

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

**Die Bedeutung des Zwei-Partner-
Sekretionssystems für die Adhärenz von
Meningokokken an Epithelzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Marion Abele
aus Würzburg

Würzburg, November 2009

Referent: Prof. Dr. med. Oliver Kurzai
Korreferent: Prof. Dr. med. Jens Waschke
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Februar 2010

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. EINFÜHRUNG	1
1.1 Epidemiologie von <i>Neisseria meningitidis</i>	1
1.2 Pathogenese von <i>Neisseria meningitidis</i>	2
1.3 <i>N. meningitidis</i> - Übertragung und Erkrankung	2
1.4 Klassifizierung und Einteilung von <i>N. meningitidis</i>	3
1.5 Virulenzfaktoren der Meningokokken	5
1.5.1 Die Polysaccharidkapsel.....	5
1.5.2 Zellwand von <i>N. meningitidis</i>	6
1.5.3 Das Lipopolysaccharid (LPS).....	7
1.6 Das Zwei-Partner-Sekretions System am Beispiel von <i>B. pertussis</i>	9
1.6.1 <i>Bordetella pertussis</i>	9
1.6.2 Struktur und Funktion des FHA.....	9
1.6.3 Das TPS System.....	10
1.6.4 TPS und FHA-homologe Gene in Meningokokken.....	11
1.6.5 Verteilung des TPS-Systems in Meningokokkenstämmen einer Trägerstudie.....	13
1.7 Hypothesen und Ziele der Arbeit	13
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Geräte	15
2.2 Bezugsfirmen	16
2.3 Verbrauchsmaterialien	16
2.4 Kits	17
2.5 Gebrauchslösungen	17
2.6 Sterilisationsverfahren	18
2.7 Bakterienstämme	19
2.7.1 <i>N. meningitidis</i>	19
2.7.2 Gentechnisch modifizierte Stämme.....	19
2.7.3 <i>E. coli</i>	20
2.8 Kulturbedingungen für Bakterien	20
2.8.1 Nährmedien.....	20
2.8.2 Antibiotika.....	21
2.9 Präparation chromosomaler DNA aus Bakterien	21
2.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	21
2.10.1 Plasmidisolierungskits.....	21
2.10.2 Schnellpräparation ohne Kit.....	22
2.11 RNA Isolierung aus Bakterien	23
2.12 DNA-Verdau mit DNase	23
2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.14 Aufreinigung von PCR-Produkten	25
2.15 RT-PCR	25

2.16 Horizontale DNA Gelelektrophorese im Agarosegel	26
2.17 DNA Extraktion aus einem Elektrophoresegel	27
2.18 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen	27
2.19 DNA-/ RNA-Quantifizierung	28
2.20 Hybridisierung von membrangekoppelter DNA	28
2.20.1 „Random primed“ DNA-labeling mit Digoxigenin-dNTP	29
2.20.2 Hybridisierung von DNA	29
2.20.3 Nachweis mit CSPD	29
2.20.4 Nylonmembran stripfen	30
2.21 Dot- Blot	30
2.22 Klonierung in E. coli	31
2.22.1 Enzyme	31
2.22.2 Ligation	31
2.22.3 Transformation	32
2.23 Plasmidkonstruktion	32
2.24 Sequenzierung	33
2.25 Proteininduktion	33
2.25.1 Induktion	33
2.25.2 Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA-Resin	34
2.25.3 Reinigung der Ni ²⁺ Beads	36
2.25.4 HisTag-Blot	36
2.26 Western Blot	37
2.27 Coomassie-Gel	39
2.28 Kultur von FaDu-Zellen	39
2.28.1 Kulturmedien für FaDu-Zellen	39
2.28.2 Kulturbedingungen FaDu-Zellen	40
2.28.3 Splitten der Zellen	40
2.29 Infektionsversuch mit FaDu-Zellen	41
2.29.1 Prinzip des Infektionsversuches	41
2.29.2. Durchführung	42
2.29.3. Auswertung	43
2.30 Software und Internetressourcen	44
2.30.1 Software	44
2.30.2 Internetressourcen	44
3. ERGEBNISSE	45
3.1 Verteilung ausgewählter hrpB Gene in den Meningokokkenstämmen einer Trägerstudie	45
3.1.1 Nachweis eines TPS Systems in Meningokokkenstämmen verschiedener klonaler Komplexe	46
3.1.2 PCR Ergebnisse zur Verteilung von NMC0443	50
3.1.3 Korrelation zwischen der Anwesenheit des putativen Transportgens NMB1762 (<i>hrpB</i>) und dem <i>hrpA</i> NMB1768	51
3.1.4 PCR Ergebnisse des NMB1762 – NMB1768 Vergleichs	53
3.2 Expressionsanalyse der hrpBs in verschiedenen klonalen Komplexen	54
3.3 Infektionsversuche mit FaDu-Zellen	57
3.3.1 <i>hrpA</i> Deletionsmutanten	57

3.3.2 <i>hrpB</i> Deletionsmutanten	58
3.4 <i>HrpB</i> Expression in <i>E.coli</i> und Aufreinigung über Ni^{2+} Beads	59
4. DISKUSSION	61
4.1 Das TPS Transportsystem in Gram-negativen Bakterien	61
4.2 Das TPS System im Genus <i>Neisseria</i>	62
4.2.1 Verteilung des TPS Systems in verschiedenen <i>Neisseria</i> Spezies	62
4.2.2 Das TPS System bei <i>N. meningitidis</i>	62
4.3 Funktion der <i>HrpA</i> und <i>HrpB</i> Proteine	65
4.3.1 Bedeutung von TpsA Proteinen in Gram-negativen Bakterien	65
4.3.2 Bedeutung von TpsB Proteinen in Gram-negativen Bakterien	67
4.3.3 Interaktion von TpsA und TpsB Proteinen in Gram-negativen Bakterien	68
4.4 Experimentelle Ansätze zum TPS-System der Meningokokken....	69
ZUSAMMENFASSUNG	70
LITERATURVERZEICHNIS.....	72
ANHANG.....	79
A.1 Verwendete Primer.....	79
A.2 Dot Blot Hybridisierungen und PCR Ergebnisse von NMB1768/NMB1762.....	79
A.3 Dot Blot Hybridisierungen mit Sonden spezifisch für NMB1762 bzw. NMC04443	80
A.4 Dot Blot Hybridisierungen und PCR Ergebnisse für NMC0443/NMC0444	82
PUBLIKATIONSLISTE
DANKSAGUNG
LEBENS LAUF

1. Einführung

1.1 Epidemiologie von *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis (Meningokokken) sind gramnegative, aerobe Diplokokken der Gattung *Neisseria*, die mindestens 20 bekannte Spezies umfasst [3]. Sie werden in 12 Serogruppen unterteilt, von denen weltweit die Serogruppen A, B und C für den Großteil der Erkrankungen verantwortlich sind. In Deutschland werden bei invasiven Infektionen seit Jahren fast ausschließlich die Serogruppen B (etwa zwei Drittel aller Fälle) und C (etwa ein Viertel aller Fälle) registriert. In Asien und Afrika dominieren die Serogruppen A und C, im afrikanischen „Meningitisgürtel“ vornehmlich Meningokokken der Serogruppe A [4]. *N. meningitidis* gehört damit zu den weltweit führenden Ursachen für Meningitis und Sepsis bei ansonsten gesunden Individuen. Im Jahre 2006 lag die Inzidenz der invasiven Meningokokken-Erkrankungen im gesamten Bundesgebiet bei 0,67 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner [5]. Am häufigsten betroffen von invasiven Meningokokkenerkrankungen sind Säuglinge und Kleinkinder, da deren Immunsystem noch keine protektiven Antikörper entwickeln hat [4]. Gleichzeitig weisen Kleinkinder die geringsten, Jugendliche und junge Erwachsenen dagegen die höchsten Trägerraten auf [3]. Der Trägerstatus gilt als immunisierender Prozess, infolge dessen es zur Bildung protektiver Antikörper kommt. Daneben bilden die gesunden Träger das einzige bisher bekannte Reservoir für *N. meningitidis*.

Die deutliche Diskrepanz zwischen den relativ hohen Kolonisierungsraten mit etwa 10 % der Europäer und den relativ geringen Inzidenzen der Meningokokkenerkrankung zeigt, dass es sich bei Meningokokken um Kommensale handelt, die nur in wenigen Fällen zum Krankheitsausbruch führen [3].

Neben Meningokokken gelten nur die Gonokokken als humanpathogene Neisserien. Zu den apathogenen Neisserien zählen z.B. *N. lactamica* und *N. cinerea*, die enge Verwandtschaft zu den Pathogenen *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* aufweisen [3].

1.2 Pathogenese von *Neisseria meningitidis*

Warum Meningokokken bei manchen Menschen diese schweren Verläufe hervorrufen, bei den meisten jedoch asymptomatisch den Nasenrachenraum kolonisieren ist noch nicht endgültig geklärt. Wichtige Mechanismen in diesem Zusammenhang scheinen Unterschiede in der Epithelzelladhärenz und – invasion, in der Zerstörung von Endothelzellen und in der inflammatorischen Reaktion des menschlichen Immunsystems zu sein. Des Weiteren prädisponieren Defekte der Antikörperbildung bzw. des Komplementsystems, Schädigungen der Schleimhäute sowie Allgemeinerkrankungen, die zur Immunsuppression führen (z.B. CLL, Myelom, Z.n. Splenektomie) zum Ausbruch der Erkrankung. Eintritt in die Blutbahn erhalten die Meningokokken wesentlich häufiger als dies klinisch relevant wird, da dies in aller Regel nur kurze Zeit (transient) stattfindet. Gelingt es den Bakterien in einem solchen Fall sich dem humoralen Immunsystem und der Phagozytose zu entziehen, kommt es zur entscheidenden Vermehrung innerhalb der Blutbahn. Diese Vermehrung der Meningokokken korreliert mit der systemischen Freisetzung von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- α , einer Schlüsselreaktion in der Pathogenese der Erkrankung (Übersicht in: [1]).

1.3 *N. meningitidis* - Übertragung und Erkrankung

Die Übertragung der Meningokokken, deren einziger Wirt der Mensch ist, erfolgt durch Inhalation von Aerosolen oder direkten Kontakt mit Sekreten des Nasopharyngealtraktes [1].

Das Krankheitsspektrum erstreckt sich von vorübergehenden asymptomatischen Bakteriämien bis hin zu foudroyanten septischen Verläufen, die innerhalb weniger Stunden zum Tode führen können. Generell ist der klinische Verlauf einer Meningokokken-Sepsis schwerer als der einer isolierten Meningokokken-Meningitis. Die Meningokokken-Sepsis imponiert durch Symptome wie abrupt einsetzendes Fieber, petechiale Blutungen, die bis zur Purpura fulminans fortschreiten können, rasch beginnende Hypotension mit

akuten suprarenalen Hämorrhagien (Waterhouse-Friderichsen-Syndrom) und Multiorganversagen.

Seit Juli 2006 empfiehlt die Ständige Impfkommission (STIKO) am RKI eine Impfung mit einem konjugierten Meningokokken-C-Impfstoff für alle Kinder ab einem Alter von 12 Monaten. In Deutschland stehen weiterhin Polysaccharid-Impfstoffe für die Impfung gegen Meningokokken der Serogruppen A/C oder A/C/W135/Y zur Verfügung, die jedoch bei Personen unter einem Alter von 2 Jahren nur eingeschränkt wirksam sind. Gegen die bei uns vorherrschende Serogruppe B existiert dagegen bisher noch kein zugelassener Impfstoff [4].

1.4 Klassifizierung und Einteilung von *N. meningitidis*

Die klassische Einteilung der Meningokokken erfolgt anhand der folgenden vier Oberflächenantigene: die Polysaccharidkapsel stellt die Basis der Serogruppeneinteilung dar, die Unterteilung in Serotypen beruht auf Klasse 2 und 3 OMPs (outer membrane proteins, PorB), die der Serosubtypen auf Klasse 1 OMPs (PorA). Die Bestimmung des Immunotyps erfolgt durch die Analyse der Lipooligosaccharid-Epitope, sodass ein serologisch klassifizierter Stamm letztendlich in der Reihenfolge Serogruppe, Serotyp, Serosubtyp und Immunotyp bezeichnet wird [4, 6]. Da bei invasiven Meningokokkenerkrankung nur einige wenige Serogruppen vorkommen [3, 7], erlaubt die Einteilung in Serogruppen keine genaue Diskriminierung für epidemiologische Studien. Hinzu kommt, dass sich nicht alle Stämme aufgrund ihrer hohen genetischen Diversität und Phasenvariabilität in Serotypen und Serosubtypen einteilen lassen. Nicht zuletzt spielt auch der hohe Selektionsdruck auf die Oberflächenantigene als Ursache der hohen Transformationsrate eine wichtige Rolle [8, 9]. Somit kann eine Beurteilung der klonalen genetische Struktur bzw. der genetischen Verwandtschaft für Langzeitepidemiologien der Meningokokkenpopulation durch Serogruppen, Serotypen und Serosubtypen nur bedingt erfolgen [10].

Weitaus genauer lassen sich Meningokokken in Epidemiologie und Dynamik durch die Methoden der Multilocus-Enzym-Elektrophorese-Typisierung (MLEE)

und der Multi-Locus-Sequenztypisierung (MLST) diskriminieren [11]. Die MLEE analysiert Enzymvarianten wichtiger Stoffwechsellzyme durch Beurteilung ihrer elektrophoretischen Mobilität und erfasst damit mehrere unabhängige genetische Loci, sodass auch eng verwandte Stämme differenziert werden können [10]. Ein großer Nachteil dieser Methode liegt jedoch in der unzureichenden Vergleichbarkeit der Ergebnisse, sobald diese aus unterschiedlichen Laboren kommen. Die MLST ermöglicht durch Sequenzierung von 430 – 501bp langen Nukleotid-Sequenzen die Detektion von sieben sogenannten housekeeping-Genen [11]. Dabei handelt es sich um Gene, die für essentielle Enzyme der Meningokokken kodieren und somit keinem erhöhten Selektionsdruck unterliegen [12]. Neben der Möglichkeit, die Analyse direkt (ohne Bakterienisolierung) aus dem Blut oder Liquor des Patienten durchzuführen, besteht der große Vorteil der MLST in der guten Vergleichbarkeit ihrer Ergebnisse wodurch der Aufbau einer weltweiten Datenbank möglich wurde. Auf diese Weise können epidemiologische Studien über große Zeiträume und unter Einbeziehung mehrerer Labore durchgeführt werden [11].

Stämme mit der gleichen Allelkombination der untersuchten Gene werden in einem Sequenztyp zusammengefasst [11]; Sequenztypen wiederum, die in vier oder mehr Allelen mit einem bestimmten zentralen Sequenztyp übereinstimmen, werden als ein klonaler Komplex bezeichnet, der dann nach dem zentralen Sequenztyp benannt wird [7].

Die Analyse multipler Loci des Genoms von *N. meningitidis* hat auch deshalb solch große Bedeutung, weil Meningokokken hohe Rekombinationsraten und damit eine nicht-klonale Populationsstruktur aufweisen [12, 13]. Außerdem zeigen Isolate der Trägerpopulation ausgeprägte genetische Unterschiede [14, 15], während die meisten Krankheits-assoziierten Stämme einigen wenigen hypervirulenten Linien angehören, die sich innerhalb ihrer housekeeping-Gene kaum unterscheiden [11, 16]. Genetische Analysen von *N. meningitidis* mittels Multi-Locus-Sequenztypisierung (MLST) konnten zeigen, dass in der Regel nur diese als hypervirulente Linien bezeichneten Genotypen für die meisten Erkrankungsfälle verantwortlich sind [11] und damit in den Krankheitsisolaten im

Vergleich zur Trägerprävalenz stark überrepräsentiert sind [10, 16]. Gleichzeitig werden Stämme der hypervirulenten Komplexe nur sehr selten aus gesunden Trägern isoliert [14, 15]. Bis heute bleibt die Frage, welche genetischen Strukturen genau für die unterschiedliche Krankheits-verursachende Potenz der hypervirulenten Linien gegenüber den Trägerisolaten verantwortlich sind, unbeantwortet.

1.5 Virulenzfaktoren der Meningokokken

1.5.1 Die Polysaccharidkapsel

Die Polysaccharidkapsel erfüllt bei *N. meningitidis* eine ganze Reihe von Funktionen. Zum einen verhindert sie die Austrocknung der Bakterien während der Transmission [17]; darüber hinaus schützt sie die Meningokokken vor der Phagozytose durch menschliche Abwehrzellen [18]. Auch für die Serumresistenz der Bakterien benötigen diese die Expression ihrer Kapsel [19]. Damit gilt die Polysaccharidkapsel der Meningokokken als deren Hauptvirulenzfaktor [19-21].

Auf der Grundlage der chemischen Zusammensetzung und immunologischer Eigenschaften der Polysaccharidkapsel werden heute 12 verschiedene Serogruppen unterschieden, von denen in der Regel nur fünf Serogruppen (A, B, C, W135 und Y) mit der Meningokokkenerkrankung assoziiert sind [22]. Die Gene die für *N. meningitidis* nötig sind, um Synthese, Transport und Modifizierung der Kapsel zu gewährleisten werden im Kapsel-Synthese-Gen-Cluster (cps) zusammengefasst, das insgesamt aus fünf Regionen (A-E) besteht [23]. Die Gene für die Synthese der Polysaccharidkapsel finden sich in der Region A [24], wobei durch Variationen der Gene in dieser Region A Polysaccharidkapseln verschiedener Serogruppen exprimiert werden können. So weisen z.B. die Stämme der Serogruppen B, C, W-135 und Y, deren Kapsel Sialinsäure enthält, verschiedene Varianten des Gens *siaD* auf; dieses Gen kodiert für eine Polysialyltransferase [24, 25]. Der Austausch von Allelen, die für die Polysialyltransferase kodieren, ermöglicht es beispielsweise einem B-Stamm eine Serogruppe C-Kapsel zu exprimieren [24].

Daneben unterliegt die Kapsel der Phasenvariation; dabei wird die Synthese der Polysaccharidkapsel entweder durch Insertion einer mobilen DNA-Sequenz (IS1301) in das Gen *siaA* (Region A) reversibel inaktiviert oder mittels eines „slipped strand mispairing“- Mechanismus im Polysialyltransferase-kodierenden Gen *siaD* unterbrochen [26, 27]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch irreversible Vorgänge zur Kapselausschaltung vorkommen [28].

Dieses Ausschalten der Kapselexpression könnte den Meningokokken dazu dienen, die Epithelbarriere des Nasopharynx besser zu überwinden und mittels nachfolgender Reexpression in der Blutbahn dem Immunsystem des Wirts zu entgehen [26]. So hat sich gezeigt, dass Meningokokken während der Kolonisation des Nasenrachenraums oft in unbekapseltem Zustand vorliegen [27, 29]. Es sind jedoch auch Stämme bekannt, denen die Regionen A, B und C des *cps*-Locus fehlen und damit von vornherein keine Kapsel exprimieren können. Die Operons für Kapselsynthese, Modifikation und Transport sind bei diesen sogenannte Kapsel-null-Locus (*cnl*) Stämmen durch nicht kodierende Regionen ersetzt [29]. Dabei können Trägerisolate sowohl in bekapseltem als auch in unbekapseltem Zustand vorkommen [27, 29].

Ähnlich dem LPS der Meningokokken (s. Kapitel 1.5.3) zeigt auch die Polysaccharidkapsel antigenes Mimikry; so gleicht die α -2-8 Polysialinsäure der Serogruppe B Kapsel Oberflächenstrukturen neuronaler Zellen des Menschen. Aufgrund dieser Eigenschaft konnte bis heute kein Impfstoff entwickelt werden [30].

1.5.2 Zellwand von *N. meningitidis*

Der typische Zellwandaufbau von Gram-negativen Bakterien lässt sich auch bei Meningokokken beobachten (Abbildung 1). Hier finden sich die wichtigsten Virulenzfaktoren von *N. meningitidis*, zu denen neben der Kapsel (s. Kapitel 1.5.1) bestimmte Außenmembranproteine, Lipooligosaccharide (s. Kapitel 1.5.3) und Pili gehören. Die Außenmembranproteine lassen sich in die Klassen 1-5 unterteilen: die Porine Por A (Klasse 1 Außenmembranprotein) und PorB (Klasse 2 und 3 Außenmembranprotein) bilden Poren in der äußeren Membran, durch die kleinere hydrophile Teilchen die Membran überwinden können [4].

Daneben zählen auch die „opacity-associated proteins“ wie Opa und Opc zu den Außenmembranproteinen (beide Klasse 5 Außenmembranproteine). Ihre Funktion besteht in erster Linie darin, Adhärenz an Wirtszellen (Opa und Opc) und Leukozyten (Opa) zu vermitteln [31, 32].

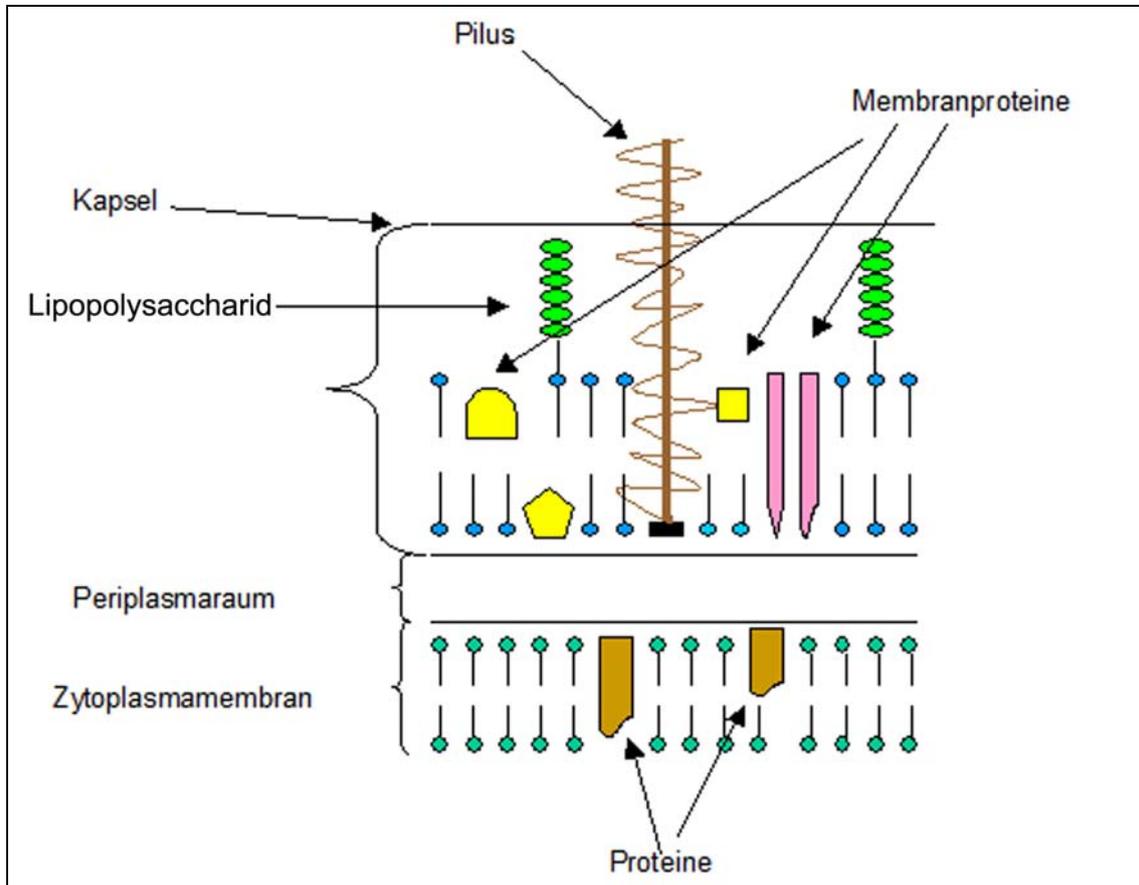


Abbildung 1: Aufbau der Zellwand Gram-negativer Bakterien [1]

Als wichtigste Adhäsine gelten jedoch die aus der äußeren Membran herausragenden Pili, welche die initialen Schritte der Epithel- und Endothelzelladhärenz vermitteln [4]. Dabei unterliegen sowohl Pili, als auch Opa und Opc Proteine der Phasenvariation, das heißt sie werden nicht permanent exprimiert. Auch die Porine sind einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt, der sich in ständigen Variationen der Antigenität äußert [3].

1.5.3 Das Lipopolysaccharid (LPS)

Das Lipopolysaccharid (LPS) der Meningokokken ist von außerordentlicher Bedeutung für die Pathogenese der invasiven Meningokokkenerkrankung. Das

LPS von *N. meningitidis* besteht aus einem in der äußeren Membran verankertem Lipidanteil, an den ein Polysaccharidanteil angeschlossen ist.

Das Lipid A gilt hierbei als die eigentlich toxische Komponente der Meningokokken. Im Gegensatz zum LPS der meisten anderen Gram-negativen Bakterien besteht der Polysaccharidanteil nur aus wenigen Zuckerresten, weshalb das LPS der Meningokokken häufig auch als Lipooligosaccharid (LOS) bezeichnet wird [33].

An das Lipid A sind zwei Heptosemoleküle über ein Keto-desoxy-octulon-Säure-Molekül (Kdo I) gebunden. Das Kdo I und ein weiteres damit verbundenes Kdo II sowie die beiden Heptosemoleküle bilden die Kernstruktur des LPS [34, 35]. Nach dem Kdo I verzweigen sich die entsprechenden Zuckerketten über die beiden Heptosemoleküle. Die α -Kette hängt direkt an Heptose I, während die β - und γ -Kette über Heptose II mit ihr verbunden sind [35]. An die beiden Heptosemoleküle können unterschiedliche Oligosaccharid-Substituenten angefügt sein, sodass man heute insgesamt 12 verschiedene Immunotypen des LPS kennt. Die verschiedenen Immunotypen unterliegen der Phasenvariation, was einigen Meningokokken in Abhängigkeit von ihrer genetischen Ausstattung einen Wechsel zwischen verschiedenen LPS-Typen ermöglicht. Auf diesem Wege gelingt es beispielsweise L3, 7, 9 Meningokokken zum L8 Phänotyp zu wechseln [36]. Dies ist deshalb relevant, da die verschiedenen Immunotypen zu bestimmten Zeitpunkten in der Meningokokken-Wirtszell-Interaktion gehäuft auftreten. So dominiert der L8-Immunotyp vornehmlich während der Kolonisation des Nasopharynx, während die L3, 7, 9 Stämme im Tiermodell hauptsächlich aus der Blutbahn isoliert werden [20, 27]. Die Immunotypen L2, 3, 5, 7, 9 weisen terminal eine Lacto-N-neotetratose auf [6, 37]; diese weist strukturelle Ähnlichkeiten mit Glycosphingolipiden an der Oberfläche humaner Zellen auf [38, 39]. Vermutlich repräsentieren diese immunologisch identischen Strukturen antigenes Mimikry, das bekanntermaßen entscheidende Bedeutung für humanpathogene Erreger besitzt, da sie sich auf diese Weise dem Immunsystem entziehen können [33, 40].

Das LPS der Meningokokken stellt den wichtigsten Aktivator für dendritische Zellen und deren Zytokinproduktion dar [31, 41]. Der Polysaccharidanteil des LPS dagegen, v.a. die α -Kette, verhindert eher die Erkennung und Phagozytose unbekapselter Meningokokken durch dendritische Zellen, beeinflusst jedoch nicht die DC-Aktivierung und Zytokinproduktion [42].

1.6 Das Zwei-Partner-Sekretions System am Beispiel von *B. pertussis*

1.6.1 *Bordetella pertussis*

Bei *Bordetella pertussis* handelt es sich um ein Gram-negatives Bakterium, das als Erreger des Keuchhustens den Respirationstrakt des Menschen infiziert. Zu seinen Virulenzfaktoren gehört neben den Toxinen (Pertussistoxin, Adenylatcyclasetoxin und Dermonekrotiktoxin) und den Adhäsinen Fimbrien und Pertactin auch das filamentöse Hämagglutinin (FHA), das als wichtigstes Adhäsion angesehen wird [43].

1.6.2 Struktur und Funktion des FHA

Das filamentöse Hämagglutinin von *Bordetella pertussis* ist ein 220-kDa großes Oberflächenprotein, das einen Hauptbestandteil des azellulären Impfstoffes zur Immunisierung gegen Keuchhusten darstellt [44, 45]. Zum einen vermittelt das FHA über eine Carbohydrat-Bindungsstelle Adhärenz an zilientragende Zellen, wie sie im Nasopharynx des Menschen vorkommen, zum anderen bindet FHA über eine Heparin-bindende Domäne auch an nicht-zilientragende Epithelien [46]. Darüber hinaus interagiert die RGD-Domäne (Arg-Gly-Asp) des FHA mit dem β_2 Intergrin Rezeptor CR3 auf der Oberfläche humaner Makrophagen [47-49] und zeigt Relevanz bei der Invasion respiratorischer Epithelzellen über ein $\alpha_5\beta_1$ Integrin [50]. Das filamentöse Hämagglutinin von *Bordetella pertussis* wird mittels des two-partner-secretion (TPS) Systems, das im Folgenden beschrieben ist, sezerniert.

1.6.3 Das TPS System

Gram-negative Bakterien haben insgesamt sechs verschiedene Sekretionswege zur Proteinsekretion entwickelt; sie werden in die Klassen I bis

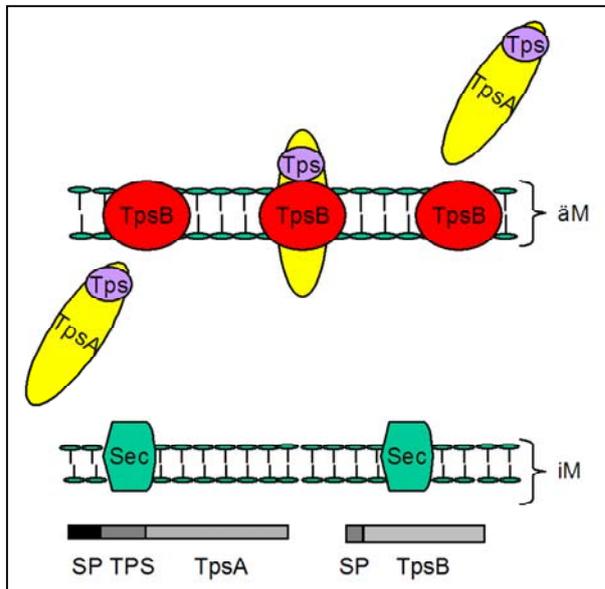


Abbildung 2: Schematische Darstellung des two-partner-secretion-pathway

SP = Signalpeptid; TPS = TPS-Domäne; TpsA = sezerniertes Protein; Sec = Sec-Apparat; TpsB = Transporter für TpsA; äM = äußere Membran; iM = Innere Membran

IV, die Autotransporter-Sekretion und das two-partner-secretion (TPS) System unterteilt, wobei die letzten beiden heute auch als Klasse V zusammengefasst werden [51, 52]. Für den Transport der Proteine über die innere Zellmembran steht prinzipiell der Mechanismus der Tat-mashinery oder der Sec-mashinery zur Verfügung, wobei letztere in *N. meningitidis* hochkonserviert scheint [53]. Über die äußere Membran werden die Proteine der Meningokokken dann mittels der Autotransportersekretion oder dem

im Folgenden ausführlicher beschriebenen TPS System sezerniert [53]. Beim TPS System handelt es sich um einen in Gram-negativen Bakterien weit verbreiteten Transportmechanismus zur Sekretion großer Exoproteine, wobei das eigentlich sezernierte Protein als TpsA und dessen zugehöriger spezifischer Transporter als TpsB bezeichnet wird. Beide Gene sind in den derzeit untersuchten Spezies in einem gemeinsamen Operon organisiert. [53, 54]. Am N-terminalen Ende der TpsAs befindet sich ein abspaltbares Signalpeptid (SP), das den Transport über die innere Membran mittels des Sec-Apparates vermittelt [55, 56]. Dem Signalpeptid folgt eine als TPS-Domäne bezeichnete hochkonservierte Sequenz, die mit einer „Rezeptorregion“ des Transporters TpsB in der äußeren Membran interagiert (Abbildung 2) [57]. Durch den periplasmatischen Raum wird das Protein vermutlich ungefaltet transportiert; die Faltung zum funktionsfähigen Protein erfolgt schließlich an der

Zelloberfläche [56]. Der Transporter TpsB gehört zur Familie der Kanalbildenden Porin-ähnlichen Proteine und weist die charakteristische Sequenz eines integralen Proteins der äußeren Membran auf. Man geht heute davon aus, dass diese Proteine spezifische β -barrel Kanäle bilden, um ihre zugehörigen Exoproteine über die äußere Membran zu transportieren [54].

Bei *Bordetella pertussis* kodiert das *fhaB* Gen (10,7 kb) für das Vorläuferprotein FhaB, aus dem durch proteolytische Spaltung das eigentlich 220 kDa große biologisch aktive FHA entsteht. Das *fhaC* Gen kodiert für das zugehörige Transportprotein FhaC.

1.6.4 TPS und FHA-homologe Gene in Meningokokken

Zu Beginn dieser Studie sind die Genome des Serogruppe A-Stammes Z2491 [58], des Serogruppe B-Stammes MC58 [59] und des Serogruppe C-Stammes FAM18 [2] sequenziert. In allen drei sequenzierten Stämmen finden sich putative *tpsA* Gene, die aufgrund ihrer Ähnlichkeiten mit dem Hämagglutinin von *Bordetella pertussis* im Stamm MC58 als *hemagglutinin/hemolysin-related proteins (hrps)* annotiert wurden [59] und im Folgenden mit *hrpA* bezeichnet werden. Ihre zugehörigen Transportgene *tpsB* werden entsprechend *hrpB* genannt. Die *hrpA* Gene sind mit einer Länge von 5,5-8 kb erheblich kürzer als das mehr als 10 kb große *fhaB* von *B. pertussis*. Homologien zwischen den HrpA Proteinen der Meningokokken und dem FhaB von *B. pertussis* finden sich in erster Linie im N-terminalen Abschnitt, während im C-terminalen Abschnitt kaum Homologien vorkommen [60].

Zu den *hrpA* Genen gehören das NMA0688 mit seinem zugehörigen *hrpB* (NMA0687) im Z2491 und das NMC0444 (*hrpA*) mit NMC0443 (*hrpB*) im FAM18 [53]. Bei der Sequenzierung des Stammes MC58 konnten insgesamt fünf *hrpA* Gene identifiziert werden, wovon NMB1779 und NMB0497 nahezu identische Kopien voneinander darstellen, während die drei weiteren putativen *hrpA* Gene NMB0493, NMB1214 und NMB1768 vor allem C-terminal starke Unterschiede aufweisen [53, 59]. Homologe zu diesen drei ORFs finden sich außer im Stamm MC58 in keinem anderen der vollständig sequenzierten Meningokokkengenome [53, 54]. Mit den beiden durch NMB0497 und

NMB1779 kodierten nahezu komplett homologen HrpAs sind die durch NMB1780 und NMB0496 kodierten HrpBs assoziiert, die ebenfalls beinahe 100%ige Homologien aufweisen [54, 60]. Bei den anderen *hrpA*-kodierenden Genen NMB0493, NMB1214 und NMB1768 im Stamm MC58 liegt nur dem zuletzt genannten *hrpA* (NMB1768) ein putatives Transportgen (NMB1762) benachbart [53].

Tabelle 1: *hrpA* und *hrpB* Gene in sequenzierten Meningokokkengenomenen nach Schmitt et al. 2007

Stamm	<i>hrpA</i> Gen ¹	Homologie auf Proteinebene	
		<i>hrpA</i> Gen in Prozent zu NMB1779	<i>hrpB</i> Gen in Prozent zu NMB1780
Z2491	NMA0688	77,4	NMA0687 98,6
MC58	NMB1779	100	NMB1780 100
	NMB0497	93,5	NMB0496 99,3
	NMB0493	13,4	- ²
	NMB1214	16	- ²
	NMB1768	13,9	NMB1762 44,5
FAM18	NMC0444	65,4	NMC0443 99

¹ NMA, NMB und NMC bezeichnen Gene in den Genomen der Stämmen Z2491, MC58 und FAM18, die für Proteine kodieren, welche homolog zum FhaB (HrpA in Meningokokken) und FhaC (HrpB in Meningokokken) von *B. pertussis* sind.

² nicht detektiert. Für NMB0493 und NMB1214 konnten keine putativen *hrpB* Gene in der Genomsequenz des Stammes MC58 detektiert werden.

Während die putativen *hrpB* Gene NMA0687, NMB1780, NMB0496 und NMC0443 nahezu identische Sequenzen (Tabelle 1) aufweisen, zeigt das nur im MC58 vorkommende NMB1762 *hrpB* deutliche Unterschiede (nur 45 %ige Sequenzhomologie auf Proteinebene) zu den übrigen hochkonservierten *hrpBs* [53, 54, 60]. Etwas komplexer stellen sich die Homologieverhältnisse der *hrpAs* dar (Tabelle 1). Während die Produkte der Gene NMB1779 und NMB0497 93,5%ige Homologien aufweisen (vor allem in der das TPS Signal umfassenden N-terminalen Domäne) zeigen sich beim *hrpA* Gen NMC0444 klare Abweichungen vom NMB1779/0497 *hrpA* - etwa 65 %ige Homologien auf Proteinebene zwischen NMC0444 und NMB1779 [53, 60]. Bei den *hrpA* Genen NMB0493, NMB1214 und NMB1768 finden sich jeweils nur sehr geringe Homologien (13-16% auf Proteinebene) zum *hrpA* von NMB0497/1779 [60]. Allerdings zeigen sich zwischen den beiden *hrpAs* NMB0493 und NMB1214

und dem NMB1768 *hrpA* vor allem N-terminal im Bereich der Sekretionsdomäne höhere Homologien - NMB1214 im Vergleich zu NMB1768 etwa 59% Homologie; NMB0493 im Vergleich zu NMB1768 etwa 75% Homologie [53, 60].

1.6.5 Verteilung des TPS-Systems in Meningokokkenstämmen einer Trägerstudie

In Dot Blot Hybridisierungen wurde die Verteilung der *hrpA* Gene NMB0493, NMB1214, NMB1768 und NMB0497/1779 in der Population der Meningokokken untersucht [61]. Zu diesem Zweck wurden Meningokokkenstämmen verwendet, die aus einer Trägerstudie [29] am Haus stammen. Die insgesamt 822 Meningokokkenisolate ($\alpha 1 - \alpha 822$) wurden bei 8000 gesunden Trägern (Kinder und Jugendliche zwischen 3 und 26 Jahren) im Zeitraum von November 1999 bis März 2000 aus deren Rachenabstrichen isoliert.

In der Arbeit von M. Bösl wurden die Hybridisierung der Blots mit Sonden durchgeführt, die C-terminale Anteile der Gene NMB0493, NMB1214 und NMB1768 erfassten. Die Sonden für die Gene NMB0497 und NMB1779 konnten zwischen diesen beiden Genen nicht differenzieren, weshalb die Hybridisierung nur mit der Sonde für NMB1779 durchgeführt wurde. Von allen auswertbaren Stämmen zeigten 80% (451/690) mindestens ein Gen, das zu den *hrpA* Genen von MC58 homolog ist. Für diese Arbeit ergab sich daraus die Fragestellung, ob die verbliebenen Stämme mit negativem Hybridisierungsergebnis (20%) tatsächlich kein TPS System aufweisen, oder ob die verwendeten Sonden dieses aufgrund ihrer Spezifität nicht detektieren konnten.

1.7 Hypothesen und Ziele der Arbeit

Bis heute ist es nicht gelungen einen Impfstoff gegen Serogruppe B Meningokokken zu entwickeln. Daher scheint es von besonderer Wichtigkeit andere Virulenzfaktoren neben der Kapsel und deren Bedeutung für die Interaktion mit dem Wirt genauer zu untersuchen und damit die Mechanismen durch die *N. meningitidis* Invasion und Erkrankung auslöst besser zu verstehen.

Da die *hrpA* Gene der Meningokokken Ähnlichkeit zum Hämagglutinin von *Bordetella pertussis* aufweisen und dieses den wichtigsten Virulenzfaktor des Erregers darstellt, ist die genauere Untersuchung der HrpAs von besonderem Interesse. Folgende Fragestellungen sollen dabei Gegenstand dieser Arbeit sein:

1. Verteilung der putativen TPS Systeme NMB1768-NMB1762 und NMC0444-NMC0443 in der Meningokokkenpopulation
2. Expressionsanalysen in Stämmen mit positiver Hybridisierungsreaktion für diese beiden TPS Systeme
3. Funktion des TPS bei der Adhärenz von Meningokokken an Epithelzellen
4. Expression und Aufreinigung des Transportproteins HrpB

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Brutschränke	Hera cell Heraeus, Hanau, Deutschland
Elektrophoresekammern	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gel – Dokumentationssystem	Herolab UVT-28MP, Wiesloch, Deutschland
Hybridisierungsöfen	Biometra OV5, Göttingen, Deutschland
Kühlgeräte	Kühlschrank 4°C Kühltruhen –20°C und –80°C
Heizblock	Typ 2099-DA Heizblock, Gebrüder Liebisch, Bielfeld, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Mikroskop	Wilovert, Hund, Wetzlar
Netzgerät	200/2.0 Power Supply, Bio-Rad, München, Deutschland
pH-Meter	digitales pH-Meter WTW, Weilheim, Deutschland
Röntgenkassette	X-Omatic Kodak, Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Röntgenfilmentwickler	Curix 60, AGFA
Schüttler	Certomat H, B. Braun, Melsungen, Deutschland
Vakuumtrockner	Speed Vac Plus, Sc110A, Savant, New York, USA
Shaker	Phero Shaker, Biotec-Fischer, Reiskirchen, Deutschland
Photometer	GeneQant pro - RNA/DNA Calculator, Biochrom, Cambridge, UK U-2000, Hitachi, San Jose, USA
Sterilbank	Cleanbench Gelaire BSB 4A , Mailand, Italien
Ultraschallgerät	Ultraschall und Labortechnik G. Heinemann, Schwäbisch- Gmünd, Deutschland
Thermocycler	Trio-Thermoblock, Biometra, Göttingen, Deutschland
UV-Crosslinker	Stratalinker 1800, Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Vortex	GLW M35, Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Waagen	Mettler, Weilheim, Deutschland
Westernblot-Kammer	Mini trans-Blot ® Cell, Bio-Rad, München
Zentrifugen	Sorvall RC-5b plus, Heraeus, Hanau, Deutschland Megafuge 1.0 Heraeus sepatech, Hanau MikroRapid/K, Hettich, Tuttlingen, Deutschland Biofuge 15R, Heraeus sepatech, Hanau

2.2 Bezugsfirmen

Chemikalien und Hilfsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen:

Ambion, Austin, USA
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
AppliChem, Darmstadt, Deutschland
American Type Culture Collection, Manassas, USA
Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Biochrom AG, Berlin Deutschland
Boehringer, Ingelheim, Deutschland
Cambrex, Verviers, Belgien
Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Difco Laboratories, Augsburg, Deutschland
GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Merck, Darmstadt, Deutschland
New England Biolabs, Schwalbach, Deutschland
Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
Promega, Madison, USA
Roche, Penzberg, Deutschland
Serva, Heidelberg, Deutschland
Sigma, München, Deutschland
Stratagene, Amsterdam, Niederlande

2.3 Verbrauchsmaterialien

porablot NY plus (Nylonmembran), Marcherey-Nagel, Düren, Deutschland
Whatman Papier, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Nylonmembran, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Röntgenfilme Hyperfilm™ MP, Amersham Biosences, Buckinghamshire, England
Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml), Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Nuclease-freie Microfuge-Caps, Ambion, Austin, Texas, USA
15 ml Röhrchen steril, Greiner, Nürtingen, Deutschland
50 ml Röhrchen steril, Greiner, Nürtingen, Deutschland
Lysing Matrix B, Qbiogene (MP Biomedicals), Heidelberg, Deutschland
Sterile Filter 0,2 µm Porengröße Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland

Zellkulturflaschen, Nunclon™ Δ , Nunc A/S, Roskilde, Dänemark

96 MicroWell™ Platten, Nunclon Δ , Nunc A/S, Roskilde, Dänemark

Weiterhin wurden wiederverwertbare Gefäße, Pipetten etc. verwendet, wie sie von jedem Laborausstatter zu beziehen sind.

2.4 Kits

QIAprep Miniprep, Qiagen, Hilden, Deutschland

QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

Rneasy Mini Kit , Qiagen, Hilden, Deutschland

QIAGEN One Step RT-PCR-Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

DIG DNA Labeling Kit, Roche, Penzberg, Deutschland

ZeroBlunt TOPO PCR Cloning Kit, INVITROGEN, Carlsbad

pGEM-T Vektor System, Promega, Madison, USA

2.5 Gebrauchslösungen

Blaumarker DNA (GEBS)	0,05% Bromphenolblau, 0,5% Sacrosyl, 50mM EDTA pH 8,0, 20% Glycerin in H ₂ O
DEPC-H ₂ O	1ml Diethylpyrocarbonat in 1l H ₂ O über Nacht (Lichtschutz); anschließend autoklavieren (Inaktivierung des DEPC) DEPC inaktiviert RNAsen
dNTP	Stocklösung von SIGMA enthält äquimolare Mengen von dATP, dCTP, dGTP, dTTP
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat Stocklösung 0,5 M pH 8,0 (autoklaviert)
Na ⁺ -Acetat	Natrium-Acetat Stocklösung 3 M, pH 4,5 (autoklaviert)
MgSO ₄	1M MgSO ₄ Stocklösung
Glycerin	Stock: Glycerin 100%

high-SDS	10,5 g SDS ultrapure 75 ml Formamid deionized (MERCK) 37,5 ml 20xSSC pH 7,0 7,5 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ pH 7,0 1,5 ml 10% Sarkosyl 30 ml 10% Blocking Reagent → bei 60°C in Lösung bringen; bei -20°C aufbewahren
Sarkosyl	Stocklösung: 10% in H ₂ O
10x Lämmli	30 g Tris, 144 g Glycin a.d. 1 l H ₂ O, pH 8,7
Maleinsäure-Puffer	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5
Saponin	1% Saponinpulver (Serva, Heidelberg, Deutschland) in RPMI, sterilfiltriert über Sterile Filter 0,2 µm Porengröße
SSPE 20x	100 mM Na ₂ HPO ₄ wasserfrei; 20 mM EDTA-Dinatriumsalz; 100 mM NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O 3,6 M NaCl
SSC 20x	3 M NaCl, 0,5 M Natriumcitrat in H ₂ O, pH 7,0
TAE 50x	2 M Tris, 0,1 M EDTA, 5,71Vol% Eisessig in H ₂ O
Tris-HCl pH 6,8	Stocklösung 1M
TE Puffer	10 mmol/l Tris-HCl, pH8 (25°C), 1 mmol/l EDTA, pH8
BSA	Bovines Serumalbumin
10×TBS	60,5 g Tris, 87,6 g NaCl, pH 7,4
1×TBS	100 ml 10×TBS, 900 ml H ₂ O
TBS Tween	0,05% Tween 20 in 1×TBS
TBS Tween/Triton	0,05% Tween 20, 0,2% Triton in 1×TBS
Tween 20	Stocklösung 100% 10% Tween20 in H ₂ O
1×SS	5% β-Mercaptoethanol, 2% SDS, 12,5% Glycerin, 0,3 M TrisHCl pH 6,8, 0,05% Bromphenolblau
IPTG	Stocklösung 1M Isopropylbeta-D-Thiogalactosid

2.6 Sterilisationsverfahren

Autoklavieren: 121°C für 20 min.

Sterilfiltrieren: Filtration durch sterile Filter 0,2 µm Porengröße
(Schleicher & Schuell)

2.7 Bakterienstämme

2.7.1 *N. meningitidis*

Tabelle 2: Verwendete Meningokokkensäme

Stamm	Serogruppe (Genotyp)	Sequenztyp	Referenz
MC58	B	ST-32	[62]
2120	C	ST-11	[15]
α 2	B	ST-854	[29]
α 11	B	ST-804	[29]
α 15	NG	ST-910	[29]
α 184	C	ST-939	[29]
α 193	B	ST-799	[29]
α 279	C	ST-278	[29]
α 366	B	ST-791	[29]
α 634	<i>Cnl</i>	ST-845	[29]

NG: non groupable (nicht serotypisierbar)

2.7.2 Gentechnisch modifizierte Säme

Tabelle 3: Gentechnisch modifizierte Säme

Stamm	Parental	Resistenzen	Genotyp	Bezeichnung ^{*)}	Referenz
2517	2120	Cm	$\Delta siaD$	2120 $\Delta siaD$	[42]
3727	2517	Cm, Sm	$\Delta siaD$, $\Delta NMC0444$	2120 $\Delta siaD$ $\Delta NMC0444$	[60]
3838	2517	Cm, Sm	$\Delta siaD$, $\Delta NMC0443$	2120 $\Delta siaD \Delta 0443$	[60]
2921	2517	Cm, Kan	$\Delta siaD$, $\Delta lgtA$	2120 $\Delta siaD \Delta lgtA$	[42]
3726	2921	Cm, Kan, Sm	$\Delta siaD$, $\Delta lgtA$, $\Delta NMC0444$	2120 $\Delta siaD$ $\Delta lgtA \Delta 0444$	[60]
3839	2921	Cm, Kan, Sm	$\Delta siaD$, $\Delta lgtA$, $\Delta NMC0443$	2120 $\Delta siaD$ $\Delta lgtA \Delta 0443$	[60]

Resistenzen: Cm = Chloramphenicol, Kan = Kanamycin, Sm = Spectinomycin

^{*)} die Ziffern bezeichnen NMC-Nummern (Annotierung nach [2])

2.7.3 E. coli

Nach der Klonierung von PCR Produkten in den pCR-Blunt II TOPO Vektor des Topo BE Kloning Kits wurde das Konstrukt in den *E. coli* Stamm TOP10 (Invitrogen) transformiert. Für Klonierungen in pQE32 wurde der Stamm DH5 α verwendet. Für die Proteinexpression wurde das konstruierte Plasmid in *E. coli* M15[pREP 4] (Qiagen) transformiert.

2.8 Kulturbedingungen für Bakterien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden Meningokokken bei 37°C und 5% CO₂ auf GC-Agar angezüchtet. *E. coli* wurden bei 37°C auf LB-Agar angezüchtet.

2.8.1 Nährmedien

GC-Agar:	BD Difco, Heidelberg, Deutschland
LB Medium:	1% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl Verfestigung durch Zugabe von 15 g Agar auf 1 l Medium
SOC Medium:	2% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 20 mM Glucose 10 mM MgCl ₂ 10 mM Mg SO ₄
PPM:	15g Protease Pepton 5g NaCl 0,5g Stärke 20 ml Stammlösung (5% K ₂ HPO ₄ , 20% KH ₂ PO ₄ in H ₂ O) → pH 8 einstellen, ad 1l H ₂ O
PPM+:	50 ml PPM

	500 µl Vitamin Mix (PolyViteX, BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)
	250 µl 8,4% NaHCO ₃
	250 µl 2M MgCl ₂
RPMI	RPMI1640, 2 g/L NaHCO ₃ , 2 mM stabiles L-Glutamin, Biochrom, Berlin, Deutschland

2.8.2 Antibiotika

Tabelle 4: Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	Konzentration für Meningokokken	Konzentration für <i>E.coli</i>
Kanamycin	100 µg/ml	30 µg/ml
Ampicillin	_____	100 µg/ml
Spectinomycin	125 µg/ml	75 µg/ml

2.9 Präparation chromosomaler DNA aus Bakterien

Die Isolierung chromosomaler DNA aus Meningokokken wurden mit dem QIAamp DNA Mini Kit von QIAGEN durchgeführt.

Die über Nacht auf GC angezüchteten Meningokokken wurden in 1,5 ml 1xPBS eingerieben und ca. $1,5 \times 10^{10}$ Bakterien (entspricht 1 ml OD_{600nm} 2) für 5 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Das weitere Procedere folgte den Angaben des Herstellers.

2.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

2.10.1 Plasmidisolierungskits

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien wurde in dieser Arbeit der QIAprep Miniprep-Kit von Qiagen verwendet.

Zunächst wurden die Bakterien, die das gewünschte Plasmid enthielten über Nacht bei 37° C auf LB-Agar angezüchtet. Die Isolierung erfolgte anschließend aus dem flüssigen Nährmedium entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

2.10.2 Schnellpräparation ohne Kit

Daneben wurde eine weitere Methode Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren verwendet:

Benötigte Lösungen:

Lösung 1 : 50mM Glucose, 25mM TrisHCl (pH8),
10 mM EDTA

Lösung 2: 0,2 M NaOH, 1% SDS; frisch ansetzen

Lösung 3: 5 M K⁺- Acetat, 11 % Essigsäure
100%iger Ethanol (eisgekühlt)
70%iger Ethanol (eisgekühlt)
H₂O (+RNase)

Isolierungsprotokoll:

Die Anzüchtung der Bakterien erfolgte analog der oben genannten Methode.

Pro Bakterienklon wurden 2 ml der Bakteriensuspension in je in 2-ml-Eppendorf-Cap gegeben und diese für eine Minute bei 13.000 rounds per minute (rpm) und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes, wurde dem Pellet 100 µl Lösung 1 zugefügt und dieses durch Vortexen vorsichtig aufgelöst. Anschließend wurden je 200 µl frisch angesetzte Lösung 2 hinzugegeben, die Caps getaumelt und jedes für ca. 5 Minuten auf Eis gestellt. Nach weiteren 150 µl Lösung 3 wurde erneut getaumelt und 5 Minuten auf Eis gekühlt.

Nun wurden die Cap-Lösungen für 3 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert (4° C). Der dabei entstandene Überstand (ca. 400 µl) wurde abgenommen und in neue 1,5-ml-Eppendorf-Caps gegeben. Nach Zufügen von 800 µl 100%igen Ethanol wurden die Caps 15 Minuten bei -20° C zwischengelagert.

Danach wurden die Proben wiederum bei 13.000 rpm und 4° C für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand sehr vorsichtig verworfen und 400 µl 70%iger Ethanol zugefügt. Nachdem ein letztes Mal für 10 Minuten (13.000 rpm, 4° C) zentrifugiert und der Überstand abgenommen wurde, blieben die Caps bei 70° C

solange mit offenem Deckel stehen (10-15 Minuten) bis der Ethanol vollständig abgetrocknet war.

Das kaum sichtbare verbleibende Pellet wurde in 30 μ l Wasser (+RNase) gelöst und zur Lagerung bei -20° C tiefgefroren.

2.11 RNA Isolierung aus Bakterien

Die RNA-Isolierung aus Meningokokken erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen. Die Meningokokken wurden über Nacht auf GC-Agar angezüchtet und am Tag der Isolierung in 8 ml PPM⁺ angeimpft. Anschließend wurde eine OD₆₀₀ von 1 in 1 ml PPM⁺ eingestellt und die Bakterien abzentrifugiert. Das weitere Protokoll folgte den Angaben des Herstellers.

2.12 DNA-Verdau mit DNase

Um eine mögliche Kontamination der RNA mit DNA zu beseitigen wurde die isolierte RNA zusätzlich mit DNase behandelt.

50- μ l-Ansatz

39 μ l RNA
5 μ l 0,05M Mg SO ₄ (DEPC- behandelt)
5 μ l 1 M NA-Acetat (DEPC- behandelt)
1 μ l DNase (10 U/ μ l, Fa. Roche)

Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37° C inkubiert und anschließend noch einmal über die Säulen des RNA-Isolierungs-Kits aufgereinigt (Protokoll s. Hersteller).

2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurde für die Polymerase-Ketten-Reaktion für kurze Fragmente überwiegend die *PicoMaxx* Polymerase von Stratagene und für lange Fragmente die *High Fidelity Taq Polymerase* von Invitrogen verwendet.

Ein möglicher Ansatz und ein Amplifikationszyklus sind im folgenden aufgezeigt:

Ansatz:

genomische DNA	20 ng
reverse-Primer	1 μ l
forward primer	1 μ l
dNTP	3 μ l der Stocklösung
10x ThermoPol Reaction Buffer	5 μ l
<i>Pico Maxx</i> Polymerase	2-5 units
Wasser	auf 50 μ l

Programm für Thermocycler :

1. Schritt	95°C	10'	DNA-Denaturierung
2. Schritt	95°C	40''	Denaturierung
3. Schritt	T _A *	30''	Annealing
4. Schritt	72°C	1'	Extension
5. Schritt	72°C	15'	finale Extension

Schritte 2-4 werden als Schleife 35 mal wiederholt

- * T_A entspricht der Annealingtemperatur der Primer, die sich für jeden Primer aus seinem GC/AT Gehalt errechnet. Folgende Formel dient dabei als Grundlage:

$$T_A = 4 \times (\eta_G + \eta_C) + 2 \times (\eta_A + \eta_T) - 2$$

η_x : absolute Nukleotidanzahl x (=A, C, G, T) der Primersequenz

Die verwendeten Primer finden sich im Anhang.

2.14 Aufreinigung von PCR-Produkten

Eine PCR-Purifikation dient grundsätzlich der Reinigung amplifizierter DNA (PCR-Produkt) von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen. In dieser Arbeit wurde zu diesem Zweck der PCR-Purification-Kit von QIAGEN verwendet. Beim Protokoll wurden die Angaben des Herstellers berücksichtigt .

2.15 RT-PCR

Bei einer RT-PCR wird von einem RNA-Template mit Hilfe einer reversen Transkriptase eine DNA-Kopie erstellt. Diese Kopie wird dann wie in einer normalen PCR amplifiziert. So kann festgestellt werden, ob ein Gen, das in einem Genom vorhanden ist, auch exprimiert wird. Nur wenn diese RNA-Kopie erstellt wird kann daraus im folgenden Schritt Proteinsynthese stattfinden.

Um in der Auswertung kein falsch-positives Ergebnis zu erhalten, muss jegliche Kontamination mit DNA ausgeschlossen werden. Um dies sicher zu stellen, wurde immer auch eine PCR mit RNA als Template durchgeführt; diese PCR muss bei einer nicht kontaminierten RNA-Probe negativ sein.

Für die Durchführung der RT-PCR wurde der RT-PCR-Kit von QIAGEN nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Primer finden sich im Anhang mit der Bezeichnung RT NMB1762.

Ansatz:

RNA Template	3 µl
reverse-Primer	3 µl
forward primer	3 µl
dNTP	2 µl der Stocklösung
5 × Puffer	10 µl
Enzym Mix	2-5 units
RNAse freies Wasser	auf 50µl

Programm für Thermocycler :

1. Schritt	50°C	35'	reverse Transkription
2. Schritt	95°C	15'	Inaktivierung der reversen Transkriptase Aktivierung der <i>Taq</i> Polymerase
3. Schritt	95°C	30''	Denaturierung
4. Schritt	52°C	30''	Annealing
5. Schritt	72°C	1'	Extension
6. Schritt	72°C	10'	finale Extension

Schritte 2-4 werden als Schleife 30 mal wiederholt.

Kontroll-PCR:

- Ansatz: entsprechend RT-PCR-Ansatz s. o.
als Template: RNA in gleicher Menge wie bei RT-PCR
- Programm: RT-PCR-Programm ab Schritt 2

2.16 Horizontale DNA Gelelektrophorese im Agarosegel

DNA wird in Agarosegelen elektrophoretisch nach dem Molekulargewicht aufgetrennt.

In dieser Arbeit wurden 1% (w/v in 1 x TAE) Agarosegele verwendet (ROTI®GAROSE, Roth, Karlsruhe). Zur einfacheren Handhabung der Proben beim Auftragen in die Geltaschen wurden jene, mit 10 Vol% Blaumarker vermischt, in die Taschen pipettiert. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wurde ein Größen- und Gewichtsmarker (smartladder, Eurogentech, Seraing, Belgien) aufgetragen (Abbildung 3). Die

Auftrennung erfolgte bei Raumtemperatur in 1xTAE Laufpuffer mit Spannungen zwischen 100 und 200

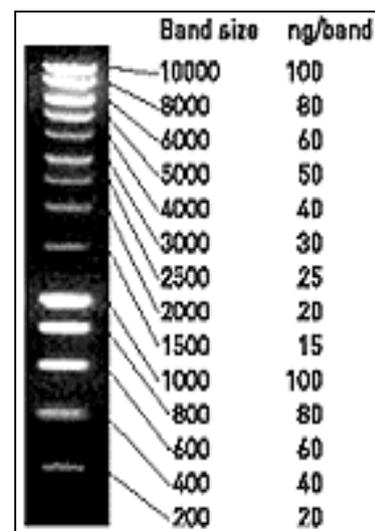


Abbildung 3: Smartladder

Volt. Nach Abschluss der Auftrennung wurde das Gel zur Anfärbung der DNA für ca. 10 Minuten in eine Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) gelegt. Unter UV-Licht wurden dann die DNA-Banden sichtbar und konnten mit Hilfe eines Gel-Dokumentationssystems im Bild festgehalten werden. Die Isolierung der aufgetrennten DNA erfolgte anschließend mittels Geextraktionsverfahren (s.2.17).

2.17 DNA Extraktion aus einem Elektrophoresegel

Verwendet man eine größere Menge DNA zum Auftrennen im Agarosegel (s. 2.16), so kann anschließend die entsprechende Bande mit der gesuchten Größe wieder aus dem Gel isoliert werden. Auf diese Weise lassen sich verschieden große DNA-Fragmente aus einer Probe gewinnen. Dazu wurde in dieser Arbeit der QIAquick Gel Extraktions Kit von Qiagen verwendet und das Protokoll entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.18 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen

In dieser Arbeit wurde zirkuläre Plasmid-DNA mit Enzymen verdaut, die an bestimmten Stellen des Plasmids dessen DNA zerschneiden und damit linearisieren. Diese Restriktionsenzyme erkennen in der Regel nur eine spezifische Basensequenz, wodurch bei bekanntem (sequenziertem) Plasmid/Genom die Schnittstelle exakt bestimmt werden kann. Verdaut man entsprechend genomische DNA mit dem gleichen Restriktionsenzym wie zuvor das Plasmid, so fügt sich das hierbei zugeschnittene DNA-Fragment nach dem Prinzip eines Puzzles in das linearisierte Plasmid ein (Genauerer s. Klonierung).

Verwendete Restriktionsenzyme:

Enzym	Schnittstelle	Puffer/Temperatur
<i>Hind</i> III	5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'	NEB2/37°C

*Sa*I 5'-GTCGAC-3' BSA/37°C
3'-CAGCTG-5'

Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammten von New England Biolabs.
Ein möglicher Ansatz für einen solchen DNA-Verdau:

20- μ l-Ansatz

10 μ l Plasmid
2 μ l 10 \times Puffer
2 μ l 10 \times BSA
1 μ l Restriktionsenzym
5 μ l Wasser (auf 20 μ l)

2.19 DNA-/ RNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der isolierten DNA- bzw. RNA-Menge erfolgte mit Hilfe eines Photometers mittels der Absorption.

Dabei gilt: $OD_{260nm} = 1$ entspricht 50 μ g/ml dsDNA

$OD_{260nm} = 1$ entspricht 40 μ g/ml RNA

2.20 Hybridisierung von membrangeboppelter DNA

DNA-Abschnitte, z.B. PCR-Produkte werden mit Digoxigenin (DIG), das an dNTP gekoppelt ist markiert. Diese markierten DNA-Proben, sogenannte Sonden, dienen zur Hybridisierung an membrangebundene DNA. Auf diese Weise kann mit Hilfe von anti-DIG-Antikörpern und CSPD eine große Anzahl von DNA-Proben auf diese Hybridisierungsprodukte hin durchsucht werden. Der eigentliche Nachweis erfolgt durch Chemolumineszenz.

2.20.1 „Random primed“ DNA-labeling mit Digoxigenin-dNTP

Die Markierung der DNA-Sonden erfolgte mit Hilfe der DIG-DNA-Labeling-Mixture (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Verwendet wurden hier PCRs mit den Primern NMB1762 und NMC0443 (s. Anhang). Die Konzentration der Sonde wurde durch Vergleich mit Dig-markierter Kontroll-DNA ermittelt.

2.20.2 Hybridisierung von DNA

Die zu untersuchende DNA-Probe (z.B. bestimmte Genabschnitte eines Meningokokkenstammes) wurde auf einer Nylonmembran mittels UV-Crosslinking fixiert und anschließend mit den Sonden hybridisiert, nachdem diese 10 Minuten im Wasserbad (100°C) denaturiert und kurz auf Eis abgekühlt worden waren. Dabei sollte die Konzentration der Sonde mindestens 10 ng Sonde pro ml high-SDS betragen.

Zunächst wurde die nukleinsäuretragende Membran in eine Hybridisierungsröhre eingebracht und dann bei 42°C in einem Hybridisierungssofen in 10 ml high-SDS für eine Stunde vorhybridisiert. Das wiederverwendbare high SDS wurde abgegossen und mit der eigentlichen Hybridisierung begonnen. Diese erfolgte über Nacht bei ebenfalls 42°C mit 10 ml der in high-SDS gelösten Sonde.

2.20.3 Nachweis mit CSPD

Zum Nachweis der Hybridisierung erfolgte nun die chemolumineszente Detektion der Hybridisierungsprodukte.

Benötigte Lösungen

Waschpuffer	0,3% Tween20 in Maleinsäure
Puffer A	2 x SSC, 0,1% SDS in H ₂ O
Puffer B	0,1 x SSC, 0,1% SDS in H ₂ O
Puffer C*	1% Blockierungsreagenz in Maleinsäure
anti-DIG-AP*	1:10.000 in Puffer C
Puffer D*	0,1 M TrisHCl pH 9,6, 0,1 M NaCl in H ₂ O
CSPD*	1:100 in Puffer D (vor Licht schützen)

Anti-DIG-AP, Blockierungsreagenz und CSPD stammten von Roche, Penzberg, Deutschland*.

Protokoll

Die hybridisierte Membran wurde verschiedenen Wasch- und Inkubationsschritten zugeführt:

- 2 x 5 Minuten in Puffer A bei Raumtemperatur
- 2 x 15 Minuten in Puffer B bei 68°C
- 5 Minuten in Waschpuffer
- 30 Minuten Puffer C
- 30 Minuten anti-DIG-AP in Puffer C
- 2 x 15 min in Waschpuffer
- 5 Minuten in Puffer D
- 5 Minuten mit CSPD in Puffer D

Anschließend wurde der Blot in Frischehaltefolie eingewickelt und für etwa 15 Minuten in den Brutschrank (37°C) gelegt.

Für 5 min bis 1 h wurde ein Film aufgelegt und danach entwickelt.

2.20.4 Nylonmembran strippen

Um die Nylonmembranen mehrmals hybridisieren zu können, musste nach jeder Hybridisierung ein sogenanntes Strippen erfolgen.

Ziel des Nylon-Strippens ist das Entfernen der gebundenen Sonden.

Dazu wurden die Membran zunächst zweimal 15 Minuten bei 37°C in 0,2 M NaOH, 0,1% SDS und danach kurz in 2 x SSC gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgte ebenfalls in 2 x SSC.

2.21 Dot- Blot

Um eine große Anzahl von DNA-Proben auf das Vorhandensein bestimmter Gene zu testen wurde die zu testende DNA direkt auf eine Nylonmembran gegeben und durch UV-Crosslinking auf der Membran fixiert.

In dieser Studie wurden Dot-Blots mit der DNA von Meningokokkenstämmen verwendet, die aus einer am Hause durchgeführten Trägerstudie [15] stammen.

2.22 Klonierung in *E. coli*

Bei einer Klonierung wird ein bestimmter Genabschnitt (DNA Fragment) in ein Plasmid integriert und anschließend in eine Wirtszelle (in dieser Arbeit *E. coli*) transformiert. *E. coli*-Bakterien vervielfältigen diese Plasmide, die dann zur weiteren Verarbeitung dienen, wie z.B. Expressionsversuche von Proteinen, die auf den Plasmiden kodiert sind (s. 2.25).

2.22.1 Enzyme

Neben den unter 2.18 aufgeführten Restriktionsenzymen wurden für die Klonierungen folgende weitere Enzyme verwendet:

a) Alkalische Phosphatase (Shrimp)

Shrimp alkalische Phosphatase (SAP) katalysiert die 5'-Dephosphorylierung von DNA. Dies verhindert bei Ligation eines DNA Fragments in einen Plasmidvektor, der mit nur einem Restriktionsenzym linearisiert wurde, dass der linearisierte Vektor ohne Interposition des Fragmentes religiert. Zu diesem Zweck wurde stets die SAP von Roche mit beigefügtem Puffer und entsprechenden Protokollangaben verwendet. Nach der Dephosphorylierung wurde das Enzym durch Erhitzen auf 65°C für 15 Minuten deaktiviert.

b) Quick T4 DNA Ligase

Die Quick Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden in doppelsträngiger DNA. In dieser Arbeit wurde die Quick Ligase von New England Biolabs mit ihrem zugehörigen Puffer verwendet.

2.22.2 Ligation

PCR-Produkte wurden zunächst in den Vektor des ZeroBlunt TOPO PCR Cloning Kit von Invitrogen kloniert (Protokoll entsprechend den Angaben des Herstellers).

Für die Ligationen des mittels Restriktionsenzymen aus- und damit zugeschnittenen DNA Fragments (aus dem oben genannten Vektor) mit dem pQE-Vektor von Qiagen (s. 2.23) wurde die Quick Ligase (New England Biolabs) verwendet.

2.22.3 Transformation

Bei der Transformation wurden 100 µl der aufgetauten *E.coli*-Suspension dem Ligationsansatz zugegeben, 30-60 Minuten auf Eis gestellt und schließlich mit 30 Sekunden Hitzeschock (42°C) behandelt. Das weitere Procedere folgte wiederum den Angaben von Invitrogen.

Die über Nacht gewachsenen Klone wurden separat auf flüssigem und festem antibiotikahaltigem Nährmedium angeimpft und 24 Stunden angezüchtet. Die Isolierung der Plasmide aus den Bakterien erfolgte entsprechend den Angaben in 2.10.

2.23 Plasmidkonstruktion

Zur Herstellung des Transporters HrpB des *two-partner secretion (TPS)* Systems wurde ein Plasmid konstruiert, das die Information für den kompletten Transporter kodiert. Wie aus der Grafik (Abbildung 4) erkennbar wird, wurde das Fragment zur besseren Detektion und späteren Aufreinigung am N-terminalen Ende mit 6×Histidin gekoppelt.

Dem 1,8 kb großen PCR-Fragment diente die genomische DNA des Meningokokkenstammes 2120 als Template (Primer siehe Anhang:

NMC0443). Nach Ligation mit dem Topo BE Cloning Vektor (Invitrogen), wurde das Plasmid in *E.coli* vermehrt und mit Hilfe des QIAprep Miniprep- Kits isoliert.

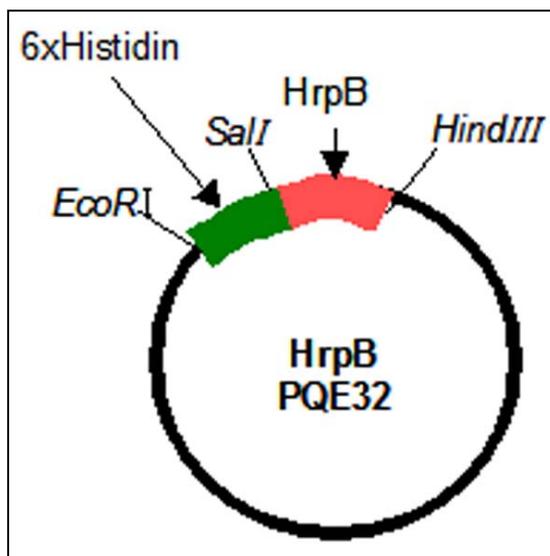


Abbildung 4: Plasmid zur Proteinexpression von HrpB

Nach Verdau mit *SaI*I und *Hind*III (Restriktionsenzyme von New England Biolabs; Verdau nach Herstellerangaben) wurde das PCR-Fragment dann mit dem durch die jeweiligen Enzyme verdauten Vektor pQE32 legiert (Quick-Ligase von New England Biolabs). Die Karte des fertigen Plasmids zeigt die Abbildung 4.

2.24 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen dieser Arbeit wurden in der automatisierten Sanger-Methode [63] mittels des *Prism ready reaction dye deoxy terminator cycle sequencing kit* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Durch Zugabe von di-deoxy-Nukleotiden kommt es bei einer Polymerisation zu Kettenabbrüchen, wodurch eine Sequenzierung möglich wird. Entsprechende Primer zur Amplifikation wurden vom Anfang, bzw. bei doppelläufiger Sequenzierung, vom Anfang und Ende der zu sequenzierenden Nukleinsäurefolge abgeleitet.

Die Annealingtemperatur für jeden Primer wurde aus der Nukleinsäureverteilung analog der Vorgehensweise bei einer PCR (s. 2.13) errechnet. Die Auswertung der Fragmente nach Elektrophorese im Polyacrylamidgel erfolgte automatisiert (ABI Prism Sequencer 377, Perkin Elmer).

2.25 Proteininduktion

2.25.1 Induktion

Um das HrpB-Protein der Plasmidkonstruktion zu exprimieren, wurde das konstruierte Plasmid in den *E. coli* Stamm M15[pREP4] von Qiagen entsprechend Herstellerangaben transformiert und die gewachsenen Klone in LB + Ampicillin (100 µg/ml) + Kanamycin (12 µg/ml) Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Von dieser Bakteriensuspension wurden pro Klon 2,5 ml abgenommen und in 47,5 ml LB + Ampicillin (100 µg/ml) + Kanamycin (12 µg/ml) Medium resuspendiert und solange bei 37°C

und 200 rpm geschüttelt bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,7 erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt wurde von jedem Klon eine *nicht-induzierte* Negativprobe entnommen, nach Einstellung einer OD₆₀₀ von 0,4 in 1ml für 5 Minuten (14.000 rpm) zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in 50 µl 1×SS gelöst. Um die Proteinproduktion zu induzieren, wurde jeder Kultur 50 µl 1M IPTG (Endkonzentration 1 mM) zugegeben und weiter geschüttelt (37°C und 200 rpm). Nach der IPTG Zugabe musste jede Stunde (Stunde 1-5) je 1 ml Kultur entnommen, davon eine OD₆₀₀ von 0,4 eingestellt und dies dann zentrifugiert werden (5 Minuten, 14.000 rpm). Das Zellpellet jeder Stunde wurde dann in 50 µl 1×SS resuspendiert, während die zugehörigen Bakteriensuspensionen nach 5 Stunden Induktion bei 4000 x g für 20 Minuten zentrifugiert und ihre Pellets nach Abnahme des Überstandes tiefgefroren wurden (-20°C).

Die in 1×SS gelösten Stundenproben wurden dann zur Proteindetektion elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot und Coomassie (je Gel 20 µl Probe auftragen) sichtbar gemacht. Dieses Procedere wurde angewandt um zu überprüfen, ob die Proteinexpression in den entsprechend induzierten Klonen regelrecht stattgefunden hat.

Im Anschluss folgt die Aufreinigung des exprimierten Proteins.

2.25.2 Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA-Resin

Lösungen

Lysepuffer	6M Guanidin-HCl, 500mM NaCl, 20mM Na ₃ PO ₄ , pH 7,8
Denaturierungswaschpuffer	8M Urea, 0,5M NaCl, 20mM NaH ₂ PO ₄ , pH 5,8
Denaturierungselutionspuffer	8M Urea, 0,5M NaCl, 20mM NaH ₂ PO ₄ , pH 3,8
Imidazolelutionspuffer	250mM Imidazol, 50mM Na ₂ HPO ₄ , 300mM NaCl, pH8
EDTA	0,05M EDTA, pH8 und 0,5M EDTA, pH8
NiCl ₂	5mg/ml
NaOH	0,5M

Zellyse

Die bei -20°C tiefgefrorenen Zellpellets (s. 2.25.1) wurden 15 Minuten auf Eis aufgetaut und anschließend zuerst in 10 ml Lysepuffer resuspendiert und dann 60 Minuten auf Eis vorsichtig geschüttelt. Zu diesem Zeitpunkt wurden $12\ \mu\text{l}$ dieses Lysats entnommen, mit $60\ \mu\text{l}$ Wasser, $18\ \mu\text{l}$ $5\times\text{SS}$ vermischt und bei -20°C tiefgefroren (als Lysatprobe zur späteren Gelauftragung). Das übrige Lysat wurde für 20 Minuten bei $10.000\ \text{x g}$ (Raumtemperatur) zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und ebenfalls $12\ \mu\text{l}$ für die Gelauftragung entnommen (Verdünnung analog Lysatprobe). Der restliche Lysatüberstand wurde dann mit den gewaschenen Ni^{2+} Beads weiterverarbeitet (s.u.).

Aufarbeitung der Ni^{2+} -Beads für 500 ml Induktionskultur

1ml der Slurry Ni^{2+} Beads (Ni^{2+} -NTA-Agarose, Pro Bond, Invitrogen) wurden mit $0,5\ \text{ml}$ Lysepuffer gemischt und kurz abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands, wurde dieser Waschschrift noch zweimal wiederholt (insgesamt dreimaliges Waschen) und anschließend die gewaschene Matrix auf Eis gestellt.

Bindungsreaktion zwischen Ni^{2+} -Beads und HisTag-Proteinen

Der Lysatüberstand wurde mit den gewaschenen Ni^{2+} Beads gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Aufreinigung

Zunächst wurde das Matrix-Proteingemisch auf ein PD-10 Säulchen (von GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Schweden) gegeben. Anschließend ließ man diese langsam durchtropfen, wobei von dem entstandenen Flow-through eine Probe entnommen und für die Gelauftragung ein 1:6 Verdünnung angelegt wurde. Diese Verdünnung war nötig, um eine Ausfällungsreaktion zwischen dem SDS der sample solution und dem im Lysepuffer enthaltenen Guanidin-HCl zu verhindern. Im nächsten Schritt wurden die unspezifisch gebundenen Proteine durch Waschen der abgesetzten Beads mit $75\ \text{ml}$

Denaturierungswaschpuffer entfernt und von dem Wasch-Flow-through erneut eine Probe entnommen (wiederum 1:6 Verdünnung).

Um die spezifisch gebundenen Proteine zu isolieren, wurde 0,5 ml Denaturierungselutionspuffer auf das Säulchen gegeben, für 10 Minuten inkubiert und die anschließend durchgetropfte Lösung in ein neues Cap gegeben. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt, wobei erneut jeweils eine Probe zur Gelauftragung entnommen wurde (1:6 Verdünnung). Nach dem gleichen Prinzip erfolgte auch eine dritte und vierte Elution mit je 0,5 ml Imidazolelutionspuffer und eine fünfte Elution mit 0,5 ml 0,5M EDTA. Alle unverdünnten Eluate wurden bei 4°C gelagert, während die verdünnten Proben tiefgefroren wurden.

2.25.3 Reinigung der Ni²⁺ Beats

Zur Reinigung der Ni²⁺ Beats wurden die Säulchen nacheinander mit je 8 ml der folgenden Puffer gespült:

0,05M EDTA

0,5M NaOH

steriles H₂O

5mg/ml NiCl₂

steriles H₂O

Zur längerfristigen Lagerung bei 4°C wurde den Ni²⁺ Beats 20%iger Ethanol zugefügt.

2.25.4 HisTag-Blot

Bevor die vorbereiteten Proben (s.o.) für den Western Blot bzw. die Coomassiefärbung elektrophoretisch aufgetrennt werden konnten, mussten alle Proben für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und im Anschluss kurz auf Eis abgekühlt werden. Schließlich wurde jede Probe kurz abzentrifugiert.

Die Auftrennung erfolgte im 9%igen Trenngel bei 30 mA, der Blot auf die Nitrocellulosemembran (Protran BA85 Cellulosenitrat, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) bei 300 mA (vgl. 2.26).

Im Folgenden wurde die Membran verschiedenen Wasch- und Inkubationsschritten zugeführt:

1×TBS	10 Minuten (2×), Raumtemperatur
1×TBS/3%BSA BSA: Bovine Serum Albumine (AppliChem)	60 Minuten, Raumtemperatur
TBS Tween/Triton	10 Minuten (2×), Raumtemperatur
1×TBS	10 Minuten, Raumtemperatur
1. Antikörper Penta His Ak 1:5000 in 1×TBS/ 3% BSA	über Nacht bei 4°C
TBS Tween/Triton	10 Minuten (2×), Raumtemperatur
1×TBS	10 Minuten, Raumtemperatur
2. Antikörper Goat α-mouse 1:5000 in 1×TBS/ 10% Magermilch	60 Minuten, Raumtemperatur
TBS Tween/Triton	10 Minuten (4×), Raumtemperatur

Durch Zugabe von ECL-Entwickler wurden die Poteinbanden sichtbar gemacht (Genauerer s. 2.26).

2.26 Western Blot

Im Western Blot werden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Membran fixiert. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern können bestimmte Proteine nach Zugabe von ECL-Entwickler als Banden auf einem Film sichtbar gemacht werden.

Lösungen

Polyacrylamid	Rotiphorese Gel 30, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Temed	Tetramethylethyldiamine: Serva 35925
10% APS	10 g Ammoniumpersulfat a.d. 100 ml H ₂ O, bei -20°C lagern
Lower tris	90,85 g Tris in ca 400 ml H ₂ O lösen, pH 8,8 einstellen, 10 ml 20% SDS zugeben, ad 500 ml H ₂ O
Upper Tris	30,3 g Tris in ca. 400 ml H ₂ O lösen, pH 6,8 entellen, 10 ml 20% SDS zugeben, ad 500 ml H ₂ O
sample solution	5% β-Mercaptoethanol, 2% 20%iges SDS, 25% Glycerin, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 1 Msp. Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer	30,3 g Tris, 143,7 g Glycin, 25 ml 20% SDS, a.d. 1 l H ₂ O use: 1:10 mit H ₂ O

Blotpuffer	700 ml H ₂ O, 200 ml Methanol, 100 ml 10x Lämmli
Blockingpuffer	1xPBS, 0,1% Tween20, 5% Magermilch
1. Antikörper	Penta His Ak: 1:5000 in 1 x PBS, 0,1% Tween20, 1% Magermilch Penta His Ak 1:5000 in 1xTBS/ 3% BSA
2. Antikörper	Goat α -mouse IgG+M pox (Dianova) 1:5000 in Waschpuffer Goat α -mouse IgG+M pox (Dianova) 1:5000 in 1xTBS/ 10% Magermilch
Waschpuffer	1xPBS, 0,1% Tween20
ECL-Entwickler	ECL TM Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosences, Buckinghamshire, England

Gelzusammensetzung

Trenngel	Sammelgel
5 ml Polyacrylamidgel	0,75 ml Polyacrylamid
4 ml H ₂ O	3,25 ml H ₂ O
3 ml Lower Tris	1,25 ml Upper Tris
20 μ l Temed	20 μ l Temed
60 μ l 10%APS	35 μ l 10% APS

Das Gel wurde wie vom Hersteller der Elektrophoresekammer vorgesehen gegossen.

Probenvorbereitung

Die über Nacht auf GC-Agar kultivierten Bakterien wurden in 1x PBS eingerieben (OD_{600nm} 0,2); 1 ml der PBS-Bakteriensuspension wurde bei 13000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 μ l sample solution resuspendiert, für 10 min bei 100°C gekocht, auf Eis abgekühlt, nochmals kurz anzentrifugiert und bis zum Auftragen auf Eis gestellt.

Bis zum Erreichen des Trenngels ließ man die Proben bei 30 mA einlaufen; die nachfolgende Auftrennung erfolgte bei 40 mA.

Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Blotkammer auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA85 Cellulosenitrat, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) überführt.

Nach einstündiger schüttelnder Inkubation der Membran in Blocking Puffer wurde im nächsten Schritt der 1. Antikörper zugegeben (über Nacht bei 4°C).

Anschließend wurde die Membran zweimal fünf Minuten mit Waschpuffer gereinigt und dann für eine Stunde mit dem 2. Antikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen (dreimal fünf Minuten) wurde die Membran luftblasenfrei auf eine Glasplatte gelegt, der ECL-Entwickler entsprechend den Angaben des Herstellers daraufgegeben und schließlich mit Frischhaltefolie umwickelt. In der Dunkelkammer wurde nun ein Film aufgelegt und nach wenigen Sekunden Belichtungszeit entwickelt.

2.27 Coomassie-Gel

Um alle für den Western Blot aufgetrennten Proteinbanden sichtbar machen zu können, wurde ein Gel nicht geblottet, sondern mit Coomassie-Blau (spezifischer Proteinfarbstoff) inkubiert. Dieses Gel wurde für eine Stunde in Coomassie-Blau-Lösung gefärbt und anschließend über Nacht in ein Entfärberbad gegeben.

Commassie-Blau-Lösung	200 ml Ethanol absolut, 160 ml H ₂ O, 40 ml Eisessig, 200 mg Coomassie Brilliant Blau R 250
Entfärber	100 ml Eisessig, 200 ml Methanol, 700 ml H ₂ O

2.28 Kultur von FaDu-Zellen

2.28.1 Kulturmedien für FaDu-Zellen

Ansatz A:

490 ml EMEM
5 ml NEAA (100×)
<u>5 ml Natrium-Pyruvat (100 mM)</u>
Σ500 ml

Komplettmedium:

450 ml Ansatz A
<u>50 ml FCS (100%)</u>
Σ500 ml

Lösung X:

10 µl Zellsuspension (s. 2.26.2)
10 µl Trypanblau
<u>80 µl 1× PBS</u>
Σ100 µl

EMEM:	Eagle's Minimum Essential Medium with L-Glutamine Cambrex, Verviers, Belgien
NEAA:	Non-Essential Amino-Acids, 100× Cambrex, Verviers, Belgien
Natrium- Pyruvat:	Na-Pyruvat Solution, 100mM Cambrex, Verviers, Belgien
FCS:	Fetal Bovine Serum Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypanblau:	Trypanblau 0,5% in NaCl Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.28.2 Kulturbedingungen FaDu-Zellen

FaDu-Zellen, beschrieben von S. R. Rangan [64], wurden aus einem Hypopharynxkarzinom eines Patienten isoliert. Sie stellen damit veränderte Epithelzellen dar und wurden in dieser Arbeit verwendet, um die Interaktion zwischen Meningokokken und Pharynx-Epithelzellen zu untersuchen.

Die bei Lieferung tiefgefrorenen (-80°C) FaDu-Zellen (American Type Culture Collection, Manassas, USA) wurden schnell in einem Wasserbad (37°C) aufgetaut und nach Zugabe von 50 ml Komplettmedium für 5 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Um das im Einfriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen, wurde nach dem Zentrifugieren der Überstand abgenommen und das Pellet in 20 ml Komplettmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in eine Zellkulturflasche überführt und in den Brutschrank (37°C/5%CO₂) gestellt. Nachdem ungefähr 90% der Zellen eine Monolayer gebildet hatten (nach etwa 4-5 Tagen), erfolgte das Splitten der Zellen.

2.28.3 Splitten der Zellen

Um die Zellen zu Splitten wurden nach Abziehen des alten Mediums und zweimaligem Waschen der Zellen mit vorgewärmtem 1 x PBS, 1-2 ml Trypsinlösung (Trypsin/EDTA Solution (0,05%/0,02%) in PBS, BiochromAG, Berlin) in die Kulturflasche gegeben und diese für ca. 5 Minuten in den Brutschrank (37°C, 5% CO₂) gestellt. Durch die Zugabe des Trypsins lösten sich die Zellen, die zuvor am Flaschenboden ein Zelllayer gebildet hatten. Im

Anschluss wurden 20 ml frisches Komplettmedium zugegeben, 5-7 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes erneut 20 ml Komplettmedium zugegeben. Aus dieser Zellsuspension wurden 10 μ l entnommen und der Lösung X zugefügt (Zusammensetzung s.o.). 10 μ l der Lösung X wurden gezählt (Neubauerzählkammer), die übrige Zellsuspension auf neue Flaschen zur Weiterkultivierung verteilt bzw. für den Infektionsversuch vorbereitet (s. 2.29.2).

2.29 Infektionsversuch mit FaDu-Zellen

2.29.1 Prinzip des Infektionsversuches

Dieser Infektionsversuch untersuchte, in welchem Ausmaß verschiedene Stämme von *N. meningitidis* an FaDu-Zellen (Hypopharynxkarzinom) binden. Dazu wurde auf eine Monolayer-Schicht von FaDu-Zellen eine definierte Menge Bakterien gegeben. In einem bestimmten Zeitraum konnten nun die Bakterien an die Zellen adhären. Danach wurde der Überstand, der die nicht adhären Bakterien enthielt, abgenommen und in bestimmten Verdünnungen ausplattiert. Die zurückgebliebenen adhären Bakterien wurden mit Hilfe von 1% Saponin in RPMI, welches Zellen lysiert, von den Zellen gelöst. Durch die Lyse der Zellen wurden auch die intrazellulär vorhandenen Bakterien als adhären mitgezählt, wobei sich in vergleichbaren Experimenten in der Regel weniger als 1 % der adhären Bakterien tatsächlich intrazellulär befanden. Auch von der eben beschriebenen Bakteriensuspension wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und ausplattiert. Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden gezählt und das Verhältnis der Anzahl der adhären zur Gesamtzahl der im well vorhandenen Bakterien gebildet.

Der sich ergebende Prozentwert gilt als Maß für die Adhärenzfähigkeit eines Meningokokkenstammes an Epithelzellen.

2.29.2. Durchführung

Benötigte Materialien/Medien.

RPMI1640
96-well Mikrotitrier-Platten
Saponin 1% in RPMI
Vorgewärmtes 1× PBS

Vorbereitungen:

- 1) 3 Tage vor dem Versuch wurden die FaDu-Zellen kultiviert und für den Infktionsversuch vorbereitet.
- 2) Die zu testenden Bakterienstämme wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ auf GC-Agar kultiviert.
- 3) In 96-well-Platten wurden Verdünnungsreihen vorgelegt: je 180µl 1xPBS pro well.

Zunächst wurden die kultivierten und gesplitteten FaDu-Zellen in der Neubauerkammer gezählt und die Zellsuspension so verdünnt, dass sich eine Konzentration von $1,5-2,5 \times 10^5$ Zellen pro ml ergab. Davon wurden nun pro Bakterienstamm 3 mal je 100 µl pro well in eine 96-well-Platte gegeben und diese für 2-3 Tage bei 37°C, 5% CO₂ einen Brutschrank gestellt.

Als die Zellen konfluent waren, wurde das Kompletmedium abgezogen, die Zellkulturschalen mit vorgewärmtem 1xPBS gespült und 100 µl RPMI jedem well zugefügt. Die 96-well-Platte wurde bis zum Infktionsversuch bei 37°C, 5% CO₂ gelagert.

Die über Nacht kultivierten Bakterien wurden in 10 ml RPMI angeimpft und für ca. 2 Stunden bei 37°C in den Schüttler (200rpm) gestellt. Dann wurde die optische Dichte (OD_{600nm}) gemessen und eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Diese Bakteriensuspension wurde mit RPMI 1:10 verdünnt. Somit ergab sich für die zu verwendende Bakteriensuspension eine OD von 0,01, was 10^7 Bakterien pro ml entsprach.

Nach diesen Vorbereitungen wurden die FaDu-Zellen mit 100µl Bakteriensuspension (OD_{600nm} 0,01) infiziert. Dies ergab eine multiplicity of

infection (MOI) von 10, d.h. auf eine Zelle kamen 10 Bakterien. Es folgte eine fünfstündige Inkubation bei 37°C/5%CO₂. Danach wurden die 200µl Überstand abgenommen, auf die vorbereiteten 96-well-Schalen (s. 3 bei Vorbereitungen) überführt und eine Verdünnungsreihe erstellt. Die abgenommenen Suspensionen wurden in 10er Schritten auf 10⁻⁵ verdünnt; je 100µl der Verdünnungsstufe -3, -4, -5 wurden anschließend auf GC-Agar ausplattiert.

Die wells, in denen die Inkubation erfolgte, wurden zunächst zweimal mit je 200µl RPMI gespült, um alle verbliebenen Bakterien zu entfernen. Anschließend wurden 200µl 1%Saponin in RPMI zugegeben und die Platte für weitere 10 min inkubiert (37°C/5%CO₂). Auch diese Suspension, die lysierte Zellen und vorher adhärenente Bakterien enthielt, wurde abgenommen, eine Verdünnungsreihe erstellt und ausplattiert.

Zudem wurden Kontrollplatten erstellt. Hierfür wurden je 100µl einer 10^{-3/-4/-5} Verdünnung der reinen Bakteriensuspension (OD_{600nm} 0,01) ausplattiert. Die GC-Platten wurden über Nacht bei 37°C/5% CO₂ bebrütet und am nächsten Tag die gewachsenen Einzelkolonien gezählt.

2.29.3. Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel. Dabei wurden die Mittelwerte aus den jeweils 3 gleichen Verdünnungsstufen und anschließend der Mittelwert aus den Verdünnungsstufen -3, -4, -5 durch Einberechnen des Verdünnungsfaktors ermittelt. Somit ergab sich für jeden Stamm ein Wert für die Anzahl der adhärenenten und ein Wert für die Anzahl der nicht adhärenenten Bakterien.

Das Verhältnis von adhärenenten Bakterien zur Gesamtzahl der im well befindlichen Bakterien ergab ein Maß für die Adhärenz.

$$\text{Adhärenz} = \frac{\text{Adhärenente Bakterien}}{(\text{Adhärenente} + \text{nicht adhärenente Bakterien})} \times 100$$

Für jedes Experiment wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

2.30 Software und Internetressourcen

2.30.1 Software

Adobe Photoshop 7.0.; Adobe Systems inc.

Microsoft Word 7.0., Word 2000; Microsoft Inc. (Textverarbeitung)

Microsoft Powerpoint 2000, Microsoft Inc. (Graphik)

Microsoft Excel 2000, Microsoft Inc. (Statistiken)

Sequence Navigator 1.0.1; Perkin Elmer (Sequenzanalysen)

2.30.2 Internetressourcen

www.ncbi.nlm.nih.gov Homepage des National Center for Biotechnology

Information mit Links zu GenBEnk und online Blast

<http://pubmlst.org/neisseria> Seite für MLST von *Neisseria*

www.rki.de Offizielle Homepage des Robert-Koch-Institutes

Die Literaturrecherche erfolgte mit Medline über den Server der Universität
Würzburg

3. Ergebnisse

3.1 Verteilung ausgewählter *hrpB* Gene in den Meningokokkenstämmen einer Trägerstudie

Eines der Ziele dieser Arbeit war es herauszufinden, ob es sich bei den Genen NMC0443 und NMB1762 tatsächlich um die vermuteten *hrpB* Gene der *hrpAs* NMC0444 und NMB1768 handelt. In diesem Zusammenhang wurde die Verteilung der putativen Transportgene NMC0443 (*hrpB*, FAM18) und NMB1762 (*hrpB*, MC58) in Dot Blot Hybridisierungen untersucht.

Für die Detektion von NMB1762 und NMC0443 bei den 830 Trägerisolaten wurden Sonden erstellt, die nahezu das gesamte Gen umfassen. Die Spezifität

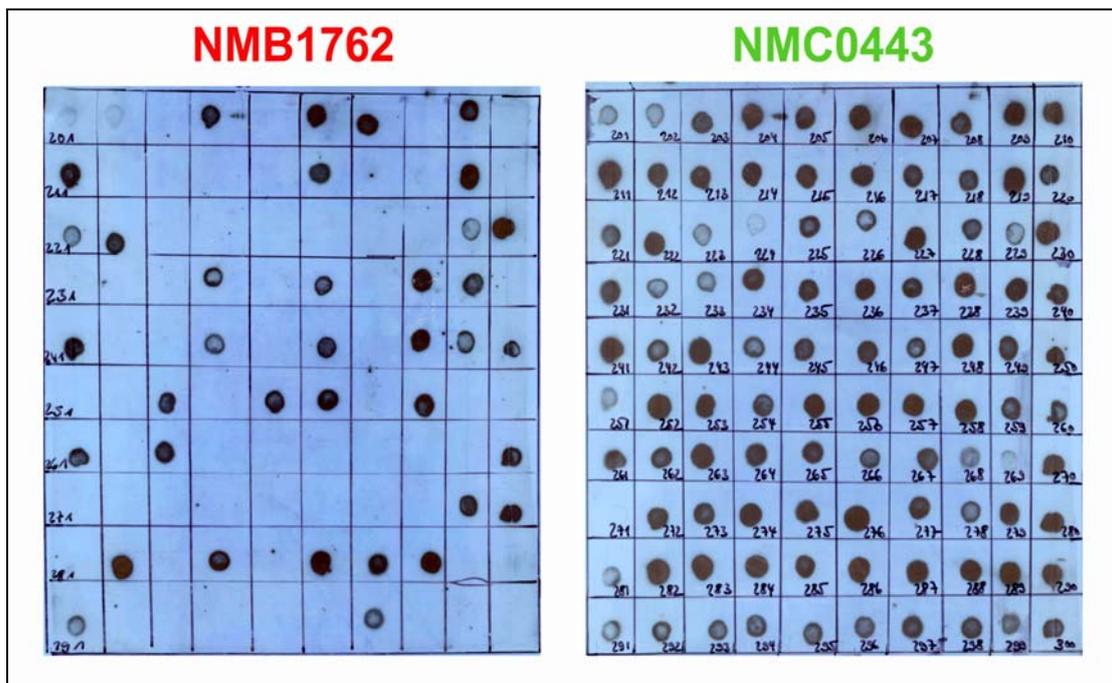


Abbildung 5: Dot Blot der Stämme α 201 - α 300 mit je einer Sonde für die HrpBs NMB1762 und NMC0443 hybridisiert.

der Sonden wurde durch Sequenzierung des entsprechenden PCR-Produkts und anschließende Hybridisierung mit Stämmen, bei denen das Vorkommen der untersuchten *hrpB* Gene bekannt ist (da die komplette Genomsequenz publiziert ist), überprüft. Im Einzelnen wurde eine solche Kontroll-Hybridisierung beim MC58 (Serogruppe B), Z-2491 (Serogruppe A), FAM18 (Serogruppe C)

und $\alpha 14$ (cni) durchgeführt. Darüber hinaus diente eine Hybridisierung mit der *hrpB*-Deletionismutante 3838 (2120 $\Delta siaD \Delta NMC0443$) als Negativkontrolle.

In Abbildung 5 sind die Dot Blots der Stämme α 201-300 nach Hybridisierung mit den beiden Sonden exemplarisch gezeigt. Eine vollständige Tabelle mit den Hybridisierungsergebnissen für NMB1762 und NMC0443 findet sich im Anhang.

3.1.1 Nachweis eines TPS Systems in Meningokokkenstämmen verschiedener klonaler Komplexe

In den von M. Bösl durchgeführten Dot Blot Hybridisierungen blieben 116 von 690 untersuchten Stämmen (16,8%) für alle vier *hrpA* Gene (NMB0497/1779, NMB1768, NMB0493 und NMB1214) negativ [61]. Genauer betrachtet handelte es sich bei 78,5% (91/116) der Stämme um solche mit Kapsel-null-Locus (cni), die nicht-hypervirulenten klonalen Komplexen zugeordnet werden.

Um zu überprüfen, ob diese Stämme tatsächlich kein TPS System aufweisen, oder ob die von M. Bösl verwendeten Sonden aufgrund ihrer Spezifität dieses nicht detektieren konnten, wurden diese Stämme nun mit der für NMC0443 spezifischen Sonde hybridisiert. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da die *hrpB* Gene im Gegensatz zu den *hrpA* Genen in den sequenzierten Genomen hochkonserviert sind und damit eine Detektion des TPS System über den *hrpB* Nachweis wahrscheinlicher schien.

Von den 116 für die MC58 *hrpA*s negativen Stämmen zeigten 113 Stämme (97,6%) ein positives Hybridisierungsergebnis für NMC0443. Allein drei Stämme $\alpha 174$, $\alpha 181$ und $\alpha 269$ zeigten im Dot Blot für NMC0443 keine positive Reaktion. Diese Beobachtung bestätigt die Hypothese, dass die im MC58 *hrpA* Gen Screening [61] negativ gebliebenen Stämme offensichtlich doch ein TPS System besitzen, welches die verwendeten *hrpA* Sonden nicht detektieren konnten. Dies lag vermutlich daran, dass die Sequenzhomologien zwischen den derzeit bekannten *hrpA* Genen vor allem N-terminal zu finden sind (z.B. *hrpA* des Stammes MC58 NMB0497/1779 und das *hrpA* des Stammes FAM18 NMC0444), während C-terminal doch deutliche Variationen auftreten; dies erklärt warum möglicherweise putativ vorhandene *hrpA* Gene mit der NMB0497/1779 spezifischen Sonde nicht erkannt werden konnten.

Die spezifisch für NMC0443 durchgeführten Dot Blots konnten nun zeigen, dass in den untersuchten 116 Stämmen ein zu NMC0443 homologes *hrpB* Gen vorkommt. Ausgehend von der allgemeinen Regel des TPS Systems, dass zu jedem *hrpB* auch ein zugehöriges *hrpA* gehört [54], wurden deshalb im Folgenden von allen 830 Trägerisolaten die Dot Blots des *hrpB* NMC0443 dem putativ zugehörigen *hrpA* NMC0444 (bzw. dem hierzu zu 100%homologen NMB1780) gegenübergestellt und die Verteilungsmuster analysiert.

Von 830 durchgeführten NMC0443 Dot Blots konnten 819 (98,4%) ausgewertet werden. Dabei zeigten 806 Proben (98,4%) eindeutig positive Hybridisierungsergebnisse; bei den 13 negativen/uneindeutigen Stämmen wurden PCRs durchgeführt (s. Kapitel 3.1.2).

Im direkten Vergleich der NMC0443 Dot Blots mit denen von NMB1779/0497 konnten von den ursprünglich 830 Proben nur 675 (81,3%) ausgewertet werden, da bei den NMB 1779/0497 Dot Blots 155 Stämme kein eindeutiges Ergebnis zeigten. Auch hier ergaben 75,3% der verglichenen Stämme positive Signale für beide Gene, zeigten also die Präsenz eines kompletten TPS Systems an. Ein einziger Stamm blieb für NMB1779/0497 und NMC0443 negativ. 154 Stämme (22,8%) waren bei positivem Resultat für NMC0443 im NMB1779/0497 Blot negativ, während 12 Stämme positiv für NMB1779/0497 und negativ/uneindeutig für NMC0443 hybridisierten.

Zur besseren Übersicht der Ergebnisse wurden die häufigsten hypervirulenten (Tabelle 5) und nicht-hypervirulenten (Tabelle 6) Komplexe genauer betrachtet: 100 % des ST-8 und ST-11 Komplexes, 88 % des ST-23, 95% des ST-32 und 92% des ST-41/44 Komplexes ergaben positive Hybridisierungsergebnisse mit den Sonden für NMB1779 und NMC0443 (Tabelle 5).

Insgesamt 7,8% der hypervirulenten Stämme zeigten ein positives Signal mit der Sonde für NMC0443, nicht jedoch für NMB1779. Ein einziger Stamm (α 165, ST-23) ließ trotz positiven Signals mit der Sonde für NMB1779 keine Reaktion im Dot Blot mit der Sonde für NMC0443 erkennen.

Bei den nicht-hypervirulenten klonalen Komplexen unterschieden sich die mit Kapsel Null Locus (*cnI*) bezüglich der Blotreaktionen von NMB1779 und NMC0443 deutlich von den übrigen klonalen Komplexen (ST-22, ST-60, ST-

162). Letztere zeigten überwiegend - das heißt 94 % der ST-22 Stämme, 88% der ST-60 Stämme und 90% der ST-162 Stämme – positive Hybridisierungsergebnisse für beide Gene wie dies auch bei den hypervirulenten Komplexen zu beobachten war. Nur 9,1% der Stämme dieser drei klonalen Komplexe ergaben ein negatives oder ungleiches Resultat für NMB1779 und NMC0443. Bei der Mehrheit (104 Stämme) der 119 Stämmen der *cnl*-Komplexe dagegen fand sich kein Signal für NMB1779 bei gleichzeitig positivem Nachweis von NMC0443 (Tabelle 6). Einzige Ausnahme stellte der ST-845 Komplex dar, der mit 10 von 11 Stämmen für beide Gene positiv war.

Tabelle 5: Verteilung der Dot Blot-Ergebnisse von NMB1779 und NMC0443 in hypervirulenten Komplexen

klonaler Komplex	Serogruppe (Genotyp)	Anzahl (Prozent)	NMB1779	NMC0443
ST-8	C	2/2 (100)	+	+
ST-11	C, W	3/3 (100)	+	+
ST-23	Y, NG	53/60 (88)	+	+
ST-23	Y, NG	6/60 (10)	-	+
ST-23	Y	1/60 (2)	+	-
ST-32	B	37/39 (95)	+	+
ST-32	B	2/39 (5)	-	+
ST-41/44	B, C, <i>cnl</i> , Y, NG	104/113 (92)	+	+
ST-41/44	B	9/113 (8)	-	+

(+ = Hybridisierung positiv; - = Hybridisierung negativ)

Von allen 207 ausgewerteten nicht-hypervirulenten Stämmen ergab sich nur für drei Stämme (α 700 und α 793, ST-60; α 359, ST-162) ein negatives Ergebnis der NMC0443 Hybridisierung. Für diese drei Stämme und für den oben erwähnten hypervirulenten α 165 (ST-23) wurden PCRs durchgeführt, die im Kapitel 3.1.2 ausführlich beschrieben sind.

Aufgrund der negativen Hybridisierungen mit der Sonde für NMB1779 bei gleichzeitig positivem NMC0443 wurde angenommen, dass die für NMB1779 spezifische Sonde das in den Kapsel Null locus Komplexen vermutete *hrpA*-Homolog aufgrund der unvollständigen Homologien zwischen beiden Genen nicht detektieren konnte.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden 10 Stämme der negativ/fraglich - positiv Konstellation ausgewählt (Tabelle 7) und repräsentativ PCRs durchgeführt (s. Kapitel 3.1.2).

Tabelle 6: Verteilung der Dot Blot-Ergebnisse von NMB1779 und NMC0443 in nicht-hypervirulenten Komplexen

Klonaler Komplex	Serogruppe (Genotyp)	Anzahl (Prozent)	NMB1779	NMC0443
ST-22	W, Y, Z, NG	30/32 (94)	+	+
ST-22	W	2/32 (6)	-	+
ST-60	29 E, Y, NG	24/27 (88)	+	+
ST-60	29E	1/27 (4)	-	+
ST-60	29E	1/27 (4)	-	-
ST-60	NG	1/27(4)	+	-
ST-162	B	26/29 (90)	+	+
ST-162	B	2/29 (7)	-	+
ST-162	B	1/29 (3)	+	-
ST-53	cnl	47/50 (94)	-	+
ST-53	cnl	3/50 (6)	+	+
ST-198	cnl	39/40 (97,5)	-	+
ST-198	cnl	1/40 (2,5)	+	+
ST-845	cnl	10/11 (91)	+	+
ST-845	cnl	1/11 (9)	-	+
ST-1117	cnl	15/16 (94)	-	+
ST-1117	cnl	1/16 (6)	+	+
ST-1136	cnl	2/2 (100)	-	+

(+ = Hybridisierung positiv; - = Hybridisierung negativ)

Tabelle 7: Auswahl an Kapsel Null Locus Stämmen (cnl), die im Dot Blot negativ für das *hrpA* (NMB1779) und positiv für das *hrpB* (NMC0443) waren.

klonaler Komplex	alpha	Serogruppe (Genotyp)	Dot Blot		PCR
			NMB1779	NMC0443	PCR NMC0444-0443
ST-53	42	cnl	0	+	+
ST-53	60	cnl	0	+	+
ST-198	55	cnl	-	+	+
ST-198	299	cnl	-	+	+
ST-198	339	cnl	-	+	+
ST-845	30	cnl	0	+	+
ST-845	62	cnl	-	+	+
ST-1117	333	cnl	0	+	+
ST-1117	598	cnl	-	+	+
ST-1117	215	cnl	0	+	+

(+ = Hybridisierung/PCR positiv; - = Hybridisierung negativ; 0 = Hybridisierung nicht eindeutig)

3.1.2 PCR Ergebnisse zur Verteilung von NMC0443

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 830 Meningokokkenträgerisolate mit einer Sonde spezifisch für NMC0443 hybridisiert (s. Kapitel 3.1). 8 Stämme waren dabei nicht eindeutig zuzuordnen, 5 weitere Stämme negativ; für diese 13 Stämme und die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen 10 ausgewählten Kapsel Null Locus Stämme (Tabelle 7) wurden PCRs durchgeführt. Der *forward* Primer wurde so gewählt, dass er das 3' Ende der hoch-konservierten *hrpB* Gene (entsprechende Nukleotide im NMC0443 sind 1641 bis 1663) erkennen konnte, während der *reverse* Primer für eine Sequenz in der Sekretionsdomäne (Vorkommen in allen *hrpA* Genen) des NMC0444 (Nukleotide 501 bis 520) konstruiert wurde.

Für alle im Dot Blot fragwürdigen oder negativen Stämme erwies sich die PCR als positiv (Tabelle 8). Einzige Ausnahme bildete der Stamm α 823 (ST-772), der sowohl in der Hybridisierung, als auch in der PCR negativ blieb.

Dieses Ergebnis zeigt, dass in allen untersuchten klonalen Komplexen (Tabelle 8) ein TPS-System vorhanden ist. Darüber hinaus beweist das Ergebnis der PCR, dass im TPS-System der Meningokokken das *hrpA* Gen und sein *hrpB* Gen grundsätzlich nebeneinander liegen.

Eine Übersicht über alle NMC0443 Hybridisierungsergebnisse einschließlich durchgeführter PCRs findet sich im Anhang.

Tabelle 8: Ergebnisse der PCR für im Dot Blot (NMC0443) negative Stämme

Klonaler Komplex	Anzahl (alpha-Stamm)	Dot Blot		PCR	
		NMC0443		NMC0444-0443	
ST-23	1 (165)	-		+	
ST-60	2 (700, 793)	-		+	
ST-89	1 (636)	0		+	
ST-162	1 (359)	-		+	
ST-254	1 (388)	0		+	
ST-774	1 (706)	0		+	
	1 (823)	0		-	
ST-949	3 (174, 181, 269)	0		+	
---	1 (694)	0		+	
---	1 (837)	-		+	

(- = Hybridisierung/PCR negativ; + = PCR positiv; 0 = Ergebnis nicht eindeutig)

3.1.3 Korrelation zwischen der Anwesenheit des putativen Transportgens NMB1762 (*hrpB*) und dem *hrpA* NMB1768

Um die Verteilung des *hrpA* Gens NMB1768 und des putativ zugehörigen Transportgens NMB1762 untersuchen zu können wurden Dot Blots für NMB1762 angefertigt und analog Kapitel 3.3.1 die Hybridisierungsergebnisse mit denen der NMB1768-Blots [61] verglichen.

Von 830 untersuchten Stämmen konnten 772 ausgewertet werden (93 %). Dabei zeigten insgesamt 486 Stämme (62,9%) ein negatives Hybridisierungsergebnis sowohl für das *hrpA* Gen NMB1768 als auch für seinen putativen Transporter NMB1762 und 286 Stämme (37,1%) ein für beide Gene positives Resultat.

Im Folgenden wurden die Ergebnisse einiger häufiger hypervirulenter klonaler Komplexe separat betrachtet (Tabelle 9) und den häufigsten nicht-hypervirulenten Komplexen (Tabelle 10) gegenübergestellt. Von den 257 Stämmen, die zu den hypervirulenten klonalen Komplexen ST-8, ST-11, ST-23, ST-32 und ST-41/44 gehören, ergaben 241 (93,8%) eindeutige Ergebnisse.

Tabelle 9: Verteilung der Dot-Blot-Ergebnisse von NMB1768 und NMB1762 in hypervirulenten Komplexen

Klonaler Komplex	Serogruppe (Genotyp)	Anzahl (Prozent)	NMB1768	NMB1762
ST-8	C	2/2 (100)	-	-
ST-11	C, W	8/8 (100)	-	-
ST-23	Y, NG	70/71 (99)	-	-
ST-23	Y	1/71 (1)	-	+
ST-32	B	34/41 (83)	+	+
ST-32	B	6/41 (15)	0	+
ST-32	B	1/41 (2)	-	-
ST-41/44	B, C, cnl, Y, NG	91/135 (67)	+	+
ST-41/44	B	31/135 (23)	-	-
ST-41/44	B	10/135 (7)	0/-	+
ST-41/44	B	3/135 (2)	+	-

(+ = Hybridisierung positiv; - = Hybridisierung negativ; 0 = Ergebnis nicht eindeutig)

43,8% der untersuchten hypervirulenten Stämme zeigten ein negatives Hybridisierungsergebnis für NMB1768 (*hrpA*) und sein putatives Transportgen NMB1762 (*hrpB*), während 48,8% für beide Gene eine positive Reaktion aufwiesen. Bei den 7,8 % der Stämme, für die entweder keine eindeutig positive

bzw. negative Zuordnung möglich war oder die Dot Blots für NMB1768 und NMB1762 nicht einheitlich positiv/negativ waren, wurden PCRs zur eindeutigen Klärung durchgeführt (Genauerer hierzu s. Kapitel 3.1.4).

Analog dem Vorgehen bei den hypervirulenten Komplexen, wurde eine Gegenüberstellung der NMB1768- und NMB1762-Dot Blot Ergebnisse für die häufigsten nicht-hypervirulenten Komplexe vorgenommen (Tabelle 10).

Von 236 untersuchten Stämme der nicht-hypervirulenten Komplexe ST-22, ST-60, ST-162, ST-53, ST-198, ST-845, ST-1117, ST-1136 konnten alle 236 (100%) eindeutig einem positiven/negativem Resultat zugeordnet werden.

Bei 234 Stämmen (99,2%) waren die Dot Blots einheitlich korreliert (Tabelle 10): Die Stämme der klonalen Komplexe ST-22, ST-162, ST-53, ST-1117 und ST-1136 zeigten alle zu jeweils 100 % negative Dot Blot-Ergebnisse für NMB1768 (*hrpA*) und für NMB1762 (*hrpB*). Bei ST-60 waren 27 von 32 Stämmen (84%) für beide Gene negativ, bei ST-198 43 von 44 Stämmen (98%). Allein beim ST-845 Komplex ergaben 11 von 12 (92%) für NMB1768 und NMB1762 positive Signale. Die beiden uneinheitlich korrelierten Stämme α 687 (ST-60) und α 701 (ST-198) wurde wie bei den hypervirulenten Stämmen einer PCR zugeführt (s. Kapitel 3.1.4).

Tabelle 10: Verteilung von NMB1768 und NMB1762 in nicht-hypervirulenten Komplexen

klonaler Komplex	Serogruppe (Genotyp)	Anzahl (Prozent)	NMB1768	NMB1762
ST-22	W, Y, Z, NG	37/37 (100)	-	-
ST-60	29 E, Y, NG	27/32 (84)	-	-
ST-60	29E, Y, NG	4/32 (13)	+	+
ST-60	NG	1/32 (3)	-	+
ST-162	B	32/32 (100)	-	-
ST-53	cnI	57/57 (100)	-	-
ST-198	cnI	43/44 (98)	-	-
ST-198	cnI	1/44 (2)	-	+
ST-845	cnI	11/12 (92)	+	+
ST-845	cnI	1/12 (8)	-	-
ST-1117	cnI	18/18 (100)	-	-
ST-1136	cnI	4/4 (100)	-	-

(+ = Hybridisierung positiv; - = Hybridisierung negativ)

Insgesamt blieben also 92,8% der nicht-hypervirulenten Komplexe für beide Gene im Dot Blot negativ und nur 6,4% der Stämme zeigten eine positive

Reaktion für NMB1768 und NMB1762. Zum Vergleich war der Prozentsatz positiver Hybridisierungsergebnisse bei den hypervirulenten Stämmen mit 48,8% (s.o.) gegenüber 6,4% bei den nicht-hypervirulenten Stämmen deutlich höher.

Eine ausführliche Tabelle mit allen Dot Blot Ergebnissen findet sich im Anhang.

3.1.4 PCR Ergebnisse des NMB1762 – NMB1768 Vergleichs

Wie bereits in Kapitel 3.1.3 erwähnt, wurde für alle uneindeutigen Hybridisierungen und für solche, die zu keinem einheitlich positivem oder negativem Ergebnis für die Gene NMB1768 und NMB1762 führten, eine PCR durchgeführt. Die Primer waren so konstruiert, dass sie jeweils spezifisch für NMB1768 waren, bei den Stämmen, die im Dot Blot hierfür negativ ausfielen und spezifisch für NMB1762 bei den Stämmen, die negative Ergebnisse im NMB1762 Dot Blot zeigten (Tabelle 11).

6 Stämme wiesen im Dot Blot ein positives Signal für NMB1768 bei gleichzeitig negativer Reaktion für NMB1762 auf. Alle für diese Stämme mit NMB1762 spezifischen Primern angesetzten PCRs bestätigten die Anwesenheit des Gens.

Weiterhin ergaben 38 Stämme im Dot Blot ein positives Ergebnis für NMB1762, blieben jedoch für NMB1768 negativ oder nicht sicher zuzuordnen.

Analog wurden auch hier NMB1768 spezifische PCRs durchgeführt, die bis auf eine Ausnahme (α 796, ST-167) alle positiv ausfielen (Tabelle 11).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für alle im Dot Blot uneinheitlichen Stämme durch die PCR gezeigt werden konnte, dass NMB1768-positive Stämme auch für NMB1762 positiv sind. Ebenso zeigten die für NMB1762 positiven Proben positive Ergebnisse für NMB1768 (mit nur einer Ausnahme für ein Isolat des ST-167 Komplexes). Es kann daher vermutet werden, dass auch das NMB1762 Gen (als *hrpB*) und sein zugehöriges NMB1768 (als *hrpA*) ein TPS System darstellen.

Eine detaillierte Übersicht aller fraglichen Stämme und ihrer Hybridisierungs-/PCR-Ergebnisse ist im Anhang einzusehen.

Tabelle 11: Ergebnisse der PCR für im Dot Blot (NMB1768 bzw. NMB1762) negative Stämme

Klonaler Komplex	Anzahl	Dot Blot		PCR	
		NMB1768	NMB1762	NMB1768	NMB1762
ST-23	1	-	+	+	/
ST-32	6	0	+	+	/
ST-35	2	0	+	+	/
ST-41/44	7	0	+	+	/
ST-41/44	2	-	+	+	/
ST-41/44	2	+	-	/	+
ST-60	1	-	+	+	/
ST-99	1	-	+	+	/
ST-167	1	-	+	-	/
ST-198	1	-	+	+	/
ST-254	1	0	+	+	/
ST-364	1	-	+	+	/
ST-778	1	0	+	+	/
ST-939	3	0	+	+	/
ST-939	2	+	0	/	+
ST-974	1	-	+	+	/
ST-974	1	+	-	/	+
--- ¹⁾	1	+	-	/	+
--- ¹⁾	7	0	+	+	/
--- ¹⁾	2	-	+	+	/

(+ = Hybridisierung/PCR positiv; - = Hybridisierung/PCR negativ; 0 = Ergebnis nicht eindeutig;

/ = keine PCR durchgeführt, da Stamm bereits im Dot Blot positiv)

¹⁾ Stämme, die keinem klonalen Komplex zugeordnet werden können

3.2 Expressionsanalyse der *hrpBs* in verschiedenen klonalen Komplexen

Im vorigen Kapitel wurde die Verteilung der beiden *phaC* homologen Gene NMB1762 und NMC0443 in den häufigsten klonalen Komplexen der Meningokokkenträgerstudie analysiert. Da mit dieser Untersuchung jedoch keinerlei Aussage darüber getroffen werden konnte, ob die beiden Gene von den positiv getesteten Stämmen auch exprimiert werden, wurden Expressionsexperimente mittels RT-PCR durchgeführt.

Zunächst wurden PCRs von genomischer DNA des Stammes MC58 (für NMB1762) und 2120 (für NMC0444-0443) durchgeführt, um die Funktion der Primer zu überprüfen. Im Anschluss wurden RT-PCRs angesetzt, mit denen sich bei beiden Stämmen die Expression der untersuchten Gene nachweisen

ließ. Durch einen PCR-Ansatz mit RNA wurde eine Verunreinigung der aufgereinigten RNA mit DNA ausgeschlossen.

Tabelle 12: Ergebnisse der RT-PCR für NMB1762 bzw. NMC0444-0443 in ausgewählten klonalen Komplexen

klonaler Komplex	Stamm	RT-PCR NMB1762
ST-32	MC58	+
ST-18	$\alpha 2$	+
ST-35	$\alpha 279$	+
ST-41/44	$\alpha 16$	+
ST-269	$\alpha 11$	+
ST-791	$\alpha 366$	+
ST-793	$\alpha 193$	+
ST-845	$\alpha 634$	+
ST-910	$\alpha 15$	+
ST-939	$\alpha 184$	+
klonaler Komplex	Stamm	RT-PCR NMC0444-0443
ST-11	2120	+
ST-8	$\alpha 198$	+
ST11	$\alpha 223$	+
ST-41/44	$\alpha 16$	+
ST-53	$\alpha 14$	+
ST-60	$\alpha 7$	+
ST-162	$\alpha 13$	+
ST-198	$\alpha 55$	+
ST-845	$\alpha 30$	+
ST-1117	$\alpha 333$	+

+ = RT-PCR/PCR positiv; - = RT-PCR/PCR negativ

Exemplarisch wurden für häufig vorkommende klonale Komplexe der Trägerstudie bei 9 Stämmen RT-PCRs zur Expressionsprüfung von NMB1762 durchgeführt (Abbildung 6). Alle neun ausgewählten Stämme (Tabelle 12) zeigten positive Ergebnisse für NMB1762, während die PCR mit RNA als Template zum Ausschluss einer Verunreinigung der RNA mit DNA negativ ausfiel.

Im Gegensatz zu den RT-PCRs zum Nachweis der Expression von NMB1762, wurde das *hrpB* des C-Stamms NMC0443 mit Primern getestet, die das zugehörige *hrpA* NMC0444 mit umfassten. Dabei erkannte der *forward* Primer das 3' Ende des *hrpB* Gens NMC0443 und der *reverse* Primer eine konservierte Region am 5' Ende des *hrpA* Gens NMC0444. Auch hier wurden RT-PCRs von

9 Stämmen häufiger klonaler Komplexe angesetzt. Üblicherweise sind beim TPS System die Gene, die für das sezernierte Protein TpsA und das zugehörige Transportprotein TpsB kodieren in einem Operon organisiert [53].

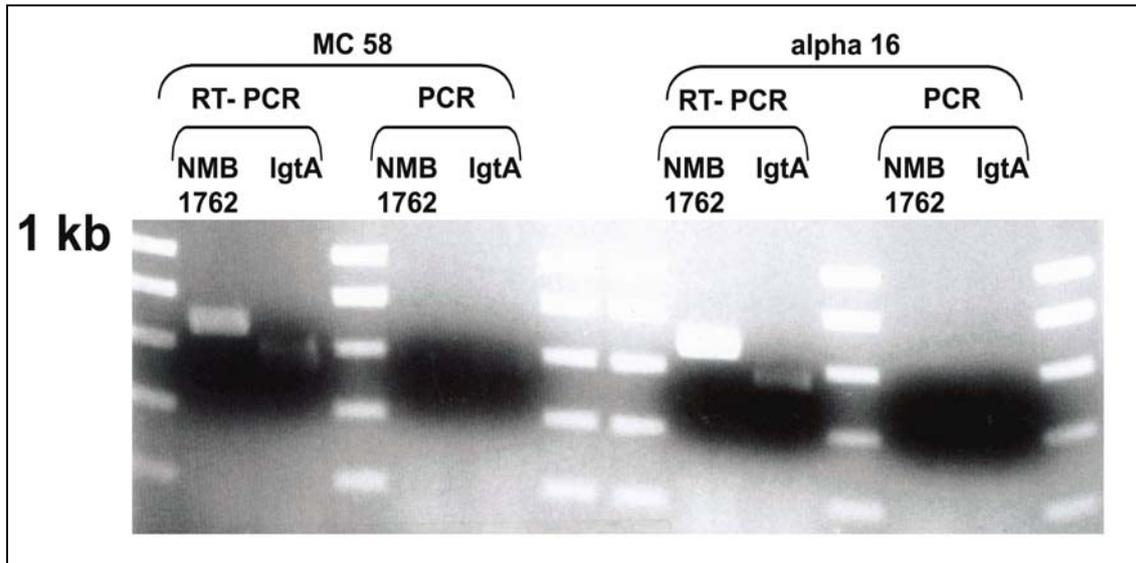


Abbildung 6: RT-PCRs der Stämme MC58 und α 16 zum Nachweis der NMB1762-Expression

Alle für NMC0444-0443 untersuchten Stämme ergaben positive RT-PCR-Resultate und ließen damit diese typische Operonstruktur erkennen, ein weiterer Hinweis dafür, dass das TPS System auch in *N. meningitidis* konserviert ist. Auch die durchgeführte Positivkontrolle (IgtA RT-PCR) und Kontroll-PCR von DNA und RNA fielen regelrecht aus (Abbildung 7).

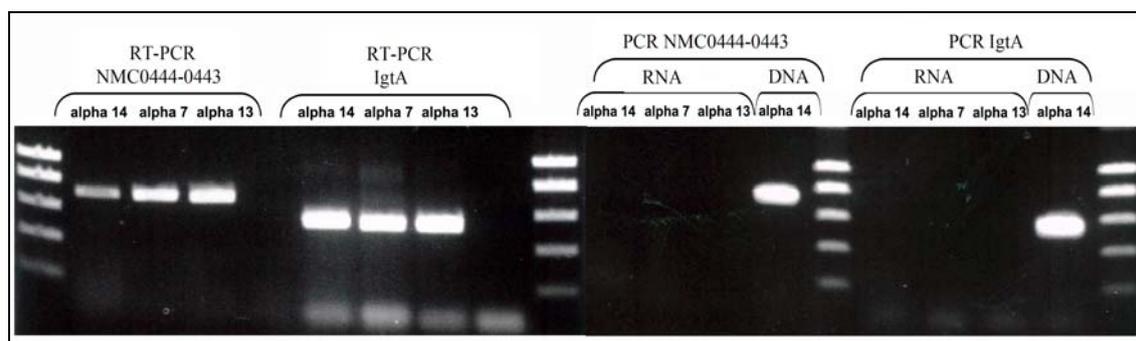


Abbildung 7: RT-PCR der Stämme α 7, α 13, α 14

3.3 Infektionsversuche mit FaDu-Zellen

Einige HrpA homologe Proteine in anderen gramnegativen Bakterien sind bekannte Adhärenzfaktoren [54]. Um zu überprüfen, ob auch die HrpA Proteine der Meningokokken an der Adhärenz an Wirtszellen beteiligt sind, wurden Infektionsversuche mit *hrpA* und *hrpB* Deletionsmutanten und verschiedenen Epithelzelllinien durchgeführt.

Der Serogruppe C Stamms 2120 gehört zum gleichen klonalen Komplex wie der sequenzierte FAM18, dessen Genom nur ein einziges *hrpA* (NMC0444) und *hrpB* (NMC0443) aufweist [2]. Davon ausgehend, dass auch der 2120 nur ein TPS System besitzt, wurden in dieser Arbeit Infektionsversuche mit Mutanten des Serogruppe C Stamms 2120 durchgeführt. Auf diese Weise konnte die Auswirkung der Genausschaltung auf die Adhärenz einfacher beobachtet werden als beim MC58 dessen Genom fünf *hrpAs* (NMB1779, NMB0497, NMB1768, NMB0493, NMB1214) und drei *hrpBs* (NMB1780, NMB0496, NMB1762) aufweist [59].

Es wurden der unbekapselte 2120 (2517) und der unbekapselte, LPS-trunkierte 2120 (2921) als parentale Stämmen ausgewählt, da bekapselte Stämme kaum an Epithelzellen adhäreren [27].

3.3.1 *hrpA* Deletionsmutanten

Im Infektionsversuch wurde das Verhältnis zwischen Anzahl adhärenter Bakterien und Anzahl adhärenter plus nicht adhärenter Bakterien in % ermittelt. Der erhaltene Wert stellt ein Maß für die Adhärenz an die Epithelzellen eines Hypopharynxkarzinoms, sogenannte FaDu-Zellen [64] dar. Es wurden Versuche für die Stämme 2517 (2120 Δ asiaD), 3727 (2517 Δ hrpA) und sowie 2921 (2120 Δ asiaD Δ lgtA) und 3726 (2921 Δ hrpA) durchgeführt (Abbildung 8). Mit 12,8% zeigte die Δ hrpA Deletionsmutante eine signifikant schlechtere Adhärenz ($p < 0,05$) als der parentale Stamm 2517 (2120 Δ asiaD; 25,8%). Ebenso fielen die Adhärenzwerte der unbekapselten und LPS trunkierten Deletionsmutante 2921 Δ hrpA mit 14,2% gegenüber 31,4% Zell-assoziierte Bakterien bei Stamm 2921 signifikant geringer aus ($p < 0,01$).

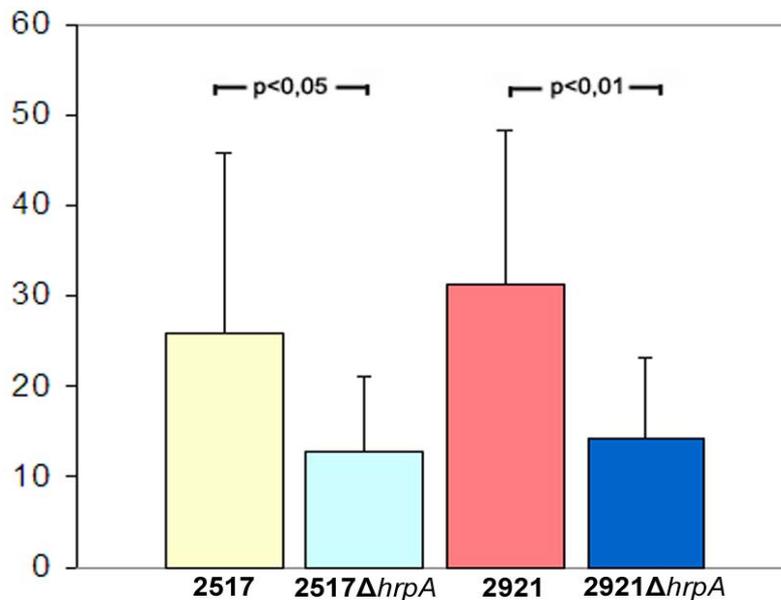


Abbildung 8: Adhärenz der Δ *hrpA* Deletionsmutante der Stämme 2517 und 2921 an FaDu-Zellen 5 Stunden post infectionem; y-Achse: Adhärenz in % der Gesamtzahl der Bakterien im well.

Mittelwerte aus 10 Infektionsversuchen; der schwarze Balken zeigt die Standardabweichung

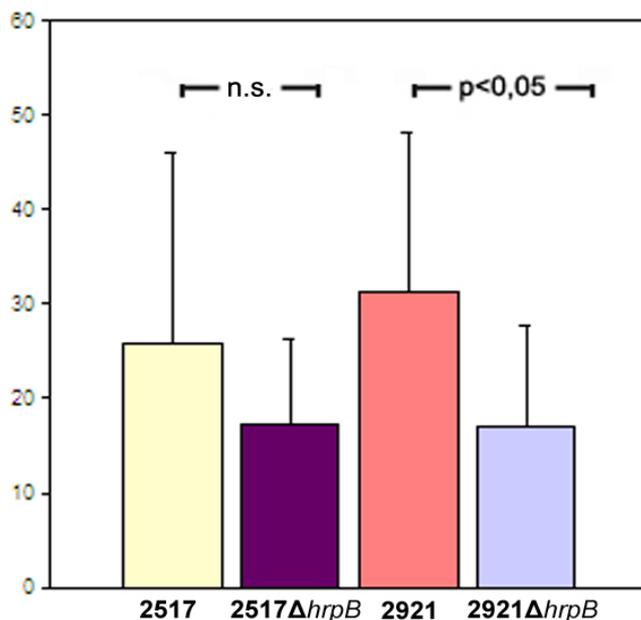
Zusammenfassend ließ sich also feststellen, dass HrpA speziell bei unbekapselten, LPS-trunkierten Mutanten eine entscheidende Bedeutung bei der Epithelzelladhärenz von Meningokokken besitzt.

3.3.2 *hrpB* Deletionsmutanten

Wie im vorigen Abschnitt für *hrpA* beschrieben, wurden im Folgenden Infektionsversuche mit den *hrpB* Deletionsmutanten 3838 (2517 Δ *hrpB*) und 3839 (2921 Δ *hrpB*) sowie den zugehörigen parental Stämme 2517 (2120 Δ *asiaD*) und 2921 (2120 Δ *asiaD* Δ *lgtA*) durchgeführt.

Die *hrpB* Deletion beim unbekapselten Stamm 2517 führte zu einem geringen Adhärenzabfall (25,8% Adhärenz bei Stamm 2517 gegenüber 17,3% bei Stamm 2517 Δ NMC0443, $p=0,16$), der allerdings nicht signifikant war. Signifikant verringert ($p < 0,05$) stellten sich jedoch die Adhärenzwerte bei der

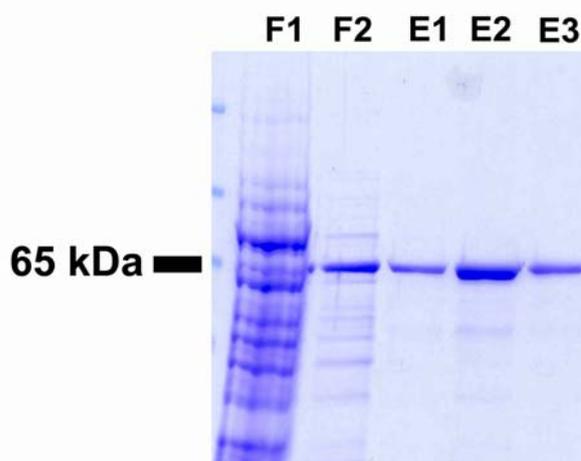
unbekapselten und LPS-trunkierten 2921-Deletionsmutante im Vergleich zum parentalen Stamm 2921 (2120 $\Delta siaD \Delta lgtA$) dar (Abbildung 9).



Diese signifikante Verminderung zell-assoziiierter Bakterien nach *hrpB* Deletion ist ein weiterer Hinweis für eine tatsächliche Funktion von HrpB als Transporter für HrpA.

Abbildung 9: Adhärenz der $\Delta hrpB$ Deletionsmutante der Stämme 2517 und 2921 an FaDu-Zellen 5 Stunden post infectionem; y-Achse: Adhärente Bakterien in % der Gesamtzahl der Bakterien im well Mittelwerte aus 10 Infektionsversuchen; der schwarze Balken zeigt die Standardabweichung.

3.4 HrpB Expression in *E.coli* und Aufreinigung über Ni^{2+} Beads



Eines der Ziele dieser Arbeit war die Gewinnung eines gegen HrpB gerichteten Antikörpers, um damit die Proteinexpression und Lokalisation des FhaC homologen Proteins in der Bakterienzelle bestimmen können. Dazu wurde wie im Kapitel 2.23 beschrieben zunächst ein Plasmid konstruiert, das mit Ausnahme des

Abbildung 10: Coomassie Gel des aufgereinigten HrpB Proteins NMC0443.

F1-E3 entspricht den einzelnen Aufreinigungsschritten des Proteingemisches (s. 2.25.2).

F1: Flow through 1; F2: Flow trough 2; E1/2/3: Eluate (s. 2.25.2).

Signalpeptids die gesamte Nukleotidsequenz des *hrpB* Gens NMC0443 umfasst. Es gelang, ein Protein mit etwa 65 kDa Molekulargewicht in *E. coli* zu induzieren. Das induzierte Protein (in der *E. coli* Suspension) konnte im Western Blot mit gegen den HisTag gerichteten Antikörperen nachgewiesen werden (Abbildung 11). Über Ni^{2+} Beads wurde das induzierte Protein aufgereinigt (Abbildung 10).

Mit der Herstellung des HrpB Proteins, das den putativen Transporter des TPS Systems in Meningokokken darstellt, konnte die Entwicklung eines Antikörpers beauftragt werden. Dies stellt einen bedeutenden Schritt in der weiteren Verteilungs- und Funktionsanalyse des TPS Systems in Meningokokken dar.

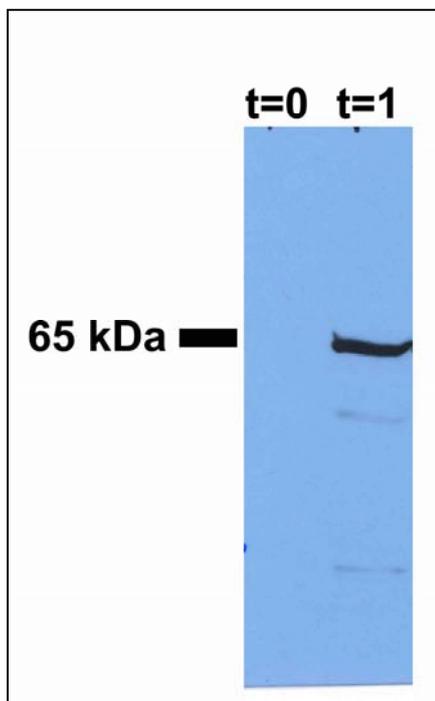


Abbildung 11: Western Blot HrpB (NMC0443) Expression in pQE32 M15[pREP4]; t=0: Suspension zum Zeitpunkt 0 kurz vor der Induktion; t=1: Suspension zum Zeitpunkt 1 h nach Induktion

4. Diskussion

Zahlreiche große Exoproteine in verschiedenen Gram-negativen Bakterien werden durch TPS Systeme sezerniert [54]. Aktuell ist über die meisten dieser Proteine sehr wenig bekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Verteilung der putativen TPS Systeme NMB1768-NMB1762 und NMC0444-NMC0443 in der Meningokokkenpopulation zu charakterisieren. Außerdem wurden Expressionsanalysen in Stämmen mit positiver Hybridisierungsreaktion für diese beiden TPS Systeme durchgeführt und die Funktion der HrpAs und HrpBs bei der Adhärenz von Meningokokken an Epithelzellen untersucht. Anschließend wurde das Transportprotein HrpB in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt.

4.1 Das TPS Transportsystem in Gram-negativen Bakterien

Zu den wichtigsten Transportmechanismen Gram-negativer Bakterien für die Sekretion großer Exoproteine zählt neben dem Autotransporter auch das Zwei-Partner Sekretionssystem (TPS-System). Während Autotransporter-Proteine selbstständig die äußere Membran Gram-negativer Bakterien passieren, benötigen die als TpsA bezeichneten Exoproteine des TPS Systems ein spezifisches Partnerprotein in Form eines kanalbildenden Transporters, genannt TpsB [56]. Das zu sezernierende TpsA Protein weist ein N-terminal gelegenes Signalpeptid mit benachbarter TPS-Domäne auf. Das Signalpeptid enthält ein Spaltsignal, bekannt von Vorläuferproteinen, die von LepB-Typ Peptidasen prozessiert werden. Beim Transport des TpsA über die innere Membran mit Hilfe des Sec-Apparats wird das Signalpeptid abgespalten, sodass die TPS-Domäne des TpsA Proteins für das TpsB erkennbar wird und das TpsA nun von diesem über die äußere Membran transportiert werden kann [56].

Beim TPS System handelt es sich um ein weit verbreitetes Transportsystem in Gram-negativen Bakterien. Zum heutigen Zeitpunkt ist es in *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*,

Haemophilus ducreyi und anderen Gram-negativen Bakterien beschrieben. Auch im Genus *Neisseria* sind TpsA homologe Proteine bekannt, die als *hemagglutinin/hemolysin related proteins (hrps)* bezeichnet werden [56, 59]. In dieser Arbeit werden die TpsAs als HrpAs und ihre zugehörigen Transporter TpsBs als HrpBs bezeichnet.

4.2 Das TPS System im Genus *Neisseria*

4.2.1 Verteilung des TPS Systems in verschiedenen *Neisseria* Spezies

In der Vorgängerdissertation dieser Arbeit [61] konnten *hrpA* Gene neben *N. meningitidis* auch in *N. gonorrhoeae* und *N. lactamica* detektiert werden. Auch Snyder et al. konnten zeigen, dass homologe Gene zu NMB0493, NMB1214 und NMB1768 (Gruppe II *hrpAs*) in *N. lactamica* vorkommen [65]. Daneben enthält das Genom des *N. gonorrhoeae* Stammes FA 1090 ein ORF, das – unterbrochen von multiplen Stop Codons – für ein NMB1768 homologes HrpA Protein kodiert [53]. Somit ist das Vorkommen von *hrpA* Genen weder spezifisch für Meningokokken noch bleibt es auf die pathogenen Spezies der *Neisserien*, d.h. *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* beschränkt.

4.2.2 Das TPS System bei *N. meningitidis*

Das TPS System in *N. meningitidis* wurde zunächst beschrieben im Serogruppe A Stamm Z2491, in dessen Genom eine Region gefunden wurde, die Homologien zum FHA von *B. pertussis* aufweist [66]. Das TPS System des Stammes Z2491 besteht aus den ORFs NMA0688 (*hrpA*) und NMA0687 (*hrpB*). Klee et al. konnten die Anwesenheit homologer Gene des *hrpA* von Z2491 in weiteren 13 Meningokokkenstämmen, die sogenannten hypervirulenten klonalen Komplexen angehören nachweisen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in den Stämmen, die mit den MC58 *hrpA* spezifischen Sonden negativ hybridisierten, NMC0443 homologe *hrpBs* vorhanden sind (s.Kapitel 3.1.1). Nach dem Prinzip des TPS Systems, dass zu jedem *hrpB* auch ein zugehöriges *hrpA* gehört [54] konnte die Vermutung bestätigt werden, dass ein TPS-System nicht nur in hypervirulenten, sondern auch in nicht-

hypervirulenten klonalen Komplexen vorkommt. Durch die Sequenzierung des Stammes $\alpha 14$ wurde ein *hrpA* (NMO0398) gefunden [67] und damit die Beobachtung dieser Arbeit bestätigt. Mittels PCR konnten sowohl die Anwesenheit des *hrpA* nachgewiesen als auch dessen benachbarte Lage zum *hrpB* im TPS System für die oben genannten *hrpA*-negativ getesteten Stämme gezeigt werden. Darüber hinaus bestätigten die durchgeführten RT-PCRs mit Primern, die *hrpA* und *hrpB* umfassten die vermutete Operonstruktur in den untersuchten Stämmen. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass *hrpA* Gene bei Meningokokken weit verbreitet sind (97% (210/216) der Stämme, die hypervirulenten klonalen Komplexen angehören wiesen mindestens eines der *hrpA* homologen Gene NMB0493, NMB1214, NMB1768 und NMB0497/1779 auf) und viele Stämme mehrere homologe *hrpA* Gene besitzen. Bei den nicht-hypervirulenten klonalen Komplexen dagegen zeigten 29% im Dot Blot kein *hrpA*, das homolog zu den *hrpA* Genen von MC58 ist, wobei es sich hierbei mehrheitlich (82,5%) um *cnI* Stämme handelte.

Es wurde vermutet, dass auch die *cnI* Stämme, die bei der Dot-Blot-Analyse keine positiven Hybridisierungen zeigten, ein *hrpA* besitzen, das nicht homolog zu den *hrpA* Genen von MC58 ist. Diese Hypothese konnte in dieser Arbeit durch Hybridisierung der *cnI*-Stämme mit einer spezifisch gegen das *hrpB* NMC0443 gerichteten Sonde (s. Kapitel 3.1.1) bestätigt werden, da die Dot Blots mit der NMC0443 (*hrpB*) spezifischen Sonde bei nahezu allen *cnI* Stämmen positiv ausfielen. Man ging also davon, dass auch die mit der NMC0443 (*hrpB*) spezifischen Sonde positiv hybridisierten *cnI* Stämme ein *hrpA* besitzen.

Im MC58 ist neben vier weiteren *hrpAs* (NMB1214, NMB0493, NMB0497, NMB1779) das *hrpA* NMB1768 bekannt. Das Gen NMB1762 zeigte im Dot Blot die gleichen Verteilungsmuster wie das *hrpA* NMB1768, weshalb davon ausgegangen wurde, dass es sich beim NMB1762 um das putativ zugehörige Transportgen *hrpB* zum *hrpA* NMB1768 handeln müsse. Gleichzeitig finden sich zwischen den beiden *hrpAs* NMB0493 und NMB1214 und dem NMB1768 *hrpA* vor allem N-terminal im Bereich der Sekretionsdomäne höhere Homologien (NMB1214 im Vergleich zu NMB1768 etwa 59% Homologie;

NMNB0493 im Vergleich zu NMB1768 etwa 75% Homologie), was vermuten lässt dass alle drei durch das HrpB Protein NMB1762 transportiert werden [53, 60]. Schmitt et al. unterteilen alle bekannten *hrpAs* aufgrund von Sequenzhomologien in 2 Gruppen: Gruppe I fasst die nahezu identischen Gene NMB0497 und NMB1779 mit den singular vorkommenden *hrpAs* in den Stämmen Z2491 (NMA0688), FAM18 (NMC0443) und α 14 (NMO0398) zusammen. Zur Gruppe II werden die zunächst nur im MC58 nachgewiesenen Gene NMB1768, NMB0493 und NMB1214 gezählt. In dieser Arbeit blieben nur 6,4% der nicht-hypervirulenten Komplexe im Dot Blot für NMB1768 (*hrpA*) und NMB1762 (*hrpB*) positiv, während bei den hypervirulenten Stämmen mit 48,8% positive Reaktionen für beide Gene zeigten. Diese unterschiedliche Verteilung des Gruppe II *hrpA* (NMB1768) mit putativ zugehörigem *hrpB* (NMB1762) kann als Hinweis für deren Bedeutung in der Virulenz der Meningokokken gesehen werden. Bemerkenswert scheint hierbei die Beobachtung, dass die Gruppe II *hrpAs* zwar nahezu nicht (nur 6,4%) in den nicht-hypervirulenten klonalen Komplexen zu finden sind, dafür aber bei *N. lactamica* weit verbreitet sind [65]. So ließ sich feststellen, dass *N. lactamica* als apathogenes Bakterium insgesamt 85 von 127 sogenannten „Virulenzgenen“ mit den Pathogenen *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* gemeinsam hat [65]. Dies lässt vermuten, dass die Virulenz der pathogenen Neisserienspezies nicht im Besitz einzelner Gene per se begründet liegt, sondern dass vielmehr die Kombination dieser Gene und deren Sequenzvariationen die Funktion ihrer Genprodukte und damit die Virulenz des Erregers verändern.

Ähnlich den Gruppe II *hrpAs* zeigen auch andere Adhärenzfaktoren von *N. meningitidis* unterschiedliche Verteilung in hypervirulenten und nicht-hypervirulenten klonalen Komplexen. So kommt das Adäsin NadA bei etwa 50% der Krankheitsisolate vor, während nur 16,2% der Trägerisolate das *nadA* Gen aufweisen [68].

Eine entscheidende Bedeutung der Gruppe I *hrpA* (NMC0444 bzw. dessen Homolg NMB0497/1779) für die Virulenz der Meningokokken bleibt aufgrund der Tatsache, dass dieses TPS System in allen untersuchten hypervirulenten und nicht-hypervirulenten klonalen Komplexen vorhanden ist, unwahrscheinlich.

Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen C-terminalen Sequenzen der *hrpA*s auch deren Funktionalität beeinflussen und sie dadurch doch Einfluss auf die Virulenz nehmen.

4.3 Funktion der HrpA und HrpB Proteine

4.3.1 Bedeutung von TpsA Proteinen in Gram-negativen Bakterien

Nur bei einigen Proteinen der TpsA Familie konnte bis heute ihre funktionelle Rolle charakterisiert werden; meist sind sie mit der Virulenz ihrer Erreger assoziiert [56]. Eine bekannte Funktion der TpsA Proteine stellt die Ca^{2+} -unabhängige Zytolysin/Hämolytin Aktivität des ShIA von *S. marcescens* dar; auch die TpsA Proteine von *Proteus mirabilis* und *Edwardsiella tarda* gehören zur Gruppe der Zytolysine [56].

Besonders ausführlich untersucht ist das FHA von *B. pertussis*, das als der wichtigste Faktor zur Adhäsion an ziliert tragende Zellen des oberen Respirationstraktes gilt und damit zur funktionellen Gruppe der Adhäsine gehört [46]. Auch die TpsAs von *Haemophilus influenzae/ducreyi* und *Erwinia chrysanthemi* weisen adhäsive Funktion auf [56]. Das TpsA Protein HxuA1 von *H. influenzae* stellt mit seiner Einbindung in den Eisenstoffwechsel eine dritte funktionelle Gruppe dar [56].

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der HrpA Proteine der Meningokokken für deren Adhärenzfähigkeit an Wirtszellen untersucht. Schmitt et al. konnten zunächst keinen signifikanten Unterschied in der Adhärenz an Epithelzellen zwischen *hrpA* Deletionsmutanten des Stammes MC58 und den zugehörigen parental Stämmen nachweisen [60]. Daraus war zu schließen, dass offenbar keines der fünf (NMB1779, NMB0497, NMB1768, NMB0493, NMB1214) im MC58 bekannten *hrpA* Gene allein für sich genommen Epithelzell Adhärenz vermittelt. Vielmehr war zu vermuten, dass die von den verschiedenen *hrpA* Genen kodierten Proteine eine redundante Funktion bei der Wirtszellinteraktion ausüben. Um den Einfluss der *hrpA* und *hrpB* Gene und die Auswirkungen ihrer Deletion auf die Adhärenzfähigkeit der Meningokokken beurteilen zu können wurden in dieser Arbeit Infektionsversuche mit Mutanten des Serogruppe C

Stamms 2120 durchgeführt, da dieser nur ein einziges *hrpA* (NMC0444) und *hrpB* (NMC0443) aufweist.

Es wurden der unbekapselte 2120 (2517) und der unbekapselte, LPS-trunkierte 2120 (2921) als parentale Stämmen ausgewählt, da bekapselte Stämme kaum an Epithelzellen adhären [27]. Der LPS-trunkierte Stamm wurde verwendet, da eine Verkürzung der α -Kette des LPS die Adhärenz der Meningokokken an Epithelzellen verstärkt. Den parental Stämmen 2517 (2120 $\Delta siaD$) und 2921 (2120 $\Delta siaD \Delta lgtA$) wurden die *hrpA* Deletionsmutanten 3727 (2517 $\Delta hrpA$) und 3726 (2921 $\Delta hrpA$) sowie die *hrpB* Deletionsmutanten 3838 (2517 $\Delta hrpB$) und 3839 (2921 $\Delta hrpB$) gegenüber gestellt. Bei den infizierten humanen Zelllinien handelte es sich um Epithelzellen eines Hypopharynxkarzinoms, sogenannte FaDu-Zellen [64]. Da die Epithelzellen des Nasopharynx eine mechanische Barriere für Meningokokken darstellen, treten die Bakterien gleich zu Beginn der Infektion eines Menschen mit diesen in Kontakt; die Interaktion der Meningokokken mit dieser Zelllinie ist daher für das Verständnis der Invasion von besonderem Interesse.

Es hat sich gezeigt, dass die *hrpA* Deletionsmutante eine signifikant geringere Adhärenzfähigkeit an FaDu-Zellen besaß als der zugehörige parentale Stamm; besonders deutlich fiel dies bei der unbekapselten, LPS-trunkierten *hrpA* Deletionsmutante auf. Bereits in vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl Kapselexpression als auch die Expression der LPS α -Kette Meningokokken vor der Interaktion mit menschlichen Abwehrzellen schützen kann [42]. Kapselexpression und die Expression der LPS α -Kette unterliegen in Meningokokken der Phasevariation [27, 36], weshalb LPS-Trunkierung und Kapseldefizienz offensichtlich sowohl für die Kolonisierung als auch in der Pathogenese Bedeutung besitzen [20, 27]. Auch die Funktion anderer Strukturen der äußeren Meningokokkenmembran wie des Opc – ein bekanntes Adhäsion – ist vom Fehlen der Kapselexpression und der LPS-Trunkierung abhängig [69].

Bei der Untersuchung der adhäsiven Eigenschaften der HrpAs zeigten sich deutliche Adhärenzverluste bei der Deletionsmutante 2120 $\Delta siaD \Delta lgtA \Delta hrpA$ gegenüber 2120 $\Delta siaD \Delta lgtA$. Dabei bleibt zu erwähnen, dass diese

Beobachtung nur bei den hier durchgeführten Infektionsversuchen mit Epithelzellen gemacht werden konnte; parallel durchgeführte Infektionsversuche mit dendritischen Zellen [61] ergaben keine Adhärenzunterschiede zwischen Deletionsmutante und parentalem Stamm. Dies lässt vermuten, dass das Adhärenzvermögen der HrpAs Zelltyp spezifisch ist.

Die Deletion des *hrpB* Gens NMC0443 im 2120 $\Delta siaD \Delta lgtA$ ergaben ebenfalls deutlich reduzierte Adhärenzwerte, wenn diese auch im Vergleich zur *hrpA* Deletion geringer ausfielen (s. Kapitel 3.3.2).

4.3.2 Bedeutung von TpsB Proteinen in Gram-negativen Bakterien

Die TpsB Proteine repräsentieren das zweite Kennzeichen des TPS Systems in Gram-negativen Bakterien; sie werden zur großen Familie der Kanal-bildenden, porinähnlichen Außenmembranproteinen gezählt [70]. Die TpsB Transportkanäle, die für die Translokation ihrer zugehörigen TpsA Proteine zuständig sind, werden mit diesen üblicherweise in einem Operon organisiert [56]. Heute kennt man zwei Klassen von TpsA translozierenden TpsB Proteinen: zum einen kann die Translokation mit der Aktivierung des jeweiligen TpsAs verknüpft sein, wie dies für *S. marcescens* diskutiert wird, zum anderen besteht die Funktion des *B. pertussis* FhaC (TpsB) allein in der Sekretion des FHA [54].

Die Deletion des *hrpB* Gens NMC0443 im Stamm 2120 $\Delta siaD \Delta lgtA$ und die daraus folgende verminderte Adhärenzfähigkeit der Mutante an Epithelzellen kann als Hinweis für die funktionelle Relevanz der HrpAs und ihrer Sekretion durch das zugehörige HrpB Transportprotein gesehen werden. Allerdings schließen diese Ergebnisse nicht prinzipiell die Möglichkeit aus, dass das HrpB als Transmembranprotein selbst an Epithelzellen adhäriert. Zur Klärung, ob es sich beim HrpB tatsächlich um das Transportprotein für HrpAs handelt, könnten Versuche mit Westernblots von Lysaten und Kulturüberständen des Wildtyps, der *hrpA*- und *hrpB*- Deletionsmutanten, sowie mit gegen HrpA/HrpB gerichteten Antisera dienen.

4.3.3 Interaktion von TpsA und TpsB Proteinen in Gram-negativen Bakterien

Der genaue Signalweg der Integration von TpsB Transmembranproteinen in die äußere Membran Gram-negativer Bakterien ist noch nicht endgültig geklärt; man konnte zeigen, dass die letzten C-terminalen Residuen der TpsB Proteine entscheidend für die Lokalisation des TpsBs von *H. influenzae* in der Außenmembran sind [56, 71]; dies weist Ähnlichkeit mit dem Signalweg von Porinen auf, bei denen ebenfalls ein C-terminal gelegenes Membran durchspannendes Segment entscheidend für die Porinlokalisierung ist [56, 72]. Man geht davon aus, dass die Interaktion zwischen TpsA Proteinen und ihren zugehörigen Transportern (TpsB) im periplasmatischen Spalt stattfindet. Entscheidend für diese Interaktion ist die TPS Domäne der TpsAs, während bis heute noch nicht genau geklärt ist, welche strukturelle Region des Transportproteins TpsB an der Erkennung des TpsA Partners Beteiligung findet [56]. Zum besseren Verständnis dieser Zusammenhänge im Meningokokken TPS System erschien es essentiell das Transportprotein in aufgereinigter Form zur Verfügung zu haben (s. Kapitel 3.4). Im Verlauf war eine Antikörperentwicklung gegen den Transporter geplant um mehr über dessen Lage und Funktion zu erfahren.

Derzeit wird vermutet, dass die TpsA Proteine die äußere Membran in ungefalteten Zustand passieren und sich erst an der Zelloberfläche in ihre eigentliche Konformation falten. Die Frage, ob die TpsA Proteine bei ihrer Faltung unterstützt werden, konnte noch nicht eindeutig beantwortet werden. Es gibt Hinweise dafür, dass einige konservierte Motive in der TPS Domäne an der Proteinfaltung beteiligt sind [56, 57, 73].

Nach Abschluss dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das TPS System sowohl für das intrazelluläre Überleben als auch beim Verlassen infizierter Wirtszellen entscheidende Bedeutung besitzt. Dabei könnten sezernierte HrpA Proteine als Lysine wirken, die für die direkte Freisetzung der Meningokokken aus den Vakuolen der infizierten Wirtszelle verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass *hrpB* und *hrpA* Gene während einer Infektion mit Meningokokken hochreguliert werden [74]. Bei Untersuchungen der Biofilmstruktur konnte weiterhin beobachtet werden, dass

das HrpA Protein auch hier eine entscheidende Rolle spielt. Zum einen fiel eine verstärkte HrpA Produktion unter anaeroben Biofilm-Bedingungen auf, zum anderen zeigte sich, dass auch die Struktur und Formation des Biofilms in Anwesenheit von HrpA verändert war [75].

4.4 Experimentelle Ansätze zum TPS-System der Meningokokken

In dieser Arbeit ist es gelungen, das HrpB Protein des Stammes 2120 (Homolog zu NMC0443) in *E. coli* zu exprimieren und aufzureinigen. Damit wurde die Voraussetzung für eine ganze Reihe von Experimenten geschaffen. Mit der Entwicklung eines spezifischen Antikörpers gegen dieses HrpB können Fragen zur Synthese, Transport, Lage und Verteilung des HrpB Transportproteins beantwortet werden. Von Interesse ist auch die genaue Lokalisation der HrpA-Proteine; hierbei ist sowohl eine Assoziation mit der äußeren Membran der Bakterien als auch die Abgabe in den Extrazellulärraum vorstellbar, weshalb auch die Aufreinigung des HrpA Proteins eines der weiteren Ziele darstellt. Mit der Aufreinigung verbunden soll auch die Antikörperproduktion gegen HrpA und damit Untersuchungen zur Lokalisation der HrpAs durchgeführt werden.

Bei den Infektionsversuchen wurde das Adhärenzverhalten des Meningokokkenstammes 2120 im Vergleich mit *hrpA* und *hrpB* Deletionsmutanten untersucht. Über die Versuche zum Adhärenzverhalten der Meningokokken hinaus könnten andere Experimente mit der Fragestellung der Zytotoxizität der HrpA Proteine von Interesse sein; damit könnte weiterer Aufschluss über eine mögliche Funktion dieser Proteine in der Pathogenese der Meningokokkenerkrankung gewonnen werden. Außerdem scheint die Analyse immunologischer Aspekte im Zusammenhang mit HrpA und HrpB Proteinen von besonderem Interesse.

Zusammenfassung

Das two-partner secretion-system (TPS-System) ist ein unter Gram-negativen Bakterien weit verbreiteter Weg der Proteinsekretion. Die als TpsA bezeichneten Exoproteine des TPS Systems benötigen ein spezifisches Partnerprotein (genannt TpsB) in Form eines kanalbildenden Transporters.

Im sequenzierten Genom des Meningokokkenstammes MC58 finden sich fünf putative *tpsA* Gene, die als *hemagglutinin/hemolysin-related protein (hrps)* bezeichnete werden. Neben MC58 finden sich auch in den anderen sequenzierten Meningokokkenstämmen (FAM18, Z2491, α 14) *hrps*. Diese weisen N-terminal Homologien zum filamentösen Hämagglutinin (FHA) von *B. pertussis* auf, das als TpsA-Protein des two-partner-secretion-system (TPS) aus der Zelle transportiert wird. In dieser Arbeit werden die *hrps* als *hrpA* Gene bzw. HrpA-Proteine bezeichnet.

Alle sequenzierten Meningokokkenstämme verfügen über *tpsB* homologe Gene (*hrpB*), die jeweils in enger Nachbarschaft zu den *hrpA* Genen zu finden sind. Das Vorhandensein von *hrpA* und *hrpB* Genen deutet darauf hin, dass auch Meningokokken über ein funktionales TPS-System verfügen.

Bei einer Dot-Blot-Analyse von 830 Meningokokkenstämmen aus einer bayerischen Trägerstudie mit Sonden spezifisch für die C-terminalen Bereiche der im Stamm MC58 gefundenen *hrpA* Gene hybridisierten 80% der ausgewerteten Stämme mit mindestens einer der Sonden. Stämme der hypervirulenten klonalen Komplexen (ST-8, ST-11, ST32, ST-44) zeigten sogar in über 99% eine positive Reaktion. Dagegen wiesen die nicht-hypervirulenten klonalen Komplexe zu 29% im Dot Blot kein *hrpA* auf, das homolog zu den *hrpA* Genen von Stamm MC58 ist, wobei es sich hierbei mehrheitlich (82%) um *cnI* Stämme handelte, so dass sich nur in 10% der untersuchten *Kapsel-null-locus*-Stämme (*cnI*) ein zu den *hrpA* Genen von MC58 homologes Gen nachweisen ließ. Mit der Hypothese, dass auch diese Stämme ein *hrpA* besitzen, welches sich im C-terminalen Anteil von denen des MC58 unterscheidet wurden in dieser Arbeit Dot Blots durchgeführt, deren Sonde spezifisch für das *hrpB* NMC0443 war. 97,6% der mit dieser Sonde untersuchten Stämme zeigten die

Anwesenheit eines *hrpB* Homologs. Um die Vermutung zu bestätigen, dass allen *hrpB* Genen ein zugehöriges *hrpA* Gen benachbart liegt, wurden repräsentativ PCRs von häufigen klonalen Komplexen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein TPS-System sowohl in den hypervirulenten als auch den nicht-hypervirulenten klonalen Komplexen der Meningokokken vorkommt.

Die vielfältigen Funktionen von bereits untersuchten TpsA Proteinen sind zumeist mit der Pathogenität der Bakterien assoziiert. In dieser Arbeit wurde ein möglicher Einfluss der HrpA Proteine auf die Adhäsion der Bakterien an humane Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine kapsellose, als auch eine kapsellose, LPS-trunkierte *hrpA* Deletionsmutante signifikant schlechter an Epithelzellen adhärirt als die parentalen Vergleichsstämme. Ebenso zeigten die analog durchgeführten Infektionsversuche mit der *hrpB* Deletionsmutante einen Adhärenzverlust, der jedoch nur für die unbekapselte und LPS trunkierte *hrpB* Deletionsmutante signifikant war.

In dieser Arbeit ist es gelungen das HrpB Protein des Stammes 2120 in *E. coli* zu exprimieren und aufzureinigen, sodass die Entwicklung eines gegen HrpB gerichteten Antikörpers in Auftrag gegeben werden konnte. Mit Hilfe dieses Antikörpers sollen noch offene Fragen zur Synthese und dem Transport des HrpB Transportproteins beantwortet werden. Außerdem können weitere Untersuchungen zur Lage und Verteilung der HrpBs in der Meningokokkenmembran dazu beitragen, weiteren Aufschluss über die Komplexität von Pathogenität und Virulenz von *N. meningitidis* zu geben.

Literaturverzeichnis

1. Tzeng YL, Stephens DS: **Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis***. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2000, **2**(6):687-700.
2. Bentley SD, Vernikos GS, Snyder LA, Churcher C, Arrowsmith C, Chillingworth T, Cronin A, Davis PH, Holroyd NE, Jagels K *et al*: **Meningococcal genetic variation mechanisms viewed through comparative analysis of serogroup C strain FAM18**. *PLoS genetics* 2007, **3**(2):e23.
3. Vogel U, Frosch M: **The genus *Neisseria*: population structure, genome plasticity, and evolution of pathogenicity**. *Current topics in microbiology and immunology* 2002, **264**(2):23-45.
4. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM: **Meningococcal disease**. *The New England journal of medicine* 2001, **344**(18):1378-1388.
5. RKI: **Invasive Meningokokken-Erkrankungen im Jahr 2006**. In: *Epidemiologisches Bulletin; Robert Koch Institut*. vol. 32/2007; 2007.
6. Verheul AF, Snippe H, Poolman JT: **Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component**. *Microbiological reviews* 1993, **57**(1):34-49.
7. Brehony C, Jolley KA, Maiden MC: **Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease**. *FEMS microbiology reviews* 2007, **31**(1):15-26.
8. Tzanakaki G, Urwin R, Musilek M, Kriz P, Kremastinou J, Pangalis A, Blackwell CC, Maiden MC: **Phenotypic and genotypic approaches to characterization of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and their close family contacts**. *Journal of clinical microbiology* 2001, **39**(4):1235-1240.
9. Maiden MC: **Population genetics of a transformable bacterium: the influence of horizontal genetic exchange on the biology of *Neisseria meningitidis***. *FEMS microbiology letters* 1993, **112**(3):243-250.
10. Caugant DA, Mocca LF, Frasch CE, Froholm LO, Zollinger WD, Selander RK: **Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern**. *Journal of bacteriology* 1987, **169**(6):2781-2792.
11. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA *et al*: **Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(6):3140-3145.
12. Feil EJ, Maiden MC, Achtman M, Spratt BG: **The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis***. *Molecular biology and evolution* 1999, **16**(11):1496-1502.

13. Holmes EC, Urwin R, Maiden MC: **The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*.** *Molecular biology and evolution* 1999, **16**(6):741-749.
14. Jolley KA, Kalmusova J, Feil EJ, Gupta S, Musilek M, Kriz P, Maiden MC: **Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population.** *Journal of clinical microbiology* 2000, **38**(12):4492-4498.
15. Claus H, Maiden MC, Wilson DJ, McCarthy ND, Jolley KA, Urwin R, Hessler F, Frosch M, Vogel U: **Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults.** *The Journal of infectious diseases* 2005, **191**(8):1263-1271.
16. Caugant DA: **Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*.** *Apmis* 1998, **106**(5):505-525.
17. Virji M: **Meningococcal disease: epidemiology and pathogenesis.** *Trends in microbiology* 1996, **4**(12):466-469; discussion 469-470.
18. Vogel U, Frosch M: **Mechanisms of neisserial serum resistance.** *Molecular microbiology* 1999, **32**(6):1133-1139.
19. Kahler CM, Martin LE, Shih GC, Rahman MM, Carlson RW, Stephens DS: **The (alpha2-->8)-linked polysialic acid capsule and lipooligosaccharide structure both contribute to the ability of serogroup B *Neisseria meningitidis* to resist the bactericidal activity of normal human serum.** *Infection and immunity* 1998, **66**(12):5939-5947.
20. Mackinnon FG, Borrow R, Gorringer AR, Fox AJ, Jones DM, Robinson A: **Demonstration of lipooligosaccharide immunotype and capsule as virulence factors for *Neisseria meningitidis* using an infant mouse intranasal infection model.** *Microbial pathogenesis* 1993, **15**(5):359-366.
21. Vogel U, Hammerschmidt S, Frosch M: **Sialic acids of both the capsule and the sialylated lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup B are prerequisites for virulence of meningococci in the infant rat.** *Medical microbiology and immunology* 1996, **185**(2):81-87.
22. Roberts IS: **The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria.** *Annual review of microbiology* 1996, **50**:285-315.
23. 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.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, **86**(5):1669-1673.
24. Swartley JS, Marfin AA, Edupuganti S, Liu LJ, Cieslak P, Perkins B, Wenger JD, Stephens DS: **Capsule switching of *Neisseria meningitidis*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(1):271-276.
25. Claus H, Vogel U, Muhlenhoff M, Gerardy-Schahn R, Frosch M: **Molecular divergence of the sia locus in different serogroups of**

- Neisseria meningitidis expressing polysialic acid capsules.** *Mol Gen Genet* 1997, **257**(1):28-34.
26. Hammerschmidt S, Hilse R, van Putten JP, Gerardy-Schahn R, Unkmeir A, Frosch M: **Modulation of cell surface sialic acid expression in Neisseria meningitidis via a transposable genetic element.** *The EMBO journal* 1996, **15**(1):192-198.
27. Hammerschmidt S, Muller A, Sillmann H, Muhlenhoff M, Borrow R, Fox A, van Putten J, Zollinger WD, Gerardy-Schahn R, Frosch M: **Capsule phase variation in Neisseria meningitidis serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (siaD): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease.** *Molecular microbiology* 1996, **20**(6):1211-1220.
28. Weber MV, Claus H, Maiden MC, Frosch M, Vogel U: **Genetic mechanisms for loss of encapsulation in polysialyltransferase-gene-positive meningococci isolated from healthy carriers.** *Int J Med Microbiol* 2006, **296**(7):475-484.
29. Claus H, Maiden MC, Maag R, Frosch M, Vogel U: **Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport.** *Microbiology (Reading, England)* 2002, **148**(Pt 6):1813-1819.
30. Finne J, Bitter-Suermann D, Goridis C, Finne U: **An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues.** *J Immunol* 1987, **138**(12):4402-4407.
31. Unkmeir A, Kammerer U, Stade A, Hubner C, Haller S, Kolb-Maurer A, Frosch M, Dietrich G: **Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of Neisseria meningitidis that determine meningococcal interaction with human dendritic cells.** *Infection and immunity* 2002, **70**(5):2454-2462.
32. Virji M, Makepeace K, Ferguson DJ, Achtman M, Moxon ER: **Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells.** *Molecular microbiology* 1993, **10**(3):499-510.
33. Brandtzaeg P, Bjerre A, Ovstebo R, Brusletto B, Joo GB, Kierulf P: **Neisseria meningitidis lipopolysaccharides in human pathology.** *Journal of endotoxin research* 2001, **7**(6):401-420.
34. Kahler CM, Stephens DS: **Genetic basis for biosynthesis, structure, and function of meningococcal lipooligosaccharide (endotoxin).** *Critical reviews in microbiology* 1998, **24**(4):281-334.
35. Mandrell RE, Zollinger WD: **Lipopolysaccharide serotyping of Neisseria meningitidis by hemagglutination inhibition.** *Infection and immunity* 1977, **16**(2):471-475.
36. Jennings MP, Srikhanta YN, Moxon ER, Kramer M, Poolman JT, Kuipers B, van der Ley P: **The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in Neisseria meningitidis.** *Microbiology (Reading, England)* 1999, **145** (Pt 11):3013-3021.
37. Mandrell RE, Kim JJ, John CM, Gibson BW, Sugai JV, Apicella MA, Griffiss JM, Yamasaki R: **Endogenous sialylation of the**

- lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis*. *Journal of bacteriology* 1991, **173**(9):2823-2832.
38. Tsai CM, Frasch CE: **A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels**. *Analytical biochemistry* 1982, **119**(1):115-119.
39. Giardina P, Preston A, Gibson B, Apicella M: **Antigenic mimicry in *Neisseria* species**. *Endotoxin In Health and Disease* 1999(Brade, H.; Opal, S.M.; Vogel, S.N; Morrison, D.C.; New York: Marcel Dekker):31-38.
40. Mandrell RE, Apicella MA: **Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modification of LOS**. *Immunobiology* 1993, **187**(3-5):382-402.
41. Dixon GL, Newton PJ, Chain BM, Katz D, Andersen SR, Wong S, van der Ley P, Klein N, Callard RE: **Dendritic cell activation and cytokine production induced by group B *Neisseria meningitidis*: interleukin-12 production depends on lipopolysaccharide expression in intact bacteria**. *Infection and immunity* 2001, **69**(7):4351-4357.
42. Kurzai O, Schmitt C, Claus H, Vogel U, Frosch M, Kolb-Maurer A: **Carbohydrate composition of meningococcal lipopolysaccharide modulates the interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells**. *Cellular microbiology* 2005, **7**(9):1319-1334.
43. Locht C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F: ***Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects**. *Current opinion in microbiology* 2001, **4**(1):82-89.
44. Tuomanen E, Weiss A: **Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells**. *The Journal of infectious diseases* 1985, **152**(1):118-125.
45. Sato Y, Kimura M, Fukumi H: **Development of a pertussis component vaccine in Japan**. *Lancet* 1984, **1**(8369):122-126.
46. Locht C, Bertin P, Menozzi FD, Renault G: **The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp**. *Molecular microbiology* 1993, **9**(4):653-660.
47. Relman D, Tuomanen E, Falkow S, Golenbock DT, Saukkonen K, Wright SD: **Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis***. *Cell* 1990, **61**(7):1375-1382.
48. Wright SD, Reddy PA, Jong MT, Erickson BW: **C3bi receptor (complement receptor type 3) recognizes a region of complement protein C3 containing the sequence Arg-Gly-Asp**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987, **84**(7):1965-1968.
49. Ishibashi Y, Claus S, Relman DA: ***Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18)**. *The Journal of experimental medicine* 1994, **180**(4):1225-1233.
50. Ishibashi Y, Relman DA, Nishikawa A: **Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a**

- filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin.** *Microbial pathogenesis* 2001, **30**(5):279-288.
51. Jacob-Dubuisson F, Antoine R, Locht C: **Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion: response.** *Trends in microbiology* 2000, **8**(12):533-534.
52. Henderson IR, Cappello R, Nataro JP: **Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion.** *Trends in microbiology* 2000, **8**(12):529-532.
53. van Ulsen P, Tommassen J: **Protein secretion and secreted proteins in pathogenic Neisseriaceae.** *FEMS microbiology reviews* 2006, **30**(2):292-319.
54. Jacob-Dubuisson F, Locht C, Antoine R: **Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins.** *Molecular microbiology* 2001, **40**(2):306-313.
55. Chevalier N, Moser M, Koch HG, Schimz KL, Willery E, Locht C, Jacob-Dubuisson F, Muller M: **Membrane targeting of a bacterial virulence factor harbouring an extended signal peptide.** *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2004, **8**(1):7-18.
56. Jacob-Dubuisson F, Fernandez R, Coutte L: **Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways.** *Biochimica et biophysica acta* 2004, **1694**(1-3):235-257.
57. Clantin B, Hodak H, Willery E, Locht C, Jacob-Dubuisson F, Villeret V: **The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(16):6194-6199.
58. Parkhill J, Achtman M, James KD, Bentley SD, Churcher C, Klee SR, Morelli G, Basham D, Brown D, Chillingworth T *et al*: **Complete DNA sequence of a serogroup A strain of Neisseria meningitidis Z2491.** *Nature* 2000, **404**(6777):502-506.
59. Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE, Eisen JA, Ketchum KA, Hood DW, Peden JF, Dodson RJ *et al*: **Complete genome sequence of Neisseria meningitidis serogroup B strain MC58.** *Science (New York, NY)* 2000, **287**(5459):1809-1815.
60. Schmitt C, Turner D, Boesl M, Abele M, Frosch M, Kurzai O: **A functional two-partner secretion system contributes to adhesion of Neisseria meningitidis to epithelial cells.** *Journal of bacteriology* 2007, **189**(22):7968-7976.
61. Bösl M: **Proteine mit Homologie zu Bordetella pertussis FHA bei Meningokokken.** *Dissertation.* Würzburg: Universität Würzburg; 2008.
62. Virji M, Kayhty H, Ferguson DJ, Alexandrescu C, Heckels JE, Moxon ER: **The role of pili in the interactions of pathogenic Neisseria with cultured human endothelial cells.** *Molecular microbiology* 1991, **5**(8):1831-1841.
63. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977, **74**(12):5463-5467.

64. Rangan SR: **A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma.** *Cancer* 1972, **29**(1):117-121.
65. Snyder LA, Saunders NJ: **The majority of genes in the pathogenic *Neisseria* species are present in non-pathogenic *Neisseria lactamica*, including those designated as 'virulence genes'.** *BMC genomics* 2006, **7**:128.
66. Klee SR, Nassif X, Kusecek B, Merker P, Beretti JL, Achtman M, Tinsley CR: **Molecular and biological analysis of eight genetic islands that distinguish *Neisseria meningitidis* from the closely related pathogen *Neisseria gonorrhoeae*.** *Infection and immunity* 2000, **68**(4):2082-2095.
67. Schoen C, Blom J, Claus H, Schramm-Gluck A, Brandt P, Muller T, Goesmann A, Joseph B, Konietzny S, Kurzai O *et al*: **Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in *Neisseria meningitidis*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(9):3473-3478.
68. Comanducci M, Bambini S, Caugant DA, Mora M, Brunelli B, Capecci B, Ciocchi L, Rappuoli R, Pizza M: **NadA diversity and carriage in *Neisseria meningitidis*.** *Infection and immunity* 2004, **72**(7):4217-4223.
69. Virji M, Makepeace K, Peak IR, Ferguson DJ, Jennings MP, Moxon ER: **Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides.** *Molecular microbiology* 1995, **18**(4):741-754.
70. Yen MR, Peabody CR, Partovi SM, Zhai Y, Tseng YH, Saier MH: **Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria.** *Biochimica et biophysica acta* 2002, **1562**(1-2):6-31.
71. St Geme JW, 3rd, Grass S: **Secretion of the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesins involves a periplasmic intermediate and requires the HMWB and HMWC proteins.** *Molecular microbiology* 1998, **27**(3):617-630.
72. Bosch D, Scholten M, Verhagen C, Tommassen J: **The role of the carboxy-terminal membrane-spanning fragment in the biogenesis of *Escherichia coli* K12 outer membrane protein PhoE.** *Mol Gen Genet* 1989, **216**(1):144-148.
73. Grass S, St Geme JW, 3rd: **Maturation and secretion of the non-typable *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin: roles of the N-terminal and C-terminal domains.** *Molecular microbiology* 2000, **36**(1):55-67.
74. Tala A, Progida C, De Stefano M, Cogli L, Spinosa MR, Bucci C, Alifano P: **The HrpB-HrpA two-partner secretion system is essential for intracellular survival of *Neisseria meningitidis*.** *Cellular microbiology* 2008, **10**(12):2461-2482.

75. Neil RB, Apicella MA: **Role of HrpA in biofilm formation of *Neisseria meningitidis* and regulation of the hrpBAS transcripts.** *Infection and immunity* 2009.

Anhang

A.1 Verwendete Primer

Primer	forward primer Sequenz 5'→3'	reverse primer Sequenz 5'→3'
NMB1762 (Sonde)	TGAAACTTCCTTTATCCTATTTG	ATAGCCTACCTGAAAACCGC
NMC0443 (Sonde)	TCGCTTTATCGTTCGATAACC	GCCAACGGTTGAGGTAAGC
NMB1762 (PCR)	GCTGCCCTACCGTGTGAG	GGATGTGTCATAGGCAAATAG
NMB1768 (PCR)	GGCCGTGATGTTGCTATTCAG	CGGTCTAGGTAGGTGCTGC
NMC0444- 0443 (PCR)	TATGTTTGCTTATGATCTGTTTG	TGGGGTTGGCAATAATCACG
RT	GCTGCCCTACCGTGTGAG	GGATGTGTCATAGGCAAATAG
NMB1762 RT	TATGTTTGCTTATGATCTGTTTG	TGGGGTTGGCAATAATCACG
NMC0444- 0443 RT IgtA	TGCCGCAAATCCAGCCAC	GCTGGAAGTTTTGTCCGAAG
NMC0443 (Plasmid)	AAAAAAGTCGACTGAAAACGATG CAGAACTTATC	AAAAAAAAGCTTTTAGAAACTGTA ATTCAAGTTGAA

A.2 Dot Blot Hybridisierungen und PCR Ergebnisse von NMB1768/NMB1762

alpha	final ass	Serogruppe	Dot Blot		PCR	
			NMB1768	NMB1762	NMB1768	NMB1762
143	23	Y	-	+	+	
370	32	B	0	+	+	
387	32	B	0	+	+	
392	32	B	0	+	+	
711	32	B	0	+	+	
713	32	B	0	+	+	
716	32	B	0	+	+	
373	35	B	0	+	+	
389	35	B	0	+	+	

50	44	B	-	+	+	
128	44	B	0	+	+	
154	44	B	0	+	+	
317	44	B	+	-		+
440	44	B	-	+	+	
470	44	B	0	+	+	
696	44	B	0	+	+	
710	44	B	0	+	+	
712	44	B	0	+	+	
740	44	B	0	+	+	
795	44	B	+	-		+
687	60		-	+	+	
484	99		-	+	+	
796	167	Y	-	+	-	
701	198	cnl	-	+	+	
388	254		0	+	+	
490	364	B	-	+	+	
480	778	B	0	+	+	
120	939	C	0	+	+	
201	939	C	+	0		+
202	939	C	+	0		+
760	939	B	0	+	+	
771	939	C	0	+	+	
161	974	B	-	+	+	
799	974	B	+	-		+
49		B	+	-		+
130			0	+	+	
140		B	0	+	+	
170			-	+	+	
261		B	-	+	+	
777			0	+	+	
778			0	+	+	
781		B	0	+	+	
782			0	+	+	
784		B	0	+	+	
						insg. 38
						insg. 6

A.3 Dot Blot Hybridisierungen mit Sonden spezifisch für NMB1762 bzw. NMC04443

klonaler Komplex	Anzahl	Serogruppe	NMB1762	NMB0443
ST-8	2	C	-	+
ST-11	8	C, W, NG	-	+
ST-18	7	B, NG	+	+

ST-22	37	W, Y, Z, NG	-	+
	1	Z	+	+
ST-23	68	Y, NG	-	+
	1	Y	+	+
	1	NG	-	-
ST-24	2	Z, NG	+	+
ST-32	40	B, NG	+	+
	1	B	-	+
ST-35	28	B, C, NG	-	+
	16	B, C, NG	+	+
	1	B	-	-
ST-44	100	B, C, Y,	+	+
	34	B, NG, cnl	-	+
ST-53	57	cnl	-	+
ST-60	25	29E, NG	-	+
	5	29E, NG, Y	+	+
ST-89	2	NG	+	+
ST-92	13	Y, NG	-	+
	1	Y	-	-
ST-99	4	29E, W, Y, NG	-	+
	2	X, NG	+	+
ST-103	4	NG	-	+
ST-116	3	Y	-	+
ST-162	31	B	-	+
ST-167	19	NG, Y	-	+
	2	B, Y	+	+
ST-175	8	Y	-	+
ST-178	9	29E, NG	-	+
ST-198	44	cnl	-	+
ST-254	14	29E, NG	-	+
	1	NG	+	+
ST-269	13	B, C	+	+
ST-364	3	B	+	+
ST-376	3	B, C, Y	+	+
ST-461	6	B	+	+
ST-778	2	B	+	+
ST-791	7	B, C	+	+
ST-793	7	B	+	+
ST-830	9	NG	-	+
St-842	3	B	-	+
	1	B	+	+
ST-845	11	cnl	+	+
	1	cnl	-	+
ST-866	1	B	-	+
	1	B	+	+
ST-870	2	B	+	+
ST-882	3	B	+	+
ST-910	8	NG	+	+
ST-917	3	B	-	+

ST-938	3	B	+	+
	2	B	-	+
ST-939	17	B, C	+	+
ST-949	8	B, Y	-	+
ST-963	2	NG	-	+
ST-971	2	NG	+	+
ST-972	2	B	+	+
	1	B	-	+
ST-1117	18	cnI	-	+
ST-1136	4	cnI	-	+

A.4 Dot Blot Hybridisierungen und PCR Ergebnisse für NMC0443/NMC0444

Klonaler Komplex	Anzahl (Alpha)	Serogruppe	Dot Blot		PCR	
			NMC0443	NMC0444	NMC0443	NMC0444
ST-8	2	C	+			
ST-11	8	W, C	+			
ST-18	7	B	+			
ST-22	38	W, Z, Y, NG	+			
ST-23	69	Y, NG	+			
	1 (a 165)	Y	-			+
ST-24	2	Z, NG	+			
ST-32	41	B	+			
ST-35	44	B, C, NG	+			
ST-44	134	B, C, cnI, Y, NG	+			
ST-53	57	cnI	+			
ST-60	30	29E, Y, NG	+			
	2 (a 700, a 793)	29E, NG	-			+
ST-89	2	NG	+			
	1 (a 636)	NG	0			+
ST-92	13	Y, NG	+			
ST-99	6	29E, W, X, Y, NG	+			
ST-103	4	NG	+			
ST-116	3	Y	+			
ST-162	31	B	+			
	1 (a 359)	B	-			+
ST-167	21	B, Y, NG	+			
ST-175	8	Y	+			
ST-178	9	29E, NG	+			
ST-198	44	cnI	+			
ST-254	15	29E, NG	+			

	1 (a 388)	X	0	+
ST-269	13	B, C	+	
ST-364	3	B	+	
ST-376	3	B, C, Y	+	
ST-461	6	B	+	
ST-774	1 (a 706)	29E	0	+
	1 (a 823)	29E	0	-
ST-778	2	B	+	
ST-791	7	B, C	+	
ST-793	7	B	+	
ST-830	9	NG	+	
ST-842	4	B	+	
ST-845	12	cnI	+	
ST-866	2	B	+	
ST-870	2	B	+	
ST-882	3	B	+	
ST-910	8	NG	+	
ST-917	3	B	+	
ST-938	5	B	+	
ST-939	19	B, C	+	
ST-947	1	B	+	
ST-949	8	B, Y	+	
	3 (a 174, a 181, a 269)	Y, NG	0	+
ST-963	2	NG	+	
ST-971	2	NG	+	
ST-974	3	B	+	
ST-1117	18	cnI	+	
ST-1136	4	cnI	+	
Sequenztyp	Anzahl (Alpha)	Serogruppe	NMC0443	NMC0444+0443
ST-213	3	B	+	
ST-759	3	B	+	
ST-818	1	NG	+	
	1 (a 694)	NG	0	+
ST-843	3	29E, NG	+	
ST-876	2	NG	+	
ST-912	3	NG	+	
ST- 934	2	NG	+	
ST-953	2	B	+	
ST-955	4	B	+	
ST-976	2	B	+	
ST-1134	2	C	+	
---	8	NG	+	

	(a 70, 114, 208, 321, 372, 417, 448, 466)	NG	-	+
---	1 (a 837)			
klonaler Komplex	Anzahl (Alpha)	Serogruppe	NMB1779	NMC0444+0443
ST-53	2 (a 42, 60)	cnl	0	+
ST-198	3 (a 55, 299, 339)	cnl	-	+
ST-845	2 (a 30, 62)	cnl	0/-	+
ST-1117	3 (a 215, 333, 598)	cnl	0/-	+

Publikationsliste

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sind Teil der Publikation:

Schmitt C, Turner D, Bösl M, Abele M, Frosch M, Kurzai O. 2007. A functional two-partner secretion system contributes to adhesion of *Neisseria meningitidis* to epithelial cells. J Bacteriol. **22:7968-76**

Danksagung

An dieser Stelle gebührt vielen Personen mein Dank. In erster Linie möchte ich mich an alle Mitarbeiter und Kollegen der Arbeitsgruppe Meningokokken am Institut für Hygiene und Mikrobiologie wenden. Julia Öchsner, Christine Meinhardt und Corinna Schmitt, die mir von Anfang an im Labor zur Seite standen und mit denen es immer eine Freude war zu arbeiten. Außerdem Nina Trzeciak und Heike Claus, die mir jederzeit bei allen Fragen und Problemen weiterhelfen konnten. Sie alle haben mich offen und herzlich in ihr Team aufgenommen und standen mir zu jeder Zeit hilfsbereit zur Seite. Hervorzuheben ist hier Maria Bösl, eine ehemalige Kommilitonin, die mich eingearbeitet und mich mit den Grundlagen der molekularbiologischen Methoden vertraut gemacht hat.

Prof. Dr. med. Matthias Frosch hatte als Leiter des Instituts stets ein offenes Ohr für jegliche Probleme oder Fragestellungen sowohl bezüglich dieser Arbeit, als auch im Fortgang meines Studiums.

Prof. Dr. med. Oliver Kurzai hat mir nicht nur die Erstellung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht, sondern mich auch in allen anderen Fragen immer unterstützt. Es war eine außergewöhnlich bereichernde Betreuung nicht nur durch mein bei ihm erlerntes Wissen über Meningokokken und wissenschaftliches Arbeiten. Besonders angenehm war sein immer freundliches und hilfsbereites Wesen, seine unerschöpfliche Motivationsgabe und die Bereitschaft jederzeit für Fragen bereitzustehen. Corinna Schmitt spielte ebenfalls eine herausragende Rolle für den Fortgang dieser Arbeit. Beide haben mich ermutigt, wenn Versuche nicht geklappt hatten oder ich den Überblick bei den komplexen Fragestellungen verloren hatte. Sie verschafften mir eine Fülle von Einblicken in die moderne molekulare Forschung. Besonders Corinna Schmitt gilt meine Anerkennung beim Erlernen molekularbiologischer Methoden und besonders beim Verfassen dieser Arbeit. Ihr stets geduldiges und ausdauerndes Wesen war mir über die ganze Zeit eine unverzichtbare Stütze.

Ein großer Dank geht an meine Familie, meinen Freund und meine engsten Freunde, die mich während des Studiums unterstützt und ermutigt haben.