

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. M. Frosch

**Interaktion von *Neisseria meningitidis*
mit den Zellen der
menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke.**

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

vorgelegt von

Kirsten Latsch

aus Hünfeld

Würzburg, April 2005

Referent: Prof. Dr. med. M. Frosch

Korreferent: Prof. Dr. med. H. J. Girschick

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Oktober 2005

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern
gewidmet

1. Einleitung	1
1.1. Die Gattung <i>Neisseria</i>	1
1.2. Historie von <i>Neisseria meningitidis</i>	1
1.3. Ätiologie	2
1.4. Vorkommen und Bedeutung	2
1.5. Klassifizierung von <i>Neisseria meningitidis</i>	4
1.6. Epidemiologie	5
1.7. Pathogenitätsfaktoren	6
1.7.1. Die Polysaccharidkapsel von <i>Neisseria meningitidis</i>	7
1.7.2. Lipooligosaccharide (LOS)	8
1.7.3. Pili	9
1.7.4. Außenmembranproteine	11
1.8. Die menschliche Blut-Hirn/Liquor-Schranke	13
1.8.1. Glykoproteinrezeptoren	14
1.8.2. Adhäsive Serumglykoproteine	14
1.9. Die Pathogenese der eitrigen Meningokokken-Meningitis	15
1.10. Problemstellung	18
1.11. Ziel der Arbeit	19
2. Eigene Untersuchungen	20
2.1. Material	20
2.1.1. Geräte	20
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3. Enzyme	21
2.1.4. Chemikalien und Reaktionskits	21
2.1.5. Nährmedien	23
2.1.6. Zusätze	24
2.1.7. Antikörper	24
2.1.8. Zytoskeletthinhibitoren	25
2.1.9. Zellen	26
2.1.10. Bakterienstämme	27
2.2. Methoden	28
2.2.1. Zellkultur der HBMEC-Zellen	28
2.2.2. Kultivierung von Hep2-Zellen	29
2.2.3. Bakterienanzucht	30
2.2.4. Durchführung der Infektionsversuche	30
2.2.5. Zugabe von Serumfraktionen	31
2.2.6. Zugabe inhibierender Antikörper	32
2.2.7. Zugabe von Zytoskeletthinhibitoren	32
2.2.8. Durchflußzytometrie	33

Inhaltverzeichnis

2.2.9.	Immunpräzipitation	33
2.2.10.	Doppelimmunfluoreszenz	34
2.2.11.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.2.12.	Western Blot	35
2.1.13.	Silberfärbung	36
2.2.14.	Chromatographische Methoden	36
3.	Ergebnisse	38
3.1.	Interaktion von Meningokokken unterschiedlicher klonaler Linien mit HBMEC-Zellen	38
3.1.1.	Infektionsversuche mit Serogruppe B Meningokokken	40
3.1.2.	Infektionsversuche mit Serogruppe C Meningokokken	47
3.1.3.	Infektionsversuche mit Serogruppe A Meningokokken	49
3.2.	Identifikation Fibronektins als invasionfördernde Komponente humanen Serums	53
3.2.1.	Einfluß der Serumkonzentration auf die Invasion von <i>N. meningitidis</i> in HBMEC-Zellen	53
3.2.2.	Infektionsversuche unter Zugabe von Serumfraktionen	55
3.2.3.	Infektionsversuche unter Depletion und Substitution von Fibronektin	64
3.3.	Identifikation von Integrinen als Rezeptoren Opc-exprimierender Meningokokken auf HBMEC-Zellen	69
3.3.1.	Infektionsversuche unter Zugabe von Anti-Integrinrezeptor-Antikörpern	71
3.4.	Einfluß von Heparansulfat-Proteoglykanen auf die Interaktion Opc-exprimierender Meningokokken mit HBMEC-Zellen	76
3.4.1.	Infektionsversuche unter Zugabe von Heparin und Heparansulfat	76
3.5.	Einfluß der Zytoskelettfunktion auf die Invasion Opc-exprimierender Meningokokken in HBMEC-Zellen	80
3.5.1.	Infektionsversuche unter Zugabe von Zytoskelettinhibitoren	80
4.	Diskussion	83
5.	Zusammenfassung	94
6.	Literatur	96
7.	Anhang	111
7.1.	Abkürzungsverzeichnis	111
7.2.	Abbildungsverzeichnis	114

1. Einleitung

1.1. Die Gattung *Neisseria*

Neisseria meningitidis gehört zur Familie der *Neisseriaceae* sowie zur Gattung der *Neisseria*, die gram-negative, unbewegliche und sporenlose Diplokokken umfaßt, deren natürlicher Wirt der Mensch ist (Vedros, 1987). *Neisseria lactamia*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria flavia*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria sicca* und *Neisseria polysaccharea* besiedeln als Kommensalen asymptomatisch die Schleimhäute. Nur selten verursachen sie manifeste Krankheiten. *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* stellen die bekanntesten humanpathogenen Arten dar und sind von weltweiter Bedeutung (Peltola, 1983). Auf DNA-Ebene sind *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* eng miteinander verwandt; die Homologie ihrer housekeeping Gene beträgt ungefähr 98% (Zhou und Spratt, 1992). Im Gegensatz zu *N. gonorrhoeae* exprimiert *N. meningitidis* jedoch eine Polysaccharidkapsel, RTX-Toxine sowie eine Rotamase (Tinsley und Nassif, 1996).

1.2. Historie von *Neisseria meningitidis*

Benannt wurde die Gattung *Neisseria* nach dem Arzt Albert Neisser, der 1879 *N. gonorrhoeae* als den Erreger der Gonorrhö entdeckte. 1805 beschrieb Viessieux erstmals das epidemische Auftreten einer Meningokokken-Meningitis. Im 19. Jahrhundert traten wiederholt Epidemien auf, die vornehmlich Kleinkinder und Soldaten in Kasernen und Feldunterkünften betrafen. 1887 gelang es Anton Weichselbaum als Erstem, den Erreger aus dem Exsudat der Hirnhäute sowie dem Liquor von sechs an den Symptomen der cerebrospinalen Meningitis verstorbenen Patienten zu isolieren und im Detail zu beschreiben (Weichselbaum, 1887). Neun Jahre nach Weichselbaums Entdeckung gelang es, den Erreger aus der Zerebrospinalflüssigkeit bzw. dem Nasen-Rachen-Raum akut an Meningitis erkrankter Patienten zu isolieren. Councilman und seine Mitarbeiter diagnostizierten schließlich in 31 von 34 Fällen *N. meningitidis* als den Erreger von Meningitiden und postulierten diesen Organismus als ätiologisches Agens der *Meningitis cerebrospinalis*.

1.3. Ätiologie

Neisseria meningitidis sind gram-negative Diplokokken mit einem Durchmesser von 0,6-1µm, die im mikroskopischen Präparat meist kugelig imponieren. Sie können in Haufen zusammenliegen, bilden aber keine Ketten. Ihre etwa 1µm großen, runden, glatten Kolonien erscheinen grau-opak und von weicher bis schleimiger Konsistenz. Meningokokken sind Oxidase-positiv und können sowohl Glukose als auch Maltose fermentieren. Unter aeroben Bedingungen zeigen die Penicillin-empfindlichen Diplokokken ihr Wachstumsoptimum bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit einem CO₂-Anteil von 3-10%. *N. meningitidis* besitzen Pili sowie eine undulierende 7,5-8,5nm dicke äußere Membran, jedoch keine Flagellen. Peptidoglykane sind Bestandteile ihrer Zellwand.

1.4. Vorkommen und Bedeutung

Neisseria meningitidis ist ein bedeutender Erreger bakterieller Meningitiden im Kindes- und Jugendalter. Die Transmission der ausschließlich humanpathogenen Meningokokken erfolgt direkt von Mensch zu Mensch über Atemwegssekrete oder Tröpfchenaerosole. Als natürliches Reservoir von *N. meningitidis* gilt der menschliche Nasopharynx, von dem ausgehend die Erreger Anschluß an das Blut- und Lymphsystem erlangen und sich im Körper ausbreiten und absiedeln können. Durch nachfolgende Passage der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke können Meningokokken eine eitrige Entzündung der Hirnhäute verursachen. Je nach geographischer Lage sind bis zu 40% der Bevölkerung im Nasopharynx asymptomatisch mit Meningokokken besiedelt, wobei die in epidemiologischen Studien ermittelten Trägerquoten bezüglich einzelner Altersgruppen und Populationen als eher zu niedrig beziffert diskutiert werden. In Deutschland ist unter Berücksichtigung der Altersstruktur und Epidemiologie mit 5-30% Keimträgern zu rechnen. Genaue Zahlen über das Verhältnis von Trägertum zu Infektionen mit *N. meningitidis* fehlen, jedoch wird bei ca. 700-800 gemeldeten invasiven Meningokokkeninfektionen von einer Inzidenz der Erkrankung unter 1/100.000 Einwohner/Jahr ausgegangen (Vogel *et al.*, 2004a). Ein erhöhtes Risiko für eine

invasive Meningokokken-Erkrankung besteht für Individuen ohne natürlich erworbene Antikörper, für Individuen mit schweren Immundefekten, aber auch für Menschen, die exogenen Risikofaktoren wie Tabakrauch oder Koinfektionen ausgesetzt sind. Eine erhöhte Krankheitsbereitschaft sowie eine Prädisposition für schwere Krankheitsverläufe konnte für bestimmte Genpolymorphismen beschrieben werden, die Einfluß auf die Produktion von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Plasminogen nehmen (Hermans *et al.*, 1999; Nadel *et al.*, 1996). Je nach Immunkompetenz und Immunstatus des Trägers kann es zur Entwicklung einer systemischen Infektion kommen, die bei ungünstigem Verlauf innerhalb von 24-48 Stunden zum Tode des Erkrankten führt (Steven und Wood, 1995). Die Letalitätsrate beträgt 5-25% und steigt bei einer fulminanten Meningokokkensepsis, der schwersten Form der Erkrankung, auf etwa 40% an (Peltola, 1983; Schuchat *et al.*, 1997). Die Meningokokken-Meningitis ist meist durch ein plötzliches Auftreten von starken Kopfschmerzen, Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Lichtempfindlichkeit und Nackenstarre (Meningismus) charakterisiert. Neurologische Anzeichen umfassen Benommenheit, Delirium und schließlich Koma. Die Freisetzung großer Mengen Endotoxine führt zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren (TNF- α , IL-1, IL-6) und konsekutiv zu einer Aktivierung des Komplementsystems mit Verbrauchskoagulopathie und Vaskulitis, die schwerwiegende Einblutungen in Haut, Nebennieren, Herzbeutel und andere Organe zur Folge haben können und binnen weniger Stunden zum Tod führen („Waterhouse-Friderichsen-Syndrom“).

Meningokokken haben die Tendenz, sich in relativ kurzer Zeit innerhalb einer menschlichen Population auszubreiten. Dies führt zur Induktion einer sog. Herdimmunität, die auf einer spezifischen humoralen Immunität gegen den innerhalb dieser Population zirkulierenden Klon basiert (Vogel *et al.*, 2004a). Es kommt zur Produktion spezifischer Antikörper, die gegen Polysaccharide wie das Kapselpolysaccharid oder äußere Membranproteine wie das PorA Protein gerichtet sind. Eine natürliche Selektion findet sowohl durch Ausbildung sog. immune-escape Varianten, die aufgrund veränderter Oberflächenantigene nicht mehr durch Antikörper gebunden werden können, als auch infolge einer Verdrängung durch andere Meningokokkenklone statt.

1.5. Klassifizierung von *Neisseria meningitidis*

Neisserien lassen sich mit Hilfe von Enzymsubstratanalysen durch den Nachweis der Säurebildung aus verschiedenen Zuckern, anhand des Hämolysevermögens, der Reduktion von Nitrit und Nitrat, der Polysaccharidbildung aus Saccharose sowie der Pigmentbildung biochemisch differenzieren. Leitnachweis von *N. meningitidis* ist ein positiver γ -Glutamylaminopeptidase-Test, während *N. polysaccharica* bzw. *N. subflava* Hydroxyprolylaminopeptidase-positiv, jedoch γ -Glutamylaminopeptidase-negativ sind.

Eine serologische Klassifizierung von Meningokokken-Isolaten orientiert sich an der Expression vier verschiedener Oberflächenantigene (Verheul *et al.*, 1993). So können 13 Serogruppen anhand unterschiedlicher Kapselpolysaccharide differenziert werden (A, B, C, X, Y, Z, 29E, W135, H, I, K). Der jeweilige Serotyp wird durch die Außenmembranproteine Klasse 2 und 3 (PorB) bestimmt, die Unterteilung in Subserotypen geht auf unterschiedliche Epitope des Außenmembranproteins Klasse 1 (PorA) zurück. Zuletzt erfolgt die Bestimmung des jeweiligen Immunotyps durch Analyse der Lipooligosaccharid (LOS)-Epitope. Ein serologisch klassifizierter Stamm wird schließlich entsprechend der Reihenfolge Serogruppe: Serotyp: Subserotyp bezeichnet. Diese serologische Klassifizierung bildete über viele Jahre die Grundlage epidemiologischer Studien über Ausbrüche Meningokokken-assoziiierter Erkrankungen und wird bis heute zur schnellen Identifizierung epidemischer Klone genutzt. Die Serologie ist jedoch bei weitem nicht ausreichend, die Variabilität innerhalb einer natürlichen *N.meningitidis*-Population zu erfassen. Vornehmlich Serogruppe B und C Isolate sind häufig „nicht typisierbar“ (not typeable, NT) bzw. „nicht subtypisierbar“ (not subtypeable, NST) (Maiden und Feavers, 1994, 1995; Maiden *et al.*, 1998).

Die Technik der Multilokus-Enzym-Elektrophorese (MLEE) ermöglicht die Erfassung chromosomaler Varianten in mehreren unabhängigen Loci zahlreicher Stämme einer Population (Caugant *et al.*, 1986). Enzymvarianten (Alloenzyme) von 10-15 verschiedenen Stoffwechsellzymen werden mit Hilfe der MLEE anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität analysiert (Caugant *et al.*, 1987). Variationen von Proteinen, die im Rahmen der Mikroevolution auftreten, resultieren in Ladungsänderungen und bedingen veränderte Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld. Die mittels Elektrophorese detektierten Allele eines Enzyms werden durchnummeriert, und die analysierten Bakterien sog. elektrophoretischen Typen (ET)

zugeordnet. Durch MLEE-Analyse einzelner genetischer Loci können beispielsweise die hypervirulenten Linien der Serogruppe B und C Meningokokken ausreichend identifiziert werden.

Goldstandard in der Typisierung bakterieller Erreger ist in jüngster Zeit die Technik der Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST) (Maiden *et al.*, 1998). Die MLST ermöglicht durch Sequenzierung von 450-500bp langen internen DNA-Fragmenten, sog. Nukleotid-Sequenzen, die Detektion von Stoffwechselgenen an 7 unabhängigen Orten des Genoms und die Identifizierung unterschiedlicher Allele einzelner housekeeping Gene. Ein 7-stelliger Zahlenkode determiniert den sogenannten Sequenztyp (ST), wobei verwandte Sequenztypen zu genetischen Linien (Komplexen) zusammengefasst werden. Gegenüber der MLEE, die für den Fall einer schnellen epidemiologischen Auswertung im Rahmen eines manifesten Krankheitsausbruchs ungeeignet ist, erlaubt die Methode der MLST eine sehr rasche Identifizierung hypervirulenter Meningokokkenstämme (Maiden *et al.*, 1998; Feavers *et al.*, 1999). Seit Publikation der MLST-Methode konnten über 1.000 unterschiedliche Sequenztypen von *N. meningitidis* identifiziert werden.

Unter Zuhilfenahme der RDA-Technik (recombinant DNA technology) sowie der Analyse des Plasmid-Profiles gelang der Nachweis ST-Komplex-spezifischer DNA-Fragmente. Die Kenntnis der restriktiven Gene *nmeA1*, *nmeB1* und *nmeD1* bzw. der Insertionssequenz *IS1655* stellt im Rahmen sog. R-M-Systeme (restriction-modification system) die Grundlage für die Entwicklung molekularer, PCR-basierter Identifikationsschemata hypervirulenter klonaler Linien von *N. meningitidis* dar.

1.6. Epidemiologie

Die Spezies *N. meningitidis* setzt sich aus einer Vielzahl unterschiedlicher Klone und klonaler Linien zusammen und stellt in der Besiedlung des menschlichen Organismus diejenige mit der höchsten genetischen Variabilität dar. Diese resultiert aus der frequenten Rekombination einzelner Gene der natürlich kompetenten Meningokokken im Rahmen von Transformation und horizontalem Gentransfer (Achtman, 1997; Feil *et al.*, 1999, 2000; Linz *et al.*, 2000). Weiterhin bedingen Punktmutation, Deletion, Insertion und Translokation von Genen innerhalb des Genoms eine stete Mikroevo­lution. Eine klonale Expansion, v.a. im Rahmen von Epidemien, führt

gleichzeitig zum Fortbestehen einzelner klonaler Linien innerhalb einer Population (Achtman, 1997). So ist trotz der starken Diversität der Population von *N. meningitidis* nur ein vergleichsweise geringer Anteil der unterschiedlichen Genotypen in Trägerpopulationen nachweisbar bzw. regelmäßig mit invasiven Meningokokkenerkrankungen assoziiert (Caugant *et al.*, 1986, 1987). Die Mehrzahl der weltweiten Meningokokken-Infektionen können auf wenige klonale Linien der Serogruppen A, B und C zurückgeführt werden, die als „hyperinvasiv“ oder „hypervirulent“ bezeichnet werden. In den westlichen Industrienationen werden Meningokokkenerkrankungen zumeist durch eine kleine Anzahl hypervirulenter Linien der Serogruppen B und C verursacht, die den Sequenztypen ST-32, ST-41/44, ST-11, ST-8, Cluster A4 sowie Linie III zuzuordnen sind (Achtman, 1995a). In Deutschland dominieren seit vielen Jahren mit über 70% Infektionen mit Serogruppe B Meningokokken, während der Anteil an Serogruppe C Infektionen bis zum Jahre 2002 durchschnittlich bei 21% lag. Seitdem zeigt letzterer zwar eine ansteigende Tendenz auf über 30%, dieser Anstieg ist jedoch nicht mit einem signifikanten Anstieg der Gesamtinzidenz aller Erkrankungen assoziiert (Vogel *et al.*, 2004b).

Serogruppe A Meningokokken werden in Deutschland nur in Ausnahmefällen vom Nationalen Referenzzentrum für Meningokokken als Verursacher einer Infektion beobachtet. In den Jahren 2002 und 2003 gab es keinen Erkrankungsfall in Deutschland mit dieser global gesehen sehr häufigen Serogruppe. Serogruppe A Meningokokken sind hauptverantwortlich für eine Vielzahl epidemischer Ausbrüche besonders im Bereich des sog. „Meningitisgürtels“ (Lapeyssonie, 1963). Innerhalb der über 500 bekannten Serogruppe A Isolate in Afrika konnte eine kleine Anzahl hypervirulenter Linien identifiziert werden, die neun Subgruppen (I, II, III, IV-1, IV-2, V, VI, VII, VIII) zugeordnet werden (Wang *et al.*, 1992). Besonders häufig sind Isolate der Subgruppen I, III und IV-1, vornehmlich Vertreter des ST-1, ST-4 und ST-5 Komplexes, mit Serogruppe A Meningokokken-Erkrankungen assoziiert.

1.7. Pathogenitätsfaktoren

Die Pathogenitätsfaktoren von *N. meningitidis* lassen sich in sekretorische Virulenzfaktoren (z.B. IgA-Protease) und Oberflächenstrukturen unterteilen. Zu den wichtigen Oberflächenstrukturen zählen die Pili, die Außenmembranproteine (OMP),

das Kapselpolysaccharid und die Lipooligosaccharide. Meningokokken sind durch molekulares Mimikry, Alteration oder Herunterregulation antigenetisch wirksamer Strukturen in der Lage, den Abwehrmechanismen des menschlichen Immunsystems zu entgehen und im menschlichen Wirtsorganismus zu persistieren.

1.7.1. Die Polysaccharidkapsel von *Neisseria meningitidis*

Die Kapselpolysaccharide von *N. meningitidis* sind Homo- oder Heteropolymere aus sich wiederholenden Einheiten von Mono-, Di- bzw. Trisacchariden. Sie setzen sich, mit Ausnahme des Kapselpolysaccharids A, aus Sialinsäurederivaten zusammen. So bestehen die Kapselpolysaccharide von *N. meningitidis* Serogruppe B und C Isolaten aus langkettigen Sialinsäure-Polymeren (N-Acetyl-Neuraminsäure, NANA) in α -2,8- bzw. α -2,9-Verknüpfung (Frosch *et al.*, 1989; Claus *et al.*, 1997; Vogel und Frosch, 1999). Die Kapsel von Serogruppe B Meningokokken aus α -2,8-verknüpften Polysialinsäuren (Frosch und Müller, 1993) ahmt im Sinne eines molekularen Mimikry die Struktur menschlicher Glykoproteine, u.a. des Nervenzell-Adhäsionsmoleküls NCAM, nach und entgeht auf diese Weise der natürlichen Immunantwort des Wirtsorganismus (Finne *et al.*, 1987). Das Kapselpolysaccharid von *N. meningitidis* Serogruppe A unterscheidet sich als Homopolymer aus α -2,6-glykosidisch verknüpftem N-Acetylmannosamin-1-Phosphat (Griffis *et al.*, 1991) und aufgrund seiner Sialinsäuredefizienz (Achtman *et al.*, 1995b) in der chemischen Zusammensetzung von den Polysaccharidkapseln der bereits dargestellten Serogruppen. Biochemisch wie auch genetisch ist das Kapselpolysaccharid der Serogruppe A nicht mit den Kapselpolysacchariden der Serogruppen B, C, W135 und Y verwandt, die ihrerseits N-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac, Sialinsäure) enthalten. Der Kapselgenkomplex *cps* von *N. meningitidis* kodiert für alle Enzyme, welche für die Biosynthese der Kapsel und deren Expression an der Zelloberfläche notwendig sind. Für Serogruppe B Meningokokken umfasst dieser eine Größe von 24kb und wird in fünf funktionelle Regionen (A-E) unterteilt (Frosch und Müller, 1993; Hammerschmidt *et al.*, 1994).

Die Polysaccharidkapsel von *N. meningitidis* wirkt immunogen und wird, mit Ausnahme des Serogruppe B Polysaccharids, zur Impfstoffherstellung verwendet. Als essentieller Pathogenitätsfaktor inhibiert das Kapselpolysaccharid von *N. meningitidis*

die Adhäsion an Monozyten und neutrophile Granulozyten und verhindert somit eine Opsonisierung und konsekutive Phagozytose (Klein *et al.*, 1996). Die Expression der Polysaccharidkapsel bedingt ferner eine Resistenz gegenüber Komplement-vermittelter Erregerelimination (Hammerschmidt *et al.*, 1994; ; Jarvis, 1994; Vogel *et al.*, 1996) und beeinflusst signifikant die Interaktion von Opa- und Opc-exprimierenden Meningokokken mit zellulären CD66- bzw. Heparansulfatproteoglykan-Rezeptoren (Virji *et al.*, 1996a, 1999; de Vries *et al.*, 1998).

Die Kapelexpression durch *N. meningitidis* unterliegt sowohl einem Selektionsdruck durch verschiedene Umweltfaktoren als auch einer spontanen Phasenvariation, die unter Standard-Kulturbedingungen beobachtet wird (Hammerschmidt *et al.*, 1996b). Während Isolate des menschlichen Nasopharynx in der Regel unkapselt sind, weisen Isolate aus dem Blut oder Liquor zumeist eine Kapselexpression auf (Cartwright *et al.*, 1987). Der Verlust der Kapselexpression durch slipped-strand mispairing geht mit einer gesteigerten Adhärenz sowie einer signifikant gesteigerten Invasion von Meningokokken in humane epitheliale Zellen einher (Virji *et al.*, 1993b; Hammerschmidt *et al.*, 1996a; Hilse *et al.*, 1996). Für Serogruppe B Meningokokken gelang der Nachweis einer Regulation dieser Phasenvariation durch Insertion bzw. Exzision des Insertionselements *IS1301* innerhalb einer 5'-AYTAG-3'-Sequenz des *siaA* Gens (Hilse *et al.*, 1996, 2000), einem essentiellen Gen der Sialinsäuresynthese (Frosch *et al.*, 1989). Die Formation der Polysaccharidkapsel ist durch erneute Exzision des Insertionselements *IS1301* vollständig reversibel (Hilse *et al.*, 1996, 2000). *IS1301*-positive Isolate wurden vornehmlich in den Serogruppen 29E, W135, X und Y nachgewiesen, während der Nachweis von *IS1301* in klonalen Linien der Serogruppen A, B und C nur in etwa 20% gelang (Hilse *et al.*, 2000).

1.7.2. Lipooligosaccharide (LOS)

Neisseria meningitidis besitzen das Potential zur Synthese von Lipooligosacchariden (LOS) sowie zur Sialisierung eines terminalen Galaktoserestes ihrer LOS (Parsons *et al.*, 1989; Mandrell *et al.*, 1991; Mandrell und Apicella, 1993). LOS machen annähernd 50% der äußeren Zellmembran der Neisserien aus und fungieren als Endotoxine, die potente Stimuli einer proinflammatorischen Zytokinantwort durch Aktivierung des

CD14-Transduktionsweges und durch Induktion von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α in monozytären Zellen sind (Bellomo R., 1992; Casey L.C., 1993; Weidenmann *et al.*, 1997). LOS bestehen aus einem Lipoid A-Anteil und dem aus 8 bis 12 Monosacchariden zusammengesetzten Core-Oligosaccharid. Mit Ausnahme der fehlenden O-spezifischen Seitenketten sind sie in ihrer Struktur mit dem LOS anderer gram-negativer Bakterien vergleichbar (Jennings *et al.*, 1983). Die kodierenden *lgt* Gene unterliegen einer Phasenvariation durch slipped-strand mispairing (Jennings *et al.*, 1995). In Serogruppe B Meningokokken ist das Lipoid A über zwei 2-Keto-3-Desoxyoctonsäuren (KDO) mit einem Kernoligosaccharid verbunden, das als Grundstruktur zwei Heptosen umfasst. Diese Heptosen sind mit N-Acetylglucosamin bzw. der β -glykosidisch verknüpften Lacto-N-Neotetraose Gal1 β →4GlcNAc β →13Gal β 1→4Glc substituiert, eine terminale Galaktose fungiert als Akzeptor (Griffis *et al.*, 1991). Das LNnt-Molekül ist chemisch identisch mit Glykosphingolipidvorstufen der menschlichen Blutgruppenantigene (Mandrell *et al.*, 1991) und Oberflächenstrukturen humaner Erythrozyten, Lymphozyten bzw. Granulozyten (Mandrell *et al.*, 1990; Tsai und Civin, 1991). Die Sialisierung des LOS durch das Enzym α -2,3-Sialintransferase resultiert in einer Resistenz gegenüber Komplement-vermittelter Bakteriolyse (Hammerschmidt *et al.*, 1994) und stellt neben der Kapselexpression einen bedeutenden Pathogenitätsfaktor für die Umgehung einer natürlichen Immunantwort des Wirtsorganismus dar (Vogel und Frosch, 1999). Für *lst* Deletionsmutanten des Serogruppe B Stamms MC58 konnte ein inhibierender Effekt der Sialisierung des LOS auf die Phagozytose der Bakterien durch dendritische Zellen gezeigt werden (Vogel *et al.*, 1999). Die Bindung von Sialinsäuren führt vermutlich zu einer Maskierung von *N. meningitidis* Oberflächenproteinen, die anderenfalls die Phagozytose der Bakterien durch dendritische Zellen vermitteln (McNeil und Virji, 1997).

1.7.3. Pili

Pili sind haarähnliche Fortsätze, die sich aus Protein-Untereinheiten, einer variablen Pilus-Untereinheit PilE sowie dem Pilus-assoziierten Adhäsin PilC, zusammensetzen. Sie können bis zu 6 μ m aus der bakteriellen Außenmembran herausragen (Stephens *et al.*, 1983). Das Zusammenspiel von Pili-Komponenten und epithelialen Rezeptoren

ermöglicht eine Verankerung des Erregers im Schleimhautgewebe und vermittelt eine Resistenz gegenüber der mukoziliären Clearance von Epithelzellen (Meyer, 1989). Mindestens 22 Genprodukte sind in Aufbau und Funktion der Typ-4-Pili pathogener Neisserien involviert (Stephens *et al.*, 1983), die durch einen GlcNAc-Rest in α -1,3-glykosidischer Verbindung charakterisiert sind (Marcaeu *et al.*, 1998). Posttranslationale Veränderungen der Pili umfassen die Bindung von Glycerophosphaten (Stimson *et al.*, 1996) sowie von Phosphorylcholin-Epitopen an die Pili-Untereinheiten (Weiser *et al.*, 1998). Die Bedeutung dieser Modifikationen ist bislang ungeklärt.

Typ-4-Pili von *N. meningitidis* gelten als wesentliche Faktoren der primären Kolonisation epithelialer Mukosazellen (Ward *et al.*, 1974; Kellogg *et al.*, 1986) und der Invasion der Meningen (Nassif *et al.*, 1994; Dehio *et al.*, 2000). Sowohl Isolate aus dem Nasopharynx asymptomatischer Träger als auch Isolate aus dem Nasenrachenraum von Meningitis-Patienten exprimieren Pili, die *in-vitro* primäre Interaktionen mit den Mikrovilli epithelialer Nasopharynxzellen ohne Zilliensaum vermitteln (McGee *et al.*, 1979; Stephens und McGee, 1981; Stephens *et al.*, 1983). Pili-defiziente Erreger sind unabhängig von der Expression der Außenmembranproteine Opa und Opc nicht in der Lage, an Endothel- bzw. Epithelzellen zu adhären (Virji *et al.*, 1992a). Als zelluläre Komponente einer Pilus-vermittelten Interaktion konnte der CD46-Rezeptor identifiziert werden, dessen Bindung in einem transienten Ca^{2+} -Ionen-Einstrom in die Zielzellen resultiert (Källström *et al.*, 1997, 1998). Die homologen Proteine PilC1 und PilC2 sind essentielle Komponenten sowohl der initialen Adhäsion von Meningokokken an die Zielzellen als auch der Pilus-Biogenese (Jonsson *et al.*, 1991; Nassif *et al.*, 1994). Die etwa 110kDa großen PilC-Moleküle, die innerhalb der Pili-Fasern lokalisiert sind und eine Zell-Bindungs-Domäne aufweisen (Rudel *et al.*, 1995), unterliegen einer transkriptionellen Hochregulation durch Induktion des kodierenden *pilC1* Gens. Dieses steht unter Kontrolle des Promotorelements CREN (contact regulatory element of Neisseria) (Taha *et al.*, 1998). Die Repression der *pilC1*-Expression wird dem LTTR-Regulatorgen *crgA* (LysR-type transcriptional regulator) zugeschrieben, das ebenfalls der Kontrolle eines CREN-Elements unterliegt und vermutlich durch Zellkontakt hochreguliert wird. Studien mit *crgA* Mutanten legen die Vermutung nahe, dass das Genprodukt CrgA auch die Synthese der Polysaccharidkapsel von *N. meningitidis* direkt inhibiert (Deghmane *et al.*, 2000).

1.7.4. Außenmembranproteine

1.7.4.1. Porine

Porine (principal outer membrane protein) sind homotrimere, ATP-regulierte Ionenkanäle innerhalb der bakteriellen Außenmembran, die die Diffusion niedermolekularer Substanzen durch die äußere Membran ermöglichen (Benz, 1988). Während *N. gonorrhoeae* sowohl ein phasenvariables PorA- als auch ein PorB-Protein exprimiert, ist *N. meningitidis* durch die Expression lediglich eines der beiden PorB-Allele charakterisiert (Tsai *et al.*, 1981). PorB-Porine translozieren in künstliche Lipidmembranen bzw. in die Wirtszellmembran (Weel und van Putten, 1991; Rudel *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1998) und induzieren auf diese Weise ein verändertes Membranpotential in Phagozyten mit Einfluß auf deren oxidative Reaktionen (Haines *et al.*, 1988, 1991; Bjerknes *et al.*, 1995). In Studien mit Gonokokken konnte gezeigt werden, dass PorA-exprimierende Isolate eine erhöhte Serumresistenz aufweisen und gehäuft für Infektionen verantwortlich sind, deren Verlauf durch das Auftreten einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) kompliziert wird (Morello und Bohnhoff, 1989). PorB1 ist als wichtige Komponente sowohl einer Opa-unabhängigen als auch einer Opa-vermittelten Invasion von *N. gonorrhoeae* beschrieben (van Putten *et al.*, 1998a). In Studien mit Meningokokken konnten diese Ergebnisse bislang nicht bestätigt werden, doch gibt es Hinweise darauf, dass *N. meningitidis* Porine für strukturelle Veränderungen der Aktinfilamente der menschlichen Wirtszelle verantwortlich sind (Giardina *et al.*, 1998).

1.7.4.2. Opa und Opc

Sowohl Opa- als auch Opc-Proteine sind multimere Außenmembranproteine, die die Adhärenz und Invasion von Meningokokken in diverse Wirtszellen vermitteln (Achtman *et al.*, 1988; Virji *et al.*, 1992b, 1993, 1999; de Vries *et al.*, 1996). Reversible Mutationen im kodierenden Genabschnitt des *opa* Gens bzw. in einer repetitiven Sequenz in der *opc* Promotorregion bedingen eine variable Expression beider Proteine (Sarkari *et al.*, 1994).

Opa-assoziierte Proteine von *N. meningitidis* (ursprünglich Klasse-5 Proteine) haben ein Molekulargewicht von 28kDa. Ihre Expression unterliegt einer translationalen Regulation. Sie durchspannen die Bakterienmembran achtfach und exponieren vier oberflächliche Schleifen (Bhat *et al.*, 1991; Malorny *et al.*, 1998). Während Schleife 4, die dem C-terminalen Ende am nächsten gelegen ist, konserviert ist, stellen die Schleifen 2 und 3 hypervariable Domänen (HV-1 und HV-2) dar (Aho *et al.*, 1991; Malorny *et al.*, 1998). Ein einziger Meningokokken-Stamm besitzt bis zu 3-4 unverbundene chromosomale Allele, die für verschiedene Opa-Varianten kodieren (Stern und Meyer, 1987). Obwohl diese Sequenzen eine Ähnlichkeit von annähernd 70% aufweisen, resultiert eine antigenetische Variabilität aus den semi- und hypervariablen Domänen auf der Zelloberfläche (Bhat *et al.*, 1991; Kupsch *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993; Malorny *et al.*, 1998). Jedes *opa* Allel unterliegt zudem der Phasenvariation durch eine *RecA*-unabhängige Veränderung der Anzahl der Pentanukleotide und nachfolgende Verschiebung des Leserasters der konstitutiv transkribierten Gene (Murphy *et al.*, 1989). Da eine genetische Rekombination sowohl innerhalb als auch zwischen verschiedenen *N. meningitidis* Stämmen möglich ist, wird eine große Anzahl unterschiedlicher *opa* Allele mit heterogener Verteilung innerhalb der einzelnen Stämme generiert (Morelli *et al.*, 1997; Hobbs *et al.*, 1998). Opa-Proteine erlauben eine Interaktion mit epithelialen, endothelialen und phagozytischen Zellen. Grundlage dieser Interaktion ist die Bindung von Opa-Proteinen an das N-terminale Ende von CD66-Rezeptoren auf endothelialen HUVEC-Zellen bzw. an epitheliale Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) (van Putten und Paul, 1995; Chen und Gotschlich, 1996; Virji *et al.*, 1996a,b, 1999; de Vries *et al.*, 1998). Eine Src-ähnliche Tyrosinkinase, eine Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase und eine saure Sphingomyelinase sind als nachgeschaltete Transduktionskaskaden beschrieben (van Putten und Paul, 1995; Grassmé *et al.*, 1997). Da nur für wenige Opa-Proteine eine Bindung an beide Rezeptoren nachgewiesen werden konnte, muß von unterschiedlichen Bindungsstellen basierend auf Unterschieden in der molekularen Struktur ausgegangen werden (Chen *et al.*, 1997; de Vries *et al.*, 1998). Studien legen die Vermutung nahe, dass die Kombination der hypervariablen Regionen HV-1 und HV-2 durch Bildung einer individuellen Bindungsdomäne eine entscheidende Rolle in der Determinierung des Rezeptortropismus spielt. Für Opa-Proteine von *N. gonorrhoeae* konnte weiterhin eine Interaktion mit den Matrixmolekülen Fibronectin und Vitronectin nachgewiesen

werden (Duensing und van Putten, 1997), eine Eigenschaft, die ebenfalls für das Opc-Protein von *N. meningitidis* bekannt ist (Virji *et al.*, 1994; de Vries *et al.*, 1998).

Opc-Proteine (ursprünglich Klasse-5c Proteine) sind hitzeinstabile trimere Außenmembranproteine, die sich aus Monomeren mit einem Molekulargewicht von 24-35 kDA zusammensetzen. Die Expression der Opc-Proteine wird primär auf Ebene der Transkription kontrolliert und ist abhängig von der Länge eines Polycytidin-Stretches in der Promotorregion des *opc* Gens (Sarkari *et al.*, 1994). Opc-exprimierende Meningokokken interagieren mit dem menschlichen Serum-Glykoprotein Vitronectin, das als Brückenmolekül die Bindung der Erreger an $\alpha_v\beta_3$ -Integrine auf der Apikalseite endothelialer HUVEC-Zellen vermittelt (Virji *et al.*, 1994). Die Bindung von Opc-Proteinen an Heparansulfatproteoglykanen auf humanen epithelialen Zellen resultiert in einer Adhäsion und Invasion von *N. meningitidis* (de Vries *et al.*, 1996, 1998; Virji *et al.*, 1992b).

Die Funktion der Außenmembranproteine Opa und Opc von *N. meningitidis* wird durch Expression des Kapselpolysaccharids bzw. durch Sialylierung der LOS signifikant beeinflusst (de Vries *et al.*, 1998; Virji *et al.*, 1993).

1.8. Die menschliche Blut-Hirn/Liquor-Schranke

Die menschliche Blut-Hirn/Liquor-Schranke trennt als eine anatomisch und funktionell einzigartige Barriere das Blutgefäßsystem vom Zentralen Nervensystem (ZNS). Diese Separation des Gehirns vom Gefäßkompartiment ist sowohl für die Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS als auch zum Schutz des Liquorraums vor dem Eindringen cerebrotoxischer Substanzen durch Passage der cerebralen Kapillarwände essentiell (Pardridge, 1999; Rubin, 1999; Huang *et al.*, 2001). Das Kapillarendothel der Hirngefäße ist durch das Vorhandensein sog. tight junctions charakterisiert, die einen passiven parazellulären Durchtritt aller sonst kapillargängigen Stoffe verhindern und eine selektive Permeabilität gewährleisten (Tsukita und Furuse, 1999; Kniesel und Wolburg, 2000; Zahraoui *et al.*, 2000). Lediglich H₂O, O₂ und CO₂ können ungehindert übertreten, während Elektrolyte und andere Moleküle vom Plexusepithel aktiv aufgenommen bzw. sezerniert werden müssen. Die Permeabilität der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke wird physiologischerweise durch Faktoren bedingt, die von

Astrozyten freigesetzt werden und sowohl die Transportmechanismen des Endothels als auch die Organisation der tight junctions kontrollieren (Nassif *et al.*, 2002).

Die Blut-Hirn/Liquor-Schranke setzt sich aus der Blut-Hirn- sowie aus der Blut-Liquor-Schranke in den *Plexus choroidei* der vier Ventrikel zusammen. Sie besteht aus dem Endothel der zerebralen Kapillaren, der darunterliegenden Basalmembran sowie Perizyten und den Fortsätzen von Astrozyten, deren Endigungen eng aneinandergereiht an den Kapillaren der Hirngefäße liegen und die dritte und äußerste Schicht bilden (Goldstein und Betz, 1986; Rubin *et al.*, 1991; Kniesel und Wolburg, 2000; Huang *et al.*, 2001).

1.8.1. Glykoproteinrezeptoren

Adhäsionsrezeptoren vom Typ der heterodimeren Integrine oder membranassoziierte Proteoglykane sind auf allen Zellen des menschlichen Organismus vorhanden. Integrine stellen die größte und am besten charakterisierte Familie von Transmembranrezeptoren dar. Bisher konnten 24 verschiedene Integrine auf humanen Zellen identifiziert werden. Integrine binden adhäsive Glykoproteine über eine Arg-Gly-Asp (RGD)-Tripeptid-Sequenz (Pierschbacher und Ruoslahti, 1987). Morphologisch bestehen Integrine als Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit. Während von der β -Untereinheit nur wenige Varianten existieren, ist die α -Untereinheit besonders variabel und für die spezifischen Bindungseigenschaften einzelner Integrine verantwortlich. Die Integrin-Liganden-Bindung ist abhängig von extrazellulären divalenten Kationen (Ca^{2+} oder Mg^{2+}), die sowohl die Affinität als auch die Spezifität der Integrin-Liganden-Bindung beeinflussen (Alberts *et al.*, 1994). Integrine sind intrazellulär mit Zytoskelett-Molekülen, meist mit Aktinfilamenten, verbunden und nehmen Einfluß auf die Organisation des Zytoskeletts im Sinne einer Regulation von Adhärenz, Migration und Invasion der Zellen (Löffler/ Petrides, 1998).

1.8.2. Adhäsive Serumglykoproteine

Neben Kollagenen, Elastin und Proteoglykanen sind Glykoproteine wie Fibronectin, Vitronectin, Osteonectin, Tenascin und Thrombospondin Bestandteile der

extrazellulären Matrix. Sie besitzen einen kovalent gebundenen Kohlenhydratanteil aus Monosaccharidketten mit bis zu 7 verschiedenen, häufig verzweigten Zuckern und vermitteln einen Kontakt zu den im Bindegewebe eingelagerten Zellen.

Fibronectin ist ein großes multifunktionelles Glykoprotein, das in gelöster Form im Blutplasma sowie in der Extrazellularflüssigkeit vorliegt und in fibrillärer Form Bestandteil der zellulären Oberfläche und der Bindegewebsmatrix ist. Neben seiner Bedeutung für die Koagulation menschlichen Bluts durch Bindung von Fibrin besteht die primäre Funktion von Fibronectin in der Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität durch Vermittlung von Zell-Zell-Verbindungen und Zell-Migration (Hynes, 1990). Die dimeren Fibronectin-Moleküle bestehen aus zwei homologen, jedoch nicht identischen Polypeptidketten, die durch differentielles Spleißen von einem einzigen Gen hervorgebracht werden und über zwei Disulfidbrücken am Carboxyende miteinander verbunden sind. Ein Fibronectin-Polypeptid ist im Mittel etwa 2500 Aminosäuren lang. Jede der Polypeptidketten besteht aus drei verschiedenen Modulen, die als Typ I, II und III Repeats klassifiziert werden und u.a. für die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten des Fibronectins verantwortlich sind (Petersen *et al.*, 1983; Pierschbacher und Ruoslahti, 1984). Eine Arg-Gly-Asp (RGD)-Sequenz innerhalb der Typ III repeat Region vermittelt die direkte Bindung von Integrinen (Pierschbacher und Ruoslahti, 1984, 1987). Als extrazelluläres Matrixmolekül besitzt Fibronectin überdies Bindungsstellen für Fibrin (Hynes, 1990), Kollagen (Hahn und Yamaha, 1979) und Heparin (Barkalow und Schwarzbauer, 1991).

1.9. Die Pathogenese der eitrigen Meningokokken-Meningitis

Die Invasion der Meningen durch *N. meningitidis* ist Komplikation eines Eindringens der Erreger in die Blutzirkulation ausgehend von einer nasopharyngealen Kolonisation (Moxon und Ostrow, 1977). Das Gehirn ist infolge des Vorhandenseins nur weniger Abwehrzellen und Antikörper in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) und des weitgehenden Fehlens einer ständigen Infektabwehr besonders anfällig für bakterielle Infektionen. Dennoch ist nur eine begrenzte Anzahl an Pathogenen in der Lage, die Barriere des zerebralen Hirnendothels zu überwinden. Nach derzeitigem Modell wird die Adhäsion von *N. meningitidis* an das nasopharyngeale Schleimhautepithel als ein zweischrittiger, sequenzieller Prozeß beschrieben. Auf eine initiale, Pilus-vermittelte

Adhäsion (initial adhesion) an die Oberfläche der Zielzellen folgt vermutlich eine zweite, stärkere Adhäsion (intimate adhesion), während der die angelagerten Bakterien unter Vermittlung zusätzlicher Adhäsine in engen Kontakt mit der Oberfläche der Zielzellen treten (Dehio *et al.*, 2000). Zytoskelettveränderungen im Sinne einer lokalen Polymerisation kortikaler Aktinfilamente unter Vermittlung Cluster-bildender integraler Membranproteine resultieren in der Formation Mikrovilli-ähnlicher Strukturen (Merz *et al.*, 1999). Diese können elektronenmikroskopisch auf der Oberfläche infizierter Zellen nachgewiesen werden und scheinen für die Internalisierung der Bakterien verantwortlich zu sein (Eugéne *et al.*, 2002). Zur Passage der nasopharyngealen Schleimhaut tragen zudem die Induktion einer Ziliostase durch eine gesteigerte Freisetzung von TNF- α , Interleukin-(IL)-1 und IL-6 nach Monozytenstimulation sowie die Produktion von sIgA₁ durch Meningokokken bei, das einen protektiven Einfluß auf das Überleben der Bakterien auf der menschlichen Schleimhaut hat (Apicella, 1995). PilC1 konnte als bedeutende bakterielle Strukturkomponente der bakteriellen Adhäsion und nachfolgender Induktion Mikrovilli-ähnlicher Zellfortsätze beschrieben werden (Nassif *et al.*, 2002). Pili-tragende Meningokokken adhärieren signifikant stärker als isogene Pili-defiziente Mutanten an endotheliale Zellen (Virji *et al.*, 1991b). Unter Vermittlung des *pilC1* Gens sowie des Regulorgens *crgA* werden Pili jedoch während der Schleimhautpassage und des Eindringens in tieferliegende Gewebeschichten herunterreguliert (Taha *et al.*, 1998; Deghmane *et al.*, 2000, 2002). Es kann daher vermutet werden, dass weitere Oberflächenstrukturen von *N. meningitidis* eine entscheidende Rolle in der Interaktion der Bakterien mit dem menschlichen Wirtsorganismus spielen. Das Ausmaß einer Infektion durch *N. meningitidis* steht in direkter Korrelation zu der Höhe der Plasma- bzw. Liquorspiegel an Endotoxin. Foudroyante Verläufe einer invasiven Meningokokken-Erkrankung sind die Folge einer Überproduktion von TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8, die von dendritischen Zellen freigesetzt werden (van Deuren *et al.*, 1995; Leib und Tauber, 1999; Unkmeir *et al.*, 2002b). Daneben stellt die Aktivierung des Komplementsystems durch *N. meningitidis* einen wesentlichen Faktor in der Genese einer schwerwiegenden Meningokokken-Erkrankung dar. Foudroyante Verläufe gehen mit hohen Serumspiegeln der Anaphylatoxine C3a und C5a einher (Hazelzet *et al.*, 1994, 1998).

Die Passage der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke durch *N. meningitidis* ist ebenso wie die Frage nach dem genauen Eintrittsort in das ZNS bislang weitgehend

ungeklärt. Als primärer Angriffspunkt des Zusammenbruchs der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke gilt das mikrovaskuläre Hirnendothel (Townsend und Scheld, 1995; Huang *et al.*, 2001), für dessen Passage transzelluläre, parazelluläre und sog. „trojan horse“-Mechanismen diskutiert werden. Eine transzelluläre Invasion in den Liquorraum ist mit einer Transzytose der Erreger verbunden und konnte im Zellmodell mit bovinen Hirnendothelzellen (BMEC) für *E. coli* (Huang *et al.*, 2000), Gruppe B-Streptokokken (Nizet *et al.*, 1997), *Listeria monocytogenes* (Greiffenberg *et al.*, 1998), *Citrobacter freundii* (Badger *et al.*, 1999) und *Streptococcus pneumoniae* (Ring *et al.*, 1998) gezeigt werden. Eine parazelluläre Invasion macht eine Öffnung der tight junctions erforderlich, in deren Folge neuroinvasive Mikroorganismen wie *Borrelia burgdorferi* (Szcepaniski *et al.*, 1990; Comstock und Thomas, 1991) und *Treponema pallidum* (Haake und Lovett, 1994) durch Zell-Zell-Zwischenräume in die Zerebrospinalflüssigkeit gelangen. Neben der Öffnung von tight junctions werden eine Zunahme der pinozytotischen Aktivität der Zellen und die Ausbildung transendothelialer tunnel-ähnlicher Strukturen als Ursache einer erhöhten Permeabilität der Zell-Zell-Verbindungen diskutiert (de Vries *et al.*, 1997). Die Überwindung der Blut-Hirn/Liquor-Schranke durch Rekrutierung latent infizierter mononuklearer Zellen des peripheren Blutes im Sinne eines „trojan horse“-Mechanismus ist für das HI- und SI-Virus (human immunodeficiency virus, simian immunodeficiency virus) beschrieben (Erlander, 1995; Lane *et al.*, 1996). Für *N. meningitidis* gibt es bislang weder schlüssige Beweise einer para- noch einer transzellulären Passage der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke. Die ausgeprägte Phagozytose von *N. meningitidis* durch dendritische Zellen (Kolb-Mäurer *et al.*, 2001; Unkmeir *et al.*, 2002a) macht eine Passage innerhalb infizierter phagozytärer Zellen für Meningokokken unwahrscheinlich.

1.10. Problemstellung

Eine Meningokokken-Meningitis ist noch immer eine lebensbedrohliche Erkrankung, die bei Ausbleiben einer unverzüglichen antibiotischen Therapie nicht selten letal verläuft. *N. meningitidis* zeigt einen besonderen Tropismus zu den Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke, der in einer gesteigerten Adhärenz an das zerebrovaskuläre Endothel zum Ausdruck kommt. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Die Analyse essentieller Mechanismen der Interaktion bakterieller Meningitiserreger mit den Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke wurde bis vor wenigen Jahren durch das Fehlen eines geeigneten *in-vitro* Modells des okklusiven menschlichen Hirnendothels beeinträchtigt. Vergleichende Untersuchungen an Tieren sind nicht möglich, da Meningokokken ausschließlich humanpathogene Erreger sind. So wurden erste *in-vitro* Studien über die Pathogenese einer bakteriellen ZNS-Infektion unter Verwendung von Gefäßendothelzellen, v.a. HUVEC-Zellen, durchgeführt, denen jedoch wesentliche Charakteristika humaner zerebraler Endothelien fehlen (Townsend und Scheld, 1995). Für das Kapselpolysaccharid, Lipooligosaccharide, Pili und die Außenmembranproteine Opa und Opc wurde eine Beeinflussung der Adhärenz und Invasion von *N. meningitidis* an menschliche Zelllinien beschrieben (Achtman *et al.*, 1988; Woods und Cannon, 1990; Jonsson *et al.*, 1991; Pinner *et al.*, 1991; Virji *et al.*, 1991b; Achtman, 1995; Rudel *et al.*, 1995). Bislang ist nicht geklärt, ob und inwieweit die dargestellten Beobachtungen auf die Interaktion von *N. meningitidis* mit humanen zerebralen Endothelzellen übertragbar sind. Zur Beantwortung dieser Frage bedarf es der Etablierung eines *in-vitro*-Modells menschlicher Hirnendothelzellen. Von der Arbeitsgruppe um Dr. A. Schubert-Unkmeir (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg) wurde unter Verwendung von HBMEC-Zellen ein *in-vitro*-Modell implementiert, das erstmals Untersuchungen zur Interaktion zwischen bakteriellen Meningitiserregern und den Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke ermöglicht (Stins *et al.*, 1997, 2001; Unkmeir *et al.*, 2002a).

1.11. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, unter Verwendung von HBMEC-Zellen als etabliertem Zellkulturmodell essentielle bakterielle bzw. endotheliale Strukturen zu identifizieren, die eine Interaktion von *N. meningitidis* mit den Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke und den Übertritt der Bakterien in den Liquorraum ermöglichen. Es sollte untersucht werden, ob und inwieweit die Beobachtungen der Interaktion von Meningokokken mit HUVEC-Zellen auf die Interaktion mit HBMEC-Zellen übertragbar sind. In Infektionsversuchen mit repräsentativen Vertretern der hochvirulenten klonalen Linien ST-1, ST-32 und ST-11 (Vogel *et al.*, 1999; Claus *et al.*, 2001) sollte die Interaktion bekapselter und unbekapselter Meningokokken-Mutanten mit dem Endothel der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke untersucht werden. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine fehlende Kapselexpression die Invasion von Serogruppe B Meningokokken in humane epitheliale Zellen begünstigt (Hammerschmidt *et al.*, 1996a,b; Hilse *et al.*, 2000). Darüberhinaus sind Bestandteile der bakteriellen Membran wie Opa, Opc und PilC als wesentliche Pathogenitätsfaktoren der Adhärenz und Invasion von *N. meningitidis* in endotheliale HUVEC-Zellen und humane Epithelzellen beschrieben (Virji *et al.*, 1994, 1999; Pron *et al.*, 1997). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in Infektionsversuchen mit kapsel- und *opc* defizienten *N. meningitidis* Mutanten die Bedeutung des Außenmembranproteins Opc und des Kapselpolysaccharids für deren Interaktion mit HBMEC-Zellen zu analysieren. Die eingesetzten Hirnendothelzellen sollten mittels Western Blot und Durchflußzytometrie bezüglich ihrer Integrinrezeptor-Expression untersucht werden. Unter Verwendung mono- und polyklonaler Antikörper gegen Epitope bekannter Integrine humaner Epi- und Endothelzellen und durch Blockade essentieller Bindungsmotive von Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs) sollten Rezeptoren auf HBMEC-Zellen identifiziert werden, die eine Invasion von *N. meningitidis* in das Hirnendothel ermöglichen. Um herauszufinden, inwieweit einzelne Bestandteile humanen Serums die Interaktion von Meningokokken mit den Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke beeinflussen, sollte der Einfluß unterschiedlicher Inkubationsmedien auf die Adhärenz und Invasion ausgewählter Isolate von *N. meningitidis* in HBMEC-Zellen untersucht werden. Die Bedeutung des Zytoskeletts bzw. einer intakten Zytoskelettfunktion für die Invasion von Meningokokken in HBMEC-Zellen sollte durch Inhibitionsstudien analysiert werden.

2. Eigene Untersuchungen

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Für die Untersuchungen wurden folgende Geräte eingesetzt:

- Blotkammern (Biometra, Göttingen)
- Spannungsgeräte Standard Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)
- Photometer U2000 (Hitachi)
- Schüttelinkubator KS 10 (Bühler, Tübingen)
- Thermovac Speed Vac Plus SC 110A (Savant, Farmingdale)
- Vortexer Reax 2000 (Heidolph Elektro KG)
- Fluoreszenz-Mikroskop Zeiss LSM 510 (Zeiss, Jena)
- FFQ SepharoseTM high performance (Amersham Pharmacia)
- FACSscan (Becton Dickinson)
- Software/ Durchflußzytometrie (Cellquest Software)
- Neubauer-Zählkammer (Brand)

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Für Zellkultur und Infektionsversuche wurden folgende Gefäße und Materialien verwendet:

- 15ml- und 50ml-Greiner Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)
- 0,5ml-, 1,5ml- und 2ml-Eppendorf-Gefäße (Eppendorf, Hamburg)
- 10ml- und 50ml-Pipetten (Costar, Corning, USA)
- Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht)
- Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden)
- Transwell-24-Platten (Nunc, Wiesbaden)

Material und Methoden

- Filter und Membranen (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Objektträger 76x26 mm/ 3x1inch (Knittel)
- Deckgläschen 24x24mm rund (Superior)
- Nitrozellulose Protran BA85 0,45µm, 70x10mm (Schleicher & Schüssel, Dassel)

2.1.3. Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Enzyme eingesetzt:

- Proteinase (Roche, Mannheim)
- Alkalische Phosphatase (Roche, Mannheim)
- Trypsin EDTA (Gibco, Karlsruhe)
- Heparinase III (Sigma, Taufkirchen)

2.1.4. Chemikalien und Reaktionskits

Für DNA-Isolation, Western Blot und Silberfärbung wurden die nachfolgenden Chemikalien und Reaktionskits verwendet:

- QIAmp DNA Mini Kit, Kit-No.51306 (Quiagen, Düsseldorf)
- Prestained Protein Ladder (Gibco, Karlsruhe)
- 1kb DNA Ladder (Promega,USA)
- Taq Polymerase (Roche, Mannheim)
- Agarose NEEO Rotigagarose[®] (Roth, Karlsruhe)
- TAE 242g Tris (Roth, Karlsruhe)
- 57,1ml Essigsäure 100% (Merck, Darmstadt)
- 100ml 0,5M EDTA pH8 (Appllichem GmbH, Darmstadt)
- ad aqua dest (Fresenius, Bad Homburg)
- Smart Ladder (Eurogentec)
- Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt)
- Sodiumdodecylsulfat (SDS)

Material und Methoden

- Lower Tris 90,85g Tris
in 400ml aqua dest,
mit HCl ad pH 8,8
10ml SDS 20%
ad 500ml aqua dest
- Upper Tris 30,0g Tris
in 400ml aqua dest,
mit HCl ad pH 6,8
10ml SDS 20%
ad 500ml aqua dest
- Polyacrylamid 30% (Roth, Karlsruhe)
- Temed p.a. 99% - C₆H₁₆N₂ (Roth, Karlsruhe)
- Ammoniumpersulfat (APS) (Applichem GmbH)
- Ponceau-Rot (Sigma, Taufkirchen)
- Gibco Prestained Protein Ladder 2x250µl (Invitrogen, Paisley, GB)
- Biorad-Marker (Biorad, München)
- Waschpuffer PBS Dulbeco instamed (Biochrom, Berlin)
0,1% Tween-20 (Merck, Darmstadt)
- Blockpuffer Waschpuffer mit 1% MM (Applichem GmbH)
- Substrat 18ml 0,1M TrisHCl pH 9,6
2ml NBT – (Applichem GmbH)
200µl BCIP – (Applichem GmbH)
40µl MgCl₂ (Merck, Darmstadt)
Bovines Serum Albumin (Applichem GmbH)
- Methanol (Merck, Darmstadt)
- Blotpuffer 10x Stock, 30g Tris
144g Glycin
in 1l aqua dest.
- Laufpuffer 700ml aqua dest
200ml Methanol
100ml 10x Stock

Material und Methoden

- FACS-Puffer 1xPBS pH 7,4
1% FCS
0,05% Azid (Merck, Darmstadt)
0,2µm-steril-filtriert
- Fixierung 3% Paraformaldehyd/PBS
3g Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)
80ml PBS pH 7,4
10N NaOH
ad 100ml 1xPBS
0,2µm-steril-filtriert

2.1.5. Nährmedien

- GC-Agar: 1,5% Proteose-Pepton
0,1% Stärke
0,45 K-Phosphat
0,5% NaCl
15-Bacto-Agar, pH 7,2
- PPM: 1,5% Proteose-Pepton
0,5% NaCl
0,05% Stärke
0,4% KH₂PO₄
0,1% KH₂PO₄, pH 7,8
- PPM⁺-Medium: 50ml PPM
250µl 2M MgCl₂
250µl 8,4% NaHCO₃
500µl Polyvitex (bio Merieux, Frankreich)
- HBMEC-Medium RPMI 1640 (Biochrom, Berlin)
10% Nu-Serum (Bacton Dickinson, Bedford, MA)
10% FCS (Biochrom, Berlin)
1% MEM-Vitamines (Biochrom, Berlin)
1% L-Glutamin (Biochrom, Berlin)

Material und Methoden

1% Na-Pyruvat	(Biochrom, Berlin)
100µl Heparin (5U/ml ⁻¹)	(Biochrom, Berlin)
100µl ECGS	(Cell systems)

2.1.6. Zusätze

- Antibiotika:
Gentamicin 10mg/ml in 50ml RPMI (Biochrom)
Penicillin/ Streptomycin (Biochrom)
10 000U/10 000µg/ml
- Saponin rein (SERVA Elektrophoresis GmbH)
- Gelatine – Gelatin research grade (SERVA Feinbiochemica GmbH)
- Humanes Serum (Eigenherstellung)
- Fibronektin Human Plasma Fibronectin (ICN Biochemicals GmbH)
Human Plasma Fibronectin (Chemicon, Temecula, USA)
Bovine Fibronectin (Biotrend, Deutschland)
- HeparinaseIII (Sigma, Taufkirchen)
- Heparansulfat (Sigma, Taufkirchen)
- Heparin – Heparin sodium salt solution (ICN Biochemicals GmbH)
- Albumin – Albumin, Humanes Serum (Calbiochem)

2.1.7. Antikörper

- Anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptor-Ak LM609, (Biogenesis, Poole, GB)
polyklonal
- Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor-Ak AB1950, (Chemicon, Temecula, USA)
polyklonal
- Anti- β_1 -Integrinrezeptor-Ak MAB2253Z, (Chemicon, Temecula, USA)
monoklonal
- Anti- α_v -Integrinrezeptor-Ak MAB1980, (Chemicon, Temecula, USA)
monoklonal

Material und Methoden

- Anti- α_5 -Integrinrezeptor-Ak MAB1986, (Chemicon, Temecula, USA)
monoklonal
- Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor-Ak HA05, (Chemicon, Temecula, USA)
monoklonal
- Unspezifischer Kontroll-Ak AB1950 (Chemicon, Temecula, USA)
- Rabbit-IgG gegen Meningokokken-OMP, (Eigenherstellung)
polyklonal
- TRITC-markierter Anti-mouse-Ak (Dianova GmbH)
- FITC-markierter Anti-mouse-Ak (Dianova GmbH)
- Anti-Vitronektin-Ak Klon BE10, (ICN Biochemicals GmbH)
monoklonal
- Anti-Fibronektin-Ak, polyklonal (ICN Biochemicals GmbH)
- Rabbit Anti-Thrombospondin-Ak, (ICN Biochemicals GmbH)
polyklonal
- Goat-anti-humanes Fibrinogen-Antiserum (ICN Biochemicals GmbH)
- Anti-Tenascin-Ak, monoklonal (ICN Biochemicals GmbH)

2.1.8. Zytoskeletthinhibitoren

- Colchizin (SERVA Feinbiochemica GmbH)
- Cytochalasin D (SERVA Feinbiochemica GmbH)

2.1.9. Zellen

HBMEC-Zellen:

HBMEC-Zellen (human brain microvascular endothelial cells) wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Kwang Sik Kim und Dr. M. Stins (John Hopkins University, Baltimore, USA) aus dem Gehirn einer jungen, an Epilepsie erkrankten Frau isoliert, kultiviert, immortalisiert und hinsichtlich ihrer morphologischen Charakteristika bzw. der Expression von Adhäsionsmolekülen charakterisiert (Stins *et al.*, 1997; 2001). HBMEC-Zellen zeigen spezifische Charakteristika zerebraler endothelialer Zellen, u.a. eine positive Reaktion gegenüber Faktor VIII-Rag-von Willebrand-Antigen (Jaffe *et al.*, 1973), Carboanhydrase IV (Goetz *et al.*, 1985; Gordon *et al.*, 1991; Fleming *et al.*, 1993) und Ulex Europeus Agglutinin I. Sie sind Gammaglutamyltransferase-positiv (GGT) und reichern Fluoreszenz-markierte acetylierte Low Density Lipoproteine (LDL) an. Eine für makrovaskuläre Zelllinien wie HUVEC-Zellen charakteristische Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1 und ELAM-1 nach TNF- α -Stimulation konnte für HBMEC-Zellen nur in geringen Mengen beobachtet werden (Stins *et al.*, 1997). Um die Expression spezifischer Endothelzellcharakteristika unverändert bis mindestens Zellpassage 30 gewährleisten zu können, wurden die isolierten HBMEC-Zellen durch Infektion mit SV40 T-large Antigen (simian 40 large T-antigen) in einer frühen Zellpassage immortalisiert. HBMEC-Zellen sind ein etabliertes *in-vitro* Modell der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke (Nizet *et al.*, 1997; Stins *et al.*, 2001).

Hep2-Zellen:

Hep2-Zellen (human laryngeal epithelial cells) sind immortalisierte Larynx-Carcinom-Zellen (ATCC CCL23). Sie stellen ein etabliertes humanes Epithelzell-Modell dar (Molinari *et al.*, 1997).

2.1.10. Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden *N. meningitidis* Isolate der hypervirulenten klonalen Linien ST-1, ST-11 und ST-32 in Infektionsversuchen mit HBMEC-Zellen analysiert. Als Vertreter des ST-32 Komplexes (ehemals ET-5) wurde der Serogruppe B Stamm MC58, Immunotyp B15:P1.7,16b, ausgewählt, der 1981/82 in Großbritannien isoliert und durch E. R. Moxon zur Verfügung gestellt wurde. Der Wildtypstamm MC58 wurde durch gezielte Punktmutationen im Polycytidinstretch des *siaD* Gens derart modifiziert, dass eine konstante Expression des Kapselpolysaccharids der Mutante MC58* resultierte (Hammerschmidt *et al.*, 1996b). Die Generierung der isogenen kapseldefizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* gelang durch Insertion eines Antibiotikaresistenzgens mit nachfolgender Inaktivierung des *siaD* Gens (Mühlhardt, 2003). Die *opc* defiziente Mutante MC58* *opc* konnte durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette in das Meningokokken-Plasmid pEWOp1, das die gesamte *opc* Sequenz enthält, generiert werden. Das entstandene Plasmid pEWOp2a wurde in MC58* *opc* transformiert, und eine Selektion transformierter Isolate auf Kanamycin-GC-Agarplatten durchgeführt.

Als Isolat der hypervirulenten Linie ST-11 (ehemals ET-37) wurde in der vorliegenden Arbeit der *N. meningitidis* Serogruppe C Stamm C2120, Serotyp C:NT,P1.2,P1.5, ausgewählt (Claus *et al.*, 2003), der 1997 in Würzburg aus der Blutkultur einer 18jährigen Patientin gewonnen wurde (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg). ST-11 Isolate sind aufgrund des Fehlens des *opc* Gens nicht in der Lage, das Meningokokken-Außenmembranprotein Opc zu exprimieren (Sarkari *et al.*, 1994; Seiler *et al.*, 1996). Die Herstellung der kapseldefizienten Mutante C2120 *siaD* gelang entsprechend der Generierung der MC58 *siaD* Mutante durch Inaktivierung des *siaD* Gens.

Bei dem in der vorliegenden Arbeit analysierten Serogruppe A Stamm A2044 handelt es sich um einen Vertreter des ST-1 Komplexes (Subgruppe I/II), Immunotyp L3,7,9, der 1983 in der damaligen DDR isoliert und durch U. Berger zur Verfügung gestellt wurde (Institut für Hygiene, Universität Heidelberg). Die kapseldefiziente Mutante A2044 *cps* wurde durch Deletion des gesamten *cps* Locus generiert. Ein 18,5kb großes *EcoRV* Fragment wurde durch ein Erythromycin-Resistenzgen ersetzt (Frosch *et al.*, 1990). Neben dem Verlust der Kapselexpression resultierte diese Mutation in der Deletion des *galE* Gens mit konsekutiver Expression eines verkürzten LOS.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur der HBMEC-Zellen

Die HBMEC-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium unter Zugabe von 10%igem fetalen Kälberserum, 10%igem Nu-Serum IV, Vitaminen (1%), nicht essentiellen Aminosäuren (1%), Natriumpyruvat (1mM), L-Glutamin (2mM), Heparin (5U ml⁻¹) und Wachstumsfaktoren (ECGF, 30µg ml⁻¹) in mit 2%iger Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen kultiviert. Bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen in feuchter Atmosphäre inkubiert.

2.2.1.1. Auftauen der Zellen

Die bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagerten HBMEC-Zellen wurden in einem auf 37°C erhitzten Wasserbad schnell und gleichmäßig aufgetaut und anschließend zu 2ml vorgelegtem FCS pipettiert. Zur Neutralisation des Einfriermediums (DMSO) wurden die Zellen in 5-6ml HBMEC-Medium überführt und anschließend 10min. bei 1350rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in etwa 9ml HBMEC-Medium mit Pen/Strep (1%) resuspendiert und auf 25cm² gelatinebeschichtete Zellkulturflaschen verteilt. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ in feuchter Atmosphäre bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens 2-3 Tage inkubiert.

2.2.1.2. Splitten der Zellen

Nach Abnahme des HBMEC-Mediums wurden die konfluenten Zellen durch Zugabe von etwa 1ml Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Das verbliebene Trypsin/EDTA wurde durch Zugabe von 5ml RPMI 1640 Medium/10% FCS verdünnt. Die abgelösten Zellen wurden 10 min bei 1350rpm zentrifugiert, das Medium wurde dekantiert, und die Zellen in 5ml HBMEC-Medium resuspendiert.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in der Neubauer-Zählkammer, bevor die Zellen im Verhältnis 1:3 auf neue gelatinebeschichtete Zellkulturflaschen verteilt und wie oben inkubiert wurden.

Für die Infektionsversuche wurden ausschließlich HBMEC-Zellen bis zur 22./23. Passage verwendet, da für ältere Zellen keine konstante Expression ihre Oberflächenmarker gewährleistet ist.

2.1.2.3. Einfrieren der Zellen

HBMEC-Zellen jüngerer Passagen, die für die Konservierung in flüssigem Stickstoff bestimmt waren, wurden in Kryo-Röhrchen überführt und bei 4°C 1-2 Stunden gekühlt. Nach Zugabe von 900µl Einfriermedium folgte das Herunterkühlen auf -80°C, bis die Zellen nach weiteren 1-2 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196°C gelagert werden konnten.

2.2.1.4. Aussäen von HBMEC-Zellen für die Infektionsversuche

Nach Ablösung des konfluenten Zellrasens durch Trypsin/EDTA verblieben die Zellkulturflaschen erneut unter Inkubationsbedingungen im Brutschrank, bis nach 5-10min. bereits mit bloßem Auge erkennbar war, dass sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Mittels Pasteurpipette wurden die Zellen in 15ml-Greiner-Röhrchen mit 5ml vorgelegtem HBMEC-Medium überführt und 5min. bei 1350rpm zentrifugiert. Nach Resuspension der Zellen in ca. 5ml HBMEC-Medium wurde die Zellzahl der Suspension mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die HBMEC-Zellen wurden mit einer Dichte 5×10^4 Zellen ml⁻¹/Vertiefung in die gelatinebeschichteten Vertiefungen einer Transwellplatte eingebracht. Nach 2-3 Tagen lag ein konfluenter Monolayer mit etwa 1×10^5 Zellen/Vertiefung vor.

2.2.2. Kultivierung von Hep2-Zellen

Zur Kultivierung der Hep2-Zellen wurde RPMI 1640 Medium unter Zugabe von fetalem Kälberserum (FCS) im Verhältnis 1:10 verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in 25cm² Zellkulturflaschen inkubiert. Die Zellkulturflaschen wurden nicht gelatinebeschichtet.

2.2.3. Bakterienanzucht

Bakterien der oben beschriebenen klonalen Linien wurden aus der Gefrierkultur (-80°C) entnommen, auf GC-Agar fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Pro Isolat wurden jeweils die 2. und 3. Fraktion in 20ml supplementiertes PPM (PPM+-Medium) überführt und ca. 1-2h bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,8-1 im Schüttelinkubator bebrütet. Die Bestimmung der Bakterienzahl erfolgte durch Ermittlung der optischen Dichte eines 100µl-Aliquots der Suspension bei 600nm (OD_{600nm}). Einer OD_{600nm} von 1 entsprechen etwa 1×10^9 Bakterien ml^{-1} . Die eingesetzte Bakterienzahl betrug in den der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Infektionsversuchen jeweils 1×10^6 Bakterien/Vertiefung (~10 Bakterien/Zelle).

2.2.4. Durchführung der Infektionsversuche

Der konfluente HBMEC-Zellrasen wurde in den Transwell-Vertiefungen dreimal mit RPMI 1640 Medium gewaschen, um Reste des HBMEC Mediums vollständig zu entfernen. Die in Flüssigkultur angezüchteten Bakterien wurden in RPMI-Medium, 10%igem fetalen Kälberserum sowie 10%igem humanen Serum gelöst. Entsprechend einer MOI (multiplicity of infection) von 10 wurden anschließend 1×10^5 HBMEC-Zellen mit 1×10^6 Bakterien infiziert, und die infizierten Zellen bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach 2h, 4h, 6h, bzw. 8h erfolgte die Bestimmung der Anzahl adhärenter, extrazellulärer und invasiver, intrazellulärer Meningokokken in Gentamicin-Protektions-Assays. Als Aminoglykosid-Antibiotikum vermag Gentamicin nicht in eukaryotische Zellen einzudringen und tötet lediglich extrazellulär befindliche Bakterien ab. Humanes oder bovines Serum wurde vor Zugabe routinemäßig 30 min bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert.

2.2.4.1. Bestimmung der Anzahl adhärenter Meningokokken

Nach Inkubation und Abnahme des Mediums wurden die HBMEC-Zellen dreimal mit RPMI 1640 Medium gewaschen. Die Bestimmung der Anzahl adhärenter Bakterien erfolgte durch 10 min Lyse der Zellen mittels 1% Saponin, Ausplattieren geeigneter Aliquote des jeweiligen Lysats auf GC-Agar und Auszählen der Kolonie-bildenden

Einheiten (KBE) nach Übernachtinkubation bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Es wurden stets Doppelwerte erhoben und die Versuchsergebnisse mindestens dreimal reproduziert.

2.2.4.2. Bestimmung der Anzahl invasiver Meningokokken

Die Anzahl intrazellulärer Bakterien wurde nach zweistündiger Inkubation mit Gentamicin-Lösung (200µg ml⁻¹ gelöst in RPMI 1640 Medium) und anschließender zehnminütiger Lyse unter Zugabe von 1% Saponin bestimmt. Jeweils 100µl-Aliquote einer 1:10- bzw. 1:100-Verdünnung wurden ausplattiert und die KBE bestimmt.

2.2.5. Zugabe von Serumfraktionen

Die Separation humanen Serums erfolgte mit Hilfe der Säulenchromatographie unter Verwendung eines Anionenaustauschers sowie unter Zuhilfenahme der Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC). Die Serumfraktionen wurden gepoolt, und ihr Proteingehalt photometrisch bestimmt. Schließlich wurden die einzelnen Fraktionen elektrophoretisch aufgetrennt, und die Bandenmuster durch Silberfärbung dargestellt. Zur Durchführung der Infektionsversuche wurden die separierten Fraktionen 30min. bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert, um eine Komplement-vermittelte Bakteriolyse während der Versuche ausschließen zu können. Die Fraktionen wurden im Verhältnis 1:10 in RPMI 1640 Medium gelöst, und die zu untersuchenden Bakterienstämme in der gewünschten Dichte zugegeben. Pro Plattenvertiefung wurde 1ml der Bakteriensuspension pipettiert.

2.2.6. Zugabe inhibierender Antikörper

Im Rahmen der Infektionsversuche wurden folgende Antikörper verwendet:

- Anti- $\alpha_v\beta_3$ –Integrinrezeptor-Ak, polyklonal
- Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor-Ak, polyklonal
- Anti- β_1 -Integrin-Ak MAB2253Z, monoklonal
- Anti- α_v -Integrin-Ak MAB1980, monoklonal
- Anti- α_5 - Integrin-Ak MAB1986, monoklonal

Die Antikörper wurden in Konzentrationen von $1\mu\text{g ml}^{-1}$, $5\mu\text{g ml}^{-1}$ und $7,5\mu\text{g ml}^{-1}$ bzw. $10\mu\text{g ml}^{-1}$ in 10%igem, hitzeinaktivierten humanen Serum gelöst. Nach dreimaligem Waschen mit RPMI 1640 Medium erfolgte eine 15minütige Präinkubation der konfluenten HBMEC-Zellen mit dem jeweiligen Antikörper. Um eine Antikörperbedingte Ablösung des Zellrasens zu verhindern, wurden die Infektionsversuche über einen maximalen Zeitraum von 5h durchgeführt, und die Zellmorphologie im Verlauf der Infektionsversuche in stündlichen mikroskopischen Kontrollen überprüft.

2.2.7. Zugabe von Zytoskeletthinhibitoren

Folgende Zytoskeletthinhibitoren wurden in den Infektionsversuchen eingesetzt:

- Colchizin, Inhibitor der Mikrotubuli-Polymerisation
- Cytochalasin D, Inhibitor der Mikrofilament -Aggregation

Nach dreimaligem Waschen mit RPMI 1640 Medium erfolgte eine 30min. Präinkubation der eingesetzten HBMEC-Zellen mit dem jeweiligen Zytoskeletthinhibitor bei 37°C und 5% CO_2 in feuchter Atmosphäre. Cytochalasin D wurde in Konzentrationen von $0,1\mu\text{g ml}^{-1}$, $0,25\mu\text{g ml}^{-1}$ und $0,5\mu\text{g ml}^{-1}$ in 10%igem humanen Serum gelöst, Cochizin in Konzentrationen von $10\mu\text{g ml}^{-1}$, $20\mu\text{g ml}^{-1}$ und $40\mu\text{g ml}^{-1}$.

2.2.8. Durchflußzytometrie

Konfluenten HBMEC-Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 bis 5×10^5 Zellen/Vertiefung wurden mit FACS-Puffer überschichtet und 5min. bei 1450rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgeklopft, und die Zellen in $200\mu\text{l}$ FACS-Puffer resuspendiert, danach erneut zentrifugiert. Nach Resuspension von 1×10^6 Zellen/well in $200\mu\text{l}$ in PBS mit 1%FCS wurden die Zellen 45 min bei 4°C mit dem ersten Antikörper inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBS/0,1%FCS, vorsichtiges Zentrifugieren, die Resuspension der Zellen und eine 45minütige Inkubation mit dem zweiten, FITC-markierten Antikörper (1:100). Nach erneutem Waschen wurden die HBMEC-Zellen in 1% Paraformaldehyd fixiert, in $200\mu\text{l}$ PBS aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt. Die Analyse der Bindung von FITC-markierten Antikörpern zur Darstellung der durch die Zellen exprimierten Integrine erfolgte mit Hilfe des FACScan unter Verwendung der Cellquest Software.

2.2.9. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation erlaubt die vollständige Depletion einzelner Proteine aus Gesamtlysaten. Hierfür werden Antikörper, die spezifisch gegen das gewünschte Protein gerichtet sind, an eine lösliche, inerte Trägersubstanz, wie z.B. Protein-G-Sepharose, gekoppelt. Der F_c -Teil des Antikörpers koppelt an Protein G, das seinerseits kovalent mit der Sepharose verbunden ist. Nach Inkubation und Bindung des Antikörpers an das Zielprotein erfolgt durch Abzentrifugieren die gezielte Depletion des Proteins.

Am Vortag der Infektion wurde ein 1ml-Ansatz der zu depletierenden Fraktion aus $250\mu\text{l}$ der Fraktion, $560\mu\text{l}$ Ampuwa und $100\mu\text{l}$ des spezifischen Antikörpers hergestellt. Nach Übernachtinkubation bei 4°C wurden $20\mu\text{l}$ Protein-G-Sepharose zupipettiert. Das Gemisch wurde dreimal vorsichtig je 1 min bei 1000rpm gevortext und schließlich mindestens 20min. bei 4°C kälteinkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, und das verbliebene Lysat über einen Zeitraum von ca. 2h auf etwa $300\text{-}400\mu\text{l}$ eingedampft. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt, um unerwünschte Enzymaktivitäten und einen proteolytischen Abbau zu verhindern. Die vollständige Depletion des jeweiligen Proteins wurde anschließend im Western Blot überprüft.

2.2.10. Doppelimmunfluoreszenz

Für Infektionsversuche mit Immunfluoreszenzfärbung wurden die HBMEC-Zellen in spezielle, zuvor mit sterilen Deckgläschen versehene, gelatinebeschichtete Vertiefungen einer Transwellplatte ausgesät, um den HBMEC-Zellrasen später leichter überführen zu können. Die Infektionsversuche wurden unter Verwendung der zu analysierenden Bakterienstämme wie beschrieben angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 3h wurden die Vertiefungen jeweils dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Der 1. Antikörper (Anti-rabbit IgG gegen *N. meningitidis* OMP) wurde in einer 1:100-Verdünnung in sterilem PBS vorsichtig in die Vertiefungen pipettiert, und die Transwellplatten 1h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die 30minütige Fixation der Antikörperbindung bei Raumtemperatur durch Zugabe von 300µl Fixationslösung. Es folgte die Permeabilisierung der Zellwand durch Zugabe von 300µl 0,1%igem Triton X-100 bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen mit sterilem PBS wurden 300µl des TRITC-markierten 2. Antikörper (Anti-rabbit IgG) zupipettiert, der diejenigen Meningokokken fluoreszenzmarkiert, die vor der Permeabilisierung an die HBMEC-Zellen adhärirten. Nach 40 min Inkubation bei 37°C und zweimaligem Waschen mit sterilem PBS folgte eine erneute Inkubation mit dem 1. Antikörper, um die invasiven Bakterien zu opsonisieren und durch 40minütige Inkubation mit dem FITC-markierten 2. Antikörper im Fluoreszenzlicht darzustellen. Nach Waschen des Monolayers mit PBS wurden die Deckgläschen vorsichtig aus den Transwellvertiefungen entnommen und in 1-2 Tropfen Eindeckmedium auf entsprechend beschriftete Objektträger überführt. Die adhärenen bzw. invasiven Meningokokken wurden fluoreszenzmikroskopiert und fotografiert.

2.2.11. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Serumproteinen sowie der Außenmembranproteine von *N. meningitidis* erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE. Das Trenngel wurde gegossen und zur Begradigung mit Butanol überschichtet. Nach Auspolymerisation des Trenngels wurde das Butanol vorsichtig entfernt und das Sammelgel aufgetragen. Die Probenkämme wurden in das noch flüssige Gel eingesetzt, dessen Polymerisation weitere 30 min benötigte. Die Gelkammern wurden mit SDS-Elektrophorese-Puffer

gefüllt, und Luftblasen mit einer feinkanuligen Spritze entfernt. Zur Auftrennung der Proteine wurde initial eine Spannung von 10mA pro Gel gewählt, bis sich der aufgetragene Marker darstellte. Die Elektrophorese wurde dann mit 20mA pro Gel bis zum Ende fortgeführt.

2.2.12. Western Blot

Das Elektrophorese-Gel wurde vorsichtig aus der Elektrophoresekammer ausgespannt, Trenngel und Glasplatten entfernt und der zu blottende Bereich ausgeschnitten. Schwämme, Filterpapiere sowie die Nitrocellulosemembran wurden in Laufpuffer getränkt und in folgender Reihenfolge auf die schwarze Seite des Blotting-Rahmens geschichtet:

- Schwamm
- Whatman-Papier
- Gel
- Nitrocellulose
- Whatman-Papier
- Schwamm

Das Gel wurde zentriert auf die Nitrocellulosefolie aufgelegt und vorhandene Luftblasen vorsichtig herausgestrichen. Anschließend wurde der Rahmen gut verschlossen und gemeinsam mit einem Kühl-Element in die mit Laufpuffer gefüllte Blotkammer eingesetzt. Bei einer Spannung von 300mA wurde 1h geblottet. Die transferierten Proteinbanden konnten im Anschluß durch Absättigung freier Bindungsstellen mit Blockpuffer und 1h Inkubation mit einer spezifischen Antikörper-Lösung unter kontinuierlicher Bewegung selektiv dargestellt werden. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS/ 0,1% Tween20 erfolgte bei Raumtemperatur für 1½h die Inkubation mit dem 2. Antikörper, einem mit alkalischer Phosphatase-markierten Anti-mouse-Antikörper. Nach zweimaligem Waschen wurde das Substrat zugegeben. Indikator einer spezifischen Bindung des Antikörpers war ein entsprechender Farbumschlag.

2.1.13. Silberfärbung

Ein bei Raumtemperatur übernachtfixiertes Protein-Gelelektrophorese-Gel wurde nach dreimaligem Waschen mit 30% Ethanol 1 min mit Natriumthiosulfat/Formaldehyd-Lösung imprägniert. Nach dreimaligem Spülen mit Ampuwa für etwa 1min. wurde das Gel 40min. in der Silberfärbelösung belassen. Es folgten zwei kurze Waschschritte von etwa 30sec. mit Ampuwa und schließlich die Zugabe der Reduktionslösung. Das Gel verblieb so lange in der Lösung, bis die Banden deutlich hervortraten. Die Reaktion wurde durch Waschen mit Ampuwa und Zugabe von 7% iger Essigsäure beendet.

2.2.14. Chromatographische Methoden

Der Begriff Chromatographie bezeichnet eine physikalische Methode zur Separation eines Stoffgemisches durch (I) unterschiedliche Verteilung der anteiligen Stoffe zwischen einer ruhenden (stationären) und einer sich bewegenden (mobilen) Phase oder durch (II) unterschiedliche Adsorption an eine stationäre Phase. Ein chromatographisches System besteht aus zwei nicht miteinander mischbaren Phasen, von denen eine sich an der anderen vorbeibewegt und den Transport der Probe bzw. der getrennten Substanzen durch das System vollzieht.

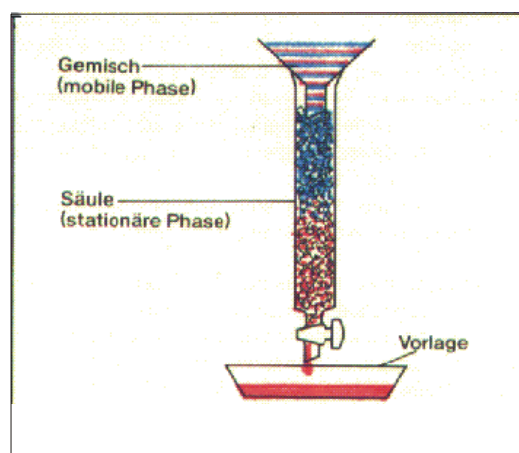


Abb. 1: Schematische Darstellung des Prinzips der Säulenchromatographie.

2.2.14.1 Säulenchromatographie

Mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie können nahezu alle Formen geladener Moleküle separiert werden; großmolekulare Proteine ebenso wie niedermolekulare Nukleotide oder Aminosäuren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 2ml humanes Serum in eine PD10-Säule eingefüllt, die zuvor mit 2,7mM KCl, 0,4mM MgSO₄ und 0,55mM Na₂HPO₄ (Pufferlösung A) äquilibriert worden war. Nach Elution der Serumproteine mit Hilfe der Pufferlösung in einer 1:20-Verdünnung erfolgte die Auftrennung des Serums unter Verwendung von FFQ SepharoseTM high performance und unter Ausnutzung eines Salzgradienten von 0 bis 1000mM NaCl in 10 unterschiedliche Fraktionen.

2.2.14.2. Fast Performance Liquid Chromatographie (FPLC)

Die Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) ist eine Form der Säulenchromatographie, bei welcher durch Einsatz computergesteuerter Pumpen eine konstante Flussrate der flüssigen Phase sichergestellt wird. Auf diese Weise ist es möglich, das jeweilige Eluat feiner und differenzierter zu fraktionieren, als dies in der gewöhnlichen Säulenchromatographie gelingt.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Separation humanen Serums mit Hilfe einer Säule der Größe 3x2,6cm und einer Flussrate von 1ml min⁻¹. Die Proteine wurden durch einen linearen 30ml-Salzgradienten (0-1000mM NaCl in Puffer A) eluiert, wobei 1ml-Fraktionen gewonnen wurden. Jeweils 4-5 Fraktionen wurden gepoolt und bei 4°C aufbewahrt. Die FPLC-Separierung erfolgte durch die Arbeitsgruppe um Dr. Schwender im Institut für klinische Biochemie der Universität Würzburg.

3. Ergebnisse

3.1. Interaktion von Meningokokken unterschiedlicher klonaler Linien mit HBMEC-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden *N. meningitidis* Isolate der Serogruppen A, B und C als repräsentative Vertreter der hochvirulenten klonalen Linien ST-1, ST-32 und ST-11 (Vogel *et al.*, 1999; Claus *et al.*, 2001) ausgewählt, um den Tropismus von Meningokokken zu den Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke zu untersuchen. Unter Verwendung von HBMEC-Zellen als etabliertem *in-vitro* Modell des okklusiven menschlichen Hirnendothels (Stins *et al.*, 2001) wurde die Bedeutung einzelner Pathogenitätsfaktoren von *N. meningitidis* sowie die Einflussnahme unterschiedlicher Inkubationsmedien auf die Adhärenz und Invasion der Bakterien in HBMEC-Zellen analysiert.

Vor Durchführung der Infektionsversuche wurde eine einheitliche Expression der Pili und der Außenmembranproteine Opa und Opc durch die zu untersuchenden Isolate mittels Western Blot überprüft. Die Expression von Klasse-1-Pili wurde unter Verwendung des monoklonalen SM1-Antikörpers (M. Virji, Bristol, UK) untersucht, zum Nachweis der Außenmembranproteine Opa und Opc wurden der Anti-Opa-Antikörper 4B12/C11 und der Anti-Opc-Antikörper B306 eingesetzt. Angesichts der variablen Expression der Außenmembranproteine Opa und Opc (Sarkari *et al.*, 1994) wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit wiederholte Kontrollen durchgeführt.

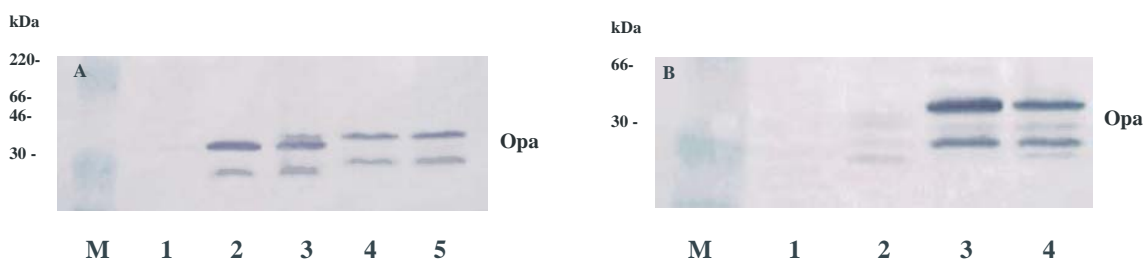


Abb. 2: Western Blot zum Nachweis der Opa-Expression durch die zu untersuchenden Isolate MC58* (A, Spur 2), MC58 *siaD* (A, Spur 3), A2044 (A, Spur 4), A2044 *cps* (A, Spur 5), C2120 (B, Spur 3) und C2120 *siaD* (B, Spur 4). Als Negativkontrolle wurde ein *E. coli* Stamm (A, Spur 1) aufgetragen.

Ergebnisse

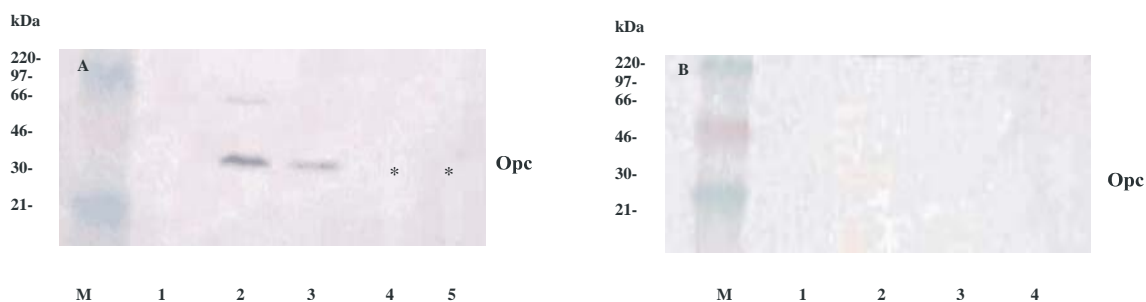


Abb. 3: Western Blot zum Nachweis der Opc-Expression durch die zu untersuchenden Isolate MC58* (A, Spur 2), MC58 *siaD* (A, Spur 3), A2044 (A, Spur 4), A2044 *cps* (A, Spur 5), C2120 (B, Spur 3) und C2120 *siaD* (B, Spur 4). Als Negativkontrolle wurde ein *E. coli* Stamm (A, Spur 1) aufgetragen. Die Sterne (*) markieren zwei im Original vorhandene, sehr schwache Opc-Banden, die durch die Bildverarbeitung nicht mehr sichtbar sind.

Die Serogruppe B Mutanten MC58* und MC58 *siaD* zeigten eine konstante Expression sowohl der Klasse-1-Pili (Daten nicht gezeigt) als auch der Außenmembranproteine Opa und Opc. Die fehlende Opc-Expression durch MC58* *opc* wurde unter Verwendung des Anti-Opc-Antikörpers überprüft (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit der natürlichen Defizienz des *opc* Gens in Serogruppe C Meningokokken konnte im Western Blot für die eingesetzten Isolate C2120 und C2120 *siaD* bei konstanter Expression des Außenmembranproteins Opa und der Klasse-1-Pili keine Opc-Expression nachgewiesen werden. Der Serogruppe A Wildtypstamm A2044 zeigte ebenso wie die isogene kapseldefiziente Mutante A2044 *cps* eine sehr schwache, kaum detektierbare Opc-Expression. Klasse-1-Pili sowie das Außenmembranprotein Opa wurden durch A2044 und A2044 *cps* konstant exprimiert.

3.1.1. Infektionsversuche mit Serogruppe B Meningokokken

In der vorliegenden Arbeit wurde der *N. meningitidis* Serogruppe B Stamm MC58 ausgewählt, um in Infektionsversuchen das Adhärenz- und Invasionsverhalten von Serogruppe B Meningokokken mit den Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke zu analysieren. Der Wildtypstamm MC58 ist ein Isolat des ST-32 Komplexes (ehemals ET-5 Komplex) und als solcher Vertreter einer hypervirulenten klonalen Linie, die für einen Großteil der invasiven Meningokokkenerkrankungen in den westlichen Industrienationen verantwortlich ist (Achtman, 1995a,b). Unter Verwendung zweier isogener MC58 Mutanten wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß des Kapselpolysaccharids von *N. meningitidis* Serogruppe B auf die Adhärenz und Invasion der Bakterien im *in-vitro* Modell der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke untersucht. Um eine Phasenvariation der Kapselexpression des Wildtypstamms MC58 während der Infektionsversuche zu verhindern, wurde der Polycytidinstrang im *siaD* Gen des Kapselgenkomplexes *cps* durch gezielte Punktmutation derart modifiziert, dass eine konstante Expression des Kapselpolysaccharids der Mutante MC58* resultierte. Durch Insertion und nachfolgende Inaktivierung des *siaD* Gens gelang es, eine isogene kapseldefiziente Mutante MC58 *siaD* zu generieren. Beide Mutanten wurden in achtstündigen Infektionsversuchen mit HBMEC-Zellen unter Zugabe von RPMI 1640 Medium wie unter 3.2.4. beschrieben eingesetzt. In Relation zu der Anzahl der HBMEC-Zellen pro Transwell-Vertiefung wurden die Bakterien im Verhältnis 10:1 dem Infektionsmedium zugefügt, was einer MOI (multiplicity of infection) von 10 entspricht.

Ergebnisse

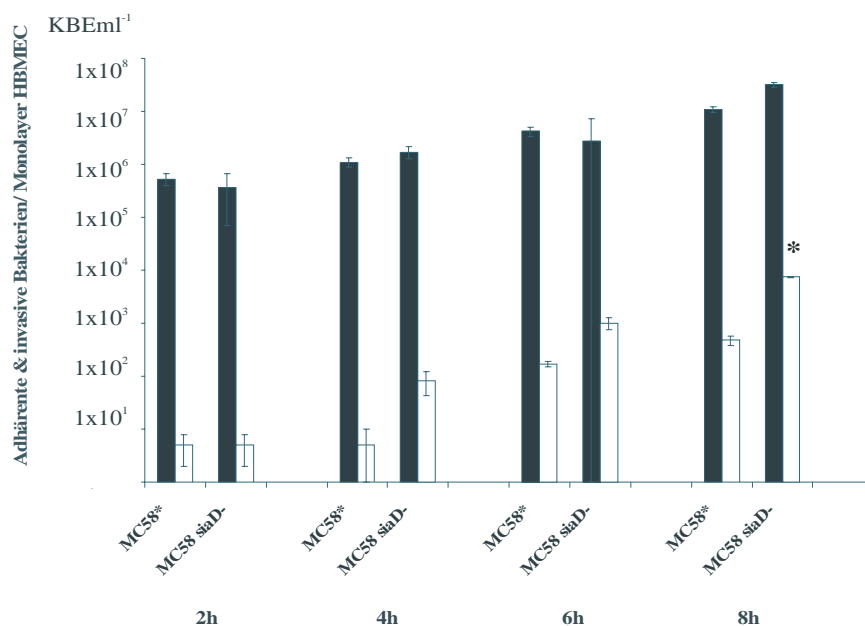


Abb. 4: Darstellung der gemittelten Adhärenz- (schwarze Säulen) und Invasionswerte (weiße Säulen) von MC58* und MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Inkubation mit RPMI 1640 Medium im Rahmen einer 8h-Kinetik. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde (* bezeichnet $p < 0,05$ im Vergleich zu der Invasion von MC58*).

Abbildung 4 stellt die Adhärenz und Invasion der Serogruppe B Mutanten MC58* und MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Inkubation mit RPMI 1640 Medium dar. Beide Mutanten zeigten bereits nach zwei- bis vierstündiger Infektionsdauer eine maximale Adhärenz an HBMEC-Zellen, wobei für die kapsel exprimierende Mutante MC58* und die kapseldefiziente Mutante MC58 *siaD* mit $1,1 \times 10^6$ KBE ml⁻¹ bzw. $1,7 \times 10^6$ KBE ml⁻¹ vergleichbare Adhärenzwerte ermittelt wurden. Die Expression des Kapselpolysaccharids zeigte keinen Einfluß auf die Adhärenz der Bakterien an HBMEC-Zellen. Demgegenüber wurden signifikante Unterschiede in der Internalisierung der beiden Serogruppe B Mutanten beobachtet. Die fehlende Kapselexpression der Mutante MC58 *siaD* resultierte in einer gegenüber MC58* durchschnittlich 16-fach stärkeren Invasion in HBMEC-Zellen nach achtstündiger Infektion ($p < 0,05$). Sowohl für die kapsel exprimierende Mutante MC58* als auch für die kapseldefiziente Mutante MC58 *siaD* wurden erst nach sechs- bis achtstündiger Infektionsdauer maximale Invasionswerte beobachtet.

Ergebnisse

Die Invasion der Meningen durch *N. meningitidis* ist Komplikation des Eindringens der Erreger in die Blutzirkulation. In vorangegangenen Studien wurde daher der Einfluß humanen Serums auf die Interaktion von ST-32 Isolaten mit HBMEC-Zellen untersucht (Unkmeir *et al.*, 2002a). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit die Invasion der Serogruppe B Mutanten MC58* und MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen einer Beeinflussung durch Bestandteile fetalen Kälberserums bzw. humanen Serums unterliegt. Humanes und bovines Serum wurden in einer Konzentration von 10% in RPMI 1640 Medium gelöst. Die 10%igen Lösungen bovinen und humanen Serums wurden neben reinem RPMI 1640 Medium zunächst in Infektionsversuchen mit der kapseldefizienten Mutante MC58 *siaD* und HBMEC-Zellen eingesetzt. Nach siebenstündiger Infektion wurden die Adhärenz- und Invasionswerte von MC58 *siaD* bestimmt.

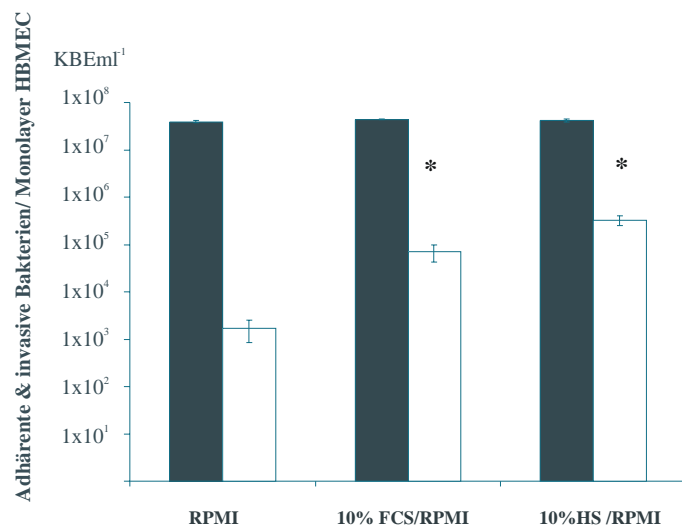


Abb. 5: Darstellung der gemittelten Adhärenz- (schwarze Säulen) und Invasionswerte (weiße Säulen) von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Inkubation in RPMI 1640 Medium, 10%igem fetalen Kälberserum/RPMI und 10%igem humanen Serum/RPMI. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde (* bezeichnet $p < 0,05$ im Vergleich zu der Invasion in RPMI 1640 Medium).

Ergebnisse

Während die Zugabe humanen und bovinen Serums in den durchgeführten Infektionsversuchen keinen Einfluß auf die Adhärenz der MC58 *siaD* Mutante zeigte, wurde eine Abhängigkeit der Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen von dem eingesetzten Inkuabtionsmedium beobachtet (Abb. 5). Die Zugabe von 10%igem fetalen Kälberserum/RPMI führte zu einer Zunahme der Invasion von $1,68 \times 10^3$ KBE ml⁻¹ internalisierten Bakterien in RPMI 1640 Medium auf $6,99 \times 10^4$ KBE ml⁻¹ in bovinem Serum. Dies entspricht einer Steigerung der Invasionswerte um den Faktor 41. Nach Inkubation in 10%igem humanen Serum/RPMI wurde eine im Vergleich zu RPMI 1640 Medium 200-fach stärkere Invasion der kapseldefizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen beobachtet ($p < 0,05$). Dieser signifikante invasionssteigernde Effekt von 10%igem humanen Serum auf die Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen konnte für die isogene Mutante MC58* bestätigt werden. Die kapseldefiziente Mutante MC58 *siaD* zeigte in Anwesenheit von 10%igem humanen Serum/RPMI jedoch eine 10-fach stärkere Invasion in HBMEC-Zellen als die durch eine konstante Kapselexpression charakterisierte Mutante MC58* (Abb.6).

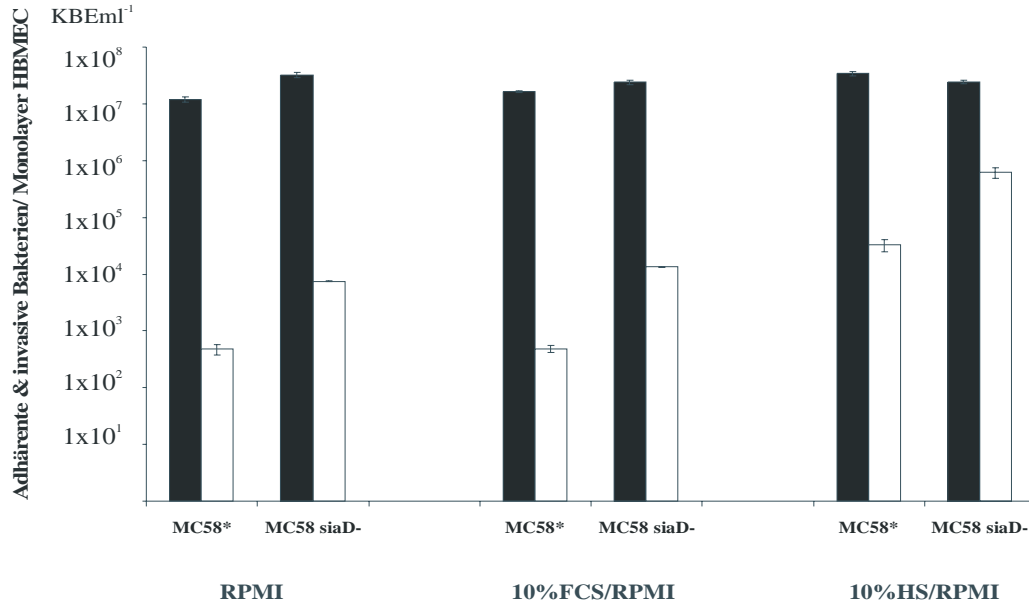


Abb. 6: Darstellung der gemittelten Adhärenz- (schwarze Säulen) und Invasionswerte (weiße Säulen) von MC58* und MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Inkubation in RPMI 1640 Medium, 10%igem fetalen Kälberserum/RPMI und 10%igem humanen Serum/RPMI. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde.

Ergebnisse

Neben der Expression des Kapselpolysaccharids stellen die Oberflächenproteine von *N. meningitidis* wichtige Pathogenitätsfaktoren in der Genese einer invasiven Meningokokkenerkrankung dar. So konnte in vorangegangenen Studien mit humanen Epithelzellen und endothelialen HUVEC-Zellen eine besondere Bedeutung der Außenmembranproteine Opa und Opc von *N. meningitidis* für die Adhärenz und Invasion der exprimierenden Meningokokken nachgewiesen werden (Virji *et al.*, 1994, 1999; Pron *et al.*, 1997; Nassif, 2000). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung des Außenmembranproteins Opc für die Interaktion von Serogruppe B Meningokokken mit den Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke zu analysieren. Im Rahmen einer achtstündigen Kinetik wurde die Adhärenz und Invasion von MC58* sowie einer isogenen, *opc* defizienten Mutante MC58* *opc* nach Inkubation in RPMI 1640 Medium und 10%igem humanen Serum/RPMI untersucht.

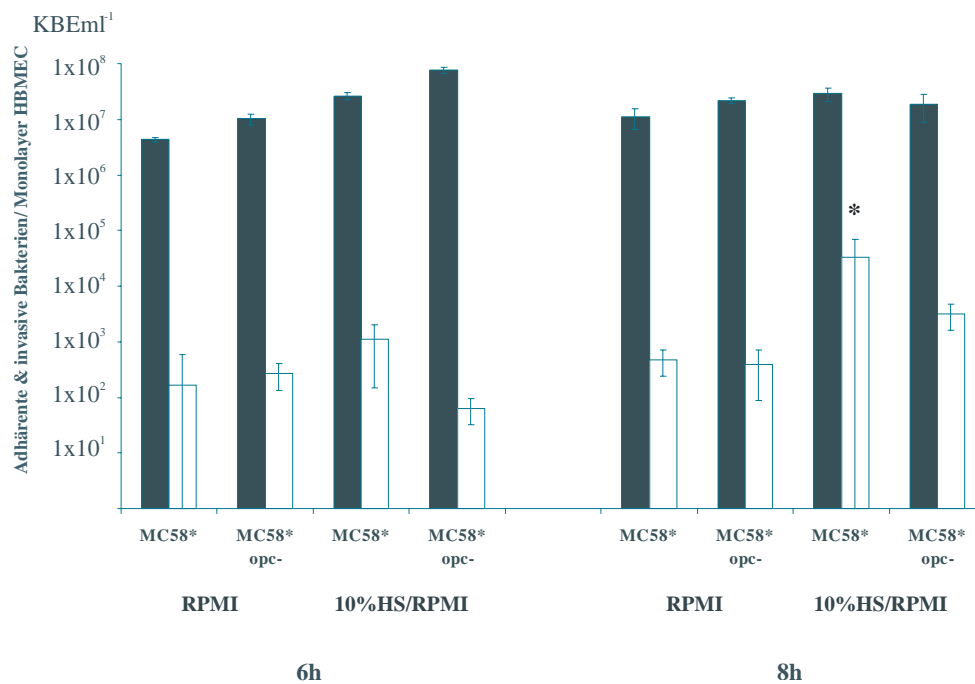


Abb. 7: Darstellung der gemittelten Adhärenz- (schwarze Säulen) und Invasionswerte (weiße Säulen) von MC58* und MC58* *opc* in HBMEC-Zellen nach Inkubation in RPMI 1640 Medium und 10%igem humanen Serum/RPMI im Rahmen einer 8h-Kinetik. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde (* bezeichnet $p < 0,05$ im Vergleich zu der Inkubation mit RPMI 1640 Medium).

Ergebnisse

Abbildung 7 veranschaulicht den unterschiedlichen Einfluß von 10%igem humanen Serum/RPMI auf die Invasion der ausgewählten Serogruppe B Mutanten. Nach achtstündiger Infektion wurde eine nach Zugabe humanen Serums um den Faktor 70 signifikant gesteigerte Internalisierung der Opc-exprimierenden Mutante MC58* in HBMEC-Zellen im Vergleich zu deren Internalisierung in reinem RPMI 1640 Medium beobachtet ($p < 0,05$). Die *opc* defiziente Mutante MC58* *opc* zeigte demgegenüber nach Inkubation mit 10%igem humanen Serum/RPMI eine um den Faktor 8 gesteigerte Invasion in HBMEC-Zellen im Vergleich zu der Invasion in RPMI 1640 Medium. Dies entspricht einer im Durchschnitt 10-fach stärkeren Invasion der Opc-exprimierenden Mutante MC58* in Anwesenheit von 10%igem humanen Serum im Vergleich zu der isogenen, *opc* defizienten Mutante MC58* *opc*. In Anwesenheit von reinem RPMI 1640 Medium wurden für die Invasion beider Serogruppe B Mutanten keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Ferner wurde kein Einfluß der Opc-Expression auf die Adhärenz von MC58* und MC58* *opc* detektiert.

Zur Bestätigung der im Gentamicin-Protektionsassay gewonnenen Daten wurden parallele Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Diese stellen eine Momentaufnahme adhärenter und invasiver *N. meningitidis* Isolate in HBMEC-Zellen dar und ermöglichen eine qualitative Darstellung extra- und intrazellulärer Bakterien.

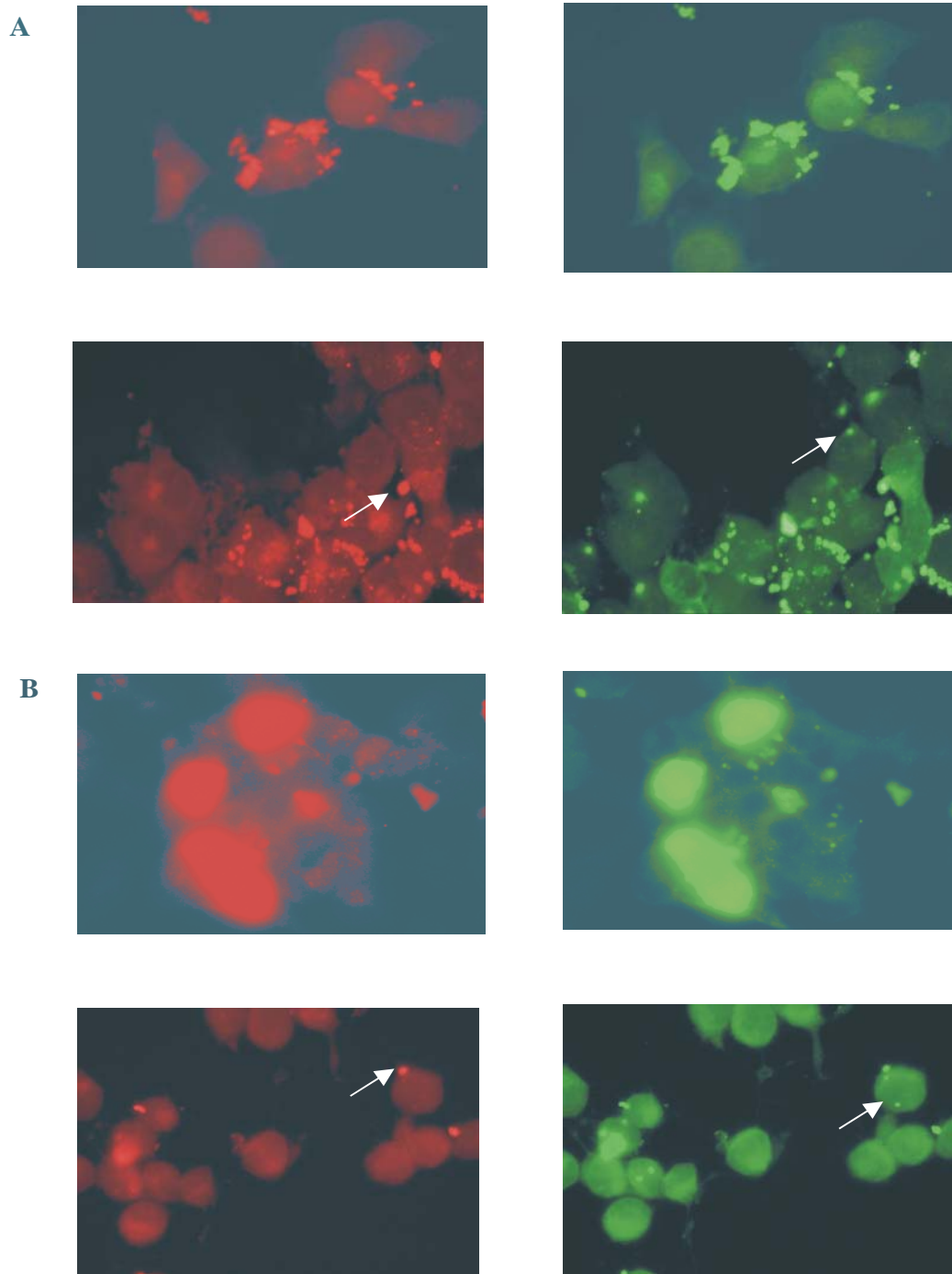


Abb. 8: Immunfluoreszenzaufnahmen adhärenter und invasiver *N. meningitidis* ST-32 Isolate. HBMEC-Zellen wurden im Rahmen eines 6h-Infektionsversuchs in Anwesenheit von 10%igem humanen Serum/RPMI mit den Serogruppe B Mutanten MC58* (A) und MC58 *siaD* (B) infiziert. Sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Bakterien wurden mit einem Kaninchen IgG-Antikörper gegen *N. meningitidis* OMP markiert. Mit Hilfe eines TRITC-markierten Kaninchen IgG-Antikörpers wurden die adhärenenten Bakterien detektiert (rotes Signal, Pfeil). Die Immunfluoreszenzfärbung der invasiven Bakterien gelang nach Permeabilisierung, Markierung mit einem Kaninchen IgG-Antikörper gegen *N. meningitidis* OMP und Detektion durch einen FITC-markierten Kaninchen IgG-Antikörper (grünes Signal, Pfeil).

3.1.2. Infektionsversuche mit Serogruppe C Meningokokken

Die Mehrzahl der invasiven Meningokokkenerkrankungen in den westlichen Industrienationen werden neben hypervirulenten Serogruppe B Isolaten durch Serogruppe C Meningokokken, meist durch hypervirulente Isolate des ST-11 Komplexes (ehemals ET-37), verursacht (Achtman, 1995a,b). Letztere sind v.a. für schwere septische Verlaufsformen mit nicht selten letalem Ausgang verantwortlich. Als repräsentativer Vertreter des ST-11 Komplexes wurde in der vorliegenden Arbeit der Serogruppe C Stamm C2120 ausgewählt. In Infektionsversuchen mit dem Wildtypstamm sowie der isogenen kapseldefizienten Mutante C2120 *siaD* sollte die Interaktion von Serogruppe C Meningokokken mit HBMEC-Zellen analysiert werden. *N. meningitidis* Isolate des ST-11 Komplexes zeichnen sich durch das Fehlen des *opc* Gens sowie durch ein Fehlen derjenigen Gene aus, die für die Expression des Außenmembranproteins PorB (Klasse 2 Porin), Isotyp1 oder 2, kodieren (Seiler *et al.*, 1996). Die Infektionsversuche wurden wie unter 3.2.4. beschrieben durchgeführt, und die Adhärenz- und Invasionswerte von C2120 und C2120 *siaD* nach Zugabe von RPMI 1640 Medium, 10%igem fetalen Kälberserum/RPMI und 10%igem humanen Serum/RPMI nach siebenstündigen Infektionsversuchen ermittelt.

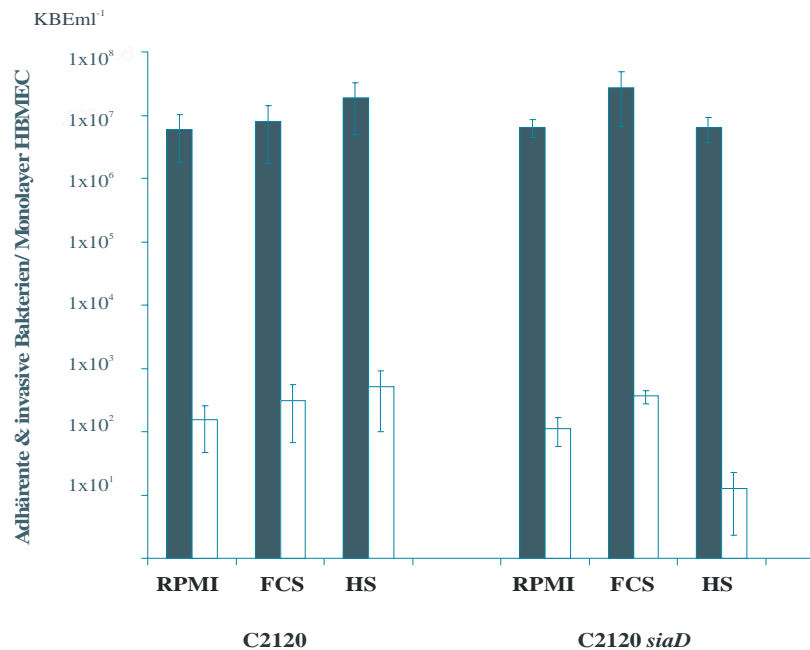


Abb. 9: Gemittelte Adhärenz- (schwarze Säulen) und Invasionswerte (weiße Säulen) von C2120 und C2120 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Inkubation in RPMI 1640 Medium, 10% FCS/RPMI und 10% HS/RPMI. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde.

Ergebnisse

Beide Serogruppe C Isolate zeigten eine ausgeprägte Adhärenz an HBMEC-Zellen bei schwacher Invasion sowohl des Wildtypstamms C2120 als auch der isogenen kapseldefizienten Mutante C2120 *siaD* (Abb. 9). Der für Serogruppe B Meningokokken in den vorangegangenen Versuchen beobachtete signifikante invasionsfördernde Effekt von 10%igem humanen Serum/RPMI ließ sich in den Versuchen mit Serogruppe C Isolaten nicht reproduzieren. Nach Inkubation mit 10%igem humanen Serum/RPMI wurde für den Wildtypstamm C2120 eine Zunahme der Invasion in HBMEC-Zellen um den Faktor 3 beobachtet. Die kapseldefiziente isogene Mutante C2120 *siaD* zeigte in Anwesenheit von 10%igem humanen Serum/RPMI eine um 90% signifikant geminderte Internalisierung in HBMEC-Zellen im Vergleich zu den Invasionswerten in RPMI 1640 Medium. Im Gegensatz zu den Infektionsversuchen mit der Serogruppe B Mutante MC58 invadierte der Wildtypstamm C2120 trotz Kapselexpression in Anwesenheit von 10%igem humanen Serum mit $5,0 \times 10^2$ KBE ml⁻¹ insgesamt 40-fach stärker in HBMEC-Zellen als die kapseldefiziente Mutante C2120 *siaD* mit $1,2 \times 10^1$ KBE ml⁻¹.

3.1.3. Infektionsversuche mit Serogruppe A Meningokokken

Während invasive Meningokokkenerkrankungen durch Serogruppe A Stämme in Deutschland nur in Ausnahmefällen vom Nationalen Referenzzentrum für Meningokokken beobachtet werden, sind Serogruppe A Meningokokken v.a. in Afrika hauptverantwortlich für eine Vielzahl epidemischer und pandemischer Ausbrüche. Die Isolate können überwiegend den Sequenztypen ST-1, ST-4 und ST-5 zugeordnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Adhärenz und Invasion des Serogruppe A Stamms A2044 und einer isogenen kapseldefizienten Mutante A2044 *cps* in HBMEC-Zellen untersucht. Der Wildtypstamm A2044 konnte 1983 klinisch isoliert und dem Sequenztyp ST-1 von *N. meningitidis* zugeordnet werden (Achtman *et al.*, 1995). In Analogie zu den vorangegangenen Experimenten wurde die Interaktion von A2044 und A2044 *cps* mit den Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke im *in-vitro* Modell nach Inkubation mit RPMI 1640 Medium, 10%igem fetalen Kälberserum/RPMI und 10%igem humanen Serum/RPMI untersucht.

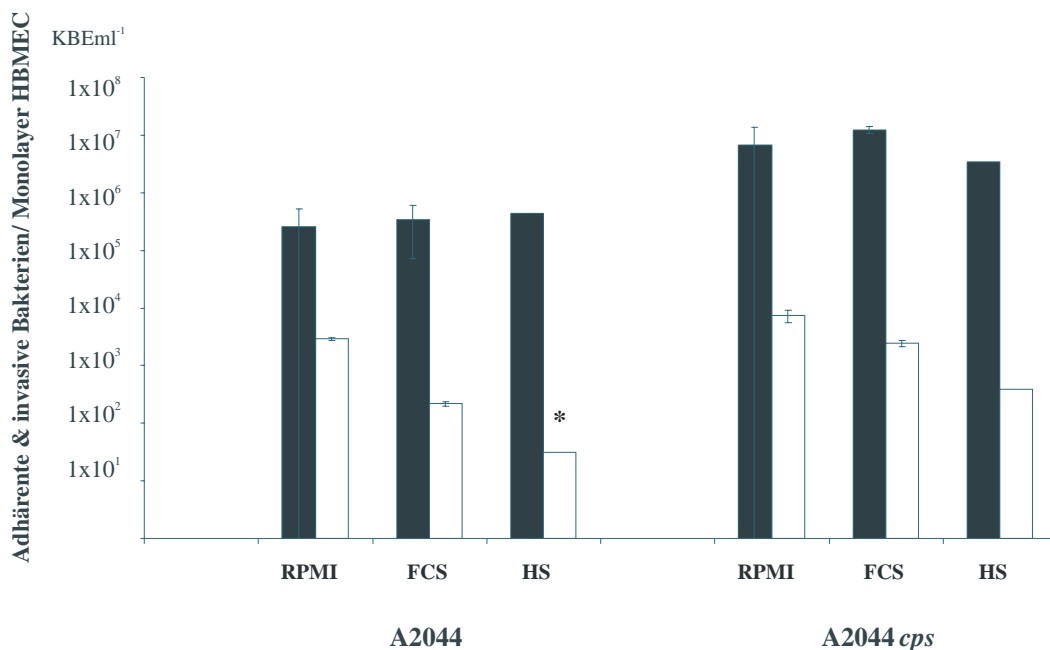


Abb. 10: Darstellung der gemittelten Adhärenz- (schwarze Säulen) und Invasionswerte von A2044 und A2044 *cps* an HBMEC-Zellen nach Inkubation in RPMI 1640 Medium, 10% FCS/RPMI und 10% HS/RPMI. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde (* bezeichnet $p < 0,05$ im Vergleich zu Inkubation mit RPMI 1640 Medium).

Ergebnisse

Für den Wildtypstamm A2044 und die isogene, kapseldefiziente Mutante A2044 *cps* wurden deutliche Unterschiede sowohl in der Adhärenz als auch in der Invasion in HBMEC-Zellen beobachtet (Abb.10). Die Adhärenzwerte der kapseldefizienten Mutante lagen mit Mittelwerten zwischen $6,7 \times 10^6$ KBE ml⁻¹ in RPMI 1640 Medium, $1,3 \times 10^7$ KBE ml⁻¹ in 10%igem fetalen Kälberserum/RPMI und $3,4 \times 10^6$ KBE ml⁻¹ in 10%igem humanen Serum/RPMI signifikant über denen des bekapselten Wildtypstamms mit Werten zwischen $2,6 \times 10^5$ KBE ml⁻¹ (RPMI), $3,4 \times 10^5$ KBE ml⁻¹ (10% FCS/RPMI) und $4,3 \times 10^5$ KBE ml⁻¹ (10% HS/RPMI). Im Gegensatz zu den Vorversuchen mit Serogruppe B Meningokokken ließ sich weder für den bekapselten Wildtypstamm A2044 noch für die isogene kapseldefiziente Mutante A2044 *cps* ein Anstieg der Invasionswerte durch Zugabe von 10%igem fetalen Kälberserum/RPMI oder 10%igem humanen Serum/RPMI beobachten. Die Inkubation mit humanem und bovinem Serum führte vielmehr zu einer signifikant schwächeren Invasion beider Isolate im Vergleich zu den Invasionswerten in RPMI 1640 Medium. Die Zugabe von 10%igem fetalen Kälberserum/RPMI resultierte in einer Abnahme der Invasion um den Faktor 3 (A2044 *cps*) bzw. 13 (A2044). Nach Inkubation mit 10%igem humanen Serum/RPMI wurde eine um den Faktor 20 (A2044 *cps*) bzw. 95 (A2044) signifikant geminderte Invasion in HBMEC-Zellen beobachtet ($p < 0,05$). In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Infektionsversuchen zeigte die kapseldefiziente Mutante A2044 *cps* insgesamt eine stärkere Invasion in HBMEC-Zellen als der bekapselte Wildtypstamm A2044.

Das Vorhandensein des *opc* Gens wurde für die eingesetzten Serogruppe A Isolate A2044 und A2044 *cps* mittels PCR nachgewiesen. Dennoch reagierten sowohl der Wildtypstamm als auch die isogene kapseldefiziente Mutante im Western Blot nur unter sehr schwacher Anfärbung der Opc-spezifischen Bande mit dem eingesetzten Anti-Opc-Antikörper B306 (Abb.3). Ausgehend von diesen Beobachtungen sollte eine für die Interaktion mit HBMEC-Zellen bedeutsame Variabilität der Opc-Expression durch A2044 und A2044 *cps* untersucht werden. Zur Analyse der Opc-Expression wurden Kolonien invasiver A2044 *cps* Isolate von den inkubierten Agarplatten auf Nitrocellulosefolie übertragen, lysiert und fixiert. Mittels Antikörper-Hybridisierung wurde die Opc-Expression der A2044 *cps* Kolonien quantitativ dargestellt. Nach Isolierung Opc-positiver Klone wurde die Expression des Außenmembranproteins Opc erneut im Western Blot detektiert (Abb. 11). Die auf diese Weise isolierten A2044 *cps*

Ergebnisse

Klone A4, A2 und A5 mit schwacher, mäßiger und starker Opc-Expression wurden in Infektionsversuchen unter Zugabe von RPMI 1640 Medium, 10%igem fetalen Kälberserum/RPMI und 10%igem humanen Serum/RPMI hinsichtlich ihrer Adhärenz und Invasion in HBMEC-Zellen untersucht. Es konnte eine direkte Korrelation zwischen der Stärke der Opc-Expression der untersuchten kapseldefizienten, Opc-exprimierenden Serogruppe A Klone und deren Invasion in HBMEC-Zellen in Anwesenheit humanen Serums beobachtet werden. So zeigte Klon A4, der durch eine schwache Opc-Expression charakterisiert ist, eine geringe Invasion in HBMEC-Zellen in Anwesenheit von 10%igem humanen Serum. Deutlich stärker invadierte Klon A2, dessen Opc-Expression im Western Blot als mittelstark nachgewiesen worden war. Die stärkste Invasion in HBMEC-Zellen wurde für Klon A5 beobachtet. Bei starker Expression des Außenmembranproteins Opc invadierte er um 215% signifikant stärker als Klon A4 (Abb. 12).

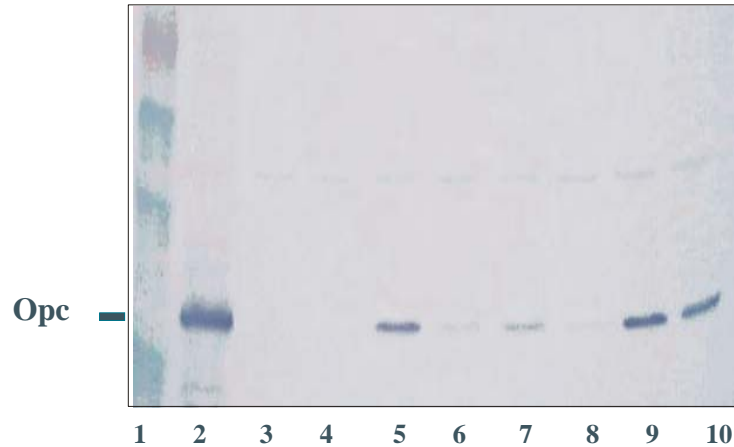


Abb. 11: Western Blot der isolierten invasiven A2044 *cps* Klone Klon A1 (Spur 5), Klon A2 (Spur 6), Klon A3 (Spur 7), Klon A4 (Spur 8), Klon A5 (Spur 9) und Klon A6 (Spur 10) zum qualitativen Nachweis der Opc-Expression. Als Kontrolle wurde der Opc-exprimierende Serogruppe B Stamm MC58 aufgetragen (Spur 2).

Ergebnisse

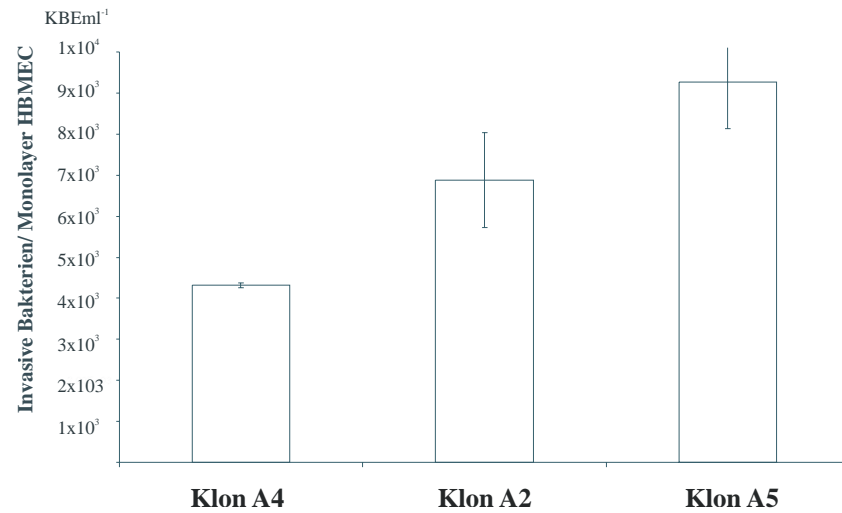


Abb. 12: Darstellung der gemittelten Invasionswerte der isolierten A2044 *cps* Klone A4, A2 und A5 in HBMEC-Zellen nach Zugabe von 10%igem humanen Serum/RPMI. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde.

3.2. Identifikation Fibronektins als invasionfördernde Komponente humanen Serums

In vorangegangenen Studien mit hypervirulenten *N. meningitidis* Isolaten wurde der Einfluß unterschiedlicher Inkubationsmedien auf die Interaktion der Erreger mit HBMEC-Zellen beschrieben (Unkmeir *et al.*, 2002a). In der vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen für ST-32 Isolate ein signifikanter invasionsfördernder Effekt von 10%igem humanem Serum/RPMI nachgewiesen werden.

3.2.1. Einfluß der Serumkonzentration auf die Invasion von *N. meningitidis* in HBMEC-Zellen

Durch Zugabe von humanem Serum in ansteigenden Konzentrationen von 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10% und 20% zu RPMI 1640 Medium wurde der Einfluß der Konzentration menschlichen Serums auf die beobachtete Bakterien-Zell-Interaktion zwischen der Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* und HBMEC-Zellen untersucht.

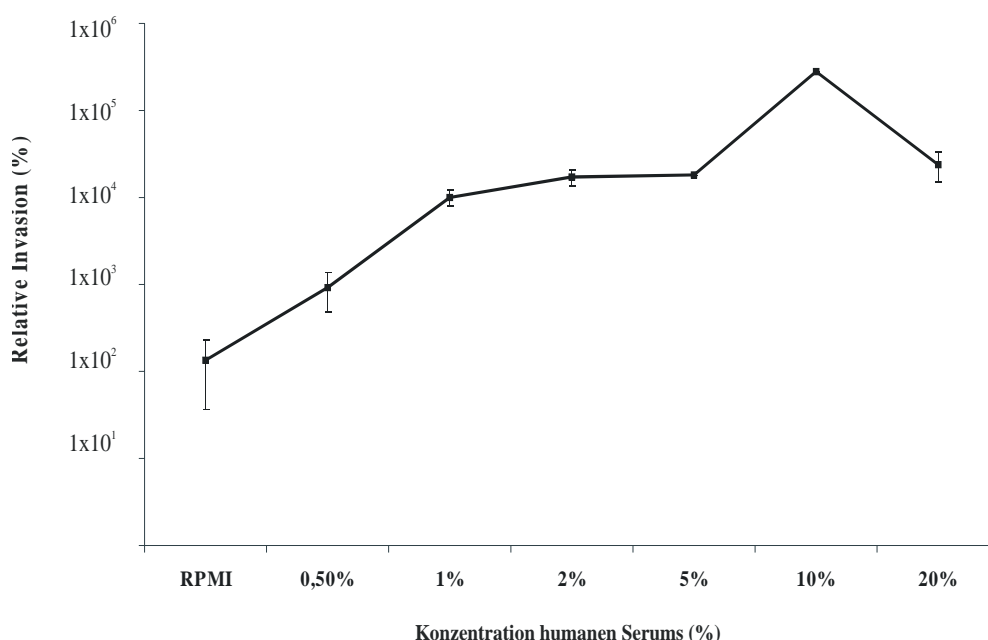


Abb. 13: Darstellung der Inavnsionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration humanen Serums (HS). Die Invasionswerte sind quantitativ, in Relation zu der Internalisierung von MC58 *siaD* in RPMI 1640 Medium aufgetragen. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde.

Ergebnisse

Abbildung 13 veranschaulicht die Konzentrationsabhängigkeit des invasionsfördernden Effekts von hitzeinaktiviertem humanen Serum auf die Internalisierung der Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* in menschliche Hirnendothelzellen. Bereits niedrige Konzentrationen humanen Serums von 0,5-1% führten zu einer gesteigerten Aufnahme der Erreger in HBMEC-Zellen. Signifikant gesteigerte, maximale Invasionswerte wurden in Anwesenheit von 10%igem humanen Serum/RPMI beobachtet. Die Wahl einer höheren Serumkonzentration von 20% resultierte in einer erneuten Abnahme der Anzahl intrazellulärer Bakterien, noch höherer Konzentrationen führten zu einer vollständigen Inhibition der Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen (Daten nicht gezeigt).

3.2.2. Infektionsversuche unter Zugabe von Serumfraktionen

In vorangegangenen Studien wurde humanes Serum über einen Zeitraum von 30min. auf 95°C erhitzt und anschließend in Infektionsversuchen mit HBMEC-Zellen und den *N. meningitidis* Serogruppe B Mutanten MC58* und MC58 *siaD* eingesetzt. Das Kochen des Serums führte zu einem vollständigen Verlust des invasionssteigernden Effekts von 10%igem humanen Serum/RPMI (Unkmeir *et al.*, 2002a). Unter der Vorstellung einer möglichen hitzebedingten Denaturierung mit konsekutivem Struktur- und Funktionsverlust muß ein möglicher Proteincharakter der gesuchten Serumkomponenten diskutiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde humanes Serum in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. M. Eigenthaler (Institut für klinische Biochemie, Universität Würzburg) unter Verwendung chromatographischer Methoden in einzelne Fraktionen separiert. Die Auftrennung erfolgte zunächst mit Hilfe von Anionenaustauschern unter Ausnutzung eines linearen Salzgradienten von 0-1000mM NaCl. Anschließend wurden die Fraktionen bei 56°C 30min. hitzeinaktiviert und im Verhältnis 1:10 in RPMI 1640 Medium gelöst. Die Serumfraktionen wurden in Infektionsversuchen mit HBMEC-Zellen und der kapseldefizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* wie unter 3.2.5. beschrieben eingesetzt, um den Einfluß der jeweiligen Fraktionen auf die Interaktion der Bakterien mit humanen Hirnendothelzellen zu beobachten. Ziel war es, jene Fraktionen, deren Zugabe im Vergleich zu RPMI 1640 Medium zu einer signifikanten Mehraufnahme von Meningokokken in HBMEC-Zellen führte, auf ihre Zusammensetzung hin zu analysieren und auf diese Weise ggf. eine einzelne invasionsfördernde Komponente humanen Serums näher charakterisieren zu können.

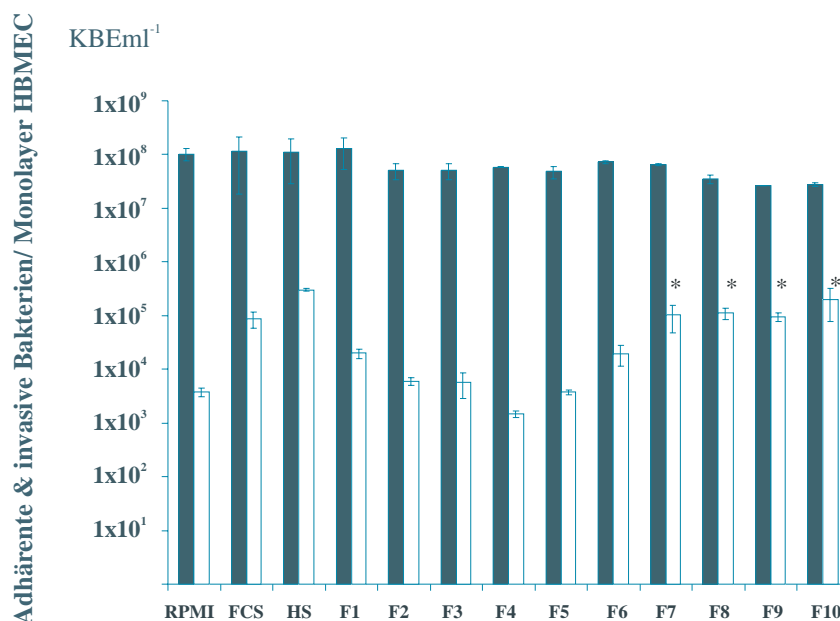


Abb. 14: Darstellung der Adhärenz- (schwarze Säulen) und Invasionswerte (weiße Säulen) von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Zugabe der säulenchromatographisch eluierten Serumfraktionen F1-F10 sowie der Kontrollmedien RPMI 1640 Medium, 10% FCS/RPMI und 10% HS/RPMI. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde (* bezeichnet $p < 0,05$ im Vergleich zu der Inkubation mit RPMI 1640 Medium).

Während nach Zugabe der einzelnen Serumfraktionen und der Kontrollmedien einheitliche Adhärenzwerte für MC58 *siaD* beobachtet wurden, zeigten sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Serumfraktion signifikante Unterschiede in der Stärke der Invasion der Serogruppe B Mutante in HBMEC-Zellen. Die Zugabe der Serumfraktionen F7, F8, F9 und F10, die bei einem Salzgradienten von 700mM bis 1000mM NaCl aus der Säule eluiert worden waren, resultierte mit $9,4 \times 10^4$ KBE ml⁻¹ bis $2,0 \times 10^5$ KBE ml⁻¹ intrazellulären Bakterien in einer signifikant gesteigerten Invasion in HBMEC-Zellen im Vergleich zu den übrigen Serumfraktionen und RPMI 1640 Medium mit durchschnittlich $3,7 \times 10^3$ KBE ml⁻¹ intrazellulären Erregern ($p < 0,05$). Nach Inkubation mit 10%igem humanen Serum wurde eine durchschnittliche Invasion der Serogruppe B Mutante von $3,0 \times 10^5$ KBE ml⁻¹ in HBMEC-Zellen beobachtet. Dieser Wert liegt nur geringfügig über den Invasionswerten von MC58 *siaD* nach Inkubation mit den Serumfraktionen F7-F10.

Ergebnisse

Um unspezifische Effekte der NaCl-Pufferlösung auf die *in-vitro* Interaktion der Mutante MC58 *siaD* mit den Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke ausschließen zu können, wurden analoge Infektionsversuche unter Zugabe von NaCl-Lösungen in ansteigender Konzentration über einen Zeitraum von 7h durchgeführt (F1 entspricht 100mM NaCl, F2 200mM NaCl usw., F10 entspricht 1000mM NaCl).

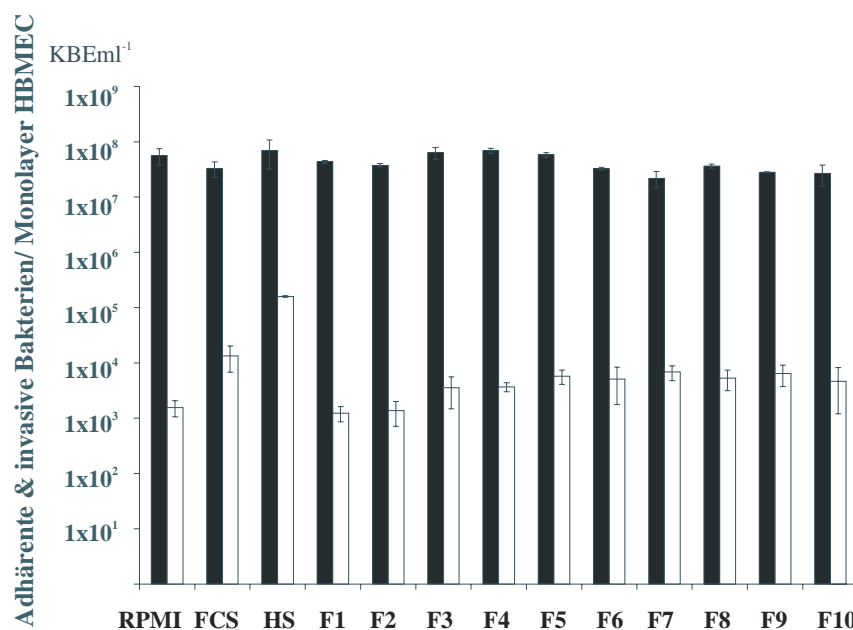


Abb. 15: Darstellung der gemittelten Adhärenz- (schwarze Säulen) und Invasionswerte (weiße Säulen) von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Zugabe der NaCl-Eluate der Fraktionen F1-F10 (100-1000mM NaCl) in ansteigender Konzentration. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde.

Die Zugabe der NaCl-Lösungen in entsprechend dem Eluationspuffer linear ansteigender Konzentration von 100mM NaCl (F1) bis 1000mM NaCl (F10) zeigte keinen Einfluß auf die Adhärenz und Invasion der kapseldefizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen. Weder für die Adhärenz- noch die Invasionswerte von MC58 *siaD* wurde nach Zugabe der einzelnen NaCl-Eluate eine signifikante Abweichung von den entsprechenden Werten in RPMI 1640 Medium detektiert.

Ergebnisse

Ein unspezifischer Effekt der Pufferlösung auf die Invasion der MC58 *siaD* Mutante konnte durch die dargestellten Versuche ausgeschlossen werden. Zur Charakterisierung der einzelnen Serumfraktionen wurden die Fraktionen F1-F10 nach initialer photometrischer Bestimmung des Proteingehalts gelelektrophoretisch aufgetrennt, und die Bandenmuster mit Hilfe der Silberfärbung zur Darstellung gebracht. In den Fraktionen F7-F10 konnte eine distinkte Bande bei ca. 200kDa nachgewiesen werden (Abb.16). In den Fraktionen F5 und F6 stellte sich diese Bande wesentlich schwächer dar. In den Fraktionen F1-F4 konnte keine spezifische Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 200kDa angefärbt werden.

Zur Charakterisierung und Identifikation der einzelnen Banden wurden die Serumfraktionen F1-F10 mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen die Glykoproteine Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin und Tenascin analysiert. Ziel war die Detektion potentiell bindungswirksamer und invasionsfördernder Faktoren in den säulenchromatographisch eluierten Fraktionen. Die in der Silberfärbung detektierte Bande bei ca. 200 kDa konnte auf diese Weise als humanes Fibronectin identifiziert werden (Abb. 17, Pfeil). Während in den Fraktionen F7-F10 die spezifische Bande humanen Fibronectins angefärbt wurde, konnte Fibronectin in den Fraktionen F1-F4 mittels Western Blot nicht nachgewiesen werden. In keiner der analysierten Serumfraktionen konnten spezifische Banden gegen die humanen Serunglykoproteine Vitronectin, Thrombospondin und Tenascin zur Darstellung gebracht werden (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

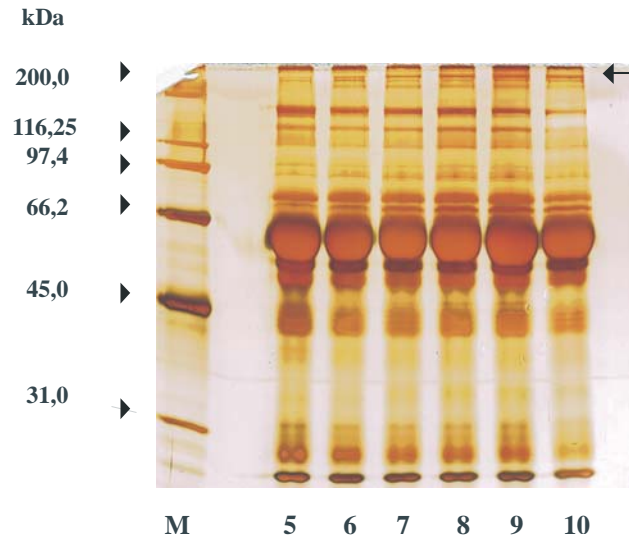


Abb. 16: Darstellung der spezifischen Proteinbandenmuster der säulenchromatographisch eluierten Serumfraktionen F1-F10 nach Auftrennung im SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung. Zur Darstellung kommen die Serumfraktionen F5 (Spur 5), F6 (Spur 6), F7 (Spur 7), F8 (Spur 8), F9 (Spur 9) und F10 (Spur 10) sowie der Marker (M).

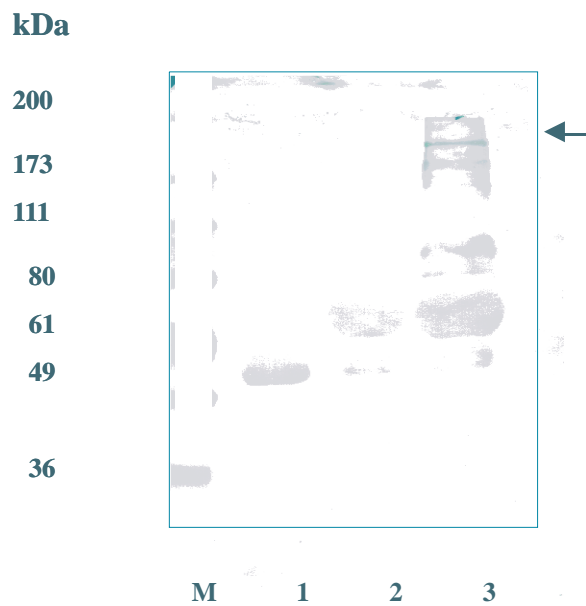


Abb. 17: Western Blot der säulenchromatographisch eluierten Serumfraktionen F1-F10 zum Nachweis des humanen Glykoproteins Fibronectin. Zur Darstellung kommen die Serumfraktionen F4 (Spur 2) und F7 (Spur 3), RPMI 1640 Medium (Spur 1) und der Marker (M).

Ergebnisse

Mit Hilfe der Silberfärbung konnte ein Großteil des Proteingehalts der separierten Fraktionen als humanes Albumin identifiziert werden (Abb.16), dessen physiologische Konzentration im menschlichen Plasma 50mg ml^{-1} beträgt. Zum Ausschluß eines unspezifischen, invasionsfördernden Effekts von Humanalbumin auf das Invasionsverhalten der Mutante MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen wurden Kontrollversuche unter Zugabe von menschlichem Albumin in Konzentrationen von 5mg ml^{-1} , 25mg ml^{-1} und 65mg ml^{-1} durchgeführt.

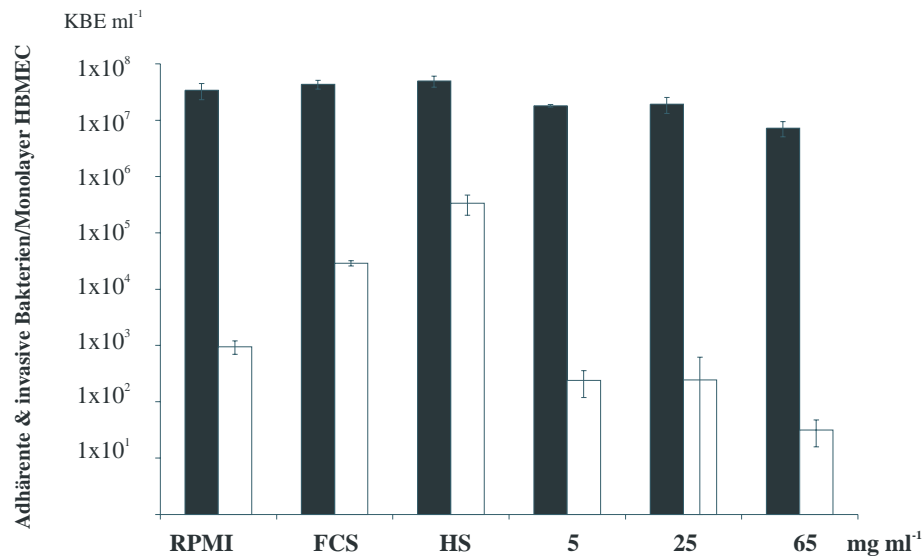


Abb. 18: Darstellung der gemittelten Adhärenz- (schwarze Säulen) und Invasionswerte (weiße Säulen) von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Zugabe von humanem Albumin in ansteigender Konzentration. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde.

Unabhängig von der eingesetzten Konzentration konnte in der vorliegenden Arbeit kein adhärenz- oder invasionsfördernder Einfluß von humanem Albumin auf die Adhärenz und Invasion der Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen beobachtet werden. Die in drei unabhängigen Kontrollversuchen ermittelten Zahlen adhärenter und invasiver Bakterien zeigten nach Zugabe von 5mg ml^{-1} bzw. 25mg ml^{-1} Humanalbumin keine signifikante Abweichung von den Adhärenz- und Invasionswerten der Mutante in reinem RPMI 1640 Medium. Die Inkubation mit Albumin in einer Konzentration von 65mg ml^{-1} resultierte sogar in einer 4-fach schwächeren Adhärenz, einhergehend mit einer um den Faktor 30 geminderten Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen im Vergleich zu den Referenzwerten in RPMI 1640 Medium.

Ergebnisse

Die heterogenen, fraktionsspezifischen Invasionswerte der Mutante MC58 *siaD* nach Zugabe der säulenchromatographisch eluierten Serumfraktionen legten die Vermutung nahe, dass einzelne Serumkomponenten für den invasionsfördernden Effekt humanen Serums auf die Interaktion von *N. meningitidis* Serogruppe B Mutanten mit HBMEC-Zellen verantwortlich sind. Mit Hilfe der Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) sollten mögliche invasionsfördernde Serumkomponenten isoliert und identifiziert werden. Nach photometrischer Bestimmung des Proteingehalts wurden jene Serumfraktionen mit ausreichendem Proteingehalt gepoolt, hitzeinaktiviert und als 10%ige Verdünnungen in RPMI 1640 Medium in Infektionsversuchen mit der Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* und HBMEC-Zellen eingesetzt. Die FPLC-eluierten Fraktionen humanen Serums wurden in Analogie zu den Vorversuchen mittels Gelelektrophorese und Silberfärbung in ihrer Zusammensetzung analysiert.

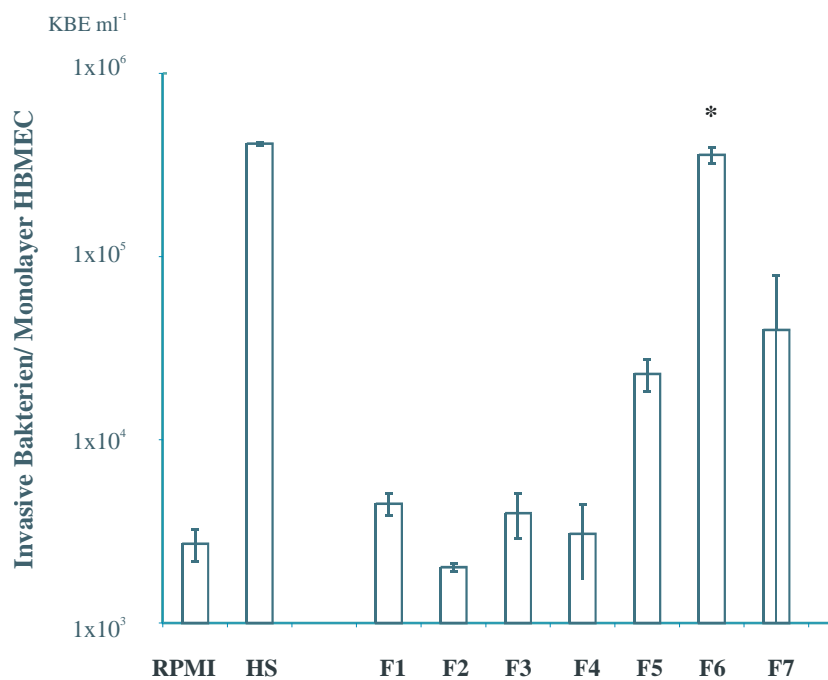


Abb. 19: Darstellung der gemittelten Invasionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Zugabe der gepoolten FPLC-eluierten Serumfraktionen F1-F7. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde (* bezeichnet $p < 0,05$ im Vergleich zu der Inkubation mit RPMI 1640 Medium).

Abbildung 19 veranschaulicht das stark unterschiedliche Invasionsverhalten der kapseldefizienten, Opc-exprimierenden Mutante MC58 *siaD* in Anwesenheit der FPLC-eluierten Serumfraktionen. Maximale Invasionswerte ließen sich nach Zugabe der gepoolten, FPLC-eluierten Fraktion F6 mit durchschnittlich $1,6 \times 10^5$ KBE ml^{-1} internalisierten Erregern beobachten. Dies entsprach einer signifikanten Zunahme der Invasion von MC58 *siaD* um 85% gegenüber der Invasion in RPMI 1640 Medium mit durchschnittlich $2,3 \times 10^4$ KBE ml^{-1} internalisierten Bakterien ($p < 0,05$). Die Invasionswerte der MC58 *siaD* Mutante nach Zugabe von Fraktion F6 waren nur geringfügig niedriger als die Invasionswerte der Serogruppe B Mutante in 10%igem humanen Serum/RPMI mit $5,1 \times 10^5$ KBE ml^{-1} . Die Invasion von MC58 *siaD* nach Inkubation in den übrigen FPLC-eluierten Serumfraktionen war demgegenüber mit Invasionswerten zwischen $2,0 \times 10^3$ KBE ml^{-1} und $2,3 \times 10^4$ KBE ml^{-1} signifikant geringer als die Invasion der Mutante in Anwesenheit von 10%igem humanen Serum.

Mit Hilfe der Silberfärbung gelang vornehmlich in der gepoolten, FPLC-eluierten Fraktion F6 die Darstellung einer spezifischen Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 200kDa (Abb. 20, Spur 7, Pfeil). Diese ließ sich in deutlich schwächerer Ausprägung ebenfalls in den gepoolten Fraktionen F5 und F7 beobachten, konnte jedoch in den gepoolten FPLC-Fraktionen F1-F4 nicht dargestellt werden. Mittels Western Blot wurde die in Fraktion F6 detektierte Bande unter Zugabe spezifischer Antikörper gegen die humanen Serunglykoproteine Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin und Tenascin weiter analysiert. In Übereinstimmung mit den Vorversuchen wurde die Proteinbande bei ca. 200 kDa als humanes Fibronectin identifiziert (Abb. 21, Spur 3).

Ergebnisse

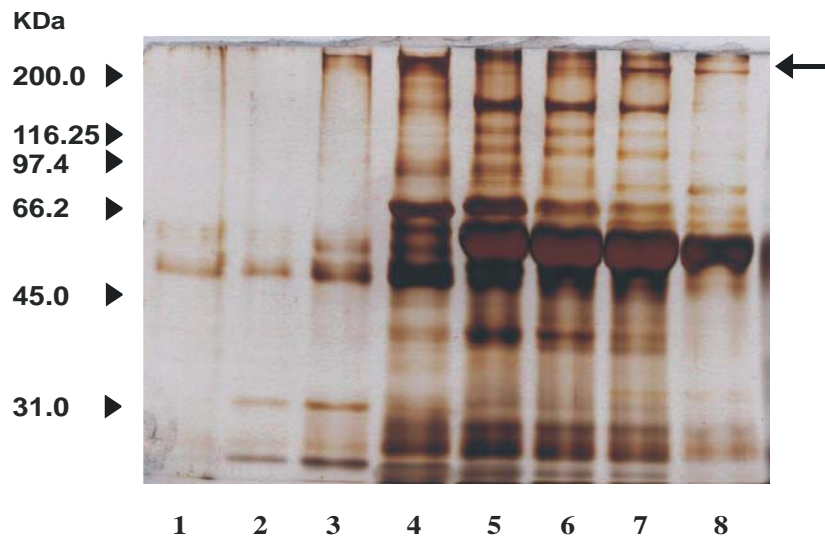


Abb. 20: Darstellung der spezifischen Proteinbandenmuster der FPLC-eluierten Serumfraktionen F1-F7 (Spur 2-8) nach Auftrennung im SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung. Als Kontrolle wurde RPMI 1640 Medium aufgetragen (Spur 1).

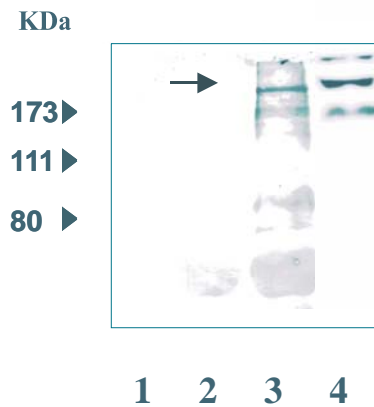


Abb. 21: Western Blot der FPLC-eluierten Serumfraktionen zum Nachweis des humanen Glykoproteins Fibronectin (Pfeil) in den gepoolten FPLC-Fraktionen F3 (Spur 2) und Fraktion F6 (Spur 3). Als Positivkontrolle wurde humanes Fibronectin (Spur 4), als Negativkontrolle RPMI 1640 Medium (Spur 1) aufgetragen.

3.2.3. Infektionsversuche unter Depletion und Substitution von Fibronectin

In jenen Serumfraktionen, deren Zugabe in einer signifikant gesteigerten Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen resultierte, wurde das menschliche Serunglykoprotein Fibronectin nachgewiesen. Die Bedeutung Fibronectins für die Serum-vermittelte Internalisierung von Serogruppe B Meningokokken in menschliche Hirnendothelzellen sollte durch Depletion des Matrixmoleküls weiter analysiert werden. Fibronectin wurde mittels Immunpräzipitation aus der gepoolten, FPLC-eluierten Fraktion F6 depletiert, und die Depletion im Western Blot überprüft (Abb. 22). Parallel wurde ein Aliquot der FPLC-eluierten Fraktion F6 Vitronectin-depletiert. In Infektionsversuchen mit HBMEC-Zellen und der kapseldefizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* wurde der Einfluß der Fibronectin- bzw. Vitronectin-Depletion auf den invasionssteigernden Effekt der Serumfraktion F6 analysiert.

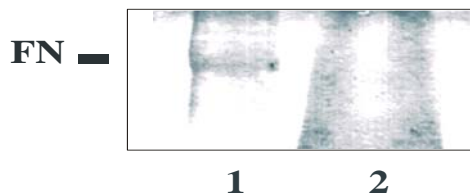


Abb. 22: Westernblot der gepoolten, FPLC-eluierten Serumfraktion F6 vor (Spur 1) und nach Depletion von Fibronectin (Spur 2).

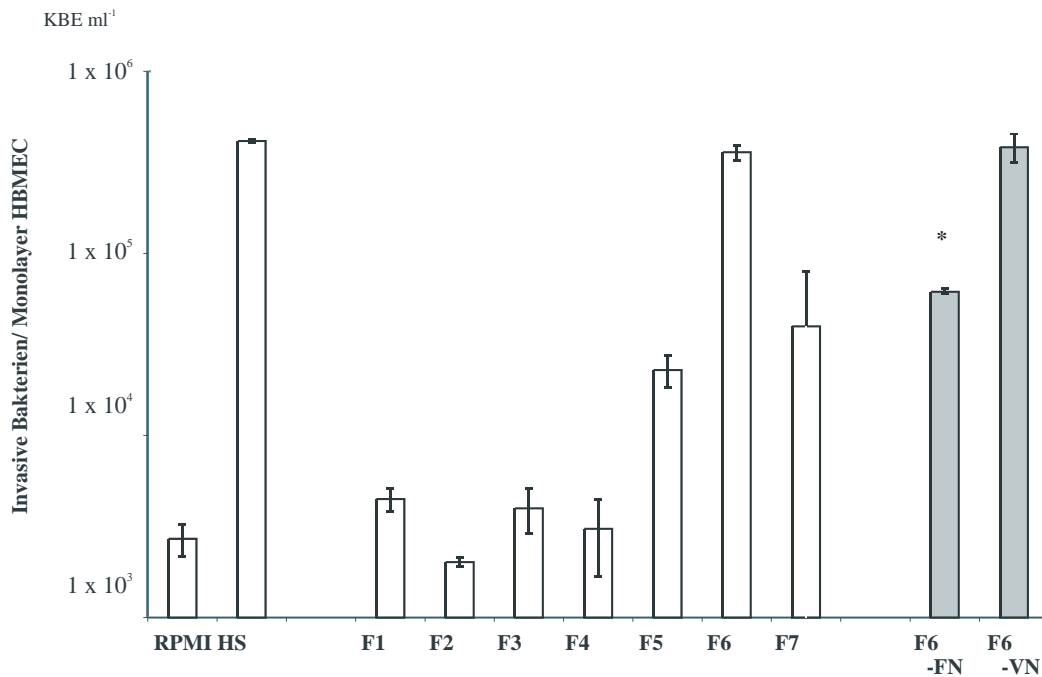


Abb. 23: Darstellung der gemittelten Invasionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Zugabe der Fibronectin- und Vitronectin-depletierten F6-Aliquote (graue Säulen) im Vergleich zu den Invasionswerten von MC58 *siaD* nach Zugabe der FPLC-eluierten Fraktionen F1-7 (weiße Säulen). Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde (* bezeichnet $p < 0,05$ im Vergleich zu der Inkubation in F6).

Die Zugabe der FPLC-eluierten Serumfraktion F6 in einer Konzentration von 10% zu RPMI 1640 Medium führte zu einem signifikanten Anstieg der Invasionswerte von $2,3 \times 10^4$ KBE ml⁻¹ in RPMI 1640 Medium auf $1,6 \times 10^5$ KBE ml⁻¹. Dies entspricht einer Zunahme der Internalisierung von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen um 85%. Die Depletion von Fibronectin aus der Serumfraktion F6 resultierte in einer um 83% signifikant geminderten Invasion der MC58 *siaD* Mutante in HBMEC-Zellen im Vergleich zu den Invasionswerten der Mutante nach Zugabe der FPLC-separierten Fraktion F6. Die Depletion von Vitronectin aus derselben FPLC-eluierten Serumfraktion F6 zeigte keinen Einfluß auf die Invasion der kapfeldefizienten Serogruppe B Mutante in HBMEC-Zellen.

Ergebnisse

Ausgehend von dem signifikanten Einfluß der Depletion von Fibronectin auf die Serum-vermittelte Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit RPMI 1640 Medium und 1M NaCl-Lösung mit humanem Fibronectin substituiert. In Infektionsversuchen wurde ein möglicher invasionsfördernder Effekt sowohl von löslichem als auch von zellulärem humanen Fibronectin analysiert. Fibronectin wurde in Konzentrationen von $2 \mu\text{g ml}^{-1}$, $5 \mu\text{g ml}^{-1}$, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, $20 \mu\text{g ml}^{-1}$, $40 \mu\text{g ml}^{-1}$, $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ und $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ eingesetzt. Weiterhin wurde in Substitutionsversuchen der Einfluß humanen Vitronectins in ansteigender Konzentration auf die Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen analysiert. Um Aussagen über die Existenz einer Humanspezifität treffen zu können, wurde der Einfluß humanen Fibronectins gegenüber Fibronectin bovinen Ursprungs untersucht. Humanes und bovines Fibronectin wurden ebenfalls in Konzentrationen von $2 \mu\text{g ml}^{-1}$, $5 \mu\text{g ml}^{-1}$, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, $20 \mu\text{g ml}^{-1}$, $40 \mu\text{g ml}^{-1}$, $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ und $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ in RPMI 1640 Medium gelöst.

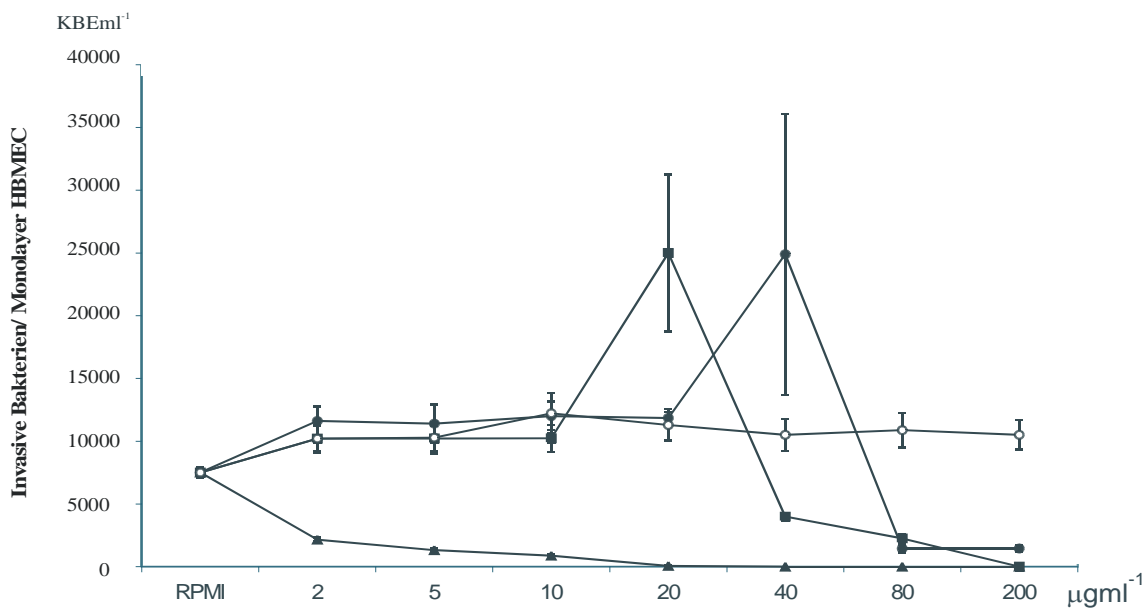


Abb. 24: Darstellung der gemittelten Invasionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Zugabe von humanem löslichem (schwarze Kreise) und zellulärem Fibronectin (Quadrate) sowie nach Zugabe von humanem Vitronectin (Dreiecke) in ansteigender Konzentration. Zum Vergleich sind die Invasionswerte der *opc* defizienten Mutante MC58 *siaD, opc* nach Inkubation mit löslichem humanen Fibronectin aufgetragen (weiße Kreise). Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein konzentrationsabhängiger, invasionsfördernder Effekt sowohl von löslichem als auch von zellulärem humanen Fibronectin auf die Invasion der Opc-exprimierenden, kapseldefizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen beobachtet (Abb.24). Maximale Invasionswerte wurden nach Substitution von $20\mu\text{g ml}^{-1}$ zellulären humanen Fibronectins bzw. von $40\mu\text{g ml}^{-1}$ löslichen humanen Fibronectins mit einer Steigerung der Invasionswerte um mehr als 300% gegenüber der Inkubation in reinem RPMI 1640 Medium ermittelt.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen führte die Substitution des Serumglykoproteins Vitronectin nicht zu einer gesteigerten Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen. Ferner resultierte weder die Zugabe von Fibrinogen noch die Inkubation mit bovinem Fibronectin in einem Anstieg der Invasionswerte der Opc-exprimierenden, kapseldefizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD*. Die dargestellten Infektionsversuche unter Zugabe von humanem löslichen Fibronectin wurden in Analogie mit der *opc* defizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD*, *opc* durchgeführt. Im Gegensatz zu den Vorversuchen mit der isogenen Opc-exprimierenden Mutante MC58 *siaD* wurde nach Zugabe von löslichem humanen Fibronectin in ansteigender Konzentration keine gesteigerte Invasion der Opc-defizienten Mutante in HBMEC-Zellen beobachtet (Abb. 24).

Die Bindung von humanem Fibronectin an das Außenmembranprotein Opc von *N. meningitidis* wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Western Blot überprüft. Der Nachweis der Fibronectin-Bindung durch die Opc-exprimierende Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* gelang durch Anfärbung einer spezifischen Fibronectin-Bande nach Zugabe des spezifischen Anti-Fibronectin-Antikörpers (Abb. 25). Eine Bindung humanen Fibronectins durch die isogene, *opc* defiziente Mutante MC58 *siaD*, *opc* wurde nicht nachgewiesen (Abb. 25).

Ergebnisse

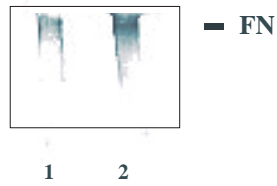


Abb. 25: Western Blot des Lysats von MC58 *siaD*, *opc* (Spur 1) und MC58 *siaD* (Spur 2) nach Zugabe von 100µl einer 20%igen Lösung der FPLC-eluierten Serumfraktion F6 zum Nachweis der Bindung von humanem Fibronectin durch das Außenmembranprotein Opc von *N. meningitidis*. Die FN-Bande wurde unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen humanes Fibronectin detektiert.

3.3. Identifikation von Integrinen als Rezeptoren Opc-exprimierender Meningokokken auf HBMEC-Zellen

In vorangegangenen Studien wurde nach Substitution des RGD-Peptids GRGDTP in 10%igem humanem Serum/RPMI eine um den Faktor 5 signifikant geminderte Invasion der Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen beobachtet (Unkmeir *et al.*, 2002a). In Abwesenheit von humanem Serum zeigte die Zugabe des RGD-Peptids keinen Einfluß auf die Invasion des ST-32 Isolats, so dass eine Serum-vermittelte Bindung von MC58 *siaD* an Rezeptoren mit RGD-Bindungsmotiv diskutiert wurde. Die Integrine $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ sind als Rezeptoren mit RGD-Bindungssequenz bekannt (Dejana, 1991). Für humanes Fibronectin gelang der Nachweis einer Bindung an die Subfamilie der Integrinrezeptoren $\alpha_{3-6}\beta_1$, vornehmlich an $\alpha_5\beta_1$ -Integrine, über eine RGD-Bindungssequenz innerhalb der Typ III-Region (Pierschbacher und Ruoslahti, 1987; Isogai *et al.*, 2001).

Humane zerebrale Hirnendothelzellen exprimieren neben Rezeptoren für Fibroblastenwachstumsfaktoren und dem von-Willebrand-Faktor eine Vielzahl von Integrinen (Isogai *et al.*, 2001). Für die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten HBMEC-Zellen konnte die Expression der genannten Integrinrezeptoren mittels Western Blot und Durchflußzytometrie nachgewiesen werden (Abb. 26). Als Positivkontrollen dienten epitheliale Hep2-Zellen.

Ergebnisse

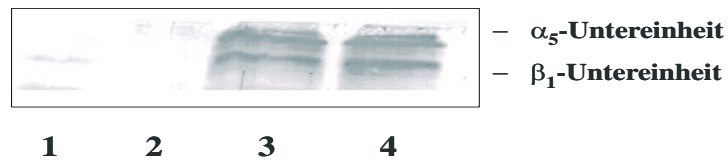


Abb. 26: Western Blot des Lysats von HBMEC-Zellen (Spur 3 und 4) zum Nachweis der $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor-Expression. Unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptoren gelang die Darstellung der distinkten Banden der α_5 - sowie der β_1 -Untereinheit.

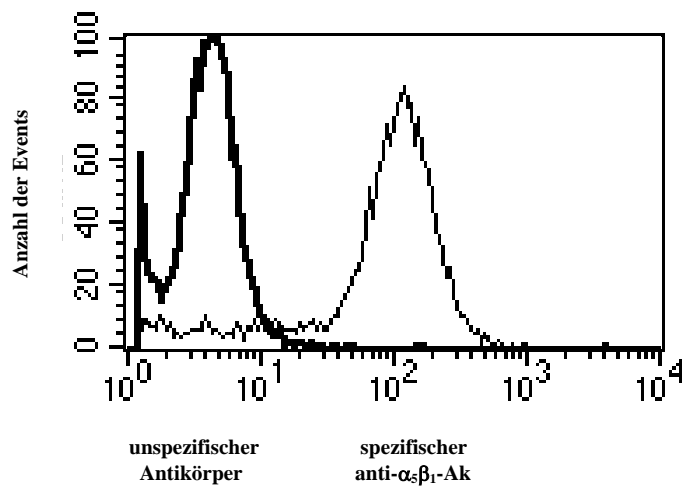


Abb. 27: Durchflußzytometrie von HBMEC-Zellen zum Nachweis der Expression des $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptors. Das Diagramm zeigt das spezifische Signal des gebundenen spezifischen, FITC-markierten Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor-Antikörpers gegenüber einer unspezifischen Signalgebung, die unter Verwendung eines unspezifischen, FITC-markierten Antikörpers detektiert wurde.

3.3.1. Infektionsversuche unter Zugabe von Anti-Integrinrezeptor-Antikörpern

In der vorliegenden Arbeit wurden Infektionsversuche mit der kapseldefizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* und HBMEC-Zellen unter Zugabe spezifischer Anti-Integrinrezeptor-Antikörper durchgeführt. Die Bedeutung des $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptors für die Serum-vermittelte Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen wurde unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen die RGD-Bindungsepitope von $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen untersucht. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von $1\mu\text{g ml}^{-1}$, $5\mu\text{g ml}^{-1}$ und $7,5\mu\text{g ml}^{-1}$ in 10%igem humanen Serum/RPMI gelöst. Zusätzlich wurde der Einfluß der Blockade des $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptors auf die Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen in Anwesenheit der zuvor analysierten FPLC-eluierten Serumfraktion F6 untersucht. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von $7,5\mu\text{g ml}^{-1}$ in einem Aliquot von F6 gelöst. Durch Präinkubation von HBMEC-Zellen mit dem polyklonalen Anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptor-Antikörper LM609 wurde der Einfluß des $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptors auf die Interaktion von Serogruppe B Meningokokken mit HBMEC-Zellen analysiert. Der Antikörper wurde ebenfalls in einer Konzentration von $1\mu\text{g ml}^{-1}$, $5\mu\text{g ml}^{-1}$ und $7,5\mu\text{g ml}^{-1}$ in 10%igem humanen Serum/RPMI gelöst.

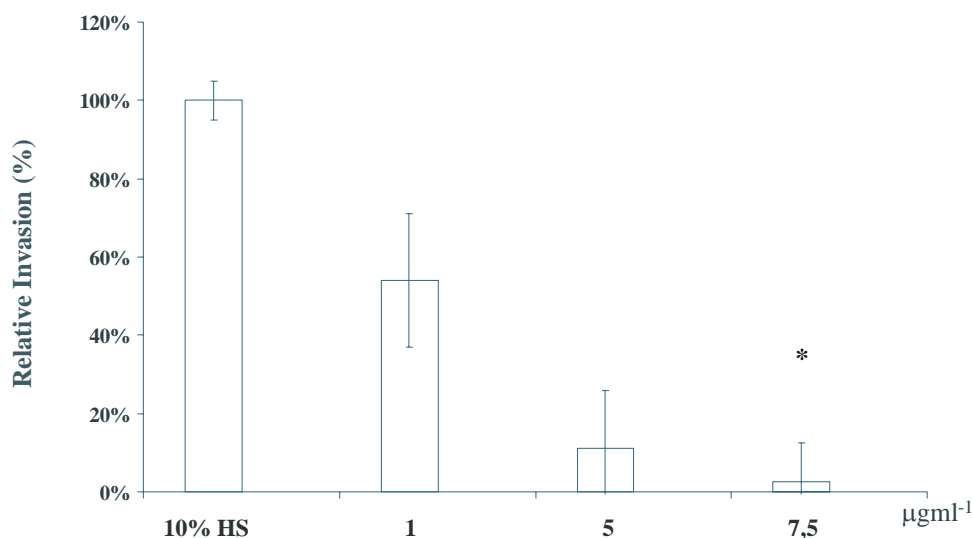


Abb. 28: Darstellung der relativen Invasion (%) von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen in Anwesenheit des Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor-Antikörpers. Der durchschnittliche Invasionswert der Bakterien nach Inkubation mit Antikörper-freiem, 10%igem humanen Serum/RPMI entspricht dem Referenzwert (100%). Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde (* bezeichnet $p < 0,05$ im Vergleich zu der Inkubation in 10%igem humanen Serum).

Ergebnisse

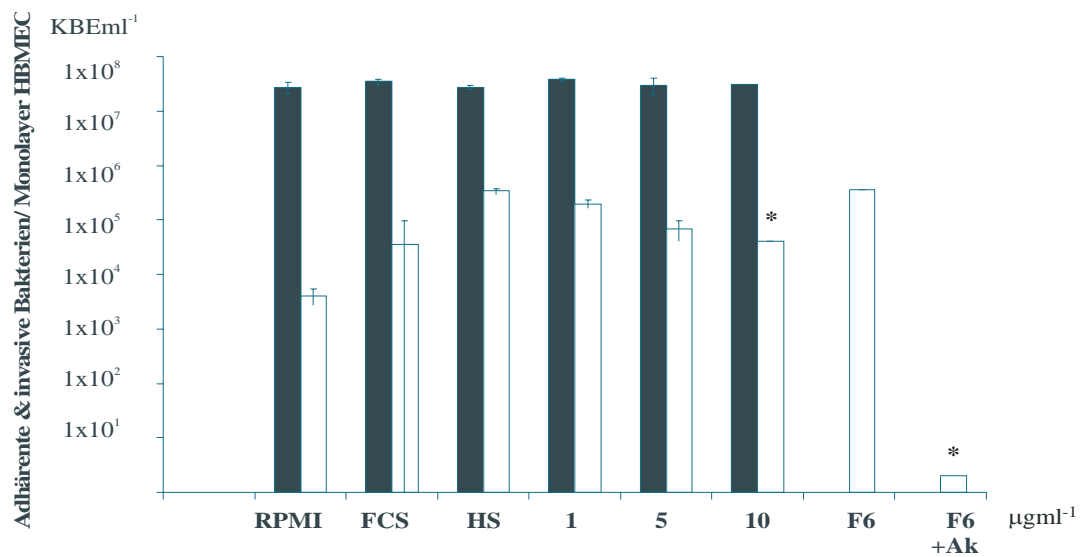


Abb. 29: Darstellung der gemittelten Adhärenz- (schwarze Säulen) und Invasionswerte (weiße Säulen) von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen in Anwesenheit des Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor-Antikörpers in ansteigender Konzentration sowie Darstellung der gemittelten Invasionswerte (weiße Säulen) von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen in Anwesenheit der FPLC-eluierten Serumfraktion F6 vor und nach Zugabe des Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor-Antikörpers. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde (* bezeichnet $p < 0,05$ im Vergleich zu der Inkubation in 10% HS/RPMI bzw. F6).

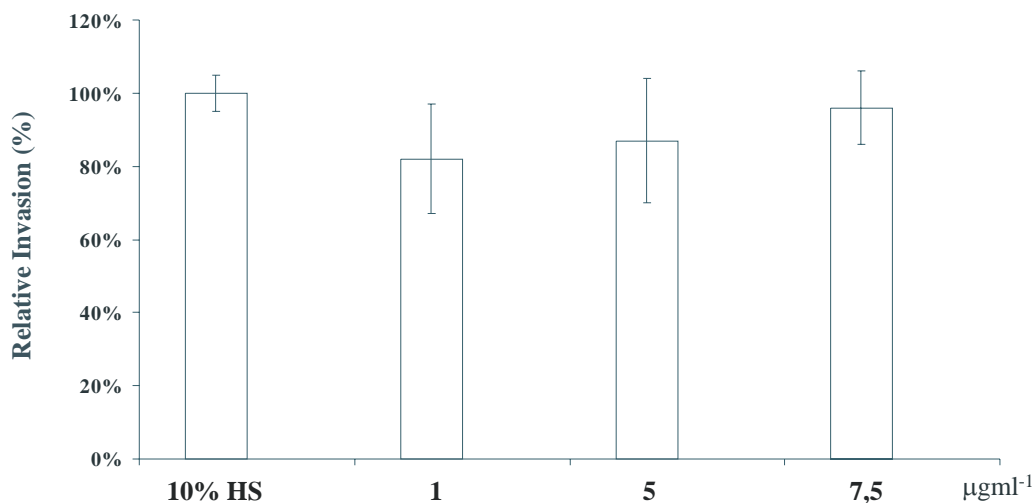


Abb. 30: Darstellung der relativen Invasion (%) von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen in Anwesenheit des Anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptor-Antikörpers LM609. Der durchschnittliche Invasionswert der Bakterien nach Inkubation mit Antikörper-freiem, 10%igen humanen Serum/RPMI entspricht dem Referenzwert (100%). Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde.

Die Abbildungen 28 und 29 veranschaulichen die signifikante Inhibition der Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen durch Zugabe des polyklonalen Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor-Antikörpers zu 10%igem humanen Serum/RPMI. So führten Antikörperkonzentrationen von $1\mu\text{g ml}^{-1}$ bzw. $5\mu\text{g ml}^{-1}$ zu signifikant geminderten Invasionswerten von 58,3% respektive 20,4% gegenüber den durchschnittlichen Invasionswerten von MC58 *siaD* in Anwesenheit von 10%igem humanen Serum (Abb. 29). Nach Zugabe des Antikörpers in einer Konzentration von $7,5\mu\text{g ml}^{-1}$ wurde eine Abnahme der Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen um mehr als 90% beobachtet ($p < 0,05$). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen führte auch die Zugabe des Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor-Antikörpers zu der zuvor analysierten FPLC-separierten Serumfraktion F6 zu einer signifikanten Inhibition der Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen von $3,6 \times 10^5$ KBE ml^{-1} auf $3,3 \times 10^1$ KBE ml^{-1} (Abb. 28). Dies entspricht einem Rückgang der Invasionswerte um den Faktor 10^4 ($p < 0,05$).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte die Zugabe des Anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptor-Antikörpers keinen signifikanten Einfluß auf die Invasion der MC58 *siaD* Mutante in HBMEC-Zellen (Abb. 30). Nach Zugabe von $1\mu\text{g ml}^{-1}$ bzw. $5\mu\text{g ml}^{-1}$ des Antikörpers entsprachen die Invasionswerte von MC58 *siaD* durchschnittlich 82% respektive 87% der Referenz. Bei Zugabe des Anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptor-Antikörpers in einer Konzentration von $7,5\mu\text{g ml}^{-1}$ stimmten die Invasionswerte mit 96% nahezu mit den Referenzwerten in 10%igem humanen Serum/RPMI überein. Die Präinkubation von HBMEC-Zellen sowohl mit dem Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor-Antikörper als auch mit dem Anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptor-Antikörper nahm keinen Einfluß auf die Adhärenz von MC58 *siaD* an HBMEC-Zellen.

Ergebnisse

Als integrale Membranproteine setzen sich Integrinrezeptoren aus verschiedenen Untereinheiten zusammen, deren Bindung unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden im Zytoplasma der Zielzellen aktiviert. Unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen einzelne Integrinrezeptor-Untereinheiten wurde untersucht, inwieweit für die Internalisierung der ausgewählten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen eine Bindung an beide Untereinheiten essentiell ist oder ob vielmehr nur eines der beiden Subintegrine unter Vermittlung von Serumkomponenten die Invasion ermöglicht. Zu diesem Zweck wurden monoklonale Antikörper gegen die α_v -, α_5 -, β_3 - und β_1 - Untereinheit der Integrine in einer Konzentration von $10\mu\text{g ml}^{-1}$ in 10%igem humanen Serum/RPMI gelöst und in Infektionsversuchen mit MC58 *siaD* und HBMEC-Zellen eingesetzt.

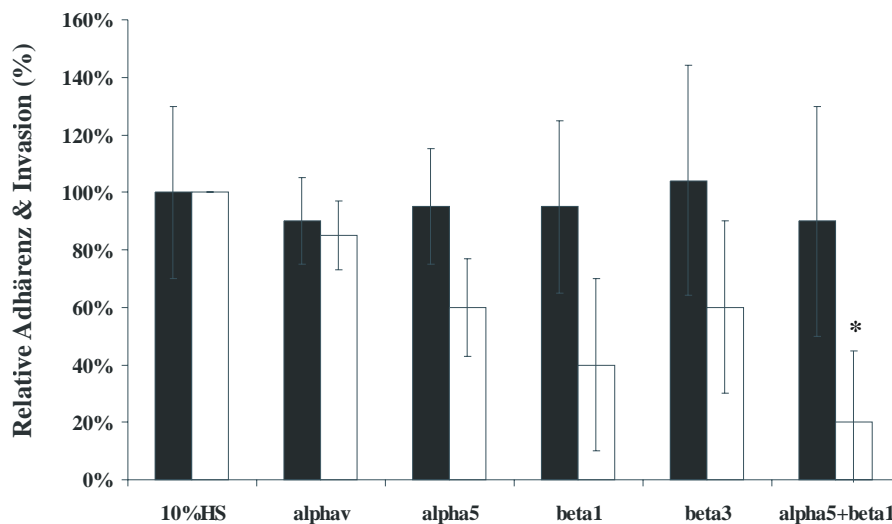


Abb. 31: Darstellung der relativen Adhärenz (% , schwarze Säulen) und Invasion (% , weiße Säulen) von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach 15minütiger Präinkubation mit monoklonalen Antikörpern gegen die α_v -, α_5 -, β_1 - und β_3 -Integrin-Untereinheit. Der durchschnittliche Invasionswert der Bakterien nach Inkubation mit Antikörper-freiem, 10%igem humanen Serum/RPMI entspricht dem Referenzwert (100%). Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde (* bezeichnet $p < 0,05$ im Vergleich zu der Inkubation mit Antikörper-freiem, 10%igem humanen Serum/RPMI).

Ergebnisse

In Anwesenheit des monoklonalen Anti- α_5 -Integrinrezeptor-Antikörpers in einer Konzentration von $10\mu\text{g ml}^{-1}$ wurde eine um 40% geminderte Invasion der MC58 *siaD* Mutante in HBMEC-Zellen im Vergleich zu der Invasion in 10%igem humanen Serum/RPMI beobachtet (Abb. 31). Nach Zugabe des Anti- β_1 -Integrinrezeptor-Antikörpers in einer Konzentration von $10\mu\text{g ml}^{-1}$ zu 10%igem humanen Serum waren die Invasionswerte von MC58 *siaD* um durchschnittlich 60% gegenüber den Referenzwerten in 10%igem humanen Serum/RPMI ohne Antikörperzusatz gemindert. Die zeitgleiche Präinkubation von HBMEC-Zellen sowohl mit dem Anti- α_5 - als auch mit dem Anti- β_1 -Integrinrezeptor-Antikörper führte zu einer signifikanten Minderung der Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen um 80% ($p < 0,05$). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte die Zugabe der monoklonalen Anti- α_v - und Anti- β_3 -Integrinrezeptor-Antikörper keinen signifikanten Einfluß auf die Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen. Die Blockade der α_v - bzw. β_3 -Integrin-Untereinheit resultierte lediglich in einer partiellen Inhibition der Invasion der Serogruppe B Mutante in HBMEC-Zellen. In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Experimenten blieb die Adhärenz von MC58 *siaD* an HBMEC-Zellen unbeeinflusst von der Präinkubation der Zellen mit dem jeweiligen Antikörper.

3.4. Einfluß von Heparansulfat-Proteoglykanen auf die Interaktion Opc-exprimierender Meningokokken mit HBMEC-Zellen

In vorangegangenen Studien mit Opc-exprimierenden Meningokokken konnte sowohl eine Vitronektin-vermittelte Bindung an $\alpha_v\beta_3$ -Integrine auf endothelialen HUVEC-Zellen (Virji *et al.*, 1994) als auch die Bindung an Heparansulfatproteoglykan (HSPG)-Rezeptoren auf Zellen epithelialer Herkunft nachgewiesen werden (de Vries *et al.*, 1998). Heparansulfatproteoglykane sind überdies als Rezeptoren des Außenmembranproteins Opa von *N. gonorrhoeae* beschrieben (Chen *et al.*, 1995; van Putten und Paul, 1995). Für *N. meningitidis* gelang der Nachweis eines inhibierenden Effekts von Heparin auf die Opa-vermittelte Bindung an Heparansulfatproteoglykan-Rezeptoren humaner Epithelzellen (Virji *et al.*, 1999).

3.4.1. Infektionsversuche unter Zugabe von Heparin und Heparansulfat

Vor dem Hintergrund dieser Studien wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit die Internalisierung der Opc-exprimierenden, kapseldefizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen durch Bindung an Heparansulfatproteoglykane vermittelt wird. In Infektionsversuchen mit MC58 *siaD* und HBMEC-Zellen wurde der Einfluß von Heparin und Heparansulfat auf die Interaktion von MC58 *siaD* mit den Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke analysiert. Sowohl Heparin als auch Heparansulfat blockieren als Rezeptoranaloga die HSPG-Bindungsmotive auf Meningokokken (Herold *et al.*, 1997). Heparin wurde in einer Konzentration von 0,1U ml⁻¹, 1U ml⁻¹ und 100U ml⁻¹ in 10%igem humanen Serum/RPMI gelöst, Heparansulfat in einer Konzentration von 5µg ml⁻¹, 10 µg ml⁻¹ und 100 µg ml⁻¹. HBMEC-Zellen wurden jeweils 15min. mit Heparin und Heparansulfat präinkubiert, als Kontrollmedien dienten RPMI 1640 Medium, 10%iges bovines und 10%iges humanes Serum.

Ergebnisse

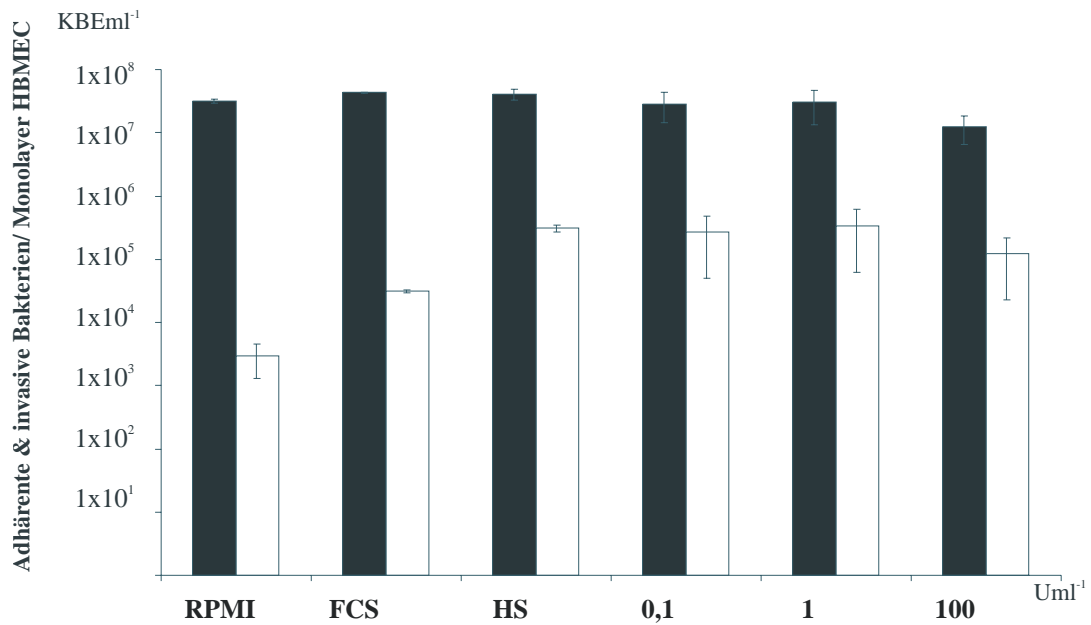


Abb. 32: Darstellung der gemittelten Adhärenz- (schwarze Säulen) und Invasionswerte (weiße Säulen) von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Zugabe von Heparin in ansteigender Konzentration. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde.

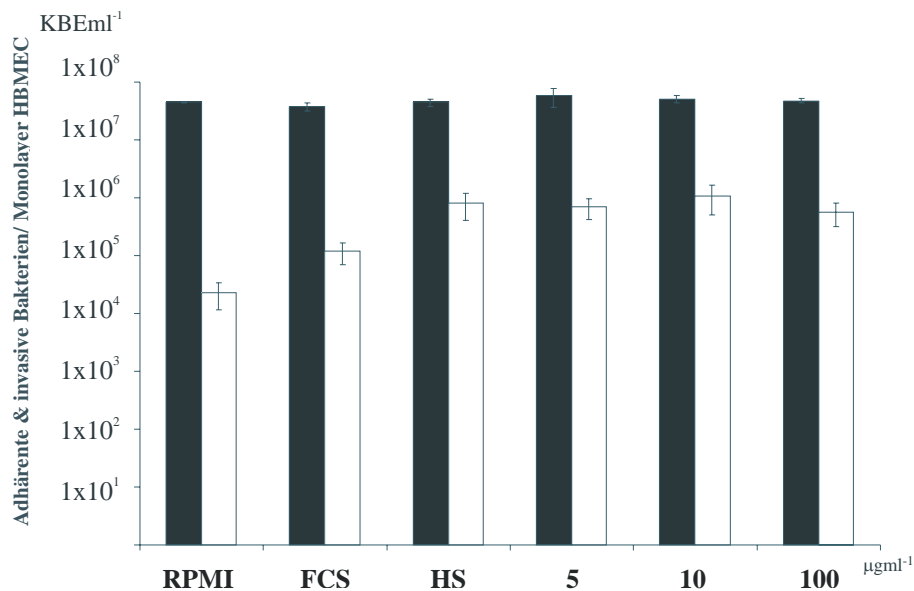


Abb. 33: Darstellung der gemittelten Adhärenz- (schwarze Säulen) und Invasionswerte (weiße Säulen) von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Zugabe von Heparansulfat in ansteigender Konzentration. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde.

Die Präinkubation von HBMEC-Zellen mit Heparin in einer Konzentration von $0,1\text{U ml}^{-1}$ respektive 1U ml^{-1} führte weder zu einer signifikanten Abnahme der Adhärenz noch zu einer signifikanten Abnahme der Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen (Abb. 32). Die Invasionswerte in Anwesenheit von $0,1\text{U ml}^{-1}$ bzw. 1U ml^{-1} Heparin entsprachen mit $2,9 \times 10^7$ KBE ml^{-1} bzw. $3,0 \times 10^7$ KBE ml^{-1} den durchschnittlichen Invasionswerten der kapseldefizienten Serogruppe B Mutante in 10%igem humanen Serum/RPMI mit $4,1 \times 10^7$ KBE ml^{-1} . Lediglich die Präinkubation von HBMEC-Zellen mit 100U ml^{-1} Heparin resultierte in einer 3-fach schwächeren Adhärenz einhergehend mit einer um den Faktor 2,5 geminderten Invasion der Mutante MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen. In parallel durchgeführten Infektionsversuchen mit epithelialen Hep2-Zellen wurde nach Zugabe von Heparin ein konzentrationsabhängiger, signifikanter Rückgang sowohl der Adhärenz- als auch der Invasionswerte von MC58 *siaD* beobachtet. Die Präinkubation von Hep2-Zellen mit Heparin in einer Konzentration von $0,1\text{U ml}^{-1}$ führte bereits zu einer signifikanten Abnahme der Adhärenz und Invasion in Hep2-Zellen um 87% respektive 95% (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um van Putten (van Putten und Paul, 1995).

Die Zugabe von Heparansulfat in ansteigender Konzentration zu 10%igem humanen Serum zeigte in Infektionsversuchen mit HBMEC-Zellen keinen signifikanten Einfluß auf die Adhärenz und Invasion der Opc-exprimierenden, kapseldefizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD*. Nach Präinkubation von HBMEC-Zellen mit $100\mu\text{g ml}^{-1}$ Heparansulfat wurden durchschnittlich $4,7 \times 10^7$ KBE ml^{-1} adhärenente und $5,6 \times 10^5$ KBE ml^{-1} invasive Bakterien ausgezählt. Diese Werte stimmen mit der durchschnittlichen Adhärenz und Invasion von MC58 *siaD* in 10%igem humanen Serum/RPMI mit $4,5 \times 10^7$ KBE ml^{-1} adhärenenten bzw. $8,1 \times 10^5$ KBE ml^{-1} invasiven Bakterien überein. In parallel durchgeführten Infektionsversuchen mit epithelialen Hep2-Zellen wurde ein dosisabhängiger, inhibierender Effekt von Heparansulfat auf die Interaktion der MC58 *siaD* Mutante mit Hep2-Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

In vorangegangenen Studien mit epithelialen Chang-Zellen wurde eine Inhibition der Opc-vermittelten Meningokokken-Zell-Interaktion nach Zugabe von Heparinase III beobachtet (de Vries *et al.*, 1998). Heparinase III zerstört Glykosaminoglykan (GAG)-Seitenketten von Proteoglykanrezeptoren durch proteolytischen Abbau. In der vorliegenden Arbeit wurde Heparinase III in einer Konzentration von $0,2\text{U ml}^{-1}$ bzw. $0,75\text{U ml}^{-1}$ in 10%igem humanen Serum/RPMI gelöst, und die HBMEC-Zellen jeweils 15 min. mit dem Enzym präinkubiert.

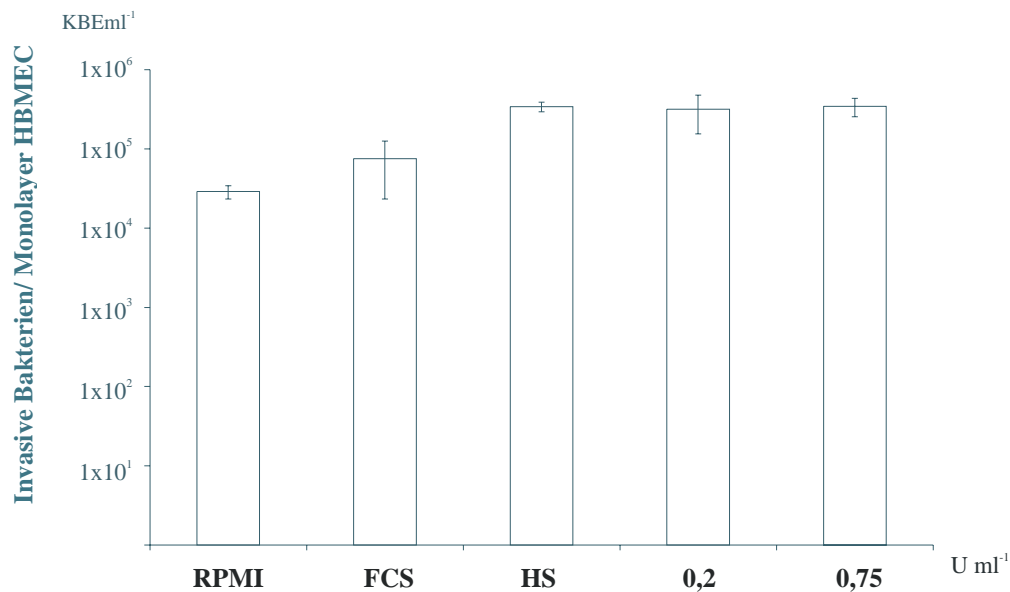


Abb. 34: Darstellung der gemittelten Invasionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Zugabe von Heparinase III zu 10%igem humanen Serum/RPMI in ansteigender Konzentration. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich kein signifikanter Einfluß der enzymatischen Digestion von Heparansulfatproteoglykanen durch Heparinase III auf die Invasion der kapseldefizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen beobachten.

3.5. Einfluß der Zytoskelettfunktion auf die Invasion Opc-exprimierender Meningokokken in HBMEC-Zellen

Die endozytotische Passage eukaryonter Zellbarrieren stellt einen weit verbreiteten Pathomechanismus von Mikroorganismen dar. Voraussetzung für die Internalisierung der Erreger und nachfolgende Freisetzung an der gegenüberliegenden Zellmembran ist eine intakte Zytoskelettfunktion der jeweiligen Endo- bzw. Epithelzellen. Während in Studien mit Gruppe B-Streptokokken eine endozytotische Aufnahme der Erreger in HBMEC-Zellen bereits nachgewiesen werden konnte (Nizet *et al.*, 1997), ist das Wissen über die Bedeutung para- bzw. transzellulärer Mechanismen für die Passage der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke durch *N. meningitidis* noch unvollständig.

3.5.1. Infektionsversuche unter Zugabe von Zytoskeletthinhibitoren

Um herauszufinden, inwieweit die Aufnahme der Opc-exprimierenden Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* in menschliche Hirnendothelzellen eine intakte Mikrofilament- und Mikrotubulifunktion des Zytoskeletts der Zellen voraussetzt, wurden in der vorliegenden Arbeit Infektionsversuche nach 30minütiger Präinkubation von HBMEC-Zellen mit den Zytoskeletthinhibitoren Cytochalasin D und Colchizin durchgeführt. Cytochalasin D hemmt die Mikrofilamentaggregation, während Colchizin die Mikrotubulipolymerisation inhibiert. Die Substanzen wurden in einer Konzentration von $0,1\mu\text{g ml}^{-1}$, $0,25\mu\text{g ml}^{-1}$ und $0,5\mu\text{g ml}^{-1}$ respektive $10\mu\text{g ml}^{-1}$, $20\mu\text{g ml}^{-1}$ und $40\mu\text{g ml}^{-1}$ in 10%igem humanen Serum/RPMI gelöst. Während der Versuche wurde die Kern- und Zellmorphologie der eingesetzten HBMEC-Zellen regelmäßig mittels Zytopspin-Verfahren überprüft. Als Kontrollmedien wurden RPMI 1640 Medium und 10%iges humanes Serum/RPMI eingesetzt.

Ergebnisse

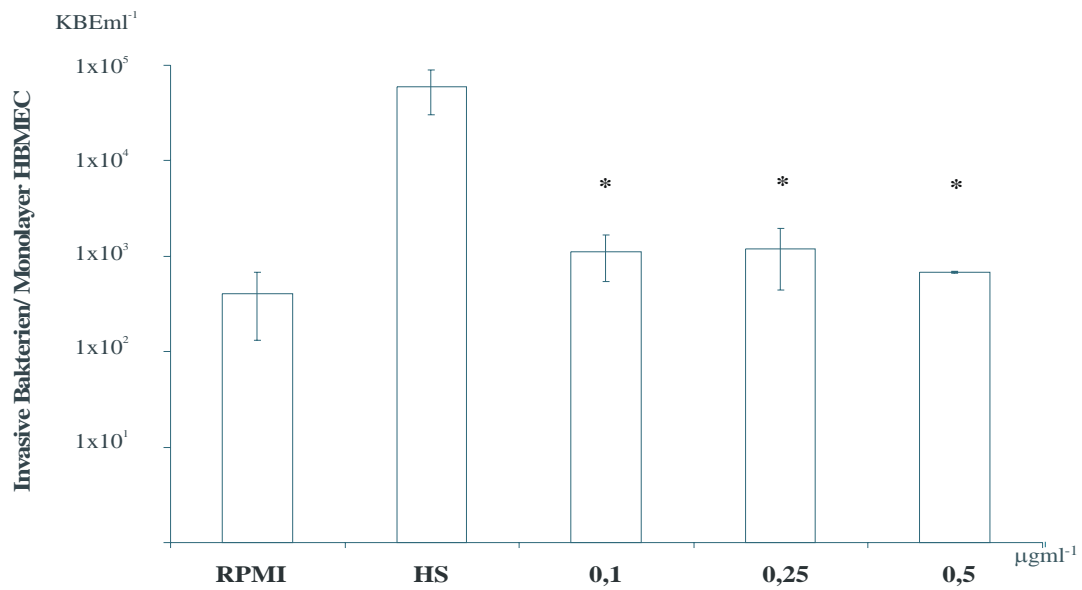


Abb. 35: Darstellung der gemittelten Invasionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Präinkubation mit Cytochalasin D in ansteigender Konzentration. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde (* bezeichnet $p < 0,05$ im Vergleich zu der Inkubation mit 10% HS/RPMI).

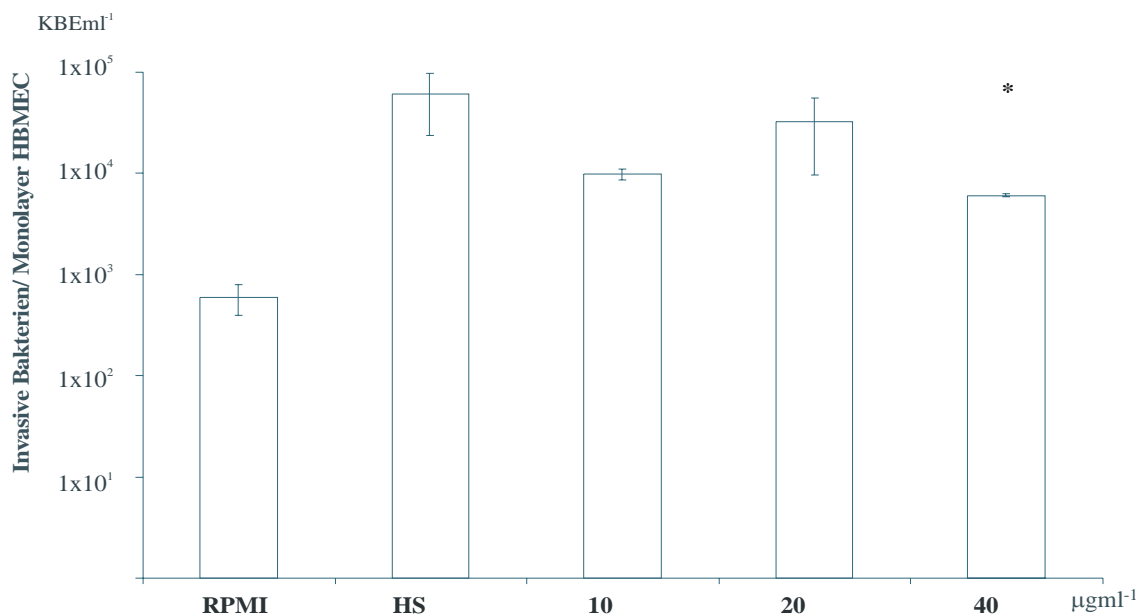


Abb. 36: Darstellung der gemittelten Invasionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Präinkubation mit Colchizin in ansteigender Konzentration. Den dargestellten Ergebnissen liegen drei unabhängig durchgeführte Experimente zugrunde (* bezeichnet $p < 0,05$ im Vergleich zu der Inkubation mit 10% HS/RPMI).

Nach Zugabe von Cytochalasin D wurde ein signifikanter inhibierender Effekt auf die Serum-vermittelte Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen beobachtet, der bereits ab einer Konzentration von $0,1\mu\text{g ml}^{-1}$ keine weitere Steigerung zeigte (Abb. 35). Die Präinkubation von HBMEC-Zellen mit $0,5\mu\text{g ml}^{-1}$ Cytochalasin D führte zu einer signifikanten Abnahme der Invasionswerte in 10%igem humanen Serum/RPMI um 98,9%. Dies entspricht einer nahezu vollständigen Inhibition der invasionsfördernden Wirkung von 10%igem humanen Serum/RPMI. Während in 10%igem humanen Serum/RPMI im Mittel $6,0 \times 10^4$ KBE ml^{-1} intrazelluläre Bakterien ausgezählt wurden, waren es nach Präinkubation mit $0,5\mu\text{g ml}^{-1}$ Cytochalasin D durchschnittlich $6,8 \times 10^3$ KBE ml^{-1} ($p < 0,05$). Im Rahmen einer siebenstündigen Kinetik konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibition der Serum-vermittelten Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen keiner zeitlichen Abhängigkeit unterliegt. Vielmehr ließ sich sowohl nach zwei-, als auch nach vier- und sechsstündiger Inkubation mit $0,5\mu\text{g ml}^{-1}$ Cytochalasin D eine signifikante Minderung der Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen um 95% gegenüber der Invasion in 10%igem humanen Serum beobachten (Daten nicht gezeigt).

In Übereinstimmung zu den Versuchen unter Zugabe von Cytochalasin D resultierte die Präinkubation von HBMEC-Zellen mit Colchizin in einer signifikanten Inhibition der Invasion von MC58 *siaD*, wenngleich sich die inhibierende Wirkung von Colchizin stark konzentrationsabhängig darstellte (Abb. 36). Nach Präinkubation der HBMEC-Zellen mit Colchizin in einer Konzentration von $40\mu\text{g ml}^{-1}$ wurde eine signifikante Reduktion der Invasionswerte um 90% beobachtet - von $6,0 \times 10^4$ KBE ml^{-1} in 10%igem humanen Serum/RPMI auf durchschnittlich $6,0 \times 10^3$ KBE ml^{-1} intrazelluläre Bakterien nach Zugabe von Colchizin ($p < 0,05$). Die Präinkubation von HBMEC-Zellen sowohl mit Cytochalasin D als auch mit Colchizin nahm keinen Einfluß auf die Adhärenz von MC58 *siaD* an HBMEC-Zellen.

4. Diskussion

Neisseria meningitidis besitzen einen ausgeprägten Tropismus zu den Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke und sind in der Lage, in die zerebrospinale Flüssigkeit zu invadieren. Die Penetration der nasopharyngealen Schleimhaut, die hämatogene Dissemination und schließlich der Übertritt der Bakterien in den Liquorraum durch Passage der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke stellen die wesentlichen Komponenten der Pathogenese einer invasiven Meningokokken-Erkrankung dar. Die menschliche Blut-Hirn/Liquor-Schranke ist eine endotheliale Barriere, die das ZNS vor dem Übertritt zerebrotoxischer Substanzen aus dem Blut in die Zerebrospinalflüssigkeit schützt und die Aufrechterhaltung einer biochemischen Homöostase innerhalb des ZNS garantiert. Angesichts eines lange Zeit fehlenden *in-vitro* Modells des okklusiven menschlichen Hirnendothels ist das Wissen über die zugrundeliegenden Pathomechanismen der Passage der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke unvollständig. In vorangegangenen Studien mit *N. meningitidis* ließ sich eine direkte Interaktion der Erreger mit der luminalen Seite des Zerebralendothels als Bestandteil der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke beobachten. Als invasionsfördernde Pathogenitätsfaktoren von *N. meningitidis* konnten die Pili und das PilC-Protein sowie die Außenmembranproteine Opa und Opc in Studien mit epithelialen und endothelialen Zellreihen identifiziert werden (Virji *et al.*, 1994, 1995; McNeil und Virji, 1997; Pron *et al.*, 1997; Hardy *et al.*, 2000).

4.1. Analyse unterschiedlicher klonaler Linien von *Neisseria meningitidis*

Während eine asymptomatische Besiedlung des Nasopharynx mit *N. meningitidis* innerhalb der Bevölkerung je nach geographischer Lage in bis zu 40% beobachtet werden kann, stellen invasive Meningokokken-Erkrankungen sehr viel seltenere Ereignisse dar. Reine Träger-Isolate lassen sich von solchen Isolaten unterscheiden, die in kurzer Zeit eine fulminante Meningokokken-Erkrankung des Patienten hervorrufen. Letztere werden als hypervirulente oder hyperinvasive Stämme bezeichnet und sind in der Lage, Erkrankungen mit überdurchschnittlich hohen Mortalitäts- und Komplikationsraten hervorzurufen (Kriz *et al.*, 2000). Die Charakteristika einzelner hypervirulenter klonaler Linien, deren Zelltropismus und die zugrundeliegenden

Pathomechanismen einer foudroyanten Meningokokkenerkrankungen galt es, in der vorliegenden Arbeit zu identifizieren.

In Infektionsversuchen mit den bekapselten Isolaten MC58*, C2120 und A2044 sowie den isogenen kapseldefizienten Mutanten MC58 *siaD*, C2120 *siaD* und A2044 *cps* als repräsentativen Vertretern der hypervirulenten klonalen Linien ST-32, ST-11 und ST-1 (Achtman, 1995a,b) gelang der Nachweis einer Adhärenz und Invasion sowohl der unbekapselten als auch der bekapselten Meningokokken-Isolate in HBMEC-Zellen. Gleichwohl konnte in der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien an epithelialen Zellen gezeigt werden, dass der Verlust der Kapselexpression zu einer signifikant gesteigerten Invasion der Bakterien in menschliche Hirnendothelzellen führt. Der Verlust der Kapselexpression resultierte in den dargestellten Infektionsversuchen in einem 8- (C2120 *siaD*) bzw. 16-fachen Anstieg (MC58 *siaD*) der Invasionswerte. Die deutlich geringeren Invasionswerte der bekapselten ST-1, ST-32 und ST-11 Isolate stehen in Übereinstimmung mit dem Nachweis eines inhibierenden Effekts der Polysaccharidkapsel und sialisierter Lipooligosaccharide auf die Interaktion zwischen Meningokokken und menschlichen Epi- und Endothelzellen in vorangegangenen Studien (Virji *et al.*, 1991, 1992, 1994; Hammerschmidt *et al.*, 1994; de Vries *et al.*, 1996). Die Adhärenz der eingesetzten Isolate an HBMEC-Zellen wurde durch die Kapselexpression bzw. Kapseldefizienz nicht beeinflusst. Die Expression des Kapselpolysaccharids ermöglicht die systemische hämatogene Dissemination von *N. meningitidis* durch Prävention einer Opsonisierung und Phagozytose bzw. einer Komplement-vermittelten Bakteriolyse (Hammerschmidt *et al.*, 1994; Jarvis, 1994). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluß zu, dass der anschließende Verlust der Kapselexpression im Rahmen eines slipped-strand mispairing Ereignisses zu einer Demaskierung jener Außenmembrankomponenten von *N. meningitidis* führt, die in den Prozess der Internalisierung der Erreger in HBMEC-Zellen involviert sind.

In Analogie zu den physiologischen Bedingungen von *N. meningitidis* zum Zeitpunkt des Übertritts aus dem Blut in den Liquorraum wurde in vorangegangenen Studien der Einfluß von humanem Serum auf die Interaktion von ST-32 Isolaten mit HBMEC-Zellen untersucht (Unkmeir *et al.*, 2002a). Für die kapseldefiziente Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* wurde eine um den Faktor 100 gesteigerte Invasion in die Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke in Anwesenheit von 10%igem humanen

Serum/RPMI beschrieben. Die bekapselte isogene Mutante MC58 zeigte eine im Durchschnitt 10-fach geringere Internalisierung in HBMEC-Zellen nach Zugabe von 10%igem humanen Serum/RPMI. Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit reproduziert. In Infektionsversuchen mit der Opc-exprimierenden Mutante MC58* und der Opc-defizienten Mutante MC58* *opc* wurde in der vorliegenden Arbeit darüberhinaus eine 10-fach stärkere Invasion von MC58* gegenüber MC58* *opc* beobachtet. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen ließ sich ferner eine signifikant gesteigerte Invasion der Opc-exprimierenden, kapseldefizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* in Anwesenheit von 10%igem humanen Serum beobachten. Die Inkubation mit 10%igem bovinen Serum führte zwar zu einer gegenüber RPMI 1640 Medium gesteigerten Internalisierung des ST-32 Isolats in HBMEC-Zellen, doch lagen die Invasionswerte nach Inkubation mit 10%igem humanen Serum um mehr als 400% über jenen Invasionswerten in bovinem Serum. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass humanem Serum eine essentielle Rolle in der Interaktion und Invasion von Serogruppe B Meningokokken in HBMEC-Zellen zukommt. Die Expression des Kapselpolysaccharids bzw. des Außenmembranproteins Opc von *N. meningitidis* scheint einen signifikanten Einfluß auf diese Serum-vermittelte Internalisierung von Serogruppe B Meningokokken in HBMEC-Zellen zu haben.

In der vorliegenden Arbeit konnte weder für Serogruppe C Meningokokken noch für Serogruppe A Meningokokken eine signifikant gesteigerte Serum-vermittelte Invasion der bekapselten bzw. einer isogenen kapseldefizienten Mutante in HBMEC-Zellen beobachtet werden. Als ursächlich für den fehlenden invasionsfördernden Effekt humanen Serums auf die Internalisierung des untersuchten Serogruppe C Stamms C2120 kann die fehlende Expression eines funktionsfähigen Opc-Proteins diskutiert werden. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ST-11 Isolate durch Fehlen des *opc* Gens nicht in der Lage sind, das Außenmembranprotein Opc zu exprimieren (Seiler *et al.*, 1996). Durch nachträgliche Klonierung gelang die Integration des *opc* Gens in das Genom der in den dargestellten Infektionsversuchen eingesetzten Serogruppe C Mutanten C2120 und C2120 *siaD*. Dennoch konnte in der vorliegenden Arbeit keine funktionelle Expression des Außenmembranproteins Opc mittels Western Blot nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde von der Arbeitsgruppe um M. Virji die erfolglose Klonierung des *opc* Gens in das Genom von *E.coli*-Stämmen beschrieben (Virji *et al.*, 1994). Darüberhinaus ist zu diskutieren, inwieweit eine Veränderung in der Konfiguration des Opc-Proteins bzw. dessen

Verankerung in der bakteriellen Membran in einer gestörten Interaktion mit Rezeptoren menschlicher Hirnendothelzellen resultiert.

Für Serogruppe A Meningokokken konnte in der vorliegenden Arbeit eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Serum-vermittelten Invasion des kapseldefizienten ST-1 Isolats A2044 *cps* in HBMEC-Zellen und der Stärke der Opc-Expression nachgewiesen werden. Die Inkubation mit 10%igem humanem Serum/RPMI führte zu einer gesteigerten Invasion lediglich jener A2044 *cps* Klone, die zuvor mittels Antikörper-Hybridisierung hinsichtlich einer ausgeprägten Opc-Expression selektioniert worden waren. Ein signifikanter Einfluß von humanem Serum im Sinne einer gesteigerten Internalisierung ließ sich für die eingesetzten Serogruppe A Isolate nicht beobachten. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, dass eine ausgeprägte Variabilität der Opc-Expression durch Serogruppe A Isolate eine gesteigerte, Serum-vermittelte Invasion der Bakterien beeinträchtigt.

Es stellt sich die Frage, inwieweit eine Serum-vermittelte Invasion - abhängig von der Expression des Außenmembranproteins Opc - spezifisch für *N. meningitidis* Isolate der Serogruppe B ist. Hypervirulente Meningokokken des ST-11 Komplexes, zu deren Vertretern vornehmlich Serogruppe C Meningokokken zählen, zeigen eine besonders häufige Assoziation mit schwerwiegenden, oft letal verlaufenden Septikämien, meist ohne das Auftreten einer ausgeprägten meningealen Entzündung (Kriz *et al.*, 1995; Struncova *et al.*, 1998). Ausgehend von diesen Beobachtungen kann eine eingeschränkte Interaktion von ST-11 Isolaten mit den Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke diskutiert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern die Hypothese, dass die molekularen Mechanismen der Adhärenz und Invasion unterschiedlicher *N. meningitidis* Serogruppen in ihrer Abhängigkeit von Außenmembrankomponenten und externen Faktoren signifikant differieren.

4.2. Identifikation von Fibronectin als invasionsfördernde Komponente humanen Serums

In vorangegangenen Studien konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der Serum-vermittelten Invasion von Serogruppe B Meningokokken in HBMEC-Zellen nachgewiesen werden. Humanes Serum führte bereits in geringen Konzentrationen von 1% zu einem Anstieg der bakteriellen Aufnahme in HBMEC-Zellen. In Gegenwart von

10%igem HS konnte die Internalisierung der Erreger maximal gesteigert werden. In Übereinstimmung zu diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit eine maximal gesteigerte Invasion der eingesetzten Serogruppe B Isolate in Anwesenheit von 10%igem humanen Serum/RPMI beobachtet. Die Adhärenz der Isolate an HBMEC-Zellen blieb unbeeinflusst von der Konzentration humanen Serums. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, dass die invasionsfördernde Wirkung nicht auf eine gesteigerte Adhärenz der Bakterien in der Gegenwart von humanem Serum zurückzuführen ist, sondern durch einen direkten Effekt von Serumbestandteilen auf die Invasion der Erreger in die Zielzellen bedingt ist. Die Tatsache, dass das Erhitzen von humanem Serum auf 95°C in vorangegangenen Studien zu einem vollständigen Verlust des invasionssteigernden Effekts von humanem Serum führte (Unkmeir *et al.*, 2002a), lässt auf den Proteincharakter der invasionsvermittelnden Serumkomponenten schließen.

In der vorliegenden Arbeit wurden chromatographisch separierte Fraktionen humanen Serums im Rahmen von Infektionsversuchen analysiert. Nur für wenige Fraktionen ließ sich eine signifikante invasionsfördernde Wirkung auf die Internalisierung von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen beobachten. Die Analysen der Serumfraktionen mittels SDS-PAGE und Silberfärbung ließen den Schluß zu, dass eine Serumkomponente mit einem Molekulargewicht von etwa 220kDA essentiell für die Interaktion Opc-exprimierender Serogruppe B Meningokokken mit HBMEC-Zellen ist. So konnte in jenen Fraktionen, die die Aufnahme der Bakterien in HBMEC-Zellen signifikant zu steigern vermochten, das menschliche Serumglykoprotein Fibronectin nachgewiesen werden. Fibronectin ist in Konzentrationen von 200-700µg ml⁻¹ Bestandteil des menschlichen Plasmas, Liquors und der Amnionflüssigkeit, bzw. kommt als schwerer lösliches multimeres Molekül u.a. in der extrazellulären Matrix vor. Für eine Vielzahl pathogener Erreger wie *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia spp.*, *Staphylococcus aureus* und *N. gonorrhoeae*, ist die besondere Bedeutung extrazellulärer Matrixmoleküle wie Fibronectin und Vitronectin nachgewiesen (Kuusela, 1978; Tamura und Rubens, 1995; van der Flier *et al.*, 1995; van Putten *et al.*, 1998a). In vorangegangenen Studien mit *N. meningitidis* konnte gezeigt werden, dass bekapselte Isolate sowohl mit zellulärem als auch mit löslichem Fibronectin interagieren (Eberhardt *et al.*, 1998). Neben Fibronectin ist Vitronectin ein bekanntes Glykoprotein menschlichen Serums, das als Brückenmolekül für die Interaktion von Meningokokken mit HUVEC-Zellen beschrieben wurde (Virji *et al.*, 1994). Opc-exprimierende

Meningokokken interagieren über die Bindung von Vitronektin mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen auf der Apikalseite des peripheren Endothels.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl 10%iges humanes Serum als auch Fibronektin-beihaltende Serumfraktionen Fibronektin-depletiert. In den anschließend durchgeführten Infektionsversuchen wurde eine signifikant geminderte Internalisierung von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen detektiert. Die Depletion des Serumglykoproteins Vitronektin aus 10%igem humanen Serum/RPMI zeigte in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluß auf die Invasion des ST-32 Isolats in HBMEC-Zellen. Darüber hinaus konnten mittels Western Blot weder Vitronektin noch Tenascin oder Thrombospondin in den eingesetzten invasionssteigernden Serumfraktionen nachgewiesen werden.

Die Bindung humanen Fibronektins durch Opc-exprimierende Serogruppe B Meningokokken wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Western Blot verifiziert. Die Tatsache, dass für die isogene, *opc* defiziente Mutante MC58 *siaD*, *opc* keine Fibronektin-Bindung nachgewiesen werden konnte, legt den Schluß nahe, dass humanes Fibronektin durch das Außenmembranprotein Opc von *N. meningitidis* gebunden wird. Angesichts der dargestellten Ergebnisse muß eine Fibronektin-vermittelte Invasion Opc-exprimierender Serogruppe B Meningokokken in HBMEC-Zellen diskutiert werden, in deren Rahmen Fibronektin als Brückenmolekül zwischen *N. meningitidis* und zellulären Rezeptoren fungiert. Eine ähnliche Fibronektin-vermittelte Adhärenz und Internalisierung wurde für SfbI (*S. pyogenes* fibronectin-binding protein)-exprimierende Gruppe A Streptokokken in Studien mit Hep2-Zellen nachgewiesen (Molinari *et al.*, 1997). Ebenso konnten die Serumglykoproteine Fibronektin und Vitronektin als Brückenmoleküle zwischen OpaA Proteinen von *N. gonorrhoeae* und korrespondierenden Integrinrezeptoren auf Hep2- und HeLa-Zellen beschrieben werden (Duensing *et al.*, 1997; Gomez-Duarte *et al.*, 1997; van Putten *et al.*, 1998a).

Nach Fibronektin-Depletion wurden in der vorliegenden Arbeit lösliches und zelluläres humanes Fibronektin in ansteigender Konzentration substituiert. Die erneute Zugabe des Serumglykoproteins resultierte in einem partiellen Anstieg der Invasionswerte. In den durchgeführten Infektionsversuchen wurde kommerziell hergestelltes Fibronektin eingesetzt. Dieses ist zu 95% aufgereinigt, weist jedoch zu einem geringen Teil noch immer Heparin-bindende Bestandteile auf. Es bleibt zu diskutieren, inwieweit freie Heparin-Bindungsdomänen die Interaktion zwischen Fibronektin und dem Außenmembranprotein Opc von *N. meningitidis* behindern, so dass die Substitution von Fibronektin nicht zu einer vollständigen Restauration der Invasionswerte führt. Die

Überprüfung dieser Hypothese durch Substitution von Fibronectin, das chromatographisch aus humanem Serum eluiert und zu 100% aufgereinigt ist, muß Thema zukünftiger Forschung bleiben. Intaktes Fibronectin zeigt darüber hinaus eine starke Tendenz zur Aggregation, so dass diskutiert werden kann, inwieweit eine wesentliche Fraktion des substituierten Fibronectins in einer physikalischen Konformation vorliegt, die eine Interaktion mit dem Außenmembranprotein Opc verhindert. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete signifikante Abnahme der Internalisierung von Serogruppe B Meningokokken in HBMEC-Zellen bei Substitution hoher Konzentrationen von Fibronectin (20% und mehr) erklärt sich möglicherweise aus der Existenz der dualen Natur Fibronectins. Neben seiner Funktion als Mediator unterschiedlicher Interaktionsprozesse kann Fibronectin die Rolle eines kompetitiven Inhibitors einnehmen, sofern es in hohen Konzentrationen in einer Lösung vorliegt (Yamada und Kennedy, 1984).

Die Substitution humanen Vitronectins im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte keine invasionsfördernde, sondern vielmehr eine inhibierende Wirkung auf die Invasion der kapseldefizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD*. Die Inkubation mit humanem Fibrinogen beeinflusste weder die Adhärenz noch die Invasion von MC58 *siaD* im *in-vitro* Modell der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke. Auch unter Verwendung bovinen Fibronectins gelang es in analogen Infektionsversuchen nicht, die Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen zu steigern. Eine mögliche Spezifität für humanes Fibronectin könnte die ausschließliche Humanpathogenität von Meningokokken erklären. Ein humanspezifisches Bindungsverhalten konnte bereits für Eisen-bindende Proteine von *N. meningitidis* nachgewiesen werden (Simonson *et al.*, 1982).

4.3. Identifikation des Fibronectin-Rezeptors auf HBMEC-Zellen

In vorangegangenen Studien wurde die inhibierende Wirkung des RGD-Peptids GRGDTP auf die Invasion der kapseldefizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen in Anwesenheit von humanem Serum nachgewiesen (Unkmeir *et al.*, 2002a). Eine Serum-vermittelte Bindung von MC58 *siaD* an Rezeptoren mit RGD-Bindungsmotiven wurde diskutiert. In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis einer signifikanten invasionsfördernden Wirkung des Serumglykoproteins Fibronectin. Es ist bekannt, dass *N. meningitidis* MC58 Isolate Fibronectin innerhalb eines N-

terminalen, 75kDa großen Fibronectin-Fragments binden, das jedoch kein RGD-Motiv beinhaltet (Eberhard *et al.*, 1998). Es kann daher vermutet werden, dass Meningokokken nach Inkubation mit humanem Serum an das Serumglykoprotein Fibronectin binden und dass selbiges als Brückenmolekül zwischen der bakteriellen Oberfläche und einem RGD-Bindungsmotiv endothelialer Rezeptoren auf HBMEC-Zellen fungiert. Fibronectin bindet über eine RGD-Bindungssequenz innerhalb der Typ III-Region an die Subfamilie von Integrinrezeptoren $\alpha_{3-6}\beta_1$ (Pierschbacher und Ruoslahti, 1987). RGD-Bindungsepitope konnten u.a. für die Integrinrezeptoren $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ nachgewiesen werden (Dejana, 1991). Es ist bekannt, dass die Bindung adhäsiver Glykoproteine an übereinstimmende Bindungsepitope auf Integrinrezeptoren eine Rezeptor-vermittelte Endozytose zu induzieren vermag (Panetti und McKeown-Longo, 1993; Panetti *et al.*, 1995).

Die Expression und homogene Verteilung einer Vielzahl von Integrinen auf HBMEC-Zellen einschließlich der Varianten $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$ konnte bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen werden (Isogai *et al.*, 2001). Während Erstere als Rezeptoren von Fibronectin bekannt sind, gelten $\alpha_v\beta_3$ -Integrine als Vitronectin- und $\alpha_2\beta_1$ -Integrine als Laminin-Rezeptoren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Integrine $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ durch die eingesetzten HBMEC-Zellen mittels Western Blot und Durchflußzytometrie verifiziert. Integrine setzen sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammen. Beide Untereinheiten sind Glykoproteine mit relativ großen extrazellulären Domänen, die in der Zellmembran verankert sind (Koivisto *et al.*, 2000). Durch Zugabe monoklonaler Antikörper gegen die Integrin-Untereinheiten α_5 und β_1 gelang eine signifikante Inhibition der Internalisierung von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen in Gegenwart von 10%igem humanen Serum/RPMI bzw. in Gegenwart jener Serumfraktionen, die die Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen signifikant zu steigern vermochten. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Studien, die die Fibronectin-bindende RGD-Bindungsdomäne von Integrinen als Bestandteil der β_1 -Untereinheit beschreiben (Horton, 1990). Nach Blockade der α_5 -Untereinheit unter Verwendung eines monoklonalen Anti- α_5 -Antikörpers konnte in der vorliegenden Arbeit nur eine partielle Inhibition der Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen beobachtet werden. Bei kombinierter Blockade sowohl der α_5 - als auch der β_1 -Untereinheit unter Verwendung eines Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Antikörpers gelang demgegenüber eine nahezu vollständige Inhibition der Aufnahme von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen. Diese

Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass $\alpha_5\beta_1$ -Integrine essentielle Rezeptoren der beschriebenen Fibronectin-vermittelten Invasion Opc-exprimierender Serogruppe B Meningokokken in HBMEC-Zellen sind. Die Bindung beider Untereinheiten scheint für eine signifikant gesteigerte Invasion essentiell.

Neben Integrinen konnte für Heparansulfatproteoglykane eine wesentliche Bedeutung in der Vermittlung von Adhärenz, Migration und Differenzierung von Zielzellen, von Blutkoagulation und Lipidhomöostase beschrieben werden (Couchman und Woods, 1993; Carey, 1997). Proteoglykane stellen eine Familie membranständiger Oberflächenmoleküle dar, deren Seitenketten durch ein oder mehrere kovalent verknüpfte Glykosaminoglykane unterschiedlichen Aufbaus und Länge substituiert sind. Viele der Proteoglykan-vermittelten biologischen Effekte gehen auf das Proteingrundgerüst sowie die chemischen und physikalischen Eigenschaften der jeweiligen Glykosaminoglykan-Seitenketten zurück, die als Rezeptoren für eine Vielzahl von Molekülen dienen. Ein Ligand-Glykosaminoglykan-Komplex kann entweder direkt als Mediator einer Signaltransduktionskaskade fungieren oder alternativ die Interaktion des Liganden mit einem zweiten Rezeptor erleichtern (Couchman und Woods, 1996; Carey, 1997). Für Bakterien wie *Bordetella pertussis*, *Listeria monocytogenes* und *Chlamydia spp.* ist die Bindung an Epitope sulfatierter Polysaccharide von Heparansulfatproteoglykanen mit nachfolgender Invasion beschrieben (Geuijen *et al.*, 1996; Su *et al.*, 1996; Alvarez-Dominguez *et al.*, 1997). Proteoglykane dienen ferner als Bindungspartner verschiedener Opa-Proteine von *N. gonorrhoeae* (Chen *et al.*, 1995; van Putten und Paul, 1995). Eine Fibronectin-vermittelte Internalisierung von Gonokokken in epitheliale Hep2-Zellen unter Bindung an Heparansulfatproteoglykanrezeptoren ist beschrieben (van Putten *et al.*, 1998). In Studien mit *N. meningitidis* konnten Heparansulfatproteoglykane als Rezeptoren des Außenmembranproteins Opc auf menschlichen Epithelzellen identifiziert werden (de Vries *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung von Heparansulfatproteoglykanen als potentiellen Rezeptoren einer Serum- bzw. Fibronectin-vermittelten Interaktion Opc-exprimierender MC58 Isolate mit HBMEC-Zellen untersucht werden. Für die Infektionsversuche wurde die kapseldefiziente Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* ausgewählt. In vorangegangenen Studien mit menschlichen Epithelzellen war bereits nachgewiesen worden, dass bekapselte Serogruppe B Mutanten signifikant geringer internalisiert werden und eine geringere Bindungskapazität für lösliche Proteoglykanrezeptoren zeigen als Mutanten ohne

Kapselexpression. In der vorliegenden Arbeit wurden HBMEC-Zellen sowohl mit Heparin als auch mit Heparansulfat präinkubiert. Als Rezeptoranaloga blockieren diese die Bindungsmotive bakterieller Rezeptoren für Heparansulfatproteoglykane. In Studien mit *Chlamydia trachomatis*, *N. gonorrhoeae* und dem *Herpes-simplex-Virus* wurde ein signifikant inhibierender Effekt sowohl von Heparin als auch von funktionell verwandten sulfatierten Polysacchariden auf die Adhärenz und Invasion der Erreger beschrieben (Herold *et al.*, 1997; Rostand und Esko, 1997). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte in der vorliegenden Arbeit weder ein signifikant inhibierender Einfluß von Heparin noch von Heparansulfat auf die Interaktion der kapseldefizienten Serogruppe B Mutante MC58 *siaD* mit HBMEC-Zellen beobachtet werden. Auch die Präinkubation von HBMEC-Zellen mit Heparinase III zeigte keinen signifikanten Einfluß auf die Adhärenz und Invasion von MC58 *siaD*. Heparinase III führt zu einem enzymatischen Abbau der Glykosaminoglykanseitenketten oberflächlicher Heparansulfatproteoglykane. In vorangegangenen Studien mit *N. gonorrhoeae* gelang der Nachweis einer inhibierenden Wirkung von Heparinase III auf die Fibronektin-vermittelte Internalisierung der Bakterien (van Putten *et al.*, 1998). Ebenso konnte in Studien mit Meningokokken nachgewiesen werden, dass die enzymatische Digestion der Heparansulfat-Motive von Glykosaminen die Opc-vermittelte Interaktion mit epithelialen Chang-Zellen inhibiert (de Vries *et al.*, 1998).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluß zu, dass Heparansulfatproteoglykane keine wesentliche Bedeutung für die Interaktion Opc-exprimierender Serogruppe B Meningokokken mit humanen zerebralen Endothelzellen haben. Dieser Nachweis stimmt mit den Ergebnissen vorangegangener Studien an endothelialen HUVEC-Zellen überein, die keinen signifikanten Einfluß von Proteoglykanen auf die Opa-vermittelte Interaktion von *N. meningitidis* zeigen konnten (Virji *et al.*, 1999). In den parallel durchgeführten analogen Infektionsversuchen mit epithelialen Hep2-Zellen und MC58 *siaD* ließ sich in der vorliegenden Arbeit die für epitheliale Zelllinien beschriebene Inhibition der bakteriellen Aufnahme vollständig reproduzieren.

Bislang ist ungeklärt, ob die Passage des okklusiven menschlichen Hirnendothels durch *N. meningitidis* die Folge eines para- oder transzellulären Übertritts ist. Ein weit verbreiteter Pathomechanismus zur Überwindung von Zellbarrieren durch Mikroorganismen beruht auf einer gesteigerten Endozytose eukaryonter Zellen.

Voraussetzung ist zum einen die aktive Synthese von DNA, RNA und anderen Proteinen durch die Bakterien, zum anderen eine intakte Mikrofilament- und Mikrotubulifunktion des Zytoskeletts der eukaryonten Zielzellen (Nizet *et al.*, 1997). In der Pathogenese einer invasiven Meningokokken-Erkrankung ist die Frage nach der Bedeutung von Zytoskelett-Modifikationen für die Interaktion von *N. meningitidis* mit dem menschlichen Hirnendothel noch nicht beantwortet. Gleichwohl werden Zytoskelett-Modifikationen, induziert durch Pili-Zell-Interaktion, sowie die Öffnung von Interzellularverbindungen als wesentliche Komponenten der Passage der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke durch Meningokokken diskutiert (Pujol *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte in Infektionsversuchen mit eukaryontischen Zytoskelettinhibitoren ein signifikanter Einfluß der Zytoskelettfunktion für die Invasion Opc-exprimierender Serogruppe B Meningokokken in HBMEC-Zellen nachgewiesen werden. Nach Präinkubation von HBMEC-Zellen sowohl mit Cytochalasin D als auch mit Colchizin wurde eine konzentrationsabhängige, nahezu vollständige Inhibition der Serum-vermittelten Internalisierung von MC58 *siaD* beobachtet. Diese Ergebnisse lassen auf die essentielle Bedeutung einer intakten Zytoskelettfunktion für die Invasion von Serogruppe B Meningokokken in HBMEC-Zellen schließen. Eine endozytotische Aufnahme der Bakterien in die Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke bleibt zu diskutieren. Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit stehen in Einklang mit Invasionsstudien an Gruppe B Streptokokken, dem bedeutensten Erreger lebensbedrohlicher Meningitiden in der Neonatalperiode. Mikrofilamente und Mikrotubuli als Elemente des Zytoskeletts wurden in diesen Studien als essentielle Komponenten einer effizienten endozytotischen Aufnahme der Erreger in eukaryonte Zellen beschrieben (Nizet *et al.*, 1997). Der elektronenmikroskopische Nachweis einer endozytotischen Aufnahme von *N. meningitidis* in HBMEC-Zellen muß ebenso wie die Identifikation zugrundeliegender Signaltransduktionskaskaden Thema zukünftiger Studien sein.

5. Zusammenfassung

Ein zentrales Ereignis in der Pathogenese einer bakteriellen, durch *N. meningitidis* verursachten Meningitis stellt die Interaktion der Bakterien mit den Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke dar. In der vorliegenden Arbeit konnten in Infektionsversuchen mit immortalisierten HBMEC-Zellen als etabliertem *in-vitro* Modell des okklusiven menschlichen Hirnendothels und *N. meningitidis* Isolaten unterschiedlicher klonaler Linien Pathomechanismen für die Interaktion von Meningokokken mit dem Endothel der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke identifiziert werden. Diese unterscheiden sich von jenen Pathomechanismen, die die Interaktion von Meningokokken und Epithelzelllinien bzw. peripheren Endothelzellen bestimmen. Die untersuchten hypervirulenten klonalen Linien ST-32, ST-11 und ST-1 zeigen *in-vivo* signifikante Unterschiede in ihrem Ausbreitungsverhalten und meist unterschiedliche Krankheitsverläufe. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die molekularen Mechanismen der Adhärenz und Invasion von *N. meningitidis* Serogruppe A, B und C Isolaten in ihrer Abhängigkeit von Außenmembrankomponenten und externen Faktoren differieren.

Die Invasion von Serogruppe B Meningokokken konnte in Infektionsversuchen mit dem Serogruppe B Stamm MC58 als repräsentativem Vertreter der hypervirulenten klonalen Linie ST-32 als Folge einer trifaktoriellen Interaktion mit den Zellen der menschlichen Blut-Hirn/Liquor-Schranke identifiziert werden: (I) Die Internalisierung der Serogruppe B Isolate in HBMEC-Zellen ist von der Expression des Außenmembranproteins Opc sowie (II) von der Anwesenheit des Serumglykoproteins Fibronectin abhängig, das als invasionsfördernde Komponente humanen Serums die Bindung von Meningokokken an spezifische Rezeptoren auf HBMEC-Zellen vermittelt. Fibronectin bindet (III) als Brückenmolekül an RGD-Bindungsmotive der $\alpha_5\beta_1$ -Integrine auf HBMEC-Zellen. Diese stellen spezifische Rezeptoren der Fibronectin-vermittelten Invasion Opc-exprimierender Serogruppe B Meningokokken in zerebrale menschliche Hirnendothelzellen dar. Weder für Serogruppe A noch für Serogruppe C Meningokokken konnte in der vorliegenden Arbeit eine Serum-vermittelte Invasion in HBMEC-Zellen beschrieben werden. Als ursächlich können die natürlicherweise fehlende Opc-Expression durch Isolate des ST-11 Komplexes sowie eine ausgeprägte Variabilität der Opc-Expression durch die analysierten ST-1 Isolate diskutiert werden.

Zusammenfassung

Die wesentliche Bedeutung der Zytoskelettfunktion für die Invasion von *N. meningitidis* in HBMEC-Zellen konnte in Infektionsversuchen mit eukaryontischen Zytoskelettinhibitoren nachgewiesen werden. Mikrofilamente und Mikrotubuli als Elemente des Zytoskeletts wurden als essentielle Komponenten einer effizienten Internalisierung Opc-exprimierender Serogruppe B Meningokokken in HBMEC-Zellen identifiziert.

6. Literatur

Achtman, M., Neibert, M., Crowe, B. A., Strittmatter, W., Kusecek, B., Weyse, E., Walsh, M., Slawig, B., Morelli, G., Moll, A., and M. Blake (1988). Purification and characterization of eight class 5 outer membrane protein variants from a clone of *Neisseria meningitidis* serogroup A. *J Exp. Med.* **168**:507-525.

Achtman, M. (1995a). Global epidemiology of meningococcal disease, p.159-176. In Cartwright (ed.), *Meningococcal disease*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England.

Achtman, M. (1995b). Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*. *Trends Microbiol* **3**: 186-192.

Achtman, M. (1997). Microevolution and epidemic spread of serogroup A *Neisseria meningitidis* – a review. *Gene* **192**:135-140.

Aho, E. L., Dempsey, J. A., Hobbs, M. M., Klapper, D. G., and J. G. Cannon (1991). Characterization of the *opa* (class-5) gene family of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **5**:1429-1437.

Apicella, M. A. (1995). *Neisseria meningitidis*. In: Mandell GK, Benett JE, Dolin R eds. *Mandell, Douglas and Benett's principles and practice of infectious diseases*, 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995: 1896-909

Badger, J. L., Stins, M. F., and K. S. Kim (1999). *Citrobacter freundii* invades and replicates in human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **67**:4208-4215.

Barkalow, F. J., and J. Schwarzbauer (1991). Localization of the major heparin-binding site in fibronectin. *J Biol Chem* **266**:7812-7818.

Bellomo, R. (1992). The cytokine network in the critically ill. *Anaesth Intensive Care* **20**(3):288-302

Benz, R. (1988). Structure and function of porins from gram-negative bacteria. *Ann Rev Microbiol* **42**:359-393.

Bhat, K. S., Gibbs, C. P., Barrera, O., Morrison, S. G., Jahnig, F., Stern, A., Kupsch, E. M., Meyer T. F., and J. Swanson (1991). The opacity proteins of *Neisseria gonorrhoeae* strain MS11 are encoded by a family of 11 complete genes. *Mol Microbiol* **6**:1073-1076.

Bjerkness, R. , Guttormsen, H. K., Solberg, C. O., and I. M. Wetzler (1995). Neisserial porins inhibit human neutrophil actin polymerization, degranulation, opsonin receptor expression and phagocytosis but prime the neutrophils to increase their oxidative burst. *Infect Immun* **63**:160-167.

- Cartwright, K. A., Stuart, J. M., Jones, D. M., and N. D. Noah (1987). The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect* **99**:591-601.
- Carey, D. J. (1997). Syndecans: multifunctional cell surface co-receptors. *Biochem J* **327**:1-16
- Caugant, D. A., K. Brove, P. Gaustad, K. Bryn, E. Holten, E. A. Hoiby, and L. O. Froholm (1986). Multilocus genotypes determined by enzyme electrophoresis of *Neisseria meningitidis* isolated from patients with systemic disease and from healthy carriers. *J Gen Microbiol* **132**:641-652.
- Caugant, D. A., L. F. Mocca, C. E. Frasch, L. O. Froholm, W. D. Zollinger, and R. K. Selander (1987). Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J Bacteriol* **169**:2781-2792.
- Casey L.C., Balk, R. A., and R. C. Bone (1993). Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* **119**:771-778.
- Chen, T., R. Belland, J. Wilson, and J. Swanson (1995). Adherence of pilus-Opa⁺ gonococci to epithelial cells *in vitro* involves heparan sulfate. *J Exp Med* **182**:511-517.
- Chen, T., and E. C. Gotschlich (1996). CGM1a antigen of neutrophils: a receptor of gonococcal opacity proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:14851-14856.
- Chen, T., Grunert, F., Medina-Marino, A., and E. C. Gotschlich (1997). Several carcinoembryonic antigens (CD66) serve as receptors for gonococcal opacity proteins. *J Exp Med* **135**:1557-1564.
- Claus, H., Vogel, U., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., and M. Frosch (1997). Molecular divergence of the *siaD* locus in different serogroups of *Neisseria meningitidis* expressing polysialic acid capsules. *Mol Gen Gent* **257**:28-34.
- Comstock, L. E., and D. D. Thomas (1991). Characterization of *Borrelia burgdorferi* invasion of cultured endothelial cells. *Microb Pathog* **10**:137-148.
- Couchman, J. R., and A. Woods (1993). Structure and biology of pericellular proteoglycans. In *Cell Surface and Extracellular Conjugates*. Roberts, D.D., and Mecham, R.P. (eds). New York: Academic Press, pp. 33-82
- Couchman, J. R., and A. Woods (1996). Syndecans, signaling and cell adhesion. *J Cell Biochem* **61**:578-584.
- Deghmane, A. E., S. Petit, A. Topilko, Y. Pereira, D. Giorgini, M. Larribe, and M. K. Taha (2000). Intimate adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells is under the control of the *crgA* gene, a novel LysR-type transcriptional regulator. *EMBO J* **19**(5):1068-1078.

- Deghmane A.E., Giorgini D., Laribbe M. Alonso J.M. and Taha M.K. (2002). Downregulation of pili and capsule of *Neisseria meningitidis* upon contact with epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein; *Molecular Microbiology* **43**: 1555-1564
- Dehio, C., S. D. Gray-Owen, and Th. F. Meyer (2000). Host cell invasion by pathogenic *Neisseriae*. *Subcellular Biochemistry*, Vol. **33**: Bacterial Invasion into Eukaryotic Cells, edited by Oelschlaeger and Hacker, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, 2000.
- Dejana, E. (1991). Endothelial cell integrin receptors. In *Vascular Endothelium: Interaction with Circulating Cells*. Gordon, J. L. (ed.). Oxford: Elsevier Science Publishers, pp.31-44
- De Vries, F. P., van der Ende, A., van Putten, J. P. M., and J. Dankert (1996). Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. *Infect Immun* **64**: 2998-3006
- De Vries, F. P., Kuiper, J., De Boer, A. G., Van Berkel, T. J. C., and A. Crisanti (1997). The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacol Rev* **49**:143-145.
- De Vries, F. P., R. Cole, J. Dankert, M. Frosch, and J. P. M. van Putten (1998). *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Mol Microbiol* **27**(6):1203-1212.
- Duensing, T. D., and J. P. M. van Putten (1997). Vitronectin mediates internalization of *Neisseria gonorrhoeae* by Chinese hamster ovary cells. *Infect Immun* **65**:964-970.
- Eberhard, T., Virkola, R., Korhonen, T., Kronvall, G., and Ullberg, M. (1998) Binding to human extracellular matrix by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **66**: 1791-1794.
- Erlander, S. R. (1995). The solution to the seven mysteries of AIDS: the "Trojan Horse". *Med Hypotheses* **44**:1-9.
- Eugène, E. *et al.* (2002). Microvilli-like structures are associated with the internalization of virulent capsulated *Neisseria meningitidis* into vascular endothelial cells. *J Cell Sci*. **115**:1231-1241.
- Feavers, I. M., Gray, S. J., Urwin, R., Russel, J. E., Bygraves, J. A., Kaczmarek, E. B., and M. C. J. Maiden (1999). Multilocus Sequence Typing and Antigen Gene Sequencing in the Investigation of a Meningococcal Disease Outbreak. *J. Clinical Microbiol.* **37**(12):3883-3887
- Feil, E. J., M. C. Maiden, M. Achtman, and B. G. Spratt (1999). The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol* **16**:1496-1502.

- Feil, E. J., M. C. Enright, and B. G. Spratt (2000). Estimating the relative contributions of mutation and recombination to clonal diversification: a comparison between *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* **151**:465-469.
- Finne J., Bitter-Suerbaum D., Goridis C. and U. Finne (1987). An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J Immunol* **138**: 4402-4407
- 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 USA* **86**:1669-1673.
- Frosch, M., and A. Müller (1993). Phospholipid substitution of capsular polysaccharides and mechanisms of capsule formation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **8**(3):483-493.
- Giardina, P. C., Wen, K., K., Williams, R., Lubaroff, D., Blake, M. S., Rubenstein, P. A., and M. A. Apicella (1998). *Neisseria*-encoded porins influence actin dynamics, in vitro. In *Abstracts of the Eleventh International Pathogenic Neisseria Conference* Nassif, X., Quentin-Millet, M. J., and M. K. Taha (eds). Paris: EDK, p.36.
- Gomez-Duarte, O. G., Dehio, M., Guzman, C. A., Chhatwal, G. S., Dehio, C., and T. F. Meyer (1997). Binding of vitronectin to Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* mediates invasion of HeLa cells. *Infect Immun* **65**(9):3857-3866.
- Greenwood, B. M. (1987). The epidemiology of acute bacterial meningitis in tropical Africa, p.61-91. In J. D. Williams and J. Burnie (ed.), *Bacterial meningitis*. Academic Press, Inc. (London), Ltd., London.
- Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K. S., Weiglein, I., Bubert, A., Engelbrecht, F., Stins, M., and M. Kuhn (1998). Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InIB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect Immun* **66**:5260-5267.
- Griffis, J. M., Yamasaki, R., Estabrook, M., and J. J. Kim (1991). Meningococcal mimicry and the search for an ideal vaccine. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **85**, Supplement **1**:32-36.
- Haake, D. A., and M. A. Lovett (1994). Interjunctional invasion of endothelial monolayers. *Methods Enzymol* **236**:447-463.

Haines, K. A., Yeh, L., Blake, M. S., Cristello, P., Korchak, H., and G. Weismann (1988). Protein I, a translocatable ion channel from *Neisseria gonorrhoeae*, selectively inhibits exocytosis from human neutrophils without inhibiting O₂-generation. *J Biol Chem* **263**:945-951.

Haines, K. A., Reibman, J., Tang, X. Y., Blake, M., and G. Weismann (1991). Effects of protein I of *Neisseria gonorrhoeae* on neutrophil activation: generation of diacylglycerol phosphatidylcholine via specific phospholipase C is associated with exocytosis. *J Cell Biol* **114**:433-442.

Hahn, L., and K. Yamaha (1979). Identification and isolation of a collagen-binding fragment of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**:1160-1163.

Hammerschmidt S., Birkholz C., Zähringer U., Robertson B.D., Putten J. van, Ebeling O. 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**: 885-896

Hammerschmidt, S., R. Hilse, J. P. van Putten, R. Gerardy-Schahn, A. Unkmeir, and M. Frosch (1996a). Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO J* **15**:192-198.

Hammerschmidt, S., Muller, A., Sillmann, H., Muhlenhoff, M., Borrow, R., Fox, A., van Putten, J., Zollinger, W. D., Gerardy-Schahn, R., and M. Frosch (1996b). Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol* **20**:1211-1220.

Hardy, S. J., Christodoudiles, M., Weller, R. O., and J. E. Heckels (2000). Interactions of *Neisseria meningitidis* with cells of the human meninges. *Mol Microbiol* **36**:817-829.

Hazelzet, J. A., van der Voort, E., Lindemans, J., ter Heerdt, P. G. J., and H. J. Neijens (1994). Relation between cytokines and routine laboratory data in children with septic shock and purpura. *Intens Care Med* **20**:371-374.

Hazelzet, J. A., de Groot, R., van Mierlo, G., Joosten, K. F. M., van der Voort, E., Eerenberg, A. *et al.* (1998). Complement activation in relation to capillary leakage in children with septic shock and purpura. *Infect Immun* **66**:5350-5356.

Hermans P.W., M. L. Hibbert, R. Booy *et al.* (1999). 4G/5G promotor polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and outcome of meningococcal disease. Meningococcal Research Group. *Lancet* **354**:556-660.

Herold, B. C., Siston, A., Bremer, J., Kirkpatrick, R., Wilbanks, G., Fugedi, P., Peto, C., and M. Cooper (1997). Sulfated carbohydrate compounds prevent microbial adherence by sexually transmitted disease pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**(12):2776-2780.

Hilse, R., S. Hammerschmidt, W. Bautsch, and M. Frosch (1996). Site-specific insertion of *IS1301* and distribution in *Neisseria meningitidis* strains. *J. Bacteriol.* **178**:2527-2532

Hilse, R., J. Stoevesandt, D. A. Caugant, H. Claus, M. Frosch, and U. Vogel (2000). Distribution of the meningococcal insertion sequence *IS1301* in clonal lineages of *Neisseria meningitidis*. *Epidemiol. Infect.* **124**:337-340.

Hobbs, M. M., Malorny, B., Prasad, P., Morelli, G., Kusecek, B., Heckels, J. E., Cannon, J. G., and M. Achtman (1998). Recombinant reassortment among *opa* genes from ET-37 complex *Neisseria meningitidis* isolates of diverse geographical origins. *Microbiol* **144**:157-166.

Huang, S. H., M. Stins, and K. S. Kim (2000). Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. *Microbes and Infection* **2**:1237-1244. ??

Huang, S.H., and A. Y. Jong (2001). Cellular Mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. *Cell Microbiol* **3**:277-287.

Hynes, R. O. (1990). *Fibronectins*. New York: Springer-Verlag

Isogai, C., Laug, W. E., Hiroyuki, S., Declerck, P. J., Stins, M. F., Durden, D. L., Erdreich-Epstein, A., and Y. A. DeClerck (2001). Plasminogen activator inhibitor-1 promotes angiogenesis by stimulating endothelial cell migration toward fibronectin. *Cancer Research* **61**:5587-5594.

Jarvis G.A. (1994). Analysis of C3 deposition and degradation on *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **62**: 11755-11760

Jennings, H.J., Beurret, M., Gamian, A., and F. Michon (1983). The structure of an R-type lipooligosaccharid core obtained from some lipopolysaccharides of *Neisseria meningitidis*. *Carbohydr Res* **121**:233-241.

Jennings, M. P., Hood, D., Peak, I. R. A., Virji, M., and E. R. Moxon (1995). Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase variable expression of the lacto-N-neotetraose terminal LPS structure in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **18**:729-740.

Jonsson, A.-B., Nyberg, G., and S. Normark (1991). Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in *pilC*, a novel gene for pilus assembly. *EMBO J* **10**:477-488.

Literatur

- Källström, H., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P., and A. B. Jonsson (1997). Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **25**:639-647.
- Källström, H., Islam, M. S., Berggren, P. O., and A. B. Jonsson (1998). Cell signaling by the type IV pili of pathogenic *Neisseria*. *J Biol Chem* **273**:21777-21782.
- Kellog, D. S. J., Cohen, I. R., Norins, L. C., Schroeter, A. L., and G. Reising (1968). *Neisseria gonorrhoeae*. II. Colonial variation and pathogenicity during 35 months *in vitro*. *J Bacteriol* **96**:596-605.
- Kim, J. J., Zhou, D., Mandrell, R. E., and J. M. Griffis (1992). Effect of exogenous sialylation of the lipooligosaccharide of *Neisseria gonorrhoeae* on opsonophagocytosis. *Infect Immun* **60**:4439-4442.
- Klein, N. J., Ison, C. A., Peakman, M., Levin, M., Hammerschmidt, S., Frosch, M., and R. S. Heyderman (1996). The influence of capsulation and lipooligosaccharide structure on neutrophil adhesion molecule expression and endothelial injury by *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* **173**(1):172-179.
- Kniesel, U., and H. Wolburg (2000). Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* **20**:57-76.
- Kolb-Mäurer, A., A. Unkmeir, U. Kämmerer, C. Hübner, T. Leimbach, A. Stade, E. Kaempgen, M. Frosch and G. Dietrich (2001). Interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Infect Immun* **69**:6912-6922.
- Kriz, P., Musilek, M., Skoczynska, A., and W. Hryniewicz (2000). Genetic and antigenetic characteristics of *Neisseria meningitidis* strains isolated in the Czech Republic in 1997-98. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**:452-459.
- Kupsch, E. M., Knepper, B., Kuroki, T., Heuer, I., and T. F. Meyer (1993). Variable opacity (Opa) outer membrane proteins account for the cell tropisms displayed by *Neisseria gonorrhoeae* for human leucocytes and epithelial cells. *EMBO J* **12**:641-650.
- Kuusela, P. (1978) Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*. *Nature* **276**: 718-720.
- Lane, J. H., Sasseville, V. G., Smith, M. O., Vogel, P., Pauley, D. R., Heyes, M. P., and A. A. Lackner (1996). Neuroinvasion by simian immunodeficiency virus coincides with increased numbers of perivascular macrophages/microglia and intrathecal immune activation. *J Neurovirol* **2**:423-432.
- Lapeyssonie, L. (1963). La méningite cérébro-spinale en Afrique. *Bull W.H.O.* **28**(Suppl.):3-114.
- Leib, S. L., and M. G. Tauber (1999). Pathogenesis of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* **13**:527-548.

Literatur

Linz, B., M. Schenker, P. Zhu, and M. Achtman (2000). Frequent interspecific genetic exchange between commensal neisseriae and *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **36**:1049-1058.

Löffler G., Petrides P.E., Biochemie und Pathobiochemie, Springer Verlag, 1998.

Maiden, M.C.J., and I.M. Feavers (1994). Meningococcal Typing. *J.Med.Microbiol.* 40:157-158

Maiden, M. C. J., and I. M. Feavers (1995). Population genetics and global epidemiology of the human pathogen *Neisseria meningitidis*, p.269-293. In S.Baumberg, J.P:W:Young, E:M:H:Wellington, and J:R:Saunders (ed.), Population genetics of bacteria. Cambridge University Press, Cambridge, UK

Maiden, M.C.J., J.A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J.E. Russel; R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feavers, M. Achtman, and B.G. Spratt (1998). Multilocus sequence typing: a potable approach to the identification of clones within populations of pathogenetic microorganisms. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **94**:3140-3145

Marceau, M., Forest, K., Béretti, J.-L., Tainer, J., and X. Nassif (1998). Consequences of the loss of O-linked glycosylation of meningococcal type IV pilin on piliation and pilus-mediated adhesion. *Mol Microbiol* **27**:705-715.

Malorny, B., Morelli, G., Kusecek, B., Kolberg, J., and M. Achtman (1998). Sequence diversity, predicted two-dimensional protein structure, and epitope mapping of neisserial Opa proteins. *J Bacteriol* **180**:1323-1330.

Mandrell, R. E., Lesse, A. J., Sugai, J. V., Shero, M., Griffiss, J. M., Cole, J. A., Parsons, N. J., Smith, E., Morse, S. A., and M. A. Apicella (1990). *In vitro* and *in vivo* modification of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide epitope structure by sialylation. *J Exp Med* :1649-1664

Mandrell, R. E., Kim, J. J., John, C. M., Gibson, B. W., Sugai, J. V., Apicella, M. A., Griffiss, J. M., and R. Yamasaki (1991). Endogenous sialylation of the lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **173**:2823-2832.

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.

McGee, Z. A., Street, C. H., Chappel, C. L., Cousar, E. S., Morris, F., and R. G. Horn (1979). Pili of *Neisseria meningitidis*: effect of media on maintenance of piliation, characteristics of Pili and colonial morphology. *Infect Immun* **24**: 194-201.

- McNeil, G., and Virji, M. (1997) Phenotypic variants of meningococci and their potential in phagocytic interactions: the influence of opacity proteins, pili, PilC and surface sialic acids. *Microb Pathog* **22**: 295-304.
- Merz, A. J. *et al.* (1999). Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells. *Mol Microbiol* **32**:1316-1332.
- Meyer, T. F. (1989). Pathogenic *Neisseria*-model of bacterial virulence and genetic flexibility. *Infect Immun* **17**:113-123.
- Molinari, G. Talay, S. R., Valentin-Weigand, P., Rohde, M., and G. S. Chhatwal (1997). The fibronectin-binding protein of *streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun* **65**(4):1357-1363.
- Morelli, G., Malorny, B., Mueller, K., Seile, A., Wang, J. F., del Valle, J., and M. Achtman (1997). Clonal descent and microevolution of *Neisseria meningitidis* during 30 years of epidemic spread. *Mol Microbiol* **25**:1047-1064.
- Morello, J. A., and M. Bohnhoff (1989). Serovars and serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* from disseminated and uncomplicated infections. *J Infect Dis* **160**:1012-1017.
- Moxon, E. R., and P. T. Ostrow (1977). *Haemophilus influenzae* meningitidis in infant rats: role of bacteriemia in pathogenesis of age-dependent inflammatory responses in cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* **135**:303-307.
- Murphy, G. L., Connell, T. D., Barritt, D. S., Koomey, M., and J. G. Cannon (1989). Phase variation of gonococcal protein II: regulation of gene expression by slipped-strand mispairing of a repetitive DNA sequence. *Cell* **56**:539-547.
- Nadel S., M. U. Newport, R. Booy *et al.* (1996). Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promotor region may be associated with death from meningococcal disease. *J Infect Dis* **174**:878-880.
- Nassif, X., J. L. Beretti, J. Lowy, P. Steinberg, P. O'Gaora, J. Pfeifer, S. Nromark, and M. So (1994). Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci, USA* **91**:3769-3773.
- Nassif, X., Bourdoulous, S., Eugène, E., and P. O. Couraud (2002). How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier? *TRENDS in Microbiology* **10**(5):227-232.
- Nizet, V., K. S. Kim, M. Stins, M. Jonas, E. Y. Chi, D. Nguyen and C. E. Rubens (1997). Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. *Infect Immun* **65**(12):5074-5081.

- Panetti, T.S., and McKeown-Longo, P.J. (1993) The alpha v beta 5 integrin receptor regulates receptor-mediated endocytosis of vitronectin. *J Biol Chem* **268**: 11492-11495.
- Panetti, T.S., Wilcox, S.A., Horzempa, C., and McKeown-Longo, P.J. (1995) Alpha v beta 5 integrin receptor-mediated endocytosis of vitronectin is protein kinase C-dependent. *J Biol Chem* **270**: 18593-18597.
- Pardridge, W. M. (1999). Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol* **5**:556-569.
- Parge, H. E., Forest, K. T., Hickey, M. J., Christensen, D. A., Getzoff, E. D., and J. A. Tainer (1995). Structure of the fibre-forming protein pilin at 2,6 Å resolution. *Nature* **378**:32-38.
- Parsons, N. J., Andrade, J. R. C., Patel, P. V., Cole, J. A., and H. Smith (1989). Sialylation of lipooligosaccharide and loss of absorption of bacteriol antibody during conversation of gonococci to serum resistance by cytidine 5'-monophospho-N-acetyl neuraminic acid. *Microb Pathogen* **7**:63-72.
- Peltola, H. (1983). Meningococcal disease: still with us. *Rev Infect Dis* **5**: 71-91.
- Petersen, T. E., Thogersen, H. C., Skorstengaard, K., Vibe Petersen, K., Sahl, P., Sottrup Jensen, L., and S. Magnusson (1983). Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: three types of internal homology. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**:137-141.
- Pierschbacher, M. D., and E. Ruoslahti (1984). Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:5985-5988.
- Pierschbacher, M. D., and E. Ruoslahti (1987). Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J Biol Chem* **262**:17294-17298.
- Pron, B., M. K. Taha, C. Rambaud, J. C. Fournet, N. Pattey, J. P. Monnet, *et al.* (1997). Interaction of *Neisseria meningitidis* with the components of the blood-brain-barrier correlates with an increased expression of PilC. *J Infect Dis* **176**:1285-1292.
- Pujol, C., Eugène, E., Morand, P., and X. Nassif (2000). Do pathogenic *Neisseria* need several ways to modify the host cell cytoskeleton? *Microbes and Infection* **2**:821-827
- Ring, A., Weiser, J. N., and E. I. Tuomanen (1998). Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier: molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* **102**:819-829.
- Rostand, K. S., and J. D. Esko (1997). Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect Immun* **65**:1-8.

- Rubin, L. L., Hall, D. E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H. C., Janatpour, M., Liaw, C. W., Manning, K., Morales, J. *et al.* (1991). A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* **115**(6):1725-1735.
- Rubin, L.L. (1999). The cell biology of the blood-brain-barrier. *Annu Rev Neurosci* **22**:11.28.
- Rudel, T. Scheuerpflug, I, and T. F. Meyer (1995). Neisseria PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin. *Nature* **373**:357-359.
- Rudel, T., Schmid, A., Benz, R., Kolb, H. A., Lang, F., and T. F. Meyer (1996). Modulation of *Neisseria meningitidis* porin (PorB) by cytosolic ATP/GTP of target cells: parallels between pathogen accomodation and mitochondrial endosymbiosis. *Cell* **85**:391-402.
- Sakari, J., Pandit, N., Moxon, E. R., and M. Achtman (1994). Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promotor containing polycytidine. *Mol Microbiol* **13**:207-217.
- Seiler, A., R. Reinhardt, J. Sarkari, D. A. Caugant, and M. Achtman (1996). Allelic polymorphism and site-specific recombination in the *opc* locus of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **19**(4):841-856.
- Simonson, C., Brener, D., and DeVoe, I.W. (1982) Expression of a high-affinity mechanism for acquisition of transferrin iron by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* **36**:107-13.
- Song, J., Minetti, C. A., Blake, M. S., and M Colombini (1998). Successful recovery of the normal electrophysiological properties of porB (class 3) porin from *Neisseria meningitidis* after expression in *Escherichia coli* and renaturation. *Biochim Biophys Acta* **1370**:289-298.
- Stephens, D. S., and Z. A. McGee (1981). Attachment of *Neisseria meningitidis* to human mucosal surfaces: influence of pili and type of receptor cell. *J Infect Dis* **143**:525-532.
- Stephens, D. S., Hoffmann, L. H., and Z. A. McGee (1983). Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis.* **148**:369-376.
- Stern, A., Brown, M., Nickel, P., and T. F. Meyer (1986). Opacity genes in *Neisseria gonorrhoeae*: control of phase and antigenic variation. *Cell* **47**:61-71.
- Stern, A., and T. F. Meyer (1987). Common mechanism controlling phase and antigenetic variation in pathogenic neisseriae. *Mol Microbiol* **1**:5-12.

- Stimson, E., Virji, M., Barker, S., Panico, M., Blench, I., Saunder, J. *et al.* (1996). Discovery of a novel protein modification: alpha-glycerophosphate is a substituent of meningococcal pilin. *Biochem J* **316**:29-33.
- Struncova, V., Kasal, E., Sedlack, D., Subert, I., Matouska, D., Krizova, P., and Taborska, J. (1998) Clinical course and sequelae of invasive meningococcal disease. Abstracts of the Eleventh international pathogenic *Neisseria* conference. Nassif, X., Quentin-Millet, M.-J., and Taha., M.K. (eds.), p.88.
- Su, H. , Raymond, L., Rockey, D. D., Fischer, E., Hackstadt, T. and H. D. Caldwell (1996). A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:11143-11148
- Szcepanski, A., Furie, M. B., Benach, J. L., Lane, B. P., and H. B. Fleit (1990). Interaction between *Borrelia burgdorferi* and endothelium in vitro. *J Clin Invest* **85**:1637-1647.
- Taha, M.-K., Morand, P. C., Pereira, Y, Eugène, E., Giorgini, D., Larribe, M., and X. Nassif (1998). Pilus-mediated adhesion of *Neisseria meningitidis*: the essential role of cell contact-dependent transcriptional upregulation of the PilC1 protein. *Mol Microbiol* **28**:1153-1163.
- Tamura, G.S., and Rubens, C.E. (1995) Group B streptococci adhere to a variant of fibronectin attached to a solid phase. *Mol Microbiol* **15**: 581-589.
- Tinsley, C., and X. Nassif (1996). Analysis of the genetic differences between *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: two closely related bacteria expressing two different pathogenicities. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:11109-11114.
- Townsend, G. C., and W. M. Scheld (1995). Microbe-endothelium interactions in blood-brain barrier permeability during bacterial meningitis. *AMS News* **61**:294-298.
- Tsai, C. M., Frasch, C. E., and L. F. Motta (1981). Five structural classes of outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **146**(1):69-78..
- Tsai, C. M., and Civin, C. I. (1991). Eight lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis* react with a monoclonal antibody which binds lacto-N-neotetraose (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc). *Infect Immun* **59**:3604-3609
- Tsukita, S., and M. Furuse (1999). Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* **9**:268-273.
- Unkmeir, A., Latsch, K., Dietrich, G., Wintermeyer, E., Schinke, B., Schwender, S., Kim, K. S., Eigenthaler, M., and M. Frosch (2002a). Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol. Microbiol* **46**: 933-946

- Unkmeir, A., Kämmerer, U., Stade, A., Hübner, C., Haller, S., Kolb-Mäurer, A., Frosch, M., and G. Dietrich (2002b). Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human dendritic cells. *Infect and Immun* **70**:2454-2462.
- Van der Flier, F.M., Chhun, N., Wizemann, T.M., Min, J., McCarthy, J.B., and Tuomanen, E.I. (1995) Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to immobilized. *Infect Immun* **63**: 4317-4322.
- Van Deuren, M., J. van der Ven-Jongekrijg, A. K. Bartelink, R. van Dalen, R. W. Sauerwein, and J. W. van der Meer (1995). Correlations between proinflammatory cytokines and antiinflammatory mediators and the severity of disease in meningococcal infections. *J Infect Dis* **172**:433-439.
- Van Putten, J. P. M., and S. M. Paul (1995). Binding of syndecan-like surface proteoglycan receptors is required for *Neisseria gonorrhoeae* entry into human mucosa cells. *EMBO J* **14**:2144-2154.
- Van Putten, J. P. M., Duensing, T. D., and R. L. Cole (1998a). Entry of Opa⁺ gonococci into Hep2-cells requires concerted action of glycosaminoglycans, fibronectin and integrin receptors. *Mol Microbiol* **29**(1):369-379.
- Vedros, N. A. (1987). Development of meningococcal serogroups. In N. A. Vedros (ed.) Evolution of meningococcal disease. *CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla.* **2**:33-38.
- Verheul, A. F. M., Snippe, H., and J. T. Poolman (1993). Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. *Microbiol Reviews* **57**:43-49.
- Virji, M., Kaythy, H. Ferguson, D. J. P., Alexandrescu, C., Heckels, J. E., and E. R. Moxon (1991b). The role of pili in the interactin of pathogenic *Neisseria* with cultured human endothelial cells. *Mol Microbiol* **5**:1831-1841.
- Virji, M., C. Alexandrescu, D. J. P. Ferguson, J. R. Saunders, and E. R. Moxon (1992a). Variations in the expression of pili: the effect on the adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol* **6**(10):1271-1279.
- Virji, M., K. Makepeace, D. J. P. Ferguson, M. Achtman, J. Sarkari, and E. R. Moxon (1992b). Expression of the Opc protein correlates with the invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **6**(19):2785-2795.
- Virji, M., K. Makepeace, D. J. P. Ferguson, M. Achtman, and E. R. Moxon (1993b). Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol* **10**(3):499-510.

- Virji, M., K. Makepeace, and E. R. Moxon (1994). Distinct mechanisms of interactions of Opc-expressing meningococci at apical and basolateral surface of human endothelial cells; the role of integrins in apical interactions. *Mol Microbiol* **14**(1):173-184.
- Virji, M., K. Makepeace, I. R. A. Peak, D. J. P. Ferguson, M. P. Jennings, and E. R. Moxon (1995). Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol Microbiol* **18**(4):741-754.
- Virji, M., Makepeace K., Ferguson D. J. and S. M. Watt (1996a). Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic neisseria. *Mol Microbiol*. **22**: 941-950.
- Virji M., Watt S.M., Barker S., Makepeace K. and R Donyonsion (1996b). The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Micobiol* **22**(5): 929-939.
- Virji, M., D. Evans, A. Hatfield, F. Grunert, A. M. Teixeira and S. M. Watt (1999). Critical determinants of host receptor targeting by *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: identification of Opa adhesiotopes an the N-domain of CD66 molecules. *Mol Microbiol* **34**(3):538-551.
- Vogel, U., Claus, H., Heinze, G., and M. Frosch (1997). Functional charaterization of an isogenic meninococcal alpha-2,3-sialyltransferase mutant: the role of lipooligosaccharide sialylation for serum resistance in serogroup B meningococci. *Med Microbiol Immunol* **186**(2):159-166.
- 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**:954-957.
- Vogel, U., and M. Frosch (1999). Mechanisms of neisserial serum resistance. *Mol Microbiol* **32**:1
- Vogel U., J. Elias, H. Claus, F. Hessler und M. Frosch (2004a). Epidemiologie invasiver Infektionen durch *Neisseria meningitidis*. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2004 **152**:371-381.
- Vogel U., I. Ehrhard, R. R. Reiner *et al.* (2004b). Epidemiologie bakterieller Meningitiserreger. In: Frosch M. (Hrsg) *Akute bakterielle Meningitis*. Uni-Med, Bremen, S3-27. 133-1139.
- Wang, J., Caugant, D. A., Li, X., Hu, X., Poolman, J. T., Crowe, B. A., and M. Achtman (1992). Clonal and antigenic analysis of serogroup A *Neisseria meningitidis* with particular reference to epidemiological features of epidemic meningitis in China. *Infect Immun* **60**:5267-5282.

Literatur

Wang, J. F., D. A. Caugant, G. Morelli, B. Koumare, and M. Achtman (1993). Antigenetic and epidemiologic properties of the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* **167**:1320-1329.

Ward, M. E., Watt, P. J., and J. N. Robertson (1974). The human fallopian tube: a laboratory model for gonococcal infection. *J Infect Dis* **129**:650-659.

Weel, J. F., and J. P. van Putten (1991). Fate of the major outer membrane protein PIA in early and late events of gonococcal infection of epithelial cells. *Res Microbiol* **142**:985-993.

Weichselbaum, A. (1887). Über die Ätiologie der akuten Meningitis cerebrospinalis. *Fortschr. Med.* **5**:573-583.

Weidenmann, B., Schletter, J., Dziarski, R., Kusumoto, S. *et al.* (1997). Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD14 on human monocytes. *Infect Immun* **65**:858-864.

Weiser, J. N., Goldberg, J. B., Pan, N., Wilson, L., and M. Virji (1998). The phosphorylcholine epitope undergoes phase variation on a 43-kilodalton protein in *Pseudomonas aeruginosa* and on pili of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **66**:4263-4267.

Yamada, K.M., and Kennedy, D.W. (1984) Dualistic nature of adhesive protein function: fibronectin and its biologically active peptide fragments can autoinhibit fibronectin function. *J Cell Biol* **99**: 29-36.

Zahraoui, A. *et al.* (2000). Tight junction, a platform for trafficking and signaling protein complexes. *J Cell Biol* **151**:F31-36.

Zhou, J., and B. G. Spratt (1992). Sequence diversity within the *argF*, *fbp* and *recA* genes of natural isolates of *Neisseria meningitidis*: interspecies recombination within the *argF* gene. *Mol Microbiol* **6**:2135-2146.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Maßeinheiten

A	Ampere
Da	Dalton
g	Gramm
kb	kilobasen
kDa	Kilodalton
M	molar
Mio.I.E.	Millionen internationale Einheiten
mM	millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
rpm	rounds per minute
U	Unit
V	Volt

Weitere Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
BCIP	5Brom-4Chlor-3Indolphosphat-p-Toluidinsalz
Blot	Transfer von DNA, RNA oder Proteinen auf eine Membran
bp	Basenpaare
CMP-NANA	Cytidin-5'-monophosphat-N-Acetylneuraminsäure
<i>cps</i>	Kapselgenkomplex

Anhang

CREN	contact regulatory element of Neisseria
DIC	disseminierte intravasale Koagulation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ET	electrophoresis type
F1-10	Fraktion 1-10
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein-markiert
FN	Fibronektin
Gal	Galaktose
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Gly	Glycin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
HBMEC	human brain microvascular endothelial cells
Hep2	human laryngeal epithelial cells
Hepes	(N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N-[2-ethanesulfonsäure])
HS	humanes Serum
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HUVEC-Zellen	Human umbilical vein endothelial cells
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
LNnt	Lacto-N-Neotetraose
LOS	Lipooligosaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MLEE	Multilokus-Enzym-Elektrophorese
MLST	Multilokus-Sequenz-Typisierung
MM	Magermilchpulver

Anhang

MOI	multiplicity of infection
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblau Tetrazoliumchlorid
NCA	non-specific cross-reactive antigen
NCAM	Nervenzell-Adhäsionsmolekül
NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure
N.m.	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
OD	Optische Dichte
Opa	outer membrane protein A
Opc	outer membrane protein C
ORF	Offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Por	principal outer membrane protein
RDA-Technik	recombinant DNA technique
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz
R-M System	restriction modification system
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
ST	sequence type
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TRITC	Rhodamin-markiert
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VN	Vitronektin
vs.	versus
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung des Prinzips der Säulenchromatographie.	36
Abb. 2:	Western Blot zum Nachweis der Opa-Expression durch die zu untersuchenden Isolate	38
Abb. 3:	Western Blot zum Nachweis der Opc-Expression durch die zu untersuchenden Isolate	39
Abb. 4:	Darstellung der gemittelten Adhärenz- und Invasionswerte von MC58* und MC58 <i>siaD</i> in HBMEC-Zellen nach Inkubation mit RPMI 1640 Medium im Rahmen einer 8h-Kinetik.	41
Abb. 5:	Darstellung der gemittelten Adhärenz- und Invasionswerte von MC58 <i>siaD</i> in HBMEC-Zellen nach Inkubation in RPMI 1640 Medium, 10%igem fetalen Kälberserum/RPMI und 10%igem humanen Serum/RPMI.	42
Abb. 6:	Darstellung der gemittelten Adhärenz- und Invasionswerte von MC58* und MC58 <i>siaD</i> in HBMEC-Zellen nach Inkubation in RPMI 1640 Medium, 10%igem fetalen Kälberserum/RPMI und 10%igem humanen Serum/RPMI.	43
Abb. 7:	Darstellung der gemittelten Adhärenz- und Invasionswerte von MC58* und MC58* <i>opc</i> in HBMEC-Zellen nach Inkubation in RPMI 1640 Medium und 10%igem humanen Serum/RPMI im Rahmen einer 8h-Kinetik.	44
Abb. 8:	Immunfluoreszenzaufnahmen adhärenter und invasiver <i>N. meningitidis</i> ST-32 Isolate.	46
Abb. 9:	Gemittelte Adhärenz- und Invasionswerte von C2120 und C2120 <i>siaD</i> in HBMEC-Zellen nach Inkubation in RPMI 1640 Medium, 10% FCS/RPMI und 10% HS/RPMI.	47
Abb. 10:	Darstellung der gemittelten Adhärenz- und Invasionswerte von A2044 und A2044 <i>cps</i> an HBMEC-Zellen nach Inkubation in RPMI 1640 Medium, 10% FCS/RPMI und 10% HS/RPMI.	49
Abb. 11:	Western Blot der isolierten invasiven A2044 <i>cps</i> Klone	51
Abb. 12:	Darstellung der gemittelten Invasionswerte der isolierten A2044 <i>cps</i> Klone A4, A2 und A5 in HBMEC-Zellen nach Zugabe von 10%igem humanen Serum/RPMI.	52
Abb. 13:	Darstellung der Invasionswerte von MC58 <i>siaD</i> in HBMEC-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration humanen Serums.	53
Abb. 14:	Darstellung der Adhärenz- und Invasionswerte von MC58 <i>siaD</i> in HBMEC-Zellen nach Zugabe der säulenchromatographisch eluierten Serumfraktionen F1-F10 sowie der Kontrollmedien RPMI 1640 Medium, 10% FCS/RPMI und 10% HS/RPMI.	56
Abb. 15:	Darstellung der gemittelten Adhärenz- und Invasionswerte von MC58 <i>siaD</i> in HBMEC-Zellen nach Zugabe der NaCl-Eluate der Fraktionen F1-F10 in ansteigender Konzentration.	57
Abb. 16:	Darstellung der spezifischen Proteinbandenmuster der säulenchromatographisch eluierten Serumfraktionen F1-F10 nach Auftrennung im SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung.	59
Abb. 17:	Western Blot der säulenchromatographisch eluierten Serumfraktionen F1-F10 zum Nachweis des humanen Glykoproteins Fibronectin.	59
Abb. 18:	Darstellung der gemittelten Adhärenz- und Invasionswerte von MC58 <i>siaD</i> in HBMEC-Zellen nach Zugabe von humanem Albumin in ansteigender Konzentration.	60
Abb. 19:	Darstellung der gemittelten Invasionswerte von MC58 <i>siaD</i> in HBMEC-Zellen nach Zugabe der gepoolten FPLC-eluierten Serumfraktionen F1-F7.	61

- Abb. 20: Darstellung der spezifischen Proteinbandenmuster der FPLC-eluierten Serumfraktionen F1-F7 nach Auftrennung im SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung. 63
- Abb. 21: Western Blot der FPLC-eluierten Serumfraktionen zum Nachweis des humanen Glykoproteins Fibronectin in den gepoolten FPLC-Fraktionen F3 und Fraktion F6. 63
- Abb. 22: Westernblot der gepoolten, FPLC-eluierten Serumfraktion F6 vor und nach Depletion von Fibronectin. 64
- Abb. 23: Darstellung der gemittelten Invasionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Zugabe der Fibronectin- und Vitronectin-depletierten F6-Aliquote im Vergleich zu den Invasionswerten von MC58 *siaD* nach Zugabe der FPLC-eluierten Fraktionen F1-7. 65
- Abb. 24: Darstellung der gemittelten Invasionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Zugabe von humanem löslichen und zellulären Fibronectin sowie nach Zugabe von humanem Vitronectin in ansteigender Konzentration. Zum Vergleich sind die Invasionswerte der *opc* defizienten Mutante MC58 *siaD*, *opc* nach Inkubation mit löslichem humanen Fibronectin aufgetragen. 66
- Abb. 25: Western Blot des Lysats von MC58 *siaD*, *opc* und MC58 *siaD* nach Zugabe von 100µl einer 20%igen Lösung der FPLC-eluierten Serumfraktion F6 zum Nachweis der Bindung von humanem Fibronectin durch das Außenmembranprotein Opc von *N. meningitidis*. 68
- Abb. 26: Western Blot des Lysats von HBMEC-Zellen zum Nachweis der $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor-Expression. 70
- Abb. 27: Durchflußzytometrie von HBMEC-Zellen zum Nachweis der Expression des $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptors. 70
- Abb. 28: Darstellung der relativen Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen in Anwesenheit des Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor-Antikörpers. 71
- Abb. 29: Darstellung der gemittelten Adhärenz- und Invasionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen in Anwesenheit des Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor-Antikörpers in ansteigender Konzentration sowie Darstellung der gemittelten Invasionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen in Anwesenheit der FPLC-eluierten Serumfraktion F6 vor und nach Zugabe des Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor-Antikörpers. 72
- Abb. 30: Darstellung der relativen Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen in Anwesenheit des Anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptor-Antikörpers LM609. 72
- Abb. 31: Darstellung der relativen Adhärenz und Invasion von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach 15minütiger Präinkubation mit monoklonalen Antikörpern gegen die α_v -, α_5 -, β_1 - und β_3 -Integrin-Untereinheiten. 74
- Abb. 32: Darstellung der gemittelten Adhärenz- und Invasionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Zugabe von Heparin in ansteigender Konzentration. 77
- Abb. 33: Darstellung der gemittelten Adhärenz- und Invasionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Zugabe von Heparansulfat in ansteigender Konzentration. 77
- Abb. 34: Darstellung der gemittelten Invasionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Zugabe von Heparinase III zu 10%igem humanen Serum/RPMI in ansteigender Konzentration. 79
- Abb. 35: Darstellung der gemittelten Invasionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Präinkubation mit Cytochalasin D in ansteigender Konzentration. 81

Abb. 36: Darstellung der gemittelten Invasionswerte von MC58 *siaD* in HBMEC-Zellen nach Präinkubation mit Colchizin in ansteigender Konzentration. 81

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir für die interessante Themenstellung und besonders für ihre unermüdliche und überaus engagierte Betreuung bedanken. Die vielen wertvollen Anregungen, die stete Unterstützung und die freundschaftliche Zusammenarbeit haben mir bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit sehr geholfen.

Herrn Prof. Dr. med. Matthias Frosch möchte ich für die Möglichkeit danken, dass ich diese Arbeit an seinem Institut ausführen konnte. Für die Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Zum Gelingen dieser Arbeit hat ferner die freundliche Atmosphäre der Arbeitsgruppe von Frau Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir beigetragen. Mein besonderer Dank gilt Ursula Panzner und Michaela Dümig.

Herrn Prof. Dr. med. Hermann Girschick danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Würzburg, 6. April 2005

Lebenslauf

Name: Kirsten Latsch
Geburtsdatum: 14. September 1978
Geburtsort: Koblenz
Wohnort: Richard-Strauß-Str.11, 97074 Würzburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

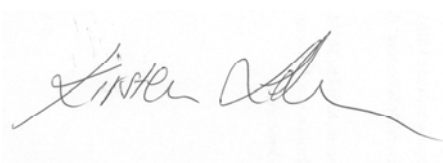
1985 – 1989 Grundschule Johann-Adam-Förster/Hünfeld
1989 – 1998 Gymnasium Wigbert-Schule/Hünfeld
22. Juni 1998 Abitur

Hochschulbildung

01. Oktober 1998 Immatrikulation an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg
27. September 2000 Ärztliche Vorprüfung
11. April 2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001 - 2003 Famulaturen in den Bereichen Innere Medizin,
Pädiatrie, Allgemeinmedizin und Klinische
Mikrobiologie.
19. September 2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4. November 2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruf

seit 1. Januar 2005 Assistenzärztin an der Universitätskinderklinik
Würzburg (Direktor Prof. Dr. med. Ch. P. Speer)



Kirsten Latsch