

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

**Mechanismen der Serumresistenz von Serogruppe A
Meningokokken unter besonderer Berücksichtigung
der Kapsel und des Lipopolysaccharids**

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

**vorgelegt von
Silke Getzlaff
aus Böblingen**

Würzburg, Dezember 2004

Referent: Prof. Dr. U. Vogel

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. M. Eigenthaler

Dekan: Prof. Dr. G. Ertl

Tag der Mündlichen Prüfung: 13. Mai 2005

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Neisseria meningitidis</i> allgemein.....	1
1.1.1	Historischer Rückblick	1
1.1.2	Epidemiologie	2
1.1.3	<i>Lifestyle</i> von <i>Neisseria meningitidis</i>	3
1.2	Aufbau und Struktur von Meningokokken.....	5
1.2.1	Polysaccharidkapsel	6
1.2.2	Lipopolysaccharid (LPS).....	7
1.2.3	Äußere Membranproteine	10
1.2.4	Serologische Klassifizierung von Meningokokken.....	10
1.3	Das Komplementsystem.....	10
1.3.1	Aktivierungswege des Komplementsystems	11
1.3.2	Die zentrale Rolle des C3 Moleküls.....	14
1.3.3	C5 Konvertasen und der Membranangriffskomplex.....	15
1.3.4	Komplement regulierende Faktoren.....	16
1.3.5	Komplementsystem und Infektion	17
1.3.6	Interaktion zwischen Komplementsystem und <i>Neisserien</i> ; vorangegangene Studien	19
1.4	Fragestellung	22
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Geräteliste	24
2.2	Materialien.....	24
2.3	Antikörperliste	27
2.4	Bakterienstämme und Mutanten.....	29
2.4.1	Wildtypstämme	29
2.4.2	Beschreibung der Mutanten.....	30

2.5	Tricin Silbergel zur LPS Darstellung	33
2.5.1	LPS Schnellpräparation	33
2.5.2	Tricingel	33
2.5.3	Silberfärbung für Tricingel	35
2.6	Serumgewinnung.....	37
2.7	ELISA	37
2.7.1	ELISA zum Nachweis von Kapsel und LPS Struktur.....	37
2.7.2	ELISA zur Detektion von C3b und MAC	38
2.8	Semiquantitative Detektion von C3b mittels Western Blot	40
2.8.1	Inkubation der Bakterien mit Serum.....	40
2.8.2	Elektrophorese.....	41
2.8.3	Blotting und Entwicklung der Nitrocellulosemembran.....	43
2.8.4	Silberfärbung des <i>SDS-Page</i> Gel	44
2.9	Bakterizidietest.....	45
2.10	FACS (<i>Analytical Flow Cytometry</i>)	46
2.11	Statistik.....	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Einführung	50
3.2	Charakterisierung und Überprüfung der Mutanten.....	50
3.2.1	Isogene Kapsel- und LPS- Mutanten von <i>Neisseria meningitidis</i> der Serogruppe A.....	50
3.2.2	Isogene Kapsel- und LPS Mutanten von Meningokokken mit sialinsäurehaltigen Kapseln.....	54
3.3	Serumresistenz von <i>Neisseria meningitidis</i> der Serogruppe A.....	55
3.3.1	Der Einfluss der Polysaccharidkapsel	56
3.3.2	Der Einfluss des LPS auf Serumresistenz von bekapselten Mutanten der Serogruppe A.....	64
3.4	Einfluss des LPS auf die Serumresistenz; unbekapselte Mutanten	66
3.4.1	Einfluss von Sialinsäure auf die Serumresistenz.....	66
3.4.2	Serumresistenz von unbekapselten L8 Mutanten.....	73

4	Diskussion.....	77
4.1	Erstellung isogener Mutanten.....	77
4.2	Einfluss der Polysaccharidkapsel auf die Serumresistenz.....	78
4.3	Einfluss des LPS auf die Serumresistenz.....	82
4.3.1	Bekapselte Bakterien.....	82
4.3.2	Unbekapselte Mutanten.....	84
5	Zusammenfassung.....	89
6	Anhang.....	91
6.1	Kontrollen der FACS Experimente.....	91
6.2	Abkürzungsverzeichnis.....	94
7	Literaturverzeichnis.....	97
8	Danksagung	
9	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 *Neisseria meningitidis* allgemein

1.1.1 Historischer Rückblick

Neisseria meningitidis wurde 1887 von Anton Weichselbaum in Wien entdeckt, der das Bakterium aus einem Meningealexsudat isolieren konnte [153]. Acht Jahre später gelang es erstmals *Neisseria meningitidis* bei einem lebenden Patienten, der akut an Meningitis erkrankt war, im Liquor nachzuweisen [61]. Trotz Identifikation des Erregers, stand man der Infektion lange Zeit machtlos gegenüber. Erst die Einführung der Sulfonamide machte eine spezifische antimikrobielle Therapie möglich. Im Jahr 1937 veröffentlichten Schwentker *et al.* die erfolgreiche Behandlung von Meningitispatienten mit Sulfonamiden [131]. Gegen Ende des zweiten Weltkrieges war ebenfalls das von Fleming entdeckte Penicillin zur Behandlung verfügbar, wobei lange Zeit weiterhin Sulfonamide als Standardtherapeutikum verwendet wurden.

Nachdem wirkungsvolle Antibiotika vorhanden waren, rückte die Prävention der Erkrankung weiter in den Vordergrund. Gotschlich *et al.* gelang in den 60er Jahren in Zusammenarbeit mit dem amerikanischen Militär die Entwicklung einer Impfung aus aufgereinigtem Kapselpolysaccharid [47]. Heute sind konjugierte Vakzinen gegen Meningokokken der Serogruppen A/C und A/C/W/Y erhältlich. Die Entwicklung einer Vakzine gegen Serogruppe B Meningokokken ist Gegenstand intensiver Forschungstätigkeiten, hoffnungsvoll wird die Forschung an Vakzinen durch OMV (*outer membrane vesicles*) Präparationen beobachtet [71]. Die Veröffentlichung der ersten vollständigen Genomsequenz des Serogruppe B Stammes MC 58 [141] eröffnete neue Möglichkeiten im Bereich der Neisserienforschung und der Entwicklung von Vakzinen. Es folgte die Sequenzierung des Genoms von Serogruppe A Stamm Z2491 [114] im Jahr 2000. An der Veröffentlichung des Genoms des Stammes FAM18 der Serogruppe C wird derzeit noch gearbeitet [Sanger Institute, UK]. Heute, mehr als hundert Jahre nach der Entdeckung von *Neisseria meningitidis*, bleiben noch viele Fragen offen; beispielsweise sind die genauen Pathomechanismen der Meningokokkeninfektion und die Interaktion des Bakteriums mit dem Immunsystem noch nicht vollständig

aufgeklärt. Daher ist und wird das Bakterium *Neisseria meningitidis* weiterhin Gegenstand reger Forschungsaktivität bleiben.

1.1.2 Epidemiologie

Ausbrüche von Meningokokkeninfektionen kommen überall auf der Welt vor. In der westlichen Welt tritt die Meningokokkeninfektion meist endemisch mit einer Inzidenz von ungefähr 1/100 000 auf, wobei die Erkrankungen überwiegend von *Neisseria meningitidis* der Serogruppe B oder C verursacht werden [126]. Es kommt zu einer saisonalen Häufung in den Wintermonaten. Zum einen erhöht das Zusammenleben auf engerem Raum in der kalten Jahreszeit die Übertragungsrate von Meningokokken. Ausserdem führen vermehrt auftretende Infekte des Nasenrachenraumes zu einer Vulnerabilität der Schleimhautbarriere [63] [12]. Es können zwei altersabhängige Krankheitshäufungen in der Bevölkerung beobachtet werden. Der erste Erkrankungsgipfel tritt während des Kleinkindalters auf, mit den meisten Erkrankungen im ersten Lebensjahr; ein zweiter Erkrankungsgipfel ist im jungen Erwachsenenalter zu verzeichnen [78] [76].

Im Gegensatz zu den meist endemisch auftretenden Meningokokkeninfektionen der westlichen Welt, kommt es im afrikanischen Meningitisgürtel, der sich von Äthiopien im Osten bis zum Senegal im Westen erstreckt, zu großen Epidemien mit vielen Todesopfern [52]. Im größten bislang beschriebenen Ausbruch 1996/97 waren 300 000 Erkrankungen mit 30 000 Todesfällen zu beklagen [144]. Verursacht werden die Erkrankungen fast ausschließlich von Meningokokken der Serogruppe A, die dadurch ein großes globales Problem darstellen. Die Epidemien im Meningitisgürtel treten in regelmäßigen 5-10 Jahresintervallen auf, wobei die Inzidenz während einer Epidemie zwischen 500-1000/ pro 100 000 Einwohner liegt. Es kann ebenfalls eine jahreszeitliche Abhängigkeit der Erkrankung beobachtet werden; ein Ausbruch beginnt in der Trockenzeit und findet sein Ende mit dem Beginn der Regenzeit [51].

Während Serogruppe B und C Meningokokken einen Grossteil der Erkrankungen in der westlichen Welt auslösen und Serogruppe A Meningokokken für große Epidemien im südlichen Afrika verantwortlich sind,

verursachen Neisserien der Serogruppe W135 und Serogruppe Y nur relativ selten eine systemische Meningokokkenkrankung. Zunehmend können jedoch kleinere Ausbrüche von Meningokokkeninfektionen durch Serogruppe W135 beobachtet werden. Beispielsweise kam es im Jahr 2000 zu mehr als 400 Erkrankungen bei Pilgern, die von der *Hajj*, ihrer Pilgerreise nach Mekka heimkehrten, wobei die Ausbreitung eines hypervirulenten Klones (elektrophoretischer Typ [ET]-37; Sequenztyp [ST]-11) verantwortlich ist [103].

1.1.3 Lifestyle von *Neisseria meningitidis*

1.1.3.1 Neisserien als Kommensale

Neisseria meningitidis und apathogene Neisserienstämme wie beispielsweise *Neisseria lactamica* kolonisieren den Nasopharynx gesunder Individuen. *Neisseria meningitidis* kann bei ca. 10% der Bevölkerung aus dem Nasopharynx isoliert werden [18]. Die Trägerrate ist einerseits von der *sampling* Methode abhängig, andererseits von einer Reihe sozioökonomischer Faktoren. In Gemeinschaften, die auf engem Raum zusammenleben, beispielsweise bei Soldaten in der Kaserne oder Collegestudenten im Wohnheim, ist eine weitaus höhere Trägerrate zu finden [50] [11] [13] [1]. Die genaue Bedeutung der Besiedlung des Rachens mit Neisserien ist noch nicht vollständig geklärt. Einerseits kann von einer Rachenbesiedlung eine invasive Meningokokkeninfektion ausgehen, andererseits scheint die Besiedlung des Rachenraums mit apathogenen Neisserienstämmen bei der Ausbildung von schützenden Antikörpern eine wichtige Funktion zu haben [79] [133].

1.1.3.2 *Neisseria meningitidis* als Krankheitserreger

Kommt es zu einer manifesten Meningokokkeninfektion, werden am häufigsten die Krankheitsbilder der Meningitis und der Meningokokkensepsis beobachtet. *Neisseria meningitidis* kann dabei entweder aus dem Liquor oder Blut isoliert werden (Abbildung 1.1-1).

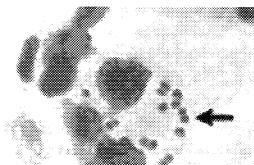


Abbildung 1.1-1 Nachweis von Meningokokken (←) im Liquorpunktat.

Bei einer Meningokokkenmeningitis weisen Säuglinge eher unspezifische Symptome wie Fieber, Schütteln, Benommenheit und Verwirrtheit auf. Ältere Kinder und Erwachsene klagen häufig über starke Kopfschmerzen und Nackensteife mit meningeealen Zeichen. Es können abdominale Beschwerden und Krampfanfälle auftreten. Bei vielen Patienten werden Bakterien im Blut vorübergehend nachgewiesen, wobei häufig Hautläsionen mit petechialem und purpuraähnlichem Charakter auftreten. Entwickelt ein Patient eine Meningokokkensepsis kommt es neben den klinischen Zeichen einer Bakteriämie zusätzlich zu einer Minderdurchblutung des Gewebes aufgrund von Hypoxämie, Azidose und Hypotension. Es entsteht ein septischer Schock, der mit massiven Schleimhauteinblutungen, Nebennierenversagen, disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) und Multiorganversagen einen fulminanten Verlauf annehmen kann und mit einer hohen Letalität belastet ist. Andere klinische Syndrome wie Pneumonie, Urethritis, Konjunktivitis, Perikarditis und Arthritis sind eher selten [134] [145] [126].

1.1.3.3 Strukturvariationen der Neisserien als Kommensale versus Krankheitserreger

Bei Isolaten von *Neisseria meningitidis* aus dem Rachenraum gesunder Individuen ist die Expression der Polysaccharidkapsel fakultativ. Bei einer Trägerstudie, die von November 1999 bis März 2000 in Bayern durchgeführt wurde und 8000 Kinder und Jugendliche einschloss, ergaben sich folgende Ergebnisse bezüglich der Kapselexpression. Isolate, die der Serogruppe B angehörten, exprimierten zu 78% eine Polysaccharidkapsel, Isolate der Serogruppe C zu 36%, Isolate der Serogruppe W135 zu 75% und Isolate der Serogruppe Y exprimierten in 58% eine Polysaccharidkapsel [18]. Bei einer

Untersuchung von epidemiologisch verwandten Isolaten eines Serogruppe B (B15:P1.7,16) Stammes wurde die LPS Expression von Stämmen, die eine Erkrankung erzeugten, mit Trägerisolaten verglichen. Trägerisolate zeigten zu 70% eine L1,8,10 LPS Struktur und nur 24% der Trägerisolate exprimierten ausschließlich eine L3,7,9 LPS Struktur [77].

Um eine Erkrankung verursachen zu können, ist die Expression einer Polysaccharidkapsel obligatorisch [58] [150]. Von den 13 beschriebenen Serogruppen, sind die Serogruppen A, B, C, W135 und Y Auslöser von Meningokokken Infektionen [117]. Bei Isolat, die eine Erkrankung verursachten, wurden im Gegensatz zu den Trägerisolaten in 97% L3,7,9 LPS exprimierende Meningokokken isoliert [77]

1.2 Aufbau und Struktur von Meningokokken

Neisseria meningitidis zeigt den typischen Wandaufbau eines gramnegativen Bakteriums. An die zytoplasmatische Zellmembran schließt sich die äußere Zellmembran an. In sie sind die äußeren Membranproteine und das Lipopolysaccharid (LPS) eingelagert. Das Bakterium besitzt außerdem Pili. Umgeben wird es von einer Polysaccharidkapsel. Ein Überblick wird in Abbildung 1.2-1 vermittelt.

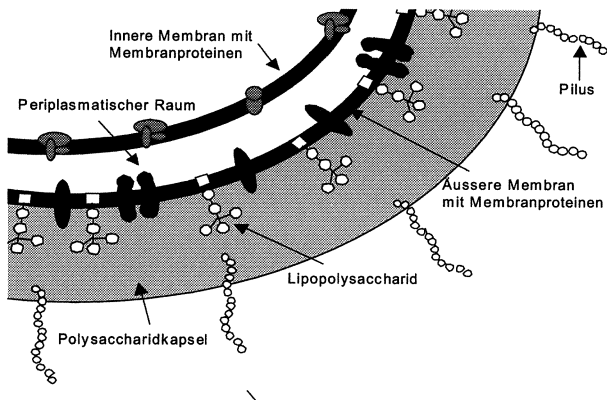


Abbildung 1.2-1 **Aufbau der Wandstruktur von *Neisseria meningitidis***, modifiziert nach Rosenstein *et al.* [126].

1.2.1 Polysaccharidkapsel

Meningokokken sind gramnegative, meist als Diplokokken vorliegende Bakterien, die sowohl unbekapselt, als auch bekapselt vorkommen. Die Polysaccharidkapsel stellt einen wichtigen Pathogenitätsfaktor dar; alle aus Blut und Liquor von Patienten isolierten Meningokokkenstämme exprimieren eine Kapsel [77] [95] [150] [151] [80].

Serogruppe	Kapselstruktur	Genetik	Erkrankung
A	(α 1,6)-N-acetyl-D-mannosamin-1-phosphat •Homopolymer •Kapsel enthält keine Sialinsäure *	<i>mynA</i> , <i>mynB</i> , <i>mynC</i> , <i>mynD</i> **	Epidemien in Afrika
B	(α 2,8)-Polysialinsäure •Homopolymer *	<i>siaA</i> , <i>siaB</i> , <i>siaC</i> , <i>siaD_B</i> **	Endemisches Auftreten in Europa und Amerika
C	(α 2,9)-Polysialinsäure •Homopolymer*	<i>siaA</i> , <i>siaB</i> , <i>siaC</i> , <i>siaD_C</i> **	Endemisches Auftreten in Europa und Amerika
W135	Heteropolymer aus 6-D-Galaktose (α 1,4)-Sialinsäure- (α 2,6) Dissacharid *	<i>siaA</i> , <i>siaB</i> , <i>siaC</i> , <i>siaD_{W135}</i> **	Selten Auslöser systemischer Erkrankung
Y	Heteropolymer aus 6-D-Glucose (α 1,4)-Sialinsäure- (α 2,6)-Dissacharid *	<i>siaA</i> , <i>siaB</i> , <i>siaC</i> , <i>siaD_Y</i> **	Selten Auslöser systemischer Erkrankung

Tabelle 1.2-1 Übersicht über die chemische Zusammensetzung der Polysaccharidkapsel verschiedener Serogruppen, sowie die genetische Anordnung der Region A des *cps* (*capsule gene complex*). * [91] [90] [8] [7] ** [20] [137] [136]

Anhand der chemischen Beschaffenheit der Kapsel ist eine Einteilung der Meningokokken in verschiedene Serogruppen möglich. Insgesamt wurden 13 verschiedene Polysaccharidkapselstrukturen beschrieben [126], wobei die Serogruppen A, B, C, W135 und Y mit Krankheit assoziiert sind [117]. Einen Überblick über die Kapselstruktur dieser Serogruppen gibt Tabelle 1.2-1.

Die klinisch bedeutsamen Serogruppen besitzen eine Polysaccharidkapsel, die Sialinsäure enthält. Eine Ausnahme bildet die Kapsel der Serogruppe A; sie besteht aus N-Acetyl-Mannosamin-1-Phosphat und enthält keine Sialinsäure [90] [91] [8] [7]. Das Kapselpolysaccharid der Serogruppe B aus α 2,8-Polysialinsäure wirkt im menschlichen Körper nicht immunogen, da das neuronale Adhäsionsmolekül (N-CAM) des Menschen ebenfalls α 2,8-Polysialinsäure als posttranslationale Modifikation besitzt [9]. Hieraus resultiert die Problematik der Entwicklung einer Polysaccharidvakzine gegen Serogruppe B Meningokokken. Die Polysaccharidkapseln der anderen Serogruppen sind immunogen und Polysaccharidvakzinen sind in konjugierter und nicht konjugierter Form erhältlich.

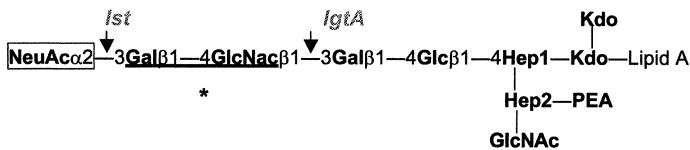
Die Gene der Kapselsynthese liegen auf dem *cps* (*capsule gene complex*) Lokus [41]. Bei den Serogruppen B, C, W135 und Y ist die Polysialinsäuresynthese in der Region A lokalisiert, die die Gene *siaA-D* enthält [20]. Bei der Serogruppe A sind die Gene *mynA-D* zur Synthese von N-Acetyl-D-Monosamin-1-Phosphat in der Region A gelegen [136]. Die Region C enthält die Gene, die für den Transport der Kapsel kodieren, die Region B jene, die für die Phospholipidsubstitution verantwortlich sind [38] [40] [39] [137]. Diese Gene sind bei allen Serogruppen konserviert.

1.2.2 Lipopolysaccharid (LPS)

Das für gramnegative Bakterien typische Lipopolysaccharid der äußeren Membran ist neben der Polysaccharidkapsel ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor von *Neisseria meningitidis*. Das LPS wirkt als Endotoxin und wird für die Auslösung der gefürchteten disseminierten Koagulopathie und des toxischen Schocks durch die Aktivierung des Komplementsystems und der Gerinnungskaskade verantwortlich gemacht. Im Gegensatz zu dem langkettigen repetitiven *smooth* LPS der Salmonellen haben Neisserien ein

kurzkettiges LPS, das als *rough* LPS bezeichnet wird [97]. Das *rough* LPS der Meningokokken besteht aus einem Lipidanteil, der in der Membran eingelagert ist und 3 kurzen Ketten (α -, β - und γ - Kette) [53]. Aufgrund des chemischen Aufbaus der Ketten, lassen sich Meningokokken in mindestens 13 verschiedene Immunotypen einteilen [101] [130]. In dieser Arbeit werden das L3,7,9 LPS und die L8 LPS Struktur bezüglich ihres Einflusses auf die Serumresistenz näher untersucht. Das L3,7,9 LPS hat in seiner α -Kette endständig 4 Zucker (Gal—GlcNac—Gal—Glc), die als Lacto-N-neotetraose bezeichnet werden. Lacto-N-neotetraose kann mit Sialinsäure verknüpft werden, was in Abbildung 1.2-2 a schematisch dargestellt ist [100]. Das L8 LPS ist im Vergleich dazu um die beiden endständigen Zucker verkürzt (Gal—GlcNac) und kann daher nicht mit Sialinsäure verknüpft werden.

a. L3,7,9 LPS Struktur



b. L8 LPS Struktur

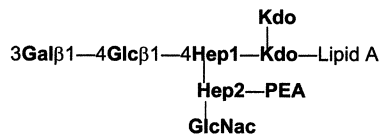


Abbildung 1.2-2 a. **L3,7,9 LPS Struktur** b. **L8 LPS Struktur** [115] Gal: Galaktose; GlcNac: N-Acetylglucosamin; Glu: Glucose; Hep: Heptose; Kdo: 2-Keto-2-Deoxyoctulosonic acid; NeuAc: Sialinsäure; PEA: Phosphoethanolamin; *Ist* Gen: α 2,3-Sialyltransferase; *IgtA* Gen: Glucosyltransferase *Bindungsstelle Antikörper 3F11

Die beiden, für diese Arbeit relevanten Gene der LPS Synthese sind in Abbildung 1.2-2 a grau unterlegt eingetragen. Das *Ist* Gen kodiert für die α 2,3-

Sialyltransferase, die die endständige Galaktose der Lacto-N-neotetraose mit Sialinsäure verknüpft [100]. Sie befähigt das Bakterium zur Sialysierung des LPS, was zumindest bei Gonokokken ein wichtiger Pathogenitätsfaktor für das Überleben im Serum ist [123]. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass Meningokokken der Serogruppe A nicht in der Lage sind, ihr LPS endogen zu sialysieren, da sie keine Sialinsäure synthetisieren können. Wird ihnen exogen Sialinsäure zugeführt, ist eine LPS Sialysierung möglich. Das *IgtA* Gen liegt, wie die meisten Gene, die für die Synthese der α -Kette des LPS benötigt werden, in dem *IgtA-E* Operon [4]. Das *IgtA* Gen kodiert für eine Glucosyltransferase, deren Ausschaltung zu einer Verkürzung der LPS Struktur führt, die der L8 LPS Struktur entspricht, wie in Abbildung 1.2-2 ersichtlich ist.

Die genetische Organisation des *Igt* Lokus differenziert von Stamm zu Stamm [158]. Prinzipiell unterliegt die Expression der LPS Struktur einer hochfrequenten Phasenvariation. Das *IgtA* Gen enthält in seinem 5' Ende mehrere Guanodin Nukleotide, die durch einen *slipped-strand mispairing* Mechanismus zur Variation der Expression des *IgtA* Genes führen. Auf diese Weise wird ein *switch* zwischen der Expression von L8 und L3,7,9 LPS möglich [69]. Da die Organisation des *Igt* Lokus von Stamm zu Stamm unterschiedlich ist, kann der Besitz verschiedener *Igt* Gene das Bakterium dazu befähigen, je nach Wachstumsbedingung parallel verschiedene LPS Typen zu exprimieren. Der Verlust einzelner *Igt* Gene kann andererseits auch dazu führen, dass der Stamm nur noch strikt ein LPS Immunotyp exprimieren kann [158].

Die Expression des LPS wird in dieser Arbeit mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern im ELISA und durch elektrophoretische Auftrennung im Tricingel detektiert (siehe Material und Methoden). Der Grad der LPS Sialysierung wird durch die Bindung des Antikörpers 3F11 überprüft. Ist die L3,7,9 LPS Struktur nicht mit Sialinsäure verknüpft, kann der Antikörper 3F11 an die beiden endständigen Zucker (Gal—GlcNac) binden. Da das L8 LPS im Gegensatz zum L3,7,9 LPS um die beiden endständigen Zucker (Gal—GlcNac) verkürzt ist, kann das L8 LPS weder sialysiert werden, noch den Antikörper 3F11 binden [3]. Der LPS Immunotyp, sowie die LPS Sialysierung spielen eine

wichtige Rolle bei der Serumresistenz von Neisserien und werden in dieser Arbeit näher untersucht und erörtert.

1.2.3 Äußere Membranproteine

Die äußeren Membranproteine OMPs (*outer membrane proteins*) von *Neisseria meningitidis* lassen sich nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung in 5 Klassen einteilen [143]. Klasse 1 (Porin A) und Klasse 2 und 3 (Porin B) sind Porine, die für den Ionenaustausch durch die Membran verantwortlich sind. Die Funktion von Klasse 4 (Rmp: *Reduction modified protein*) ist noch unbekannt. Die Klasse 5 OMPs werden von Opa und Opc (*opacity proteins*) gebildet, denen eine Funktion bei der Adhäsion und bei der Invasion von Meningokokken zugeschrieben wird [117].

1.2.4 Serologische Klassifizierung von Meningokokken

Die einzelnen Stämme von *Neisseria meningitidis* lassen sich nach verschiedenen Kriterien klassifizieren:

- Serogruppe: Bestimmung anhand der Polysaccharidstruktur der Kapsel
- Serotyp: Klasse 2 und 3 OMP: PorB
- Serosubtyp: Klasse 1 OMP: PorA mit 2 variablen Regionen

Eine weitere Charakterisierung der Meningokokkenstämme kann durch Bestimmung des Immunotypen gemacht werden. Der Immunotyp wird anhand der LPS Struktur klassifiziert [117].

Mittlerweile werden die Serotypisierung und die Serosubtypisierung zunehmend durch DNA-Sequenztypisierungsverfahren abgelöst.

1.3 Das Komplementsystem

Nach Entdeckung der Antikörper hatte man schnell herausgefunden, dass diese nicht alleine in der Lage sind Erreger abzutöten, sondern dass es etwas bedarf, um sie zu komplementieren. Das Komplementsystem ist Teil der unspezifischen angeborenen Immunabwehr. Es besteht aus mehreren

Serumproteasen, die in einer Kaskade der Reihe nach aktiviert werden, um am Ende den Membranangriffskomplex (*membrane attack complex* (MAC)) zu bilden. Der MAC ist in der Lage eine Pore in der Membran des Erregers zu bilden und den Eindringling auf diese Weise durch Lyse unschädlich zu machen [104]. Weitere Abwehrmechanismen des Komplementsystems sind die Bildung von Entzündungsmediatoren und die Opsonisierung von Pathogenen [29]. Abbildung 1.3-1 gibt einen Überblick über die Funktionen und die beteiligten Komponenten des Komplementsystems.

1.3.1 Aktivierungswege des Komplementsystems

Es sind drei verschiedene Aktivierungswege des Komplementsystems beschrieben, die alle zur Bildung einer C3 Konvertase führen.

Die Initiation des klassischen Weges erfolgt durch einen Antigen-Antikörperkomplex, der über eine Aktivierung von C1 über C4 und C2 zur Bildung der C3 Konvertase führt. Die Komplementkomponente C1 besteht aus den Untereinheiten C1q, zwei Molekülen C1s und zwei Molekülen C1r, die in Abhängigkeit von Calcium das C1 Molekül bilden. Die Bindung von C1q an den Antikörperkomplex führt zu einer Konformationsänderung des C1 Moleküls und damit zu dessen Aktivierung. Das Bindungsverhalten von C1q an verschiedene Antikörpersubklassen ist verschieden; starke Aktivatoren sind IgM, IgG1 und IgG3 [93] [92]. Die Untereinheit C1s des aktivierten C1 Moleküls ist in der Lage C4 zu spalten und dadurch eine Aktivierung von C4 zu bewirken. Es entsteht einerseits das kleinere Anaphylatoxin C4a und das größere C4b Molekül. Durch die Spaltung des Moleküls wird eine stark reaktive Gruppe des C4b Moleküls exponiert, die das Proenzym C2 in der Anwesenheit von Magnesium bindet [108]. Es entsteht der Komplex C4bC2. Geschieht dies in der Nähe des C1 Komplexes, so spaltet C1s das C2 Molekül in C2a und C2b. Die gebildete C3 Konvertase besteht aus C4bC2a(C2b), wobei C2b für die Formation der C3 Konvertase nicht benötigt wird [82] [125].

Das Komplementsystem

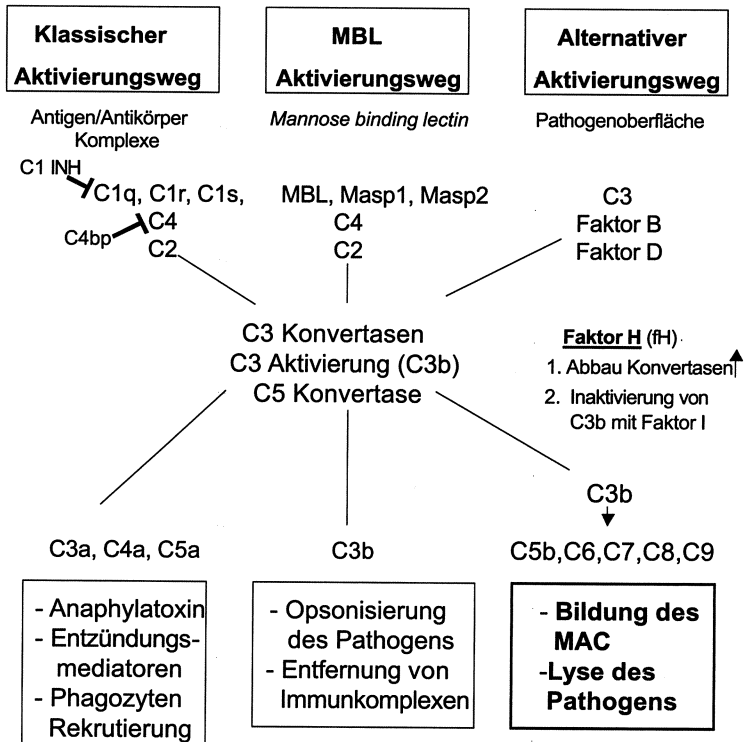


Abbildung 1.3-1 **Überblick über die Komponenten und die Aufgaben des Komplementsystems** modifiziert nach Janeway in *Immuno Biology* [68]

Neben Antikörperkomplexen wurde auch für eine Reihe von anderen Faktoren, wie beispielsweise Nukleinsäure, Proteine, Polysaccharide und mikrobielle Bestandteile eine Aktivierung des klassischen Komplementweges gezeigt. Hierbei kommt es antikörperunabhängig zu einer Aktivierung von C1 [72] [73] [81].

Die Aktivierung des Komplementsystems durch MBL (*mannan-binding lectin*) ist der klassischen Komplementaktivierung ähnlich. Allerdings verläuft die Aktivierung durch den MBL Weg weder über Antikörper noch über eine Aktivierung von C1 ab. MBL kann zusammen mit den MASPs 1-3 (*MBL associated serum proteases*) an Zuckerstrukturen vieler Mikroorganismen binden. Die gebundenen MBL-MASP Komplexe führen zu einer Spaltung des C4 Moleküls. Ist das C4 Molekül aktiviert, läuft die weitere Kaskade analog zur Aktivierung des klassischen Komplementsystemweges ab. Es gibt Hinweise, dass MASP1 ebenfalls direkt zu einer C3 Aktivierung führen kann [102] [142] [22].

Bei der Aktivierung über den alternativen Weg kommt es zur Bindung eines spontan aktivierten C3 Moleküls an der Oberfläche einer körpereigenen Struktur oder an der Oberfläche eines Pathogens. Aktivierung von C3 bedeutet, dass das C3 Molekül in C3a und C3b gespalten wird. Diese C3 Aktivierung kann beispielsweise durch die spontane Formation einer C3 Konvertase geschehen [112]. Geschehen solche spontanen Aktivierungen von C3 an einer körpereigenen Struktur, wird eine weitere Komplementaktivierung im Normalfall durch Komplementregulatoren wie Faktor H und Faktor I verhindert. Eine Komplementaktivierung auf einer Pathogenoberfläche dagegen führt in der Regel zu einer Amplifikation der Menge an deponiertem C3b [107]. Es folgt die Bindung des Faktors B in Abhängigkeit von Magnesium an C3b. Der Faktor B wird von Faktor D aktiviert und es entsteht die C3 Konvertase C3bBb [48] [35]. Die gebildete C3 Konvertase ist in der Lage, weitere C3 Moleküle zu aktivieren und mehr C3b an der Oberfläche abzulagern. Der Faktor Properdin ist in der Lage C3bBb zu binden und die Halbwertszeit der C3 Konvertase zu verlängern [30].

Alle drei Aktivierungswege des Komplementsystems münden in der Bildung einer C3 Konvertase. Die C3 Konvertase besteht aus den Molekülen C4bC2a (nach Aktivierung über den klassischen oder MBL Weg) oder im Falle einer Aktivierung über den alternativen Weg aus C3bBb. Man kann die Aktivierungswege nicht strikt von einander abgrenzen; findet beispielsweise eine Aktivierung und eine Deposition von C3b über den klassischen Weg statt,

so setzt ebenfalls die alternative Aktivierung ein, die als Verstärker der klassischen Aktivierung wirkt [68].

1.3.2 Die zentrale Rolle des C3 Moleküls

Die gebildeten C3 Konvertasen aktivieren das C3 Molekül, indem sie es in C3a und C3b spalten. Das kleinere C3a Molekül wirkt als Anaphylatoxin, während das entstandene C3b Molekül kovalent an der Pathogenoberfläche bindet. Das gebundene C3b hat bezüglich der Infektabwehr zwei entscheidende Aufgaben. Zum einen führt die Opsonisierung durch C3b zur erleichterten Aufnahme des Pathogens durch Phagozyten über die Rezeptoren CR1 und CR3 [105] [138]. Außerdem bindet das C3b Molekül an eine C3 Konvertase und bildet so die C5 Konvertase (C4bC2aC3b oder C3b₂Bb), wodurch die Einlagerung des MAC in die Membran des Pathogens ermöglicht wird.

Das C3 Molekül besteht aus einer α -Kette (115 kD) und einer β -Kette (75 kD), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die C3 Konvertasen des klassischen oder des alternativen Weges spalten das C3 Molekül in C3a (9 kD) und in C3b (175 kD). Die Spaltung führt zu einer Konformationsänderung und die Thioestergruppe des C3b Moleküls (Abbildung 1.3-2) wird zugänglich für H₂O (iC3) oder für nukleophile Hydroxyl- oder Aminogruppen der *target* Oberfläche [132]. Außerdem entstehen eine Reihe von Bindungsstellen für komplementregulatorische Strukturen, wie beispielsweise Faktor H, Faktor I, sowie für membrangebundene Faktoren DAF und MCP [66] [127] [89]. Im weiteren Verlauf kommt es, je nach Beschaffenheit der *target* Oberfläche oder Bindung der regulatorischen Faktoren, zur Bildung einer C5 Konvertase oder zur Inaktivierung des C3b Moleküls.

Der Abbau von gebundenem C3b erfolgt durch Faktor I, der zusammen mit Kofaktor H die α -Kette an mehreren Stellen spaltet. Faktor I spaltet erst ein kleines Fragment (C3f) aus C3b heraus, es entsteht iC3b. Das iC3b Molekül ist nicht mehr in der Lage, eine C5 Konvertase zu bilden und das Komplementsystem weiter zu aktivieren. iC3b interagiert mit den Rezeptoren CR3 und CR4, die eine Rolle bei der Phagozytose spielen. iC3b wird weiter abgebaut zu C3dg und C3c [60] [23].

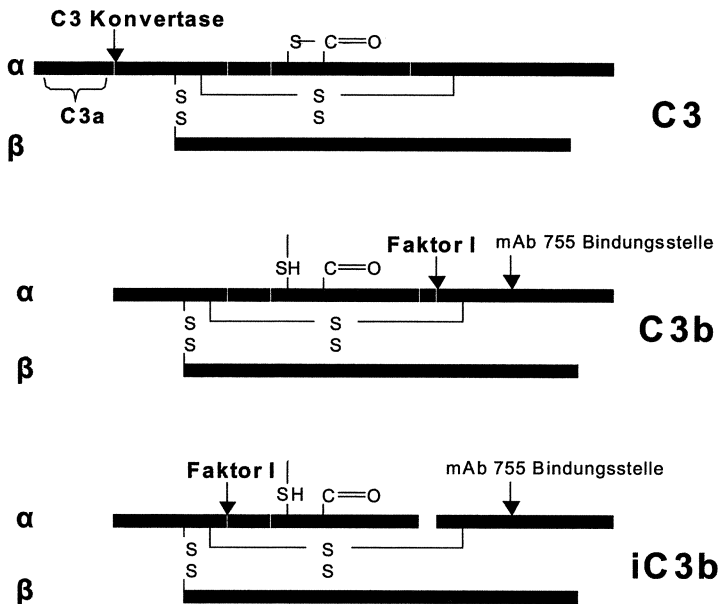


Abbildung 1.3-2 Das C3 Molekül und seine Abbauprodukte modifiziert nach Nilsson [110]. Das C3 Molekül wird durch die C3 Konvertasen in die aktive Form C3b Form überführt. Die Inaktivierung von C3b zu iC3b erfolgt durch Faktor I und Kofaktor H. Der Pfeil markiert die Bindungsstelle für den zum Nachweis von C3b und iC3b verwendeten Antikörper mAb755 [86] [151].

1.3.3 C5 Konvertasen und der Membranangriffskomplex

Die C5 Konvertasen entstehen aus C3 Konvertasen, die ein weiteres C3b Molekül binden. Nach einer Aktivierung über den klassischen Weg oder via MBL besteht die C5-Konvertase aus C4bC2aC3b [84]. Erfolgte die Aktivierung über den alternativen Weg setzt sie sich aus C3b₂Bb zusammen [85]. Die C5 Konvertasen binden das C5 Molekül und spalten es in C5a und C5b. Das C5b Molekül bindet C6 und anschließend C7. Die Bindung von C7 führt dazu, dass der Komplex hydrophobische Eigenschaften annimmt und die Insertion in eine Phospholipidmembran möglich wird [26]. Wenn nun an den C5b7 Komplex C8 bindet, bildet sich die erste transmembrane Pore des MAC (*membrane attack*

complex) [124]. Der C5b8 Komplex bewirkt die Polymerisation von C9; es kommt zur Formation einer zirkulären transmembranösen Pore, die aus dem C5b8 Komplex und 12 Molekülen C9 besteht [116]. Die Formation des Membranangriffkomplexes führt zur Lyse der Zelle oder des Pathogens durch Zerstörung der Phospholipidmembran.

Während des Ablaufes der Abwehrkaskade entstehen die Entzündungsmediatoren C3a, C4a und C5a, die potente Anaphylatoxine sind. Sie bewirken eine Ausschüttung diverser Mediatoren aus Leukozyten und haben chemotaktische Wirkung. Außerdem führen Anaphylatoxine zu einer Steigerung der Gefäßpermeabilität, zur Kontraktion glatter Muskelzellen und zur Entstehung freier Radikale [49].

1.3.4 Komplement regulierende Faktoren

Ein derart kompetentes System mit der potentiellen Fähigkeit, Zellen und Mikroorganismen abzutöten, benötigt eine umfassende und effektive Kontrolle. Um eine unkontrollierte Aktivierung und eine Zerstörung körpereigener Strukturen zu verhindern, gibt es daher eine Vielzahl von Proteinen, die eine regulatorische Funktion besitzen. Die Regulatoren sind zum einen Plasmaproteine und zum anderen membranassoziierte Regulatorproteine. Die wichtigsten membranassoziierten Regulatorproteine sind der *decay-acceleration factor* (DAF) und das *membrane-cofactor protein* (CD46). Mechanismen der Regulation sind einerseits ein beschleunigter Abbau der Konvertasen und andererseits eine Kofaktoraktivität bei der Inaktivierung von Komplementkomponenten [62]. C1 Esterase Inhibitor (C1INH), Properdin, Faktor I, Faktor H und das *C4 binding protein* (C4bp) gehören zu den wichtigsten regulatorischen Plasmaproteinen.

Der C1 Esterase Inhibitor ist einer der effektivsten Inhibitoren des klassischen Weges, indem er den C1 Komplex bindet und zu einer Dissoziation der C1q Untereinheit von C1s und C1r führt [159]. Wie wichtig eine Regulation des Komplementsystems ist, wird durch das Krankheitsbild des hereditären Angioödems deutlich. Bedingt durch einen Mangel an funktionsfähigem C1 Esterase Inhibitor kommt es rezidivierend zu massiven Ödemen im

Gesichtsbereich unter Beteiligung der Schleimhäute, die teilweise mit lebensbedrohlicher Atemnot einhergehen [135].

Faktor I und Faktor H sind wichtige hemmende Regulatoren des alternativen Aktivierungsweges. Faktor H reguliert die Bildung der C3 Konvertase (C3bBb) und beschleunigt die Dissoziation des Komplexes. Faktor H konkurriert mit Faktor B um eine Bindungsstelle an dem C3b Molekül und verhindert dadurch die Bildung der C3-Konvertase C3bBb. Außerdem reduziert die Anwesenheit von Faktor H die Halbwertszeit dieser C3 Konvertase [154] [157]. Die Affinität von Faktor H gegenüber oberflächengebundenem C3b ist deutlich größer als gegenüber ungebundenem C3b im Serum [25]. Faktor I fungiert als Serinprotease und ist in der Lage, C3b zu iC3b irreversibel zu inaktivieren, durch Abspaltung eines 68 kD großen Fragments aus der α -Kette des C3b Moleküls. Eine weitere Eigenschaft von Faktor H ist seine Kofaktorfunktion bei dieser Inaktivierung von C3b zu iC3b gemeinsam mit Faktor I [113] [23].

Das *C4 binding protein* (C4bp) reguliert die Aktivierung des Komplementsystems durch den klassischen Weg, indem es C4b bindet und so die Bildung der C3 Konvertase (C4bC2b) verhindert. C4bp besitzt außerdem Kofaktoraktivität bei der Inaktivierung von C4b zu C4d durch Faktor I [42] [129] [44].

Properdin ist, im Gegensatz zu den vorangehend beschriebenen Inhibitoren, ein aktivierender Regulator des Komplementsystems. Properdin ist in der Lage, die C3 Konvertase des alternativen Weges, den Komplex C3bBb, zu binden und dessen Halbwertszeit dadurch zu verlängern [30].

1.3.5 Komplementsystem und Infektion

Das Komplementsystem ist Teil der unspezifischen angeborenen Immunabwehr (*innate immunity*) und stellt eine erste Verteidigungslinie dar, nach Eintritt von infektiösen Erregern in serumhaltige Kompartimente. Die alternative Komplementsystemaktivierung wird ohne die Beteiligung von Antikörpern ausgelöst. Sind bereits Antikörper gegen den Erreger vorhanden, kommt es zu einer Aktivierung des klassischen Weges. Außerdem führt die Bindung von MBL (*mannan-binding lectin*) zu einer Initiation der Komplementkaskade über den MBL Aktivierungsweg, der dem klassischen

Aktivierungsweg ähnlich ist. Es ist auch eine antikörperunabhängige Aktivierung von C1q, der Komponente des klassischen Weges für einige Bakterien beschrieben worden. Beispielsweise wurde berichtet, dass das Porin OmpK36 eines serumsensitiven Stammes von *Klebsiella pneumoniae* C1q bindet und somit zu einer Aktivierung des Komplementsystems und zur MAC Insertion führt [2]. Zudem kann C1 direkt an das LPS von *Mycoplasma pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* und *Salmonella minnesota* binden. Porine gramnegativer Bakterien können ebenfalls direkt C1 binden und auf diese Art den klassischen Weg des Komplementsystems aktivieren [10] [94] [6] [14]. Entscheidend bei der Interaktion von Bakterien mit dem Komplementsystem ist neben der Aktivierung des Komplementsystems auch die Menge und Stabilität des auf der Bakterienoberfläche gebundenen C3b. Die Effektivität der C3b Deposition ist insofern wichtig, da die Menge von stabil gebundenem C3b die Anzahl der deponierten MAC Moleküle bestimmt. Ferner führt C3b zur Phagozytose über die Rezeptoren CR1 und CR3 [46].

Wenn Bakterien keine speziellen Schutzmechanismen besitzen, sind sie der Zerstörung durch das Komplementsystem ausgeliefert. Die Empfindlichkeit gegenüber der Abtötung durch das Komplementsystem stellt daher einen wichtigen Virulenzfaktor eines Bakteriums dar. Wie schaffen es Bakterien nun sich dem Komplementsystem zu entziehen?

Es gibt eine Vielzahl von Faktoren, die die Interaktion zwischen Pathogen und dem Komplementsystem beeinflussen können. Die Kapsel, das Lipopolysaccharid (LPS), Sialinsäure als terminale Extension des LPS und äußere Membranproteine sind bakterielle Strukturen, die eine Inhibition und Distanzierung der Aktivierung des Komplementsystems ermöglichen. Die Polyribosephosphatkapsel von *Hämophilus influenzae type b* verhindert beispielsweise die effiziente Deposition von C3b [139]. Bei einigen Bakterien bestimmt die Struktur des LPS, ob das Bakterium serumsensitiv oder serumresistent ist. Bei *E. coli* Stämmen mit einem *rough* LPS führt die Bindung von C1 zu einer schnelleren und effektiveren Komplementaktivierung als dies bei *E. coli* Stämmen mit einem längeren *smooth* LPS der Fall ist [14] [15]. Bei *Salmonella minnesota* kommt es zu einer bevorzugten Bindung von C3b an das lange *smooth* LPS. Dies führt zur Formation des

Membranangriffskomplexes in großer Distanz zur inneren Membran und es kommt zu einem Abstoßen des MAC/LPS Komplexes, dem sogenannten *shedding*. Auf diese Art wird eine erfolgreiche Insertion des MAC verhindert, was das Bakterium serumresistenter werden lässt [74] [36]. Bei Yersinien entscheidet beispielsweise die Struktur des äußeren Membranproteins, ob das Komplementsystem aktiviert wird [140].

Neben struktureller Beschaffenheit des Bakteriums spielt die Bindung von regulatorischen Proteinen bei der Abwehr des Komplementsystemangriffes ebenfalls eine wichtige Rolle. *Borrelia burgdorferi* bedient sich zur Abwehr des Komplementsystems der Bindung der komplementregulatorischen Proteine Faktor H und *Faktor H like protein*. Einen ähnlichen Mechanismus der Komplementabwehr durch Bindung dieser Regulatorproteine konnte auch für *N. gonorrhoeae* [122], *Streptococcus pyogenes* [87] und *Echinococcus granulosum* [24] gezeigt werden.

Außerdem kann der Angriff des Komplementsystems durch die Bildung von bakteriellen Enzymen abgewehrt werden. Die virulenten *Streptococcus pyogenes* Stämme M1 sezernieren beispielsweise das Protein SIC (*streptococcal inhibitor of complement*), das die Insertion des Membranangriffskomplexes in die bakterielle Membran verhindert. Zusätzlich interferiert SIC mit Abwehrfaktoren der neutrophilen Granulozyten [32] [31] [37].

1.3.6 Interaktion zwischen Komplementsystem und Neisserien; vorangegangene Studien

Aufgrund der Verwandtschaft von *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae* und der Ähnlichkeit im Aufbau ihres LPS und der Struktur ihrer äußeren Membran, werden die Mechanismen der Serumresistenz der beiden Spezies hier gemeinsam beschrieben.

1.3.6.1 Serumresistenz von *Neisseria gonorrhoeae*

Gonokokken besitzen im Gegensatz zu Meningokokken keine Polysaccharidkapsel. Sie können in serumsensitive und serumresistente

Stämme unterteilt werden. Serumsensitive Stämme verursachen meist lokale Entzündungen wie Urethritis und Epididymitis beim Mann und Urethritis, Cervicitis, Endometritis und Pelveoperitonitis bei der Frau. Sind Gonokokken serumresistent, können sie zur disseminierten Gonokokkeninfektion führen, die charakterisiert ist durch Arthritis, Synovitis und andere Organmanifestationen.

Ein wichtiger Faktor der Serumresistenz von *Neisseria gonorrhoeae* ist die Sialysierung des LPS. Die Verknüpfung der endständigen Galaktose der Lacto-N-neotetraose mit Sialinsäure führt bei einigen Gonokokkenstämmen zur Serumresistenz [109] [100]. Ram *et al.* konnten zeigen, dass LPS Sialysierung zu einer vermehrten Bindung von Faktor H führt [123]. Faktor H inaktiviert gemeinsam mit Faktor I C3b zu iC3b [113]. Außerdem führt die Bindung von Faktor H zu einem beschleunigten Abbau der C3 Konvertase des alternativen Komplementweges, durch Abspaltung von Bb aus dem Komplex C3b₂Bb [157]. Zusätzlich trägt LPS Sialysierung zur Regulation der klassischen Komplementaktivierung bei, da bakterizidwirkende Antikörper Gonokokken mit vollständig sialysiertem LPS weniger wirkungsvoll angreifen können [55].

Es gibt serumresistente Gonokokkenstämmen, die keine Lacto-N-neotetraose besitzen und folglich ihr LPS nicht sialysieren können. Faktor H bindet bei diesen Stämmen direkt an Por1A, ein äußeres Membranprotein der Gonokokken, und führt dadurch zur Serumresistenz des Bakteriums [122]. Ein weiterer Mechanismus der Serumresistenz bei Gonokokken ist die Bindung von C4bp an die äußeren Membranproteine Por1A und Por1B [119] [120]. C4bp ist ein regulatorisches Protein des klassischen Komplementaktivierungsweges, das Kofaktoraktivität bei der Inaktivierung von C4b zu C4d durch Faktor I besitzt [42] [43]. Außerdem ist C4bp in der Lage, den Abbau der C3 Konvertase des klassischen Weges zu beschleunigen [44] [21].

1.3.6.2 Serumresistenz von *Neisseria meningitidis*

Liegt ein Defekt der Komplementkaskade vor, so kann dies mit einer vermehrten Anfälligkeit gegenüber bestimmten Infektionen einhergehen.

Beispielsweise treten bei einem Defekt der späten Komplementkomponenten (C6, C7, C8 oder C9) rezidivierende Infektionen durch Meningokokken auf [33] [34]. Diese Tatsache verdeutlicht die entscheidende Rolle, die das Komplementsystem bei der Abwehr von Meningokokkeninfektionen spielt.

Die Polysaccharidkapsel der Meningokokken stellt den wichtigsten Pathogenitätsfaktor des Bakteriums dar. Isolate von Patienten mit Meningokokkensepsis oder Meningokokkenmeningitis sind nur in Ausnahmefällen unbekapselt [149]. Dass die Polysaccharidkapsel essentiell für das Überleben des Bakteriums im Serum ist, wurde für Serogruppe B und C Meningokokken gut belegt. Die Bedeutung der Kapsel für die Virulenz des Bakteriums wurde sowohl *in vitro* durch Bakterizidietests, als auch *in vivo* im *infant rat model* bestätigt [95] [150] [151] [80]. Die Polysaccharidkapseln von Serogruppe B und Serogruppe C enthalten Sialinsäure. Interessant ist die Untersuchung des Einflusses der Kapsel von Serogruppe A Meningokokken im Bezug auf die Serumresistenz, da sie aus N-Acetyl-Mannosamin-1-Phosphat besteht und keine Sialinsäure enthält [91]. Zu Beginn dieser Arbeit lagen noch keine Daten zur Interaktion der Serogruppe A Polysaccharidkapsel mit dem Komplementsystem vor.

Meningokokken exprimieren verschiedene LPS Immunotypen. Patientenisolate aus Liquor oder Blut zeigen überwiegend den Immunotyp L3,7,9, der Lacto-N-neotetraose enthält. Die endständige Galaktose der Lacto-N-neotetraose kann bei Meningokokken der Serogruppe B, C, W135 und Y mit endogen synthetisierter Sialinsäure verknüpft werden [99]. Vogel *et al.* untersuchten den Einfluss von LPS Sialysierung auf die Serumresistenz von hochvirulenten Serogruppe B und C Meningokokken durch Konstruktion isogener Mutanten, die kein funktionsfähiges *lst* Gen zur LPS Sialysierung mehr besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass die LPS Sialysierung nur bei sehr hohen Konzentrationen von normalem humanen Serum einen Überlebensvorteil darstellte [148]. Estabrook *et al.* demonstrierten im Gegensatz dazu einen Zusammenhang zwischen der Menge von unsialysiertem L3,7,9 LPS und Serumsensitivität bei Serogruppe C Meningokokken. Vollständige LPS Sialysierung durch exogen zur Verfügung gestellte Sialinsäure erhöhte die Serumresistenz [28]. Die diskrepanten Ergebnisse können möglicherweise

durch unterschiedliche Stammauswahl und experimentelle Ansätze begründet werden. Es ist aber anzunehmen, dass die LPS Sialysierung von bekapselten Meningokokken einen geringeren Einfluss auf die Serumresistenz als bei Gonokokken hat.

Während Isolate von erkrankten Personen meist einen L3,7,9 LPS Immunotypen zeigen, exprimieren Trägerisolate häufig einen L8 LPS Immunotypen und sind oft unbekapselt [77]. Moran *et al.* untersuchten spontane L8 LPS Mutanten von zwei Serogruppe B Meningokokkenstämmen, die ursprünglich eine L3,7 LPS Struktur exprimierten. Die Expression des L8 LPS Epitope korrelierte mit einer verstärkten Serumsensitivität [106]. Bislang existieren keine Daten zum Einfluss von LPS Struktur und LPS Sialysierung auf die Serumresistenz bei Serogruppe A Meningokokken. Besonders spannend ist diese Frage, da Serogruppe A Meningokokken aufgrund des Fehlens der *siaA-C* Gene im Gegensatz zu den übrigen Serogruppen nicht in der Lage sind, ihr LPS endogen zu sialysieren; exogene Sialysierung des LPS ist allerdings möglich [99].

1.4 Fragestellung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der Pathogenitätsfaktoren und Mechanismen, die Meningokokken befähigen, in menschlichem Serum zu überleben und der Lyse durch das Komplementsystem zu entgehen. Ein Schwerpunkt wird dabei auf Serogruppe A Meningokokken gelegt; die Mutanten anderer Serogruppen werden anschliessend vergleichend untersucht.

Zur Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Pathogenitätsfaktoren werden isogene *knock-out* Mutanten verwendet, die sich genau in einem Punkt von dem Wildtyp Bakterium unterscheiden. Die Konstruktion neuer Mutanten, sowie die Überprüfung von Kapsel und LPS bereits vorliegender Mutanten bilden den ersten Teil dieser Arbeit.

Im zweiten Teil der Arbeit wird der Einfluss der Polysaccharidkapsel auf die Serumresistenz untersucht. Hierzu sollen bekapselte Bakterien mit

unkapselten Mutanten bezüglich Serumresistenz, Bindung von Komplementfaktoren, Antikörpern und komplementregulatorischen Proteinen verglichen werden. Außerdem wird der Einfluss von LPS Struktur und LPS Sialysierung bei bekapselten Meninokokken näher analysiert.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit den Serumresistenzmechanismen von unkapselten Meningokokken, wie sie beispielsweise im Nasopharynx gesunder Individuen vorkommen. Hierbei liegt der Schwerpunkt in der Aufklärung des Einflusses des LPS und der LPS Sialysierung auf die Serumresistenz.

2 Material und Methoden

2.1 Geräteliste

ELISA Lesegerät	Titertec Multiskan, ICN Biochemicals, Costa Mesa, CA, USA
Elektrophoresekammer	BIORAD, Laboratories, Hercules, CA, USA
FACS Gerät	FACScan, BD Immunocytometry systems, San Jose, USA
Brutschrank	B5060 E-CO ₂ , Heraeus, Hanau
Schüttelinkubator	G25, New Brunswick Scientific Edition, New Jersey, USA
Waage	Mettler, P1200 Carley &Whitemore Corporation, Sommerville, MA, USA
Wasserbad	Shaking water bath 25, Precision Scientific Inc., Chicago, Illinois, USA
Western Blotting System	Amersham pharmacia biotech, Buckinghamshire, England
Zentrifuge	Hermle, Labnet Z233MK, Hermle Labortechnik, Wehingen Biofuge 15, Heraeus, Hanau
Zentrifuge 4°C	RC-5B Sorvall Heraeus, Hanau

2.2 Materialien

ABTS	2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate diammonium salt #1.112.422, Roche, Mannheim
Acrylamid 30%	Roth Nr. 3029.1, rotiphorese gel 30, Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bis 30% solution	29 :1; 3.3%Acrylamid, N,N' Methylenacrylamid, Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Silbernitrat	AgNO ₃ # 1.01512, Merck, Darmstadt
Amberlite	Serva # 40701, Serva, Heidelberg
Ammoniak	# 5002, Riedel de Haën, Seelze
Ammoniumpersulfat APS,	BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA

Barbital	Serva, Heidelberg
Bis-Acrylamid	#10897, Merck, Darmstadt
Blue G	Coomassie Brilliant Blue G 250 pure # 17524, Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Bovines Serum Albumin; Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Butanol gesättigt	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid	CaCl ₂ , Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
ECL System	Western Blot system, RPN 2106, Amersham pharmacia biotech, Buckinghamshire, England
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Serva, Heidelberg
ELISA Platten	Greiner # 650061, Deutschland
ELISA Platten	Immulon 1, Cat Nr. 011 010 3555, Dynatech Laboratories, Chantilly, Virginia, USA
Essigsäure	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Ethanol 30%	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Ethanol 70%	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Faktor H	#a137 Purified human complement component FH, Advanced Research Technologies, San Diego, CA, USA
Formaldehyd 37%	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
GC Agar	Difco Lab., Detroit, USA
Glutaraldehyd	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Glycerin	Fisher Chemicals, Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA
Glycin	Serva #23390, Serva, Heidelberg
HBSS	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Dikaliumhydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄ , Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Kaliumchlorid	KCl, Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄ , Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Kaliumhydroxit	KOH, Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA

Magermilch	handelsübliches Magermilchpulver, bezogen aus Reformhaus, Würzburg
Magnesiumchlorid	MgCl ₂ , Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Methanol	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃ , Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Dinatriumhydrogen-phosphat	Na ₂ HPO ₄ , Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Natriumthiosulfat	Na ₂ S ₂ O ₃ , #13481 Riedel de Haën, Seelze
Natriumchlorid	NaCl, #1.06400 Merck, Darmstadt
Natriumhydrogen-carbonat	NaHCO ₃ , Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Natriumhydroxit	NaOH, Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
NHS	Normales Humanes Serum: gepooltes Serum von 10 freiwilligen Personen ohne eine Meningokokken Vorerkrankung, Meningokokkenimpfung oder Gonokokken-erkrankung in der Anamnese
Nitrocellulose	Schleicher&Schüll Nr. 401213/0.45, Dassel
Paraformaldehyd	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung, Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Periodsäure	Merck #100524, Darmstadt
Poly-D-Lysin	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Polyvitex	BioMérieux, # 55651, l'Etoile, Frankreich
Proteinase K	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Proteose Pepton	Difco Reorder, #0120-17-6, Detroit, USA
SDS	Natriumdodecylsulfat, BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA
SDS-Page Marker	#1610318, broad range standard, BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA
Serum Monoveten	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Stärke, löslich	Serva 35368, Heidelberg
TEMED	Tetraethylethylendiamine 35925, Serva, Heidelberg
Tricin	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA

Tris	Roth, Art.5429.3, Karlsruhe
Tween20	Merck 822184, Darmstadt
Whatman-Papier	Schleicher&Schüll Nr. 3469, Dassel
Zitronensäure	# 244 Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA

2.3 Antikörperliste

Name des Antikörpers	Zielstruktur	Modifikation	Quelle
α-Sg. A Kapsel #932 AK	Polysaccharidkapsel der Sero- gruppe A	Monoklonaler Antikörper (Ascites)	Hergestellt und validiert im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Mainz, freundlich überlassen von Prof. D. Bitter-Suerbaum
α-L3,7,9 LPS AK	L3,7,9 LPS	(in mouse)	WD Zollinger
α-2-1-L8mAB AK	L8 LPS	(in mouse)	WD Zollinger
α-3F11 AK	Lacto-N-neotetraose des nicht sialysierten L3,7,9 LPS	(in mouse)	[55]
α-mouse IgG+IgM AK	IgG und IgM (mouse)	H+L Peroxidase conjugate (in goat)	Dianova #115-035-044, Hamburg, Deutschland
α -C-5G AK	C3b (human)		Dr. K. Iida, Takeda Chemical

			Industries, Ltd., Tsukuba, Japan [64]
α -SC5b-9 (TCC) AK	SC5b-9 (human)	(in mouse)	Metra Biosystems, Inc., Mountain View, California, USA
α -mouse IgG AK	IgG (mouse) whole molecule	Alkaline phosphatase conjugate (in goat)	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
Mab 755 AK	C-terminale C3c Fragment (human)		[86] [151]
α -C3 AK	C3 (human)	FITC conju- gate (in sheep)	Biodesign International, ME, USA
α -C4 AK	C4 (human)	FITC conju- gate (in sheep)	Biodesign International, ME, USA
α -mouse IgG AK	IgG (mouse)	FITC conjugate	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
α -mouse IgM AK	IgM (mouse)	FITC conjugate	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
α -Faktor H AK	Faktor H (human)	affinity purified (in rabbit)	Dr. Micheal Pangburn,

			University of Texas, Health Science Ctr., Tyler, Texas, USA [113]
α -mouse IgG AK	IgG (mouse) whole molecule	FITC conjugate (in goat)	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
α -goat IgG AK	IgG (goat) whole molecule	FITC conjugate (in rabbit)	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA
α -rabbit IgG AK	IgG (rabbit) whole molecule	FITC conjugate (in goat)	Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA

Tabelle 2.3-1 Übersicht über in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

2.4 Bakterienstämme und Mutanten

2.4.1 Wildtypstämme

Die Tabelle 2.4-1 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Meningokokkenstämme.

Nummer ^{a)}	Serogruppe	Serotyp / Serosubtyp	Klonale Linie	Isolationsort	Referenz
#2594	A	4 :P1.9	ST-5	Deutschland 1991	
#2135 ^{b)}	B	15 :P1.17, 16b	ST-74 (ST-32 Komplex)	United Kingdom 1985	[27]
#2120	C	NT :P1.5,2	ST-11	Deutschland 1997	[152]
#171	W135	NT :P1.10	ST-11	Nicht bekannt	[20]

#2220	Y	21 :P1.15	ST-172 (ST-92 Komplex)	Deutschland 1992	[118]
-------	---	-----------	------------------------------	---------------------	-------

Tabelle 2.4-1 **Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Meningokokken Stämme.** Bei allen Stämmen handelt es sich um Patientenisolate. a) Stammsammlung des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg b) entspricht Stamm MC 58

2.4.2 Beschreibung der Mutanten

Die folgende Tabelle 2.4-2 gibt einen Überblick über die verwendeten Mutanten.

Serogruppe	A	B	C	W135	Y
Wildtyp	#2594	MC58 (#2135)	#2120	#171	#2220
Δ lst	#2677	#2344	#2345	#2680	#2681
Δ lgtA	#2678	#2535	#2920	#2696	#2697
Δ siaD		#2425	#2517	#2661	#2662
Δ mynB*	#2668				
Δ siaD/lst		#2516	#2508	#2683	#2684
Δ siaD/lgtA		MC 58 Δ siaD/lgtA☼	#2921☼	#2922☼	#2923☼
Δ mynB/lgtA*	#2706☼				

Tabelle 2.4-2 **Übersicht über in dieser Arbeit verwendeten Mutanten** #: Nummer in Würzburger Stammsammlung; *: Die Kapselsynthese ist bei *Neisseria meningitidis* der Serogruppe A auf den *myn* Genen kodiert, bei Serogruppe B, C, W135 und Y auf den *sia* Genen; ☼: in dieser Arbeit erstellte Mutanten

2.4.2.1 Beschreibung der Plasmide

Δ siaD Mutanten: Das *siaD* Gen kodiert für eine Polysialyltransferase, die für die Polymerisation der Sialinsäure der Kapsel verantwortlich ist. Durch die Insertion einer Antibiotikaresistenzkassette in das *siaD* Gen lässt sich eine kapsellose Mutante herstellen.

Der Serogruppe B Stamm MC 58 wird mit dem Plasmid pMF32.35 T5 transformiert [41]. Die Δ siaD Mutante enthält eine Chloramphenicolresistenz im *siaD* Gen. Der Serogruppe C Stamm #2120 wurde mit dem Plasmid pHC10 transformiert, dessen Konstruktion in den folgenden Referenzen charakterisiert

ist [20] [17] [57] [118]. Die $\Delta siaD$ Mutante hat ebenfalls eine Chloramphenicolresistenz im *siaD* Gen. Die beiden Wildtypstämme #171 (Serogruppe W135) und #2220 (Serogruppe Y) wurden mit dem Plasmid pHC4siaD:TnMax5 transformiert. Das Plasmid enthält das *siaD* Gen des Serogruppe W Stammes #171 mit einer Chloramphenicol Resistenzkassette. Die Polysialyltransferase Gene der Serogruppe W135 und Y sind äußerst ähnlich, so dass für beide Serogruppen dasselbe Plasmid zur Geninaktivierung verwendet werden konnte [20].

$\Delta mynB$ Mutanten: Bei Serogruppe A Meningokokken besteht die Region A der Kapselbiosynthese aus den *mynA-D* Genen, im Gegensatz zu den anderen Serogruppen, bei denen die Kapselsynthese auf den *siaA-D* Genen kodiert ist. Zur Herstellung einer kapsellosen Serogruppe A Mutante wurde das *mynB* Gen inaktiviert, welches vermutlich für die α 1,6-UPD-ManNAc Polymerase kodiert [136]. Ein PCR Produkt (1617bp) der ORF2 (*mynB*) Region von Serogruppe A Stamm #1124 wurde mit den Primern NT2 5'-(TACTACCATTACCCTTTTCTCA)-3' und NT4 5'-(ATACTTAATAACAGAAAA TGGCG)-3' hergestellt. Es folgte die Insertion des PCR Produktes in das Plasmid pCR 2.1- TOPO nach Herstellerangaben (Invitrogen K 4500 01-40 und K4500 01-40). Über einen Verdau mit *HincII* wurde eine CM Kassette aus dem Plasmid pBS-CM eingefügt. Das entstandene Plasmid (pNT5) wurden in das Wildtypbakterium #2594 transformiert [Fr Dr. Ngo-Viet, unveröffentlicht].

ΔIst Mutanten: Das *Ist* Gen kodiert für das Enzym α 2,3-Sialyltransferase, das das Anfügen von Sialinsäure an die Lacto-N-neotetraose (LNnT) des L3,7,9 LPS katalysiert [45] [98]. Die Konstruktion des Plasmids wurde in Referenz [148] beschrieben.

$\Delta IgtA$ Mutanten: Das *IgtA* Gen kodiert für eine Glycosyltransferase, deren Ausschaltung zu einer Verkürzung der L3,7,9 LPS Struktur um 2 Zucker führt, woraus eine L8 LPS Struktur resultiert. Die $\Delta IgtA$ Mutanten wurden mit dem Plasmid pNT2 transformiert, das eine Kanamycinresistenzkassette im *IgtA* Gen enthält [118].

2.4.2.2 Transformation von Meningokokken

Die Transformation dient dazu, auf Plasmiden kodierte genetische Informationen in das Genom der Meningokokken zu integrieren.

Material

Stammlösung:	200 g KH_2PO_4 1.47M 50 g K_2HPO_4 0.22M ad 1000 ml Ampuwa
PPM	15 g Proteose Pepton 5,0g NaCl 0,5g lösliche Stärke 20 ml Stammlösung pH mit KOH auf 7,5-8,0 einstellen ad 1000 ml Ampuwa
PPM+	25 ml Proteose Pepton + 250 μl Polyvitex +125 μl 8,4% NaHCO_3 +125 μl 2M MgCl_2

Procedere

Die Meningokokken über Nacht bei 37° C, 5% CO_2 auf GC Agar anziehen. Bakterien aus der dritten Fraktion in 5 ml PPM+ einreiben und eine Stunde bei 37° C/ 200 rpm inkubieren. Anschließend die OD_{600} bestimmen und $\text{OD}_{600}=0,1$ in PPM+ herstellen. 1 ml der Bakteriensuspension ($\text{OD}_{600}= 0,1$) in ein 12 ml Greiner Röhrchen vorlegen. Anschließend 100-1000 ng Plasmid hinzufügen. Für 5-6 Stunden bei 37° C/ 200 rpm/RT inkubieren, dann 5 Minuten bei 7000 rpm zentrifugieren, 900 ml Überstand verwerfen, Pellet resuspendieren, ausplattieren und über Nacht auf GC Agar mit Antibiotikazusatz bei 37° C, 5% CO_2 bebrüten. Als Kontrollen dienen ein Ansatz mit einem Kontrollplasmid und ein Ansatz ohne Plasmid.

2.5 Tricin Silbergel zur LPS Darstellung

Um die LPS Struktur der Meningokokken darzustellen, wird durch Zusatz von Proteinase K das LPS partiell aufgereinigt. Es folgt die elektrophoretische Auftrennung über ein Tricingel. Die Banden werden danach mittels Silberfärbung zur Darstellung gebracht. Das Gel kann anschließend getrocknet werden.

2.5.1 LPS Schnellpräparation

Material

Lysis Puffer 2% SDS
 4% β -Mercaptoethanol
 10% Glycerin
 1 M Tris-HCl pH 6,8
 1 Msp Bromphenolblau

Proteinase K (2,5 mg Proteinase K/ ml Lysis Puffer)

1X PBS

Procedere

Meningokokken über Nacht bei 37° C und 5% CO₂ auf GC Agar anziehen. Aus der dritten Fraktion mit einem Tupfer Bakterien in 1X PBS einreiben, eine OD₆₀₀=0,6 herstellen und 1 ml Bakteriensuspension für zwei Minuten bei 13000 rpm/RT abzentrifugieren. Den Überstand verwerfen und das Pellet in 50 μ l Lysis Puffer resuspendieren. Die Proben 10 Minuten bei 100° C kochen und anschließend 10 Minuten bei 60° C im Wasserbad abkühlen lassen. Proteinase K hinzufügen und eine Stunde bei 60° C im Wasserbad inkubieren.

2.5.2 Tricingel

Ein Tricingel dient zur Auftrennung von niedermolekularen Proteinen (Größe 1-20 kD) oder Zuckerstrukturen.

Material

Anodenpuffer 0,2 M Tris-HCl pH 8,9

Kathodenpuffer	0,1 M Tris- HCl	
	0,1 M Tricin	pH 8,25
	0,1% SDS	
Gelpuffer	3,0 M Tris-HCl	pH 8,45
	0,3 % SDS	
49,5% Acrylamid/3% Bisacrylamid:	48,0% Acrylamid	
	1,5% Bisacrylamid	
49,5% Acrylamid/6% Bisacrylamid:	46,5% Acrylamid	
	3% Bisacrylamid	
Tricin Sample Solution 2x	8% SDS	
	24% Glycerin	
	100mM Tris-Base	pH 6,8
	4% β -Mercaptoethanol	
	0,02% Blue G	

TEMED

10% Ammoniumpersulfat

Butanol gesättigt

Menge für 1 Gel

Trenngel	(16.5%Acrylamid/6% Bisacrylamid)
	2,5 ml 49,5% Acrylamid/6% Bisacrylamid
	1,5 ml Ampuwa
	2,5 ml Gelpuffer
	1,0 ml Glycerin 87%
	7,5 μ l TEMED
	75 μ l 10% Ammoniumpersulfat
Sammelgel	(4%Acrylamid/3% Bisacrylamid)
	0,25 ml 49,5% Acrylamid/3% Bisacrylamid
	2,1 ml Ampuwa
	0,78 ml Gelpuffer
	3 μ l TEMED
	30 μ l 10% Ammoniumpersulfat

Procedere

Ansetzen der 49,5% Acrylamid/ 3% Bisacrylamid Mischung

48,0 g Acrylamid, 1,5 g Bisacrylamid, 1,5 g Amberlite (Serva # 40701) und 50 ml Ampuwa eine Stunde gut rühren, eventuell erwärmen. Anschließend mit Ampuwa auf 100 ml auffüllen und über einen Faltfilter geben. Dunkel bei 4° C lagern. Ansetzen im Abzug, mit Handschuhen und Mundschutz!

Ansetzen der 46,5% Acrylamid/ 6% Bisacrylamid Mischung

Wie oben verfahren. Es werden 46,5 g Acrylamid, 3 g Bisacrylamid, und 3 g Amberlite (Serva # 40701) verwendet.

Glasplatten gründlich mit Salpetersäure reinigen und das Gel gießen. LPS Proben, deren Herstellung unter 2.5.1 beschrieben wurde, 5 Minuten bei 100° C kochen, danach auf Eis stellen. Anschließend für den Probenauftrag 1,5 µl LPS Präparation mit 1,5 µl 2X Tricin Sample Solution mischen und in eine Geltasche einfüllen. Den Kathodenpuffer zwischen die Glasplatten, den Anodenpuffer außen auffüllen. Während das Sammelgel durchlaufen wird, das Elektrophoresegerät auf 30 V einstellen. Danach für 4-6 Stunden mit 110 V das Trenngel durchlaufen lassen.

2.5.3 Silberfärbung für Tricingel

Material

Fixierungslösung	40% Ethanol absolut 5% Essigsäure 96% ad 500 ml Ampuwa
Oxidierungslösung	40% Ethanol absolut 5% Essigsäure 96% 0,7% Periodsäure ad 50 ml Ampuwa
Silberfärbelösung	28 ml 0,1 N NaOH 2 ml 33% NH ₃ 5 ml 20% AgNO ₃ ad 150 ml Ampuwa
Formaldehydfixierer	50 mg Zitronensäure

	0,5 ml 37% Formaldehyd
	ad 200 ml Ampuwa
Stopplösung	7% Essigsäure
Trocknen des Gels	65% Methanol/ 5% Glycerin
	ad 400 ml Ampuwa
Einlegen Folien	5ml Glycerin 87%
	Ad 500ml Ampuwa

Procedere

Das Gel für mindestens eine Stunde, am besten aber über Nacht in die Fixierungslösung legen. Danach die Fixierungslösung abschütten und das Gel 5 Minuten mit der Oxidierlösung inkubieren. Anschließend dreimal 15 Minuten in einer neuen Schale mit Ampuwa waschen. Während der Waschschritte kann die Silberfärbelösung zubereitet werden. Unter dem Abzug wird NaOH vorgelegt, Ammoniak hinzugegeben und dann das Silbernitrat unter Rühren tropfenweise hinzugefügt. Die Lösung mit Ampuwa auffüllen. Nach dem Waschen das Gel für 10 Minuten mit der Silbernitratlösung färben. Lösung in den Sondermüll geben und erneut in einer frischen Schale dreimal 15 Minuten mit Ampuwa waschen. Gel in eine neue Schale geben und mit dem Formaldehydentwickler inkubieren, bis die Banden sichtbar werden. Zum Stoppen der Reaktion 7% Essigsäure hinzugeben, abschütten, nochmals Essigsäure hinzufügen und das Gel in Schale mit Ampuwa überführen. Zum Trocknen des Gels das gefärbte Tricingel für 2-6 Stunden in die Methanol/Glycerin Mischung legen. Danach die Einmachfolien in der Ampuwa/Glycerin Mischung ungefähr 30 Sekunden vollständig einweichen. Eine Einmachfolie auf eine Platte spannen, das Gel darauf legen, eine zweite Einmachfolie ohne Luftblasen darüber legen. Anschließend einen Rahmen auf die Platte legen, mit Klammern befestigen und 24 Stunden trocknen lassen.

2.6 Serumgewinnung

Zur Serumgewinnung wird von 10 freiwilligen Spendern, die keine Meningokokkenerkrankung, Gonokokkenerkrankung oder Impfung gegen Meningokokken in ihrer Anamnese aufweisen, mit Serum Monovetten Blut entnommen. Das Blut wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für zwei Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Serum wird in bereits gekühlte Eppendorf tubes überführt, auf Eis gestellt und mit Stickstoff schockgefroren. Das Serum bis zum Gebrauch bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahren.

2.7 ELISA

2.7.1 ELISA zum Nachweis von Kapsel und LPS Struktur

Meningokokken werden auf eine ELISA Platte angelagert. Sie werden mit einem Antikörper gegen die Kapsel oder die LPS Struktur inkubiert. Anschließend wird ein enzymgekoppelter Detektionsantikörper verwendet.

Material

1X PBS

1% BSA/PBS

Glutaraldehyd

Poly-D-Lysin

ABTS

ELISA Platten

1. Antikörper :
- α -Sg. A Kapsel #932 AK (Polysaccharidkapsel der Serogruppe A), hergestellt und validiert im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Univesität Mainz, freundlicherweise überlassen von Prof. D. Bitter-Suerbaum
 - α -L3,7,9 LPS AK (L3,7,9 LPS) von WD Zollinger
 - α -2-1-L8mAB AK (L8 LPS) von WD Zollinger
 - α -3F11 AK (Lacto-N-neotetraose des L3,7,9 LPS) [55]

2. Antikörper: α -mouse IgG+IgM AK H+L Peroxidase conjugate von
Dianova #115-035-044, Hamburg, Deutschland

Procedere

Meningokokken über Nacht in 37°C bei 5% CO₂ auf GC Agar anzüchten. Aus der dritten Fraktion Bakterien mit einem Tupfer entnehmen und eine OD_{600nm}= 0.15 in PBS einstellen. Die ELISA Platte mit 50 μ l Poly-D-Lysin (25 μ g/ml) in 1X PBS pro well für 30 Minuten inkubieren. Dreimal mit 1X PBS waschen. Danach erfolgt die Antigenanlagerung mit 20 μ l Bakteriensuspension für eine Stunde. Erneut dreimal mit 1X PBS waschen. Anschließend werden die Bakterien mit 100 μ l 0,05% Glutaraldehyd/PBS für 10 Minuten fixiert und mit 150 μ l 1% BSA/PBS für 30 Minuten bei 37°C geblockt. Wiederum dreimal mit 1X PBS waschen. Nun folgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper mit 50 μ l für eine Stunde bei 37°C. Die folgenden Verdünnungen werden für die verschiedenen Antikörper verwendet:

α -Sg. A Kapsel AK 1:4000 in 1% BSA/PBS; α -L3,7,9 LPS AK 1:100 in 1% BSA/PBS; α -2-1-L8mAB AK 1:1000 in 1% BSA/PBS; α -3F11 AK unverdünnt. Nochmals dreimal waschen mit 1X PBS. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgt mit 50 μ l α -mouse IgG+IgM AK H+L Peroxidase conjugate in 1:2500 in 1% BSA/PBS für 45 Minuten bei 37°C. Mit 1X PBS 3x waschen. Es folgt die Entwicklung mit 20 μ l APTS Substrat (1 mg/ml) bei 37°C und abschließend die Messung der OD_{410nm} nach 10 Minuten oder 20 Minuten.

2.7.2 ELISA zur Detektion von C3b und MAC

Die Meningokokken werden mit NHS inkubiert und auf ELISA Platten aufgebracht. Der erste Antikörper ist gegen die Komplementkomponente gerichtet. Über den zweiten Detektionsantikörper kann das an die Bakterien gebundene C3b und der MAC quantitativ gemessen werden.

Material

ELISA Platten

HBSS

HBSS++ 100 ml HBSS
 + 100 μ l 1M MgCl₂
 + 100 μ l 0.15 M CaCl₂

BSA

PBS

Glutaraldehyd

AP Substrat (ABTS)

1. Antikörper: α -C-5G AK (humanes C3b) von Dr. K. Iida, Takeda Chemical Industries, Ltd., Tsukuba, Japan [64]
 α -SC5b-9 (TCC) AK (humanes SC5b-9) von Metra Biosystems, Inc., Mountain View, California, USA
2. Antikörper: α -mouse IgG AK alkaline phosphatase conjugate in goat von Sigma chemical company, A#3688, St. Louis, MO, USA

Procedere

Meningokokken werden über Nacht in 37°C, 5% CO₂ auf Schokoladenagar kultiviert. Aus der dritten Fraktion mit einem Tupfer Bakterien in HBSS++ einreiben und eine bakterielle Suspension mit einer OD_{600nm} = 0.3 in HBSS++ herstellen. Danach 900 μ l dieser Suspension mit 100 μ l NHS im Wasserbad bei 37°C und 200 rpm 15 Minuten lang inkubieren. Anschließend Bakterien bei 4°C und 10000 rpm für zwei Minuten zentrifugieren. Dann zweimal mit HBSS waschen und in 1 ml HBSS resuspendieren. 50 μ l Bakteriensuspension pro well auftragen und bei 37°C 1,5 Stunden lang inkubieren. 100 μ l 0.05% Glutaraldehyd in PBS hinzufügen und weitere 20 Minuten inkubieren. Danach dreimal mit 1X PBS waschen. Anschließend mit 150 μ l 1% BSA in PBS bei 37°C für 45 Minuten blocken. Erneut dreimal mit 1X PBS waschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgt mit 50 μ l für eine Stunde bei 37°C in den folgenden Verdünnungen: α -C-5G AK unverdünnt; α -SC5b-9 (TCC) AK 1: 500 in 1% BSA/PBS. Dreimal mit 1X PBS waschen. Danach wird mit 50 μ l des zweiten Antikörpers, α -mouse IgG AK alkaline phosphate conjugate

1:1000 in 1% BSA/PBS, bei 37°C für 45 Minuten inkubiert. Abschließend viermal mit 1X PBS waschen, zum Entwickeln 100 µl AP Substrat pro *well* hinzufügen und die OD_{410 nm} nach 10 Minuten messen.

2.8 Semiquantitative Detektion von C3b mittels Western Blot

Meningokokken wurden mit normalen humanem Serum inkubiert, anschließend gewaschen und auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel nach Molekulargewicht aufgetrennt (SDS-PAGE). Danach werden die aufgetrennten Bakterienbestandteile elektrophoretisch auf eine Membran übertragen und mit einem ersten Antikörper gegen die α -Kette des C3b Moleküls inkubiert. Der Antikörper mAb755 erkennt ein Epitop der α -Kette, wodurch auf der Bakterienoberfläche gebundenes C3b mittels elektrophoretischer Auftrennung und Western Blot detektiert werden kann [151] [86]. Aufgrund der Position des mAB735 Epitops auf der α -Kette des C3 Moleküls kann iC3b von C3b im Western blot unterschieden werden [151]. Das Molekulargewicht der Bande von membrangebundenem C3b setzt sich zusammen aus Membrananteil und dem Molekulargewicht der α -Kette von C3b (106 kD). Die β -Kette spielt bei der Detektion keine Rolle, da die Disulfidbrücken zwischen α -Kette und β -Kette durch SDS im Western Blot zerstört werden. Bei der Entstehung von iC3b wird deshalb das kleinere, nicht direkt membrangebundene C-terminale Fragment (43 kD) der α -Kette freigesetzt. Mit einem zweiten Antikörper, der gegen den ersten gerichtet und an ein Enzym gekoppelt ist, kann der gebundene Komplementfaktor (C3b bzw. iC3b) nachgewiesen werden.

2.8.1 Inkubation der Bakterien mit Serum

Material

VBS *Veronal buffered saline* (siehe unter Bakterizidietest)

NHS

Sample solution buffer 5% β -Mercaptoethanol (1ml)
2% SDS
12.5% Glycerin
in 0,5M Tris-HCl ph 6,8
1Msp Bromphenolblau

EDTA

Procedere

Bakterien über Nacht in 37° C, 5% CO₂ auf GC Agar kultivieren. Aus der dritten Fraktion mit Tupfer abtragen und in VBS/BSA einreiben. Danach 1 ml Bakterienlösung OD₆₀₀= 0,2 in VBS/BSA (OD₆₀₀= 0,1 entspricht ca. 10⁸ Bakterien/ ml) herstellen. In einem Ansatz von insgesamt 400 μ l Bakteriensuspension mit dem gewünschten Anteil von NHS mischen. Die Inkubation erfolgt bei 37° C im Thermomixer für die jeweils zu untersuchende Inkubationszeit. Die Interaktion zwischen Meningokokken und Serum wird durch die Zugabe von 10 mM EDTA (Endkonzentration) auf Eis abgestoppt. Anschließend bei 4° C und 13000 rpm für fünf Minuten zentrifugieren. Das Pellet dreimal mit 500 μ l PBS waschen und in 40 μ l *sample solution buffer* resuspendieren.

2.8.2 Elektrophorese

Material

20% SDS

30% Acrylamid-Stammlösung

TEMED

10%APS

70% Ethanol

Lower Tris 90.85g Tris
mit HCl ad ph 8.8
10ml 20%SDS
ad 500ml Ampuwa

Upper Tris 30.3g Tris
mit HCl ad pH 6.8
10ml 20%SDS
ad 500ml Ampuwa

Elektrophoresepuffer 10x stock 30,3g TRIS
(Gebrauch 1:10 in Ampuwa) 144g Glycin
50ml 20%SDS
ad 1l Ampuwa

Trenngel 9% : 1,8 ml Acrylamid
2,7 ml A.dest.
1,5 ml Lower Tris
10 µl TEMED
30 µl 10% APS

Sammelgel 0,375 ml Acrylamid
1,625 ml A.dest.
0,625 ml Upper Tris
10 µl TEMED

17,5 µl 10% APS

Elektrophoresekammer

SDS-Page Marker

Procedere

Glasplatten mit 70% Ethanol reinigen und das Gel gießen. Das Gel in der Elektrophoresekammer befestigen und den Elektrophoresepuffer einfüllen. Danach 10 µl Bakterienlysat (siehe 2.8.1) pro Tasche und 5 µl des Markers auf das Gel auftragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 20 mA. Danach wird das Gel in das Blotting System übertragen. Jedes Gel sollte in doppelter Ausführung angefertigt werden. Ein Gel wird zum Blotten verwendet, das andere wird mit einer Silberfärbung gefärbt, um die Menge des geladenen Proteins vergleichen zu können.

2.8.3 Blotting und Entwicklung der Nitrocellulosemembran

Material

10X Blot-Puffer	30g Tris 144g Glycin in 1l A.dest.
1X Laufpuffer	700ml A.d./200ml Methanol/100mlx10X Blot-Puffer
Blockpuffer	1X PBS/0.1%Tween20/5% Magermilch
Waschpuffer	1X PBS/0.1%Tween20

Whatman-Papier

Nitrocellulose

Blotting System

1. Antikörper: mAb 755 AK (C-terminales C3c Fragment human) [86]
[151]
2. Antikörper: α-mouse IgG+IgM AK H+L Peroxidase conjugate (in goat)
von Dianova #115-035-044, Hamburg, Deutschland

ECL System

Procedere

Die Schwämmchen und zwei Whatman-Papiere kurz in Blotpuffer einweichen. Die Nitrocellulosemembran in Ampuwa schwenken. Das Gitter des Blotting Systems aufklappen, ein Schwämmchen, dann ein Whatman-Papier, das Gel, die Nitrocellulosemembran, ein Whatman-Papier und ein Schwämmchen aufeinander legen. Das Gitter schließen, das Kühlelement in das Blotting System einhängen und das Gerät eine Stunde bei 300 mA laufen lassen. Nach einer Stunde die Nitrocellulosemembran vorsichtig mit der Pinzette aus dem Gitter entfernen und unspezifische Bindungen mit 1X PBS in 0.1% Tween20 in 5% Magermilch bei Raumtemperatur absättigen. Es folgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper mAb 755 AK 1:3000 in 1X PBS in 0.1% Tween20 in 1% Magermilch bei 4° für 8 bis 12 Stunden oder alternativ für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend zweimal mit Waschpuffer je 5 Minuten waschen. Mit dem zweiten Antikörper α-mouse IgG+IgM AK H+L Peroxidase conjugate 1:5000 in 1X PBS in 0.1% Tween20 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren. Nochmals dreimal mit dem Waschpuffer für fünf Minuten waschen. Den Blot blasenfrei auf eine Glasplatte legen. Zur

Entwicklung des Blots mit dem ECL System 1 ml Lösung 1 in ein Greiner Röhrchen vorlegen, und 1 ml Lösung 2 rasch hinzufügen, gut mischen und gleichmäßig auf den Blot verteilen. Eine Minute einwirken lassen, abgießen und eine Frischhaltefolie luftblasenfrei auflegen. Hyperfilm ECL RPN 2103 in Dunkelkammer auflegen und durch den Entwickler laufen lassen.

2.8.4 Silberfärbung des SDS-Page Gel

Um die eingesetzte Menge an Bakterienlysat in den verschiedenen Spuren des Gels miteinander vergleichen zu können, wird das zeitgleich mit den gleichen Proben erstellte Duplikat des SDS-Page Gels mit einer Silberfärbung gefärbt.

Material

Fixierungslösung	50% Methanol + 12% Essigsäure
Imprägnierungslösung	150 µl 1.73 M Na ₂ S ₂ O ₃ Natriumthiosulfat 200 µl 37% Formaldehyd ad 300 ml Ampuwa
Silberfärbelösung	200 µl 37% Formaldehyd 12 mM AgNO ₃ ad 300 ml Ampuwa
Reduktionslösung	150 µl 37% Formaldehyd 3 µl 1.73 M Na ₂ S ₂ O ₃ 0,57 M Na ₂ CO ₃
Stopplösung	7% Essigsäure
30% Ethanol	
Ampuwa	
Glycerin 87%	

Procedere

Das Gel über Nacht in Fixierlösung legen. Anschließend dreimal 30 Minuten in 30% Ethanol waschen. Danach das Gel für exakt eine Minute in die Imprägnierungslösung geben und dreimal eine Minute in Ampuwa waschen. Dann das Gel für 20 Minuten bis eine Stunde in die Farblösung geben; erneut

zweimal 30 Sekunden in Ampuwa waschen. Nun wird die Reduktionslösung hinzugefügt bis die Banden ausreichend sichtbar sind, dann abschütten und sofort die Stopplösung dazugeben. Nochmals mit Ampuwa waschen, und zweimal 10 Minuten in Stopplösung legen. Zum Trocknen des Gels werden die Einmachfolien für 30 Sekunden in 5 ml Glycerin 87% in 500 ml Ampuwa vollständig eingeweicht. Eine Einmachfolie auf eine Platte spannen, das Gel darauf legen, eine zweite Einmachfolie ohne Luftblasen darüber tun. Anschließend einen Rahmen auf die Platte legen und mit Klammern befestigen. 24 Stunden trocknen lassen.

2.9 Bakterizidietest

Der Begriff Bakterizidietest wird in der Literatur für zwei verschiedene Testsysteme verwendet. Einerseits wird damit ein *assay* mit bakteriziden Antikörpern in Gegenwart von Komplement beschrieben. Wir verwenden den Begriff Bakterizidietest im Sinne eines *serum killing assays*, wobei die Serumkomplement vermittelte bakterizide Aktivität erfasst wird. Hierfür wird eine bestimmte Menge Bakterien mit einer bestimmten Menge normalem humanen Serum inkubiert. Anschließend wird der Ansatz ausplattiert und die Anzahl der überlebenden Bakterien bestimmt.

Material

VBS/BSA <i>Veronal buffered saline</i>	5 mg Barbitol
	145 mM NaCl
	0,5 mM MgCl ₂
	0,15 mM CaCl ₂
	0,5% BSA

Serum

1X PBS

GC Agar

Procedere

Bakterien über Nacht bei 37° C in 5% CO₂ auf GC Agar kultivieren. Aus der dritten Fraktion Bakterien mit einem Tupfer entnehmen und in VBS/BSA einreiben. Danach 1 ml Bakteriensuspension mit einer OD₆₀₀= 0,1 in VBS/BSA herstellen, was etwa 10⁸ Bakterien pro ml entspricht. Die Suspension zweimal 1:10 in VBS/BSA auf 10⁶ Bakterien pro ml verdünnen. Das Gesamtvolumen des Ansatzes festlegen, gewünschte Konzentration an NHS hinzufügen, Bakterienendkonzentration von 10⁵ pro ml durch Auffüllen mit VBS/BSA erreichen. Anschließend erfolgt die Inkubation im Thermomixer bei 37 ° C für den zu untersuchenden Zeitraum. 100 µl des Ansatzes unverdünnt sowie erste (1:10), zweite (1:100) und dritte (1:1000) Verdünnung in PBS auf Agarplatte ausplattieren. Als Kontrolle der ursprünglich eingesetzten Bakterienmenge aus der Suspension mit 10⁶ Bakterien pro ml eine Verdünnungsreihe in PBS herstellen und jeweils 100 µl der Verdünnungen mit 10³, 10² und 10¹ Bakterien pro ml ausplattieren. Die GC Agarplatten über Nacht bei 37° C in 5% CO₂ inkubieren. Am nächsten Morgen die gewachsenen Kolonien auszählen und die Kolonie bildenden Einheiten bestimmen.

2.10 FACS (*Analytical Flow Cytometry*)

Mit Hilfe des FACS Assays kann die auf den Bakterien abgelagerte Menge an Komplementkomponenten gemessen werden. Bakterien werden erst mit NHS, dann mit einem ersten Antikörper gegen die Komplementkomponente und anschließend mit einem zweiten FITC konjugiertem Antikörper inkubiert. Die Messung der Intensität der Fluoreszenz wird mit Hilfe des FACS Gerätes gemessen.

Material

HBSS

HBSS++: 100 ml HBSS
 + 100 µl 1M MgCl₂
 + 100 µl 0.15 M CaCl₂

1% Paraformaldehyd/ PBS

1X PBS

FACS Gerät

Serum

Faktor H #a137 Purified human complement component FH, Advanced Research Technologies, San Diego, CA, USA
Konzentration 5 µg pro 100 µl in HBSS

1. Antikörper: α-Faktor H AK (humaner Faktor H) affinity purified (in rabbit) von Dr. Michael Pangburn, University of Texas, Health Science Ctr., Tyler, Texas, USA [113]

α-C3 AK (humanes C3) FITC conjugate (in sheep) von Biodesign International, ME, USA 1:50 in HBSS

α-C4 AK (humanes C4) FITC conjugate (in sheep) von Biodesign International, ME, USA 1:50 in HBSS

α-SC5b-9 (TCC) AK (humanes SC5b-9) von Metra Biosystems, Inc., Mountain View, California, USA 1:50 in HBSS

α-IgG AK (human IgG) FITC conjugate von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA 1:50 in HBSS

α-IgG AK (human IgG) FITC conjugate von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA 1:50 in HBSS

2. Antikörper: α-mouse IgG whole molecule FITC conjugate (in goat) von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA 1:50 in HBSS

α-goat IgG whole molecule FITC conjugate (in rabbit) von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA 1:50 in HBSS

α-rabbit IgG whole molecule FITC conjugate von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA

Procedere

Bakterien über Nacht auf Schokoladenagar bei 37°C in 5% CO₂ kultivieren. Anschließend eine Bakteriensuspension mit 10⁸ Bakterien pro Probe in HBSS++ herstellen (siehe 2.9). Anschließend folgt die Inkubation mit variabler

Konzentration an NHS oder purem Faktor H bei 37°C im Wasserbad unter Bewegung. Danach die Proben zwei Minuten mit 10000 rpm zentrifugieren und einmal mit HBSS++ waschen. Den ersten Antikörper für 20 Minuten bei Raumtemperatur hinzufügen. Erneut die Proben zwei Minuten mit 10000 rpm zentrifugieren; falls der erste Antikörper nicht mit FITC konjugiert war, das Pellet mit dem zweiten Antikörper resuspendieren und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nochmals zentrifugieren für zwei Minuten mit 10000 rpm. Das Pellet wird in 1 ml 1% Paraformaldehyd resuspendiert. Es folgt die Messung im FACS Gerät. Es wurde ein *gate* gesetzt, um agglutinierte Bakterien von der Messung auszuschließen [123]. Die Konzentrationen der verwendeten Antikörper wurden oben zu Beginn der Versuchsbeschreibung unter Material angegeben.

Kontrollen

Um unspezifische Bindungen der Antikörper im FACS Assay auszuschließen, wurden Inkubationen ohne NHS durchgeführt. Es konnte keine Antikörperbindung an Meningokokken festgestellt werden, die nicht mit NHS inkubiert wurden. Die Kontrollen sind für die verschiedenen Mutanten und Antikörper im Anhang in Tabelle 6.1-1, 6.1-2 und 6.1-3 dargestellt.

Einstellungen am FACS Gerät

Detector/Amps:

Parameter	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E01	3.00	Lin
P2	SSC	450	1.00	Lin
P3	FL1	669	1.00	Log
P4	FL2	604	1.00	Log
P5	FL3	150	1.00	Log

Threshold:

Parameter: FSC

Value: 15

Compensation:

FL1 – 0.0% FL2

FL2 – 29.3% FL1

FL2 – 0.0% FL3

FL3 – 0.0% FL2

2.11 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde, sofern nicht anders angegeben, die STABWN (Standardabweichung vom Mittelwert) von Excel Microsoft Premium Version 2000 benutzt. Die gezeigten Experimente sind alle mindestens zweimal in doppelter Ausführung durchgeführt worden. Repräsentative Experimente werden dargestellt. Unterschiede zwischen Experimenten wurden mittels student-t-Test (Typ=2: homoskedastisch; Seiten=2: zwei seitig) auf Signifikanz getestet. Ein Wert von $p < 0,01$ wurde als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Einführung

Der Ergebnisteil ist in verschiedene Abschnitte untergliedert. Zuerst werden die, in dieser Arbeit verwendeten, isogenen Kapsel- und LPS Mutanten bezüglich ihrer Struktur charakterisiert. Im Anschluss daran werden die Experimente zur Untersuchung der Serumresistenz von Serogruppe A Meningokokken dargestellt. Es wird sowohl der Einfluss der Kapsel, als auch der Einfluss des LPS auf die Serumresistenz untersucht. Vergleichend mit bekapselten Mutanten der Serogruppen B, C, W135 und Y wird auf die Menge an bakteriengebundenen Komplementfaktoren, Komplementregulatoren und Immunglobulinen näher eingegangen.

Im dritten Abschnitt des Ergebnisteils werden die Serumresistenzmechanismen von unbekapselten Bakterien untersucht. Hierbei werden einerseits der Einfluss von LPS Sialisierung und andererseits die Auswirkungen einer LPS Verkürzung (L8 LPS) genauer analysiert. Da der Schwerpunkt der Arbeit auf der Untersuchung der Serumresistenz von *Neisseria meningitidis* der Serogruppe A liegt, werden isogene kapsellose Mutanten des Serogruppe A Stammes #2594 jeweils gesondert zu Anfang dieses Abschnittes dargestellt.

3.2 Charakterisierung und Überprüfung der Mutanten

3.2.1 Isogene Kapsel- und LPS- Mutanten von *Neisseria meningitidis* der Serogruppe A

Um den Einfluss verschiedener Pathogenitätsfaktoren auf die Serumresistenz zu untersuchen, wurden vom Serogruppe A Stamm #2594 isogene Kapsel und LPS Mutanten erstellt. Serogruppe A Meningokokken heben sich von den übrigen Serogruppen durch ein Fehlen von Sialinsäure in ihrer Polysaccharidkapsel ab. Außerdem sind sie nicht in der Lage ihr LPS endogen zu sialisieren. LPS Sialisierung bedeutet, dass die endständigen Zucker der

α -Kette des 3,7,9 LPS, die sogenannte Lacto-N-neotetraose, mit Sialinsäure verknüpft werden. Sialinsäure muss für die Sialysierung aktiviert sein (CMP-Nana). Nach externer Zugabe von CMP-Nana ist eine exogene Sialysierung des LPS auch bei Meningokokken der Serogruppe A möglich.

Die Tabelle 3.2-1 gibt einen Überblick über die Eigenschaften der verschiedenen Mutanten.

Mutante	Kapsel	LPS Immunotyp	exogene LPS Sialysierung
Wildtyp wt #2594	+	L3,7,9	+
Δ <i>lst</i> #2677	+	L3,7,9	-
Δ <i>mynB</i> #2668	-	L3,7,9	+
Δ <i>lgtA</i> #2678	+	L8	-
Δ <i>mynB/lgtA</i> #2706 ☼	-	L8	-

Tabelle 3.2-1 Übersicht der erstellten Mutanten des Wildtypes #2594 der Serogruppe A. Die mit diesem Symbol gekennzeichnete Mutante ☼ wurde in dieser Arbeit erstellt.

Um die Struktur der Mutanten zu überprüfen, wurde ein ELISA mit Antikörpern gegen die Kapsel und gegen LPS Strukturen durchgeführt. Die Überprüfung der Mutanten in Abbildung 3.2-1 zeigte, dass der Wildtyp, die Δ *lst* Mutante und die Δ *lgtA* Mutante eine Kapsel exprimierten, während Δ *mynB* Mutante und *mynB/lgtA* Mutante unbekapselt waren. Das Wildtypbakterium exprimierte, ebenso wie Δ *lst* Mutante und Δ *mynB* Mutante, ein L3,7,9 LPS; die Mutanten Δ *lgtA* und Δ *mynB/lgtA* zeigten eine L8 LPS Struktur.

Der Antikörper 3F11 bindet die endständige Lacto-N-neotetraose (Gal-GlcNac) des L3,7,9 LPS [55]. Da diese Struktur Akzeptor für Sialinsäure ist, kann der Antikörper sialisiertes L3,7,9 LPS nicht mehr binden. Aufgrund des Fehlens von Gal-GlcNac beim L8 LPS kann der Antikörper 3F11 an L8 LPS auch nicht binden. Der Wildtyp, Δ *mynB* und Δ *lst* Mutante konnten den Antikörper 3F11 an

ihrem nicht sialysierten L3,7,9 LPS binden. Die Mutanten mit L8 LPS ($\Delta lgtA$ und $\Delta mynB/lgtA$) zeigten keine Bindung von Antikörper 3F11.

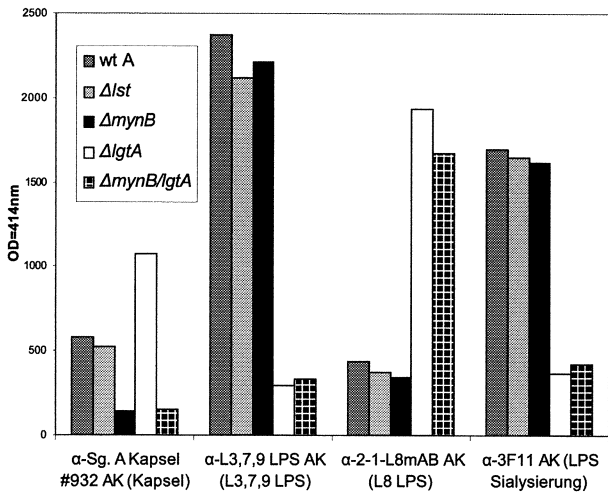


Abbildung 3.2-1 ELISA zur Überprüfung der Kapselstruktur, des LPS sowie der LPS Sialysierung der Mutanten des Serogruppe A Stammes #2594. Der Antikörper 3F11 bindet die endständigen Zucker von nicht sialysiertem L3,7,9 LPS. Der Wildtyp, die Δlst Mutante und die $\Delta lgtA$ Mutante exprimierten eine Polysaccharidkapsel der Serogruppe A; die Mutanten $\Delta mynB$ und $\Delta mynB/lgtA$ waren unkapselt. Ein nicht sialysiertes L3,7,9 LPS zeigte der Wildtyp, die $\Delta mynB$ Mutante sowie die Δlst Mutante; ein L8 LPS wurde von den Mutanten $\Delta lgtA$ und $\Delta mynB/lgtA$ exprimiert.

Zur genaueren Darstellung des LPS wurde aufgereinigtes LPS auf ein Tricingel aufgetragen und durch Silberfärbung zur Darstellung gebracht. Das LPS des Wildtyps, der $\Delta mynB$ und der Δlst Mutante zeigten das Migrationsverhalten von L3,7,9 LPS, während sich die Banden der $\Delta lgtA$ und $\Delta mynB/lgtA$ Mutanten im Gel weiter unten befanden, was dem Migrationsverhalten des um zwei Zucker kürzeren L8 LPS entspricht. Die erstellten Mutanten werden in der schematischen Darstellung in Abbildung 3.2-2 nochmals verdeutlicht.

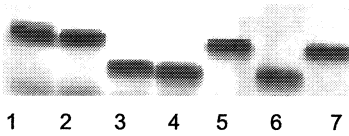


Abbildung 3.2-2 Darstellung des LPS der Mutanten des Serogruppe A Stammes #2594 mittels silbergefärbtem Tricingel. 1 MC 58 (Kontrolle) 2 Wildtyp Serogruppe A #2594 3 $\Delta lgtA$ # 2678 4 MC58 $\Delta lgtA$ (Kontrolle) 5 $\Delta mynB$ #2668 6 $\Delta mynB/lgtA$ #2706 7 Δlst #2677 Die LPS Banden der $\Delta lgtA$ Mutanten mit der um zwei Zucker kürzeren L8 LPS Struktur migrierten im Tricingel schneller als das L3,7,9 LPS der übrigen Mutanten.

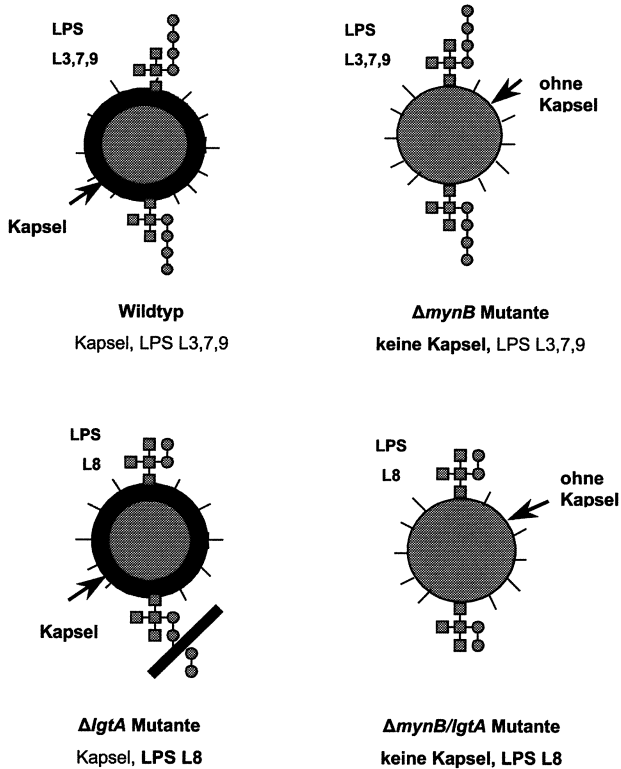


Abbildung 3.2-3 Schematische Darstellung der Mutanten des Serogruppe A Stammes #2594. Der Wildtyp mit Kapsel und L3,7,9 LPS, die $\Delta mynB$ Mutante unbekapselt mit L3,7,9 LPS, die $\Delta lgtA$ Mutante mit Kapsel und L8 LPS und die $\Delta mynB/lgtA$ Mutante unbekapselt mit L8 LPS

3.2.2 Isogene Kapsel- und LPS Mutanten von Meningokokken mit sialinsäurehaltigen Kapseln

Um die für Serogruppe A gefundenen Ergebnisse besser mit den Serumresistenzmechanismen der anderen Serogruppen vergleichen zu können, wurden Mutanten der Wildtypstämme MC58 (Serogruppe B), #2120 (Serogruppe C), #171 (Serogruppe W135) und #2220 (Serogruppe Y) herangezogen. Diese Mutanten lagen bereits vor; von mir erstellt wurden die unbekapselten L8 LPS Varianten ($\Delta siaD/igtA$). Durch den *knock-out* des jeweiligen Sialyltransferase Gens ($\Delta siaD$) ist eine Expression der Kapsel nicht mehr möglich. Der *knock-out* des *igtA* Gens führt zu einer Expression von L8 LPS.

Zur Überprüfung der $\Delta siaD/igtA$ Mutanten wurde ein ELISA (siehe Abbildung 3.2-5) und ein Tricingel (siehe Abbildung 3.2-4) zur Darstellung der LPS Struktur angefertigt. Da Meningokokken der Serogruppen B, C, W135 und Y im Gegensatz zu Serogruppe A Meningokokken ihr LPS sialysieren können, exprimierten die $\Delta siaD$ Mutanten ein sialysiertes L3,7,9 LPS. Alle Mutanten wiesen den erwarteten LPS Phänotypen auf (siehe Abbildung 3.2-5 und Abbildung 3.2-4). Der Grad der endogenen LPS Sialysierung variierte zwischen den verschiedenen Serogruppen und war beim Serogruppe C Stamm #2120 am höchsten, wie die geringe Bindung des Antikörpers 3F11, dargestellt in Abbildung 3.2-5, zeigte.

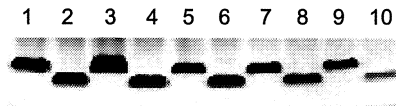


Abbildung 3.2-4 Darstellung des LPS der unbekapselten L8 LPS Mutanten ($\Delta siaD/igtA$) mittels silbergefärbtem Tricingel. Serogruppe A (Stamm #2594) $\Delta mynB$ (1) und $\Delta mynB/igtA$ (2), Serogruppe B (Stamm #2135) $\Delta siaD/ist$ (3) und $\Delta siaD/igtA$ (4), Serogruppe Y (Stamm #2220) $\Delta siaD/ist$ (5) und $\Delta siaD/igtA$ (6), Serogruppe W (Stamm #171) $\Delta siaD/ist$ (7) und $\Delta siaD/igtA$ (8), Serogruppe C (Stamm #2120) $\Delta siaD/ist$ (9) und $\Delta siaD/igtA$ (10). Die höher gelegenen Banden zeigten das Migrationsverhalten von L3,7,9 LPS, während die unteren Banden das Migrationsverhalten von L8 LPS zeigten.

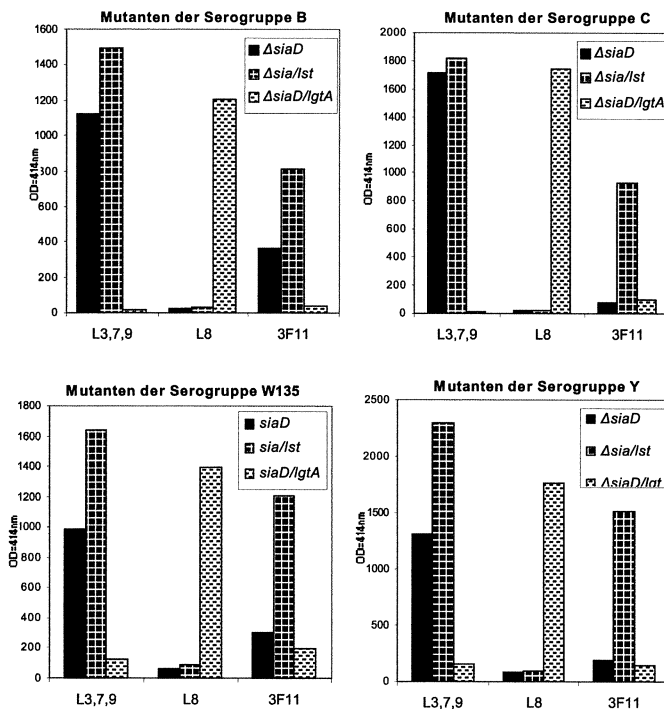


Abbildung 3.2-5 ELISA zur Überprüfung der LPS Struktur der unbekapselten Mutanten der Serogruppen B (Stamm 2135), der Serogruppe C (Stamm 2120), der Serogruppe W135 (Stamm 171) und der Serogruppe Y (Stamm 2220). Verwendet wurden der L3,7,9 Antikörper, der L8 Antikörper, sowie der Antikörper 3F11, der an die endständige Zucker des L3,7,9 LPS bindet. Ist das LPS sialysiert, kann der Antikörper 3F11 nicht binden. Die $\Delta siaD$ Mutanten exprimierten ein sialysiertes L3,7,9 LPS, die $\Delta siaD/lst$ Mutanten ein nicht sialysiertes L3,7,9 LPS und die $\Delta siaD/igtA$ ein L8 LPS. Alle Mutanten waren unbekapselt.

3.3 Serumresistenz von *Neisseria meningitidis* der Serogruppe A

Zum Zeitpunkt des Beginns der experimentellen Arbeit lagen noch keine Daten zu Mechanismen der Serumresistenz von *Neisseria meningitidis* der Serogruppe A vor. In dieser Arbeit wurden daher mit Hilfe der bereits charakterisierten isogenen Kapsel und LPS Mutanten verschiedene

Serumresistenzfaktoren untersucht. Die funktionellen Untersuchungen wurden im folgenden durch vergleichende Untersuchungen der Serogruppen B, C, W135 und Y komplementiert.

3.3.1 Der Einfluss der Polysaccharidkapsel

3.3.1.1 Überleben der Serogruppe A Mutanten in humanem Serum

Die Serogruppe A Mutanten des Stammes #2594 wurden mit normalem humanen Serum inkubiert, anschließend ausplattiert und die Anzahl der überlebenden Bakterien bestimmt. Folgende Mutanten wurden im Bakterizidietest untersucht: Serogruppe A Wildtyp #2594, die unbekapselte $\Delta mynB$ Mutante, die ΔIst Mutante ohne Möglichkeit der Sialysierung (entspricht ohne Zugabe von Sialinsäure dem Wildtypbakterium) und die bekapselte $\Delta IgtA$ Mutante mit L8 LPS.

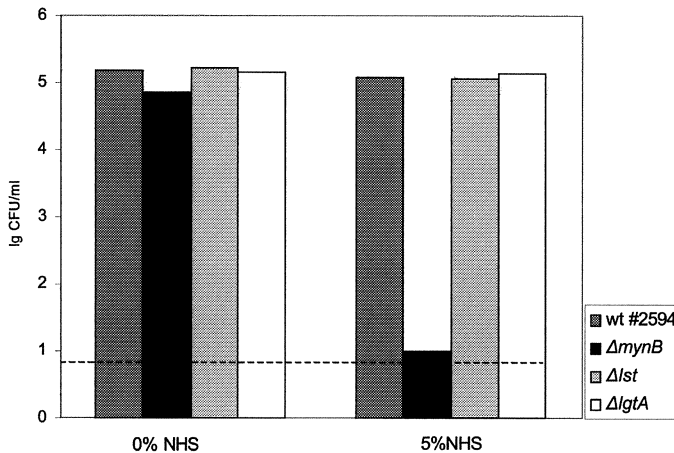


Abbildung 3.3-1 Inkubation der Mutanten der Serogruppe A Stammes 2594 mit 5% NHS für 60 Minuten im Bakterizidietest. Die Zahl der Bakterien wird in log₁₀ CFU (*colony forming unit*) pro ml angegeben. Die gestrichelte Linie zeigt die Nachweisgrenze an. Die Inkubation mit 5% Serum tötete die unbekapselte Mutante $\Delta mynB$ vollständig ab.

In Abbildung 3.3-1 ist zu sehen, dass nach Inkubation der Meningokokken mit 5% NHS die unbekapselte Mutante $\Delta mynB$ bereits vollständig abgetötet wurde, während sich der Wildtyp und die bekapselten L8 LPS Mutante ($\Delta lgtA$) als resistent erwiesen. Die Kapsel ist bei Serogruppe A Stamm #2594, trotz fehlender Sialinsäure in ihrer Struktur, essentiell zum Überleben in normalem humanem Serum.

3.3.1.2 Deposition von C3b auf der Bakterienoberfläche

Um festzustellen, ob die wenig serumresistente unbekapselte Mutante mehr C3b deponiert als die bekapselten Mutanten, wurde nach Inkubation der Bakterien mit normalem humanem Serum und elektrophoretischer Auftrennung ein Western Blot zur semiquantitativen Bestimmung der gebundenen C3b Menge angefertigt.

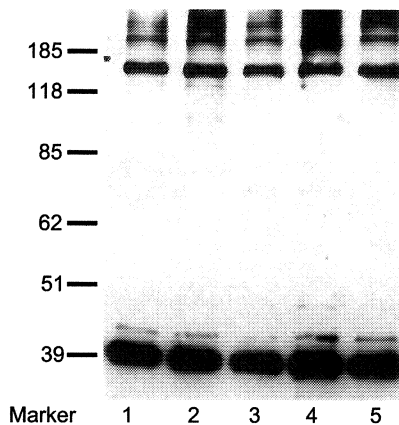


Abbildung 3.3-2 **Detektion von C3b und iC3b auf Mutanten des Serogruppe A Stammes #2594 mittels Western Blot nach Inkubation mit 40% NHS für 10 Minuten.** Die Detektion der deponierten C3b Menge erfolgte mit Antikörper mAB755. Gezeigt sind wt #2594 (1), $\Delta mynB$ (2), $\Delta lgtA$ (3), $\Delta galE$ (4) von B1940 als Kontrolle eines Stammes, der viel C3b deponierte und $\Delta mynB/lgtA$ (5). Die Bande um 160 kD entspricht membrangebundenem C3b, die Bande bei 40 kD entspricht dem generierten iC3b. Die bekapselten Bakterien, der wt (1) und die $\Delta lgtA$ (3) Mutante deponierten weniger C3b und generierten weniger iC3b als die unbekapselten Mutanten $\Delta mynB$ (2) und $\Delta mynB/lgtA$ (5).

Der Antikörper mAb755 erkennt die α -Kette des C3b Moleküls, die eine Größe von 106 kD hat. Wird C3b an der Bakterienoberfläche deponiert, kommt es in einem reduzierenden SDS-PAGE Gel zu einem *shift* dieser Bande, wobei in Abhängigkeit vom kovalenten Bindungspartner mehrere hochmolekulare Banden entstehen können. In dem assay erscheint iC3b als 40 kD Bande. Die Bindungsstelle des Antikörpers mAb755 ist in Abbildung 1.3-2 markiert.

Beim Vergleich zwischen bekapselten Bakterien (wt und Δ IgtA) mit unbekapselten Mutanten (Δ mynB und Δ mynB/IgtA) in Abbildung 3.3-2 wird deutlich, dass die bekapselten Bakterien weniger C3b deponierten und vermutlich auch weniger iC3b generierten.

Um die eingesetzte Menge an Bakterienlysat in den einzelnen Spuren zu kontrollieren, wurde ein Silbergel angefertigt, das entsprechend dem oben gezeigten Western Blot beladen wurde.

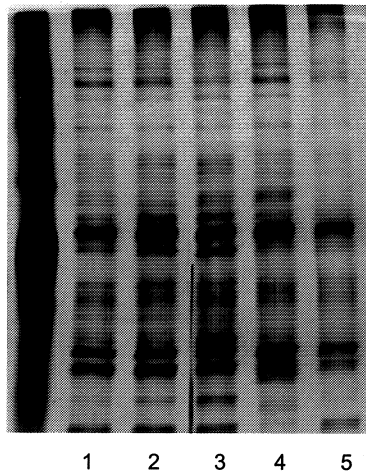


Abbildung 3.3-3 Die eingesetzte Menge an Bakterienlysat wurde mittels eines silbergefärbten SDS-PAGE Gels quantifiziert. Das Gel wurde entsprechend dem Western Blot (Abbildung 3.3-2) mit identischen Proben beladen. Gezeigt sind wt #2594 (1), Δ mynB (2), Δ IgtA (3), Δ galE (4) von B1940 und Δ mynB/IgtA (5). Die Spuren der unbekapselten Mutanten (Δ mynB (2) und Δ mynB/IgtA (5)) enthielten nicht mehr Bakterienlysat, als die Spuren, die mit dem Lysat bekapselter Bakterien beladen wurden.

Die Spuren der unbekapselten Mutanten (Δ mynB (2) und Δ mynB/igtA (5)) in Abbildung 3.3-3 enthielten nicht mehr Bakterienlysat, als die Spuren, die mit dem Lysat bekapselter Bakterien beladen wurden. Die vermehrte C3b Deposition der unbekapselten Mutanten ist also nicht durch Mengenvariation bedingt.

3.3.1.3 Bindung von Komplementfaktoren

An den bisherigen Ergebnissen wurde ersichtlich, dass die unbekapselte Δ mynB Mutante des Serogruppe A Stammes #2594 im Gegensatz zum Wildtyp serumsensibel war und im oben gezeigten Western Blot deutlich mehr C3b deponierte als der Wildtyp. Zur genaueren Untersuchung der Komplementablagerung wurde durch FACS Analyse die gebundene Menge von C3, C4 und MAC auf der Bakterienoberfläche bestimmt.

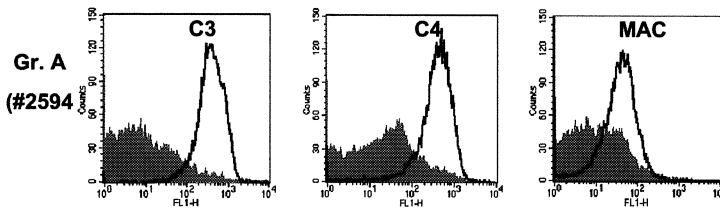


Abbildung 3.3-4 Detektion der Bindung von C3, C4 und MAC an die unbekapselte Mutante und den Wildtyp des Serogruppe A Stammes #2594 mittels FACS Analyse. Nach Inkubation mit 10% NHS für 10 Minuten deponierte die unbekapselte Δ mynB Mutante mehr C3, C4 und MAC im Vergleich zum Wildtyp auf ihrer Membran. ■ Wildtyp — Δ mynB 2668

In der Abbildung 3.3-4 wird deutlich, dass die unbekapselte Δ mynB Mutante tatsächlich mehr C3, mehr C4 und mehr MAC deponierte. Durch vermehrte Komplementaktivierung über den klassischen Weg kommt es zu einer vermehrten C3 Deposition, die in eine verstärkte Einlagerung von MAC in die Membran gipfelt. Diese vermehrte MAC Einlagerung führt zur Lyse des Bakteriums, was die verminderte Serumresistenz der unbekapselten Mutante erklären würde. Vergleichend wurde das Experiment auf die anderen Serogruppen ausgeweitet.

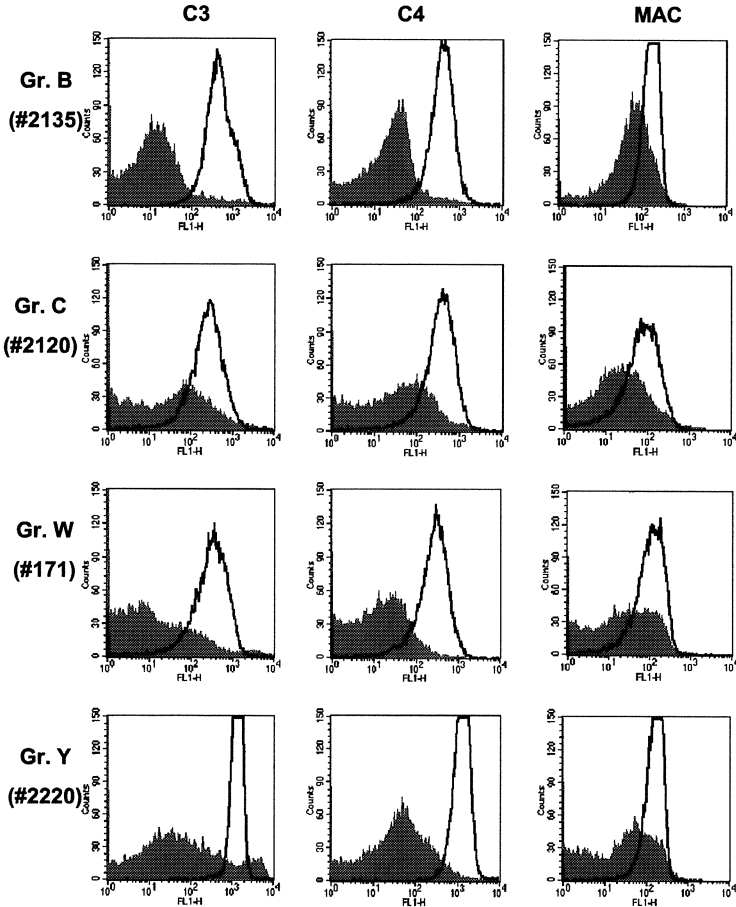



Abbildung 3.3-5 Detektion der C3, C4 und MAC Bindung der Stämme der verschiedenen Serogruppen mittels FACS Analyse zur Determination des Einflusses der Polysaccharidkapsel auf Komplementbindung. Die Inkubation erfolgte mit 10% NHS für 10 Minuten. Die unbekapselten $\Delta lst/siaD$ Mutanten lagerten mehr C3, C4 und MAC im Vergleich zu den bekapselten Δlst Mutanten auf ihrer Membran ab. Δlst  $\Delta lst/siaD$ —

Um den Einfluss der endogenen LPS Sialysierung auf die Serumresistenz auszuschalten, wurden Δlst mit $\Delta siaD/lst$ Mutanten verglichen.

Entsprechend der Beobachtung bei Serogruppe A Stamm #2594 deponierten die unbekapselten $\Delta siaD/ist$ Mutanten der verschiedenen Serogruppen mehr C3, C4 und MAC als die bekapselten Δist Mutanten. Für die hier untersuchten Mutanten der verschiedenen Serogruppen zeigte sich, dass die Expression einer Polysaccharidkapsel die Menge an gebundenen Komplementfaktoren verringert.

3.3.1.4 Bindung von IgM und IgG

Die vermehrte Aktivierung des klassischen Komplementweges kann aus einer vermehrten Antikörperbindung der unbekapselten Mutanten resultieren.

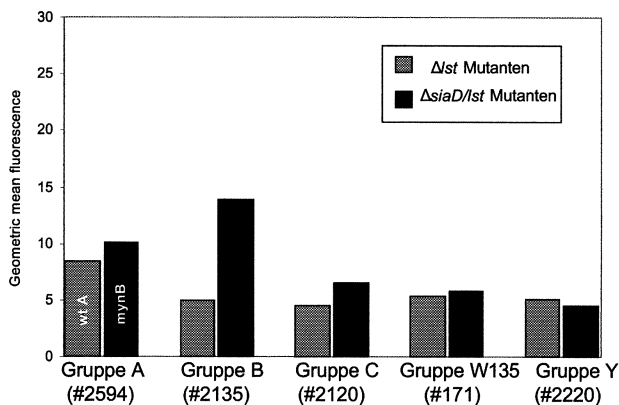


Abbildung 3.3-6 Nachweis der IgG Bindung an bekapselte und unbekapselte Meningokokken nach Seruminkubation durch FACS Analyse. Mit Ausnahme der Serogruppe B ergaben sich keine deutlichen Unterschiede in der Bindung von IgG nach Inkubation mit 10% NHS für 10 Minuten. Dargestellt ist die *geometric mean fluorescence*.

Mittels FACS Analyse wurde daher die Menge an IgG und IgM bestimmt, die nach Seruminkubation angelagert wurde. Bei den Mutanten des Serogruppe B Stammes konnte beobachtet werden, dass die $\Delta siaD/ist$ Mutante etwas mehr IgG Antikörper bindet, als die Δist Mutante; bei den Stämmen der übrigen Serogruppen konnten beim Vergleich der Menge an gebundenem IgG Antikörper zwischen bekapselter Mutante und unbekapselter Mutante keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 3.3-6).

Bei der Detektion der IgM Antikörperbindung konnten, mit Ausnahme der Serogruppe B, ebenfalls keine größeren Unterschiede der IgM Bindung beobachtet werden. Bei Serogruppe B fiel auf, dass die bekapselte Δ lst im Vergleich zur Δ siaD/lst Mutante und auch im Vergleich zu den anderen Δ lst Mutanten eine große Menge an IgM deponierte. Dies ist überraschend, da die bekapselte Δ lst Mutante des Stammes MC 58 einen sehr serumresistenten Phänotypen im Bakterizidetest zeigte [148]. Es handelt sich vermutlich um natürlich induzierte, nicht bakterizide Antikörper gegen α 2,8-Polysialinsäure. Die FACS Analysen konnten die Hypothese, dass die vermehrte Aktivierung des klassischen Weges durch erhöhte Antikörperbindung hervorgegangen ist, nicht unterstützen. Die Hypothese kann allerdings auch nicht verworfen werden, da möglicherweise auf unbekapselten Stämmen Antikörper mit anderer Spezifität binden, als auf bekapselten Stämmen.

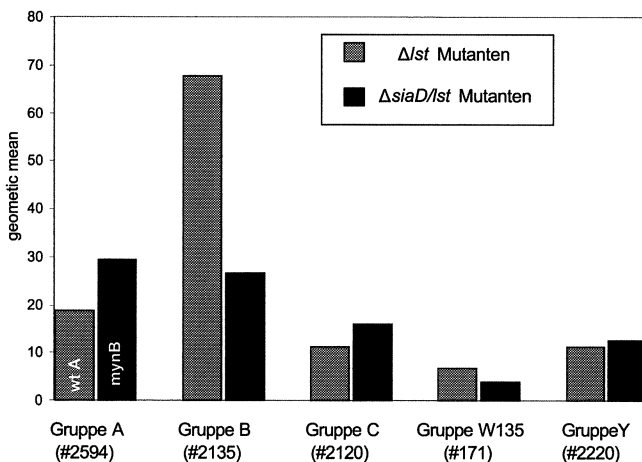


Abbildung 3.3-7 **Nachweis der IgM Bindung an bekapselte und unbekapselte Meningokokken nach Seruminkubation durch FACS Analyse.** Mit Ausnahme der Serogruppe B ergaben sich keine deutlichen Unterschiede in der Bindung von IgM nach Inkubation mit 10% NHS für 10 Minuten. Dargestellt ist die *geometric mean fluorescence*.

3.3.1.5 Bindung von Factor H

Die Blockade des klassischen Weges der Komplementaktivierung durch Zugabe von EGTA zum Serum führt im Bakterizidietest zu einer Schädigung der Bakterien. Die Untersuchung des Einflusses des alternativen Weges der Komplementaktivierung gestaltet sich daher schwieriger. Faktor H wird als ein wichtiger Regulator des alternativen Komplementweges angesehen. Faktor H ist als Kofaktor von Faktor I für die regulatorische C3b Spaltung verantwortlich. Die Bindung von Faktor H an der Bakterienoberfläche führt beispielsweise bei *Neisseria gonorrhoeae* zu einem serumresistenten Phänotypen [122]. Um den Einfluss der Polysaccharidkapsel auf die Faktor H Bindung bei Meningokokken darzustellen, wurden bekapselte und unbekapselte Mutanten mit aufgereinigtem Faktor H inkubiert, und anschließend die Menge an gebundenem Faktor H im FACS Scan detektiert.

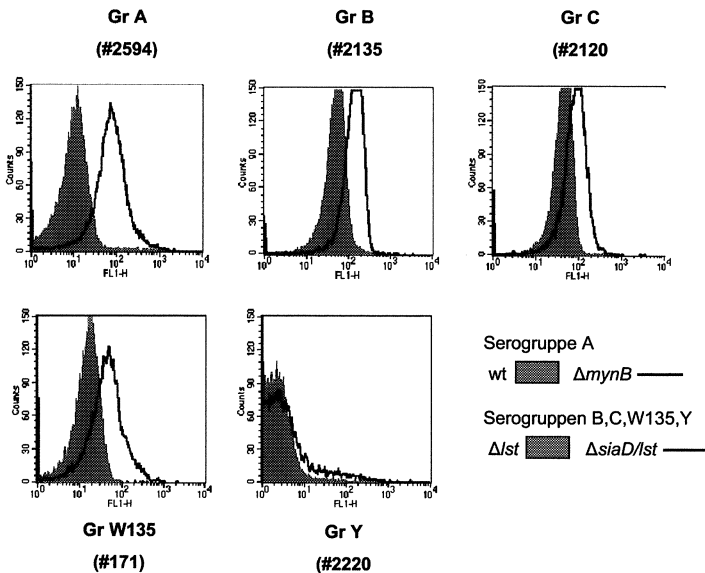


Abbildung 3.3-8 FACS Analyse der Bindung von Faktor H an Meningokokken nach Inkubation mit aufgereinigtem Faktor H. Verglichen wurde zwischen bekapselten Bakterien wt A bzw. Δst und den unbekapselten Mutanten $\Delta mynB$ bzw. $\Delta st/siaD$. Mit Ausnahme der Serogruppe Y banden die bekapselten Mutanten weniger Faktor H.

In Abbildung 3.3-8 ist zu sehen, dass der Wildtyp der Serogruppe A weniger Faktor H deponierte, als die unkapselte $\Delta mynB$ Mutante. Entsprechend banden die Δlst Mutanten der Serogruppen B, C und W135 weniger Faktor H als die $\Delta siaD/lst$ Mutanten. Beide Mutanten der Serogruppe Y zeigten eine geringe Bindung von Faktor H.

Da die serumresistenteren Mutanten mit Polysaccharidkapsel weniger Faktor H ablagerten, kann eine Vermittlung der Serumresistenz durch Faktor H bei den bekapselten Stämmen ausgeschlossen werden.

3.3.2 Der Einfluss des LPS auf Serumresistenz von bekapselten Mutanten der Serogruppe A

Anhand der bisherigen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Polysaccharidkapsel ein entscheidender Faktor für die Serumresistenz des untersuchten Serogruppe A Stammes ist. Nun soll die Frage nach dem Einfluss des LPS und der LPS Sialysierung auf das Überleben im Serum bei gleichzeitiger Expression einer Polysaccharidkapsel näher untersucht werden. Der Wildtyp der Serogruppe A #2594 besitzt ein nicht sialisiertes L3,7,9 LPS. Um den Einfluss von LPS Sialysierung auf die Serumresistenz bei dem verwendeten Serogruppe A Stamm zu untersuchen, wurde bei Kultivierung dem Medium CMP-Nana (Sialinsäure) zugefügt, da der Wildtyp seine L3,7,9 LPS Struktur nicht endogen sialysieren kann. Nach Inkubation mit verschiedenen Serumkonzentrationen ergab eine Sialysierung des LPS keinen Vorteil für das Überleben im Serum, wie in Abbildung 3.3-9 ersichtlich wird. Bei einer Inkubation mit 20% NHS war sogar eine geringere überlebende Kolonienzahl zu beobachten, als bei dem Wildtyp ohne LPS Sialysierung.

Nachdem gezeigt wurde, dass LPS Sialysierung keinen Überlebensvorteil für den Wildtyp des Serogruppe A Stammes darstellt, wurde der Einfluss der Expression von L8 LPS untersucht. Hierfür wurden der bekapselte Wildtyp mit nicht sialisiertem L3,7,9 LPS und die bekapselte $\Delta lgtA$ Mutante mit L8 LPS verwendet (Abbildung 3.3-10).

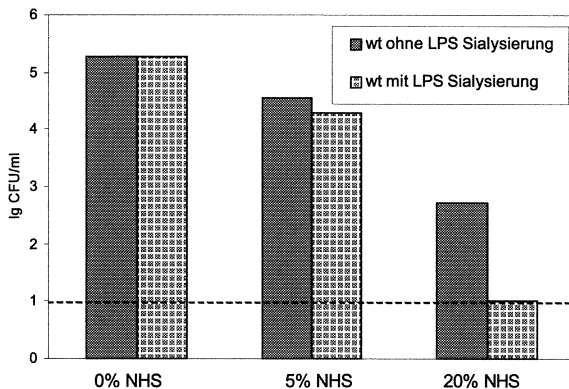


Abbildung 3.3-9 Einfluss von LPS Sialysierung auf das Überleben von Serogruppe A Stamm #2594 im Serum. Im Bakterizidietest erfolgte die Inkubation mit verschiedenen Serumkonzentrationen für 60 Minuten. Es wurden der Wildtyp der Serogruppe A #2594 mit und ohne LPS Sialysierung verglichen. Es wurde deutlich, dass LPS Sialysierung kein Überlebensvorteil bei dem bekapselten Wildtyp #2594 darstellt. Nach Inkubation mit 20%NHS kam es sogar zu einer Verringerung der Zahl der überlebenden Kolonien nach LPS Sialysierung.

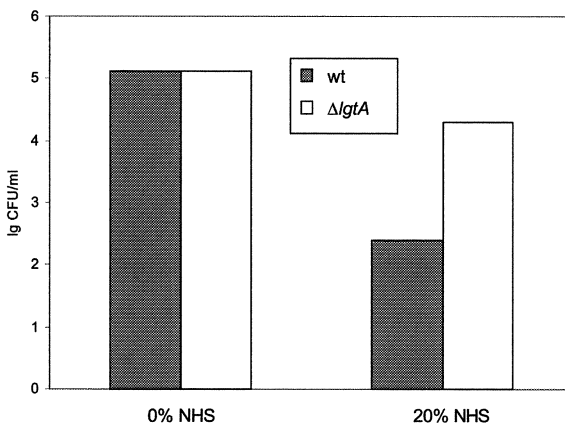


Abbildung 3.3-10 Überleben von Serogruppe A Stamm #2594 mit L3,7,9 LPS (wt) im Vergleich zu Mutante ($\Delta lgtA$), die ein L8 LPS exprimiert. Die $\Delta lgtA$ Mutante mit dem kürzeren L8 LPS zeigte im Bakterizidietest bei der Inkubation mit 20% NHS einen deutlich serumresistenteren Phänotypen als der Wildtyp.

Interessanterweise zeigte die $\Delta lgtA$ Mutante der Serogruppe A im Bakterizidietest einen serumresistenteren Phänotypen, als der Wildtyp (Abbildung 3.3-10). Dies steht im Gegensatz zur Untersuchung von Moran *et al.*, die bei zwei Stämmen der Serogruppe B eine verringerte Serumresistenz bei spontanen L8 LPS Mutanten beobachteten [106].

3.4 Einfluss des LPS auf die Serumresistenz; unbekapselte Mutanten

Bislang wurde das Serumresistenzverhalten von bekapselten Bakterien untersucht. Die Serumresistenzmechanismen der unbekapselten Bakterien sind insofern interessant, da es sich bei Trägerisolaten aus dem Nasopharynx häufig um unbekapselte Bakterien handelt. Im Nasopharynx sind die Bakterien ebenfalls geringen Komplementkonzentrationen ausgesetzt. Macht es einen Unterschied, welches LPS die Meningokokken exprimieren oder ob das LPS sialysiert ist? Um diese Frage zu klären, wurden unbekapselte Mutanten erstellt, die verschiedene LPS Strukturen exprimierten und anschließend bezüglich ihres Verhaltens im Serum untersucht. Der Schwerpunkt der Experimente wurde auf Mutanten der Serogruppe A gelegt; vergleichend werden die Ergebnisse der anderen Serogruppen dargestellt.

3.4.1 Einfluss von Sialinsäure auf die Serumresistenz

3.4.1.1 Unbekapselte Mutante der Serogruppe A

Die unbekapselte $\Delta mynB$ Mutante der Serogruppe A besitzt ein nicht sialisiertes L3,7,9 LPS; um den Einfluss von LPS Sialysierung auf die Serumresistenz zu untersuchen, wurde sie unter Zugabe von CMP-Nana (Sialinsäure) zum Medium kultiviert. Der Grad der LPS Sialysierung der $\Delta mynB$ Mutante wurde sowohl für die Bakterizidietests, als auch für die Messung des gebundenen C3b und MAC immer parallel zum Experiment kontrolliert. Die Kontrolle erfolgte durch einen ELISA mit dem Antikörper 3F11. Der Antikörper 3F11 bindet die Lacto-N-neotetraose Struktur des L3,7,9 LPS.

Nach LPS Sialysierung ist eine Bindung des Antikörpers nicht mehr möglich.
Ein repräsentativer ELISA ist in Abbildung 3.4-1 gezeigt.

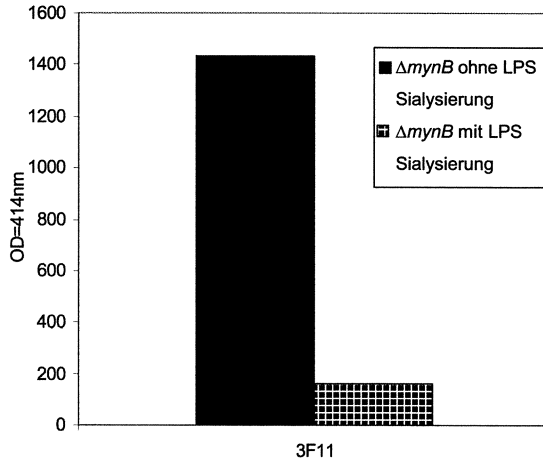


Abbildung 3.4-1 Quantifizierung des Grades der LPS Sialysierung der unkapselten Mutante des Serogruppe A Stammes (*ΔmynB*) nach exogener Zugabe von Sialinsäure durch ELISA. Der Antikörper 3F11 bindet an die Lacto-N-neotetraose von nicht sialysiertem L3,7,9 LPS. Eine Bindung an sialysiertes LPS ist nicht möglich. Die *ΔmynB* Mutante, angezüchtet unter Zugabe von Sialinsäure, bindet deutlich weniger Antikörper 3F11, das heißt ihr LPS wurde zu einem hohen Anteil sialysiert. Die nicht sialysierte *ΔmynB* Mutante zeigt eine hohe Bindung von Antikörper 3F11.

Anschließend wurde das Überleben der beiden Mutanten im Serum analysiert. In Abbildung 3.4-2 und Abbildung 3.4-3 sind Bakterizidietests gezeigt, wobei NHS Konzentrationen und die Dauer der Inkubation variiert wurden. Im Bereich niedriger NHS Konzentrationen (2,5% und 5% NHS) konnte die unkapselte *ΔmynB* Mutante nach LPS Sialysierung im Serum einen Zeitraum von 60 Minuten überleben. Sogar nach Inkubation mit 10% NHS zeigte die *ΔmynB* mit sialysiertem LPS über einen Inkubationszeitraum von 30 Minuten einen serumresistenteren Phänotypen.

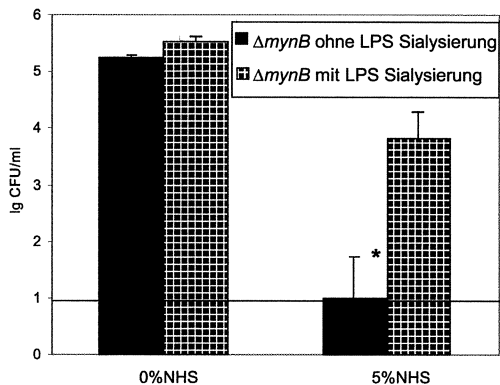


Abbildung 3.4-2 Einfluss der LPS Sialysierung auf das Überleben der unkapselten Mutante ($\Delta mynB$) des Serogruppe A Stammes #2594 im Serum. Die Inkubation im Bakterizidietest erfolgte mit 5% NHS für 60 Minuten. LPS Sialysierung führte zu einer verstärkten Serumresistenz bei einer Inkubation mit 5% NHS. *signifikant ($p=0.045$)

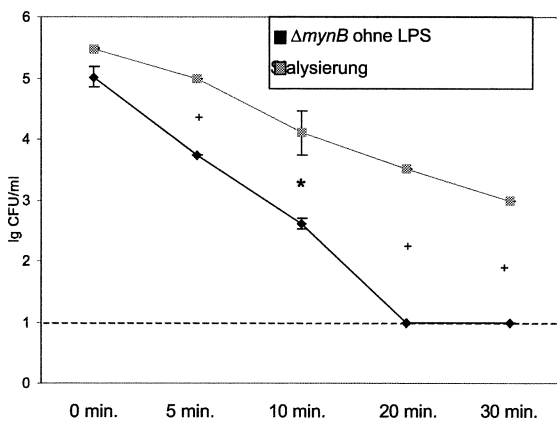


Abbildung 3.4-3 Einfluss der LPS Sialysierung auf das Überleben der unkapselten $\Delta mynB$ des Serogruppe A Stammes #2594 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Der Bakterizidietest wurde mit 10% NHS durchgeführt. Die Mutante $\Delta mynB$ mit LPS Sialysierung zeigte einen serumresistenteren Phänotypen als die $\Delta mynB$ Mutante ohne LPS Sialysierung. †(keine Fehlerindikatoren n=2) *signifikant ($p=0.002$)

Im Gegensatz zu dem bekapselten Serogruppe A Stamm #2594 trägt die exogene LPS Sialysierung bei der unbekapselten Mutante dieses Stammes zu einem verbesserten Überleben im Serum bei.

Um zu überprüfen, ob der in den Bakterizidietests beobachtete Überlebensvorteil der $\Delta mynB$ Mutante mit LPS Sialysierung auf eine verminderte C3b Deposition und damit eine verminderte MAC Insertion zurückgeht, wurden die gebundenen Komplementkomponenten detektiert. Eine Detektion mittels FACS erwies sich als technisch problematisch, da es zu Verklumpungen kam. Deshalb wurde an dieser Stelle als Nachweismethode ein ELISA gewählt. Die Quantifizierung der Deposition von C3b und MAC erfolgte nach Inkubation mit 10% NHS über verschiedene Zeiträume.

Die Experimente ergaben, dass die $\Delta mynB$ Mutante mit LPS Sialysierung zu jedem Zeitpunkt weniger C3b und MAC auf ihrer Oberfläche gebunden hatte, als die $\Delta mynB$ Mutante ohne LPS Sialysierung. Die Ergebnisse korrelieren mit den Phänotypen der Serumresistenz, die in den Bakterizidietests beobachtet wurden.

Bei der unbekapselten Mutante $\Delta mynB$ Mutante der Serogruppe A ermöglichte die Sialysierung von LPS eine verstärkte Serumresistenz bei niedrigen NHS Konzentrationen, durch eine verminderte Deposition von C3b und einer daraus resultierenden geringeren MAC Insertion.

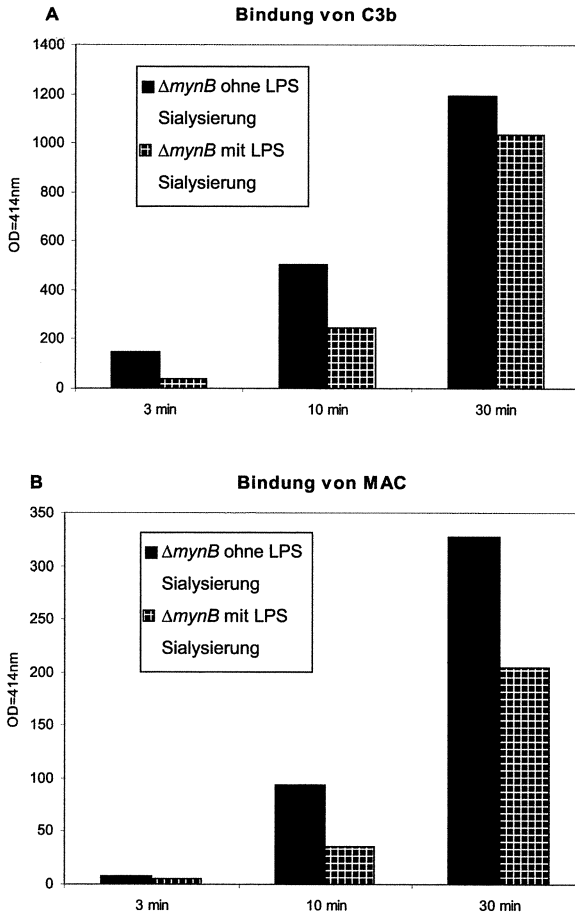


Abbildung 3.4-4 Einfluss der LPS Sialysierung auf die C3b und MAC Bindung an die unkapselte Mutante Δ mynB des Serogruppe A Stammes #2594. Die Detektion der Komplementkomponenten erfolgte im ELISA nach einer Inkubation mit 10% NHS über verschiedene Zeiträume. **A** Messung der Bindung von C3b an Δ mynB mit LPS Sialysierung und Δ mynB ohne LPS Sialysierung; **B** Messung der Bindung von MAC an Δ mynB mit LPS Sialysierung und Δ mynB ohne LPS Sialysierung. LPS Sialysierung führte bei der unkapselten Mutante des Serogruppe A Stammes zu einer verminderten Deponierung von C3b und MAC an der Bakterienoberfläche, was mit dem, im Bakterizidietest beobachteten serumresistenteren Phänotypen korreliert.

3.4.1.2 Unbekapselte Mutanten der Serogruppen B, C, W135 und Y

Die bei der Serogruppe A gefundenen Ergebnisse wurden mit Untersuchungen bei unbekapselten Mutanten der Serogruppen B, C, W135 und Y verglichen. Unbekapselte $\Delta siaD$ Mutanten dieser Serogruppen sind in der Lage, das L3,7,9 LPS endogen zu sialysieren. Um den Einfluss von LPS Sialysierung zu untersuchen, müssen für diese Serogruppen die kapsellosen $\Delta siaD$ Mutanten, deren LPS sialysierbar ist, mit den $\Delta siaD/st$ Doppelmutanten verglichen werden, die unbekapselt sind und deren LPS weder exogen noch endogen sialysierbar ist. Zuerst wurde der Sialysierungsgrad der verschiedenen Mutanten dargestellt. Der Grad der Sialysierung zwischen den verschiedenen $\Delta siaD$ Mutanten variierte. Der ELISA mit dem Antikörper 3F11 zeigte deutlich, dass die $\Delta siaD$ Mutante der Serogruppe B einen geringeren Anteil des LPS endogen sialysierte, als dies bei den übrigen Serogruppen der Fall war. In Abbildung 3.4-5 ist ein repräsentatives Experiment gezeigt.

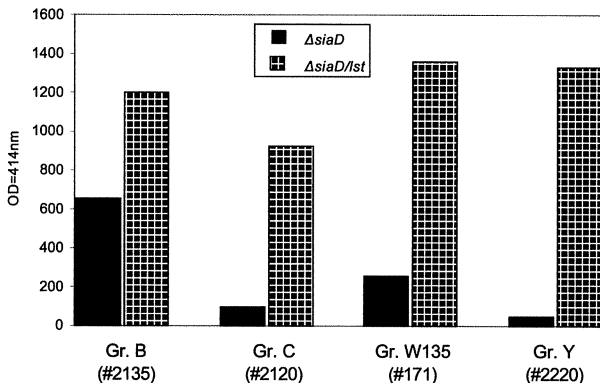


Abbildung 3.4-5 Bestimmung des Grades der LPS Sialysierung der $\Delta siaD$ Mutanten durch Messung der Bindung von Antikörper 3F11 im ELISA. Es erfolgte keine exogene Zugabe von Sialinsäure. Dargestellt sind die Mutanten $\Delta siaD$ und $\Delta siaD/st$ Mutanten verschiedener Serogruppen. Die $\Delta siaD$ Mutante des Serogruppe B Stammes #2135 zeigte den geringsten Anteil von sialysiertem LPS im Vergleich zu den anderen $\Delta siaD$ Mutanten.

Im nächsten Schritt wurde die Komplementdeposition and die Stämme nach Inkubation mit 10% NHS für 10 Minuten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4-6 dargestellt.

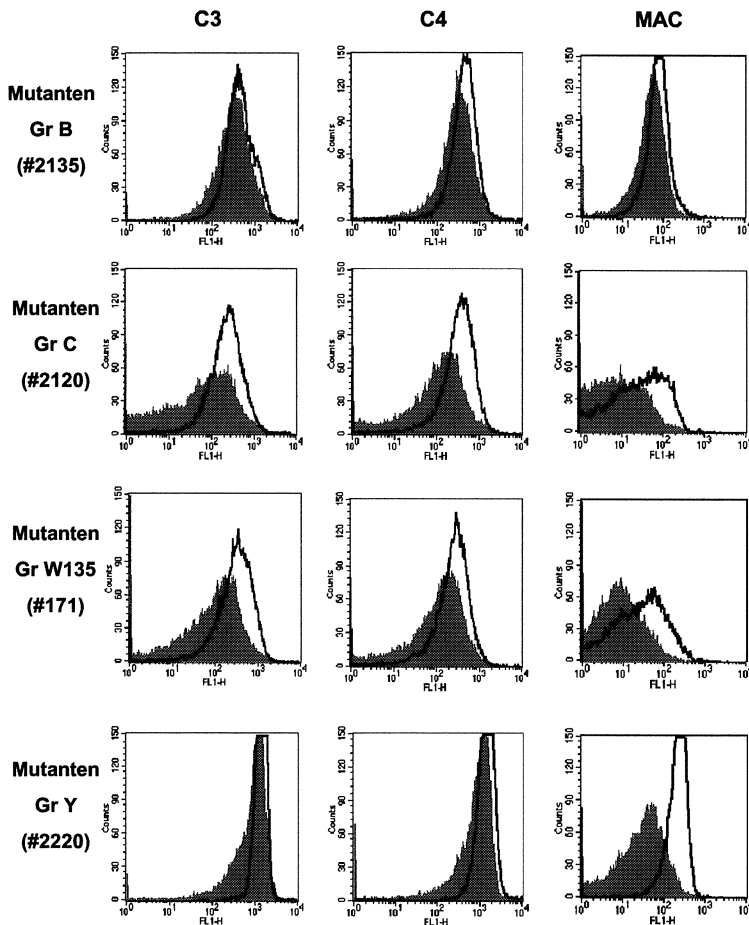


Abbildung 3.4-6 Detektion der Bindung von C3, C4 und MAC an $\Delta siaD$ und $\Delta siaD/ist$ Mutanten zur Charakterisierung der Einflusses von LPS Sialysierung auf die Komplementaktivierung bei unkapselfen Meningokokken. Die Inkubation erfolgte mit 10% NHS für 10 Minuten, die Detektion mittels FACS Analyse. Bei den Stämmen der Serogruppen C, W135 und Y banden die Mutanten mit LPS Sialysierung ($\Delta siaD$) weniger C3, C4 und MAC. Bei Serogruppe B Stamm #2135 waren die Unterschiede weniger deutlich. $\Delta siaD$ Mutanten $\Delta siaD/ist$ Mutanten

In den meisten Fällen deponierten die $\Delta siaD$ Mutanten mit sialysiertem L3,7,9 LPS weniger C3, C4 und auch MAC an ihrer Oberfläche, als die $\Delta siaD/ist$ Mutanten ohne LPS Sialysierung. Während die detektierten Bindungsunterschiede für Mutanten der Serogruppen C, W135 und Y vor allem in Bezug auf die MAC Deposition deutlich erkennbar waren, zeigten die Mutanten der Serogruppe B Stammes geringere Unterschiede in der Menge an abgelagertem C3, C4 und MAC. Dies könnte dadurch erklärbar sein, dass bei der $\Delta siaD$ Mutante der Serogruppe B ein geringerer Anteil des LPS sialysiert ist. Die Mutanten der Serogruppe Y deponierten weit mehr C3, C4 und MAC als die Stämme der übrigen Serogruppen, was mit der geringen Serumresistenz des Stammes korreliert, wobei die $\Delta siaD/ist$ Mutante bereits nach Inkubation mit 2,5% NHS vollständig abgetötet wurde [Vogel *et al.*, Daten nicht publiziert].

3.4.2 Serumresistenz von unbekapselten L8 Mutanten

L8 LPS Mutanten treten durch Phasenvariation im *igtA* Gen spontan auf. Meningokokken, die aus dem Nasopharynx gesunder Individuen isoliert wurden, exprimieren vermehrt ein L8 LPS [77]. Im folgenden Teil dieser Arbeit soll deshalb untersucht werden, ob die Expression einer L8 Struktur einen Einfluss auf die Serumresistenz hat. Hierzu wurden isogene unbekapselte L8 LPS Mutanten der verschiedenen Serogruppen konstruiert. Die L8 LPS Struktur ist durch das Fehlen der beiden endständigen Zucker (Gal-GlcNac) in der α -Kette um zwei Zucker kürzer, als das L3,7,9 LPS und kann daher nicht sialysiert werden. Vergleiche wurden daher zwischen unbekapselten Mutanten mit L8 LPS und unbekapselten Mutanten mit nicht sialysiertem L3,7,9 LPS gezogen.

3.4.2.1 Unbekapselte Mutanten der Serogruppe A

Im Bakterizidietest wurden die unbekapselte $\Delta mynB$ Mutante (unsialysiertes L3,7,9 LPS) mit der $\Delta mynB/igtA$ Mutante (L8 LPS) verglichen. Wie in Abbildung 3.4-7 ersichtlich, zeigte die unbekapselte $\Delta mynB/igtA$ Mutante mit dem L8 LPS einen serumresistenteren Phänotypen als die $\Delta mynB$ Mutante mit dem L3,7,9 LPS. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen in Kapitel

3.3.2; hier erwies sich die bekapselte Serogruppe A Mutante mit L8 LPS ($\Delta lgtA$) als serumresistenter gegenüber dem Wildtyp mit nicht sialysiertem L3,7,9 LPS.

Für den untersuchten Serogruppe A Stamm gilt daher, dass die Expression von L8 LPS sowohl bei bekapselten, als auch bei den unbekapselten Mutanten einen Überlebensvorteil gegenüber nicht sialysiertem L3,7,9 LPS im Serum darstellt.

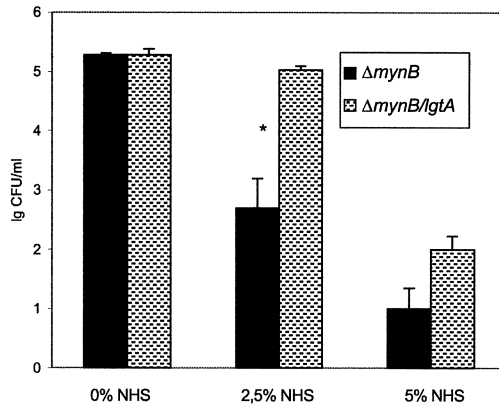


Abbildung 3.4-7 Einfluss von L3,7,9 LPS und L8 LPS auf das Überleben im Serum der unbekapselten Mutanten des Serogruppe A Stammes #2594. Die Inkubation im Bakterizidietest erfolgte mit verschiedenen Serumkonzentrationen für 60 Minuten. Die $\Delta mynB/lgtA$ Mutante mit L8 LPS zeigte einen serumresistenteren Phänotypen als die $\Delta mynB$ Mutante mit unsialysiertem L3,7,9 LPS. *signifikant ($p=0.008$)

3.4.2.2 Einfluss des *knock-outs* des *lgtA* Genes bei unbekapselten Mutanten verschiedener Serogruppen

Der bei den unbekapselten Serogruppe A Mutanten beobachtete serumresistentere L8 LPS Phänotyp soll durch Quantifizierung der gebundenen Komplementkomponenten genauer untersucht werden. Ebenfalls eingeschlossen in das Experiment wurden die Mutantenpaare der anderen Serogruppen, um zu überprüfen, ob diese Beobachtungen auf die Stämme der anderen Serogruppen erweiterbar sind.

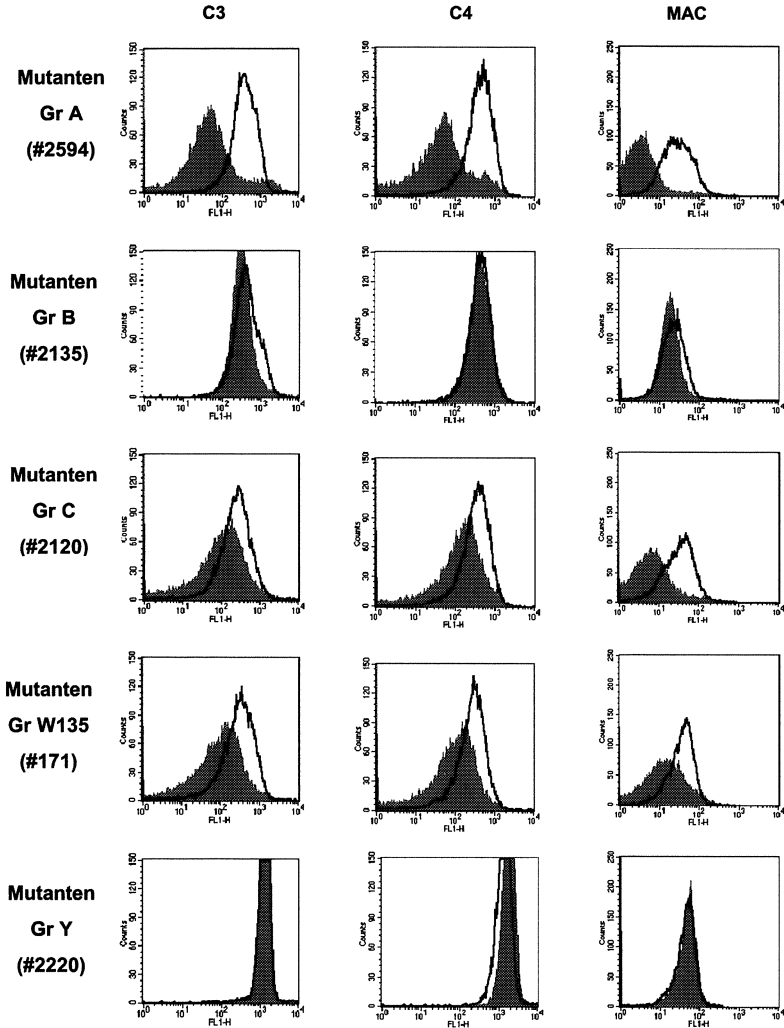


Abbildung 3.4-8 Bindung von C3, C4 und MAC an unbekapselte Mutanten mit nicht sialisiertem L3,7,9 LPS ($\Delta siaD/Ist$) und L8 LPS Mutanten ($\Delta siaD/IgtA$). Die Detektion erfolgte nach Inkubation mit 10% NHS für 10 Minuten mittels FACS Analyse. Die L8 LPS Mutanten der Stämme der Serogruppen A, C und W135 lagerten weniger C3, C4 und MAC ab. Diese Unterschiede in der Bindung waren bei Mutanten des Serogruppe B Stammes #2135 weniger deutlich. Mutanten des Serogruppe Y Stammes #2220 deponierten insgesamt sehr viel Komplementkomponenten. $\Delta siaD/IgtA$ Mutanten $\Delta siaD/Ist$ Mutanten

Verglichen wurden analog zu dem vorangegangenen Bakterizidietest die unbekapselte Mutante mit nicht sialysiertem L3,7,9 LPS und unbekapselte Mutanten mit L8 LPS. In Abbildung 3.4-8 sind FACS Analysen zur Bindung von C3, C4 und MAC nach Inkubation mit 10% NHS für 10 Minuten dargestellt. Die durchgeführten FACS Experimente ergaben folgende Ergebnisse: die unbekapselten L8 LPS Mutanten ($\Delta siaD/igtA$) deponierten weniger C3, C4 und MAC als die Mutanten mit unsialysiertem L3,7,9 LPS ($\Delta siaD/ist$). Die C3 und C4 Deposition war besonders bei der $\Delta mynb/igtA$ Mutante des Serogruppe A Stammes #2594 reduziert, was in Einklang mit den Bakterizidietestdaten steht. Bei den Mutanten des Serogruppe B Stammes konnte nur eine geringfügige Komplementregulation durch die L8 LPS Struktur der $\Delta siaD/igtA$ Mutante detektiert werden. Bei den Mutanten des Serogruppe Y Stammes #2220 konnten aufgrund der insgesamt auffällig starken Bindung von Komplement keine Unterschiede gezeigt werden. Die starke Komplementdeposition der Mutanten des Stammes #2220 wurde bereits zuvor beim Vergleich von $\Delta siaD$ und $\Delta siaD/ist$ Mutanten in Kapitel 3.4.1 beobachtet.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass sowohl bei der bekapselten Mutante der Serogruppe A, als auch bei den unbekapselten Mutanten der Serogruppe A, C, und W135 die Expression einer L8 LPS Struktur im Gegensatz zur Expression einer nicht sialysiertem L3,7,9 LPS Struktur zu einer verminderten Komplementdeposition führt. Die Beobachtungen sind vor allem für die Serogruppe A bedeutsam, da Meningokokken der Serogruppe A nicht in der Lage sind, ihr LPS endogen zu sialysieren.

4 Diskussion

4.1 Erstellung isogener Mutanten

In der vorgelegten Arbeit wurden isogene *knock-out* Mutanten von gut charakterisierten Wildtypbakterien erstellt und bezüglich ihrer Serumresistenz untersucht. Die Mutanten unterscheiden sich theoretisch nur in einem Gen vom Wildtyp. Weicht das Verhalten der Mutante im Bezug auf die Serumresistenz von dem des Wildtyps ab, so ist es möglich, indirekte oder direkte Effekte des ausgeschalteten Gens zu untersuchen. Natürlich aufgetretene Varianten, wie sie beispielsweise in der Arbeit von Moran *et al.* [106] verwendet wurden, bringen den Nachteil mit sich, dass eine Veränderung einer anderen Struktur nicht ausgeschlossen und somit der Einfluss der verschiedenen Faktoren nicht eindeutig zugeordnet werden kann. Natürlich vorkommende Varianten müssen daher in großer Anzahl untersucht und so genau wie möglich geno- und phänotypisch charakterisiert werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten isogenen *knock-out* Mutationen wurden so gewählt, dass ihr Phänotyp unter physiologischen Bedingungen vorkommt. Der *knock-out* der *siaD* Gene beziehungsweise des *myxB* Gens führt zu einer kapsellosen Mutante. Die Expression des *siaD* Gens unterliegt der Phasenvariation [59], wobei häufig unkapselte Meningokokken aus dem Nasopharynx gesunder Individuen isoliert werden [50] [11] [13] [1]. Das *lgtA* Gen, welches nach Interruption zur Expression von L8 LPS führt, unterliegt ebenfalls der Phasenvariation [70]. Für die Expression des *lst* Gens, das für eine Sialyltransferase kodiert, die die Sialysierung des L3,7,9 LPS ermöglicht, wurde bislang keine Phasenvariation beschrieben. Allerdings treten physiologische Variationen im Grad der Sialysierung des LPS auf. Variationen von OpC und Pilusstrukturen sind ebenfalls möglich, wurden in dieser Arbeit im Bezug auf die Serumresistenz allerdings nicht berücksichtigt.

Probleme isogener Mutanten sind unvorhersehbare *downstream* Effekte, die durch den *knock-out* des Gens entstehen. Teilweise kommt es zu nicht polaren Insertionen beispielsweise des *lst* oder *lgtA* Gens. Um fehlerhafter Rekombinationen auszuschließen, wurden LPS Untersuchungen durchgeführt.

Zu Beginn dieser Arbeit war das Gen, das für die O-Acetylierung der Polysaccharidkapsel verantwortlich ist, noch nicht identifiziert. Da es mit den *sia* Genen kotranskribiert wird, kann durch den *knock-out* des *siaD* Gens, die O-Acetylierung der Polysaccharidkapsel beeinflusst werden [16]. Die O-Acetylierung der Kapsel hat aber wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Serumresistenz [Claus und Vogel, unveröffentlicht].

4.2 Einfluss der Polysaccharidkapsel auf die Serumresistenz

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Besitz einer Kapsel bei dem Serogruppe A Stamm #2594 ein entscheidender Faktor der Serumresistenz ist. Nach Inkubation mit 5% normalem humanen Serum wird die unbekapselte Mutante im Gegensatz zu dem bekapselten Wildtyp bereits vollständig abgetötet. Es kommt bei dem bekapselten Wildtyp zu einer verminderten Aktivierung des Komplementsystems. Es werden deutlich weniger C3b Moleküle und weniger MAC an der Oberfläche deponiert, als bei der serumsensitiven unbekapselten Mutante. Der geringere Anteil des deponierten MAC kann einerseits aus der verminderten C3b Anlagerung resultieren, andererseits kann er auch durch die aufgrund der Polysaccharidkapsel erschwerte Insertion des MAC bedingt sein. Für die Serogruppe B und C ist gut belegt, dass der Besitz der Polysaccharidkapsel ein wichtiger Pathogenitätsfaktor des Bakteriums ist. Die Expression einer Polysaccharidkapsel ist Voraussetzung für das Überleben im Serum [151] [80] und das Auslösen einer Meningokokkenerkrankung im *infant rat model* [95] [150]. Liquor- und Blutisolate von Patienten zeigen üblicherweise eine Kapselexpression [77]. Serogruppe A Meningokokken sind im Vergleich zu Serogruppe B und C Meningokokken weniger serumresistent. Die Kapsel der Serogruppe A Meningokokken enthält im Gegensatz zu den Polysaccharidkapseln der Serogruppen B, C, W 135 und Y keine Sialinsäure [91].

Um die Mechanismen der Serumresistenzvermittlung durch die Kapsel besser zu verstehen, wurde auch bei den übrigen Serogruppen mittels FACS Analysen die Menge an deponiertem C3, C4 und MAC bestimmt. Analog zu den Ergebnissen bei Serogruppe A Stamm #2594 konnte gezeigt werden, dass die kapselexprimierenden Mutanten weniger C3, C4 und weniger MAC an ihrer Oberfläche deponieren. Die Bindung der Komplementfaktoren korrelierte mit dem in den Bakterizidietests beobachteten Phänotypen der Serumresistenz [151]. Der Mechanismus der Vermittlung von Serumresistenz durch die Kapsel scheint bei Bakterien der verschiedenen Serogruppen, trotz des Fehlens von Sialinsäure in der Serogruppe A Kapsel, ähnlich zu sein, da die Vergleichspaare der verschiedenen Serogruppen in der FACS Analyse dasselbe Bindungsmuster von C3, C4 und MAC zeigen.

Um zu untersuchen, ob die vermehrte Aktivierung des klassischen Weges bei unbekapselten Meningokokken aus einer vermehrte Antikörper Bindung resultiert, wurde die Menge an gebundenem IgG und IgM für die bekapselte Δ/st Mutante im Vergleich zu der unbekapselten $\Delta/siaD/st$ Mutante bestimmt. Bis auf den Serogruppe B Stamm MC58 konnten keine signifikanten Unterschiede in der Menge an gebundenen Antikörpern festgestellt werden. Die identische Bindung von Immunglobulinen konnte die Hypothese, dass die vermehrte Aktivierung des klassischen Weges bei unbekapselten Meningokokken durch erhöhte Antikörperbindung hervorgegangen ist, nicht unterstützen. Die Hypothese kann allerdings auch nicht verworfen werden, da möglicherweise auf unbekapselten Stämmen Antikörper mit anderer Spezifität binden, als auf bekapselten Stämmen.

Bei der bekapselten Δ/st Mutante der Serogruppe B konnte eine deutlich vermehrte Bindung von IgM gezeigt werden. Diese starke IgM Bindung ist überraschend, da die Serogruppe B Δ/st Mutante einen serumresistenten Phänotypen hat [148] und man eher eine vermehrte Antikörperbindung der unbekapselten Bakterien erwartet hätte. S. Ram konnte zeigen, dass das IgM ausschließlich gegen die Kapsel gerichtet ist. Nach Zugabe von Colominsäure (α 2,8-Polyneuraminsäure) wurde die Bindung von IgM an die Δ/st Mutante inhibiert. Die Menge des gebundenen C3 blieb unbeeinflusst, was bedeutet, dass das IgM weder in der Lage war, Komplement zu fixieren, noch *targets* für

Komplementfaktoren unzugänglich zu machen [persönliche Mitteilung von S. Ram].

Komplementregulatorische Proteine

Ein weiterer Mechanismus, der die Serumresistenz bekapselter Bakterien erklären könnte, ist die vermehrte Bindung eines komplementregulierenden Proteins. Bei einer Reihe von Bakterien, wie beispielsweise *Borrelia burgdorferi* [88], Gruppe A Streptokokken [75], und *Bordetella pertussis* [5] spielen die Bindung von Faktor H oder C4 *binding protein* eine wichtige Rolle für die Serumresistenz. Interessanterweise benutzen Gonokokken, die keine Kapsel besitzen, unter anderem diese beiden Faktoren, um im Serum überleben zu können [120] [121] [122, 123]. Um zu untersuchen, ob Faktor H einen Einfluss auf die Vermittlung der Serumresistenz bekapselter Mutanten hat, wurde durch FACS Analyse die Menge an gebundenem Faktor H bestimmt. Es zeigte sich überraschenderweise, dass die unbekapselten Mutanten $\Delta siaD/ist$ mehr Faktor H binden als die bekapselten Δist Mutanten. Da die bekapselten Stämme aber serumresistenter sind, wäre eine vermehrte Bindung von Faktor H bei diesen zu erwarten gewesen. Die durch die Kapsel vermittelte Serumresistenz erklärt sich folglich nicht durch eine vermehrte Bindung von Faktor H. Außerdem wird durch das Experiment deutlich, dass die Bindung von Faktor H an die unbekapselten Mutanten zu keinem serumresistenten Phänotypen führt. Im Gegensatz zu serumresistenten Gonokokken scheint also auf der Oberfläche von unbekapselten Meningokokken effektiven Bindungsstellen für Faktor H zugänglich zu sein. Dies könnte zum Beispiel mit der von Gonokokken abweichenden Struktur der Porine zusammenhängen.

Der zweite wichtige Komplementregulator C4bp bindet an Porinproteine der äußeren Membran von *Neisseria gonorrhoeae* und führt durch Regulation des klassischen Komplementweges zu einer Erhöhung der Serumresistenz [119] [120]. Eine Bindung von C4bp konnte bisher weder für bekapselte noch für unbekapselte Meningokokken gezeigt werden [persönliche Mitteilung von S. Ram].

Ein weiterer Gesichtspunkt bei der Diskussion der Serumresistenz von bekapselten im Vergleich zu unbekapselten Meningokokken ist die Bindung von MBL. MBL ist ein Akute-Phase Protein, das bevorzugt an Zuckerstrukturen wie beispielsweise an repetitive Zuckereinheiten von Mikroorganismen bindet [155]. Nach der Bindung kommt es, ähnlich wie bei der Bindung von C1q, zu einer Aktivierung des Komplementsystems durch die MBL assoziierten Serinproteasen MASP-1 und MASP-2 [65] [142]. Van Emmerik *et al.* untersuchten Meningitis verursachende Keime auf ihre Fähigkeit MBL zu binden. Sie teilten die Pathogene in drei Gruppen ein, wobei *Neisseria meningitidis* der Serogruppe A zu der mittleren Bindungsgruppe gehörten; die übrigen bekapselten *Neisseria meningitidis*-Serogruppen wurden der wenig MBL bindenden Gruppe zugeordnet und die unbekapselten *Neisseria meningitidis* zeigten eine hohe Bindung von MBL [146]. Jack *et al.* berichteten nach einer Untersuchung des Bindungsverhaltens mit isogenen Mutanten, dass die LPS Struktur und nicht die Kapsel von entscheidender Bedeutung für die Bindung von MBL ist [67]. Beide, Jack *et al.* und van Emmerik *et al.* verwendeten aufgereinigtes MBL bei ihren Untersuchungen. Dies entspricht nicht den physiologischen Bedingungen, denen das Bakterium im Serum gegenüber steht. Gulati *et al.* berichteten kürzlich, dass es nach einer Präopsonierung von *Neisseria gonorrhoeae* mit MBL und anschließender Inkubation mit MBL-negativem Serum zu einer vermehrten Abtötung der Gonokokken kam [56]. Bei der Inkubation mit MBL-negativem Serum, das durch Zugabe von MBL komplementiert wurde, ohne vorherige Inkubation konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Des weiteren zeigten sie, dass C1 Inhibitor und α_2 Makroglobulin in physiologischen Konzentrationen die komplementaktivierende Wirkung durch Präopsonierung mit MBL hemmen konnten. Die Schlussfolgerung ist, dass MBL nicht an der Komplementaktivierung in der Gegenwart von komplettem Serum, wie es im menschlichen Körper existiert, beteiligt ist. Bei den verschiedenen Mutanten gelang es mir ebenfalls nicht, MBL Bindung nach Inkubation mit normalem humanen Serum (NHS) zu detektieren [Daten nicht gezeigt].

4.3 Einfluss des LPS auf die Serumresistenz

4.3.1 Bekapselte Bakterien

LPS Sialysierung

LPS Sialysierung bedeutet die Verknüpfung der Lacto-N-neotetraose des L3,7,9 LPS mit Sialinsäure [54] [100]. Für den in dieser Arbeit untersuchten Serogruppe A Stamm, der keine Sialinsäure produzieren kann, stellt exogen zugeführte Sialinsäure keinen Überlebensvorteil im Serum dar. Nach Inkubation mit 20% NHS wurde der Wildtyp, angezogen auf sialinsäurehaltigem Agar eher stärker abgetötet, als der Wildtyp, dessen LPS nicht sialysiert war. Dies bestätigt die geringe Bedeutung von LPS Sialysierung bei pathogenen Stämmen der Serogruppe C (#2120) und Serogruppe B (B1940 und MC 58) [148]. LPS Sialysierung führte bei den Stämmen der Serogruppe C (#2120) und der Serogruppe B (B1940) nur zu einer marginal verstärkten Serumresistenz nach Inkubation mit hohen Serumkonzentrationen [148]. Bei Serogruppe B Stamm MC58 konnte auch bei hohen Serumkonzentrationen kein Einfluss von LPS Sialysierung gezeigt werden. Die Serumresistenz des MC58 Wildtypes erhöhte sich durch exogene Zugabe von Sialinsäure nicht [148], obwohl, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, das LPS des Wildtypes nicht vollständig sialysiert ist. Die Bedeutung der Variationen im Grad der LPS Sialysierung der verschiedenen Stämme ist nicht geklärt. Es ist denkbar, dass sich eine Balance zwischen Kapselproduktion und LPS Sialysierung entstellt. Hinweise auf eine Genexpressionsregulation durch Serum gibt es nicht.

Im Gegensatz zu dem vorangehend beschriebenen geringen Einfluss von LPS Sialysierung bekapselter Bakterien auf die Serumresistenz, berichteten Estabrook *et al.* über eine negative Korrelation von nicht sialysierter Lacto-N-neotetraose mit Serumresistenz bei Serogruppe C Meningokokken. Allerdings handelt es sich bei den von Estabrook *et al.* untersuchten Stämmen nicht um hypervirulente Isolate. Außerdem ist eine Wertung der Experimente schwierig, da keine isogenen Stämme miteinander verglichen wurden [28] [148].

Während LPS Sialysierung des Stamm #2120 der Serogruppe C im Bakterizidietest nur einen marginale Einfluss auf die Serumresistenz hatte,

zeigte der Wildtyp Stamm #2120 mit LPS Sialysierung im *whole blood model* einen resistenteren Phänotypen, als die entsprechende *lst* Mutante ohne LPS Sialysierung. Bei dem Serogruppe B Stamm MC58 hingegen bewirkte LPS Sialysierung keinen Unterschied der Resistenz im *whole blood model* [persönliche Mitteilung von Prof. U. Vogel]. Diese uneinheitlichen Beobachtungen bezüglich des Einflusses von LPS Sialysierung auf die Serumresistenz geben Anlass zur Spekulation, dass bei der Komplementregulation durch LPS Sialysierung weitere Membranstrukturen eine Rolle spielen. Potentielle Kandidaten für eine derartige Interaktion sind die *opacity proteins* der äußeren Membran.

L8 LPS Struktur

Im Bakterizidietest wurden das Wildtypbakterium der Serogruppe A #2594 mit einer L3,7,9 LPS Struktur ohne Sialinsäure und die $\Delta lgtA$ Mutante mit einer um zwei Zucker kürzeren L8 LPS Struktur untersucht. Beide Bakterien exprimieren eine Serogruppe A Kapsel. Es zeigte sich eine verstärkte Serumresistenz der $\Delta lgtA$ Mutante mit der L8 LPS Struktur. Diese Beobachtung ist insofern erstaunlich, da bis dato in der Literatur die L8 LPS Mutante als serumsensitiv beschrieben wurde. Moran *et al.* isolierten spontan aufgetretene LPS Mutanten von zwei häufig mit Erkrankung assoziierten Serogruppe B Stämmen. Das Wildtypbakterium mit L3,7,9 LPS zeigte einen resistenten Phänotypen, die Mutante mit beiden LPS Strukturen (L3,7,9 und L8 LPS) einen intermediären Phänotypen und die L8 Mutante einen serumsensitiven Phänotypen [106]. Auch hier ist ein Vergleich zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten schwierig, da die Bakterien einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund besitzen. Außerdem wurde in dieser Arbeit sialysiertes L3,7,9 LPS mit der Expression von L8 LPS verglichen, während bei Moran *et al.* unklar bleibt, zu welchem Grad das L3,7,9 LPS sialysiert war. Es wird also nicht ausschließlich der Einfluss der Struktur des LPS, sondern auch der Einfluss der LPS Sialysierung bei den Untersuchung von Moran *et al.* mit einbezogen.

Bei den bekapselten Abkömmlingen der Serogruppe A ergibt sich folgende Reihenfolge der Serumresistenz: kurzes L8 LPS ($\Delta lgtA$ Mutante), dann das nicht sialysierte L3,7,9 LPS (Wildtyp) und anschließend das sialysierte L3,7,9

LPS (Wildtyp+Sialinsäure). Bei den Serogruppen B und C ließ sich bisher die Beobachtung machen, dass das sialysierte L3,7,9 LPS des Wildtypbakteriums gegenüber dem L8 LPS [106] und gegenüber der nicht sialysierten Δ/st Mutante am serumresistentesten ist [148]. Diese Beobachtung wird unterstützt von der Tatsache, dass die meisten Krankheitsisolate eine Kapsel und ein sialysiertes L3,7,9 LPS aufweisen [77]. Bei Serogruppe A hingegen müsste auch ein großer Anteil an L8 LPS positiven Krankheitsisolaten zu finden sein, da für unseren Serogruppe A Stamm die Δ/gtA Mutante den serumresistentesten Phänotypen zeigte. Eine Untersuchung, die 54 Patientenisolat aus Schweden und aus einer Epidemie aus dem Sudan einschloss ergab folgende Verteilung der LPS Immunotypen für Serogruppe A Meningokokken: L10 LPS (23/50), L11 LPS (11/50), L9 LPS (9/50) und L8 (3/50) [128]. Das L10 und L11 LPS soll ausschließlich bei Serogruppe A Meningokokken vorkommen [83] [128] [147], was eine Untersuchung von Mutanten, die diese LPS Immunotypen exprimieren, sehr interessant erscheinen lässt.

4.3.2 Unbekapselte Mutanten

Neisseria meningitidis konnte bei einer 1999/2000 in Bayern durchgeführten Studie bei 10% der untersuchten Kinder und Jugendlichen aus dem Nasopharynx isoliert werden [18]. Davon besaßen 16% der Trägerisolate nicht die zur Kapselsynthese notwendigen Gene und waren trotzdem in der Lage im Nasopharynx zu überleben [19]. Unbekapselte Meningokokken im Nasopharynx spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion von protektiven Antikörpern. Andererseits kann von einer Besiedlung im Rachen eine manifeste, invasive Meningokokkeninfektion ausgehen. Die Untersuchung der Interaktion von unbekapselten Meningokokken mit dem Komplementsystem ist daher wichtig. Die Expression von L8 LPS oder LPS Sialysierung könnte einen wichtigen Pathogenitätsfaktor unbekapselter Neisserien in Nischen des menschlichen Körpers darstellen, beispielsweise im Nasopharynx, wo die Bakterien geringen Mengen an Komplement ausgesetzt sind.

LPS Sialysierung

Da Meningokokken der Serogruppe A nicht zur endogenen LPS Sialysierung befähigt sind, wurde Sialinsäure exogen zur Verfügung gestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die unbekapselte Mutante mit LPS Sialysierung bei niedrigen NHS Konzentrationen serumresistenter ist, als die unbekapselte Mutante mit nicht sialysiertem L3,7,9 LPS. Analog dazu wurde der Vergleich bei den Stämmen der übrigen Serogruppen durchgeführt. Auch hier führte eine LPS Sialysierung zu einer vermehrten Serumresistenz, wobei die detektierten Unterschiede der Bindungsmenge von C3, C4 und MAC bei den verschiedenen Stämmen unterschiedlich groß ausfielen. Allerdings führte die LPS Sialysierung nicht zu einer starken Serumresistenz, NHS Konzentrationen von 10-20% konnten unabhängig von der LPS Sialysierung nicht überlebt werden. Bei Gonokokken kann LPS Sialysierung zu einer vollständigen Serumresistenz führen, vermittelt durch die Bindung von Faktor H [109] [156] [123]. Warum unbekapselte Neisserien im Gegensatz zu Gonokokken trotz LPS Sialysierung keine hohen NHS Konzentrationen tolerieren, bleibt unklar. Einerseits ist ein Unterschied in der Menge an gebundenem Faktor H denkbar, andererseits könnte die Kapsel die regulatorische Interaktion von gebundenem Faktor H mit dem Komplementsystem beeinflussen. Die Blockade von wichtigen Strukturen durch die Polysaccharidkapsel, die an der Faktor H vermittelten Regulation des Komplementsystems beteiligt sind, könnten den Unterschied in der Serumresistenz erklären. Außerdem könnte die negative Ladung der Polysaccharidkapsel die Bindung von Faktor H und den Komplementfaktoren beeinflussen. Ein weiterer Aspekt beim Vergleich von Serumresistenz zwischen Meningokokken und Gonokokken ist die Induktion protektiver Antikörper gegen Meningokokken durch die Kolonisation des Nasopharynx. Bei Gonokokken ist ein solches Vorkommen von natürlichen Antikörpern nicht bekannt.

L8 LPS Struktur

Um den Einfluss von L3,7,9 LPS im Vergleich zu L8 LPS auf die Serumresistenz unabhängig von einer Kapsel betrachten zu können, wurden für den Serogruppe A Stamm #2594, sowie für die anderen Serogruppen

unbekapselte *ΔsiaD/igtA* Mutanten erstellt, die ein L8 LPS exprimieren. Die unbekapselte L8 LPS Mutante der Serogruppe A zeigte im Bakterizidietest mit niedrigen NHS Konzentrationen einen serumresistenteren Phänotypen als die unbekapselte L3,7,9 LPS Mutante. Für unbekapselte Stämme der Serogruppen A, C und W135 wurde gezeigt, dass die Expression einer L8 Struktur zu einer verminderten Bindung von C3, C4 und MAC im Gegensatz zur nicht sialysierten L3,7,9 LPS Struktur führt. Der Stamm #2135 der Serogruppe B deponierte annähernd identische Mengen von C3 und C4, eine verminderte Bindung von MAC durch die L8 LPS Struktur war allerdings zu beobachten.

Erklärt werden könnte die erhöhte Serumresistenz von L8 LPS im Vergleich zum nicht sialysierten L3,7,9 LPS durch eine verstärkte Wirksamkeit von Faktor H. *ΔsiaD/igtA* Mutanten und *ΔsiaD/ist* Mutanten binden zwar die gleiche Menge an Faktor H [Ram *et al.*, nicht veröffentlicht], aber Pangburn *et al.* beschrieben eine verstärkte Faktor H Aktivität bei kurzen Zuckerstrukturen, wobei die Faktor H Aktivität ab einer Länge von 4 Zuckermolekülen, was der Länge von L3,7,9 LPS entspricht, abnimmt [111]. Als eine weitere Erklärung für die detektierten Unterschiede in der Serumresistenz könnte eine unterschiedliche Bindung von bakteriziden Antikörpern in Betracht kommen. Es ist denkbar, dass L8 LPS Epitope für bakterizide Antikörper auf der Bakterienoberfläche unzugänglich macht. Warum dieser Effekt bei dem Stamm der Serogruppe A stärker ausgeprägt ist, als bei den Stämmen der anderen Serogruppen könnte mit den Strukturen der Bakterienoberfläche bei dem Serogruppe A Stamm in Zusammenhang stehen. Der Stamm der Serogruppe A unterscheidet sich von den anderen Stämmen durch die Struktur der Porine, sowie durch die Polysaccharidkapsel. Die Kapsel der Serogruppe A enthält keine Sialinsäure [91]. Eine andere mögliche Erklärung für die Unterschiede ist eine Variation in der Struktur des L3,7,9 LPS, die durch die Überprüfung des LPS durch Antikörper Bindung und Darstellung im Tricingel nicht detektiert werden konnte.

C4b Bindung an Phosphoethanolamin der zweiten Heptose des Kern LPS

Bei unseren Untersuchungen fiel auf, dass der Serogruppe Y Stamm 2220 und seine unbekapselten Mutanten deutlich mehr C3 und C4 deponierten, als die anderen untersuchten Stämme. Im Bakterizidietest zeigte er einen sehr serumsensitiven Phänotypen (Daten nicht gezeigt). In weiteren Experimenten konnten wir in Kooperation S. Ram *et al.* Phosphoethanolamin (PEA) im Kern des LPS als Akzeptor für die Bindung von C4b identifizieren. C4b bildete eine Amidbindung mit dem 3-PEA und dem 6-PEA Molekül der zweiten Heptose (HepII) des LPS aus, wobei die Bindung an das 6-PEA Molekül effektiver war, und zu einer stärkeren C4b Deposition führte. Der serumsensitive Stamm 2220 der Serogruppe Y exprimiert ein LPS mit einem 3-PEA Molekül und einem 6-PEA Molekül an HepII, wobei die 6-PEA Substitution entscheidend für die geringe Serumresistenz des Stammes war. Der PEA Substituent an der zweiten Heptose des Kerns des LPS könnte damit ein entscheidender Faktor in der Vermittlung Serumresistenz sein. Die deutlich serumresistenteren Stämme der Serogruppe C #2120 und der Serogruppe B MC58 wiesen eine 3-PEA Substitution an HepII auf. Die C4b Bindung war bei Stämmen mit 3-PEA an HepII abhängig von der Struktur der Zucker an ersten Heptose des LPS. Bei einer verkürzten LPS Kette an HepI kommt es zur Ausbildung von Amidbindungen; hat HepI einen Lacto-N-neotetraose Zucker, so kommt es vorwiegend zur Ausbildung von Esterbindungen. Der Besitz von 3-PEA an HepII könnte dem Bakterium die Möglichkeit verleihen, Komplement gezielt an der Bakterienoberfläche zu aktivieren und damit der Lyse zu entgehen. Ram *et al.* zeigten, dass MC58 $\Delta siaD/ist/ipt-3$ (unbekapselt; nicht sialisiertes L3,7,9 LPS; kein 3-PEA an HepII) mehr C4, IgM gebunden hat und im Bakterizidietest serumsensitiver war, als die analoge Mutante mit einer 3-PEA Substitution [96] [118]. Diese Beobachtungen legen nahe, dass ein 6-PEA Substituent an Hep II zu einem serumsensitiven Phänotypen führt, während eine 3-PEA Substitution Serumresistenz vermitteln kann. Diese Hypothese wird von der Tatsache unterstützt, dass 70% der isolierten Stämme eine 3-PEA Substitution aufweisen, während das Auftreten von 6-PEA Stämmen selten ist [118]. Die Aufklärung der Rolle von C4b und PEA Bindung lieferte einen wichtigen

Beitrag zum Verständnis Mechanismen der Serumresistenz von *Neisseria meningitidis*.

5 Zusammenfassung

Neisseria meningitidis ist Auslöser der Meningokokkenmeningitis und der gefürchteten Meningokokkensepsis, die mit einer hohen Letalität belastet sind. Meningokokken lassen sich anhand ihrer Polysaccharidkapsel in verschiedene Serogruppen einteilen, wobei die Serogruppen A, B, C, W135 und Y mit Krankheit assoziiert sind [117]. Krankheitsisolate aus Serum oder Liquor sind fast ausnahmslos bekapselt [58] [150], während Trägerisolate, die aus dem Nasopharynx von ca. 10% der gesunden Bevölkerung isoliert werden können, häufig unbekapselt sind [18]. Das Komplementsystem, das einen wichtigen Abwehrmechanismus gegen Meningokokken darstellt, ist Teil der unspezifischen angeborenen Immunabwehr und besteht aus mehreren Serumproteasen, die in einer Kaskade der Reihe nach aktiviert werden, um am Ende eine Pore (MAC) in der Membran des Pathogens zu bilden.

In dieser Arbeit wurden Faktoren untersucht, die *Neisseria meningitidis* dazu befähigen, im Serum zu überleben und der Lyse durch das Komplementsystem zu entgehen. Ein Schwerpunkt lag dabei auf den Serumresistenzmechanismen von Serogruppe A Meningokokken, vergleichend wurden anschließend die Mutanten der Serogruppen B, C, W135 und Y untersucht.

Um den Einfluss verschiedener Pathogenitätsfaktoren auf die Serumresistenz zu beurteilen, wurden isogene *knock-out* Mutanten verwendet, die durch ELISA und Tricingel auf ihre Kapsel- und LPS Struktur überprüft wurden. Die Serumresistenz der Mutanten wurde durch Bakterizidietests bestimmt; zur Detektion der Bindung von Komplementkomponenten, Immunglobulinen und regulatorischen Proteinen wurden FACS Analysen, Western Blot und ELISA benutzt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kapsel der Serogruppe A Meningokokken essentiell für das Überleben im Serum ist. Die Expression der Polysaccharidkapsel führte auch bei den übrigen Serogruppen zu einer verminderten Deposition von Komplementkomponenten (C3, C4 und MAC) auf der Bakterienoberfläche. Die verminderte Komplementdeposition war nicht durch veränderte Antikörperbindung bedingt. Die bekapselten und unbekapselten Bakterien zeigten die gleichen Bindungsmuster von IgG und

IgM. Auch Faktor H, ein wichtiger Regulator des Komplementsystems, ist an der Vermittlung der Serumresistenz durch die Kapsel nicht beteiligt. Die serumsensiblen unbekapselten Mutanten banden mehr Faktor H, als die entsprechenden bekapselten Meningokokken. Aus der Literatur ist bekannt, dass LPS Immunotyp und LPS Sialysierung die Serumresistenz pathogener Neisserien beeinflussen kann. Für den Serogruppe A Stamm konnte nur dann ein Überlebensvorteil durch LPS Sialysierung gezeigt werden, wenn die unbekapselte Mutante untersucht wurde. Die Expression eines verkürzten L8 LPS hingegen führte bei diesem Stamm unabhängig von der Kapselexpression zu einer erhöhten Serumresistenz.

Besonders auffällig bei den entsprechenden Kontrollexperimenten mit Derivaten anderer Serogruppen war die außergewöhnliche Komplementdeposition durch den Serogruppe Y Stamm. In weiterführenden Experimenten konnten wir in Kooperation mit Dr. Sanjay Ram, Boston, zeigen, dass besondere Phosphoethanolamin Substitutionen des LPS für dieses Phänomen verantwortlich waren.

Die vorliegende Arbeit beleuchtet die Komplexität der Auseinandersetzung von Meningokokken mit dem Komplementsystem. Sie zeigt auf, dass Klon spezifische Unterschiede für das Verständnis der Serumresistenz von Bedeutung sind. Die Experimente belegen, dass bei Serogruppe A Meningokokken neben der Kapsel auch das LPS einen modulierenden Einfluss auf die Serumresistenz hat.

6 Anhang

6.1 Kontrollen der FACS Experimente

Wildtyp	Mutante	Bindung (<i>geometric mean fluorescence</i>) ¹				
		IgG	IgM	C3	C4	C5b-9
A (2594)	Wildtyp	597	86	19	7	8
	$\Delta mynB$	178	23	374	113	103
	$\Delta mynB$ ohne NHS ²	6	7	3	3	7
B (MC58)	ΔIst	52	131	5	3	24
	$\Delta siaD/Ist$	165	34	259	61	185
	$\Delta siaD/Ist$ ohne NHS	6	6 ³ /20	3	4	20
C (2120)	ΔIst	50	10	6	3	4
	$\Delta siaD/Ist$	68	9	203	55	56
	$\Delta siaD/Ist$ ohne NHS	6	6	3	3	7
W 135 (171)	ΔIst	227	7	16	4	7
	$\Delta siaD/Ist$	129	13	185	44	114
	$\Delta siaD/Ist$ ohne NHS	6	11	6	4	8
Y (2220)	ΔIst	71	26	48	7	29
	$\Delta siaD/Ist$	34	16	647	266	372
	$\Delta siaD/Ist$ ohne NHS	6	5	3	3	6

Tabelle 6.1-1. **Kontrollen zu den FACS Experimenten, die in Abbildung 3.3-4, Abbildung 3.3-5, Abbildung 3.3-6, Abbildung 3.3-7 und in Abbildung 3.3-8 dargestellt sind.** Die Inkubation erfolgte 30 Minuten mit 10% NHS, die Kontrolle wurde nicht mit NHS inkubiert. 1) Angabe auf ganze Zahlen gerundet 2) Für die Kontrollen wurde jeweils die $\Delta siaD/Ist$ Mutante (oder $\Delta mynB$ bei Serogruppe A) verwendet 3) Kontrolle wurde zusätzlich wegen vermehrter Bindung mit MC58 ΔIst durchgeführt

Wildtyp	Mutante	Bindung (<i>geometric mean fluorescence</i>) ¹				
		IgG	IgM	C3	C4	C5b-9
B (MC58)	$\Delta siaD$	671	31	589	219	184
	$\Delta siaD/ Ist$	820	51	615	222	181
	$\Delta siaD/ Ist$ ohne NHS ²	6	20	3	4	20
C (2120)	$\Delta siaD$	174	15	564	115	23
	$\Delta siaD/ Ist$	186	29	958	181	230
	$\Delta siaD/ Ist$ ohne NHS	6	6	3	3	7
W-135 (171)	$\Delta siaD$	607	22	725	152	136
	$\Delta siaD/ Ist$	442	29	1030	169	506
	$\Delta siaD/ Ist$ ohne NHS	6	11	6	4	8
Y (2220)	$\Delta siaD$	210	19	859	188	106
	$\Delta siaD/ Ist$	180	24	1051	399	525
	$\Delta siaD/ Ist$ ohne NHS	6	5	3	3	6

Tabelle 6.1-2 Kontrolle zu dem FACS Experiment, das in

Abbildung 3.4-6 dargestellt wurde. Die Inkubation erfolgte 30 Minuten mit 10% NHS. Die Kontrollen wurden nicht mit Serum inkubiert. 1) Angabe auf ganze Zahlen gerundet 2) Für die Kontrollen wurde jeweils die $\Delta siaD/ Ist$ Mutante verwendet

Wildtyp	Mutante	Bindung (<i>geometric mean fluorescence</i>) ¹				
		IgG	IgM	C3	C4	C5b-9
A (2594)	<i>ΔmynB</i>	921	44	1094	284	191
	<i>ΔmynB/IgtA</i>	961	31	338	148	43
	<i>ΔmynB</i> ohne NHS ²	6	7	3	3	7
B (MC58)	<i>ΔsiaD/Ist</i>	820	51	615	222	181
	<i>ΔsiaD/IgtA</i>	937	79	505	244	314
	<i>ΔsiaD/Ist</i> ohne NHS	6	20	3	4	20
C (2120)	<i>ΔsiaD/Ist</i>	186	29	958	181	230
	<i>ΔsiaD/IgtA</i>	318	36	507	154	77
	<i>ΔsiaD/Ist</i> ohne NHS	6	6	3	3	7
W-135 (171)	<i>ΔsiaD/Ist</i>	442	29	1030	169	506
	<i>ΔsiaD/IgtA</i>	597	40	688	124	204
	<i>ΔsiaD/Ist</i> ohne NHS	6	11	6	4	8
Y (2220)	<i>ΔsiaD/Ist</i>	180	24	1051	399	525
	<i>ΔsiaD/IgtA</i>	201	44	1015	479	632
	<i>ΔsiaD/Ist</i> ohne NHS	6	5	3	3	6

Tabelle 6.1-3 **Kontrolle zu dem FACS Experiment, das in Abbildung 3.4-8 dargestellt wurde.** Die Inkubation erfolgte 30 Minuten mit 10% NHS. Die Kontrollen wurden nicht mit Serum inkubiert. 1) Angabe auf ganze Zahlen gerundet 2) Für die Kontrollen wurde jeweils die *ΔsiaD/Ist* Mutante (oder *ΔmynB* bei Serogruppe A) verwendet

6.2 Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate diammonium
AgNO ₃	Silbernitrat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	bovines Serumalbumin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
C1INH	C1 Esterase Inhibitor
C4bp	C4 <i>binding protein</i>
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CFU	<i>colony forming unit</i>
CMP-Nana	aktivierte Sialinsäure
<i>cps</i>	<i>capsule gene complex</i>
DAF	<i>decay acceleration factor</i>
DIC	<i>disseminated intravascular coagulation</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ECL	<i>ECL blotting system</i> , Amersham, England
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(-β-aminoethylether-)N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ET	elektrophoretischer Typ
FACS	<i>Analytical Flow Cytometry</i>
Gal	Galaktose
GC Agar	Gonokokken Agar
Glc	Glucose
GlcNac	N-Acetylglucosamid
h	Stunde
H ₂ O	Wasser

HBSS	<i>hanks balanced salt solution</i>
Hep	Heptose
Ig	Immunglobulin
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
Kdo	2-Keto-2-Deoxyoctulosonic acid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxit
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
mA	milli Ampere
mAB	<i>monoclonal antibody</i>
MAC	<i>membrane attack complex</i>
MASP	<i>MBL-associated serine protease</i>
MBL	<i>mannan-binding lectin</i>
MCP	<i>membrane cofactor protein (CD46)</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mM	milli Mol
Msp	Messerspitze
N.	<i>Neisseria</i>
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxit
NeuAc	Sialinsäure
NHS	normales humanes Serum
OMP	<i>outer membrane protein</i>
OpA	<i>opacity protein A</i>
OpC	<i>opacity protein C</i>

PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEA	Phosphoethanolamin
pH	negativer dekadischer Logarithmus
PorA	Porin A
PorB	Porin B
RMP	<i>reduction modified protein</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sg.	Serogruppe
SIC	<i>streptococcal inhibitor of complement</i>
ST	Sequenztyp
TEMED	Tetraethylethylendiamine
VBS	<i>veronal buffered saline</i>

7 Literaturverzeichnis

1. Alber, D., M. Oberkötter, S. Suerbaum, H. Claus, M. Frosch, and U. Vogel. 2001. Genetic diversity of *Neisseria lactamica* strains from epidemiologically defined carriers. *J Clin Microbiol.* 39:1710-5.
2. Alberti, S., G. Marques, S. Hernandez-Alles, X. Rubires, J. M. Tomas, F. Vivanco, and V. J. Benedi. 1996. Interaction between complement subcomponent C1q and the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36. *Infect Immun.* 64:4719-25.
3. Apicella, M. A., K. M. Bennett, C. A. Hermerath, and D. E. Roberts. 1981. Monoclonal antibody analysis of lipopolysaccharide from *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* 34:751-6.
4. Arking, D., Y. Tong, and D. C. Stein. 2001. Analysis of lipooligosaccharide biosynthesis in the *Neisseriaceae*. *J Bacteriol.* 183:934-41.
5. Berggard, K., E. Johnsson, F. R. Mooi, and G. Lindahl. 1997. *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous hemagglutinin. *Infect Immun.* 65:3638-43.
6. Betz, S. J., and H. Isliker. 1981. Antibody-independent interactions between *Escherichia coli* J5 and human complement components. *J Immunol.* 127:1748-54.
7. Bhattacharjee, A. K., H. J. Jennings, C. P. Kenny, A. Martin, and I. C. Smith. 1976. Structural determination of the polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups Y, W-135, and BO1. *Can J Biochem.* 54:1-8.

8. Bhattacharjee, A. K., H. J. Jennings, C. P. Kenny, A. Martin, and I. C. Smith. 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.* 250:1926-32.
9. Bitter-Suermann, D., and J. Roth. 1987. Monoclonal antibodies to polysialic acid reveal epitope sharing between invasive pathogenic bacteria, differentiating cells and tumor cells. *Immunol Res.* 6:225-37.
10. Bredt, W., B. Wellek, H. Brunner, and M. Loos. 1977. Interactions between *mycoplasma pneumoniae* and the first components of complement. *Infect Immun.* 15:7-12.
11. Broome, C. V. 1986. The carrier state: *Neisseria meningitidis*. *J Antimicrob Chemother.* 18 Suppl A:25-34.
12. Cartwright, K. A., D. M. Jones, A. J. Smith, J. M. Stuart, E. B. Kaczmarek, and S. R. Palmer. 1991. Influenza A and meningococcal disease. *Lancet.* 338:554-7.
13. Caugant, D. A., E. A. Hoiby, P. Magnus, O. Scheel, T. Hoel, G. Bjune, E. Wedege, J. Eng, and L. O. Froholm. 1994. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J Clin Microbiol.* 32:323-30.
14. Clas, F., and M. Loos. 1981. Antibody-independent binding of the first component of complement (C1) and its subcomponent C1q to the S and R forms of *Salmonella minnesota*. *Infect Immun.* 31:1138-44.
15. Clas, F., G. Schmidt, and M. Loos. 1985. The role of the classical pathway for the bactericidal effect of normal sera against gram-negative bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 121:19-72.

16. Claus, H., R. Borrow, M. Achtman, G. Morelli, C. Kantelberg, E. Longworth, M. Frosch, and U. Vogel. 2004. Genetics of capsule O-acetylation in serogroup C, W-135 and Y meningococci. *Mol Microbiol.* 51:227-39.
17. Claus, H., M. Frosch, and U. Vogel. 1998. Identification of a hotspot for transformation of *Neisseria meningitidis* by shuttle mutagenesis using signature-tagged transposons. *Mol Gen Genet.* 259:363-71.
18. Claus, H., M. Maiden, D. Wilson, N. McCarthy, K. Jolley, R. Urwin, F. Hessler, M. Frosch, and U. Vogel. Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis.* in press:.
19. Claus, H., M. C. Maiden, R. Maag, M. Frosch, and U. Vogel. 2002. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology.* 148:1813-9.
20. Claus, H., U. Vogel, M. Muhlenhoff, R. Gerardy-Schahn, and M. Frosch. 1997. Molecular divergence of the sia locus in different serogroups of *Neisseria meningitidis* expressing polysialic acid capsules. *Mol Gen Genet.* 257:28-34.
21. Daha, M. R., and L. A. van Es. 1980. Relative resistance of the F-42-stabilized classical pathway C3 convertase to inactivation by C4-binding protein. *J Immunol.* 125:2051-4.
22. Dahl, M. R., S. Thiel, M. Matsushita, T. Fujita, A. C. Willis, T. Christensen, T. Vorup-Jensen, and J. C. Jensenius. 2001. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity.* 15:127-35.

23. Davis, A. E., 3rd, and R. A. Harrison. 1982. Structural characterization of factor I mediated cleavage of the third component of complement. *Biochemistry.* 21:5745-9.
24. Diaz, A., A. Ferreira, and R. B. Sim. 1997. Complement evasion by *Echinococcus granulosus*: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall. *J Immunol.* 158:3779-86.
25. DiScipio, R. G. 1981. The binding of human complement proteins C5, factor B, beta 1H and properdin to complement fragment C3b on zymosan. *Biochem J.* 199:485-6.
26. DiScipio, R. G., D. N. Chakravarti, H. J. Muller-Eberhard, and G. H. Fey. 1988. The structure of human complement component C7 and the C5b-7 complex. *J Biol Chem.* 263:549-60.
27. Dunn K. L., V. M. a. M. E. R. 1995. Investigations into the molecular basis of meningococcal toxicity for human endothelial and epithelial cells: the synergistic effect of LPS and pili. *Microb. Pathog.* 18:81-96.
28. Estabrook, M. M., J. M. Griffiss, and G. A. Jarvis. 1997. Sialylation of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-N-neotetraose. *Infect Immun.* 65:4436-44.
29. Farries, T. C., and J. P. Atkinson. 1991. Evolution of the complement system. *Immunol Today.* 12:295-300.
30. Fearon, D. T., and K. F. Austen. 1975. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med.* 142:856-63.

31. Fernie-King, B. A., D. J. Seilly, A. Davies, and P. J. Lachmann. 2002. Streptococcal inhibitor of complement inhibits two additional components of the mucosal innate immune system: secretory leukocyte proteinase inhibitor and lysozyme. *Infect Immun.* 70:4908-16.
32. Fernie-King, B. A., D. J. Seilly, C. Willers, R. Wurzner, A. Davies, and P. J. Lachmann. 2001. Streptococcal inhibitor of complement (SIC) inhibits the membrane attack complex by preventing uptake of C567 onto cell membranes. *Immunology.* 103:390-8.
33. Figueroa, J., J. Andreoni, and P. Densen. 1993. Complement deficiency states and meningococcal disease. *Immunol Res.* 12:295-311.
34. Fijen, C. A., E. J. Kuijper, M. T. te Bulte, M. R. Daha, and J. Dankert. 1999. Assessment of complement deficiency in patients with meningococcal disease in The Netherlands. *Clin Infect Dis.* 28:98-105.
35. Fishelson, Z., M. K. Pangburn, and H. J. Muller-Eberhard. 1983. C3 convertase of the alternative complement pathway. Demonstration of an active, stable C3b, Bb (Ni) complex. *J Biol Chem.* 258:7411-5.
36. Frank, M. M., K. Joiner, and C. Hammer. 1987. The function of antibody and complement in the lysis of bacteria. *Rev Infect Dis.* 9 Suppl 5:S537-45.
37. Frick, I. M., P. Akesson, M. Rasmussen, A. Schmidtchen, and L. Bjorck. 2003. SIC, a secreted protein of *Streptococcus pyogenes* that inactivates antibacterial peptides. *J Biol Chem.* 278:16561-6. Epub 2003 Mar 5.

38. Frosch, M., U. Edwards, K. Bousset, B. Krausse, and C. Weisgerber. 1991. Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. *Mol Microbiol.* 5:1251-63.
39. Frosch, M., and A. Muller. 1993. Phospholipid substitution of capsular polysaccharides and mechanisms of capsule formation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 8:483-93.
40. Frosch, M., D. Muller, K. Bousset, and A. Muller. 1992. Conserved outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in capsule expression. *Infect Immun.* 60:798-803.
41. Frosch, M., C. Weisgerber, and T. F. Meyer. 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.
42. Fujita, T., I. Gigli, and V. Nussenzweig. 1978. Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b- inactivator. *J Exp Med.* 148:1044-51.
43. Fujita, T., and V. Nussenzweig. 1979. The role of C4-binding protein and beta 1H in proteolysis of C4b and C3b. *J Exp Med.* 150:267-76.
44. Gigli, I., T. Fujita, and V. Nussenzweig. 1979. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:6596-600.
45. Gilbert, M., D. C. Watson, A. M. Cunningham, M. P. Jennings, N. M. Young, and W. W. Wakarchuk. 1996. Cloning of the lipooligosaccharide alpha-2,3-sialyltransferase from the bacterial pathogens *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Biol Chem.* 271:28271-6.

46. Gordon, D. L., J. Rice, J. J. Finlay-Jones, P. J. McDonald, and M. K. Hostetter. 1988. Analysis of C3 deposition and degradation on bacterial surfaces after opsonization. *J Infect Dis.* 157:697-704.
47. Gotschlich, E. C., T. Y. Liu, and M. S. Artenstein. 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.* 129:1349-65.
48. Götze, O., and H. J. Müller-Eberhard. 1971. The C3-activator system: an alternate pathway of complement activation. *J Exp Med.* 134:Suppl:90s-108s.
49. Götze, O., and J. Zwirner. 1998. Receptors for C5a, C3a and Factor H, p. 221-232. In K. Rother, G. O. Till, and G. M. Hänsch (ed.), *The Complement System*, 2nd ed. Springer Verlag, Heidelberg.
50. Greenfield, S., P. R. Sheehe, and H. A. Feldman. 1971. Meningococcal carriage in a population of "normal" families. *J Infect Dis.* 123:67-73.
51. Greenwood, B. M., A. K. Bradley, and R. A. Wall. 1985. Meningococcal disease and season in sub-Saharan Africa. *Lancet.* 2:829-30.
52. Greenwood, B. M., A. M. Greenwood, A. K. Bradley, K. Williams, M. Hassan-King, F. C. Shenton, R. A. Wall, and R. J. Hayes. 1987. Factors influencing susceptibility to meningococcal disease during an epidemic in The Gambia, West Africa. *J Infect.* 14:167-84.
53. Griffiss, J. M. 1995. Mechanisms of host immunity, p. 35-70. In K. Cartwright (ed.), *Meningococcal disease*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester England.

54. Griffiss, J. M., H. Schneider, R. E. Mandrell, R. Yamasaki, G. A. Jarvis, J. J. Kim, B. W. Gibson, R. Hamadeh, and M. A. Apicella. 1988. Lipooligosaccharides: the principal glycolipids of the neisserial outer membrane. *Rev Infect Dis.* 10 Suppl 2:S287-95.
55. Gulati, S., D. P. McQuillen, R. E. Mandrell, D. B. Jani, and P. A. Rice. 1996. Immunogenicity of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide epitope 2C7, widely expressed in vivo with no immunochemical similarity to human glycosphingolipids. *J Infect Dis.* 174:1223-37.
56. Gulati, S., K. Sastry, J. C. Jensenius, P. A. Rice, and S. Ram. 2002. Regulation of the mannan-binding lectin pathway of complement on *Neisseria gonorrhoeae* by C1-inhibitor and alpha(2)-macroglobulin. *J Immunol.* 168:4078-86.
57. Haas, R., A. F. Kahrs, D. Facius, H. Allmeier, R. Schmitt, and T. F. Meyer. 1993. TnMax--a versatile mini-transposon for the analysis of cloned genes and shuttle mutagenesis. *Gene.* 130:23-31.
58. Hammerschmidt, S., C. Birkholz, U. Zähringer, B. D. Robertson, J. van Putten, O. Ebeling, and M. Frosch. 1994. Contribution of genes from the capsule gene complex (cps) to lipooligosaccharide biosynthesis and serum resistance in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 11:885-96.
59. Hammerschmidt, S., A. Müller, H. Sillmann, M. Muhlenhoff, R. Borrow, A. Fox, J. van Putten, W. D. Zollinger, R. Gerardy-Schahn, and M. Frosch. 1996. Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol.* 20:1211-20.

60. Harrison, R. A., and P. J. Lachmann. 1980. The physiological breakdown of the third component of human complement. *Mol Immunol.* 17:9-20.
61. Heubner. 1896. Beobachtungen und Versuche über den Meningokokkus intracellularis. *JB Kinderheilk.* 43:1-22.
62. Hourcade, D., V. M. Holers, and J. P. Atkinson. 1989. The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv Immunol.* 45:381-416.
63. Hubert, B., L. Watier, P. Garnerin, and S. Richardson. 1992. Meningococcal disease and influenza-like syndrome: a new approach to an old question. *J Infect Dis.* 166:542-5.
64. Iida, K., K. Mitomo, T. Fujita, and N. Tamura. 1987. Characterization of three monoclonal antibodies against C3 with selective specificities. *Immunology.* 62:413-7.
65. Ikeda, K., T. Sannoh, N. Kawasaki, T. Kawasaki, and I. Yamashina. 1987. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J Biol Chem.* 262:7451-4.
66. Isenman, D. E., and N. R. Cooper. 1981. The structure and function of the third component of human complement--I. The nature and extent of conformational changes accompanying C3 activation. *Mol Immunol.* 18:331-9.
67. Jack, D. L., A. W. Dodds, N. Anwar, C. A. Ison, A. Law, M. Frosch, M. W. Turner, and N. J. Klein. 1998. Activation of complement by mannose-binding lectin on isogenic mutants of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Immunol.* 160:1346-53.

68. Janeway, C. 1999. The complement system in human humoral immunity, p. 339-361. *In* C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, and J. D. Capra (ed.), *Immuno Biology*, 4th edition ed. Current Biology publications / Elsevier Science London, London.
69. Jennings, M. P., D. W. Hood, J. R. Peak, M. Virji, and E. R. Moxon. 1995. Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 18:729-40.
70. Jennings, M. P., Y. N. Srikhanta, E. R. Moxon, M. Kramer, J. T. Poolman, B. Kuipers, and P. van der Ley. 1999. The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology.* 145:3013-21.
71. Jessouroun, E., I. F. da Silveira, A. P. Larangeira, S. Pereira, S. A. Fernandes, L. Rabinovitch, C. E. Frasch, H. C. Castro-Faria-Neto, and P. T. Bozza. 2004. Outer membrane vesicles (OMVs) and detoxified lipooligosaccharide (dLOS) obtained from Brazilian prevalent *N. meningitidis* serogroup B strains protect mice against homologous and heterologous meningococcal infection and septic shock. *Vaccine.* 22:2617-25.
72. Jiang, H., B. Cooper, F. A. Robey, and H. Gewurz. 1992. DNA binds and activates complement via residues 14-26 of the human C1q A chain. *J Biol Chem.* 267:25597-601.
73. Jiang, H., F. A. Robey, and H. Gewurz. 1992. Localization of sites through which C-reactive protein binds and activates complement to residues 14-26 and 76-92 of the human C1q A chain. *J Exp Med.* 175:1373-9.

74. Jimenez-Lucho, V. E., K. A. Joiner, J. Foulds, M. M. Frank, and L. Leive. 1987. C3b generation is affected by the structure of the O-antigen polysaccharide in lipopolysaccharide from salmonellae. *J Immunol.* 139:1253-9.
75. Johnsson, E., A. Thern, B. Dahlback, L. O. Heden, M. Wikstrom, and G. Lindahl. 1996. A highly variable region in members of the streptococcal M protein family binds the human complement regulator C4BP. *J Immunol.* 157:3021-9.
76. Jones, D. 1995. Epidemiology of Meningococcal disease in Europe and the USA, p. 147-158. In K. Cartwright (ed.), *Meningococcal disease.* John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England.
77. Jones, D. M., R. Borrow, A. J. Fox, S. Gray, K. A. Cartwright, and J. T. Poolman. 1992. The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. *Microb Pathog.* 13:219-24.
78. Jones, D. M. 1993. Age incidence of meningococcal infection England and Wales, 1984-1991. *J Infect.* 27:83-8.
79. Jones, G. R., M. Christodoulides, J. L. Brooks, A. R. Miller, K. A. Cartwright, and J. E. Heckels. 1998. Dynamics of carriage of *Neisseria meningitidis* in a group of military recruits: subtype stability and specificity of the immune response following colonization. *J Infect Dis.* 178:451-9.
80. Kahler, C. M., L. E. Martin, G. C. Shih, M. M. Rahman, R. W. Carlson, and D. S. Stephens. 1998. The (alpha2-->8)-linked polysialic acid capsule and lipooligosaccharide structure both contribute to the ability of serogroup B *Neisseria meningitidis* to resist the bactericidal activity of normal human serum. *Infect Immun.* 66:5939-47.

81. Kaplan, M. H., and J. E. Volanakis. 1974. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J Immunol.* 112:2135-47.
82. Kerr, M. A. 1980. The human complement system: assembly of the classical pathway C3 convertase. *Biochem J.* 189:173-81.
83. Kim, J. J., R. E. Mandrell, and J. M. Griffiss. 1989. *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis* share lipooligosaccharide epitopes but lack common capsular and class 1, 2, and 3 protein epitopes. *Infect Immun.* 57:602-8.
84. Kim, Y. U., M. C. Carroll, D. E. Isenman, M. Nonaka, P. Pramoongjago, J. Takeda, K. Inoue, and T. Kinoshita. 1992. Covalent binding of C3b to C4b within the classical complement pathway C5 convertase. Determination of amino acid residues involved in ester linkage formation. *J Biol Chem.* 267:4171-6.
85. Kinoshita, T., Y. Takata, H. Kozono, J. Takeda, K. S. Hong, and K. Inoue. 1988. C5 convertase of the alternative complement pathway: covalent linkage between two C3b molecules within the trimolecular complex enzyme. *J Immunol.* 141:3895-901.
86. Klos, A., V. Ihrig, M. Messner, J. Grabbe, and D. Bitter-Suermann. 1988. Detection of native human complement components C3 and C5 and their primary activation peptides C3a and C5a (anaphylatoxic peptides) by ELISAs with monoclonal antibodies. *J Immunol Methods.* 111:241-52.

87. Kotarsky, H., J. Hellwage, E. Johnsson, C. Skerka, H. G. Svensson, G. Lindahl, U. Sjöbring, and P. F. Zipfel. 1998. Identification of a domain in human factor H and factor H-like protein- 1 required for the interaction with streptococcal M proteins. *J Immunol.* 160:3349-54.
88. Kraiczky, P., C. Skerka, M. Kirschfink, V. Brade, and P. F. Zipfel. 2001. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H. *Eur J Immunol.* 31:1674-84.
89. Lambris, J. D., D. Avila, J. D. Becherer, and H. J. Muller-Eberhard. 1988. A discontinuous factor H binding site in the third component of complement as delineated by synthetic peptides. *J Biol Chem.* 263:12147-50.
90. Liu, T. Y., E. C. Gotschlich, F. T. Dunne, and E. K. Jonssen. 1971. Studies on the meningococcal polysaccharides. II. Composition and chemical properties of the group B and group C polysaccharide. *J Biol Chem.* 246:4703-12.
91. Liu, T. Y., E. C. Gotschlich, E. K. Jonssen, and J. R. Wysocki. 1971. Studies on the meningococcal polysaccharides. I. Composition and chemical properties of the group A polysaccharide. *J Biol Chem.* 246:2849-58.
92. Loos, M. 1982. The classical complement pathway: mechanism of activation of the first component by antigen-antibody complexes. *Prog Allergy.* 30:135-92.
93. Loos, M., T. Borsos, and H. J. Rapp. 1972. Activation of the first component of complement evidence for an internal activation step. *J Immunol.* 108:683-8.

94. Loos, M., B. Wellek, R. Thesen, and W. Opferkuch. 1978. Antibody-independent interaction of the first component of complement with Gram-negative bacteria. *Infect Immun.* 22:5-9.
95. Mackinnon, F. G., R. Borrow, A. R. Gorringe, A. J. Fox, D. M. Jones, and A. Robinson. 1993. Demonstration of lipooligosaccharide immunotype and capsule as virulence factors for *Neisseria meningitidis* using an infant mouse intranasal infection model. *Microb Pathog.* 15:359-66.
96. Mackinnon, F. G., A. D. Cox, J. S. Plested, C. M. Tang, K. Makepeace, P. A. Coull, J. C. Wright, R. Chalmers, D. W. Hood, J. C. Richards, and E. R. Moxon. 2002. Identification of a gene (*lpt-3*) required for the addition of phosphoethanolamine to the lipopolysaccharide inner core of *Neisseria meningitidis* and its role in mediating susceptibility to bactericidal killing and opsonophagocytosis. *Mol Microbiol.* 43:931-43.
97. Mandrell, R. E., and M. A. Apicella. 1993. Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modification of LOS. *Immunobiology.* 187:382-402.
98. Mandrell, R. E., J. M. Griffiss, and B. A. Macher. 1988. Lipooligosaccharides (LOS) of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* have components that are immunochemically similar to precursors of human blood group antigens. Carbohydrate sequence specificity of the mouse monoclonal antibodies that recognize crossreacting antigens on LOS and human erythrocytes. *J Exp Med.* 168:107-26.
99. Mandrell, R. E., J. J. Kim, C. M. John, B. W. Gibson, J. V. Sugai, M. A. Apicella, J. M. Griffiss, and R. Yamasaki. 1991. Endogenous sialylation of the lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* 173:2823-32.

100. Mandrell, R. E., A. J. Lesse, J. V. Sugai, M. Shero, J. M. Griffiss, J. A. Cole, N. J. Parsons, H. Smith, S. A. Morse, and M. A. Apicella. 1990. In vitro and in vivo modification of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide epitope structure by sialylation. *J Exp Med.* 171:1649-64.
101. Mandrell, R. E., and W. D. Zollinger. 1977. Lipopolysaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by hemagglutination inhibition. *Infect Immun.* 16:471-5.
102. Matsushita, M., and T. Fujita. 1992. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med.* 176:1497-502.
103. Mayer, L. W., M. W. Reeves, N. Al-Hamdan, C. T. Sacchi, M. K. Taha, G. W. Ajello, S. E. Schmink, C. A. Noble, M. L. Tondella, A. M. Whitney, Y. Al-Mazrou, M. Al-Jefri, A. Mishkhis, S. Sabban, D. A. Caugant, J. Lingappa, N. E. Rosenstein, and T. Popovic. 2002. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. *J Infect Dis.* 185:1596-605. Epub 2002 May 17.
104. Mayer, M. M. 1972. Mechanism of cytolysis by complement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69:2954-8.
105. Medof, M. E., K. Iida, C. Mold, and V. Nussenzweig. 1982. Unique role of the complement receptor CR1 in the degradation of C3b associated with immune complexes. *J Exp Med.* 156:1739-54.
106. Moran, E. E., B. L. Brandt, and W. D. Zollinger. 1994. Expression of the L8 lipopolysaccharide determinant increases the sensitivity of *Neisseria meningitidis* to serum bactericidal activity. *Infect Immun.* 62:5290-5.

107. Müller-Eberhard, H. J., and O. Götze. 1972. C3 proactivator convertase and its mode of action. *J Exp Med.* 135:1003-8.
108. Müller-Eberhard, H. J., M. J. Polley, and M. A. Calcott. 1967. Formation and functional significance of a molecular complex derived from the second and the fourth component of human complement. *J Exp Med.* 125:359-80.
109. Nairn, C. A., J. A. Cole, P. V. Patel, N. J. Parsons, J. E. Fox, and H. Smith. 1988. Cytidine 5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid or a related compound is the low Mr factor from human red blood cells which induces gonococcal resistance to killing by human serum. *J Gen Microbiol.* 134:3295-306.
110. Nilsson, B., and K. N. Ekdahl. 1998. Components of the Alternative Pathway, p. 23-49. *In* K. Rother, G. O. Till, and G. M. Hänsch (ed.), *The Complement System*, 2nd ed. Springer Verlag, Heidelberg.
111. Pangburn, M. K. 1989. Analysis of recognition in the alternative pathway of complement. Effect of polysaccharide size. *J Immunol.* 142:2766-70.
112. Pangburn, M. K., R. D. Schreiber, and H. J. Müller-Eberhard. 1981. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med.* 154:856-67.
113. Pangburn, M. K., R. D. Schreiber, and H. J. Müller-Eberhard. 1977. Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J Exp Med.* 146:257-70.

114. Parkhill, J., M. Achtman, K. D. James, S. D. Bentley, C. Churcher, S. R. Klee, G. Morelli, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. M. Davies, P. Davis, K. Devlin, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, S. Leather, S. Moule, K. Mungall, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, S. Whitehead, B. G. Spratt, and B. G. Barrell. 2000. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. *Nature*. 404:502-6.
115. Plested, J. S., K. Makepeace, M. P. Jennings, M. A. Gidney, S. Lacle, J. Brisson, A. D. Cox, A. Martin, A. G. Bird, C. M. Tang, F. M. Mackinnon, J. C. Richards, and E. R. Moxon. 1999. Conservation and accessibility of an inner core lipopolysaccharide epitope of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*. 67:5417-26.
116. Podack, E. R. 1984. Molecular composition of the tubular structure of the membrane attack complex of complement. *J Biol Chem*. 259:8641-7.
117. Poolman, J. T., P. A. v. d. Ley, and J. Tommassen. 1995. Surface Structures and Secreted Products of Meningococci, p. 21-34. *In* K. Cartwright (ed.), Meningococcal disease. John Wiley and Sons Ltd., Chichester England.
118. Ram, S., A. D. Cox, J. C. Wright, U. Vogel, S. Getzlaff, R. Boden, J. Li, J. S. Plested, S. Meri, S. Gulati, D. C. Stein, J. C. Richards, E. R. Moxon, and P. A. Rice. 2003. Neisserial lipooligosaccharide is a target for complement component C4b. Inner core phosphoethanolamine residues define C4b linkage specificity. *J Biol Chem*. 278:50853-62.
119. Ram, S., M. Cullinane, A. M. Blom, S. Gulati, D. P. McQuillen, R. Boden, B. G. Monks, C. O'Connell, C. Elkins, M. K. Pangburn, B. Dahlback, and P. A. Rice. 2001. C4bp binding to porin mediates stable serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *Int Immunopharmacol*. 1:423-32.

120. Ram, S., M. Cullinane, A. M. Blom, S. Gulati, D. P. McQuillen, B. G. Monks, C. O'Connell, R. Boden, C. Elkins, M. K. Pangburn, B. Dahlback, and P. A. Rice. 2001. Binding of C4b-binding protein to porin: a molecular mechanism of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med.* 193:281-95.
121. Ram, S., F. G. Mackinnon, S. Gulati, D. P. McQuillen, U. Vogel, M. Frosch, C. Elkins, H. K. Guttormsen, L. M. Wetzler, M. Oppermann, M. K. Pangburn, and P. A. Rice. 1999. The contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. *Mol Immunol.* 36:915-28.
122. Ram, S., D. P. McQuillen, S. Gulati, C. Elkins, M. K. Pangburn, and P. A. Rice. 1998. Binding of complement factor H to loop 5 of porin protein 1A: a molecular mechanism of serum resistance of nonsialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med.* 188:671-80.
123. Ram, S., A. K. Sharma, S. D. Simpson, S. Gulati, D. P. McQuillen, M. K. Pangburn, and P. A. Rice. 1998. A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med.* 187:743-52.
124. Ramm, L. E., M. B. Whitlow, and M. M. Mayer. 1982. Size of the transmembrane channels produced by complement proteins C5b-8. *J Immunol.* 129:1143-6.
125. Reid, K. B. M. 1998. Classical pathway of activation, p. 68-85. In K. Rother, G. O. Till, and G. M. Hänsch (ed.), *The complement system*, 2nd ed. Springer Verlag, Heidelberg.
126. Rosenstein, N. E., B. A. Perkins, D. S. Stephens, T. Popovic, and J. M. Hughes. 2001. Meningococcal disease. *N Engl J Med.* 344:1378-88.

127. Ross, G. D., S. L. Newman, J. D. Lambris, J. E. Devery-Pocius, J. A. Cain, and P. J. Lachmann. 1983. Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. II. Location of binding sites in the C3 fragments for factors B and H, complement receptors, and bovine conglutinin. *J Exp Med.* 158:334-52.
128. Salih, M. A., D. Danielsson, A. Backman, D. A. Cauquant, M. Achtman, and P. Olcen. 1990. Characterization of epidemic and nonepidemic *Neisseria meningitidis* serogroup A strains from Sudan and Sweden. *J Clin Microbiol.* 28:1711-9.
129. Scharfstein, J., A. Ferreira, I. Gigli, and V. Nussenzweig. 1978. Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. *J Exp Med.* 148:207-22.
130. Scholten, R. J., B. Kuipers, H. A. Valkenburg, J. Dankert, W. D. Zollinger, and J. T. Poolman. 1994. Lipo-oligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole- cell ELISA with monoclonal antibodies. *J Med Microbiol.* 41:236-43.
131. Schwentker, F. 1937. Treatment of meningococcal meningitis with sulfanilamide. *J Pediatr.* 11:874-80.
132. Sim, R. B., T. M. Twose, D. S. Paterson, and E. Sim. 1981. The covalent-binding reaction of complement component C3. *Biochem J.* 193:115-27.
133. Stephens, D. S. 1999. Uncloaking the meningococcus: dynamics of carriage and disease. *Lancet.* 353:941-2.

134. Steven, N., and M. Wood. 1995. The Clinical Spectrum of Meningococcal disease, p. 177-206. *In* K. Cartwright (ed.), Meningococcal disease. John Wiley and Sons Ltd., Chichester England.
135. Strang, C. J., S. Cholin, J. Spragg, A. E. Davis, 3rd, E. E. Schneeberger, V. H. Donaldson, and F. S. Rosen. 1988. Angioedema induced by a peptide derived from complement component C2. *J Exp Med.* 168:1685-98.
136. Swartley, J. S., L. J. Liu, Y. K. Miller, L. E. Martin, S. Edupuganti, and D. S. Stephens. 1998. Characterization of the gene cassette required for biosynthesis of the (α 1 \rightarrow 6)-linked N-acetyl-D-mannosamine-1-phosphate capsule of serogroup A *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* 180:1533-9.
137. Swartley, J. S., A. A. Marfin, S. Edupuganti, L. J. Liu, P. Cieslak, B. Perkins, J. D. Wenger, and D. S. Stephens. 1997. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:271-6.
138. Taniguchi-Sidle, A., and D. E. Isenman. 1994. Interactions of human complement component C3 with factor B and with complement receptors type 1 (CR1, CD35) and type 3 (CR3, CD11b/CD18) involve an acidic sequence at the N-terminus of C3 α '-chain. *J Immunol.* 153:5285-302.
139. Tarr, P. I., S. W. Hosea, E. J. Brown, R. Schneerson, A. Sutton, and M. M. Frank. 1982. The requirement of specific anticapsular IgG for killing of *Haemophilus influenzae* by the alternative pathway of complement activation. *J Immunol.* 128:1772-5.

140. Tertti, R., E. Eerola, O. P. Lehtonen, T. H. Stahlberg, M. Viander, and A. Toivanen. 1987. Virulence-plasmid is associated with the inhibition of opsonization in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Clin Exp Immunol.* 68:266-74.
141. Tettelin, H., N. J. Saunders, J. Heidelberg, A. C. Jeffries, K. E. Nelson, J. A. Eisen, K. A. Ketchum, D. W. Hood, J. F. Peden, R. J. Dodson, W. C. Nelson, M. L. Gwinn, R. DeBoy, J. D. Peterson, E. K. Hickey, D. H. Haft, S. L. Salzberg, O. White, R. D. Fleischmann, B. A. Dougherty, T. Mason, A. Ciecko, D. S. Parksey, E. Blair, H. Cittone, E. B. Clark, M. D. Cotton, T. R. Utterback, H. Khouri, H. Qin, J. Vamathevan, J. Gill, V. Scarlato, V. Masignani, M. Pizza, G. Grandi, L. Sun, H. O. Smith, C. M. Fraser, E. R. Moxon, R. Rappuoli, and J. C. Venter. 2000. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science.* 287:1809-15.
142. Thiel, S., T. Vorup-Jensen, C. M. Stover, W. Schwaeble, S. B. Laursen, K. Poulsen, A. C. Willis, P. Eggleton, S. Hansen, U. Holmskov, K. B. Reid, and J. C. Jensenius. 1997. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature.* 386:506-10.
143. Tsai, C. M., C. E. Frasch, and L. F. Mocca. 1981. Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* 146:69-78.
144. Tzeng, Y. L., and S. D.S. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microbes Infect.* 2:687-700.
145. van Deuren, M., P. Brandtzaeg, and J. W. van der Meer. 2000. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev.* 13:144-66.

146. van Emmerik, L. C., E. J. Kuijper, C. A. Fijen, J. Dankert, and S. Thiel. 1994. Binding of mannan-binding protein to various bacterial pathogens of meningitis. *Clin Exp Immunol.* 97:411-6.
147. Verheul, A. F., H. Snippe, and J. T. Poolman. 1993. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. *Microbiol Rev.* 57:34-49.
148. Vogel, U., H. Claus, G. Heinze, and M. Frosch. 1999. Role of lipopolysaccharide sialylation in serum resistance of serogroup B and C meningococcal disease isolates. *Infect Immun.* 67:954-7.
149. Vogel, U., H. Claus, L. von Muller, D. Bunjes, J. Elias, and M. Frosch. 2004. Bacteremia in an immunocompromised patient caused by a commensal *Neisseria meningitidis* strain harboring the capsule null locus (cni). *J Clin Microbiol.* 42:2898-901.
150. Vogel, U., S. Hammerschmidt, and M. Frosch. 1996. Sialic acids of both the capsule and the sialylated lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup B are prerequisites for virulence of meningococci in the infant rat. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 185:81-7.
151. Vogel, U., A. Weinberger, R. Frank, A. Müller, J. Kohl, J. P. Atkinson, and M. Frosch. 1997. Complement factor C3 deposition and serum resistance in isogenic capsule and lipooligosaccharide sialic acid mutants of serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* 65:4022-9.
152. Vogel U., M. G., Zurth K., Claus H., Kriener E., Achtman M. and Frosch M. 1998. Necessity of molecular techniques to distinguish between *Neisseria meningitidis* strains isolated from patients with meningococcal disease and from their healthy contacts. *J. Clin. Microbiol.* 36:2465-2470.

153. Weichselbaum. 1887. Über die Ätiologie der akuten Meningitis cerebrospinalis. *Fortschr Med.* 5:573-583.
154. Weiler, J. M., M. R. Daha, K. F. Austen, and D. T. Fearon. 1976. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73:3268-72.
155. Weis, W. I., and K. Drickamer. 1994. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. *Structure.* 2:1227-40.
156. Wetzler, L. M., K. Barry, M. S. Blake, and E. C. Gotschlich. 1992. Gonococcal lipooligosaccharide sialylation prevents complement-dependent killing by immune sera. *Infect Immun.* 60:39-43.
157. Whaley, K., and S. Ruddy. 1976. Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J Exp Med.* 144:1147-63.
158. Zhu, P., M. J. Klutch, and C. M. Tsai. 2001. Genetic analysis of conservation and variation of lipooligosaccharide expression in two L8-immunotype strains of *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Lett.* 203:173-7.
159. Ziccardi, R. J., and N. R. Cooper. 1979. Active disassembly of the first complement component, C-1, by C-1 inactivator. *J Immunol.* 123:788-92.

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Vogel für die stets hervorragende Betreuung dieser Arbeit bedanken. Sein vorbildliches Engagement, seine Förderung und seine Hilfe ermöglichten das Erstellen dieser Arbeit und weckten mein Interesse an der Forschung. Dank gebührt ebenfalls der kompletten Arbeitsgruppe, im besonderen Frau Gabriele Heinze, die mich sehr geduldig und nett in den Laboralltag einführte. Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Frosch für die freundliche Unterstützung dieser Arbeit, und dafür, dass er mich durch seine spannenden Vorlesungen für die Mikrobiologie begeisterte.

Des weiteren möchte ich Herrn Dr. Sanjay Ram danken, der mich während meines Aufenthaltes in Boston hervorragend betreute; dies gilt auch für die übrigen Mitglieder der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Peter Rice, die mich freundschaftlich aufnahmen und durch fachliche Diskussion einen großen Beitrag zu dieser Arbeit leisteten.

Dem DFG-Graduiertenkolleg 520 (Immunmodulation) der Universität Würzburg und seinem Sprecher, Herrn Prof. Dr. Hünig, möchte ich ganz herzlich für spannende Fortbildungen, interessante Diskussionen, die finanzielle Unterstützung und eine schöne gemeinsame internationale Zeit danken. Außerdem möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Eigenthaler danken, dass er sich als Koreferent für diese Doktorarbeit zur Verfügung gestellt hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, für ihre persönliche und finanzielle Unterstützung während dieser Arbeit und meines Studiums.

Abschließend möchte ich noch Herrn Andreas Peter danken, der mir während den Höhen und Tiefen der Dissertation immer zur Seite stand.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Silke Getzlaff
Geburtstag	9. Mai 1975
Geburtsort	Böblingen
Familienstand	ledig

Ausbildung

1981-1985	Grundschule, Schönaich
1985-1994	Goldberg Gymnasium, Sindelfingen
1994	Abitur (gut 2,2)

Universität

Okt 95- Aug 96	Studium der Betriebswirtschaft, Universität Würzburg
Okt 96- Nov 03	Studium der Medizin, Universität Würzburg
Sep 98	Physikum (gut 2,3)
Sep 99	1. Staatsexamen (befriedigend 3,0)
Sep 99-Okt 00	Promotion bei Prof. Dr. U. Vogel am Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg.
Jan 00- Jan 01	Stipendium für DFG- Graduiertenkolleg 520 für Immunmodulation Institut für Immunologie, Universität Würzburg
Mär 00-Okt 00	Forschungsaufenthalt bei Dr. S. Ram, Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Boston University, Medical Center, Boston, USA
Sep 02	2. Staatsexamen (gut 1,6)
Nov 03	3. Staatsexamen (sehr gut 1,0) Gesamtnote: gut (1,6)

Praktisches Jahr

- Okt 02- Dez 02 Plastische Chirurgie, Royal Prince Alfred Hospital,
Central Clinical School, Sydney University, Sydney,
Australien
- Dez 02- Feb 03 Allgemein Chirurgie, Teaching Hospital, Royal Nepal
Medical College, Kathmandu University, Nepal
- Feb 03- Jun 03 Innere Medizin, Missionsärztliche Klinik, Institut für
Tropenmedizin, Universität Würzburg, Würzburg
- Jun 03- Sep 03 Dermatologie, Dermatologische Klinik, Universitäts-
spital Zürich, Zürich, Schweiz

Berufserfahrung

- Apr 04- Jul 04 Ärztin im Praktikum an dem Universitätsklinikum
Leipzig, Klinik für Dermatologie
- Okt 04 Vollapprobation als Ärztin
- Jan 05 Assistentin im Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Universität Zürich, Schweiz

Kongreßbeiträge

- International Complement Workshop,
2000, Salt Lake City, Utah, USA;
International Pathogenic Neisseria Conference,
2000, Galveston, Texas, USA
International Pathogenic Neisseria Conference,
2002, Oslo, Norwegen
International Pathogenic Neisseria Conference,
2004, Milwaukee, USA

Publikation

Ram, S., A. D. Cox, J. C. Wright, U. Vogel, S. Getzlaff, R. Boden, J. Li, J. S. Plested, S. Meri, S. Gulati, D. C. Stein, J. C. Richards, E. R. Moxon, and P. A. Rice. 2003. Neisserial lipooligosaccharide is a target for complement component C4b. Inner core phosphoethanolamine residues define C4b linkage specificity. *J Biol Chem.* 278:50853-62.

Silke Getzlaff

