

**Protein Microarray Analysen der Immunantwort gegen
*Neisseria meningitidis***

Master-Arbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades
„Master of Science“

Vorgelegt von

Franziska Wegerich

Geb. am 01.06.1981

Technische Fachhochschule Wildau

Fachbereich Ingenieurwesen / Wirtschaftsingenieurwesen

Studiengang: Biosystemtechnik / Bioinformatik

Gutachter: Prof. Dr. F. Lisdat (Technische Fachhochschule Wildau)
Dr. J. Kreuzberger (Max-Planck-Institut für molekulare
Genetik, Berlin)

Wildau, 18.08.2006

Anmeldung der Masterarbeit

Name: Franziska Wegerich

Jahrgang: 2004 (BBM/04)

Matrikel Nr.: 047752932

Reg.-Nr.: _____

Betreuer und 1. Gutachter
(Dozent des Studienganges)

Prof. Dr. F. Lisdat

2. Gutachter
(Dozent des Studienganges)

Dr. J. Kreuzberger

Beginn der Arbeit: 13. März 2006

Abgabetermin: 31. Juli 2006

**Anschrift und Telefon/e-mail der
Einrichtung, wenn die Arbeit extern
ausgeführt wird:**

Max-Planck-Institute for Molecular Genetics
Department Lehrach

Ihnestraße 63-73, 14195 Berlin

E-mail: kreutzbg@molgen.mpg.de

Tel.: 030 8413 16 90

Fachlicher Betreuer der ext. Einrichtung:

Dr. J. Kreuzberger

Kurzthema: (Formulierung, die auf das Zeugnis übernommen werden kann/ca. 2 Schreibzeilen)

Protein Microarray Analysen der Immunantwort gegen *Neisseria meningitidis*.

Engl.:

Protein microarray analysis of immune reactions against *Neisseria meningitidis*.

Aufgabenstellung/Teilaufgaben:

- biologischen Voraussetzungen (Proteinexpression mit vorhandenen und neuen Klonen, evtl. wenn nötig auch *in vitro* Expression, Aufreinigung und Überprüfung mittels PAGE)
- methodische Voraussetzungen (Bedingungen für Spotting-Technik, Inkubation, Waschen und Detektion testen mit Kontroll-Proteinen und -Serum)
- Screening (mit Patienten- und Kontroll-Serum)
- Bearbeitung von Problemen und neuen Fragestellungen

Konsultationstermine:

- 03.04.2006
- weitere Termine nach Vereinbarung

Unterschrift und Datum:

Betreuer

Student



Vors. d. Prüfungsausschusses

KURZZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden Proteine des bakteriellen Meningitis-Erregers *Neisseria meningitidis* mit der Hilfe von Protein Microarrays untersucht. Im Vordergrund stand dabei die Analyse der Immunantwort gegen Proteine, die durch phasenvariable Gene gesteuert werden.

Dazu wurden die Gene rekombinant in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt. Die experimentellen Rahmenbedingungen für die Untersuchung dieser Proteine mit Protein Microarrays wurden optimiert. Eine geeignete Normalisierungsstrategie wurde entwickelt und ein Multiplexing-Ansatz für den effizienteren Einsatz der Microarrays gewählt.

Alle 103 erfolgreich aufgereinigten Proteine wurden mit 96 Meningitis-Patientenseren und 36 Kontrollseren auf den Microarrays untersucht. Nach entsprechender Datenverarbeitung konnten dann Proteine identifiziert werden, die von den Patientenseren erkannt wurden. Hervorzuheben sind dabei die IgA-Protease und andere oberflächenassoziierte Proteine, die von besonders vielen Patientenseren erkannt wurden. Die starke Immunantwort dieser Proteine zeigt, dass diese Proteine während der Infektion des Erregers exprimiert wurden und gibt damit Hinweise auf die Rolle der entsprechenden Gene für die Pathogenität des Erregers.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig von mir verfasst wurde und keine anderen als die gekennzeichneten Quellen verwendet wurden.

Die Arbeit wurde an keiner anderen Stelle als Prüfungsleistung vorgelegt.

Wildau, den 18.08.2006

Franziska Wegerich

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	ZIELSETZUNG.....	3
3	KENNTNISSTAND	4
3.1	<i>Neisseria meningitidis</i>	4
3.2	Phasenvariation.....	11
3.3	Protein-Microarray-Technologie	15
4	MATERIAL UND METHODEN	30
4.1	Material.....	30
4.2	Methoden	35
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	48
5.1	Auswahl der zu untersuchenden Gene von <i>Neisseria meningitidis</i>	48
5.2	Proteinexpression und –Aufreinigung	53
5.3	Optimierung der Microarray-Prozedur	64
5.4	Screening mit Patienten- und Kontrollseren.....	84
6	ZUSAMMENFASSUNG	102
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	105

DANKSAGUNG

ANLAGEN

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP	–	Alkalische Phosphatase
CSF	–	cerebrospinale Flüssigkeit
ddH ₂ O	–	doppelt destilliertes Wasser
DNA	–	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	–	<i>enzyme-linked-immunosorbent assay</i>
FSME	–	Frühsommermeningitis
GuHCL	–	Guanidinhydrochlorid
LOS	–	Lipooligosaccharid
LPS	–	Lipopolysaccharid
OMP	–	äußeres Membranprotein
ORF	–	offene Leseraster/ offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	–	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	–	Polymerasen-Ketten-Reaktion
PVG	–	Phasenvariables Gen
PMA	–	Protein Microarray
RNA	–	Ribonukleinsäure
SDS	–	Natriumdodecylsulfat
TK	–	Testkriterium
TIGR	–	Institut für genomische Forschung (<i>The Institut for Genomic Research</i>)

1 EINLEITUNG

Das Bakterium *Neisseria meningitidis* ist der Hauptverursacher der bakteriellen Meningitis (Gehirnhautentzündung). Als Wirt kommt für diesen gramnegativen Diplokokkus, auch Meningokokkus genannt, nur der Mensch in Frage. Neben den Epidemien im afrikanischen Meningitisgürtel, erkranken weltweit jährlich ca. 500 000 Menschen an bakterieller Meningitis, viele davon sterben. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass 20 % der Bevölkerung Träger des Erregers sind, die Infektionsrate jedoch nur bei 1:100 000 liegt (Davidsen & Tonjum, 2006). Bis heute ist dieses Phänomen jedoch nicht eindeutig geklärt. Es stellt sich die Frage, wie es das Bakterium schafft, plötzlich und innerhalb kürzester Zeit den gesamten Körper zu befallen und eine Sepsis hervorzurufen (Blutvergiftung), bis hin zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke mit eitriger Infektion der Hirnhaut (Meningitis). Eine Erklärung hierfür könnte der Mechanismus der so genannten Phasenvariation sein.

Neisseria meningitidis besitzt die größte Anzahl an phasenvariablen Genen unter allen bisher sequenzierten Organismen (Snyder *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass diese phasenvariablen Gene für die Pathogenität des Bakteriums mitverantwortlich sind. Auch für das lange Überleben im menschlichen Körper im apathogenen Zustand, wobei das Immunsystem umgangen werden muss, könnten phasenvariable Gene eine Rolle spielen. Dabei wird die Expression bestimmter Gene durch Zu- oder Abnahme der Anzahl von Nukleotidwiederholungen geregelt. Dieser Schaltmechanismus könnte bewirken, dass beim Übergang von der apathogenen Form zur pathogenen, krankheitsverursachenden Form des Bakteriums, solche Proteine expremiert werden, die die Invasion des Erregers im gesamten Körper begünstigen. Dabei kommen sowohl Strukturproteine als auch Enzyme, die bestimmte Stoffwechselbedingungen steuern in Frage.

Die Identifizierung von Proteinen, die während der pathogenen Phase des Erregers expremiert werden und dem Mechanismus der Phasenvariation unterliegen, ist daher von hohem Interesse. Damit könnten Hinweise auf die Funktion von bisher unbekanntem Genen bzw. Proteinen erhalten werden und neue Informationen über die Rolle der phasenvariablen Gene und den von ihnen geregelten Proteinen für das Überleben des Bakteriums im Körper und für die massiven Invasion während der pathogenen Phase gewonnen werden. Zusätzlich könnten so potentielle diagnostische Marker evaluiert werden.

Der Nachweis kann dabei indirekt über in Patientenseren enthaltene Antikörper gegen diese Proteine erfolgen. Dabei stellen Protein-Microarrays eine geeignete Technologie dar, um parallel eine große Anzahl an Proteinen mit Patientenseren zu screenen (siehe Abb. 1).

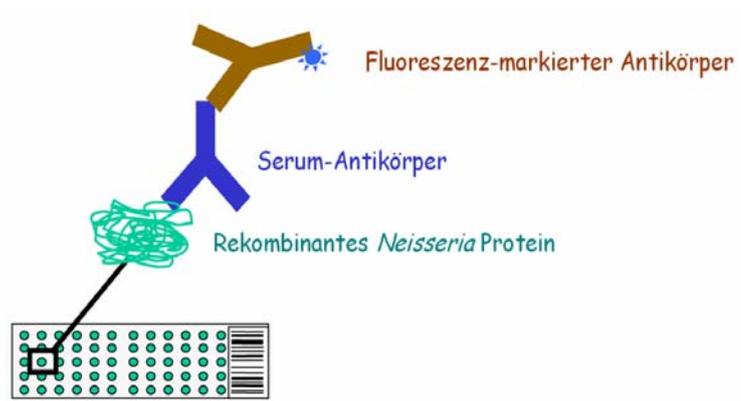


Abb. 1: Prinzip des Nachweises von *Neisseria meningitidis*-Proteinen mit Hilfe eines Protein Microarrays

2 ZIELSETZUNG

Das Ziel dieser Arbeit ist die indirekte Expressionsanalyse phasenvariabel exprimierter Gene (PVGs) des bakteriellen Meningitis-Erregers *Neisseria Meningitidis* mit Hilfe von Protein Microarrays (PMAs). Dabei sollen diejenigen Proteine identifiziert werden, die bei Meningitis-Patienten eine Immunantwort auslösen, um deren Expression während einer Meningitis nachzuweisen. Diese Proteine könnten später als diagnostische Marker bzw. als Impfstoffkandidaten genutzt werden sowie mögliche Hinweise für die Mechanismen während der pathogenen Phase von *Neisseria meningitidis* liefern. Für diese Untersuchung sollen rekombinante, in *E. coli* exprimierte, Proteine auf eine Protein Microarray-Oberfläche aufgebracht und dann mit Patientenseren gescreent werden. Serum-Antikörper, die ein Protein erkennen, sollen dann über einen zweiten fluoreszenz-markierten Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abb. 1 unter 1).

Die Arbeit gliedert sich dabei in drei Teilaufgaben:

a) Schaffung der biologischen Voraussetzungen

Hierfür sollen mit Hilfe geeigneter *E. coli*-Klone *Neisseria meningitidis* Proteine rekombinant exprimiert werden. Anschließend soll eine Aufreinigung dieser Proteine und eine Überprüfung mittels SDS-PAGE erfolgen.

b) Schaffung der methodische Voraussetzungen

Dafür sollen die Bedingungen der Microarray-Prozedur optimiert werden. Dazu gehört die Wahl einer geeigneten Microarray-Plattform bzw. -Oberfläche, die Optimierung von Inkubations- und Waschschrinen sowie die Entwicklung einer passenden Normalisierungs und evtl. Multiplexing-Strategie.

c) Screening

Wenn sowohl die biologischen als auch die methodischen Voraussetzungen geschaffen sind, sollen die auf den Microarray aufbrachten Proteine mit Patienten- und Kontrollseren gescreent werden. Anschließend sollen die Daten mit einer geeigneten Methode ausgewertet werden.

3 KENNTNISSTAND

3.1 *Neisseria meningitidis*

Unter einer Meningitis (Gehirnhautentzündung) versteht man allgemein eine durch verschiedene Erreger, vor allem Bakterien, aber auch Viren (z.B. bei FSME), Pilze oder Parasiten (Békondi *et al.*, 2006), verursachte Entzündung der weichen Häute des Gehirns (Meninges) und des Rückenmarks. Die bakterielle Meningitis gehört zu den zehn häufigsten Infektionskrankheiten mit einem tödlichem Ausgang (Morens *et al.*, 2004). *Neisseria meningitidis* ist dabei der wichtigste Erreger der bakteriellen Meningitis, da er weltweit Epidemien verursacht (WHO, 2003). Dieses diplokokkoide Bakterium, daher auch Meningokokus genannt, kann neben der Gehirnhautentzündung auch eine Sepsis (Blutvergiftung) verursachen. Insgesamt erkranken weltweit jährlich ca. 500.000 Menschen an einer Meningokokkeninfektion (Davidsen & Tonjum, 2006). Lokale Epidemien sind dabei ausgenommen.

Das Krankheitsbild, welches durch Meningokokken hervorgerufen wird, wurde erstmals 1805 während eines Ausbruchs in Genf beschrieben (Vieusseaux, 1806). Jedoch gelang es erst 1887 durch Anton Weichselbaum, das Bakterium im Rückenmark von Patienten zu identifizieren (Weichselbaum, 1887). Er gab dem Erreger auch den Namen *Neisseria meningitidis*.

Bis zu Beginn des 20. Jahrhunderts endete eine Erkrankung noch für 70% der Patienten tödlich (Flexner, 1913). Auch wenn heute verschiedene Antibiotika zur Bekämpfung des Erregers zur Verfügung stehen, sterben immer noch 9 bis 12 % der an Meningitis erkrankten und 40% der unter einer Sepsis leidenden Patienten (Rosenstein & Perkins, 2000). Eine akute Sepsis tritt zwar nicht so häufig wie Meningitis auf, ist jedoch meist schwieriger zu behandeln. Von den Überlebenden einer Meningitis und/oder einer Sepsis behalten 19% dauerhafte Schäden zurück, wie z.B. ein vermindertes Hörvermögen, andere neurologische Defekte oder der Verlust von Gliedmaßen (Kirsch *et al.*, 1996).

Meningokokken gehören zur Gattung der *Neisseria*, die der Familie der *Neisseriaceae* zugeordnet sind. Auf der Basis von Genomsequenzierungen werden die *Neisseriaceae* aktuell in die Klasse der β -Proteobakterien eingeordnet (Tettelin *et al.*, 2000). Neben *N. meningitidis* ist auch *N. gonorrhoeae* (der Gonokokkus) für den Menschen pathogen, also krankheitsauslösend. Dieses Bakterium ist für die sexuell übertragbare Krankheit Gonorrhoe („Tripper“) verantwortlich. Für beide Erreger ist der Mensch der einzige natürliche Wirt.

Bei den Bakterien der Art *Neisseria meningitidis* handelt es sich um Gram-negative, bohnenförmige, unbewegliche Diplokokken (Abb. 2).

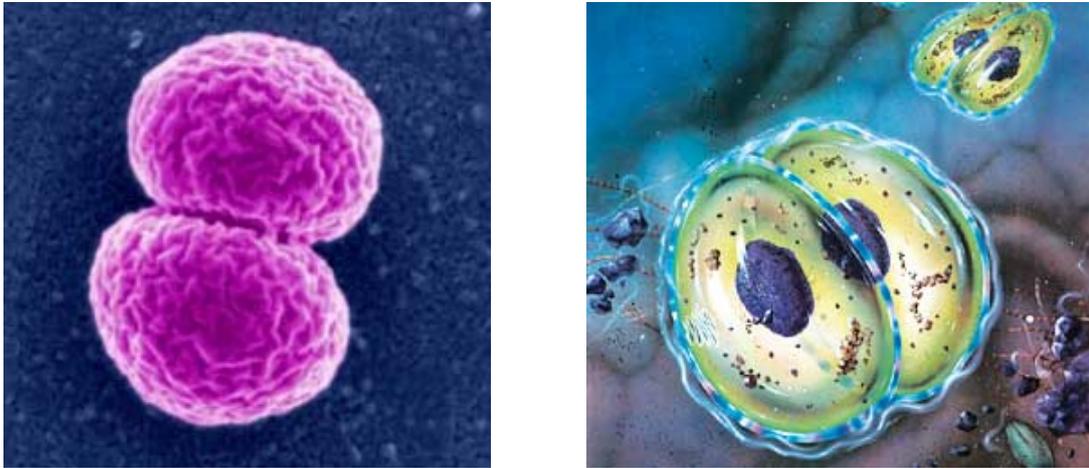


Abb. 2: Mikroskopische Aufnahme (links) und schematische Darstellung (rechts) von Meningokokken (Feavers, 2002)

Wie auch andere Gram-negative Bakterien sind Meningokokken von einer äußeren Membran umhüllt, die Lipide, äußere Membranproteine (OMPs) und Liposaccharide enthält. Pathogene Meningokokken besitzen zusätzlich noch eine Polysaccharid-Kapsel, die den Erreger wie einen Schutzwall umgibt und hilft dem humanen Immunsystem zu entgehen (Manchanda *et al.*, 2006). Die unterschiedliche Zusammensetzung dieser Kapselpolysaccharide bildet die Grundlage für die Einteilung der Meningokokken in 13 Serogruppen: A, B, C, 29-E, H, I, K, L, M, W-135, X, Y, Z (Caugant, 1998). Dabei sind die fünf Serogruppen A, B, C, W-135 und Y für ca. 90% aller Meningokokkenerkrankungen verantwortlich (Frasch *et al.*, 1985). Am häufigsten sind die Serogruppen A, B und C vertreten. In Afrika und Asien sind die Serogruppen A und C vorherrschend, in Europa und Amerika die Serogruppen B (50-70%) und C (30%) (Abb. 3 links). In Deutschland ist der Anteil an der Serogruppe B auf 71,8% gestiegen (Daten des Nationalen Referenzzentrums für Meningokokken für das Jahr 2005, www.meningococcus.de).



Abb. 3: Verbreitung der häufigsten Meningokokken-Serogruppen auf der Welt (links) und Ausdehnung des Meningitisgürtels in Afrika (rechts)

Am stärksten betroffen ist der so genannte Meningitisgürtel in der afrikanischen Sub-Sahara-Region (Serogruppe A) (Abb. 3 rechts). 1996 wurde dort der bisher größte Ausbruch einer Meningokokken-Epidemie mit 153.000 Erkrankten und 16.000 Toten beobachtet (WHO, 1997). Die Erkrankungsrate liegt in den Industrienationen, wie Deutschland, bei 1-3 Fällen pro 100.000 Einwohnern. In manchen Entwicklungsländern erhöht sich die Rate auf 10 bis 25 Fälle pro 100.000 Einwohner. Der Grund für diese Unterschiede liegt in den verschiedenen pathogenen Eigenschaften der einzelnen Meningokokken-Stämme sowie in unterschiedlichen regionalen sozioökonomischen Gegebenheiten und Umweltbedingungen (Manchanda *et al.*, 2006).

Der Anteil der verschiedenen Serogruppen an den Erkrankten schwankt ebenfalls je nach Altersgruppe. So ist z.B. der Erreger der Serogruppe B für über die Hälfte der Fälle bei Kindern, jünger als ein Jahr, verantwortlich (Fischer & Perkins, 1997).

Meningokokken werden durch direkten Kontakt oder durch Tröpfcheninfektion übertragen. Dabei stellt die Schleimhaut des Nasen-Rachen-Raums (Nasopharynx) das einzige natürliche Reservoir für den Erreger dar (Abb. 4 links). Untersuchungen haben gezeigt, dass 10 bis 20% der Bevölkerung Träger von *N. meningitidis* sind, ohne zu erkranken (Caugant *et al.*, 1994; Davidsen & Tonjum, 2006; van Ulsen & Tommassen, 2006). An Orten, mit großen Menschenansammlungen, wie z.B. in Kindereinrichtungen oder Militärstützpunkten erhöht sich die Zahl der Meningokokken-Träger. Der Erreger tritt hier lediglich als harmloses Kommensal auf. Das heißt, er lebt mit dem Wirt, also dem Menschen, zusammen, ohne ihm Schaden zuzuführen (Abb. 4 rechts). Meist handelt es sich hier um nicht pathogene Stämme. Aber es gibt auch Fälle, bei denen Menschen für Monate oder Jahre Träger pathogener Meningokokken sind, ohne zu erkranken (van Deuren *et al.*, 2000). Im

Durchschnitt beträgt die Inkubationszeit bei virulenten Stämmen jedoch nur 4 Tage (WHO, 2003).

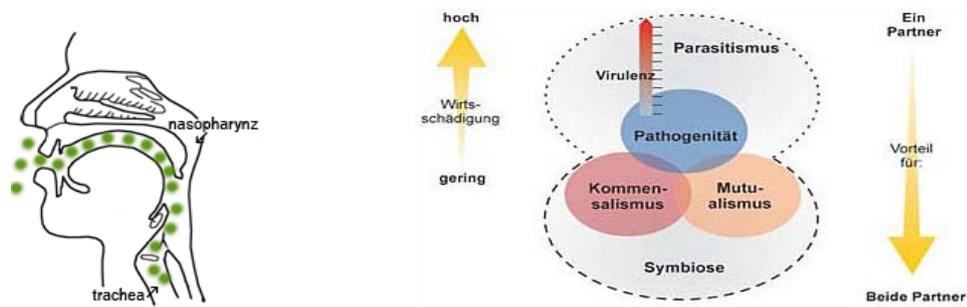


Abb. 4: Besiedlung des Nasen-Rachenraumes als Kommensal (links) und Zusammenhang zwischen Kommensalismus und Pathogenität (rechts)

Bei einer Erkrankung durch pathogene Meningokokken gelingt es dem Erreger nach der Besiedelung der Mund- und Rachen-Schleimhaut, die Epithelzellenbarriere zu durchbrechen und in die Blutgefäße einzudringen. In einigen Fällen verursacht dies eine Sepsis (Blutvergiftung). Freigesetzte Endotoxine verursachen dabei schwere Störungen des Gerinnungsystems und können zum tödlichen septischen Schock führen (Brandtzaeg *et al.*, 1992). Wenn es das Bakterium schafft, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, kann sich der Erreger auf Grund der fehlenden humoralen und zellulären Immunabwehr ungebremsst vermehren und es kommt zur Entzündung des Rückenmarks und der Hirnhaut (Meningitis) (Abb. 5 links). Dabei treten üblicherweise Symptome wie ein steifer Nacken, Fieber, Lichtempfindlichkeit, Kopfschmerzen und Übelkeit auf. Typische Anzeichen einer Sepsis sind blutende Ausschläge am ganzen Körper und rapides Kreislaufversagen (WHO, 2003) (Abb. 5 rechts).

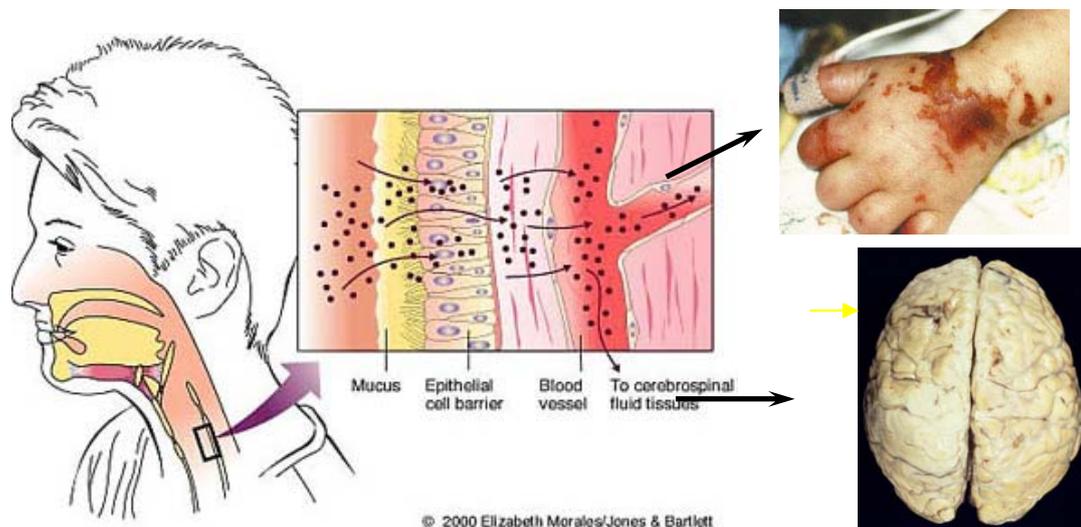


Abb. 5: Weg des Erregers von der Mundschleimhaut bis zu den Blutgefäßen (links) und die möglichen Folgen: Sepsis (rechts oben) und Meningitis (rechts unten)

Bisher ist es noch nicht vollständig geklärt, welche Faktoren für die plötzliche aggressive Invasion des Erregers im gesamten Körper verantwortlich sind. Bestimmte Wirtsfaktoren, aber auch bakterielle Virulenzfaktoren müssen dabei eine Rolle spielen.

Es fällt auf, dass die höchsten Erkrankungsraten zwischen einem Alter von sechs Monaten und 2 Jahren liegen (Abb. 6). In dieser Zeit verringert sich stetig die Anzahl der mütterlichen Antikörper. Dies macht die große Bedeutung der humoralen Immunabwehr gegen den Erreger deutlich und erklärt, warum Kleinkinder besonders anfällig für eine Meningokokkeninfektion sind (Goldschneider *et al.*, 1969).

Die meisten Menschen erhalten durch den wiederholten Kontakt mit verschiedenen Meningokokken und auch den nicht pathogenen *Neisseria lactamica* eine natürliche Immunität gegen Meningokokken (Moore *et al.*, 1989). Dies verhindert zwar nicht die Besiedelung des Nasen-Rachen-Raums, könnte aber vor einer massiven Invasion schützen (Manchanda *et al.*, 2006). Der erneute Anstieg der Meningokokkenerkrankungen bei Jugendlichen zwischen 15 und 19 Jahren lässt sich mit dem erhöhten zwischenmenschlichem Kontakt mit Beginn der Pubertät erklären.

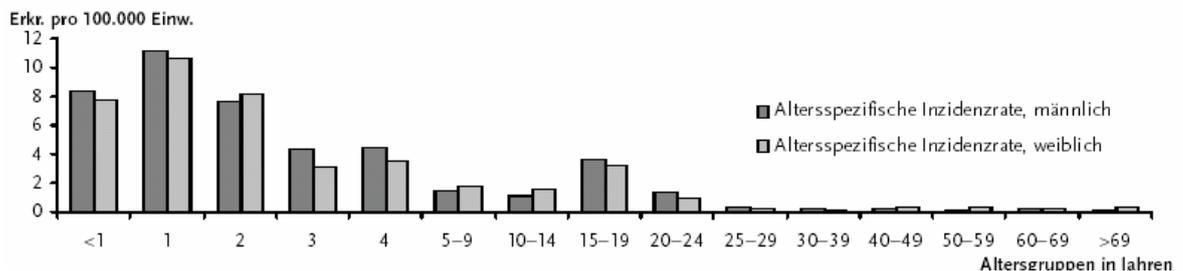


Abb. 6: Gemeldete Meningokokken-Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern, Deutschland 1993-2001, Erkrankungsraten nach Altersgruppen und Geschlecht (Robert-Koch-Institut, 2002)

Für das lange Überleben des Bakteriums im menschlichen Körper, trotz vorhandener Antikörper, und für den plötzlichen Wechsel vom harmlosen Kommensal zum aggressivem Pathogen mit schwerwiegenden gesundheitlichen Folgen, muss der Meningokokkus Strategien entwickelt haben, die es ihm ermöglichen, der menschlichen Immunabwehr zu entkommen.

Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren ist sicherlich die Ausbildung einer Polysaccharidkapsel, die den pathogenen Erreger als Schutz umgibt. Zusätzlich vermutet man, dass Adhesine wie Pili und Faktoren, die die Aufnahme von Eisen aus menschlichem Lactoferin, Transferrin und Hämoglobin ermöglichen, das pathogene Potential des Erregers

erhöhen (Rosenstein *et al.*, 2001). Ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor ist die Freigabe von äußeren Membranvesikeln, die Endotoxine (Lipopolysaccharide=LPS), OMPs, Phospholipide und Kapsel-Polysaccharide enthalten (Manchanda *et al.*, 2006). Das LPS Lipid A agiert als Endotoxin, indem es mit angeborenen Immunrezeptoren interagiert.

Sehr charakteristisch für *N. meningitidis* ist die sehr variable Expression der Pili, der OMPs, der Kapsel und der LPS (van Deuren *et al.*, 2000). Man vermutet, dass diese sich immer wieder ändernde Zelloberfläche eine Immunreaktion des Menschen verhindert bzw. erschwert und gleichzeitig eine schnelle Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen ermöglicht.

Die genetische Basis für die stark variierende Expression und die Anpassungsfähigkeit wurde durch die Sequenzierung des Meningokokkengenoms offengelegt. Bisher stehen die Sequenzdaten von *N. meningitidis* Serogruppe A Stamm Z2491 (Parkhill *et al.*, 2000), Serogruppe B Stamm MC58 (Tettelin *et al.*, 2000) und Serogruppe C Stamm Fam18 (Sanger) zur Verfügung. Es zeigte sich, dass das Genom von *N. meningitidis* relativ klein ist (z.B. im Vergleich zu dem von *E. coli*), eine reduzierte DNA-Reparatur-Kapazität aufweist sowie diverse Mechanismen besitzt, die die Genominstabilität fördern (Davidsen & Tonjum, 2006). So vermutet man, dass Meningokokken damit einen Überschuss an genetischen Varianten generieren, die dann der natürlichen Selektion unterworfen sind (Moxon *et al.*, 1998).

Die genomische Diversität von *N. meningitidis* wird durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen. Dazu gehören z.B. lokale genomische Änderungen gesteuert durch wiederholte Sequenzelemente, die die Duplikation, Deletion und die Rekombination von einzelnen Genomregionen erleichtern (Davidsen & Tonjum, 2006). Weiterhin nutzen Meningokokken horizontalen Gentransfer durch Transformation, also der Aufnahme von externer DNA und deren Einbau durch homologe Rekombination (Chen & Dubnau, 2004). Der Mechanismus der so genannten Antigen-Variation führt dazu, dass zu einem Zeitpunkt immer nur eine bestimmte Variante von z.B. Zelloberflächenkomponenten wie Pili, LPS oder verschiedenen Proteinen exprimiert wird, obwohl der Erreger das genetische Material für sehr viele Varianten besitzt. Hier wird der Mechanismus der Genkonversion genutzt (Zhang *et al.*, 1992). Zusammen mit dem weiteren für die genomische Variabilität entscheidenden Mechanismus der Phasenvariation (siehe 3.2) ist der Meningokokkus so mit einem großem Repertoire an Phänotypen innerhalb einer klonalen Population ausgestattet und kann damit anscheinend dem menschlichem Immunsystem entkommen und sich schnell an einen neuen Wirt anpassen.

Zur Diagnose einer Meningokokkeninfektion wird meist eine Rückenmarkspunktion durchgeführt. Teilweise kann man dann schon durch mikroskopische Untersuchungen, wie z.B. durch Gram-Färbung, Meningokokken identifizieren (Dunbar *et al.*, 1998). Zur Bestätigung wird aber meist eine Bakterien-Kultur von Rückenmarks- oder Blut-Proben angelegt, wobei die Rückenmarks-Analyse mehr Sicherheit bietet. Zur Feststellung der Serogruppen, z.B. für eine passende Antibiotika-Behandlung, sind noch weitere Tests notwendig. Dazu gehört z.B. die direkte Antigen-Detektion mittels Latex-Agglutination, bei der die Kapsel-Polysaccharide in der zerebrospinalen Flüssigkeit (CSF, *cerebrospinal fluid*, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit,), Serum oder Urin mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Zollinger & Boslego, 1997). Jedoch werden ca. 50% der Fälle mit dieser Methode nicht erkannt. Am sensitivsten ist bisher der Nachweis über die Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR). Dabei werden durch spezifische Primer bakterielle Gene nachgewiesen. Das Gen, welches das Protein PorA kodiert, stellte sich dabei als besonders geeignet heraus, da damit ein besonders spezifischer und sensitiver Nachweis möglich ist (Jordens & Heckels, 2005). Es existiert jedoch immer noch ein großer Bedarf an der Identifizierung weiteren neuer diagnostischer Marker für Meningokokkeninfektionen, auch für den Nachweis ganz bestimmter Meningokokkenstämme.

Für die Behandlung einer *N. meningitidis* Infektion stehen verschieden Antibiotika, wie z.B. Sulfonamid, Penicillin und Chloramphenicol zur Verfügung. Große Probleme macht dabei die Entwicklung von Resistenzen des Erreger gegenüber den eingesetzten Antibiotika (Galimand *et al.*, 1998). Dies wird vor allem durch die oben beschriebene große genomische Dynamik der Meningokokken begünstigt.

Da der Mangel an spezifischen Antikörpern für eine massive Ausbreitung der Meningokokkeninfektion verantwortlich ist, kann eine Erkrankung durch die Induzierung dieser Antikörper mittels einer Impfung verhindert werden. In den 60er Jahren wurden so erste Impfstoffe auf der Basis von Kapsel-Polysacchariden gegen Erreger der Serogruppe A und C entwickelt (Rosenstein *et al.*, 2001). Heute stehen Impfstoffe gegen die Serogruppen A, C, Y und 135-W zur Verfügung. Gegen die Serogruppe B konnte allerdings bisher noch kein wirksamer Impfschutz entwickelt werden. Eine Ursache hierfür ist die strukturelle Ähnlichkeit der Polysaccharidkapsel, die ein Hauptantigen des Pathogens darstellt, mit einem menschlichen Protein (N-Cam), welches eine Immunantwort verhindert (Griffiss *et al.*, 1991). Impfstoffe, die die Polysaccharide der Kapsel von Serogruppe B nutzen, bergen daher zusätzlich die Gefahr einer Autoimmunreaktion. Deshalb liegt der Fokus bei der Entwicklung eines Impfstoffs gegen Erreger der Serogruppe B eher auf Antigenen, die sich nicht auf die

Kapsel beziehen wie z.B. OMPs (Manchanda *et al.*, 2006). Auch die Identifizierung neuer Pathogenitätsfaktoren wäre eine Quelle für potentielle Impfstoffkandidaten.

Diese Strategie würde sich auch für andere Serogruppen anbieten, da *N. meningitidis* durch genetische Mechanismen zwischen den verschiedenen Kapselvarianten wechseln kann und damit die gegen eine bestimmte Serogruppe gerichteten Antikörpern ihre Wirkung verfehlen (Swartley *et al.*, 1997).

3.2 Phasenvariation

Viele Bakterienarten nutzen genetische Mechanismen, um sich veränderten Umweltbedingungen anzupassen. Die Expression der meisten bakteriellen Gene wird dabei auf der Ebene der Transkription über die Kontrolle des Promotors geregelt, was zu einer abgestuften erhöhten oder verringerten Expression des entsprechenden Gens führt. Eine andere wichtige Strategie, ist der Mechanismus der so genannten Phasenvariation. Darunter versteht man das meist reversible „An- und Abschalten“ der Expression bestimmter Gene auf DNA-Ebene (Henderson *et al.*, 1999). Diese phasenvariablen Gene werden also entweder normal exprimiert („An“) oder gar nicht bzw. nicht korrekt exprimiert („Aus“). Damit können innerhalb weniger Generationen viele verschieden Phänotypen in einer klonalen Population hervorgebracht werden.

Phasenvariation wurde erstmals bei *Haemophilus influenza* nachgewiesen (Hood *et al.*, 1996), später auch bei *Helicobacter pylori* (Saunders *et al.*, 1998) und anderen Bakterien. Die Genomsequenzierungen verschiedener *N. meningitidis* Stämme (Parkhill *et al.*, 2000; Sanger; Tettelin *et al.*, 2000) führte zu Identifizierung von ca. 100 phasenvariablen Genen. Damit besitzen Meningokokken die größte Anzahl an putativen phasenvariablen Genen unter allen bisher sequenzierten Organismen (Snyder *et al.*, 2001).

Für das Auftreten der Phasenvarianz sind verschiedene Mechanismen verantwortlich. Dazu gehören epigenetische DNA-Methylierungen, die Neuordnung von DNA und das so genannte „*slipped strand mispairing*“ (Henderson *et al.*, 1999). Wobei der zuletzt genannte Mechanismus am häufigsten auftritt und auch bei *N. meningitidis* bei den meisten phasenvariablen Genen eine Rolle spielt (Saunders *et al.*, 2000). Dabei findet eine Regulation durch die Variation der Anzahl repetitiver Elemente in der Gensequenz statt. Die repetitiven Sequenzen können entweder im offenen Leserahmen (ORF) eines Gens, innerhalb des Promotorbereichs oder in der Nähe des Promotors, vor dem -35-Element, lokalisiert sein (Martin *et al.*, 2003; Saunders *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 2001). So bewirkt die Addition oder

Deletion eines repetitiven Elements (Repeats) je nach Lage entweder eine Verschiebung des Leserahmens (Frameshift) und damit eine Beeinflussung der Translation. Änderungen im Promoterbereich oder vor dem -35-Element wirken sich auf die Bindung der RNA-Polymerase und somit auf die Transkription aus (Abb. 7 a).

In Abb. 8 b ist die Deletion eines Repeats durch „*slipped strand mispairing*“ dargestellt: Während der Replikation kann es zu Verschiebungen entlang des Synthese- oder Template-Stranges und damit zu nicht korrekt hybridisierten Strängen kommen. Ist der Template-Strang betroffen so werden ungepaarte Nukleotide sowie die entstandene DNA-Schleife durch DNA-Reparaturmechanismen entfernt, so dass die replizierte DNA ein Repeat weniger enthält. Umgekehrt wird die replizierte DNA um ein Repeat ergänzt, wenn der Synthese-Strang betroffen ist (Davidsen & Tonjum, 2006). In den meisten Fällen handelt es sich um Bereiche innerhalb des ORF. Kommt dort ein Repeat mit einer nicht durch drei teilbaren Anzahl an Nukleotiden hinzu oder wird entfernt, so kommt es zu einem Frameshift, der dazu führt, dass eine „falsche“ Aminosäuresequenz entsteht. Das Translationsprodukt ist damit nicht mehr funktionstüchtig. Oft kommt es auch bei der Verschiebung des Leserahmens zum vorzeitigen Abbruch der Translation aufgrund eines neu auftretendem Stoppcodons und somit entsteht ein verkürztes und ebenfalls nicht mehr funktionsfähiges Protein.

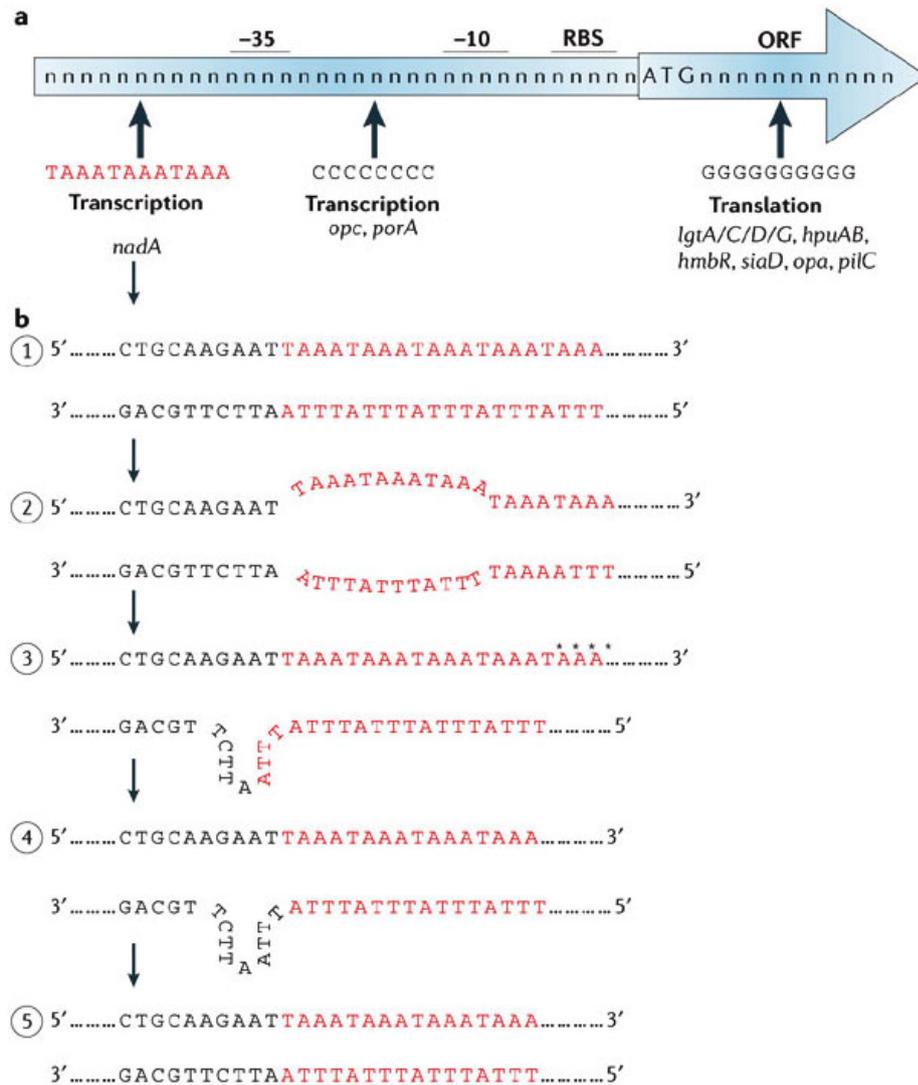


Abb. 7: (a) Lage von repetitiven Sequenzelementen und deren Auswirkung auf Trankription oder Translation (b) Deletion eines Repeats durch „*slipped strand mispairing*“ am Template-Strang während der DNA-Replikation (Davidsen & Tonjum, 2006)

Einige der identifizierten Kandidaten für phasenvariable Gene wurden schon in anderen Studien als tatsächlich phasenvariabel bestätigt, für die meisten ist dieses jedoch noch zu beweisen, sie werden deshalb unter putativen phasenvariablen Gene aufgeführt.

Ein großer Teil der phasenvariablen Gene kodiert für Proteine, die sich an der Zelloberfläche befinden bzw. an der Interaktion mit dem Wirt, also mit menschlichen Zellen, beteiligt sind. Dazu gehören äußere Membranproteine (OMPs) wie Opa, Opc und PorA, Modifizierungen von Lipopolysacchariden (LPS) und Kapselbestandteilen, Pili sowie spezifische Adhäsine (Abb. 8) (Davidsen & Tonjum, 2006).

Viele dieser Proteine gelten als wichtige Virulenzfaktoren (siehe 3.1). Gleichzeitig ergeben sich durch das häufige An- und Abschalten der verschiedenen Gene immer wieder

völlig neue Phänotypen, die es dem Erreger ermöglichen, das menschliche Immunsystem zu umgehen. Denn eine Immunantwort, die sich gegen zwischenzeitlich veränderte Oberflächenantigene richtet, ist unwirksam. Dies stellt ebenfalls ein Hindernis bei der Entwicklung wirksamer Impfstoffe dar.

Phenotype	Gene
Type IV pili	<i>pilE, pilS</i>
Type IV pilus adhesin	<i>pilC</i>
Opacity protein	<i>opa</i>
Outer-membrane protein	<i>opc</i>
Outer-membrane protein	<i>porA</i>
Adhesin	<i>nadA</i>
Lipo-oligosaccharide modification	<i>lgtA,C,D,G</i>
Haemoglobin receptor	<i>hpuAB, hmbR</i>
Capsule	<i>siaD</i>

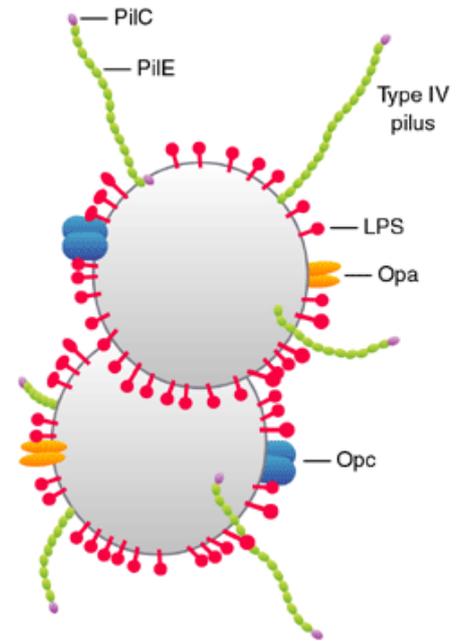


Abb. 8: Übersicht verschiedener phasenvariabler Gene bei *N. meningitidis* (links) (Davidsen & Tonjum, 2006) und schematische Darstellung der entsprechenden Genprodukte (rechts)

Der *N. meningitidis* Stamm MC58 der Serogruppe B, besitzt 83 potentielle phasenvariable Gene, die auch in dieser Arbeit untersucht werden sollen. Für Serogruppe A wurden dagegen nur 68 Gene identifiziert (Snyder *et al.*, 2001). Erreger der Serogruppe B besitzen bisher die größte Anzahl phasenvariabler Gene unter den analysierten Meningokokken-Stämmen.

In einer Studie, bei der die Immunantwort von Meningitis-Patienten gegen Proteine, die von phasenvariablen Genen des MC58 Stammes kodiert werden, mit Protein-Microarrays untersucht wurde, fiel das OMP OpaV auf. 11 von 20 Patientenseren erkannten dieses Oberflächenprotein und es kann daraus geschlossen werden, dass dieses Protein häufig während der pathogenen Phase des Erregers exprimiert wird (Kreutzberger, 2005; Steller *et al.*, 2005).

Die Untersuchung der phasenvariablen Gene von *N. meningitidis* auf der Proteinebene kann also zum Verständnis ihrer Rolle für den Erreger beitragen sowie helfen neue potentielle diagnostische Marker, Pathogenitätsfaktoren und Impfstoffkandidaten zu identifizieren.

3.3 Protein-Microarray-Technologie

3.3.1 Von DNA zu Protein Microarrays

Die großen Genomsequenzierungsprogramme der letzten 15 Jahren führten zur Identifizierung vieler neuer Gene, wie z.B. beim Menschen (Venter *et al.*, 2001). Damit war das Genom aber noch lange nicht „entschlüsselt“. Als Konsequenz rückte nun die vielfältige Expression der Gene, bzw. der von ihnen codierten Proteine in den Mittelpunkt. Nach der Sequenzanalyse und Annotierung der einzelnen Gene („Genomics“) wurden daher verstärkt Transkriptomanalysen („functional Genomics“ oder auch Transcriptomics) durchgeführt. Dabei interessierte man sich für die Art und Menge der mRNA, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem bestimmten Gewebe bzw. in einer Zelle exprimiert wird, um damit Hinweise auf die Funktion des entsprechenden Gens bzw. Genprodukts oder auch über Krankheitszusammenhänge zu erhalten.

Mit den Methoden der Transcriptomics lassen sich jedoch längst nicht alle Fragestellungen beantworten. So spiegelt die Menge an mRNA eines Gens, nicht unbedingt die Menge oder die Aktivität des translatierten Proteins wieder (Gygi *et al.*, 1999; Kambhampati, 2004). Ein Grund dafür ist die posttranskriptionale Kontrolle der Proteintranslation. Beispielsweise können RNA Moleküle durch das sog. „RNA-Storage“ über lange Zeiträume in der Zelle gelagert werden und eine Proteinbildung erfolgt dann erst wesentlich später. Eine reine Analyse auf der Ebene der mRNA würde in diesem Falle zu falschen Schlussfolgerungen führen. Des Weiteren lassen sich bestimmte Aspekte ausschließlich auf Proteinebene untersuchen. Dazu zählen alle Interaktionen von Proteinen mit anderen Molekülen (Antikörpern, DNA, kleine Moleküle, andere Proteine,...), sowie die über 200 möglichen posttranslationalen Modifikationen von Proteinen (Phosphorylierungen, Acetylierungen, Methylierungen, Glykosylierungen usw.) (Feilner *et al.*, 2005; Kersten *et al.*, 2005). So entsprechen den ca. 22.000 menschlichen Genen 100000 bis hin zu mehreren Millionen verschiedene Protein-Moleküle (Orchard *et al.*, 2005). Das Proteom erweist sich demnach als wesentlich komplexer als das zugrunde liegende Genom. Die direkte Analyse von Proteinen ist damit unausweichlich. Auch bei Untersuchungen von Proteininteraktionen, z.B. in der pharmazeutischen Forschung, müssen die Proteine direkt analysiert werden, um eindeutige Aussagen generieren zu können. Die konventionellen Methoden der Proteomics, umfassen hauptsächlich verschiedene Chromatographie und Elektrophorese-Methoden. Die Massenspektrometrie erlaubt zwar eine quantitative Analyse von vielen Proteinen gleichzeitig (meist gekoppelt mit einer 2D-Gelelektrophorese), ist aber sehr aufwendig und kostenintensiv.

Strukturelle Proteinanalysen lassen sich mit Hilfe der Röntgenkristallographie durchführen. Eine andere Methode für *in vivo* Protein-Interaktionsstudien ist das „Yeast Two Hybrid“ System, welches Transkriptionsfaktoren und Markergene nutzt (Fields & Song, 1989). Schon länger etabliert sind verschiedene Festphasenassays für die Immunoanalytik wie z.B. Westernblotting oder der bekannte ELISA-Test.

Herkömmliche Genexpressionsstudien für die Transkriptomanalyse waren aufgrund der Vielzahl von Genen mit sehr viel Aufwand verbunden. Um Kosten zu sparen, ging der Trend immer weiter in Richtung Parallelität, Miniaturisierung und Automatisierung, welche alle dem „High Throughput“ dienen sollten. Anfang der 90er Jahre wurden so die ersten DNA Microarrays entwickelt und ständig weiter optimiert (DeRisi *et al.*, 1997; Schena *et al.*, 1995). Auf einer planaren Oberfläche ist dabei DNA in hoher Anzahl und Dichte in definierter Mikroanordnung ("Microarray") fixiert (z.B. auf einem Glaträger). Jeder Messpunkt ("Spot") repräsentiert dabei ein Gen. Gibt man markierte mRNA aus einer Probe (z.B. eines kranken Gewebes) auf den Chip, so bindet sie an komplementäre Sonden auf der Oberfläche und entsprechende Spots sind je nach Menge der mRNA stärker oder schwächer detektierbar (Abb. 9). So ist es beispielsweise möglich nach geeigneter Datenanalyse, einzelne Gene bzw. deren Über- oder Unterexpression bestimmten Krankheiten oder Stoffwechselwegen zuzuordnen. Mit Hilfe von DNA Microarrays wurde auch schon das Transkriptom von *N. meningitidis* während verschiedener Infektionsstadien untersucht (Dietrich *et al.*, 2003; Grifantini *et al.*, 2002; Kurz *et al.*, 2003).

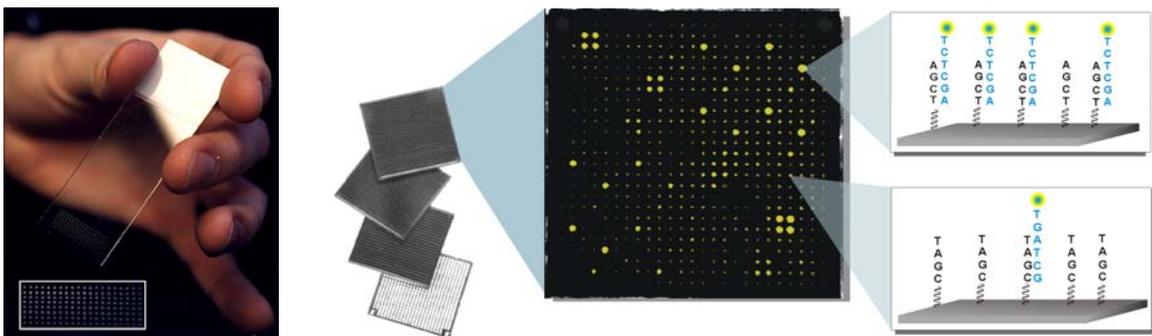


Abb. 9: Dimension, Aufbau und Funktionsweise eines DNA-Microarrays

Auch im Bereich der Proteomics werden Parallelität, Miniaturisierung und ein hoher Durchsatz für die Analyse von Proteinen im großen Maßstab angestrebt. Neben den gängigen Mikrotiterplatten, die 96 Analysen gleichzeitig ermöglichen, wurden schon in den 80er Jahren

kleine Mengen wieder zuerst mit Nukleinsäuren auf Nitrocellulose-Membranen "gedotted" (Thoman, 1980). Die damit durchgeführten „Dot Blot“ Analysen waren aufgrund des geringen Probenvolumens wesentlich sensitiver.

Es lag also nahe einige klassische Methoden der Proteomics mit den bekannten, schon etablierten Techniken der DNA-Microarrays zu verknüpfen, um eine parallele Analyse einer großen Anzahl an Proteinen in einem einzigem Experiment durchführen zu können. Ende der 90er Jahre wurden schließlich erste Protein-Arrays entwickelt. Diese noch relativ großen „Macroarrays“ (ca. 22 x 22 cm) wurden und werden noch heute genutzt, um cDNA-Bibliotheken nach rekombinanten Proteinen zu screenen (Bussow *et al.*, 1998) und für erste funktionelle Studien einzusetzen (Lopez & Pluskal, 2003). Diese Macroarrays haben theoretisch die gleichen Eigenschaften von Microarrays, jedoch bereitet die Größe einige Probleme. So wird bei dieser Methode ein großes Probenvolumen benötigt. Bei Versuchen mit kostspieligen oder nicht in beliebig großen Mengen zur Verfügung stehenden Material (z.B. Patientenproben) werden eigentlich nötige Versuchswiederholungen zum Problem.

Die technische Weiterentwicklung von Protein Microarrays dauerte dann noch einige Jahre aufgrund der wesentlich größeren Diversität und Komplexität der Proteine gegenüber den verhältnismäßig einfach strukturierten, untereinander sehr ähnlichen Nukleinsäuren (Angenendt *et al.*, 2002; Angenendt *et al.*, 2003b). Viele der Techniken, wie z.B. das Spotten kleiner Flüssigkeitsmengen mit speziellen Spotting-Robotern, das Scannen mit speziellen Laserscannern sowie Software zur Datenauswertung konnten zwar übernommen werden, eine Weiterentwicklung von Materialien und Apparaturen, der Oberflächenchemie und Spotting-Techniken, angepasst an die höheren Anforderungen von Proteinen, war jedoch nötig (Kreutzberger, 2006). Daher handelt es sich bei der Protein Microarray Technologie um eine noch recht junge Technologie, für die die ersten Proteom-umfassenden Protein Microarrays erst 2001 veröffentlicht wurden (Zhu *et al.*, 2001).

Mittlerweile ist die Protein-Chip-Technologie, zu der neben den Protein Microarrays auch andere miniaturisierte Protein-Biosensoren gehören (siehe Klassifizierung), der am schnellsten wachsende Sektor auf dem Proteomics-Markt mit Schwerpunkt auf dem Gebiet der funktionellen Proteomics, also der direkten Analyse der biochemischen und zellulären Funktion von Proteinen im großen Maßstab (Twyman, 2004). Damit finden sie verstärkt Anwendung im Bereich der biomedizinischen Forschung, der klinische Diagnostik und der pharmazeutische Industrie.

Die Verwendung von Protein Microarrays bietet gegenüber traditionellen analytischen Methoden auch erhebliche Vorteile: Sie zeichnen sich durch Schnelligkeit, einer hohen

Effizienz und Leistungsfähigkeit aus, da bis zu Tausende von Proteinen simultan mit einem sehr geringen Proben-Volumen untersucht werden können (Feilner *et al.*, 2005; Lueking *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2001).

3.3.2 Definition und Klassifizierung von Protein Microarrays

Bei Protein Microarrays handelt es sich um kleine planare Träger aus Metall, Plastik oder Glas, auf deren ggf. vorbehandelten Oberfläche Proteine in hoher Dichte und in einer geordneten Mikrostruktur immobilisiert sind (Müller & Nicolau, 2005). Die gemeinsame Funktion aller Protein-Microarrays ist dabei die Analyse von Proteinen im großem Maßstab (Twyman, 2004).

Protein-Microarrays kann man auch noch der übergeordneten Klasse der „Protein-Chips“ zuordnen, zu denen auch Protein-Biosensoren gehören. Im Falle der Biosensoren sind die Proteine nicht unbedingt in einer Mikrostruktur angeordnet und werden meist auch nur einzeln analysiert bzw. dienen der selektiven Analyse einzelner niedermolekularer Verbindungen, mit einem hohem Durchsatz. Durch die Miniaturisierung lassen sich jedoch sehr sensitive Messungen durchführen. Außerdem lassen sich durch die direkte Kopplung von biologischem Erkennungselement und Signalumwandler sowie der Integration von (Mikro-) Fluidiksystemen interessante „Lab-on-a-Chip“-Systeme realisieren, die besonders für „Vor-Ort-Anwendungen“ (Point-of-Care) in der medizinischen Diagnostik geeignet sind (Abb. 10).

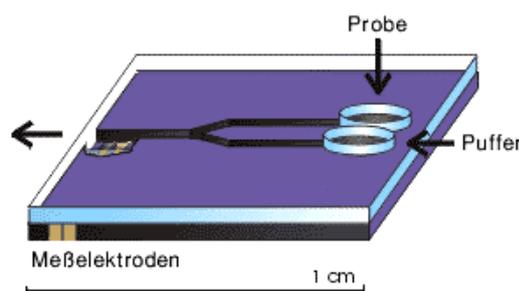


Abb. 10: Schematischer Aufbau eines Biosensorchips

Protein Microarrays lassen sich weiter nach verschiedenen Kriterien unterteilen: Nach der Herstellungsweise, der Oberflächen-Chemie, der Spezifität, der Dichte der Spots, der Zielmoleküle in der zu analysierenden Lösung, nach dem, was gemessen, wie das Signal generiert oder wie es detektiert wird (Twyman, 2004).

Die wichtigste Unterteilung ist dabei die Unterscheidung von analytischen PMAs und funktionellen PMAs (Phizicky *et al.*, 2003). Analytische Arrays werden hauptsächlich für das Expressions-Profilung, also für die quantitative Analyse einer Vielzahl von Proteinen genutzt.

Auch in dieser Arbeit sollen analytischen PMAs verwendet werden. Mit der Hilfe von funktionellen Arrays werden biochemische Aktivitäten und Interaktionen der auf dem Microarray aufgebrachtene Proteine oder Peptide untersucht (Abb. 11).

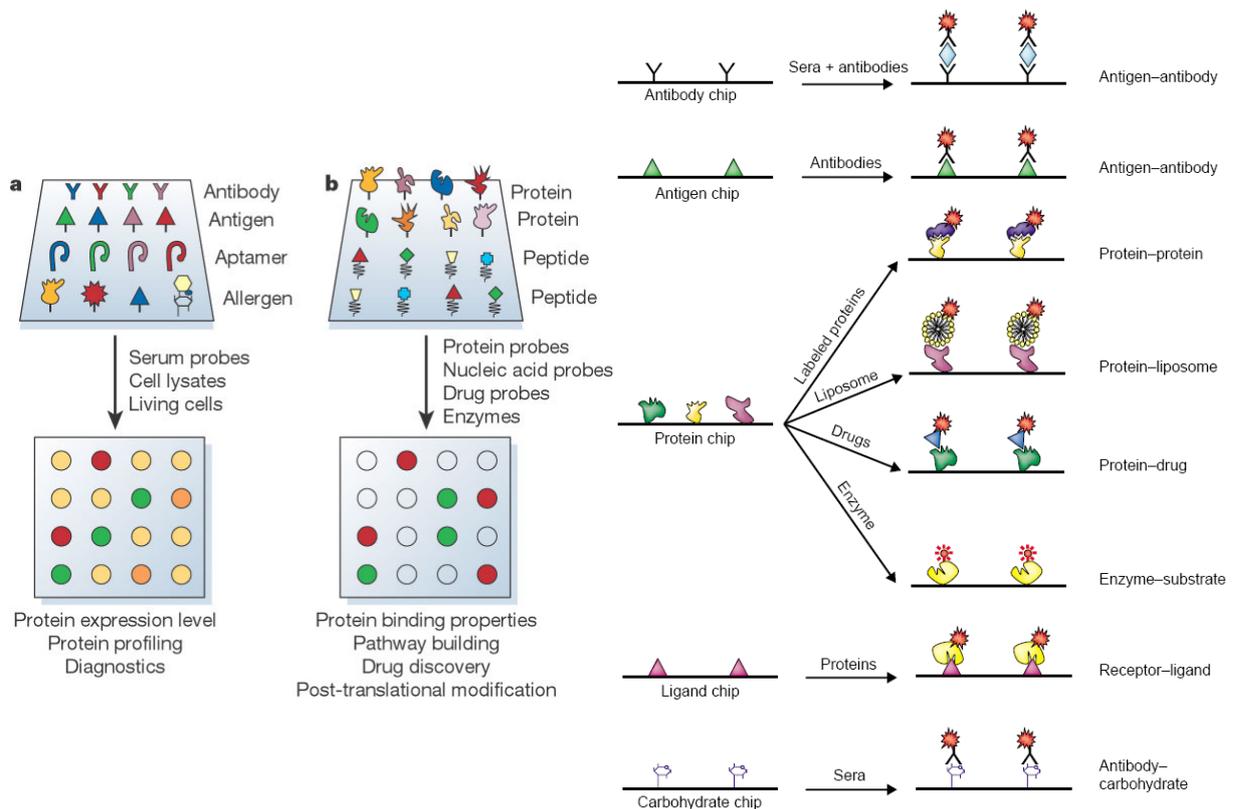


Abb. 11: analytische (a) und funktionelle (b) Protein Microarrays (links) (Phizicky *et al.*, 2003) und deren Anwendungen (rechts) (Zhu & Snyder, 2003)

Analytische PMAs lassen sich weiter nach dem auf ihrer Oberfläche immobilisierten Biomolekülen unterscheiden: Der häufigste Typ der analytischen PMAs sind Antikörper-Arrays. Sie stellen parallelisierte und miniaturisierte Immunoassays dar, mit deren Hilfe spezifisch Proteine in einer komplexen biologischen Probe detektiert und quantifiziert werden können (Kambhampati, 2004; Zhu & Snyder, 2003). Angelehnt an Genexpressionstudien mit DNA-Microarrays können auch mit Antikörper-Arrays zwei verschiedene biologische Proben (z.B. die eines Krebspatienten und eines gesunden Menschen), deren Zielproteine unterschiedlich markiert sind, miteinander verglichen werden (Miller *et al.*, 2003) (Abb. 12).

Die Gewinnung von hochspezifischen Antikörpern im großem Maßstab stellt bei Antikörper-Arrays die größte Herausforderung dar (Konthur *et al.*, 2005; Zhu & Snyder, 2003).

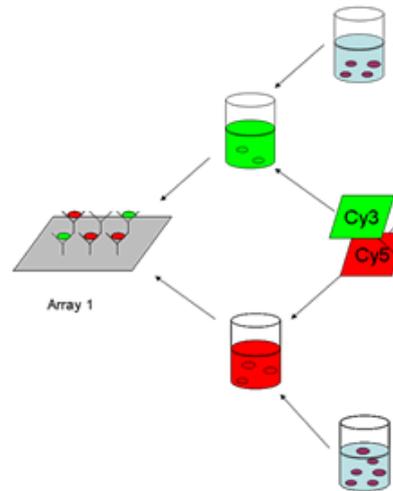


Abb. 12: Schematische Darstellung eines Antikörper-Microarray-Experiments zur vergleichenden Proteinanalyse von zwei verschiedenen biologischen Proben

Alternativ können auch andere Fängermoleküle wie Aptamere, Ribozyme, *Molecular Imprinted Polymers* oder Kohlenhydrate eingesetzt werden. Dann spricht man von Capture- oder Non-Protein-Microarrays (Kreutzberger, 2006; Twyman, 2004).

Das Gegenstück zu den Antikörper-Arrays stellen die Antigen-Arrays dar. Hier werden Antigene auf die Microarray-Oberfläche gespottet, welche von Antikörpern aus einer Probenlösung erkannt werden (Abb. 13 links). Antigene können neben Proteinen auch Peptide oder Kohlenhydrate sein. Anwendung finden Antigen-Arrays hauptsächlich bei dem Antikörper-Profilung von humanen Seren, was auch in dieser Arbeit durchgeführt werden soll. Andererseits können Microarrays mit gespotteten Allergenen oder Autoantigenen verwendet werden, um bei der Untersuchung von Allergien oder Autoimmunkrankheiten Serum-Proben nach Antikörpern verschiedener Klassen zu screenen, (Hueber *et al.*, 2005; Jahn-Schmid *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2002; Krenn *et al.*, 2004; Lebrun *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2002), (Lueking *et al.*, 2003). Auch Antikörper gegen mikrobielle Antigene können so detektiert werden (siehe unten).

Werden komplexe Proteingemische wie z.B. Zellen, Zell- bzw. Gewebelysate oder Serum auf die Array-Oberfläche gespottet spricht man auch von Reversen Protein Microarrays (Hultschig *et al.*, 2006; Kreutzberger, 2006), (Abb. 13 rechts). Dieser Ansatz bietet sich an, wenn die Expression oder Aufreinigung von Proteinen aus *E. coli* oder Hefezellen nicht möglich ist wie z.B. wenn modifizierte Proteine aus Proben von Krebspatienten untersucht werden sollen.

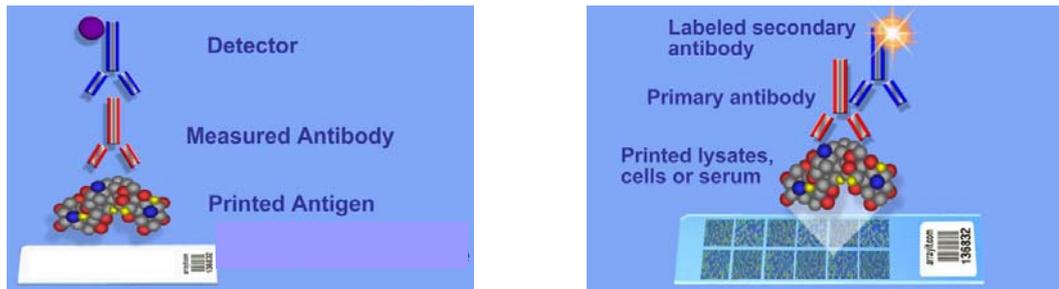


Abb. 13: Schematische Darstellung eines Antigen-PMA-Experiments (links, Telechem, USA) und eines reversen PMA-Experiments (rechts, Telechem, USA)

Einen weiteren besonderen Typ der analytischen PMA stellen die Gewebe-Arrays oder auch *Tissue Microarrays* dar. Hier sind auf kleinstem Raum viele verschiedene Gewebeproben in einem Parafinblock angeordnet (Krenn *et al.*, 2004). Standard-Analysemethoden für herkömmliche Gewebeproben wie immunohistochemische Färbungen, *in situ* Hybridisierung und andere molekulare Detektionsmethoden können auf Gewebe-Microarrays übertragen werden und ermöglichen damit eine effektive parallele Analyse von verschiedenen Geweben.

In den letzten Jahren fand auch die Nanotechnologie zunehmend Anwendung in der Bioanalytik. So entstanden u.a. „Nanoarrays“ die ganz auf eine planare Oberfläche verzichten. Die Biomoleküle sind bei diesem nicht mehr arraybasierten Format (Twyman, 2004) auf Beads, Nanopartikeln oder Quantenpunkten immobilisiert (Abb. 14). Trotzdem können sehr viele Analysen gleichzeitig in einem Experiment durchgeführt werden (näheres siehe 3.3.4). Diese Technologie wird womöglich die nächste Generation an Arrays hervorbringen, da hier noch sehr viel Potential besonders im Bereich der Sensitivität vorhanden ist (Jain, 2005).

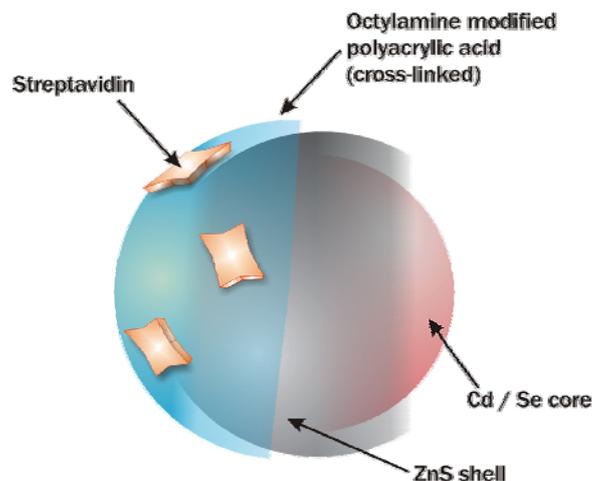


Abb. 14: schematische Darstellung eines Quantendots bestehend aus Kern, Hülle und einer Schicht zur Kopplung von Biomolekülen (hier über Streptavidin)

3.3.3 Anwendungen von Protein Microarrays im Bereich der Mikrobiologie

Da in dieser Arbeit Serum-Antikörper detektiert werden sollen, die gegen Proteine eines bakteriellen Erregers gerichtet sind, erfolgt an dieser Stelle eine kurze Übersicht über bisherige Arbeiten mit vergleichbarem Hintergrund.

Der erste Protein-Microarray, der für die Serodiagnose von Infektionskrankheiten eingesetzt wurde, nutzte Antigene von *Toxoplasma gondii*, sowie dem Rubella-Virus, dem Cytomegalovirus und dem Herpes Simplex Virus Type I und II, die auf Amino-Silan beschichtete Glasträger gespottet wurden (Mezzasoma *et al.*, 2002). Damit konnten simultan Antikörper aus humanen Seren gegen diese Antigene detektiert und so eine eventuelle Infektion mit dem entsprechenden Erreger nachgewiesen werden.

In einer anderen Arbeit wurden PMAs mit 149 verschiedenen *Yersinia pestis* Proteinen beschrieben, um Antikörperreaktionen von immunisierten Kaninchen zu analysieren (Li *et al.*, 2005). Es konnten dabei potentielle Kandidaten für Impfstoffe und/oder diagnostische Marker für den Erreger der Pest identifiziert werden.

Für die Untersuchung des Coronavirus, welches SARS (*severe acute respiratory syndrome*) verursacht (SARS-CoV), wurden auch bereits PMAs eingesetzt. Auch hier war das Ziel durch das Screening von Antikörpern gegen Virus-Proteine Impfstoffkandidaten oder diagnostische Marker zu identifizieren. Dafür wurden in dieser Arbeit 13 rekombinante SARS-CoV-Proteine auf aldehyd-aktivierte Glasträger gespottet, welche dann mit SARS-Patienten-Seren gescreent wurden (Qiu *et al.*, 2005). Neben der Identifizierung von potentiellen Impfstoffen und diagnostischen Markern, konnte auch für einige Proteine die Hypothese bestätigt werden, dass diese während des Virus-Zyklus synthetisiert werden. Eine ähnliche Arbeit konnte ebenfalls diagnostische Marker identifizieren. Zusätzlich wurde hier noch gezeigt, dass mit PMAs im Vergleich zu, ferner getesteten, herkömmlichen ELISA-Assays eine höhere Sensitivität erzielt werden kann (Lu *et al.*, 2005). In einer aktuellen Arbeit diesen Jahres kam man auch zu diesem Ergebnis (Zhu *et al.*, 2006). Hier wurden neben SARS-CoV-Proteinen auch Proteine von fünf anderen Corona-Viren auf Nitrocellulose-beschichtete Glasträger gespottet. Mit einem Computer-Algorithmus, der die Daten der PMA-Experimente heranzog, konnten SARS-CoV-Infektionen mit hoher Treffersicherheit Patientenseren zugeordnet werden.

Zur Serodiagnose von Tuberkolose-Patienten wurden ebenfalls schon PMAs eingesetzt (Tong *et al.*, 2005). Dabei konnte von 54 gespotteten *Mycobacterium tuberculosis* Antigenen, eines identifiziert werden, welches spezifisch zwischen nicht infizierten und infizierten

Patienten unterschied. Bei anderen Antigenen bereiteten *E. coli* Protein-Kontaminationen und fehlende Glykosylierungen aufgrund der rekombinanten Antigen-Produktion in *E. coli* Probleme.

Neben den bisher angesprochenen Antigen-Arrays können auch Antikörper-Arrays zur Analyse von Mikroorganismen genutzt werden. Beispielsweise wurden Antikörper gegen *E. coli* auf einem Microarray immobilisiert, so dass erfolgreich *E. coli* Bakterien in einer Probenlösung über einen Sandwich-Assay nachgewiesen werden konnten (Lee *et al.*, 2005).

In einer Arbeit dieser Arbeitsgruppe aus dem letzten Jahr wurden bereits Serum-Screening-Experimente mit Seren von Meningitis-Patienten auf Nitrocellulose-beschichteten PMAs durchgeführt (Kreutzberger, 2005; Steller *et al.*, 2005). Dabei zeigten von 91 verschiedenen rekombinanten *Neisseria* Proteinen 47 eine Immunreaktion mit mindestens einem von 20 Patientenseren. Dabei werden die meisten der anderen Proteine nur von wenigen (1-3) verschiedenen Seren, das phasenvariable Oberflächen-Protein OpaV wurde jedoch von 11 Seren erkannt und es kann daraus geschlossen werden, dass dieses Protein häufig während der pathogenen Phase des Erregers exprimiert wird. Neue Experimente mit zusätzlichen Proteinen und Patientenseren könnten diese Ergebnisse bestätigen und noch weitere neue Informationen liefern.

3.3.4 Anforderungen und Probleme bei der Herstellung von Protein Microarrays

Bei der Planung eines Protein-Microarray-Experiments, müssen verschiedene Punkte berücksichtigt werden: Angefangen bei den zu immobilisierenden Proteinen über die passende Oberfläche bis hin zur geeigneten Detektionsstrategie.

Die Generierung der zu untersuchenden aufgereinigten Proteine ist nicht trivial und stellt meist die Hauptlimitierung bei Protein-Microarray- Experimenten dar (Kreutzberger, 2006). Die Expression und Aufreinigung großer Protein-Bibliotheken erweist sich oft als sehr zeitaufwendig und schwierig, nicht zuletzt, da sich jedes Protein aufgrund der variierenden Eigenschaften anders verhält. Für viele funktionelle PMAs ist eine native Aufreinigung nötig, die sicherstellt, dass die Funktionalität des Proteins erhalten bleibt. Hier ist die Aufreinigung daher besonders problematisch. Bei der Expression in prokaryotischen Expressionssystemen (*E. coli*) können meist auch keine alternativen Spliceformen oder spezielle posttranslationalen Modifikationen berücksichtigt werden. Da in dieser Arbeit bakterielle Proteine exprimiert werden sollen, stellt dies hier kein Problem dar. Auch ist die Funktionalität nicht von Bedeutung, da nur die Epitope der Proteine von Relevanz sind. Auch wenn an

dieser Stelle erwähnt werden muss, dass lediglich lineare Epitope erkannt werden können, was aber für viele Fragestellungen ausreichend ist. Um die Expression von Proteinen im großen Maßstab zu erleichtern, besteht die Möglichkeit die Proteine direkt auf dem Array zu exprimieren (Angenendt *et al.*, 2006; Bussow *et al.*, 1998; Ramachandran *et al.*, 2004). Für die Sicherstellung der Reinheit und standardisierter Proteinmengen werden aber dennoch in Zukunft noch weitere Entwicklungen nötig sein.

Für Antikörper-Arrays stellt die Bereitstellung der spezifischen Antikörper im großen Maßstab in kurzer Zeit noch eine Limitierung dar. Hier können jedoch *in-vitro*-Methoden wie z.B. die Antikörper-Generierung mit Hilfe des *phage display* angewendet werden (Konthur *et al.*, 2005).

Für das Spotten der Proteine auf die Microarray-Oberfläche stehen verschiedene so genannte Arrayer zur Verfügung. Im Wesentlichen unterscheidet man Roboter, die Kontakt- und nicht Kontakt-Verfahren nutzen (Kambhampati, 2004). Bei der letzteren kontaktfreien Methode nutzt man piezo-elektrische Verfahren (angelehnt an übliche Tintenstrahldrucker), die es ermöglichen eine Probe mehrmals hintereinander zu spotten. Dies spart Zeit, allerdings kostet es jedoch hier mehr Zeit zwischen verschiedenen Proben zu wechseln. Des Weiteren sind die benötigten Nadeln teuer und produzieren nicht immer homogene Spots. Bei den Kontakt-Verfahren unterscheidet man zwischen Solid- und Split-Pins (Nadeln mit einem Reservoir), letztere ermöglichen ebenfalls ein mehrmaliges Spotten (siehe Abb.15). Split-Pins sind jedoch gegenüber den in dieser Arbeit eingesetzten Solid-Pins kostenintensiver, nicht so robust, neigen zur Verschleppung von Probenmaterial und Viskositäts-Unterschiede in den Protein-Proben können das abgegebene Volumen beeinflussen. Die zur Zeit üblichen Pins haben an der Spitze einen Durchmesser von 75 bis 300 μm (z.B. von Genetix, GB).

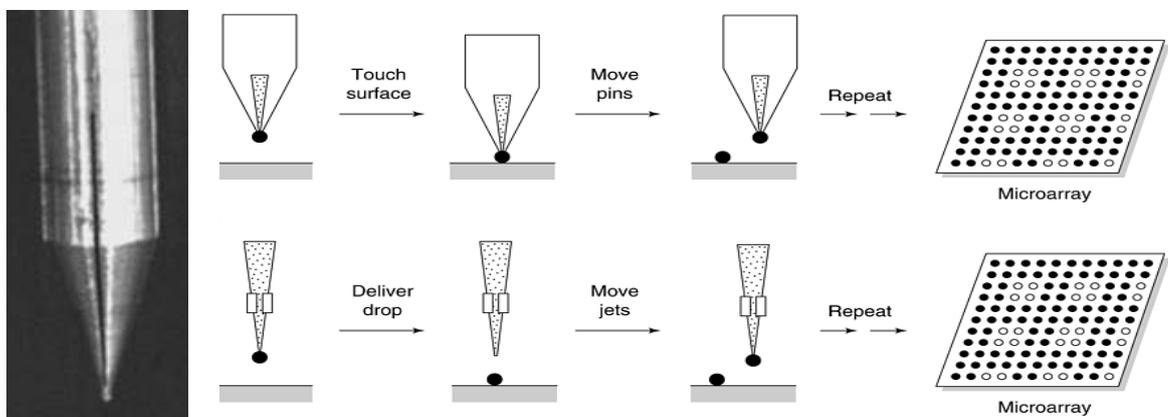


Abb. 15: Direktes Spotten mit Split-Pins (oben und links) sowie kontaktfreies Spotten (unten) (Schna, 1999)

Die Auswahl einer geeigneten Oberfläche für PMAs, die möglichst vielen verschiedenen Ansprüchen der aufzutragenden Proteine gerecht werden muss, ist nicht trivial und daher ein entscheidender Faktor für ein erfolgreiches PMA-Experiment. Es lassen sich keine pauschalen Aussagen treffen, da für jede Anwendung eine individuell beste Variante gefunden werden muss. Eine nicht sorgfältige Prüfung der gewählten Oberfläche kann zu unzureichender Haftung der Proteine, zu heterogenen Spots bzw. „Verschmierungen“, zu denaturierten und falsch orientierten Proteinen sowie zu unspezifischen Bindungen führen.

Hinsichtlich der Oberflächenstruktur lassen sich PMA-Träger in drei Gruppen unterteilen (Cretich *et al.*, 2006): Die Proteine können direkt auf einer aktivierten Glasoberfläche unter Nutzung einer planaren ein-dimensionalen Beschichtung mit funktionellen Gruppen wie z.B. Poly-L-Lysin, Aldehyden oder Epoxiden aufgebracht werden. Alternativ können die Biomoleküle über eine zweidimensionale Linker-Architektur mit der Hilfe von SAMs (selbst organisierende Monoschichten) (Ge & Lisdat, 2002) oder PEG (Polyethylenglycol) (Jun *et al.*, 2004) immobilisiert werden. Als dritte Möglichkeit bietet sich die Einbettung in dreidimensionale Gel-Beschichtungen aus z.B. Polyacrylamid, Agarose oder Nitrocellulose an (siehe auch Abb. 16).

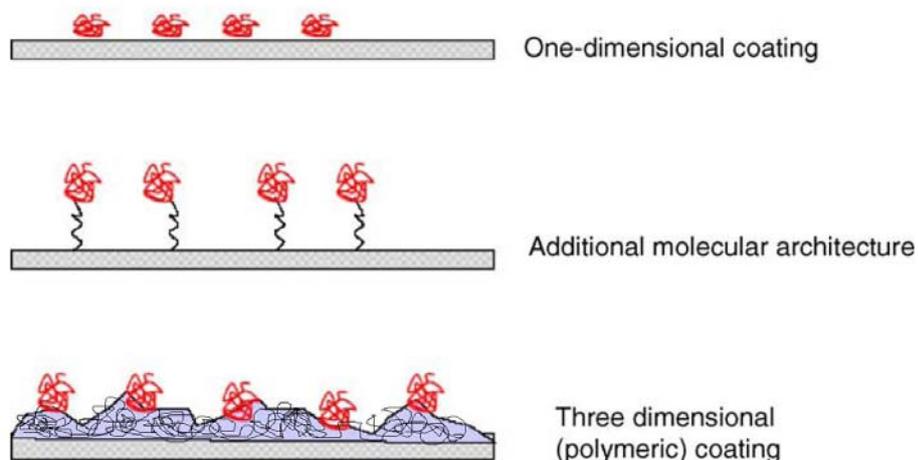


Abb. 16: Schematische Darstellung typischer Oberflächenstrukturen von PMAs (Cretich *et al.*, 2006).

Mit der Wahl der Oberflächenbeschichtung und damit einer bestimmtem Oberflächenchemie fällt auch meist die Entscheidung für eine bestimmte Immobilisierungsstrategie. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen kovalenter und nicht kovalenter Immobilisierung sowie zwischen nicht orientierter (ungerichteter) und orientierter (gerichteter) Immobilisierung. Letztere ist notwendig, wenn die Zugänglichkeit von z.B. katalytischen Zentren bei funktionellen PMAs sichergestellt werden muss (Abb. 17 rechts), was durch bioaffine Bindung oder der Nutzung von spezifischen Oberflächeneigenschaften

des Proteins z.B. bei der Adsorption erreicht werden kann. Neben der Adsorption von Biomolekülen, der kovalenten Fixierung und der bioaffinen Bindung besteht auch die Möglichkeit der Einbettung in eine drei-dimensionale Gelmatrix.

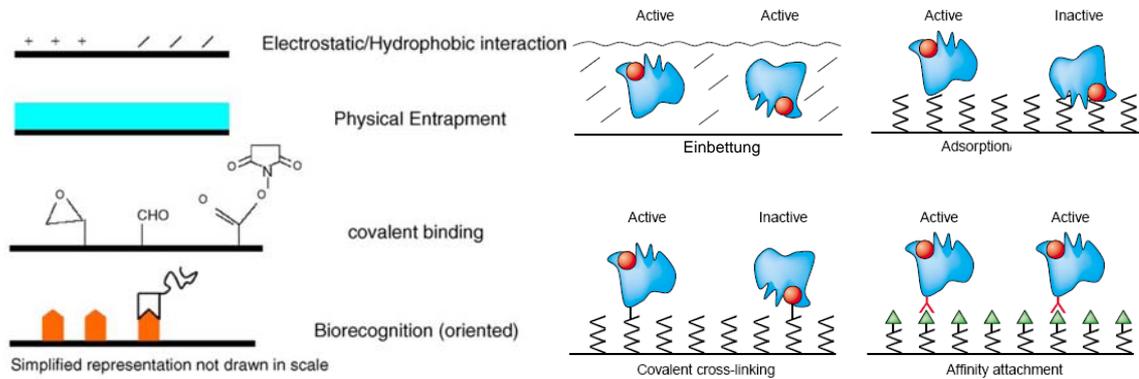


Abb. 17: Schematische Darstellung verschiedener Immobilisierungsstrategien (links) (Cretich *et al.*, 2006) und deren Auswirkung auf die Zugänglichkeit von funktionellen Gruppen oder reaktiven Zentren (rechts) (Zhu & Snyder, 2003).

Einige experimentelle Vergleiche von verschiedenen Oberflächen für PMAs wurden bereits durchgeführt (Angenendt *et al.*, 2002; Angenendt *et al.*, 2003b; Guillaume *et al.*, 2005; Kusnezow & Hoheisel, 2003). Auch in dieser Arbeit sollen kommerziell erhältliche Oberflächen, verglichen werden, um die für diesen Fall am besten geeignete Oberfläche zu ermitteln. Eine ausführliche Diskussion zu den Vor- und Nachteilen der einzelnen Oberflächen-Beschichtungen erfolgt daher erst im Ergebnisteil.

Für die Detektion der Bindungsereignisse auf dem PMA stehen verschiedene Detektionsmethoden zur Verfügung (Abb. 18). Dabei unterscheidet man zunächst grundsätzlich zwischen solchen Methoden, die markierte Sonden (labelled probes) verwenden und solche, die ohne Label auskommen (markierungsfrei) (Espina *et al.*, 2004). Je nach Anwendung sind die Anforderungen an die gewählte Detektionsstrategie unterschiedlich. Die wesentlichen Parameter sind die Sensitivität, das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis, die untere und/oder obere Detektionsgrenze, der dynamische Messbereich und die Selektivität.

Methoden, bei denen die Biomoleküle markiert werden, orientieren sich hauptsächlich an den klassischen Immunoassays wie z.B. ELISA. Bindungsereignisse werden hier optisch sichtbar gemacht. Es können Fluorophore, Chromogene, radioaktive Isotope, sowie Chemolumineszenz und Elektrochemolumineszenz eingesetzt werden. Je nach immobilisiertem Fängermolekül, also des verwendeten Microarraytyps (Antikörper-, Antigen-Array usw.) werden unterschiedliche Detektionsstrategien mit markierten Sonden angewendet

(Abb. 18 rechts): Befinden sich die Zielmoleküle direkt auf der Oberfläche, verwendet man markierte Bindemoleküle wie Antikörper, die diese spezifisch erkennen. Für Antikörper-Arrays können entweder indirekte Assays mit markierten Proteinen oder Sandwichassays mit markierten Zweitantikörpern verwendet werden. Auch für PMAs mit immobilisierten Proteinen, die für Antikörper-Serum-Screenings wie in dieser Arbeit genutzt werden, finden Sandwichassays Anwendung (Cretich et al., 2006; Espina et al., 2004).

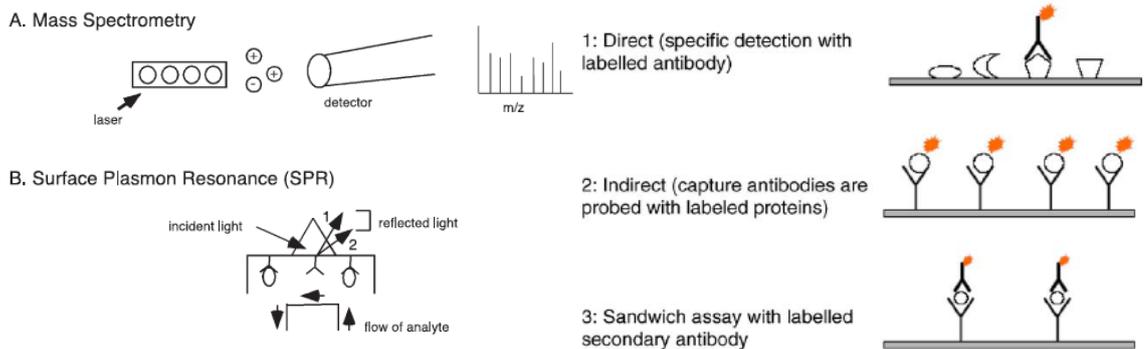


Abb. 18: Schematische Darstellung ausgewählter markierungsfreier Detektionsmethoden (links) (Espina *et al.*, 2004) und Methoden, die markierte Biomoleküle nutzen (rechts) (Cretich *et al.*, 2006).

Zur Signalamplifizierung wurden in den letzten Jahren viele interessante Methoden entwickelt, wie z.B. das Redoxrecycling, oder die Nutzung markierter DNA bei der so genannten *rolling circle amplification* (RCA) (Gao *et al.*, 2005; Kingsmore & Patel, 2003; Lizardi *et al.*, 1998). Bei der letzten Methode wird das zu detektierende Biomolekül mit einer Markierung versehen (z.B. Biotin), die von einem Antikörper erkannt wird. Dieser Antikörper ist seinerseits an einen Primer gebunden. Nach Hybridisierung mit einem zirkulärem DNA-Molekül, wird der Primer mit Hilfe einer Polymerase verlängert. In einem nächsten Schritt binden komplementäre fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide an die verlängerte DNA, welche dann detektiert werden (Abb. 19).

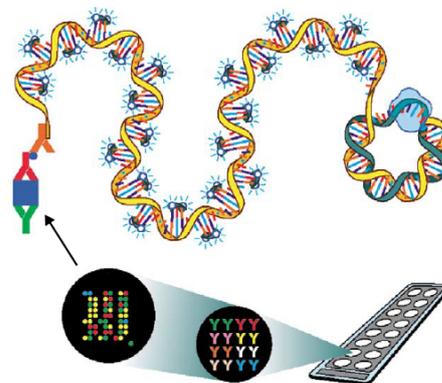


Abb. 19: Signalamplifizierung durch Nutzung von RCA Kingsmore, 2003 #200}.

Zu den markierungsfreien Methoden zählen Massenspektrometrie, Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR), welche die veränderten optischen Eigenschaften nach einem Bindungsereignis nutzt, Rasterkraftmikroskopie, welche ein direktes „Abtasten“ der Oberfläche ermöglicht, mikro-elektromechanische Systeme wie Cantilever und die massesensitive Quarzmikrowaage sowie neuere Entwicklungen aus dem Bereich der Nanotechnologie wie z.B. Kohlenstoffnanoröhrchen, bei denen oft veränderte elektrische Eigenschaften wie die Leitfähigkeit detektiert werden. Markierungsfreie Detektionssverfahren haben den Vorteil, dass umständliche und evtl. die Proteinaktivität herabsetzende Markierungsschritte entfallen sowie Echtzeit-Messungen möglich sind. Jedoch wird hierfür meist teures Equipment benötigt, welches in vielen Laboren nicht vorhanden ist (Cretich et al., 2006; Ramachandran et al., 2005).

Mit allen bisher genannten Strategien können zwar bis zu Tausende von gespotteten Molekülen analysiert werden, jedoch meist nur mit einem Analyten in der Probenlösung pro verwendetem Microarray. Möchte man aber mehrere Analyte oder Probenlösungen gleichzeitig untersuchen, muss man auf andere Strategien ausweichen. Die Entwicklung von Multiplexing-Ansätzen für diese Fragestellung ist ein sehr aktuelles Forschungsthema, weil es die Leistungsfähigkeit von PMA enorm erhöhen würde und damit auch große Kosten gespart werden könnten (Kersten et al., 2005). Zwei Strategien können hierzu verfolgt werden: Der Einsatz von verschiedenen Fluorophoren erlaubt es, verschiedene Biomoleküle zu markieren und gleichzeitig zu detektieren. Limitierend ist hier nur die Anzahl der zur Verfügung stehenden Fluorophore. Viel versprechend ist daher Möglichkeit der Markierung mit fluoreszierenden Quantendots (QDs), einer neuen Entwicklung aus dem Bereich der Nanotechnologie. Ihre Vorteile gegenüber bisherigen organischen Fluorophoren bestehen beispielsweise in der gigantischen Farbauswahl, da man QDs mit so gut wie jeder Emissionswellenlänge (465-2300nm) herstellen kann. Die Farbe des emittierten Lichts wird dabei nur durch die Größe des Kristalls bestimmt (Abb. 20 links) Zusätzlich bieten QDs den Vorteil, dass die Anregung mehrerer QDs mit nur einer Wellenlänge durchgeführt werden kann und dass sie eine wesentlich höhere Fluoreszenzintensität und –dauer gegenüber organischen Fluorophoren erreichen können (Jain, 2005). So kann durch die Zusammenstellung verschiedener QDs, z.B. in einem Bead, ein spektraler Barcode generiert werden, der eine unbegrenzte Anzahl an möglichen Markierungen gestattet (Abb. 20 rechts).

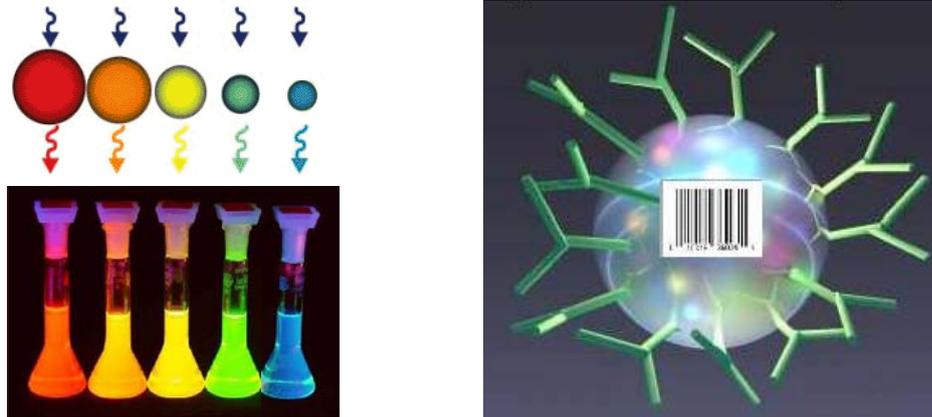


Abb. 20: Abhängigkeit des emittierten Lichts von der Größe der QD (links) und schematische Darstellung eines Latexbeads mit immobilisierten Antikörpern. Verschiedenfarbige Quantenpunkte im Inneren des Beads bilden dabei einen spektralen Barcode, der als eindeutige Markierung dient (QuantumDot-Corp., USA)

Die zweite Multiplexing-Strategie ist die Unterteilung des Microarrays in verschiedene Kompartimente, bei der jedes der Kompartimente die gleichen gespotteten Biomoleküle enthält. Dies kann physisch durch so genannte Multiwell-Slides geschehen, die meist eine auf den Microarray aufgebrachte Gitterstruktur nutzen (Mendoza *et al.*, 1999). Auch ohne der Verwendung zusätzlicher Strukturen kann z.B. durch sequentielles Spotten auf dieselbe Mikroarray-Position für jeden Spot der gewünschte Analyt gewählt werden (MIST-Technologie). Bei dieser Technologie können außerdem durch eine enzymatische Signalverstärkung sehr hohe Sensitivitäten erreicht werden (Angenendt *et al.*, 2003a), (Angenendt *et al.*, 2005). Problematisch ist allerdings die mögliche Kontamination des Spotting-Pins bei der Arbeit mit gefährlichen Probenlösungen.

Jede noch so gut gewählte Detektionsstrategie ist jedoch wenig wert, wenn nicht auch in eine gute Aufbereitung der gewonnenen Daten investiert wird. Für die Datenanalyse stehen einige kommerziell erhältliche Software-Module zur Verfügung, die die Auswertung erleichtern. Dennoch ist dieser letzte entscheidende Schritt eines Microarrayexperiments oft sehr zeitaufwendig und eine eindeutige Interpretierung der Daten nur durch das Vorhandensein von passenden Kontrollen und das Anwenden geeigneter statistischer Verfahren möglich.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Es wurden folgende Geräte eingesetzt: Elektrophoresesysteme für Proteingele (Gelkammer 80 cm x 100 cm; Werkstatt MPI; Gelkammer 335 cm x 100 cm, C.B.S. Scientific; Gelkammer „NuPAGE™ Midi-Cell“, Invitrogen; Gelkammer „NuPAGE™ Mini-Cell“, Invitrogen); Dot-Blot-Apparatur, Schleicher&Schuell; Photometer (Elisa Reader: SpectraMax 250, Molecular Devices; Spektralphotometer: Ultrospec 3100 pro, Pharmacia Biotech); Scanner (ScanArray4000), Perkin Elmer; Spotter (Q-Array), Genetix; Spotter, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin, Arbeitsgruppe Hultschig; Thermozykler, MJ Research; Wasserstrahlvakuum-Vorrichtung, Qiagen; Zentrifugen (Eppendorf Zentrifuge 5415 D; Eppendorf Zentrifuge 5810 R).

4.1.2 Gebrauchswaren

Folgende Gebrauchswaren wurde eingesetzt: Einweg-Filter-Röhrchen, 1 ml und 5 ml, Qiagen; Filter-Röhrchen zum Aufkonzentrieren, „Microcon YM-10“, Millipore; Filter-Papier „Optitran“, Schleicher&Schuell; Microarray-Inkubations-Behälter, Vitri; Microarray-Substrate:

- Nitrocellulose-Slides, „FAST™“, Schleicher & Schuell
- Nitrocellulose-Slides, „SuperNitro“, Telechem
- Aldehyd-Slides, „SuperAldehydII“, Telechem
- Aldehyd-Slides, „Nexterion Slide AL“, Schott
- Aldehyd-Slides, Genetix
- Epoxy-Slides, “SuperEpoxy” und “SuperEpoxyII”, Telechem
- Epoxy-Slides, „Nexterion Slide E“, Schott
- Epoxy-Slides, Genetix
- Amin-Slides, SuperAmin“, Telechem
- Amin-Slides, „Nexterion Slide A“ und „Nexterion Slide HiSens A“, Schott
- Polymer-Slides, “SuperProtein”, Telechem
- Hydrogel-Slides, “Nexterion Slide H”, Schott

Mikrotiterplatten:

- 96 “wells” runder Boden Greiner
- 96 “deep-wells” runder Boden Qiagen
- 96 “deep-wells” flacher Boden Qiagen
- PCR-Platten „Thermo Fast 384“, Abgene
- 384-Well-Platten, Genetix

Multiplexing-Systeme

- Microplate Microarray Hardware, Telechem
- „Nexterion Slide MPX“, Schott

Polypropylen-Röhrchen (15 und 50 ml), Greiner; Objektträger, Menzel-Gläser; SDS-PAGE-Gradienten-Gele „NuPage Novex 4-12% Bis-Tris Mini/Midi Gel“, Invitrogen; SpinColumns „Mobicols“, MoBiTec; SpinColumns mit Ni-NTA gefüllt, Qiagen; Chromatographie-Papier „3MM Chr“, Whatman.

4.1.1. Feinchemikalien und Lösungsmittel

Von Merck wurden bezogen: APS (Ammoniumperoxodisulfat), di-Natriumhydrogenphosphat, Essigsäure, Ethanol, Glukose, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Salzsäure, SDS (Natriumdodecylsulfat).

Von Sigma wurden bezogen: Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin), BCIP-NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate / Nitro Blue Tetrazolium Tabletten), Bromphenolblau, Guanidinhydrochlorid (GuHCL), Tween 20, Dithiothreitol (DTT).

Von Roth wurde bezogen: Acrylamid/Bisacrylamid Mischung „Rothiphorese Gel 30“ (Acrylamid 30 % (w/v) / Bisacrylamid 0,8 % (w/v) - 37,5:1).

Von Gibco wurde bezogen: Agarose Gibco BRL, FKS (Fötale Kälberserum), hitzeinaktiviert, Harnstoff.

Von Promega wurde bezogen: Attophos.

Von Pierce wurde bezogen: Bradford-Färbereagenz (“Coomassie™ Plus”), Coomassie Brilliant Blue R-250.

Von PAA Laboratories wurde bezogen: BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V).

Von BioVectra wurde IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid) bezogen.

Lysozym wurde von Roche bezogen.

Von BioRad wurden bezogen: Magermilchpulver, Protein-Größen-Standard “Precision Plus Protein Standards All Blue” (10 – 250 kDA).

Von Qiagen wurde Ni-NTA-Agarose bezogen

Von Invitrogen wurde TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) bezogen.
Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel hatten, soweit nicht anders angegeben, Analysenqualität.

Von Amersham wurde bezogen: Streptavidin, Alexa546 konjugiert

4.1.3 Antikörper und Seren

- Ziege-Anti-Human-IgA(Fab spezifisch)-Antikörper, AP-Konjugat Sigma
- Ziege-Anti-Human-IgG(Fab spezifisch)-Antikörper, AP-Konjugat Sigma
- Ziege-Anti-Human-IgM(Fab spezifisch)-Antikörper, AP-Konjugat Sigma
- Ziege-Anti-Maus-IgG(Fab spezifisch) -Antikörper, AP-Konjugat Sigma
- Ziege-Anti-Maus-IgG (H+L)-Antikörper CyTM5-Konjugat, Jackson ImmunoResearch
- Ziege-Anti-Human-IgG (H+L)-Antikörper CyTM5-Konjugat, Jackson ImmunoResearch
- Ziege-Anti-Human-IgG (H+L)-F(ab')₂-Fragment CyTM5-Konjugat, Jackson ImmunoResearch
- Ziege-Anti-Maus-IgG (H+L)-Antikörper TexasRed-Konjugat, Jackson ImmunoResearch
- Ziege-Anti-Human-IgG (H+L)-Antikörper TexasRed-Konjugat, Jackson ImmunoResearch
- Ziege-Anti-Human-IgA/G/M (H+L)-Antikörper CyTM5-Konjugat Jackson ImmunoResearch
- Ziege-Anti-Human-IgM (Fc5μ)-Antikörper CyTM5-Konjugat Jackson ImmunoResearch
- Humane-IgG-Antikörper, Sigma
- Maus-Anti-RGS-His-Antikörper, Qiagen
- Maus-Anti-His-Antikörper, Trendpharma
- Maus-Anti-RGS-His, Alexa-Red konjugiert, Qiagen
- Patienten Serum (Meningitis) S. Heuberger (Graz, Österreich)
- Patienten Serum (Meningitis) Georgina Tzanakaki (Athen, Griechenland)
- Patienten Serum (Meningitis) Jamie Findlow (Manchester, England)
- Kontrollseren (DRK-Klinik, Berlin)

4.1.4 Expressionsstamm und Expressionsvektor

Es wurde der *E. coli* Stamm SCS1 mit dem Helferplasmid pSE111 verwendet (Abb. 21) (Bussow *et al.*, 1998). Die klonierten Gene befanden sich in dem Plasmidvektor: pQE32-NST-BTattB (ein Derivat von pQE30NST). Die Genbank Accession Number lautet: GI: 3328183. Der Expressionsvektor enthält eine Ampicillinresistenz und das Helferplasmid eine Kanamycinresistenz.

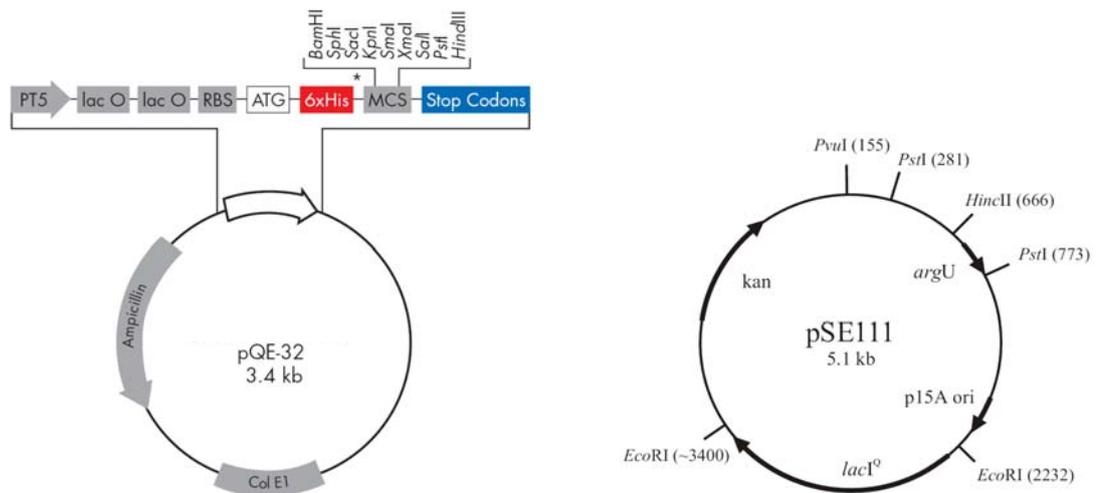


Abb. 21: schematische Darstellung des Expressionsvektors pQE32-NST-BTattB (links) und des Helferplasmids pSE111 (rechts), "The QIAexpressionist" 06/2003, Qiagen. PT5: T5 Promotor, lac O: lac Operator, RBS: Ribosomenbindungsstelle, ATG: Start-Codon, 6xHis: RGS-His₆-Tag, MCS: Multiple Klonierungsstelle mit Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme, Col E1: Replikationsursprung, Ampicillin: Ampicillin-Resistenz, kan: Kanamycin-Resistenz, lacI^Q: Gen für das lac-Repressor-Protein.

4.1.5 Puffer und Medien

- LB-Medium (ein Liter) für *E. coli*-Expression: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH 7,5, Sterilisiert durch Autoklavierung
- LB-Agarose: LB-Medium, 15 g Agar für einen Liter
- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7,5
- PBST: PBS, 0,05% (v/v) Tween 20
- TBS: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7,5, 0,1 % (v/v) Tween 20
- TBST: TBS, 0,05% (v/v) Tween 20

- Lysepuffer A : 6 M GuHCl, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, pH 8,0
- Waschpuffer C: 8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, pH 6,3
- Elutionspuffer D: wie Waschpuffer C, pH 5,9
- Elutionspuffer E: wie Waschpuffer C; pH 4,5
- 4 x SDS-Ladepuffer: 200 mM Tris-HCl pH 6,8, 8 % (w/v) SDS, 1 M Glycin, 0,4 % (w/v) Bromophenol Blau
- Laufpuffer für SDS-PAGE: 25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 0,1% (w/v) SDS, 250 mM Glycin
- gebrauchsfertiger 25xMES-SDS-Laufpuffer für „NuPage-SDS-PAGE-Gele“, Invitrogen: für einen Liter 50 ml 25x-Puffer mit 950 ml ddH₂O mischen
- Coomassie Blue-Färbelösung für SDS-PAGE (ein Liter): 1,25 g Coomassie Brillant Blue G 250, 225 ml technischem Ethanol gelöst, 225 ml doppelt-distilliertes Wasser (ddH₂O), 50 ml Eisessig
- Entfärber-Lösung für SDS-PAGE: 20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig, in ddH₂O
- 40 % (w/v) Glukose: 400 g D-+-Glukose Monohydrat werden in 1 l ddH₂O gelöst und autoklaviert
- Attophos-Puffer: 1 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9,5
- Gebrauchsfertige Bradford-Reagenz „Coomassie™ Plus-200 Protein Assay Reagent“, Pierce

4.1.6 Computer-Programme und Online-Datenbanken

- Genepix Pro 5.0, Axon Instruments, USA
- Weiterführende Microarray-Datenauswertung: Excel 2002, Microsoft
- Neisseria: <http://www.tigr.org>
- Literaturrecherche: www.pubmed.org
- Spectraviewer: www.probes.com (Invitrogen)

4.2 Methoden

Prinzipiell und vereinfacht wurde in dieser Arbeit wie folgt vorgegangen (siehe auch Abb. 22): Mit vorhandenen *E. coli*-Expressionsklonen wurden die gewünschten Proteine rekombinant hergestellt und denaturierend aufgereinigt. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Erfolgreich aufgereinigte Proteine wurden dann auf die ausgewählten Microarray-Substrate gespottet und anschließend für das Serumscreening prozessiert. Abschließend wurden die erhaltenen Daten entsprechend ausgewertet, um Proteine zu identifizieren, die von Patientenseren erkannt wurden.

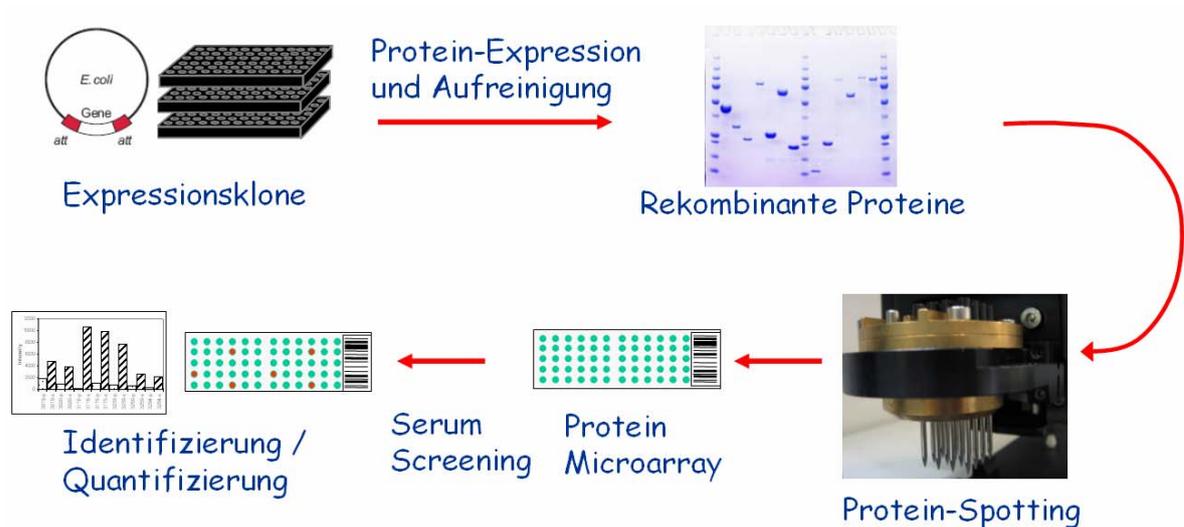


Abb. 22: Schematische Darstellung des methodischen Ablaufs in dieser Arbeit, modifiziert nach (Kreutzberger, 2005)

4.2.1 Proteinchemische Methoden

4.2.1.1 Proteinexpression in *E. coli*

Für die Vermehrung der *E. coli* Klone, die das Plasmid mit dem gewünschten Gen enthalten, wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt, mit der dann am nächsten Tag das Hauptkulturmedium angeimpft wurde. Nach ca. 2 Stunden erfolgte die Induktion der Proteinexpression und nach weiteren 4 Stunden konnten die Bakterien geerntet werden.

Die Proteinexpression wurde im kleinen, mittlerem oder auch im großen Maßstab durchgeführt.

Großer Maßstab:

Hier wurden zunächst je 5 ml Vorkulturmedium in einem 15-ml-Röhrchen (LB-Medium mit 2% (v/v) Glukose, 15 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Ampicillin) mit 50 µl der *E. coli* Bakterien des entsprechenden Glycerinstocks angeimpft. Die Anzucht erfolgte im Schüttelinkubator bei 37°C über Nacht.

Die gesamte Vorkultur wurde dann zu 150 ml Hauptkulturmedium (Zusammensetzung wie Vorkultur) in einen Erlenmyerkolben gegeben und für ca. 2 Stunden schüttelnd bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit 150 µl 1M IPTG (Endkonzentration 1 mM). Nach weiteren 4 Stunden wurden die Kulturen in Zentrifugenbecher überführt und die Bakterien für 10 min bei 3.000 x g abzentrifugiert. Das überstehende Medium wurde verworfen und das erhaltene Bakterienpellet wurde bis zur Proteinaufreinigung bei -20°C eingefroren.

Mittlerer Maßstab:

Hier wurde prinzipiell wie oben vorgegangen. Anders als bei der Expression im großem Maßstab wurden allerdings nur 5 ml Vorkulturmedium angeimpft. Zur Übernachtskultur wurden dann 45 ml Hauptkulturmedium zugegeben und die Induktion erfolgte mit 50 µl 1M IPTG. Die Zellernte erfolgte bei 1400 x g für 15 Minuten.

Kleiner Maßstab:

Es wurde nur 1 ml Vorkulturmedium angeimpft. Zur Übernachtskultur wurden dann 9 ml Hauptkulturmedium zugegeben und die Induktion erfolgte mit 100 µl 100 mM IPTG. Zur Zellernte wurde ebenfalls bei 1400 x g für 15 Minuten zentrifugiert.

4.2.1.2 Aufreinigung der Proteine aus *E.coli*

Die rekombinanten, in *E. coli* exprimierten, Proteine besaßen am N-Terminus sechs Histidinreste (His₆-Tag) und konnten somit affinitätschromatographisch über eine Nickel-Chelat Matrix aufgereinigt werden. Die spezifische Bindung der His₆-getaggten Proteine an Metallchelate beruht auf der Tatsache, dass bei neutralen bis basischen pH-Werten ein Stickstoffatom des Histidins im Imidazolring deprotoniert vorliegt und sein freies Elektronenpaar koordinative Bindungen zu Übergangsmetallkationen wie Ni⁺ ausbilden kann. Die Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) -Matrix von Qiagen zeichnet sich dabei durch eine hohe Affinität und Selektivität aus. Die Matrix ist in diesem Fall an Sepharose[®] CL-6B gekoppelt (Ni-NTA-Agarose) und hat eine Aufnahmekapazität von 5-10 mg Protein/ml.

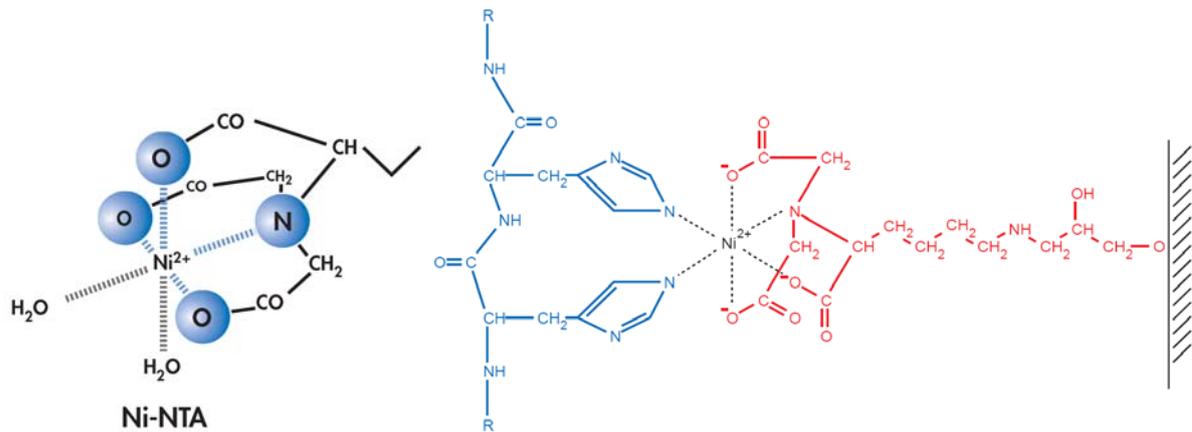


Abb. 23: Schematische Darstellung des Aufbaus der Ni-NTA-Matrix (inks) und der Interaktion benachbarter Reste des His₆-Tags mit der Ni-NTA-Matrix (“The QIAexpressionist“ 06/2003, Qiagen)

Die Reinigung der Proteine wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden die *E. coli* Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut, anschließend je nach Menge der kultivierten Zellen (großer oder kleiner Maßstab, siehe 4.2.1.1.) mit 5 ml, 2 ml oder 1 ml Lysepuffer A (teilweise zusätzlich unter Verwendung von Lysozym) versetzt und resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien wurden dann zur Lyse 1h bei 37°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert und anschließend die Zelltrümmer für 30 Minuten bei 10.000 g abzentrifugiert. Das Lysat (Überstand) wurde zur weiteren Aufreinigung aufbewahrt. Zur Bindung der Proteine aus dem Lysat an die Ni-NTA-Matrix und der anschließenden Elution wurden verschiedene Filter-Röhrchen genutzt (siehe auch Abb. 24):

- Verwendung von Filter-Röhrchen zur Befüllung mit Ni-NTA-Agarose (1 ml und 5 ml)
 - Das Lysat wurde hier in mit 1 ml (großer Maßstab) bzw. 500 µl (mittlerer Maßstab) Ni-NTA-Agarose gefüllte 15 ml Polypropylen-Röhrchen (PP-Tubes) gegeben und eine Stunde auf dem Rotationsschüttler zur Bindung der Proteine inkubiert. Dabei wurde die Suspension alle 15 Minuten mit dem Vortex erneut gemischt und schließlich in die entsprechenden Filter-Röhrchen überführt. Die Matrix wurde dann zwei Mal mit 4 ml Waschpuffer C gewaschen. Die Elution erfolgte mit 500 µl Elutionspuffer D bzw. E. Der verwendete Puffer sowie die Anzahl der Elutionsschritte wurde variiert. Für die SDS-PAGE wurden Proben der Eluate zurückbehalten. Alle Eluate wurden bis zur weiteren Verwendung (zur Proteinbestimmung oder zum Spotten der Proteine) bei -20°C aufbewahrt.
- Verwendung von gebrauchsfertigen SpinColumns von Qiagen
 - Die SpinColumns wurden zunächst auf eine Wasserstrahlvakuum-Vorrichtung gesteckt und mit 600 µl Puffer A equilibriert, der Puffer dabei durch Anlegen

von Vakuum abgesaugt. Nach der Equilibrierung wurde das gesamte Lysat (ca. 1 ml, kleiner Expressionsmaßstab) auf die Filtersäule gegeben und abgesaugt. Die Matrix wurde 2 x mit je 600 μ l Puffer C gewaschen, welcher ebenfalls abgesaugt wurde. Zur Elution wurde 2 x 200 μ l Puffer E verwendet. Dabei wurden die Filterröhrchen in 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäße gesetzt und zwei Minuten bei 700 x g zentrifugiert. Das Eluat in den Mikroreaktionsgefäßen wurde wie oben beschrieben weiterbehandelt.

- Verwendung von MoBiTec SpinColumns zur Befüllung mit Ni-NTA-Agarose
 - Hier wurden die Röhrchen vorab mit 100 μ l 1:5 verdünnter Ni-NTA-Agarose befüllt. Die weitere Vorgehensweise ist mit der für die Qiagen SpinColumns äquivalent.



Abb. 24: Fotografie der verwendeten Filter-Röhrchen. Von links nach rechts: Filter-Röhrchen zur Befüllung mit Ni-NTA-Agarose (5 ml und 1 ml-Volumen), Qiagen SpinColumns gefüllt mit Ni-NTA-Agarose, MoBiTec SpinColumns zum Befüllen mit Ni-NTA-Agarose

4.2.1.3 Expressionstest mit Kolonie-Blot

Für das Screening nach proteinexprimierenden *E. coli* Klonen wurde ein so genannter Kolonie-Blot durchgeführt, bei dem der RGS-His₆-Tag der rekombinanten Proteine mit einem Sandwich-ELISA (*enzyme-linked-immunosorbent assay*) nachgewiesen wurde. Dazu wurde zunächst LB-Agarose mit 15 μ g/ml Kanamycin sowie 100 μ g/ml Ampicillin versetzt und in Petrischalen gegossen. Für die Vorkulturplatten wurde mit einem Glasspatel 800 μ l 40%-Glukose in den erstarrten Agar eingearbeitet. Mit einem Zahnstocher wurden die *E. coli* Klone aus den angetauten Glycerin-Stocks auf die Platten überführt (44 Klone pro Platte nach Schema in Abb. .6). Die Klone wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C angezogen.

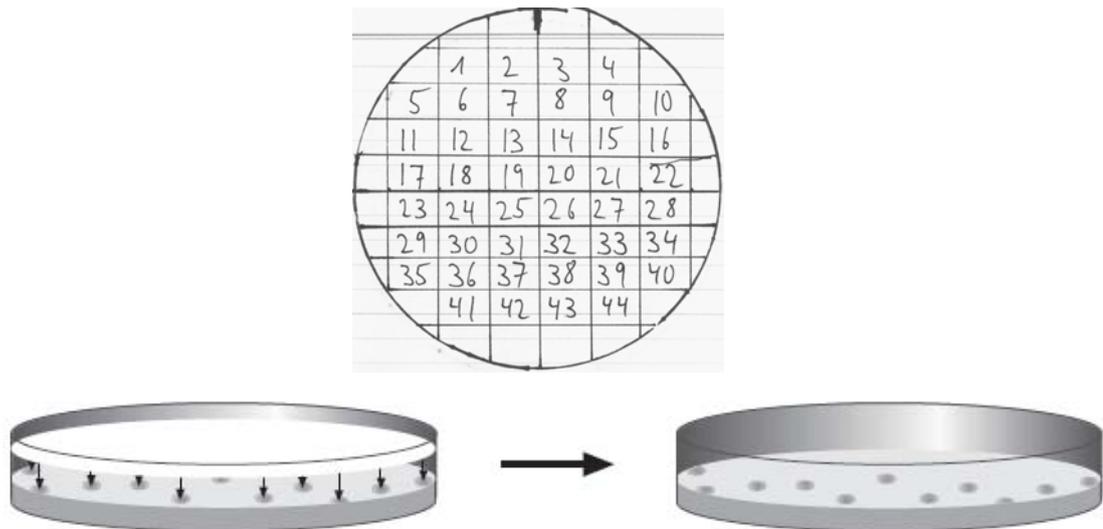


Abb. 25: Oben: Schematische Darstellung der Klonanordnung auf den Vorkulturplatten (jede Nummer entspricht einem *E. coli* Klon). Unten: Schematische Darstellung der Übertragung der Kolonien auf ein Filterpapier und anschließend auf eine neue Platte ("The QIAexpressionist" 06/2003, Qiagen)

Für die Hauptkulturplatten wurden 120 μ l IPTG zur Expressionsinduktion in die Agarplatten mit einem Glasspatel eingearbeitet. Durch Auflegen eines Filterpapiers auf die Vorkulturplatte, wurden die einzelnen *E. coli* Kolonien auf den Filter übertragen. Die Proteinexpression erfolgte durch Auflegen des Filters auf die Hauptkulturplatten und der Inkubation über 4 h im Brutschrank bei 37°C. Zur Lyse der Zelle wurden die Filter für 10 min mit 10 % (w/v) SDS und für weitere fünf Minuten mit 0,5 M Natronlauge behandelt. Dann erfolgte die Behandlung für zwei Mal fünf Minuten mit Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4). Anschließend wurde der Filter zwei Mal für 10 min mit TBS gewaschen und zum Blocken für eine Stunde mit 3 % (w/v) Milchpulver in TBS schüttelnd inkubiert. Die Blockinglösung wurde durch die zweimalige Behandlung mit TBST für je 10 min und einmal für weitere 10 min mit TBS abgewaschen. Zum Nachweis der rekombinant exprimierten Proteine wurden die Filter über Nacht mit 3 ml 0,2 μ g/ml Maus-Anti-RGS-His-Antikörper in einem 50 ml-PP-Tube schüttelnd inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit TBST für je 10 min und einmal für weitere 10 min mit TBS abgewaschen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem 1:3000 verdünnten enzymmarkierte Zweitantikörper (Ziege-Anti-Maus-IgG-, alkalische Phosphatase-Konjugat). Auch hier wurde wie oben ungebundene Antikörper abgewaschen. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von BCIP/NBT-Lösung (1 Tablette auf 10 ml ddH₂O) gestartet. Nach 10 minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von ddH₂O abgestoppt. Die Färbung der Filter wurden mit der Hilfe eines Farbscanners dokumentiert.

4.2.1.4 Proteinkonzentrierung

Zur Konzentrierung von gering konzentrierten Proteinproben wurden die Filter-Röhrchen „Microcon YM-10“ von Millipore verwendet. Die Ausschlussgrenze beträgt hier 10 kDa. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen (Nr.99394).

4.2.1.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die eindimensionale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Bei der diskontinuierlichen PAGE durchlaufen die Proteine zunächst ein kurzes großporiges Sammelgel, wo sie zu einem Stapel komprimiert werden, bevor sie in das längere engporige Trenngel gelangen und dort nach ihrer Mobilität (Ladung und Größe) aufgetrennt werden. Bei der SDS-PAGE dient das stark anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) der Denaturierung der Proteine. Durch die sequenzunabhängige Bindung von SDS an die Proteine, werden auch unterschiedlich geladene Proteine mit einer einheitlichen negativen Ladung versehen. Die Auftrennung im Trenngel ist deshalb nur noch vom Molekulargewicht der Proteine abhängig.

Zur vollständigen Denaturierung der Proteine wurden je 9,75 µl Proteinprobe (aus dem Eluaten) mit 3,75 µl 4 x Ladepuffer (enthält SDS) sowie 1,5 µl 1M Dithiothreitol (DTT) versetzt und für 10 Minuten bei 70°C erhitzt. DTT diente dabei als Reduktionsmittel, welches die für die Tertiärstruktur wichtigen Schwefelbrücken zwischen Cystein-Resten reduziert und damit aufbricht.

Verwendung selbst hergestellter Gele

Die bei der SDS-PAGE eingesetzte Gelmatrix besteht aus Polyacrylamid, welches durch eine radikalische Reaktion aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis) entsteht. Die Trenneigenschaften des Gels können durch den Anteil an Gesamtacrylamid kontrolliert werden. Die Reaktion ist radikalischer Natur und wird durch den Zerfall von Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet, welches in Lösung freie Radikale bildet. N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) dient dabei als Katalysator.

Es wurde zunächst das Trenngel und nach dessen Polymerisierung das Sammelgel zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 1

aufgelistet. Anschließend wird der Kamm in das Sammelgel gesetzt und nach dessen Polymerisierung wieder entfernt. Das Gel wurde nun in der Gelkammer arretiert und diese mit Laufpuffer gefüllt. Die Taschen der Gele wurden mit ca. 12 µl denaturierte Proteinprobe bzw. 7,5 µl Proteingrößenstandard beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 50 – 60V für 20 Minuten bis die Lauffront die Trenngelgrenze erreichte, dann wurde die Spannung für etwa 4 Stunden auf ca. 120 V erhöht. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine etwa 1 h unter leichtem Schütteln in Coomassie-Färbelösung fixiert. Coomassie-Färbung ist eine sehr einfache Methode, Polyacrylamid-Gele zu färben. Diese Art der Färbung beruht auf reversibler Anlagerung des Farbstoffs an Amino-Gruppen der Proteine. Die untere Nachweisgrenze von Coomassie liegt bei ca. 500 ng Protein/Bande. Ungebundener Farbstoff konnte anschließend durch Schütteln in Entfärberlösung für mehrere Stunden entfernt werden. Die Geldokumentation erfolgte elektronisch mit einem Farb-Scanner.

Tabelle 1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

Komponente	Trenngel 6% 20ml	Trenngel 15% 20ml	Sammelgel 5% 10ml
ddH ₂ O	8,1 ml	2,1 ml	6,8 ml
Acrylamid, 30% (w/v)	4 ml	10 ml	1,7 ml
Tris, 1M, pH 8,8/6,8	7,5 ml	7,5 ml	1,25 ml
SDS, 10% (w/v)	200 µl	200 µl	100 µl
APS, 10% (w/v)	200 µl	200 µl	100 µl
TEMED	20 µl	20 µl	10 µl

Verwendung gebrauchsfertiger Gradientengele

Die gebrauchsfertigen Gradientengele des „NuPAGE“-Elektrophoresesystems von Invitrogen wurden wie beim Hersteller angegeben (NuPage Technical Guide , Version E, Oktober 2003) angewendet. Es wurden 12 µl denaturierte Proteinproben bzw. 7,5 µl Proteingrößenstandard aufgetragen. Für die Färbung und Entfärbung der Gele wurde wie oben vorgegangen.

4.2.1.6 Proteinbestimmung

nach OD₂₈₀

Die spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration basiert auf der UV-Absorption der Reste der drei aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Maßgeblich für die Messung das Absorptionsmaximum von Tryptophan bei 280 nm. Da die Anteile der drei Aminosäuren in den einzelnen Proteinen unterschiedlich sind, schwankt der Absorptionswert (=optische Dichte) für eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml zwischen 0,4 und 2,8. Auf der Basis eines mittleren Absorptionskoeffizienten für die drei Aminosäuren hat eine Lösung mit der optischen Dichte (OD₂₈₀) von 1,0 bei einem Lichtweg von 1 cm eine Proteinkonzentration von ca. 1 mg/ml. Andere Substanzen in der Lösung, die auch bei 280 nm absorbieren (wie z.B. Nukleinsäuren) können die Messung erheblich stören. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Einfachheit der Messung und der Tatsache, dass kein Proteinmaterial bei der Messung zerstört bzw. denaturiert wird.

Für die Messung wurde zunächst der Blindwert durch Messung der optischen Dichte des Elutionspuffers mit einem Photometer bestimmt. Dieser wurde dann von dem Messwert der Proteinprobe abgezogen. Jede Messung wurde dabei dreimal durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

nach Bradford

Dieses colorimetrische Verfahren zur Quantifizierung von des Gesamtproteingehalts einer Lösung beruht auf der Bindung des blauen Säurefarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau an Proteine in saurer Lösung (Bradford, 1976). Durch die Bindung des Farbstoff an Proteine, verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm.

Es wurde nach dem Mikrotiterplatten-Protokoll der Anleitung „Coomassie Plus“ von Pierce (Nr. 23238) vorgegangen.

4.2.1.7 Dot-Immunoassay

Zur Analyse der in den Patientenseren enthaltenen Antikörper wurde ein nicht kompetitiver ELISA durchgeführt. Die Serum-Antikörper stellten in diesem Fall die Antigene dar, an die die entsprechenden anti-humanen, enzymmarkierten Antikörper binden.

Zwischen die Dot-Blot-Apparatur wurde eine Nitrocellulose-Membran eingespannt. Die Membran wurde zunächst mit je 200 µl pro Vertiefung gespült bevor je 200 µl der verdünnten Seren auf die Membran gebracht wurden. Dann wurde erneut mit zwei Mal mit je 350 µl PBS gespült und die Apparatur auseinander gebaut. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde mit Blockinglösung (3% (w/v) Magermilchpulver in TBS) geblockt und daraufhin zwei Mal für je 15 min mit TBST und für 10 min in TBS gewaschen. Für die Reaktion mit dem enzymmarkierten Antikörper wurde die Membran für eine Stunde in 1:2500 mit Blocking-Lösung verdünnter anti-human-IgG (bzw. IgA oder IgM)-AP-Antikörper-Lösung inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen der Membran für je zwei Mal 10 min mit TBST und ein Mal für 10 min mit TBS sowie ein Mal 10 min mit Attophos-Puffer entfernt. Für die Farbreaktion wurde die Membran mit Attophos-Lösung (500 µl Attophos in 10 ml Attophos-Puffer) bis zur gewünschten Färbung inkubiert, die Reaktion mit Wasser gestoppt und die Membran für die Dokumentierung gescannt.

4.2.2 Protein Microarrays

4.2.2.1 Spotten der Proteine

Protein Microarrays bestehen aus einer großen Anzahl von verschiedenen dennoch gleichmäßig angeordneten Protein-Spots auf einer planaren Oberfläche. Diese werden mit einem Roboter durch Nadeln („Pins“) aus der Lösung auf das Trägersubstrat übertragen („Spotten“).

Für den Großteil der Vorversuche wurde dazu der Q-Arrays-Roboter von Genetix mit einem 16-Pin-Druckkopf verwendet. So konnten bei jedem Aufsetzen des Druckkopfes auf die Oberfläche immer 16 Proteine gleichzeitig gespottet werden (Abb. 26). Dabei wird das Probenvolumen (ca. 5 nl) durch Adsorptionskräfte am Pinschaft gehalten und durch den direkten Kontakt mit der Microarrayoberfläche wieder abgegeben. Die rostfreien Stahlpins besaßen Enden mit einem Durchmesser von 150 µm. Zur Ansteuerung wurde die Software Q-soft-200-Microarraying von Genetix verwendet.

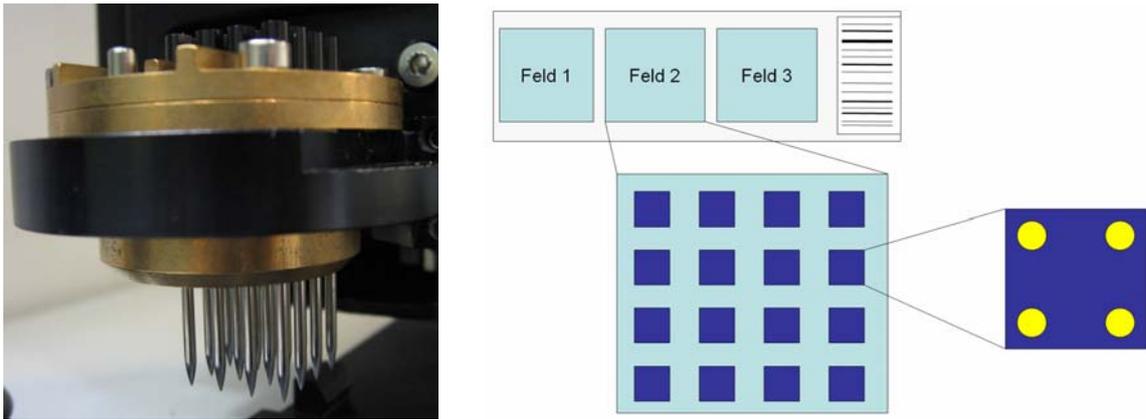


Abb. 26: Fotografie des Q-Array-Druckkopfes mit 16 Nadeln (links) und schematische Darstellung des erzeugten Protein-Patterns auf dem Microarray: Pro Feld werden 16 verschiedene Proteinproben gespottet wobei jedes Protein-Pattern aus mehreren identischen Spots besteht (z.B. 2x2, wie in dieser Abbildung gelb dargestellt). Alle gespotteten Felder sind ebenfalls identisch (hier Feld 1, 2 und 3).

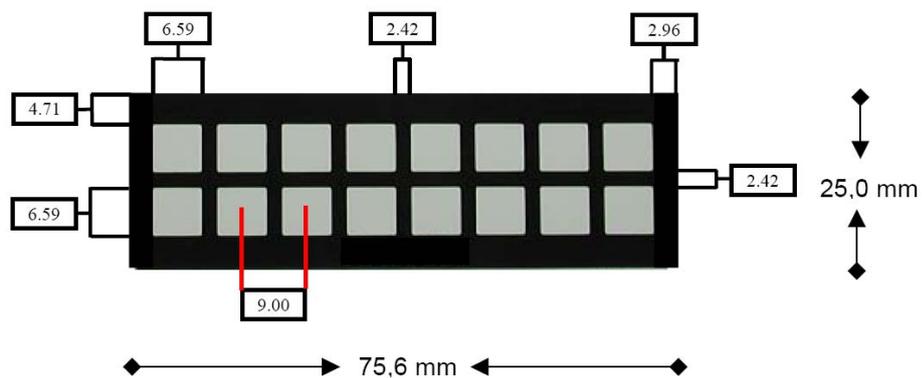
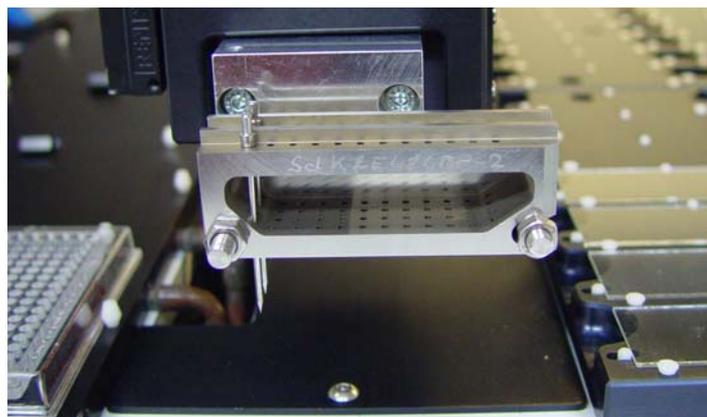


Abb. 27: Druckkopf für das Spotten der Multiplexing-Slides (oben) und Maße der Multiplexing-Struktur „Nexterion Slide MPX“ von Schott (unten). Zahlen beziehen sich auf mm-Angaben.

Für das Serumscreening mit allen rekombinanten Proteinen wurde ein von der Arbeitsgruppe Hultschig des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik abgewandelter QArray Spotter (Genetix) und ein selbst entwickelter Druckkopf verwendet. Es wurde mit einem oder zwei Pins 16 Felder in einem 11x11 Pattern gespottet, welches dem Multiplexing-System von Schott angepasst wurde (Abb. 27.). Für jeden Spot konnte dabei individuell ein anderes Protein gewählt werden. Der Abstand zwischen zwei Spots (*dot pitch*) betrug 380 µm. Die Ansteuerungssoftware ist ebenfalls eine arbeitsgruppeneigene Entwicklung.

4.2.2.2 Serumscreening

Die Prozessierung der Protein-Mikroarrays, sowohl bei den Vorversuchen zur Optimierung als auch bei den eigentlichen Serumscreenings, unterteilte sich allgemein in folgende Schritte: Zunächst wurde die Oberfläche der bespotteten Arrays mit einer Blockinglösung geblockt, um unspezifische Bindungen zu unterbinden. Nach der Inkubation der Arrays mit dem Erstantikörper (Serum- und/oder Maus-anti-RGS-His-Antikörper) in der Blockinglösung über Nacht wurden überschüssige ungebundene Antikörper wieder abgewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper im Dunkeln (anti-human- und/oder anti-Maus-Antikörper). Auch hier wurden anschließend ungebundene Antikörper durch Waschschrte entfernt bevor die Slides getrocknet und bis zum Scannen dunkel bei 4°C gelagert wurden.

Bei den Vorversuchen (ohne Multiplexing-System) erfolgte das Blocking und Waschen (5x 10 min mit entsprechender Waschlösung nach der Erstantikörper-Inkubation und nach der Zweitantikörperreaktion zusätzlich 1x fünf Minuten mit ddH₂O) schüttelnd in einem mit der entsprechenden Lösung gefülltem Plastik-Gefäß (siehe Abb. 28 links). Die Antikörperreaktionen wurden mit je 140 µl Antikörperlösung unter einem Deckgläschen durchgeführt. Dabei wurden die Microarrays in einer mit feuchten Papier ausgelegten geschlossenen Box gelagert, um während der Inkubation eine hohe Luftfeuchtigkeit zu garantieren (Abb. 28 rechts). Zum Ablösen der Deckgläschen vor den Waschschrten wurden die Slides kurz in Waschpuffer getaucht.



Abb. 28: Plastikgefäß zum Blocken und Waschen der Microarrays (links) und Box mit feuchtem Papier zum Generieren einer hohen Luftfeuchtigkeit während der Antikörper-Inkubationen (rechts).

Die Prozessierung der Multiplexing-Slides, unterschied sich im Wesentlichen dadurch von der vorigen Prozessierung, dass alle Lösungen mit einer Multikanalpipette in die jeweiligen Einsparungen gegeben wurden, also auch keine Deckgläschen verwendet wurden (Abb. 29). Für das Blocking wurden pro Feld 70 μl Blocking-Lösung (10 % (w/v) Magermilchpulver in PBST) und für die Antikörperreaktionen jeweils 50 μl Antikörperlösung (verdünnt in Blockinglösung) verwendet. Gewaschen wurde nach jeder Antikörperinkubation 4 mal für je drei Minuten mit je 100 μl PBST. Dabei wurde die Flüssigkeit jeweils vor dem nächsten Waschschritt mit einer Multikanalpipette wieder abgezogen. Anschließend wurde die Multiplexing-Struktur von dem Microarraysubstrat entfernt und der gesamte Chip für 10 min in PBS und für weitere fünf Minuten in ddH₂O gewaschen. Die Slides wurden zum Trocknen in ein 50-ml-PP-Tube überführt und für drei Minuten bei 500 x g zentrifugiert.

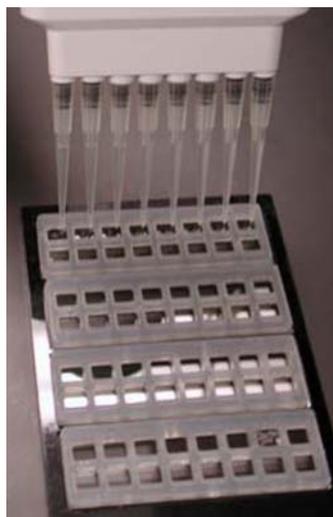


Abb. 29: Prozessierung der Multiplex-Microarrays mit einer Multikanalpipette

Alle Versuche, bei denen mit humanen Seren gearbeitet wurde, wurden im Sicherheitslabor (S2) unter einer Clean-Bench durchgeführt.

Nähere Versuchsbedingungen, die hier nicht angegeben wurden, da sie Gegenstand von Optimierungsversuchen sind, werden im Ergebnisteil unter 5.3. sowie 5.4 erläutert.

4.1.1.1. Scannen

Die Detektion der fluoreszenzmarkierten Antikörper erfolgte mit einem Laserscanner, dem ScanArray 4000 von Perkin Elmer (Abb. 30). Die Anregungs-Wellenlänge für den Fluoreszenzfarbstoff Cy5 betrug 633 nm, die Emission wurde bei 670 nm detektiert. Für den Farbstoff TexasRed waren es 594 nm für die Anregung und 615 nm bei der Emissionsdetektion. Es wurde mit einer Laserpower von 100 % und in einem Photomultiplierbereich von 40 – 100 % gescannt. Die Scanauflösung betrug 10 bzw. 20 μm .



Abb. 30: Laserscanner ScanArray 4000 von Perkin Elmer. In die Einsparung an der Vorderseite wurde der jeweils zu scannende Microarray eingeführt.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Entsprechend der Zielstellung dieser Arbeit, wurden zunächst die Gene der zu untersuchenden Proteine ausgewählt und diese dann rekombinant in *E. coli* exprimiert. Nach der Aufreinigung und Optimierung des Microarray-Versuchsablaufs wurden die Proteine schließlich mit Patienten- und Kontrollseren gescreent.

5.1 Auswahl der zu untersuchenden Gene von *Neisseria meningitidis*

Wie unter 3.2 erläutert wurde, ist die Untersuchung der phasenvariablen Gene (PVGs) bzw. der von ihnen kodierten Proteine ein interessanter Forschungsgegenstand, der zum Verständnis ihrer Rolle für den Erreger beitragen sowie helfen kann, neue potentielle diagnostische Marker, Pathogenitätsfaktoren und Impfstoffkandidaten zu identifizieren. Die Analyse der PVGs von *N. meningitidis* Serogruppe B ist zusätzlich von besonderem Interesse, da diese Serogruppe in Amerika und Europa vorherrschend ist und bisher noch kein wirksamer Impfstoff entwickelt werden konnte.

Für den Stamm MC58 der Serogruppe B wurden durch computergestützte Vorhersagen 83 putative PVGs identifiziert (Snyder *et al.*, 2001), die in die Studie dieser Arbeit mit einbezogen werden sollen. Das entspricht rund 4 % aller offenen Leserahmen (ORFs, Gesamtzahl 2226). Einige dieser Kandidatengene (16) wurden schon in anderen Studien als tatsächlich phasenvariabel bestätigt. Dazu gehören die Gene der Opa-Proteine (de Vries *et al.*, 1996), Proteine, die an der Lipopolysaccharid(LPS)-Synthese sowie an der Synthese und Modifikation der Pili beteiligt sind (Jennings *et al.*, 1998; Jennings *et al.*, 1999; Jonsson *et al.*, 1991), Hämoglobinrezeptoren (Lewis *et al.*, 1999), das äußere Membranprotein (OMP) PorA (van der Ende *et al.*, 1995) und Opc (Sarkari *et al.*, 1994), Kapselpolysaccharide (Hammerschmidt *et al.*, 1996), das Adhäsins NadA (Martin *et al.*, 2003) sowie ein Eisenrezeptor (Biegel Carson *et al.*, 2000). Von den restlichen Genen werden 40 als starke, 11 als moderate und 16 als schwächere Kandidaten für PVGs eingestuft (Snyder *et al.*, 2001).

Auffällig ist die starke Homologie der Gene zu Genen von *N. meningitidis* Serogruppe A Stamm Z2491 und *N. gonorrhoeae* Stamm FA1090. Dies ist ein Indiz für den horizontalen Gentransfer zwischen diesen Bakterien. *N. gonorrhoeae* weist ebenfalls 83 putative PVGs auf (Snyder *et al.*, 2001) und das gesamte Genom ist sogar zu 96% mit dem von *N. meningitidis* identisch (Snyder *et al.*, 2005). Dieser Aspekt wirft die Frage auf, welche Gene für das aggressivere Vorgehen des Meningokokkus im Vergleich zum Gonokokkus verantwortlich

sein könnten. Interessant sind dabei sicherlich auch die 26 PVG-Kandidaten von *N. meningitidis*, zu denen man keine Homologie bei *N. gonorrhoeae* finden konnte. Sechs davon (die vier Opa-Proteine, das Adhäsın NadA und das Kapselprotein SiaD) wurden schon mit Mechanismen der Pathogenese in Verbindung gebracht (Davidsen & Tonjum, 2006; Tettelin *et al.*, 2000).

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden auch diejenigen Gene mit einbezogen werden, die zwar nicht als phasenvariabel angesehen werden, für die jedoch homologe phasenvariable Gene in *N. meningitidis* Serogruppe A Stamm Z2491 oder in *N. gonorrhoeae* Stamm FA1090 gefunden wurden. Zwei weitere Proteine, die noch in einer früheren Arbeit als phasenvariabel eingestuft wurden (Saunders *et al.*, 2000) sollen ebenfalls mit einbezogen werden (NMB300 und NMB1140). Damit ergeben sich insgesamt 102 Gene, die mit dem Mechanismus der Phasenvarianz assoziiert sind und Gegenstand dieser Arbeit sein sollten. Sie sind zusammen mit deren Funktion nach der Datenbank TIGR (www.tigr.org) sowie deren Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein PVG handelt und deren Homologien in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zusammenstellung der mit Phasenvarianz assoziierten Gene von *N. meningitidis* Stamm MC58 nach (Saunders *et al.*, 2000) und (Snyder *et al.*, 2001) für die Untersuchung mit Protein-Microarrays.

NMB1	Mögliche Funktion nach TIGR2	PVG3	Homologien4
0032	• hypothetisches Protein	+++	A/G
0039	• hypothetisches Protein, überlappend mit 0040	+++	A/G
0040	• Hydrolase	+++	A/G
0049	• Pilus-Protein, (pilC2), auth. Frameshift	B	A/G
0053	• konserviertes hypothetisches Protein	-	G
0065	• hypothetisches Protein	+++	-
0067	• Sialinsäure-Kapsel-Biosyntheseprotein SiaD	B	-
0098	• ABC Transporter, ATP-Bindungsprotein, auth. Frameshift	+++	-
0127	• 50S ribosomales Protein L11 (rplK)	-	(A)/G
0182	• äußeres Membranprotein (omp85)	+	A/G
0193	• Glukose-inhibiertes Teilungsprotein A	-	A/G
0218	• Glycosyltransferase (pglA)	B	A/G
0270	• putatives bioH Protein	++	A/G
0297	• hypothetisches Protein	-	(A)/G
0300	• hypothetisches Protein, degeneriert	-	(A)/(G)
0312	• Virulenz assoziiertes Protein (vapA), auth. Frameshift	+++	A/G
0341	• tspA Protein	+++	A/G
0368	• hypothetisches Protein	+++	(A)/(G)

0377	• konserviertes hypothetisches Protein	++	A/G
0385	• Thiamin-Monophosphat-Kinase	+	A/G
0415	• konserviertes hypothetisches Protein, auth. Frameshift	+++	A/(G)
0432	• konserviertes hypothetisches Protein	+	(A)/(G)
0442	• Opa-Protein, auth. Frameshift	B	-
0456	• N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase	-	A/(G)
0471	• konserviertes hypothetisches Protein	+	A/G
0486	• konserviertes hypothetisches Protein	+++	A/G
0488	• hypothetisches Protein	+++	G
0593	• konserviertes hypothetisches Protein	+++	A/(G)
0623	• Spermidin/Putrescin ABC Transporter, periplasmatisches Spermidin/Putrescin Binde-Protein (potD-2)	-	A/(G)
0624	• Galactosyltransferase verwandtes Protein, auth. Frameshift	+++	A/G
0726	• Typ II Restriktionsenzym Hgal	+	-
0741	• konserviertes hypothetisches Protein	+	A/G
0785	• ExodeoxyribonucleaseV 135 kDa Polypeptid	+	A/(G)
0831	• Typ I Restriktionsenzym S Protein, degeneriert	+++	A/G
0846	• Verwandtes Protein der LPS-Biosynthese	+++	(A)/(G)
0872	• konserviertes hypothetisches Protein	++	A/G
0884	• Superoxiddismutase (sodB)	-	(A)/G
0892	• AzlC verwandtes Protein	-	(A)/G
0926	• Opa Protein, auth. Frameshift	B	-
0955	• 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, E1 Komponente (sucA)	+	A/G
0961	• FunZ Protein (funZ)	+++	-
0970	• konserviertes hypothetisches Protein, auth. Frameshift	+++	A/G
0983	• Phosphoribosylaminoimidazocarboxamideformyltransferase /IMP Zyklhydrolyase (purH)	-	(A)/G
1001	• Integrase-Protein, degeneriert	+	A/G
1030	• konserviertes hypothetisches Protein	-	A/(G)
1032	• Typ II Restriktionsenzym (nlalVR)	++	(A)/(G)
1053	• Klasse 5 OMP, Opc-Protein (opc)	B	A
1080	• Ner Protein (ner), auth. Frameshift	+++	-
1094	• hypothetisches Protein	-	A
1140	• tRNA(alle)-Lysidine-Synthetase (tilS-1)	-	(A)/(G)
1200	• Ribonuclease II Protein	-	A/(G)
1202	• hypothetisches Protein	+	A
1223	• ortspezifische DNA Methylase, degeneriert	++	A
1255	• Glycosyltransferase, degeneriert	+++	A/(G)
1261	• Typ III Restriktionsmodifikations-EcoPI-Enzym, Untereinheit mod, degeneriert	+++	A/G
1265	• konserviertes hypothetisches Protein	++	-
1275	• hypothetisches Protein, degeneriert	++	A/(G)

1277	• Transporter, BCCT-Familie	+	A/G
1350	• hypothetisches Protein	+	A
1375	• putative Modifikationsmethylase, auth. Frameshift	+++	A/G
1377	• L-Lactat Dehydrogenase (lldD)	-	(A)/G
1379	• NifS Protein (nifS)	+++	(A)/(G)
1407	• FrpA verwandtes Protein, degeneriert	+++	-
1429	• äußeres Membranprotein (porA)	B	A/G
1443	• DNA Polymerase III, Untereinheiten Gamma und Tau (dnaX)	-	A/G
1465	• Opa-Protein, auth. Frameshift	B	-
1467	• Exopolyphosphatase (ppx)	+++	A/G
1489	• hypothetisches Protein	+++	-
1507	• hypothetisches Protein	+++	A/G
1525	• VirG verwandtes Protein, auth. Frameshift	+++	A/G
1540	• Lactoferrin Bindeprotein A (lbpA)	B	(A)/(G)
1543	• konserviertes hypothetisches Protein	+++	A
1626	• konserviertes hypothetisches Protein	-	(A)/G
1634	• konserviertes hypothetisches Protein	+++	A/G
1636	• Opa-Protein, auth. Frameshift	B	-
1668	• Hämoglobin Rezeptor (hmbR)	B	A/(G)
1723	• Cytochrom-c-Oxidase, Untereinheit III (fixP)	+++	A/G
1734	• Glutardoxin (grx)	++	A/G
1741	• konserviertes hypothetisches Protein, auth. Frameshift	+++	-
1760	• konserviertes hypothetisches Protein	+++	-
1783	• putatives Sekretionsprotein, auth. Frameshift	+++	A/(G)
1786	• hypothetisches Protein	+	A/(G)
1824	• konserviertes hypothetisches Protein	-	(A)/G
1836	• putatives Lipopolysaccharid-Biosynthese-Protein WbpC	+++	A/G
1846	• Protein der Mrp/NBP35-Familie	+	A/G
1847	• Pilus Protein(pilC1), auth. Frameshift	B	A/G
1877	• Protein der Prolyl-Oligopeptidasen-Familie	-	A/(G)
1893	• konserviertes hypothetisches Protein, auth. Frameshift	+++	A
1900	• Polyphosphat-Kinase (ppk)	+	A/(G)
1913	• Fettsäure/Phospholipid-Synthese-Protein (plsX)	++	A/G
1929	• Lacto-N-Neotetraose-Biosynthese-Glycosyl-Transferase (lgtA)	B	(A)/G
1931	• hypothetisches Protein	+++	(A)
1969	• putatives Serotyp-1-spezifisches Antigen	+++	A/G
1985	• homolog zu Adhäsions- / Penetrations-Proteinen	++	(A)/G
1988	• Eisen reguliertes äußeres Membranprotein (frpB)	B	(A)/G
1994	• Adhäsion/Invasin (nadA)	B	-

1998	• Serin-Typ-I-Peptidase	+++	-
2008	• verwandt zu ABC-Transporter/ATP-Bindeproteinen	++	-
2032	• Lipopolysaccharid-Glycosyltransferase (lgtG), auth. Frameshift	B	G
2093	• Methionin-Aminopeptidase (map)	+++	A/G
2104	• MafA-Protein, (mafA-3) auth. Frameshift	+++	(A)/(G)
2145	• hypothetisches Protein	+	G

¹ NMB steht für *N. meningitidis* Serogruppe B und wird gewöhnlich mit der ORF-Nummern zusammen genannt

² TIGR: Datenbank aus denen die Annotierungen entnommen wurden (www.tigr.org). Gennamen sind in Klammern dargestellt. Ein authentischer Frameshift ist eine echte, z.B. durch das Fehlen einer Base (nicht durch Addition oder Deletion eines Repeats), entstandene Verschiebung des Leserahmens. Bei degenerierten Genen handelt es sich um Pseudogene, die in diesem Stamm in keinem Leserahmen eine Proteinsequenz ergeben, jedoch homologe Bereiche zu anderen bekannten Proteinen enthält.

³ Dargestellt sind die vorausgesagten Wahrscheinlichkeiten, dass es sich um ein phasenvariables Gen handelt. „+++“ steht für starke Kandidaten, „++“ für moderate Kandidaten und „+“ für schwache Kandidaten. „-“ steht für Gene, die nicht als phasenvariabel angesehen werden, für die jedoch äquivalente phasenvariable Gene in *N. meningitidis* Serogruppe A Stamm Z2491 oder in *N. gonorrhoeae* Stamm FA1090 gefunden wurden (Snyder *et al.*, 2001). „B“ steht für schon durch andere Arbeiten bestätigte PVGs

⁴ Wenn es zu den Genen aus *N. meningitidis* Serogruppe B Stamm MC58 homologe Gene in *N. meningitidis* Serogruppe A Stamm Z2491 gibt, so ist dies mit „A“ und im Falle von *N. gonorrhoeae* Stamm FA1090 mit „G“ gekennzeichnet. Klammern sollen verdeutlichen, dass zwar ein homologes Gen existiert, welches aber in diesen Stämmen nicht als PVG angesehen wird (Snyder *et al.*, 2001).

Ergänzend zu den mit Phasenvarianz assoziierten Genen aus Tabelle 2 wurden noch einige weitere interessante Gene ausgewählt, die in Tabelle 3 zusammengestellt sind. Es handelt sich um Proteine, von denen in der Literatur schon Hinweise auf eine pathogene Beteiligung gefunden wurden. Dazu gehört z.B. das Gen für die IgA-Protease (NMB700), die für das Überleben der Meningokokken in den Epithelzellen verantwortlich sein könnte (Manchanda *et al.*, 2006; van Ulsen & Tommassen, 2006). Insgesamt wurden damit 109 Gene bzw. den von ihnen kodierten Proteine ausgewählt, deren Immunantwort mit Protein Microarrays untersucht werden soll.

Tabelle 3: Zusammenstellung weiterer interessanter Gene für die Untersuchung mit Protein Microarrays

NMB ¹	Mögliche Funktion nach TIGR ²
0033	putative membrangebundene lytische Murein-Transglykosylase A
0051	Protein für zuckendes Bewegungsvermögen
0052	Protein für zuckendes Bewegungsvermögen (pilT-1)
0088	putatives OMP P1
0293	putativer TonB-abhängiger Rezeptor
0700	IgA-spezifische Serin-Endopeptidase (iga)
0768	Protein für zuckendes Bewegungsvermögen (pilT-2)

¹ NMB steht für ORF-Nummern von *N. meningitidis* Serogruppe B

² TIGR: Datenbank aus denen die Annotierungen entnommen wurden (www.tigr.org). Gennamen sind in Klammern dargestellt. (www.tigr.org)

5.2 Proteinexpression und –Aufreinigung

Die rekombinante Herstellung der gewünschten Proteine erfolgte durch Überexpression in einem *E. coli* Expressionsvektor, der das zu exprimierende Protein N-terminal also vor Beginn der eigentlichen Proteinsequenz (Abb. 31) mit einem RGS-His₆-Tag modifizierte (Arginin, Glycin und Serin und sechs Mal Histidin). Das so erzeugte Fusionsprotein konnte damit leicht durch Affinitätschromatographie an einer Nickelchelate-Matrix aufgereinigt werden.

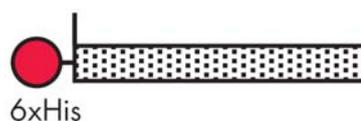


Abb. 31: schematische Darstellung des Fusionsproteins mit RGS-His₆-Tag

5.2.1 Expression in *E. coli*

Durch eine Dissertationsarbeit dieser Arbeitsgruppe existierten bereits *E. coli* Klone für *Neisseria*-Proteine (Steller, 2004). Da der zeitliche Rahmen dieser Arbeit, keine neuen Klonierungen zuließ, konnte auch nur auf diese schon vorhandenen Bibliothek zurückgegriffen werden. Bei der Erstellung dieser Bibliothek wurden die Primer für die Genamplifikation im Falle der putativen PVGs so gewählt, dass ein möglichst langer offener Leserahmen entstand. War das aufgrund mehrerer interner Stoppcodons nicht möglich (z.B.

bei Genen mit einem authentischem Frameshift), so wurde das Gen gekürzt (NMB300, NMB415, NMB486, NMB0624, NMB970, NMB1223, NMB1255, NMB1375, NMB1741 und NMB 2104) oder das Gen in zwei Teile A und B geteilt, um so später zwei Peptide eines Proteins zu exprimieren (NMB0831, NMB1261, NMB1275, NMB1783 und NMB2032). Da für diese Arbeit nur Epitope von Bedeutung sind, welche in Durchschnitt aus nur 15 Aminosäuren bestehen, stellen diese Modifikationen kein Problem dar. Für die Gene NMB0297, NMB1407 und NMB1202 konnten keine Gen-Fragmente amplifiziert werden. Die Transformation des Expressionsvektors für das Gen NMB1032 in den *E. coli* Klonierungsstamm war ebenfalls nicht erfolgreich. Somit verblieben von den 109 ausgewählten Genen aus Tabelle 2 zusammen mit den fünf in A und B unterteilten Genen und ohne die vier nicht generierten *E. coli* Klone insgesamt 111 Gene zur Proteinexpression und -aufreinigung.

Für viele der Proteine existierten jeweils mehrere *E. coli* Klone. Um diejenigen Klone zu selektieren, die auch tatsächlich rekombinante Proteine exprimieren, wurde ein Kolonie-Blot durchgeführt. Die aufwendige Aufreinigungsprozedur entfiel bei diesem Vorscreening. Die Kultivierung der Klone, die Expression der Proteine, die Lyse der Zellen sowie der anschließende Nachweis der rekombinanten Proteine über den RGS-His₆-Tag mit einem Sandwich-ELISA wurde auf einem Filter durchgeführt. Proteinexprimierende Klone konnten so über die Anfärbung der entsprechenden Kolonien identifiziert werden (Abb. 32, und 4.2.1.3). Klone die offensichtlich keine rekombinanten Proteine exprimierten, enthielten evtl. keinen oder nur einen leeren Expressionsvektor (ohne des jeweiligen *Neisseria*-Gens). Auch könnten die Genprodukte toxisch für die Bakterien gewesen sein.

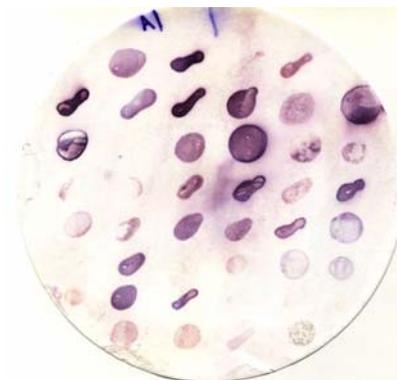


Abb. 32: Nachweis proteinexprimierender Klone über einen Kolonie-Blot. Stark gefärbte Kolonien stehen für Klone, die eine große Menge rekombinanter Proteine exprimieren. Bei keiner oder einer sehr geringen Färbung wurden keine oder nur eine sehr geringe Menge an rekombinanten Proteinen exprimiert. Nähere versuchsbedingungen unter 4.2.1.3.

5.2.2 Proteinaufreinigung

Für alle potentiell exprimierenden Klone wurden Expressionskulturen angelegt, um dann daraus die rekombinanten Proteine aufzureinigen. Oft aggregieren rekombinante Proteine in *E. coli* in Form von unlöslichen Einschlusskörpern (*inclusion bodies*). Die Ursachen dafür können verschiedenster Natur sein. Die Menge des exprimierten Proteins und auch die Natur des Proteins selbst, wie hydrophobe Bereiche etc. können eine Rolle spielen. Auch werden Protein in *E. coli* oft aufgrund fehlender Hilfsstoffe nicht richtig gefaltet. Daher liegt in vielen Fällen nur eine geringe Menge an löslichem Protein im Cytoplasma von *E. coli* vor. Um eine möglichst große Protein-Menge gewinnen zu können, war es nötig während des gesamten Aufreinigungsprozesses denaturierende Reagenzien einzusetzen. Unter denaturierenden Bedingungen werden die Proteine völlig entfaltet und der His₆-Tag bei allen Proteinen zugänglich gemacht. So kann mehr Protein an die Ni-NTA-Matrix binden und damit die Effizienz der Aufreinigung erhöht werden, auch da hiermit gleichzeitig unspezifische Bindungen (durch Verdrängung) vermieden werden. Wenn für weitere Experimente nativ vorliegende Proteine benötigt werden würden, könnte nach der Aufreinigung eine Renaturierung durchgeführt werden. Dies ist jedoch aufwendig und führt nicht immer zum Erfolg. Für diese Arbeit wurden die Proteine im denaturierten Zustand belassen. So können zwar bei den vorgesehenen Immunreaktionen nur lineare und keine konformativen, diskontinuierlichen Epitope von den Antikörpern berücksichtigt werden (Abb. 33), jedoch ist dies für die meisten Untersuchungen ausreichend.

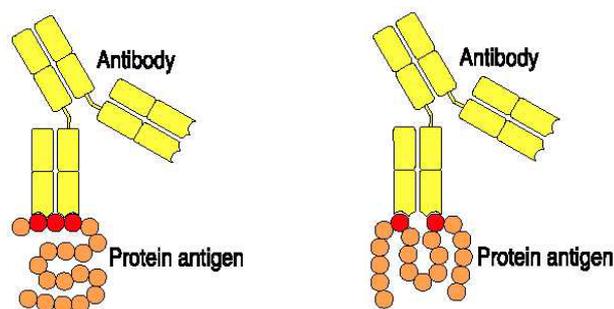


Abb. 33: Erkennung linearer (kontinuierlicher, links) und diskontinuierlicher Epitope (rechts) durch Antikörper

Die Aufreinigungsprozedur unterteilte sich grob in die folgenden Abschnitte: Lyse der Zellen, Binden der gelösten Proteine an die Ni-NTA-Matrix, dem Waschen zum Entfernen unspezifischer gebundener Proteine und schließlich der Elution der gebundene rekombinanten Proteine von der Matrix.

Für die Lyse der Zellen wurde das stark denaturierend wirkende Guanidin-Hydrochlorid (GuHCl) und zusätzlich, unterstützend für den Abbau der Zellwand, das Enzym Lysozym eingesetzt. Die Puffer für die Wasch- und Elutionsschritte enthielten kein GuHCl, dafür aber den nicht ganz so stark denaturierenden Harnstoff in einer hohen Konzentration (8 M). Es gibt auch Protokolle, die ganz auf GuHCl verzichten und nur auf Harnstoff zurückgreifen. Dies hat den Vorteil, dass schon das Lysat direkt per SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert werden könnte. Für Proteinproben, die GuHCl enthalten ist ohne aufwendige Vorbehandlung (durch Ausfällen) keine SDS-PAGE-Analyse möglich. Es wurde für diese Arbeit dennoch GuHCl eingesetzt, da es noch effizienter als Harnstoff ist und sicher stellt, dass auch stark unlösliche Proteine gelöst werden. So konnten in dieser Arbeit erst die Elutionsschritte mit SDS-PAGE analysiert werden.

Die spezifische Bindung der His₆-getaggtten Proteine an die Ni-NTA-Matrix beruht auf der Tatsache, dass bei neutralen bis basischen pH-Werten ein Stickstoffatom des Histidins im Imidazolring deprotoniert vorliegt und sein freies Elektronenpaar koordinative Bindungen zu Übergangsmetallkationen wie Ni⁺ ausbilden kann (siehe auch 4.2.1.2.). Die Bindung der Proteine an die Matrix wird daher auch bei einem pH-Wert von 8,0 durchgeführt. Der pKa-Wert der Histidin-Reste liegt bei 6,0. Während der Elution wird der pH-Wert auf einen Wert unter 6,0 (5,9 -4,5) gebracht und damit die Histidin-Reste protoniert, woraufhin das Protein von der Ni-NTA-Matrix dissoziiert.

Für die Kontrolle des Aufreinigungserfolges und der Größe der einzelnen Proteine wurden anschließend SDS-PAGE-Analysen durchgeführt. Dazu wurden zum einen die dafür benötigten Gele selbst hergestellt, aber auch käuflich zu erwerbende gebrauchsfertige Gradienten-Gele („NuPage“-System, Invitrogen) verwendet. In Abb. 34. sind die Ergebnisse für beide Methoden exemplarisch gegenübergestellt. Man kann deutliche Qualitätsunterschiede feststellen: Während das käufliche System klare fokussierte Proteinbanden erzeugt, sind bei den selbst hergestellten Gelen nur deutlich undefiniertere Banden zu erkennen. Dies ist auf den neutralen pH-Wert des Bis-Tris-Puffers der NuPAGE-Gele zurückzuführen (gegenüber pH 9,5 im Trenngel des hergestellten Gels), der keine chemischen Modifikationen zulässt. Auch kann mit dem käuflichem System eine wesentlich bessere Auftrennung erreicht werden, was anhand des Größenstandards gut nachzuvollziehen

ist. Die 15- und 10 kDa-Bande des Standards auf dem selbst hergestelltem Gel konnte bis zum Ende der Elektrophorese nicht aufgetrennt werden. Die gleichmäßigere Verteilung und der erweiterte Trennbereich des NuPAGE-Systems ist auf die Verwendung von einem Gradienten-Trenngel (4-12 % Acrylamid) zurückzuführen. Dieses System wurde daher auch für die folgenden Analysen präferiert.

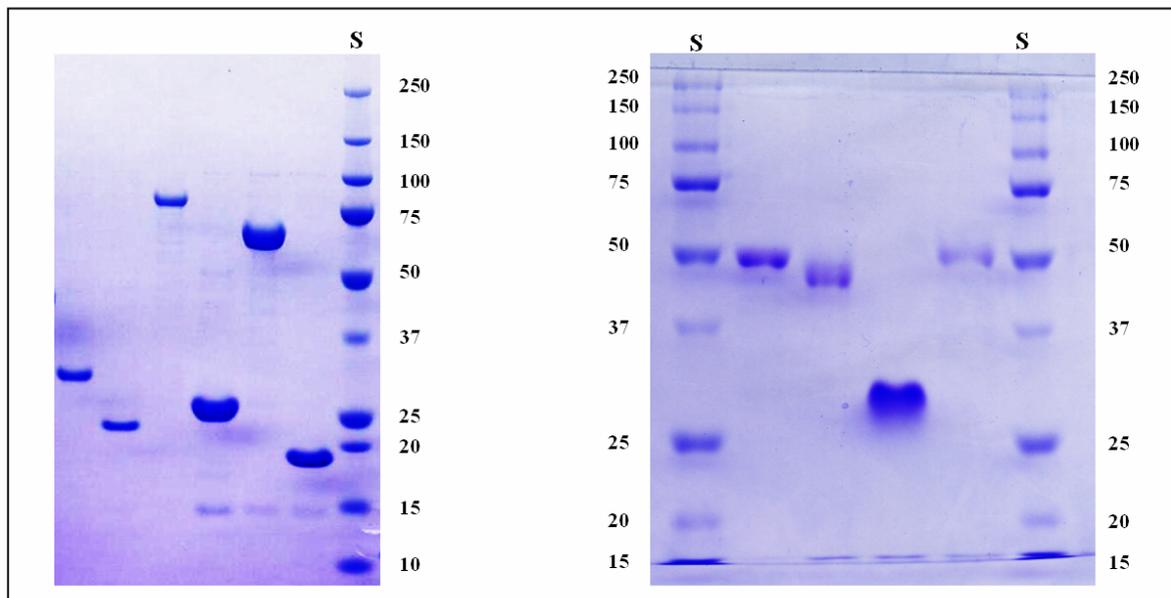


Abb. 34: Gegenüberstellung von exemplarischen SDS-PAGE-Analysen die mit gebrauchsfertigen Gelen (links) und mit selbst hergestellten Gelen (rechts) erzielt wurden. Zahlen beziehen sich auf die Proteinmasse des jeweiligen Größen-Standards (S) in kDa.

Für die Aufreinigung über die Ni-NTA-Matrix wurden verschiedene Strategien verfolgt: Es wurden sowohl verschiedene Filter-Röhrchen verwendet als auch der verwendete Elutions-Puffer sowie die Anzahl der Elutionsschritte variiert (siehe Tabelle 4 und auch Abb. 24 unter 4.2.1.2.). In Abb. 35 sind die SDS-PAGE-Analysen der Protein-Elutionen für die verschiedenen Aufreinigungsstrategien jeweils exemplarisch anhand eines Proteins dargestellt.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Aufreinigungsstrategien. (Puffer D hatte einen pH-Wert von 5,9 und Puffer E einen pH-Wert von 4,5.)

1-ml-Filterröhrchen zur Befüllung mit Ni-NTA-Agarose	5-ml-Filterröhrchen zur Befüllung mit Ni-NTA-Agarose	Spin-Columns zum Befüllen mit Ni-NTA-Agarose	Gebrauchsfertige Spin-Columns (Qiagen)
① 3x Puffer D 3x Puffer E	④ 3x Puffer D 3x Puffer E	⑤ 2x Puffer E	⑥ 2x Puffer E
② 2x Puffer D 2x Puffer E			
③ 3x Puffer D 1x Puffer E			

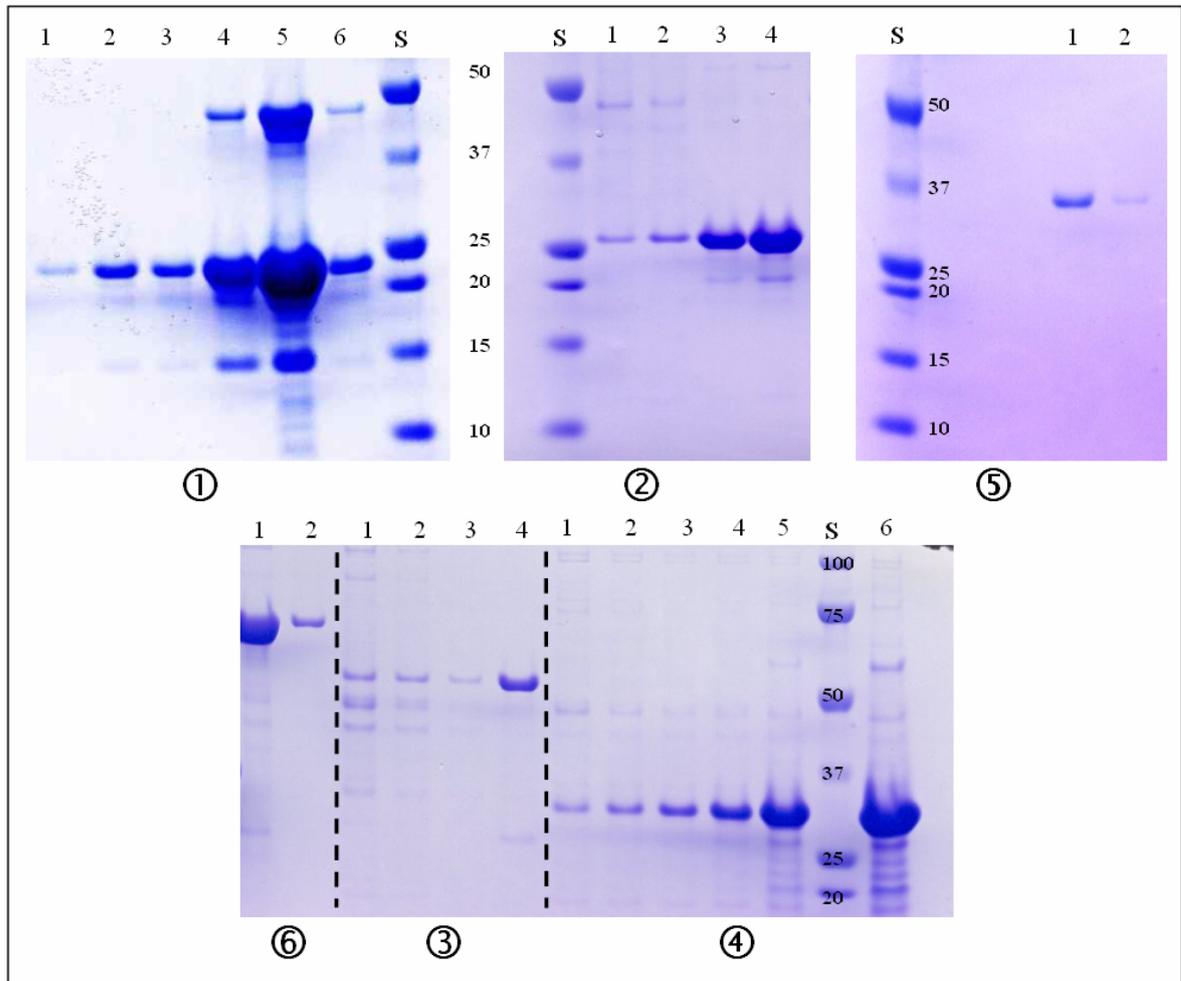


Abb. 35: SDS-PAGE-Analysen der Protein-Elutionen für die verschiedenen Aufreinigungsstrategien aus Tabelle.4 Zahlen beziehen sich auf die Proteinmasse des jeweiligen Größen-Standards (S) in kDa.

Anhand der Analyse von Menge und Reinheit des im Eluat enthaltenem Proteins wurde entschieden, welcher Elutionsschritt für die jeweilige Aufreinigungsstrategie das beste Resultat erzeugte. Die Eluate dieser Fraktionen erfolgreich aufgereinigter Proteine wurde anschließend für das Microarray-Screening genutzt. Dabei musste meist ein Kompromiss zwischen Menge und Reinheit der Fraktion eingegangen werden. Für Strategie ① zeigte der dritte Elutionsschritt die höchste Qualität. In den drei weiteren Fraktionen wurde zwar deutlich mehr rekombinantes Protein eluiert, jedoch traten auch mehr Kontaminationen auf. So ähnlich verhielt es sich auch bei Strategie ④. Hier wies jedoch meist die Elution 4 noch eine ausreichende Reinheit auf. Für die Aufreinigungen mit den Spin-Columns (Strategie ⑤ und ⑥) wurde in den meisten Fällen schon in der ersten Fraktion die größte Menge an Protein eluiert. Bei Strategie ② und ③ war es jeweils die vierte und damit letzte Fraktion.

Kontaminationen werden durch das unspezifische Binden von ungetaggtten *E. coli* Proteinen an die Ni-NTA-Matrix verursacht. Dies können z.B. auch Proteine sein, die ebenfalls nebeneinander liegenden Histidinreste aufweisen. Das Auftreten von Kontaminationen deutet darauf hin, dass das Verhältnis zwischen der Menge an Ni-NTA-Agarose und der rekombinant exprimierten Proteine nicht optimal war (Schmitt *et al.*, 1993). Aufgrund der höheren Affinität der His₆-getaggtten Proteine gegenüber den möglichen Kontaminationen werden diese bevorzugt an die Matrix binden. Nur wenn mehr freie Bindungsplätze als rekombinante Proteine vorhanden sind, können auch zusätzlich ungetaggte Proteine an die Matrix binden. Kontaminationen lassen sich dennoch kaum vermeiden, da jedes Lysat aufgrund der unterschiedlichen Expressionsrate in den *E. coli* Klonen eine andere Proteinmenge enthält und die Menge an Ni-NTA-Agarose nicht für jedes der über 100 Proteinen neu eingestellt werden konnte. Jedoch werden Kontaminationen aufgrund ihrer geringeren Affinität gewöhnlich schon in den Waschschritten oder in den ersten Elutionsschritten entfernt. Dies lässt sich gut bei der SDS-PAGE-Analyse von Strategie ③ nachvollziehen. Während die ersten zwei Fraktionen noch Verunreinigungen enthalten, sind diese in der letzten Fraktion fast vollständig verschwunden. Unter diesem Gesichtspunkt erscheint jedoch das Auftreten von Kontaminationen nach dem Wechsel des Elutionsspuffer bei Strategie ① zunächst ungewöhnlich. Die höhere Stringenz des Elutionsspuffers E mit einem niedrigerem pH-Wert von 4,5 erklärt zwar die größere Menge an eluiertem rekombinantem Protein, jedoch hätten Kontaminationen theoretisch auch schon vorher auftreten müssen. Daher ist es denkbar, dass es sich im Falle der vermeintlichen Kontamination, knapp unter 50 kDa, eher um ein Multimer oder Aggregat handelt, dessen Affinität höher ist und daher erst mit der Verwendung einem stringenterem Puffers eluiert.

Bei der 15-kDa-Bande handelt es sich wahrscheinlich um Lysozym, welches genau diese Größe aufweist. Für eine eindeutige Klärung, ob es sich bei verdächtigen Banden um mögliche Kontaminationen oder um rekombinante Proteine handelte, wäre die Durchführung eines Western-Blots sinnvoll, mit dem der RGS-His₆-Tag nachgewiesen werden könnte.

Aufgrund der Vielzahl aufzureinigender Proteine, konnten zwar für viele Fälle noch die alternativen Strategien getestet werden, um evtl. bessere Resultate zu erzeugen, jedoch war eine Optimierung für jedes einzelne Protein nicht möglich. Daher wurde auch für das Microarray-Serum-Screening jeweils eine Negativkontrolle von sowohl Lysozym als auch einer *E. coli* Aufreinigung, die kein rekombinantes Protein enthielt, mit in die Untersuchung einbezogen, um mögliche falsch positive Immunreaktion zu identifizieren.

Gehäuft findet man in Abb. 35 zusätzliche Banden, die kleiner sind, als das eigentliche rekombinante Protein. Dabei handelt es sich wahrscheinlich in den meisten Fällen um verkürzte rekombinante Proteine, die z.B. durch den vorzeitigen Abbruch der Translation während der Proteinexpression entstehen können. Möchte man diesen Effekt vermeiden, so hätte man schon bei der Klonierung einen Expressionsvektor wählen müssen, bei dem der His₆-Tag nicht N-terminal sondern C-terminal an das Protein angefügt wird. Dann würden nur diejenigen Proteine, die vollständig translatiert werden, einen His₆-Tag aufweisen und nur diese könnten dann auch aufgereinigt werden.

Verkürzte Proteine können aber auch durch eine Degradation nach der Translation, z.B. durch Proteasen, verursacht werden. Die Lyse wurde in dieser Arbeit bei 37°C durchgeführt, um die Aktivität von Lysozym heraufzusetzen, evtl. wurde dabei aber auch gleichzeitig die Proteaseaktivität ebenfalls erhöht. Um Proteindegradationen zu minimieren hätte man entweder bei 4°C arbeiten oder auch Proteaseinhibitoren einsetzen können. Solange aber noch eine ausreichende Menge an Protein in der Originallänge vorhanden sind, stören zusätzliche verkürzte Proteine nicht bei den späteren Versuchen dieser Arbeit. Denn auch verkürzte Konstrukte können Epitope enthalten.

Bei einigen Proteinen ließen sich in der SDS-PAGE-Analyse nur sehr schwach gefärbte Banden nachweisen. Dies könnte zwei Ursachen haben: Zum einen kann dies mit einer nur geringen Expressionsrate des jeweiligen *E. coli* Klons zusammenhängen und zum anderen kann auch eine suboptimale Proteinaufreinigung verantwortlich sein. So war z.B. möglicherweise die Zelllyse nicht vollständig oder der pH-Wert der Puffer in Folge der Hydrolyse von Harnstoff nicht mehr optimal. Für diese Fälle wurde eine Proteinaufkonzentrierung durchgeführt. Auszugsweise wurde für einige Proteinproben die Proteinkonzentration nach Bradford oder mit Hilfe der Bestimmung der optischen Dichte bei

280 nm ermittelt. Im Durchschnitt betrug die Proteinkonzentration (nach der Konzentrierung) ca. 200 µg/ml. Die Nachweisgrenze für die SDS-PAGE-Analyse mit Coomassie Brilliant Blau beträgt ca. 500 ng Protein/Bande. Für ein Auftragungsvolumen von 13 µl ergeben sich im Durchschnitt 2,6 µg pro Bande, vorausgesetzt es treten keine Nebenbanden auf. Proteinkonzentrationen unter 40 µg/ml konnten also per SDS-PAGE nicht mehr nachgewiesen werden. Mit einer Silber-Färbung hätten auch 0,1 bis 1 ng Protein pro Bande nachgewiesen werden können. Auch wenn man so auch sehr gering exprimierende Klone finden kann, wäre die Proteinmengen trotz einer evtl. durchgeführten Aufkonzentrierung zu gering für das vorgesehene Antikörper-Screening.

Neben der Reinheit und der Proteinkonzentration wurde per SDS-PAGE-Analyse auch überprüft, ob das Molekulargewicht der rekombinanten Proteine mit der theoretischen Proteinelänge übereinstimmt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass zusätzlich zur Länge der *Neisseria*-Proteinsequenz noch die des angehängenen Tags addiert werden muss. In diesem Fall bilden der RGS-His₆-Tag und das ebenfalls zusammen mit dem Protein exprimierte Biotin ein zusätzliches Molekulargewicht von ca. 6,2 kDa. Doch auch wenn man diesen Umstand mit einbezieht, wiesen viele Proteine nicht das vorhergesagte Molekulargewicht auf. Bei sehr großen Abweichungen kann vermutet werden, dass nicht das richtige Gen im Expressionsvektor vorhanden ist. Diese Klone wurden verworfen. Traten nur kleinere Abweichungen auf (+-5 kDa), wurde dies in der Regel darauf zurück geführt, dass diese Proteine eine von der Norm abweichende Mobilität aufwiesen (z.B. bei stark sauren oder basischen Proteinen) und somit nicht direkt mit den Protein-Standards verglichen werden können. Auch die Bildung von Aggregaten bzw. Multimeren kann zu einer vermeintlich falschen Molekülmasse führen.

Für einige *Neisseria*-Proteine ließen sich trotz sorgfältiger Prüfung mehrerer *E. coli* Klone keine proteinexprimierenden Klone finden, bzw. kein oder kein korrektes Protein aufzureinigen. Dies war bei NMB0098, NMB0624, NMB0892, NMB1525, NMB1723, NMB1783A und NMB2008 der Fall. Zusammenfassend konnten für insgesamt 103 der 111 vorhandenen *E. coli* Klone mit *Neisseria*-Genen die entsprechende Genprodukte erfolgreich aufgereinigt werden (mit Berücksichtigung der in A und B aufgeteilten Genabschnitte). Das entspricht einer Effizienz von 93%. Von den 102 mit Phasenvarianz assoziierten Genen aus Tabelle 2 konnten für insgesamt 92 Gene (ohne Berücksichtigung von aufgeteilten Genabschnitten) die passenden Proteine exprimiert und aufgereinigt werden. In einer vorigen Arbeit ist dies nur für 87 Gene gelungen (Steller *et al.*, 2005). Für die zusätzlich ausgewählten Gene aus Tabelle 3 war es in allen Fällen möglich die dazugehörigen Proteine aufzureinigen.

Eine Übersicht über alle erfolgreich aufgereinigten Proteine zusammen mit ihrem Molekulargewicht (ohne Tags) befindet sich in Tabelle 5 und 6. In Anlage A lassen sich die für jedes Protein entsprechenden SDS-PAGE-Analysen finden. Dabei wurden diejenigen Elutionsschritte bzw. Konzentrate auf das Gel aufgetragen, die auch später für das Microarray-Screening verwendet wurden.

Tabelle 5: Zusammenstellung aller erfolgreich aufgereinigten PVG-Proteine mit dem dazugehörigem Molekulargewicht (theoretisch und ohne Tags).

NMB	M _w (kDa)	NMB	M _w (kDa)
0032	20	1255	27,7
0039	10	1261B	58
0040	26,8	1261A	18
0049	116	1265	18,9
0053	24,7	1275A	13,6
0065	35,1	1275B	38,8
0067	26	1277	76,3
0127	15	1350	13,1
0182	88	1375	64,1
0193	69,8	1377	43,5
0218	42	1379	44,6
0270	27	1429	42
0300	7,3	1443	76,3
0312	76,6	1465	36,3
0341	92,5	1467	55,9
0368	18	1489	18,6
0377	40,9	1507	13,1
0385	34,6	1540	105,7
0415	45,6	1543	47,1
0432	27,2	1626	41,1
0442	29,1	1634	46,8
0456	45,2	1636	30,3
0471	38,6	1668	87
0486	45,2	1734	23,9
0488	18,8	1741	45,2
0593	89,1	1760	19,5
0623	41,2	1783B	18,2
0726	56,8	1786	44,5
0741	52,8	1824	30,2

0785	134,6	1836	70,4
0831A	18	1846	38,6
0831B	21	1847	113,2
0846	39	1877	74,7
0872	68,7	1893	31
0884	21,9	1900	80,6
0926	30,2	1913	37
0955	105,1	1929	40,6
0961	62,7	1931	13,5
0970	45,2	1969	113,6
0983	56,8	1985	160
1001	21,6	1988	79,1
1030	20,5	1994	38
1053	30	1998	157,6
1080	9,5	2032A	21
1094	58,6	2032B	23
1140	47	2093	28,2
1200	89	2104	26,4
1223	24,2	2145	7

Tabelle 6: Zusammenstellung aller erfolgreich aufgereinigten nicht mit PVGs assoziierten Proteine mit dem dazugehörigem Molekulargewicht (theoretisch und ohne Tags)

NMB	M _w (kDa)
0033	48
0051	46
0052	38
0088	51
0218	42
0293	79
0700	201
0768	42

5.3 Optimierung der Microarray-Prozedur

Für das Screening nach Serumantikörpern, die rekombinante *Neisseria*-Proteine auf Protein-Microarrays erkennen, wurden zunächst die experimentellen Rahmenbedingungen angepasst und optimiert. Dabei wurde versucht, möglichst viele Parameter der einzelnen Schritte zu berücksichtigen.

Allgemein unterteilt sich die Microarray-Prozedur nach dem Spotten der Proteine in folgende Schritte (siehe auch 4.2.2.2): Blocking der Microarray-Oberfläche zum Vermeiden unspezifischer Bindungen, Inkubation mit dem Erstantikörper (Serum-/oder anti-RGS-His-Antikörper), Waschen zum Entfernen ungebundener Antikörper, Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper, erneutes Waschen zum Entfernen ungebundener Antikörper und schließlich das Trocknen und Scannen der Microarray-Slides.

5.3.1 Blockierung unspezifischer Bindungen (Blocking)

Die Blockierung der Oberfläche zum Vermeiden von unspezifischen Antikörperbindungen ist ein wichtiger Schritt, um das Hintergrundsignal herabzusetzen. Eine Blockinglösung hat die Aufgabe die Microarray-Oberfläche durch die meist in der Lösung enthaltenen Proteinen so zu verändern, dass später so wenig wie möglich Antikörper unspezifisch an die Oberfläche binden können. Daher wurden in dieser Arbeit Experimente durchgeführt, um die optimale Blocking-Reagenz für das Serumscreening zu finden.

Zunächst wurde geprüft, ob fetales Kälberserum (FKS) oder eine Magermilchlösung besser geeignet ist. Beide Ansätze wurden schon in verschiedenen Protein Microarray Arbeiten angewendet (z.B. (Qiu *et al.*, 2005) und (Hueber *et al.*, 2005)). Jedoch erwies sich FKS hier als keine gute Blocking-Reagenz. Das Verhältnis von Signal/Hintergrund ist sehr gering im Vergleich zu einer mit Magermilch-Lösung geblockten Oberfläche (Abb. 36). Die Verwendung von FKS wurde daher verworfen.

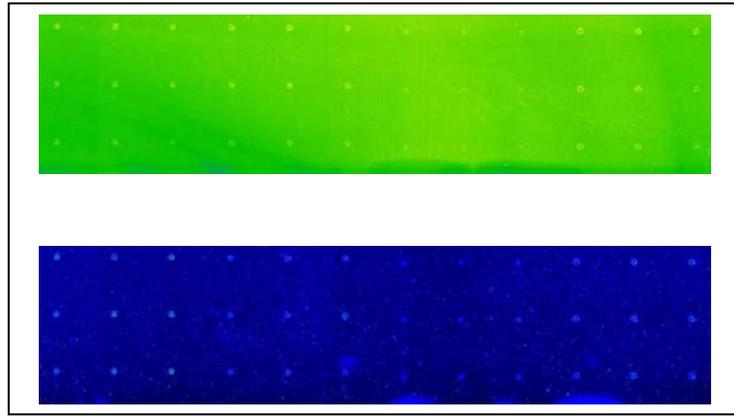


Abb. 36: Microarrayexperiment zur Optimierung der Blocking-Reagenz. **Oben:** Microarray geblockt mit 3 % (v/v) FKS in PBS. **Unten:** Microarray geblockt mit 3 % (w/v) Magermilchpulver in PBS. Oberfläche: Nitrocellulose, „FAST“, Schleicher&Schuell. Serumverdünnung: 1:100. Antikörper: Ziege-anti-human-IgG-Cy5-konjugiert (1:800), Inkubationen jeweils bei 37°C. Pattern: 3x3 (es sind vier gespottete Proteine dargestellt (von links nach rechts), wobei immer neun identische Spots ein Protein repräsentieren).

Um die Effektivität der Blocking-Lösung zu steigern wurde der Anteil von Magermilchpulver von 3 % (w/v) auf 10 % (w/v) erhöht und in einem weiteren Versuch zur Verdünnung der Blocking-Lösung PBST statt PBS verwendet. Wie aus Abb. 37 ersichtlich wird, kann mit einer höheren Milchpulver-Konzentration ein wesentlich besseres Signal/Hintergrund Verhältnis erzielt werden. Die effizientere Blockierung der Oberfläche kann auf die erhöhte Konzentration an Milchproteinen zurück geführt werden, welche einen größeren Teil der Oberfläche effektiver blockieren können.

Der Puffer PBST enthält im Gegensatz zu PBS zusätzlich 0,05 % (v/v) der Detergenz Tween 20 (Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat), das unspezifische Antikörperaggregationen verhindern kann. Tatsächlich wirkt sich die Verwendung von PBST beim Blocking positiv auf das Signal/Hintergrund Verhältnis aus (Abb 37). Sicherlich ist der Effekt auch darauf zurück zu führen, dass PBST statt PBS auch zum Waschen der Microarrays und Verdünnen der Antikörper genutzt wurde.

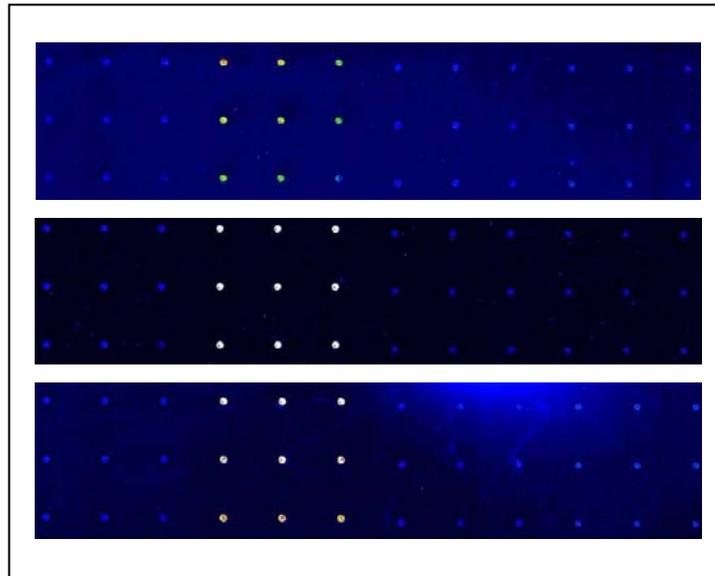


Abb. 37: Microarrayexperiment zur Optimierung der Blockingreagenz. **Oben:** Microarray geblockt mit 3 % (w/v) Magermilchpulver in PBS. **Mitte:** Microarray geblockt mit 10 % (w/v) Magermilchpulver in PBS. **Unten:** Microarray geblockt mit 3 % (w/v) Magermilchpulver in PBST. Oberfläche: Nitrocellulose, „FAST“, Schleicher&Schuell. Serumverdünnung: 1:100. Antikörper: Ziege-anti-human-IgG-Cy5-konjugiert (1:800), Inkubationen jeweils bei 37°C. Pattern: 3x3 (es sind vier gespottete Proteine dargestellt (von links nach rechts), wobei immer neun identische Spots ein Protein repräsentieren).

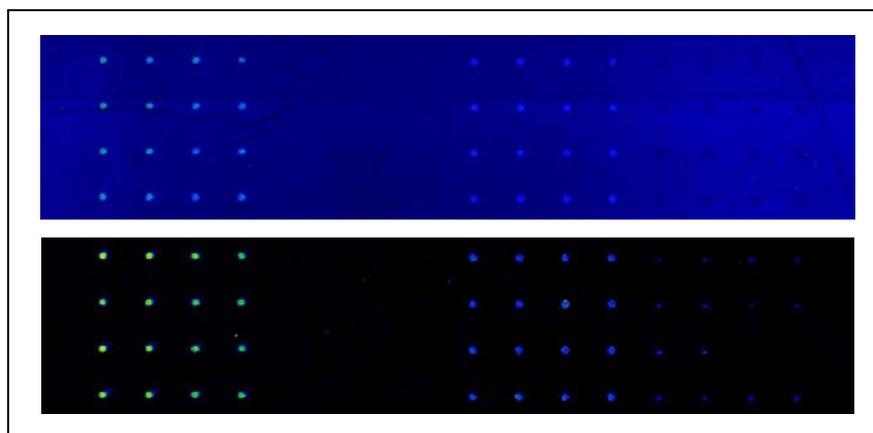


Abb. 38: Microarrayexperiment zur Optimierung der Blockingreagenz. **Oben:** Microarray geblockt mit 50 mM Ethanolamin in PBST. **Unten:** Microarray geblockt mit 10 % (w/v) Magermilchpulver in PBST. Oberfläche: Epoxid „Nexterion Slide E“, Schott. Serumverdünnung: 1:500. Antikörper: Ziege-anti-human-IgG-Cy5-konjugiert (1:800), Inkubationen jeweils bei 37°C. Pattern: 4x4 (es sind vier gespottete Proteine dargestellt (von links nach rechts), wobei immer 16 identische Spots ein Protein repräsentieren).

Für die Microarrays, die mit einer Epoxid-Schicht modifiziert waren, wurde zusätzlich zum Blocking mit 10 % (w/v) Milchpulver in PBST auch 50 mM Ethanolamin (auch in PBST) getestet. Es wurde vermutet, dass durch die Aminogruppen des Ethanolamins alle noch freien, nicht mit rekombinantem Protein reagierten, Epoxid-Gruppen inaktiviert werden und damit

die Oberfläche blockiert wird. Jedoch zeigte sich gegenüber der Verwendung von Milchpulver keine Verbesserung des Signal/Hintergrund Verhältnisses (Abb. 38).

Als optimale Blockingreagenz für die Anwendung in dieser Arbeit konnte also schließlich 10 % (w/v) Magermilchpulver in PBST identifiziert werden.

5.3.2 Inkubationstemperatur

Zur Optimierung der Temperatur während der Inkubationen des Erst- und Zweitantikörpers wurden verschiedene Temperaturen getestet. In einer ersten Versuchsreihe wurden 4°C, 25°C, 37°C und 50°C untersucht (Abb. 39 links). Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C konnten im Durchschnitt die höchsten Spotintensitäten erzielt werden. Bei 50°C nahm die Intensität wieder drastisch ab. Um den optimalen Temperaturbereich noch näher eingrenzen zu können, wurden in einer zweiten Versuchsreihe die Temperaturen 33,5°C, 37°C, 40°C, 45°C und 50°C untersucht. (Abb. 39 rechts). Hier wurden bei einer Temperatur von 40°C die höchsten Spotintensitäten erreicht. Dieses Ergebnis lässt sich mit der erhöhten Diffusionsgeschwindigkeit der Antikörper erklären, die nach dem Fick'schen Gesetz temperaturabhängig ist, sowie gut anhand der Körpertemperaturen der Antikörperquellen nachvollziehen. Bei diesen Optimierungsversuchen kamen Antikörper aus Ziege und Maus zum Einsatz. Die Maus hat eine Körpertemperatur von 38 bis 39,5°C und Ziegen besitzen eine Körpertemperatur von 39 bis 40°C.

Bei Versuchen mit human Seren wurden die Spotintensitäten bei 37°C und 40°C verglichen. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, so dass für alle weiteren Versuche eine Antikörperinkubationstemperatur von 37°C gewählt wurde. Bei dieser Temperatur handelt es sich um eine gängige Labortemperatur, für die in den meisten Fällen ausreichend Brutschränke bzw. Inkubatoren zur Verfügung stehen. Auch aus diesem Grund wurde 37°C der Temperatur von 40°C vorgezogen.

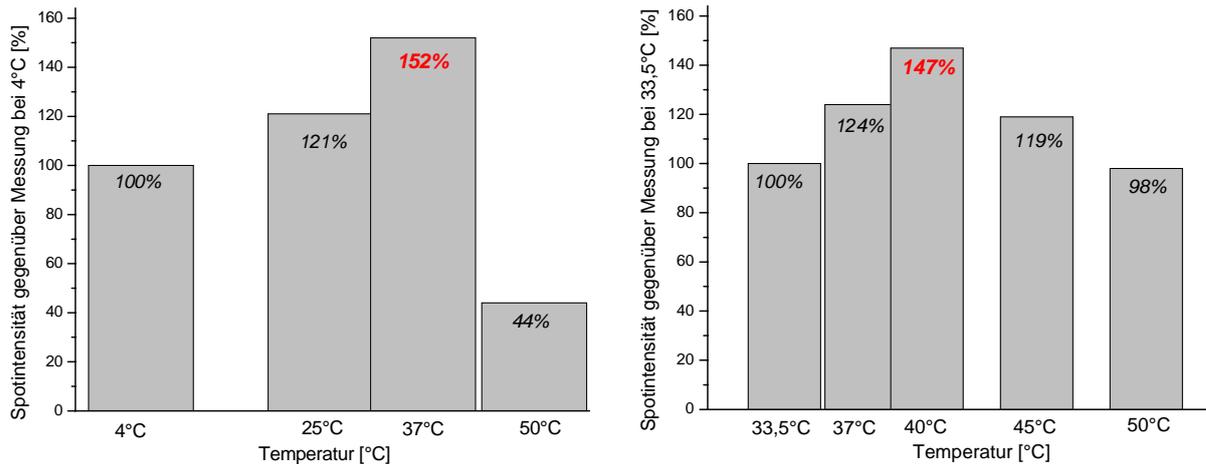


Abb. 39: Diagramme zur Veranschaulichung des Ergebnisses von Microarray-Experimenten zur Optimierung der Inkubationstemperatur. Die zu Grunde liegenden Daten wurden bei folgenden Parametern ermittelt: Microarray-Oberfläche: Nitrocellulose, „FAST“, Schleicher&Schuell. Antikörper: Maus-Anti-RGS-His-Antikörper (1:1000), Ziege-anti-Maus-IgG-TexasRed-konjugiert (1:2000).

Während der Prozessierung der Multiplex-Microarrays wurden jedoch bei der Inkubation des Erstantikörpers über Nacht Probleme festgestellt. Teilweise war die Antikörperlösung geronnen. Dies kann auf unsterile Bedingungen zurückgeführt werden. Während die Inkubation bei einem Großteil der Vorversuche unter einem Deckgläschen nahezu unter Luftabschluss durchgeführt wurde, wurde bei den Multiplex-Versuchen, die Multiplex-Struktur lediglich mit einem Kunststoffstreifen abgedeckt, bei dem eine Reaktionskammer mit dem dreifachen Volumen des Inkubationsvolumens vorhanden war.. Um das Wachsen von Keimen in der Antikörperlösung zu vermeiden wurde hier die Inkubation mit dem Erstantikörper nur bei 4°C über Nacht durchgeführt. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper für eine Stunde wurde aber auch hier weiterhin bei 37°C durchgeführt.

Bei anderen Arbeiten zu Protein Microarrays wurden Inkubation oft nur bei 4°C durchgeführt (Steller *et al.*, 2005), um die Serenstabilität zu garantieren. Man kann hier jedoch sehen, dass mit höheren Inkubationstemperaturen wesentlich höhere Spotintensitäten erhalten werden können. Die Sensitivität der Versuche kann so gesteigert werden.

5.3.3 Untersuchung verschiedener Microarray-Oberflächen

Um eine geeignete Oberfläche für das Serum-Screening zu finden, wurden Oberflächenbeschichtungen verschiedener Hersteller untersucht (Tabelle 7). Neben planaren eindimensionalen Beschichtungen mit Aldehyden, Epoxiden und Aminen wurden auch komplexere dreidimensionale Beschichtungen, wie Membranen und Hydrogele in die Studie

mit einbezogen. Bei der Bewertung der Oberflächenqualität wurde sowohl das Signal/Hintergrundverhältnis als auch die Spothomogenität berücksichtigt. Relevant war außerdem auch die Bindungskapazität und die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Spotintensitäten bei identischen Spots. Letztendlich musste ein Kompromiss zwischen den verschiedenen Parametern gefunden werden, da es schwierig war, eine Oberfläche zu identifizieren, deren Eigenschaften sich in allen Punkten als optimal herausstellten.

Tabelle 7: Tabelle 1: Übersicht über die untersuchten Oberflächenbeschichtungen für Protein Microarrays

Oberflächenbeschichtung	Hersteller
Aldehyd	Telechem
Aldehyd	Schott
Aldehyd	Genetix
Epoxy	Telechem
Epoxy	Schott
Epoxy	Genetix
Amin	Telechem
Amin	Schott
Nitrocellulose	Schleicher&Schuell / Whatman
Nitrocellulose	Telechem
Hydrophobes Polymer	Telechem
Hydrogel	Schott

Aldehyd-Modifizierung

Bei Microarray-Substraten, die eine Aldehydbeschichtung aufweisen, werden Proteine über Aminogruppen der Aminosäureseitenketten kovalent auf der Oberfläche immobilisiert. (Abb. 40 oben). Da die Aminogruppen eines Proteins meist über die ganze Oberfläche verteilt vorliegen, kann es in vielen verschiedenen Orientierungen immobilisiert werden und es stehen damit eine Vielzahl an möglichen Epitopen für die Antikörperbindung zur Verfügung. Durch die kovalente Fixierung der Proteine sind auch stringente Waschschrte möglich. In Abbildung 40 unten sind die Ergebnisse von Serum-Experimenten mit 8 *Neisseria*-Proteine für drei kommerziell erhältlich Oberflächen dargestellt. In allen drei Fällen ist der Signalhintergrund sehr niedrig. Jedoch zeigen sich im Falle der Slides von Telechem und Genetix Spotheterogenitäten, die evtl. auf eine zu geringe Bindekapazität der Oberfläche

hinweisen könnten. Im Falle der Aldehyd-Microarrays von Schott sind zwar zum größten Teil homogene Spots vorhanden, jedoch ist die Sensitivität im Gegensatz zu z.B. den Genetix-Slides sehr gering. So lässt sich feststellen, dass die Genetix-Aldehydoberfläche in diesem Vergleich noch die höchste Qualität zeigte.

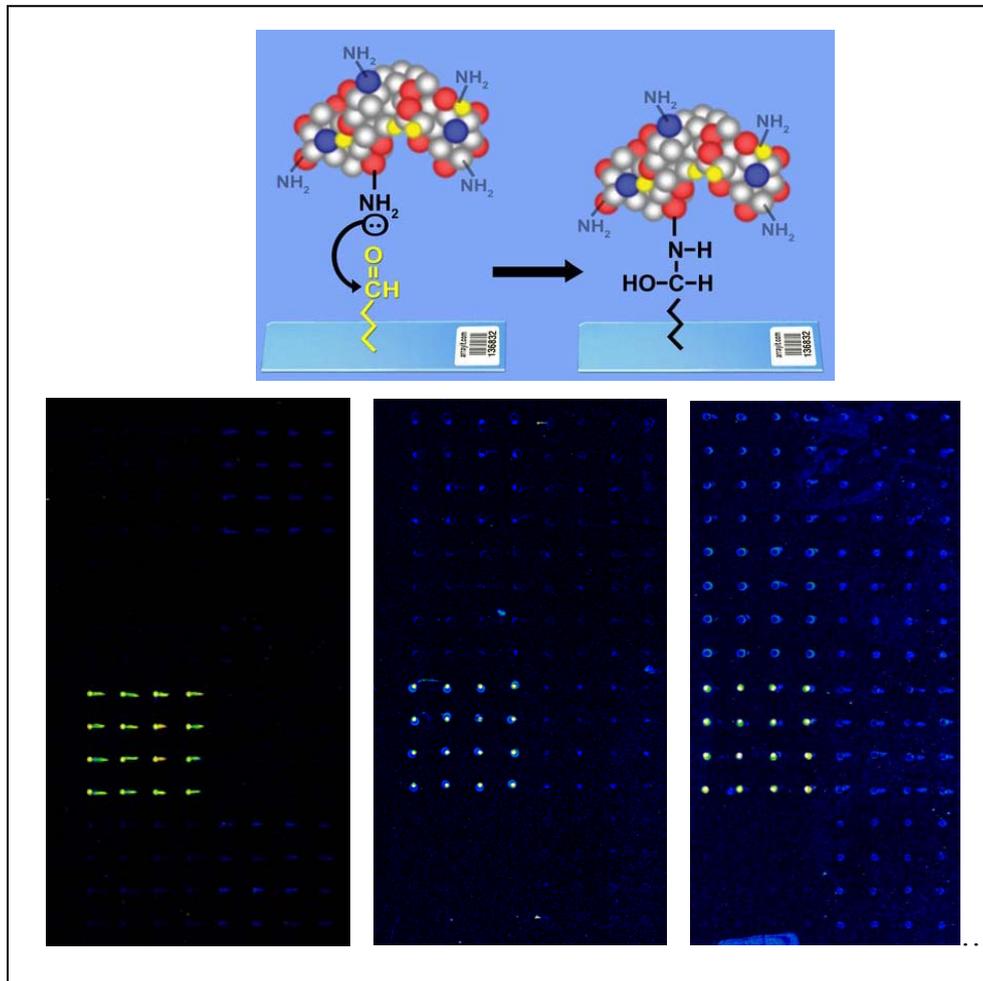


Abb. 40: **Oben:** Schematische Darstellung der Bindung eines Proteins an eine Aldehydgruppen modifizierte Microarrayoberfläche (Telechem). **Unten:** Ergebnisse von Serum-Experimenten mit drei verschiedenen Aldehydoberflächen. Von links nach rechts: „SuperAldehydII“ (Telechem), „Nexterion Slide AL“ (Schott), Aldehyd-Slide (Genetix). Serumverdünnung: 1:500. Antikörper: Ziege-anti-human-IgG-Cy5-konjugiert (1:800), Inkubationen jeweils bei 37°C. Pattern: 4x4 (es sind acht gespottete Proteine dargestellt (je vier in zwei Reihen), wobei immer 16 identische Spots ein Protein repräsentieren.).

Epoxid-Modifizierung

Epoxid-Beschichtungen ermöglichen wie auch bei den Aldehydoberflächen eine kovalente Immobilisierung von Proteinen. Jedoch können hier neben den Aminogruppen des Proteins auch Hydroxyl- und Thiol-Gruppen mit der Epoxid-Gruppe reagieren (Abb. 41

oben). Die Bindungsaffinität ist hier wegen größerer Reaktivität hoch. Für die Lagerung der Slides bedarf es jedoch einer feuchtigkeitsfreien Umgebung, da sonst die Epoxid-Gruppen an der Oberfläche schon vor der Verwendung abreagieren können (Kambhampati, 2004).

Es wurden Epoxid-Oberflächen von drei Herstellern verglichen (Abb. 41 unten). Alle Oberflächen zeigten einen sehr geringen Hintergrund. Auch wenn leichte Spotheterogenitäten bei den Schott-Slides auftraten, so zeigte diese Oberfläche noch den größten dynamischen Messbereich: Auch viele der geringer konzentrierten Proteine ließen sich noch detektieren.

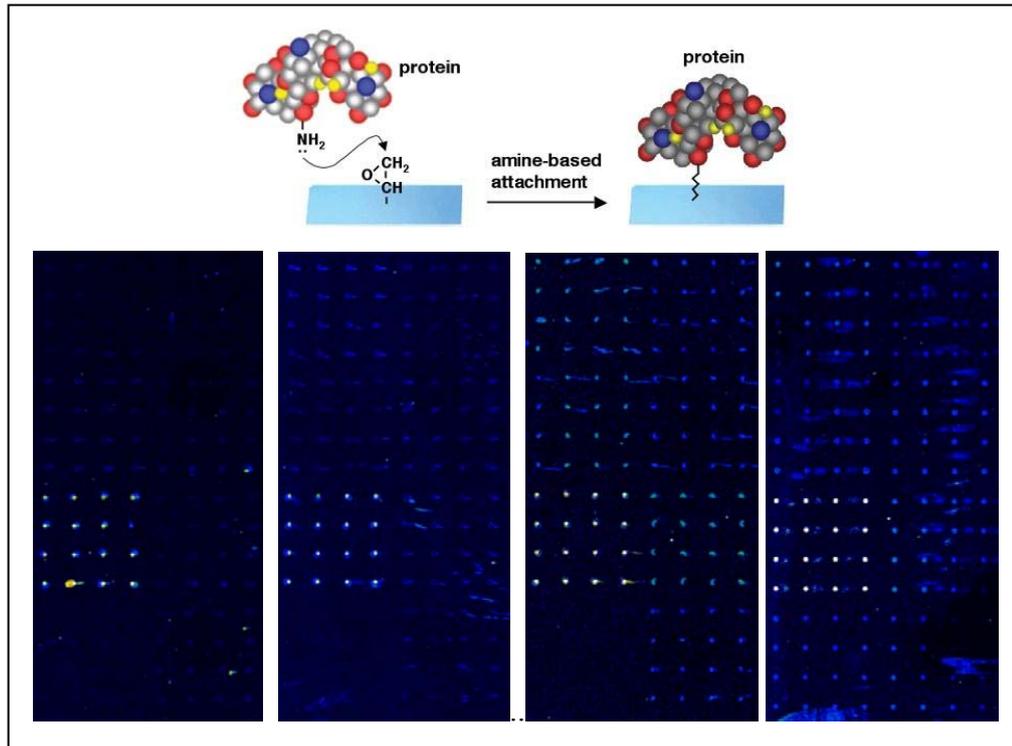


Abb. 41: **Oben:** Schematische Darstellung der Bindung eines Proteins über seine Amino-Gruppe an eine Epoxy modifizierte Microarrayoberfläche (Telechem). **Unten:** Ergebnisse von Serum-Experimenten mit vier verschiedenen Epoxyoberflächen. Von links nach rechts: "SuperEpoxy" und "SuperEpoxyII" (Telechem), „Nexterion Slide E“ (Schott), Epoxy-Slides (Genetix). Serumverdünnung: 1:500. Antikörper: Ziege-anti-human-IgG-Cy5-konjugiert (1:800), Inkubationen jeweils bei 37°C. Pattern: 4x4 (es sind acht gespottete Proteine dargestellt (je vier in zwei Reihen), wobei immer 16 identische Spots ein Protein repräsentieren.).

Amin-Modifizierung

Aminmodifizierte Microarrays binden Proteine über elektrostatische Wechselwirkungen in Form von Salzbrücken. Dabei interagieren negativ geladene Gruppen der Proteine (z.B. die Carboxylgruppe der Glutaminsäuren) mit den positiv geladenen Aminogruppen auf der Microarray Oberfläche. Oft kommt auch Poly-Lysin zum Einsatz, das eine große Oberfläche

mit vielen Aminogruppen bereitstellt. Diese Oberflächenodifizierung wird auch schon lange in der DNA-Microarray-Technologie eingesetzt. Für Protein Microarrays, wie sie in dieser Arbeit vorgesehen sind, scheint eine Aminobeschichtung jedoch nicht geeignet zu sein. Bei der Auswertung der mit Serum prozessierten Slides wurden bei beiden Herstellern viele Spotheterogenitäten und Artefakte festgestellt (Abb. 42 unten). Eine Ursache könnte die schwächere Bindungsenergie dieser nicht kovalenten Bindung sein und die evtl. damit verbundene teilweise Ablösung von Proteinen z.B. während der Waschschrinen.

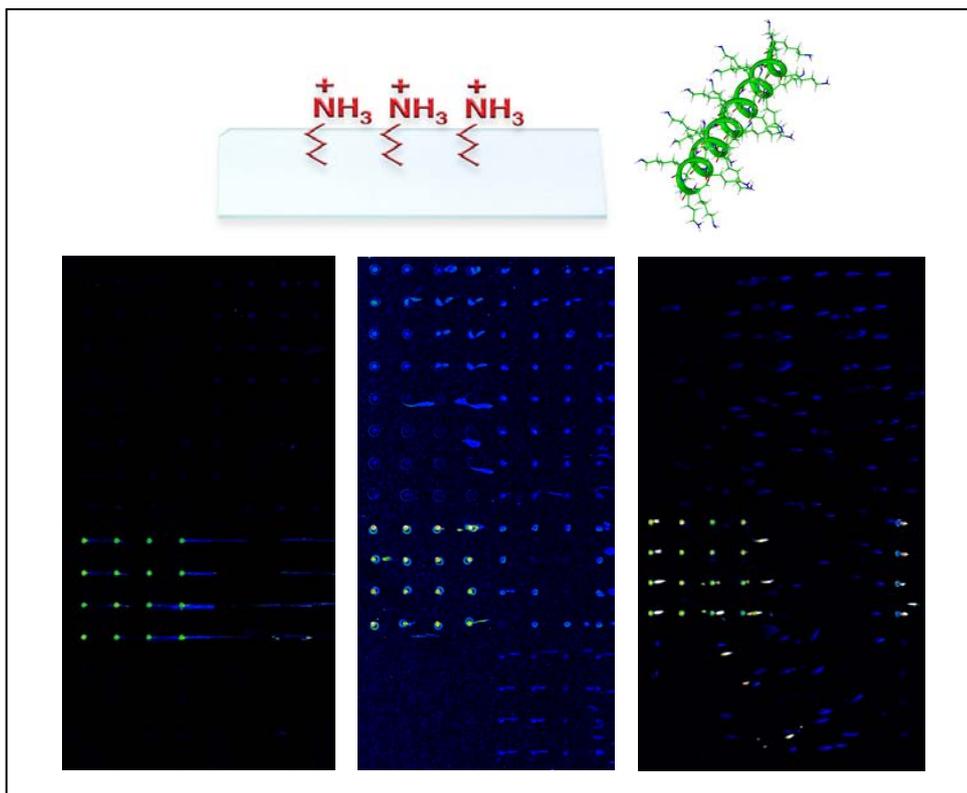


Abb. 42: **Oben:** Schematische Darstellung einer aminmodifizierten Microarrayoberfläche und der Struktur von Poly-Lysin (Telechem). **Unten:** Ergebnisse von Serum-Experimenten mit drei verschiedenen Aminoberflächen. Von links nach rechts: „SuperAmin“ (Telechem), „Nexterion Slide A“ und „Nexterion Slide HiSens A“ (Schott). Serumverdünnung: 1:500. Antikörper: Ziege-anti-human-IgG-Cy5-konjugiert (1:800), Inkubationen jeweils bei 37°C. Pattern: 4x4 (es sind acht gespottete Proteine dargestellt (je vier in zwei Reihen), wobei immer 16 identische Spots ein Protein repräsentieren.).

Nitrocellulose-Beschichtung

Die Verwendung von Membranen wie z.B. aus Nitrocellulose ist in der Proteinbiochemie z.B. für Western-Blots schon lange etabliert. Daher wurden diese Membranen auch für Protein Microarray Beschichtungen genutzt. Nitrocellulose zeichnet sich aufgrund der

dreidimensionalen Struktur durch eine hohe Bindungskapazität aus, was auch die sehr gleichmäßigen Spots bei den in dieser Arbeit untersuchten Oberflächen erklärt (Abb. 43). Aufgrund der vermehrten Lichtstreuung an der Membran zeigten die hier untersuchten Oberflächen einen höheren Hintergrund, als zuvor getestete Beschichtungen. Dabei zeigten die „FAST“-Slides von Schleicher&Schuell noch das beste Signal/Hintergrund Verhältnis von den drei untersuchten Oberflächen und es konnten auch bei geringen Proteinkonzentrationen noch gute Signale erzeugt werden. Die Microarrays von Telechem erwiesen sich zudem als unbrauchbar, da sich die gesamte Beschichtung im Laufe der Prozessierung teilweise von dem Glas-Träger ablöste.

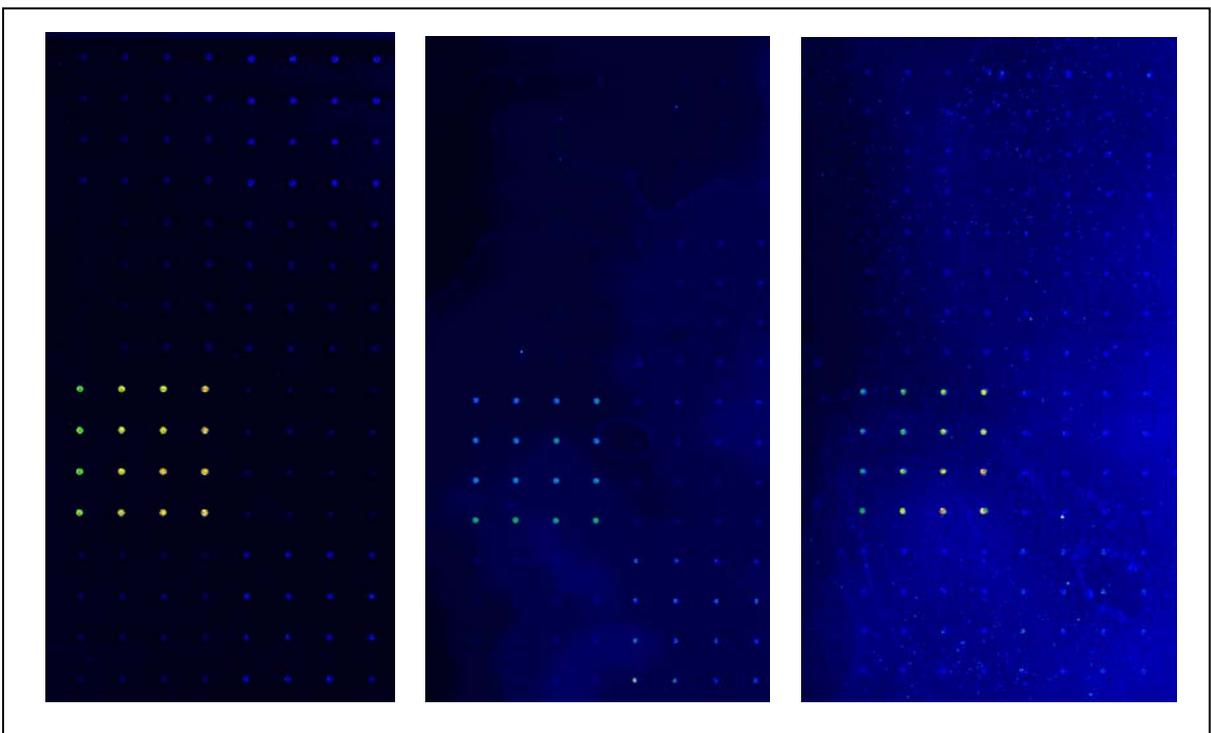


Abb. 43: Ergebnisse von Serum-Experimenten mit drei verschiedenen Membranoberflächen. Von links nach rechts: Nitrocellulose-Slides „FAST™“ (Schleicher&Schuell), Nitrocellulose-Slides „SuperNitro“ (Telechem), Polymer-Slides „SuperProtein“ (Telechem). Serumverdünnung: 1:500. Antikörper: Ziege-anti-human-IgG-Cy5-konjugiert (1:800), Inkubationen jeweils bei 37°C. Pattern: 4x4 (es sind acht gespottete Proteine dargestellt (je vier in zwei Reihen), wobei immer 16 identische Spots ein Protein repräsentieren.).

Hydrogel-Beschichtung

Seit noch relativ kurzer Zeit sind auch komplexere dreidimensionale Hydrogel-Beschichtungen auf dem Protein Microarray Markt verfügbar. Aufgrund der verwendeten hydrophilen Polymere sind diese Beschichtungen besonders für PMAs geeignet, bei denen die

Funktionalität der Proteine erhalten bleiben soll. Die Polymerbeschichtung bildet dabei eine hydrophile, flexible Umgebung ähnlich wie in einer Lösung. Bei der in dieser Arbeit untersuchten Hydrogel-Slides von Schott werden die Proteine kovalent über ihre Amingruppen und den aktivierten Carboxylgruppen der Polymere auf der Oberfläche fixiert. Jedoch konnte bei der Untersuchung in dieser Arbeit ein nur sehr geringes Signal/Hintergrund Verhältnis erreicht werden.

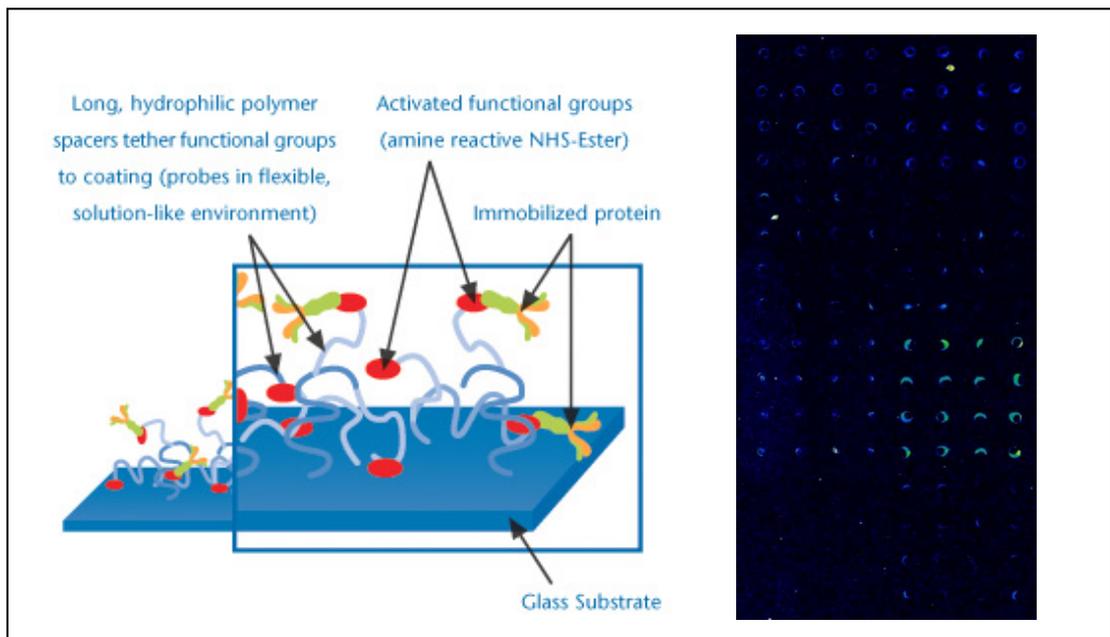


Abb. 44: **Links:** Schematische Darstellung einer Hydrogel-modifizierten Microarrayoberfläche. **Rechts:** Ergebnis des Serum-Experiments mit einem Hydrogelslide („Nexterion Slide H“, Schott). Serumverdünnung: 1:500. Antikörper: Ziege-anti-human-IgG-Cy5-konjugiert (1:800), Inkubationen jeweils bei 37°C. Pattern: 4x4 (es sind acht gespottete Proteine dargestellt (je vier in zwei Reihen), wobei immer 16 identische Spots ein Protein repräsentieren.).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Nitrocellulose-Slides von Schleicher&Schuell, die beste Spotuniformität zeigten, jedoch auch ein relativ hohes Hintergrundsignal im Vergleich zu anderen Beschichtungen aufwiesen. Dennoch wurden diese auch verhältnismäßig preiswerten Microarrays für einige der noch folgenden Vorversuche eingesetzt. Für das Screening wurde sich letztendlich für die Epoxy-Oberflächenbeschichtung der „Nexterion Slide E“ Microarrays von Schott entschieden, da hier bei einem sehr geringem Hintergrundsignal auch eine sehr hohe Sensitivität und verhältnismäßig uniforme Spots erzielt werden konnten.

5.3.4 Normalisierungsstrategie

Eine Analyse die mehrere, verschiedene Bedingungen (z.B. Patient/Kontrollperson, Patient A/Patient B) miteinander vergleicht, erfordert eine Normalisierung der Daten. Dabei gibt es verschiedene Faktoren, die unterschiedlich sein können, jedoch nicht alle für die Auswertung berücksichtigt werden können und müssen. Ein Punkt ist die verschiedene Beschaffenheit der unterschiedlichen Seren. Diese variieren in der Zusammensetzung der Antikörper aber auch sonstiger Bestandteile, die zu veränderten Hintergründen führen können. Durch eine geeignete Hintergrundsubtraktion kann dieser Umstand aber kontrolliert werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist das gleichmäßige Vorhandensein der Proben (Protein) auf den unterschiedlichen Arrays. Dieses sollte durch die Anwendung von hochpräzisen Microarrayern (Spottern) gewährleistet sein, es kommt jedoch trotzdem aus verschiedenen Gründen (unterschiedliche Übertragung, Materialabweichungen der Oberflächen, Veränderung der Viskosität/Konzentration während des Spotting-Vorganges, etc.) zu Abweichungen. Außerdem ist es praktisch unmöglich rekombinante Proteinproben zu generieren, die alle die identische Konzentration aufweisen

Um die dadurch auftretenden Signalunterschiede sinnvoll bewerten zu können, wurde in dieser Arbeit eine Normalisierungsstrategie entwickelt, die es ermöglicht parallel mit der Erfassung der Signalintensitäten, verursacht durch Serumantikörper, auch quantitative Unterschiede der rekombinanten Proteine auf dem Microarray zu erfassen.

Für den Nachweis der rekombinanten Proteine wurde ein indirekter nicht kompetitiver Sandwich-Assay gewählt: Da alle rekombinanten *Neissera*-Proteine einen RGS-His₆-Tag besitzen, wurde ein Anti-RGS-His-Antikörper eingesetzt, an dem in einem zweiten Schritt ein gegen diesen Antikörper gerichteter fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper binden sollte. Diese Strategie sollte sicher stellen, dass für jeden Protein-Spot auf dem Microarray, neben der Information über gebundene Serumantikörper auch gleichzeitig Informationen über die Menge des jeweiligen Proteins erhalten werden konnten (Abb. 45).

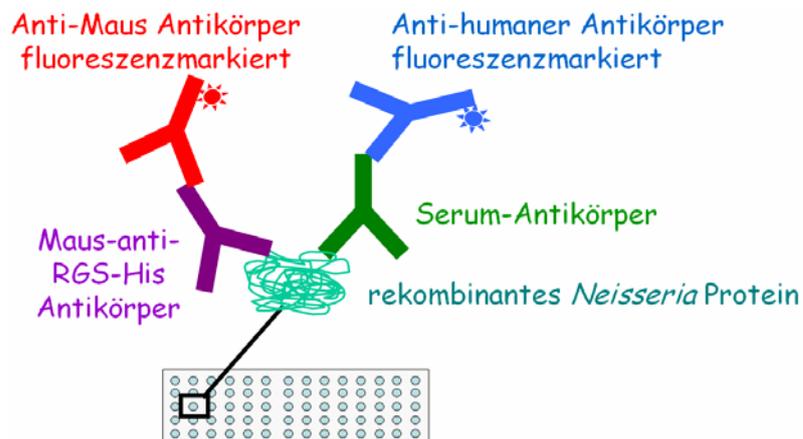


Abb. 45: Schematische Darstellung der Antikörperzusammenspiels zur bivalenten Detektion der rekombinanten *Neisseria*-Proteine

Um mögliche Behinderungen der Serumantikörper durch den zusätzlichen Antikörper während der Bindung an die Proteine zu minimieren, wurde in einem ersten Versuch verschiedene Konzentration des Maus-Anti-RGS-His Antikörpers getestet, um dann eine möglichst geringe Konzentration zu ermitteln, bei der immer noch ein ausreichend hohes Signal für den zu detektierenden Erstantikörper erhalten werden kann. Es wurden fünf Konzentrationsstufen in einem Bereich von 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 0,1 ng/ml untersucht. Dabei kam der Maus-Anti-RGS-His Antikörper der Firma Qiagen sowie der Ziege-Anti-Maus-IgG Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff TexasRed konjugiert der Firma Jackson ImmunoResearch zum Einsatz. In Abb. 46 sind die Ergebnisse von drei untersuchten Konzentrationsstufen dargestellt. Das Signal der Spots bei einer Maus-Anti-RGS-His-Antikörperkonzentration von 10 ng/ml ist noch fast genauso hoch wie bei 1 $\mu\text{g/ml}$. Jedoch konnten die Spots schon ab der nächst kleineren Größenordnung von 1 ng/ml kaum noch quantifiziert werden.

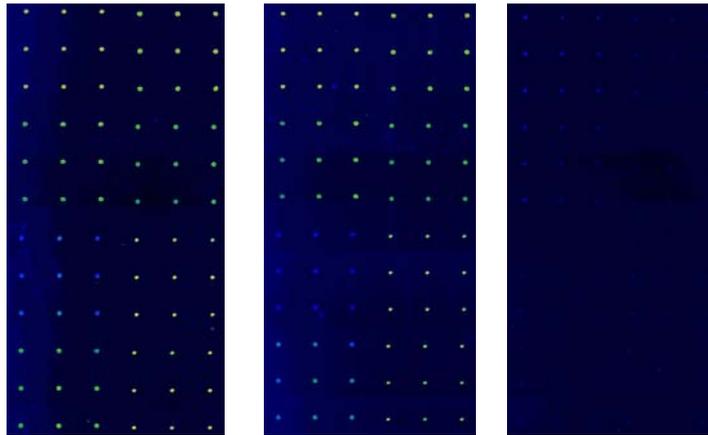


Abb. 46: Ergebnisse des Microarray-Experiments zum Test verschiedener Anti-RGS-His-Antikörperkonzentrationen. Von links nach rechts: 1 µg/ml, 10 ng/ml und 1 ng/ml. Oberfläche: Nitrocellulose („FAST“, Schleicher&Schuell). Antikörper: Anti-RGS-His (Qiagen), Ziege-anti-Maus-IgG-TexasRed-konjugiert (1:2000), Inkubationen jeweils bei 37°C. Pattern: 3x3 (es sind acht gespottete Proteine dargestellt (je vier in zwei Reihen), wobei immer 9 identische Spots ein Protein repräsentieren.).

Zusätzlich wurde auch noch ein Antikörper eines anderen Herstellers getestet (Abb. 47). Bei gleicher Konzentration (1 µg/ml) konnte aber nur ein wesentlich schwächeres Signal erzielt werden. Dies ist wahrscheinlich auf die geringere Affinität des Antikörpers, der nur gegen His₆ und nicht gegen des gesamten RGS-His₆-Tag gerichtet ist, zurückzuführen. Die Verwendung dieses Antikörpers wurde daher verworfen.

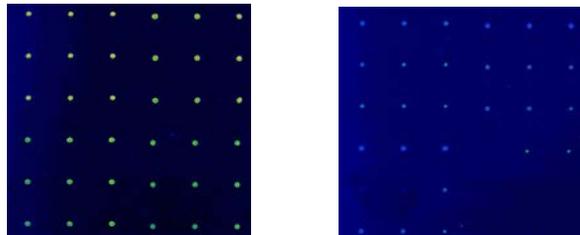


Abb. 47: Ergebnisse des Microarray-Experiment zum Test verschiedener Anti-His-Antikörper verschiedener Hersteller. Links: Anti-RGS-His (Qiagen). Rechts: Anti-His (TendPharma). Antikörperkonzentration: jeweils 1 µg/ml. Oberfläche: Nitrocellulose („FAST“, Schleicher&Schuell). Zweit-Antikörper: Ziege-anti-Maus-IgG-TexasRed-konjugiert (1:2000), Inkubationen jeweils bei 37°C. Pattern: 3x3 (es sind vier gespottete Proteine dargestellt (je zwei in zwei Reihen), wobei immer 9 identische Spots ein Protein repräsentieren.).

Für das Experiment zum Testen des Zusammenspiels beider Nachweissysteme wurde zunächst der Fluoreszenzfarbstoff TexasRed für den anti-Maus Antikörper und Cy5 für den anti-human Antikörper gewählt. Es wurden auch starke Signale in beiden Farbkanälen erzielt. Diese Kombination wurde daher auch für das erste Screening verwendet (siehe 5.4.2). Bei der Auswertung von Kontrollexperimenten fiel jedoch auf, dass das Serum-Cy5-Signal ohne anti-

RGS-His und ohne anti-Maus Antikörper etwas schwächer war. Verwunderlich schien zunächst ebenso, dass selbst ohne Serum (und ohne anti-humanen Cy5-Antikörper) ein schwaches Serum-Signal im Cy5-Kanal des Scanners detektiert werden konnte. Es wurde daher vermutet, dass der TexasRed-konjugierte Antikörper auch im Cy5-Kanal des Scanners ein Signal verursacht und damit dieses Signal verfälscht. Dies konnte durch ein weiteres Experiment tatsächlich bestätigt werden: Es wurden dazu verschiedene TexasRed- und Cy5-konjugierte Antikörper direkt auf einen Glasträger aufgebracht und das Fluoreszenzsignal ausgewertet. Es konnte im Cy5-Kanal ein starkes Signal für die Texas-Red-konjugierten Antikörper detektiert werden. Im Gegensatz dazu verursachten die Cy5-konjugierten Antikörper kein Signal im TexasRed-Kanal des Laserscanners.

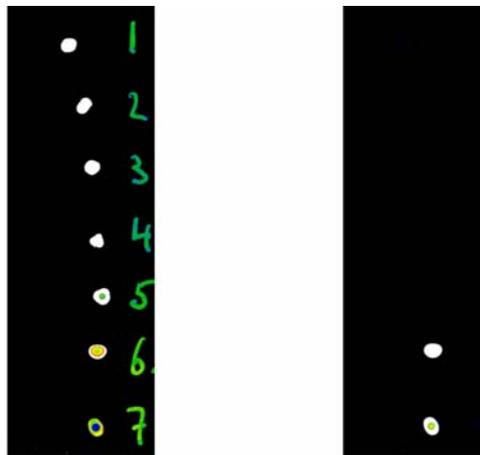


Abb. 48: Fluoreszenzmessung verschiedener Fluorophore in zwei verschiedenen Farbkanälen. **Links:** Cy5-Kanal. **Rechts:** TexasRed Kanal. Es wurden je 0,2 μ l unverdünnte Antikörperlösung auf einen Glasobjektträger mit einer Pipette aufgetragen. Antikörper 1-5: verschiedene Cy5-konjugierte Antikörper (anti-Maus und anti-human). Antikörper 6 und 7: anti-Maus und anti-humaner TexasRed-konjugierter Antikörper.

Betrachtet man die Anregungs- und Emissions-Spektren für beide Fluorophore, so lässt sich dieses Phänomen jedoch zunächst nicht erklären (Abb. 49): Cy5 wird mit einem HeNe-Laser bei 633 nm angeregt. Wie dem Spektrum zu entnehmen ist, wird der Fluorophor TexasRed bei dieser Wellenlänge theoretisch nicht angeregt. Da der Fluorophor nicht angeregt wird, kann eigentlich auch keine emittierte Strahlung bei 670 nm detektiert werden, auch wenn sich hier beide Emissionsspektren überlappen. Eine möglicher Erklärung für die dennoch auftretende Emissionsstrahlung sind andere Versuchsbedingungen (z.B. pH-Wert oder Lösungsbestandteile), die für abweichende Spektren verantwortlich sein könnten. Denkbar wäre auch, dass die Anregungsstrahlung an der Oberfläche gestreut wird, dabei teilweise absorbiert wird und dann in energieärmerer Form auch bei 670 nm wieder detektiert wird.

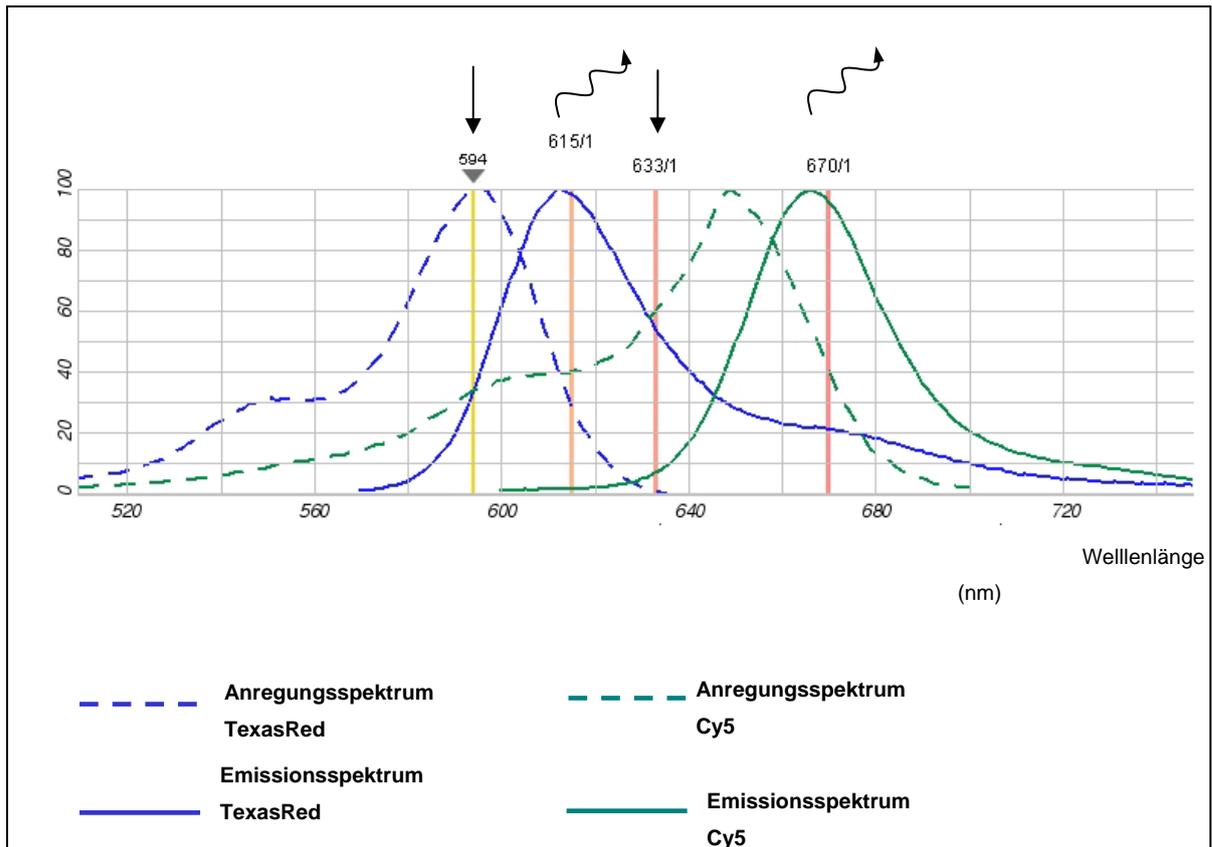


Abb. 49: Emissions- und Absorptionsspektrum für einen Cy5-markierten IgG-Antikörper und einen Ziege-anti-Maus-IgG-TexasRed-konjugierten Antikörper, bei pH 7.2. Anregungswellenlängen: 594 nm (TexasRed) und 633 nm (Cy5). Emmissionsmessung: 615 nm (TexasRed) und 670 nm (Cy5). Dieses Spektrum wurde mit Hilfe des „SpectraViewers“ (www.probes.com) erstellt.

Um den Effekt der unspezifischen Messung von Cy5-Serum-Signalen (verursacht durch TexasRed-Antikörper) zu vermeiden wurden die Fluorophormarkierungen getauscht. Damit konnte zwar sichergestellt werden, dass der nun mit Cy5 konjugierte anti-Maus Antikörper nicht zum Texas-Red-Serum-Signal beiträgt und damit nicht durch hohe Protein-Mengen auf dem Chip als falsch-positiv erkannte Proteine identifiziert werden können. Es konnte jedoch damit nicht verhindert werden, dass umgekehrt das Cy5-RGS-His-Signal auch vom TexasRed-Serum-Signal beeinflusst wird, auch wenn dieser Effekt aufgrund einer geringeren Konzentration an proteinspezifischen Antikörpern im Serum wesentlich geringer war. Beispielsweise könnte aber dennoch ein sehr hohes Serumsignal auch ein höheres RGS-His-Signal generieren, was letztendlich falsch-negative Ergebnisse erzeugen würde, da bei der Daten-Auswertung die vermeintlich hohe Proteinkonzentration zu einer Abwertung des hohen Serumsignals führen würde.

Zusätzlich traten bei dieser Fluorophorenkombinationen auch Probleme in Form von Kreuzreaktionen auf. Auch ohne Serum wurde ein TexasRed-Signal detektiert (Abb. 50).

Nach der Durchführung verschiedener Tests wurde deutlich, dass anscheinend der anti-humane-TexasRed-konjugierte Antikörper unspezifisch auch an den anti-RGS-His-Antikörper aus der Maus bindet. So würden auch hier wieder unterschiedlich Protein-Mengen ein verfälschtes Serum-Signal generieren.

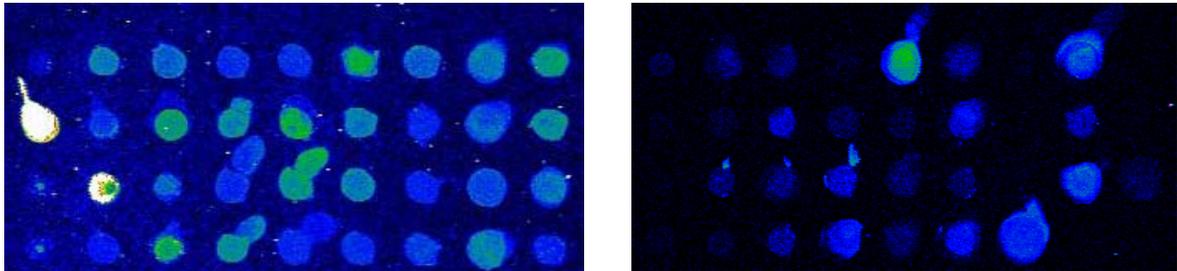


Abb. 50: Gegenüberstellung von Fluoreszenzmessungen mit (links) und ohne (rechts) Serum im TexasRed-Kanal des Laserscanners. Oberfläche: Exposit „Nexterion Slide E“, Schott. Serumverdünnung: 1:100. Antikörper: Ziege-anti-human-IgG-TexasRed-konjugiert (1:2000), Ziege-anti-Maus-IgG-Cy5-konjugiert (1:800), Maus-anti-RGS-His Antikörper (1:10⁴) Inkubationen jeweils bei 4°C (Erstantikörper) und 37°C (Zweitantikörper). Pattern: Es sind 36 verschiedene Proteine dargestellt, wobei jeder Spots ein anderes Protein repräsentiert.

Die anti-humanen Antikörper wurden aus Ziegen gewonnen. Es ist durchaus vorstellbar, dass dabei auch kreuzreaktive Antikörper gegen Maus-IgG auftreten können. Selbst der Vertreiber der Antikörper (Jackson ImmunoResearch) weist in seinen Produktspezifikationen darauf hin, dass eine Kreuzreaktion mit IgG anderer Spezies nicht ausgeschlossen werden kann.

Um dennoch Kreuzreaktionen der nicht ganz spezifischen anti-humanen Antikörper zu umgehen, wurde eine andere Normalisierungsstrategie getestet. Dabei wurde sich der Umstand zu Nutze gemacht, dass alle rekombinant exprimierten *Neisseria*-Proteine neben dem RGS-His₆-Tag auch eine Biotinylierung aufwiesen. So können die Proteine auch direkt über fluoreszenzmarkiertes Streptavidin nachgewiesen werden. Die hochaffine Bindung von Biotin an Streptavidin kommt dabei gänzlich ohne Antikörper aus. Kreuzreaktionen konnten hierbei also ausgeschlossen werden. Für die Überprüfung der Eignung dieses Nachweissystems wurde Alexa546-markiertes Streptavidin eingesetzt. Alexa 546 wird bei 555 nm angeregt und die Emission wird bei 570 nm detektiert..

Dabei konnte bei der Messung ohne Serum und ohne TexasRed-konjugiertem Antikörper nur ein sehr geringes, vernachlässigbares Signal durch Alexa im TexasRed-Kanal festgestellt werden. Nach dem Spektrum aus Abb. 49 sind keine Probleme erkennbar. Die Auswertung des Serum-Signals lieferte gute Ergebnisse. Auch für den Streptavidin-Assay konnten hohe

Signale erzielt werden. Jedoch zeigten sich starke Spotheterogenitäten (Abb. 51), die eine sinnvolle Auswertung der Signale unmöglich machten. Auch geringere Konzentrationen an Streptavidin-Alexa konnten hier nicht zu einer Erhöhung der Spothomogenität beitragen. Da die Heterogenitäten nur im Alexa-Kanal auftreten und das Serum-Signal relativ gleichmäßige Protein-Spots zeigt, sind diese Effekte nicht auf die Proteine selbst, auf Serumantikörpern oder den antihumanen TexasRed-Kanal, sondern eindeutig auf Streptavidin-Alexa zurückzuführen. Was jedoch die genauen Ursachen dafür waren, dass Streptavidin-Alexa auch außerhalb der eigentlichen Protein-Spots so hohe Signale erzeugte, blieb unklar. Es wäre evtl. denkbar, dass die verwendete Epoxy-Oberfläche nicht optimal für diesen Assay geeignet ist. Auch in der Literatur wurde schon von Erfahrungen dieser Art berichtet, jedoch konnten auch dort keine Erklärungen gefunden werden (Guillaume et al., 2005).

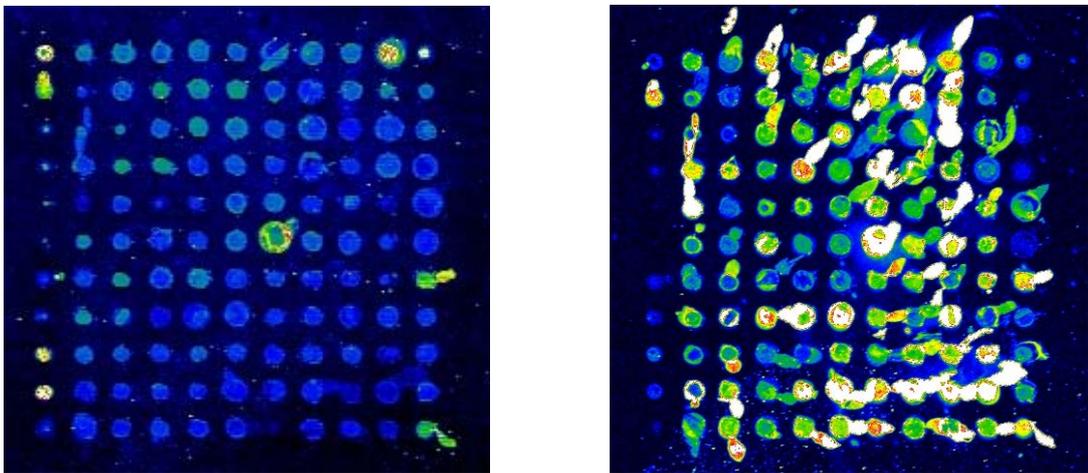


Abb. 51: Test der Normalisierungstrategie mit Streptavidin-Alexa. Es ist der gleiche Microarray-Ausschnitt im TexasRed-Kanal (links) und im Alexa-Kanal (rechts) dargestellt. Oberfläche: Exopid „Nexterion Slide E“, Schott. Serumverdünnung: 1:100. Antikörper: Ziege-anti-human-IgG-TexasRed-konjugiert (1:2000). Streptavidin-Alexa546-konjugiert (1:400). Inkubationen bei 4°C (Erstantikörper) und 37°C (Zweitantikörper). Pattern: es sind alle rekombinant aufgereinigten Proteine je einmal dargestellt (siehe Screening 2, 5.4.2.)

Da der zeitliche Rahmen für einen erneuten Oberflächentest fehlte, wurde sich daher für das zweite Screening wieder für den Protein-Nachweis über anti-RGS-His-Antikörper entschieden. Um Kreuzreaktionen auszuschließen wurde dieser Assay dann jedoch getrennt von dem Serum-Assay durchgeführt. Nähere Einzelheiten dazu sind unter 5.4.2 erläutert.

5.3.5 Multiplexing

Für ein Serumscreening müssen die gespotteten Proteine auf dem PMA mit einer großen Zahl von verschiedenen Seren gescreent werden. Bisher wurde dabei meist für jedes Serum auch ein einzelner Microarray verwendet. Da die Kosten für Microarray-Substrate jedoch immer noch recht hoch sind, kann der finanzielle Rahmen für solch eine Versuchreihe schnell überschritten werden. Außerdem ist die einzelne Inkubation unter Deckgläschen sehr zeitintensiv, so dass nicht viel mehr als gleichzeitig ca. 20 Seren getestet werden können. Um mehrere Seren gleichzeitig auf einem PMA untersuchen zu können, bedarf es einer geeigneten Multiplexing-Strategie. Die möglichen Ansätze für solche Strategien wurden unter 3.3.4 vorgestellt. In dieser Arbeit wurden Systeme eingesetzt, welche den Microarray in verschiedene Kompartimente unterteilen. In jedem der Kompartimente, kann so ein anderer Assay durchgeführt werden bzw. in diesem konkreten Fall ein anderes Serum getestet werden.

Zunächst wurde das Multiplexing-System von Telechem untersucht. Hierbei werden bis zu vier Microarrays durch das Aufbringen einer flexiblen Gitter-Struktur in je 24 Felder unterteilt. Diese Struktur wird anschließend mit einem Kunststoff-Rahmen auf den Microarrays fixiert (Abb. 52 links). Es können also so theoretisch mit vier PMAs 96 Seren gleichzeitig untersucht werden, wo bisher 96 einzelne Microarrays nötig waren. Bei der Verwendung dieses Systems zeigten sich jedoch gravierende Mängel: Schon nach der Inkubation mit dem Erst-Antikörper enthielten einige Felder deutlich weniger bis gar keine Antikörper-Lösung mehr (Abb. 52 rechts oben). Die einzelnen Felder waren also nicht vollständig von den sie umgebenden Feldern abgegrenzt. Dieses Multiplexing-System erwies sich auch nach wiederholten Tests als völlig unbrauchbar.

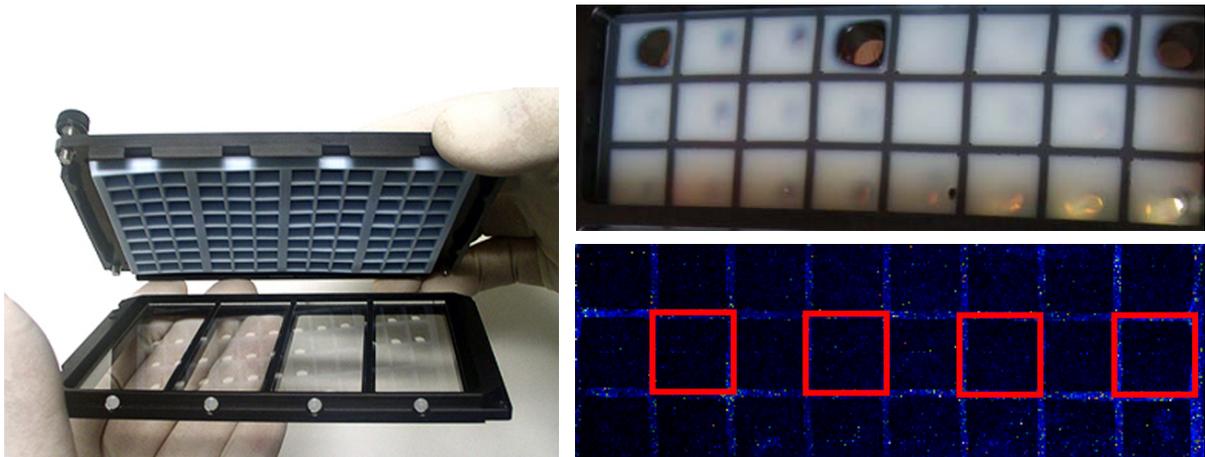


Abb. 52: Multiplexing-System von Telechem. **Links:** Funktionsweise des Multiplexing-Systems. Im unteren Rahmen befinden sich bis zu vier Microarrays. Der obere Rahmen wird zusammen mit der flexiblen Gitterstruktur auf den unteren Rahmen durch Verschraubung fixiert. Der obere Rahmen besitzt dabei auf der Oberseite Öffnungen zum Einbringen der verschiedenen Lösungen. **Rechts oben:** Fotografie eines der vier Microarrays nach der Inkubation mit dem Erst-Antikörper. Das Foto wurde von unten aufgenommen. **Rechts unten:** Ergebnis eines Kontaminationstests mit dem Telechem-Multiplexing-System, TexasRed-Kanal. Rote Rahmen kennzeichnen Felder in denen kein anti-RGS-His-Antikörper verwendet wurde. Oberfläche: Exposit „Nexterion Slide E“, Schott. Antikörper: Maus-anti-RGS-His (1:10⁴), Ziege-anti-Maus-TexasRed-konjugiert (1:2000). Inkubationen bei 4°C (Erstantikörper) und 37°C (Zweitantikörper). Pattern: Es wurde ein Protein je fünf mal in zwei Reihen gespottet.

Aufgrund des Misserfolgs mit dem Telechem-Multiplexing-System wurden zwei weitere Systeme von Schott getestet, welche den Microarrays in 16 Felder unterteilten. Das erste System nutzte wieder flexible Strukturen, die aber hier mittels Klebefilm auf die Microarrays aufgeklebt und vor dem Scannen wieder entfernt wurden. Sie waren nur für den Einmalgebrauch vorgesehen. Ein Rahmen für vier Microarrays diente dabei dem komfortableren Handling (Abb. 53 oben links). Es konnte aber auch ohne Rahmen gearbeitet werden. Das zweite Schott-System umfasste eine wieder verwendbare feste Struktur, die mit zwei Schienen auf dem Microarray fixiert wurde (Abb. 53 oben rechts). Beide Systeme erwiesen sich als gut geeignet. Es wurden keine undichten Stellen beobachtet und bei einem Kontaminationstest konnte gezeigt werden, dass die Lösungen nicht aus den Feldern heraus gelangten (Abb. 53 unten). Für das Serum-Screening wurden daher die beiden Schott-Systeme eingesetzt.

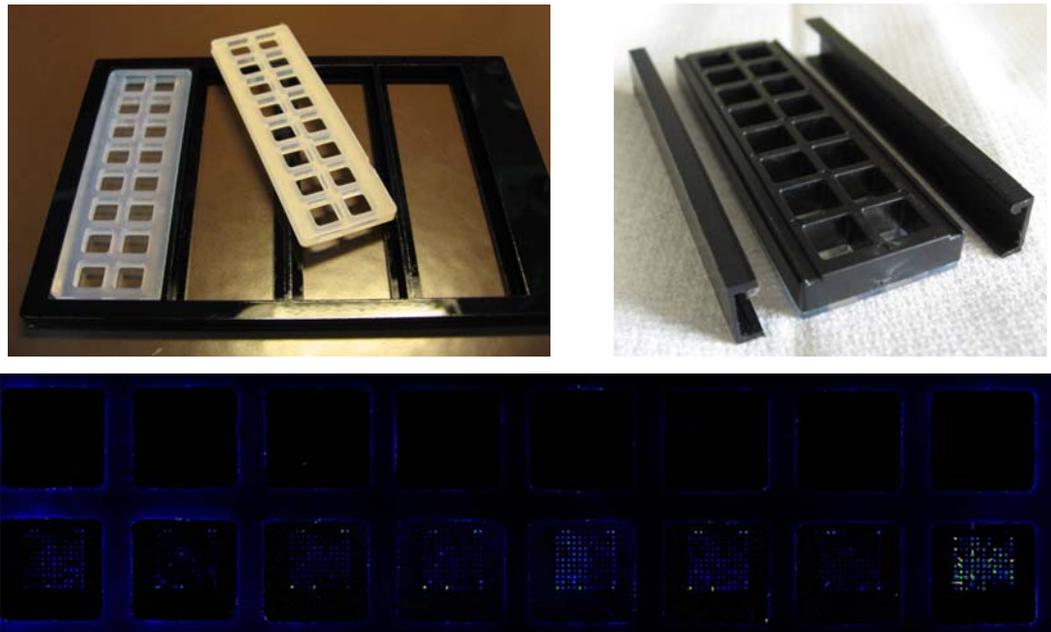


Abb. 53: Multiplexing-Systeme von Schott .Oben links: Rahmen mit flexibler Multiplexing-Struktur zum Aufkleben auf die Microarrays Oben rechts: Starre Multiplexing-Struktur zum Auflegen auf die Microarrays. Mit den zwei Schienen wird die Struktur auf den Microarrays fixiert. Unten: Ergebnis eines Kontaminationstests mit dem Schott-Klebe-Multiplexing-System, TexasRed-Kanal. In den oberen acht Feldern wurden keine Antikörper-Lösungen hinein pipettiert. Oberfläche: Expoxid „Nexterion Slide E“, Schott. Versuchsbedingungen siehe Screening 2 unter 5.4.3

Damit waren alle Optimierungsversuche abgeschlossen. Es wurde eine optimale Blockingreagenz und eine optimale Antikörper-Inkubationstemperatur gefunden. Des Weiteren wurde eine geeignete Microarray-Oberfläche sowie eine passende Normalisierungs- und Multiplexing-Strategie ausgewählt.

5.4 Screening mit Patienten- und Kontrollseren

Nachdem alle Optimierungsversuche abgeschlossen waren, wurde das Serumscreening für alle rekombinant exprimierten *Neisseria*-Proteine durchgeführt. Es standen dafür insgesamt 96 Patientenseren und 36 Kontrollseren von Patienten ohne Meningokokkeninfektion zur Verfügung. Von den 96 Patientenseren stammen je 20 Seren aus Österreich (Graz) und aus England (Manchester). Die restlichen 56 Seren stammen aus Griechenland (Athen). Die Kontrollseren stammen aus Berlin. Alle Informationen über Alter, Geschlecht und Serogruppe der Patienten sind, soweit vorhanden, in Anlage B aufgelistet.

Von den Seren 52 Seren der *N. meningitidis* Serogruppe B, 24 der Serogruppe C und zwei der Serogruppe A, zwei der Serogruppe Y und ein Serum der Serogruppe W135 zugeordnet werden. 13 Seren konnten keiner Serogruppe zugeordnet werden. Ein Großteil der Meningokokken-Patienten war unter 5 Jahre alt (23). Nur 7 Patienten waren älter als 20 Jahre. Diese Verteilung der Serogruppen und Altersklassen entspricht auch der allgemein beobachteten Verteilung, wie unter 3.1. erläutert. Es handelt sich also um repräsentative Meningokokkenfälle. Für die Kontrollseren wurden Patienten mit einer ähnlichen Altersverteilung ausgewählt.

5.4.1 Dot-Immunoassay zur Validierung der Seren

Unabhängig von ihrer Spezifität wurden die Patientenserum in einem Vorversuch auf ihren reaktiven Gehalt an IgA-, IgM- und IgG-Antikörper mit einem Dot-Immunoassay untersucht (siehe 4.2.1.7 und Abb. 54 links). Dazu wurden enzymmarkierte anti-humane-IgA-, IgM-, und IgG-Antikörper eingesetzt. In Abb. 54 rechts ist beispielhaft das Ergebnis für die Seren aus Manchester dargestellt. Die Signalintensitäten für alle Seren sind in Anhang C zu finden. Erwartungsgemäß fällt auf, dass sich die Antikörpermenge je nach Patient stark unterscheidet. Dies ist auf das unterschiedliche Alter und den individuellen Immunstatus der Patienten zurückzuführen. Es lässt sich jedoch eine allgemeine Tendenz in Bezug auf die relative Verteilung der verschiedenen Immunglobuline feststellen: Die Menge an (zugänglichen) IgA-Antikörpern ist in allen Seren weitaus geringer als die der IgG- und IgM-Antikörper. In 80% der Fällen stellen IgG die größte Menge an detektierten Antikörpern dar. Nur bei drei Seren, war die IgG-Konzentration so gering, dass sie für ein Serumscreening nicht so gut geeignet wären. Dies ist auch nicht verwunderlich, machen doch IgG-Antikörper 75 % aller Immunglobuline im Serum aus. (Richter, 2003). Dieser Umstand und die gute Löslichkeit sind auch der Grund, warum IgG bevorzugt bei immunochemischen Techniken eingesetzt werden. IgA-Antikörper finden sich hauptsächlich auf Schleimhaut-Oberflächen und Sekreten. Sie liegen meist als Dimer, oder Multimer vor und sind daher nur eingeschränkt zugänglich. IgM-Antikörper liegen als Pentamer vor. Diese Antikörper sind die ersten Antikörper, die während der Immunantwort gebildet werden. Aufgrund der geringen Löslichkeit und der Tendenz, an diversen Oberflächen unspezifisch zu binden, bleibt auch hier die Verwendung für analytische Zwecke beschränkt.

In einem Vorversuch, bei dem die Signale für an *Neisseria*-Proteine gebundene IgA, IgM und IgG Antikörper verglichen wurden, konnte ebenfalls bestätigt werden, dass die

Untersuchung der IgG-Antikörper die besten Resultate erzeugt. Daher wurde das Serumscreening in dieser Arbeit auf die Detektion von IgG-Antikörpern beschränkt.

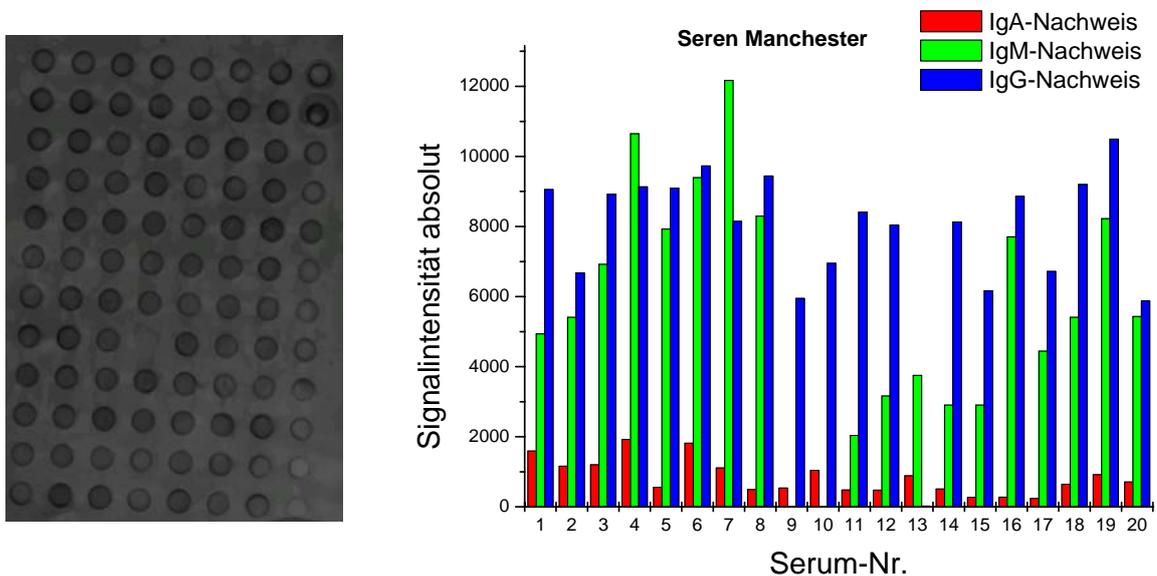


Abb. 54: Links: Bild der gescannten Membran des Dot-Immunoassays zur Detektion von IgM-Antikörpern. Rechts: quantitative Auswertung des Dot-Immunoassays exemplarisch für die 20 Seren aus Manchester.

5.4.2 Screening 1

Das Serumscreening wurde unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Daher werden die Ergebnisse für die zwei Screening-Versuchsreihen im Folgendem getrennt aufgeführt.

Für das erste Screening wurden 16 Microarrays verwendet. Es wurden die 20 Seren aus Graz, die 56 Seren aus Athen sowie 20 Kontrollseren nach Antikörpern, die an die *Neisseria*-Proteine binden, gescreent. Auf jedem Microarray wurden 16 verschiedene Seren untersucht. Bis auf die Kontrollseren, wurde jedes Serum drei Mal auf drei verschiedenen Microarrays getestet. Die 20 Kontrollseren wurden je einmal mit allen rekombinanten Proteinen untersucht. Um die Auswirkung einer unterschiedlichen Serumkonzentration zu untersuchen wurden die Seren aus Graz 1:500 und alle anderen Seren 1:100 mit Blocking-Lösung verdünnt.

In jedem der 16 Felder, die durch die Multiplexing-Struktur räumlich abgetrennt wurden, wurden alle rekombinanten Proteine (siehe 5.2) und Kontrollen in einem 11x11-Pattern gespottet (Abb. 55). Insgesamt befanden sich so jeweils 103 verschiedene rekombinante Proteine auf den einzelnen Feldern des Microarrays. Alle Proteine, die bei der SDS-PAGE-Analyse nur eine schwache Bande aufzeigten, wurden 1:2 mit PBS verdünnt. Alle anderen

Proteine wurden 1:4 verdünnt. Eine gewisse Verdünnung ist nötig, da die Protein-Lösungen sonst durch den hohen Harnstoffgehalt schnell auskristallisierten und dann nicht mehr gespottet werden konnten. Als Negativ-Kontrolle wurde Lysozym und der Elutionspuffer in zwei Verdünnungstufen (1:2 und 1:4) gewählt. Für die Positiv-Kontrollen wurden anti-IgG-Antikörper in vier Verdünnungstufen je zwei Mal gespottet. Schon bei den Vorversuchen fiel auf, dass das Protein NMB0700 (IgA-Protease) besonders hohe Serum-Signale lieferte. Deshalb wurde es ebenfalls in verschiedenen Verdünnungen als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Die Positiv-Kontrollen sollten vorrangig zur richtigen Orientierung der Microarrays, z.B. während des Scanvorgangs, und für den Nachweise der erfolgreichen Detektion mit den verschiedenen Antikörpern dienen.

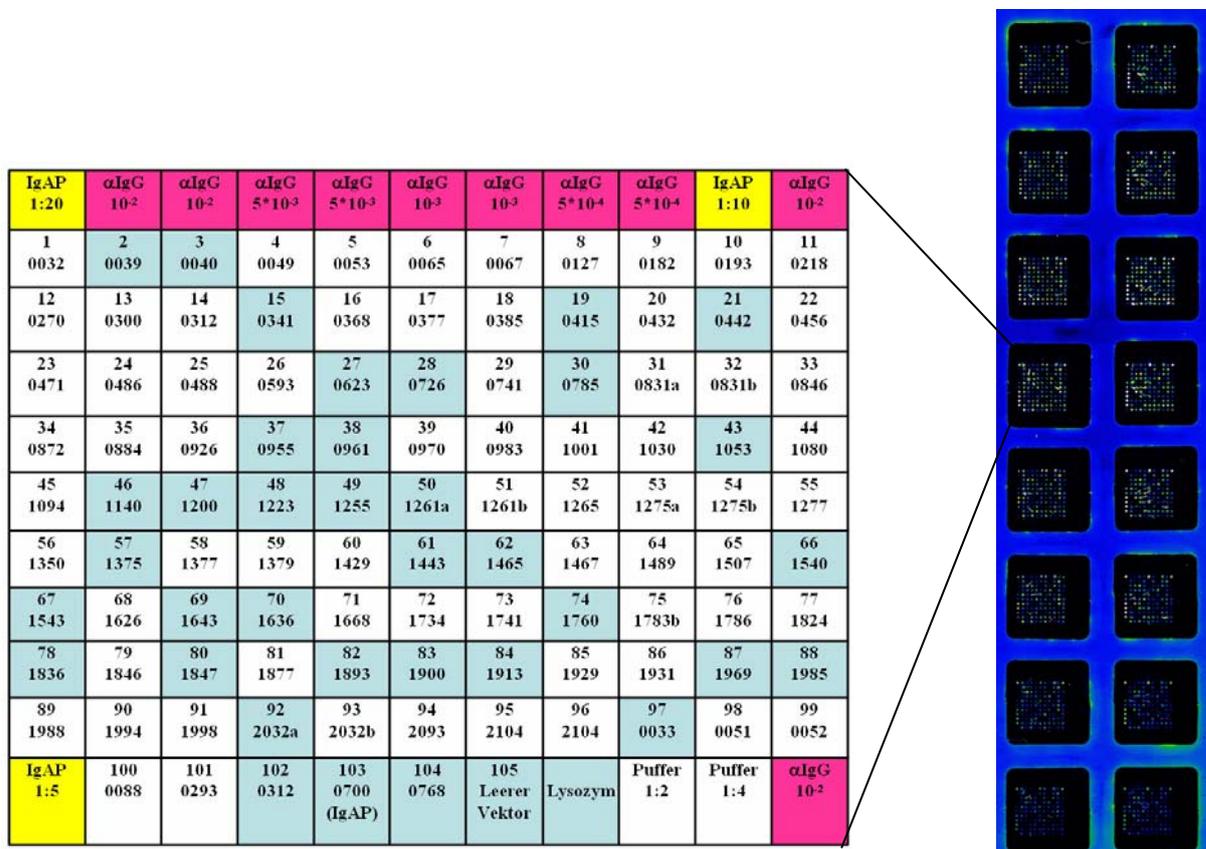


Abb. 55: Schema des 11x11 Patterns, welches für das erste Screening verwendet wurde. In jedem der 16 Felder des Microarrays (rechts), findet sich dieses Pattern wieder. Alle nicht farbig unterlegten Proteine wurden 1:4 mit PBS verdünnt. Türkis unterlegte Proteine wurden 1:2 mit PBS verdünnt. IgAP: NMB0700 IgA-Protease. α IgG: anti-IgG-Antikörper in verschiedenen Verdünnungsstufen

Für die Serum-unabhängige quantitative Detektion der *Neisseria*-Proteine wurde bei diesem ersten Screening ein Maus-anti-RGS-His-Antikörper und ein TexasRed-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper eingesetzt. Der Nachweis der Serum-Antikörper erfolgte über mit Cy5 markierten Ziege-anti-humanen-IgG-Antikörper (Abb. 56). Beide Erstantikörper und

beide Zweitantikörper wurden jeweils zusammen auf dem Microarray inkubiert, so dass in jedem Feld ein Cy5-Serum-Signal und ein TexasRed-RGS-His-Signal detektiert werden konnte. Dazu wurde die Microarrays zwei mal bei den entsprechenden Wellenlängen der beiden Fluorophore eingescannt. Für jeden Microarray standen dann also zwei Bilddateien für die Auswertung der Cy5- und TexasRed-Signale zur Verfügung.

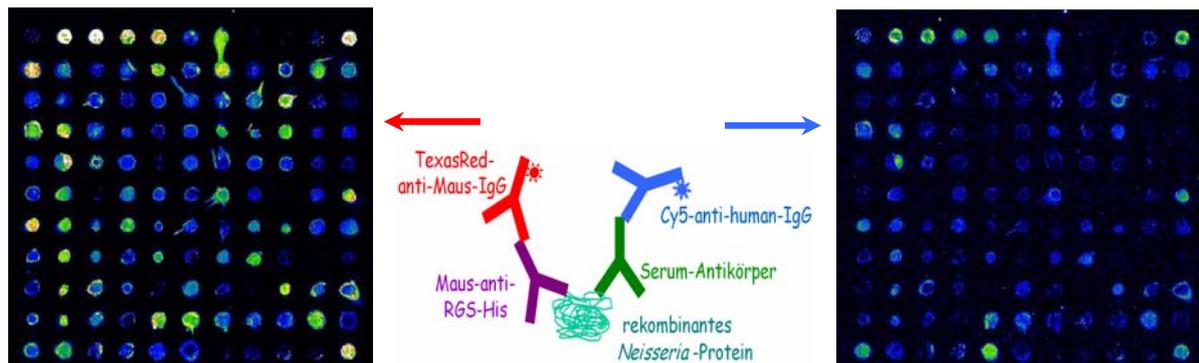
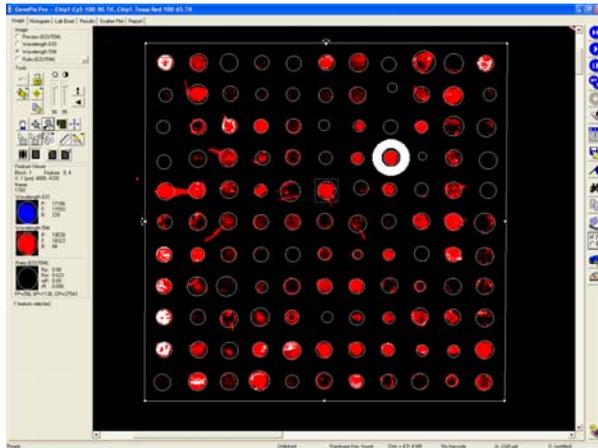


Abb. 56: Detektionsstrategie für die Detektion der gebundenen Serumantikörper und die Serum-unabhängige Detektion der *Neisseria*-Proteine. Ganz links bzw. rechts ist das 11x11 Pattern eines der 16 Felder im TexasRed-Kanal bzw. im Cy5-Kanal des Scanners dargestellt.

Die Datenauswertung wurde mit Hilfe der Software „GenePix Pro 5.0“ vorgenommen. Dazu wurden jeweils die Bilddateien des zu untersuchenden Microarrays für beide Farbkanäle geladen und für jedes Feld alle Spots des 11x11 Patterns identifiziert (Abb. 57). Die Software gab anschließend für jeden Spot die mittlere Signalintensität sowie das mittlere lokale Hintergrundsignal (siehe breiter weißer Kreis in Abb.57 links) aus. Die erzeugten Daten wurden anschließend zur weiteren Datenverarbeitung in die Software „Microsoft Excel“ exportiert.



Datenverarbeitungsschritte:

- Hintergrundsubtraktion
- Normalisierung (Cy5/TexasRed)
- Mittelwertberechnung der drei Patientenserum-Werte bzw. aller Kontrollseren
- Testkriterium für jedes Protein: Patientenserum/Mittelwert der Kontrollseren

Abb. 57: **Links:** Screenshot der Software „Gene Pix 5.0“ zur Datenaufbereitung. Der breite weiße Kreis zeigt exemplarisch den Bereich, der für die Berechnung des mittleren lokalen Hintergrundsignals eines Spots herangezogen wird. **Rechts.:** Zusammenfassung der einzelnen Datenverarbeitungsschritte zur Berechnung des Testkriteriums

Als erster Schritt der Datenverarbeitung wurde eine Hintergrundsubtraktion durchgeführt. Die unterschiedlichen Konzentrationen der Serum-Antikörper (totale Menge) sowie variierende Einstellungen während des Scanvorgangs (z.B. unterschiedliche Signalverstärkung) haben einen großen Einfluss auf das Hintergrundsignal. Durch die Hintergrundsubtraktion werden diese Unterschiede wieder ausgeglichen und die Daten vergleichbar gemacht. Dafür wurde der durchschnittliche Hintergrund eines Feldes anhand aller lokalen Spot-Hintergrundsignale des jeweiligen Feldes ermittelt und anschließend von dem Spotsignal abgezogen. Eine direkte Hintergrundsubtraktion über das Hintergrundsignal jedes Spots (ohne der feldweisen Mittelwertbildung) wurde nicht gewählt, da einige Spots Heterogenitäten aufwiesen, die das Hintergrundsignal verfälschen würden. Traten nach Hintergrundsubtraktion negative Werte auf, wurden diese für die weiteren Berechnungsschritte nicht berücksichtigt.

Zur Normalisierung der Serum-Signale wurden diese durch die jeweiligen TexasRed-Signale (RGS-His-Assay) dividiert. So werden die Protein-Mengen der Spots berücksichtigt. Für jedes Patientenserum und Protein konnten so drei normalisierte Serum-Signale generiert werden (da jedes Serum auf drei Feldern untersucht wurde), von denen dann jeweils das arithmetische Mittel berechnet wurde. Für die Kontrollseren, die jeweils nur einmal auf den Microarrays untersucht wurden, wurde für jedes Protein der Median aller Kontrollserum-Signale ermittelt. Schließlich wurde dann für jedes Protein das entscheidende Testkriterium (TK) mittels Division der jeweiligen Patientenserum-Signale durch die für jedes Protein gemittelten Kontrollseren-Signale berechnet. Die beschriebenen Schritte der Datenverarbeitung

sind in Abb. 57 rechts kurz zusammengefasst. Tendenziell deutete also ein hoher Wert des TK auf Proteine hin, an die mehr Antikörper aus dem Patientenserum als Antikörper aus den Kontrollseren gebunden haben, aufgrund einer echten Zunahme der Antikörperkonzentration, bedingt durch die Krankheit.

In Abb. 58 sind die mittleren berechneten TKs von allen Seren für jedes Protein dargestellt. Schon hier können einige Proteine identifiziert werden, die im Mittel einen besonders hohen TK-Wert aufweisen und damit für eine erhöhte Antikörperkonzentration in den Patientenseren stehen. Viele Proteine weisen einen mittleren TK-Wert von unter eins auf. Hier sind im Mittel also weniger spezifische Antikörper in den Patientenseren enthalten als in den Kontrollseren.

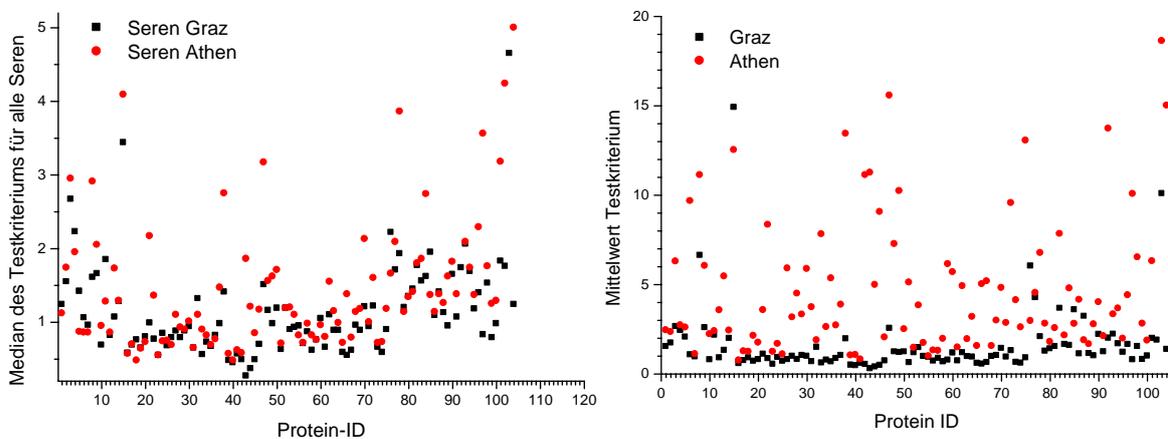


Abb. 58: graphischer Überblick über das mittlere Testkriterium (arithmetischer Mittelwert bzw. Median) der Seren aus Graz und Athen für jedes Protein.

Die mittleren TK-Werte erlauben jedoch noch keine Aussage darüber, bei wie vielen Seren hohe TK-Werte erzielt wurden. Um die Häufigkeit der Patienten-Seren, die erhöhte Antikörperkonzentrationen gegen ein Protein aufweisen, mit in die Gesamt-Bewertung einfließen zu lassen, wurde ein geeigneter Grenzwert des Testkriteriums fest gelegt, der definierte, ab wann ein Protein als „von einem Serum erkannt“ galt. Ein Grenzwert von sieben wurde gewählt, um sicher nur signifikante Seren zu erfassen. Da für dieses Screening die Seren aus Graz in einer niedrigerer Konzentration eingesetzt wurden (1:500), als die Athen- und die Kontroll-Seren (1:100), musste der Grenzwert für die Graz-Seren angepasst werden. Hier wurde daher ein erniedrigter Wert von 1,5 festgelegt. Wie auch in Abb. 58 ersichtlich, liegen die mittleren Kriteriumswerte für die Athen-Seren meist über denen für die Graz-Seren, was die Notwendigkeit einer Anpassung unterstreicht.

In Abb. 59 ist die Anzahl der Seren aufgeführt, bei denen das Testkriterium für das jeweilige Protein größer als 1,5 (Graz) bzw. größer 7 (Athen) war. Bei den Graz-Seren wurden insgesamt 62 Proteine erkannt, davon 20 in mehr als zehn Patientenseren. Die TK-Werte aller Seren für alle erkannten Proteine sind in Anhang D aufgeführt. Die Proteine NMB0040, NMB0049, NMB0341, NMB0700 und NMB2032B sind besonders hervorzuheben, da sie hier von 17 und mehr Seren erkannt wurden. Bei den 56 Seren aus Athen wurden mit einer Zahl von 99 deutlich mehr Seren erkannt. Deren Bedeutung muss jedoch noch diskutiert werden (siehe 5.4.4). Hervorzuheben sind hier die Proteine NMB0312, NMB0700, NMB0786, NMB0961, NMB1836 und NMB2032A die in 18 und mehr Seren erkannt wurden.

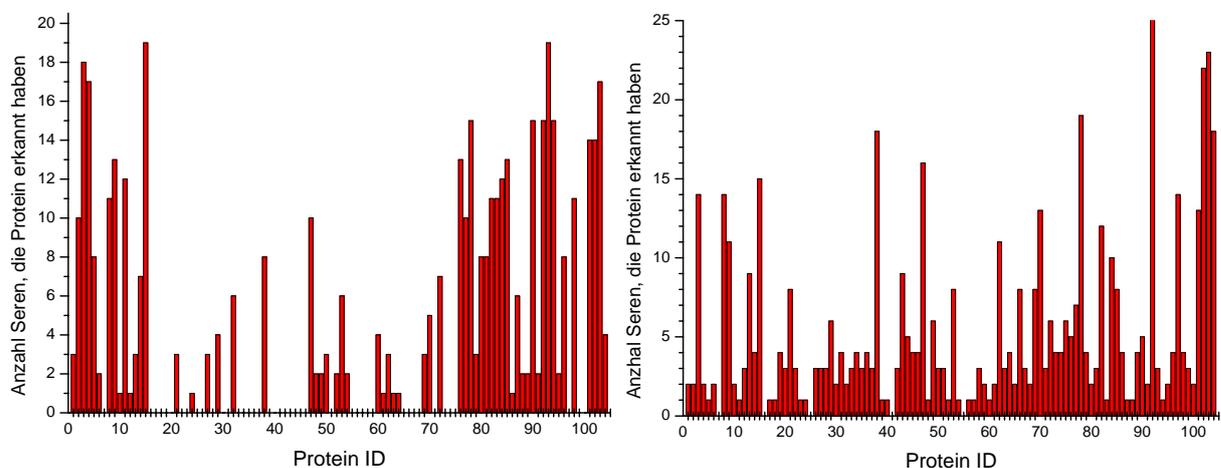


Abb. 59: Überblick über das Ergebnis von Screening 1. Dargestellt sind die Anzahl der Patientenseren, die ein Neisseria-Protein auf den Microarrays erkannt haben. Links: Graz-Seren, Grenzwert: Testkriterium >1,5. Rechts: Athen-Seren, Grenzwert: Testkriterium >7.

5.4.3 Screening 2

Für das zweite Screening unter anderen Bedingungen wurden auf 15 Microarrays insgesamt 32 Patienten und 32 Kontrollseren in einer 1:100 Verdünnung untersucht. Für alle Seren wurde dabei eine Dreifachbestimmung vorgenommen. Bei den Patientenseren handelt es sich um die 20 Seren aus Manchester und um 12 der schon in Screening 1 untersuchten Athen-Seren. Für die Kontrollseren wurden die 20 Seren aus Screening eins und 12 weitere Seren gewählt. Es wurde ein leicht abgewandeltes 11x11 Pattern verwendet (Abb. 60). Als zusätzliche Kontrollen wurden noch anti-RGS-His-Antikörper und humane IgG-Antikörper gespottet. Außerdem wurde die Proteinkonzentrationen angepasst: Proteinen, die im ersten

Screening oft heterogene Spots verursachten, wurden stärker verdünnt und Proteine, die im ersten Screening nur schwache (RGS-His)-Signale lieferten, wurden schwächer verdünnt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0032b 386 10 ⁵	01gG 5*10 ⁵	01gG 5*10 ⁵	01gG 10 ⁷	01gG 10 ⁷	01gG 10 ⁷	01gG 10 ⁷	01gG 10 ⁷	01gG 10 ⁷	IgAP 1:10	01gG 5*10 ⁵
2	1 0032 1:4	2 0039 1:0.5	3 0040 1:4	4 0040 1:4	5 0053 1:4	6 0065 1:4	7 0067 1:8	8 0127 1:4	9 0182 1:8	10 0193 1:8	11 0218 1:4
3	12 0270 1:4	13 0300 1:4	14 0312 1:4	15 0341 1:2	16 0368 1:4	17 0377 1:4	18 0385 1:4	19 0415 1:4	20 0432 1:8	21 0442 1:2	22 0450:2
4	23 0471 1:4	24 0486 1:8	25 0488 1:4	26 0593 1:4	27 0623 1:2	28 0726 1:2	29 0741 1:8	30 0785 1:4	31 0831a 1:8	32 0831b 1:4	33 0846 1:4
5	34 0872 1:4	35 0884 1:8	36 0926 1:4	37 0955 1:2	38 0961 1:2	39 0970 1:4	40 0983 1:8	41 1001 1:4	42 1030 1:4	43 1053 1:2	44 1080 1:4
6	45 1094 1:4	46 1140 1:2	47 1200 1:0.5	48 1223 1:2	49 1255 1:2	50 1261a 1:2	51 1261b 1:4	52 1265 1:4	53 1275a 1:2	54 1275b 1:4	55 1277 1:8
7	56 1350 1:8	57 1375 1:2	58 1377 1:4	59 1379 1:4	60 1420 1:4	61 1443 1:2	62 1465 1:2	63 1467 1:4	64 1489 1:4	65 1507 1:4	66 1540 1:2
8	67 1543 1:2	68 1626 1:4	69 1643 1:2	70 1636 1:0.5	71 1668 1:4	72 1734 1:4	73 1741 1:4	74 1760 1:2	75 1783b 1:2	76 1786 1:2	77 1824 1:2
9	78 1836 1:2	79 1846 1:4	80 1847 1:2	81 1877 1:4	82 1893 1:0.5	83 1900 1:2	84 1913 1:2	85 1929 1:4	86 1931 1:4	87 1969 1:2	88 1985 1:4
10	89 1998 1:4	90 1994 1:4	91 1999 1:8	92 2032a 1:2	93 2032b 1:8	94 2093 1:8	95 2104 1:8	96 2104 1:0.5	97 0033 1:2	98 0051 1:8	99 0052 1:4
11	IgAP 1:5	100 0088 1:4	101 0293 1:4	102 0312 1:2	103 0700 1:4	104 0768 1:2	105 Lysostatin 1:2	Leerre Vektor 1:2	Puffer 1:2	Puffer 1:4	01gG 5*10 ⁵

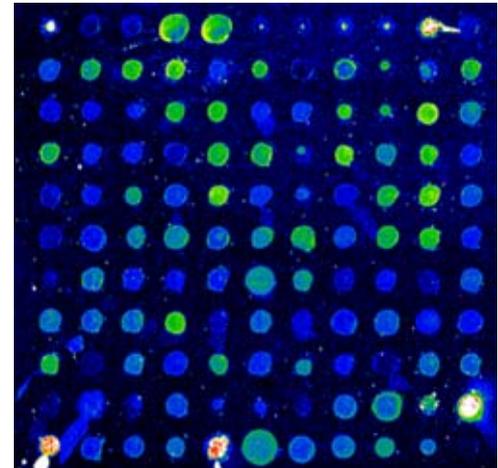


Abb. 60: Links: 11x11 Pattern, welches für das zweite Screening verwendet wurde. Abkürzungen siehe Abb. 55. Rechts: Beispiel eines Serum-Antikörper-Nachweises mit dem Pattern des zweiten Screenings

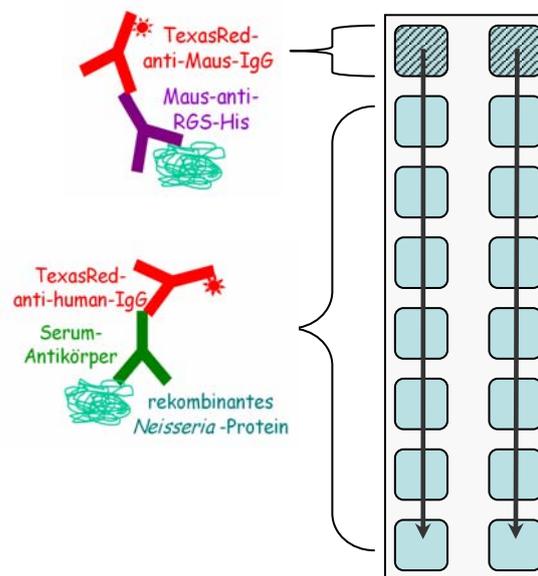


Abb. 61: Schematische Darstellung der Normalisierungsstrategie des zweiten Screenings. Die beiden Pfeile deuten an, dass die beiden oberen Felder jeweils zur Normalisierung der linken bzw. rechten sieben Felder verwendet wurden.

Der Nachweis der Serumantikörper und der anti-RGS-His-Antikörper wurde hier aus Gründen der leichten Signalüberlagerung der Fluorophore und Kreuzreaktivitäten (siehe 5.3.4). getrennt durchgeführt. Je zwei Felder pro Microarray wurden mit Maus-anti-RGS-His-Antikörpern und TexasRed-anti-Maus-IgG-Antikörpern inkubiert. Diese Signale wurden genutzt um die Serum-Signale der anderen 14 Felder zu normalisieren (Abb. 61). Während des Spottens der Proteine wurden zwei Nadeln verwendet, eine Nadel spottete alle Proteine der linken acht Felder und die andere Nadel alle Proteine der rechten acht Felder. Um die unterschiedlichen Spottingeigenschaften beider Nadeln zu berücksichtigen wurde das linke RGS-His-Feld zum Normalisieren der linken sieben Serum-Felder und das rechte RGS-His-Feld zur Normalisierung der rechten sieben Serum-Felder verwendet. Trotz der getrennten Detektionsstrategie konnten damit also immer noch 14 Seren pro Microarray (statt 16 bei Screening 1) gleichzeitig untersucht werden. Da verschiedene Fluorophore bei diesem Ansatz nicht benötigt werden, wurden in beiden Fällen TexasRed-konjugierte Antikörper eingesetzt. Für die Datenauswertung wurde also immer eine Bilddatei pro Microarray generiert. Die Erzeugung der Signaldaten und die einzelnen Datenverarbeitungsschritte wurden grundsätzlich wie beim ersten Screening durchgeführt. Bei der Berechnung des Hintergrundsignals eines gesamten Feldes für die Hintergrundsubtraktion wurde hier jedoch der Median aller lokalen Hintergrundsignale statt des arithmetischen Mittelwerts verwendet, da der Median einzelne Ausreißer der lokalen Hintergrundsignale besser toleriert (Kambhampati, 2004). Zur Normalisierung wurden alle Spotsignale durch die Werte aus dem jeweiligen RGS-His-Feld dividiert. Die weiteren Schritte zur Berechnung des Testkriteriums sind mit denen der ersten Screenings identisch.

Die mittleren Werte der Testkriterien lagen in der Größenordnung des ersten Screening der Athen-Seren (Abb. 62 links). Ein Grenzwert von sieben führte jedoch bei diesem zu Screening zu zu vielen positiv Seren, weshalb hier ein Wert von 10 festgelegt wurde. Die meisten Proteine wurden damit von wenigstens einem oder zwei Seren erkannt, aber einige wenige Proteine (NMB0182, NMB0368, NMB0486 und NMB0700) wurden hier von mehr als 8 Seren erkannt und sind damit hervorzuheben (Abb. 62 rechts).

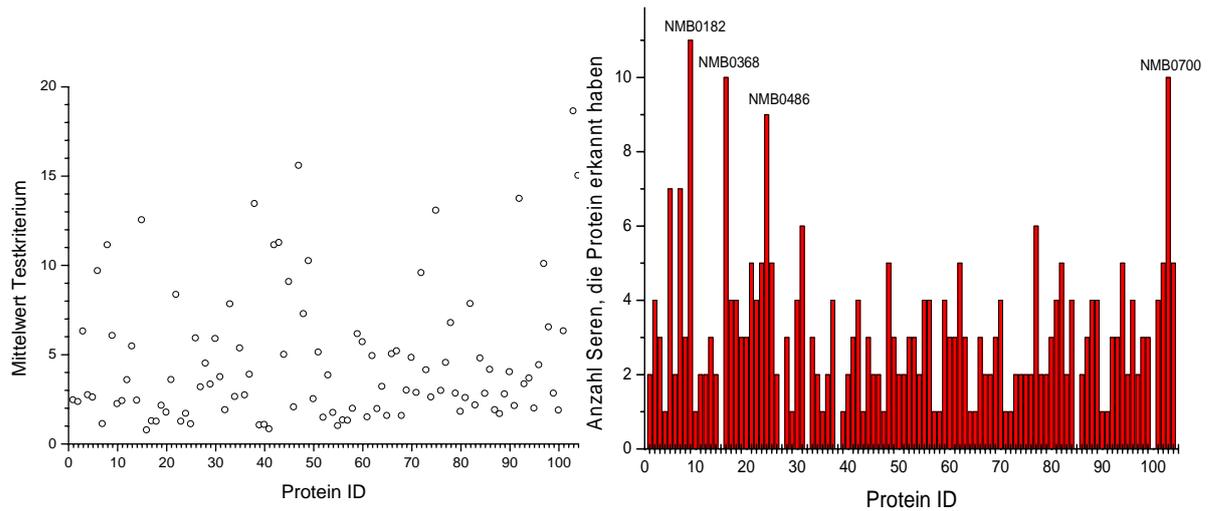


Abb. 62: **Links:** graphischer Überblick über das mittlere Testkriterium (arithmetischer Mittelwert) der Seren des zweiten Screenings für jedes Protein. **Rechts:** Dargestellt sind die Anzahl der Patientenserum, die ein Neisseria-Protein auf den Microarrays erkannt haben. Grenzwert: Testkriterium >10.

5.4.4 Zusammenfassende Darstellung der Screeningergebnisse und deren Bedeutung

Die Anzahl der erkannten Proteine schwankte sehr zwischen den einzelnen Screenings. Dort wo mehr Seren untersucht wurden, wurden auch mehr Proteine erkannt. Die meisten jedoch nur von einem oder zwei Seren. Die Wahrscheinlichkeit der einzelnen Proteine von einem Serum erkannt zu werden steigt natürlich mit der Anzahl an untersuchten Seren. Proteinen, die nur von sehr wenigen Seren erkannt wurden, wurden daher eher keine große Bedeutung beigemessen. Dass es kaum ein Protein gibt, welches von allen Seren erkannt wurde, ist ebenfalls nachvollziehbar, da die hier zum größten Teil untersuchten phasenvariablen Gene eben nicht immer „angeschaltet“ sind. Auch stellte die Festlegung eines Grenzwertes für das Testkriterium immer einen Kompromiss dar. Ein sehr hoher Grenzwert, führt zwar dazu, dass insgesamt weniger Proteine erkannt werden, jedoch die erkannten Proteine sich untereinander nicht mehr so stark hinsichtlich der Anzahl an Seren, die dieses Protein erkannten, unterschieden. Wählte man einen zu geringen Grenzwert, wurden zu viele falsch positive Seren registriert. Es wurde daher versucht einen Mittelweg zu finden. Anhaltspunkte für den Grenzwert lieferten die Mittelwerte und die Median-Werte der berechneten Testkriterien. Um die Ergebnisse der verschiedenen Screenings besser vergleichen zu können, wurde die Proteine nicht nur hinsichtlich der mittleren Testkriteriumswerte für alle Seren beurteilt, sondern auch die Häufigkeit der erkennenden Seren mit in die Bewertung einbezogen. Für jedes der drei Kriterien (Anzahl (a), Mittelwert

(b) und Median (c)) wurden die jeweils fünf höchstplatzierten Proteine selektiert. Alle so identifizierten Protein sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Es fällt auf, dass außer dem Protein, welches vom Gen NMB0700 kodiert wird, keines der Highlights aus dem ersten Screening auch unter den Highlights des zweiten Screenings zu finden ist. Sicherlich spielen dabei die unterschiedlichen Versuchsbedingungen wie die jeweilige Normalisierungsstrategie oder die Anzahl der untersuchten Kontrollseren eine Rolle.

Man muss hier daher klar herausstellen, dass es sich bei den durchgeführten Screenings nur um Vorscreenings handelte. Für eine größere Aussagekraft muss das Screening für alle Seren unter identischen Bedingungen wiederholt werden, also mit der gleichen Normalisierungsstrategie, mit gleichen Serumkonzentrationen und identischen Kontrollseren. Nur so können endgültige Aussagen getroffen werden.

In Tabelle 9 sind zusammenfassend die Proteine aufgelistet, die in Tabelle 8. am häufigsten zu finden waren, die sich also auch unter Berücksichtigung verschiedener Kriterien mehr als einmal unter den fünf höchstplatzierten Proteinen befanden.

Tabelle 8: Überblick über herausragende Proteine der beiden Screenings. Für jedes Screening sind dabei jeweils die fünf höchstplatzierten Proteine aufgelistet, die von den meisten Seren erkannt wurden (a) oder den höchsten Mittelwert (b) bzw. Median-Wert (c) für das Testkriterium (TK) aufwiesen. * Für das erste Screening wurden die Grazeren 1:500 und die Athen-Seren 1:100 verdünnt.

Screening	Name (NMB)	Anzahl Seren TK>Grenzwert	Mittelwert Testkriterium	Median Testkriterium	
1 Graz*	0341	19	14,90	3,44	
	2032 B	19	2,22	2,06	
	a	0040	18	2,65	2,67
	0049	17	2,43	2,23	
	0700	17	10,08	4,65	
b	0341	19	14,90	3,44	
	0700	17	10,08	4,65	
	0127	11	6,63	1,61	
	1786	13	6,03	2,22	
	1824	10	4,26	1,71	
c	0700	17	10,08	4,65	
	0341	19	14,90	3,44	
	0040	18	2,65	2,67	
	0049	17	2,43	2,23	
	1786	13	6,03	2,22	

1 Athen*	2032 A	25	13,72	6,29	
	0700	23	18,62	5,27	
	a	0312	22	58,78	4,24
	1836	19	6,76	3,86	
	0961	18	13,43	2,75	

		0312	22	58,78	4,24
		0700	23	18,62	5,27
	b	1200	16	15,57	3,17
		0786	18	15,01	5,00
		2032 A	25	13,72	6,29

		2032 A	25	13,72	6,29
		0700	23	18,62	5,27
	c	0786	18	15,01	5,00
	0312	22	58,78	4,24	
	0341	15	12,52	4,09	
<hr/>					
2	0182	11	26,11	3,33	
	0368	10	10,20	3,71	
	a	0700	10	7,20	2,00
	0486	9	8,47	4,29	
	0053	7	8,75	2,56	

		0067	7	32,22	1,52
		0182	11	26,11	3,33
	b	2093	5	15,96	3,67
		0368	10	10,20	3,71
		1877	4	9,31	2,22

		0486	9	8,47	4,29
		0368	10	10,20	3,71
	c	2093	5	15,96	3,67
	0456	4	5,39	3,39	
	0182	11	26,11	3,33	

Tabelle 9: Überblick über die am häufigsten auftretenden Proteine aus Tabelle 8. mit ihrer möglichen Funktion nach der Datenbank TIGR, ihrer prognostizierten Wahrscheinlichkeit, dass es sich um PVGs handelt („nein“ gar nicht mit PVGs assoziiert) und mit mögliche Homologien zu Genen aus *N. meningitidis* Serogruppe A oder *N. gonorrhoe*. Die Bedeutung der Symbole bzw. Abkürzungen sind Tabelle 2 aus 5.1. zu entnehmen.

<i>NMB</i>	<i>Anzahl in Top 5</i>	<i>Mögliche Funktion nach TIGR</i>	<i>PVG</i>	<i>Homologien</i>
0700	7	IgA-spezifische Serin-Endopeptidase (iga)	nein	(A)/(G)
0341	4	tspA Protein	+++	A/G
0182	3	äußeres Membranprotein (omp85)	+	A/G
0312	3	Virulenz assoziiertes Protein (vapA), auth. Frameshift	+++	A/G
0368	3	hypothetisches Protein	+++	(A)/(G)
2032 A	3	Lipopolysaccharid-Glycosyltransferase (lgtG), auth. Frameshift	B	G
0040	2	Hydrolase	+++	A/G
0049	2	Pilus-Protein, (pilC2), auth. Frameshift	B	A/G
0486	2	konserviertes hypothetisches Protein	+++	A/G
0786	2	Protein für zuckendes Bewegungsvermögen (pilT-2)	nein	(A)/(G)
1786	2	hypothetisches Protein	+	A/(G)
2093	2	Methionin-Aminopeptidase (map)	+++	A/G
0053	1	konserviertes hypothetisches Protein	-	G
0067	1	Sialinsäure-Kapsel-Biosyntheseprotein SiaD	B	-
0127	1	50S ribosomales Protein L11 (rplK)	-	(A)/G
0456	1	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase	-	A/(G)
0961	1	FunZ Protein (funZ)	+++	-
1200	1	Ribonuclease II Protein	-	A/(G)
1824	1	konserviertes hypothetisches Protein	-	(A)/G
1836	1	putatives Lipopolysaccharid-Biosynthese-Protein WbpC	+++	A/G
1877	1	Protein der Prolyl-Oligopeptidasen-Familie	-	A/(G)
2032 B	1	Lipopolysaccharid-Glycosyltransferase (lgtG), auth. Frameshift	B	G

Es fällt auf, dass fast alle als herausragend identifizierten Proteine aus Tabelle 9 mit der Zelloberfläche des Meningokokkus assoziiert sind oder Sekretionsproteine darstellen. Dies kann man auch leicht nachvollziehen, denn hauptsächlich solche Proteine sind für die humanen Antikörper der Patienten überhaupt zugänglich und können eine Immunantwort auslösen.

In allen Screenings sticht die IgA-Protease (NMB0700) heraus. Sie wird im ersten Screening von 40 Seren (52 %) und im zweiten Screening von 10 Patientenserum (31 %) erkannt. Dieses Protein ist nicht dem Mechanismus der Phasenvariabilität unterworfen. Wahrscheinlich handelt es sich um ein essentielles Protein der pathogenen Meningokokkus. In

anderen Studien wurden bereits viele Hinweise gefunden, dass es sich bei der IgA-Protease um einen wichtigen Virulenzfaktor handelt. So wurde eine erhöhte IgA-Proteasen-Aktivität in allen pathogenen Stämmen im Vergleich zu Stämmen, die nur als Kommenal in Erscheinung treten, gefunden (Vitovski *et al.*, 1999). Auch die Abwesenheit dieses Gens im nicht pathogenen Bakterium *N. lactamica* deutet auf die wichtige Bedeutung für pathogene Stämme hin (Jose *et al.*, 2003). Die von *N. meningitidis* sekretierte IgA-Protease spaltet nicht nur humane IgA-Antikörper, sondern hat anscheinend noch andere Targets, wie lysosomale Marker, Hormone und Rezeptoren. Die Spaltung dieser Targets tragen anscheinend wesentlich zum intrazellulären Überleben des Erregers in den Epithelzellen bei (van Ulsen & Tommassen, 2006). Die in dieser Arbeit identifizierten Antikörper gegen die rekombinante IgA-Protease, liefert einen Indiz dafür, dass dieses Protein während einer Meningokokkeninfektion exprimiert wird, welches seine Bedeutung für den pathogenen Erreger unterstreicht. Daher wäre dieses Protein als Bestandteil eines Impfstoffes gut geeignet. Antikörper, die die Funktion der IgA-Protease blockieren könnten so die Virulenz des Erregers einschränken. Gegenüber den bisher eingesetzten Impfstoffkandidaten, die oft phasenvariabel exprimiert werden und damit die Expression auch wieder abgeschaltet werden können, bietet die IgA-Protease Vorteile. Bisher wurden noch keine Studien zur Eignung dieses Protein als Impfstoffbestandteil durchgeführt. Doch gerade für Infektionen mit der Serogruppe B, bei denen bisher noch kein Impfstoff gefunden wurde, wäre die IgA-Protease eine Alternative. Der Einsatz von Auch als diagnostischer Marker wäre dieses Protein geeignet.

Das phasenvariabel exprimierte Protein TspA (NMB0341) wurde während des ersten Screenings von 34 Seren erkannt und wird demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit während der Infektion exprimiert. Es handelt sich dabei um ein bedeutendes *Neisseria* spezifisches T- und B-Zell-stimulierendes Antigen und wurde auch schon als potentieller Impfstoffkandidat identifiziert (Kizil *et al.*, 1999). In der Literatur finden sich ebenfalls Hinweise auf die Funktion des Proteins. Es könnte sich um eine Glyoxalase handeln, die an Detoxifikationsprozessen beteiligt ist. Toxine wie Methylglyoxal werden damit in harmlosere Stoffe umgewandelt (Kizil *et al.*, 2000). Der Nachweis der gehäuften Expression dieses Proteins in dieser Arbeit bestätigt, dass sich das phasenvariable Gen während der pathogenen Phase oft im der „angeschalteten“ Zustand befindet. Die Detoxifikation mit Hilfe des TspA Proteins könnte dem Erreger also Vorteile verschaffen. Als Bestandteil eines Impfstoffes würde dieses Protein ebenfalls in Frage kommen. Auch wenn es phasenvariabel exprimiert

wird, stellt es wahrscheinlich auch gleichzeitig einen Pathogenitätsfaktor dar und Antikörper gegen das Enzym würden evtl. zur Bekämpfung des Erregers beitragen können.

Das äußere Membranprotein Omp85 (NMB0182) wurde sowohl im ersten als auch im zweiten Screening von jeweils 11 Seren erkannt. Auch konnten hier besonders hohe Testkriteriumswerte bei den Patientenseren ermittelt werden, was die Signifikanz der Erhöhung der Antikörperkonzentration gegenüber den Kontrollseren unterstreicht. Omp85 spielt eine wesentliche Rolle bei der Biogenese der äußeren Meningokokkus-Membran (Genevrois et al., 2003; Voulhoux et al., 2003). Andere Untersuchungen zeigten, dass das Gen *omp85* nicht der Phasenvarianz unterliegt (Martin et al., 2003). Dies stärkt die Vermutung, dass es sich um ein essentielles Protein handelt. Daher wäre dieses Protein ebenfalls ein geeigneter Impfstoffkandidat. Die prinzipielle Eignung wurde auch schon in einer anderen Arbeit bestätigt (Steller et al., 2005). Mit dieser Arbeit ebenfalls experimentell gezeigt werden, dass weitere Versuche, Omp85 als Impfstoffsbestandteil einzusetzen, sinnvoll wären.

Ein weiteres hoch platziertes Protein aus Tabelle 9 ist das virulenz-assoziierte Protein VapA (NMB0312), welches auch unter dem Namen AutA bekannt ist (van Ulsen & Tommassen, 2006). Es handelt sich dabei um einen sekretierten Autotransporter, dessen Gen im Stamm MC58 jedoch degeneriert vorliegt. Aufgrund eines vorzeitigen Stoppcodons kann kein funktionsfähiges Protein gebildet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten aber darauf hin, dass das verkürzte Protein dennoch exprimiert wird oder die Patienten mit Stämmen infiziert waren, die das Protein in vollständiger Länge exprimierten. Auch in anderen Studien konnten schon Antikörper gegen dieses Protein in Patientenseren nachgewiesen werden (Ait-Tahar et al., 2000). Die Funktion des Proteins konnte bisher nicht geklärt werden (van Ulsen & Tommassen, 2006). Eine Begründung, dafür, warum das Protein in der Datenbank TIGR dennoch als virulenz-assoziiert annotiert ist, könnte die Tatsache sein, dass Teile des Proteins zu dem Adhesin AIDA I aus *E. coli* homolog sind. Die in dieser Arbeit gefundene gehäufte Expression dieses Gens während der Infektion würde für eine Rolle bei Anlagerung an Wirtszellen sprechen, da damit das Anschalten dieses Gens einen Vorteil für den Erreger bringt.

Die Identifizierung des Proteins des PVGs NMB2032, ist interessant, da dieses Protein nur in Meningokokken der Serogruppe B zu finden ist. Im Stamm MC58 besitzt dieses Protein einen authentischen Frameshift mit einem vorzeitigen Stoppcodon, weshalb in dieser Arbeit zwei Teile des Proteins untersucht wurden. Sowohl der Teil A also auch der Teil B wurden gehäuft von Patientenseren erkannt (A: 25 Mal, B 19 Mal). In seiner funktionsfähigen

Form stellt dieses Protein eine Lipopolysaccharid-Glycosyltransferase dar und ist an der Bildung der Lipopolysachharide (LPS, oder auch Lipooligosaccharide-LOS) der äußeren Zellmembran beteiligt. LPS wirken als Endotoxine. Damit kann NMB2032 auch eine Rolle bei der Pathogenität des Erregers zugeordnet werden. Für den möglichen Einsatz als diagnostischer Marker für die Serogruppe B sind aber noch weitere Versuche notwendig, die die Eignung belegen.

In dieser Arbeit wurden auch hypothetische Proteine erkannt (z.B. NMB0053, NMB0368, NMB0486, NMB1824), deren Funktion bisher unbekannt ist. Es konnten damit erste Hinweise gefunden werden, dass diese Proteine expremiert, also die entsprechenden phasenvariablen Gene während der Infektion „angeschaltet“ waren.

Unter den weiteren erkannten Proteinen befinden sich ebenfalls verstärkt oberflächenassoziierte Proteine, wie Pilus-, LPS- und Kapsel-Proteine. Insgesamt konnten so sehr viele Proteine die mit den in Abb 63 dargestellten Bestandteilen der Zelloberfläche in Verbindung gebracht wurden, identifiziert werden. Dies macht deutlich, wie wichtig die nähere Untersuchung dieser Komponenten für das Verständnis der pathogenen Mechanismen von *N. meningitidis* ist.

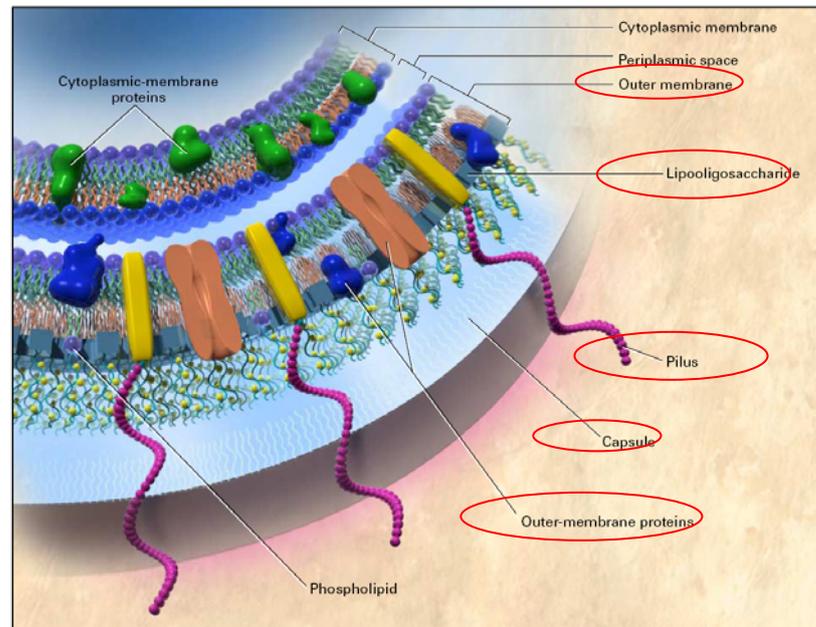


Abb. 63: Schematische Darstellung oberflächenassoziierter Proteine und weiterer Bestandteile der Zelloberfläche die mit den identifizierten Proteinen dieser Arbeit im Zusammenhang stehen (rot umrandet) (Rosenstein *et al.*, 2001)

In einer Arbeit, in der ebenfalls die Expression von PVGs mit PMAs untersucht wurden, konnte nur die Expression eines Proteins sicher nachgewiesen werden. Dieses Opa-Protein

NMB0442 wurde auch in dieser Arbeit von insgesamt 16 Seren erkannt. Dass jedoch in der Studie dieser Arbeit andere Proteine mit einer höheren Signifikanz identifiziert wurden, kann auf den Umstand zurück geführt werden, dass hier wesentlich mehr Patientenseren (96 statt 20) untersucht wurden sowie eine Normalisierungsstrategie angewendet wurde, die quantitative Unterschiede der Proteine auf dem Microarray berücksichtigt.

An dieser Stelle muss auch erwähnt werden, dass mit dem in dieser Arbeit gewählten Ansatz des indirekten Nachweises der *Neisseria*-Proteine über Antikörper aus Patientenseren nur solche exprimierten Proteine erfasst werden können, die auch eine immunogene Wirkung haben, gegen die also Antikörper gebildet werden. Außerdem können Antikörper, die konformative Epitope der Proteine erkennen aufgrund der denaturierenden Aufreinigungsstrategie dieser Arbeit nicht detektiert werden.

Einige Proteine wurden evtl. auch nicht erkannt, weil die Kontrollseren möglicherweise ebenfalls Antikörper gegen diese Proteine enthielten. Dies ist nicht unwahrscheinlich, da wie eingangs erwähnt 20 % der Bevölkerung Träger des Erregers sind. Auch bei potentiell pathogenen Proteinen kann man argumentieren, dass die Menschen, von denen die Kontrollseren stammten, gerade deshalb nicht erkrankt sind, weil sie genügend Antikörper besitzen, um sich vor einer Infektion zu schützen. Umgekehrt kann nicht ausgeschlossen, dass mögliche kreuzreaktiver Antikörper der Patientenseren zu falsch positiv erkannten Proteinen führten. Dazu wäre eine direkte Expressionsanalyse von pathogenen *Neisseria*-Stämmen nötig, für die aber bisher nur Ansätze auf mRNA-Ebene existieren. Hierbei ist jedoch eine Kultur der Bakterien *in vitro* nötig, bei denen naturgetreue Bedingungen wie während des Überganges von der apathogenen zur pathogenen Phase im Menschen nur unzureichend nachgeahmt werden können.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, stellt die Protein-Microarray-Technologie dennoch ein sehr geeignetes Werkzeug dar, mit der eine Vielzahl von interessanten Fragestellungen analysiert werden können. Um jedoch endgültige Aussagen unter Verwendung aller zur Verfügung stehenden Seren treffen zu können ist eine Wiederholung des Screenings unter einheitlichen Bedingungen unumgänglich. Die hier gezeigten Screeningergebnisse können nur einen Zwischenstand darstellen und müssen noch validiert werden. Die Voraussetzung für ein abschließendes Screening unter optimierten Bedingungen konnten in dieser Arbeit geschaffen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Der Erreger *N. meningitidis* (auch Meningokokkus genannt) ist der Hauptverursacher der bakteriellen Meningitis (Hirnhautentzündung) und weltweit für Epidemien mit vielen Todesopfern verantwortlich. Welche Faktoren zum Überleben als harmloses Kommensal des Nasen- und Rachenraums in 20% der menschlichen Bevölkerung sowie für die plötzliche Auftreten als aggressives Pathogen beitragen, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Man vermutet, dass die genomische Diversität des Meningokokkus dabei eine Rolle spielt, da so ein immer wieder neues Reservoir an Proeinen bereit gestellt werden kann, die dem Erreger helfen, das menschliche Immunsystem zu umgehen, sich wechselnden Umweltbedingungen anzupassen und schließlich auch die Epithelzellbarriere und die Blut-Hirn-Schranke des Menschen zu überwinden. Ein wichtiger Mechanismus der zu dieser Vielfältigkeit beiträgt, ist der Mechanismus der Phasenvariation, bei dem durch die unterschiedliche Anzahl repetitiver Elemente Gene an- und abgeschaltet werden können. Unter allen bisher sequenzierten Organismen weist *N. meningitidis* die größte Anzahl an Genen auf, die durch diesen Mechanismus gesteuert werden. Daher stand die Analyse jener Gene auch im Vordergrund dieser Arbeit. Mit der Hilfe von Protein Microarrays sollte untersucht werden, welche phasenvariablen Gene während der pathogenen Phase des Erregers exprimiert werden. Neben den phasenvariablen Genen wurden noch einige andere Gene ausgewählt, die möglicherweise für die Pathogenität des Erregers von Bedeutung sind.

Alle ausgewählten Gene wurden zunächst rekombinant in *E. coli* exprimiert, die erhaltenden Proteine unter denaturierenden Bedingungen mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend Menge, Reinheit und Größe der Proteine mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Zur Identifizierung proteinexprimierender Klone wurde ein Kolonie-Blot durchgeführt. Es wurden verschiedene Aufreinigungsstrategien angewendet. Insgesamt konnten für 103 der 111 ausgewählten ausgewählten Gene, die entsprechenden Proteine erfolgreich aufgereinigt werden. Davon sind 92 Gene mit dem Mechanismus der Phasenvarianz assoziiert.

Der Expressionsnachweis dieser Proteine erfolgte indirekt über die in Meningitis-Patientenseren enthaltene Antikörper, die über einen zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörper detektiert werden. Um parallel eine große Anzahl an Proteinen mit Patientenseren zu screenen wurde die Protein Microarray Technologie angewendet. In Vorversuchen wurden zunächst die experimentellen Rahmenbedingungen für den Versuchsablauf angepasst bzw. optimiert. Dazu gehörten eine geeignete Lösung für die Blockierung der Microarray-

Oberfläche und eine optimale Temperatur für die Antikörperinkubationen. Des Weiteren wurden verschiedenen Microarray-Oberflächen untersucht, wobei mit einer Epoxy-Beschichtung die besten Ergebnisse hinsichtlich Signal/Hintergrund-Verhältnis und Spothomogenität erzielt wurden. Für die Berücksichtigung quantitativer Unterschiede der auf die Microarray-Oberfläche gespotteten Proteine wurde eine passende Normalisierungsstrategie entwickelt, bei die Proteine parallel zum Nachweis der Serumantikörper über einen weiteren fluoreszenzmarkierte Antikörper nachgewiesen wurden. Um mit einem Microarray verschiedene Seren gleichzeitig nach Antikörpern screenen zu können, wurde eine Multiplexing-Strategie gewählt, die den Microarray in 16 Felder aufteilt. In jedem der Felder wurden alle rekombinant exprimierten Proteine in einem 11x11 Pattern gespottet.

Für das Antikörperscreening wurden 96 Patientenseren und 32 Kontrollseren in zwei Versuchsreihen untersucht. Nach anschließender Datenverarbeitung der erhaltenen Signal-Daten, wurde für jedes der 104 Proteine ein Testkriterium berechnet. So konnte die Anwesenheit von Antikörpern gegen *Neisseria*-Proteine in den Patientenseren nachgewiesen werden. Anhand eines festgelegten Grenzwerts für das Testkriterium konnten damit Proteine identifiziert werden, die von den Patientenseren signifikant erkannt wurden. Es konnten so einige Proteine gefunden werden, die von auffällig vielen Patientenseren erkannt wurden, d.h. bei denen in den Patientenseren signifikant mehr spezifische Antikörper gegen diese Proteine vorhanden waren als in den Kontrollseren. Diese Proteine standen also für Gene, die während der pathogene Phase des Erregers in größerer Menge exprimiert wurden. Hervorzuheben ist dabei das Protein NMB0700, welches im ersten Screening von 40 und im zweiten Screening von 10 Seren erkannt wurde. Bei diesem nicht phasenvariablen Gen handelt es sich um eine IgA-Protease (NMB0700), der auch in der Literatur eine Rolle für das Überleben des Erregers in den Epithelzellen zugeschrieben wird. Dieses Protein wäre als Bestandteil eines Impfstoffes oder als diagnostischer Marker ein geeigneter Kandidat. Weiterhin wurden gehäuft auch oberflächenassoziierte oder sekretierte Proteine erkannt, wie z.B. das Protein Omp85 (NMB0182), welches schon in einer anderen Studie als geeigneter Impfstoffkandidat identifiziert wurde. Die starke Immunogenität konnte hier also erneut experimentell belegt werden. Auch die Virulenz des VapA- und TspA-Proteins konnte bestätigt werden. Es konnten aber auch Proteine identifiziert werden, die bisher noch nicht mit der Pathogenität von *N. meningitidis* in Zusammenhang gebracht wurden. Dazu gehören z.B. mehrere hypothetische durch phasenvariable Gene gesteuerte Proteine, dessen Funktionen unbekannt

sind. Erste Hinweise für Ihre Bedeutung für den Erreger während der pathogenen Phase konnten damit gefunden werden.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Protein Microarray Technologie zusammen mit einer adaptierten Multiplexingstrategie für Analysen mit großem Umfang, wie in dieser Arbeit, geeignet ist und die Identifizierung von Proteinen mit möglicher Beteiligung an pathogenen Mechanismen des Meningitis-Erregers *N. meningitidis* ermöglichte. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Schaffung optimaler Bedingungen für das Serumscreening lag, konnten noch nicht alle Seren unter einheitlichen Bedingungen untersucht werden. Für eine endgültige Aussage ist daher ein abschließendes Gesamt-Screening unumgänglich. Die nötigen Voraussetzungen dafür, konnten in dieser Arbeit geschaffen werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Ait-Tahar, K., Wooldridge, K. G., Turner, D. P., Atta, M., Todd, I. & Ala'Aldeen, D. A. (2000).** Auto transporter A protein of *Neisseria meningitidis*: a potent CD41T-cell and B-cell stimulating antigen detected by expression cloning. *Mol Microbiol* **37**, 1094-1105.
- Angenendt, P., Glokler, J., Murphy, D., Lehrach, H. & Cahill, D. J. (2002).** Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials. *Analytical Biochemistry* **309**, 253-260.
- Angenendt, P., Glokler, J., Konthur, Z., Lehrach, H. & Cahill, D. J. (2003a).** 3D protein microarrays: performing multiplex immunoassays on a single chip. *Anal Chem* **75**, 4368-4372.
- Angenendt, P., Glokler, J., Sobek, J., Lehrach, H. & Cahill, D. J. (2003b).** Next generation of protein microarray support materials: evaluation for protein and antibody microarray applications. *J Chromatogr A* **1009**, 97-104.
- Angenendt, P., Lehrach, H., Kreutzberger, J. & Glokler, J. (2005).** Subnanoliter enzymatic assays on microarrays. *Proteomics* **5**, 420-425.
- Angenendt, P., Kreutzberger, J., Glökler, J. & Hoheisel, J. D. (2006).** Generation of high-density protein microarrays by cell-free *in situ* expression of unpurified PCR products. *MCP in Press*.
- Békondi, C., Bernede, C., Passone, N., Minssart, P., Kamalo, C., Mbolidi, D. & Germani, Y. (2006).** Primary and opportunistic pathogens associated with meningitis in adults in Bangui, Central African Republic, in relation to human immunodeficiency virus serostatus. *International Journal of Infectious Diseases in press*.
- Biegel Carson, S. D., Stone, B., Beucher, M., Fu, J. & Sparling, P. F. (2000).** Phase variation of the gonococcal siderophore receptor FetA. *Mol Microbiol* **36**, 585-593.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P., Espevik, T. & Waage, A. (1992).** Molecular mechanisms in the compartmentalized inflammatory as meningococcal meningitis or septic shock. *Microb Pathog* **13**, 423-431.
- Bussow, K., Cahill, D., Nietfeld, W., Bancroft, D., Scherzinger, E., Lehrach, H. & Walter, G. (1998).** A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. *Nucleic Acids Research* **26**, 5007-5008.
- Caugant, D. A., Hoiby, E. A., Magnus, P., Scheel, O., Hoel, T., Bjune, G., Wedege, E., Eng, J. & Froholm, L. O. (1994).** Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J Clin Microbiol* **32**, 323-330.
- Caugant, D. A. (1998).** Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS* **106**, 505-525.
- Chen, I. & Dubnau, D. (2004).** DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Rev Microbiol* **2**, 241-249.
- Cretich, M., Damin, F., Pirri, G. & Chiari, M. (2006).** Protein and peptide arrays: Recent trends and new directions. *Bio Eng* **246**.
- Davidson, T. & Tonjum, T. (2006).** Meningococcal genome dynamics. *Nature Reviews Microbiology* **4**, 11-22.
- de Vries, F. P., van der Ende, A., van Putten, J. P. & Dankert, J. (1996).** Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. *Infect Immun* **64**, 2998-3006.

- DeRisi, J. L., Iyer, V. R. & Brown, P. O. (1997).** Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**, 680-686.
- Dietrich, G., Kurz, S., Hubner, C., Aepinus, C., Theiss, S., Guckenberger, M., Panzner, U., Weber, J. & Frosch, M. (2003).** Transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* during infection. *Journal of Bacteriology* **185**, 155-164.
- Dunbar, S. A., Eason, R. A., Musher, D. M. & Clarridge, J. E. (1998).** Microscopic examination and broth culture of cerebrospinal fluid in diagnosis of meningitis. *J Clin Microbiol* **36**, 1617-1620.
- Espina, V., Woodhouse, E. C., Wulfkuhle, J., Asmussen, H. D., Petricoin, E. F., 3rd & Liotta, L. A. (2004).** Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies. *J Immunol Methods* **290**, 121-133.
- Feavers, I. M. (2002).** ABC of meningococcal diversity. *Nature* **404**, 451-452.
- Feilner, T., Hultschig, C., Lee, J. & other authors (2005).** High-throughput identification of potential *Arabidopsis* MAP kinases substrates. *Mol Cell Proteomics* **11**, 11.
- Fields, S. & Song, O.-k. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fischer, M. & Perkins, B. A. (1997).** *Neisseria meningitidis* serogroup B: emergence of the ET-5 complex. *Semin Pediatr Infect Dis* **8**, 50-56.
- Flexner, S. (1913).** The results of serum treatment in thirteen hundred cases of epidemic meningitis. *J Exp Med* **17**, 553-576.
- Frasch, C. E., Zollinger, W. D. & Poolman, J. T. (1985).** Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis* **7**, 504-510.
- Galimand, M., Gerbaud, G., Guibourdenche, M., Riou, J. Y. & Courvalin, P. (1998).** High-level chloramphenicol resistance in *Neisseria meningitidis*. *N Engl J Med* **339**, 868-874.
- Gao, W. M., Kuick, R., Orzechowski, R. P. & other authors (2005).** Distinctive serum protein profiles involving abundant proteins in lung cancer patients based upon antibody microarray analysis. *BMC Cancer* **5**, 110.
- Ge, B. & Lisdat, F. (2002).** Superoxide sensor based on cytochrome c immobilized on mixed thiol SAM with a new calibration method. *Anal Chim Acta* **454**, 53-64.
- Genevrois, S., Steeghs, L., Roholl, P., Letesson, J. J. & van der Ley, P. (2003).** The Omp85 protein of *Neisseria meningitidis* is required for lipid export to the outer membrane. *Embo J* **22**, 1780-1789.
- Goldschneider, I., Gotschlich, E. C. & Artenstein, M. S. (1969).** Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* **129**, 1307-1326.
- Grifantini, R., Bartolini, E., Muzzi, A. & other authors (2002).** Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays. *Nature Biotechnology* **20**, 914-921.
- Griffiss, J. M., Yamasaki, R., Estabrook, M. & Kim, J. J. (1991).** Meningococcal molecular mimicry and the search for an ideal vaccine. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **85**, 32-36.
- Guillaume, B., Buneß, A., Schmidt, C. & other authors (2005).** Systematic comparison of surface coatings for protein microarrays. *Proteomics* **5**, 4705-4712.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. & Aebersold, R. (1999).** Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* **19**, 1720-1730.

- Hammerschmidt, S., Muller, A., Sillmann, H. & other authors (1996).** Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Molecular Microbiology* **20**, 1211-1220.
- Henderson, I. R., Owen, P. & Nataro, J. P. (1999).** Molecular switches \pm the ON and OFF of bacterial phase variation. *Molecular Microbiology* **33**, 919-932.
- Hood, D. W., Deadman, M. E., Jennings, M. P., Bisercic, M., Fleischmann, R. D., Venter, J. C. & Moxon, E. R. (1996).** DNA repeats identify novel virulence genes in *Haemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 11121-11125.
- Hueber, W., Kidd, B. A. & Tomooka, B. H. (2005).** Antigen Microarray Profiling of Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **52**, 2645-2655.
- Hultschig, C., Kreutzberger, J., Seitz, H., Konthur, Z., Bussow, K. & Lehrach, H. (2006).** Recent advances of protein microarrays. *Curr Opin Chem Biol* **10**, 4-10. Epub 2005 Dec 2002.
- Jahn-Schmid, B., Harwanegg, C., Hiller, R., Bohle, B., Ebner, C., Scheiner, O. & Muellerw, M. W. (2003).** Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy* **33**, 1443-1449.
- Jain, K. K. (2005).** Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clinica Chimica Acta*, 37-54.
- Jennings, M. P., Virji, M., Evans, D., Foster, V., Srikhanta, Y. N., Steeghs, L., van der Ley, P. & Moxon, E. R. (1998).** Identification of a novel gene involved in pilin glycosylation in *Neisseria meningitidis*. *Molecular Microbiology* **29**, 975-984.
- Jennings, M. P., Srikhanta, Y. N., Moxon, E. R., Kramer, M., Poolman, J. T., Kuipers, B. & van der Ley, P. (1999).** The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* **145**, 3013-3021.
- Jonsson, A. B., Nyberg, G. & Normark, S. (1991).** Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in *pilC*, a novel gene for pilus assembly. *EMBO J* **10**, 477-488.
- Jordens, J. Z. & Heckels, J. E. (2005).** A novel *porA*-based real-time PCR for detection of meningococcal carriage. *J Med Microbiol* **54**, 463-466.
- Jose, J., Otto, G. W. & Meyer, T. F. (2003).** The integration site of the *iga* gene in commensal *Neisseria* sp. *Mol Genet Genomics* **269**, 197-204.
- Jun, Y., Cha, T., Guo, A. & Zhu, X. Y. (2004).** Patterning protein molecules on poly(ethylene glycol) coated Si(1 1 1). *Biomaterials* **25**, 3503-3509.
- Kambhampati, D. (2004).** *Protein Microarray Technology*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kersten, B., Wanker, E. E., Hoheisel, J. D. & Angenendt, P. (2005).** Multiplex approaches in protein microarray technology. *Expert Rev Proteomics* **2**, 499-510.
- Kim, T. E., Park, S. W., Cho, N. Y., Choi, S. Y., Yong, T. S., Nahm, B. H., Lee, S. & Noh, G. (2002).** Quantitative measurement of serum allergen-specific IgE on protein chip. *Experimental & Molecular Medicine* **34**, 152-158.
- Kingsmore, S. F. & Patel, D. D. (2003).** Multiplexed protein profiling on antibody-based microarrays by rolling circle amplification. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 74-81.
- Kirsch, E. A., Barton, R. P., Kitchen, L. & Giroir, B. P. (1996).** Pathophysiology, treatment and outcome of meningococemia: a review and recent experience. *Pediatr Infect Dis J* **15**, 967-979.

- Kizil, G., Todd, I., Atta, M., Borriello, S. P., Ait-Tahar, K. & Ala'Aldeen, D. A. (1999).** Identification and characterization of TspA, a major CD4 T-cell- and B-cell-stimulating Neisseriaspecific antigen. *Infect Immun* **67**, 3533-3541.
- Kizil, G., Wilks, K., Wells, D. & Ala'Aldeen, D. A. (2000).** Detection and characterisation of the genes encoding glyoxalase I und II from *Neisseria meningitidis*. *J Mol Microbiol* **49**, 669-673.
- Konthur, Z., Hust, M. & Dubel, S. (2005).** Perspectives for systematic in vitro antibody generation. *Gene* **25**, 25.
- Krenn, V., Petersen, I., Häupl, T., Koepenik, A., Blind, C., Dietel, M., Konthur, Z. & Skriner, K. (2004).** Array technology and proteomics in autoimmune diseases. *Pathology*, 95-103.
- Kreutzberger, J. (2005).** Proteinchip-Diagnose von N. meningitidis-Infektionen. *Laborwelt* **6**, 18-21.
- Kreutzberger, J. (2006).** Protein microarrays: a chance to study microorganisms? *Appl Microbiol Biotechnol* **70**, 383-390. Epub 2006 Feb 2018.
- Kurz, S., Hubner, C., Aepinus, C., Theiss, S., Guckenberger, M., Panzner, U., Weber, J., Frosch, M. & Dietrich, G. (2003).** Transcriptome-based antigen identification for *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* **21**, 768-775.
- Kusnezow, W. & Hoheisel, J. D. (2003).** Solid supports for microarray immunoassays. *J Mol Recognit* **16**, 165-176.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lebrun, S. J., Petchpud, W. N., Hui, A. & McLaughlin, C. S. (2005).** Development of a sensitive, colorimetric microarray assay for allergen-responsive human IgE. *Journal of Immunological Methods* **300**, 24-31.
- Lee, W., Park, K. S., Kim, Y. W., Lee, W. H. & Choi, J. W. (2005).** Protein array consisting of sol-gel bioactive platform for detection of *E. coli* O157:H7. *Biosens Bioelectron* **20**, 2292-2299.
- Lewis, L. A., Gipson, M., Hartman, K., Ownbey, T., Vaughn, J. & Dyer, D. W. (1999).** Phase variation of HpuAB and HmbR, two distinct haemoglobin receptors of *Neisseria meningitidis* DNM2. *Molecular Microbiology* **32**, 977-989.
- Li, B., Jiang, L., Song, Q. & other authors (2005).** Protein microarray for profiling antibody responses to *Yersinia pestis* live vaccine. *Infect Immun* **73**, 3734-3739.
- Lizardi, P. M., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D. C. & Ward, D. C. (1998).** Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet* **19**, 225-232.
- Lopez, M. F. & Pluskal, M. G. (2003).** Protein micro- and macroarrays: digitizing the proteome. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences* **787**, 19-27.
- Lu, D.-D., Chen, S.-H., Zhang, S.-M., Zhang, M.-L., Zhang, W., Bo, X.-C. & Wang, S.-Q. (2005).** Screening of specific antigens for SARS clinical diagnosis using a protein microarray. *The Analyst* **130**, 474-482.
- Lueking, A., Possling, A., Huber, O., Beveridge, A., Horn, M., Eickhoff, H., Schuchardt, J., Lehrach, H. & Cahill, D. J. (2003).** A Nonredundant Human Protein Chip for Antibody Screening and Serum Profiling. *Mol Cell Proteomics* **2**, 1342-1349.
- Manchanda, V., Gupta, S. & Bhalla, P. (2006).** Meningococcal disease: History, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention. *Indian J Med Microbiol* **24**, 7-19.

- Martin, P., van de Ven, T., Mouchel, N., Jeffries, A. C., Hood, D. W. & Moxon, E. R. (2003).** Experimentally revised repertoire of putative contingency loci in *Neisseria meningitidis* strain MC58: evidence for a novel mechanism of phase variation. *Mol Microbiol* **50**, 245-257.
- Mendoza, L. G., McQuary, P., Mongan, A., Gangadharan, R., Brignac, S. & Eggers, M. (1999).** High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Biotechniques* **27**, 778-780.
- Mezzasoma, L., Bacarese-Hamilton, T., Di Cristina, M., Rossi, R., Bistoni, F. & Crisanti, A. (2002).** Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin Chem* **48**, 121-130.
- Miller, J. C., Zhou, H., Kwekel, J., Cavallo, R., Burke, J., Butler, E. B., Teh, B. S. & Haab, B. B. (2003).** Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: Antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomics*, 56-63.
- Moore, P. S., Reeves, M. W., Schwartz, B., Gellin, B. G. & C.V., B. (1989).** Intercontinental spread of an epidemic group A *Neisseria meningitidis* strain. *Lancet* **2**, 260-263.
- Morens, D. M., Folkers, G. K. & Fauci, A. S. (2004).** The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* **430**, 242-249.
- Moxon, E. R., Lenski, R. E. & Rainey, P. B. (1998).** Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Perspect Biol Med* **42**, 154-155.
- Müller, U. R. & Nicolau, D. V. (2005).** *Microarray Technology and Its Applications*. Berlin: Springer-Verlag.
- Orchard, S., H., H. & R., A. (2005).** Annotating the human proteome. *Mol Cell Proteomics* **4**, 435-440.
- Parkhill, J., Achtman, M., James, K. D. & other authors (2000).** Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. *Nature* **404**, 502-506.
- Phizicky, E., Bastiaens, P., Zhu, H., Snyder, M. & Fields, S. (2003).** Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* **422**, 208-215.
- Qiu, M., Shi, Y., Guo, Z. & other authors (2005).** Antibody responses to individual proteins of SARS coronavirus and their neutralization activities. *Microbes Infect* **7**, 882-889. Epub 2005 Apr 2003.
- Ramachandran, N., Hainsworth, E., Bhullar, B., Eisenstein, S., Rosen, B., Lau, A. Y., Walter, J. C. & LaBaer, J. (2004).** Self-assembling protein microarrays. *Science* **305**, 86-90.
- Ramachandran, N., Larson, D. N., Stark, P. R., Hainsworth, E. & LaBaer, J. (2005).** Emerging tools for real-time label-free detection of interactions on functional protein microarrays. *FEBS J* **272**, 5412-5425.
- Richter, G. (2003).** *Praktische Biochemie*. Stuttgart: Thieme.
- Robert-Koch-Institut (2002).** *Epidemiologisches Bulletin* Nr. **33**.
- Robinson, W. H., DiGennaro, C., Hueber, W. & other authors (2002).** Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nature Medicine* **8**, 295-301.
- Rosenstein, N. E. & Perkins, B. A. (2000).** Update on *Haemophilus influenzae* serotype b and meningococcal vaccines. *Pediatr Clin North Am* **47**, 337-352.
- Rosenstein, N. E., Perkins, B. A., Stephens, D. S., Popovic, T. & Hughes, J. M. (2001).** Meningococcal disease. *N Engl J Med* **344**, 1378-1388.
- Sanger** http://www.sanger.ac.uk/Projects/N_meningitidis.
- Sarkari, J., Pandit, N., Moxon, E. R. & Achtman, M. (1994).** Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine. *Molecular Microbiology* **13**, 207-217.

- Saunders, N. J., Peden, J. F., Hood, D. W. & Moxon, E. R. (1998).** Simple sequence repeats in the *Helicobacter pylori* genome. *Mol Microbiol* **27**, 1091-1098.
- Saunders, N. J., Jeffries, A. C., Peden, J. F., Hood, D. W., Tettelin, H., Rappuoli, R. & Moxon, E. R. (2000).** Repeat-associated phase variable genes in the complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* strain MC58. *Molecular Microbiology* **37**, 207-215.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & P.O., B. (1995).** Quantitative monitoring of gene expression pattern with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.
- Schena, M. (1999).** *DNA Microarrays - A Practical Approach*. New York: Oxford University Press.
- Schmitt, J., Hess, H. & Stunneberg, H. G. (1993).** Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Molecular Biology Reports* **18**, 223-230.
- Snyder, L. A., Butcher, S. A. & Saunders, N. J. (2001).** Comparative whole-genome analyses reveal over 100 putative phase-variable genes in the pathogenic *Neisseria* spp. *Microbiology* **147**, 2321-2332.
- Snyder, L. A. S., Davies, J. K., Ryan, C. S. & Saunders, N. J. (2005).** Comparative overview of the genomic and genetic differences between the pathogenic *Neisseria* strains and species. *Plasmid* **54**, 191-218.
- Steller, S. (2004).** Analyse von *Neisseria meningitidis* mit Protein Microarrays. In *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie*. Berlin: Freie Universität.
- Steller, S., Angenendt, P., Cahill, D. J., Heuberger, S., Lehrach, H. & Kreutzberger, J. (2005).** Bacterial protein microarrays for identification of new potential diagnostic markers for *Neisseria meningitidis* infections. *Proteomics* **5**, 2048-2055.
- Swartley, J. S., Marfin, A. A., Edupugant, i. S., Liu, L. J., Cieslak, P. & Perkins, B. (1997).** Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 271-276.
- Tettelin, H., Saunders, N. J., Heidelberg, J. & other authors (2000).** Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58.[comment]. *Science* **287**, 1809-1815.
- Thoman, P. (1980).** Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 5201-5205.
- Tong, M., Jacobi, C. E., van de Rijke, F. M. & other authors (2005).** A multiplexed and miniaturized serological tuberculosis assay identifies antigens that discriminate maximally between TB and non-TB sera. *J Immunol Methods* **301**, 154-163.
- Twyman, R. M. (2004).** *Principles of Proteomics*. Oxon: Garland Science/BIOS Scientific Publishers.
- van der Ende, A., Hopman, C. T., Zaat, S., Essink, B. B., Berkhout, B. & Dankert, J. (1995).** Variable expression of class 1 outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by variation in the spacing between the -10 and -35 regions of the promoter. *Journal of Bacteriology* **177**, 2475-2480.
- van Deuren, M., Brandtzaeg, P. & van der Meer, J. W. (2000).** Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* **13**, 144-166.
- van Ulsen, P. & Tommassen, J. (2006).** Proteinsecretionandsecreted proteins in pathogenic *Neisseriaceae*. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 292-319.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W. & other authors (2001).** The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351.
- Vieusseaux, G. (1806).** Mémoire sur la maladie qui a régné à Genève au printemps de 1805. *J Med Chi Pharm* **11**, 163-182.

- Vitovski, S., Read, R. C. & Sayers, J. R. (1999).** Invasive isolates of *Neisseria meningitidis* possess enhanced immunoglobulin A1 protease activity compared to colonizing strains. *FASEB J* **13**, 331-337.
- Voulhoux, R., Bos, M. P., Geurtsen, J., Mols, M. & Tommassen, J. (2003).** Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* **299**, 262-265.
- Weichselbaum, A. (1887).** Ueber die Aetiologie der akuten Meningitis cerebrospinalis. *Fortschr Med* **5**, 573-583.
- WHO (1997).** Response to epidemic meningitis in Africa. *Wkly Epidemiol Rec* **42**, 313-318.
- WHO (2003).** Meningococcal meningitis. *Fact sheet N°141*.
- Zhang, Q. Y., DeRyckere, D., Lauer, P. & Koomey, M. (1992).** Gene conversion in *Neisseria gonorrhoeae*: evidence for its role in pilus antigenic variation. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 5366-5370.
- Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R. & other authors (2001).** Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* **293**, 2101-2105.
- Zhu, H. & Snyder, M. (2003).** Protein chip technology. *Current Opinion in Chemical Biology* **7**, 55-63.
- Zhu, H., Hu, S., Jona, G. & other authors (2006).** Severe acute respiratory syndrome diagnostics using a coronavirus protein microarray. *PNAS* **103**, 4011-4016.
- Zollinger, W. D. & Boslego, J. (1997).** Immunologic methods for diagnosis of infections by gram-negative cocci. In *Manual of clinical laboratory immunology*, pp. 473-483. Edited by N. R. Rose, E. Conway de Macario, J. D. Folds, H. C. Lane & R. M. Nakamura. Washington DC: ASM Press.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte mich bei Herrn Dr. Kreuzberger für die Bereitstellung dieses interessanten und vielseitigen Themas meiner Masterarbeit bedanken. Auch für seine intensive Betreuung und Unterstützung bei allen Angelegenheiten und auch Problemen, die sich bei der Durchführung und dem Verfassen dieser Arbeit ergaben, bin ich sehr dankbar.

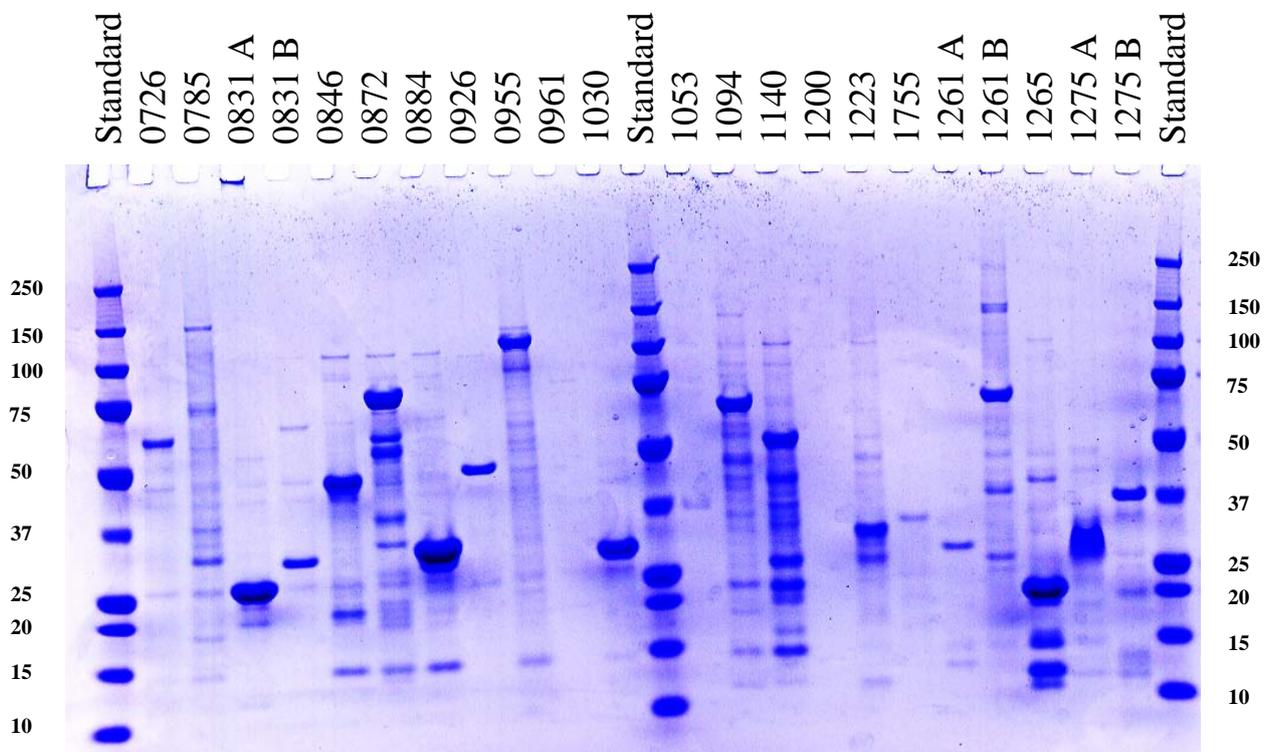
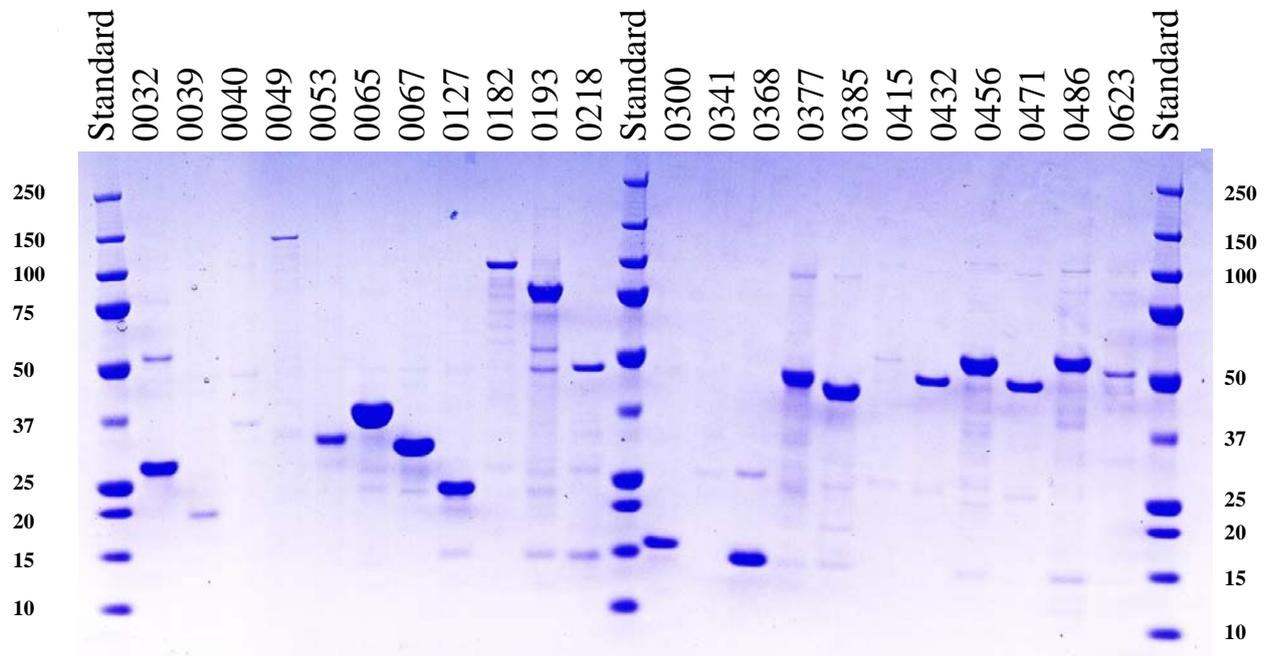
Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Lisdat, der es mir ermöglichte diese Arbeit an einem externen Institut durchzuführen. Die zahlreichen Anregungen bei der Durchführung sowie dem Korrekturlesen dieser Arbeit waren ebenfalls sehr hilfreich.

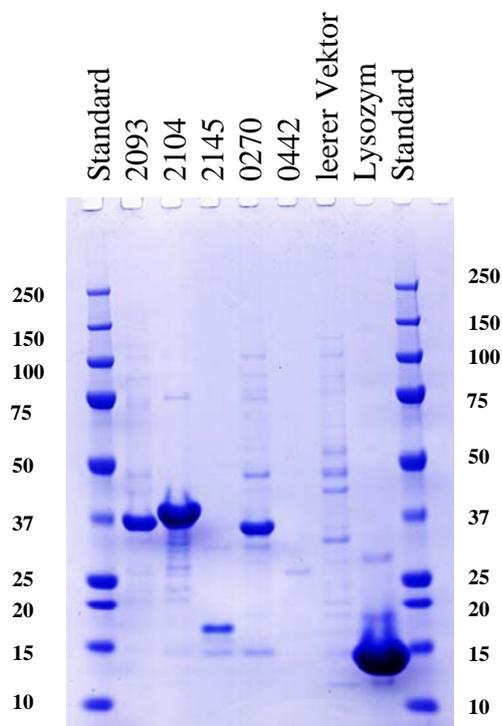
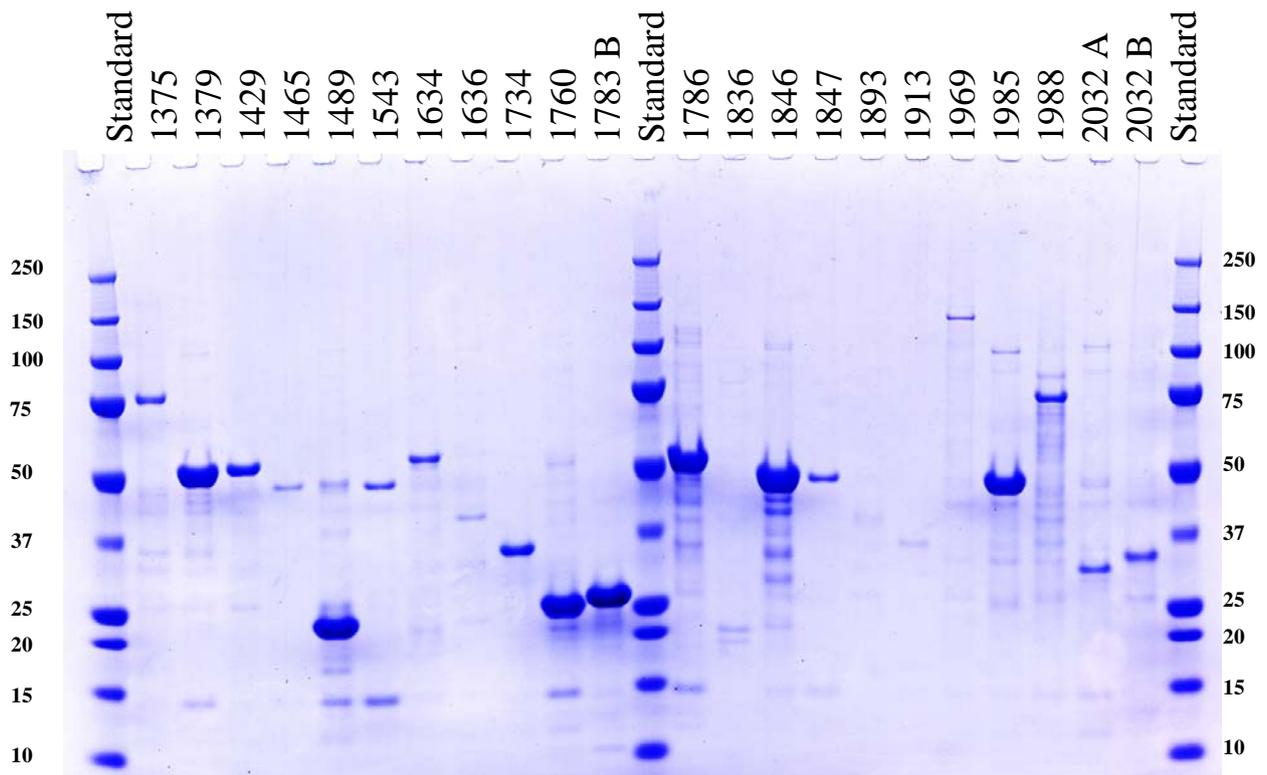
Der Arbeitsgruppe von Dr. Hultschig danke ich für die ausgezeichnete technische Unterstützung und für die anregenden Diskussionen.

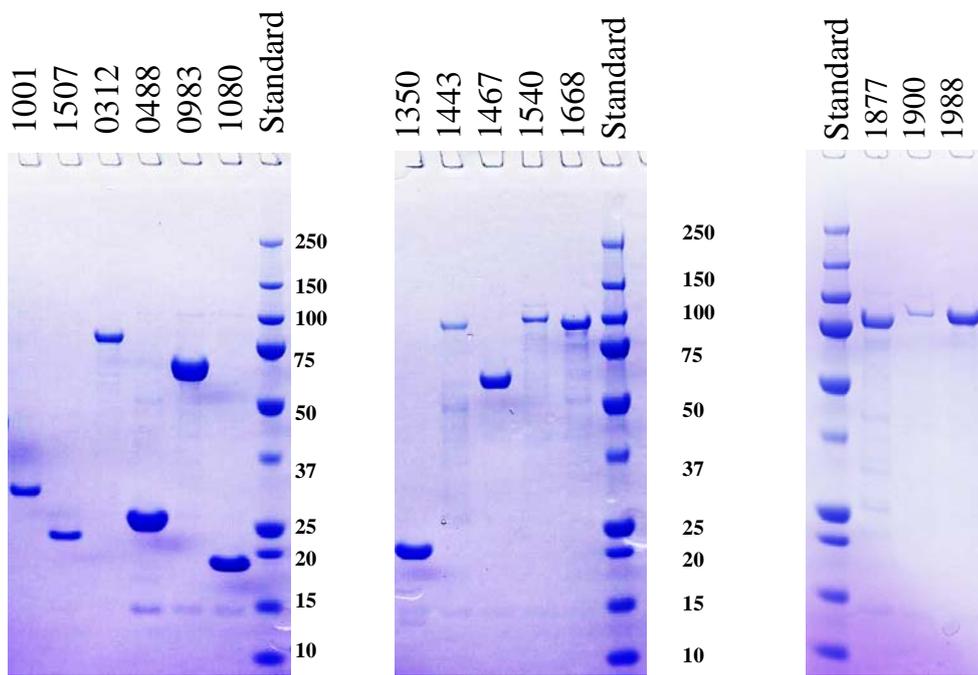
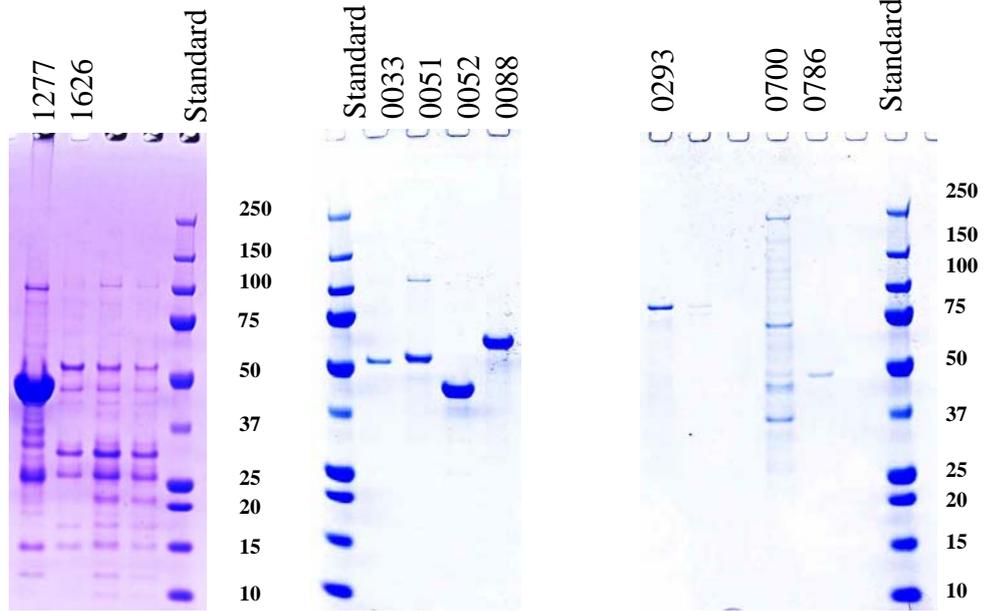
Den Mitarbeitern Ulrike Borgmeier, Annika Andersson und Anna Politis der Abteilung Lehrach des Instituts für molekulare Genetik danke ich für die angenehme Atmosphäre in der diese Arbeit entstand, sowie ihre stets hilfreiche Unterstützung jeglicher Art.

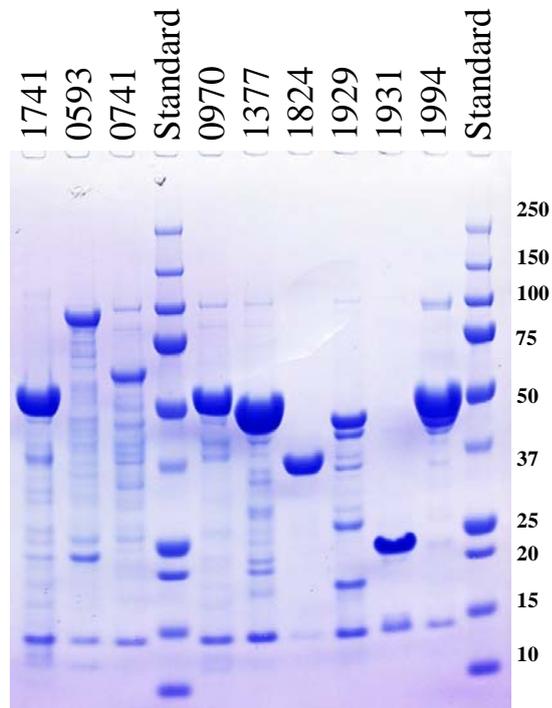
ANLAGE A

SDS-PAGE-Analysen aller rekombinant exprimierten und aufgereinigten Proteine.
 Der Zahlen neben dem jeweiligem Standard beziehen sich auf Größenangaben in kDa.









ANLAGE B

Übersicht über alle untersuchten Patienten- und Kontrollseren

Seren Graz:

#	Alter	Geschlecht	Serogruppe	#	Alter	Geschlecht	Serogruppe
1	17 Jahre	m	B	11	14 Jahre	m	C
2	11 Jahre	m	B	12	6 Jahre	m	C
3	20 Jahre	m	B	13	15 Jahre	w	B
4	16 Jahre	m	?	14	6 Jahre	w	B
5	33 Jahre	w	C	15	17 Jahre	w	B
6	9 Jahre	m	C	16	5 Jahre	m	B
7	2 Jahre	m	B	17	19 Jahre	m	B
8	6 Jahre	w	C	18	33 Jahre	m	B
9	9 Jahre	w	B	19	8 Monate	w	B
10	8 Jahre	w	B	20	15 Jahre	m	C

Seren Manchester:

	Infecting organism		
	Group	Type	Subtype
1	B	NT	P1.19/P1.15/NT
2	B	1	P 1.15
3	B	1	P 1.4
4	B	4	P 1.5/P 1.2
5	B	22	P 1.14
6	B	NT	P 1.9
7	B	NT	P 1.14/P 1.14
8	B	1	P 1.14
9	B	NT	P 1.9
10	B	15	P 1.12/P 1.13
11	B	NT	NT/P 1.15/ NT
12	B	1	P 1.5/NT/NT
13	B	4	NT/P 1.4/NT
14	B	NT	P 1.16
15	B	22	NT
16	B	NT	P 1.15
17	C	4	NT
18	W 135	NT	P 1.3/P 1.6
19	Y	NT	NT/NT/NT
20	Y	NT	P 1.16

Seren Athen:

	code	code/LAB	YEAR	AGE	SEX	MICROORGANISM	strain isolation	PCR	serogroup	serotype	sybtype
1	S-3	BM-65	1997	15 MO	F	N.m.	Y		B		4 P1.6
2	S-4	BM-68	1997	5 Y	M	N.m.	Y		B	NT	P1.4
3	S-5	BM-62	1996	2 Y	M	N.m.	N	Y	B		
4	S-7	Θ-23	1997	6 Y	M	N.m.	Y		C	2a	P1.2
5	S-8	Θ-24	1997	21 Y	F	N.m.	Y		C	2a	P1.2
6	S-9	BM-66	1997	14 MO	F	N.m.	Y		B		4 P1.4
7	S-10	BM-67	1997	7 MO	M	N.m.	Y		B		14 P1.14
8	S-11	BM-72	1997	6 Y	M	N.m.	Y		C	2b	P1.5
9	S-15	BM-74	1997	8 Y	M	N.m.	Y		C	2a	P1.5
10	S-20α	BM-75	1997	2 Y	F	N.m.	Y		C	2a	NT
11	S-20β										
12	S-23	BM-76	1997	3 Y	F	N.m.	Y		B	NT	P1.16
13	S-39	BM-78	1997	9 Y	M	N.m.	Y		C	2a	P1.2
14	S-45	BM-80	1997	14 Y	F	N.m.	Y		B	2b	P1.10
15	S-71	BM-89	1998	14 Y	F	N.m.	Y		B		4 P1.4
16	S-72	BM-90	1998	8 Y	F	N.m.	Y		C	2a	P1.2
17	S-81	W-105	1998	49 Y	F	N.m.	Y		C	2a	P1.2
18	S-88	BM-96	1998	14 Y	M	N.m.	Y		A		15 P1.7
19	S-89	BM-97	1998	6 Y	M	N.m.	Y		B	NT	NT
20	S-97	BM-98	1998	3 Y	M	N.m.	Y		C	2a	P1.2
21	S-99	BM-99	1998	21 MO	M	N.m.	Y		C	2a	P1.10
22	S-103α	AK-96	1998	7 Y	F	N.m.	Y		C	2a	
23	S-103β										
24	S-108	AK-98	1998	1 Y	M	N.m.	Y		B	NT	NT
25	S-109	BM-100	1998	10 Y	M	N.m.	Y		C	2b	P1.2
27	S-112	AK-101	1998	6 MO	F	N.m.	Y		B		4 P1.14
28	S-117	Θ-69	1999	17 Y	F	N.m.	N	Y	B		
29	S-118	W-157	1999	20 Y	M	N.m.	N	Y	NG		
30	S-119	W-159	1999	20 Y	M	N.m.	N	Y	B		
31	S-120	AK-112	1999	13 Y	M	N.m.	N	Y			
32	S-123	W-168	1999	20 Y	M	N.m.	N	Y	NG		
33	S-130	BM-121	1999	5 Y	F	N.m.	N	Y	B		
34	S-133	BM-122	1999	4 Y	F	N.m.	N	Y	B		
35	S-155	BM-134	1999	6 Y	F	N.m.	N	Y	NG		
36	S-156	AK-126	1999	11 Y	M	N.m.	Y	N	C	2a	P1.2

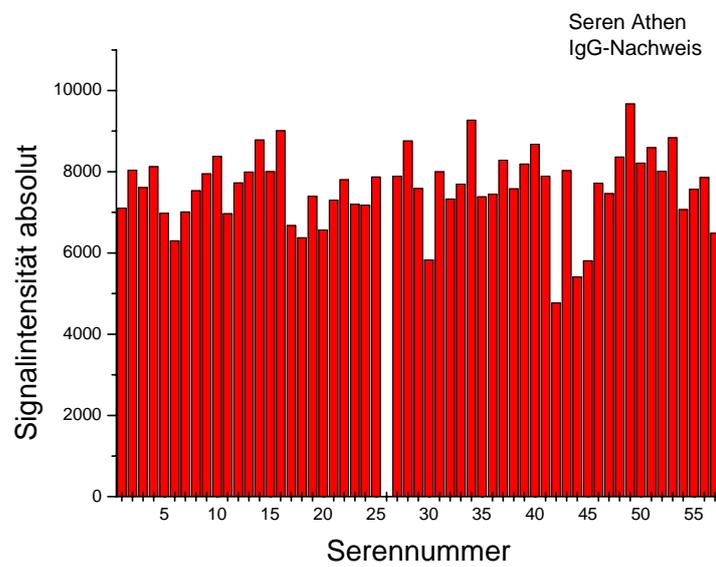
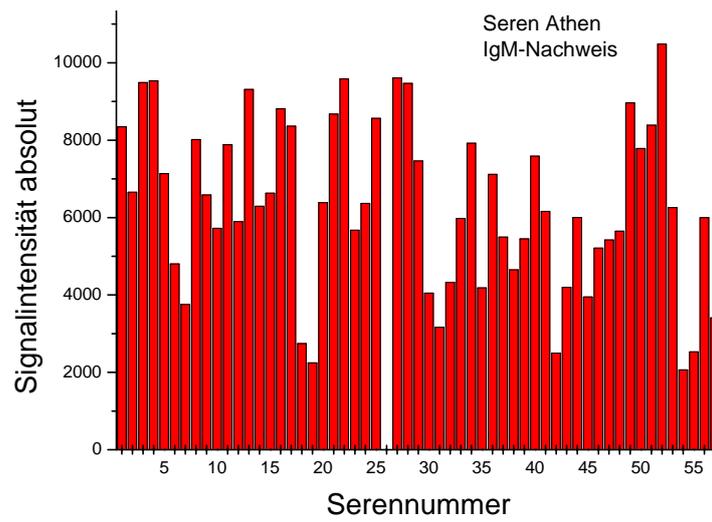
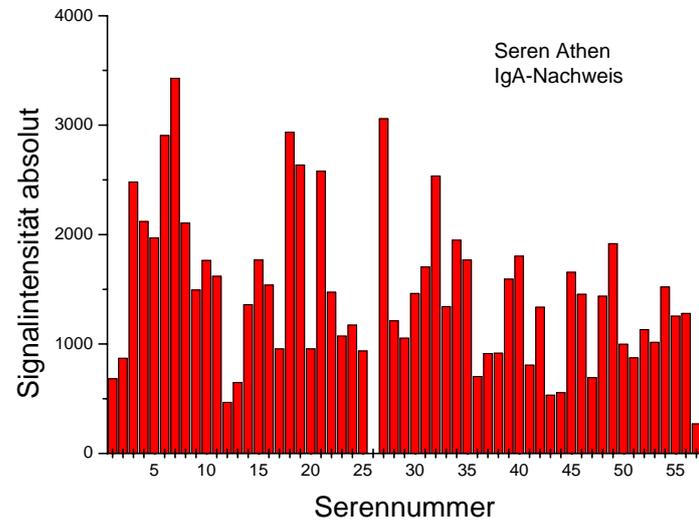
	code	code/LAB	YEAR	AGE	SEX	MICROORGANISM	strain isolation	PCR	serogroup	serotype	sybtype
37	S-160	AK-129	1999	4 Y	M	N.m.	Y	N	B	NT	P1.4
38	S-167	W-229	1999	13 Y	M	N.m.	N	Y	A		
39	S-176	Θ-105	2000	74 Y	F	N.m.	N	Y	C		
40	S-177	AK-137		13 Y	M	N.m.	N	Y	B		
41	S-178	AK-142	2000	4 Y	M	N.m.	N	Y	B		
42	S-180	W-266	2000	8 Y	F	N.m.	N	Y	B		
43	S-181	AK-170	2000	2 Y	M	N.m.	N	Y	B		
44	S-182	AK-166	2000	12 Y	M	N.m.	N	Y	NG		
45	S-185	AK-205	2000	2 Y	M	N.m.	N	Y			
46	S-187	W-300	2000	70 Y	M	N.m.	N	Y	B		
47	S-191	W-326	2000	31 Y	M	N.m.	N	Y	NG		
48	S-192	AK-238	2000	7 Y	M	N.m.	N	Y	NG		
49	S-194	AK-272	2000	6 Y	F	N.m.	N	Y	NG		
50	S-197	W-370	2001	18 Y	F	N.m.	N	Y	B		
51	S-209	Θ-159	2001	1 Y	M	N.m.	N	Y	B		
52	S-211	AK-555	2002	2 Y	M	N.m.	N	Y			
53	S-213	AK-604	2002	2 Y	F	N.m.	N	Y	NG		
54	S-215	W-570	2001	6 Y	M	N.m.	N	Y	NG		
55	S-227		1997	4 Y	F	N.m.	Y	N	C		
56	S-228		1997	4 Y	F	N.m.	Y	N	C		
57	S-230		1997	4 Y	F	N.m.	Y	N	C		

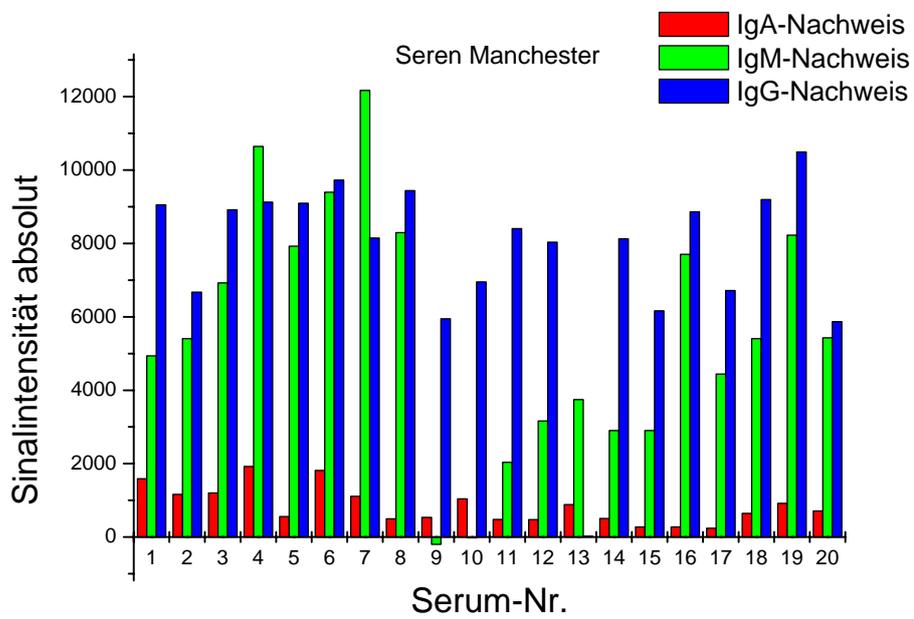
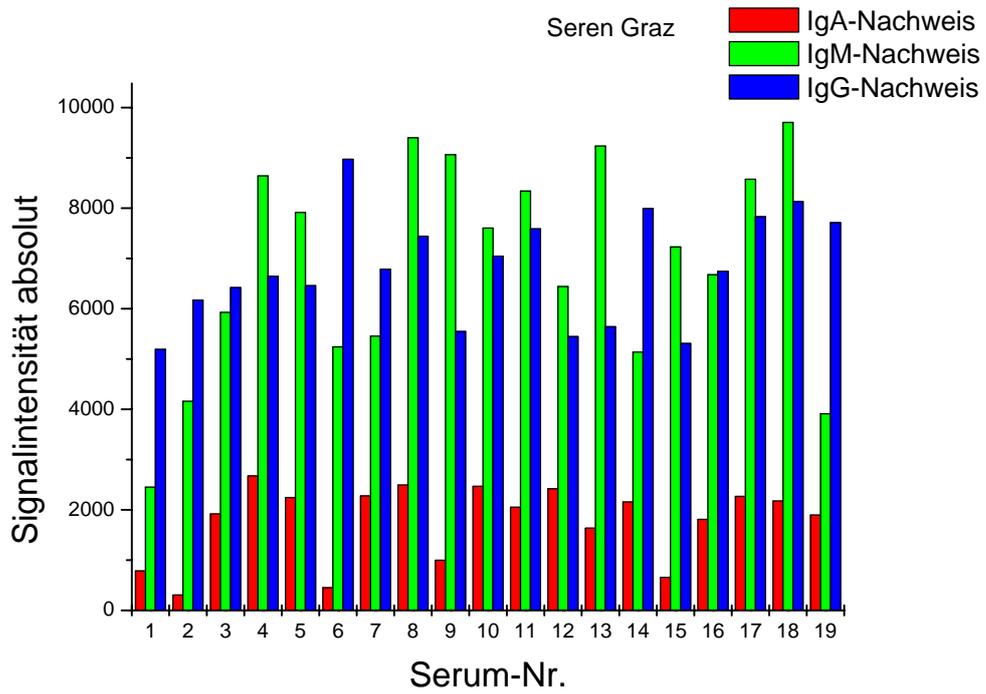
Kontrollseren

<u>Geschlecht</u>	<u>Alter (Jahre)</u>
m	9
m	12
m	12
m	29
m	34
m	33
m	2
m	3
m	1
m	4
m	11
m	4
m	3
m	3
m	3
m	3
m	2
m	3
w	14
w	41
w	4
w	10
w	6
w	6
w	3
w	5
w	4
w	6
w	8
w	8
w	8
w	10 Monate

ANLAGE C

Signalintensitäten Dot-Immunoassay für alle untersuchten Seren





ANLAGE D

Testkriterien Screening 1 Graz (bei fehlenden IDs handelt es sich um Proteine, bei denen der Grenzwert nicht erreicht wurde):

ID	NMB	Anzahl erkannt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	32	3																1,74				2,03	6,68
2	39	10					2,25	1,77		1,99		2,42	2,66			1,62	2,42	1,77				2,29	1,85
3	40	18	1,63		2,47	1,91	3,65	3,56	2,22	3,11	1,92	4,05	2,87	3,05	1,78	2,92	4,75	1,66	4,20			2,98	1,61
4	49	17	1,72	3,63		1,70	2,45	2,02	3,45	1,66	4,52	3,01	4,37	1,65	1,83	2,10	3,47	2,36	2,80			3,12	
5	53	8					4,26	8,20		1,52	1,69				3,91		3,19					2,92	1,68
6	65	2										1,71				1,54							
8	172	11	1,96				2,18			1,83	1,61	1,99	1,66	1,77		2,42			1,64		1,60	103,94	
9	182	13	1,57				3,67			1,53	1,56	1,74	1,85	2,02		1,86	2,07	1,91	14,86		1,82	6,30	
10	193	1																				2,01	
11	218	12		2,29	1,85	2,18	2,62		2,02	1,86	5,15		6,17				3,18		2,44		2,55	1,78	
12	270	1					1,52																
13	300	3					1,97								3,78							3,65	
14	312	7					11,05		2,11				1,50	1,55		1,90						4,26	3,00
15	341	19	2,79	2,53	2,46	2,24	4,79	2,18	4,08	2,12	7,94	110,45	6,90	2,61	96,75	2,01	14,61	2,04	4,42	16,65	8,99		
21	442	3										1,56					1,98	1,55					
24	486	1																				1,69	
27	623	3										1,63								1,60	1,75		
29	741	4				1,60	2,67								2,20		2,00						
32	831 B	6	2,91		1,51		1,91										2,50		2,27	1,60			
38	961	8					5,13	2,24				6,93		1,66		2,50	1,77			4,42	1,54		
47	1200	10	5,24	1,59			1,59	3,11		3,69			6,49			2,14			3,97		11,62	1,87	
48	1223	2										2,17			1,56								
49	1255	2										2,04										4,82	
50	1261 A	3					1,61					2,46	1,50										
52	1265	2					1,60												1,99				
53	1275 A	6		1,69	2,95							7,53					1,53		2,30		2,04		
54	1275 B	2						1,84				1,55											
60	1429	4					1,74						1,70		2,48		1,79						
61	1443	1					1,93																
62	1465	3														2,04	2,31					2,22	
63	1467	1													1,54								
64	1489	1																					2,86
69	1634	3														2,41			1,52		2,79		
70	1636	5	3,30									3,13	2,05		1,64						1,87		
72	1734	7			1,67		1,76					2,65	2,15			1,57	1,92				2,10		
76	1786	13		5,60		3,19	2,26	33,38	2,48	24,33	4,24	3,09		1,51	2,18	21,60	7,47			2,05			
77	1824	10	2,59	2,39	2,00	3,02			17,05		2,23			5,43	7,35	4,99							27,52
78	1836	15			2,30	1,56	3,28	2,37	1,64			3,49	2,25	1,61	2,48	2,84	1,71	2,68	1,82		3,17	2,05	
79	1846	3										1,69										2,16	1,65
80	1847	8					1,54		1,53	1,66		1,99	1,77					1,57			1,97	1,55	
81	1877	8	1,55			1,61	1,91			1,68			2,09					1,58			2,03	2,68	
82	1893	11			1,74			2,30	1,95		18,42	4,83	1,81	2,35			6,90		2,43	8,94	12,80		
83	1900	11	1,55				2,10	1,58		1,76		1,89	1,68		1,87			1,71	1,67		1,68	3,27	
84	1913	12	1,68			1,75	1,64		1,68	1,63	1,63	2,08	2,48				2,23	1,62			1,84	1,54	
85	1929	13	18,98	6,34			7,77		5,87	1,60	1,79	2,34	2,31		5,85		3,12	1,63		2,11	5,41		

86	1931	1																				1,93	
87	1969	6							1,52		1,87				1,51					1,62		1,63	38,48
88	1985	2									1,53												1,68
89	1988	2										1,54											1,51
90	1994	15		1,59	1,69	1,64	6,82			2,06	1,58	1,52	1,65	1,54	1,74	2,66		1,94	1,82		7,61	2,04	
91	1998	2					3,84															1,91	
92	2032 A	15	1,81			1,79	5,31	1,86	1,57	1,89	1,89	3,13	2,05	1,65	1,68	2,39	1,65		1,78			3,44	
93	2032 B	19	2,04	1,75		2,01	2,40	1,95	2,03	2,38	1,75	2,77	2,21	1,99	2,07	2,32	1,70	2,23	2,14	1,67	2,34	5,22	
94	2093	15	1,67				1,98	1,71	1,60	1,97	1,77	2,03	1,86	1,62	1,89	1,80		2,14	1,74		1,55	1,65	
95	2104	2											1,56										1,97
96	2145	8	1,76				1,70	1,51		1,62	1,52	1,93				1,58							5,88
98	51	11	1,78				1,82			1,65		1,97	1,51		1,56	1,67		1,56	1,63		1,56	1,66	
101	291	14	1,77	2,56		1,90	2,30	1,81		2,11	2,20	1,74	1,97	1,66	1,85	2,55		2,22				5,05	
102	312	14	2,03			2,10	4,07	1,53		1,82	1,53	1,64	1,70	1,85	1,89		1,92	3,06			2,52	2,07	
103	700	17	20,70	6,16	10,81	1,79	31,54	18,33	2,01	8,86	11,62	3,29		3,86	2,57	5,45	12,45		54,25	2,26		2,04	
104	786	4	2,50				2,05					2,23							1,76				

ID	Name	Anzahl erkannt	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57
1	32	1														14,6												
2	39	2														10											17,7	
3	40	4							16,7				17,2			14,3	7,62											
4	49	2					9,19																18					
5	53	1																										83,2
6	65	2									7,1	465																
7	67	0																										
8	172	6	8,47					14,8	11,8		18,3		10,8	25,6														
9	182	4							11,5									9,78	9,12						33,8			
10	193	0																										
11	218	1								54																		
12	270	3			119																16,9	9,84						
13	300	3	10,9							8,73									73,5									
14	312	4									16,9						7,26					13	13,5					
15	341	4									20,5	30,2				7,12												21,1
16	368	0																										
17	377	1				10,6																						
18	385	1																					28,2					
19	415	4				11,7							35,8												23,6		7,7	
20	432	3											14,4						23,4					11,2				
21	442	1												14														
22	456	1																							8,53			
23	471	1													22,2													
24	486	1									38,6																	
25	488	0																										
26	593	3									257															13,5		7,94
27	623	2				16,2																	62,6					
28	726	3				32,7						52,6											109					
29	741	4					8,31										7,07		7,47					47,4				
30	785	2												208														
31	831 A	4						7,22							7,84						139		11,2					
32	831 B	2				12,8		21,8																				
33	846	3						12,8	274												80,1							
34	872	4			22,5						32,8		9,06			23,8												
35	884	3								60,3					56,2													
36	926	4											21,9		39,4			10,6				24,7						
37	955	3				100					18,2																	
38	961	5	11,3	9,37											16	7,07	7,06											11,4
39	970	1											7															
40	983	1																						21,4				
41	1001	0																										
42	1030	3						13,3																				
43	1053	6						7,94	17,7					8,82					16,7						528	41,7		18,6

Testkriterien Screening 2 (M: Manchester, A: Athen):

ID	Name	Anzahl erkannt	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12	M 13	M 14	M 15	M 16	M 17	M 18	M 19	M 20	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A 8	A 9	A 10	A 11	A 12					
1	32	2																		11,3																78,7			
2	39	4						18,8									12,8				18,4	28,8																	
3	40	3						11,5													14,6					10,8													
4	49	1						13,5																															
5	53	7	25,7	14,1		11,0		28,3													13,5								27,2	105,1									
6	65	2																			12,8					11,5													
7	67	7		24,5		175,0		640,7		17,0						20,0					100,6															11,4			
8	172	3																			68,9		18,3				13,0												
9	182	11	27,8		15,5		19,8		17,4		22,2										401,4	154,1		15,5		15,3	32,1		27,0										
10	193	1						27,3																															
11	218	2																								14,3									10,0				
12	270	2						22,7													29,0																		
13	300	3						12,2													30,3		10,1																
14	312	2																				14,4					23,2												
15	341	0																																					
16	368	10	27,9		13,2				13,0		16,3						13,9					25,1				51,9			25,8	69,9				26,9					
17	377	4																				18,4				18,8									43,6		28,4		
18	385	4	17,2								10,2																		15,8	25,0									
19	415	3																			17,3	17,3				41,7													
20	432	3																				17,9				22,6			15,4										
21	442	5						23,8								24,7					11,2		16,8			25,2													
22	456	4						22,5													28,7		10,1			22,6													
23	471	5																			12,3		10,7			10,8		24,2	155,0										
24	486	9	17,1		10,7						10,1						20,9				52,3	17,3			12,1	49,7								11,1					
25	488	5	20,1													10,7					10,0					14,7									13,4				
26	593	2																			39,0		23,2																
27	623	0																																					
28	726	3						10,7																															
29	741	1													55,8							15,9				13,1													
30	785	4						17,7																															
31	831 A	6						20,8													19,9		14,4			12,1													
32	831 B	0																			36,3	12,3	20,9			22,9			16,7										
33	846	3						11,3																			25,2												
34	872	2						25,3														12,6																	
35	884	1						48,0																															
36	926	2						17,9																															
37	955	4						10,1																					12,5	37,3									
38	961	0																																					
39	970	1																																					
40	983	2				11,0		18,5																															
41	1001	3	11,7					28,7																															
42	1030	4						10,1																			28,2												
43	1053	1																																					
44	1080	3						15,8																			21,6												
45	1094	2						12,4																															
46	1140	2						12,9																															
47	1200	1						11,2																															
48	1223	5						22,3								18,2																							
49	1255	3						11,6																															
50	1261 A	2						13,1																															
51	1261 B	2						10,3																															
52	1265	3						20,0																															
53	1275 A	3						12,1																															
54	1275 B	2						10,6																															

