

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. M. Frosch

Analyse des Transkriptoms von *Neisseria*
meningitidis Serogruppe B mit
DNA-Microarrays

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Sebastian Gerhard Kurz

aus Freiburg im Breisgau

Würzburg, Januar 2005

Referent: Professor Dr. med. M. Frosch

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

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 2005

Der Promovend ist Arzt

Meinen lieben Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Neisserien	1
1.1	Aufbau	1
1.2	Epidemiologie	1
1.3	Klinik	3
1.3.1	Manifestationsformen	3
1.3.2	Diagnose	4
1.3.3	Therapie	4
1.3.4	Prävention	5
1.4	Pathogenese	5
1.4.1	Virulenzfaktoren	5
1.4.2	Pathogenese invasiver Infektionen	8
1.5	Impfstoffentwicklung	10
1.5.1	Entwicklung der natürlichen Immunität	10
1.5.2	Polysaccharidvakzine	11
1.5.3	Outer-Membrane-Vesicles (OMV)	12
1.5.4	Subunit-Vakzine	13
1.5.5	Genomanalysen	13
1.5.6	Genexpressionsstudien	14
1.5.7	Lebendvakzine	14
2	Microarrays	15
2.1	Das System	15
2.1.1	Proben: cDNA, DNA	16
2.1.2	Array-Systeme	17
2.1.3	Hybridisierungsbedingungen	18
2.1.4	Anwendungen	19
2.2	Grundlagen des Neisserien-Microarrays	21
2.2.1	Das Genom von <i>Neisseria meningitidis</i> , Serogruppe B - Stamm MC58	21
2.2.2	Hitzeschock	22
3	Ziel der Arbeit	23
II	Material und Methoden	24
1	Material	24
1.1	Geräte	24
1.2	Computer	25

1.2.1	Hardware	25
1.2.2	Software	25
1.3	Verbrauchsmaterialien	26
1.4	Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme	26
1.5	Nukleinsäuren	28
1.5.1	Plasmide	28
1.5.2	PCR-Sonden:	28
1.5.3	Oligonukleotide	28
1.6	Puffer und Lösungen	29
1.7	Nährmedien und Agarplatten	30
1.7.1	Nährmedien	30
1.7.2	Agarplatten	30
1.8	Bakterienstämme	30
1.9	Kulturbedingungen	31
1.10	Serum-Pool:	31
2	Methoden	31
2.1	Auftrennung von Nukleinsäuren	31
2.1.1	Herstellung des Gels:	32
2.1.2	Auftrennung	32
2.1.3	Gelelution	32
2.2	Enzymatische Bearbeitung von DNA	33
2.2.1	Spaltung von DNA	33
2.2.2	Amplifikation definierter DNA-Fragmente mittels Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	33
2.3	RNA-Isolation	35
2.3.1	Bakterienkultur:	35
2.3.2	Isolatation	35
2.3.3	DNase-Behandlung:	36
2.3.4	Analyse der isolierten RNA:	36
2.4	<i>In vitro</i> Transkription:	37
2.5	Reverse Transkription:	37
2.5.1	Alkalische Hydrolyse:	39
2.6	Herstellung der <i>Slides</i>	40
2.6.1	PCR-Array	40
2.6.2	Oligonukleotid-Array	40
2.6.3	Blocken	41
2.6.4	Hybridisierung	42
2.6.5	Waschen	42
2.7	Auswertung der <i>Slides</i>	42
2.8	Bestimmung der Wachstumskinetik	43

III	Ergebnisse	44
1	Etablierung von Oligonukleotid-basierten Microarrays anhand des Hitzeschock-Modells	44
1.1	Vergleich PCR-Produkt-basierter <i>versus</i> Oligonukleotid-basierter <i>Arrays</i>	44
1.1.1	Parallelhybridisierung identischer RNA-Proben	47
1.1.2	Hitzeschock	53
1.2	Etablierung eines Gesamtgenom- <i>Arrays</i>	60
1.2.1	Hitzeschock-Experimente	60
2	Untersuchung der Genregulation nach Inkubation mit humanem Serum	68
2.1	Wachstumskinetik der Neisserien	68
2.2	Vergleich NHS <i>versus</i> PPM	69
2.3	Vergleich NHS <i>versus</i> PBS	74
IV	Diskussion	85
1	Vergleich und Etablierung	85
2	Seruminkubation	87
V	Zusammenfassung	99

Abkürzungen

A	Adenosin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCG	Bacille Calmette-Guerin
C	Cytosin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CFU	Colony forming unit (koloniebildende Einheit)
cRNA	copy RNA
CTP	Cytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrrocarbonat
DIC	Disseminierte Intravasale Gerinnung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EST	expressed sequence tags
ET	Electrophoretic type
FcG	Effektorteil des IgG Antikörpers
G	Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
Ig	Immunglobulin
IHT	Island of horizontally transfered DNA
Il	Interleukin
INH	Isoniacid
IS	Insertionssequenz
LPS	Lipopolysaccharid
MLEE	Multi Locus Enzyme Electrophoresis
MLST	Multi Locus Sequence Typing
mRNA	Messenger-RNA
NCAM	Neuronal cell adhesion molecule
NHS	Normales humanes Serum
OD	Optische Dichte
OMP	outer membrane protein
OMV	outer membrane vesicle
ORF	Open reading frame (offenes Leseraster)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PPM	Proteose-Pepton-Medium

PPM+	PPM supplementiert
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
ST	Sequence type
T	Thymin
TNF	Tumornekrosefaktor
tRNA	Transfer RNA
TTP	Thymidintriphosphat
UTP	Uraciltriphosphat

Definierte Symbole

Q	<i>Signal intensity ratio</i>
\overline{Q}	ermittelte <i>Signal intensity ratio</i> für ein Gen: entspricht für cDNA-Array Q_{Rep} , entspricht für Oligonukleotid-Array \overline{Q}_{Tripel}
Q_{Rep}	arithmetisches Mittel von Q über Replikate
SD_{Rep}	Standardabweichung von Q über Replikate
\overline{Q}_{Tripel}	Mittel von Q_{Rep} über die drei Oligonukleotid-Positionen #1 bis #3 eines Gens, abgekürzt \overline{Q}
SD_{Tripel}	Standardabweichung von Q_{Rep} über die drei Oligonukleotid-Positionen #1 bis #3 eines Gens
\overline{SD}_{Rep}	Mittelwert der Standardabweichungen SD_{Rep1} bis SD_{Rep3} innerhalb der Replikate
\overline{SD}_{Reihe}	Mittelwert der Standardabweichungen SD_{Reihe1} bis SD_{Reihe3} innerhalb der Oligonukleotid-Positionen
mittleres \overline{Q}	Mittelwert aller bestimmten Ratios eines Arrays
$\overline{S}_{2;3}$	mittleres \overline{Q} der Sonden für die internen Standard-RNAs Sacc2 und Sacc3
c_S	Kehrwert von $\overline{S}_{2;3}$. Faktor, mit dem die Ratios \overline{Q} der vier Sacc-Standards multipliziert werden, um durch Normalisierung über den gesamten Array entstandene Verschiebungen zu korrigieren
$SD_{Pos.\#1-\overline{Q}}$	Standardabweichung von Q_{Rep} der Position #1 zum Mittelwert \overline{Q}_{Tripel}

Teil I

Einleitung

1 Neisserien

Neisserien zählen zu den gramnegativen Diplokokken. Das Genus *Neisseria* wird aktuell mit *Aquaspirillum*, *Chromobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*, *Laribacter*, *Microvirgula*, *Simonsiella* und *Vogesella* zur Familie der *Neisseriaceae* zusammengefasst. Sie bilden einen Zweig der β *Proteobacteriae* (Dewhirst u. a., 1993). Zum Genus *Neisseria* gehören neben zahlreichen überwiegend als Kommensalen in Erscheinung tretenden Spezies die humanpathogenen Keime *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae*.

1.1 Aufbau

Dem generellen Aufbau gramnegativer Organismen folgend besitzen Neisserien eine innere und eine äußere Zellmembran, die durch eine dünne Peptidoglykanschicht voneinander getrennt sind. Die äußere Zellmembran enthält neben Lipooligosacchariden zahlreiche Membranproteine (*Outer membrane proteins, OMPs*). Darüber hinaus werden pathogene Meningokokkenstämme von einer Polysaccharidkapsel umhüllt.

1.2 Epidemiologie

Aufgrund der Kapselchemie lassen sich 13 Serogruppen unterscheiden, von denen A, B, C, Y und W-135 medizinische Bedeutung erlangt haben. Die Differenzierung immunogener Oberflächenproteine bildet die Grundlage der traditionellen Serotypisierung: So wurden anhand der Proteine PorB 20 Serotypen und anhand PorA 10 Serosubtypen definiert. Unterschiede im Lipooligosaccharid lassen die Unterscheidung von 13 Immunotypen zu. Die Serotypisierung ist für die Impfstoffentwicklung von nachhaltiger Bedeutung (van Deuren u. a., 2000).

Neuere Typisierungsverfahren basieren auf Varianzanalysen ausgewählter Stoffwechselfgene: Bei der *Multi Locus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) werden Allele aufgrund unterschiedlicher Laufeigenschaften der Genprodukte in der elektrophoretischen Auftrennung differenziert. Allelprofile lassen sich zu *Electrophoretic Types* (ET) zusammenfassen. Beim *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) werden Polymorphismen in

den Gensequenzen detektiert und analog zu ET *Sequence Types* (ST) definiert (Maiden u. a., 1998). Tabelle 3 gibt die Zuordnung verschiedener Allelkombinationen zu ET- und ST-Gruppen wieder. Diese Verfahren sind geeignet, um die Verteilung unterschiedlicher Linien in der Population zu untersuchen, wobei die MLST heute den Goldstandard definiert. Sie korrelieren nicht unbedingt mit der traditionellen Serotypisierung. So konnte in einzelnen Fällen eine Konversion der Kapsel-eigenschaft B nach C innerhalb eines Klons direkt nachgewiesen werden (Swartley u. a., 1997)

MLEE-Linien	MLST-Linien	Allel an den folgenden Genloci						
		abcZ	adk	aroE	fumC	gdh	pdhC	pgm
Subgruppe I	ST-1 Komplex	1	3	1	1	1	1	3
Subgruppe IV	ST-4 Komplex	1	3	3	1	4	2	3
Subgruppe III	ST-5 Komplex	1	1	2	1	3	2	3
Cluster A4	ST-8 Komplex	2	3	7	2	8	5	2
ET-37 Komplex	ST-11 Komplex	2	3	4	3	8	4	6
ET-5 Komplex	ST-32 Komplex	4	10	5	4	6	3	8
Linie 3	ST-41 Komplex	3	6	9	5	9	6	9

Tabelle 3: MLST-Schema

Meningokokkeninfektionen kommen weltweit als endemische Infektionen vor. Besonders gefährdet sind Kleinkinder im Alter von einem halben bis zu 4 Jahren und Jugendliche. In Ländern der dritten Welt ist die Mehrzahl der Infektionen auf die Serogruppe A zurückzuführen, gefolgt von der Serogruppe C. Die durchschnittliche Inzidenz beträgt hier 10 bis 25 Erkrankte auf 100000 Einwohner. Südlich der Sahara gelegene Länder unterliegen einer ausgeprägten jährlichen Erkrankungshäufung gegen Ende der Trockenzeit und werden zum so genannten Meningitis-Gürtel zusammengefasst. In Epidemiezeiten trägt *Neisseria meningitidis* mit einer Inzidenz von bis zu 1000 pro 100000 Einwohner somit erheblich zur Sterblichkeit vor allem der Kinder in diesen Regionen bei.

In entwickelten Ländern dominieren die Serogruppen B und C, wobei mehr als 50% der Infektionen durch Keime der Serogruppe B verursacht werden. Die Inzidenz der Meningokokkeninfektionen beträgt in Europa im Schnitt 1 auf 100000 mit saisonaler Häufung in den ersten Monaten des Jahres. Hyperendemisch lokale Erhöhungen der Inzidenzrate auf bis zu 50 kommen vor und sind mit dem Neueintritt eines virulenten

Klons in eine empfängliche Population verknüpft. Die epidemiologische Situation ist sehr komplex und macht die Schwierigkeit der Impfstoffentwicklung deutlich, Epitope zu finden, die konserviert sind und in allen pathogenen Stämmen exprimiert werden: Stämme der Serogruppe B, vor allem des ST-32-Komplex und des ST-41/44-Komplex (Linie-3), verursachen seit Mitte der 1970er Jahre hyperendemische Infektionen in Norwegen, Island, England und in den Niederlanden. ST-32 Stämme wurden zuerst in China, dann in weiteren Teilen Ostasiens, Spanien und Teilen Südamerikas isoliert. Zur selben Zeit tauchten Stämme der Linie-3 in Europa auf. In den 1990er Jahren wurde eine Zunahme in Neuseeland, England und Chile beobachtet.

Stämme des ST-11-Komplex kommen weltweit vor. In den 1980er Jahren waren die meisten Fälle der Serogruppe C in Europa und den vereinigten Staaten auf ST-11-Klone zurückzuführen. In den 1990er Jahren führten verwandte ET-15-Klone der Serogruppe C zu *Cluster* artigen Ausbrüchen in Nordamerika, Israel, Tschechien, Australien und England (Caugant, 1998). Der in dieser Arbeit untersuchte Stamm MC58 gehört dem ST-32-Komplex an.

Infektionen der Gruppen Y und W135 sind selten und in der Regel mit Defekten in der terminalen Komplementkaskade der betroffenen Personen assoziiert (Fijen u. a., 1994). Allerdings tauchten in den USA mitte der 1990er Jahre Stämme der Serogruppe Y auf, die für endemische *Cluster* verantwortlich sind (Racoosin u. a., 1998).

1.3 Klinik

1.3.1 Manifestationsformen

Erste Symptome einer invasiven Meningokokkeninfektion sind unspezifisch und können mit banalen grippalen Infekten verwechselt werden. Frösteln, akuter Fieberanstieg, Schmerzen in der Lendenwirbelsäule und in den Oberschenkeln, generalisierte Muskelschmerzen können als Zeichen der Bakteriämie auftreten.

Die Meningitis stellt die häufigste Manifestationsform dar und beginnt meist 18 bis 36 Stunden nach der Bakteriämie. Symptome sind plötzliches Auftreten von Kopfschmerzen, Fieber, Nackensteifigkeit, oft begleitet von Übelkeit, Erbrechen, Photophobie und Bewusstseinsstörung bis hin zum Koma. Bisweilen findet sich ein makulopapuläres Exanthem mit Petechien an den Extremitäten als Zeichen einer bestehenden septischen Komponente.

Klinische Zeichen der meningealen Reizung nach Brudzinski, Kernig und Lasège können positiv ausfallen. Säuglinge zeigen weniger typische Symptome wie ein erhöhtes Schlaf-

bedürfnis, Berührungsempfindlichkeit und gelegentlich gespannte Fontanellen. Eine Nackensteifigkeit fehlt meist.

Innerhalb nur weniger Stunden nach Beginn der Bakteriämie kann sich eine fulminante Sepsis mit plötzlich hohem Fieberanstieg entwickeln. Eine menigeale Beteiligung kann fehlen. Es tritt ein makulopapuläres Exanthem mit petechialen Blutungen auf, das sich zu Ekchymosen und Hautnekrosen als Zeichen der intravasalen disseminierten Gerinnung ausweiten kann. Extremform ist das Waterhouse-Friderichsen-Syndrom mit Hämorrhagien innerer Organe, speziell der Nebennieren. Zeichen des beginnenden Schocks sind kalte Akren, verzögerte kapilläre Blutfüllung, schließlich Tachykardie und Hypotension. Als weitere Komplikationen können sich ARDS (acute respiratory distress syndrome) und Versagen mehrerer Organsysteme einstellen. Seltener finden sich Pneumonie, Pharyngitis und Lokalsymptome nach hämatogener Streuung. Bei Patienten mit Defiziten im Komplementsystem können chronisch rezidivierende Meningokokkämien mit intermittierendem Fieber, Exanthem, Arthralgien und Kopfschmerzen vorkommen (Rosenstein u. a., 2001; van Deuren u. a., 2000; Gärtner, 2000).

1.3.2 Diagnose

Bei der Meningitis finden sich im Liquor eine Granulozytose und Proteinerhöhung als Zeichen der eitrigen Entzündung. Oft lassen sich Neisserien im Grampräparat darstellen. Da nach früh einsetzender Antibiotikatherapie der mikroskopische und kulturelle Nachweis oft nicht mehr gelingt, gewinnt die PCR-Diagnostik an Bedeutung. Bei der Sepsis lassen sich die Erreger aus Hautläsionen, Blut und Liquor isolieren.

1.3.3 Therapie

Ohne Therapie verläuft die Infektion meist tödlich. Im Vordergrund steht die möglichst rasche Antibiotikagabe. Bis zur Diagnosesicherung erfolgt sie kalkuliert. Antibiotikum der Wahl bei nachgewiesener Meningokokkeninfektion ist Penicillin G. Bei Patienten mit septischen Verläufen werden zusätzlich intensivmedizinische Maßnahmen zur Schockbekämpfung notwendig. Glukokortikoide, Infusion von Plasmabestandteilen und immunmodulierende Therapien sind Gegenstand der Diskussion. Die Letalität liegt insgesamt bei 9 bis 12 % und steigt bei Patienten mit septischen Verläufen auf bis zu 40% an. 11 bis 19% der Genesenen tragen Schäden davon wie Taubheit, neurologische Behinderungen oder Verlust von Gliedmaßen (Rosenstein u. a., 2001).

1.3.4 Prävention

Kontaktpersonen von Erkrankten können mit Rifampicin oral einer invasiven Infektion vorbeugen. Bei einsetzendem Fieber nach Kontakt kann eine Infektion mit Penicillin intravenös kuptiert werden. Gegen die Serogruppen A, C, W-135 und Y existieren Kapselpolysaccharid-Impfstoffe, gegen die Serogruppen A und C auch Kapsel-Konjugatimpfstoffe. Mit einem tetravalenten Kapsel-Konjugatimpfstoff gegen alle vier oben genannten Serogruppen wurden klinische Studien durchgeführt (Campbell u. a., 2002)

1.4 Pathogenese

1.4.1 Virulenzfaktoren

Kapsel Durch die Kapsel wird die Phagozytose durch Makrophagen (McNeil u. a., 1994) und dendritische Zellen (Kolb-Maurer u. a., 2001) inhibiert. Weiterhin trägt sie zum Schutz vor komplementvermittelter Lyse bei (Vogel und Frosch, 1999). Unterschiede in der Zusammensetzung der Kapselpolysaccharide bilden die Grundlage für die Einteilung in Serogruppen. Das Kapselantigen der Serogruppe B besteht aus ($\alpha 2 \rightarrow 8$)-verknüpfter Polysialinsäure. Es ist identisch mit dem Kohlenhydratanteil des humanen neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM, welches in fetalen und adulten Geweben exprimiert wird, somit nicht immunogen ist und als Impfantigen nicht zur Verfügung steht (Weisgerber u. a., 1990). Die Gene der Serogruppe B-Meningokokken für die Kapselbildung sind im *cps*-Genlocus kodiert. Er enthält die für die intrazelluläre Synthese der Sialinkapsel zuständigen Gene *siaA* bis *siaD* und die Exportgene *ctrA* bis *ctrD* (Frosch u. a., 1989). Bei der Serogruppe A finden sich neben anderen Synthesewegen Unterschiede in den Exportgenen *ctrB* und *ctrC*, was auf Unterschiede in der Substrataffinität hindeutet (Tettelin u. a., 2000).

Typ-IV-Pili Pili sind filamentöse Strukturen, welche über die Kapseloberfläche herausragen. Damit sind sie für den initialen Wirtszellkontakt von entscheidender Bedeutung. Weiterhin tragen sie zur natürlichen Kompetenz der Neisserien bei. Schließlich verleihen sie Motilität durch kontinuierlichen Auf- und Abbau ihrer Struktur (Merz u. a., 2000). Polymere aus Pilin-Untereinheiten bilden das Gerüst. PilC1 sitzt am freien Ende und wird für die Wechselwirkung mit CD 46, einem verbreiteten Oberflächenprotein humaner Zellen, verantwortlich gemacht (Kallstrom u. a., 1997). An der

Basis lokalisiert ist der Synthesepapparat, der in seinem Aufbau einem Typ-II-Sekretionssystem gleicht (Sandkvist, 2001).

Der Genlocus für Pilin enthält mehrere Strukturgenkassetten, von denen nur eine dem intakten Promotor nachgeschaltet ist und transkribiert wird. Durch Rekombination wechseln die Strukturkassetten ihre Position innerhalb des Locus und somit auch ihre Beziehung zum Promotor: Die Pilin-Expression ist phasenvariabel (Meyer und van Putten, 1989).

Opa und Opc Opa und Opc sind integrale Proteine der äußeren Membran (OMP). Opa-Proteine vermitteln dichten Kontakt mit Epithel- und Endothelzellen und sind notwendig für die Durchquerung dieser Zellbarrieren. Interaktionspartner sind CD66-Moleküle auf den Wirtszelloberflächen. Sie bilden eine Gruppe innerhalb der CEA-Rezeptor-Familie und finden sich in unterschiedlicher Verteilung auf zahlreichen Zelltypen. Innerhalb der Meningokokkenpopulation existiert eine Vielfalt an Opa-Allelen, von denen bis zu vier von einem Bakterium phasenvariabel exprimiert werden. Somit bedingt die Opa-Allelverteilung eines Bakteriums die Präferenz für ein bestimmtes CD66-Molekülmuster. Von einigen Meningokokkenstämmen werden zusätzlich Opc-Moleküle exprimiert. Ihnen wird aufgrund von Zellkulturstudien eine herausragende Bedeutung für die Interaktion mit Endothelzellen beigemessen. Als Rezeptor wurden Heparansulfat-Proteoglykane identifiziert (de F. P. Vries u. a., 1998). Alternativ wird über Vitronektin oder Fibronektin eine Bindung an Integrine vermittelt (Virji u. a., 1994), (Unkmeir u. a., 2002).

Porine: PorA, PorB Die Porine PorA und PorB bilden Kanäle in der äußeren Zellmembran. Sie sind für Ionen und Nährstoffe durchlässig. Bei dichtem Kontakt zu Wirtszellen können Porine in die eukaryontische Zellmembran translozieren und über die Veränderung des Membranpotentials und den Einstrom von Ionen wie Ca^{2+} das Verhalten der Zellen modulieren (Ulmer u. a., 1992). So wurde die Inhibition der Degranulation von Granulozyten, Induktion von Apoptose und Beeinflussung von Aktinpolymerisation durch Porine beobachtet, (Haines u. a., 1988), (Christoph Dehio u. a., 2000), (Giardina u. a., 1998).

Porine werden aufgrund hypervariabler Regionen auf der Außenseite zur Serotypisierung einzelner Stämme herangezogen. Von PorB sind zwei Formen bekannt, PorB2 und PorB3, von denen eine konstitutiv exprimiert wird. Die Expression von PorA ist phasenvariabel.

Eisenaufnahme Neisserien besitzen keine Siderophoren, um freies Eisen binden zu können. Sie haben jedoch verschiedene Strategien entwickelt, um organisch gebundenes Eisen aus ihrem Umfeld aufzunehmen. Die Nutzung der Eisenvorkommen des menschlichen Wirts ist essentiell für eine invasive Infektion. Der Wirtsorganismus hält hingegen die Konzentration an freiem Eisen möglichst niedrig. Die Eisentransportproteine Transferrin und Laktoferrin binden freies Eisen im Serum, auf mukosalen Oberflächen und anderen Kompartimenten. Sie sind somit Bestandteil der ungerichteten Abwehr und werden im Rahmen der akuten Phase einer systemischen Entzündungsreaktion vermehrt gebildet. Neisserien können über die Proteine TbpA und TbpB Transferrin aufnehmen (Gray-Owen und Schryvers, 1996), (Pettersson u. a., 1998). Parallel hierzu bilden die Proteine LbpA und LbpB einen Rezeptor für das Laktoferrin (Schryvers und Morris, 1988). An der Internalisierung des Eisens sind FbpA und FbpB/C beteiligt (Khun u. a., 1998). Schlüsselprotein für den Transmembrantransport ist in allen oben genannten Fällen der TonB-Komplex (Stojiljkovic und Srinivasan, 1997). Eine andere Quelle stellt das Häm-gebundene Eisen dar. HmbR vermittelt die Aufnahme von freiem Häm und Hämoglobin, HpuA und HpuB die Aufnahme von Hämoglobin und an Haptoglobin gebundenem Hämoglobin (Stojiljkovic u. a., 1996), (Lewis u. a., 1997).

LPS Endotoxin ist ein hochpotenter Entzündungsauslöser. Es aktiviert das Komplementsystem, stimuliert Makrophagen und Dendritische Zellen zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen. Das Endotoxin der Neisserien besteht aus Lipid A, mit dem es in der äußeren Membran verankert ist, und dem acht bis zwölf Zucker umfassenden Core-Oligosaccharid. Im Gegensatz zu anderen gramnegativen Bakterien bilden Neisserien keine polymeren O-Seitenketten aus, darum wird das Endotoxin von einigen Autoren auch als Lipooligosaccharid bezeichnet. Das Lipid A wird für die entzündungsauslösende Wirkung verantwortlich gemacht, während das Core-Oligosaccharid die immunologischen Eigenschaften bestimmt. Mehrere Glykosyltransferasen sind an der Synthese des Core-Oligosaccharids beteiligt. Sie sind phasenvariabel, Klone des gleichen Stammes können somit unterschiedliche LPS-Phänotypen ausbilden. Sie werden als Immunotypen L charakterisiert. Bestimmte Epitope sind mit invasiver Infektion korreliert.

IgA-Protease Es wird angenommen, dass die sezernierte IgA1-Protease einen wichtigen Faktor für die nasopharyngeale Kolonisierung darstellt, indem sie mukosale IgA-Antikörper spaltet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß durch Spaltung des LAMP1 Proteins die phagolysosomale Fusion blockiert wird (Hauck und Meyer, 1997)

1.4.2 Pathogenese invasiver Infektionen

Erkenntnisse über molekulare Interaktionen beruhen größtenteils auf *in vitro* Untersuchungen, so daß Ausführungen zur Pathogenese stets modellhaft bleiben müssen. Diese sind hier für Meningokokken der Serogruppe B recherchiert.

Übertragung und Kolonisierung *Neisseria meningitidis* ist streng anthropophil. Nach aerogener Übertragung kolonisieren die Bakterien die Schleimhaut des Nasopharynx. Etwa 10-15% aller Personen sind kolonisiert, ohne Symptome einer invasiven Infektion zu zeigen (Cartwright u. a., 1987; Verdu u. a., 2001). Prävalenzstudien deuten auf eine schwache klonale Struktur innerhalb der Trägerisolate hin, während invasive Infektionen überwiegend durch wenige pathogene Stämme hervorgerufen werden (Verdu u. a., 2001). Die Oberflächenhaftung wird vor allem durch die Interaktion der Pili mit CD46-Molekülen auf den zilienträgenden Mukosaepithelzellen vermittelt, wodurch auch ein Signal in die Wirtszelle transduziert wird. Durch Pilusretraktion wird der Zellkontakt verstärkt, eine Wechselwirkung von Opa mit CD66 und Opc mit HSPG-Rezeptoren wird möglich. Die sezernierte IgA1-Protease kann vorhandene mukosale Antikörper inaktivieren.

Invasion Die Bindung von Opa und Opc stimuliert die Aufnahme und Transzytose der jetzt unbekapselten Erreger durch das Mukosaepithel. PorB und die IgA1-Protease können die Phagosomenreifung und die Lysosomenfusion behindern.

Welche Faktorenkonstellationen schließlich dazu führen, dass kolonisierende Keime die Epithelbarriere durchbrechen, ist nicht klar. Ein Zusammenhang scheint mit Schleimhautirritationen durch Zigarettenrauch oder virale Infektionen der oberen Atemwege zu bestehen (Fischer u. a., 1997; Moore u. a., 1990).

Überleben im Blutstrom Im Blutstrom werden die Erreger mit den Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität konfrontiert: Komplementlyse, Phagozytose und Eisensequestrierung. Sind darüber hinaus spezifische Antikörper vorhanden, folgt in der Regel eine rasche Keimeliminierung.

Pathogenen Neisserien gelingt es, den Immunmechanismen zu entgehen: Die Kapsel verleiht Schutz vor Phagozytose und Komplement-vermittelter Zellyse, PorB und IgA1-Protease wirken einer effektiven Keimabtötung im Phagolysosom entgegen. Kontinuierliche Abschnürung von Vesikeln der äußeren Membran, sogenannter *Blebs*, lassen die

Abwehrmechanismen in die Leere greifen. Durch Rezeptoren für organisch gebundenes Eisen sind die Erreger in der Lage, körpereigene Eisenvorräte für sich zu nutzen. Die Antigenstruktur zahlreicher Oberflächenproteine ist aufgrund von Phasenvariation, Mutation und horizontalem Gentransfer hochvariabel, so dass eventuell vorhandene Antikörper nicht mehr binden.

Meningokokkämie kann sich in zwei unterschiedlichen Krankheitsbildern manifestieren: Die passagere Meningokokkämie, welche einer baldigen Clearance unterliegt, jedoch nach Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke eine eitrige Meningitis hervorrufen kann.

Die Meningokokkensepsis, bei der eine rasche Keimvermehrung in der Blutbahn erfolgt, verläuft foudroyant und ist durch Schock und disseminierte intravasale Gerinnung (*Disseminated intravascular clotting*, DIC) gekennzeichnet. Als Schlüsselmolekül wird vor allem Endotoxin verantwortlich gemacht. Wegen der raschen Erregervermehrung und der Abschnürung von Membranvesikeln ist es in großen Mengen vorhanden. Es führt zur Aktivierung der Komplementkaskade, des Gerinnungssystems und des Kallikrein-Bradykininsystems. Durch Verbrauch regulierender Proteine kommt es zur unkontrollierten Komplementaktivierung mit Freisetzung der Anaphylatoxine C3a und C5a in hohen Mengen. Der Grad der Komplementaktivierung korreliert mit der Schwere des Schockgeschehens (Brandtzaeg u. a., 1989). Über LPS-binding protein vermittelte CD14 Interaktion kommt es zur Zytokinfreisetzung durch mononukleäre Zellen (Salyers und Whitt, 2002). Hierzu zählen IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α , wobei die Höhe der Zytokinpiegel mit der Schwere des Krankheitsbildes korreliert (van Deuren u. a., 2000). Sie führen zur Neutrophilen- und Makrophagenrekrutierung aus dem Knochenmark und Endothelaktivierung. Durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade kommt es zur Mikrothrombenbildung in den Kapillaren und schließlich durch Faktorenmangel zum Vollbild der DIC mit Petechien und Ekchymosen an der Haut und multiplen Einblutungen an den inneren Organen, besonders ausgeprägt an den Nebennieren (van Deuren u. a., 2000).

Invasion des Subarachnoidalraumes Das Zentrale Nervensystem ist durch spezielle Schrankensysteme vor ungehindertem Stoffaustausch mit der Blutbahn geschützt. Die Blut-Hirnschranke wird von Endothel, Basalmembran und Astrozytenfortsätzen aufgebaut. *Tight junctions* verleihen dem Endothel hohe Dichtigkeit. Die Kapillaren der *Plexus chorioidei* sind mit fenestriertem Endothel ausgekleidet. Hier bilden *Tight junctions* zwischen den Zellen des sezernierenden Epithels die Blut-Liquorschranke aus. Interaktion von Neisserien mit Endothel beider Schrankensysteme wurde beobachtet

(Pron u. a., 1997), die genaue Eintrittspforte bleibt jedoch unklar (Nassif u. a., 2002). Es wird angenommen, dass die Bakterien das Endothel via Transzytose durchqueren. Die Zellinteraktion wird wieder über Pili, Opa und Opc vermittelt. Nach Erreichen des Subarachnoidalraumes vermehren sich die Erreger in Abwesenheit von Komplement ungestört. Die Endotoxinfreisetzung führt zur intrathekalen Zytokinfreisetzung, darunter IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 TNF α und NO. Die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke nimmt zu, es kommt zum Influx von neutrophilen Granulozyten: Eine eitrige Meningitis resultiert (van Deuren u. a., 2000).

1.5 Impfstoffentwicklung

Die uncharakteristischen Frühsymptome, der plötzliche Beginn, der zu spät behandelt fatale Ausgang und die nicht seltenen bleibenden Schäden nach Überstehen der Infektion unterstreichen die dringende Notwendigkeit einer wirksamen Impfprotektion. Ein Impfstoff sollte anhaltenden Schutz auch im Säuglingsalter gewähren und nicht auf bestimmte Serotypen begrenzt sein. Für die Serogruppen A, C, Y und W135 scheint dieses Ziel erreicht zu sein, für die Gruppe B stellt es nach wie vor eine Herausforderung dar.

1.5.1 Entwicklung der natürlichen Immunität

Spezifische Antikörper verleihen schützende Immunität. Sie führen zur Opsonisierung und damit zur verstärkten Aufnahme durch phagozytierende Zellen via Interaktion mit Fc γ -Rezeptoren. Über den klassischen Weg tragen sie zur Komplementaktivierung bei, was wiederum zur verstärkten Phagozytose via Komplementrezeptoren C3R beiträgt und zur Bakteriolyse durch terminale Komplementkomponenten führt, der sogenannten Serumbakterizidie. Serumtitel bakterizider Antikörper sind mit der Inzidenz einer Infektion negativ korreliert (Goldschneider u. a., 1969): Maternale Antikörper verleihen dem Neugeborenen Nestschutz: 50% verfügen über bakterizide Serumaktivität, die Inzidenz ist gering. Im ersten Lebensjahr fällt die Immunität rapide ab, weniger als 20% zeigen Serumbakterizidie. Zusätzlich ist die Phagozytenfunktion eingeschränkt und die Spiegel terminaler Komplementkomponenten niedrig. Die Inzidenz erreicht in dieser Altersgruppe ihren Höhepunkt. Dann nimmt die Immunität stetig zu, so dass 50 bis 80% der Zwölfjährigen und schließlich 65 bis 85% der Erwachsene bakterizide Antikörper im Serum aufweisen. Ausschlaggebend ist die Kolonisation mit Bakterien, die gemeinsame Epitope mit pathogenen Neisserien aufweisen und so zur Bildung kreuzprotektiver Antikörper führen. Beispielfhaft ist die Kolonisation des Pharynx mit kommensalen

Neisserienspezies wie *Neisseria lactamica* (Gold u. a., 1978). Während Antikörper gegen Neisserien der Serogruppe A und C überwiegend gegen Kapslepitope gerichtet sind, stehen bei der Serogruppe B *Outer membrane proteins (OMPs)* und LPS als Epitope im Vordergrund (Pollard und Frasch, 2001).

Nach überstandener Meningokokkeninfektion werden Antikörper der Klassen IgG - vor allem IgG1 und IgG3 -, IgA und IgM gebildet. Nach Infektion mit Neisserien der Serogruppe B fanden sich kaum altersabhängige Unterschiede im Titeranstieg spezifischer IgG Antikörper, jedoch waren Kinder unter zehn Jahre nicht in der Lage, bakterizide Antikörperantworten zu generieren. Altersbedingte Unterschiede in der Serumbakterizidie scheinen also in erster Linie in der Qualität der Antikörper begründet zu sein (Pollard u. a., 1999).

Messung der Protektivität Allgemein wird das Vorhandensein bakterizider Antikörper mit Schutz vor invasiver Infektion gleichgesetzt. Es herrscht jedoch keine Einigkeit darüber, ab welchen Titerstufen von einer sicheren protektive Wirkung ausgegangen werden kann. Der Beitrag opsonisierender Antikörper und Mechanismen der angeborenen Immunität wird durch Bakterizidiebestimmungen nicht erfasst (Morley und Pollard, 2001).

1.5.2 Polysaccharidvakzine

Erste Vakzinen wurden aus gereinigtem Kapselpolysaccharid der Serogruppen A und C hergestellt (Gotschlich u. a., 1969). Da die hervorgerufenen Immunantworten T_H-Zell unabhängige B-Zellantworten sind, erfolgt keine Memorierung. Entsprechend wurde ein rascher Titerabfall beobachtet (Reingold u. a., 1985). Kleinkinder erlangten keinen Impfschutz. Registrierte Polysaccharidvakzinen existieren für die Serogruppen A, C, W135 und Y. Versuche mit gereinigtem B-Polysaccharid riefen keinen meßbaren Titeranstieg hervor (Pollard und Frasch, 2001)

Glykokonjugatvakzine Nach chemischer Konjugation mit Proteinen werden Polysaccharidantigene von antigenpräsentierenden Zellen auf MHCII-Molekülen dargeboten und rufen somit eine T-Zell abhängige Immunreaktion hervor, die sich durch Memorierung und Fähigkeit zum *Boostering* auszeichnet. Gruppe-C-Kapselpolysaccharid wurde partiell hydrolysiert, der Größe nach fraktioniert und an ein Trägerprotein gebunden. Die so hergestellte Glykokonjugatvakzine ruft hohe Titer avider Antikörper auch bei Säuglingen hervor. Sie ist als Vakzine registriert und hat sich als hochprotektiv erwiesen.

Tetravalente Konjugatvakzinen mit A, C, Y, und W135-Polysacchariden in Kombination sind in klinischer Erprobung (Campbell u. a., 2002).

Gruppe B-Polysaccharid-Vakzine Wie unter 1.4.1 auf Seite 5 dargestellt, ist das B-Kapselpolysaccharid wegen Kreuztoleranz mit körpereigenen Strukturen nicht immunogen. Ein durch N-Propionylierung der Sialinsäurereste modifiziertes Polysaccharid rief nach Proteinkonjugation im Tierversuch hohe Antikörpertiter hervor (Jennings u. a., 1987), (Jennings u. a., 1986). Ob hierdurch Autoimmunität induziert wird, ist ungewiss (Pollard und Frasc, 2001). Mit monoklonalen Antikörpern gegen Kapselepitope, die keine Kreuzreaktivität mit neuronalen Zelllinien aufweisen, wurden Oligopeptide, die gleiche Bindungsaffinitäten aufweisen, sogenannte Peptidmimotope, identifiziert (Shin u. a., 2001).

1.5.3 Outer-Membrane-Vesicles (OMV)

Da präzipitierte Oberflächenproteine nur geringe Immunogenität aufwiesen, wurden Präparationen aus gereinigten Vesikeln der äußeren bakteriellen Membran entwickelt, in denen die Oberflächenproteine in ihrer natürlichen Konformation enthalten sind. Durch Behandlung mit Detergentien sind sie weitgehend frei von LPS. Sie werden als AIOH-Adsorbate verabreicht. In den 1980er Jahren wurden zur Eindämmung von Hyperendemien auf Cuba und in Norwegen monovalente OMV-Vakzinen aus dem jeweiligen Erregerstamm hergestellt und in mehreren Studien eingesetzt (Sierra u. a., 1991), (Bjune u. a., 1991). Bei Jugendlichen und Erwachsenen wurden bakterizide Antikörpertiter gemessen, jedoch nicht bei Säuglingen und Kleinkindern. Als Hauptimmunogen wurde PorA identifiziert, welches eine subtypspezifische Immunantwort generiert. So konnten weitere Studien in Chile und Island eine nur gering ausgeprägte Kreuzprotektivität bezüglich anderer Subtypen demonstrieren (Tappero u. a., 1999). In den Niederlanden wurde daraufhin eine hexavalente OMV-Vakzine entwickelt, in der die PorA-Moleküle der sechs häufigsten europäischen Serosubtypen enthalten sind, um damit 80% der pathogenen Stämme in Europa abzudecken. Auch hiermit wurden bei älteren Kindern und Erwachsenen subtypspezifische Immunantworten generiert, die jedoch nur von begrenzter Dauer waren. Kleinkinder reagierten kaum mit einem Titeranstieg (Cartwright u. a., 1999).

1.5.4 Subunit-Vakzine

Die Suche nach konservierten, in allen Serotypen vorkommenden, immunogenen Oberflächenstrukturen hat einige potentielle Kandidaten hervorgebracht, die gegenwärtig evaluiert werden.

Dazu zählen TbpB das *Transferrin binding protein*, welches essentiell ist für die Eisenaufnahme im Wirtsorganismus und somit von allen pathogenen Neisserien exprimiert wird. Während für TbpB im Mausmodell Protektion demonstriert werden konnte, wurden in ersten klinischen Studien nur geringe Titer bakterizider Antikörper gemessen (Danve u. a., 1993), (Danve u. a., 1998). TbpA wird derzeit alternativ oder in Kombination mit TbpB evaluiert (West u. a., 2001).

Neisserial surface protein A ist hochkonserviert und in der Lage, Mäusen schützende Immunität gegen Stämme der Serogruppen A bis C zu verleihen (Martin u. a., 1997). Jedoch zeigten weiteren Studien mit lebenden Bakterien stammspezifische Unterschiede in der Fähigkeit antiNspA-Antikörper zu binden (Moe u. a., 2001).

LPS ruft eine Immuntypen-spezifische Antikörperantwort hervor. Im Tierversuch erwiesen sich jedoch Antikörper gegen ein konserviertes Epitop der inneren Core-Region als kreuzprotektiv gegenüber verschiedene Serogruppe B und A-Stämmen (Plested u. a., 1999). Eine Konjugatvakzine mit Inner-Core-Sacchariden rief serumbakterizide Antikörperantworten gegen einige Serogruppe B-Stämme hervor. (Morley und Pollard, 2001)

1.5.5 Genomanalysen

Die Publikationen der Genomsequenzen von Z2491, einem Stamm der Serogruppe A, und MC58, einem Stamm der Serogruppe B, im Jahr 2000 hat neue Wege auf der Suche nach geeigneten Vakzinekandidaten eröffnet (Parkhill u. a., 2000), (Tettelin u. a., 2000).

In einem als *Reverse vaccinology* bezeichneten Ansatz wurden aufgrund von Sequenzanalysen 570 Gene des MC58 Stammes als potentiell membranständig identifiziert. Davon wurden von 350 Genen in *E. coli* exprimiert und zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt. Es wurden sieben Proteine ausgewählt, die oberflächenbindende bakterizide Antikörper hervorgerufen hatten und keiner Phasenvariation unterliegen. Hiervon zeigten 5 Kandidaten zu mehr als 99% Homologie mit 31 getesteten Stämmen aller Serogruppen sowie mit *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria lactamica*. Mit den Proteinen generierte Immunsere zeigten stammübergreifende Bakterizidie (Pizza u. a., 2000).

1.5.6 Genexpressionsstudien

Wichtig für die Auswahl potentieller Vakzinekandidaten ist zu wissen, ob das entsprechende Antigen auch unter Infektionsbedingungen exprimiert wird und welche Gene an der Pathogenese beteiligt sind. *In silico*-Genomanalysen und *in vitro*-Experimente liefern darüber keine Informationen.

Signature tagged mutagenesis In einer Tiermodellstudie wurden Transposoninsertionsmutationen *in vitro* generiert und anschließend in Neisserien transformiert, wobei jede Mutante durch eine spezifische Sequenz im Insertionsbereich gekennzeichnet wurde. Ein Bakteriengemisch mit verschiedenen Mutanten wurde jungen Ratten intraperitoneal injiziert und nach zwei Tagen reisoliert. Über Vergleiche der überlebenden Bakterien mit denen der ursprünglichen Suspension konnten 70 Mutanten identifiziert werden, die aufgrund ihrer Mutation nicht fähig waren, im Tier zu überleben. In diesen Mutanten fanden sich Insertionen in bekannten Virulenzgenen, die Kapsel, LPS und Eisenaufnahme-proteine betreffen. 65 Gene wurden erstmals mit Virulenz assoziiert, darunter zahlreiche Stoffwechselgene (Sun u. a., 2000)

Microarrays Auf der Basis der Genomsequenz lassen sich *Microarrays* herstellen, mit denen Transkriptionsprofile unter verschiedenen Umweltbedingungen analysiert werden können. Die Etablierung eines solchen Systems ist Gegenstand dieser Arbeit, es wird im Folgenden ausführlich erläutert.

1.5.7 Lebendvakzine

Als Alternative zur Subunitvakzine wird die Entwicklung einer rekombinanten attenuierten Lebendvakzine diskutiert. Der epidemiologischen Situation entsprechend können verschiedene attenuierte Serotypen enthalten sein. Sämtliche Antigene sind in ihrer natürlichen Konformation enthalten, darunter auch solche, die lediglich unter Wachstumsbedingungen im Wirt exprimiert werden. Intranasale Applikation würde die mukosale Immunantwort in Form von sezernierten Antikörpern der Klasse Ig-A stimulieren und damit die Kolonisation mit pathogenen Stämmen verhindern. Umstritten ist, ob die Sicherheit einer solchen Vakzine garantiert werden kann. Lipooligosaccharid ist wesentlicher Induktor der Zytokinkaskade, die für foudroyante septische Verläufe mit verantwortlich ist. Andererseits ist ein Impferfolg an eine adäquate Zytokinantwort geknüpft. Besonderes beachtet werden muß die Fähigkeit der Neisserien, DNA aus ihrem

Umfeld aufzunehmen. Durch Deletion von Genen, die natürliche Kompetenz vermitteln, muss ausgeschlossen werden, dass dadurch eine Reversion zum Wildtyp stattfinden kann (Tang u. a., 1999).

2 Microarrays

2.1 Das System

Grundprinzip zur spezifischen Detektion von Nukleinsäuren ist die Formierung einer Doppelhelix durch Zusammenlagerung komplementärer Nukleinsäurestränge. Dieser Hybridisierungsvorgang ist nach Denaturierung zu Einzelsträngen komplett reversibel. Durch Immobilisierung einzelsträngiger Nukleinsäuremoleküle bekannter Spezifität lassen sich Sondensysteme konstruieren, mit denen sich in Lösung befindliche, mit Radionukliden oder Fluoreszenzfarbstoffen markierte Nukleinsäuren durch Hybridisierung nachweisen lassen. Die Immobilisierung von DNA-Sonden auf Glasoberflächen ermöglicht die Unterbringung kleinster Mengen auf engem Raum: Im Vergleich mit Membransystemen entfällt die Diffusion der Nukleinsäureproben durch Poren, die Sonden sind direkt zugänglich und befinden sich auf einer Ebene an einem definierten Ort. Durch die Miniaturisierung der Sondensysteme zu sogenannten *Microarrays* lassen sich mehrere tausend Sonden auf einem Glasobjektträger fixieren, mit kleinen Probenvolumina hybridisieren und damit das Vorhandensein oder die Aktivität einer großen Anzahl von Genen parallel analysieren: Hybridisierung einer Probe bedeutet parallele Suche sämtlicher Moleküle nach einem zutreffenden Partner auf einer Affinitätsmatrix, bei der eventuelle Molekülpaarungen nach den Regeln der molekularen Erkennung erfolgen (Lockhart und Winzeler, 2000). Für die Anwendung von *Microarrays* zur Analyse der Genexpression gilt: Die Gesamtheit der transkribierten Gene ist eine Determinante für Zellphänotyp und Funktion. Sie wird als Expressionsprofil oder Transkriptom bezeichnet. Das Transkriptom ist hochdynamisch. Bei wechselnden Umweltbedingungen oder während normaler zellulärer Vorgänge wie Teilung ändert es sich rasch und umfangreich (Lockhart und Winzeler, 2000). Bei einem *Array-Experiment* werden stets zwei Zustände miteinander verglichen: RNA wird getrennt aus einer Zellpopulation, die Experimentalbedingungen ausgesetzt worden ist, und aus einer Kontrollkultur unter Standardbedingungen isoliert. Analog kann RNA aus zwei Populationen isoliert werden, die sich in unterschiedlichen Wachstumsphasen befinden. Ein Unterschied in der transkriptionellen Aktivität eines Gens zwischen Experiment und Standardbedingung bildet sich ab in der unterschiedli-

chen Mächtigkeit der eingesetzten mRNA Äquivalente, welche zu unterschiedlichen Hybridisierungsraten mit den entsprechenden Gensonden auf dem *Array* führen. Überwiegt die RNA-Menge eines Gens in der Experimentalkultur, spricht man von *Hochregulation* des Gens, überwiegt die RNA-Menge in der Kontrollkultur, von *Herunterregulation*. Beide Begriffe werden in dieser Arbeit rein deskriptiv verwendet. Werden die mRNA-Äquivalente unterschiedlich markiert, können die Proben aus beiden Kulturen auf den selben *Array* gegeben werden. Die Probenmoleküle sind somit einem einheitlichen Mikromilieu unterworfen und konkurrieren um die selben Bindungsstellen an den Sonden: Die Hybridisierung erfolgt kompetitiv. Die Bestimmung des Verhältnisses der Signalintensitäten der unterschiedlich markierten Proben an einem Sondenlocus (*Spot*) erlaubt somit Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandenen RNA-Mengenverhältnisse des transkribierten Gens. Die Hybridisierungsrate hängt unter anderem von der Sequenz ab. Somit lassen Intensitätsvergleiche zwischen verschiedenen *Spots* keine sicheren Rückschlüsse auf Unterschiede in der Genaktivitäten innerhalb einer Kultur zu. Das Transkriptom in seiner obigen Definition kann also nicht direkt, sondern nur in Form seiner ersten Ableitung analysiert werden.

2.1.1 Proben: cDNA, DNA

Die Nukleotide, die zur Hybridisierung gebracht werden, sind markierte Repräsentanten der zellulären mRNA. Aufgrund seiner freien OH-Funktion in 2'-Position ist RNA im Gegensatz zu DNA ein sehr reaktives Molekül. Da bakterielle mRNA weder *Cap* noch *Poly-A-tail* besitzt, ist sie besonders vor Degradation gefährdet. In der Bakterienzelle liegt die Halbwertszeit eines mRNA-Moleküls im Bereich weniger Minuten (Dietrich u. a., 2000). Um überhaupt eine repräsentative Probe zu erhalten, muss die RNA nach dem Zellaufschluss schnellstmöglich in eine stabile Lösung überführt werden (siehe Methodenteil). In der Regel wird die mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Hierbei werden markierte Nukleotide mit eingebaut. Im Reaktionsansatz liegt das Enzym im Überschuss vor, so dass die Anzahl der cDNA Transkripte proportional zur vorliegenden Menge der RNA-Matrix ist. Die Transkription eukaryontischer mRNA kann durch Poly-T-Primer initiiert werden, bei Vorliegen bakterieller RNA müssen *Random-Primer* oder genspezifische Primer verwendet werden. Zur Markierung werden Nukleotide eingesetzt, die entweder radioaktive Isotope wie ^{33}P enthalten oder Fluoreszenzfarbstoffe tragen. Für kompetitive Hybridisierungen werden die beiden Farbstoffe Cy3 und Cy5 regelmäßig verwendet, da die chromophorentragenden Nukleotide hohe

Einbauraten aufweisen, die Spektren für Anregung und Emission beider Farbstoffe weit auseinanderliegen und somit nach Hybridisierung auf dem selben *Array* getrennt detektiert werden können (Duggan u. a., 1999). Limitierender Faktor ist die zur Verfügung stehende RNA-Menge. Ein erfolgversprechender Ansatz zur Amplifikation der RNA-Menge ist die Kopplung von cDNA-Synthese mittels reverser Transkription und cRNA-Synthese mittels RNA-Polymerase. Andere Verfahren basieren auf PCR-Reaktionsschritten, wobei die Gefahr besteht, dass die Amplifikation nicht im linearen Bereich stattfindet (Lockhart und Winzeler, 2000).

2.1.2 *Array-Systeme*

Es finden derzeit zwei Sondensysteme breite Anwendung: cDNA- und Oligonukleotid-*Arrays*.

cDNA-Arrays Bei bekannter Gensequenz lassen sich für jedes Gen von Interesse Primerpaare auswählen und damit spezifische Sequenzbereiche mittels *Polymerase chain reaction* (PCR) amplifizieren. Für eukaryontische Organismen mit nicht vollständig bekannter Genomsequenz lassen sich cDNA-Sonden aufgrund von *3' expressed sequence tags* (ESTs) herstellen: mRNA-Proben werden mittels reverser Transkription, initiiert durch an den 3'-ständigen Poly-A-Schwanz gebundene Poly-T-Primer, in cDNA umgeschrieben. Nach Klonierung der cDNA-Fragmente lassen sich PCR-Amplifikate unter Verwendung vektorspezifischer Primer herstellen. Teilsequenzierung erlaubt eine spezifische Zuordnung der generierten cDNA-Proben (Schea u. a., 1995). Die gereinigten PCR-Sonden liegen in einer Pufferlösung vor. Während des *Spotting*-Prozesses werden kleinste Volumina von wenigen Nanolitern durch einen *Arrayer* auf einen Glasobjektträger aufgebracht. Ein gängiges Verfahren ist die *Pin and ring* Technologie. Ein Ring taucht in die Sondenlösung und spannt in seinem Durchmesser einen Flüssigkeitsfilm auf. Eine Nadel durchstößt diesen Film und deponiert die an ihrer Spitze haftende Portion auf der Glasoberfläche. Alternativen sind Kapillarsysteme und kontaktfreie *Ink-jet*-Systeme (Duggan u. a., 1999). Die Glasoberfläche ist mit einer Beschichtung versehen, die Aminogruppen enthält. Über ionische Wechselwirkung mit den Phosphatgruppen erfolgt die initiale Bindung der DNA-Moleküle. Durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht werden Basen an die Beschichtung radikalisch gebunden. Problematisch ist die Ausbildung von Sekundärstrukturen. Die DNA-Moleküle sollten möglichst denaturiert vorliegen.

Oligonukleotid-Arrays Oligonukleotid-Arrays werden allein auf Basis der Sequenzinformation entworfen und synthetisiert, Intermediate wie Klonierungen, PCR-Produkte oder cDNA-Synthese entfallen. Grundlage sind vollständige Genomsequenzen oder teilsequenzierte ESTs. Um größtmögliche Spezifität zu erreichen, sind bei der Sequenzauswahl einige Kriterien zu berücksichtigen wie Komplementarität des zu detektierenden Gentranskripts, das Vermeiden von Homologien zu Genen der selben Familie und anderen Genen, das Vermeiden von Sequenzähnlichkeiten mit Transkripten, die in großer Menge vorliegen, wie rRNA und tRNA, (Lipshutz u. a., 1999). Die Validität der Expressionsmessung lässt sich durch Abbildung mehrerer Sequenzausschnitte des selben Gens auf einem *Array* steigern. Oligonukleotide lassen sich wie oben beschrieben mit einem *Arrayer* auf Glasobjektträger aufbringen. Die Glasoberfläche trägt eine Beschichtung mit funktionellen Gruppen, die mit endständigen Modifikationen der Oligonukleotide eine kovalente Bindung eingehen. Beispielhaft ist eine Aldehyd-Glasbeschichtung und eine Aminomodifikation der Oligonukleotide, welche eine Kopplungsreaktion zur Schiff'schen Base ermöglichen. Photolithographie und Festphasen-DNA-Synthese stellen Verfahren zur *in situ* Synthese der Oligonukleotide auf der Glasoberfläche dar (Lipshutz u. a., 1999). Damit wird eine sehr hohe und einheitliche Dichte an Oligonukleotiden erreicht.

2.1.3 Hybridisierungsbedingungen

Stringenz Die Hybridisierung komplementärer Nukleinsäurestränge zur Doppelhelix ist reversibel. Einfluss auf die Lage des Gleichgewichts üben Temperatur und Ionenmilieu aus: Temperaturerhöhung führt zu gesteigerter thermischer Beweglichkeit, Reduktion der Kationenkonzentration zu Demaskierung negativer Ladungen der Phosphatgruppen. Beides fördert die Separation zu Einzelsträngen. Da inkomplette Strangpaarungen zuerst gelöst werden, nimmt die Hybridisierungsdichte generell ab, die Spezifität jedoch zu. Man spricht von einer Zunahme der Stringenz. Anhand von Oligonukleotid-Arrays wurden weitere Einflüsse auf die Hybridisierung untersucht (Southern u. a., 1999):

Oberflächeneffekte Die endständige Kopplung der Oligonukleotide führt dazu, dass die der Glasoberfläche zugewandten Basen schlechter zugänglich sind als die abgewandten. Darüber hinaus ist die Dichte bei *in situ* synthetisierten Oligonukleotid-Arrays sehr hoch, so dass gegenseitige sterische Behinderungen zu erwarten sind. Hybridisierungsraten können durch Einführen von Platzhaltern zwischen Glasoberfläche und Gensonden, die ein freies Flottieren der Sonden erlauben, um bis zu zwei Größenordnungen gesteigert

werden.

Sequenzeffekte Cytosin und Guanin bilden drei Wasserstoffbrücken aus, Adenin und Thymin lediglich zwei. Somit gilt, dass die Paarung C::G stabiler ist als A::T. Gensonden mit hohem GC-Gehalt hybridisieren also mit höherer Bindungsstärke. Gensonden mit einheitlicher Basenkomposition, jedoch unterschiedlicher Sequenzabfolge führen zu unterschiedlichen Hybridisierungsraten mit ihren komplementären Proben. Darüber hinaus ist die Separationsrate unter den wenig stringenten Hybridisierungsbedingungen für *Microarrays* niedrig anzusetzen. Die Stabilität der Doppelhelix allein scheint also nur einen sekundären Einfluss auf die Hybridisierungsrate auszuüben.

Kinetik der Doppelhelixformation Entscheidender Faktor für die Hybridisierungsrate ist die Schnelligkeit der Hinreaktion. Man geht davon aus, dass wenige Basenpaarungen einen initialen Nukleationskomplex bilden, von dem aus sich weitere Basenpaarungen nach dem Reissverschlussprinzip ausbilden. Jede neue Baseninteraktion kann die Reaktion in Richtung Paarung oder Separation lenken. Basenkomplementarität und freie Zugänglichkeit machen das Fortschreiten der Doppelhelixformation wahrscheinlich. Hybridisierungsraten sind also abhängig von der Stabilität des Nukleationskomplex und seiner folgenden Zwischenstufen. Negativen Einfluss üben stabile Sekundärstrukturen der Probenmoleküle aus, die sich unter den für Oligonukleotid-Arrays üblichen wenig stringenten Hybridisierungsbedingungen leicht ausbilden können.

2.1.4 Anwendungen

Microarrays sind in den verschiedensten Richtungen biomedizinischer Wissenschaft etabliert. Dem Fokus der Arbeit entsprechend werden hier Anwendungsbeispiele aus der mikrobiologischen Forschung skizziert. Die in jüngster Zeit publizierten Genomsequenzen verschiedener Mikroorganismen - darunter zahlreiche Pathogene - haben großen Anteil am rasch fortschreitenden Verständnis prokaryontischer Biologie, von Virulenz und Pathogenese, Evolution und Epidemiologie.

Microarrays können zur komparativen Genomanalyse eingesetzt werden und erlauben Einblicke in die Diversität und Evolution einer Bakterienpopulation. Hierzu werden die Gene des sequenzierten Referenzstammes auf einem *Array* präsentiert und mit fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten des zu untersuchenden Stammes, eventuell in Konkurrenz mit DNA-Fragmenten des Referenzstammes, hybridisiert. Deletionen und

Sequenzunterschiede, die zu schwächerer Hybridisierung führen, können somit identifiziert werden. Durch Hybridisierung mit cDNA-Fragmenten können Unterschiede in der konstitutiven Genexpression detektiert werden, wie sie bei Mutationen im Promotorbereich vorkommen (Schoolnik, 2002). In einer der ersten Studien dieser Art wurde das Genom von *Mycobacterium tuberculosis* mit *Mycobacterium bovis* Stämmen und der attenuierten Tuberculosevakzine *Bacille Calmette-Guerin* (BCG) verglichen.

Analysen des bakteriellen Transkriptom brachten zu Tage, dass die Genomexpression hochplastisch ist und mit Hilfe von komplexen Regulationsmechanismen auf sich ändernde Umweltbedingungen reagieren kann. Mit Hilfe von Expressionsanalysen unter verschiedenen Kulturbedingungen können regulative Einheiten innerhalb eines Transkriptoms identifiziert werden: Als *Regulon* wird eine Gruppe von einem Regulator gemeinsam kontrollierter Gene bezeichnet. Durch Transkriptomvergleiche verschiedener Stämme, die Mutationen im Regulatorbereich tragen, mit Wildtypen lassen sich mögliche abhängige Gene identifizieren. Ein Beispiel ist die Untersuchung von σ -Faktoren. Zeigen benachbarte Gene unter verschiedenen Umweltbedingungen gleichgerichtete differentielle Regulation, liegt möglicherweise ein Operon vor. Differentielle Reregulation unterschiedlicher Ausrichtung legt die Präsenz mehrerer Promotoren nahe. Sind unter verschiedenen Umweltbedingungen nicht benachbarte Gene unbekannter Funktion in gleicher Richtung differentiell reguliert wie bekannte Gene, lässt sich eine funktionelle Assoziation vermuten. Ziel der Analysen des Transkriptoms pathogener Bakterien ist, Gene zu identifizieren, die während des Krankheitsgeschehens differentiell reguliert sind. Der Komplexität des Infektionsgeschehens *in natura* stehen die Instabilität der bakteriellen RNA, das Überwiegen eukaryontischer RNA und die Menge der für die RNA-Isolation benötigten Keime entgegen. Somit konzentrieren sich die ersten Arbeiten auf die Signalwirkung weniger Milieuparameter, die im Kontext der Auseinandersetzung mit dem Wirt stehen. Inzwischen sind zahlreiche Transkriptomanalysen bei unterschiedlichen Erregern durchgeführt worden. Auch hier zählt *Mycobacterium tuberculosis* zu den am gründlichsten untersuchten Erregern: (Fisher u. a., 2002), (Mangan JA u. a., 1999), (Wilson u. a., 1999). Mittlerweile sind mehrere Studien zu *Neisseria meningitidis* veröffentlicht, auf die in der Diskussion näher eingegangen wird.

Noch vor den ersten *Microarray*-Studien pathogener Bakterien wurde die Änderung der transkriptionellen Aktivität zahlreicher Wirtszellgene als Antwort auf die Interaktion mit Bakterien untersucht. Wie oben beschrieben lassen sich über ESTs Gentranskripte identifizieren, deren Sequenz nicht vollständig bekannt ist. Interessante Aspekte für das Verständnis der Meningitispathogenese beleuchtete eine *Microarray*-Studie, die

3528 Gene einer humanen Meningealzelllinie bei Infektion mit *Neisseria meningitidis* untersuchte. Induziert waren unter anderem die Gene für $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und IL-8, was belegt, dass Meningealzellen als Quelle früher Zytokinfreisetzung in Frage kommen (Wells u. a., 2001). Bei der Übertragung der Ergebnisse der vorgestellten Zellkulturexperimente auf die Situation *in natura* muss bedacht werden, dass es sich um Zellkultursysteme einer einzelnen, meist transformierten Zelllinie handelt, während die Reaktion natürlichen Gewebebarrieren des Wirtes durch verschiedene zelluläre und humorale Faktoren modifiziert werden (Belcher u. a., 2000). Jedoch ermöglichen die Modellsysteme eine systematische Analyse des komplexen Interaktionsgeschehens. Mit der Durchführung simultaner Expressionsstudien von Bakterien und ihren Wirtszellen zu mehreren Zeitpunkten wird eine umfassende kinetische Betrachtung des molekularen Wechselspiels der Erreger-Wirts-Interaktion möglich.

2.2 Grundlagen des Neisserien-Microarrays

2.2.1 Das Genom von *Neisseria meningitidis*, Serogruppe B - Stamm MC58

(Tettelin u. a., 2000) Das Chromosom von MC58, einem invasiven Patientenisolat, wurde mit Hilfe der *Random shotgun sequencing* Strategie analysiert. Es besteht aus 2272351 Basenpaaren, von denen 83% kodierenden Bereichen zugeordnet werden können. Es wurden 2158 Gene (*Open reading frames*, ORFs) mit einer durchschnittlichen Größe von 874 Basenpaaren identifiziert, von denen 53,7% über Homologivergleiche mit bekannten Proteinen eine biologischen Funktion zugeordnet werden konnte. Es wurden 234 Proteinfamilien identifiziert, in denen 678 Proteine enthalten sind. Im Hinblick auf die Impfstoffentwicklung besonders interessant sind der Vergleich mit verwandten Pathogenen und Aspekte der Genomplastizität.

Im Vergleich mit dem Stamm Z2491 der Gruppe A finden sich Übereinstimmungen in 91,2% der Gene. Die restlichen differierenden Gene sind überwiegend hypothetischer Natur. 71% der Gene weisen ausgeprägte Homologien mit Genen der verwandten γ -Proteobakterien *Escherichia coli* und *Haemophilus influenzae* auf, wobei mit letzterem auch hinsichtlich des Genomumfangs die größte Ähnlichkeit besteht. *Neisseria meningitidis* und *Haemophilus influenzae* kolonisieren beide den Nasopharynx und können eine Meningitis hervorrufen. Neisserien sind natürlich kompetent, sie können nackte DNA-Moleküle aus ihrer Umwelt aufnehmen und in ihr Genom integrieren. Als Signal dient eine speziesspezifische Oligonukleotidsequenz (*DNA uptake signal sequence*, USS), die mit 1910 Kopien über das Genom verteilt überraschend häufig vorhanden ist. Es

sind 51 Insertionssequenzen enthalten, von denen 22 intakt sind. Unterschiede im CG-Gehalt weisen auf Regionen hin, die durch horizontalen Gentransfer von anderen Spezies aufgenommen worden sind. Es wurden drei putative Regionen identifiziert: IHT-A1/2, IHT-B und IHT-C (*Putative islands of horizontally transferred DNA*). In IHT-A1 liegt der *cps*-Locus, in dem die an der Kapselbildung beteiligten Gene kodiert sind. Reversible Längenmutationen innerhalb einfacher repetitiver Sequenzen führen zu phasenvariabler Genexpression. Hierdurch wird eine mikroevolutionäre Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen möglich. Zu den vormals bekannten 13 phasenvariablen Genen wurden 52 weitere potentielle Kandidaten identifiziert. Damit nimmt *Neisseria meningitidis* unter allen bisher untersuchten Spezies eine Spitzenstellung ein. (Saunders u. a., 2000).

2.2.2 Hitzeschock

Hierbei handelt es sich um eine gleichförmige Stressreaktion, die es den Bakterien ermöglicht, sich an verschiedene Änderungen der Umweltbedingungen anzupassen und zu überleben. Die Hitzeschock-Reaktion ist konserviert, gut untersucht, leicht reproduzierbar und eignet sich somit hervorragend, um ein *Microarray*-System zur Transkriptomanalyse neu zu implementieren.

Für *Escherichia coli* ist die Reaktion wie folgt beschrieben: Bei Erwärmung auf 42°C wird die Synthese von über 20 *Heat shock*-Proteinen induziert, darunter vor allem die *Chaperone*-Protein-Systeme DnaK und GroE und ATP-abhängige Proteasen (Arsene u. a., 2000). *Chaperones* helfen Proteinen, ihre Tertiärstruktur zu stabilisieren, Proteasen bauen nicht korrekt gefaltete Proteine ab.

Transkriptionell wird die Hitzeschock-Reaktion durch die RNA-Polymeraseuntereinheit σ^{32} positiv reguliert, welche spezifisch an Promotoren von *Heat shock*-Genen wie *dnaK*, *dnaJ* und *grpE* bindet (Arsene u. a., 2000). Die Synthese des σ^{32} -Faktors wird auf mehreren Ebenen reguliert: Mehrere Promotorsequenzen des kodierenden Gens *rpoH* erlauben wahrscheinlich die Reaktion auf verschiedene Stimuli. Regulatorregionen des Transkripts mit vermuteter *Silencer* und *Enhancer* Wirkung auf die Translation können RNA-Sekundärstrukturen ausbilden, die die Translation behindern und durch Temperaturerhöhung gelöst werden. (Morita u. a., 1999). Schließlich wird die Stabilität des kurzlebigen Genprodukts durch Temperaturanstieg vorübergehend erhöht. Einige *Heat shock*-Gene wie *groEL* und *groES* stehen zusätzlich unter dem Einfluss von σ^{70} , welcher zur konstitutiven Basalexpression dieser Gene beiträgt (Arsene u. a., 2000).

Die Änderung des Transkriptoms von *Escherichia coli* unter Hitzeschock-Bedingungen

wurde mit Nylon- und Glas-basierten *Arrays* untersucht. Hierbei wurden 119 differentiell regulierte Gene detektiert, von denen 35 nicht vorher charakterisiert worden waren. Unter den induzierten Genen fanden sich die des oben beschriebenen Regulons. 42 Gene waren supprimiert (Richmond u. a., 1999).

3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war zunächst, die Anwendbarkeit von Oligonukleotid-basierten und cDNA-basierten *Microarrays* zur Analyse des Transkriptionsprofils von *Neisseria meningitidis* Serogruppe B zu vergleichen. Hierzu wurde anhand des Hitzeschock-Modells ein Subset von 60 Genen mit beiden Plattformen untersucht. Die cDNA- sowie das Hitzeschock-Modell waren zuvor von Matthias Guckenberger etabliert worden (Guckenberger, 2004).

Als zweiter Schritt sollte aufgrund der Vergleichsdaten ein *Microarray*-System etabliert werden, welches das gesamte Genom von *Neisseria meningitidis* repräsentiert.

Schließlich sollte mit diesem System ein Modell zur Untersuchung der Transkriptionsänderung bei Konfrontation mit Serum realisiert werden und die Anwendbarkeit im Hinblick auf die Suche nach potentiellen Vakzinekandidaten demonstriert werden.

Teil II

Material und Methoden

1 Material

1.1 Geräte

Array System

Affymetrix 417™ *Arrayer* (MWG Biotech AG, München)

Affymetrix 418™ *Scanner* (MWG Biotech AG, München)

Brutschränke

KB 500 (Heraeus, Hanau)

B5060 E-CO2 (Heraeus, Hanau)

Elektrophoresekammern

DNA Subcell™ (BioRad, München)

Wide Mini-Subcell™ (BioRad, München)

Fastprep Beater

Fastprep 120 (Savant, Framingdale, NY, USA)

Heizblöcke

BT1 und BT3 (Grant Instruments, Cambridge, UK)

Hybridisierungsöfen

DUO-Therm OV5 (Biometra, Göttingen)

Hybridisierungskammern

CMT™-Hybridization Chambers (Corning, New York, USA)

Schüttelinkubatoren

G25 (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA)

KS 10 (Bühler, Tübingen)

Videoprinter

Sony Videoprinter

Spannungsgeräte

Gene Power Supply GPS 200/400 (Pharmacia, Freiburg)

Power Supply 3000Xi (BioRad, München)

Spektrophotometer

U-2000 (Hitachi, San Jose, CA, USA)

GeneQuant pro RNA/DNA Calculator

Thermocycler

TRIO (Biometra, Göttingen)

Personal Cycler (Biometra, Göttingen)

Primus 96^{plus} Thermocycler (MWG Biotech, München)

UV Crosslinker

Stratalinker[®] 1800 (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande)

Vacuumzentrifuge

Speed Vac[®] Plus SC110A (Savant, New York, USA)

Wasserbäder verschiedener Hersteller

Zentrifugen

Biofuge 15 (Heraeus, Hanau)

Biofuge 15R (Heraeus, Hanau)

Omnifuge2.0 RS (Heraeus, Hanau)

Kühlzentrifuge RC-5B (Sorvall Heraeus, Hanau)

Tisch-Ultrazentrifuge TL-100 (Beckman, München)

1.2 Computer

1.2.1 Hardwarre

Dell Dimension XPS 450, Windows 98

1.2.2 Software

Image 4.0 (BioDiscovery Inc., Los Angeles, CA, USA)

GMS Scanner Software 1.51 (Genetic Microsystems, Inc.)

Arrayer Version 1.50 (Genetic Microsystems, Inc.)

Office XP Professional

1.3 Verbrauchsmaterialien

0,5ml-, 1,5ml- und 2,0ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht)

15ml-Röhrchen, steril (Greiner, Nürtingen)

15ml- und 50ml-Zentrifugengefäße Falcon (Heidelberg)

CMT-GAPS™ Coated Slides (Corning, Wiesbaden)

SuperAldehydescriptsize™ Slides (TeleChem International, Sunnyvale, CA, USA)

FastRNA Tubes Blue (Q biogene, Heidelberg)

PS-Mikrotiterplatte 96 K, (Greiner, Nürtingen)

Spritzen und Kanülen (Braun Melsungen AG, Melsungen)

RNase freie 1,5ml Microfuge Tubes (Ambion, Woodward, USA)

Serummonovetten (Staeder)

1.4 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme

von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Ficoll 400

FluoroLink Cy3-dCTP

FluoroLink Cy3-dUTP

FluoroLink Cy5-dCTP

FluoroLink Cy5-dUTP

MicroSpin™ G-25 Columns[1ex] von Applicam, Darmstadt

Albumin -Fraktion V, pH 7,0

von Biochrom AG, Berlin

10x PBS(Dulbecco) von bioMérieux, MarCy l'Etoile, Frankreich

PolyVitex (Vitaminlösung für Flüssigmedien)

von Difco Laboratories, Augsburg

GC-Medium Base

Proteose-Pepton

von Life Technologies, Karlsruhe

dATP, dCTP, dGTP, dTTP

DTT

Random Primer Mix

RNaseOut™ RNase Inhibitor
rNTP Mix (10mM)
SuperScript™ II RNase H-Reverse Transcriptase
T7 RNA Polymerase
5x First Strand Buffer
5xTranskriptionspuffer (T7)

von Merck, Darmstadt

Ethanol absolut, 99,8%

von Perkin Elmer, Weiterstadt

AmpliTaq®

*MgCl*₂ 25mM

10x PCR Puffer

von Qiagen, Hilden

QIAamp DNA Mini Kit

QIAquick Gel Extraction Kit

QIAquick PCR Purification Kit

Qiagen Plasmid Midi Kit

RNeasy®, mini, midi Kit

von Promega, Mannheim

100bp DNA Ladder

1kp DNA Ladder

von Roche, Mannheim

DNase I, RNase frei

von Roth, Karlsruhe

Agarose NEE0

von Sigma Chemical Co., Steinheim

2-Mercaptoethanol

Diethyl-Pyrocabonate (DEPC)

Sämtliche weiteren verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck und Sigma geliefert.

1.5 Nukleinsäuren

1.5.1 Plasmide

Name	Herkunft	Beschreibung	Zitat
Sacc1	M.Guckenberger	<i>chs1</i> , internes Fragment in pCDNA3	Guckenberger (2004)
Sacc2	M.Guckenberger	<i>gas1</i> , internes Fragment in pCDNA3	Guckenberger (2004)
Sacc3	M.Guckenberger	<i>fks1</i> , internes Fragment in pCDNA3	Guckenberger (2004)
Sacc4	M.Guckenberger	<i>chs2</i> , internes Fragment in pCDNA3	Guckenberger (2004)

Interne Fragmente der bezeichneten Gene von *Saccharomyces* mit einer Länge zwischen 590bp und 1020bp wurden in den Vektor pCDNA3 kloniert.

1.5.2 PCR-Sonden:

Zur Konstruktion des cDNA-Arrays sind für 60 Gene spezifische Primer ausgewählt und mit PCR interne Fragmente von 300 bis 560bp Länge amplifiziert worden. Herstellung und Liste der verwendeten Oligonukleotid-Primer: (Guckenberger, 2004)

1.5.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert.

Oligonukleotid-Sonden Für die Konstruktion des Oligonukleotid-Arrays wurden für jedes zu untersuchende Gen drei Oligonukleotidsonden von 40 Basen Länge hergestellt, die jeweils für den 5', den mittleren und den 3' Bereich des Gens spezifisch sind. Die Oligonukleotide tragen am 5'-Ende eine C6-Amino Linker Modifikation, um eine kovalente Bindung an die aldehydbeschichteten Objektträger zu ermöglichen. Zunächst wurden Oligonukleotidsonden für 60 Gene hergestellt, schließlich für alle 2160 Gene.

Design und Produktion der Oligonukleotidsonden erfolgte durch MWG-Biotech AG, Ebersberg, die Liste der Sequenzen ist im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg hinterlegt.

Oligonukleotid-Primer: RT Für die Reverse Transkription von cDNA zur Hybridisierung mit Oligonukleotid-Arrays wurden spezifische Primer eingesetzt. Die Liste der Sequenzen ist im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, hinterlegt.

Oligonukleotid-Primer: PCR Zur Herstellung der *Saccharomyces*-Standard-Sonden wurden folgende Primer verwendet:

Gen	Primer	Sequenz
CHS1	Sacc1F	TGATCAAATAAGCGGCCGCGAAATGAATATC
	Sacc1R	TTTATCAAATAGTCTCGAGATCATCGTACTC
GAS1	Sacc2F	CTTTCAAAGTTAGCGGCCGCTGCTGCTTTTTT
	Sacc2R	ACAAGCCTCCGTCTCGAG GGTGGTAATT
FSK1	Sacc3F	TATCAGGGCCAAGCGGCCGCTACCCAGGGACC
	Sacc3R	TCAGGAGACATTCTCGAGGAACC
CHS2	Sacc4F	CTAACGTTTTCCGCGGCCGCCCGGCATCTCCT
	Sacc4R	CGTTGATAGAGACTCGAGTTGTCAATTCAA

Zur Reinheitskontrolle der isolierten RNA wurden folgende Primer verwendet:

Gen	Primer	Sequenz
<i>hsdM</i>	NMB0829F	5'-TTTCCGGCAGAGGCCGCG-3'
<i>hsdM</i>	NMB0829R	5'-TCAATTTACGCCGCGAGCCG-3'
<i>groEL</i>	NMB1972F	5'-GTCCGGTGCCGCGACCGAAGT-3'
<i>groEL</i>	NMB1972R	5'-CATCATGCCGCCCATACCAC-3'
<i>atpA</i>	NMB1936F:	5'-TCTTGAAACCGACCTCTTC-3'
<i>atpA</i>	NMB1936F	5'-GCCTGATAGGCGTAAGAAGA-3'

1.6 Puffer und Lösungen

20x SSC

<i>NaCl</i>	3M
<i>Na – Citrat</i>	0,3M
	pH7,0

50x TAE-Puffer 1l-Ansatz:

Tris-Puffer	2,0 M
Eisessig	57,1ml
EDTA	50 mM
<i>H₂O</i>	<i>adll</i>
	pH8,3

1.7 Nährmedien und Agarplatten

1.7.1 Nährmedien

PPM-Medium

Proteose-Pepton	1,5%
<i>NaCl</i>	0,5%
Stärke	0,05%
<i>KH₂PO₄</i>	0,4%
<i>K₂HPO₄</i>	0,1%
	pH7,8 (mit <i>KOH</i>)

PPM-Medium, supplementiert (bezeichnet PPM+)

PPM-Medium mit Zugabe von	
<i>MgCl₂</i>	0,01M
<i>NaHCO₃</i>	0,042%
PolyVitex	1Vol-%

1.7.2 Agarplatten

GC-Agar

Proteose-Pepton	1,5%
Stärke	0,1%
<i>K – Phosphat</i>	0,4%
<i>NaCl</i>	0,5%
Bacto-Agar	1,0%
	pH7,2

1.8 Bakterienstämme

Neisseria meningitidis Serogruppe B, Stamm H44/76, klinisches Isolat Norwegen, 1976.

Neisseria meningitidis Serogruppe B, Stamm MC58, klinisches Isolat Großbritannien, 1983. Beide Isolate gehören dem ST-32/ET-5-Komplex an und besitzen die antigenetische Formel B:15:P1.7, 16 Immunotyp L3.

Neisseria meningitidis Serogruppe B, Stamm MC58 Δ *siaD*; trägt eine Chloramphenicol-Kassette, welche ein internes Fragment des für die Kapselsynthese notwendigen 2,8-Polysialyltransferase kodierenden Gens ersetzt (Kolb-Maurer u. a., 2001).

1.9 Kulturbedingungen

Neisserien werden aus der vorliegenden Gefrierkultur mit einer sterilen Öse entnommen und auf GC-Agarnährböden, supplementiert mit Faktor VX, ausgestrichen. Die Inkubation findet bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO_2 -Atmosphäre statt.

Messung der optischen Dichte Die bei einer Wellenlänge von 600nm bestimmte Extinktion einer Bakteriensuspension korreliert mit der darin herrschenden Bakteriendichte. Eine gemessene optische Dichte (OD_{600nm}) von 1,0 entspricht hierbei 10^9 koloniebildenden Einheiten (CFU) pro ml Suspension. Hierzu werden 100µl der Bakteriensuspension in eine Küvette gegeben, auf 1ml mit dem Kulturmedium verdünnt und die Extinktion im Photometer bestimmt.

1.10 Serum-Pool:

Es wurden Mitarbeitern des Instituts, die nicht in der Neisserienforschung tätig waren, nach ausdrücklichem Einverständnis Blutproben entnommen und nach folgendem Protokoll aufgearbeitet:

Serummonovetten mit Kunststoffgranulat werden senkrecht aufgestellt und 30min lang bei Raumtemperatur stehengelassen.

Zentrifugieren 2min bei 3000rpm.

Überstehendes Serum wird mit der Pipette abgenommen und in 15ml Greiner Röhrchen auf Eis zusammengegeben.

Nochmals 5min bei 3000rpm und 4°C zentrifugieren.

Überstand auf 1,5ml in Eis stehende Reaktionsgefäße aufteilen.

Schockgefrieren in flüssigem N_2 .

Bei -60°C aufbewahren.

Eine Liste der Mitarbeiter mit schriftlicher Einverständniserklärung ist im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg hinterlegt.

2 Methoden

2.1 Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Gleichstrom-Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrem Molekulargewicht. Durch Puffer wird ein basisches Milieu geschaffen, in dem

sämtliche Nukleinsäuren negativ geladen vorliegen. In einem angelegten Gleichstromfeld wandern die Moleküle in Richtung Kathode, wobei der Laufwiderstand mit steigender Molekülgröße zunimmt. Um kleinere Nukleinsäuremoleküle aufzutrennen, wird höher konzentrierte Agarose eingesetzt, um einen größeren Laufwiderstand entgegenzusetzen. Es wurden folgenden Agarosekonzentrationen angewendet:

1,5 Gewichts-% Agarose zur Auftrennung von DNA-Molekülen,

1,0 Gewichts-% Agarose zur Auftrennung von RNA-Molekülen.

2.1.1 Herstellung des Gels:

Die entsprechende Menge Agarose wird in 1x TAE-Puffer aufgeköcht, gut durchmischt und auf ca. 50°C wieder abgekühlt. Zur Darstellbarkeit der Nukleinsäuremoleküle kann noch Ethidiumbromid in einer Konzentration von $3\mu\text{l}/\text{ml}$ zugesetzt werden. Die noch gleichmäßig flüssige Agaroselösung wird dann in eine Gelform gegossen, wobei die Probenaschen durch einen eingesetzten Kamm ausgespart werden. Nach Verfestigung des Gels wird es mit 1x TAE -Puffer überschichtet.

2.1.2 Auftrennung

Die Nukleinsäureproben werden mit Auftragspuffer versetzt und in die Taschen gegeben. Zum Größenvergleich werden parallel DNA-Molekülgemische definierter Größe (Leiter) aufgetragen. Die Elektrophorese wird mit maximal 200V /200mA durchgeführt. Die Nukleinsäuren werden durch das zugesetzte Ethidiumbromid markiert und lassen sich mit UV-Licht darstellen und photographisch festhalten (Sony-Videoprinter).

10x DNA-Auftragspuffer:

Bromphenolblau	0,2%
EDTA	0,2 M
Glyzerin	50 %

2.1.3 Gelelution

Unter UV-Licht visualisierte Banden können aus dem Gel geschnitten werden. Mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) lassen sich die Gelstücke verflüssigen und die darin enthaltenen DNA-Moleküle extrahieren und über Silikagelmembran-Säulchen aufreinigen.

2.2 Enzymatische Bearbeitung von DNA

2.2.1 Spaltung von DNA

Durch prokaryontische Endonukleasen lassen sich DNA-Moleküle an jeweils spezifischen Sequenzen schneiden. Zahlreiche Restriktionsenzyme sind beschrieben, die verschiedene Sequenzen erkennen. In dieser Arbeit wurde ein Restriktionsverdau mit dem Enzym XhoI angewendet. 20 μ l Ansatz:

Opa-buffer (10x)	4 μ l
XhoI	1 μ l
Plasmid in H_2O	0,5 – 1,0 μ g
H_2O	ad20 μ l

In Vorbereitung zur *in vitro* Transkription wurden hiermit Sacc-Plasmide stromabwärts des klonierten Genfragments linearisiert.

2.2.2 Amplifikation definierter DNA-Fragmente mittels Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, um DNA-Fragmente, die von spezifischen Sequenzen eingerahmt sind, zu amplifizieren. Prinzip ist, dass die DNA-abhängige DNA-Polymerase einzelsträngige Matrix-DNA zu Doppelsträngen ergänzt, sofern an ein bereits vorliegendes Doppelstrangelement in 3'-Richtung angeknüpft werden kann. Dies wird durch sequenzspezifisch synthetisierte Oligonukleotide, die Primer erreicht. Da sie auf beiden Strängen jeweils im 5'- Bereich des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts gesetzt werden, resultiert als Amplifikat ein Doppelstrangfragment, welches durch die Primer beidseitig begrenzt wird.

Ein 100 μ l-Ansatz wird in einem Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert:

10x-PCR-Puffer	10 μ l
MgCl ₂ 25mM	6,5 μ l
dNTP (4mM) ¹	5 μ l
Primer 1 (100pmol/ μ l)	1 μ l
Primer 2 (100pmol/ μ l)	1 μ l
dsDNA als Matrix	5ng
Taq-Polymerase	1,5 – 2,5U
H ₂ O	ad100 μ l

¹dATP, dCTP, dGTP, dTTP zu äquimolaren Anteilen

Die Schritte des Amplifikationszyklus sind:

1. Initiales Erhitzen der Matrix-DNA auf 95°C für 5 Minuten zur Separation der Doppelstränge
2. Hybridisieren der Primernukleotide, die im Überschuss vorliegen: 45-62°C für 1min.
3. Primerextension durch die Polymerase bei einem Temperaturoptimum von 72°C für die Taq-Polymerase. Die Dauer hängt von der Größe des zu amplifizierenden Fragments ab. 45 Sekunden reichen aus für 1kb Länge.
4. Erhitzen des Ansatzes auf 95°C für 30 Sekunden zur erneuten Denaturierung der DNA-Moleküle

Die Schritte 2 bis 5 werden ca. 25-30 mal wiederholt, abschließend wird der Ansatz einige Minuten bei 72°C gehalten, um amplifizierte Teilfragmente zu komplettieren.

Die Proben werden schließlich bei 4°C gelagert.

Die PCR Produkte werden mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und mit H₂O eluiert.

Die PCR wurde eingesetzt zur Reinheitskontrolle des isolierten RNA nach DNase-Behandlung und für die Herstellung der cDNA-Sonden für die internen Standard-RNAs. Hierfür wurde das Reaktionsprodukt mit der Gelelektrophorese aufgetrennt, die Bande der PCR-Amplifikate ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert, um sie von der Plasmid-DNA zu separieren.

2.3 RNA-Isolation

Um die RNA vor dem Abbau ubiquitär vorhandener RNasen zu schützen, sind an die Reinheit der Materialien und Prozeduren besondere Anforderungen zu stellen:

Reaktionsgefäße und fertige Reagenzien werden vom Hersteller RNase-frei geliefert. Alle selbst angesetzten Lösungen werden mit DEPC 0,1% versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Hierbei werden sämtliche katalytisch wirksamen Biomoleküle inaktiviert. Das toxische DEPC zerfällt durch zweimaliges Erhitzen im Autoklaven in die ungiftigen Bestandteile CO_2 , H_2O und $EtOH$. Letzteres verflüchtigt sich beim Autoklavieren. Zu verwendende Pipettenspitzen werden mit Pinzetten in die Vorratsbehälter gesteckt und zweimal autoklaviert. Alle Arbeiten werden mit zwei Paar Handschuhen ausgeführt. Es empfiehlt sich, einen eigens für RNA-Arbeiten reservierten Platz einzurichten. Kritischer Schritt der RNA-Gewinnung ist das Intervall vom Aufschluss der Zelle bis zur Überführung in ein RNase freies Milieu.

Zur Isolierung wird nach einem von G. Dietrich beschriebenen Protokoll vorgegangen, das einen mechanischen Zellaufschluss mit anschließender Lösung in stabilisierenden Agentien kombiniert (Dietrich u. a., 2000).

2.3.1 Bakterienkultur:

Ein Bakterienstamm wird auf GC-Agar mit einer sterilen Öse ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden wenige Kolonien von der Platte geerntet, in 1ml PPM+-Flüssigmedium eingerieben und im Schüttelinkubator kultiviert, bis eine OD_{600nm} von 1,0 vorliegt. Es werden 100 μ l entnommen, um damit eine neue Flüssigkultur mit einer OD_{600nm} von 0,1 anzulegen. Diese Suspension wird weiter kultiviert, bis die für das Experiment gewünschte OD_{600nm} erreicht ist.

2.3.2 Isolation

Nachdem die Bakterienkultur den experimentellen Bedingungen ausgesetzt worden ist, erfolgt die Isolation der RNA: Die Bakteriensuspension wird bei 6000xg zentrifugiert, der Überstand verworfen, das entstandene Sediment in 1ml RLT-Puffer (Qiagen RNeasy midi kit, zu versetzen mit 1 Vol% β -Mercaptoethanol) resuspendiert und in ein FastRNA Tube Blue überführt und hermetisch verschlossen. Die Tubes werden in den FastPrep FP120 eingespannt und bei Stufe 6,5 für 45 Sekunden prozessiert. Die in den Tubes vorliegende Silikagelmatrix zermahlt die Bakterienzellen, und die freigesetzte RNA wird

in den stabilisierenden RLT-Puffer aufgenommen. Nach Herunterzentrifugieren der Silikagelmatrix (3 min bei 8000g) wird der Überstand abgenommen, in 4ml RLT-Puffer vorgelegt in 15ml Greiner Röhren überführt, mit 2,8ml Ethanol versetzt und gut durchmischt. Anschließend wird die Probe mit dem RNeasy midi Kit (Qiagen) weiter aufgereinigt und mit 2x 250 μ l RNase freiem H_2O eluiert.

Zur Durchführung der Hitzeschock- und RNA-Split-Experimente wurden 10ml Bakteriensuspension in 50ml Greinerröhren eingesetzt, für Seruminkubationen 5ml Bakteriensuspension in 15ml Greinerröhren. Die Methode erlaubt die Gewinnung von mehr als 100 μ g RNA per 10⁹CFU.

2.3.3 DNase-Behandlung:

Um eventuell vorhandene DNA-Reste zu entfernen, wird die RNA-Probe einem Verdau mit DNase unterzogen. 500 μ l Ansatz:

$MgSO_4$ (0,5 mol/l)	50 μ l
Na-Acetat (1mol/l)	50 μ l
DNase (10U/ μ l)	10 μ l
RNA-Probe	350 – 380 μ l
H_2O	ad500 μ l

Nach Inkubation bei 37°C für 60 min wird die Probe noch einmal über das RNeasy midi Kit (Qiagen) aufgereinigt und mit 2x 250 μ l H_2O eluiert.

2.3.4 Analyse der isolierten RNA:

Die aufgereinigten Proben werden mit der Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierbei stellen sich die charakteristischen 16S und 23S-Banden der prokaryontischen ribosomalen RNA dar, während die mRNA-Fragmente über einen weiteren Größenbereich verteilt sind. Die Bandenstärke nebeneinander aufgetragener Proben der parallel durchgeführten RNA-Isolationen erlaubt eine vergleichende Abschätzung der jeweiligen RNA-Menge. Genaue Konzentrationsbestimmungen werden mit photometrischen Messungen in 1ml-Quarzküvetten durchgeführt. Eine OD_{260nm} von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 μ g/ml. Kontamination mit Proteinen führt zu einer Zunahme der OD_{280nm} . Das Verhältnis OD_{260nm} zu OD_{280nm} ist ein Maß für die Reinheit der RNA und sollte idealerweise 1,8 bis 2,0 betragen.

Um die Freiheit von DNA-Resten zu beweisen, wird Material für eine PCR entnommen,

die mit Primerpaaren spezifisch für die Gene NMB0829 (*hsdM*) und NMB1972 (*groEL*) bzw. NMB1936 (*atpA*) durchgeführt wird: Als Positivkontrolle wird genomische DNA eingesetzt, als Negativkontrolle reines H_2O .

2.4 *In vitro* Transkription:

Für die Herstellung der internen Sacc-Standard-RNA wird eine Transkription der Plasmid-DNA mit Hilfe einer RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 hergestellt. Hierfür ist die kodierende Sequenz in ein Plasmid kloniert worden, welches stromaufwärts der Klonierungsregion eine T7-spezifische Promotorregion enthält (Dissertation Matthias Guckenberger). Für die Transkription einer Plasmid-Vorlage wird folgender Ansatz verwendet:

Template-DNA	4 μ g
T7-Transkriptionspuffer (5x)	20 μ l
rNTP-Mix (10mM)	4 μ l
DDT (0,1mol/l)	30 μ l
T7-Polymerase (50U/ μ l)	0,8 μ l
DEPC- H_2O	ad100 μ l

Der Ansatz wird 30 min lang bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Aufreinigung über RNeasy mini-kit, wobei mit insgesamt 90 μ l H_2O eluiert wird. In einem weiteren Schritt wird die Plasmid-DNA mittels DNase-Verdau abgebaut. Der Ansatz wird mit dem RNeasy-mini-kit erneut aufgereinigt, wobei mit 90 μ l H_2O eluiert wird.

2.5 Reverse Transkription:

Über die reverse Transkription mittels eines Enzyms retroviraler Herkunft wird RNA in cDNA umgeschrieben. Durch Zugabe des Enzyms im Überschuss wird erreicht, dass die Reaktion im linearen Bereich abläuft, sodass die Mengenverhältnisse der RNA-Moleküle in der cDNA abgebildet werden. Die cDNA-Moleküle werden durch Einbau chromophorentragender Nukleotide markiert. Da stets zwei RNA-Proben miteinander verglichen werden, erfolgt die cDNA-Synthese in getrennten Reaktionsansätzen, wobei Cy3 den unter Experimentalbedingungen und Cy5 den unter Standardbedingungen gewonnenen Proben zugeordnet wird. Zur Qualitätskontrolle der Transkription werden *in vitro* Transkripte von *Saccharomyces* Genen als interne Standards in definierten Verhältnissen zugegeben: Für Reaktionsansätze mit Cy3-markierten Nukleotiden:

Sacc1-RNA 15 μ l
Sacc2-RNA 15 μ l
Sacc3-RNA 15 μ l
Sacc5-RNA 5 μ l

Für Reaktionsansätze mit Cy5-markierten Nukleotiden:

S1-RNA 5 μ l
S2-RNA 15 μ l
S3-RNA 15 μ l
S5-RNA 15 μ l

Von diesem Gemisch interner Standard-RNAs werden der jeweiligen Reaktion 3 μ l hinzugesetzt. Da DNA nicht *de novo* synthetisiert werden kann, müssen Primer hinzugegeben werden. Der Anteil an mRNA beträgt weniger als 10% der isolierten RNA, deshalb werden neben *Random primers*, die zur unspezifischen Transkription führen, spezifische Primer zugegeben. Es wurden hierbei folgende Primeransätze verwendet:

Für Experimente mit den Subset-Arrays wurden spezifische Primer in einer Konzentration von 100 $pmol/\mu$ l angewendet.

Für Experimente mit dem Gesamtgenom-Oligonukleotid-Array wurde folgender Stammsatz generiert: 1,4ml Primermix, bestehend aus 2714 NM-spezifischen und 4 Sacc-spezifischen Primern mit einer Gesamtkonzentration von 100 $pmol/\mu$ l, was einer Einzelkonzentration von 0,037 $pmol/\mu$ l entspricht.

Für die Hitzeschock-Experimente wurde dieser Ansatz auf 20 μ l eingedampft (entspricht 70-fach Konzentrierung, 2,575 $pmol/\mu$ l je Primer) und davon 8 μ l pro Umschrieb verwendet (entspricht 20,6 $pmol$ je Primer).

Für die Seruminkubationsexperimente wurde der Primeransatz auf 100 μ l (entspricht 14-fach Konzentrierung, 0,515 $pmol/\mu$ l je Primer) eingedampft, über MicroSpin G-25 Säulchen (Amersham Pharmacia) aufgereinigt und mit 100 μ l H_2O eluiert. Davon wurden 10 μ l je Umschrieb verwendet, was 5,150 $pmol$ je Primer entspricht. Die Verdünnung der Primer auf 1/4 der für Hitzeschock-Experimente verwendeten Konzentration und die nochmalige Aufreinigung über Säulchen wurde durchgeführt, um die Konzentration der die Reverse Transkription potentiell hemmenden DNA zu reduzieren, um damit die anfangs schwachen Umschribergebnisse zu optimieren. Ein 40 μ l Reaktionsansatz sieht

Vor:

Primer-Standard-Mix:

Interne Standard-RNA $3\mu l$

Random-Primers $3\mu l$

Specific Primers $3\mu l$

Reaktions-Mix:

RNase out	$1\mu l$
dATP (20mM)	$1\mu l$
dCTP (10mM)	$0,8\mu l$
dGTP (20mM)	$1\mu l$
dTTP (20mM)	$1\mu l$
DTT (100mM)	$0,4\mu l$
first strand buffer	$8\mu l$
RT(superscriptII, $200U/\mu l$)	$1\mu l$

Eingesetzt werden in der Regel $40\mu g$ RNA. Die Probe wird auf $14,8\mu l$ eingedampft. Hierzu wird $9\mu l$ Primer-Standard-Mix gegeben, anschließend bei $70^\circ C$ für 5 min inkubiert, um die Primerbindung zu ermöglichen. Anschließend wird die Probe auf Eis gelegt. Nach Zugabe von $2\mu l$ des Cy3 (5)-dye (unter Lichtabschirmung) zu dem Reaktions-Mix wird dieser mit der RNA-Primer-Probe vereint und bei Raumtemperatur für 10min inkubiert. Die reverse Transkription findet bei $42^\circ C$ für 2h statt. Beide in getrennten Reaktionsansätzen generierten und Cy3 bzw. Cy5 markierten cDNA-Proben werden nun vereint.

2.5.1 Alkalische Hydrolyse:

Die verbliebene RNA zersetzt sich in alkalischem Milieu, während die cDNA-Moleküle stabil bleiben: Dem $80\mu l$ cDNA-Gemisch wird zugesetzt:

NaOH (1M) $12\mu l$

Anschließend Inkubation bei $70^\circ C$ für 10min

Neutralisierung des Gemisches erfolgt mit

HCl (1M) $12\mu l$

Die cDNA-Proben werden mit PCRquick (Qiagen) aufgereinigt und mit 2x 50 μ l H_2O eluiert. Alternativ wird die Aufreinigung mit MicroSpin G-25 Columns (Amersham Pharmacia) bei gleichem Eluatvolumen durchgeführt.

2.6 Herstellung der *Slides*

2.6.1 PCR-Array

Im ersten Schritt werden die PCR-Produkte, welche die in dieser Arbeit zu untersuchenden ORFs repräsentieren, mit dem Affimertrix 417™ *Arrayer* auf die CMT-GAPSScriptsize™ *Coated Slides* aufgebracht. Die PCR-Produkte liegen in einer Konzentration von ca. 0,1 μ g/ μ l in 3x SSC in einer 96x-Mikrotiterplatte vor. Der *Arrayer* arbeitet mit der *Ring-and-pin*-Technologie, wie unter 2.1.2 auf Seite 17 dargestellt. Es werden jeweils vier Proben gleichzeitig entnommen und in fünffacher Wiederholung an der selben Position mit der Nadel aufgebracht. Dabei wird ein Probenvolumen von ca. 35–50pl deponiert. Die *Spots* haben einen Durchmesser von etwa 150 μ m und werden im Abstand von 375 μ m nebeneinander gesetzt. Für jede PCR-Probe werden 10 *Spots* untereinander aufgebracht. Um ein Austrocknen der Probe an Ring und Nadel zu verhindern, wird die Luftfeuchtigkeit bei 60-70% gehalten. Die Fixierung der aufgetragenen DNA erfolgt über UV-Crosslink im Stratalinker® 1800 mit dem *Auto-Crosslink* Programm. Für die weitere Verarbeitung werden die Objektträger in Färbekästchen eingestellt und die Lösungen in Färbeschalen vorgelegt. Nach Eintauchen in ein Wasserbad von 95°C für 2 min zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA werden die *Slides* für eine Minute in reinen *EtOH* eingetaucht und durch Zentrifugation (800g, 2min) in einem 50ml Greiner Röhrchen getrocknet. Die *Slides* können nun bis zur Hybridisierung aufbewahrt werden. Die Herstellung der *Slides* lag in den Händen der technischen Assistentinnen unserer Arbeitsgruppe.

2.6.2 Oligonukleotid-Array

Lösen der Oligonukleotid-Sonden: Die in Trockenform gelieferten Sonden der Vorauswahl von 60 Genen werden mit H_2O jeweils auf eine Standardkonzentration von 100 μ mol/l eingestellt. Damit wird eine 96x-Mikrotiterplatte mit Portionen zu 25 μ l beschickt. Die Volumina werden mit weiteren 25 μ l aus einer Stammlösung ergänzt, die 100mM *Na* – *Borat* (mit *NaOH* auf pH 8,5 titriert) und 500mM *NaCl* enthält, sodass in jeweils eine 50 μ l Lösung vorliegt, in der 50 μ mol/l Oligonukleotid, 50mmol/l *Na* – *Borat* und

250mmol/lNaCl enthalten sind. Die Oligonukleotide des Gesamtgenom-Array liegen in 384x-Mikrotiterplatten in gebrauchsfertiger Lösung vor.

Mit dem GMS-Arrayer werden die Oligonukleotidsonden auf Aldehyd-beschichtete Objektträger aufgebracht. Die rel. Luftfeuchtigkeit wird zwischen 60 und 70% gehalten. Die Sonden des kleinen Arrays werden in fünffacher Wiederholung untereinander gesetzt. Die insgesamt 7968 Oligonukleotidsonden des Gesamtgenom-Arrays werden jeweils nur einfach aufgebracht und nach einem Schema (Institut für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg) auf zwei Slides verteilt. Nach dem Printvorgang werden die Objektträger noch für 2-4 Stunden in der feuchten Kammer belassen, um die kovalenten Bindungen zu ermöglichen, und danach über einen Tag in einer dunklen Box zwischengelagert. Zur Weiterverarbeitung wird folgende Reduktionslösung hergestellt: 330mgNaBH₄ in 100ml PBS lösen und EtOH reinst 33ml zugeben.

Danach werden die Slides nach folgendem Protokoll weiterverarbeitet:

- Waschen in 0,2% SDS (heftig schütteln)
- Waschen in H₂O 2x 1min (heftig schütteln)
- Array in Reduktionslösung baden für genau 5min:
- Array in eiskaltes H₂O geben 1min
- Array in 0,2% SDS 1min waschen
- Waschen in 2x H₂O und nachfolgend trocken zentrifugieren

2.6.3 Blocken

Hierdurch wird erreicht, dass noch vorhandene Bindungsstellen besetzt werden und nicht mehr für unspezifische Hybridisierung zur Verfügung stehen: Die PCR-Slides werden für 20min in einer Lösung mit 3,5x SSC, 0,1% SDS und 1Gewichts-% Bovine serum albumine (BSA) bei 50°C inkubiert. Nach zwei Waschsritten von je einer Minute in Wasser und darauf in Isopropanol und anschließendem Trocken zentrifugieren sind die Slides gebrauchsfertig.

Die Oligonukleotid-Slides werden in einer Lösung mit 4x SSC, 0,5% SDS und 1% BSA für 45min bei 42°C gebadet, 4x im Wasserbad unter Schütteln gewaschen, in EtOH reinst getaucht und trocken zentrifugiert.

2.6.4 Hybridisierung

Die beiden cDNA-Proben, die miteinander verglichen werden sollen, werden vereinigt und in der *Speed Vac* (Savant, USA) auf ein Volumen von ca. $30\mu\text{l}$ eingedampft. Die Probe wird auf 3x SSC und 0,1% SDS mit einem Endvolumen von $50\mu\text{l}$ eingestellt, für eine Minute auf 95°C erhitzt und dann sofort auf Eis gestellt. Für Parallelhybridisierungs-Experimente wird das Probenvolumen auf $60\mu\text{l}$ eingestellt und geteilt. Die Probe wird nun auf die *Slides* pipettiert und mit einem Deckgläschen bedeckt. In der Corning CMT™ Hybridisierungskammer erfolgt die Hybridisierung bei 50°C in einem Wasserbad für 16h. Mit 2x $10\mu\text{l}$ Wasser, in die Hybridisierungskammer pipettiert, herrschen dort konstante Bedingungen, die eine reproduzierbare Bindung der cDNA ermöglichen.

2.6.5 Waschen

Nach 16h Hybridisieren werden die *Slides* gewaschen:

PCR-Array:

in 0,1x SSC mit 0,1% SDS für 5min

2x in 0,1x SSC für je 5min

Oligonukleodid-Array:

in 3x SSC mit 0,3% SDS für 5min

2x in 3x SSC für je 5min

Anschließendes Trockenzentrifugieren bei 800U/min.

2.7 Auswertung der *Slides*

Die *Slides* werden mit dem GMS 418 *Array Scanner* in zwei Farbkanälen eingelesen: Cy3 wird bei 532nm , Cy5 bei 635nm erfasst. Die Auswertung der beiden Bilddateien erfolgt mit Imagene 4.0 nach Anleitung mit folgenden Einstellungen:

Normalisierung - über den ganzen *Slide*,

Hintergrundkorrektur - lokal.

In der weiteren Auswertung werden lediglich *Spots* berücksichtigt, die ein positives Signal über Hintergrund geben. Die *Spots* des Gesamtgenom-Array werden mit der *Clonetracker Software*TM identifiziert.

2.8 Bestimmung der Wachstumskinetik

Eine Bakteriensuspension wird in PPM+ unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Hierbei wird regelmäßig die OD_{600nm} bestimmt. Bei einer OD_{600nm} nahe 1,0 werden 3ml zur Aufnahme in NHS und 2ml zur Aufnahme in PPM+ portioniert. Die Suspensionen werden zentrifugiert, die sedimentierten Bakterien in 3ml bzw. 2ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert, um sie dann in 3ml NHS bzw. 4ml PPM+ aufzunehmen. Von diesen Proben werden rasch 3x 1ml Portionen angelegt, um einer Agglutination der Bakterien im NHS zuvorzukommen. Parallel dazu werden 3ml einer Suspension des Stammes H44/76 in PPM+ analog weiterverarbeitet, um sie dann in 3x 1ml NHS Portionen aufzuteilen. Es liegen also jeweils 3x 1ml Proben in den Ansätzen MC58 in NHS, MC58 in PPM+ und H44/76 in NHS vor, die unter Standardbedingungen weiterinkubiert werden. Zu den Zeitpunkten 30min, 75min und 120 Minuten werden von jedem Ansatz eine Probe mit 1ml Saponin 2% durchmischt, um eine Verdünnungsreihe anzulegen. Die Proben für die drei Zeitpunkte werden also nicht aus demselben Ansatz entnommen, was zu einer höheren Streuung der Bakterienzahlen führen kann, jedoch durch die notwendige Behandlung mit Saponin, um Agglutinate im NHS zu lösen, bedingt ist. Für die Verdünnungsreihe wird je 900 μ l PBS in 7 Reaktionsgefäßen vorgelegt. Aus der mit Saponin durchmischten Probe werden 100 μ l entnommen und zu den ersten 900 μ l PBS gegeben. Von dieser ersten 1:10-Verdünnung werden wieder 100 μ l entnommen, um sie zu den zweiten 900 μ l PBS zugeben. Analog werden somit Verdünnungen der Stufen $-2 \cdot \log_{10}$ bis $-7 \cdot \log_{10}$ angelegt. Von den Stufen, die eine Bakteriendichte im zählbaren Bereich erwarten lässt, werden 100 μ l entnommen und auf einem Agarnährboden gleichmäßig verteilt, was einem weiteren Verdünnungsschritt um eine \log_{10} -Stufe entspricht. Die Agarplatten werden über Nacht unter Standardbedingungen inkubiert. Um die in die Verdünnungsreihe eingegangene Bakterienzahl zu bestimmen, werden die entstandenen Kolonien gezählt, wobei angenommen wird, dass eine Kolonie einem Klon entspricht und entsprechend der Verdünnungsstufe zurückgerechnet. Um die Zahl der Bakterien im vorgelegenen Ansatz zu bestimmen, werden Mittelwerte aus benachbarten Verdünnungsstufen gebildet und mit 2 multipliziert, um die Verdünnung durch Saponingabe zu korrigieren.

Teil III

Ergebnisse

1 Etablierung von Oligonukleotid-basierten Microarrays anhand des Hitzeschock-Modells

1.1 Vergleich PCR-Produkt-basierter *versus* Oligonukleotid-basierter Arrays

Nachdem von Matthias Guckenberger ein cDNA-Array mit 59 repräsentierten Genen implementiert worden war, wurden in einer ersten Serie von Experimenten dieser cDNA- und ein Oligonukleotid-Array hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität miteinander verglichen. Die für beide Arrays identische Auswahl von 59 Genen beinhaltet bereits bekannte Hitzeschock-regulierte Gene sowie elementare Stoffwechselgene. RNA wurde jeweils aus der kapsellosen Mutante MC58 Δ *siaD* isoliert. Für die cDNA-Arrays wurde

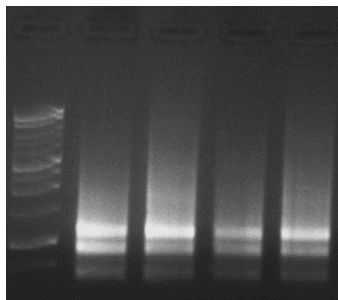


Abbildung 1: Gelelektrophorese von vier parallel isolierten RNA-Proben, jeweils 5μ l aufgetragen

für jedes Gen ein internes Basenfragment von 300-560bp Länge mittels PCR amplifiziert und mit einem Affymetrix 417 Arrayer auf CTM-GAPS-beschichtete Glasobjektträger aufgetragen, vertikal in 10 facher Wiederholung. Die Bindung der DNA-Sonden an die Silanbeschichtung erfolgte durch UV-Bestrahlung (Guckenberger, 2004). Für die Oligonukleotid-Arrays wurden für jedes Gen drei Oligonukleotidsonden (40bp Länge) mit Sequenzen spezifisch für 5'-Region, Zentrum und 3'-Region des Gens hergestellt (MWG-Biotech AG, Ebersberg). Die Oligomere wurden mit dem Arrayer auf Aldehyd-Oberflächen-Objektträger aufgetragen und über eine kovalente C6-Aminomodifikation

am 5' Ende gebunden. Die drei Sonden pro Gen lagen nebeneinander, jeweils in 5-facher Wiederholung vertikal. Tabelle 4 listet die Gene der auf beiden *Arrays* gesetzten Sonden auf, Abbildung 2 zeigt hybridisierte *Arrays* beider Typen in der Fluoreszenzdarstellung.

Tabelle 4: Subset der Gene vorhanden auf Oligonukleotid- und PCR-Produkt-*Arrays*

Locus	Produkt
<i>Hitzeschock-assoziiert</i>	
NMB0027 ¹	FkbP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (<i>fbp</i>)
NMB0059	Heat shock protein (<i>dnaJ</i>)
NMB0550	Thiol:disulfide interchange protein (<i>dsbC</i>)
NMB0554	Heat shock protein 70 (<i>dnaK</i>)
NMB0791	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
NMB1027	truncation
NMB1131	chaperone protein HscA (<i>hscA-1</i>)
NMB1313	trigger factor (<i>tig</i>)
NMB1366	thioredoxin
NMB1519	thiol:disulfide interchange protein (<i>dsbD</i>)
NMB1522	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FkbP-type (<i>slyD</i>)
NMB1649	disulfide bond formation protein B (<i>dsbB</i>)
NMB1845	thioredoxin
NMB1972	heat shock protein (<i>groEL</i>)
NMB1973	chaperonin (<i>groES</i>)
<i>Kompetenz/Transformation</i>	
NMB0018	pilin Pile (<i>pilE</i>)
NMB0049	pilC2 protein, authentic frameshift (<i>pilC2</i>)
NMB0116	DNA processing chain A (<i>dprA</i>)
NMB0118	DNA topoisomerase(<i>topA</i>)
NMB0269	competence protein
NMB0329	type IV pilus assembly protein (<i>pilF</i>)
NMB0332	type IV prepilin peptidase (<i>pilD</i>)
NMB0405	competence protein (<i>comM</i>)
NMB0692	tpc protein (<i>tpc</i>)
NMB0702	competence protein A (<i>comA</i>)
NMB0703	competence protein L (<i>comL</i>)
NMB1445	recA protein (<i>recA</i>)
NMB1588	CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase(<i>pgsA</i>)

Fortsetzung nächste Seite

¹ORF Nummern nach (Tettelin u. a., 2000)

Locus	Produkt
NMB1715	multiple transferable resistance system protein MtrD (<i>mtrD</i>)
NMB1808	pilM protein (<i>pilM</i>)
NMB1809	pilN protein (<i>pilN</i>)
NMB1810	pilO protein (<i>pilO</i>)
NMB1811	pilP protein (<i>pilP</i>)
NMB1812	pilQ protein (<i>pilQ</i>)
NMB1847	pilC1 protein, authentic frameshift (<i>pilC1</i>)
NMB1936	ATP synthase F1 subunit (<i>atpA</i>)
NMB1940	ATP synthase F0 subunit (<i>atpB</i>)
NMB2044	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (<i>ptsI</i>)
<i>Restriktion/Modifikation</i>	
NMB0829	type I restriction enzyme EcoR124II M protein (<i>hsdM</i>)
NMB0831	type I restriction enzyme S protein, degenerate
NMB0835	type I restriction enzyme EcoR124II R protein
NMB1289	type II restriction enzyme
NMB1375	modification methylase, putative, authentic frameshift
<i>housekeeping</i>	
NMB0207	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (<i>gapA-1</i>)
NMB0950	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit (<i>sdhA</i>)
NMB0951	succinate dehydrogenase, iron-sulfur protein (<i>sdhB</i>)
NMB0955	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component (<i>sucA</i>)
NMB1341	pyruvate-dehydrogenase <i>pdhA</i>
NMB2159	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (<i>gapA-2</i>)
<i>Sigma Faktoren</i>	
NMB0712	RNA polymerase sigma-32 factor (<i>rpoH</i>)
NMB1538	RNA polymerase sigma-70 factor (<i>rpoD</i>)
NMB2044	sigma faktor
NMB2144	sigma faktor
<i>nqr-Operon</i>	
NMB0564	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase, subunit F (<i>nqrF</i>)
NMB0565	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase, subunit E (<i>nqrE</i>)
NMB0566	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase, subunit D (<i>nqrD</i>)
NMB0567	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase, subunit C (<i>nqrC</i>)
NMB0568	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase, subunit B (<i>nqrB</i>)
NMB0569	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase, subunit A (<i>nqrA</i>)
<i>NO Reduktase</i>	
NMB1622	nitric oxide reductase (<i>norB</i>)

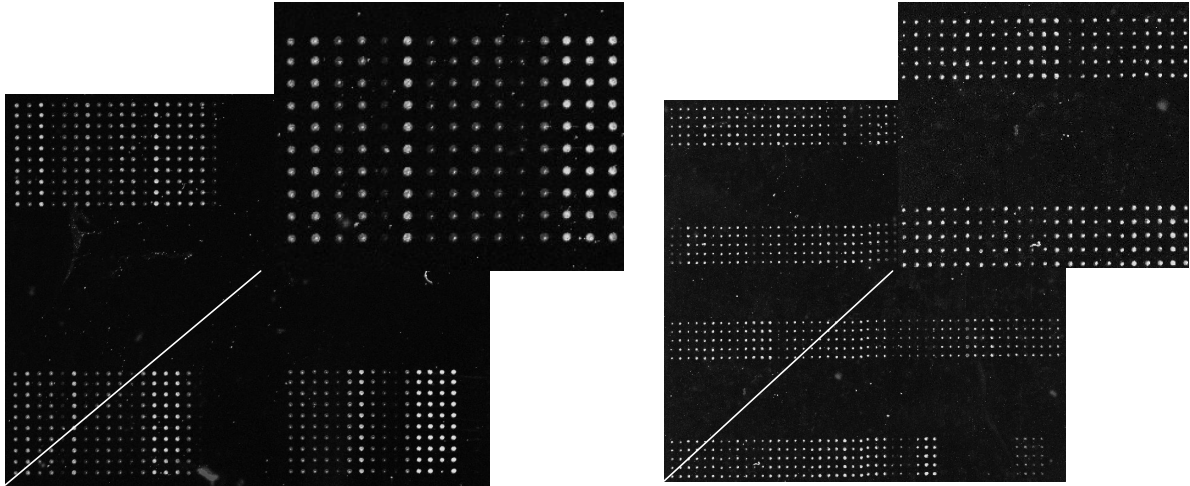


Abbildung 2: Fluoreszenzdarstellung der Arrays mit Ausschnittsvergrößerung; links PCR-Array, rechts Oligonukleotid-Array. In einer Säule sind die jeweiligen Replikate einer Sonde aufgebracht.

1.1.1 Parallelhybridisierung identischer RNA-Proben

Um die Variabilität beider Systeme zu bestimmen, wurde eine Kultur $MC58\Delta siaD$ in PPM+ Medium unter $37^\circ C$ Standardbedingungen inkubiert und in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm} = 0.7$) RNA nach Protololl isoliert und weiterverarbeitet.

Die RNA wurde identisch in zwei Hälften aufgeteilt und beide Hälften getrennt unter Beisein von Cy3- bzw. Cy5-CTP in farbig markierte cDNA umgeschrieben. Die unterschiedlich markierten cDNA-Proben wurden anschließend vereint, gemischt, erneut geteilt und nach Protokoll weiterbehandelt, um je eine Hälfte auf den cDNA-Array und auf den Oligonukleotid-Array zur Hybridisierung zu bringen. Im Idealfall sollte für alle Gensonden das Verhältnis der Grün-zu-Rot-Fluoreszenz (*Signal intensity ratio*) eins zu eins betragen. Für jedes Gen des cDNA-Arrays wurde das arithmetische Mittel Q_{Rep} und die Standardabweichung SD_{Rep} der *Signal intensity ratio* Q über die 10 Replikate gebildet. Wie in Abbildung 3 auf der nächsten Seite dargestellt wurde analog hierzu das Mittel Q_{Rep} für die Oligonukleotid-Positionen #1 bis #3 pro Gen sowie die Standardabweichung SD_{Rep} über die 5 Replikate gebildet und anschließend für jedes Gen das Mittel \bar{Q}_{Tripel} mit seiner Standardabweichung SD_{Tripel} über die drei Oligonukleotid-Positionen berechnet. Schließlich wurde als Endwert für beide Arrays der Durchschnitt mit Standardabweichung über die 59 Gene gebildet:

Für den cDNA-Array wurde eine mittlere *Signal intensity ratio* von 1,04

bestimmt mit einer Standardabweichung von 0,19.

Der Minimalwert lag bei 0,73, was einem Abstand zum Mittelwert von 1,73 Standardabweichungen entspricht.

Der Maximalwert lag bei 1,45, einem Abstand zum Mittelwert von 2,15 Standardabweichungen entsprechend,

Für den Oligonukleotid-Array wurde eine mittlere *Singnal intensity ratio* von 1,03 bestimmt mit einer Standardabweichung von 0,20.

Der Minimalwert lag bei 0,74, einem Abstand zum Mittelwert von 1,6 Standardabweichungen entsprechend.

Der Maximalwert bei 1,41, einem Abstand zum Mittelwert von 1,9 Standardabweichungen entsprechend.

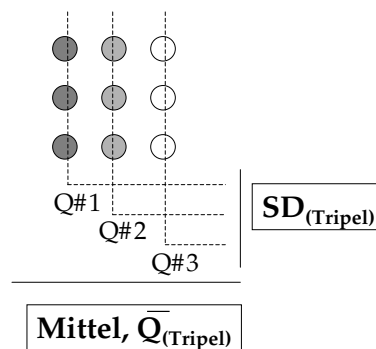


Abbildung 3: Oligonukleotid-Array: Berechnung von mittlerer Ratio und Standardabweichung

Wie oben ausgeführt, tragen sowohl Schwankungen innerhalb der Replikate als auch zwischen den Oligonukleotid-Positionen #1 bis #3 zur SD_{Tripel} bei. Um herauszufinden, welcher Parameter den größeren Anteil zur Gesamtstandardabweichung liefert, wurde für jedes Gen das Mittel \overline{SD}_{Rep} der Standardabweichungen SD_{Rep1} bis SD_{Rep3} innerhalb der Replikate gebildet und mit dem Mittel \overline{SD}_{Reihe} der Standardabweichungen SD_{Reihe1} bis SD_{Reihe3} innerhalb der Oligonukleotid-Positionen verglichen. Für \overline{SD}_{Rep} wurden lediglich die ersten drei Replikate gewertet, um für beide Parameter über die gleiche Anzahl an Berechnungselementen zu verfügen:

Für 52 von 59 Genen war die Abweichung zwischen den drei Oligonukleotiden größer als die zwischen den Replikaten.

Abbildung 4 auf der nächsten Seite veranschaulicht die Art der Bestimmung beider Vergleichswerte:

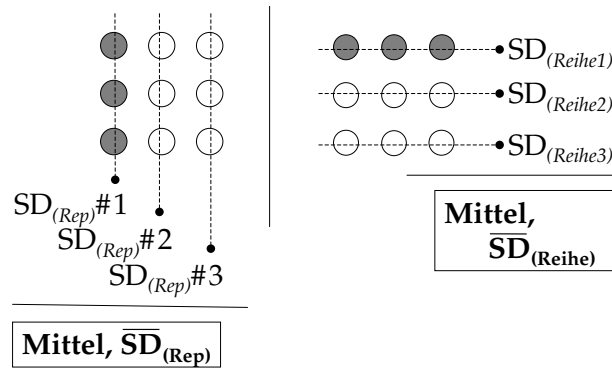


Abbildung 4: SD-Bestimmung über drei Replikate und Oligonukleotid-Positionen

Um die Standardabweichungen über die Replikate beider *Array*-Systeme miteinander vergleichen zu können, wurde SD_{Rep} für den cDNA-*Array* lediglich über die Replikate 1 bis 5 und für den Oligonukleotid-*Array* für jede Oligonukleotidposition # 1 bis # 3 getrennt bestimmt:

Die Abweichung zwischen den Replikaten war
für Oligonukleotidposition #1 bei 45 Genen von 59 geringer als die des cDNA-*Array*, entsprechend 0,76%,
für Oligonukleotidposition #2 bei 42 Genen, entsprechend 71%,
für Oligonukleotidposition #3 bei 39 Genen von 59 geringer als die des cDNA-*Array*, entsprechen 66%.

Die Ergebnisse der Parallelhybridisierungen sind Grundlage für die Festlegung der Schwellenwerte, ab denen ein Gen als differentiell reguliert betrachtet wird. Legt man eine Normalverteilung zugrunde, so liegen im Intervall, welches mit Abstand von 2,58 facher SD Abstand zu beiden Seiten des Mittelwertes aufgespannt wird, 99% der Gene, also 58,41 - gerundet 58 von 59 Genen. Für den cDNA-*Array* (mittleres \bar{Q} 1,04, SD 0,20) ergeben sich hieraus Intervallgrenzen von 0,65 und 1,51, für den Oligonukleotid-*Array* (mittleres \bar{Q} 1,02, SD 0,19) von 0,65 und 1,52. In beiden *Arrays* lagen sämtliche Gene innerhalb dieser Intervallgrenzen. Legt man dem Intervall eine 3,3 fache Standardabweichung zugrunde, so liegen darin 99,9% der Werte, also 58,84, gerundet 59 aus 59 Genen. Für den cDNA-*Array* ergeben sich somit rechnerisch Grenzen von 0,59 und 1,70, für den Oligonukleotid-*Array* von 0,60 und 1,65 innerhalb derer sämtliche nicht differentiell regulierte Gene liegen sollten. In den folgenden vergleichenden Hitzeschock-Experimenten

wurde das Verhalten beider *Arrays* bei Anwendung der Grenzen 1,6 bzw. 0,63 und 2,0 bzw. 0,5 untersucht.

Die Häufigkeitsverteilungen (Abbildungen 5 und 7) sowie die sogenannten *Scatterplots* (Abbildungen 6 und 8) veranschaulichen die Werteverteilung der Parallelhybridisierungen. In einem Scatterplot werden auf der X-Achse die Intensitäten im roten Farbkanal und auf der Y-Achse die Intensitäten im grünen Farbkanal in logarithmischem Maßstab abgebildet. Jeder in beiden Farbkanälen gemessene *Spot* wird somit als Punkt mit den Koordinaten (X;Y) dargestellt. Man erkennt, dass in beiden *Array*-Systemen sich die *Spots* um eine das Verhältnis eins zu eins repräsentierende Gerade scharen.

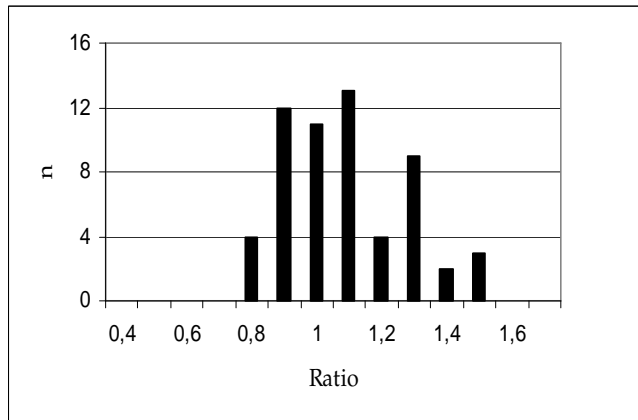


Abbildung 5: Parallelhybridisierung: Häufigkeitsverteilung PCR-Array

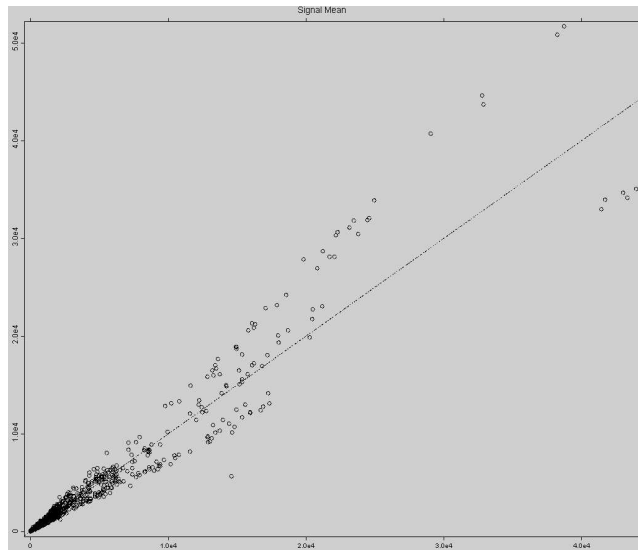


Abbildung 6: Parallelhybridisierung: Scatterplot PCR-Array

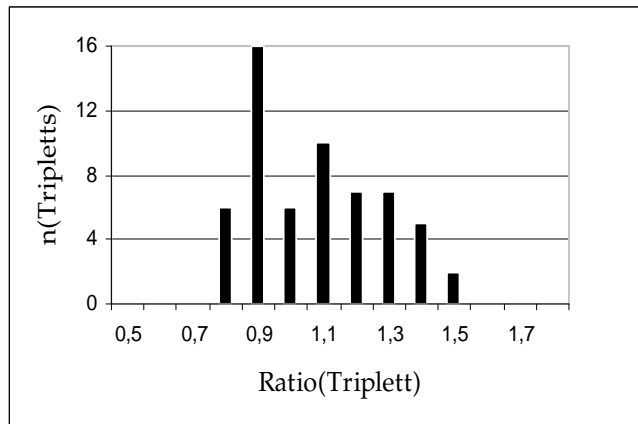


Abbildung 7: Parallelsybridisierung: Häufigkeitsverteilung Oligonucleotid-Array

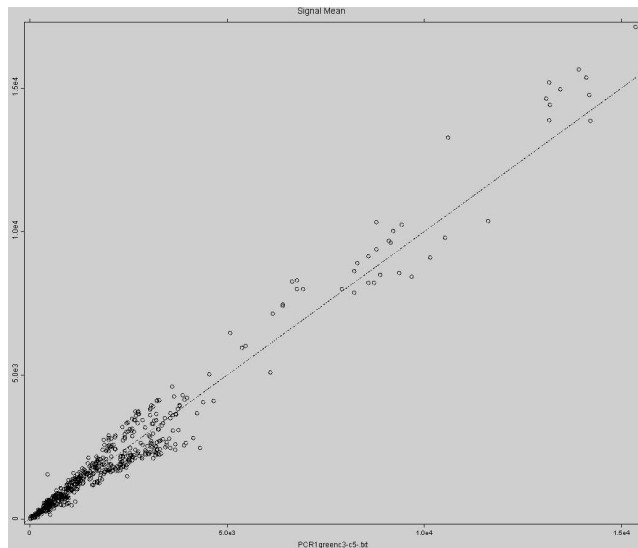


Abbildung 8: Parallelsybridisierung: Scatterplot Oligonucleotid-Array

1.1.2 Hitzeschock

Anhand des Hitzeschock-Modells wurden beide *Array*-Systeme daraufhin getestet, Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität zu detektieren. Hierzu wurde eine Suspension von *MC58 Δ siaD* unter Standardbedingungen kultiviert und in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm} = 0,7$) in identische Hälften aufgeteilt. Eine Hälfte wurde für 7 min einem Hitzeschock von 44°C ausgesetzt, während die andere Hälfte weiter unter Standardbedingungen kultiviert wurde. 20 min nach Hitzeschock-Beginn wurde aus beiden Kulturen simultan RNA isoliert und nach Protokoll weiterverarbeitet. Als interne Standards wurden RNA-Transkripte von *Saccharomyces*-Genen im Verhältnis 3 : 1 : 1 : 1/3 beigefügt. Differentiell farbmarkierte cDNA-Suspensionen wurden gemischt und identisch in zwei Hälften geteilt, um sie zur Hybridisierung auf cDNA- und Oligonukleotid-Arrays zu bringen. Der Vergleich basiert auf Datensätzen, die aus zwei unabhängigen Hitzeschock-Experimenten generiert wurden. Aufgeführt in Tabelle 5 sind die Gene, die auf mindestens einem *Array* ein \overline{Q} von größer oder gleich 1,6 bzw. kleiner gleich 0,63 aufweisen, was bei den cDNA-Arrays Q_{Rep} , bei den Oligonukleotid-Arrays \overline{Q}_{Tripel} entspricht.

Tabelle 5: Hitzeschock-Experimente 1 und 2: differentiell regulierte Gene, $\overline{Q} \leq 0,63; \geq 1,6$

Gen	Experiment 1				Experiment 2			
	Oligo-Array Ratio	SD	cDNA-Array Ratio	SD	Oligo-Array Ratio	SD	cDNA-Array Ratio	SD
<i>Hitzeschock-assoziiert</i>								
NMB0059 ²	2,36	0,60	1,77	0,12	3,50	0,98	1,31	0,28
NMB0554	1,98	0,81	3,29	0,07	1,79	1,12	3,77	0,19
NMB0791	1,94	0,15	1,71	0,11	2,08	0,23	1,30	0,15
NMB1131	0,92	0,18	0,94	0,05	1,75	1,17	0,87	0,06
NMB1366	2,53	0,66	2,11	0,15	4,18	1,03	3,80	0,12
NMB1519	1,67	0,49	1,34	0,05	0,84	0,06	1,09	0,05
NMB1522	1,38	0,18	1,25	0,06	0,68	0,02	0,57	0,02
NMB1972	2,47	0,60	2,79	0,20	3,91	1,39	2,76	0,13
NMB1973	3,49	1,14	4,17	0,70	4,52	3,01	4,02	0,22

²ORF Nummern nach (Tettelin u. a., 2000)

	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD
<i>Kompetenz/Transformation</i>								
NMB0116	1,66	0,32	1,41	0,07	1,04	0,02	1,01	0,11
NMB1808	0,55	0,12	0,76	0,06	0,95	0,03	1,14	0,06
NMB1809	0,47	0,08	0,79	0,06	0,73	0,14	0,55	0,03
NMB1810	0,44	0,06	0,41	0,04	0,51	0,05	0,39	0,02
NMB1812	0,74	0,20	0,54	0,03	0,68	0,12	0,64	0,04
NMB1936	0,64	0,02	0,61	0,10	0,49	0,00	0,57	0,14
NMB1940	0,91	0,08	0,77	0,07	0,89	0,08	0,50	0,02
<i>housekeeping</i>								
NMB0950	0,74	0,26	0,49	0,06	0,86	0,15	0,66	0,04
NMB0951	0,50	0,15	0,46	0,04	0,83	0,28	0,80	0,11
NMB0955	0,78	0,07	0,60	0,13	0,83	0,17	0,71	0,06
NMB1341	0,96	0,03	1,02	0,04	0,57	0,06	0,90	0,05
<i>Sigma Faktoren</i>								
NMB0712	2,20	0,21	1,75	0,11	1,17	0,28	0,96	0,07
NMB1538	1,99	0,44	1,77	0,08	1,63	0,17	1,42	0,04
<i>nqr-Operon</i>								
NMB0565	0,59	0,11	0,74	0,04	0,55	0,18	0,45	0,01
NMB0566	0,67	0,08	0,85	0,03	0,53	0,16	0,70	0,03

In Experiment 1 wurden 10 Genen von beiden *Arrays* übereinstimmend als differentiell reguliert detektiert. Sechs weitere lediglich vom Oligonukleotid-*Array* und 4 weitere vom cDNA-*Array*, wobei die unterschwellige Ratio der Gene auf dem korrespondierenden *Array* die selbe Tendenz zeigte.

In Experiment 2 wurden 7 Gene übereinstimmend von beiden *Arrays* als differentiell reguliert detektiert. Fünf weitere wurden vom Oligonukleotid-*Array* und 3 weitere lediglich vom cDNA-*Array* detektiert. Auch hier zeigte sich bis auf ein Gen die selbe Tendenz auf dem korrespondierenden *Array*. In folgender Tabelle sind die Gene gegenübergestellt, die übereinstimmend von beiden Oligonukleotid- bzw. cDNA-*Array* detektiert wurden:

Oligo-Array 1 & 2		cDNA-Array 1 & 2	
NMB0059	NMB1538		
NMB0554	NMB1810	NMB0554	NMB1810
NMB0565			NMB1936
NMB0791	NMB1972		NMB1972
NMB1366	NMB1973	NMB1366	NMB1973

So wurden neun von insgesamt zehn Genen von beiden Oligonukleotid-Arrays als differentiell reguliert detektiert, von den cDNA-Arrays lediglich sechs.

Die Standardisierung erfolgte über alle Signale des Arrays, wodurch mögliche Unterschiede in den Ausgangsmengen der eingesetzten RNA-Isolate ausgeglichen werden konnten. Hierdurch kam es oft zur Verschiebung der absoluten Ratios der internen Standards. Um das auszugleichen, wurden die Ratios der internen Standards auf die das Verhältnis 1:1 repräsentierenden Sonden Sacc2 und Sacc3 restandardisiert: Es wurde der Mittelwert $\bar{S}_{2,3}$ von \bar{Q} der Sonden Sacc2 und Sacc3 gebildet und alle vier Standard-Ratios mit seinem Kehrwert c_S multipliziert:

Tabelle 6: Hitzeschock-Experimente 1 und 2: korrigierte interne Sacc-Standards

	Experiment 1		Experiment 2	
	Oligo-Array	cDNA-Array	Oligo-Array	cDNA-Array
<i>Mittel</i> $\bar{S}_{2,3}$	0,54	0,84	0,50	0,40
<i>Faktor</i> c_S	1,85	1,19	2,00	2,5
Sacc1	2,72	2,80	1,86	2,73
Sacc2	0,87	0,88	0,88	0,8
Sacc3	1,12	1,19	1,14	1,13
Sacc4	0,56	0,45	0,76	0,35

Wendet man die Definition der differentiellen Regulation auf die korrigierten internen Standards an, so liegt Sacc1 in allen vier *Arrays* jenseits des Schwellenwertes $\geq 1,6$ und Sacc4 in drei von vier *Arrays* jenseits $\leq 0,63$. Sacc2 und Sacc3 liegen in allen vier *Arrays* unterschwellig. Die Idealverhältnisse von $3 : 1 : 1 : 1/3$ werden allerdings nicht erreicht.

Legt man die Grenze, ab der ein Gen als differentiell reguliert betrachtet wird, auf 2 bzw. 0,5 so ergibt sich Tabelle 7.

Tabelle 7: Hitzeschock-Experimente 1 und 2: differentiell regulierte Gene, $\bar{Q} \leq 0,5; \geq 2,0$

Gen	Experiment 1		Experiment 2	
	Oligo-Array Ratio	cDNA-Array Ratio	Oligo-Array Ratio	cDNA-Array Ratio
<i>Hitzeschock-assoziiert</i>				
NMB0059	2,36	1,77	3,50	1,31
NMB0554	1,98	3,29	1,79	3,77
NMB0791			2,08	1,30
NMB1366	2,53	2,11	4,18	3,80
NMB1972	2,47	2,79	3,91	2,76
NMB1973	3,49	4,17	4,52	4,02
<i>Kompetenz/Transformation</i>				
NMB1809	0,47	0,79	0,73	0,55
NMB1810	0,44	0,41	0,51	0,39
NMB1812	0,74	0,54		
NMB1936			0,49	0,57
NMB1940			0,89	0,50
<i>housekeeping</i>				
NMB0950	0,74	0,49		
NMB0951	0,50	0,46		
<i>Sigma Faktoren</i>				
NMB0712	2,20	1,75		
NMB1538	1,99	1,77		
<i>nqr-Operon</i>				
NMB0565			0,55	0,45
NMB0566			0,53	0,70

Es sind die Gene aufgeführt, die auf einem der vier *Arrays* eine gerundete differentielle Regulierung \overline{Q} von 2 und mehr bzw. 0,5 und weniger zeigen.

Im ersten Experiment wurden sechs Gene übereinstimmend als differentiell reguliert detektiert, vier weitere Gene lediglich vom Oligonukleotid-*Array*, wobei drei hochregulierte Gene auf dem PCR-*Array* mit größer oder gleich 1,75 detektiert wurden.

Im zweiten Experiment wurden vier Gene gut korrelierend als differentiell reguliert detektiert, zwei Gene, die in einem System knapp über den Schwellenwert-Kriterien lagen und drei auf dem Oligonukleotid-*Array*, die keine Entsprechung auf dem PCR-*Array* fanden, und zwei auf dem PCR-*Array* ohne Entsprechung auf dem Oligonukleotid-*Array*.

In folgender Tabelle sind aus beiden Experimenten die Gene zusammengestellt, die von beiden Oligonukleotid- bzw. cDNA-basierten Systemen als differentiell reguliert detektiert wurden:

Oligo- <i>Array</i> 1 & 2		cDNA- <i>Array</i> 1 & 2	
NMB0059	NMB1810		NMB1810
	NMB1972	NMB0554	NMB1972
NMB1366	NMB1973	NMB1366	NMB1973

Um herauszufinden, ob die Unterschiede in der Ratio Q_{Rep} zwischen den drei Oligonukleotid-Positionen pro Gen systematischen Einflüssen unterliegen, wurden die Ergebnisse des Oligonukleotid-*Arrays* aus Experiment 1 zunächst auf Abhängigkeit von der Positionierung in der Gensequenz untersucht. Die drei Oligonukleotide sind jeweils in 5'-3' Richtung gesetzt. Hierzu wurde wieder für jedes Gen das Mittel Q_{Rep} über die fünf Replikate gebildet und \overline{Q}_{Tripel} über die drei Oligonukleotid-Positionen gemittelt. Für jedes Q_{Rep} der drei Oligonukleotid-Positionen #1 bis #3 wurde die Standardabweichung $SD_{Pos.\#1-\overline{Q}}$ bis $SD_{Pos.\#3-\overline{Q}}$ zu diesem Mittelwert berechnet. Schließlich wurde über alle Gene für die jeweilige Position #1, #2, #3 die Anzahl der Oligonukleotide mit der höchsten SD innerhalb des Oligonukleotidtripels bestimmt:

Auf Position #1 lagen 22 Oligonukleotide mit der höchsten SD im Tripel, höchste $SD_{Pos.\#1-\overline{Q}}$ 0,66, mittlere SD 0,21

Auf Position #2 lagen 16 Oligonukleotide mit der höchsten SD im Tripel, höchste $SD_{Pos.\#2-\bar{Q}}$ 0,80, mittlere SD 0,20
 Auf Position #3 lagen 21 Oligonukleotide mit der höchsten SD im Tripel, höchste $SD_{Pos.\#3-\bar{Q}}$ 0,46, mittlere SD 0,12.

Dies zeigt, dass die Positionierung der Oligonukleotidsonden innerhalb der Gensequenz keinen systematischen Effekt auf Unterschiede in Q_{Rep} im Tripel hat, was bei einseitiger RNA-Degradation zu erwarten gewesen wäre.

Weiterhin wurden überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der oben bestimmten Abweichungen $SD_{Pos.\#\bar{Q}}$ der einzelnen Oligonukleotid-Positionen zum Mittelwert des Tripels und ihrer Intensität besteht. Als Maß für die Intensität wurde für jedes Oligonukleotid die Differenz aus *Mean signal intensity* und *Mean background intensity* gebildet und über beide Farbkanäle gemittelt.

20 Oligonukleotid-Positionen mit der höchsten SD im Tripel hatten die höchste Intensität im Tripel.

18 Oligonukleotid-Positionen mit der höchsten SD im Tripel hatten die mittlere Intensität im Tripel.

21 Oligonukleotid-Positionen mit der höchsten SD im Tripel hatten die niedrigste Intensität im Tripel.

Es lässt sich kein Zusammenhang zwischen Signalintensität der Oligonukleotid-Positionen und größter Abweichung im Tripel nachweisen. Nimmt man die Signalstärke als Maß für die Affinität der Oligonukleotid-Sonden zur cDNA-Probe, so besteht kein Hinweis drauf, dass Unterschiede in den Affinitäten die Fähigkeit zur Bestimmung von \bar{Q} beeinflussen.

Schließlich wurde untersucht, ob die SD über das Tripel mit der mittleren Ratio \bar{Q} korreliert. Hierzu wurden die Replikate gemittelt und für jedes Gen die mittlere Ratio \bar{Q} und die SD_{Tripel} über die drei Oligonukleotidpositionen berechnet (Vergleiche oben, Figur 3 auf Seite 48). Die Gene wurden anhand ihrer SD_{Tripel} in vier Klassen mit vergleichbarer Anzahl an Elementen eingeteilt. In jeder Klasse wurde die Menge an Genen bestimmt, deren Ratio \bar{Q} innerhalb des Intervalls von 0,63 bis 1,6 liegen.

15 Gene mit SD_{Tripel} kleiner 0,08

15 Gene mit SD_{Tripel} zwischen 0,08 und $< 0,15$

15 Gene mit SD_{Tripel} zwischen 0,15 und $< 0,27$

14 Gene mit SD_{Tripel} größer 0,27

Abbildung 9 zeigt, dass die Anzahl dieser nicht differentiell regulierten Gene über die Klassen mit steigender SD_{Tripel} stetig abnimmt. Werte von \bar{Q} in Richtung differentielle Regulation gehen also mit einer höheren Abweichung zwischen den Oligonukleotidpositionen einher. Es bestehen demzufolge innerhalb eines Oligonukleotid-Tripels Unterschiede in der Fähigkeit, differentielle Regulation eines Gens in der Ratio Q abzubilden, wobei ein Positionseffekt, wie oben dargestellt, nicht festgestellt werden konnte.

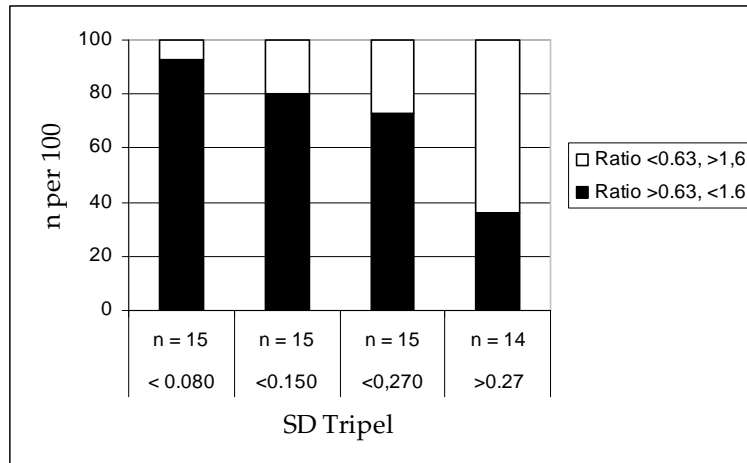


Abbildung 9: Korrelation SD_{Tripel} - Ratio

1.2 Etablierung eines Gesamtgenom-Arrays

1.2.1 Hitzeschock-Experimente

Nachdem die Eigenschaften beider Array-Systeme unter Standard- und Hitzeschock-Bedingungen anhand eines Subsets von Genen analysiert und verglichen worden waren, wurde ein Array auf Oligonukleotid-Basis implementiert, der das Gesamtgenom von *Neisseria meningitidis* mit 2160 Genen abbildet, wobei für jedes Gen drei unterschiedliche Sonden gesetzt wurden. Darüberhinaus waren zusätzliche Gensonden vorhanden, welche Transkriptomanalysen des Stammes Z2491 der Serogruppe A erlauben. Die Gensonden wurden auf zwei Superaldehyd-Galsobjektträger aufgeteilt. Hitzeschock-Experimente wurden mit dem Stamm MC58 Δ *siaD* nach identischem Protokoll wie oben dargestellt durchgeführt, die erhaltene farbmarkierte cDNA-Suspension geteilt und zu gleichen Hälften auf die beiden Oligonukleotid-Array-Objektträger aufgebracht. Die Arrays erlaubten die Detektion spezifischer Hybridisierungssignale mit Fluoreszenzintensitäten über *Back ground level* bei 1498 Genen, entsprechend 69,35 % aller Gene. Es wurden drei unabhängig durchgeführte Experimente ausgewertet. Setzt man die Grenze, ab der ein Gen als differentiell reguliert gewertet wird, bei 1,60 beziehungsweise 0,63 und fordert man, dass dieser Schwellenwert in mehr als 50% der Experimente erreicht werden soll, so wurden diese Kriterien von 143 Genen erfüllt. Es ergeben sich folgende Schnittmengen zwischen den Einzelexperimenten:

Experiment 1 und 2: 83 Gene von 143 übereinstimmend detektiert, entsprechend 58,0 %

Experiment 1 und 3: 105 Gene von 143 übereinstimmend detektiert, entsprechend 73,4 %

Experiment 2 und 3: 60 Gene von 143 übereinstimmend detektiert, entsprechend 42,0 %

Durchschnittlich wurden von 2 Experimenten 57,8 % der Gene detektiert

Von allen Experimenten übereinstimmend als differentiell reguliert wurden 53 von 142 Genen detektiert, entsprechend 37,2 %.

Für die Grenze von 2,0 beziehungsweise 0,5 wurden unter Beibehalten der übrigen Kriterien 40 Gene als differentiell reguliert detektiert, mit folgenden Schnittmengen zwischen den Einzelexperimenten:

Experiment 1 und 2: 23 Gene von 40 übereinstimmend detektiert, entspre-

chend 57,5%

Experiment 1 und 3: 39 Gene von 40 übereinstimmend detektiert, entsprechend 97,5%

Experiment 2 und 3: 22 Gene von 40 übereinstimmend detektiert, entsprechend 55,0%

Durchschnittlich wurden von 2 Experimenten 70,0 % der Gene detektiert

Von allen Experimenten übereinstimmend als differentiell reguliert wurden 22 Gene von 40 detektiert, entsprechend 55,0%

Eine Übersicht über die Verteilung der Gene auf Funktionsklassen gibt Tabelle 8:

Gengruppe	Anzahl der Gene	
	hochreguliert	herunterreguliert
<i>zelluläre Funktion</i>	6/0 ¹	1/1
<i>Energiemetabolismus</i>	8/6	5/0
<i>Stoffwechsel</i>	6/1	
<i>DNA Metabolismus</i>	5/1	
<i>Transkription/Regulation</i>	6/2	1/0
<i>Proteinsynthese</i>	15/2	
<i>Proteinmodifikation</i>	13/10	
<i>Hülle</i>	3/1	1/0
<i>Transport- und Bindeproteine</i>	3/0	7/2
<i>Prophagen assoziiert</i>	3/0	
<i>unbekannte Funktion</i>	10/0	1/0
<i>hypothetische Proteine</i>	49/14	
<i>Summe</i>	127/37	16/3

Tabelle 8: Hitzeschock Gesamtgenom: Gruppenzuordnung differentiell regulierter Gene. ¹Es sind die Anzahlen der Gene mit $\bar{Q} \geq 1,6$ und $\leq 0,63$ /bzw. $\geq 2,0$ und $\leq 0,5$ angegeben.

Die mächtigste Gruppe bilden die hypothetischen Gene mit 49 Genen, gefolgt von Proteinsynthese- und Modifikationsgenen. In der letztgenannten Gruppe liegt \bar{Q} in 10 von 13 Genen im Bereich $\geq 2,0$. Betrachtet man die Gene innerhalb dieser Gruppe genauer, so lässt sich die Funktion Proteinfaltung und Stabilisierung alleine acht hochregulierten Genen zuordnen: Die Gene für die *Chaperone*-Protein-Systeme *dnaK*, *dnaJ*,

grpE bzw. *groEL*, *groES*, das Chaperone *hscB*, die Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase NMB0791 sowie NMB0294 (*dsbA-2*, ein *thiol:disulfide interchange protein*. Drei weitere Gene kodieren für Proteasen: Die Oligopeptidase A (*prlC*, NMB0214), ATP-abhängige Protease La (NMB1231, *ion*, NMB1472, *clpB*).

Die Gruppe Transkription/Regulation enthält die beiden gut charakterisierten Faktoren *rpoH*/ σ 32 und *rpoD*/ σ 32, sowie NMB1563, einen Regulator der GntR-Familie, jeweils hochreguliert. In der Gruppe des Energiemetabolismus zeigen 6 von 8 Genen eine differentielle Regulation $\bar{Q} \geq 2,0$. Darunter befinden sich die Dehydrogenasen NMB1377 (L-Laktat-DH), NMB0947 (2-Oxoglutarat-DH), NMB0604 (Alkohol-DH). In derselben Gruppe findet sich auch die größte Anzahl herunterregulierter Gene. Unter diesen sind Gene des aeroben Metabolismus wie die für die F1-Untereinheit der ATP-Synthetase kodierenden Gene *atpH*, *atpA*, *atpD*. Unter den herunterregulierten Genen befindet sich auch das *pil*-Operon NMB1808-1812.

Auffallend in der Summe ist, dass die meisten differentiell regulierten Gene unter Hitzeschock-Bedingungen eine verstärkte relative Transkription zeigen:

Für 127 von 143 Genen liegt \bar{Q} bei 1,6 oder größer, was einem Anteil von 87,5 % entspricht.

Für 37 von 40 Genen liegt \bar{Q} bei 2,0 oder größer, entsprechend 92,5 %

Um zu prüfen, ob die unter Hitzeschock-Bedingungen gemessene Steigerung der Ratio \bar{Q} mit einer überdurchschnittlichen absoluten Signalintensität einhergeht, wurden die absoluten Intensitäten eines Teil-Arrays des ersten Experiments näher analysiert: Für jedes differentiell regulierte Gen wurde das Mittel der absoluten Intensitäten über alle *Spots* und beide Farbkanäle gebildet. Analog wurde für alle *Spots* des Arrays, deren absolute Intensität beider Farbkanäle über dem *Back ground level* liegen, der Durchschnitt bestimmt:

Von den herunterregulierten Genen lagen 5 von 9 Genen mit ihrer mittleren Intensität über dem Durchschnitt aller positiven Gensonden, entsprechend 56 %.

Von den hochregulierten Genen lagen 33 von 43 Genen mit ihrer absoluten Intensität über dem Durchschnitt, entsprechend 77 %

Herunterregulation geht also mehrheitlich mit geringerer Signalintensität einer als Hochregulation. Die Ergebnisse der drei Experimente sind im Detail in Tabelle 9 aufgeführt. Übereinstimmend differentiell reguliert wurden Gene detektiert, die in einem Operon

organisiert sind. Sie sind der Ergebnistabelle **fett** hervorgehoben. Leerstellen kommen vor, wenn ein Gen in zwei Experimenten überschwellige Werte für \overline{Q} erreichte, sich im dritten Experiment jedoch kein Signal über Hintergrundniveau ergab bzw. nicht genug Elemente vorlagen, um eine SD zu berechnen.

Tabelle 9: Hitzeschock Gesamtgenom-Array: differentiell regulierte Gene, Schwellenwert $\geq 1,6$; $\leq 0,63$

Locus	Gen/Funktion	Experiment 1		Experiment 2		Experiment3		Mittel
		Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	
<i>zelluläre Funktion</i>								
NMB0216 ³	<i>kat</i>	2,35	0,24	1,94	0,42	1,74	0,54	2,01
NMB0798	<i>ftsH</i>	1,82	0,41	1,64	0,35	2,33	0,59	1,93
NMB0838 ¶	cold-shock	0,45	0,2	0,5	0,01	0,29	0,02	0,42
NMB1067	<i>ftsK-1</i>	2,94	1,05	1,86	0,02	1,92	0,63	2,24
NMB1414	<i>FrpC</i> operon	1,87	0,58	1,26	0,29	1,93	0,4	1,69
NMB1415	<i>frpC</i> iron reg.	1,72	0,49	1,72	0,3	1,47	0,2	1,64
NMB1750	<i>pivNM-2</i>	2,09	1,38	1,82		1,02	0,16	1,64
<i>Energiemetabolismus</i>								
NMB0010	<i>pgk</i>	1,93				1,95	0,26	1,94
NMB0259 ¶	<i>nuoN</i>	2,95	1,15			2,47	1,36	2,71
NMB0546	<i>adhP</i>	1,86	0,22	1,65	0,07	1,7	0,13	1,74
NMB0565	<i>nqrE</i>	0,53	0,21	0,8	0,2	0,55	0,13	0,63
NMB0604 ¶	alcohol DH	5,39	0,69	3,33	0,69	4,94	0,89	4,55
NMB0947⁴ ¶	2-oxoglut. DH	3,15	0,73	2,17	0,1	2,31	0,51	2,54
NMB0960	<i>sucD</i>	0,49	0,02	0,87	0,45	0,58	0,11	0,65
NMB1366 ¶	thioredox.	4,12	1,83	2,81	0,71	4,51	1,92	3,81
NMB1377 ¶	<i>lldD</i>	2,28	0,54	1,5	0,62	2,16	0,34	1,98
NMB1790⁵ ¶	<i>grxC</i>	2,54	0,16	3,05	0,57	2,69	0,28	2,76
NMB1933	<i>atpC</i>	0,53	0,01	0,67	0,1	0,55	0,03	0,58
NMB1937	<i>atpH</i>	0,55	0,19	0,72	0,15	0,56	0,04	0,61
NMB2051	<i>petC</i>	0,45	0,08	1,27	0,28	0,57	0,08	0,76
<i>Stoffwechsel</i>								
NMB0337	aminotr., put.	1,81	0,83	1,79	0,53	2,16	0,62	1,92
NMB0396 ¶	<i>nadC</i>	2,53	1,64	1,93	0,49	3,22	1,6	2,56
NMB0559	<i>aarF</i>	1,84	0,52	1,61	0,54	3,05	0,69	2,17
NMB1055	<i>glyA</i>	1,8	0,34	2,31	0,5	1,3	0,21	1,8

Fortsetzung nächste Seite

³ORF Nummern nach (Tettelin u. a., 2000), Gene, die Schwellenwerte von 2,0 bzw. 0,5 erreichen, sind mit ¶ markiert.

Fett gedruckte Gene sind Operon-organisiert

⁴Operon: NMB0946, *Hülle* und NMB0947, *Energiemetabolismus*

⁵Operon: NMB1789, *protein fate* und NMB1790, *Energiemetabolismus*

Locus	Gen	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio
NMB1300	<i>cmk</i>			1,6	0,11	1,65	0,23	1,63
NMB1555	<i>fadD-2</i>	2,01	0,62	1,42	0,01	1,7	0,34	1,71
<i>DNA Metabolismus</i>								
NMB1038	<i>radC</i>	1,76	0,86	2,59		1,73	0,59	2,03
NMB1331	<i>wvrB</i>	1,77	0,28	1,66	0,03	1,33	0,13	1,59
NMB1479	<i>recX</i>	1,69	0,14	1,61	0,38	1,38	0,25	1,56
NMB1537	<i>dnaG</i>	2,47	0,76	1,92	1,04	1,68	0,11	2,02
NMB1902 ¶	<i>dnaN</i>	2,26		1,34	0,23	3,07	1,14	2,22
<i>Transkription</i>								
NMB0168	<i>rpoA</i>	1,59	0,22	1,61	0,17	1,64	0,15	1,61
NMB0686	<i>rnc</i>	0,48	0,15	0,71	0,15	0,56	0	0,58
NMB1538 ¶	<i>rpoD</i>	4,14	0,8	2,45	0,32	2,58	0,14	3,06
<i>transkriptionelle Regulation</i>								
NMB0646	ribonuc. inhib.	2,44				1,64	0,17	2,04
NMB1007	transcript. reg.	2,66	1,56	1,68		1,07	0,23	1,8
NMB1561	<i>DeoR</i> family	2,13	0,46	1,45	0,31	1,82	0,62	1,8
NMB1563⁶ ¶	<i>GntR</i> family	2,18	1,08	2,02	0,51	2,63	0,73	2,28
<i>Proteinsynthese</i>								
NMB0124	<i>tufB</i>	1,44	0,08	1,81	0,6	1,77	0,12	1,68
NMB0159	<i>rpsE</i>	1,6	0,4	1,79	0,15	1,12	0,14	1,5
NMB0160	<i>rpmD</i>	1,74	0,36	1,67	0,09	1,4	0,11	1,6
NMB0161	<i>rplO</i>	1,63	0,11	1,73	0,12	1,41	0,21	1,59
NMB0163	<i>infA</i>	1,98	0,49	1,73	0,26	1,66	0,14	1,79
NMB0164 ¶	<i>rpmJ</i>	2,45	0,34	1,61	0,37	2,1	0,12	2,05
NMB0165 ¶	<i>rpsM</i>	2,48	0,33	1,79	0,16	2,01	0,17	2,09
NMB0166	<i>rpsK</i>	1,83	0,2	1,75	0,14	1,77	0,05	1,78
NMB0325	<i>rplU</i>	1,63	0,24	1,74	0,37	1,13	0,1	1,5
NMB0463	<i>rpsT</i> 3	1,74		2,22		1,92	0	1,96
NMB1230	<i>hupB</i>	1,83	0,2	1,61	0,55	1,64	0,19	1,69
NMB1956	<i>rpmE</i>	1,73	0,49	1,57	0,29	1,81	0,44	1,7
NMB2056	<i>rpsI</i> S9	1,39	0,07	1,66	0,21	1,67	0,17	1,57
NMB2057	<i>rplM</i>	1,72	0,33	1,61	0,34	1,77	0,34	1,7
NMB2102	<i>tsf</i> elong. fact.	1,69	0,05	1,44	0,13	1,68	0,08	1,6
<i>protein fate</i>								
NMB0059 ¶	<i>dnaJ</i>	2,76	0,89	1,97	0,65	4,01	0,55	2,91
NMB0125	<i>secE</i>	1,81		1,4		1,95	0,12	1,72
NMB0214 ¶	<i>prlC</i>	2,01	0,63	1,52	0,12	2,02	0	1,85
NMB0294 ¶	<i>dsbA-2</i>	2,06	0,12	1,72	0,12	3,65	0,54	2,48
NMB0554 ¶	<i>dnaK</i>	5,37	0,38	3,61	0,49	6,23	1,38	5,07
NMB0561 ¶	<i>grpE</i>	5,93	4,26	3,7	1,46	4,01	1,05	4,54
NMB0791 ¶	isomerase	2,59	0,5	1,7	0,47	3,49	0,62	2,59
NMB1231	<i>lon</i>	3,89	1,22	3,24	0,96	5,45	0,94	4,19
NMB1383	<i>hscB</i>	1,61		1,8	0,21	1,44	0,24	1,62
NMB1472 ¶	<i>clpB</i>	4,64	1,2	2,14	0,69	5,65	1,01	4,15

Fortsetzung nächste Seite

⁶Operon: NMB1563, Regulation und NMB1564, hypothetische Proteine

Locus	Gen	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio
NMB1789 ⁷ ¶	<i>secB</i>	2,32	0,21	2,16	0,68	2,55	0,56	2,34
NMB1972 ¶	<i>groEL</i>	4,11	1,36	3,11	0,54	3,89	0,63	3,7
NMB1973 ¶	<i>groES</i>	6,11	2,75	4,54	0,96	5,33	1,39	5,33
<i>Hülle</i>								
NMB0382	<i>rmpM</i>	0,48	0,1	0,61	0,07	0,73	0,03	0,61
NMB0456	<i>amiC</i>	1,7	0,75	1,6	0,26	1,61	0,22	1,64
NMB0946 ⁸ ¶	peroxiredoxin	5,57	1,76	3,21	0,42	3,77	0,83	4,18
NMB1946	OM Lipoprot.	1,69	0,09	1,39	0,12	1,88	0,14	1,65
<i>Transport- und Bindeproteine</i>								
NMB0041	ABC transp.	1,69	0,93	1,48	0,79	1,74	0,98	1,64
NMB0535 ¶	<i>gluP</i>	0,5	0,14	0,9	0,1	0,51	0,11	0,64
NMB0623	<i>potD-2</i>	0,55	0,24	0,65	0,12	0,42	0	0,54
NMB0787 ¶	ABC transp.	0,23	0,1	0,64	0,27	0,29	0,09	0,38
NMB0788	ABC transp.	0,58		0,67	0,05	0,31	0	0,52
NMB1051	ABC transp.	1,74		1,58		1,63	0,48	1,65
NMB1429	<i>porA</i>	0,49	0,2	0,91		0,62	0	0,68
NMB1541	<i>lbpB</i>	1,79		1,78		1,2	0,21	1,59
NMB1809 ⁹	<i>pilN</i>	0,48	0,10	0,67	0,13	0,58	0,01	0,58
NMB1812	<i>pilQ</i>	0,46	0,06	0,57	0,10	0,52	0,02	0,52
<i>Prophagen assoziiert</i>								
NMB0556	repress. prot., put.	3,29	0,87	1,81	0,34	1,91	0,38	2,34
NMB1081	phage transpos.	1,77	0,03	1,34	0,25	1,65	0,14	1,59
NMB1104	phage sheath	1,96		1,38		1,68	0,33	1,67
<i>unbekannte Funktion</i>								
NMB0204	<i>smpA</i>	1,64	0,38	1,61	0,35	1,66	0,18	1,64
NMB0833	type I restr.	2,41				1,73	0	2,07
NMB0845	<i>PhoH</i> -rel.	1,65	0,58	1,32		1,62	0,11	1,53
NMB0901	LDH rel.	1,77	0,4	1,51	0,39	1,7	0,41	1,66
NMB1220	stomatin/Mec-2	2,11	0,58	1,26	0,21	1,79	0,22	1,72
NMB1380	<i>nifU</i>	2,41	0,29	1,48	0,48	1,9	0,07	1,93
NMB1381	<i>HesB/YadR/YfhF</i>	2,66	0,42	1,5	0,42	1,94	0,31	2,03
NMB1405	<i>FrpA/C</i> -rel.	1,63	0,09	1,72	0,16	1,36	0,24	1,57
NMB1669	<i>pepA</i>	0,53	0,47	0,9	0,42	0,55	0,37	0,66
NMB1891	helix-turn fam.	1,72	0,33	1,24	0,36	2,12	0,41	1,7
NMB2038	<i>PemK</i> -rel.	2,08		1,43		1,72	0,43	1,74
<i>hypothetische Proteine</i>								
NMB0028	hyp	2,7				1,7	0	2,2
NMB0034	conserved hyp	1,8	0,11	1,48	0,13	2,47	0,02	1,92
NMB0046 ¶	hyp	3,67	2,69	3,49		3,36	1,59	3,51
NMB0223	hyp	1,73	0,18	1,63	0,26	1,24	0,16	1,53
NMB0227	conserved hyp			4,87		1,95	0	3,41
NMB0266	conserved hyp	1,96	1,42	1,5	0,88	1,71	0,32	1,72
NMB0367	hyp	2,72	1,81	1,69	0,65	1,51	0,4	1,97

Fortsetzung nächste Seite

⁷Operon: NMB1789, *Protein fate* und NMB1790, *hypothetische Proteine*

⁸Operon: NMB0946, *Hülle* und NMB0947, *Energiemetabolismus*

⁹*pil*-Operon: *pilM-Q*

Locus	Gen	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio
NMB0370 ¶	hyp	5,76	1,11	3,13	1,04	2,28	0,39	3,72
NMB0502	hyp	1,64		1,61		0,94	0,23	1,4
NMB0555 ¶	hyp	2,34	0,21	1,71	0,03	2,25	0,15	2,1
NMB0557 ¶	conserved hyp	4,15	0,19	2,29	1,31	3,1	0,04	3,18
NMB0600	hyp	1,28	0,08	1,87		1,65	0	1,6
NMB0644	hyp	2,44	0,36	1,56		1,97	0,23	1,99
NMB0779	hyp	1,67	0,73	1,25	0,48	1,87	0,52	1,6
NMB0864	hyp	1,74	0,39	1,89		1,46	0,07	1,7
NMB0883	conserved hyp	1,71		1,92		1,14	0,17	1,59
NMB0902	hyp	2,94	1,96	1,16		1,73	0,36	1,94
NMB0906 ¶	hyp	2,92	1,31			2,07	0,38	2,49
NMB0907 ¶	hyp	3,26	0,56	1,67	0,12	2	0,53	2,31
NMB0908	hyp	1,81	0,69	0,91	0,1	1,63	0,48	1,45
NMB0945	hyp	2,22		1,62	0,6	1,69	0,96	1,84
NMB0952	conserved hyp	1,93		1,83		1,02	0	1,59
NMB1010	hyp	2,53	0,63			1,61	0,14	2,07
NMB1056 ¶	hyp	6,7	1,38	1,62	0,52	2,51	0,25	3,61
NMB1059	conserved hyp	2,29	0,54	1,52	0,51	1,63	0,27	1,81
NMB1071	conserved hyp	1,67	0,13	1,45	0,15	1,61	0,37	1,57
NMB1116	hyp	1,93	0,43	1,62	0,22	1,43	0,11	1,66
NMB1123	hyp	1,84		1,66		1,28	0,06	1,59
NMB1334 ¶	hyp	2,73	0,31	1,81	0,36	2,09	0,39	2,21
NMB1456	hyp	1,74		2,04		1,22	0	1,67
NMB1468 ¶	hyp	3,19	0,11	2,22	0,23	2,64	0,19	2,68
NMB1469 ¶	hyp	2,04	0,37	2,1	0,53	1,64	0,14	1,93
NMB1551	conserved hyp	1,77	0,13	1,62	0,05	1,47	0,13	1,62
NMB1557	conserved hyp	1,71	0,2	1,69	0,05	1,42	0,05	1,61
NMB1564¹⁰ ¶	conserved hyp	4,54	1,89	2,61	0,08	3,78	0,35	3,64
NMB1796 ¶	conserved hyp	3,54	1,03	2,01	0,15	3,04	0,3	2,86
NMB1848	hyp			2,2		1,71	1,04	1,95
NMB1854	hyp	1,75	0,51	1,69	0,31	1,65	0,33	1,7
NMB1870	hyp	1,61	0,07	1,41	0,13	1,78	0,3	1,6
NMB1908	conserved hyp	3,14	0,79	1,6	0,35	1,61	0,09	2,12
NMB1943	hyp	1,63	0,1	1,73		1,2	0,06	1,52
NMB1951	conserved hyp	1,79	0,36	1,4	0,17	1,7	0,14	1,63
NMB2000 ¶	conserved hyp	2,02	0,57	1,72	0,37	4,16	0,48	2,63
NMB2013 ¶	hyp	2,93	0,86	2,01	0,42	2,17	0,15	2,37
NMB2020	conserved hyp	1,69	0,21	1,37	0,33	1,8	0,14	1,62
NMB2037	hyp	1,83	0,26	1,02	0,1	1,76	0,48	1,54
NMB2067	conserved hyp	1,94		1,93		1,57	0,2	1,81
NMB2080	hyp	1,62	0,22	1,63	0,04	1,16	0,15	1,47
NMB2100	hyp	1,64		1,83		1,35	0,27	1,61

¹⁰Operon: NMB1563, *Regulation* und NMB1564, *hypothetische Proteine*

Werte für interne Standards lagen für die Experimente 1 und 2 vor und wurden wie unter 1.1.2 auf Seite 55 beschrieben auf die beiden im Verhältnis 1:1 vorgelegten Standards Sacc2 und Sacc3 korrigiert:

Tabelle 10: Hitzeschock-Experimente 1 und 2: korrigierte interne Sacc-Standards

	Experiment 1		Experiment 2		Mittelwert
	<i>Slide 1</i>	<i>Slide 2</i>	<i>Slide 1</i>	<i>Slide 2</i>	
<i>Mittel $\bar{S}_{2;3}$</i>	1,23	1,15	1,35	1,11	
<i>Faktorc_S</i>	0,81	0,87	0,74	0,90	
Sacc1	2,24	1,76	1,39	1,72	1,78
Sacc2	1,00	1,03	0,96	1,00	1,00
Sacc3		0,97	1,05	0,99	1,00
Sacc4	0,62	0,53	0,82	0,66	0,66

In Experiment 1 werden auf beiden *Slides* für Sacc1 und Sacc2 die Kriterien der differentiellen Regulation erfüllt, in Experiment 2 werden lediglich auf *Slide 2* die Kriterien für Sacc1 erfüllt. Die übrigen Ratios zeigen jedoch die richtige Tendenz.

2 Untersuchung der Genregulation nach Inkubation mit humanem Serum

Im nächsten Schritt sollte die Änderung des Expressionsprofils unter Inkubation mit humanem Serum untersucht werden. Vorbereitend wurde ein Pool von Normalem Humanem Serum, im Folgenden NHS abgekürzt, nach in 1.10 auf Seite 31 beschriebenen Protokoll hergestellt.

2.1 Wachstumskinetik der Neisserien

Untersucht wurde das Wachstumsverhalten des Stammes MC58 (Wildtyp) in den Medien PPM+ und NHS sowie des Stammes H44/76 in NHS. Hierzu wurden Bakterien-suspensionen nach Protokoll in PPM+ Medium kultiviert, bei einer OD_{600nm} von 0,93 (MC58) bzw. OD_{600nm} von 0,78 (H44/76) aufgeteilt, in PBS gewaschen, in den jeweiligen Medien aufgenommen und weiter portioniert, so dass jeweils 3x 1ml Proben in den Ansätzen *MC58 in NHS*, *MC58 in PPM+* und *H44/76 in NHS* vorlagen, die unter Standardbedingungen weiterinkubiert wurden. Bei den Ansätzen in NHS zeigte sich eine deutliche Agglutination. Zu den Zeitpunkten 30min, 75min und 120min wurden von jedem Ansatz eine Probe mit Saponin durchmischt, eine Verdünnungsreihe angelegt und auf Agarnährböden ausplattiert. Die Bakterienzahl zum Zeitpunkt 0 wurde aufgrund der gemessenen OD_{600nm} kalkuliert. Für die weiteren Zeitpunkte wurden Mittelwerte der ausgezählten Kolonien aus den Stufen -5 und -6 der NHS-Ansätze bzw. -7 und -8 des PPM+Ansatzes gebildet:

	CFU's zum Zeitpunkt			
	0 min	30min	75min	120min
MC58 in PPM+	$4,80 \cdot 10^8$	$4,10 \cdot 10^8$	$1,04 \cdot 10^9$	$2,00 \cdot 10^9$
MC58 in NHS	$9,40 \cdot 10^8$	$7,53 \cdot 10^7$	$3,16 \cdot 10^7$	$6,77 \cdot 10^7$
H44/76 in NHS	$7,80 \cdot 10^8$	$1,57 \cdot 10^8$	$9,96 \cdot 10^7$	$1,55 \cdot 10^8$

Tabelle 11: Wachstumskinetik der Neisserien

Zum Zeitpunkt 30min entspricht die Zahl der in NHS inkubierten Bakterien des Stammes MC58 dem 0,1-fachen der Ausgangskonzentration, die des

Stammes H44/76 dem 0,2-fachen, während die Zahl der Bakterien im PPM+-Medium nahezu konstant geblieben ist.

Nach 120min ist die Zahl der in NHS inkubierten Bakterien beider Stämme im Vergleich zum Zeitpunkt 30min nahezu konstant geblieben, während sich die Zahl der Bakterien im PPM+Medium vervierfacht hat. In Abbildung 10 lässt sich das Ergebnis graphisch nachvollziehen.

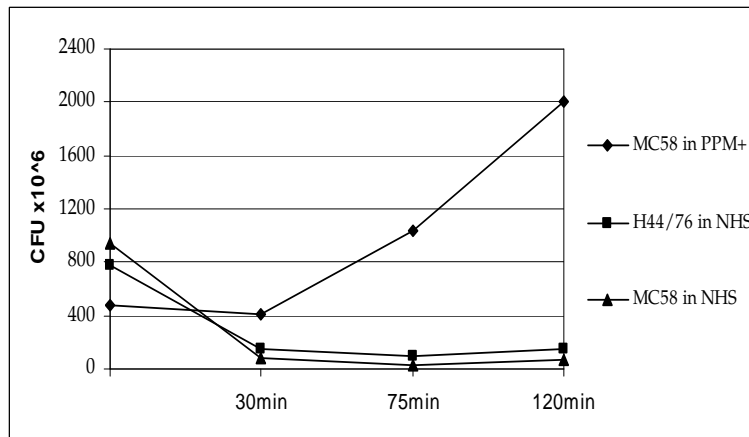


Abbildung 10: Wachstumskinetik der Neisserienstämme MC58 in PPM+ und NHS sowie H44/76 in NHS

2.2 Vergleich NHS versus PPM

In einer ersten Serie von Experimenten wurden Neisserien des Stammes MC58 (Wildtyp) in PPM+ Flüssigmedium mit einer Anfangskonzentration von OD_{600nm} 0,1 unter Standardbedingungen inkubiert und das Wachstum bis auf eine OD_{600nm} von 1,0 abgewartet. Die Suspension wurde in 5ml Portionen aufgeteilt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die sedimentierten Bakterien jeweils mit 1,5ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert, um sie dann im gewünschten Medium aufzunehmen: 5ml reines NHS für die experimentelle Kultur und 5ml PPM+ für die Kontrollkultur. Beim Einbringen der Bakterien in das NHS konnte regelmäßig eine Agglutination beobachtet werden. Nach 30 Minuten Inkubation wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert, RNA nach Protokoll isoliert und weiterverarbeitet.

In drei RNA-Isolationen aus unabhängigen Inkubationen unter Verwendung des gleichen Serumpools zeigte sich ein deutliches Überwiegen der herunterregulierten Gene.

In Tabelle 12 sind die Anzahlen differentiell regulierten Gene nach Gruppen sortiert angegeben. Aufgeführt wurden Gene, die in mindestens 50% der Experimente einen Schwellenwert von \overline{Q} größer oder gleich 1,6 bzw. keiner oder gleich 0,63 erreichten. In der Rubrik *Proteinmodifikation* finden sich die beiden *Heat shock* Gene NMB1972 (*gro-EL*) und NMB1973 (*groES*), herunterreguliert auf 0,56 und 0,63. Auf eine detaillierte Darstellung wird verzichtet.

Gengruppe	Anzahl der Gene	
	hochreguliert	herunterreguliert
<i>Kapsel</i>		3
<i>Membran</i>	4	41
<i>Transport</i>	4	16
<i>Zellteilung</i>		4
<i>DNA</i>	5	9
<i>Transkription</i>		10
<i>Translation</i>	3	63
<i>Proteinmodifikationä</i>	1	7
<i>Metabolismus</i>	4	24
<i>Energiestoffwechsel</i>	1	30
<i>Varia</i>	2	15
<i>hypothetisch</i>	12	99
<i>Summe</i>	36	321

Tabelle 12: Verteilung differentiell regulierter Gene NHS *versus* PPM auf Gruppen

Exemplarisch sind in Tabelle 13 auf Seite 72 differentiell regulierte Gene der Gruppen *Translation* und *Energiemetabolismus* aufgeführt.

Tabelle 13: Auswahl differentiell regulierter Gene NHS vs PPM

Locus	Gen	Ratio ¹¹
<i>Translation</i>		
NMB0124 ¹²	translation elongation factor Tu	0,43
NMB0127	50S ribosomal protein L11	0,2
NMB0128	50S ribosomal protein L1	0,17
NMB0131	50S ribosomal protein L7/L12	0,15
NMB0136	30S ribosomal protein S12	0,25
NMB0137	30S ribosomal protein S7	0,34
NMB0138	elongation factor G (EF-G)	0,36
NMB0142	50S ribosomal protein L3	0,24
NMB0143	50S ribosomal protein L4	0,28
NMB0144	50S ribosomal protein L23	0,24
NMB0146	30S ribosomal protein S19	0,16
NMB0147	50S ribosomal protein L22	0,13
NMB0148	30S ribosomal protein S3	0,24
NMB0149	50S ribosomal protein L16	0,18
NMB0151	30S ribosomal protein S17	0,19
NMB0152	50S ribosomal protein L14	0,14
NMB0153	50S ribosomal protein L24	0,18
NMB0154	50S ribosomal protein L5	0,14
NMB0155	30S ribosomal protein S14	0,16
NMB0156	30S ribosomal protein S8	0,15
NMB0157	50S ribosomal protein L6	0,14
NMB0158	50S ribosomal protein L18	0,18
NMB0159	30s ribosomal protein S5	0,21
NMB0161	50S ribosomal protein L15	0,24
NMB0163	translation initiation factor IF-1	0,21
NMB0164	50S ribosomal protein L36	0,32
NMB0165	30S ribosomal protein S13	0,33
NMB0166	30S ribosomal protein S11	0,33
NMB0169	50S ribosomal protein L17	0,18
NMB0174	valyl-tRNA synthetase	0,47
NMB0268	RNA methyltransferase, TrmH family	0,62
NMB0321	50S ribosomal protein L28	0,36
NMB0322	50S ribosomal protein L33	0,42
NMB0324	50S ribosomal protein L27	0,23
NMB0325	50S ribosomal protein L21	0,31
NMB0466	aspartyl-tRNA synthetase	0,55
NMB0589	50s ribosomal protein L19	0,33
NMB0590	tRNA (guanine-N1)-methyltransferase	0,28
NMB0592	30S ribosomal protein S16	0,35
NMB0609	30s ribosomal protein S15	0,25
NMB0719	queuine tRNA-ribosyltransferase	0,52
NMB0720	threonyl-tRNA synthetase	0,25

Fortsetzung nächste Seite

¹²ORF Nummern nach (Tettelin u. a., 2000)

Locus	Gen	Ratio
NMB0721	translation initiation factor 3	0,43
NMB0722	50S ribosomal protein L35	0,34
NMB0723	50S ribosomal protein L20	0,4
NMB0920	isocitrate dehydrogenase	0,18
NMB0937	elongation factor P (EF-P)	0,38
NMB0941	50S ribosomal protein L36	5,6
NMB0942	50S ribosomal protein L31, putative	13,32
NMB1301	30S ribosomal protein S1	0,35
NMB1321	30S ribosomal protein S18	0,4
NMB1323	30S ribosomal protein S6	0,33
NMB1356	Glu-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit A	0,4
NMB1859	S-adenosylmethionine:tRNAribosyltransferase-isomerase	0,29
NMB1911	50S ribosomal protein L32	0,36
NMB1950	30S ribosomal protein S21	0,4
NMB1958	thioredoxin, putative	0,23
NMB2056	30S ribosomal protein S9	0,36
NMB2057	50S ribosomal protein L13	0,55
NMB2083	cysteinyl-tRNA synthetase	0,46
NMB2101	30S ribosomal protein S2	0,25
NMB2102	elongation factor TS (EF-TS)	0,43
<i>Energiemetabolismus</i>		
NMB1933	ATP synthase F1, epsilon subunit	0,22
NMB1934	ATP synthase F1, beta subunit	0,29
NMB1935	ATP synthase F1, gamma subunit	0,32
NMB1936	ATP synthase F1, alpha subunit	0,41
NMB1937	ATP synthase F1, delta subunit	0,34
NMB1938	ATP synthase F0, B subunit	0,4
NMB1939	ATP synthase F0, C subunit	0,4
NMB0123	e-transport (ferredoxin, 4Fe-4S bacterial type)	0,53
NMB0257	e-transport (NADH dehydrogenase I, L subunit)	0,59
NMB0566	e-transport (Na(+)-translocating NADH-quinone reductase,subunit D)	0,53
NMB0923	e-transport (cytochrome c)	0,61
NMB1677	e-transport (cytochrome c5)	0,58
NMB1724	e-transport (cytochrome c oxidase, subunit II)	0,37
NMB1725	e-transport (cytochrome c oxidase, subunit I)	0,42
NMB2051	e-transport (ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochromec1)	0,2
NMB2052	e-transport (ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome b)	0,35
NMB0089	e-transport (pyruvate kinase II)	0,52
NMB0618	e-transport (phosphoenolpyruvate synthase)	0,55
NMB1869	e-transport (fructose-bisphosphate aldolase)	0,52
NMB2159	e-transport(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)	0,39
NMB0948	TCA (succinate dehydrogenase, cytochrome b556subunit)	0,56
NMB0951	TCA (succinate dehydrogenase, iron-sulfur protein)	0,45
NMB0955	TCA (2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component)	0,44
NMB0997	D-lactate dehydrogenase	0,45
NMB1393	phosphogluconate dehydratase	2,66
NMB0546	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring	0,39

Werte für interne Standards lagen für alle Experimente vor und wurden wie unter 1.1.2 auf Seite 55 beschrieben auf die beiden im Verhältnis 1:1 vorgelegten Standards Sacc2 und Sacc3 korrigiert:

Tabelle 14: *NHS versus PPM+* Experimente 1 bis 3: korrigierte interne Sacc-Standards

	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3		Mittelwert
	<i>Slide 1</i>	<i>Slide 2</i>	<i>Slide 1</i>	<i>Slide 2</i>	<i>Slide 1</i>	<i>Slide 2</i>	
<i>Mittel $\bar{S}_{2,3}$</i>	1,31	1,01	1,06	0,58	1,44	0,92	
<i>Faktor c_S</i>	0,76	0,99	0,94	1,72	0,69	1,08	
Sacc1	2,26	2,91	2,94	4,40	2,65	4,03	3,19
Sacc2	0,53	0,85	0,74	1,14	1,15	1,24	0,94
Sacc3	1,46	1,15	1,26	0,84	0,85	0,62	1,03
Sacc4	0,24	0,29	0,38	0,34	0,32	0,41	0,33

Auf allen *Slides* wurden für Sacc1 bzw. Sacc4 die Kriterien der differentiellen Regulation erfüllt. Sacc2 liegt einmalig auf *Slide1* des ersten Experiments, Sacc3 einmalig auf *Slide2* des zweiten Experiments jenseits des Schwellenwertes, womit jedoch nicht das Kriterium, in mindestens 2 von 3 Experimenten den Schwellenwert zu überschreiten, erfüllt wurde.

Betrachtet man die Mittelwerte über alle *Slides*, bildet sich das vorgelegte Probenverhältnis von 3 : 1 : 1 : 1/3 in nahezu idealer Weise ab.

2.3 Vergleich NHS versus PBS

Es wurde eine zweite Serie von Experimenten nach dem selben Muster durchgeführt, wie unter 2.2 beschrieben, jedoch wurde als Kontrollmedium PBS anstelle von PPM+ eingesetzt. Eingesetzt wurde wieder der Stamm MC58 (Wildtyp). Setzt man die Grenze für \overline{Q} , ab der ein Gen als differentiell reguliert gewertet wird, auf 1,6 beziehungsweise 0,63, und fordert man, dass in mindestens 2 von 3 Experimenten ein Gen diesen Schwellenwert erreichen muss, so wurde dies von 284 Genen erfüllt. Es ergeben sich folgende Schnittmengen zwischen den Einzelexperimenten:

Experiment 1 und 2: 191 Gene von 284 übereinstimmend detektiert, entsprechend 67,3%

Experiment 1 und 3: 149 Gene von 284 übereinstimmend detektiert, entsprechend 52,5%

Experiment 2 und 3: 204 Gene von 284 übereinstimmend detektiert, entsprechend 71,8%

Von allen 3 Experimenten übereinstimmend wurden 78 Gene als hochreguliert, 52 als herunterreguliert erkannt, insgesamt 130 Gene von 284, entsprechend 45,8%. Setzt man die Grenze, ab der ein Gen als differentiell reguliert gewertet wird, bei 2,0 beziehungsweise 0,5 unter Beibehaltung der oben genannten Kriterien, so wurden diese Kriterien von 149 Genen erfüllt mit folgenden Schnittmengen zwischen den Einzelexperimenten:

Experiment 1 und 2: 98 Gene von 149 übereinstimmend detektiert, entsprechend 65,8%

Experiment 1 und 3: 82 Gene von 149 übereinstimmend detektiert, entsprechend 55,0% Experiment 2 und 3: 99 Gene von 149 übereinstimmend detektiert, entsprechend 66,4%

Durchschnittlich wurden von 2 Experimenten 62,4 % der Gene detektiert.

Von allen 3 Experimenten übereinstimmend wurden 48 Gene als hochreguliert, 18 als herunterreguliert erkannt, insgesamt also 66 von 149 Genen (44,3%). Tabelle 2.3 auf der nächsten Seite zeigt die Anzahl der differentiell regulierten Gene in den jeweiligen Gengruppen, Abbildung 11 die relative Mächtigkeit der Gruppen zueinander.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Inubationsversuche NHS versus PPM ist das Verhältnis hoch- / herunterreguliert mit 133 zu 151 ausgewogen.

Am mächtigsten ist die Gruppe der hypothetischen Proteine, gefolgt von der Gruppe Proteinsynthese.

Die meisten herunterregulierten Gene finden sich in der Gruppe des Energiemetabolismus, was sich allerdings nur für die Grenze $\bar{Q} \leq 0,63$ abbildet.

Tabelle 16 auf Seite 82 zeigt die Ergebnisse im Detail.

Gengruppe	Anzahl der Gene		
	hochreguliert	herunterreguliert	Virulenz assoziiert
<i>zelluläre Funktion</i>	1/1 ¹	5/3	
<i>Energiemetabolismus</i>	6/6	30/12	2/1
<i>Stoffwechsel</i>	6/3	10/3	3/2
<i>DNA Metabolismus</i>	6/4	7/3	
<i>Transkription/Regulation</i>	3/3	7/4	
<i>Proteinsynthese</i>	26/21	17/8	
<i>Proteinmodifikation</i>	3/2	4/1	
<i>Hülle</i>	6/3	15/5	13/5
<i>Transport- und Bindeproteine</i>	12/9	13/3	8/4
<i>Plasmid/Prophagen assoziiert</i>		3/0	1/0
<i>unbekannte Funktion</i>	3/2	4/0	1/1
<i>hypothetische Proteine</i>	63/45	38/12	
<i>Summe</i>	133/96	151/53	28/13

Tabelle 15: *NHS versus PBS* Gesamtgenom: Gruppenzuordnung differentiell regulierter Gene.

¹Es sind die Anzahlen der Gene mit $\bar{Q} \geq 1,6$ und $\leq 0,63$ /bzw. $\geq 2,0$ und $\leq 0,5$ angegeben

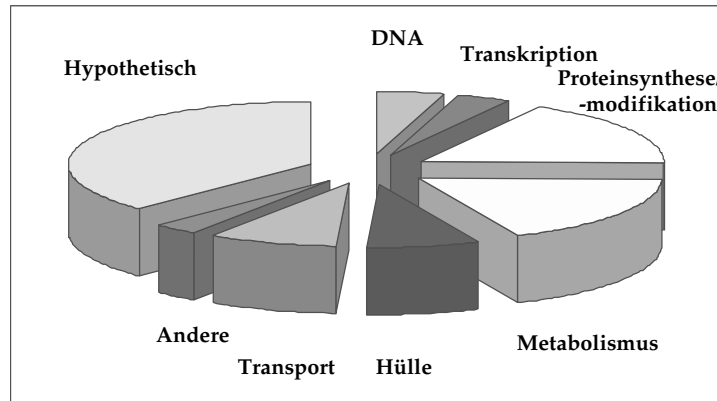


Abbildung 11: *NHS versus PBS* Gesamtgenom: Gruppenverteilung differentiell regulierter Gene

Tabelle 16: *NHS versus PBS* Gesamtgenom: differentiell regulierte Gene mit $\bar{Q} \geq 1,6$ und $\leq 0,63$

Locus	Gen/Funktion	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3		Mittel
		Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	
<i>zelluläre Funktion</i>								
NMB0342 ¹³ ¶	<i>ispA</i>	4,42	0,56	4,09	1,31	4,01	0,67	4,17
NMB0427 ¶	<i>FtsZ</i>	0,31	0,02	0,37	0,04	0,38	0,03	0,35
NMB0838 ¶	cold-shock	0,43	0,00	0,45	0,09	0,49	0,07	0,46
NMB0977	<i>mdaB</i> , putat.			0,09	0,00	0,57	0,15	0,33
NMB1857 ¶	<i>mdaB</i>	0,26	0,06	0,13	0,04	0,19	0,08	0,19
NMB1953	<i>spsA</i>	0,57	0,09	0,57	0,02	0,73	0,21	0,62
<i>Energiemetabolismus</i>								
NMB0006	thioered.-rel.	0,44	0,00	0,54	0,04	0,57	0,05	0,52
NMB0089 ¶	pyruv. kin.II	0,36	0,01	0,37	0,02	0,53	0,15	0,42
NMB0207 ¶	GAP-DH	0,48	0,00	0,28	0,00	0,51	0,16	0,42
NMB0334	G-6-P-isom.	0,75	0,00	0,47	0,00	0,59	x	0,60
NMB0390	malt. phosphoryl.	0,42	0,00	0,61	0,00	0,52	0,00	0,52
NMB0391	beta-P-glc-mut.	0,39	0,00	0,55	0,00	0,90	0,25	0,61
NMB0546 ¶	<i>adhP</i>	0,40	0,04	0,26	0,03	0,31	0,04	0,33
NMB0564 ¶	<i>nqrF</i>	0,59	0,01	0,30	0,00	0,43	0,09	0,44
NMB0565 ¶	<i>nqrE</i>	0,42	0,00	0,31	0,04	0,35	0,05	0,36
NMB0566 ¶	<i>nqrD</i>	0,47	0,00	0,38	0,00	0,50	0,04	0,45
NMB0568 ¶	<i>nqrB</i>	0,59	0,11	0,34	0,00	0,40	0,03	0,44
NMB0574 ¶	<i>gcvT</i>			0,45	0,00	0,50	0,09	0,47

Fortsetzung nächste Seite

¹³ORF Nummern nach (Tettelin u. a., 2000), Gene, die Schwellenwerte von 2,0 bzw. 0,5 erreichen, sind mit ¶ markiert

Locus	Gen	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio
NMB0618 ¶	<i>ppsA</i>	0,27	0,00	0,46	0,02	0,47	0,03	0,40
NMB0743	<i>ubiE</i>	0,74	0,03	0,47	0,03	0,53	0,03	0,58
NMB0790 ¶	<i>pgm</i>	3,86	0,00	3,14	0,00	2,38	0,82	3,13
NMB0929	<i>dapA</i>			0,59	0,03	0,59	0,04	0,59
NMB0948	<i>sdhC</i>	0,62	0,00	0,45	0,00	0,60	0,21	0,56
NMB0997	<i>d-ldh</i>			0,43	0,00	0,63	0,23	0,53
NMB1324	<i>trxB</i>	0,45	0,00	0,53	0,00	0,60	0,13	0,53
NMB1341	<i>pdhA</i>	0,50	0,01	0,55	0,00	0,96	0,14	0,67
NMB1342	<i>aceF</i>	0,53	0,06	0,57	0,00	1,08	0,46	0,73
NMB1392	G6P-DH	0,55	0,06	0,48	0,09	0,68	0,15	0,57
NMB1478	<i>gph</i>			0,37	0,00	0,33	0,05	0,35
NMB1609	trans-sulfur. fam.	0,59	0,06	0,53	0,00	0,64	0,11	0,59
NMB1722	CyC555, trunc.	0,58	0,02	0,44	0,04	0,48	0,04	0,50
NMB1723	CyC oxidase, subIII	0,35	0,00	0,52	0,07	0,55	0,05	0,47
NMB1725 ¶	CyC oxidase, subI	0,88	0,22	0,45	0,06	0,50	0,11	0,61
NMB1790 ¶	<i>grxC</i>	1,46	0,37	2,00	0,37	2,27	0,39	1,91
NMB1887 ¶	<i>tpiA</i>	2,63	0,20	2,16	0,49	2,47	0,31	2,42
NMB1935 ¶	<i>atpG</i>	2,22	0,75	1,83	0,14	2,30	0,33	2,12
NMB1937 ¶	<i>atpH</i>	4,07	0,33	2,01	0,25	2,01	0,49	2,70
NMB2051 ¶	<i>petC</i>	0,78	0,05	0,37	0,06	0,43	0,02	0,53
NMB2052	<i>petB</i>	1,26	0,00	0,59	0,02	0,45	0,03	0,77
NMB2060	<i>gpsA</i>	0,57	0,04	0,62	0,18	0,64	0,09	0,61
NMB2154 ¶	<i>etfA</i>	2,44	0,22	2,19	0,15	2,39	0,28	2,34
NMB2159 ¶	<i>gapA-2</i>	0,68	0,04	0,34	0,07	0,39	0,07	0,47
<i>Stoffwechsel</i>								
NMB0211	L-ser dehyd.	1,81	0,00	2,83	0,00	1,83	1,11	2,16
NMB0220 ¶	acyl carr. prot.	2,05	0,49	2,35	0,15	2,86	0,41	2,42
NMB0630	HisH	2,36	0,22	1,90	0,23	1,88	0,38	2,05
NMB0641 ¶	inorg. PPase	0,47	0,10	0,31	0,05	0,38	0,08	0,39
NMB0690 ¶	<i>purF</i>	0,33	0,00	0,39	0,00	1,05	0,56	0,59
NMB0777 ¶	HemD, putat.			2,40	0,00	2,00	0,69	2,20
NMB0778	HemX, putat.	0,63	0,00	0,59	0,00	0,74	0,01	0,65
NMB0944	<i>metH</i>			0,34	0,00	0,53	0,05	0,44
NMB1152	sulfite red.	1,83	0,18	1,81	0,45	0,81	0,28	1,48
NMB1201	IMP dehydr.	0,42	0,00	0,53	0,04	0,52	0,13	0,49
NMB1276	<i>fadD-1</i>			0,63	0,00	0,44	0,13	0,53
NMB1658	<i>dfp</i>	0,50	0,00	0,68	0,00	0,59	0,07	0,59
NMB1710 ¶	<i>gdhA</i>	5,84	0,29	6,22	1,85	5,13	1,00	5,73
NMB1855 ¶	<i>carB</i>			0,40	0,00	0,33	0,08	0,36
NMB2005	<i>argJ</i>	0,51	0,00	0,44	0,00	0,72	0,13	0,55
NMB2079	<i>asd</i>	0,52	0,01	0,54	0,08	0,57	0,04	0,54
<i>DNA-Metabolismus</i>								
NMB0077 ¶	methylase, trunc.	2,27	0,19	2,29	0,29	2,03	0,27	2,19
NMB0212 ¶	DNA gyr. sub.B	0,36	0,00	0,36	0,03	0,51	0,12	0,41
NMB0262	exoDNase sub.	2,06	0,00	1,87	0,00	1,23	0,27	1,72
NMB0265	<i>RuvA</i>	0,42	0,00	0,63	0,00	1,13	0,53	0,73
NMB1230	<i>hupB</i>	1,97	0,13	2,18	0,34	1,78	0,43	1,98
NMB1322 ¶	primosomal rep., put	3,74	0,00	2,00	0,00	2,51	1,31	2,75

Fortsetzung nächste Seite

Locus	Gen	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio
NMB1445 ¶	<i>recA</i>	0,53	0,00	0,38	0,00	0,34	0,03	0,42
NMB1479 ¶	<i>RecX</i>	2,82	0,00	2,00	0,00	1,42	0,26	2,08
NMB1537 ¶	<i>dnaG</i>	2,22	0,00	2,53	0,00	2,43	1,01	2,40
NMB1655 ¶	A-spec. methyl., put.	0,35	0,04	0,37	0,04	0,39	0,04	0,37
NMB1673	<i>tag</i>	0,54	0,00	0,56	0,00	0,68	0,00	0,59
NMB1682	<i>parE</i>			0,57	0,00	0,56	0,01	0,56
NMB1863	oligoribonucl.	0,70	0,00	0,50	0,00	0,62	0,04	0,61
<i>Transkription</i>								
NMB0132 ¶	RNA polym. β sub.			0,45	0,00	0,30	0,01	0,38
NMB0133 ¶	RNA polym. β' sub.			0,50	0,00	0,48	0,12	0,49
NMB0168 ¶	RNA polym., α sub.	4,18	0,25	4,19	0,29	4,32	0,59	4,23
NMB0381	Cys-reg. activ.	0,57	0,00	0,58	0,00	0,69	0,12	0,61
NMB0591 ¶	<i>RimM</i>	2,36	0,22	1,97	0,13	2,12	0,09	2,15
NMB0712 ¶	<i>rpoH</i>			0,27	0,00	0,40	0,05	0,34
NMB0758 ¶	<i>pnp</i>	0,41	0,05	0,41	0,00	0,69	0,03	0,50
NMB1241	<i>cca</i>			0,63	0,10	0,54	0,08	0,59
NMB1660 ¶	<i>rpoZ</i>	2,35	0,92	1,86	0,78	3,70	2,76	2,63
<i>transkriptionelle Regulatoren</i>								
NMB1843 ¶	<i>MarR</i> fam.	0,43	0,01	0,35	0,01	0,49	0,03	0,42
NMB1878	<i>AraC</i> fam.	0,40	0,00	0,67	0,00	0,56	0,11	0,54
<i>Protein Synthese</i>								
NMB0127	50S rp L11	0,89	0,19	0,58	0,09	0,58	0,06	0,68
NMB0131 ¶	50S rp L7/L12	0,40	0,12	0,46	0,17	0,38	0,08	0,41
NMB0143 ¶	50S rp L4	4,52	0,95	2,70	0,28	2,50	0,62	3,24
NMB0144 ¶	50S rp L23	3,66	0,35	2,16	0,13	1,74	0,26	2,52
NMB0145	50S rp L2	2,51	0,61	1,66	0,54	1,77	0,52	1,98
NMB0148	30S rp S3	3,74	0,50	1,56	0,19	1,82	0,47	2,37
NMB0149	50S rp L16	1,58	0,29	0,58	0,13	0,61	0,18	0,92
NMB0150 ¶	50S rp L29	4,05	0,96	2,96	1,05	1,75	0,23	2,92
NMB0152 ¶	50S rp L14	10,83	0,00	5,44	0,50	6,61	1,10	7,62
NMB0153 ¶	50S rp L24	9,79	0,00	5,01	0,00	5,65	0,58	6,82
NMB0154 ¶	50S rp L5	4,34	0,74	2,02	0,86	2,62	0,95	2,99
NMB0155 ¶	30S rp S14	4,84	1,63			5,04	0,00	4,94
NMB0157 ¶	50S rp L6	4,44	0,67	2,39	0,26	2,07	0,22	2,97
NMB0158	50S rp L18	3,06	0,09	1,64	0,37	1,42	0,12	2,04
NMB0160 ¶	50S rp L30	3,99	0,98	2,53	0,38	2,22	0,34	2,91
NMB0161 ¶	50S rp L15	2,86	0,62	2,45	0,41	2,31	0,25	2,54
NMB0163 ¶	IF-1	11,20	3,07	5,46	1,06	3,40	0,17	6,69
NMB0164 ¶	50S rp L36	8,37	1,23	6,80	0,78	4,32	0,29	6,49
NMB0165 ¶	30S rp S13	7,65	1,66	4,14	0,86	4,50	0,82	5,43
NMB0166 ¶	30S rp S11	4,57	0,74	6,03	1,01	3,57	1,06	4,72
NMB0174	<i>valS</i> .	0,62	0,00	0,52	0,00	0,85	0,16	0,66
NMB0463	30S rp S20	1,65	0,00	2,64	0,00	1,37	0,34	1,88
NMB0466	<i>aspS</i>	0,61	0,12	0,41	0,00	0,70	0,11	0,58
NMB0589	50S rp L19	0,75	0,02	0,58	0,06	0,53	0,04	0,62
NMB0590 ¶	<i>trmD</i>	3,00	0,19	1,83	0,07	2,18	0,07	2,34
NMB0609 ¶	30s rp S15	0,44	0,19	0,31	0,11	0,38	0,14	0,37

Fortsetzung nächste Seite

Locus	Gen	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio
NMB0941 ¶	50S rp L36	2,99	1,05	3,96	1,78	3,68	1,17	3,54
NMB0942 ¶	50S rp L31, put.	4,35	0,34	4,32	0,41	4,23	0,65	4,30
NMB1321	30S rp S18	2,06	0,99	1,53	0,88	1,67	0,72	1,75
NMB1323 ¶	30S rb S6	5,57	1,74	2,42	0,63	1,63	0,30	3,21
NMB1595	<i>alaS</i>	0,52	0,09	0,60	0,10	0,62	0,03	0,58
NMB1833	<i>ileS</i>	0,60	0,00	0,52	0,00	0,64	0,08	0,59
NMB1859 ¶	<i>queA</i>	0,47	0,02	0,42	0,01	0,50	0,01	0,46
NMB2083	<i>cysS</i>	0,63	0,00	0,61	0,00	0,81	0,04	0,68
NMB2101 ¶	30S rp S2	0,48	0,11	0,29	0,04	0,31	0,05	0,36
NMB2102 ¶	EF-TS	0,67	0,06	0,36	0,02	0,39	0,01	0,48
NMB1911	50S rp L32	1,85	0,44	1,94	0,00	1,49	0,44	1,76
NMB1950 ¶	30S rp S21	0,40	0,03	0,48	0,02	0,54	0,05	0,47
<i>Proteinmodifikation</i>								
NMB0110 ¶	polypep. deformyl.	0,29	0,00	0,25	0,00	0,41	0,00	0,32
NMB0125	<i>SecE</i> subunit			2,93	0,00	1,92	0,21	2,43
NMB0162 ¶	<i>SecY</i> sub.	11,54	1,23			2,40	0,62	6,97
NMB1231 ¶	<i>lon</i>	2,12	0,22	2,40	0,31	1,03	0,30	1,85
NMB1313	trigg. fact.	0,59	0,00	0,72	0,00	0,46	0,03	0,59
NMB1969	serot.-1-spec.antig,put	0,33	0,00	0,62	0,13	0,64	0,00	0,53
NMB1972	<i>groEL</i>	0,46	0,12	0,55	0,14	0,81	0,21	0,61
<i>Zellhülle</i>								
NMB0049	<i>pilC2</i>	1,59	0,05	1,88	0,02	2,26	0,54	1,91
NMB0068	<i>siaC</i>	1,64	0,33	1,27	0,17	1,77	0,75	1,56
NMB0082	LipA	0,47	0,00	0,54	0,00	0,80	0,20	0,60
NMB0333	PilG	0,65	0,10	0,50	0,12	0,53	0,08	0,56
NMB0341 ¶	TspA	0,43	0,00	0,40	0,00	0,59	0,09	0,47
NMB0382	OPM class 4	0,69	0,08	0,54	0,05	0,58	0,04	0,60
NMB0418 ¶	<i>mraY</i>	0,46	0,00	0,52	0,00	0,43	0,03	0,47
NMB0490	PspA-rel. prot.			0,55	0,00	0,54	0,00	0,54
NMB0586 ¶	adhesin, put.	2,83	0,04	3,50	0,14	2,38	1,19	2,91
NMB0663	NspA			0,36	0,00	0,56	0,18	0,46
NMB0707	rarelipoprot. B, put.	0,58	0,00	0,61	0,00	0,58	0,01	0,59
NMB0768	PilT	0,50	0,00	0,51	0,00	0,63	0,02	0,55
NMB0887 ¶	PilV	2,12	0,00	2,76	0,00	1,46	0,79	2,12
NMB1414... ¶	FrpC operon ¹⁴	3,60	0,71			3,54	1,95	3,57
NMB1623 ¶	<i>pan1</i>			0,33	0,00	0,51	0,15	0,42
NMB1809 ¶	<i>pilN</i>	0,59	0,09	0,33	0,01	0,48	0,05	0,47
NMB1811	<i>pilP</i>	0,93	0,08	0,58	0,03	0,60	0,02	0,71
NMB1812 ¶	<i>pilQ</i>	0,37	0,04	0,36	0,04	0,52	0,02	0,42
NMB1820	PglB	0,54	0,16	0,75	0,07	0,53	0,05	0,61
NMB1821	PglC	0,50	0,00	0,62	0,00	1,15	0,59	0,76
NMB1847	<i>pilC1</i>	1,16	0,00	1,88	0,00	1,93	0,23	1,66
<i>Transport- und Bindeproteine</i>								
NMB0041	ABC transp.	0,53	0,00	0,58	0,00	0,85	0,19	0,65
NMB0470 ¶	C4-dicarbox.trans.	4,01	0,00	3,03	0,00	1,84	1,14	2,96

Fortsetzung nächste Seite

¹⁴0364, 0584, 1412, 1414

Locus	Gen	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio
NMB0535	glc/gal trans.	0,53	0,00	0,48	0,04	0,58	0,04	0,53
NMB0543	L-lactate perm., put.			0,59	0,00	0,57	0,05	0,58
NMB0578	ABC transp.	0,42	0,00	0,56	0,00	0,86	0,04	0,61
NMB0610 ¶	ABC transp.	0,67	0,00	0,39	0,00	0,41	0,02	0,49
NMB0615	AmtB, put.			2,66	0,00	1,93	0,00	2,29
NMB0696	ABC transp.			0,51	0,07	0,62	0,04	0,57
NMB0736 ¶	<i>ptsN</i>			2,32	0,00	2,44	0,60	2,38
NMB0752 ¶	ferredox., put.	2,58	0,00			2,66	1,48	2,62
NMB0787 ¶	ABC transp.	1,12	0,07	4,12	0,28	3,47	0,60	2,90
NMB1051 ¶	ABC transp.	3,81	0,00	2,32	0,00	1,89	0,68	2,67
NMB1207 ¶	<i>bfrA</i>	0,14	0,04	0,22	0,00	0,70	0,10	0,35
NMB1429 ¶	PorA	2,36	0,29	2,54	0,43	2,52	0,18	2,47
NMB1540	<i>lbpA</i>	0,52	0,00	0,55	0,00	0,51	0,00	0,52
NMB1707 ¶	NaCl-dep.trans.			3,71	0,00	2,50	0,36	3,11
NMB1714	<i>mtrE</i>	0,45	0,00	0,51	0,01	0,53	0,05	0,50
NMB1715 ¶	<i>mtrD</i>			0,31	0,00	0,21	0,02	0,26
NMB1716	<i>mtrC</i>	0,55	0,00	0,52	0,00	0,63	0,35	0,57
NMB1730 ¶	TonB	2,03	0,72	1,68	0,76	2,55	1,12	2,09
NMB1732 ¶	trans., put.			2,31	0,00	2,11	0,69	2,21
NMB1966	ABC transp.			1,81	0,00	1,81	0,45	1,81
NMB1989	ABC transp.	0,52	0,00	0,60	0,00	0,64	0,07	0,59
NMB2133	Na/dicarbox. symp.	0,52	0,00	0,45	0,00	0,85	0,26	0,60
NMB2136	peptide trans.	1,55	0,00	1,70	0,00	2,42	1,23	1,89
<i>Plasmid/Prophagen assoziiert</i>								
NMB0748	host factor-I	0,43	0,09	0,53	0,03	0,58	0,03	0,51
NMB0913	pemK	0,30	0,00	0,51	0,00	0,94	0,47	0,58
NMB1098	I protein, put.			0,61	0,00	0,44	0,17	0,53
<i>unbekannte Funktion</i>								
NMB0344	BolA/YrbA fam. prot.	2,30	0,00	1,58	0,63	1,82	0,85	1,90
NMB0890 ¶	typeIV-pil-rel. Prot.	2,42	0,00	2,02	0,69	1,13	0,35	1,86
NMB1199	TypA	0,61	0,02	0,62	0,03	0,53	0,20	0,59
NMB1380	<i>nifU</i> prot.			0,46	0,00	0,55	0,15	0,50
NMB1692	chorismat mut.-rel.	0,60	0,00	0,62	0,00	0,69	0,12	0,64
NMB1909	<i>Maf/YceF/YhdE</i> fam.	0,50	0,08	0,54	0,04	0,64	0,01	0,56
NMB2086 ¶	GTP-bind. prot.	2,00	0,98	1,43	0,35	2,75	2,11	2,06
<i>hypothetische Proteine</i>								
NMB0034 ¶	conserved hyp	2,24	0,95	2,97	0,00	2,47	0,74	2,56
NMB0042	conserved hyp	0,50	0,07	0,57	0,06	0,65	0,12	0,57
NMB0043 ¶	conserved hyp	0,45	0,00	0,50	0,00	0,67	0,16	0,54
NMB0046	hyp	1,94	0,00	2,35	0,00	1,97	0,23	2,09
NMB0054 ¶	hyp	3,38	0,00	2,58	0,27	2,21	0,37	2,72
NMB0091 ¶	hyp	3,47	0,30	2,60	0,20	2,85	1,25	2,98
NMB0092 ¶	hyp			3,25	0,00	3,22	0,35	3,24
NMB0093 ¶	hyp			2,12	0,09	3,06	0,43	2,59
NMB0095	hyp	0,52	0,00	0,61	0,00	0,75	0,12	0,63
NMB0129	hyp	1,98	0,31	1,99	0,37	1,96	0,53	1,98
NMB0228	conserved hyp	0,48	0,00	0,57	0,00	0,74	0,19	0,60

Fortsetzung nächste Seite

Locus	Gen	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio
NMB0252 ¶	hyp			2,13	0,00	3,25	0,00	2,69
NMB0260	hyp	0,58	0,00	0,57	0,00	0,50	0,10	0,55
NMB0288	hyp	0,56	0,00	0,48	0,00	0,67	0,21	0,57
NMB0292	conserved hyp	0,63	0,00	0,62	0,00	0,94	0,20	0,73
NMB0297 ¶	hyp	3,37	1,19	2,36	0,89	3,87	1,39	3,20
NMB0298 ¶	hyp	14,11	0,56	10,84	1,56	10,82	2,15	11,92
NMB0309	conserved hyp			1,93	0,00	2,35	0,00	2,14
NMB0314	hyp	0,48	0,00			0,56	0,17	0,52
NMB0315 ¶	conserved hyp			0,46	0,00	0,50	0,00	0,48
NMB0317 ¶	conserved hyp	2,05	0,00	1,84	0,00	2,34	0,81	2,08
NMB0338	hyp	0,55	0,11	0,56	0,05	0,66	0,16	0,59
NMB0339	conserved hyp	0,56	0,01	0,60	0,07	0,74	0,15	0,63
NMB0346	hyp	1,96	0,11	2,36	0,34	1,76	0,47	2,03
NMB0347 ¶	conserved hyp	2,69	0,08	2,68	0,54	1,81	0,59	2,40
NMB0353	hyp	0,45	0,00	0,59	0,00	0,68	0,03	0,57
NMB0355	conserved hyp	0,91	0,26	0,58	0,08	0,58	0,08	0,69
NMB0370	hyp	1,81	0,00	1,86	0,27	1,89	0,13	1,85
NMB0403	hyp	0,58	0,00	0,62	0,00	1,13	0,44	0,78
NMB0437 ¶	conserved hyp	0,46	0,00	0,45	0,00	0,59	0,05	0,50
NMB0457	conserved hyp	0,43	0,00	0,63	0,00	0,79	0,07	0,62
NMB0467	hyp			2,14	0,00	1,99	0,72	2,07
NMB0473 ¶	conserved hyp	2,12	0,00	2,03	0,00	1,86	0,13	2,00
NMB0475 ¶	hyp	3,38	0,16	3,11	0,32	2,68	0,21	3,05
NMB0476 ¶	hyp	2,34	0,47	2,29	0,03	2,03	0,20	2,22
NMB0477	conserved hyp	2,31	0,22	1,64	0,16	1,81	0,48	1,92
NMB0479 ¶	conserved hyp	2,86	0,31	2,62	0,55	2,36	0,75	2,61
NMB0521	hyp			2,39	0,00	1,84	0,44	2,11
NMB0557 ¶	conserved hyp	1,84	0,00	2,08	0,31	2,54	0,35	2,16
NMB0558 ¶	hyp			2,09	0,00	2,59	0,73	2,34
NMB0606	conserved hyp	0,55	0,06	0,60	0,07	0,64	0,10	0,60
NMB0649 ¶	hyp	0,59	0,00	2,37	1,99	2,70	0,79	1,88
NMB0709	hyp			0,37	0,02	0,53	0,03	0,45
NMB0711	conserved hyp	0,51	0,00	0,59	0,04	0,59	0,15	0,57
NMB0746	conserved hyp			1,98	0,00	1,97	0,40	1,97
NMB0762 ¶	hyp	2,04	0,00	4,34	0,00	2,30	0,17	2,89
NMB0803	conserved hyp			1,97	0,00	1,80	0,26	1,89
NMB0809	conserved hyp	0,62	0,00	0,55	0,00	0,48	0,07	0,55
NMB0817	hyp	1,77	0,00	1,90	0,40	1,88	0,13	1,85
NMB0821 ¶	hyp			4,28	0,00	4,52	2,88	4,40
NMB0850 ¶	hyp	2,19	0,00	2,26	0,00	1,16	0,34	1,87
NMB0862 ¶	hyp	6,02	0,00	6,53	0,00	2,68	1,93	5,08
NMB0864 ¶	hyp	7,69	0,00	6,88	0,00	5,31	2,25	6,62
NMB0865 ¶	hyp	7,32	5,42	9,63	7,34	4,85	3,02	7,27
NMB0874	conserved hyp			3,50	0,00	1,98	0,00	2,74
NMB0889 ¶	hyp	2,37	0,00	2,67	0,59	1,83	0,69	2,29
NMB0897 ¶	hyp	2,42	0,00	2,09	0,69	2,18	0,47	2,23
NMB0938 ¶	hyp	0,37	0,00	0,46	0,00	0,56	0,14	0,46
NMB0945 ¶	hyp	3,55	0,00	4,88	0,00	1,18	0,35	3,20

Fortsetzung nächste Seite

Locus	Gen	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio
NMB0952 ¶	conserved hyp	1,16	0,00	2,54	0,00	2,01	0,34	1,90
NMB1004	hyp	0,53	0,00	0,49	0,00	0,88	0,03	0,63
NMB1023	conserved hyp	0,47	0,00	0,93	0,00	0,57	0,09	0,65
NMB1035	hyp	1,91	0,24	3,09	1,10	0,95	0,20	1,98
NMB1041 ¶	hyp	3,11	0,00	2,27	1,53	1,19	0,65	2,19
NMB1061	conserved hyp			0,56	0,02	0,55	0,12	0,55
NMB1100	hyp	0,30	0,00	0,63	0,00	1,04	0,19	0,66
NMB1113 ¶	hyp	0,31	0,00	0,71	0,00	0,32	0,13	0,45
NMB1124 ¶	hyp	0,50	0,00	0,50	0,02	0,46	0,06	0,48
NMB1211 ¶	hyp	2,64	0,22	2,69	0,69	2,32	0,30	2,55
NMB1212 ¶	hyp	2,17	0,47	2,58	0,51	2,53	0,60	2,43
NMB1308	conserved hyp	0,45	0,00	0,63	0,00	0,91	0,42	0,66
NMB1340 ¶	hyp	3,88	0,00	2,64	0,00	2,45	0,41	2,99
NMB1343 ¶	hyp	5,36	0,00			3,88	2,25	4,62
NMB1369 ¶	hyp	0,37	0,00	0,33	0,00	0,65	0,30	0,45
NMB1438 ¶	conserved hyp	0,48	0,03	0,47	0,02	0,75	0,13	0,57
NMB1452 ¶	conserved hyp			0,39	0,00	0,33	0,12	0,36
NMB1468 ¶	hyp	1,84	0,26	2,56	0,29	2,04	0,47	2,15
NMB1504	conserved hyp			0,45	0,00	0,53	0,15	0,49
NMB1508	hyp	0,36	0,00	0,67	0,00	0,62	0,09	0,55
NMB1534 ¶	hyp	3,41	0,00	2,33	0,00	2,30	0,09	2,68
NMB1564 ¶	conserved hyp	4,57	0,90	5,27	0,12	2,80	0,96	4,21
NMB1575	conserved hyp	1,42	0,11	1,86	0,18	2,00	0,23	1,76
NMB1590 ¶	conserved hyp	0,33	0,04	0,40	0,00	0,40	0,09	0,38
NMB1644	hyp			0,63	0,00	0,62	0,11	0,62
NMB1653 ¶	conserved hyp	2,56	0,48	3,45	0,71	3,31	0,52	3,11
NMB1745	hyp			0,59	0,00	0,52	0,00	0,56
NMB1844 ¶	hyp	0,27	0,00	0,22	0,00	0,34	0,15	0,28
NMB1881 ¶	conserved hyp	0,37	0,00	0,42	0,00	0,59	0,16	0,46
NMB1910 ¶	conserved hyp	3,23	0,35	3,16	0,11	2,55	0,71	2,98
NMB1912!	conserved hyp	2,27	0,00	1,83	0,08	1,85	0,16	1,98
NMB1941 ¶	hyp	5,76	0,00			2,87	1,53	4,32
NMB1962 ¶	hyp			3,05	0,00	2,25	0,85	2,65
NMB1965 ¶	conserved hyp			2,49	0,00	2,73	0,85	2,61
NMB2013 ¶	hyp	2,74	0,00	3,20	0,00	1,70	0,05	2,55
NMB2020	conserved hyp	1,32	0,00	1,95	0,15	1,90	0,37	1,73
NMB2078	conserved hyp	1,70	0,04	1,80	0,21	1,90	0,12	1,80
NMB2085 ¶	hyp	3,19	0,71	2,41	0,36	2,39	0,16	2,66
NMB2131	hyp			2,91	0,00	1,85	0,00	2,38
NMB2141 ¶	hyp	3,44	0,35	4,51	0,16	3,07	0,81	3,67
NMB2147 ¶	hyp	2,62	1,30	2,32	1,55	1,29	0,34	2,08
NMB2153 ¶	conserved hyp	2,70	0,07	1,69	0,00	2,42	0,26	2,27

Werte für interne Standards lagen für alle Experimente vor und wurden wie unter 1.1.2 auf Seite 55 beschrieben auf die beiden im Verhältnis 1:1 vorgelegten Standards

Sacc2 und Sacc3 korrigiert:

Tabelle 17: *NHS versus PBS*, Experimente 1 bis 3: korrigierte interne Sacc-Standards

	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3		Mittelwert
	<i>Slide 1</i>	<i>Slide 2</i>	<i>Slide 1</i>	<i>Slide 2</i>	<i>Slide 1</i>	<i>Slide 2</i>	
<i>Mittel $\bar{S}_{2,3}$</i>	0,54	0,51	0,54	0,35	0,62	0,41	
<i>Faktor c_S</i>	1,85	1,96	1,85	2,86	1,61	2,44	
Sacc1	2,07	2,39	2,04	2,51	2,97	2,44	2,40
Sacc2	1,05	1,16	0,67	0,62	0,50	0,51	0,75
Sacc3	0,96	0,84	1,33	1,34	1,50	1,51	1,24
Sacc4	0,48	0,47	0,30	0,37	0,37	0,44	0,41

Auf allen *Slides* werden für Sacc1 bzw. Sacc4 die Kriterien der differentiellen Regulation erfüllt. Sacc2 liegt auf *Slide1* des zweiten und auf beiden *Slides* des dritten Experiments jenseits von 0,63. Beide Ansätze wurden am selben Tag unter Verwendung des selben Standard-RNA-Mix weiterverarbeitet. Es liegt somit nahe, dass sich ein abweichendes Mischungsverhältnis der zugesetzten Standard-RNAs hier fortgesetzt hat.

In Abbildung 12 ist die Verteilung der differentiell regulierten Gene über das Chromosom dargestellt. Im unteren Abschnitt sind die durch horizontalen Gentransfer acquirierten Sequenzen eingetragen. Eine Häufung von differentiell regulierten Genen in diesen Abschnitten lässt sich nicht beobachten.

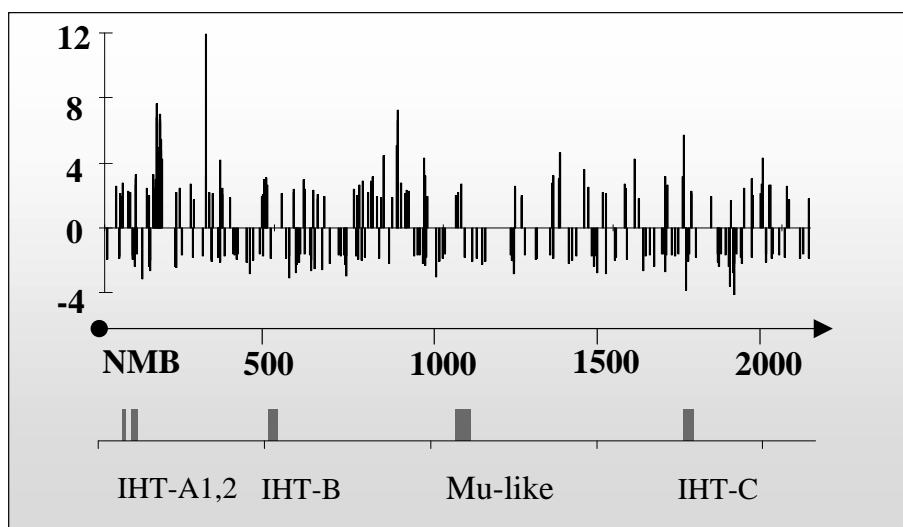


Abbildung 12: *NHS versus PBS* Gesamtgenom: Verteilung differentiell regulierter Gene über das Chromosom

Teil IV

Diskussion

1 Vergleich und Etablierung

In der ersten Reihe von Experimenten wurden die Eigenschaften cDNA- und Oligonukleotid-basierter *Arrays* untersucht. Die wichtigsten Ergebnisse sind: Für beide Systeme wurden unter Standardbedingungen vergleichbare Werte für die Ratio \bar{Q} und die durchschnittliche Standardabweichung ermittelt. Für den Oligonukleotid-*Array* gilt, dass die Schwankung zwischen den drei Oligonukleotid-Positionen größer ist als die zwischen den Replikaten. Die Abweichung zwischen den einzelnen Oligonukleotid-Replikaten einer Position ist geringer als die zwischen den Replikaten des cDNA-*Arrays*. Aus den Daten lassen sich für beide Plattformen gleiche Grenzwerte ableiten, ab der ein Gen als differentiell reguliert angesehen wird.

In zwei unabhängigen Hitzeschock-Experimenten wurden insgesamt zehn Gene als differentiell reguliert identifiziert. Von diesen wurden neun durch die Oligonukleotid-*Arrays* und sechs durch die cDNA-*Arrays* detektiert. Die Übereinstimmung zwischen den Oligonukleotid-*Arrays* beider Experimente war größer als die zwischen den beiden cDNA *Arrays*. Es wurde untersucht, ob Unterschiede in den Werten für \bar{Q} zwischen den drei Oligonukleotid-Positionen systematischen Einflüssen unterliegen: Das Oligonukleotid mit der größten Abweichung im Tripel zeigte keine Positionspräferenz. Dies spricht gegen den Einfluss endständiger Degradation der mRNA-Moleküle, durch den die Bevorzugung vorderer Oligonukleotid-Positionen zu erwarten gewesen wäre. Weiterhin konnte kein Zusammenhang zwischen größter Abweichung im Tripel und Intensität hergestellt werden: Nimmt man die Signalstärke als Maß für die Affinität der Oligonukleotid-Sonden zur cDNA-Probe, so besteht kein Hinweis darauf, dass Unterschiede in den Affinitäten in der beobachteten Größenordnung die Fähigkeit zur Bestimmung von \bar{Q} beeinflussen. Es konnte eine positive Korrelation zwischen Grad der differentiellen Regulation und Standardabweichung im Tripel gezeigt werden. Differentielle Regulation bildet sich also nicht gleichmäßig im Tripel ab. Daraus folgt, dass Mittelwertbildung das System stabiler, jedoch auch unempfindlicher gegenüber der Detektion differentieller Regulation macht.

Schwellenwert

Da das mögliche Ausmaß der differentiellen Regulation eines Gens innerhalb eines Kontinuums von \overline{Q} *ungleich eins* bis *beliebig groß* liegt, ist jede Festlegung einer Grenze zur Detektion letztendlich artifiziell. Aufgrund der Parallelhybridisierungen mit identischen RNA-Transkripten wurde für Einzelexperimente die Grenze stringent auf 0,5 und 2 festgesetzt, um die Zahl der falsch positiven Kandidaten zu minimieren. Bei Vorliegen einer Serie von Experimenten wurde die Grenze auf 1,6 bzw. 0,63 festgesetzt und gefordert, dass mehr als die Hälfte der Experimente einen Wert jenseits dieser Grenze zeigen. Gerade herunterregulierte Gene erfüllen das Kriterium *kleiner 0,5* seltener: Wie für die Analyse des Hitzeschocks mit dem Gesamtgenom-Array gezeigt, reduziert sich der Anteil der herunterregulierten Gene an der Gesamtheit aller als differentiell reguliert detektierten Gene überproportional um die Hälfte (von 12,5% auf 7,5%), wenn die Schwelle von 1,6 bzw. 0,63 auf 2,0 bzw. 0,5 angehoben wird. Hierbei wurde auch gezeigt, dass Herunterregulation mehrheitlich mit geringerer Signalintensität einhergeht. Daraus lässt sich schließen, dass Hochregulation in der Mehrzahl der Gene mit starker absoluter Signalintensität und damit hoher transkriptioneller Aktivität einhergeht, was die Wahrscheinlichkeit, mit dem Array detektiert zu werden, erhöht. Zusammengenommen mit den oben aufgeführten Ergebnissen des Teilgenom-Arrays kann gefolgert werden, dass die absolut zur Verfügung stehende Menge an cDNA kritisch für die Detektion von \overline{Q} ist, während Unterschiede in der Affinität zu den einzelnen Oligonukleotid-Sonden eines Gens von untergeordneter Bedeutung sind. Auf die Schwierigkeit, Signale niedriger Intensität korrekt zu messen, wird auch von anderen Autoren hingewiesen (Richmond u. a., 1999).

Interne Standards

Betrachtet man das Verhältnis der internen Standards zueinander, so ergeben sich zum Teil deutliche Schwankungen um das Idealverhältnis von 3 : 1 : 1 : 1/3 im Einzelexperiment. Ursachen hierfür können in jedem Schritt der Prozessierung liegen. Möglich ist auch die Fortsetzung von Abweichungen im Mischungsverhältnis des verwendeten Standard-RNA-Gemisches. Dies ist wahrscheinlich, wenn die übrigen Ergebnisse eines Arrays in weiteren Experimenten reproduzierbar sind. In den meisten Fällen jedoch zeigten die internen Standards zumindest in Richtung des Idealverhältnisses. Für Serien mehrerer Experimenten zeigten die internen Standards auch bei eng gefassten Grenzen von 1,6 bzw. 0,63 ein stabiles Verhalten: Für die Gene *Sacc1* bzw. *Sacc4* wurden

die Schwellenwerte regelmäßig überschritten, allerdings erreichten die Auslenkungen für \overline{Q} meist nicht die vorgelegten RNA-Mengenverhältnisse von 3 : 1 bzw. 1 : 1/3. Wie oben angeführt, kann eine mögliche Ursache dieser Trägheit in der Mittelwertbildung über mehrere Oligonukleotidsonden liegen. Trägheit ebenso wie Robustheit der internen Standards über mehrere Experimente unterstützen die Wahl enger gefasster Grenzen.

Hitzeschock

Nachdem die sinnvolle Anwendbarkeit des Oligonukleotid basierten Systems gezeigt worden war, wurden alle 2160 Gene auf einem Oligonukleotid-basierten *Array* abgebildet. Hierbei erfüllten 143 Gene die oben genannten Kriterien der differentiellen Regulation, wobei 53 Gene in allen drei Einzelexperimenten die Schwelle erreichten. Die Hitzeschock-Antwort ist über verschiedene Organismen hinweg konserviert und ermöglicht Zellen, sich Änderungen der äußeren Bedingungen innerhalb kurzer Zeit anzupassen. Sie ist an verschiedenen Bakterienspezies untersucht worden. Die Detektierung zahlreicher im Vorfeld als Hitzeschock-reguliert beschriebener Gene wie $\sigma 32$ Regulon, Proteasen und *Chaperone* unterstreicht die Validität des Systems. Übereinstimmungen im Grad der differentiellen Regulation wurden innerhalb mehrerer Opera festgestellt. Für die meisten *Microarray* Studien bilden cDNA-basierte *Arrays* die Grundlage. Die Implementierung eines Oligonukleotid-basierten Systems bietet hierzu eine sinnvolle Alternative.

2 Seruminkubation

Nach der Etablierung des Gesamtgenom-*Arrays* wurde in einem ersten Versuchsmodell die Anwendbarkeit zur Erforschung der Pathogenese geprüft.

Das Ergebnis der Wachstumskinetik zeigt, dass die Zahl der Bakterien des Stammes MC58 inkubiert in NHS zum Zeitpunkt 30min auf das 0,1-fache der ursprünglich eingesetzten Konzentration abgefallen ist, sich dann jedoch bis zum Zeitpunkt 120min kaum verändert. Der parallel getestete Stamm H44/76 zeigte ein analoges Wachstumsverhalten. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der Bakterien inkubiert in PPM+ zunächst konstant, hatte sich dann aber zum Zeitpunkt 120min vervierfacht. Da die Werte zum Zeitpunkt *null* aus der OD_{600nm} der Stammsuspension vor der Waschprozedur kalkuliert worden ist, ist möglich, dass es während des Waschschrattes in PBS zu einer Reduktion der Bakterienzahl gekommen ist. Bei der Resuspension in NHS können aufgrund der einsetzender Agglutination zusätzliche Verluste entstehen. Weiter ist anzunehmen, dass

es initial zu einer Reduktion der lebenden Bakterien kommt, bedingt durch die komplementvermittelte bakterizide Wirkung des Nativserums. Möglicherweise nimmt dieser Effekt durch Verbrauch der Komplementfaktoren während der weiteren Inkubation ab. Die Konstanz der Bakterienzahl zu den nachfolgenden Zeitpunkten würde dann für eine geringe Teilungsaktivität der Neisserien im Serum sprechen. Eine mögliche Ursache hierfür kann in der Agglutination liegen, die zu besonders dichter Packung der Bakterienzellen und damit zur Konkurrenz um Nährstoffe im Mikromilieu des einzelnen Bakteriums führt. Alternativ könnte eine nach den ersten 30min einsetzende Teilungsaktivität einer weiteren komplementvermittelten Abnahme der Bakteriendichte entgegenwirken. Abtötung und Wachstum müssten dann nach derselben Kinetik ablaufen.

Um die Situation der Bakterien so lebensnah wie möglich im Modell nachzustellen, wurde natives Serum als Experimentalmedium eingesetzt. Da Neisserien sich durch eine besonders hohe Mutationsfrequenz auszeichnen, kommen für Unterschiede im gemessenen RNA-Gehalt eines Gens gegenüber der Vergleichskultur verschiedene Mechanismen in Frage: Aktivierung der Transkription im Sinne einer Induktion führt zu einer vermehrten mRNA-Produktion innerhalb des einzelnen Bakteriums, welche eine Steigerung der Expression in der gesamten Bakterienpopulation ermöglicht. Demgegenüber führen Mutationen, z.B. in Form von Phasenvariation, im Promotor- oder Strukturgenbereich zu Bakterienklonen, die sich in ihrer Fähigkeit unterscheiden, das Gen konstitutiv zu exprimieren. Eine heterogene Verteilung der konstitutiven Expression innerhalb der Population ist Voraussetzung für die Selektion einer Subpopulation, die im Serum überlebens- und vermehrungsfähig ist. In beiden Fällen ist eine Anpassung an das Serummilieu erfolgt, das Gen erscheint auf dem *Array* hochreguliert. Eine Aussage, welcher Mechanismus zur Hochregulation geführt hat, kann aufgrund der *Microarray*-Daten nicht getroffen werden. Darum wird der in *Microarray*-Studien häufig verwendete Begriff *differenzielle Regulation* in dieser Arbeit rein deskriptiv verwendet, wie im Abschnitt 2.1 auf Seite 16 ausgeführt. Die Frage, welche Rolle Selektionsphänomene spielen, beschränkt sich nicht auf das Serummodell, sie kann auch bei anderen *Microarray*-Studien wie Zelladhäsions-, oder auch Stoffwechselmodelle gestellt werden.

In der Einleitung unter 2.1 auf Seite 16 wurde dargestellt, dass sich die Reaktion des Transkriptomts immer nur als relative Änderung in Bezug auf einem Vergleichszustand beschreiben lässt. Die Wahl des Kontrollmediums ist somit entscheidend, um biologisch sinnvolle Schlussfolgerungen aus dem Vergleich ziehen zu können. Mit der Absicht, so wenig Variablen wie möglich zu verändern, wurde in einer ersten Serie von Experimenten die Änderung des Transkriptomts bei Inkubation in NHS im Vergleich

zu PPM+ untersucht. Hierbei fiel das starke Überwiegen der herunterregulierten Gene mit 89,9% und insbesondere die stark herunterregulierten ribosomalen Gene auf. Es liegt nahe, dieses Ergebnis auf den Einfluss eines regen Teilungsverhaltens der Bakterien in der PPM+-Kultur zurückzuführen (Karlin S und Mrazek J, 2000). PPM+ ist als Wachstumsmedium gut etabliert, ist aber ein künstliches Medium, so dass die Relation eines Effektes zu dieser Kontrolle stets als artifiziell zu werten ist, wie der beobachtete Wachstumseffekt gezeigt hat.

Um einen Wachstumseffekt im Kontrollmedium zu vermeiden, wurde in der zweiten Versuchsserie PBS als Vergleichsmedium herangezogen. Bei PBS handelt es sich um ein kristalloides, osmotisch neutrales Medium, das dem Ionenmilieu vergleichbar ist. Es lässt sich somit eine biologische Begründung ableiten. PBS wird für Verdünnungsreihen von Bakteriensuspensionen verwendet, da sich darin die Zahl der Bakterien konstant verhält. Problematisch ist, dass es sich um ein Mangelmedium handelt, welches die Bakterien nicht mit Nährstoffen versorgen kann und damit über die Zeit mit eingreifende Umstellungen des Zellstoffwechsels gerechnet werden muss, was die Verwendung als Kontrollmedium problematisch werden lässt. Die Wahl eines geeigneten Kontrollmediums ist also nicht trivial. Im Vergleich mit der Inkubation in NHS *versus* PPM+ zeigt sich in der zweiten Versuchsserie NHS *versus* PBS ein ausgewogenes Verhältnis zwischen hoch- und herunterregulierten Genen bei leichtem Überwiegen der letzteren. Die ribosomalen Gene waren zum Teil hochreguliert, was für ein verstärktes Wachstum in der NHS Kultur sprechen könnte, jedoch in geringerem Umfang, als es in PPM+ Medium beobachtet wurde. Untersucht man die Ergebnisse des NHS *versus* PPS Vergleichs auf mögliche Stresseffekte in der PBS inkubierten Population, so findet man unter den hochregulierten Genen *groEL* als klassisches *Heat shock* Gen. Wie nachfolgend für die gegenläufige Annahme einer möglichen Stressreaktion in der NHS Population diskutiert, wird eine vollständige *Heat shock* Reaktion jedoch nicht abgebildet.

Im Vergleich zu anderen Studien liegt die Anzahl der insgesamt als differentiell reguliert gewerteten Gene mit 284 in einer ähnlichen Größenordnung: Grifantini u. a. (2002) untersuchten die Änderung des Expressionsprofils von *Neisseria meningitidis* bei Adhärenz an eine transformierte Bronchialepithel-Zelllinie (16HBE14) und fanden Änderungen im Expressionsverhalten von 347 Genen über einen Zeitraum von drei Stunden. Davon waren 189 Gene hochreguliert, entsprechend 54 %. Dieselbe Arbeitsgruppe fand unter Zusatz von Eisen eine Änderung im Expressionsverhalten von 233 Genen, davon 153 hochreguliert, entsprechend 66 % (Grifantini u. a., 2003). Unsere Arbeitsgruppe konnte zum Zeitpunkt 6h nach Infektion einer Epithelzelllinie (HEP-2) 72 Gene und

nach Infektion einer Endothelzelle (HBMEC) 58 differentiell regulierte Gene identifizieren (Dietrich u. a., 2003). Jedoch zeigt der Vergleich mit anderen Modellen, dass das Expressionsprofil während der Seruminkubation individuell ist, es lässt sich nicht alleine auf eine Stressreaktion im Sinne eines Hitzeschocks oder mögliche Eiseneffekte im aus Blutproben gewonnenen Serum zurückführen: Insgesamt 37 Gene sind sowohl unter Seruminkubation als auch unter Hitzeschock-Bedingungen differentiell reguliert. 31 Gene zeigen eine gleichsinnige Änderung der Expression. Darunter sind Gene des *nqr*-Operons, für ribosomale Proteine kodierende Gene und zahlreiche hypothetische Gene, während unter den 6 gegensinnig regulierten Genen Transporter und *groEL* zu finden sind. Das inverse Verhalten dieses für ein typisches *Heat shock* Protein kodierenden Gens entspricht nicht dem Muster einer klassischen Hitzeschock-Reaktion. Es ist jedoch möglich, dass unter beiden Versuchsbedingungen eine allgemeine Stressreaktion provoziert wird. Dies kann aber nur einen Teil der im Vergleich hierzu hohen Gesamtzahl von 384 der in Serum differentiell regulierten Gene erklären. Mit den unter Eisengabe differentiell regulierten Genen existiert zum Zeitpunkt 30min eine Schnittmenge von 18 Genen, von denen sich 15 gegensinnig verhalten, darunter *nspA*, unter Eisengabe hochreguliert, und das *frpC*-Operon, unter Eisengabe reprimiert (Grifantini u. a., 2003). Da NHS aus Vollblut gewonnen wurde und damit im Vergleich zum PBS einen höheren Eisengehalt besitzen sollte, wäre eine größere Übereinstimmung von Genen mit gleichgerichteter Regulation zu erwarten gewesen. Die Gegenüberstellung dieser Modelle mit Änderung des Milieus zeigt, dass *Neisseria meningitidis* sein Transkriptom an unterschiedliche Umweltbedingungen individuell anpasst. Bezeichnend hierbei ist, dass ein großer Anteil des Genoms involviert ist, bis hin zu Genen des basalen Zellstoffwechsels. Die Ergebnisse unterstützen die These, dass virulente Eigenschaften nicht nur an spezifische für schädigende Faktoren kodierende Gene gebunden sind, sondern eine generelle *Fitness* im Sinne eines schnell reagierenden Zellstoffwechsels voraussetzen. (Finlay und Falkow, 1997). Für *Neisseria meningitidis* konnte im Rattenmodell gezeigt werden, dass zahlreiche durch *Signal tagged mutagenesis* veränderte Bakterienklone, die ihre Fähigkeit zum Überleben im Blutstrom eingebüßt hatten, Mutationen in Stoffwechselgenen trugen (Sun u. a., 2000).

Stellt man die Daten der Seruminkubationsversuche in eine Reihe mit denen der Zelladhäsions-Modelle, so lässt sich die Änderung des Transkriptionsprofils in verschiedenen Stadien der Pathogenese nachzeichnen: Besonders auffallend ist, dass ein Großteil der gemeinsam als differentiell reguliert identifizierten Gene ein kontrastierendes Expressionsverhalten zeigen: In der direkten Gegenüberstellung der Modelle Seruminku-

bation und Zelladhärenz (16HBE14) zum Zeitpunkt 30min waren 20 Gene gleichsinnig reguliert, darunter die Gene *secY*, *OMP classIV* und *pilP*, und 27 Gene gegensinnig reguliert, darunter zahlreiche für ribosomale Proteine kodierende Gene (Grifantini u. a., 2002). Der Vergleich mit den Zelladhäsionsmodellen unserer Arbeitsgruppe erbrachte eine gemeinsame Schnittmenge von 39 Genen, von denen 23 lediglich während Seruminkubation und HBMEC-Adhärenz, 13 während Seruminkubation und Hep-2-Adhärenz und 3 Gene (*mdaB*, *tonB*, NMB1575) in allen drei Modellsystemen differentiell reguliert waren. Darunter zeigten 10 Gene ein inverses Verhalten bei Inkubation in Serum und Zelladhärenz (Kurz u. a., 2003), was in der Relation den davor genannten Ergebnissen entspricht. Die Ergebnisse in der Gesamtschau sprechen für eine exakte Feinabstimmung der Genexpression in verschiedene Stadien des Infektionsgeschehens.

Wie oben erwähnt, steht die Gesamtmenge der hoch- und herunterregulierten Gene in einem ausgewogenen Verhältnis zueinander bei leichtem Überwiegen der herunterregulierten Gene. Betrachtet man die mächtigen Gruppen Stoffwechsel, Hülle, Virulenz-assoziiert, Proteinsynthese und -modifikation, so fällt jedoch eine unterschiedliche Verteilung bezüglich Hoch- und Herunterregulation auf:

In der Gruppe des Energiemetabolismus überwiegen mit 83 % die herunterregulierten Gene. Hierzu zählt das *nqr*-Operon, dessen Genprodukte im Energiemetabolismus eine zentrale Stellung einnehmen. Neisserien sind damit wahrscheinlich in der Lage, neben eines Protonen- auch einen Na^+ -Gradienten aufzubauen und für die Energiegewinnung zu nutzen (Häse CC u. a., 2001). Auch unter Hitzeschock-Bedingungen zeigten sich Gene des *nqr*-Operons herunterreguliert. Ebenfalls herunterreguliert sind die Gene der Cytochromoxidase, welche mit den Genprodukten des *nqr*-Operons funktionell verknüpft ist. Umgekehrt verhalten sich die Gene der Proteinsynthese. Hier sind 60 % der differentiell regulierten Gene hochreguliert, darunter zahlreiche für ribosomale Proteine kodierende Gene. Sie gehören zu den generell am stärksten transkribierten Genen (Karlin S und Mrazek J, 2000). Wie oben erwähnt, könnte dies ein Hinweis auf eine verstärkte Teilungsaktivität der Bakterien im Serum sein, jedoch ist eine Verstärkung der transkriptionellen Aktivität auch denkbar im Rahmen einer Stresssituation, die eine rasche Umstellung der Proteinsynthese erfordert. So waren ribosomale Proteine auch unter Hitzeschock-Bedingungen verstärkt transkribiert. Abbildung 13 auf der nächsten Seite stellt die Relationen innerhalb dieser Gruppen der Grundgesamtheit gegenüber.

28 der differentiell regulierten Gene sind in verschiedenen Studien mit Virulenz assoziiert worden. Grundlage ist die Tabelle in Kurz u. a. (2003). In dieser Gruppe dominieren herunterregulierte Gene mit 57%, wobei viele Virulenzgene für membranständige Proteine

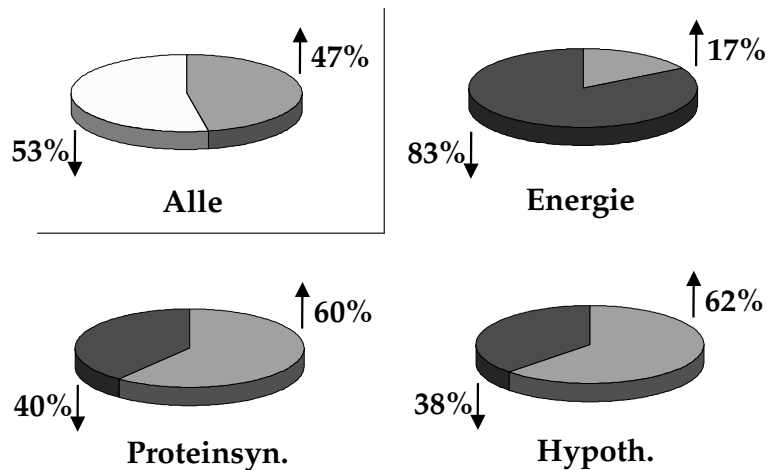


Abbildung 13: Verteilung der Hoch- bzw. herunterregulierten Gene in verschiedenen Gruppen

kodieren. Unter ihnen zeigen die Pilus-assoziierten Gene ein differenziertes Transkriptionsmuster: Typ IV-Pili sind essentiell für initialen Kontakt mit der Wirtszelle, für die DNA-Aufnahme im Rahmen der natürlichen Kompetenz und Motilität. Hochreguliert sind *pilC1/C2*, die für die Rezeptorproteine am freien Ende der Pili kodieren und wichtig für die Interaktion mit der Wirtszelle sind, während die Gene *pilT*, benötigt für Pilus-Retraktion, und das Operon *pilM-pilQ*, herunterreguliert sind. Weitere hochregulierte Virulenz-assoziierte Gene sind das *frpC*-Operon, das putative Adhäsion NMB0586 und *tonB*: *FrpC* kodiert für ein Protein mit so genannten RTX-Domänen, welche typischerweise bei Zytotoxinen anderer Gram-negativer Bakterien vorkommen. *FrpC*-Allele wurden in allen invasiven und den meisten Trägerisolaten gefunden. Nach invasiven Meningokokkeninfektionen wurden hohe Antikörpertiter der Klassen IgG und IgA gegen FrpC-Proteine gefunden, was im Einklang mit den Ergebnissen unseres Systems steht. Die Proteine spielen somit eine mögliche Rolle in der Pathogenese invasiver Infektionen (Osicka u. a., 2001). Allerdings konnte eine virulente Rolle im Babyrattenmodell nicht belegt werden. (Forman u. a., 2003). TonB ist in der inneren Membran verankert und integraler Bestandteil verschiedener Eisenprotein-Rezeptorkomplexe. Wie unter 1.4.1 auf Seite 7 beschrieben, wird ihm eine zentrale Funktion im Eisentransport zugesprochen. So wird auch die Eisenaufnahme aus Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexen, der dominierenden Eisenquelle im Serum, über den TonB-abhängigen Rezeptor HpuAB vermittelt (Rohde und Dyer, 2004), womit TonB eine wichtige Stellung beim Überleben im Blutstrom zukommt. Unter den herunterregulierten Genen finden sich die möglicher-

weise in einem Operon organisierten Gene des *Multiple transferable resistance*-Systems *mtrC*, *D*, *E* (NMB1716, 1715, 1714) mit einem *Multi-drug efflux pump* Kanalprotein und einem Membranfusionsprotein, sowie das Klasse IV- Membranprotein NMB0382. Noch deutlicher überwiegt die Anzahl herunterregulierter Gene in der Gruppe der für potentielle Oberflächenproteine kodierenden Gene. Hierzu wurden die Gruppen der Adhäsion- und Oberflächenstrukturgene mit denen der Transporter zusammengefasst. Ergänzt wurden Gene, die in ihrer Sequenz Motive für mindestens eine Transmembrandomäne tragen. Ihre Anzahl ist mittlerweile auf 99 Gene gewachsen (aktualisierte Liste: www.TIGR.org *comprehensive microbiological database*, Juli 2004), Sie stellen damit die größte Anzahl innerhalb der Gruppe. Jedoch gilt einschränkend, dass mit den jetzigen Verfahren keine sichere Aussage über die tatsächliche Membranständigkeit der kodierten Proteine gemacht werden kann. Insbesondere helikale Motive globulärer Proteine können fälschlicherweise als Transmembrandomänen imponieren. Proteine der inneren Membran sind nicht oberflächenständig. Schwierig ist die Vorhersage von Membranproteinen mit β -Faltblattstruktur, ihre Anzahl wird mit den gängigen Methoden unterschätzt (Chen und Rost, 2002). In Abbildung 14 auf Seite 96 sind die Relationen in den Gruppen der Virulenz-assoziierten und oberflächenständigen Gene denen der Grundgesamtheit gegenübergestellt. Die Gene im Einzelnen sind in Tabelle 18 als Essenz der Arbeit aufgeführt.

Tabelle 18: *NHS versus PBS* Gesamtgenom: differentiell regulierte Gene kodierend für oberflächenständige Proteine

hochreguliert		herunterreguliert	
Locus	Gen/Funktion	Locus	Gen/Funktion
NMB0034	conserved hypothetical protein	NMB0006	thioredoxin-related protein
NMB0046	hypothetical protein	NMB0042	conserved hypothetical protein
NMB0049	pilC2 protein, auth. frameshift	NMB0043	conserved hypothetical protein
NMB0054	hypothetical protein	NMB0095	hypothetical protein
NMB0092	hypothetical protein	NMB0131	50S ribosomal protein L7/L12
NMB0125	preprotein translocase SecE	NMB0132	DNA-dir. RNA polymerase, β
NMB0162	preprotein translocase SecY	NMB0133	DNA-dir. RNA polymerase, β
NMB0342	intracellular septation protein A	NMB0174	valyl-tRNA synthetase
NMB0346	hypothetical protein	NMB0288	hypothetical protein
NMB0467	hypothetical protein	NMB0315	conserved hypothetical protein
NMB0470	C4-dicarboxylate transporter	NMB0333	pilus assembly protein PilG
NMB0479	conserved hypothetical protein	NMB0334	glucose-6-phosphate isomerase
NMB0521	hypothetical protein	NMB0338	hypothetical protein
NMB0558	hypothetical protein	NMB0339	conserved hypothetical protein
NMB0586	adhesin, putative	NMB0341	tspA protein
NMB0590	tRNA (guanine-N1)-methyltransf	NMB0382	outer membrane protein class 4
NMB0615	ammonium transp. AmtB, put	NMB0390	maltose phosphorylase
NMB0736	PTS system	NMB0418	muramyl-pentapeptide-transf.
NMB0746	conserved hypothetical protein	NMB0427	cell division protein FtsZ
NMB0752	ferredoxin, put	NMB0535	glucose/galactose transporter
NMB0762	hypothetical protein	NMB0543	L-lactate permease, putative
NMB0787	amino acid ABC transp	NMB0546	alcohol dehydrogenase,
NMB0790	phosphoglucomutase	NMB0564	nqr F
NMB0821	hypothetical protein	NMB0565	nqr E
NMB0850	hypothetical protein	NMB0566	nqr D
NMB0864	hypothetical protein	NMB0568	nqr B
NMB0865	hypothetical protein	NMB0578	copper ABC transporter,
NMB0887	PilV, putative	NMB0606	conserved hypothetical protein
NMB0889	hypothetical protein	NMB0610	spermidine/putrescine ABC tr.
NMB1035	hypothetical protein	NMB0690	amidophosphoribosyltransferase
NMB1051	ABC transporter, ATP-bp	NMB0696	amino acid ABC transp.
NMB1211	hypothetical protein	NMB0709	hypothetical protein
NMB1212	hypothetical protein	NMB0758	polyribonucleotide nucleotidyltr.
NMB1231	ATP-dependent protease La	NMB0770	PilZ, putative
NMB1414	FrpC operon protein	NMB0778	HemX, putative
NMB1429	outer membrane protein PorA	NMB0809	conserved hypothetical protein
NMB1468	hypothetical protein	NMB0929	dihydrodipicolinate synthase
NMB1537	DNA primase	NMB0938	hypothetical protein
NMB1564	conserved hypothetical protein	NMB0948	succinate DH, cytochr. b556 sub
NMB1707	sodium- and chloride-dep transp	NMB0997	D-lactate dehydrogenase
NMB1730	TonB protein	NMB1124	hypothetical protein

Fortsetzung nächste Seite

Locus	Gen/Funktion	Locus	Gen/Funktion
NMB1732	transporter, putative	NMB1201	IMP dehydrogenase
NMB1847	pilC1 protein, auth. frameshift	NMB1207	bacterioferritin A
NMB1941	hypothetical protein	NMB1276	long-chain-fatty-acid-CoA lig.
NMB1965	conserved hypothetical protein	NMB1341	pyruvate dehydr., E1
NMB2020	conserved hypothetical protein	NMB1342	pyruvate dehydr., E2
NMB2078	conserved hypothetical protein	NMB1369	hypothetical prot.
NMB2131	hypothetical protein	NMB1452	conserved hypothetical protein
NMB2136	peptide transporter	NMB1508	hypothetical protein
NMB2141	hypothetical protein	NMB1540	lactoferrin-binding prot. A
NMB2147	hypothetical protein	NMB1590	cons. hypothetical prot.
NMB2154	electron transfer flavoprotein, α	NMB1609	trans-sulf. enz. fam prot
		NMB1623	major anaerobic. ind. omp
		NMB1644	hypothetical protein
		NMB1658	DNA/pantothenate metab.
		NMB1714	multidrug efflux pump ch. prot
		NMB1715	MtrD
		NMB1716	membrane fusion protein
		NMB1723	cytochrome c oxidase, subu. III
		NMB1725	cytochrome c oxidase, subu. I
		NMB1745	hypothetical protein
		NMB1809	pilN protein
		NMB1811	pilP protein
		NMB1812	pilQ protein
		NMB1820	pilin glycosylation prot. PglB
		NMB1833	isoleucyl-tRNA synthetase
		NMB1844	hypothetical protein
		NMB1855	carbamoyl-phosph. synth., large
		NMB1859	S-aden.-met:tRNA ribos.-tr.-iso.
		NMB1966	ABC transp., ATP-bind. prot.
		NMB1969	serotype-1-specific anti., put
		NMB1989	iron(III) ABC transporter
		NMB2005	glutamate N-acetyltransfe
		NMB2051	ubiquinol-cyt c reduct., cyt c1
		NMB2052	ubiquinol-cyt c reduct., cyt b
		NMB2060	glycerol-3-ph. DH (NAD ⁺)
		NMB2079	aspartate-semialdehyde DH
		NMB2133	sodium/dicarbox. symp
		NMB2159	glyceraldehyde 3-p DH

Oberflächenproteine nehmen in der Pathogenese invasiver Infektionen eine Schlüsselstellung ein, stellen aber auch Epitope, gegen die eine schützende Immunantwort generiert werden kann. Der besonders hohe Anteil der herunterregulierten Gene sicher und potentiell oberflächenständiger Proteine könnte auf einen möglichen Evasionsmechanismus hindeuten, der jenen Bakterien eine Überlebenschance im Blutstrom einräumt, wel-

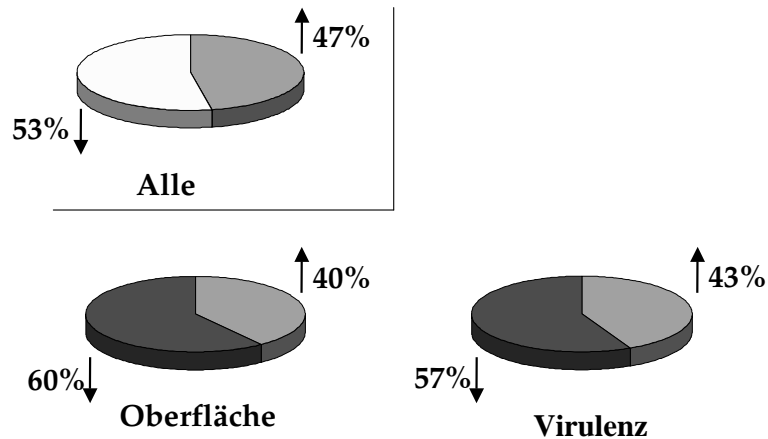


Abbildung 14: Verteilung der Hoch- bzw. herunterregulierten Virulenzgene sowie der Gene, die für potentiell oberflächenständige Proteine kodieren

che eine reduzierte Anzahl an exponierten Epitopen aufweisen. Grifantini u. a. (2002) untersuchten die Interaktion von *Neisseria meningitidis* mit Epithelzellen auf Transkriptomebene und analysierten daraufhin die Expression membranständiger Proteine. Die Bestimmung des jeweiligen Proteins wurde zum Zeitpunkt seiner maximalen transkriptionellen Aktivität durchgeführt. Die Änderungen im Transkriptionsprofil konnten hierbei unmittelbar auf Proteinebene nachvollzogen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Änderung der transkriptionellen Aktivität oberflächenständiger Proteine rasch zu einer Remodelierung der Oberflächenstruktur führt, womit das Bakterium prompt und flexibel auf sich ändernde Umwelteinflüsse reagieren kann. Überträgt man diese Ergebnisse auf die Situation im Blutstrom, so kann ein unmittelbarer biologischer Effekt der gemessenen Änderung im Transkriptionsprofil während der Inkubation in humanem Serum angenommen werden.

Oberflächenständige Proteine sind für die Impfstoffentwicklung prinzipiell attraktiv. Unter den unter Seruminkubation differentiell regulierten Genen finden sich einige, deren Proteine als potentielle Vakzinekandidaten evaluiert werden. Auf dem *Array* hochreguliert wurde zum Beispiel jenes für das hochvariable Membranprotein PorA kodierende Gen gemessen. Kompositionen der am häufigsten von invasiven Stämmen exprimierten PorA-Varianten sind integraler Bestandteil der *Outer membrane vesicle*-Vakzine. Unter den herunterregulierten Genen finden sich die Gene für NspA, TspA und Vertreter der Klasse IV-Proteine. Interessanterweise zeigten NspA-spezifische Antikörper gegenüber MC58 ein variables Bindungsverhalten. Es ergaben sich hierbei keine Hinweise auf Unterschiede in der Expression (Moe u. a., 2001). Die Ergebnisse unserer Versuchsreihe

können jedoch auf eine situativ verminderte transkriptionelle Aktivität hindeuten. Von den durch Sequenzanalysen indentifizierten potentiellen Vakzinekandidaten zeigten lediglich 1/3 eine verstärkte Transkription in Zelladhäsionsexperimenten (Grifantini u. a., 2002). Es zeigt sich also, dass Analysen des Transkriptoms mittels *Microarray*-Technik einen wichtigen Beitrag in der Vakzineforschung stellen können.

Ausblick

Inzwischen hat es in der Analyse von *Microarray*-Daten große Fortschritte gegeben. Es stehen komplexe *Software*-Lösungen zur Verfügung, mit denen Serienexperimente analysiert und sogenannte *Gen-Cluster* identifiziert werden können. Hierbei werden unter verschiedenen experimentellen Bedingungen sich gleich verhaltende Gene zusammengefasst. Somit können Vermutungen über die Funktion hypothetischer Gene angestellt werden. Auch für die Normalisierung und *Background*-Korrektur stehen komplexe Algorithmen zur Verfügung.

Während die Analyse des Transkriptoms von *Neisseria meningitidis* unter Zelladhäsion eingehend untersucht worden ist, wird die Analyse nach Konfrontation mit humanem Serum in dieser Arbeit erstmals beleuchtet. Für die Erforschung der Pathogenese sind beide Modellsysteme von Bedeutung, und hieraus lässt sich auch ihre Relevanz für die Impfstoffentwicklung ableiten: Antikörper gegen in Zellkulturexperimenten identifizierte Epitope können eine Kolonisierung bzw. Invasion der mukosalen Barrieren blockieren, im Serum vorhandene Antikörper die rasche Eliminierung eingedrungener Erreger bewirken. Wie oben dargestellt ist die Änderung des Transkriptoms bei Inkubation mit humanem Serum individuell, wobei eine Überlagerung sowohl von Effekten verschiedener Faktoren auf die transkriptionelle Regulierung, als auch von Selektionsphänomenen wahrscheinlich ist. Eine eingehendere Untersuchung des Wachstumsverhaltens in verschiedenen Medien wie Hitze-inaktiviertes Serum oder Verdünnungsreihen von nativem NHS in PBS in unterschiedlichen Konzentrationen könnte die Rolle möglicher Selektionseffekte näher beleuchten. Durch Anwendung von Vitalfärbungen nach Inkubation in nativem Serum könnte der Anteil lebender Bakterien an der Gesamtbakterienzahl quantifiziert werden. Um zu untersuchen, in wie weit sich die komplexe Reaktion der Transkription im Sinne einer Induktion oder Repression auf definierte Einzelfaktoren zurückführen lässt, können weitere Experimente mit verschiedenen Serumkomponenten durchgeführt werden. Ein Weg, um die problematische Auswahl eines geeigneten Kontrollmediums zu umgehen, ist die Anwendung eines inversen Versuchsansatzes: Als Kontrolle wird NHS

verwendet, gegebenenfalls Hitze-inaktiviert, um mögliche Selektionseffekte durch Bakterizidie auszuschalten. Gegen diesen Standard können Serumproben, denen verschiedene Proteinfractionen entzogen worden sind, getestet werden. Herunterregulation würde in diesem Fall für einen induzierenden Effekt der entzogenen Serumkomponente auf die Genexpression sprechen.

In dem hier vorgestellten Seruminkubationsmodell wurde NHS von erwachsenen Spendern eingesetzt. Die gleich nach Inokulation der Bakterien beobachtete Agglutination weist auf vorhandene Antikörper hin, welche für die Immunität erwachsener Individuen entscheidend sind. Um die Situation des Kleinkindes nachzustellen, wäre es sinnvoll, weitere Experimente mit Serum dieser Altersgruppe durchzuführen. Durch komparative Transkriptomanalysen können die Untersuchungen auf andere Neisserienstämme ausgeweitet werden. Weiterhin wäre interessant, die Analysen auf andere Stämme auszuweiten. Hierzu muss cDNA generiert aus MC58 und dem zu untersuchenden Stamm kompetitiv hybridisiert werden, um die Oligonukleotidsonden mit einheitlichem Bindungsvermögen auszuwählen.

Letztendlich entscheidend für jedes Ergebnis ist die biologische Relevanz: Nachdem die Validierung der *Microarray*-Daten mittels RT-PCR als unabhängige Methode für einige Gene durchgeführt worden ist, wäre es interessant, beobachteten Änderungen auch auf Proteinebene nachzuvollziehen, wie bereits für Zelladhäsionsexperimente gezeigt worden ist. Weiterhin könnte das Verhalten von generierten Stämmen, die Mutationen in Genen tragen, die unter Seruminkubation als differentiell reguliert in Erscheinung getreten sind, studiert werden, um deren Effekte *in natura* zu untersuchen. Um die Wertigkeit identifizierter potentieller Impfstoffkandidaten zu untersuchen, bietet sich folgende Vorgehensweise an: Durch Klonierung des Gens in einen Vektor mit vorangeschalteter für Poly-Histidin kodierender Sequenz und anschließender Expression in *Escherichia coli* lässt sich das Protein über die Poly-Histidinreste an Nickelsäulen binden und aufreinigen. Die Immunogenität des Proteins kann im Tierversuch überprüft werden. Mit den generierten Antikörpern lassen sich Bakterizidiebestimmungen mit verschiedenen Stämmen durchführen und damit die Immunantwort auf gewünschte Kreuzprotektivität untersuchen.

Bisher sind aus *Microarray*-basierten Studien noch keine Impfstoffe in klinischer Anwendung hervorgegangen. Jedoch demonstrieren die zahlreichen veröffentlichten Studien das hohe Potential dieser Technik, um in naher Zukunft praktische Bedeutung für die Vakzinologie zu erlangen.

Teil V

Zusammenfassung

Im Vergleich mit dem bereits etablierten cDNA-basierten *Microarray*-System für 60 Gene konnte die Anwendbarkeit von Oligonukleotid-basierten *Microarrays* zur Analyse des Transkriptoms von *Neisseria meningitidis* Serogruppe B gezeigt werden. Die Eigenschaften beider Systeme wurden zunächst anhand von Parallelhybridisierungen mit identischen RNA-Proben untersucht. Hierbei wurden für beide Systeme vergleichbare Werte für die Standardabweichung gefunden und daraufhin einheitliche Kriterien für die differentielle Regulation eines Gens abgeleitet. Die Anwendbarkeit dieser Kriterien wurde anhand des Hitzeschockmodells untersucht. Daraufhin wurde das gesamte Genom von *Neisseria meningitidis* auf einem Oligonukleotid-basierten Array abgebildet. Die damit untersuchte Änderung des Transkriptoms unter Hitzeschock-Bedingungen korrelierten gut mit den Ergebnissen des kleinen Arrays und mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen. Schließlich wurde die Anwendbarkeit des Systems für die Analyse eines ersten Pathogenesmodells, der Konfrontation mit humanem Serum, untersucht.

Die Verwendung von PPM+ als Vergleichsmedium erbrachte wenig ausgewogene Ergebnisse, was am ehesten auf verstärktes Wachstum im PPM+Medium zurückzuführen ist. In daraufhin mit PBS als Vergleichsmedium durchgeführten Experimenten wurden 284 Gene als differentiel reguliert detektiert mit gleichmäßiger Verteilung der hoch- und herunterregulierten Gene. Der Vergleich mit anderen Modellen zeigt, dass Neisserien ihr Transkriptionsprofil auf sich ändernde Umweltbedingungen prompt, umfassend und spezifisch ändern. Im Vergleich mit Zelladhäsionsmodellen zeigen einige Gene ein kontrastierendes Muster in ihrem Expressionsverhalten. Hochreguliert waren unter anderem Gene der Proteinsynthese und hypothetische Gene. Herunterreguliert waren Gene des Energiemetabolismus, zahlreiche für potentiell oberflächenständige Proteine und einige für Virulenzfaktoren kodierende Gene, was auf einen möglichen Evasionsmechanismus der mit Antikörpern konfrontierten Neisserien hinweisen könnte. Die Anwendbarkeit der Technik auf konkrete medizinische Fragestellungen wurde am Beispiel der Fahndung nach potentiellen Vakzinekandidaten diskutiert.

Literatur

- [Arsene u. a. 2000] ARSENE, F. ; TOMOYASU, T. ; BUKAU, B.: The heat shock response of *Escherichia coli*. In: *Int J Food Microbiol* 55(1-3) (2000), Apr 10, S. 3–9.
- [Belcher u. a. 2000] BELCHER, C. E. ; DRENKOW, J. ; KEHOE, B. ; GINGERAS, T. R. ; MCNAMARA, N. ; LEMJABBAR, H. ; BASBAUM, C. ; RELMAN, D. A.: From the cover: the transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), Dec 5, Nr. 25, S. 13847–52.
- [Bjune u. a. 1991] BJUNE, G. ; HOIBY, E.A. ; GRONNESBY, J.K. ; ARNESEN, O. ; FREDRIKSEN, J.H. ; HALSTENSEN, A. ; HOLTEN, E. ; LINDBAK, A.K. ; NOKLEBY, H. ; ROSENQVIST, E. ; ET AL.: Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. In: *Lancet* 338 (1991), Nr. 8775, S. 1093–6
- [Brandtzaeg u. a. 1989] BRANDTZAEG, P. ; KIERULF, P. ; GAUSTAD, P. ; SKULBERG, A. ; BRUUN, J. N. ; HALVORSEN, S. ; SORENSEN, E.: Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. In: *J Infect Dis* 159 (1989), Feb, Nr. 2, S. 195–204.
- [Campbell u. a. 2002] CAMPBELL, J.D. ; EDELMAN, R. ; KING, J.C. ; PAPA, T. ; RYALL, R. ; RENNELS, M.B.: Safety, reactogenicity, and immunogenicity of a tetravalent meningococcal polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine given to healthy adults. In: *J Infect Dis* 186 (2002), Nr. 12, S. 1848–51
- [Cartwright u. a. 1999] CARTWRIGHT, K. ; MORRIS, R. ; RUMKE, H. ; FOX, A. ; BORROW, R. ; BEGG, N. ; RICHMOND, P. ; POOLMAN, J.: Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane proteins. In: *Vaccine* 17 (1999), Nr. 20-21, S. 2612–9
- [Cartwright u. a. 1987] CARTWRIGHT, K.A. ; STUART, J.M. ; JONES, D.M. ; NOAH, N.D.: The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. In: *Epidemiol Infect* 99 (1987), Dec, Nr. 3, S. 591–601
- [Caugant 1998] CAUGANT, D.A.: Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. In: *APMIS* 106 (1998), May, Nr. 5, S. 505–525

- [Chen und Rost 2002] CHEN, C.P. ; ROST, B.: State-of-the-art in membrane protein prediction. In: *Appl Bioinformatics* 1 (2002), Nr. 1, S. 21–35
- [Christoph Dehio u. a. 2000] CHRISTOPH DEHIO ; SCOTT D. GRAY-OWEN ; MEYER, Thomas F.: *Host Cell Invasion by Pathogenic Neisseriae*. Bd. 33. Kap. Host Cell Invasion by Pathogenic Neisseriae, S. 89. In: OELSCHLAEGER, Hacker (Hrsg.): *Subcellular Biochemistry, Volume 33: Bacterial Invasion into Eucaryotic Cells* Bd. 33, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2000
- [Danve u. a. 1998] DANVE, B. ; LISSOLO, L. ; AL., F. G. et: Safety and immunogenicity of a *Neisseria meningitidis* group B transferrin binding protein vaccine in adults. In: (X. Nassif, 1998)
- [Danve u. a. 1993] DANVE, B. ; LISSOLO, L. ; MIGNON, M. ; DUMAS, P. ; COLOMBANI, S. ; SCHRYVERS, A. B. ; QUENTIN-MILLET, M. J.: Transferrin-binding proteins isolated from *Neisseria meningitidis* elicit protective and bactericidal antibodies in laboratory animals. In: *Vaccine* 11 (1993), Sep, Nr. 12, S. 1214–20.
- [van Deuren u. a. 2000] DEUREN, M. van ; BRANDTZAEG, P. ; MEER, J.W. van der: Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. In: *Clin Microbiol Rev* 13 (2000), Jan, Nr. 1, S. 144–66, table of contents
- [Dewhirst u. a. 1993] DEWHIRST, F.E. ; CHEN, C.K. ; PASTER, B.J. ; ZAMBON, J.J.: Phylogeny of species in the family Neisseriaceae isolated from human dental plaque and description of *Kingella oralis* sp. nov [corrected]. In: *Int J Syst Bacteriol* 43 (1993), Jul, Nr. 3, S. 490–409
- [Dietrich u. a. 2003] DIETRICH, G. ; KURZ, S. ; HUBNER, C. ; AEPINUS, C. ; THEISS, S. ; GUCKENBERGER, M. ; PANZNER, U. ; WEBER, J. ; FROSCH, M.: Transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* during infection. In: *J Bacteriol* 185 (2003), Nr. 1, S. 155–64
- [Dietrich u. a. 2000] DIETRICH, G. ; SCHAIBLE, U.E. ; DIEHL, K.D. ; MOLLENKOPF, H. ; WIEK, S. ; HESS, J. ; HAGENS, K. ; KAUFMANN, S.H. ; KNAPP, B.: Isolation of RNA from mycobacteria grown under in vitro and in vivo conditions. In: *FEMS Microbiol Lett* 186 (2000), Nr. 2, S. 177–80

- [Duggan u. a. 1999] DUGGAN, D. J. ; BITTNER, M. ; CHEN, Y. ; MELTZER, P. ; TRENT, J. M.: Expression profiling using cDNA microarrays. In: *Nat Genet* 21(1 Suppl) (1999), Jan, S. 10–4.
- [de F. P. Vries u. a. 1998] F. P. VRIES de ; COLE, R. ; DANKERT, J. ; FROSCH, M. ; J. P. PUTTEN van: Neisseria meningitidis producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. In: *Mol Microbiol* 27 (1998), Mar, Nr. 6, S. 1203–12.
- [Fijen u. a. 1994] FIJEN, C.A. ; KUIJPER, E.J. ; TJIA, H.G. ; DAHA, M.R. ; DANKERT, J.: Complement deficiency predisposes for meningitis due to nongroupable meningococci and Neisseria-related bacteria. In: *Clin Infect Dis* 18 (1994), May, Nr. 5, S. 780–704
- [Finlay und Falkow 1997] FINLAY, B.B. ; FALKOW, S.: Common themes in microbial pathogenicity revisited. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 61 (1997), Nr. 2, S. 136–69
- [Fischer u. a. 1997] FISCHER, M. ; HEDBERG, K. ; CARDOSI, P. ; PLIKAYTIS, B. D. ; HOESLY, F. C. ; STEINGART, K. R. ; BELL, T. A. ; FLEMING, D. W. ; WENGER, J. D. ; PERKINS, B. A.: Tobacco smoke as a risk factor for meningococcal disease. In: *Pediatr Infect Dis J* 16 (1997), Oct, Nr. 10, S. 979–83.
- [Fisher u. a. 2002] FISHER, M. A. ; PLIKAYTIS, B. B. ; SHINNICK, T. M.: Microarray analysis of the Mycobacterium tuberculosis transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. In: *J Bacteriol* 184 (2002), Jul, Nr. 14, S. 4025–32.
- [Forman u. a. 2003] FORMAN, S. ; LINHARTOVA, I. ; OSICKA, R. ; NASSIF, X. ; SEBO, P. ; PELICIC, V.: Neisseria meningitidis RTX proteins are not required for virulence in infant rats. In: *Infect Immun* 71 (2003), Nr. 4, S. 2253–7
- [Frosch u. a. 1989] FROSCH, M. ; WEISGERBER, C. ; MEYER, TF: Molecular characterization and expression in Escherichia coli of the gene complex encoding the polysaccharide capsule of Neisseria meningitidis group B. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989), Mar, Nr. 5, S. 1669–1673
- [Gärtner 2000] GÄRTNER, J.: in *Koletzko, Kinderheilkunde / Begr. von G.-A. von Harnack*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 2000. – 11. Auflage 2000, Kapitel 17: Erkrankungen des Nervensystems, Seite 649, 11. Auflage

- [Giardina u. a. 1998] GIARDINA, P. C. ; WEN, K. K. ; WILLIAMS, R. ; LUBAROFF, D. ; BLAKE, M. S. ; RUBENSTEIN, P. A. ; APICELLA, M. A.: *Neisseria*-encoded porins influence actin dynamics, *in vitro*. In: (X. Nassif, 1998)
- [Gold u. a. 1978] GOLD, R. ; GOLDSCHNEIDER, I. ; LEPOW, M. L. ; DRAPER, T. F. ; RANDOLPH, M.: Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. In: *J Infect Dis* 137 (1978), Feb, Nr. 2, S. 112–21.
- [Goldschneider u. a. 1969] GOLDSCHNEIDER, I. ; GOTSCHLICH, E. C. ; ARTENSTEIN, M. S.: Human immunity to the meningococcus.. Development of natural immunity. In: *J Exp Med* 129 (1969), Jun 1, Nr. 6, S. 1327–48.
- [Gotschlich u. a. 1969] GOTSCHLICH, E. C. ; LIU, T. Y. ; ARTENSTEIN, M. S.: Human immunity to the meningococcus. 3. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. In: *J Exp Med* 129 (1969), Jun 1, Nr. 6, S. 1349–65.
- [Gray-Owen und Schryvers 1996] GRAY-OWEN, SD ; SCHRYVERS, AB: Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. In: *Trends Microbiol* 4 (1996), May, Nr. 5, S. 185–91
- [Grifantini u. a. 2002] GRIFANTINI, R. ; BARTOLINI, E. ; MUZZI, A. ; DRAGHI, M. ; FRIGIMELICA, E. ; BERGER, J. ; RATTI, G. ; PETRACCA, R. ; GALLI, G. ; AGNUSDEI, M. ; GIULIANI, M.M. ; SANTINI, L. ; BRUNELLI, B. ; TETTELIN, H. ; RAPPUOLI, R. ; RANDAZZO, F. ; GRANDI, G.: Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays. In: *Nat Biotechnol* 20 (2002), Nr. 9, S. 914–21
- [Grifantini u. a. 2003] GRIFANTINI, R. ; SEBASTIAN, S. ; FRIGIMELICA, E. ; DRAGHI, M. ; BARTOLINI, E. ; MUZZI, A. ; RAPPUOLI, R. ; GRANDI, G. ; GENCO, C.A.: Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Nr. 16, S. 9542–7
- [Guckenberger 2004] GUCKENBERGER, Matthias: Analyse des Hitzeschocks bei *Neisseria meningitidis* mit DNA Microarrays. In: *Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der medizinischen Fakultät der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg* (2004). – URL <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus/volltexte/2004/895/>

- [Haines u. a. 1988] HAINES, KA ; YEH, L. ; BLAKE, MS ; CRISTELLO, P. ; KORCHAK, H. ; WEISSMANN, G.: Protein I, a translocatable ion channel from *Neisseria gonorrhoeae*, selectively inhibits exocytosis from human neutrophils without inhibiting O₂-generation. In: *J Biol Chem* 263 (1988), Jan, Nr. 2, S. 945–951
- [Häse CC u. a. 2001] HÄSE CC ; FEDOROVA ND ; GALPERIN MY ; DIBROV PA: Sodium Ion Cycle in Bacterial Pathogenesis: Evidence from Cross-Genome Comparison. 65 (2001), Nr. 3, S. 353–370
- [Hauck und Meyer 1997] HAUCK, C.R. ; MEYER, T.F.: The lysosomal/phagosomal membrane protein h-lamp-1 is a target of the IgA1 protease of *Neisseria gonorrhoeae*. In: *FEBS Lett* 405 (1997), Nr. 1, S. 86–90
- [Jennings u. a. 1987] JENNINGS, H. J. ; GAMIAN, A. ; ASHTON, F. E.: -propionylated group meningococcal polysaccharide mimics a unique epitope on group *Neisseria meningitidis*. In: *J Exp Med* 165 (1987), Apr 1, Nr. 4, S. 1207–11.
- [Jennings u. a. 1986] JENNINGS, H. J. ; ROY, R. ; GAMIAN, A.: Induction of meningococcal group polysaccharide-specific IgG antibodies in mice by using an-propionylated polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. In: *J Immunol* 137 (1986), Sep 1, Nr. 5, S. 1708–13.
- [Kallstrom u. a. 1997] KALLSTROM, H. ; LISZEWSKI, M.K. ; ATKINSON, J.P. ; JONSSON, A.B.: Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. In: *Mol Microbiol* 25 (1997), Nr. 4, S. 639–47
- [Karlin S und Mrazek J 2000] KARLIN S ; MRAZEK J: Predicted Highly Expressed Genes of Diverse Prokaryotic Genomes. In: *Journal of Bacteriology* 182 (2000), Nr. 18, S. 5238–5250
- [Khun u. a. 1998] KHUN, HH ; KIRBY, SD ; LEE, BC: A *Neisseria meningitidis* fbpABC mutant is incapable of using nonheme iron for growth. In: *Infect Immun* 66 (1998), May, Nr. 5, S. 2330–2306
- [Kolb-Maurer u. a. 2001] KOLB-MAURER, A. ; UNKMEIR, A. ; KAMMERER, U. ; HUBNER, C. ; LEIMBACH, T. ; STADE, A. ; KAMPGEN, E. ; FROSCH, M. ; DIETRICH, G.: Interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. In: *Infect Immun* 69 (2001), Nov, Nr. 11, S. 6912–6922

- [Kurz u. a. 2003] KURZ, S. ; HUBNER, C. ; AEPINUS, C. ; THEISS, S. ; GUCKENBERGER, M. ; PANZNER, U. ; WEBER, J. ; FROSCH, M. ; DIETRICH, G.: Transcriptome-based antigen identification for *Neisseria meningitidis*. In: *Vaccine* 21 (2003), Nr. 7-8, S. 768–75
- [Lewis u. a. 1997] LEWIS, LA ; GRAY, E. ; WANG, YP ; ROE, BA ; DYER, DW: Molecular characterization of hpuAB, the haemoglobin-haptoglobin-utilization operon of *Neisseria meningitidis*. In: *Mol Microbiol* 23 (1997), Feb, Nr. 4, S. 737–749
- [Lipshutz u. a. 1999] LIPSHUTZ, R. J. ; FODOR, S. P. ; GINGERAS, T. R. ; LOCKHART, D. J.: High density synthetic oligonucleotide arrays. In: *Nat Genet* 21(1 Suppl) (1999), Jan, S. 20–4.
- [Lockhart und Winzeler 2000] LOCKHART, D. J. ; WINZELER, E. A.: Genomics, gene expression and arrays. In: *Nature* 405 (2000), Jun 15, Nr. 6788, S. 827–36.
- [Maiden u. a. 1998] MAIDEN, M. ; BYGRAVES, J. ; FEIL, E. ; MORELLI, G. ; RUSSELL, J. ; URWIN, R. ; ZHANG, Q. ; ZHOU, J. ; ZURTH, K. ; CAUGANT, D. ; FEAVERS, I. ; ACHTMAN, M. ; SPRATT, B.: Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Nr. 6, S. 3140–5
- [Mangan JA u. a. 1999] MANGAN JA ; MONAHAN IM ; WILSON MA ; SCHNAPPINGER D ; SCHOOLNIK GK ; BUTCHER PD: The expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infecting the human monocytic cell line THP-1 using whole genome microarray analysis. In: *Nature Genetics* 23 (1999), Nr. 61
- [Martin u. a. 1997] MARTIN, D. ; CADIEUX, N. ; HAMEL, J. ; BRODEUR, B. R.: Highly conserved *Neisseria meningitidis* surface protein confers protection against experimental infection. In: *J Exp Med* 185 (1997), Apr 7, Nr. 7, S. 1173–83.
- [McNeil u. a. 1994] MCNEIL, G. ; VIRJI, M. ; MOXON, ER: Interactions of *Neisseria meningitidis* with human monocytes. In: *Microb Pathog* 16 (1994), Feb, Nr. 2, S. 153–63
- [Merz u. a. 2000] MERZ, AJ ; SO, M. ; SHEETZ, MP: Pilus retraction powers bacterial twitching motility. In: *Nature* 407 (2000), Sep, Nr. 6800, S. 98–102

- [Meyer und van Putten 1989] MEYER, T.F. ; PUTTEN, J.P. a. van: Genetic mechanisms and biological implications of phase variation in pathogenic neisseriae. In: *Clin Microbiol Rev* 2 Suppl (1989), S. S139–45
- [Moe u. a. 2001] MOE, G. R. ; ZUNO-MITCHELL, P. ; LEE, S. S. ; LUCAS, A. H. ; GRANOFF, D. M.: Functional activity of anti-Neisserial surface protein monoclonal antibodies against strains of *Neisseria meningitidis* serogroup. In: *Infect Immun* 69 (2001), Jun, Nr. 6, S. 3762–71.
- [Moore u. a. 1990] MOORE, P. S. ; HIERHOLZER, J. ; DEWITT, W. ; GOUAN, K. ; DJORE, D. ; LIPPEVELD, T. ; PLIKAYTIS, B. ; BROOME, C. V.: Respiratory viruses and mycoplasma as cofactors for epidemic group meningococcal meningitis. In: *JAMA* 264 (1990), Sep 12, Nr. 10, S. 1271–5.
- [Morita u. a. 1999] MORITA, M. ; KANEMORI, M. ; YANAGI, H. ; YURA, T.: Heat-induced synthesis of sigma32 in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of rpoH mRNA secondary structure. In: *J Bacteriol* 181 (1999), Jan, Nr. 2, S. 401–10.
- [Morley und Pollard 2001] MORLEY, S. L. ; POLLARD, A. J.: Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? In: *Vaccine* 20(5-6) (2001), Dec 12, S. 666–87.
- [Nassif u. a. 2002] NASSIF, X. ; BOURDOULOUS, S. ; EUGENE, E. ; COURAUD, P. O.: How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier? In: *Trends Microbiol* 10 (2002), May, Nr. 5, S. 227–32.
- [Osicka u. a. 2001] OSICKA, R. ; KALMUSOVA, J. ; KRIZOVA, P. ; SEBO, P.: *Neisseria meningitidis* RTX protein FrpC induces high levels of serum antibodies during invasive disease: polymorphism of frpC alleles and purification of recombinant FrpC. In: *Infect Immun* 69 (2001), Nr. 9, S. 5509–19
- [Parkhill u. a. 2000] PARKHILL, J. ; ACHTMAN, M. ; JAMES, K. D. ; BENTLEY, S. D. ; CHURCHER, C. ; KLEE, S. R. ; MORELLI, G. ; BASHAM, D. ; BROWN, D. ; CHILLINGWORTH, T. ; DAVIES, R. M. ; DAVIS, P. ; DEVLIN, K. ; FELTWELL, T. ; HAMLIN, N. ; HOLROYD, S. ; JAGELS, K. ; LEATHER, S. ; MOULE, S. ; MUNGALL, K. ; QUAIL, M. A. ; RAJANDREAM, M. A. ; RUTHERFORD, K. M. ; SIMMONDS, M. ; SKELTON, J. ; WHITEHEAD, S. ; SPRATT, B. G. ; BARRELL, B. G.: Complete sequence of a serogroup strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. In: *Nature* 404 (2000), Mar 30, Nr. 6777, S. 502–6.

- [Pettersson u. a. 1998] PETTERSSON, A. ; PRINZ, T. ; UMAR, A. ; BIEZEN, J. van der ; TOMMASSEN, J.: Molecular characterization of LbpB, the second lactoferrin-binding protein of *Neisseria meningitidis*. In: *Mol Microbiol* 27 (1998), Feb, Nr. 3, S. 599–610
- [Pizza u. a. 2000] PIZZA, M. ; SCARLATO, V. ; MASIGNANI, V. ; GIULIANI, M. M. ; ARICO, B. ; COMANDUCCI, M. ; JENNINGS, G. T. ; BALDI, L. ; BARTOLINI, E. ; CAPECCHI, B. ; GALEOTTI, C. L. ; LUZZI, E. ; MANETTI, R. ; MARCHETTI, E. ; MORA, M. ; NUTI, S. ; RATTI, G. ; SANTINI, L. ; SAVINO, S. ; SCARSELLI, M. ; STORNI, E. ; ZUO, P. ; BROEKER, M. ; HUNDT, E. ; KNAPP, B. ; BLAIR, E. ; MASON, T. ; TETTELIN, H. ; HOOD, D. W. ; JEFFRIES, A. C. ; SAUNDERS, N. J. ; GRANOFF, D. M. ; VENTER, J. C. ; MOXON, E. R. ; GRANDI, G. ; RAPPUOLI, R.: Identification of vaccine candidates against serogroup meningococcus by whole-genome sequencing. In: *Science* 287 (2000), Mar 10, Nr. 5459, S. 1816–20.
- [Plested u. a. 1999] PLESTED, J. S. ; MAKEPEACE, K. ; JENNINGS, M. P. ; GIDNEY, M. A. ; LACELLE, S. ; BRISSON, J. ; COX, A. D. ; MARTIN, A. ; BIRD, A. G. ; TANG, C. M. ; MACKINNON, F. M. ; RICHARDS, J. C. ; MOXON, E. R.: Conservation and accessibility of an inner core lipopolysaccharide epitope of *Neisseria meningitidis*. In: *Infect Immun* 67 (1999), Oct, Nr. 10, S. 5417–26.
- [Pollard und Frasch 2001] POLLARD, A. J. ; FRASCH, C.: Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. In: *Vaccine* 19(11-12) (2001), Jan 8, S. 1327–46.
- [Pollard u. a. 1999] POLLARD, A. J. ; GALASSINI, R. ; E. M. VOORT van der ; BOOY, R. ; LANGFORD, P. ; NADEL, S. ; ISON, C. ; KROLL, J. S. ; POOLMAN, J. ; LEVIN, M.: Humoral immune responses to *Neisseria meningitidis* in children. In: *Infect Immun* 67 (1999), May, Nr. 5, S. 2441–51.
- [Pron u. a. 1997] PRON, B. ; TAHA, M. K. ; RAMBAUD, C. ; FOURNET, J. C. ; PATTEY, N. ; MONNET, J. P. ; MUSILEK, M. ; BERETTI, J. L. ; NASSIF, X.: Interaction of *Neisseria meningitidis* with the components of the blood-brain barrier correlates with an increased expression of PilC. In: *J Infect Dis* 176 (1997), Nov, Nr. 5, S. 1285–92.
- [Racoosin u. a. 1998] RACOOSIN, J.A. ; WHITNEY, C.G. ; CONOVER, C.S. ; DIAZ, P.S.: Serogroup Y meningococcal disease in Chicago, 1991-1997. In: *JAMA* 280 (1998), Dec, Nr. 24, S. 2094–2008
- [Reingold u. a. 1985] REINGOLD, A. L. ; BROOME, C. V. ; HIGHTOWER, A. W. ; AJELLO, G. W. ; BOLAN, G. A. ; ADAMSBAUM, C. ; JONES, E. E. ; PHILLIPS, C. ;

- TIENDREBEOGO, H. ; YADA, A.: Age-specific differences in duration of clinical protection after vaccination with meningococcal polysaccharide vaccine. In: *Lancet* 2 (1985), Jul 20, Nr. 8447, S. 114–8.
- [Richmond u. a. 1999] RICHMOND, C. S. ; GLASNER, J. D. ; MAU, R. ; JIN, H. ; BLATTNER, F. R.: Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli*-12. In: *Nucleic Acids Res* 27 (1999), Oct 1, Nr. 19, S. 3821–35.
- [Rohde und Dyer 2004] ROHDE, K.H. ; DYER, D.W.: Analysis of haptoglobin and hemoglobin-haptoglobin interactions with the *Neisseria meningitidis* TonB-dependent receptor HpuAB by flow cytometry. In: *Infect Immun* 72 (2004), Nr. 5, S. 2494–506
- [Rosenstein u. a. 2001] ROSENSTEIN, N. E. ; PERKINS, B. A. ; STEPHENS, D. S. ; POPOVIC, T. ; HUGHES, J. M.: Meningococcal disease. In: *N Engl J Med* 344 (2001), May 3, Nr. 18, S. 1378–88.
- [Salyers und Whitt 2002] SALYERS, Abigail A. ; WHITT, Dixie D.: *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. S. 73–75, ASM Press, Washington, 2002
- [Sandkvist 2001] SANDKVIST, M.: Biology of type II secretion. In: *Mol Microbiol* 40 (2001), Apr, Nr. 2, S. 271–283
- [Saunders u. a. 2000] SAUNDERS, N. J. ; JEFFRIES, A. C. ; PEDEN, J. F. ; HOOD, D. W. ; TETTELIN, H. ; RAPPUOLI, R. ; MOXON, E. R.: Repeat-associated phase variable genes in the complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* strain MC58. In: *Mol Microbiol* 37 (2000), Jul, Nr. 1, S. 207–15.
- [Schena u. a. 1995] SCHENA, M. ; SHALON, D. ; DAVIS, R. W. ; BROWN, P. O.: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary microarray. In: *Science* 270 (1995), Oct 20, Nr. 5235, S. 467–70.
- [Schoolnik 2002] SCHOOLNIK, G. K.: Functional and comparative genomics of pathogenic bacteria. In: *Curr Opin Microbiol* 5 (2002), Feb, Nr. 1, S. 20–6.
- [Schryvers und Morris 1988] SCHRYVERS, A.B. ; MORRIS, L.J.: Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from *Neisseria meningitidis*. In: *Infect Immun* 56 (1988), May, Nr. 5, S. 1144–1109

- [Shin u. a. 2001] SHIN, J. S. ; LIN, J. S. ; ANDERSON, P. W. ; INSEL, R. A. ; NAHM, M. H.: Monoclonal antibodies specific for *Neisseria meningitidis* group polysaccharide and their peptide mimotopes. In: *Infect Immun* 69 (2001), May, Nr. 5, S. 3335–42.
- [Sierra u. a. 1991] SIERRA, G.V. ; CAMPA, H.C. ; VARCACEL, N.M. ; GARCIA, I.L. ; IZQUIERDO, P.L. ; SOTOLONGO, P.F. ; CASANUEVA, G.V. ; RICO, C.O. ; RODRIGUEZ, C.R. ; TERRY, M.H.: Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. In: *NIPH Ann* 14 (1991), Nr. 2, S. 195–207; discussion 208–10
- [Southern u. a. 1999] SOUTHERN, E. ; MIR, K. ; SHCHEPINOV, M.: Molecular interactions on microarrays. In: *Nat Genet* 21(1 Suppl) (1999), Jan, S. 5–9.
- [Stojiljkovic u. a. 1996] STOJILJKOVIC, I. ; LARSON, J. ; HWA, V. ; ANIC, S. ; SO, M.: HmbR outer membrane receptors of pathogenic *Neisseria* spp.: In: *J Bacteriol* 178 (1996), Aug, Nr. 15, S. 4670–4608
- [Stojiljkovic und Srinivasan 1997] STOJILJKOVIC, I. ; SRINIVASAN, N.: *Neisseria meningitidis* tonB, exbB, and exbD genes: Ton-dependent utilization of protein-bound iron in *Neisseriae*. In: *J Bacteriol* 179 (1997), Feb, Nr. 3, S. 805–812
- [Sun u. a. 2000] SUN, Y. H. ; BAKSHI, S. ; CHALMERS, R. ; TANG, C. M.: Functional genomics of *Neisseria meningitidis* pathogenesis. In: *Nat Med* 6 (2000), Nov, Nr. 11, S. 1269–73.
- [Swartley u. a. 1997] SWARTLEY, J.S. ; MARFIN, A.A. ; EDUPUGANTI, S. ; LIU, L.J. ; CIESLAK, P. ; PERKINS, B. ; WENGER, J.D. ; STEPHENS, D.S.: Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Jan, Nr. 1, S. 271–206
- [Tang u. a. 1999] TANG, C. ; MOXON, R. ; LEVINE, M. M.: For discussion: live attenuated vaccines for group meningococcus. In: *Vaccine* 17 (1999), Jan, Nr. 2, S. 114–7.
- [Tappero u. a. 1999] TAPPERO, J.W. ; LAGOS, R. ; BALLESTEROS, A.M. ; PLIKAYTIS, B. ; WILLIAMS, D. ; DYKES, J. ; GHEESLING, L.L. ; CARLONE, G.M. ; HOIBY, E.A. ; HOLST, J. ; NOKLEBY, H. ; ROSENQVIST, E. ; SIERRA, G. ; CAMPA, C. ; SOTOLONGO, F. ; VEGA, J. ; GARCIA, J. ; HERRERA, P. ; POOLMAN, J.T. ; PERKINS, B.A.: Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. In: *JAMA* 281 (1999), Nr. 16, S. 1520–7

- [Tettelin u. a. 2000] TETTELIN, H. ; SAUNDERS, N. J. ; HEIDELBERG, J. ; JEFFRIES, A. C. ; NELSON, K. E. ; EISEN, J. A. ; KETCHUM, K. A. ; HOOD, D. W. ; PEDEN, J. F. ; DODSON, R. J. ; NELSON, W. C. ; GWINN, M. L. ; DEBOY, R. ; PETERSON, J. D. ; HICKEY, E. K. ; HAFT, D. H. ; SALZBERG, S. L. ; WHITE, O. ; FLEISCHMANN, R. D. ; DOUGHERTY, B. A. ; MASON, T. ; CIECKO, A. ; PARKSEY, D. S. ; BLAIR, E. ; CITTONE, H. ; CLARK, E. B. ; COTTON, M. D. ; UTTERBACK, T. R. ; KHOURI, H. ; QIN, H. ; VAMATHEVAN, J. ; GILL, J. ; SCARLATO, V. ; MASIGNANI, V. ; PIZZA, M. ; GRANDI, G. ; SUN, L. ; SMITH, H. O. ; FRASER, C. M. ; MOXON, E. R. ; RAPPUOLI, R. ; VENTER, J. C.: Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup strain MC58. In: *Science* 287 (2000), Mar 10, Nr. 5459, S. 1809–15.
- [Ulmer u. a. 1992] ULMER, JB ; BURKE, CJ ; SHI, C. ; FRIEDMAN, A. ; DONNELLY, JJ ; LIU, MA: Pore formation and mitogenicity in blood cells by the class 2 protein of *Neisseria meningitidis*. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Sep, Nr. 27, S. 19266–19271
- [Unkmeir u. a. 2002] UNKMEIR, A. ; LATSCH, K. ; DIETRICH, G. ; WINTERMEYER, E. ; SCHINKE, B. ; SCHWENDER, S. ; KIM, K.S. ; EIGENTHALER, M. ; FROSCH, M.: Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. In: *Mol Microbiol* 46 (2002), Nr. 4, S. 933–46
- [Verdu u. a. 2001] VERDU, ME ; COLL, P. ; VAZQUEZ, JA ; MARCH, F. ; FONTANALS, D. ; BERRON, S. ; PONS, I. ; ESSO, D. V. ; PRATS, G.: Association between asymptomatic carriage and sporadic (endemic) meningococcal disease in an open community. In: *Epidemiol Infect* 127 (2001), Oct, Nr. 2, S. 245–259
- [Virji u. a. 1994] VIRJI, M. ; MAKEPEACE, K. ; MOXON, ER: Distinct mechanisms of interactions of Opc-expressing meningococci at apical and basolateral surfaces of human endothelial cells; the role of integrins in apical interactions. In: *Mol Microbiol* 14 (1994), Oct, Nr. 1, S. 173–84
- [Vogel und Frosch 1999] VOGEL, U. ; FROSCH, M.: Mechanisms of neisserial serum resistance. In: *Mol Microbiol* 32 (1999), Jun, Nr. 6, S. 1133–1109
- [Weisgerber u. a. 1990] WEISGERBER, C. ; HUSMANN, M. ; FROSCH, M. ; RHEINHEIMER, C. ; PEUCKERT, W. ; GORGEN, I. ; BITTER-SUERMAN, D.: Embryonic neural cell adhesion molecule in cerebrospinal fluid of younger children: age-dependent decrease during the first year. In: *J Neurochem* 55 (1990), Nr. 6, S. 2063–71

- [Wells u. a. 2001] WELLS, D. B. ; TIGHE, P. J. ; WOOLDRIDGE, K. G. ; ROBINSON, K. ; ALDEEN, Ala' D. A.: Differential gene expression during meningeal-meningococcal interaction: evidence for self-defense and early release of cytokines and chemokines. In: *Infect Immun* 69 (2001), Apr, Nr. 4, S. 2718–22.
- [West u. a. 2001] WEST, D. ; REDDIN, K. ; MATHESON, M. ; HEATH, R. ; FUNNELL, S. ; HUDSON, M. ; ROBINSON, A. ; GORRINGE, A.: Recombinant *Neisseria meningitidis* transferrin binding protein protects against experimental meningococcal infection. In: *Infect Immun* 69 (2001), Mar, Nr. 3, S. 1561–7.
- [Wilson u. a. 1999] WILSON, M. ; DERISI, J. ; KRISTENSEN, H. H. ; IMBODEN, P. ; RANE, S. ; BROWN, P. O. ; SCHOOLNIK, G. K.: Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Oct 26, Nr. 22, S. 12833–8.
- [X. Nassif 1998] X. NASSIF, M. K. T. (Hrsg.): *Proceedings of the Eleventh International Pathogenic Neisseria Conference*. Paris, 1998

Die Arbeit wurde mit L^AT_EX₂^ε geschrieben. Als Referenzen wurden die Bücher *Der L^AT_EX₂^εWegweiser* von Susanne Detig und *Der L^AT_EX₂^εBegleiter* von Michael Goosens und Frank Mittelbach verwendet.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Matthias Frosch für die Überlassung des Themas und seine nachhaltige Unterstützung der Arbeit bedanken.

Ein besonderes Dankeschön an Dr. Guido Dietrich, der mit großem Engagement und persönlichem Einsatz in seiner Betreuung entscheidend für das Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Herzlich gedankt seien Ursula Panzner und Anja Glück für ihren unermüdlichen Einsatz und für die Herstellung der besten *Slides*,
meinem Vorgänger Matthias Guckenberger für die Einarbeitung und Übergabe des Systems,

Dr. Christian Aepinus und Stephanie Theiss für die weitere Betreuung,

Dr. Alexandra Unkmeir, Claudia Hübner, meinen Kommilitoninnen Anne Stade und Sabine Haller für die gegenseitige Unterstützung und Motivation
sowie allen weiteren Mitstreitern der *Neisseria meningitidis*-Forschungsgruppe des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg.

Lebenslauf

Sebastian Gerhard Kurz

Geboren am 13.10.76 in Freigurg im Breisgau
Eltern: Annelie Dorothea Kurz, Logopädin
Günter Christian Kurz, Lehrer für Pflegeberufe

Schulbildung

1983-1987 Grundschule: Wilhelm-August-Lay-Schule, Bötzingen
1987-1996 Gymnasium: Martin-Schongauer-Gymnasium, Breisach

Hochschulbildung

1997-1999 Studium der Medizin an der Philipps Universität Marburg
1998-2004 Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
Sept.1999 Physikum
1999-2004 Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
Aug.2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Sept.2000 Promotionsarbeit am Institut für Hygiene und
- Dec.2001 Mikrobiologie der Universität Würzburg
März 2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003-2004 Praktisches Jahr mit Wahlfach Kinderheilkunde an den Klini-
ken der Universitäten Newcastle und Edinburgh (UK), Würz-
burg, Chicago (Pritzker; USA), sowie Missionsärztliche Kli-
nik, Würzburg
Mai 2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

jetzige Tätigkeit

seit Aug. 2004 PRHO Gloucestershire Royal Hospital, Gloucester (UK)

Würzburg, Januar 2005



