konnte dann für die quantitative RT-PCR verwendet werden.

#### 4.2.8.3 Quantitative Real Time PCR

Bevor die Proben für die quantitative Real Time PCR verwendet worden sind, wurde die Funktionalität der Primer zuerst vorab mittels normaler PCR analysiert:

cDNA	1 µl
fwd Primer [10 µM]	1 µl
rev Primer [10 µM]	1 µl
10x Thermopol Puffer	2 µl
dNTPs [4mM]	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	13,5 µl
	Σ 20 µl

PCR-Programm:	1 min	95°C	} 35 x
	30 sec	56°C	
	30 sec	72°C	

Da es sich bei den PCR-Fragmenten um sehr kleine Produkte handelte (<200 bp) wurden die Fragmente nicht auf einem Agarosegel, sondern auf einem Acrylamidgel aufgetrennt:

12%-iges Acrylamid-Gel:	1,5 ml TAE (10x)
	6 ml Acrylamid 30%
	7,5 ml autoklaviertes H <sub>2</sub> O
	18 µl Temed
	125 µl APS (10%)

Die Fragmente wurden im Gel für ca. 1 1/2 h bei 140 V in 1x TAE aufgetrennt und anschließend im Ethidiumbromidbad gefärbt. Wenn das PCR-Produkt auf der gewünschten Höhe gelaufen ist, wurden die cDNA-Proben für die quantitative real Time PCR nach folgendem Pippetierschema zusammen gemischt und bei folgendem Programm laufen gelassen:

SYBR Green (ABgene)	10 µl
Primer fwd [5 µM]	1 µl
Primer rev [5 µM]	1 µl
cDNA [4 µg]*	4 µl
H <sub>2</sub> O	4 µl
	Σ20µl

\* 4 µg nur bei QuantiTec Kit

	Cycles	Analysis Mode	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*
Denaturation	1	None	95	15	2.00	0	0.0	0	None
Amplification	40-55	Quati- fication	95	15	20.00	0	0.0	0	None
			56	20	20.00	0	0.0	0	None
			72	20	20.00	0	0.0	0	Single
Melting Curve	1	Melting Curve	95	0	20.00	0	0.0	1	None
			60	1:00	20.00	0	0.0	1	None
			95	0	0.10	0	0.0	80	Cont
Cooling	1	None	40	30	20.00	0	0.0	0	None

1\* Target Temperature (°C), 2\* Incubation Time (hrs:min:sec), 3\* Temperature Transition Rate (°C/sec), 4\* Secondary Target Temperature (°C), 5\* Step Size (°C), 6\* Step Delay (cycles), 7\* Aquisition Mode

#### 4.2.9 RNAi

Dendritische Zellen wurden an Tag 5 geerntet und  $1 \times 10^6$  Zellen pro 100  $\mu$ l RPMI angesetzt. Diese 100  $\mu$ l wurden in eine sterile 4 mm Elektroporationsküvette pipettiert. Erst kurz vor der Elektroporation wurde 6,6  $\mu$ l von der siRNA [20 mmol] zu den Zellen gegeben. Die Zellen werden für 10 msec bei 340 V elektroporiert und anschließend 15 min bei RT stehen gelassen. Danach wurden die Zellen in 2 ml RPMI mit 10% FCS/IL4/GMCSF/Gentamicin wieder in Kultur genommen. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden die Zellen mit dem Zellschaber geerntet und die RNA wie unter 4.2.8 beschrieben präpariert.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Meningokokkenkapsel und Zytokinexpression

#### 5.1.1 Einfluss der Meningokokkenkapsel auf die Zytokinsekretion

Infektionsversuche haben gezeigt, dass die Expression einer Polysaccharidkapsel bei Meningokokken vor Erkennung und Phagozytose durch Dendritischen Zellen (DZ) schützt (Kurzai *et al.*, 2005; Unkmeir *et al.*, 2002). Um zu untersuchen, ob der Kapselstatus auch einen Einfluss auf die Zytokinproduktion hat, wurden Infektionsversuche mit dem Stamm MC58 der Serogruppe B und dem Stamm 2120 der Serogruppe C sowie deren isogenen Kapselmutanten MC58 $\Delta$ *siaD* und 2120 $\Delta$ *siaD* durchgeführt. DZ wurden mit einer MOI von 10 infiziert, nach 3 h Infektion wurde Gentamicin hinzugegeben, nach weiteren 21 h wurden die Zytokinüberstände abgenommen und mittels ELISA analysiert. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Kapselexpression einen signifikanten Einfluss auf die Zytokinproduktion hat. Der bekapselte Serogruppe B Stamm MC58 induzierte bei DZ im Schnitt 116 ng/ml (+/- 64) TNF- $\alpha$ , wohingegen sich die Zytokininduktion durch DZ nach Infektion mit MC58 $\Delta$ *siaD* auf 223 ng/ml (+/- 104) TNF- $\alpha$  erhöht. Der bekapselte Serogruppe C induzierte 67 ng/ml (+/- 13) TNF- $\alpha$  und der unbekapselte Stamm 268 ng/ml (+/- 48) TNF- $\alpha$  (Abb. 1 A). Die IL-8 Induktion durch DZ nach Kontakt mit MC58 liegt im Schnitt bei 154 ng/ml (+/- 35) und die isogene Kapselmutante induziert 208 ng/ml (+/- 49) IL-8. 2120 induzierte 137 ng/ml (+/- 20) und der isogene unbekapselte Stamm 208 ng/ml (+/- 35) IL-8 (Abb.1B). Die Kapselexpression der Meningokokken hat daher eine signifikante Reduktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-8 durch humane DZ zur Folge.

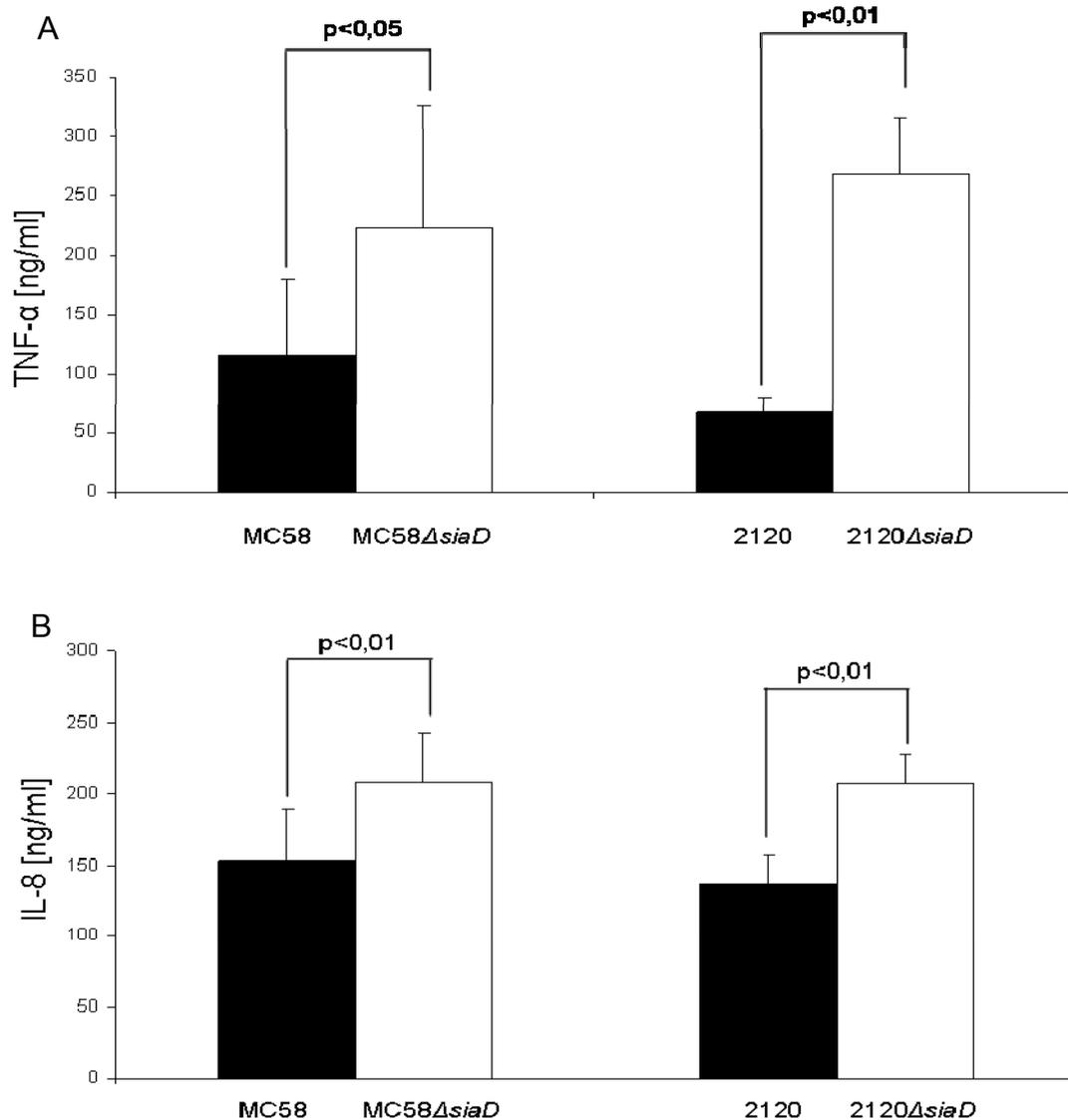


Abb. 1 TNF- $\alpha$  (A) und IL-8 (B) Induktion durch DZ, die mit Meningokokken der Serogruppe B (MC58) oder C (2120) und deren isogene kapseldefizienten Mutanten ( $\Delta$ siaD) infiziert worden sind. Die unbekapselten Stämme (weiß) induziert signifikant mehr Zytokine als der bekapselte Wildtyp (schwarz). Die Daten sind aus mindestens drei unterschiedlichen Spendern ermittelt.

### 5.1.2 Einfluss von $\alpha$ -2,8 Polysialinsäure auf die Zytokinexpression

Die Kapselexpression führt zur signifikanten Reduktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-8 durch humane DZ. Um zu überprüfen, ob der Kapselbestandteil  $\alpha$ -2,8 Polysialinsäure der Serogruppe B selbst für die Reduktion der Zytokinproduktion verantwortlich ist, wurden DZ mit  $\alpha$ -2,8 Polysialinsäure (Colominsäure) und dem unbekapselten B-Stamm

MC58 $\Delta$ *siaD* inkubiert. Nach 24 h wurden die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-1 analysiert. Die Inkubation mit dem unbekapselten Stamm f"uhrt in Anwesenheit von Colomins"ure zur selben Zytokininduktion wie bei der unbekapselten Form ohne Zus"atze (Abb. 2). Da nicht die chemische Komponente f"ur die Reduktion der Zytokinproduktion verantwortlich ist, weisen die Daten darauf hin, dass die anti-phagozytotischen Eigenschaften f"ur die Reduktion der Zytokinproduktion verantwortlich sind.

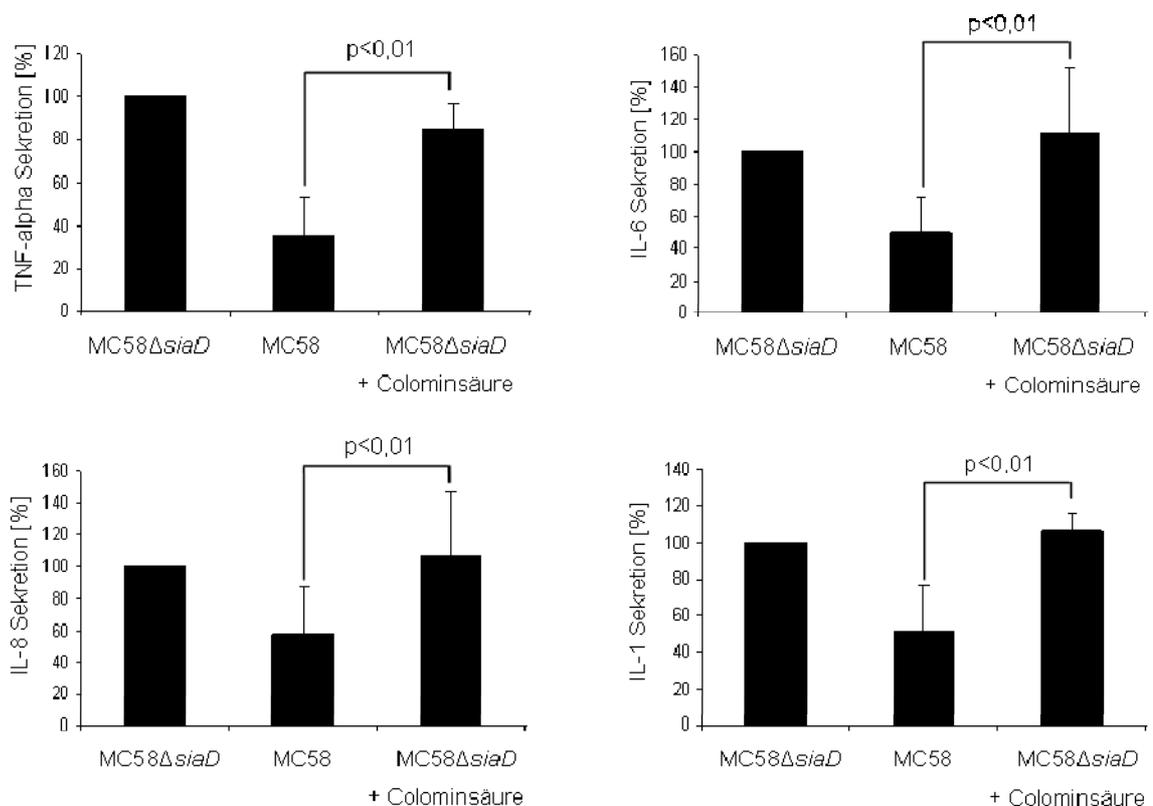


Abb. 2 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-1 Produktion von DZ aus mindestens drei verschiedenen Spendern nach Kontakt mit dem Serogruppe B Stamm MC58 und dessen unbekapselte Mutante MC58 $\Delta$ *siaD* in Anwesenheit von Colomins"ure. Die Colomins"ure f"uhrt zu keiner Reduktion der Zytokinproduktion durch DZ nach Kontakt mit MC58 $\Delta$ *siaD*.

## 5.2 Kapsel-Modifikation: O-Acetylierung

Meningokokkenst"amme der Serogruppe C, W-135 und Y exprimieren eine Kapsel, die phasenvariabel O-acetyliert sein kann. Der O-Acetylierungsstatus der Kapsel hat einen Einfluss auf die humorale Immunantwort (Fusco *et al.*,

2007) (Richmond *et al.*, 2001). Um zu untersuchen, ob der Acetylierungsstatus einen Einfluss auf die zelluläre Interaktion hat, wurden mit O-acetylierten und nicht-O-acetylierten Stämmen der Serogruppe C, W-135 und Y Infektionsversuche durchgeführt, Zytokinüberstände überprüft und der Reifungsstatus von DZ nach Kontakt mit diesen Stämmen ermittelt.

### 5.2.1 Einfluss der Kapsel-Acetylierung auf die Erkennung durch DZ

Von Serogruppe C, W-135 und Y wurden bekapselte O-Acetyltransferase-Deletionsmutanten von Stamm 2120 (Serogruppe C), 2144 (Serogruppe W-135) und 172 (Serogruppe Y) in Infektionsversuchen getestet. Dazu wurden DZ mit einer MOI von 10 dieser Stämme für 3 h infiziert. Die Quantifizierung der assoziierten Bakterien fand mittels Ausplattierung von Verdünnungsreihen statt. Wie bei bekapselten Stämmen zu erwarten, war die Zellassoziation sehr gering und es konnte kein Unterschied zwischen den Stämmen ohne O-Acetyltransferase und den Parentalstämmen der einzelnen Serogruppen beobachtet werden (Abb.3). Unabhängig vom Acetylierungsstatus verhinderte die Kapsel von Serogruppe C, W-135 und Y die Erkennung durch DZ.

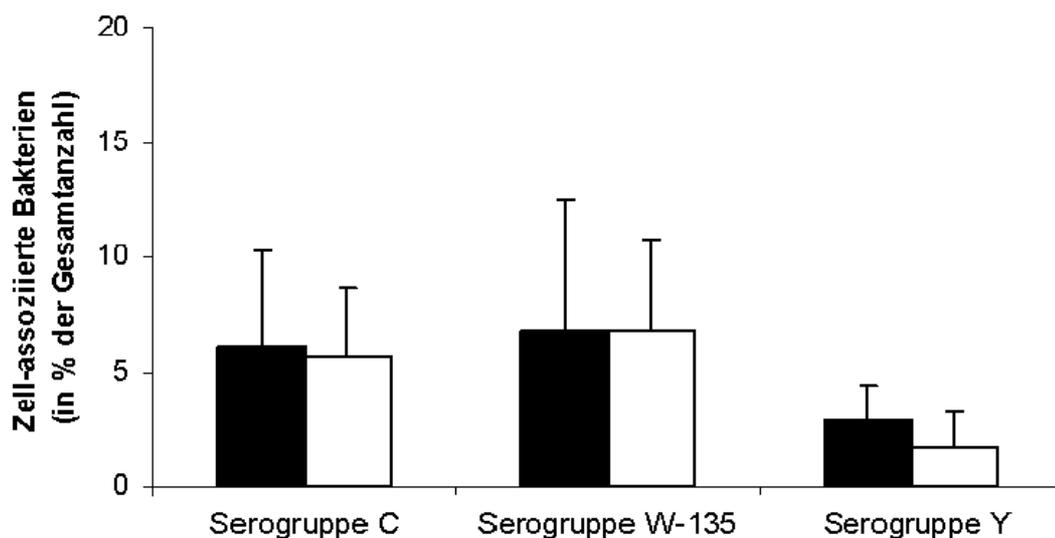


Abb. 3 Infektionsversuche mit DZ von Serogruppe C, W-135 und Y mit O-acetylierter Kapsel (schwarze Balken) und die jeweiligen O-Acetyltransferase-Deletionsmutanten (weiße Balken). Die Daten wurden aus mindestens drei verschiedenen Experimenten ermittelt. Es ist kein Unterschied zwischen den Mutanten und den Parentalstämmen zu sehen.

## 5.2.2 Adhärenznachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie

Da im Ausplattierungsassay nur lebende Bakterien nachgewiesen werden konnten, wurden zur Überprüfung Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen getätigt. Dazu wurden die jeweiligen Meningokokkenstämme mit GFP transformiert und mit humanen DZ inkubiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von DZ, die mit Kapsel-acetylierten (*oat+*) und nicht-acetylierten Stämmen ( $\Delta oat$ ) der Serogruppe C, W-135 und Y infiziert worden sind bestätigen, dass es keinen Unterschied zwischen den O-acetylierten Stämmen und den nicht-O-acetylierten Stämmen gibt. Nur wenige Bakterien konnten an den DZ detektiert werden (Abb. 4).

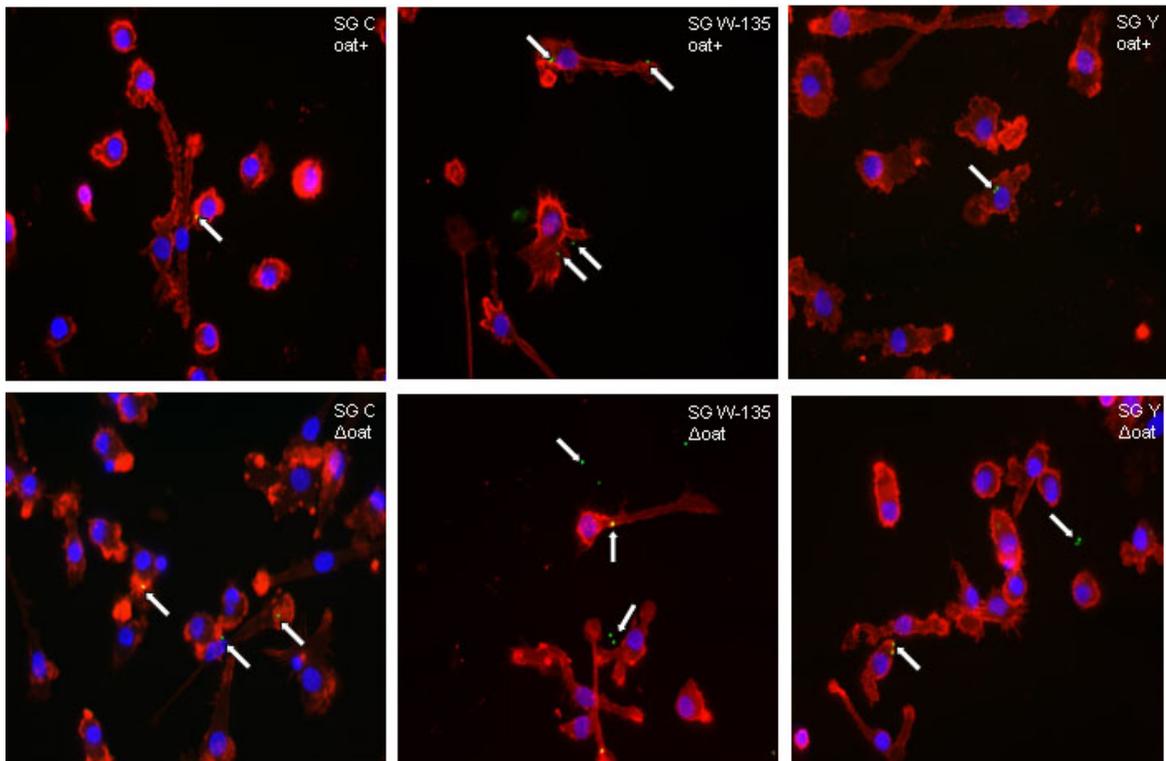


Abb. 4 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (40x) von DZ infiziert mit Serogruppe C, W-135, Y (*oat+*) und deren isogenen O-Acetyltransferase-Mutanten ( $\Delta oat$ ). Die weißen Pfeile zeigen GFP-transformierte Meningokokken (grün). Das Actin-Filament ist mit Alexa Fluor 568 Phalloidin rot und der Zellkern ist mit DAPI blau gefärbt.

### 5.2.3 Einfluss der Kapsel-Acetylierung auf die Phagozytose durch DZ

Die Meningokokkenkapsel schützt vor Phagozytose. Um abzuschätzen, wie viele Meningokokken von DZ phagozytiert werden, wurden Infektionsversuche mit den O-Acetyltransferase-Mutanten von Serogruppe C, W-135 und Y und den entsprechenden Wildtyp-Stämmen durchgeführt. Dazu wurden nach 4 h die extrazellulären Bakterien für 1 h mit Gentamicin abgetötet. Nach anschließender Permeabilisierung der DZ konnten die lebenden, intrazellulären Bakterien ausplattiert und ausgezählt werden. Alle Stämme wurden nur in geringem Maße von den DZ phagozytiert. Auch hier konnte kein Unterschied zwischen den Mutanten und den Parentalstämmen detektiert werden. Folglich beeinflusst der Kapselacetylierungsstatus nicht die protektive Rolle des Kapselpolysaccharids gegenüber der Phagozytose von Meningokokken durch humane DZ.

Die Zuckerkette des Meningokokken-LPS variiert auf Grund von natürlich vorkommender Phasenvariation durch slipped-stand mispairing oder durch verschiedene genetische Zusammensetzungen der Glycosyltransferasen. Diese unterschiedlichen Isotypen haben großen Einfluss auf die Erkennung durch DZ bei unbekapseltem Hintergrund. Die Trunkierung der LPS  $\alpha$ -Kette erhöht die Adhärenz an DZ. Diese verstärkte Erkennung von Bakterien mit trunkiertem LPS kann über die Kapselexpression verhindert werden. Um zu überprüfen, ob dies abhängig vom Kapselacetylierungsstatus ist, wurde eine Deletion in *pgm*, codierend für Phosphoglucomutase, in O-Acetyltransferase Mutanten der Serogruppe C, W-135 und Y eingeführt. Die Trunkierung des LPS wurde mittels Tricin-Gel bestätigt. Die Quantifizierung von phagozytierten Bakterien ergab, dass die Kapselexpression die Aufnahme von *N. meningitidis* verhinderte, unabhängig vom Acetylierungsstatus und der Gegenwart von trunkiertem LPS (Daten nicht gezeigt).

## 5.2.4 Einfluss der Kapsel-Acetylierung auf die Zytokinproduktion von DZ

Die Expression der Kapsel führt zu einer signifikanten Reduktion der Zytokinproduktion durch humane DZ verglichen mit isogenen Kapselmutanten. Um zu überprüfen, ob der Kapselacetylierungsstatus Einfluss auf die Zytokinsekretion von DZ hat, wurden Zytokinüberstände von DZ generiert. Dazu wurden DZ mit acetylierten und nicht-acetylierten Serogruppe C, W-135 und Y Stämmen und Doppelmutanten, die ein trunkiertes LPS und keine acetylierte Kapsel haben, infiziert. Mittels Luminex-Technologie wurden die Zytokinkonzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 quantifiziert. Alle getesteten Stämme induzierten identische Zytokinlevel. Dieses Zytokinprofil wurde durch TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 dominiert und IL-1 wurde nur in geringen Mengen sezerniert (Abb. 5). Weder die Kapselacetylierung noch die gleichzeitige Trunkierung vom LPS änderten das Zytokinmuster. IL-10 wurde bei allen Ansätzen nur in geringen Konzentrationen entsprechend der Erwartung detektiert.

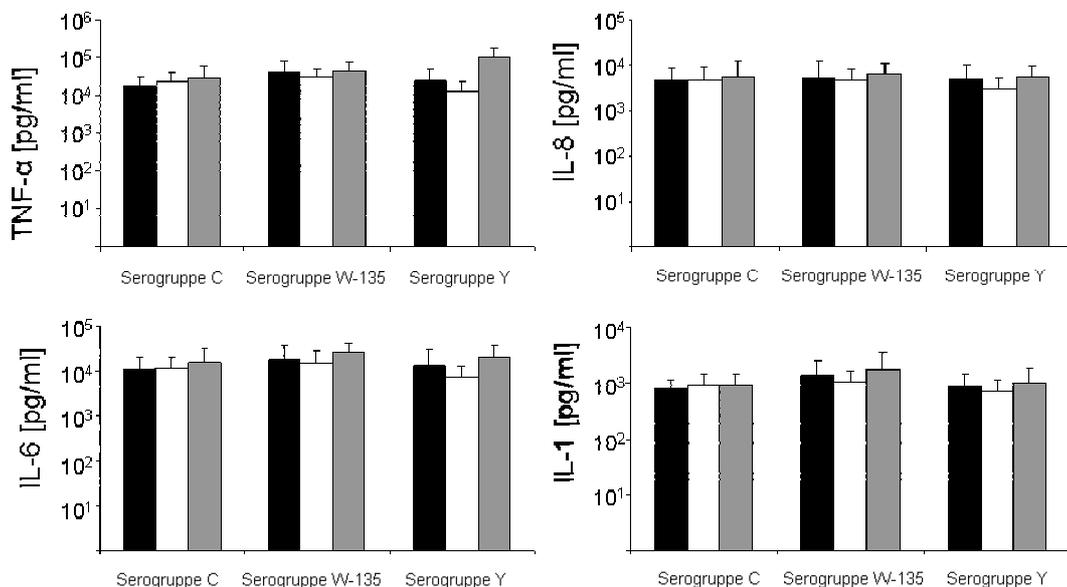


Abb. 5 TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6 und IL-1 produziert von DZ nach Infektion mit verschiedenen Meningokokkenstämmen: Wildtyp mit O-acetylierter Kapsel (schwarz), O-Acetyl-Kapsel Mutante (weiß), Doppelmutante ohne O-acetylierter Kapsel und trunkiertem LPS (grau). Zytokinprofil ist aus mindestens drei verschiedenen Experimenten zusammengestellt.

### 5.2.5 Einfluss der Kapsel-Acetylierung auf die Ausreifung von DZ

Nach Kontakt von Meningokokken mit humanen DZ kommt es zur Ausreifung der DZ. Dies lässt sich anhand von differentiell regulierten Oberflächenmarkern nachweisen (Banchereau & Steinman, 1998). Um zu überprüfen, ob der Kapsel-acetylierungsstatus den Reifungsprozess von humanen DZ nach Kontakt mit Meningokokken beeinflusst, wurden DZ mit den Wildtyp-Stämmen und den O-Acetyltransferase-Mutanten von Serogruppe C, W-135 und Y infiziert, und nach 24 h wurden die Oberflächenmarker mittels FACS analysiert. Sowohl Stämme mit acetylierter als auch Stämme mit nicht-acetylierter Kapsel induzierten die Ausreifung von DZ. Es konnte kein unterschiedlicher Effekt auf die Regulation der Oberflächenmarker von DZ festgestellt werden. CD 40, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR wurden durch beide Varianten stark nach oben reguliert und CD25 wurde nur leicht hochreguliert. Dies ist ein Zeichen für die phänotypische Reifung der DZ. CD1a wurde herunter reguliert und CD14 zeigte keine Veränderungen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (Abb. 6). Alle Stämme induzierten gleichermaßen eine phänotypische Ausreifung der DZ.

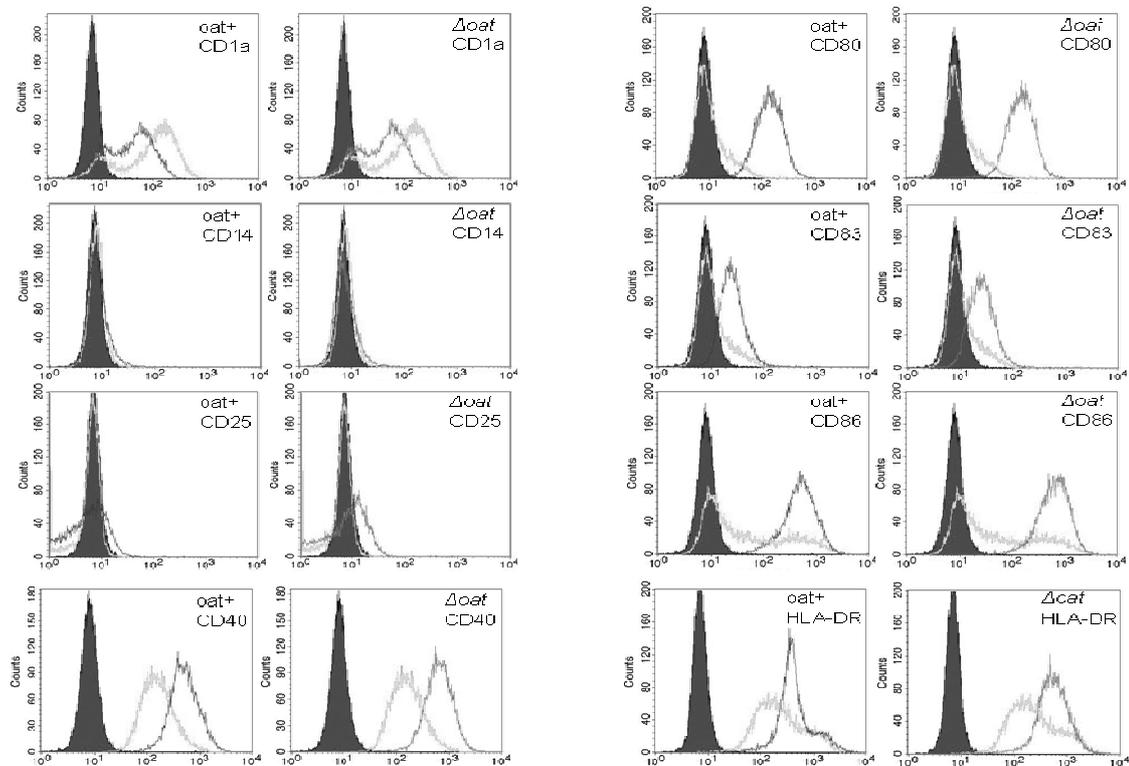


Abb. 6 FACS-Daten exemplarisch für Serogruppe C dargestellt. Die dunkle Linie zeigt die infizierten Zellen und die helle Linie die nicht infizierten DZ. Die rechte Spalte zeigt den Wildtyp mit O-Acetylierter Kapsel (oat+), die linke Spalte die der de-O-Acetylierte-Mutante ( $\Delta$ oat). Es ist kein Unterschied bei der Ausreifung von DZ nach Kontakt mit O-acetylierten oder de-O-acetylierten Stämmen zu erkennen.

## 5.3 Sonderfall $\alpha$ 14

### 5.3.1 Infektionsversuche mit $\alpha$ 14

Kurzai *et al.* haben gezeigt, dass der bekapselte hypovirulente Stamm MC58 der Serogruppe B kaum von DZ erkannt und phagozytiert wird. Das Ausschalten der Kapsel führte zu einer stärkern Adhärenz und Phagozytose durch DZ als beim bekapselten Stamm. Dieser Effekt wird durch Verkürzung des LPS ( $\Delta lgtA$ ) gesteigert (Kurzai *et al.*, 2005) (Abb. 7). Diese Daten wurden mit Elektronenmikroskopie-Aufnahmen bestätigt.

$\alpha$  14 ist ein Kapsel-Null-Lokus (cni) Stamm isoliert bei der bayerischen Trägerstudie (Claus *et al.*, 2005). Obwohl dieser Stamm unbekapselt ist, wird er von DZ schlecht erkannt und phagozytiert, d.h. er verhält sich in Infektionsversuchen wie ein bekapselter Stamm. Auch die Verkürzung des LPS bei diesem Stamm durch Deletion von *lgtA* führt nach 3 h Infektion ebenfalls zu keiner gesteigerten Erkennung und Phagozytose durch DZ (Abb. 7).

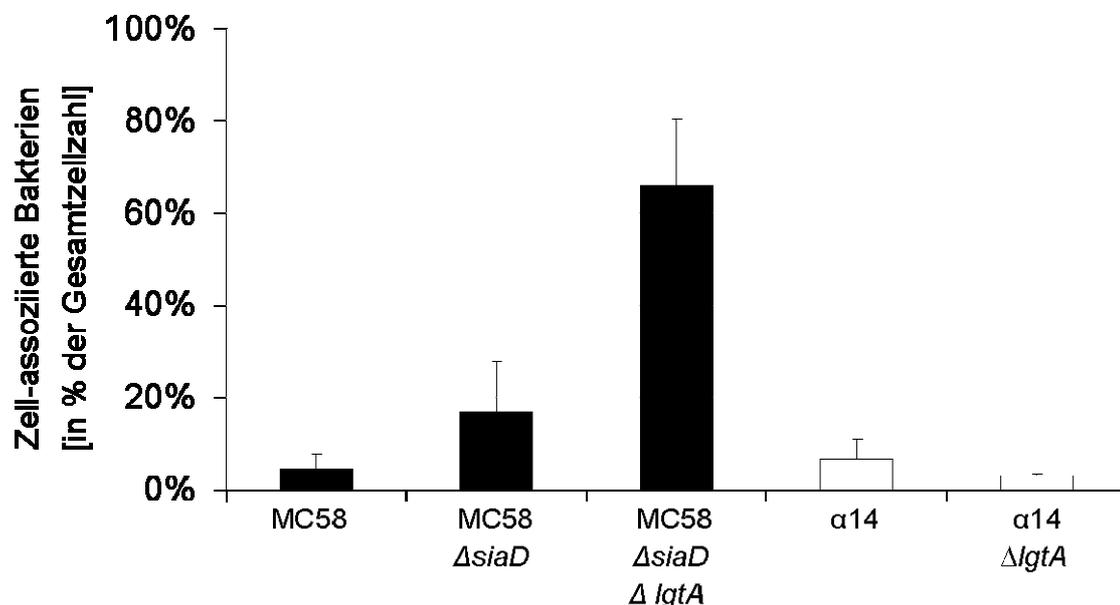
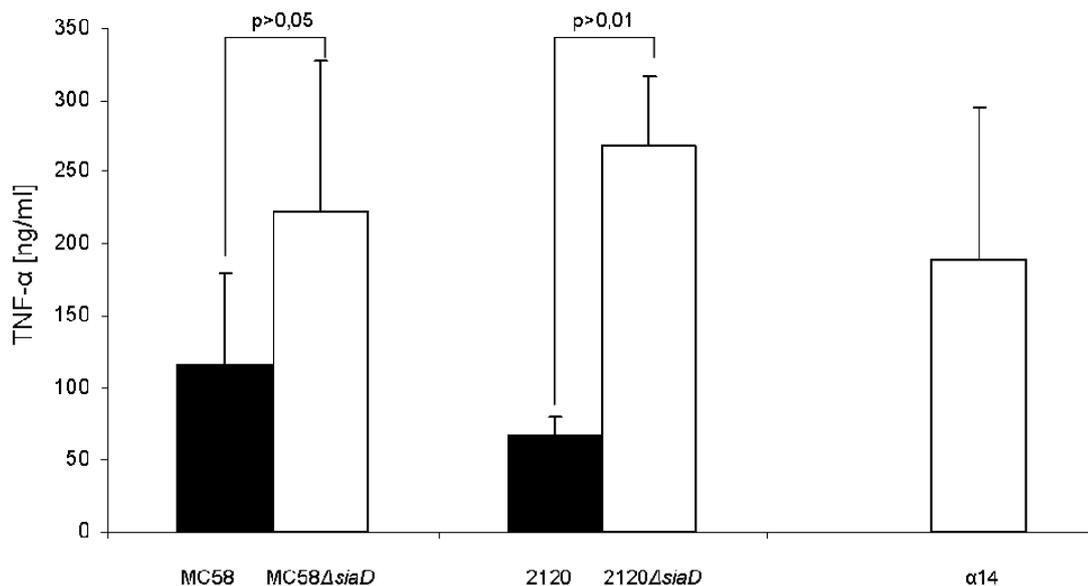


Abb. 7 Infektionsversuche mit DZ von MC58 (schwarze Balken) und  $\alpha$  14 (weiße Balken). Die Daten wurden aus mindestens drei verschiedenen Experimenten ermittelt. Das Fehlen der Kapsel (MC58 $\Delta siaD$ ) und die Trunkierung des LPS (MC58 $\Delta siaD \Delta lgtA$ ) haben bei MC58 eine gesteigerte Adhärenz an DZ zur Folge. Bei  $\alpha$  14 hat die Trunkierung des LPS ( $\alpha$  14  $\Delta lgtA$ ) nicht diesen Effekt.

### 5.3.2 Zytokininduktion durch $\alpha$ 14

Bisherige Daten zeigten, dass die antiphagozytotischen Eigenschaften der Kapsel für die verminderte Zytokininduktion verantwortlich sind. Um zu überprüfen, ob dies auch bei dem *cnI*-Stamm  $\alpha$  14 der Fall ist, da dieser Stamm, obwohl er unbekapselt ist, schlecht von DZ erkannt und phagozytiert wird, wurden DZ mit  $\alpha$  14 infiziert und die Zytokininduktion analysiert. Interessanterweise induziert dieser Stamm genauso viel TNF- $\alpha$  (Abb. 8 A) und IL-8 (Abb. 8 B) wie andere unbekapselte Stämme. Diesen Daten stehen im Widerspruch zu der Annahme, dass die antiphagozytotischen Eigenschaften der Kapsel für die verminderte Zytokinproduktion verantwortlich sind.

(A)



(B)

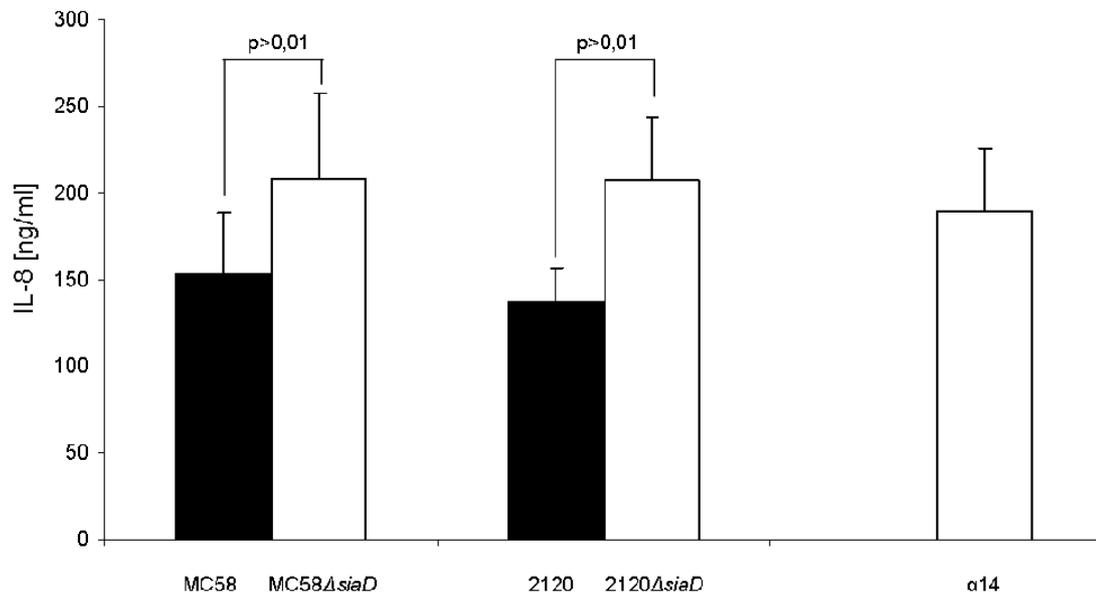


Abb. 8 TNF- $\alpha$  (A) und IL-8 (B) Sekretion durch DZ nach Kontakt mit Meningokokken. Die unbekapselten Stämme  $\alpha$  14, MC58 $\Delta$ siaD und 2120 $\Delta$ siaD (weiß) induzieren mehr TNF- $\alpha$  und IL-8 als die bekapselten Serogruppe B (MC58) bzw. C (2120) Stämme (schwarz). Obwohl  $\alpha$  14, genauso wie bekapselte Stämme kaum von DZ erkannt und phagozytiert wird, induziert dieser Stamm genauso viel Zytokine wie die unbekapselten Stämme. Die Ergebnisse wurden aus mindestens drei verschiedenen Spendern ermittelt.

#### 5.4 Microarray-Analyse des Zytokin-Transkriptionsprofils von DZ nach Kontakt mit Meningokokken

Bisherige Daten zeigten, dass bekapselte Meningokokken, unabhängig vom Acetylierungsstatus der Kapsel, signifikant weniger Zytokine induzieren als deren unbekapselten isogene Mutantenstämme. Infektionsversuche zeigten, dass die bekapselten Stämme sowie der unbekapselte Stamm  $\alpha$  14 sehr schlecht von DZ erkannt werden. Um festzustellen, welchen Einfluss diese Stämme auf das Transkriptionsprofil von DZ haben, wurde die Microarray-Methode zur Bestimmung der differentiellen Regulation von 100 Zytokinen (Oligo GEArray Human Common Cytokines von Superarray) gespottet auf Amino Sildes (Quantifoil von Peqlab) verwendet. Dazu wurden DZ mit den Stämmen MC58, MC58 $\Delta$ siaD oder  $\alpha$  14 für vier oder 18 h infiziert, da kinetische Analysen ergeben haben, dass es nach Infektion von DZ nach vier, 12 und 18

---

Stunden zu einer gesteigerten Expression des Zytokintranskripts kommt (Huang et al., 2001).

Von sechs verschiedenen Versuchsansätzen pro Zeitpunkt wurde die RNA aus infizierten und nicht-infizierten DZ präpariert. Nach photometrischer und visueller Überprüfung der Qualität und Quantität der RNA wurden identische Mengen von nicht infizierten und infizierten DZ mit zwei verschiedenen Farbstoffen (Cy3/Cy5) markiert und zu cDNA umgeschrieben. Mittels kompetitiver Hybridisierung von Cy3/Cy5-gelabelter cDNA auf Aminoligosilica wurden die Transkriptionsprofile verglichen. Außerdem wurden die Hybridisierungsexperimente jeweils mit einem Austausch der Farbstoffe während der Markierungsreaktion durchgeführt. Die Zytokine, die in mindestens vier Experimenten einen Regulationsfaktor  $>1,8$  oder  $<0,5$  aufwiesen, wurden als differentiell reguliert betrachtet. Zytokine die in vier oder fünf Experimenten eine differentielle Regulation zeigten, wurden mit einem + bewertet. Bis maximal +++ wurde das Transkriptionsprofil von Zytokinen bewertet wenn in allen Experimenten (bis auf 1 oder 2 Ausnahmen) eine differentielle Regulation nachgewiesen werden konnte. Zytokine, die zwischen sechs- und 10-mal differentielle reguliert waren wurden mit ++ bewertet.

Nach vier Stunden Infektion mit den drei Stämmen war der Zytokinlevel der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1  $\alpha/\beta$ , IL-6 und IL-8 identisch. TNF- $\alpha$  und IL-8 wurden stärker hochreguliert als IL-1 und IL-6. Neben der Hochregulation der proinflammatorischen Zytokine, induzierte nur der unbekapselte Stamm MC58 $\Delta$ *siaD* weitere differentielle regulierte Zytokine. Fünf weitere Zytokine wurden hochreguliert, und zwar die Zytokine IL-19, IL-17, IL-4, IL-12 und IL1F9. Das Zytokin TNFSF13 wurde herunterreguliert (Abb.9). Die Transkriptionsanalyse von DZ nach 18 Stunden Infektion mit MC58, MC58 $\Delta$ *siaD* oder  $\alpha$  14 ergab ein identisches Zytokinprofil induziert durch diese drei Stämme. Zu diesem Zeitpunkt waren wie proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und IL-8 hochreguliert. Des Weiteren waren IL-12 und IL1F9 hochreguliert und TNFSF13 runterreguliert (Abb.9). Die Daten zeigen, dass nach vier Stunden Infektion nur der phagozytierte Stamm MC58 $\Delta$ *siaD* neben den proinflammatorischen Zytokinen noch weitere Zytokine induziert. Nach 18 Stunden Infektion mit MC58, MC58 $\Delta$ *siaD* oder  $\alpha$  14 kommt es zum Angleich des Zytokinprofils. Für den klinischen Verlauf der Meningokokken-Infektion sind

vor allem die proinflammatorischen Zytokine relevant. Das gemessene Expressionsprofil spiegelt die mittels ELISA erhobenen Daten wieder und konnte daher auf Proteinebene bestätigt werden.

	4 h			18 h
	MC58	MC58 $\Delta$ <i>siaD</i>	$\alpha$ 14	MC58/MC58 $\Delta$ <i>siaD</i> / $\alpha$ 14
TNF- $\alpha$	+++	+++	+++	Nd
IL-1 $\alpha/\beta$	++	++	++	+++
IL-6	+	+	+	+++
IL-8	+++	+++	+++	+++
IL-19	Nd	+	Nd	Nd
IL-17	Nd	+	Nd	Nd
IL-4	Nd	++	Nd	Nd
IL-12	Nd	(+)	Nd	++
IL1-F9	Nd	+	Nd	+++
TNFSF13	Nd	-	Nd	--

Abb. 9 Mircoarray-Transkriptomanalyse aus insgesamt 100 getesteten Zytokinen von DZ nach Kontakt mit MC58, MC58 $\Delta$ *siaD* oder  $\alpha$  14. Nach 4 h Infektion wurden die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1  $\alpha/\beta$ , IL-6 und IL-8 durch alle drei Stämme hochreguliert. Nur MC58 $\Delta$ *siaD* regulierte nach 4 h Infektion zusätzliche Zytokintranskripte bei DZ. Die Transkriptionsanalyse von DZ induziert nach 18 h Infektion nach Kontakt mit MC58, MC58 $\Delta$ *siaD* oder  $\alpha$  14, ergab ein identisches Transkriptionsprofil. Nicht detektiert (Nd), + Hochregulierung, - Herunterregulierung

## 5.5 Einfluss der Phagozytose auf die Zytokinproduktion

### 5.5.1 Einfluss der Phagozytose auf die TNF- $\alpha$ Ausschüttung

Die Kapselexpression von Meningokokken verhindert die Phagozytose durch humane DZ. Außerdem kommt es zur verminderten Zytokinproduktion nach Kontakt von bekapselten Meningokokkenstämmen mit DZ im Vergleich zu unbekapselten Stämmen. Um zu überprüfen, ob die Phagozytose für die Zytokinproduktion wichtig ist, wurden DZ vor der Infektion 30 min mit zwei verschiedenen Actin-Filament-Inhibitoren inkubiert: Cytochalasin D [4  $\mu$ g/ml] oder Swinholid A [500 nM]. Diese Inhibitoren verhindern nur die Phagozytose und beeinflussen jedoch nicht die Adhärenz an jeden zellulären Rezeptor. Nach Vorinkubation der DZ mit den Inhibitoren wurden sie mit dem bekapselten

Serogruppe B oder C Stamm, deren isogenen Kapselmutanten oder den Trägerisolaten  $\alpha$  710 und  $\alpha$  14 infiziert. Die Zytokinüberstände wurden 24 h nach Infektion abgenommen und gemessen. Die TNF- $\alpha$  Produktion von DZ nach Kontakt mit Meningokokkenstämmen in Anwesenheit der Phagozytose-Inhibitoren führten bei allen getesteten Stämmen zu einer signifikanten Reduktion ( $p < 0,01$ ). Sowohl Cytochalasin D als auch Swinholid A reduzierten die TNF- $\alpha$  Sekretion signifikant auf ca. 20% der normalerweise induzierten TNF- $\alpha$  Menge (Abb. 10). Der Effekt dieser Phagozytose-Inhibitoren konnte auch für IL-6 und IL-1 gezeigt werden. DZ produzieren nach Infektion mit MC58 $\Delta$ siaD in Gegenwart von Cytochalasin D nur 16% (+/-17) IL-6 und 14% (+/-9) IL-1 (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Phagozytose ein essentielles Ereignis für die TNF- $\alpha$  (und IL-6, IL-1) Produktion von DZ nach Kontakt mit Meningokokken ist. Obwohl man bei den bekapselten Stämmen und auch beim unbekapselten Stamm  $\alpha$  14 davon ausgegangen ist, dass diese Stämme kaum an DZ adhärieren und somit nicht oder kaum phagozytiert werden, scheint die Phagozytose auch bei diesen Stämmen stattzufinden und für die TNF- $\alpha$  Produktion durch DZ bedeutend zu sein.

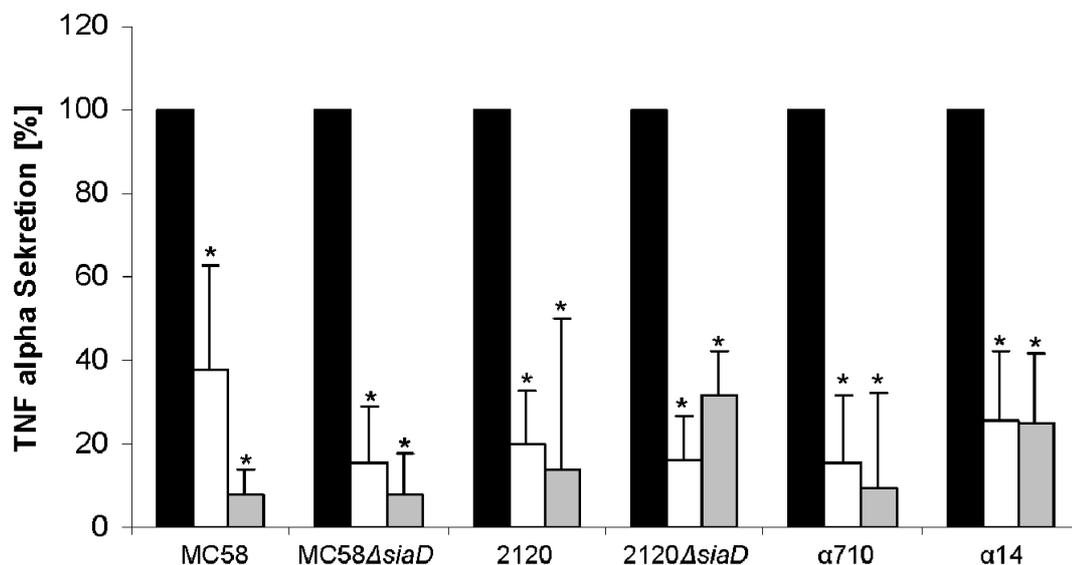


Abb. 10 TNF- $\alpha$  Sekretion von DZ nach Kontakt mit Meningokokken unter Einfluss der Phagozytose-Inhibitoren Swinholid A (weiß) oder Cytochalasin D (grau). Die Darstellung ist jeweils in Relation zum Absolutwert der TNF- $\alpha$  Produktion von DZ ohne Inhibitor (schwarz) berechnet. Das Zytokinprofil wurde aus mindestens drei verschiedenen DZ-Spendern geprüft. Bei allen getesteten Stämmen kommt es in Anwesenheit von Phagozytose-Inhibitoren zu einer signifikanten Reduktion (\*  $p < 0,01$ ) der TNF- $\alpha$  Sekretion von DZ.

### 5.5.2 Einfluss der Phagozytose auf die IL-8 Induktion

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Phagozytose bei DZ essentiell für die TNF- $\alpha$  Produktion ist, wurde überprüft, ob bei DZ auch für die IL-8 Produktion Phagozytose wichtig ist. Dafür wurden DZ ebenfalls mit Cytochalasin D oder Swinholid A 30 min vor Infektion vorinkubiert und anschließend wurden DZ mit den bekapselten Serogruppe B Stämmen MC58 bzw.  $\alpha$ 710 oder dem Serogruppe C Stamm 2120, den Kapselmutanten MC58 $\Delta$ siaD oder 2120 $\Delta$ siaD bzw. dem cni-Stamm  $\alpha$ 14 infiziert. Nach 24 h wurden die Zytokinüberstände mittels ELISA analysiert. Im Gegensatz zur TNF- $\alpha$  Produktion wurde die IL-8 Produktion nicht durch diese beiden Inhibitoren signifikant beeinflusst (Abb. 11). Es kommt zu keiner signifikanten Reduktion der IL-8 Produktion durch DZ in Anwesenheit der Phagozytose-Inhibitoren nach Infektion mit allen getesteten Stämmen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass DZ nach Infektion mit Meningokokken für die IL-8 Produktion keine Phagozytose benötigen.

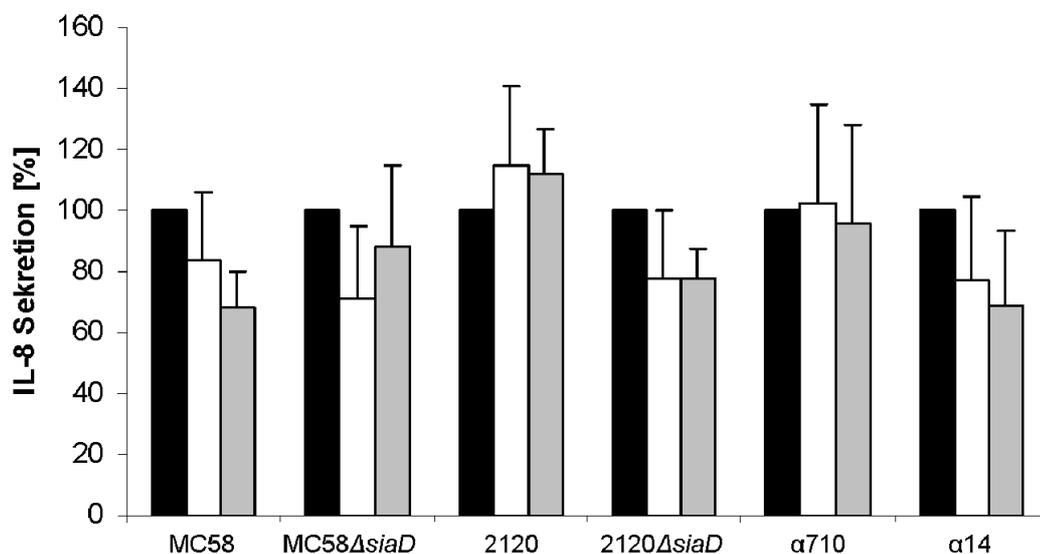


Abb. 11 IL-8 Sekretion von DZ nach Kontakt mit Meningokokken unter Einfluss der Phagozytose-Inhibitoren Swinholid A (weiß) und Cytochalasin D (grau). Das Zytokinprofil wurde aus mindestens drei verschiedenen DZ-Spendern ermittelt. Schwarze Balken stellen den Absolutwert der IL-8 Sekretion von DZ ohne Inhibitor dar. Es kommt nach Kontakt von DZ mit den getesteten Meningokokkenstämmen zur keiner signifikanten Minderung der IL-8 Sekretion in Anwesenheit von Phagozytose-Inhibitoren. Folglich ist die Phagozytose von Meningokokken durch DZ keine Bedingung für die Induktion von der IL-8 Sekretion.

## 5.6 Scavenger Rezeptor

Kurzai *et al.* haben gezeigt, dass der Scavenger Rezeptor Klasse A (SR-A) der Hauptrezeptor für die Phagozytose von MC58 $\Delta$ *siaD* durch humane DZ ist. Um zu überprüfen, ob der Kontakt mit Meningokokken Einfluss auf diesen Rezeptor hat, wurden Transkriptionsanalysen durchgeführt und die Proteinregulation überprüft. Darüber hinaus wurde ein möglicher Einfluss von SR-A auf die Zytokinproduktion nach Kontakt mit Meningokokken untersucht.

### 5.6.1 Nachweis von SR-A bei DZ infiziert mit MC58 $\Delta$ *siaD*

Bisherige Ergebnisse haben gezeigt, dass der Meningokokkenstamm MC58 $\Delta$ *siaD* vom SR-A der DZ erkannt wird (Kurzai *et al.*, 2005) (Peiser *et al.*, 2002). Um visuell zu veranschaulichen, dass es bei der Infektion von DZ mit MC58 $\Delta$ *siaD* zu einer Co-Lokalisation des SR-A kommt, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Dazu wurde eine spezielle Präparation gewählt, bei der der SR-A auch intrazellulär detektiert werden kann, indem ultrakleine Goldpartikel den Rezeptor markieren, und anschließend die Goldpartikel durch verwenden einer Entwicklerlösung das Signal verstärken. Hier konnte gezeigt werden, dass MC58 $\Delta$ *siaD* nach 3 h von DZ über Dendriten (Abb.12 B) in Phagosomen (Abb. 12 A) aufgenommen wurden, und dass in diesen Dendriten und Phagosomen auch der SR-A auch vorhanden ist.

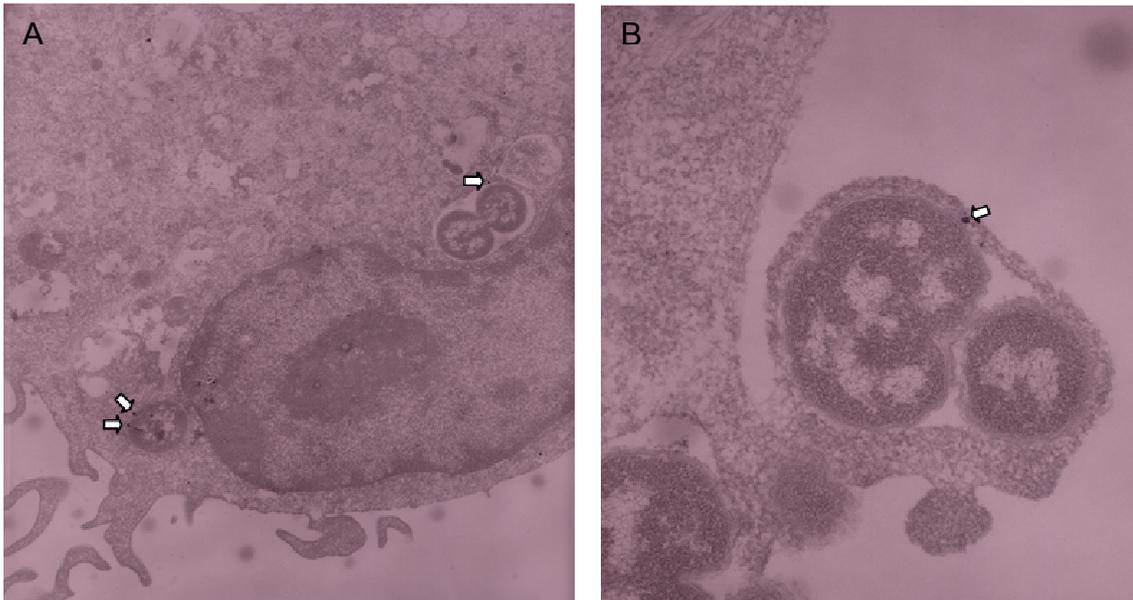


Abb. 12 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von DZ nach 3 h Infektion mit MC58 $\Delta$ siaD. Weiße Pfeile zeigen die Goldfärbung von SR-A. (A) MC58 $\Delta$ siaD intrazellulär in Vakuolen von DZ bei 12.500-facher Vergrößerung. (B) Meningokokken umschlungen von Dendriten bei 40.000-facher Vergrößerung.

### 5.6.2 Transkriptionsprofil von SR-A nach Infektion mit *N. meningitidis*

Józefowski *et al.* haben gezeigt, dass es nach Stimulation von J774-Zellen mit LPS zur Herunterregulierung des SR-A kommt (Jozefowski et al., 2005). Um zu überprüfen, ob sich nach Infektion von DZ mit Meningokokken das Transkriptionsprofil von SR-A ändert, wurden THP-1 Makrophagen für 30 min, 90 min, 4 h, 8 h, und 12 h mit MC58, MC58 $\Delta$ siaD, 2120, 2120 $\Delta$ siaD oder  $\alpha$  14 inkubiert. Da DZ und Makrophagen viele Ähnlichkeiten haben und man für diesen Versuchsansatz sehr viele Zellen benötigt, wurden die Experimente mit der Zelllinie THP-1 durchgeführt. Nach Infektion der THP-1 Makrophagen wurde die RNA von den infizierten Zellen isoliert und mittels Real-Time-PCR wurde die Regulation auf mRNA Ebene überprüft. Die Primer wurden so gewählt, dass alle drei Splice-Varianten des SR-A detektiert werden konnten. Innerhalb der gewählten Zeiten konnte keine differentielle Regulation nachgewiesen werden. Es konnten nur geringfügige Abweichungen verzeichnet werden, die den normalen Schwankungen unterliegen (Abb.13).

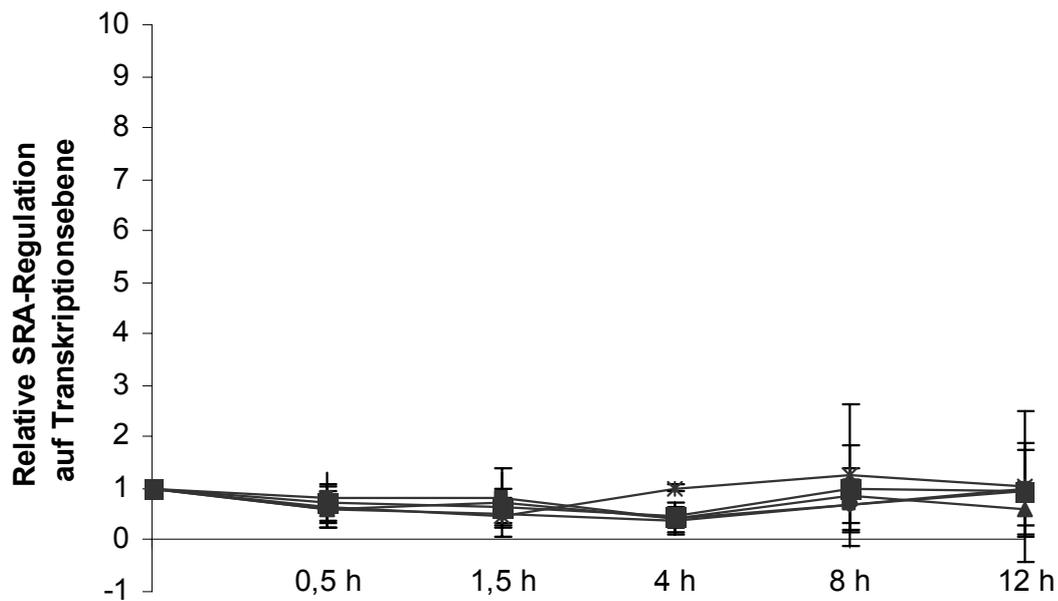


Abb. 13 Relative Regulation des Scavenger Rezeptors auf Transkriptionsebene bei Makrophagen von drei verschiedenen Experimenten zusammengestellt. Bei Makrophagen wird der SR-A nach Kontakt mit MC58, MC58 $\Delta$ siaD, 2120, 2120 $\Delta$ siaD oder  $\alpha$  14 nicht differentiell reguliert.

### 5.6.3 Regulation von SR-A nach Infektion mit *N. meningitidis* auf Proteinebene

Nachdem auf RNA-Ebene keine differentielle Regulation des SR-A nachgewiesen werden konnte, wurde überprüft, ob nach Infektion von THP-1 Makrophagen mit Meningokokken der SR-A auf der Proteinebene beeinflusst wird. Dazu wurden FACS-Analysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (30 min bis 12 h) von THP-1 Makrophagen getätigt, die den SR-A auf der zellulären Oberfläche nachwiesen. THP-1 Makrophagen wurden entweder mit MC58, MC58 $\Delta$ siaD, 2120, 2120 $\Delta$ siaD oder  $\alpha$  14 infiziert. Nach Inkubation der DZ mit den verschiedenen Meningokokkenstämmen zu den gewählten Zeitpunkten, wurden die DZ gewaschen und mittels FITC-gekoppelter Zweitantikörper gefärbt und im FACS analysiert. Die Infektion mit den verschiedenen Stämmen führte zu keiner unterschiedlichen Regulation des SR-A auf THP-1-Makrophagen. Lediglich nach einer Stunde Infektion konnte eine minimal erhöhte Expression von SR-A verzeichnet werden (Abb.14).

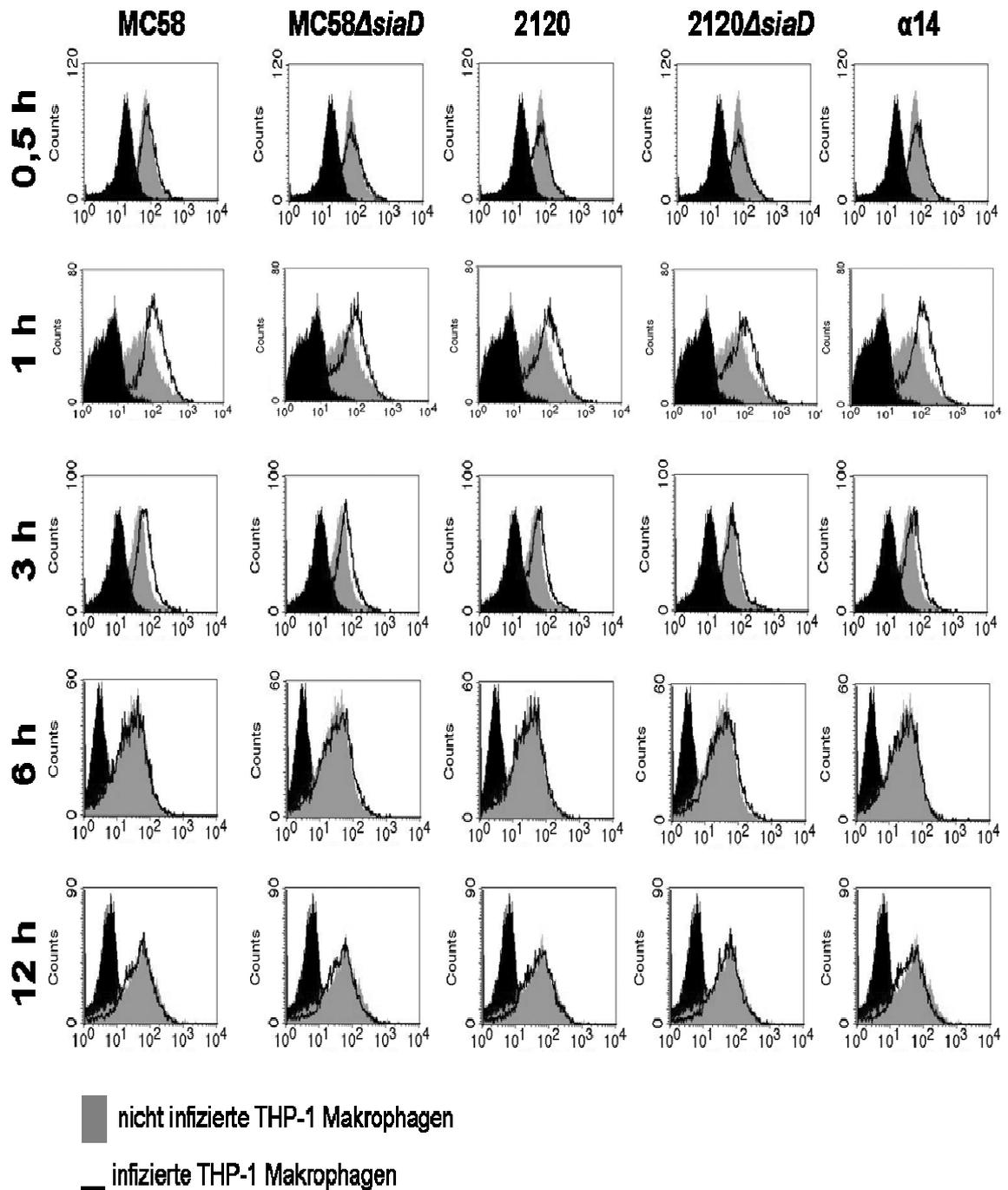


Abb. 14 SR-A-Regulation bei THP-1 Makrophagen auf Proteinebene nach Infektion mit den *N. meningitidis* Stämmen MC58, MC58 $\Delta$ siaD, 2120, 2120 $\Delta$ siaD oder  $\alpha$  14 vom Zeitpunkt 0,5 h bis 12 h. Nach einer Stunde Infektion kommt es bei allen Infektionsansätzen zu einer leichten Hochregulation des SR-A. Die Hochregulation nach 1h Infektion wurde in drei unabhängigen Experimenten nachgewiesen. Die einzelnen Stämme haben keinen unterschiedlichen Einfluss auf die SR-A Regulation bei THP1-Makrophagen.

## 5.6.4 Einfluss von SR-A auf die Zytokinproduktion

### 5.6.4.1 Einfluss von SR-A auf die TNF- $\alpha$ Ausschüttung

Bisherige Daten haben gezeigt, dass die Phagozytose von Meningokokken durch DZ Voraussetzung ist, TNF- $\alpha$  zu produzieren. Um zu überprüfen, ob der Phagozytose-Rezeptor SR-A von DZ wichtig für die TNF- $\alpha$  Produktion ist, wurden DZ 30 min vor Infektion mit dem SR-A Inhibitor polyG [500  $\mu$ g/ml] inkubiert. PolyG ist ein Inhibitor, der sowohl die Adhärenz als auch die Phagozytose über dem SR-A inhibiert. Als Kontrolle wurde polyC, ein polyanionischer Nicht-Ligand des SR-A, mitgeführt. Nach der Vorinkubation wurden die DZ mit MC58, MC58 $\Delta$ *siaD*, 2120, 2120 $\Delta$ *siaD*,  $\alpha$  710 oder  $\alpha$  570 infiziert. Nach 24 h Infektion wurden die Zytokinüberstände im ELISA analysiert. In Gegenwart des SR-A-Inhibitors polyG wurde signifikant weniger TNF- $\alpha$  von DZ nach Kontakt mit allen getesteten Meningokokkenstämmen nachgewiesen (Abb.15). Neben dem Einfluss des SR-A auf die TNF- $\alpha$  Produktion, wurde noch eine signifikante Reduktion mittels polyG bei der IL-6 und IL-1 Produktion nach Kontakt von DZ mit MC58 $\Delta$ *siaD* nachgewiesen. IL-6 wurde in Anwesenheit von polyG auf 14% (+/-16) reduziert und IL-1 auf 22% (+/-6) (Daten nicht gezeigt). Zusammen mit den Ergebnissen der Phagozytose-Inhibitoren (siehe 5.5.1) kann man sagen, dass die Phagozytose über den SR-A wichtig für die TNF- $\alpha$  (IL-6 und IL-1) Produktion bei MC58, MC58 $\Delta$ *siaD*, 2120 $\Delta$ *siaD*,  $\alpha$  710 und  $\alpha$  570 ist. Auffällig ist, dass beim bekapselten Serogruppe C Stamm 2120 keine signifikante Reduktion mit polyG nachgewiesen werden konnte.

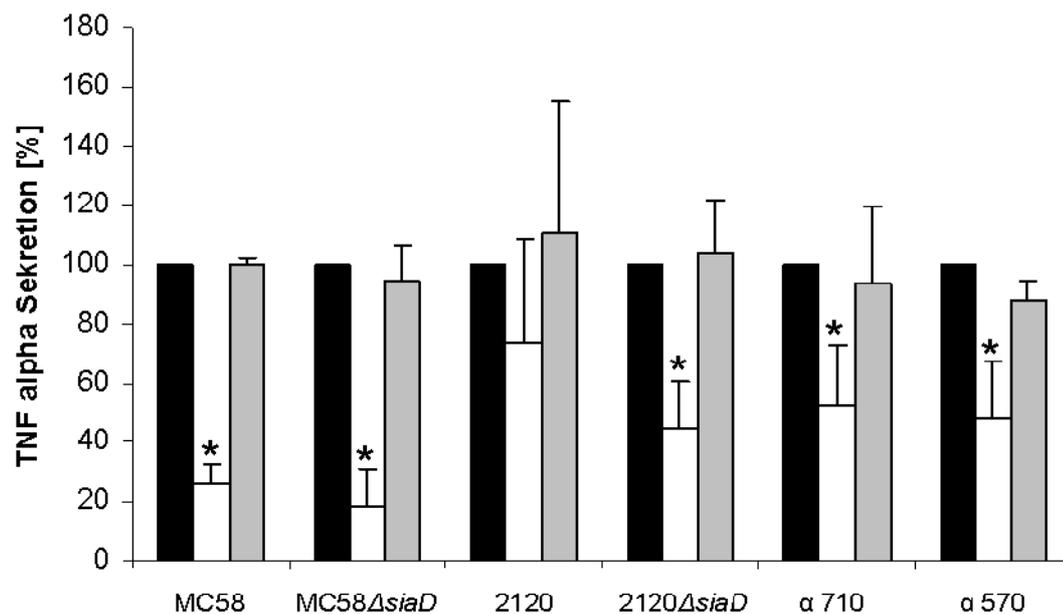


Abb. 15 TNF- $\alpha$  Produktion durch DZ nach Infektion mit Meningokokken in Anwesenheit des SR-A-Inhibitors polyG. Zusammenstellung der Daten ergibt sich aus mindestens drei verschiedenen DZ-Spendern. Die Darstellung ist so gewählt, dass die Werte in Relation zum Absolutwert von TNF- $\alpha$ , der durch Meningokokken von DZ ohne Inhibitor induziert wird (schwarz), stehen. Die TNF- $\alpha$  Produktion in Anwesenheit des anionischen SR-A-Inhibitors polyG (weiß) oder als Kontrolle polyC (grau) einem polyanionischen Nicht-Liganden des SR-A. Bei allen getesteten Stämmen wird die TNF- $\alpha$  Produktion durch DZ signifikant reduziert (\*  $p < 0,01$ ) in Anwesenheit von polyG. Die Phagozytose über den SR-A ist wichtig für die TNF- $\alpha$  Produktion durch DZ nach Kontakt mit den getesteten *N. meningitidis* Stämmen.

#### 5.6.4.2 Einfluss des SR-A auf die IL-8 Produktion

Vorherige Experimente konnten zeigen, dass die IL-8 Freisetzung, anders als bei TNF- $\alpha$ , keine Phagozytose benötigt, um induziert zu werden. Um zu überprüfen, ob der SR-A von DZ für die IL-8 Produktion wichtig ist, wurden DZ 30 min vor Infektion mit dem SR-A Inhibitor polyG [500  $\mu\text{g/ml}$ ] inkubiert und anschließend wurden die DZ mit MC58, MC58 $\Delta\text{siaD}$ , 2120, 2120 $\Delta\text{siaD}$ ,  $\alpha$  570 oder  $\alpha$  710 infiziert. Nach 24 h Infektion wurden die Zytokinüberstände im ELISA analysiert. In Gegenwart von polyG konnte bei allen Infektionsansätzen eine signifikante Reduktion ( $p < 0,01$ ) der IL-8 Sekretion nachgewiesen werden (Abb.16). Zusammen mit den Ergebnissen der Phagozytose-Inhibitoren (siehe 5.5.1), kann man sagen, dass die Adhärenz über den SR-A wichtig für die IL-8 Produktion durch DZ nach Kontakt mit MC58, MC58 $\Delta\text{siaD}$ , 2120, 2120 $\Delta\text{siaD}$ ,  $\alpha$  710 oder  $\alpha$  570 ist.

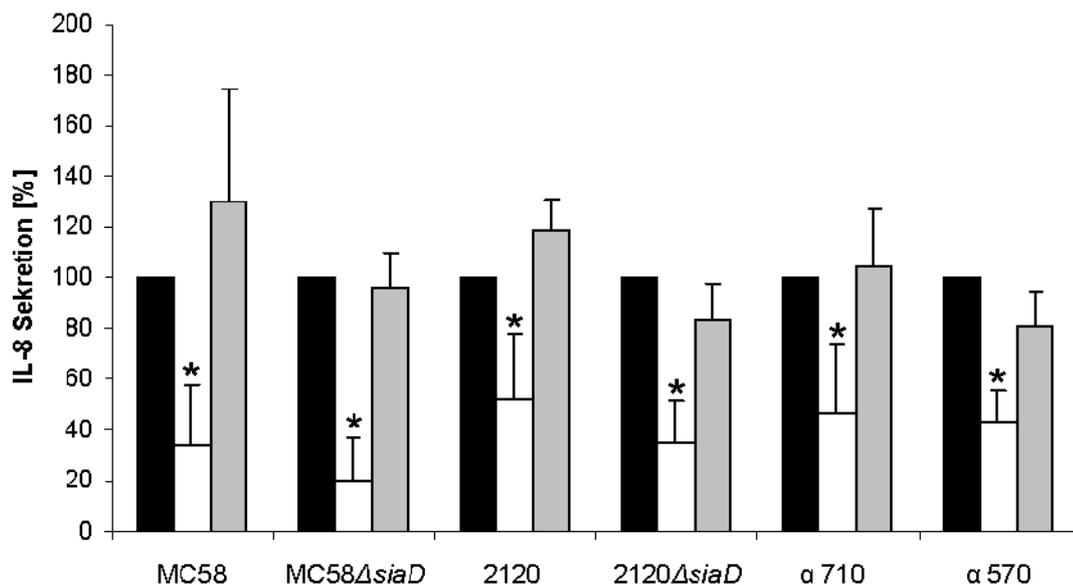


Abb. 16 IL-8 Produktion durch DZ nach Infektion mit Meningokokken. Alle Werte setzen sich aus mindestens drei verschiedenen Testergebnissen zusammen. Die Darstellung der Daten ist so gewählt, dass alle Werte in Relation stehen zum Absolutwert von IL-8 produziert durch DZ nach Kontakt mit Meningokokken ohne Inhibitor (schwarz). IL-8 Produktion in Anwesenheit vom SR-A Inhibitor polyG (weiß) oder zur Kontrolle dem Nicht-SR-A-Inhibitor polyC (grau). Bei allen getesteten Stämmen wird die IL-8 Produktion durch DZ signifikant reduziert (\*  $p < 0,01$ ) in Anwesenheit von polyG. D.h. SR-A ist wichtig für die IL-8 Produktion durch DZ nach Kontakt mit Meningokokken.

## 5.7 Zytokininduktion bei $\alpha$ 14

### 5.7.1 TNF- $\alpha$ und IL-8 Induktion unabhängig von SR-A

Bei allen bisher getesteten Stämmen konnte eine Reduktion der Zytokinproduktion durch DZ nach Kontakt mit Meningokokken durch den SR-A Inhibitor polyG nachgewiesen werden. Jedoch konnte nach Infektion von DZ mit  $\alpha$  14 diese SR-A abhängige Zytokinproduktion nicht nachgewiesen werden (Abb. 17). Nach Infektion von DZ mit  $\alpha$  14 konnte sowohl für die TNF- $\alpha$  als auch für die IL-8 Produktion keine signifikante Reduktion durch polyG nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Zytokininduktion von DZ durch  $\alpha$  14 komplett unabhängig von SR-A ist.

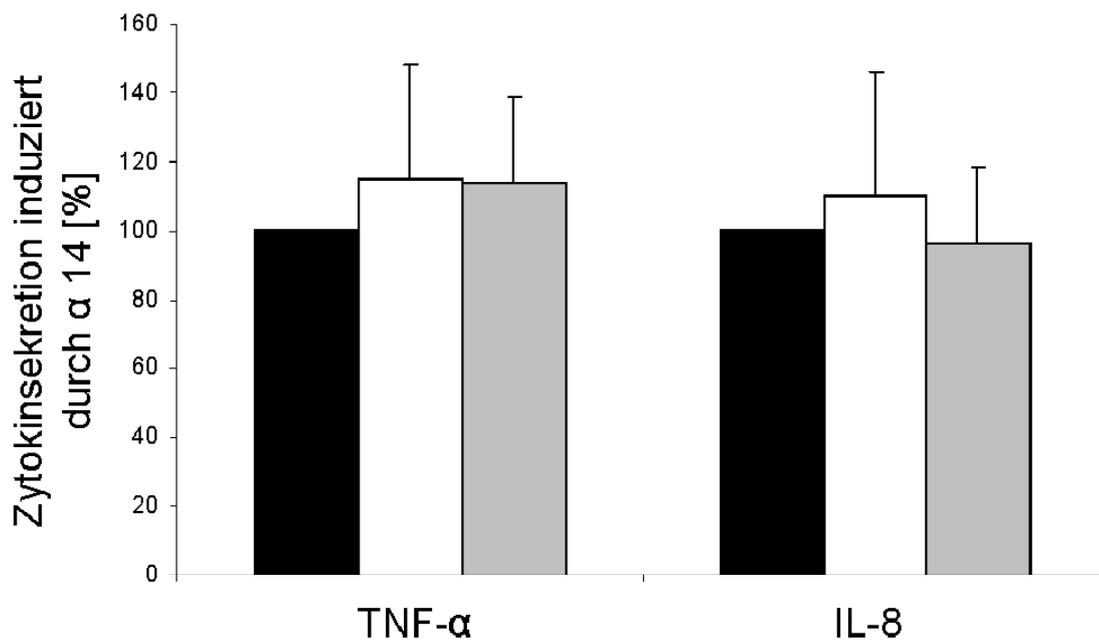
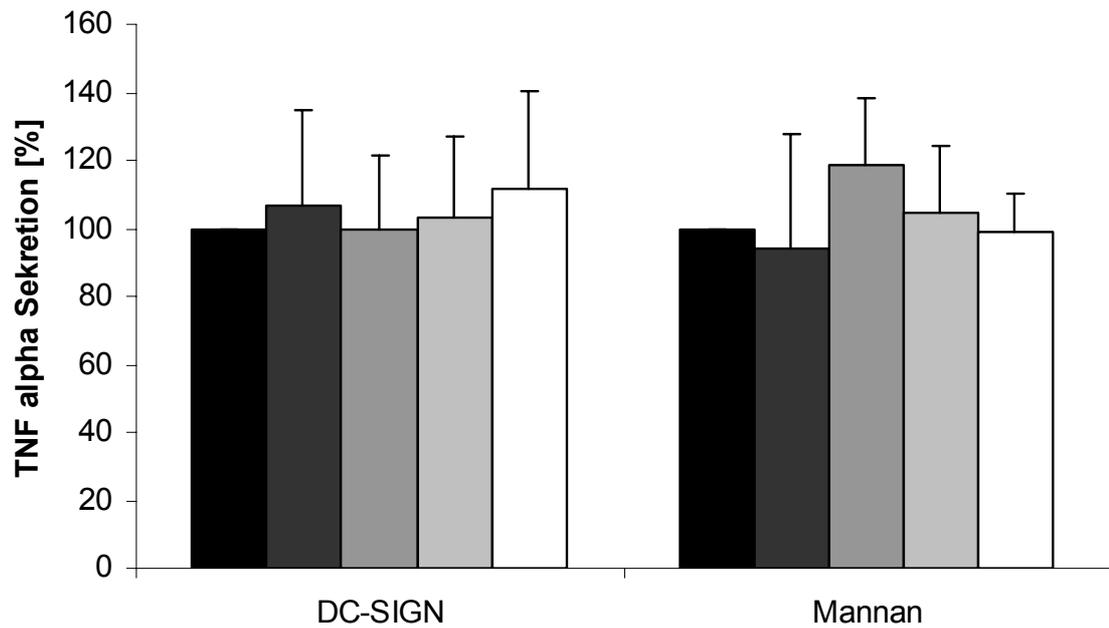


Abb. 17 TNF- $\alpha$  und IL-8 Produktion von DZ nach Infektion mit  $\alpha$  14 in Anwesenheit des SR-A Inhibitors polyG (weiß). Als Kontrolle dient polyC (grau). Die Werte sind immer in Relation zur Zytokininduktion ohne Inhibitoren dargestellt (schwarz). Weder TNF- $\alpha$  noch IL-8 wird nach Infektion von DZ mit  $\alpha$  14 in Anwesenheit von polyG signifikant reduziert. Die Zytokininduktion durch diesen Stamm ist unabhängig von SR-A. Die Ergebnisse setzten sich aus mindestens drei verschiedenen Experimenten zusammen.

### 5.7.2 Zytokininduktion durch $\alpha$ 14 über andere Rezeptoren

Um zu überprüfen, ob  $\alpha$  14 die Zytokininduktion durch DZ über einen anderen Rezeptor induziert, wurden zwei weitere serum-unabhängige Rezeptoren getestet: DC-SIGN und der Mannose-Rezeptor. DZ wurden mit inhibierenden DC-SIGN Antikörper oder Mannan vorinkubiert und anschließend mit  $\alpha$  14 infiziert. Für DC-SIGN wurden die Antikörper-Konzentrationen 20  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml oder 1  $\mu$ g/ml gewählt und von Mannan wurden 50 mg/ml, 25 mg/ml, 5 mg/ml oder 0,5 mg/ml pro Ansatz eingesetzt. Nach 24 h wurden die Zytokinüberstände abgenommen und die TNF- $\alpha$  und IL-8 Konzentration mittels ELISA gemessen. Bei allen getesteten Konzentrationen der Inhibitoren konnte keine signifikante Reduktion nachgewiesen werden (Abb.18 A+B). Die für die Erkennung von  $\alpha$  14 relevanten Rezeptoren bleiben unklar.

(A)



(B)

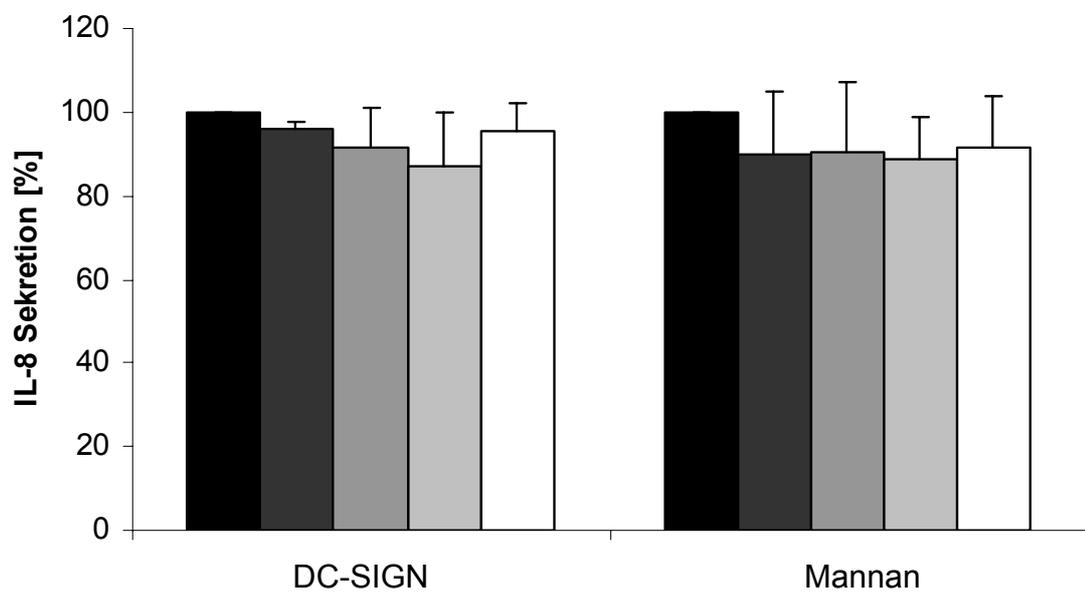


Abb.18 TNF- $\alpha$  (A) und IL-8 (B) Produktion von DZ nach Infektion mit  $\alpha$  14 in Anwesenheit von DC-SIGN- oder Mannan-Inhibitoren. Alle Daten wurden von mindestens drei verschiedenen DZ-Spendern errechnet. Alle Daten sind in Relation zum Absolutwert der durch  $\alpha$  14 induzierten TNF- $\alpha$  Menge ohne Inhibitor (schwarz) dargestellt. Inhibitoren-Konzentration (siehe Text): höchste Konzentration (dunkelgrau), zweithöchste Konzentration (mittelgrau), zweitniedrigste Konzentration (hellgrau), niedrigste Konzentration (weiß). Keine der gewählten Inhibitor-Konzentration führte zur Reduktion der TNF- $\alpha$  Menge. D.h. diese Rezeptoren sind nicht wichtig für die TNF- $\alpha$  Produktion durch DZ nach Kontakt mit  $\alpha$  14.

## 5.8 SR-A Phosphorylierungsstatus

In Infektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass der Scavenger Rezeptor von DZ der Hauptrezeptor für die Erkennung und Phagozytose des Stammes MC58 $\Delta$ *siaD* ist. Außerdem ist die Erkennung über diesen Rezeptor wichtig für die Zytokininduktion. Um zu überprüfen, ob die Infektion mit diesem Stamm die Aktivierung des SR-A verändert, wurde der Phosphorylierungsstatus analysiert. Zu diesem Zweck wurden entweder DZ oder THP-1 Makrophagen für 2,5 min, 5 min oder 10 min mit MC58 $\Delta$ *siaD* infiziert. Anschließend wurde der Rezeptor mittels Immunpräzipitation isoliert und mit einem globalen Antikörper, der phosphorylierte Serine, Threonine und Tyrosine erkennt, wurde der Phosphorylierungsstatus des Rezeptors bestimmt. Im nicht infizierten Zustand war der SR-A stark phosphoryliert, und nach 2,5 min konnte eine verminderte Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abb. 19). Die Dephosphorylierung der SR-A konnte jedoch nur in 2/3 aller Versuchsansatz nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob  $\alpha$  14 auch in der Lage ist, den SR-A zu aktivieren, wurden DZ oder THP-1 Makrophagen mit diesem Stamm infiziert und der Phosphorylierungsstatus des SR-A überprüft. Wie zu erwarten konnte nach 2,5 min, 5 min, 10 min und 30 min keine Dephosphorylierung des SR-A detektiert werden (Abb.19).

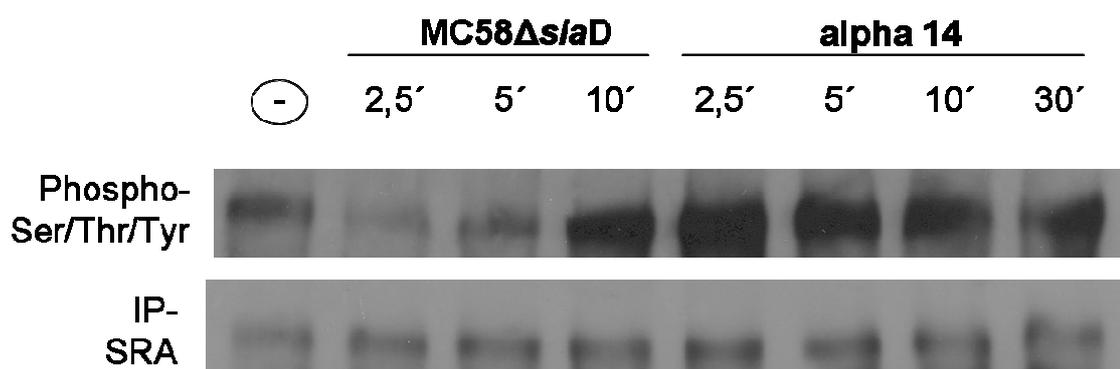


Abb.19 Phosphorylierungsstatus des SR-A aus DZ nach Kontakt mit den Meningokokken-Stämmen MC58 $\Delta$ *siaD* und  $\alpha$  14 . Nach 2,5 min Inkubation mit MC58 $\Delta$ *siaD* wird die Dephosphorylierung des SR-A detektiert.  $\alpha$  14 ist nicht in der Lage, den Rezeptor zu dephosphorylieren.

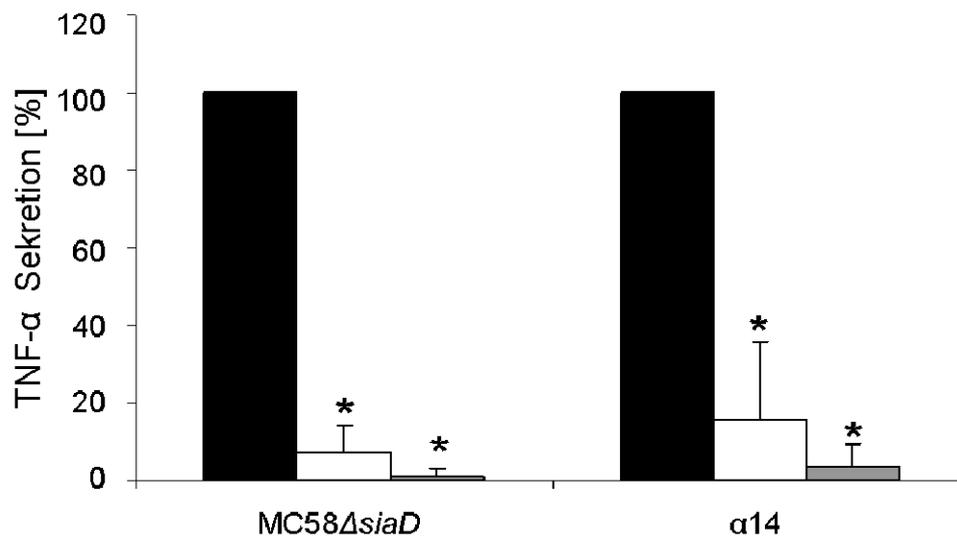
---

Der SR-A besitzt drei hochkonservierte Phosphorylierungsseiten auf der zytoplasmatischen Domäne: Ser-21, Thr-30 und Ser-49. Zur detaillierteren Analyse des Phosphorylierungsprofils wurden Western Blots mit spezifischen Antikörpern, die Phospho-Serine und Phospho-Threonine erkennen, durchgeführt. Jedoch haben die getesteten Antikörper nicht die Epitope des phosphorylierten SR-A erkannt. Somit müssen die genauen Dephosphorylierungsstellen des SR-A nach Kontakt mit *N. meningitidis* noch bestimmt werden.

## **5.9 Einfluss der De-/Phosphorylierung des SR-A auf die Zytokininduktion**

Nach Kontakt von MC58 $\Delta$ *siaD* mit DZ ist der SR-A wichtig für die Zytokinproduktion, Phagozytose und Dephosphorylierung des Rezeptors. Um zu überprüfen, ob die Dephosphorylierung und die anschließende Wieder-Phosphorylierung einen Effekt auf die Zytokinproduktion haben, wurden DZ mit zwei verschiedenen Inhibitoren, die Einfluss auf die Phosphorylierung haben, vorinkubiert. Da es keine spezifischen Phosphorylierungsinhibitoren für den SR-A gibt, wurden globale Phosphatase- und Kinase-Inhibitoren verwendet. Okadasäure ist ein spezifischer Inhibitor der Serin/Threonin-Phosphatasen 1 und 2A und Staurosporin ist ein Inhibitor der Phospholipid/Calcium-abhängigen Proteinkinase. Nach Vorinkubation der DZ mit diesen Inhibitoren wurden DZ mit entweder MC58 $\Delta$ *siaD* oder  $\alpha$  14 infiziert. Nach 24 h wurden die Zytokinüberstände abgenommen und mittels ELISA analysiert. Die TNF- $\alpha$  und IL-8 Produktion von DZ nach Kontakt mit MC58 $\Delta$ *siaD* wurde sowohl mit Staurosporin [50 nM] als auch mit der Okadasäure [50 nM] auf signifikant gesenkt (Abb.20). Jedoch konnte kein unterschiedlicher Effekt zwischen den Zellen, die mit MC58 $\Delta$ *siaD* oder  $\alpha$  14 infiziert wurden, detektiert werden. Offensichtlich handelt es bei den Inhibitoren um zu globale Effektoren, als dass diese über den spezifischen De/Phosphorylierungseffekt des SR-A genauere Information geben können.

(A)



(B)

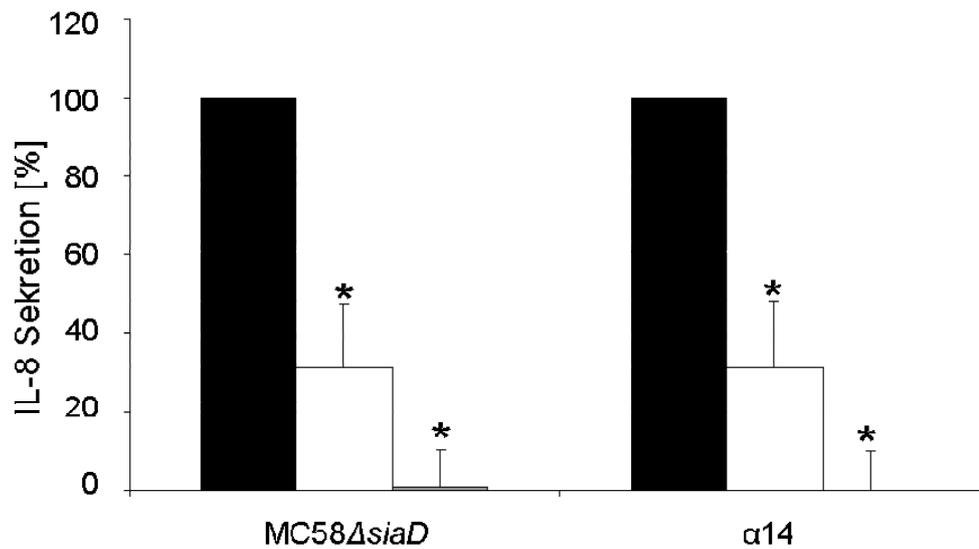


Abb. 20 (A) TNF- $\alpha$  und (B) IL-8 Sekretion von DZ induziert durch MC58 $\Delta$ siaD oder  $\alpha$  14 unter Einfluss von Staurosporin (weiß), Okadasäure (grau) oder ohne Inhibitor (schwarz). Alle Daten sind aus mindestens drei verschiedenen Versuchansätzen zusammengestellt. In Anwesenheit von Staurosporin und Okadasäure kommt es zu einer signifikant (\*  $p < 0,01$ ) Reduktion der TNF- $\alpha$  Sekretion durch DZ, sowohl durch MC58 $\Delta$ siaD als auch durch  $\alpha$  14.

## 5.10 Methodischer Teilaspekt: RNAi

Die RNAi Technologie stellt eine attraktive Methode zur genetischen Manipulation dar. Um DZ zu manipulieren wurde die Elektroporationsmethode als Transfektionsmittel für siRNA verwendet.  $1 \times 10^6$  DZ wurden mit  $20 \mu\text{M}$  siRNA bei 30Volt für 10 msec transfiziert.

### 5.10.1 Tansfektionseffizienz

Die Transfektionseffizienz von fluoreszierender siRNA wurde mittels Fluoreszenzmikroskop und FACS-Analyse bestimmt. Die FACS-Analyse ergab, dass knapp 90% der Zellen transfiziert worden sind. Die Transformationseffizienz wurde auch mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Abbildung 21 und 22 zeigen die FACS-Analyse und die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von DZ, die mit fluoreszierender siRNA transformiert worden sind.

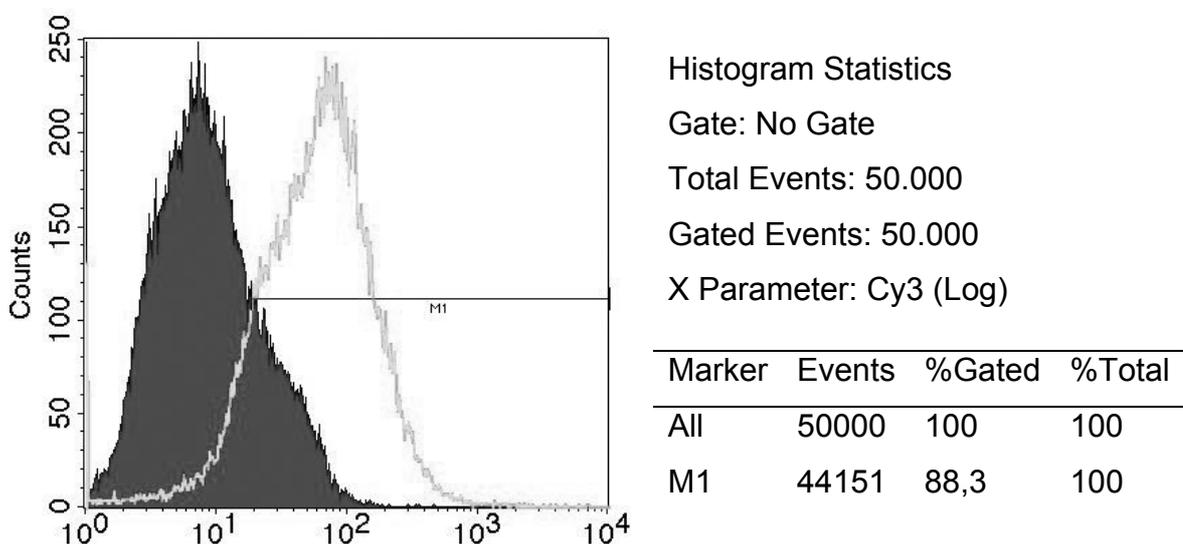


Abb. 21 FACS-Analyse von Dendritischen Zellen, die mit fluoreszierender siRNA transfiziert worden sind. Dunkler sind die nicht transformierten Zellen und helle Linie sind die transfizierten Zellen. 88,3% der Zellen wurden siRNA transformiert.

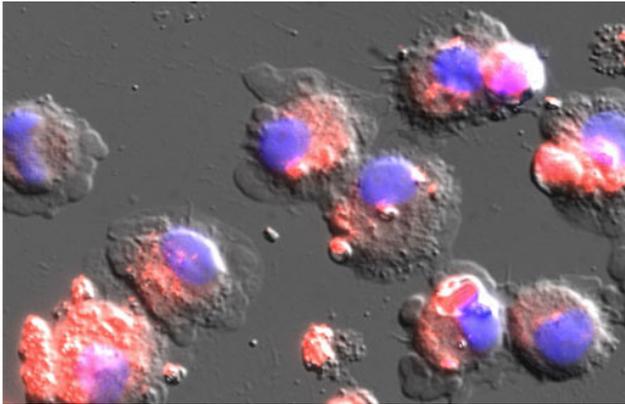


Abb. 22 Fluoreszenzmikroskopie von Dendritischen Zellen, die mit fluoreszierender siRNA transfiziert worden sind.

### 5.10.2 Transfektionseffektivität

Die Effektivität von RNAi mittels Elektroporationsmethode bei DZ wurde durch Transfektion einer Apoptose auslösenden siRNA, genannt siTox, getestet. An Hand von Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen konnte man zeigen, dass nach 24 h mit siTox Apoptose induziert wurde. Fragmentierte Zellkerne und granuliert Partikel konnten detektiert werden, vergleichbar zu Zellen die mit 5 mM Camptothecin, einem Apoptose-Induzierer, behandelt worden sind. Abbildung 23 zeigt die Zellkerne von DZ die mit siTox transfiziert worden sind und Zellkerne von DZ, die mit einer siRNA transfiziert worden sind, die keinen Effekt haben (mock siRNA).

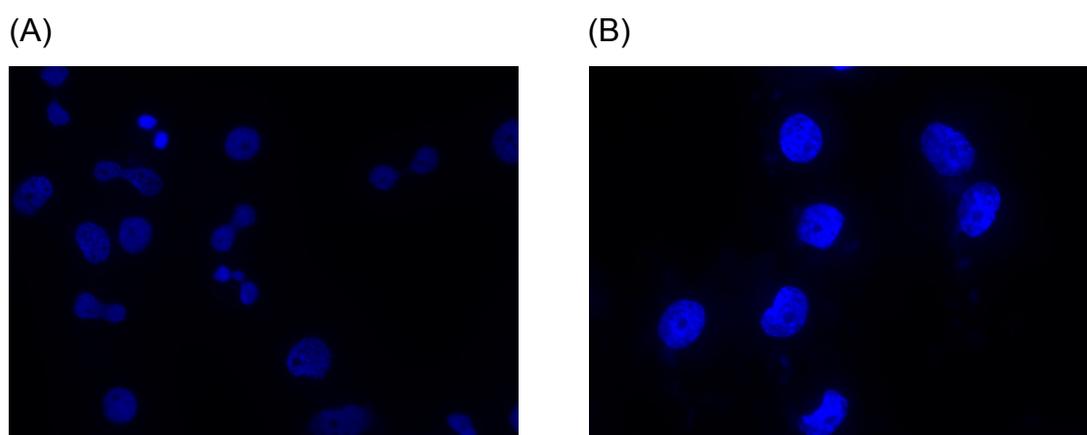


Abb. 23 (A) DZ Zellkerne die mit siTox transformiert worden sind und (B) Zellen die mit mock siRNA transformiert worden sind. Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt.

### 5.10.3 Anwendung von RNAi für den SR-A

Nachdem gezeigt wurde, dass DZ mittels Elektroporation mit siRNA transfiziert werden können, wurde überprüft ob mit dieser Methode der SR-A herunterreguliert werden kann. DZ wurden mit zwei verschiedenen siRNAs spezifisch für den SR-A transfiziert und nach 24 h, 48 h und 72 h wurde mittels quantitativer Real-time PCR die Regulation des SR-A auf Transkriptionsebene untersucht und auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. Mit keiner der getesteten siRNAs konnte jedoch auf Transkriptionsebene eine signifikante Herunterregulation nachgewiesen werden (Abb. 24). Schwankungen zwischen dem Faktor 2 und 0,5 unterliegen den normalen Abweichungen der Versuchsmethode.

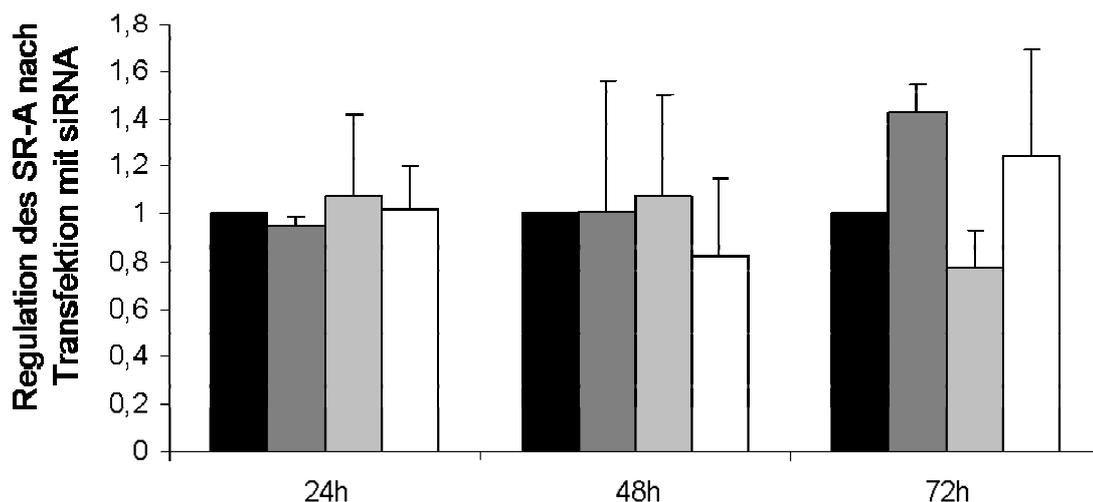


Abb. 24 Regulation des SR-A nach Transfektion mit siRNA auf Transkriptionsebene. Daten wurden von zwei verschiedenen DZ-Spendern berechnet. Alle Daten sind in Relation zu nicht transfizierten Zellen (schwarz) dargestellt. Regulation des SR-A nach Transfektion der DZ mit: mock siRNA (dunkelgrau), MSR1-1 siRNA (hellgrau), MSR1-2 (weiß). Es konnte keine signifikante Herunterregulation des SR-A auf Transkriptionsebene mit den spezifischen siRNAs nachgewiesen werden.

## 6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Interaktion von DZ mit Meningokokken und den Einfluss auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Zytokine spielen eine wichtige Rolle während der Meningokokken-Pathogenese. Der Level an proinflammatorischen Zytokinen korreliert mit dem Schweregrad des Krankheitsverlaufs bei Patienten mit invasiver Erkrankung (van Deuren *et al.*, 1994; Waage *et al.*, 1989). Während die Expression des Kapselpolysaccharids maßgeblich die Zytokinproduktion beeinflusst, war die Bedeutung der Kapsel-O-Acetylierung von untergeordneter Rolle bei der Interaktion von Meningokokken und DZ. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Phagozytose von Meningokokken von zentraler Wichtigkeit für die Zytokinproduktion ist. Der Scavenger Rezeptor Klasse A scheint eine nicht nur für die rezeptorvermittelte Phagozytose wichtige Rolle zu übernehmen, sondern auch die Zytokinproduktion zu beeinflussen.

### 6.1 Kapsel-abhängige verminderte Zytokinproduktion

Die Kapsel von *Neisseria meningitidis* spielt eine entscheidende Rolle beim Schutz vor dem angeborenen Immunsystems des Menschen. Bekapselte Stämme werden schlechter von DZ erkannt und phagozytiert (Kurzai *et al.*, 2005; Kolb-Maurer *et al.*, 2001), darüber hinaus vermittelt die Kapsel Schutz vor dem Komplementsystem (Vogel & Frosch, 1999). Die Ergebnisse (siehe 5.1.1) haben gezeigt, dass bekapselte Stämme der Serogruppe B und C signifikant weniger proinflammatorische Zytokine bei DZ induzieren als deren isogene kapsellose Mutanten. Schon frühere Daten legten nahe, dass bekapselte Stämme der Serogruppe A, B, und C weniger proinflammatorische Zytokine induzieren als unbekapselte Varianten, jedoch wurden diese bisher nicht quantifiziert (Unkmeir *et al.*, 2002). Diesen Effekt konnte man auch bei anderen bekapselten Keimen nachweisen. Beispielsweise induzieren bekapselte *Salmonella enterica*, die das Kapselantigen Vi exprimieren, weniger IL-8 in der

---

intestinalen Mucosa als deren unbekapselte Form (Raffatellu *et al.*, 2005). Das Kapselpolysaccharid von *Actinobacillus actinomycescomitans* reduziert die IL-8 und IL-6 Produktion bei Gingival-Fibroblasten (Dongari-Bagtzoglou & Ebersole, 1996). Der Mechanismus, der dem Phänomen zugrunde liegt, ist jedoch nicht bekannt. Zwei Hypothesen können den Einfluss der Kapsel erklären. Zum Einen können die anti-phagozytotischen Eigenschaften der Kapsel für die verminderte Zytokinproduktion verantwortlich sein, zum Anderen könnte das Kapselpolysaccharid direkten Einfluss auf die Zytokinminderung haben.

Für die Zytokinminderung auf Grund der anti-phagozytotischen Eigenschaften der Kapsel sprechen, dass die Inkubation von DZ mit dem unbekapselten Stamm MC58 $\Delta$ *siaD* mit Colominsäure (Kapselbestandteil der Serogruppe B) keinen Einfluss auf die proinflammatorische Zytokinproduktion hat (siehe 5.1.2). Daraus lässt sich schließen, dass die Colominsäure nicht für die Reduktion verantwortlich ist sondern vielmehr die anti-phagozytotischen Eigenschaften der Kapsel.

Es gibt jedoch Anhaltspunkte für den direkten Einfluss des Kapselpolysaccharids auf die verminderte Zytokinproduktion. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die konstitutiv unbekapselten Stämme  $\alpha$  14 und  $\alpha$  570 schlecht von DZ erkannt und phagozytiert werden (siehe 5.3.1). Dennoch wird dieselbe Menge an Zytokinen nach 24 h p.i. bei DZ induziert wie die unbekapselten isogenen Kapselmutanten, die effizient phagozytiert werden (siehe 5.3.2). Offenbar reicht eine geringe Anzahl an phagozytierten Meningokokken aus, um maximale Zytokinlevel nach 24 h p.i. zu induzieren. Kocabas *et al.* haben für Serogruppe C Meningokokken zeigen können, dass die Kapselkomponente  $\alpha$ -2,9 Polysialinsäure direkt an CD14 binden kann und somit wird die Aktivierung von TLR4 durch LPS verhindert wird (Kocabas *et al.*, 2007). Dieser Effekt ist jedoch sehr stark konzentrationsabhängig. Selbst die höchsten Konzentrationen an aufgereinigtem Kapselpolysaccharid der Serogruppe C sind nicht in der Lage die TNF- $\alpha$  und IL-6 Sekretion zu inhibieren, wenn hohe Konzentrationen von LPS verwendet werden. Neben dem konzentrationsabhängigen Effekt konnte man auch einen MOI-abhängig Effekt nachweisen. Infiziert man  $2 \times 10^6$  THP-1 Zellen mit  $6 \times 10^4$  hitzeinaktivierten Meningokokkenstämmen (MOI:0,03) erkennt man einen signifikanten

Unterschied bei den TNF- $\alpha$  und IL-6 Mengen induziert von bekapselten und unbekapselten Serogruppe C Stämmen. Höhere oder niedrigere MOIs zeigten diesen Effekt nicht. Dieser Effekt wurde nur bei Meningokokken der Serogruppe C festgestellt. Mit Kapselpolysaccharide von Streptokokken Gruppe B Typ III konnten kein solcher Effekt erzielt werden.

Die Zellaktivierung über die PRRs nimmt einen wichtigen Stellenwert für das Immunsystem ein, um inflammatorische Ereignisse auszulösen und somit Bakterien zu eliminieren. Die Inhibierung der TLR-vermittelten Zellaktivierung scheint somit ein wichtiger Virulenzmechanismus zu sein (Hoebe *et al.*, 2004; Iwasaki & Medzhitov, 2004; Rosenberger & Finlay, 2003). Es wurden auch schon einige andere bakterielle Bestandteile dokumentiert, die die LPS-vermittelte Zellaktivierung verhindert (Asai *et al.*, 2003; Macagno *et al.*, 2006; Monari *et al.*, 2005). Dies zeichnete sich in einer verminderten proinflammatorischen oder einer erhöhten antiinflammatorischen Zytokinantwort aus. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass wenn man DZ mit dem Polysaccharid von Pneumokokken vorinkubiert und die Zellen dann mit LPS stimuliert, DZ sehr viel mehr von dem antiinflammatorischen Zytokin IL-10 produzieren als DZ, die nicht mit dem Kapselpolysaccharid vorinkubiert worden sind (Meltzer & Goldblatt, 2006). Der Mechanismus, der diesem Ereignis zu Grunde liegt, konnte noch nicht geklärt werden. Zu beachten ist auch, dass die Zytokinproduktion von DZ nach Kontakt mit bekapselten Stämmen nicht komplett verhindert wird. Dies würde auch für eine kompetitive Bindung des Kapselpolysaccharids an CD14 oder LBP sprechen, wodurch eine effiziente Bindung von LPS verhindert wird. Somit wäre nur noch die TLR2 vermittelte Zytokininduktion möglich. Sprong *et al.* haben schon gezeigt, dass eine ausschließlich über TLR2 ausgelöste Zytokininduktion nicht dieselbe Menge an Zytokinen induziert wie mit LPS über TLR4 (Sprong *et al.*, 2002).

## 6.2 Kapselmodifikation: O-Acetylierung

O-Acetylierung von bakteriellen Oberflächenstrukturen kommt sehr häufig bei pathogenen Keimen vor und es konnte gezeigt werden, dass diese die

---

Immunogenität beeinflussen und auch funktionell wichtig sind. Beispielsweise gibt es eine Studie die darauf hindeutet, dass *E.coli* K1 Stämme mit O-Acetylierung virulenter sind als nicht-O-acetylierte Stämme (Frasa *et al.*, 1993). O-acetyl-positive *E.coli* K1 Stämme sind resistenter gegen die Hydrolyse durch Neuraminidasen. Außerdem produzierten Kaninchen, die mit O-acetylierten Keimen infiziert worden sind spezifische Antikörper gegen diese Varianten. Das Fehlen der O-Acetylierung führte zu einer Minderung der Immunogenität (Orskov *et al.*, 1979). Bei *Pseudomonas aeruginosa* mit O-acetyliertem Alignat wird die Aktivierung des alternativen Komplementsystems verhindert (Pier *et al.*, 2001). *Streptococcus pneumoniae* induziert im Rhesusaffen Modell und im Menschen Antikörper sowohl gegen nicht-O-acetylierte als auch O-acetylierte 9V Kapseln protektive Antikörpern (McNeely *et al.*, 1998).

Bei Meningokokken korreliert die Immunität vor Meningokokken-Erkrankung mit der Anwesenheit von Antikörpern gegen Meningokokkenstämme (Glode *et al.*, 1979; Goldschneider *et al.*, 1969a; Goldschneider *et al.*, 1969b). Die O-Acetylierung der Kapsel modifiziert das Epitop und führt so zu einer unterschiedlichen Spezifität der Antikörper gegen das Kapselpolysaccharid (Rubinstein & Stein, 1988a; Rubinstein & Stein, 1988b). Somit hängt die Effizienz der humoralen Immunantwort von dem Acetylierungsstatus ab (Richmond *et al.*, 2001). Es zeigt sich ein Serogruppen abhängiger Einfluss der O-Acetylierung der Kapsel auf die Immunogenität. Bei Serogruppe A konnte eine gesteigerte Immunogenität bei O-acetyliertem Kapselpolysaccharid festgestellt werden (Berry *et al.*, 2002), jedoch senkt die O-Acetylierung die Immunogenität der Serogruppe C (Fusco *et al.*, 2007). Die Antikörper, die aus dem Serum von Individuen, die mit Serogruppe A Polysaccharid vakziniert worden sind waren generell spezifisch für O-acetyliertes Polysaccharid. Mäuse, die mit einem Protein-konjugiertem O-acetyliertem Polysaccharid geimpft worden sind zeigten eine hohe Immunogenität im Gegensatz zu Mäusen, die mit dem de-O-acetylierten Polysaccharid-Konjugat geimpft worden sind, die eine merkliche Minderung der Immunoreaktivität aufwiesen (Berry *et al.*, 2002). Eine signifikant höhere Inhibierung durch Serumbakterizidie (Serumstress) erhielt man für nicht-acetyliertes Polysaccharid der Serogruppe C als für O-acetyliertes Polysaccharide (Richmond *et al.*, 2001; Fusco *et al.*, 2007).

---

Der funktionelle Einfluss der Kapsel O-Acetylierung wurde hier untersucht, indem die Interaktion von DZ mit den jeweiligen acetylierten oder nicht-acetylierten Stämmen getestet wurde. Die Daten haben gezeigt, dass die O-Acetylierung der Meningokokkenkapsel von Serogruppe C, W-135 und Y sich weder auf die Zytokinproduktion noch auf die Ausreifung von DZ auswirkt. Auch die Hypothese, dass sich die über die O-Acetylierung herbeigeführte Nettoladung geändert, und sich somit möglicherweise auf die Erkennung und Phagozytose auswirkt, konnte nicht bestätigt werden. Die Phagozytoserate von O-acetylierten und nicht-O-acetylierten Stämmen der Serogruppe C, W-135 und Y war gleichermaßen gering und es konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Somit kann man sagen, dass die Kapsel-O-Acetylierung nicht die Interaktion von DZ mit Meningokokken beeinflusst und die Kapsel-Acetylierung bei Meningokokken bislang nur Auswirkung auf die humorale Immunantwort hat.

### **6.3 Einfluss der Phagozytose auf die Zytokinproduktion**

Auch wenn die kapsel-abhängige verminderte Zytokinproduktion durch DZ wahrscheinlich nicht nur über die verminderte Phagozytose der DZ von bekapselten Meningokokken erklärt werden kann, ist die Phagozytose ein nicht zu vernachlässigender Faktor bei der Zytokinproduktion. Die Phagozytose kann bei DZ in zwei verschiedenen Varianten vorkommen; entweder über spezifische rezeptorvermittelte Phagozytose oder über unspezifische Makropinozytose. Es konnte bei allen getesteten Meningokokkenstämmen gezeigt werden, dass DZ Meningokokken phagozytieren müssen, um maximale Mengen von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 zu induzieren (siehe 5.5.1). Diese Daten zeigen indirekt, dass offenbar alle Stämme zumindest in geringem Maße phagozytiert werden, selbst die bekapselten Stämme oder auch der unbekapselte Stamm  $\alpha$  14. D.h. um die maximale Zytokinproduktion bei DZ auszulösen, müssen Keime internalisiert werden. Dies weist auf einen intrazellulären Signalweg hin, aktiviert durch ein phagosomales Kompartiment. Hingegen wird IL-8 unabhängig von der Phagozytose der Meningokokken produziert (siehe 5.5.2). Offenbar wird ein

direkter Signalweg von einem zellulären Oberflächenrezeptor ausgelöst um die IL-8 Produktion zu aktivieren.

Bei anderen Keimen konnte auch diese Phagozytose-abhängige oder -unabhängige Zytokinproduktion nachgewiesen werden. Interaktion zwischen DZ und *Helicobacter pylori* haben gezeigt, dass durch Inkubation von DZ mit dem Phagozytoseinhibitor Cytochalasin D die Produktion von IL-12, IL-1  $\beta$  und TNF- $\alpha$  verhindert wird, jedoch nicht die von IL-6, IL-8 und IL-10 (Kranzer *et al.*, 2005; Hafsi *et al.*, 2004).

Die Microarray Daten zeigen (siehe 5.4), dass eine rezeptorvermittelte Phagozytose des unbekapselten Stammes MC58 $\Delta$ *siaD* mittels SR-A nach vier Stunden Infektion zur differentiellen Regulation von weiteren Zytokine neben den proinflammatorischen Zytokinen führt. Der Angleich des Transkriptionsprofils nach 18 h Infektion deutet jedoch darauf hin, dass sich das Transkriptionsprofil vor allem zeitlich verschiebt. Weitergehende Experimente sollten den Zytokinlevel auf Proteinebene über den zeitlichen Verlauf untersuchen.

## 6.4 Scavenger Rezeptor Klasse A

Der Scavenger Rezeptor der Klasse A ist für zwei Funktionen bekannt; zum Einen spielt er als Aufnahmerezeptor von modifiziertem LDL die zu Artherosklerose Erkrankung führt eine Rolle und zum Anderen erkennt er bakterielle Oberflächenstrukturen wie Lipoteichonsäuren (LTS) von Gram-positiven und LPS von Gram-negativen Bakterien.

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Gram-negativen Vertreter *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* vom SR-A erkannt werden (Dunne *et al.*, 1994). Greenberg *et al.* haben gezeigt, dass verschiedene LTS Strukturen auch unterschiedliche Spezifität für SR-A aufweisen, abhängig von der negativen Ladung (Greenberg *et al.*, 1996). Außerdem sind SR-A Knock-out Mäuse viel anfälliger gegenüber *L. monocytogenes* Infektionen (Suzuki *et al.*, 1997a; Suzuki *et al.*, 1997b).

---

Von Gram-negativen Bakterien wurden *E.coli* und *Neisseria meningitidis* als Liganden von SR-A beschrieben. Versuche mit SR-A Knock-out Mäusen haben gezeigt, dass die Mäuse weniger resistent gegen endotoxischen Schock sind (Haworth *et al.*, 1997). Hampton *et al.* haben gezeigt, dass SR-A an LPS bindet und somit für die Entgiftung vom Endotoxin verantwortlich ist (Hampton *et al.*, 1991). Bei Versuchen mit Makrophagen, die aus SR-A (-/-) Mäusen isoliert und mit Meningokokken infiziert worden sind, konnte gezeigt werden, dass die Makrophagen nicht mehr in der Lage waren Meningokokken aufzunehmen, konnten aber trotz allem noch Zytokine produzieren. Umgekehrt waren Makrophagen, die aus TLR4 (-/-) Mäusen isoliert worden sind nicht mehr in der Lage Zytokine zu produzieren, konnten aber Meningokokken phagozytieren (Mukhopadhyay *et al.*, 2006; Peiser *et al.*, 2002). Zwar gehört das LPS zu den bekannten Liganden des SR-A jedoch konnten Peiser *et al.* zeigen, dass das Meningokokken LPS nicht der Ligand von SR-A ist. Es konnten die Kapsel, die Pili und das Oberflächenmolekül Opa und Opc als Ligand ebenfalls ausgeschlossen werden. Dafür wurden drei hypothetische Außenmembranproteine als Ligand identifiziert: NMB1220 (Stomatin/Mec-2 Familie Protein), NMB0278 (Thiol-Disulfid Interchange Protein DsbA) und NMB0667 (hypothetisches Protein) (Peiser *et al.*, 2006).

#### 6.4.1 Einfluss des SR-A auf die Zytokinproduktion

Bei allen getesteten Stämmen, außer dem Stamm  $\alpha$  14, konnte gezeigt werden, dass der SR-A wichtig für die TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-8 Produktion von DZ nach Kontakt mit Meningokokken ist (siehe 5.6.4). Zusammen mit den Ergebnissen, die den Einfluss der Phagozytose auf die Zytokinproduktion aufzeigen (siehe 5.5.1), kann man sagen, dass bei DZ die Phagozytose von Meningokokkenstämmen über den SR-A wichtig ist für die TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 Produktion. Ein mögliches Modell zur Erklärung der TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 Sekretion ist, dass Meningokokken an den SR-A binden und über diesen phagozytiert werden. Anschließend kommt es zur Fusion der Meningokokkenenthaltenden Endosomen mit Lysosomen. Die Lysosomen fusionieren

letztendlich mit abgeschnürten Vesikeln des Golgi. Uronen *et al.* haben gezeigt, dass in DZ die TLR2 und 4 Rezeptoren auch intrazellulär im Golgi vorkommen und nicht nur auf der zellulären Oberfläche (Uronen-Hansson *et al.*, 2004). Eine weitere intrazelluläre Aktivierung der Zytokininduktion kann über TLR9 stattfinden, da dieser nur intrazellulär vorkommt und bestimmte DNA-Motive von Meningokokken erkennt (Mogensen *et al.*, 2006). Somit kommt es erst nach der Phagozytose intrazellulär zur verstärkten Aktivierung der TLRs (Abb.1 a). Ein Argument, das für diese Theorie spricht, ist dass die TLR4-abhängige Aktivierung von DZ vor allem durch das membranständige Lipid A des LOS aktiviert wird (Brandtzaeg & van Deuren, 2002). Dieser Lipid A-Teil kann jedoch nur an seinen Rezeptor binden, wenn er aus der Membran gelöst ist. Dieser Prozess geschieht in den Lysosomen. Eine andere Möglichkeit, die TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 Sekretion zu erklären, ist, dass SR-A zur stärkeren Bindung der Meningokokken an die Oberfläche führt und somit eine effizientere Interaktion zu den Oberflächenrezeptoren TLR2/4 gewährleistet (Abb.1 b). Es ist vorstellbar, dass nach Kontakt des SR-A mit den Meningokokkenstämmen ein direkter Signalweg ausgelöst wird, der zur Aktivierung von NF-kB und schließlich zur TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 Sekretion führt (Abb.1 c).

Für die IL-8 Produktion von DZ nach Kontakt mit Meningokokken ist nur die Adhärenz an SR-A wichtig, jedoch nicht die Phagozytose (siehe 5.5.2 und 5.6.4). Deshalb müssen für die IL-8 Produktion andere Erklärungsmodelle herangezogen werden, da man aus den Ergebnissen schließen kann, dass eine direkte Signalaktivierung von zellulären Oberflächenstrukturen ausreichend ist. Eine mögliche Erklärung für die IL-8 Produktion wäre, dass der SR-A direkt einen Signalweg aktiviert und somit zur IL-8 Produktion führt (Abb. 1 d). Eine andere Erklärung könnte sein, dass die Bindung der Meningokokken an den SR-A Voraussetzung ist, um wiederum die Aktivierung eines anderen Rezeptors zu fördern und somit die IL-8 Produktion aktiviert wird (Abb.1 e). Für die zweite Möglichkeit spricht, dass Peiser *et al.* im murinen Modell keinen Einfluss von SR-A auf die sekretorische Zytokinantwort nachweisen konnte (Peiser *et al.*, 2002).

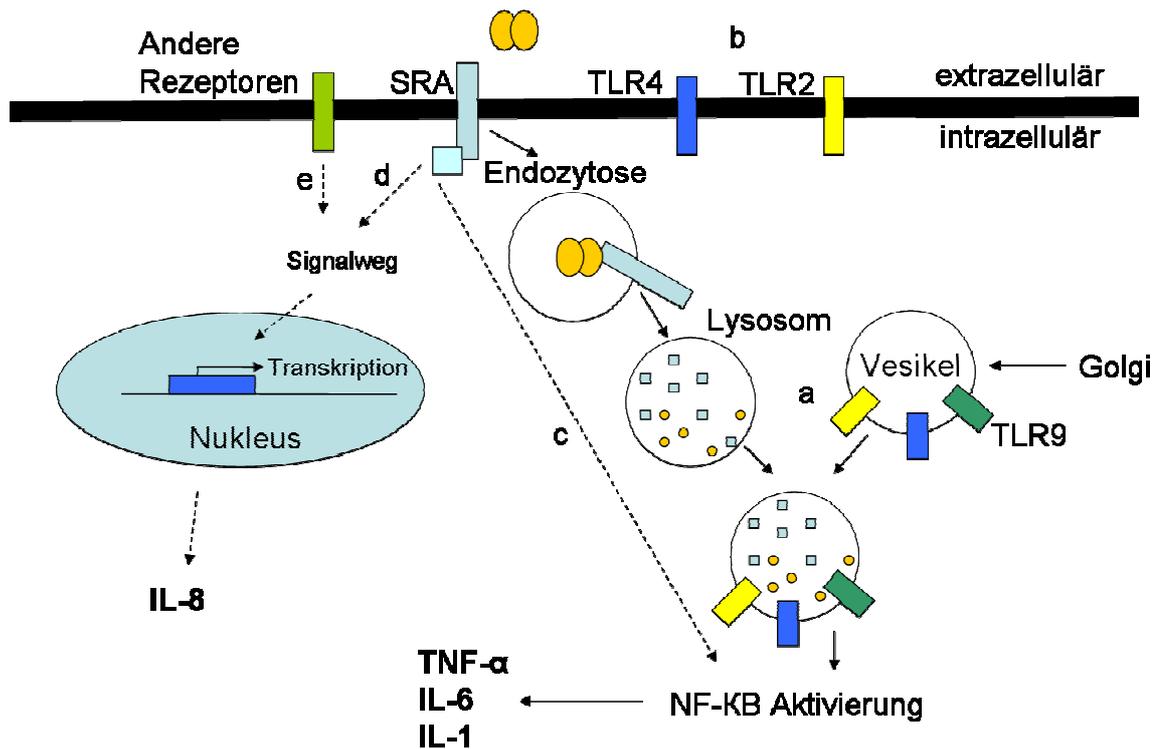


Abb. 1 Graphische Darstellung der Scavenger Rezeptor Klasse A abhängigen Zytokinproduktion nach Kontakt von DZ mit Meningokokken. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 Produktion: a) Meningokokken werden phagozytiert und intrazelluläre über TLR2/4/9 wird NF $\kappa$ B aktiviert b) initiale Bindung über SR-A, die den physiologisch näherer Kontakt zur den Oberflächenrezeptoren TLR2 und 4 ermöglicht und so zu einem gesteigerten Effekt der TLR-Aktivierung führt c) Signalweg, der durch SR-A ausgelöst wird und NF $\kappa$ B direkt aktiviert. IL-8 Produktion: d) Signalweg, der direkt durch SR-A ausgelöst wird und zur IL-8 Produktion führt e) initialer Kontakt über SR-A der den physiologisch näherer Kontakt zu anderen Oberflächenrezeptoren gewährleistet und so über einen anderen Rezeptor zur Aktivierung eines Signalweg führt.

Die Ergebnisse zeigen, dass es der SR-A bei fast allen getesteten Meningokokkenstämmen wichtig für die Zytokininduktion ist, aber es gibt auch Stämme die nicht von SR-A erkannt werden und unabhängig von SR-A Zytokine induzieren, dazu zählt der das Trägerisolat  $\alpha$  14. Der SR-A hat ein breites Spektrum an Liganden und obwohl LPS als Ligand von SR-A zählt und  $\alpha$  14 genauso wie MC58 und 2120 dieselbe LPS Struktur hat, ist das LPS somit nicht der Ligand für die Zytokininduktion. Peiser *et al.* haben noch drei weitere Liganden identifiziert. Auch diese drei Proteine besitzt der Stamm  $\alpha$  14 genauso wie MC58 und 2120 (Schoen *et al.*, 2008). Daraus lässt sich schließen, dass es noch andere Liganden geben muss.

Beim Stamm  $\alpha$  14 ist Phagozytose auch ein wichtiges Ereignis um maximale Mengen an TNF- $\alpha$  zu produzieren, da mittels Cytochalasin D und Swinholid A eine signifikante Reduktion der TNF- $\alpha$  Produktion erfolgte (siehe 5.5.1).

---

Vermutlich ist ein anderer Rezeptor für die Phagozytose verantwortlich, wobei die Rezeptoren DC-SIGN oder der Mannose-Rezeptor ausgeschlossen werden konnten (siehe 5.7.1). Allerdings sind unreife DZ auch in der Lage über unspezifische, rezeptor-unabhängige Mechanismen Mikroorganismen aufzunehmen (Norbury, 2006).

#### **6.4.2 Dephosphorylierung von SR-A und die Aktivierung von Signalwegen**

Der Stamm MC58 $\Delta$ *siaD* wird über den SR-A rezeptorvermittelt phagozytiert und die Zytokinproduktion wird über SR-A beeinflusst. Hingegen erfolgt die Aufnahme von  $\alpha$  14 unabhängig von SR-A und ebenso die Induktion von Zytokinen. Die in 5.8 gezeigten Daten zeigen, dass der SR-A von DZ nach Infektion mit dem Meningokokkenstamm MC58 $\Delta$ *siaD* nach 2,5 Minuten dephosphoryliert wird, jedoch nach Infektion mit dem Stamm  $\alpha$  14 kein Unterschied im Phosphorylierungsstatus nachgewiesen werden konnte. Die Dephosphorylierung des SR-A könnte darauf schließen lassen, dass ein Signalweg aktiviert wird, der entweder die Phagozytose und/oder die Zytokinproduktion beeinflusst.

Die Infektion von DZ mit MC58 $\Delta$ *siaD* und die damit verbundene Dephosphorylierung ist entweder der Trigger für die Phagozytose oder die Phagozytose löst die Dephosphorylierung aus. Nachdem die zytoplasmatische Domäne des SR-A keine charakteristischen Merkmale aufweist, die für eine intrinsische Kinase- oder Phosphatase-Aktivität sprechen, muss eine zytoplasmatische Phosphatase dazu nötig sein den Rezeptor zu dephosphorylieren. Interessanterweise zeigt sich ein ganz anderes Bild für den Phosphorylierungsstatus des SR-A nach Kontakt von Makrophagen mit dem Low Density Lipoprotein (LDL), das wichtig bei artherosklerotischen Erkrankungen ist. Die Internalisation von modifiziertem LDL durch den Scavenger Rezeptor verläuft über Coated-Pit-abhängige Pinozytose (Mori *et al.*, 1994). Inkubiert man Maus Makrophagen in Medium mit [<sup>32</sup>P] Orthophosphat mit oxidiertem oder acetyliertem LDL kann man nach Immunpräzipitation des

---

SR-A mittels Phosphoaminoanalyse eine Serin-Phosphorylierung nach 0,5 min respektive 2,5 min nachweisen (Fong & Le, 1999). Nachdem gezeigt wurde, dass die Serin-Phosphorylierung des SR-A mit der Coated-Pit-abhängigen Pinozytose korreliert, könnte es möglich sein, dass die Dephosphorylierung mit der Phagozytose zusammenhängt.

Die Möglichkeit, dass die Dephosphorylierung des SR-A einen Signalweg auslöst der die Zytokinproduktion beeinflusst wurde bereits in 6.4.2 erörtert. Schon andere Daten zeigten, dass womöglich SR-A direkten Einfluss auf die Zytokinproduktion hat. So haben Kobayashi *et al.* gezeigt, dass SR-A Knock-out Mäuse nach Infektion mit LPS eine stark verminderte IL-1 Produktion aufwiesen (Kobayashi *et al.*, 2000), und es konnte gezeigt werden, dass durch oxidiertes LDL bei humanen Monozyten/Makrophagen TNF- $\alpha$  induziert wird (Jovinge *et al.*, 1996).

## 6.5 Fazit

Bekapselte Meningokokken induzieren nach Kontakt mit DZ signifikant weniger proinflammatorische Zytokine als unbekapselte Meningokokken. Inflammatorische Ereignisse sind bei der Pathogenese wichtig, um Bakterien zu eliminieren. Somit scheint ein kapselpolysaccharid-abhängiger Virulenzmechanismus hinter der reduzierten Zytokinproduktion zu stecken. Dieser Mechanismus begünstigt vor allem am Anfang der Pathogenese die Replikation des Pathogens. Da der Schweregrad des Krankheitsverlaufs mit erhöhten Zytokinmengen korreliert, scheint diese Reduktion der Zytokininduktion im Verlauf der Pathogenese eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Alle unbekapselten Meningokokkenstämme induzieren signifikant größere Mengen an Zytokinen als bekapselte Stämme, 24 h p.i. Dabei ist egal, ob sie über rezeptorvermittelte Phagozytose effektiv aufgenommen werden oder schlecht von DZ erkannt werden. Folglich ist nicht die Menge an phagozytierten Meningokokken für die maximale Zytokinproduktion verantwortlich. Jedoch ist dabei zu beachten, dass unbekapselte hypervirulente Stämme vor allem zeitlich gesehen schneller Zytokine induzieren als unbekapselte Trägerisolate.

Die Zytokinkonzentration ist wichtig für den Verlauf der Meningokokken-erkrankung und der SR-A ist wichtig für die Zytokinproduktion. Somit ist der SR-A von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese. Bei allen getesteten Stämmen, außer dem Stamm  $\alpha$  14, konnte man nachweisen, dass der SR-A auf DZ wichtig ist für die Zytokininduktion. Um genauere Aussagen über die Bedeutung des SR-A auf die rezeptorvermittelte Phagozytose und dessen Einfluss auf die Zytokinproduktion zu treffen, wäre es aufschlussreich, die Liganden der Meningokokken zu bestimmen, die die Phagozytose auslösen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Andersen, B.M., Solberg, O., 1988. Endotoxin liberation associated with growth, encapsulation and virulence of *Neisseria meningitidis*. *Scand J Infect Dis.* 20, 21-31.
- Andersson, L., Freeman, M.W., 1998. Functional changes in scavenger receptor binding conformation are induced by charge mutants spanning the entire collagen domain. *J Biol Chem.* 273, 19592-19601.
- Arakere, G., Frasch, C.E., 1991. Specificity of antibodies to O-acetyl-positive and O-acetyl-negative group C meningococcal polysaccharides in sera from vaccinees and carriers. *Infect Immun.* 59, 4349-4356.
- Asai, Y., Hashimoto, M., Ogawa, T., 2003. Treponemal glycoconjugate inhibits Toll-like receptor ligand-induced cell activation by blocking LPS-binding protein and CD14 functions. *Eur J Immunol.* 33, 3196-3204.
- Ashkenas, J., Penman, M., Vasile, E., Acton, S., Freeman, M., Krieger, M., 1993. Structures and high and low affinity ligand binding properties of murine type I and type II macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res.* 34, 983-1000.
- Asseffa, A., Dickson, L.A., Mohla, S., Bremner, T.A., 1993. Phorbol myristate acetate-differentiated THP-1 cells display increased levels of MHC class I and class II mRNA and interferon-gamma-inducible tumoricidal activity. *Oncol Res.* 5, 11-18.
- Ayala, P., Lin, L., Hopper, S., Fukuda, M., So, M., 1998. Infection of epithelial cells by pathogenic neisseriae reduces the levels of multiple lysosomal constituents. *Infect Immun.* 66, 5001-5007.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392, 245-252.
- Bell, D., Young, J.W., Banchereau, J., 1999. Dendritic cells. *Adv Immunol.* 72, 255-324.
- Berrington, A.W., Tan, Y.C., Srikhanta, Y., Kuipers, B., van der Ley, P., Peak, I.R., Jennings, M.P., 2002. Phase variation in meningococcal lipooligosaccharide biosynthesis genes. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 34, 267-275.
- Berry, D.S., Lynn, F., Lee, C.H., Frasch, C.E., 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., Smith, I.C., 1975. Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance. *J Biol Chem.* 250, 1926-1932.
- Bhattacharjee, A.K., Jennings, H.J., Kenny, C.P., Martin, A., Smith, I.C., 1976. Structural determination of the polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups Y, W-135, and BO1. *Can J Biochem.* 54, 1-8.
- Blackwell, T.S., Christman, J.W., 1996. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth.* 77, 110-117.
- Borrow, R., Joseph, H., Andrews, N., Acuna, M., Longworth, E., Martin, S., Peake, N., Rahim, R., Richmond, P., Kaczmarek, E., Miller, E., 2000.

- Reduced antibody response to revaccination with meningococcal serogroup A polysaccharide vaccine in adults. *Vaccine*. 19, 1129-1132.
- 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.
- Brandtzaeg, P., 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., Ovstebo, R., Kierulf, P., 1992a. Compartmentalization of lipopolysaccharide production correlates with clinical presentation in meningococcal disease. *J Infect Dis*. 166, 650-652.
- Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P., Espevik, T., Waage, A., 1992b. Molecular mechanisms in the compartmentalized inflammatory response presenting as meningococcal meningitis or septic shock. *Microb Pathog*. 13, 423-431.
- Brandtzaeg, P., Bjerre, A., Ovstebo, R., Brusletto, B., Joo, G.B., Kierulf, P., 2001. *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharides in human pathology. *J Endotoxin Res*. 7, 401-420.
- Brandtzaeg, P., Bryn, K., Kierulf, P., Ovstebo, R., Namork, E., Aase, B., Jantzen, E., 1992c. Meningococcal endotoxin in lethal septic shock plasma studied by gas chromatography, mass-spectrometry, ultracentrifugation, and electron microscopy. *J Clin Invest*. 89, 816-823.
- Broome, C.V., 1986. The carrier state: *Neisseria meningitidis*. *J Antimicrob Chemother*. 18 Suppl A, 25-34.
- Cartwright, K., Noah, N., Peltola, H., 2001. Meningococcal disease in Europe: epidemiology, mortality, and prevention with conjugate vaccines. Report of a European advisory board meeting Vienna, Austria, 6-8 October, 2000. *Vaccine*. 19, 4347-4356.
- Cartwright, K.A., Stuart, J.M., Jones, D.M., Noah, N.D., 1987. The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect*. 99, 591-601.
- Caugant, D.A., 1998. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *Apmis*. 106, 505-525.
- Caugant, D.A., Kristiansen, B.E., Froholm, L.O., Bovre, K., Selander, R.K., 1988. Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. *Infect Immun*. 56, 2060-2068.
- Claus, H., Vogel, U., Muhlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., 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., Maag, R., Frosch, M., 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., Vogel, U., 2004. Genetics of capsule O-acetylation in serogroup C, W-135 and Y meningococci. *Mol Microbiol*. 51, 227-239.
- Claus, H., Maiden, M.C., Wilson, D.J., McCarthy, N.D., Jolley, K.A., Urwin, R., Hessler, F., Frosch, M., Vogel, U., 2005. Genetic analysis of

- meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis.* 191, 1263-1271.
- Costerton, J.W., Irvin, R.T., Cheng, K.J., 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.* 35, 299-324.
- de Kleijn, E.D., Hazelzet, J.A., Kornelisse, R.F., de Groot, R., 1998. Pathophysiology of meningococcal sepsis in children. *Eur J Pediatr.* 157, 869-880.
- de Vries, F.P., Cole, R., Dankert, J., Frosch, M., van Putten, J.P., 1998. *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Mol Microbiol.* 27, 1203-1212.
- Dehio, C., Gray-Owen, S.D., Meyer, T.F., 1998. The role of neisserial Opa proteins in interactions with host cells. *Trends Microbiol.* 6, 489-495.
- Dehio, C., Gray-Owen, S.D., Meyer, T.F., 2000. Host cell invasion by pathogenic *Neisseriae*. *Subcell Biochem.* 33, 61-96.
- Dixon, G.L., Newton, P.J., Chain, B.M., Katz, D., Andersen, S.R., Wong, S., van der Ley, P., Klein, N., Callard, R.E., 2001. Dendritic cell activation and cytokine production induced by group B *Neisseria meningitidis*: interleukin-12 production depends on lipopolysaccharide expression in intact bacteria. *Infect Immun.* 69, 4351-4357.
- Doi, T., Kurasawa, M., Higashino, K., Imanishi, T., Mori, T., Naito, M., Takahashi, K., Kawabe, Y., Wada, Y., Matsumoto, A., et al., 1994. The histidine interruption of an alpha-helical coiled coil allosterically mediates a pH-dependent ligand dissociation from macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem.* 269, 25598-25604.
- Dongari-Bagtzoglou, A.I., Ebersole, J.L., 1996a. Gingival fibroblast cytokine profiles in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *J Periodontol.* 67, 871-878.
- Dongari-Bagtzoglou, A.I., Ebersole, J.L., 1996b. Production of inflammatory mediators and cytokines by human gingival fibroblasts following bacterial challenge. *J Periodontal Res.* 31, 90-98.
- Dunne, D.W., Resnick, D., Greenberg, J., Krieger, M., Joiner, K.A., 1994. The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 1863-1867.
- Elomaa, O., Kangas, M., Sahlberg, C., Tuukkanen, J., Sormunen, R., Liakka, A., Thesleff, I., Kraal, G., Tryggvason, K., 1995. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell.* 80, 603-609.
- Estabrook, M.M., Griffiss, J.M., Jarvis, G.A., 1997. Sialylation of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-N-neotetraose. *Infect Immun.* 65, 4436-4444.
- Estabrook, M.M., Zhou, D., Apicella, M.A., 1998. Nonopsonic phagocytosis of group C *Neisseria meningitidis* by human neutrophils. *Infect Immun.* 66, 1028-1036.
- Fong, L.G., Le, D., 1999. The processing of ligands by the class A scavenger receptor is dependent on signal information located in the cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 274, 36808-36816.
- Frasa, H., Procee, J., Torensma, R., Verbruggen, A., Algra, A., Rozenberg-Arska, M., Kraaijeveld, K., Verhoef, J., 1993. *Escherichia coli* in

- bacteremia: O-acetylated K1 strains appear to be more virulent than non-O-acetylated K1 strains. *J Clin Microbiol.* 31, 3174-3178.
- Frasch, C.E., Zollinger, W.D., Poolman, J.T., 1985. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis.* 7, 504-510.
- Frosch, M., Weisgerber, C., Meyer, T.F., 1989. Molecular characterization and expression in *Escherichia coli* of the gene complex encoding the polysaccharide capsule of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 1669-1673.
- Fusco, P.C., Farley, E.K., Huang, C.H., Moore, S., Michon, F., 2007. Protective meningococcal capsular polysaccharide epitopes and the role of O acetylation. *Clin Vaccine Immunol.* 14, 577-584.
- Gardlund, B., Sjolín, J., Nilsson, A., Roll, M., Wickerts, C.J., Wretling, B., 1995. Plasma levels of cytokines in primary septic shock in humans: correlation with disease severity. *J Infect Dis.* 172, 296-301.
- Geng, Y., Kodama, T., Hansson, G.K., 1994. Differential expression of scavenger receptor isoforms during monocyte-macrophage differentiation and foam cell formation. *Arterioscler Thromb.* 14, 798-806.
- Geng, Y.J., Hansson, G.K., 1995. High endothelial cells of postcapillary venules express the scavenger receptor in human peripheral lymph nodes. *Scand J Immunol.* 42, 289-296.
- Glode, M.P., Lewin, E.B., Sutton, A., Le, C.T., Gotschlich, E.C., Robbins, J.B., 1979. Comparative immunogenicity of vaccines prepared from capsular polysaccharides of group C *Neisseria meningitidis* O-acetyl-positive and O-acetyl-negative variants and *Escherichia coli* K92 in adult volunteers. *J Infect Dis.* 139, 52-59.
- Goldschneider, I., Gotschlich, E.C., Artenstein, M.S., 1969a. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *J Exp Med.* 129, 1327-1348.
- Goldschneider, I., Gotschlich, E.C., Artenstein, M.S., 1969b. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med.* 129, 1307-1326.
- Gotschlich, E.C., Liu, T.Y., Artenstein, M.S., 1969. Human immunity to the meningococcus. 3. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. *J Exp Med.* 129, 1349-1365.
- Gough, P.J., Greaves, D.R., Gordon, S., 1998. A naturally occurring isoform of the human macrophage scavenger receptor (SR-A) gene generated by alternative splicing blocks modified LDL uptake. *J Lipid Res.* 39, 531-543.
- Greenberg, J.W., Fischer, W., Joiner, K.A., 1996. Influence of lipoteichoic acid structure on recognition by the macrophage scavenger receptor. *Infect Immun.* 64, 3318-3325.
- Gudlavalleti, S.K., Datta, A.K., Tzeng, Y.L., Noble, C., Carlson, R.W., Stephens, D.S., 2004. The *Neisseria meningitidis* serogroup A capsular polysaccharide O-3 and O-4 acetyltransferase. *J Biol Chem.* 279, 42765-42773.
- Hackett, S.J., Thomson, A.P., Hart, C.A., 2001. Cytokines, chemokines and other effector molecules involved in meningococcal disease. *J Med Microbiol.* 50, 847-859.

- Hafsi, N., Volland, P., Schwendy, S., Rad, R., Reindl, W., Gerhard, M., Prinz, C., 2004. Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro. *J Immunol.* 173, 1249-1257.
- Hammerschmidt, S., Hilse, R., van Putten, J.P., Gerardy-Schahn, R., Unkmeir, A., 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., 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.
- Hampton, R.Y., Golenbock, D.T., Penman, M., Krieger, M., Raetz, C.R., 1991. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature.* 352, 342-344.
- Hart, D.N., 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood.* 90, 3245-3287.
- Hart, D.N., Prickett, T.C., McKenzie, J.L., Martin, M.L., Beard, M.E., 1989. Characterization of interstitial dendritic cells in human tissues. *Transplant Proc.* 21, 401-403.
- Haworth, R., Platt, N., Keshav, S., Hughes, D., Darley, E., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T., Gordon, S., 1997. The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *J Exp Med.* 186, 1431-1439.
- Hilse, R., Hammerschmidt, S., Bautsch, W., Frosch, M., 1996. Site-specific insertion of IS1301 and distribution in *Neisseria meningitidis* strains. *J Bacteriol.* 178, 2527-2532.
- Hoebe, K., Janssen, E., Beutler, B., 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 5, 971-974.
- Hsu, H.Y., Chiu, S.L., Wen, M.H., Chen, K.Y., Hua, K.F., 2001. Ligands of macrophage scavenger receptor induce cytokine expression via differential modulation of protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem.* 276, 28719-28730.
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L.C., Korn, J.M., Young, R.A., Lander, E.S., Hacohen, N., 2001. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science.* 294, 870-875.
- Hughes, D.A., Fraser, I.P., Gordon, S., 1995. Murine macrophage scavenger receptor: in vivo expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. *Eur J Immunol.* 25, 466-473.
- Ishiguro, T., Naito, M., Yamamoto, T., Hasegawa, G., Gejyo, F., Mitsuyama, M., Suzuki, H., Kodama, T., 2001. Role of macrophage scavenger receptors in response to *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Am J Pathol.* 158, 179-188.
- Iwasaki, A., Medzhitov, R., 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 5, 987-995.
- Janeway, C.A., Jr., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 20, 197-216.

- Jennings, H.J., Beurret, M., Gamian, A., Michon, F., 1987. Structure and immunochemistry of meningococcal lipopolysaccharides. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 53, 519-522.
- Jennings, M.P., Hood, D.W., Peak, I.R., Virji, M., Moxon, E.R., 1995a. Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*. 18, 729-740.
- Jennings, M.P., Srikhanta, Y.N., Moxon, E.R., Kramer, M., Poolman, J.T., Kuipers, B., van der Ley, P., 1999. The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*. 145 ( Pt 11), 3013-3021.
- Jennings, M.P., Bisercic, M., Dunn, K.L., Virji, M., Martin, A., Wilks, K.E., Richards, J.C., Moxon, E.R., 1995b. Cloning and molecular analysis of the *Isi1 (rfaF)* gene of *Neisseria meningitidis* which encodes a heptosyl-2-transferase involved in LPS biosynthesis: evaluation of surface exposed carbohydrates in LPS mediated toxicity for human endothelial cells. *Microb Pathog*. 19, 391-407.
- Jolley, K.A., Wilson, D.J., Kriz, P., McVean, G., Maiden, M.C., 2005. The influence of mutation, recombination, population history, and selection on patterns of genetic diversity in *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol*. 22, 562-569.
- Jones, D.M., Mallard, R.H., 1993. Age incidence of meningococcal infection England and Wales, 1984-1991. *J Infect*. 27, 83-88.
- Jones, D.M., Borrow, R., Fox, A.J., Gray, S., Cartwright, K.A., Poolman, J.T., 1992. The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. *Microb Pathog*. 13, 219-224.
- Jonuleit, H., Knop, J., Enk, A.H., 1996. Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch Dermatol Res*. 289, 1-8.
- Jovinge, S., Ares, M.P., Kallin, B., Nilsson, J., 1996. Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to Ox-LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 16, 1573-1579.
- Jozefowski, S., Arredouani, M., Sulahian, T., Kobzik, L., 2005. Disparate regulation and function of the class A scavenger receptors SR-AI/II and MARCO. *J Immunol*. 175, 8032-8041.
- Kirchner, M., Heuer, D., Meyer, T.F., 2005. CD46-independent binding of neisserial type IV pili and the major pilus adhesin, PilC, to human epithelial cells. *Infect Immun*. 73, 3072-3082.
- Klein, N.J., Ison, C.A., Peakman, M., Levin, M., Hammerschmidt, S., Frosch, M., Heyderman, R.S., 1996. The influence of capsulation and lipooligosaccharide structure on neutrophil adhesion molecule expression and endothelial injury by *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis*. 173, 172-179.
- Kobayashi, Y., Miyaji, C., Watanabe, H., Umezu, H., Hasegawa, G., Abo, T., Arakawa, M., Kamata, N., Suzuki, H., Kodama, T., Naito, M., 2000. Role of macrophage scavenger receptor in endotoxin shock. *J Pathol*. 192, 263-272.
- Kocabas, C., Katsenelson, N., Kanswal, S., Kennedy, M.N., Cui, X., Blake, M.S., Segal, D.M., Akkoyunlu, M., 2007. *Neisseria meningitidis* type C

- capsular polysaccharide inhibits lipooligosaccharide-induced cell activation by binding to CD14. *Cell Microbiol.* 9, 1297-1310.
- Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrecky, J., Matsudaira, P., Krieger, M., 1990. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature.* 343, 531-535.
- Kolb-Maurer, A., Unkmeir, A., Kammerer, U., Hubner, C., Leimbach, T., Stade, A., Kampgen, E., Frosch, M., Dietrich, G., 2001. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Infect Immun.* 69, 6912-6922.
- Kranzer, K., Sollner, L., Aigner, M., Lehn, N., Deml, L., Rehli, M., Schneider-Brachert, W., 2005. Impact of *Helicobacter pylori* virulence factors and compounds on activation and maturation of human dendritic cells. *Infect Immun.* 73, 4180-4189.
- Kranzer, K., Eckhardt, A., Aigner, M., Knoll, G., Deml, L., Speth, C., Lehn, N., Rehli, M., Schneider-Brachert, W., 2004. Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 72, 4416-4423.
- Krieger, M., Herz, J., 1994. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem.* 63, 601-637.
- Kurzai, O., Schmitt, C., Claus, H., Vogel, U., Frosch, M., Kolb-Maurer, A., 2005. Carbohydrate composition of meningococcal lipopolysaccharide modulates the interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Cell Microbiol.* 7, 1319-1334.
- Kwiatkowski, D., 2000. Genetic dissection of the molecular pathogenesis of severe infection. *Intensive Care Med.* 26 Suppl 1, S89-97.
- Lehmann, A.K., Halstensen, A., Sornes, S., Rokke, O., Waage, A., 1995. High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. *Infect Immun.* 63, 2109-2112.
- Leonard, E.J., Yoshimura, T., 1990. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1 [interleukin-8]). *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2, 479-486.
- Li, H., Freeman, M.W., Libby, P., 1995. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines. *J Clin Invest.* 95, 122-133.
- Liu, J., Shapiro, J.I., 2003. Endocytosis and signal transduction: basic science update. *Biol Res Nurs.* 5, 117-128.
- Liu, T.Y., Gotschlich, E.C., Dunne, F.T., Jonssen, E.K., 1971a. Studies on the meningococcal polysaccharides. II. Composition and chemical properties of the group B and group C polysaccharide. *J Biol Chem.* 246, 4703-4712.
- Liu, T.Y., Gotschlich, E.C., Jonssen, E.K., Wysocki, J.R., 1971b. Studies on the meningococcal polysaccharides. I. Composition and chemical properties of the group A polysaccharide. *J Biol Chem.* 246, 2849-2858.
- Longworth, E., Fernsten, P., Mininni, T.L., Vogel, U., Claus, H., Gray, S., Kaczmarek, E., Borrow, R., 2002. O-Acetylation status of the capsular polysaccharides of serogroup Y and W135 meningococci isolated in the UK. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 32, 119-123.
- Macagno, A., Molteni, M., Rinaldi, A., Bertoni, F., Lanzavecchia, A., Rossetti, C., Sallusto, F., 2006. A cyanobacterial LPS antagonist prevents endotoxin shock and blocks sustained TLR4 stimulation required for cytokine expression. *J Exp Med.* 203, 1481-1492.

- Mackinnon, F.G., Borrow, R., Gorrings, A.R., Fox, A.J., Jones, D.M., Robinson, A., 1993. Demonstration of lipooligosaccharide immunotype and capsule as virulence factors for *Neisseria meningitidis* using an infant mouse intranasal infection model. *Microb Pathog.* 15, 359-366.
- Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S.L., Nussenzweig, M., Steinman, R.M., 2000. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol.* 151, 673-684.
- Maiden, M.C., 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., Spratt, B.G., 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 3140-3145.
- Matsumoto, A., Naito, M., Itakura, H., Ikemoto, S., Asaoka, H., Hayakawa, I., Kanamori, H., Aburatani, H., Takaku, F., Suzuki, H., et al., 1990. Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 9133-9137.
- McNeely, T.B., Staub, J.M., Rusk, C.M., Blum, M.J., Donnelly, J.J., 1998. Antibody responses to capsular polysaccharide backbone and O-acetate side groups of *Streptococcus pneumoniae* type 9V in humans and rhesus macaques. *Infect Immun.* 66, 3705-3710.
- McNeil, G., Virji, M., Moxon, E.R., 1994. Interactions of *Neisseria meningitidis* with human monocytes. *Microb Pathog.* 16, 153-163.
- Meltzer, U., Goldblatt, D., 2006. Pneumococcal polysaccharides interact with human dendritic cells. *Infect Immun.* 74, 1890-1895.
- Mertsola, J., 1991. Cytokines in the pathogenesis of bacterial meningitis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 85 Suppl 1, 17-18.
- Meyer, T.F., van Putten, J.P., 1989. Genetic mechanisms and biological implications of phase variation in pathogenic neisseriae. *Clin Microbiol Rev.* 2 Suppl, S139-145.
- Mogensen, T.H., Paludan, S.R., Kilian, M., Ostergaard, L., 2006. Two *neisseria meningitidis* strains with different ability to stimulate toll-like receptor 4 through the MyD88-independent pathway. *Scand J Immunol.* 64, 646-654.
- Monari, C., Bistoni, F., Casadevall, A., Pericolini, E., Pietrella, D., Kozel, T.R., Vecchiarelli, A., 2005. Glucuronoxylomannan, a microbial compound, regulates expression of costimulatory molecules and production of cytokines in macrophages. *J Infect Dis.* 191, 127-137.
- Mori, T., Takahashi, K., Naito, M., Kodama, T., Hakamata, H., Sakai, M., Miyazaki, A., Horiuchi, S., Ando, M., 1994. Endocytic pathway of scavenger receptors via trans-Golgi system in bovine alveolar macrophages. *Lab Invest.* 71, 409-416.
- Mukhopadhyay, S., Chen, Y., Sankala, M., Peiser, L., Pikkarainen, T., Kraal, G., Tryggvason, K., Gordon, S., 2006. MARCO, an innate activation marker of macrophages, is a class A scavenger receptor for *Neisseria meningitidis*. *Eur J Immunol.* 36, 940-949.
- Musher, D.M., 2003. How contagious are common respiratory tract infections? *N Engl J Med.* 348, 1256-1266.

- Naito, M., Suzuki, H., Mori, T., Matsumoto, A., Kodama, T., Takahashi, K., 1992. Coexpression of type I and type II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 141, 591-599.
- Nakagawa, T.Y., Rudensky, A.Y., 1999. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol Rev.* 172, 121-129.
- Namork, E., Brandtzaeg, P., 2002. Fatal meningococcal septicaemia with "blebbing" meningococcus. *Lancet.* 360, 1741.
- Nassif, X., So, M., 1995. Interaction of pathogenic neisseriae with nonphagocytic cells. *Clin Microbiol Rev.* 8, 376-388.
- Norbury, C.C., 2006. Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology.* 117, 443-451.
- Orskov, F., Orskov, I., Sutton, A., Schneerson, R., Lin, W., Egan, W., Hoff, G.E., Robbins, J.B., 1979. Form variation in *Escherichia coli* K1: determined by O-acetylation of the capsular polysaccharide. *J Exp Med.* 149, 669-685.
- Parton, R.G., Richards, A.A., 2003. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic.* 4, 724-738.
- Pavliak, V., Brisson, J.R., Michon, F., Uhrin, D., Jennings, H.J., 1993. Structure of the sialylated L3 lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem.* 268, 14146-14152.
- Peiser, L., De Winther, M.P., Makepeace, K., Hollinshead, M., Coull, P., Plested, J., Kodama, T., Moxon, E.R., Gordon, S., 2002. The class A macrophage scavenger receptor is a major pattern recognition receptor for *Neisseria meningitidis* which is independent of lipopolysaccharide and not required for secretory responses. *Infect Immun.* 70, 5346-5354.
- Peiser, L., Makepeace, K., Pluddemann, A., Savino, S., Wright, J.C., Pizza, M., Rappuoli, R., Moxon, E.R., Gordon, S., 2006. Identification of *Neisseria meningitidis* nonlipopolysaccharide ligands for class A macrophage scavenger receptor by using a novel assay. *Infect Immun.* 74, 5191-5199.
- Peltola, H., 1983. Meningococcal disease: still with us. *Rev Infect Dis.* 5, 71-91.
- Pier, G.B., Coleman, F., Grout, M., Franklin, M., Ohman, D.E., 2001. Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect Immun.* 69, 1895-1901.
- Platt, N., Gordon, S., 2001. Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? - The mouse's tale. *J Clin Invest.* 108, 649-654.
- Platt, N., da Silva, R.P., Gordon, S., 1998. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol.* 8, 365-372.
- Pluddemann, A., Neyen, C., Gordon, S., Peiser, L., 2008. A sensitive solid-phase assay for identification of class A macrophage scavenger receptor ligands using cell lysate. *J Immunol Methods.* 329, 167-175.
- Poolman, J.T., Kriz-Kuzemenska, P., Ashton, F., Bibb, W., Dankert, J., Demina, A., Froholm, L.O., Hassan-King, M., Jones, D.M., Lind, I., et al., 1995. Serotypes and subtypes of *Neisseria meningitidis*: results of an international study comparing sensitivities and specificities of monoclonal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2, 69-72.
- Prickett, T.C., McKenzie, J.L., Hart, D.N., 1988. Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation.* 46, 754-761.

- Pridmore, A.C., Wyllie, D.H., Abdillahi, F., Steeghs, L., van der Ley, P., Dower, S.K., Read, R.C., 2001. A lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis* elicits attenuated cytokine release by human macrophages and signals via toll-like receptor (TLR) 2 but not via TLR4/MD2. *J Infect Dis.* 183, 89-96.
- Pron, B., Taha, M.K., Rambaud, C., Fournet, J.C., Pattey, N., Monnet, J.P., Musilek, M., Beretti, J.L., Nassif, X., 1997. Interaction of *Neisseria meningitidis* with the components of the blood-brain barrier correlates with an increased expression of Pili. *J Infect Dis.* 176, 1285-1292.
- Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R.P., Dusold, R., Rubino, S., Baumler, A.J., 2005. The Vi capsular antigen of *Salmonella enterica* serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. *Infect Immun.* 73, 3367-3374.
- Read, R.C., Zimmerli, S., Broaddus, C., Sanan, D.A., Stephens, D.S., Ernst, J.D., 1996. The (alpha2-->8)-linked polysialic acid capsule of group B *Neisseria meningitidis* modifies multiple steps during interaction with human macrophages. *Infect Immun.* 64, 3210-3217.
- Resnick, D., Chatterton, J.E., Schwartz, K., Slayter, H., Krieger, M., 1996. Structures of class A macrophage scavenger receptors. Electron microscopic study of flexible, multidomain, fibrous proteins and determination of the disulfide bond pattern of the scavenger receptor cysteine-rich domain. *J Biol Chem.* 271, 26924-26930.
- Richmond, P., Borrow, R., Findlow, J., Martin, S., Thornton, C., Cartwright, K., Miller, E., 2001. Evaluation of De-O-acetylated meningococcal C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine in infancy: reactogenicity, immunogenicity, immunologic priming, and bactericidal activity against O-acetylated and De-O-acetylated serogroup C strains. *Infect Immun.* 69, 2378-2382.
- Rohrer, L., Freeman, M., Kodama, T., Penman, M., Krieger, M., 1990. Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II. *Nature.* 343, 570-572.
- Rosenberger, C.M., Finlay, B.B., 2003. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 385-396.
- Rosenstein, N.E., Perkins, B.A., Stephens, D.S., Popovic, T., Hughes, J.M., 2001. Meningococcal disease. *N Engl J Med.* 344, 1378-1388.
- Rubinstein, L.J., Stein, K.E., 1988a. Murine immune response to the *Neisseria meningitidis* group C capsular polysaccharide. II. Specificity. *J Immunol.* 141, 4357-4362.
- Rubinstein, L.J., Stein, K.E., 1988b. Murine immune response to the *Neisseria meningitidis* group C capsular polysaccharide. I. Ontogeny. *J Immunol.* 141, 4352-4356.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 179, 1109-1118.
- Schneider, M.C., Exley, R.M., Ram, S., Sim, R.B., Tang, C.M., 2007. Interactions between *Neisseria meningitidis* and the complement system. *Trends Microbiol.* 15, 233-240.

- Schoen, C., Blom, J., Claus, H., Schramm-Gluck, A., Brandt, P., Muller, T., Goesmann, A., Joseph, B., Konietzny, S., Kurzai, O., Schmitt, C., Friedrich, T., Linke, B., Vogel, U., Frosch, M., 2008. Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Scholten, R.J., Kuipers, B., Valkenburg, H.A., Dankert, J., Zollinger, W.D., Poolman, J.T., 1994. Lipo-oligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies. *J Med Microbiol.* 41, 236-243.
- Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V., 1989. Global epidemiology of meningococcal disease. *Clin Microbiol Rev.* 2 Suppl, S118-124.
- Singleton, T.E., Massari, P., Wetzler, L.M., 2005. Neisserial porin-induced dendritic cell activation is MyD88 and TLR2 dependent. *J Immunol.* 174, 3545-3550.
- Sorensen, H.T., Steffensen, F.H., Schonheyder, H.C., Nielsen, G.L., Hansen, I., Madsen, K.M., Hamburger, H., 1998. Trend in incidence and case fatality of meningococcal disease over 16 years in Northern Denmark. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 17, 690-694.
- Sprong, T., van der Ley, P., Steeghs, L., Taw, W.J., Verver-Janssen, T.J., Netea, M.G., van der Meer, J.W., van Deuren, M., 2002. *Neisseria meningitidis* can induce pro-inflammatory cytokine production via pathways independent from CD14 and toll-like receptor 4. *Eur Cytokine Netw.* 13, 411-417.
- Sprong, T., Stikkelbroeck, N., van der Ley, P., Steeghs, L., van Alphen, L., Klein, N., Netea, M.G., van der Meer, J.W., van Deuren, M., 2001. Contributions of *Neisseria meningitidis* LPS and non-LPS to proinflammatory cytokine response. *J Leukoc Biol.* 70, 283-288.
- Steinman, R.M., 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 9, 271-296.
- Stephens, D.S., 1999. Uncloaking the meningococcus: dynamics of carriage and disease. *Lancet.* 353, 941-942.
- Stephens, D.S., McGee, Z.A., 1983. Association of virulence of *Neisseria meningitidis* with transparent colony type and low-molecular-weight outer membrane proteins. *J Infect Dis.* 147, 282-292.
- Stephens, D.S., Hoffman, L.H., 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., Spellman, P.A., Swartley, J.S., 1993. Effect of the ( $\alpha$  2-->8)-linked polysialic acid capsule on adherence of *Neisseria meningitidis* to human mucosal cells. *J Infect Dis.* 167, 475-479.
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Sakaguchi, H., Kruijt, J.K., Higashi, T., Suzuki, T., van Berkel, T.J., Horiuchi, S., Takahashi, K., Yazaki, Y., Kodama, T., 1997a. The multiple roles of macrophage scavenger receptors (MSR) in vivo: resistance to atherosclerosis and susceptibility to infection in MSR knockout mice. *J Atheroscler Thromb.* 4, 1-11.
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H.,

- Yazaki, Y., Kodama, T., et al., 1997b. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*. 386, 292-296.
- Swartley, J.S., Marfin, A.A., Edupuganti, S., Liu, L.J., Cieslak, P., Perkins, B., Wenger, J.D., Stephens, D.S., 1997. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 271-276.
- Takeda, K., Akira, S., 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 16, 3-9.
- Tsai, C.M., Mocca, L.F., Frasch, C.E., 1987. Immunotype epitopes of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide types 1 through 8. *Infect Immun*. 55, 1652-1656.
- Unkmeir, A., Kammerer, U., Stade, A., Hubner, C., Haller, S., Kolb-Maurer, A., Frosch, M., Dietrich, G., 2002. Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human dendritic cells. *Infect Immun*. 70, 2454-2462.
- Uronen, H., Williams, A.J., Dixon, G., Andersen, S.R., Van Der Ley, P., Van Deuren, M., Callard, R.E., Klein, N., 2000. Gram-negative bacteria induce proinflammatory cytokine production by monocytes in the absence of lipopolysaccharide (LPS). *Clin Exp Immunol*. 122, 312-315.
- Uronen-Hansson, H., Allen, J., Osman, M., Squires, G., Klein, N., Callard, R.E., 2004a. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 are present inside human dendritic cells, associated with microtubules and the Golgi apparatus but are not detectable on the cell surface: integrity of microtubules is required for interleukin-12 production in response to internalized bacteria. *Immunology*. 111, 173-178.
- Uronen-Hansson, H., Steeghs, L., Allen, J., Dixon, G.L., Osman, M., van der Ley, P., Wong, S.Y., Callard, R., Klein, N., 2004b. Human dendritic cell activation by *Neisseria meningitidis*: phagocytosis depends on expression of lipooligosaccharide (LOS) by the bacteria and is required for optimal cytokine production. *Cell Microbiol*. 6, 625-637.
- Vaara, M., 1999. Lipopolysaccharide and the permeability of the bacterial outer membrane. In *Endotoxin in Health and Disease*. Brade, H., Opal, S.M., Vogel, S.N., and Morrison, D.C. (eds). New York: Marcel Dekker, pp. 31-38.
- Vaara, M., Nurminen, M., 1999. Outer membrane permeability barrier in *Escherichia coli* mutants that are defective in the late acyltransferases of lipid A biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother*. 43, 1459-1462.
- van der Ley, P., Steeghs, L., 2003. Lessons from an LPS-deficient *Neisseria meningitidis* mutant. *J Endotoxin Res*. 9, 124-128.
- van Deuren, M., van der Ven-Jongekrijg, J., Bartelink, A.K., van Dalen, R., Sauerwein, R.W., van der Meer, J.W., 1995. Correlation between proinflammatory cytokines and antiinflammatory mediators and the severity of disease in meningococcal infections. *J Infect Dis*. 172, 433-439.
- van Deuren, M., van der Ven-Jongekrijg, J., Demacker, P.N., Bartelink, A.K., van Dalen, R., Sauerwein, R.W., Gallati, H., Vannice, J.L., van der Meer, J.W., 1994. Differential expression of proinflammatory cytokines and their inhibitors during the course of meningococcal infections. *J Infect Dis*. 169, 157-161.
- Vedros, N.A., 1987. Development of meningococcal serogroups. In *Evolution of*

- meningococcal disease. Boca Raton: CRC Press,, pp. 33-37.
- Verheul, A.F., Snippe, H., Poolman, J.T., 1993. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. *Microbiol Rev.* 57, 34-49.
- Villwock, A., Schmitt, C., Frosch, M., Kurzai, O., 2007. Capsule acetylation does not impair recognition of serogroup C, W-135 and Y meningococci by human dendritic cells. *Int J Med Microbiol.*
- Virji, M., 1999. Glycans in meningococcal pathogenesis. *Biochem Soc Trans.* 27, 498-507.
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D.J., Achtman, M., Moxon, E.R., 1993a. Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol.* 10, 499-510.
- Virji, M., Saunders, J.R., Sims, G., Makepeace, K., Maskell, D., Ferguson, D.J., 1993b. Pilus-facilitated adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells: modulation of adherence phenotype occurs concurrently with changes in primary amino acid sequence and the glycosylation status of pilin. *Mol Microbiol.* 10, 1013-1028.
- Virji, M., Makepeace, K., Peak, I.R., Ferguson, D.J., Jennings, M.P., 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.
- Vogel, U., Frosch, M., 1999. Mechanisms of neisserial serum resistance. *Mol Microbiol.* 32, 1133-1139.
- Vogel, U., Claus, H., Heinze, G., Frosch, M., 1999. Role of lipopolysaccharide sialylation in serum resistance of serogroup B and C meningococcal disease isolates. *Infect Immun.* 67, 954-957.
- Waage, A., Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P., Espevik, T., 1989a. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med.* 169, 333-338.
- Waage, A., Halstensen, A., Shalaby, R., Brandtzaeg, P., Kierulf, P., Espevik, T., 1989b. 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., Morelli, G., Koumare, B., Achtman, M., 1993. Antigenic and epidemiologic properties of the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis.* 167, 1320-1329.
- Waring, P.M., Waring, L.J., Metcalf, D., 1994. Circulating leukemia inhibitory factor levels correlate with disease severity in meningococemia. *J Infect Dis.* 170, 1224-1228.
- Weber, M.V., Claus, H., Maiden, M.C., Frosch, M., Vogel, U., 2006. Genetic mechanisms for loss of encapsulation in polysialyltransferase-gene-positive meningococci isolated from healthy carriers. *Int J Med Microbiol.* 296, 475-484.
- Westendorp, R.G., Langermans, J.A., Huizinga, T.W., Verweij, C.L., Sturk, A., 1997a. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet.* 349, 1912-1913.
- Westendorp, R.G., Langermans, J.A., de Bel, C.E., Meinders, A.E., Vandenbroucke, J.P., van Furth, R., van Dissel, J.T., 1995. Release of

- tumor necrosis factor: an innate host characteristic that may contribute to the outcome of meningococcal disease. *J Infect Dis.* 171, 1057-1060.
- Westendorp, R.G., Langermans, J.A., Huizinga, T.W., Elouali, A.H., Verweij, C.L., Boomsma, D.I., Vandenbroucke, J.P., 1997b. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet.* 349, 170-173.
- Wright, S.D., 1991. Multiple receptors for endotoxin. *Curr Opin Immunol.* 3, 83-90.
- 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., Maiden, M.C., 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.
- Zhou, D., Lee, N.G., Apicella, M.A., 1994. Lipooligosaccharide biosynthesis in *Neisseria gonorrhoeae*: cloning, identification and characterization of the alpha 1,5 heptosyltransferase I gene (*rfaC*). *Mol Microbiol.* 14, 609-618.
- Zhu, P., Tsai, C.M., Frasch, C.E., 2002a. Immunologic and genetic characterization of lipooligosaccharide variants in a *Neisseria meningitidis* serogroup C strain. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 34, 193-200.
- Zhu, P., Klutch, M.J., Bash, M.C., Tsang, R.S., Ng, L.K., Tsai, C.M., 2002b. Genetic diversity of three *lgt* loci for biosynthesis of lipooligosaccharide (LOS) in *Neisseria* species. *Microbiology.* 148, 1833-1844.
- Zughaier, S.M., Tzeng, Y.L., Zimmer, S.M., Datta, A., Carlson, R.W., Stephens, D.S., 2004. *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide structure-dependent activation of the macrophage CD14/Toll-like receptor 4 pathway. *Infect Immun.* 72, 371-380.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

-	Minus
+	Plus
%	Prozent
<	kleiner als
>	größer als
Δ	Deletion
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiammintetraacetat
<i>et al.</i>	et alii (lat. und andere)
etc.	et cetera (und so weiter)
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
g	Gramm
g	Gravitation (Erdbeschleunigung)

---

h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
kb	Kilobasen
L	Liter
μ	10 <sup>-6</sup> (mikro)
μM	mikromolar
m	10 <sup>-3</sup> (milli)
mM	millimolar
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger Ribonukleinsäure)
MW	Mittelwert
n	10 <sup>-9</sup> (nano)
nM	Nanomolar
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Kettenreaktion
p.i.	nach Infektion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
sec	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Nukleotidaustausch)
Tab.	Tabelle
TBE	Trisborat, EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Enzymaktivität
V	Volt
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Σ	Summe

## 8.2 Publikationsliste

### Publikationen

- Februar 2008 Recognition via scavenger receptor class A modulates cytokine secretion by human dendritic cells after contact with *Neisseria meningitidis*, Andrea Villwock, Corinna Schmitt, Matthias Frosch, Oliver Kurzai (submitted)
- Dezember 2007 Cellular response of the innate immune system in meningococcal colonization and disease, Review, Corinna Schmitt, Andrea Villwock, Oliver Kurzai, International Journal of Medical Microbiology (invited review)
- Dezember 2007 Capsule acetylation does not impair recognition of serogroup C, W-135 and Y meningococci by human dendritic cells, Andrea Villwock, Corinna Schmitt, Matthias Frosch, Oliver Kurzai, International Journal of Medical Microbiology, 2007 Dec. 28
- Mai 2005 Cultivation of the Rhabditid *Poikilolaimus oxycercus* as a Laboratory Nematode for Genetic Analysis, Ray L. Hong, Andrea Villwock and Ralf J. Sommer, Journal of Experimental Zoology 303A:742-760

### Vorträge

- Oktober 2006 Capsule Expression of *Neisseria meningitidis* impairs Cytokine Secretion of Dendritic Cells, DGHM in Würzburg

### Posterpräsentation

- September 2006 Cytokine Induction in Dendritic Cells is influenced by Capsule Expression of *Neisseria meningitidis*, Summer School auf Spetses/Griechenland
- Dezember 2005 Regulation of Immunity by Dendritic Cells after Contact with *Neisseria meningitidis*, Network of Excellence (NoE) in Würzburg
- Oktober 2005 The SRA is a major Pattern Recognition Receptor for *N. meningitidis*, DGHM in Göttingen
- Mai 2004 Molecular and Genetic Analysis of the Nematode *Poikilolaimus oxycerca*, *C.elegans*-Meeting in Interlaken/Schweiz

### 8.3 Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Matthias Frosch für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor durchführen zu können und für die hervorragende technische Ausstattung.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Betreuer Dr. Oliver Kurzai für die Unterstützung und kompetente Regie dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Kreft danke ich für die Bereitschaft als Gutachter dieser Arbeit an der Fakultät für Biologie der Universität Würzburg zu fungieren.

Aus der AG Kurzai bleiben mir Anke Hornbach, Steffi Schielke, Corinna Schmitt, Nina Trzeciak, Martin Weber, Iwona Wozniok in guter Erinnerung.

Mein ganz besonderer Dank von der AG Kurzai gilt Iwona Wozniok und Steffi Schielke für ihren ausgesprochen angenehmen Umgang, die wertvollen Diskussionen und stetige Unterstützung.

Ausdrücklich möchte ich mich bei Nina Trzeciak für die technische Assistenz bedanken.

Bei Julia Batzilla, Anja Halscheidt, Tessa van Alen und bei vielen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern möchte ich mich für ihre angenehme Atmosphäre außerhalb und innerhalb des Instituts bedanken.

Und natürlich möchte ich mich an bei allen freiwilligen Blutspendern bedanken, auch wenn es dem Einen oder dem Anderen dann doch eher schwer fiel auf den Beinen zu bleiben.

Nicht zu letzt, geht mein größter Dank an meine Familie für ihr Vertrauen, ihre Motivation und ihre stetige Unterstützung.

## 8.4 Lebenslauf

---

### Persönliche Daten

Name	Andrea Villwock
Geburtstag	21.11.1978
Geburtsort	Böblingen
Staatsangehörigkeit	deutsch

---

### Wissenschaftliche Anstellung

Okt. 2004 - Feb. 2008	Julius-Maximilians-Universität Würzburg <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausarbeitung der Doktorarbeit am Institut für Hygiene und Mikrobiologie mit dem Thema: Bedeutung des Klasse A Scavenger Rezeptors für die Zytokinsekretion von humanen dendritischen Zellen nach Kontakt mit dem humanen Pathogen <i>Neisseria meningitidis</i></li> </ul>
-----------------------	---

---

### Universitäre Bildung

Okt. 1998 - Jul. 2004	Biologie (Diplom) Eberhard-Karls-Universität Tübingen <ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwerpunktfächer: Mikrobiologie, Zellbiologie, Virologie</li> <li>• Ausarbeitung der Diplomarbeit in englischer Sprache am Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie mit dem Thema: Marker assisted Domestication of the Nematode <i>Poikilolaimus oxycerca</i> as Laboratory Species</li> </ul>
-----------------------	---

---

### Schulbildung

1989 - 1998	Schönbuchgymnasium, Holzgerlingen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife/Abitur
1985 - 1989	Grundschule Weil im Schönbuch und Breitenstein