

**Vergleichende Proteomanalyse von Biofilmen und
planktonischen Zellen bei dem humanen Infektionserreger
*Neisseria meningitidis***

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Tessa van Alen

aus Rheine

Würzburg, 2010

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Vogel

Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärungen gemäß § 4 Abs. 3 S. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich versichere zudem, dass diese Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Bis auf den Titel der Diplom-Biologin habe ich bislang keinen anderen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, August 2010

Tessa van Alen

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung.....	4
3.1	Biofilme	4
3.1.1	Transkriptom- und Proteomanalysen von Biofilmen	5
3.2	<i>Neisseria meningitidis</i>	8
3.2.1	Trägertum von Meningokokken	9
3.2.2	Modellsysteme für Meningokokkenerkrankungen und Trägertum.....	10
3.3	Proteomanalysen in <i>N. meningitidis</i>	14
3.4	Ziele dieser Arbeit.....	16
4	Material und Methoden	17
4.1	Geräte	17
4.2	Verbrauchsmaterialien	18
4.3	Antikörper.....	18
4.4	Chemikalien, Enzyme und Reaktionskits	19
4.5	Bakterienstämme	20
4.6	Oligonukleotide	21
4.7	Plasmide	22
4.8	Kulturmedien für Bakterien.....	23
4.9	Puffer und Lösungen	23
4.9.1	Puffer und Lösungen für mikrobiologische Methoden	23
4.9.1.1	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten	23
4.9.1.2	Elektroporation von <i>E. coli</i> Zellen	24
4.9.1.3	Mikroskopie der Biofilme.....	24
4.9.2	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden.....	24
4.9.2.1	Isolation chromosomaler DNA	24
4.9.2.2	Gelelektrophoretische Trennung von DNA in Agarosegelen.....	24
4.9.2.3	Southern Blot	25
4.9.3	Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden	25
4.9.3.1	Proteinpräparation	25
4.9.3.2	SDS-PAGE	26
4.9.3.3	Western Blot	27
4.9.3.4	LPS-Analyse	27
4.9.3.5	2-DE	28
4.10	Mikrobiologische Methoden	29
4.10.1	Kultivierungsbedingungen.....	29
4.10.2	Biofilmbildung im Flusssystem	29
4.10.2.1	Zusammenbau und Vorbereitung.....	29
4.10.2.2	Biofilmbildung	30
4.10.2.3	Biofilmernte und -verarbeitung	31
4.10.2.4	Mikroskopie der Biofilme.....	31

4.10.3	Herstellung von Bakteriensuspensionen mit definierter Zellzahl	32
4.10.4	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten	32
4.10.5	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen für die Elektroporation	32
4.10.6	Elektroporation von <i>E. coli</i> Zellen	32
4.10.7	Transformation von <i>N. meningitidis</i>	33
4.11	Molekularbiologische Methoden	33
4.11.1	Isolation von Plasmid-DNA	33
4.11.2	Isolation chromosomaler DNA	33
4.11.3	PCR	34
4.11.4	Gelelektrophoretische Trennung von DNA in Agarosegelen	34
4.11.5	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
4.11.6	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	35
4.11.7	Ligation von DNA-Fragmenten	35
4.11.8	Aufreinigung von Ligationsansätzen für die Elektroporation	35
4.11.9	Southern Blot	36
4.11.9.1	Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter DNA-Sonden	36
4.11.9.2	DNA-Hybridisierung	37
4.11.9.3	Nachweis DIG-markierter DNA mittels Chemilumineszenz	37
4.11.10	DNA-Sequenzierung	37
4.12	Konstruktion von Mutanten in <i>N. meningitidis</i>	38
4.12.1	Deletion des <i>mntC</i> -Gens	38
4.12.2	Deletion des <i>pldA</i> -Gens	38
4.13	Proteinbiochemische Methoden	39
4.13.1	Präparation vom Gesamtzellprotein aus <i>N. meningitidis</i>	39
4.13.2	Präparation vom Gesamtzellprotein mit mechanischem Zellaufschluss ..	39
4.13.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	40
4.13.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
4.13.4.1	Färbemethoden für Polyacrylamidgele mit Coomassie	41
4.13.4.2	Färbemethoden für Polyacrylamidgele mit Silberfärbung	41
4.13.5	Western Blot	42
4.13.6	LPS-Analysen	42
4.13.6.1	LPS-Schnellpräparation	42
4.13.6.2	Tricin-Gelsystem	42
4.13.6.3	LPS-Silberfärbung	43
4.13.7	2D-Gelelektrophorese	43
4.13.7.1	Rehydrieren	44
4.13.7.2	Fokussieren	44
4.13.7.3	Äquilibrieren	44
4.13.7.4	Zweite Dimension der 2-DE: SDS-PAGE	45
4.13.7.5	Färbung mit Coomassie Brilliant Blau	45
4.13.7.6	Bilderfassung und Auswertung	46
4.13.8	Identifizierung von Proteinen aus den 2D Gelen mittels Nano-HPLC mit MS-Kopplung (Nano-LC-MS/MS)	46
4.13.9	Spectral Counting	47
4.14	Phänotypische Tests	48
4.14.1	Nachweis der Empfindlichkeit gegenüber Paraquat (Paraquat-Assay)	48
4.14.2	Bestimmung der Autolyse bei <i>N. meningitidis</i> (Autolyse-Assay)	48
4.15	Datenauswertung	48

4.15.1 Statistik	48
4.15.2 DNA-Sequenzanalyse.....	48
5 Ergebnisse.....	49
5.1 Biofilmbildung des <i>N. meningitidis</i> Stammes WUE3671.....	49
5.1.1 Stammauswahl.....	49
5.1.2 Planktonische Kultur	50
5.1.3 Biofilmbildung im Flusssystem.....	51
5.2 Vergleich der Expression wesentlicher Strukturen der äußeren Membran von <i>N. meningitidis</i> WUE3671.....	53
5.2.1 Untersuchung von PorB, Opa, Opc und FetA.....	53
5.2.2 Analyse des Lipopolysaccharids (LPS)	54
5.3 Vergleichende Proteomanalyse	55
5.3.1 Auswahl einer geeigneten Proteinpräparation	55
5.3.2 Optimierung der 2D-Gelelektrophorese.....	56
5.3.3 Computergestützte Auswertung mit PDQuest™ Advanced	56
5.3.4 2D-Gelelektrophorese.....	57
5.3.5 Massenspektrometrie und Spectral Counting.....	59
5.3.6 Bestätigung der mittels 2-DE identifizierten regulierten Proteine durch die Verwendung spezifischer Antiseren	63
5.4 Untersuchungen zu MntC (NMB0586).....	64
5.4.1 Sequenzanalyse von MntC.....	64
5.4.2 Herstellung von <i>mntC</i> Knock-out Mutanten.....	65
5.4.3 Wachstumsverhalten der <i>mntC</i> -Mutanten	67
5.4.4 MntC und OMPLA-vermittelte Autolyse.....	69
5.4.4.1 Herstellung von <i>pldA</i> -Mutanten	69
5.4.4.2 OMPLA-vermittelte Autolyse und oxidativer Stress	70
6 Diskussion.....	72
6.1 Biofilmbildung von <i>N. meningitidis</i> WUE3671 im Flusssystem.....	72
6.2 Proteomanalyse von Meningokokken-Biofilmen.....	74
6.2.1 Veränderung der Proteinexpression aufgrund von nutritiven Anpassungen im Biofilm	76
6.2.2 Verfügbarkeit von Sauerstoff im Biofilm	78
6.2.3 Verstärkung des Schutzes gegen oxidativen Stress im Biofilm.....	80
6.3 Untersuchungen zum periplasmatischen substratbindenden Protein MntC des MntABC-Transporters	83
6.3.1 Bedeutung von MntC in der Biofilmbildung von <i>N. meningitidis</i>	84
6.3.2 Rolle von MntC und OMPLA in der Biofilmbildung.....	86
6.4 Fazit und Einschränkungen der Proteomanalyse.....	88
7 Literaturverzeichnis.....	90
8 Anhang	105
8.1 Abkürzungsverzeichnis	105
8.2 Danksagung	106
8.3 Lebenslauf	108
8.4 Publikationen.....	109

1 Zusammenfassung

Neisseria meningitidis ist ein humaner Infektionserreger, der Meningitis und Sepsis hervorruft. Das asymptomatische Trägertum im Nasenrachenraum ist entscheidend für die Übertragung des Bakteriums und dessen Interaktion mit dem menschlichen Wirt. Frühere Beobachtungen legen die Annahme nahe, dass Meningokokken im Tonsillengewebe in einem biofilmähnlichen Stadium vorliegen. Daher werden *in vitro* Biofilme als Modell für das Trägertum verwendet. Expressionsunterschiede zwischen Biofilmen und planktonisch gewachsenen pathogenen Neisserien wurden in wenigen Transkriptomanalysen untersucht, während bisher keine Proteomanalysen durchgeführt wurden. Kartierungen des Proteoms und des Immunoproteoms von Meningokokken liegen allerdings vor.

In dieser Studie wurde das Biofilmproteom des unbekapselten *N. meningitidis* Stammes WUE3671 im Vergleich zum Proteom der planktonisch gewachsenen Bakterien untersucht. Dazu wurde ein auf Silikonschläuchen basierendes Biofilmmodell mit kontinuierlichem Fluss etabliert. Es erfolgte eine Anreicherung bakterieller Biomasse über 48 h, wobei die koloniebildenden Einheiten bei 24 h ein Plateau erreichten. Licht- und Elektronenmikroskopie belegten die deutliche Zunahme der Biomasse über 48 h und zeigten zudem eine Strukturierung des 48 h Biofilms in eine apikale Region mit überwiegend vitalen Meningokokken und eine basale Region mit einer verstärkten Anzahl von Bakterien mit avitalem Erscheinungsbild. Das Proteom von *N. meningitidis* Biofilmen, die 24 beziehungsweise 48 h gewachsen waren, wurde mit dem einer exponentiell gewachsenen planktonischen Kultur mit 2D-Gelelektrophorese verglichen. Unterschiedlich exprimierte Proteine wurden mit Massenspektrometrie identifiziert und die Ergebnisse mit Spectral Counting und, wenn möglich, mit spezifischen Antikörpern abgesichert. Die Expression von ungefähr 2 % aller Proteinspots im Biofilm unterschied sich von der in planktonischen Zellen wenigstens um das 2-fache. Es wurden Veränderungen beobachtet, die mit einem Nährstoff- und Sauerstoffmangel sowie einer Zunahme von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) in Verbindung gebracht werden können. Die Expression der Proteine SodC und MntC war im Biofilm deutlich erhöht, was mutmaßlich auf ROS im Biofilm zurückzuführen ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MntC in der Tat essentiell für Biofilmwachstum, nicht aber für planktonisches Wachstum ist. Die Daten zu SodC und MntC legen die Hypothese nahe, dass Meningokokken im Biofilm trainiert werden mit Mediatoren des Immunsystems, wie ROS,

umzugehen. Zudem wird NMB0573, ein Lrp-Homolog, als wesentlicher globaler Regulator für metabolische Anpassungen im Biofilm postuliert. Es konnte über die Proteomanalyse hinaus gezeigt werden, dass die Adhäsine Opc und Opa, die unter der Kontrolle von NMB0573 stehen, im Biofilm vermindert exprimiert werden.

2 Summary

Neisseria meningitidis is a human pathogen that causes meningitis and sepsis. Asymptomatic nasopharyngeal carriage is crucial for the transmission of the bacterium and its interaction with the human host. Previous observations led to the assumption that meningococci persist in the tonsillar tissue in a biofilm-like state. Therefore *in vitro* biofilms are used to model carriage. Despite successful mapping of the meningococcal proteome and immunoproteome, no proteome and only a few transcription analyses investigated the differences between biofilm and planktonic growth in pathogenic *Neisseria*.

This study investigated the biofilm proteome of the unencapsulated *N. meningitidis* strain WUE3671 in comparison to planktonically grown bacteria. A continuous flow biofilm model based on silicone tubes was established. There was an accumulation of bacterial biomass over 48 h with the number of colony forming units reaching a plateau at 24 h. Light- and electron microscopy confirmed biomass accumulation and revealed a structuring of the 48 h biofilm in an apical region with predominantly vital meningococci and a basal region with increased numbers of bacteria with avital appearance. The proteomes of *N. meningitidis* biofilms grown for 24 or 48 h, respectively and of exponentially grown planktonic cultures were compared by 2D-gelelectrophoresis. Differentially expressed proteins were identified by mass spectrometry. The results were confirmed by spectral counting and, if available, with specific antibodies. Approximately 2 % of all protein spots in the biofilm were at least 2-fold differentially expressed in comparison to planktonic cells. Changes related to nutrient and oxygen limitation and increase of reactive oxygen species (ROS) were observed. There was an increased expression of SodC and MntC in the biofilm that supposedly is caused by ROS in the biofilm. MntC was specifically required for meningococcal biofilm formation, but not for planktonic growth. Data for SodC and MntC suggest that meningococci in the biofilm are trained to cope with mediators of the immune system like ROS. Moreover, NMB0573, an Lrp-like global regulator, was implicated as a possible mediator of metabolic adaptation in the biofilm. Independent of the proteome analysis, the NMB0573-dependent adhesions Opc and Opa were in addition shown to be down-regulated within the biofilm.

3 Einleitung

3.1 Biofilme

Ein Biofilm ist eine komplexe sessile Gemeinschaft aus Mikroorganismen, die durch eine irreversible Bindung an eine Oberfläche, Grenzfläche oder aneinander gebundene Zellen charakterisiert ist. Die Zellen sind in eine selbst produzierte Matrix extrazellulärer polymerer Substanzen eingebettet und zeigen einen veränderten Phänotyp hinsichtlich ihrer Wachstumsrate und Genexpression [Übersicht in (Donlan & Costerton, 2002)]. Der Prozess der Biofilmbildung wird in fünf Schritten eingeteilt (Abbildung 1), wobei sich auf die initiale reversible Bindung planktonischer Zellen an eine Oberfläche eine irreversible Anlagerung anschließt (Sauer *et al.*, 2002). Die nächsten Schritte umfassen die Proliferation der Zellen und die Biofilmreifung, gefolgt von der finalen Ablösung und Streuung der Biofilmzellen (Sauer *et al.*, 2002, Stoodley *et al.*, 2001).

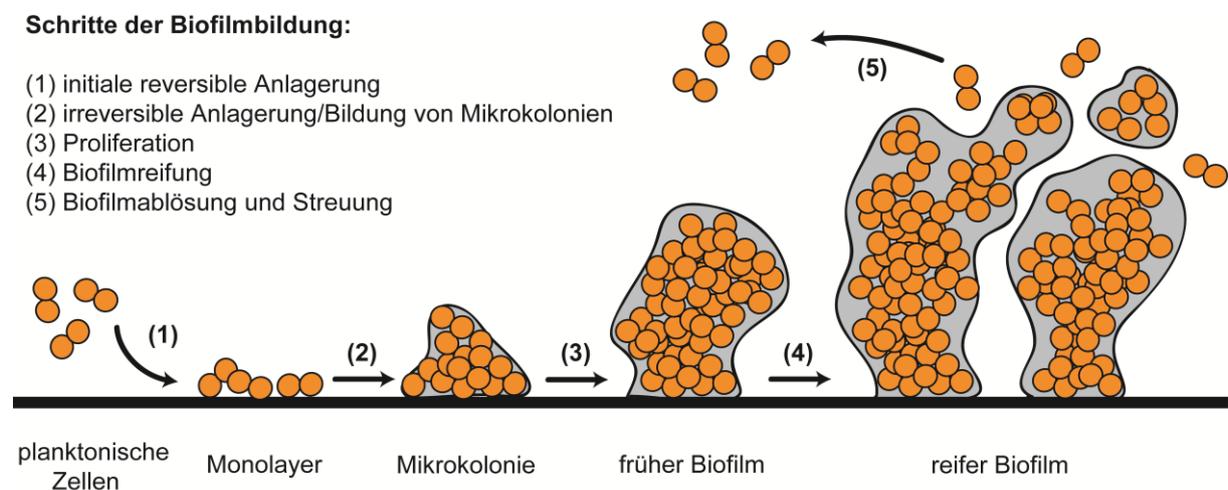


Abbildung 1. Schritte der Biofilmbildung [modifiziert nach (Davies, 2003)]

Während der Biofilmbildung wird die Bakterienpopulation in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen eingebettet, die mitverantwortlich für die Bildung und Aufrechterhaltung der Biofilmstrukturen ist [Übersicht in (Sutherland, 2001)]. Abhängig vom Mikroorganismus besteht diese extrazelluläre Matrix des Biofilms aus Polysacchariden, Lipopolysacchariden, Proteinen, Membranvesikeln und Zelltrümmern (Branda *et al.*, 2005). Auch extrazelluläre DNA spielt eine bedeutende Rolle in der Biofilmbildung (Whitchurch *et*

al., 2002, Moscoso *et al.*, 2006, Qin *et al.*, 2007, Lappann *et al.*, 2010, Harmsen *et al.*, 2010). Biofilme kontaminieren viele Oberflächen in der unbelebten Umwelt, in Industrieanlagen und in medizinischen Implantaten. Sie sind für viele chronische humane Infektionen verantwortlich [Übersicht in (Costerton *et al.*, 1994, Costerton *et al.*, 1999)]. Zudem bieten Biofilme Überlebensvorteile im Vergleich zu den frei beweglichen planktonischen Bakterien, einschließlich einer erhöhten Resistenz gegenüber antimikrobiellen Agentien (Donlan, 2000, Stewart & Costerton, 2001, Prince, 2002, Mah *et al.*, 2003) und dem Immunsystem des Wirtes (Yasuda *et al.*, 1994, Jesaitis *et al.*, 2003, Bjarnsholt *et al.*, 2005).

3.1.1 Transkriptom- und Proteomanalysen von Biofilmen

Aufgrund der veränderten Wachstumsbedingungen der Mikroorganismen im Biofilm weisen diese oft andere phänotypische Eigenschaften auf als planktonisch gewachsene Zellen [Übersicht in (Stewart & Franklin, 2008)]. Das Verständnis dieser gewandelten Physiologie ist notwendig, um u.a. Infektionen und ökologische Prozesse der biofilmassoziierten Mikroorganismen zu verstehen. Daher wurden in vielen Studien die Veränderungen zwischen Biofilmzellen und planktonischen Zellen mit globalen Transkriptom- und Proteomanalysen untersucht [Übersicht in (Stewart & Franklin, 2008)]. Auch Hochdurchsatz-Screens zur Identifizierung von Genen, die für die Biofilmbildung verantwortlich sind, kamen zum Einsatz (O'Toole & Kolter, 1998).

Durch vergleichende Transkriptomanalysen zwischen Biofilm- und planktonischen Zellen konnte eine Vielzahl regulierter Gene ermittelt werden. Die codierten Proteine steuern u.a. die Sensitivität gegenüber Antibiotika (Whiteley *et al.*, 2001), Adhäsion und Autoaggregation (Schembri *et al.*, 2003, Resch *et al.*, 2005), Pilusproduktion und Motilität (Waite *et al.*, 2005), Energieproduktion (Beloin *et al.*, 2004), Synthese der Zellhülle (Beloin *et al.*, 2004, Resch *et al.*, 2005), Membrantransport und Eisenaufnahme (Sampathkumar *et al.*, 2006) sowie Quorum Sensing (Moreno-Paz *et al.*, 2010). Zudem waren Gene reguliert, deren codierte Proteine an der Antwort auf verschiedene Stressbedingungen wie z.B. Sauerstoff- und Nährstoffmangel (Schembri *et al.*, 2003, Beloin *et al.*, 2004, Beenken *et al.*, 2004, Resch *et al.*, 2005, Waite *et al.*, 2006) und Schutz gegen oxidativen Stress (Sampathkumar *et al.*, 2006) involviert sind. Kürzlich veröffentlichte Studien beschreiben das Transkriptom von Biofilmen von *N. meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae* (O'Dwyer *et al.*, 2009, Falsetta *et al.*, 2009). In Gonokokken sind beim Vergleich von planktonischen Zellen und Biofilmen 3,8 % des

Genoms unterschiedlich reguliert, wobei deutlich hochregulierte Gene (*aniA*, *norB* und *ccp*) an der anaeroben Atmung und der Stresstoleranz beteiligt sind (Falsetta *et al.*, 2009). Insertionsmutanten von *aniA*, *norB* und *ccp* waren in ihrer Biofilmbildung deutlich beeinträchtigt, auf Glasoberflächen und auch auf transformierten humanen Epithelzellen (Falsetta *et al.*, 2009). Die Transkriptomanalyse von *N. meningitidis* MC58 Biofilmen im Vergleich zu einer auf Platte gewachsenen Kultur zeigte die stärkste Hochregulation in Genen dreier funktionaler Gruppen: der Aminosäure-Biosynthese, des Energie-Metabolismus und der Zellwand-Synthese (O'Dwyer *et al.*, 2009). Zudem waren Gene, die für die Kapselsynthese verantwortlich sind, im Biofilm herunterreguliert. Transkriptomanalysen geben einen globalen Überblick über die Veränderungen während des Biofilmstadiums, jedoch sind auch posttranskriptionale, posttranslationale sowie metabolische Modifikationen wichtig, die nicht durch mRNA Expressionsanalysen vorhergesagt werden können (Sauer, 2003, Serra *et al.*, 2008). So konnten durch proteinbasierte Analysen in Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa* deutlich mehr unterschiedlich regulierte Proteine im Vergleich zu planktonischen Zellen detektiert werden, als mit Transkriptomanalysen (Whiteley *et al.*, 2001, Sauer *et al.*, 2002). Bisher liegen jedoch keine Daten für *N. meningitidis* vor. Proteomanalysen in diversen anderen Mikroorganismen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Es zeigt sich, dass in Biofilmen Proteine der oxidativen Stressabwehr verändert exprimiert werden (Sauer *et al.*, 2002, Tremoulet *et al.*, 2002, Ram *et al.*, 2005, Resch *et al.*, 2005, Resch *et al.*, 2006, Patrauchan *et al.*, 2007, Martinez-Gomariz *et al.*, 2009, Nigaud *et al.*, 2010). Zudem legten Proteomanalysen eine vermehrte Aminosäure-Biosynthese im Biofilm nahe (Sauer *et al.*, 2002, Planchon *et al.*, 2009). Es erfolgte in den Studien nicht nur ein Vergleich von planktonischen Zellen und Biofilmzellen in den verschiedensten Wachstumsphasen. In Proteomanalysen von *P. aeruginosa*, des am häufigsten zur Untersuchung von Monospezies-Biofilmen verwendeten Erregers, wurden auch sogenannte „Oberflächen beeinflusste planktonische Zellen“ (*surface influenced planktonics*, SIP) untersucht (Steyn *et al.*, 2001, Nigaud *et al.*, 2010). Diese Studien zeigten, dass Bakterien einen Biofilm in ihrer nahen Umgebung registrieren und als Konsequenz ihre Genregulation anpassen (Nigaud *et al.*, 2010). Auch der Einfluss des divalenten Kations Calcium oder des globalen Regulators RpoS auf das Proteom in planktonischen Zellen und Biofilmen konnte durch Proteomanalysen vergleichend analysiert werden (Patrauchan *et al.*, 2005, Patrauchan *et al.*, 2007, Collet *et al.*, 2008).

Tabelle 1. Proteomanalysen von Biofilmen

Mikroorganismus	Biofilmmodell (Inkubationszeit)	planktonische Kultur (Inkubationszeit)	Proteom-analyse	Referenz
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Statisch in Petrischalen (24 h)	Schüttelkolben (24 h)	2-DE, MS	(Shin <i>et al.</i> , 2009)
<i>Bacillus cereus</i>	Schüttelkolben mit Glaswolle (18 h)	Schüttelkolben (18 h)	2-DE, N	(Oosthuizen <i>et al.</i> , 2001, Oosthuizen <i>et al.</i> , 2002)
<i>Bacillus cereus</i>	Schüttelkolben mit Glaswolle (24 h)	Schüttelkolben (mittlere exp., transiente, stat. Phase)	2-DE	(Vilain & Brozel, 2006)
<i>Bordetella pertussis</i>	Reaktor, BF auf Polypropylen-Plättchen (72 h)	Schüttelkolben [mittlere exp. (24 h), stat. Phase (44 h)]	2-DE, MS	(Serra <i>et al.</i> , 2008)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Kolben mit Glasperlschnur (48 h)	Kolben (48 h)	2-DE	(Dykes <i>et al.</i> , 2003)
<i>Candida albicans</i>	Flusssystem, BF auf Plexiglas-Streifen (48 h)	Schüttelkolben (48 h)	DIGE, MS	(Martinez-Gomariz <i>et al.</i> , 2009)
<i>Candida glabrata</i>	Schüttelkultur, Polystyrol Petrischalen (48 h)	Schüttelkolben [späte exp. Phase (24 h)]	DIGE, MS	(Seneviratne <i>et al.</i> , 2010)
<i>Escherichia coli</i>	Statisch auf Glasfaserfilter (7 d)	Schüttelkolben (7 d)	2-DE, MS	(Tremoulet <i>et al.</i> , 2002b)
<i>Escherichia coli</i>	Schüttelkolben mit Glaswolle (3 d)	Schüttelkolben [exp. (8 h), stat. Phase (24 + 72 h)]	2-DE, MS	(Collet <i>et al.</i> , 2008)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Statisch auf Glasfaserfilter (7 d)	Schüttelkolben (7 d)	2-DE, MS	(Tremoulet <i>et al.</i> , 2002a)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Chemostat-Bioreaktor (30 d), BF auf Oberfläche	Chemostat-Bioreaktor (30 d), Überstand	1-DE, MS	(Ang <i>et al.</i> , 2008)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bioreaktor (7-106 h)	Schüttelkolben	2-DE, MS	(Patrauchan <i>et al.</i> , 2005)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Schüttelkolben mit Glaswolle (18 h)	Schüttelkolben (18 h)	2-DE	(Steyn <i>et al.</i> , 2001)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Flusssystem mit Silikonschläuchen (bis zu 12 d)	Chemostat-Bioreaktor (170 min)	2-DE, MS	(Sauer <i>et al.</i> , 2002, Southey-Pillig <i>et al.</i> , 2005)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Schüttelkolben mit Glaswolle (18 + 48 h)	Schüttelkolben (18 + 48 h)	2-DE, MS	(Vilain <i>et al.</i> , 2004b, Vilain <i>et al.</i> , 2004a)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Flusskammer mit Tonperlschnur (18 + 48 h)	Flusskammer (18 + 48 h)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Flusssystem mit Silikonschläuchen (3 + 5 d)	Schüttelkolben [exp. (3 h) + stat. Phase (9 h)]	DIGE, MS	(Mikkelsen <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Flusssystem mit Silikonschläuchen (72 h)	Schüttelkolben [mittlere exp. Phase (18 h)]	2-DE, MS	(Patrauchan <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Schüttelkolben mit Glaswolle (72 h)	Schüttelkolben (24 h)	2-DE, MS	(Nigaud <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pseudomonas putida</i>	Flusssystem mit Silikonschläuchen (bis zu 24 h)	Chemostat-Bioreaktor (170 min)	2-DE, N	(Sauer & Camper, 2001)
<i>Salmonella enterica</i>	Flusssystem mit Flusszellen (168 h)	Schüttelkolben mit Mediumfluss (168 h)	2-DE, MS	(Mangalappalli-Illathu <i>et al.</i> , 2008)
<i>Shewanella oneidensis</i>	Flusssystem mit Silikonschläuchen (7 d)	Schüttelkolben (stat. Phase)	2-DE, MS	(De Vriendt <i>et al.</i> , 2005)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Dialysemembran auf Agarplatte (8 + 48 h)	Schüttelkolben	2-DE, MS	(Resch <i>et al.</i> , 2006)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Flusssystem mit künstl. Herzkappen (48 h)	Flusssystem (48 h)	2-DE, MS	(Benard <i>et al.</i> , 2009)
<i>Streptococcus mutans</i>	Biofilmmodell (7 h)	Chemostat-Bioreaktor (7 h)	2-DE, MS	(Svensater <i>et al.</i> , 2001)
<i>Streptococcus mutans</i>	Statisch, Styropor Kulturplatten +/- Apatit (17 h)	Überstand des BF (17 h)	DIGE	(Luppens & ten Cate, 2005)
<i>Streptococcus mutans</i>	Flussreaktor (48 h)	Chemostat-Bioreaktor (stat. Phase)	2-DE, MS	(Rathsam <i>et al.</i> , 2005a, Rathsam <i>et al.</i> , 2005b)
<i>Yersinia ruckeri</i>	Agarplatten (48 h)	Schüttelkolben [frühe (24 h) + späte (48 h) stat. Phase]	2-DE, MS	(Coquet <i>et al.</i> , 2005)

Abkürzungen: BF, Biofilm; 2-DE, 2D-Gelelektrophorese; MS, Massenspektrometrie; DIGE, difference gel electrophoresis, N, N-terminale Sequenzanalyse

3.2 *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis, auch Meningokokken genannt, sind Gram-negative Diplokokken (Abbildung 2), die im Nasenrachenraum des Menschen die Schleimhäute asymptomatisch besiedeln können. Dieser Erreger trägt bei Kindern und Heranwachsenden erheblich zur Morbidität und Mortalität durch Meningitis und Sepsis bei (Rosenstein *et al.*, 2001). Die ersten Krankheitsausbrüche wurden 1805 in Genf und 1806 in Neu England beschrieben (Vieusseux, 1805, Danielson & Mann, 1806). Zum ersten Mal isoliert wurden die Meningokokken im Jahre 1887 von Anton Weichselbaum aus der Cerebrospinalflüssigkeit eines Meningitispatienten (Weichselbaum, 1887). Der Hauptvirulenzfaktor der Meningokokken ist die Polysaccharidkapsel (Vogel *et al.*, 1996), die zum Schutz vor Phagozytose, Opsonisierung und Komplement-vermittelte Abtötung dient (Vogel *et al.*, 1997). Bekapselte Meningokokken lassen sich anhand der Antigeneigenschaften der Kapselpolysaccharide in 12 verschiedene Serogruppen (A, B, C, 29E, H, I, K, L, W-135, X, Y und Z) einteilen, wobei die Krankheitsisolate zumeist den Serogruppen A, B, C, W-135 und Y zugeordnet werden können (Peltola, 1983, Rosenstein *et al.*, 2001). Zu epidemiologischen Zwecken werden die Meningokokken zusätzlich zur Serogruppe hinsichtlich ihrer subkapsulären Antigene untersucht. Dies bietet die Basis für die Bestimmung der Antigenformel, die sich aus der Serogruppe, dem PorA-Sequenztyp und dem FetA-Sequenztyp zusammensetzt [Übersicht in (Jolley *et al.*, 2007)]. Zusätzlich erfolgt die Analyse der Genotypen durch Multilokus Sequenztypisierung (MLST) (Maiden *et al.*, 1998).

In den Industrieländern sind vor allem Meningokokken der Serogruppe B und C für die Mehrheit aller Erkrankungsfälle verantwortlich [Übersicht in (Harrison *et al.*, 2009)], die Inzidenz für invasive Erkrankungen liegt in Europa bei 0,5 bis 5 Fällen auf 100.000 Einwohnern im Jahr mit einer Sterblichkeitsrate von etwa 8 % (Trotter *et al.*, 2007). In Deutschland kommen bei invasiven Erkrankungen bis zu 2/3 Serogruppe B und zu 1/4 Serogruppe C Meningokokken vor (Elias *et al.*, 2006). Die Serogruppe A verursacht epidemische Erkrankungen in der Sub-Sahara Region Afrikas (Pollard & Frasch, 2001), dem sogenannten „Meningitisgürtel“, der sich vom Senegal im Westen bis Äthiopien im Osten erstreckt. Hier ist die Inzidenz mit 1000 Personen/100.000 Einwohnern/Jahr (1 %) deutlich höher als in den Industrienationen [Übersicht in (Harrison *et al.*, 2009)]. Diese hohe Inzidenz

ist teilweise durch Umweltfaktoren (z.B. Harmattan) zu erklären [(Schwartz *et al.*, 1989), Übersicht in (Stephens, 2007)].

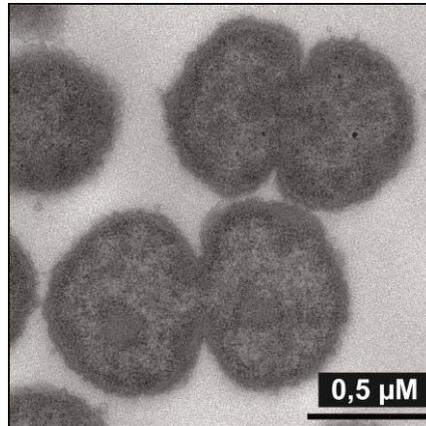


Abbildung 2. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Diplokokken der Spezies *N. meningitidis*.

3.2.1 Trägertum von Meningokokken

Die Übertragung von *N. meningitidis* erfolgt bei engem Kontakt durch Tröpfcheninfektion (Nelson, 1996). Infolgedessen kann sich ein asymptomatisches Trägertum im menschlichen Nasopharynx etablieren. Das Trägertum kann chronisch über einen längeren Zeitraum (mehr als 90 Tage), intermittierend oder transient auftreten, und wird vor allem durch das Alter beeinflusst (Andersen *et al.*, 1998). In nicht-epidemischen Zeiten tragen durchschnittlich 5-10 % der gesunden Individuen *N. meningitidis* im Nasenrachenraum. Die Trägerrate ist in den ersten Lebensjahren mit 3 % sehr gering und erreicht bei Heranwachsenden und jungen Erwachsenen (15-24 Jahre) mit 10-35 % ihren Höhepunkt (Cartwright *et al.*, 1987, Blackwell *et al.*, 1990, Caugant *et al.*, 1994, Stephens, 1999, Claus *et al.*, 2005). Der geringen Trägerrate bei Säuglingen und Kleinkindern steht deren hohe, altersbezogene Inzidenz der invasiven Meningokokkenerkrankung gegenüber (Goldschneider *et al.*, 1969a). Dahingegen fällt die leichte Zunahme der Erkrankungen bei Jugendlichen, im Vergleich zu deren hohen asymptomatischen Trägerraten, kaum ins Gewicht. Sie ist vor allem in *Lifestyle*-Faktoren von Jugendlichen begründet (Tully *et al.*, 2006). Neben dem Alter und dem Kontakt zu erkrankten Personen sind Risikofaktoren für Trägertum u.a. Infektionen des Respirationstraktes mit Viren oder Bakterien, Umweltfaktoren wie eine sehr geringe Luftfeuchtigkeit und sozioökologische Faktoren (Stuart *et al.*, 1988, Tzeng & Stephens, 2000). Die Kolonisierung mit Meningokokken führt zu einer natürlich erworbenen Immunität. Zudem scheinen auch

kommensale Neisserien Spezies von zentraler Wichtigkeit bei der Vermeidung von invasiven Meningokokkenerkrankungen zu sein (Goldschneider *et al.*, 1969b). Nur selten gelangen die Meningokokken über die Schleimhaut in den Blutstrom und führen im Anschluss zu schwerwiegenden Blutvergiftungen und Hirnhautentzündungen, mit einem tödlichen Verlauf in 10-20 % der Fälle [Übersicht in (Peltola, 1983, Tzeng & Stephens, 2000)].

Während des Trägertums sind die Meningokokken häufig unbekapselt weil sie anstelle des Kapselgenclusters den *capsule null locus* (*cnl*) enthalten (Claus *et al.*, 2002) oder aufgrund der Inaktivierung dieses Genclusters durch Phasenvariation, Deletion und Insertion (Hammerschmidt *et al.*, 1996a, Hammerschmidt *et al.*, 1996b, Hilse *et al.*, 1996, Dolan-Livengood *et al.*, 2003, Weber *et al.*, 2006). Eine breit angelegte Trägerstudie mit Kindern und jungen Erwachsenen zeigte, dass mehr als 16 % aller Meningokokkenisolate *cnl* Meningokokken waren (Claus *et al.*, 2005) und 31 % aller Stämme, die positiv hinsichtlich der Kapselsynthesegene der Serogruppen B, C, W-135 und Y waren, aufgrund von Phasenvariation, Deletion und Insertion unbekapselt waren (Weber *et al.*, 2006).

3.2.2 Modellsysteme für Meningokokkenerkrankungen und Trägertum

Kolonisationsprozesse sind schwer zu untersuchen besonders für Pathogene, die ausschließlich an den Menschen adaptiert sind und wirtsspezifische Nährstoffe und/oder Rezeptoren verwenden (West *et al.*, 2003). In diesem Fall sind biologisch relevante Modellsysteme selten. Auch *N. meningitidis* ist ausschließlich an den menschlichen Wirt angepasst, wobei die Verfügbarkeit von Eisen der entscheidende Faktor einer erfolgreichen Meningokokkeninfektion bzw. Kolonisation ist (Schryvers & Stojiljkovic, 1999). Eisen wird im Menschen sehr effektiv von eisenbindenden Proteinen gebunden, so dass nur sehr geringe Eisenkonzentrationen im Serum und auf der Mucosaoberfläche gefunden werden (Schryvers & Stojiljkovic, 1999). Meningokokken sind in der Lage, sich das notwendige Eisen von den humanen eisenbindenden Proteinen Transferrin und Laktoferrin durch spezifische Rezeptoren auf der Bakterienoberfläche anzueignen (Schryvers & Gonzalez, 1989, Gray-Owen & Schryvers, 1996). Diese Rezeptoren sind spezifisch für die humanen Proteine, wodurch die Wirtsspezifität zu erklären ist (Schryvers & Morris, 1988a, Schryvers & Morris, 1988b). Zudem sind auch spezielle Bindungen von Oberflächenproteinen der Meningokokken an Rezeptoren oder anderen Oberflächenstrukturen der Wirtszellen für die Wirtsspezifität verantwortlich (Kallstrom *et al.*, 1997, Dehio *et al.*, 1998, Unkmeir *et al.*,

2002). Dies erschwert die Entwicklung geeigneter Tiermodelle zur Untersuchung der Pathogenese bzw. des Trägertums von *N. meningitidis*. Das Hauptaugenmerk bei der Entwicklung von Tiermodellen für Meningokokken lag bisher auf Entwicklung von Krankheitsmodellen, nicht aber auf der Entwicklung von Modellen zur Untersuchung des Trägertums. Die Meningokokkenerkrankung wurde u.a. in Modellen mit adulten Mäusen untersucht, denen zusätzlich Eisendextran oder humanes Holotransferrin intraperitoneal oder auch intranasal verabreicht wurde (Holbein, 1980, Yi *et al.*, 2003, Newcombe *et al.*, 2004). Studien mit neugeborenen Ratten haben die Wichtigkeit der Kapsel für die Ausbildung einer Bakteriämie gezeigt (Vogel *et al.*, 1996). Es wurden auch transgene Mausmodelle entwickelt, die CD46 oder humanes Transferrin exprimieren und der Erforschung der Meningokokkenerkrankung dienen (Johansson *et al.*, 2003, Zarantonelli *et al.*, 2007, Sjolinder & Jonsson, 2007). Bei dem humanen Oberflächenprotein CD46 handelt es sich um ein Komplement-Regulatorprotein, das als Pilus-Rezeptor identifiziert worden ist (Kallstrom *et al.*, 1997). Ein gemeinsamer Nachteil der beschriebenen Studien ist die ausschließliche Verwendung von bekapselten Meningokokken. Um das Trägertum in Tiermodellen *in vivo* untersuchen zu können, müssten auch unbekapselten Meningokokken untersucht werden können. Zudem ist eine Besiedlung über einen längeren Zeitraum wünschenswert.

Neben den Tiermodellen wurden auch andere Modellsysteme zur Untersuchung von *N. meningitidis* entwickelt. In einem Organkulturmodell mit menschlichem Gewebe aus dem Nasenrachenraum wurden Gene identifiziert, die zur Kolonisation von Meningokokken notwendig sind (Exley *et al.*, 2009). Jedoch ist die Anzahl der Bakterien in dieser Meningokokken-Epithelzellen-Kokultivierung so gering, dass dieses Modell nicht für alle experimentellen Untersuchungen wie zum Beispiel eine Proteomanalyse geeignet ist. Vorausgegangene immunhistochemische Studien haben gezeigt, dass Meningokokken asymptomatisch auf humanem Tonsillengewebe in einem biofilmähnlichen Stadium vorkommen (Sim *et al.*, 2000). Somit sind *in vitro* Biofilme eine Alternative um bakterielle Prozesse bei der Besiedlung zu modellieren. Meningokokken-Biofilme wurden bereits unter statischen (Yi *et al.*, 2004) sowie unter kontinuierlichen Flussbedingungen auf abiotischen Oberflächen (Lappann *et al.*, 2006, O'Dwyer *et al.*, 2009, Lappann *et al.*, 2010) und auf Epithelzellen etabliert (Neil *et al.*, 2009, Neil & Apicella, 2009). Diese Modellsysteme

(Übersicht in (Lappann & Vogel, 2010)) sind sehr gut geeignet, um die verschiedensten Fragestellungen zu untersuchen.

3.2.3 Transkriptionsregulation in *N. meningitidis*

Durch die Regulation der Genexpression durch Zweikomponenten-Regulationssysteme, alternative Sigmafaktoren oder Transkriptionsregulatoren können sich Bakterien an unterschiedlichste Umweltbedingungen anpassen. Dabei reagieren sie auf verschiedene Parameter, wie z.B. Änderungen der Temperatur, Ionenkonzentration, Osmolarität, pH-Wert, Verfügbarkeit einer Kohlenstoffquelle, Wachstumsphase und Sauerstoffgehalt (Finlay & Falkow, 1997). Die Reaktion auf einen/mehrere dieser Einflüsse erfordert die Wahrnehmung, Weiterleitung und Umsetzung der Signale hin zu einer Veränderung der Genexpression.

Zweikomponenten-Regulationssysteme wirken oft als globale Regulatoren in der Koordination von bakteriellen Virulenzfaktoren. Sie bestehen meist aus einer membran-gebundenen Histidinkinase, die als Sensor für umweltbedingte Stimuli dient, und einem zytoplasmatischen Responseregulator der die Aktivität der DNA-Bindung und somit die Transkription moduliert (Hoch, 2000). Bisher wurden vier Zweikomponenten-Systeme in Meningokokken identifiziert, von denen nur für eines die Funktionalität gezeigt werden konnte. Das PhoP/PhoQ (MisR/MisS) System beeinflusst direkt und indirekt eine große Anzahl biologischer Funktionen, zu denen die Modulation der äußeren Membranstruktur gehört (Tzeng *et al.*, 2008, Jamet *et al.*, 2009). Die drei weiteren Systeme weisen Homologien zu NarQ/NarP in *N. gonorrhoeae*, PilS/PilR in *P. aeruginosa* und NtrY/NtrX in *Azorhizobium caulinodanz* auf (Pawlowski *et al.*, 1991, Hobbs *et al.*, 1993, Lissenden *et al.*, 2000, Overton *et al.*, 2006).

Alternative Sigmafaktoren kontrollieren Regulons, die unter spezifischen Stressbedingungen, Wachstumsveränderungen und morphologischen Umgestaltungen aktiviert werden [Übersicht in (Gruber & Gross, 2003)]. Die Annotierung des Genoms von *N. meningitidis* deutet auf nur drei alternative Sigmafaktoren hin, RpoH (σ^{32}), RpoN (σ^{54}) und RpoE (σ^E) (Gunsekere *et al.*, 2006, Hopman *et al.*, 2010), zu deren Funktion es nur wenige Informationen gibt. Zusätzlich erfolgt eine Modulation der Transkription durch Regulatorproteine (Aktivator- und Repressorproteine), die zumeist die Expression des *Houskeeping*-Sigmafaktors beeinflussen. Im Gegensatz zu *Escherichia coli* mit mehr als 200

Transkriptionsregulatoren wurden in Meningokokken nur 35 möglichen Regulatoren identifiziert (Pareja *et al.*, 2006), von denen bisher nur acht genauer charakterisiert wurden.

(I) Das Lrp (*leucine-responsive regulatory protein*) - Homolog NMB0573 ist ein globaler Regulator, der unter nährstoffarmen Bedingungen als Transkriptionsaktivator wirkt, wobei die Aminosäuren Leucin und Methionin als Indikatoren für einen generellen Nährstoffmangel dienen (Ren *et al.*, 2007).

(II) Der zur LysR-Familie gehörige Transkriptionsregulator CrgA (*contact-regulated gene A*) spielt eine zentrale Rolle bei der Adhäsion von Meningokokken (Deghmane *et al.*, 2000, Deghmane *et al.*, 2002, Deghmane *et al.*, 2004).

(III) Ein weiterer zur LysR-Familie gehöriger Transkriptionsregulator ist OxyR. Dieser Mediator der Wasserstoffperoxid-induzierten Genexpression umfasst in *N. gonorrhoeae* ein kleines Regulon, mit den Genen für die Katalase (*kat*), die Gluthation-Oxidoreduktase (*gor*) und die Peroxiredoxin-Oxidoreduktase (*prx*) (Tseng *et al.*, 2003, Seib *et al.*, 2006, Seib *et al.*, 2007). In Meningokokken wurde dieser Regulator erst kürzlich beschrieben und dessen straffe Regulation der Katalase-Expression dargelegt (Ieva *et al.*, 2008).

(IV) Der globale Regulator Fur (*ferric uptake regulator*) dient als Repressor von eisen-regulierten Genen (Grifantini *et al.*, 2003, Delany *et al.*, 2004, Delany *et al.*, 2006). Zudem beeinflusst Fur indirekt die Genexpression über die Regulation kleiner, regulatorischer RNA Moleküle (NrrF) (Mellin *et al.*, 2007).

(V) Der Stickstoffmonoxid-sensitive Repressor NsrR (*nitric oxide-sensitive repressor*) wirkt auf ein kompaktes Regulon von Genen der Stickstoffmonoxidsynthese und -detoxifikation (Rock *et al.*, 2007, Heurlier *et al.*, 2008).

(VI) In Meningokokken ist FarR (*fatty acid resistance regulator*) im Gegensatz zu Gonokokken nicht an der Regulation der Fettsäureresistenz der Bakterien beteiligt, sondern lenkt über die Expression des Adhäsins NadA die Anpassung an die Wirtsumgebung (Schielke *et al.*, 2009, Schielke *et al.*, 2010a, Schielke *et al.*, 2010b).

(VII) Eine Adaptation an sauerstofflimitierende Bedingungen erfolgt durch den Transkriptionsaktivator FNR (*fumarate and nitrate reduction regulator*), dessen Regulon in Meningokokken 11 Gene umfasst, die zu 9 Transkriptionseinheiten gehören (Bartolini *et al.*, 2006). Zu diesen Genen gehört u.a. *aniA* (Nitritreduktase), *pgmB* (β -Phosphoglucomutase), *galM* (Aldose-1-epimerase), *mapA* (Maltose-Phosphorylase), NMB0388 (Zuckertransporter), sowie die Cytocrome c4 und c5 kodierenden Gene.

(VIII) Ein weiterer erst kürzlich beschriebener Transkriptionse regulator ist NMB1805, der an der Expression von *pilC1* beteiligt ist (Jamet *et al.*, 2010).

Insgesamt besitzt *N. meningitidis* jedoch nur wenige regulatorische Elemente wie Zweikomponenten-Regulationssysteme, alternative Sigmafaktoren oder Transkriptionsregulatoren. Die genetische und antigene Diversität der Meningokokken wird unter anderem durch Rekombination, Mutation, chromosomale Umlagerungen und Phasenvariation bewirkt (Feil *et al.*, 1999, Jolley *et al.*, 2005, Schoen *et al.*, 2008, Schoen *et al.*, 2009).

3.3 Proteomanalysen in *N. meningitidis*

Eine Reihe von Studien wurden im vergangenen Jahrzehnt zum Meningokokkenproteom veröffentlicht [Übersicht in (Wheeler *et al.*, 2007)]. Zumeist erfolgte die Untersuchung mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese und der anschließenden Identifizierung der Proteine durch die Massenspektrometrie. 2004 wurde eine Referenzkarte des Gesamtzellproteoms für den Serogruppe A Stamm Z4970 erstellt, in der von den ca. 1500 Proteinspots im 2D-Gel (pH-Bereich: 3-10) 273 Proteine identifiziert wurden (Bernardini *et al.*, 2004). Im folgenden Jahr wurde eine Proteomkarte für den Serogruppe B Stamm MC58 veröffentlicht (Mignogna *et al.*, 2005). Hier wurden verschiedene Zellfraktionen im pH-Bereich von 4-7 untersucht, wobei eine Anzahl von 653 Spots detektiert wurde, von denen 238 Proteine identifiziert werden konnten.

Vergleichende Proteomanalysen wurden durchgeführt, um differenziell exprimierte Proteine zu identifizieren und spezifische Fragestellungen zu beantworten. Mit Hilfe der DIGE (*difference gel electrophoresis*) - Technologie wurden zelluläre Targets des Autoinducers AI-2 in *N. meningitidis* MC58 gesucht, um die Rolle des Quorum Sensings in der Regulation von Virulenzfaktoren von Meningokokken aufzuklären (Schauder *et al.*, 2005). Dazu wurde eine *luxS*-Mutante des Stammes MC58 mit und ohne *in vitro* produziertem AI-2 verglichen, was zu keiner unterschiedlichen Expression führte. Eisenregulierte Gene in *N. meningitidis* konnten durch den Vergleich des Proteoms unter Eisenmangel und Eisenüberschuss mit 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert werden (Basler *et al.*, 2006).

Der Fokus vieler weiterer Studien lag vor allem auf der Analyse äußerer Membranvesikel (*outer membrane vesicles*, OMV) und OMV-basierter Impfstoffe (Uli *et al.*, 2006, Vipond *et*

al., 2006, Ferrari *et al.*, 2006, Williams *et al.*, 2007, Marzoa *et al.*, 2010). Eine Proteomkarte des OMV-basierten Impfstoffes VA-MENGOC-BC® wurde durch 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie erstellt (Uli *et al.*, 2006). Zeitgleich erschien eine ähnlich angelegte Studie zum OMV-basierten Impfstoff des Serogruppe B Stammes NZ98/254 (Vipond *et al.*, 2006). Zu den 74 identifizierten Proteinen gehörten u.a. die äußeren Membranproteine PorA, PorB, RmpM und OpcA. Die Analyse zeigte zudem, dass OMV-basierte Impfstoffe auch periplasmatische, membranassoziierte und zytoplasmatische Proteine enthalten. Neben Kartierungen sind auch vergleichende Proteomanalysen von OMV-basierten Impfstoffen vorhanden. Die vergleichende Proteomanalyse von Serogruppe B Detergent abgeleiteten OMVs (DOMVs) mit den spontan freigesetzten äußeren Membranvesikel einer *gna33*-Mutante zeigte eine deutlich höhere Anzahl an äußeren Membranproteinen in der Mutante (Ferrari *et al.*, 2006). Somit lässt sich die genaue Charakterisierung der äußeren Membranproteine durch die Verwendung von Mutanten vorantreiben. Eine weitere vergleichende Proteomanalyse belegte die Unterschiede in der Zusammensetzung der äußeren Membran und der äußeren Membranvesikel des Wildtyp Stammes MC58 und einer Lipopolysaccharid-defizienten Mutante (Williams *et al.*, 2007).

Durch eine Kombination von Proteomics und homologiebasierten bioinformatischen Methoden sollten vor allem hypothetische Proteine untersucht und die Annotierung von *N. meningitidis* Z4970 verbessert werden (Bernardini *et al.*, 2007). Neuere Studien beschäftigten sich mit dem Immunoproteom der Meningokokken (Abel *et al.*, 2007, Williams *et al.*, 2009, Mendum *et al.*, 2009). Dabei wurde die 2D-Gelelektrophorese mit Western Blot Analysen kombiniert um immunreaktive Proteine zu identifizieren und zu analysieren.

3.4 Ziele dieser Arbeit

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die vergleichende Proteomanalyse von Biofilmen und planktonischen Zellen bei dem humanen Infektionserreger *N. meningitidis*.

Aus dieser Aufgabenstellung ergaben sich folgende Teilaspekte:

- Etablierung eines auf Silikonschläuchen basierenden Biofilm-Flusssystems
- Visualisierung der Meningokokken-Biofilme durch Licht- und Elektronenmikroskopie
- Auswahl und Optimierung der Präparationsmethode für das Gesamtzellprotein
- Optimierung der 2D-Gelelektrophorese
- Durchführung der Proteomanalyse und Auswertung der gewonnenen Daten
- Identifizierung der unterschiedlich regulierten Proteine durch Massenspektrometrie in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Sickmann (RVZ, Würzburg; ISAS, Dortmund)
- Bestätigung der Regulation durch Spectral Counting in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Sickmann (RVZ, Würzburg; ISAS, Dortmund) und durch die Verwendung spezifische Antikörper
- Untersuchung der Bedeutung von differenziell regulierten Proteinen hinsichtlich der Biofilmbildung durch die Analyse von Knock-out Mutanten von MntC.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte

Tabelle 2. Geräte

Geräte	Hersteller (Modell)
Analysewaage	Sartorius (R 160 P)
Blotkammer für SDS-PAGE Gele	Bio-Rad
Brutschrank	Thermo Scientific (Heraeus)
Diamantmesser	DiS-Galetzka (Diatome Diamantmesser)
DNA-Sequenzierer	Applied Biosystems 3130
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Bio-Rad
Elektrophoresekammer für 1-DE	Biometra
Elektrophoresekammer für 2-DE	Bio-Rad (PROTEAN II xi Cell)
Elektroporationsgerät	Bio-Rad (Gene Pulser™)
ELISA-Reader	ThermoLabsystems (Multi Scan Ex)
Entwickler	AGFA (Curix 60)
Fokussierungskammer für 2-DE	Bio-Rad (PROTEAN IEF cell)
Geldokumentationsanlage	Herolab (UVT 28 MP)
Gelscanner für 2-DE	Bio-Rad (GS-800 Calibrated Densitometer)
Hybridisierungsöfen	Biometra (OV5)
Kamera für Lichtmikroskop	Visitron Systems (CCD)
Kühlzentrifugen	Sorvall (RC5B und RC5B Plus), Heraeus (Megafuge 1.0 R)
Lichtmikroskop	Zeiss (Axiophot 2 Mikroskop)
Magnetrührer	Janke und Kunkel (IKAMAG®RH)
Mehrkanal-Pumpenkopf	Ismatec (MS/CA 8-6)
Microtom	Leica (Reichert-Jung Ultracut Microtom)
Mikrowelle	Bauknecht (MWS 1820 Duo)
pH-Meter	WTW (pH530)
Photometer	Biochrom (WPA CO8000 Cell Density Meter)
Schlauchpumpe	Ismatec (BVP Standard)
Schüttelinkubator	B. Braun Biotech (Certomat H/R/U), New Brunswick Scientific (G25)
Spektralphotometer	Peqlab (NanoDrop 1000)
Thermoblock	Eppendorf (Thermomixer 5436)
Thermocycler	MWG Biotech (Primus 96 plus), Biometra (TRIO-Thermoblock)
Tischzentrifuge	Heraeus (Biofuge 15 und Biofuge 15R)
UV-Lampe	Heraeus (UVT-20LP)
UV-Crosslinker	Stratagene (Stratalinker 1800)
Vakuumverdampfer	Savant (SpeedVac Plus SC110A)
Vortexer	Scientific Industries (Vortex Genie 2)
Wasserbad	Julabo (SW20)
Zellaufschluß	ThermoSavant (Fast Prep 120)

4.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Mehrwegehahn (3-Wege-Hahn)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmal-Injektions-Kanüle (100 Sterican)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Elektroporationsküvetten, 2 mm	Eurogentec, Seraing, Belgien
Masterflex® peroxide-cured silicone tubing, L/S® 16	Cole Parmer, Illinois, USA
Mikrotiterplatten (96-well)	GreinerBioOne, Essen
Nitrocellulose Transfer Membran (BA 85)	Schleicher & Schuell, Dassel
positiv geladene Nylonmembran porablot NY plus	Macherey & Nagel, Düren
PharMed® 3-Stopper-Schläuche (ID 2,79 mm)	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
ReadyStrip™ IPG Strip	Bio-Rad, München
Röntgenfilm Super RX	Fuji Film, Düsseldorf
Schlauchverbinder aus PP, gerade Form, 4-8/8-12 mm	Hartenstein, Würzburg
Schlauchverbinder aus PP, gerade Form, 3-5 mm	Hartenstein, Würzburg
Lysing Matrix B Tubes	MP Biomedicals, Heidelberg
Silikonschläuche	Hartenstein, Würzburg
Spritzen für Infusionspumpen (Infuject, 50 ml)	Dispomed, Gelnhausen
Sterilfilter (0,2 µm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Whatman Papier	Schleicher & Schüll, Dassel

4.3 Antikörper

Tabelle 4. Antikörper

Antikörper/Antiserum	Verdünnung ^{a)}	Hersteller /Quelle
Rabbit -α- FetA	1:1000	(Thompson <i>et al.</i> , 2003)
Rabbit -α- PorB	1:4000	Genosys Biotechnologies, USA
Mouse -α- Opa (4B12/C11)	1:1000	Mark Achtman, Cork, Irland
Mouse -α- Opc (B306)	1:1000	Mark Achtman, Cork, Irland
Mouse -α- TrkA	1:900	M. Pizza, Novartis Vaccines, Italien
Mouse -α- SdhA	1:900	M. Pizza, Novartis Vaccines, Italien
Mouse -α- HemB	1:900	M. Pizza, Novartis Vaccines, Italien
Mouse -α- NMB1475	1:900	M. Pizza, Novartis Vaccines, Italien
Goat Anti-Mouse, IgG- & IgM-Antikörper, Meerrettich-Peroxidase (POX)-konjugiert	1:5000	Dianova, Hamburg
Goat Anti-Rabbit, IgG, F(ab') ₂ Fragment specific, POX-konjugiert	1:5000	Dianova, Hamburg

a) Verdünnung im Western Blot

4.4 Chemikalien, Enzyme und Reaktionskits

Tabelle 5. Chemikalien, Enzyme und Reaktionskits

Chemikalien und Enzyme	Hersteller
Acrylamidlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
AmpliTaq Gold®DNA Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt
APS, Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
ASB-14, Amidosulfobetaine-14	Sigma-Aldrich, München
Bacto™ Proteose-Pepton	Difco Laboratories, Augsburg
Benzonase®Nuclease, Rekombinant	Sigma-Aldrich, München
Bio-Lyte pH3-10	Bio-Rad, München
CHAPS	Sigma-Aldrich, München
Columbia Agar mit 5 % Schafblut	bioMerieux, Nürtingen
Coomassie Brilliant Blue G-250	Merck, Darmstadt
Difco™ GC Medium Base	Difco Laboratories, Augsburg
DIG VII-Marker	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA modifizierende Enzyme	New England Biolabs, Schwalbach
dNTP-Markierungsgemisch	Roche Diagnostics, Mannheim
DTT, Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, München
Hexanukleotidgemisch	Roche Diagnostics, Mannheim
Jodacetamid	Bio-Rad, München
Klenow-Enzym	Roche Diagnostics, Mannheim
Kristallviolett	Difco Laboratories, Augsburg
Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell
Mineralöl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhypochloritlösung (12 % Cl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ortho-Phosphorsäure (85 %)	Merck, Darmstadt
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem, Darmstadt
PolyViteX	bioMerieux, Nürtingen
Prestained Protein Marker, 6-175 kDa	New England Biolabs, Schwalbach
Protease-Inhibitor (Complete, EDTAfree)	Roche Diagnostics, Mannheim
ProteoExtract® Complete Bacterial Proteome Extraction Kit	Merck Biosciences, Bad Soden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gelextraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Genomic-tip 100/G	QIAGEN, Hilden
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
Roti-Nanoquant ready to use 5x Konzentrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS (Natrium-dodecyl-sulfate) (ultrapure)	MP Biomedicals, Eschwege
Sequenzierpuffer (5 x)	Applied Biosystems, Darmstadt
Smart-Ladder	Eurogentec, Seraing, Belgien
Taq-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Thioharnstoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tributylphosphan (TBP)	Sigma-Aldrich, München

Die restlichen Chemikalien wurden bei AppliChem, Carl Roth GmbH, Merck, Roche Diagnostics und Sigma-Aldrich in p.a. Qualität erworben.

4.5 Bakterienstämme

Für Klonierungen wurde der *E. coli* K12 Stamm DH5 α verwendet (Hanahan, 1983).

Tabelle 6. Meningokokkenstämme

WUE-ID ^{a)}	Sero- gruppe ^{b)}	Sequenz Typ	Genotyp	Resistenz ^{c)}
3671 (WUE3671) 4253 4079	NG (cni)	ST-845	WT (Trägerisolat) <i>mntC</i> - <i>pldA</i> -	- Kana Kana
2135 (MC58) 3240 3349 4254 4259 4074 4075	B	ST-74	WT (invasives Isolat) <i>siaD</i> - <i>siaD</i> -, <i>gfp</i> + <i>siaD</i> -, <i>gfp</i> +, <i>mntC</i> - <i>siaD</i> -, <i>gfp</i> +, <i>mntC</i> -, <i>mntC</i> ₃₆₇₁ <i>siaD</i> -, <i>gfp</i> +, <i>pldA</i> - <i>siaD</i> -, <i>gfp</i> +, <i>pldA</i> -, <i>pldA</i> _{MC58}	- CM CM, Ery CM, Ery, Kana CM, Ery, Kana, Spc CM, Ery, Kana CM, Ery, Kana, Spc
2120 2517 3379 4076 4077	C	ST-11	WT (invasives Isolat) <i>siaD</i> - <i>siaD</i> -, <i>gfp</i> + <i>siaD</i> -, <i>gfp</i> +, <i>pldA</i> - <i>siaD</i> -, <i>gfp</i> +, <i>pldA</i> -, <i>pldA</i> _{MC58}	- CM CM, Ery CM, Ery, Kana CM, Ery, Kana, Spc
α 30 4256	NG (cni)	ST-845	WT (Trägerisolat) <i>mntC</i> -	- Kana
α 62 4257	NG (cni)	ST-845	WT (Trägerisolat) <i>mntC</i> -	- Kana
α 458 4258	NG (cni)	ST-845	WT (Trägerisolat) <i>mntC</i> -	- Kana

a) Nummern gemäß der Stammsammlung des IHM Würzburg

b) NG, *non groupable*; Serogruppe kann nicht ermittelt werden

c) Kana, Kanamycin; Spc, Spectinomycin; CM, Chloramphenicol; Ery, Erythromycin

4.6 Oligonukleotide

Tabelle 7. Oligonukleotide

Oligo	Sequenz (5'-3') ^{a)}	Zielsequenz	Position in Bezug auf die NMB-Nr. ^{b)}
TA3	gcgcgc <u>GAATTC</u> CCAGGAGATTCCAATATGGC	<i>pldA</i> upstream Region	438-418 Bp. 5' von NMB0464
TA4	gcgcgc <u>GAATTC</u> CTGACACGAAAGCAATCGTC	NMB0465	441-421
TA1-R	gcgcgcATGCATCCATCGGCAACAGTCCTGTC	NMB0464 (<i>pldA</i>)	73-54
TA2-R	gcgcgcATGCATGCAGAACGGTATCGGTATCG	NMB0464 (<i>pldA</i>)	1098-1117
TA5	gcgcgc <u>ACTAGT</u> TCCGCTATAAAATGCCGTTTG	<i>pldA</i> upstream Region	30-10 Bp. 5' von NMB0464
TA6	gcgcgc <u>GAATTC</u> TCAGATGCCGTCCAAGTCG	NMB0464 (<i>pldA</i>)	1149-1131
TA77	gcgcgc <u>GGATCCC</u> CTTGCCGTCATCTACCG	NMB0587	464-482
TA78	gcgcgc <u>CAATTG</u> CTATCAGTAATCCAGATTTTGC	NMB0585	3752-3773
TA79	gcgcgcATGCATTCGCCTAAAATGCTGAAGCTG	NMB0586 (<i>mntC</i>)	78-98
TA80	gcgcgcATGCATCCCGCAGACACCTACATCG	NMB0586 (<i>mntC</i>)	847-865
TA81	gcgcgc <u>ACTAGT</u> CAGATGTTACGTTATATCACAG	<i>mntC</i> upstream Region	32-10 Bp. 5' von NMB0586
TA82	gcgcgc <u>CAATTG</u> CCTACTATAATTTTCAGACGGC	<i>mntC</i> downstream Region	37-57 Bp. 3' von NMB0586
CM-Eco1	gcgcgc <u>GAATTC</u> GTTAATCCGCCATATTGTGTTG	Chloramphenicol Kasette	
CM-Eco2	gcgcgc <u>GAATTC</u> GGATCCACGTTGAAAATCTCC	Chloramphenicol Kasette	
AP1	GGCATTATGAGATATTTGTTT	pAP1	
AP2	GCTCAGAGCATGGCTTTATG	pAP1	
AP3	AAGACGTATCGGGTGTGTTG	pAP1	
329	ACCATGATTACGCCAAGC	pBluescript	
KB9	AATACGACTCACTATAGGGC	pBluescript	
Kana 1	CACGAGGCAGACCTCAA	Kanamycin Kasette, pUC4K	
Kana 2	GATTGTGAGACACAACGTGG	Kanamycin Kasette, pUC4K	

a) Restriktionsschnittstellen für anschließende Klonierungen sind unterstrichen.

b) NMB; offenes Leseraster annotiert für das MC58 Genom (Tettelin *et al.*, 2000).

4.7 Plasmide

Tabelle 8. Plasmide

Plasmid	Description	References
pBluescript II SK + pUC4K	Klonierungsvektor Vektor, der ein Aminoglykosid 3`-Phosphotransferase-Gen enthält. Verleiht eine Resistenz gegen Kanamycin.	Stratagene GE Healthcare
pAP1	Durch Deletion des <i>rs-gfp</i> aus pEG2 (Christodoulides <i>et al.</i> , 2000) entstandener Neisserien Expressionsvektor.	(Lappann <i>et al.</i> , 2006)
pAP2-1	Von pAP1 abgeleiteter Expressionsvektor. Die Erythromycin-Resistenzkassette wurde durch eine Spectinomycin-Resistenzkassette ersetzt.	(Lappann <i>et al.</i> , 2006)
pTA1	PCR-Produkt TA3/TA4, umfasst das <i>pldA</i> -Gen (NMB0464), kloniert in die <i>EcoRI</i> -Restriktionsschnittstelle des pBluescript II SK +	(Lappann <i>et al.</i> , 2010)
pTA2	Insertion der Kanamycin-Resistenzkassette von pUC4K in das <i>pldA</i> -Gen nach inverser PCR des Plasmids pTA1 mit den Primern TA1-R/TA2-R	(Lappann <i>et al.</i> , 2010)
pTA3	PCR-Produkt TA3/TA4, umfasst das <i>pldA</i> -Gen von Stamm MC58, kloniert in die <i>SpeI/EcoRI</i> -Restriktionsschnittstellen von pAP2-1	(Lappann <i>et al.</i> , 2010)
pTA5	PCR-Produkt TA77/TA78, umfasst das <i>mntC</i> -Gen (NMB0586), kloniert in die <i>BamHI/EcoRI</i> -Restriktionsschnittstelle des pBluescript II SK +	diese Arbeit
pTA6	Insertion der Kanamycin-Resistenzkassette von pUC4K in das <i>mntC</i> -Gen nach inverser PCR des Plasmids pTA5 mit den Primern TA79/TA80	diese Arbeit
pTA7	PCR-Produkt TA81/TA82, umfasst das <i>mntC</i> -Gen von Stamm WUE3671, kloniert in die <i>SpeI/EcoRI</i> -Restriktionsschnittstellen von pAP2-1	diese Arbeit

4.8 Kulturmedien für Bakterien

Modifiziertes *Neisseria Defined Medium* (NDM)

NDM (Archibald & DeVoe, 1978)
modifiziert nach (Lappann *et al.*, 2006)

D-Glucose	10 mM
Tris-HCl	40 mM
NaCl	140 mM
NH ₄ Cl	10 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	1 mM
Na ₂ SO ₄	2,3 mM
KCl	2,0 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,5 mM
L-Glutaminsäure	10 mM
L-Cystein	1 mM
L-Arginin	1 mM
Uracil	1 mM
ZnCl ₂	20 nM
CuCl ₂	20 nM
CoCl ₂	20 nM
MnCl ₂	20 nM
FeNO ₃	1 mg
ad 1000 ml ddH ₂ O, pH 7,6	
NaHCO ₃	5 mM
Medium autoklavieren	
PolyViteX	1 %

Proteose-Pepton-Medium (PPM)

Bacto™ Proteose-Pepton	1,5 %
NaCl	0,5 %
Stärke	0,05 %
KH ₂ PO ₄	0,4 %
K ₂ HPO ₄	0,1 %
pH 7,8	

Supplementiertes PPM (PPM⁺)

PPM	50 ml
MgCl ₂ (2M)	250 µl
NaHCO ₃ (8,4 %)	250 µl
PolyViteX	500 µl

GC-Medium

Difco™ GC Medium Base	36 g
ad 1000 ml Aqua dest., autoklavieren	
PolyViteX	1 %

LB-Medium

Baktotrypton	1 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	1 %
Bacto-Agar (bei Agarplatten)	1,5 %

4.9 Puffer und Lösungen

4.9.1 Puffer und Lösungen für mikrobiologische Methoden

4.9.1.1 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (*colony forming units*, CFU)

PBS (10 x)

1 Päckchen Dulbecco PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺
ad 1000 ml Aqua dest.

PBS (1 x)

10 x PBS
ad 1000 ml Aqua dest.

4.9.1.2 Elektroporation von *E. coli* Zellen

SOB-Medium

Baktotrypton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM

SOC-Medium

SOB-Medium	
Glucose	20 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

4.9.1.3 Mikroskopie der Biofilme

Spurr (Kunstharz)

ERL 4206 (3,4-Epoxy-cyclohexyl-methyl-3,4-epoxy-cyclohexyl-carboxylate)	10 g
DER 736	6 g
NSA (Nonacyl Succinyl Anhydrid)	26 g
DMAE (Dimethylaminoethanol)	0,4 g
20 min vor Gebrauch ansetzen	

4.9.2 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

4.9.2.1 Isolation chromosomaler DNA

Puffer B1

Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	50 mM
Tris	50 mM
Tween 20	5 %
Triton X-100	5 %
pH 8,0	

Puffer B2

Guanidin-HCl	0,33 M
Tween 20	20 %
<u>TE</u>	
Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

4.9.2.2 Gelelektrophoretische Trennung von DNA in Agarosegelen

GEBS

Glycerin	20 %
EDTA	50 mM
N-Lauroylsarkosin	0,5 %
Bromphenolblau	0,05 %
pH 8,0	

1 x TBE

Tris-HCl	100 mM
Borsäure	100 mM
EDTA	2,5 mM
pH 8,3	

4.9.2.3 Southern BlotDenaturierungslösung

NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M

Neutralisierungslösung

Tris-HCl (pH 7)	1 M
NaCl	3 M

20 x SSPE

NaCl	3,6 M
NaH ₂ PO ₄	0,1 M
Na ₂ HPO ₄	0,1 M
EDTA	20 mM

20 x SSC

NaCl	3,0 M
Natriumcitrat	0,3 M
pH 7,0 mit 25 % HCl einstellen	

Puffer 1

Maleinsäure	0,1 M
NaCl	0,15 M
pH 7,5 mit NaOH einstellen	

Puffer 2

Puffer 1	
Blockierungsreagenz	1 %

Puffer 3 (pH 9,6)

Tris-HCl	0,1 M
NaCl	0,1 M

Waschpuffer

Puffer 1	
Tween 20	0,3 %

„High SDS“ - Hybridisierungslösung

SDS	7 %
Formamid	50 %
SSC	5 x
Natriumphosphatpuffer (pH 7,0)	50 mM
N-Lauroylsarkosin	0,1 %
Blockierungsreagenz	2 %

4.9.3 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden4.9.3.1 ProteinpräparationDNase/RNase-Mix

DNase	1 mg/ml
RNase	0,25 mg/ml
MgCl ₂	50 mM

Harnstoffpuffer

Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
Dithiothreitol	70 mM

Reswelling-Puffer

Harnstoff	8 M
Thioharnstoff	2 M
Tributylphosphan	2 mM
CHAPS	2 %
Amidosulfobetaine-14 (ASB-14)	2 %
Bio-Lyte pH 3-10	2 %
Dithiothreitol	1 %

Tris-Puffer

Tris-HCl (pH 7,2)	10 mM
MgCl ₂	5 mM

4.9.3.2 SDS-PAGELower Tris-Puffer

Tris	1,5 M
pH 8,8 mit konz. HCl einstellen	
SDS	2 %

Upper Tris-Puffer

Tris	0,5 M
pH 6,8 mit konz. HCl einstellen	
SDS	2 %

Sample Solution (1 x)

β-Mercaptoethanol	5 %
SDS	2 %
Glycerin	25 %
Tris-HCl, pH 6,8	5 M
Bromphenolblau	

Elektrophorese-Puffer (10 x)

Tris	0,25 M
SDS	0,5 %
Glycin	0,5 M
zur Verwendung 1:10 verdünnen	

Coomassie-Färbelösung

Methanol	50 %
Essigsäure	10 %
Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma)	0,275 %

Coomassie-Entfärbelösung

Essigsäure	7,5 %
Methanol	20 %

Fixierungslösung (Silberfärbung)

Silbernitrat	0,1 %
Formaldehyd	0,03 %

Inkubationslösung (Silberfärbung)

Natriumacetat	0,5 M
Natriumthiosulfat	0,2 %
Ethanol	30 %

Färbelösung (Silberfärbung)

Silbernitrat	0,1 %
Formaldehyd	0,03 %

Spülung (Silberfärbung)

Natriumcarbonat	2,5 %
pH 10,9 mit NaHCO ₃ einstellen	

Entwicklungslösung (Silberfärbung)

Natriumcarbonat	2,5 %
Formaldehyd	0,03 %
pH 10,9 mit NaHCO ₃ einstellen	

Stopplösung (Silberfärbung)

EDTA	0,05 M
------	--------

4.9.3.3 Western BlotBlot-Puffer (10 x)

Tris	3 %
Glycin	14,4 %

Laufpuffer (1 x)

Blot-Puffer (10 x)	10 %
Methanol	20 %

PBS-T

PBS (1 x)	
Tween-20	0,1 %

4.9.3.4 LPS-AnalyseLysepuffer

SDS	2 %
β-Mercaptoethanol	4 %
Glycerin	10 %
Tris-HCl (pH 6,8)	1 M
Bromphenolblau	

Proteinase K/Lysepuffer

Proteinase K	2,5 mg
Lysepuffer	1 ml
Lagerung bei -20°C (kann 2-3 x aufgetaut und eingefroren werden)	

Acrylamid-Bisacrylamid-Mix (für Trenngel)

Acrylamid	46,5 %
Bisacrylamid	3,0 %
SERDOLIT	1,5 g
1 h in 50 ml ddH ₂ O rühren ad 100 ml ddH ₂ O, filtrieren dunkel bei 4°C lagern	

Acrylamid-Bisacrylamid-Mix (für Sammelgel)

Acrylamid	48 %
Bisacrylamid	1,5 %
SERDOLIT	1,5 g
1 h in 50 ml ddH ₂ O rühren ad 100 ml ddH ₂ O, filtrieren dunkel bei 4°C lagern	

Sample Solution für Tricin-Gele

Glycerin	12 %
SDS	4 %
Tris-Base, pH 6,8	50 mM
β-Mercaptoethanol	2 %
Coomassie Brilliant Blau G250 (Sigma)	0,01 %

Kathodenpuffer für Tricin-Gele

Tris-HCl	0,1 M
Tricin	0,1 M
pH 8,25	
SDS	0,2 M

Gelpuffer für Tricin-Gele

Tris-HCl	3,0 M
pH 8,45	
SDS	0,3 %

Anodenpuffer für Tricin-Gele

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

Fixierer (LPS-Silberfärbung)

Ethanol	40 %
Essigsäure	5 %

Formaldehyd-Entwickler (LPS-Silberfärbung)

Zitronensäure	1,3 M
Formaldehyd	0,25 %

Oxidierer (LPS-Silberfärbung)

Ethanol	40 %
Essigsäure	5 %
Periodsäure	0,7 %

Silbernitratlösung (LPS-Silberfärbung)

NaOH	0,47 M
NH ₃	0,33 %
AgNO ₃	0,27 %

4.9.3.5 2-DEÄquilibriumslösung

Harnstoff	6 M
Tris-HCl, pH 8,8	0,05 M
Glycerin	30 %
SDS	2 %
Bromphenolblau	
in 50 ml Aliquots bei -20°C einfrieren	

Coomassie-Färbelösung

Ammoniumsulfat	0,76 M
H ₃ PO ₄	10 %
Coomassie Brilliant Blue	0,12 %
G250 (Sigma)	
1 h Rühren	
Ethanol	20 %

Elektrodenpuffer (10 x)

Tris	0,25 M
Glycin	0,5 M
SDS	1 %

Trenngelpuffer

Tris	1,5 M
pH 8,8	

Rehydratisierungslösung

Harnstoff	8 M
Dithiothreitol	10 mM
CHAPS	1 %
Bio-Lyte pH 3-10	0,25 %
Bromphenolblau	0,001 %

4.10 Mikrobiologische Methoden

4.10.1 Kultivierungsbedingungen

Zur Anzucht von Meningokokken wurden diese auf GC-Agar (supplementiert mit PolyViteX) oder Columbia Agar mit 5 % Schafblut ausplattiert und ÜN bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Wenn notwendig, wurde dem GC-Agar Erythromycin (7 mg/l), Kanamycin (100 mg/l), Chloramphenicol (7 mg/l) bzw. Spectinomycin (125 mg/l) zugesetzt. Für Flüssigkulturen und Biofilmexperimente wurde modifiziertes *Neisseria defined Medium* (NDM) (Archibald & DeVoe, 1978, Lappann *et al.*, 2006) verwendet. Des Weiteren wurde Proteose-Pepton-Medium (PPM⁺) für die Transformation von Meningokokken genutzt. Die Kultivierung von Flüssigkulturen erfolgte bei 37°C in einem Schüttler bei 200 rpm.

4.10.2 Biofilmbildung im Flusssystem

Um große Mengen an bakterieller Biomasse zu erhalten, wurden die Biofilme in einem Schlauchsystem unter Mediumfluss bei 37°C (Brutschrank) angezüchtet. Dazu wurde eine BVP-Standard Schlauchpumpe mit einem Mehrkanal-Pumpenkopf MS/CA 8-6 von Ismatec verwendet. Parallel konnten vier getrennte Biofilmansätze durchgeführt werden.

4.10.2.1 Zusammenbau und Vorbereitung

Bevor das Biofilm-Schlauchsystem unter sterilen Bedingungen zusammengebaut werden konnte, wurden die Schlauchverbinder, die Deckel der Schott-Flaschen und der Pumpenschlauch mit 70 % Ethanol gereinigt und die Silikonschläuche autoklaviert. Es folgte die Sterilisation des Systems durch Durchfluss von je 1 l 0,5 % (v/v) Natriumhypochloritlösung (Pumpeneinstellung 50, ca. 2-3 h) und das anschließende Waschen ÜN mit je 2 l autoklaviertem Wasser (Pumpeneinstellung 13). Mindestens 1 h vor der Verwendung wurden die Schläuche mit vorgewärmten (37°C) NDM-Medium befüllt und die Luftblasen sorgfältig heraus geklopft.

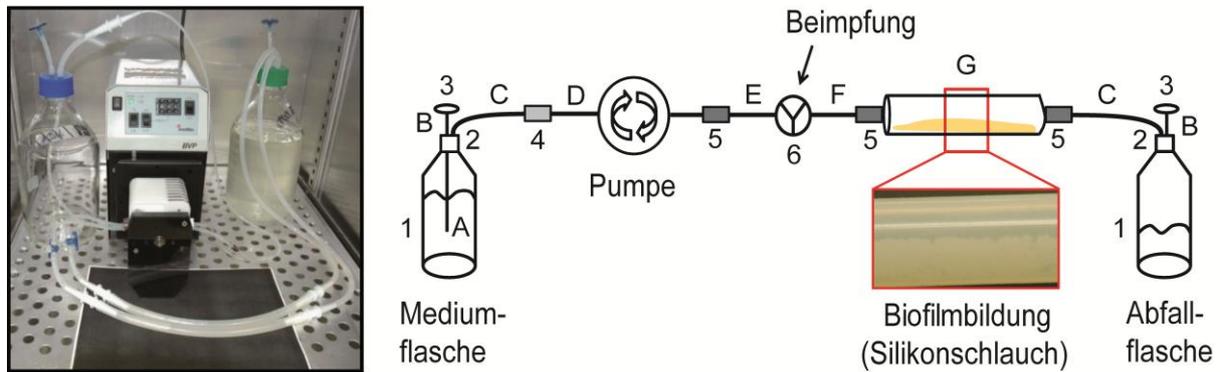


Abbildung 3. Biofilm-Schlauchsystem. Das Foto auf der linken Seite zeigt die Schläuchpumpe mit Pumpenkopf und zwei parallel verlaufende Biofilmsätze im Schlauchsystem. Die Versuchsanordnung befand sich in einem Brutschrank mit 37°C. Rechts ist eine schematische Darstellung des Schlauchsystems mit einem Ausschnitt des bewachsenen Silikonschlauches abgebildet. Die verschiedenen Schläuche sind mit A-G benannt und alle weiteren Verbrauchsmaterialien von 1-5 durchnummeriert.

Verwendete Schläuche

- A) Silikonschlauch, variable Länge, innen \varnothing 2,0 mm
- B) Masterflex® Schlauch, ca. 6 cm
- C) Silikonschlauch, 60 cm, innen \varnothing 5,0 mm
- D) PharMed® 3-Stopper-Schlauch (Pumpenschlauch)
- E) Silikonschlauch, ca. 8-10 cm, innen \varnothing 2,0 mm
- F) Silikonschlauch, ca. 8-10 cm, innen \varnothing 5,0 mm
- G) Silikonschlauch, 30 cm, innen \varnothing 8,0 mm („Biofilmschlauch“)

Sonstige Verbrauchsmaterialien

- 1) Schott-Flasche (1-5 Liter)
- 2) Deckel für Schott-Flasche mit 2-3 eingebauten Schlauchverbindern
- 3) Sterilfilter
- 4) Schlauchverbinder aus PP gerade Form, 3-5 mm
- 5) Schlauchverbinder aus PP gerade Form, 4-8/8-12 mm
- 6) 3-Wege-Hahn

4.10.2.2 Biofilmbildung

Bakterien einer ÜN Kultur auf GC-Agar wurden in 30 ml NDM auf eine OD_{600} von 0,2 eingestellt und für 6-7 h bei 37°C geschüttelt. Diese Bakterienkultur wurde durch Zugabe von NDM auf $1-2 \times 10^8$ Bakterien/ml verdünnt, und 40 ml über einen 3-Wege-Hahn luftblasenfrei in das Schlauchsystem gespritzt. Hierzu wurde der Mediumfluss gestoppt. Anschließend wurde der 3-Wege-Hahn am Biofilmschlauch geschlossen und auf der anderen Seite des Schlauches eine Klemme angebracht. Nach einer Inkubation ohne Mediumfluss von 1 h zur Gewährleistung der Anheftung der Bakterien an die Silikonoberfläche wurde der Mediumfluss mit einer konstanten Flussrate von 0,2 mm/s (Pumpeneinstellung 7) gestartet. Die Bakterienkultur zum Animpfen der Biofilme diente zudem der Herstellung der Kontrolle für die Proteomanalysen.

4.10.2.3 Biofilmernte und -verarbeitung

Nach 24 oder 48 h Mediumfluss bei 37°C wurde der Biofilm geerntet. Der 3-Wege-Hahn und die Klemme wurden geschlossen, das gesamte Schlauchsystem vorsichtig unter die Sicherheitswerkbank getragen und der Schlauch zum Medium und zum Abfall abgeklemmt und entsorgt. Der Biofilm im Silikonschlauch („Biofilmschlauch“) wurde durch Reiben von der Oberfläche gelöst und mit dem Medium in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt. Nach sorgfältigem Mischen wurde die OD₆₀₀ gemessen und eine CFU-Bestimmung (siehe 4.10.4) durchgeführt. Die Bakterienkultur wurde 10 min bei 4000 rpm (Megafuge 1.0 R) und 5°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Nassgewicht des Biofilms bestimmt. Anschließend konnte die Proteinpräparation durchgeführt werden (siehe 4.13.1).

4.10.2.4 Mikroskopie der Biofilme

Diese Methode wurde zum Teil im Labor von Prof. Rudolf Martini (Neurologische Klinik, Abteilung für Entwicklungsneurobiologie, Würzburg) durchgeführt. Die Biofilme wurden auf den Silikonschläuchen ÜN in 0,1 M Natriumcacodylat (NaCaCo) - Puffer mit 4 % Formaldehyd und 2 % Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurde die Probe mit 0,1 M NaCaCo gewaschen und der Silikonschlauch mit dem anhaftenden Biofilm vorsichtig in kleinere Stückchen (< 5 mm) geteilt. Nach 2 h Inkubation in 2 % Osmiumtetroxid (in 0,1 M NaCaCo) folgte das erneute Waschen mit 0,1 M NaCaCo und das Dehydrieren mit einer aufsteigenden Aceton-Reihe (je 10 min in 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 96 % und 100 % Aceton). Danach wurden die Biofilmstücke, die vorsichtig von der Silikonoberfläche abgelöst wurden, jeweils 1 h bei RT in Aceton/Spurr (2:1), Aceton/Spurr (1:2) und ÜN bei 4°C in 100 % Spurr gelagert (Spurr, 1969, Wallis & Griffin, 1973). Im weiteren Verlauf wurde der Biofilm in 100 % Spurr eingebettet (Silikonform) und der Kunstharz ÜN bei 67-70°C auspolymerisiert.

Für lichtmikroskopische Aufnahmen wurden die Biofilme mit einem Reichert-Jung Ultracut Microtom (Leica) und Diatome Diamantmessern (DiS-Galetzka) in semidünne Schnitte geschnitten (0,5 µm) und mit Methylen Blau gefärbt. Zur Bilderaufnahme wurde ein Axiophot 2 Mikroskop (Zeiss) verwendet, das an eine CCD (*charge-coupled device*) - Kamera (Visitron Systems) angeschlossen war. Elektronenmikroskopische Schnitte (70 nm) wurden mit Bleicitrat gegengefärbt und mit einer Zeiss 906 E, angeschlossen an eine Proscan slow-scan Kamera, mit Hilfe der zugehörigen Software iTEM (Soft Imaging System) dokumentiert.

4.10.3 Herstellung von Bakteriensuspensionen mit definierter Zellzahl

Bei Meningokokken ist eine OD₆₀₀ von 1 in etwa gleichbedeutend mit einer Bakterienzellzahl von 1×10^9 /ml. Zur Bestimmung der genauen Bakterienzellzahl wurde 1 ml einer Bakterienkultur in eine Küvette überführt und die Absorption bei 600 nm mit einem Photometer gemessen. Als Leerwert diente das verwendete Nährmedium.

4.10.4 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (*colony forming units*, CFU)

Um die Anzahl der lebensfähigen Bakterien zu bestimmen wurden serielle Verdünnungen einer Bakteriensuspension in PBS hergestellt und auf Columbia Agar mit 5 % Schafblut ausplattiert. Diese Platten wurden ÜN bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

4.10.5 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die Elektroporation

Aus einer Übernachtskultur *E. coli* (Stamm DH5α) wurden 700 ml LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Nach der darauf folgenden Kühlung der Bakteriensuspension im Eisbad (10-15 min) wurde diese 15 min (5000 rpm, 4°C, Sorval RC5B, Rotor GS3) zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde zweimal in 250 ml eiskalten, sterilen ddH₂O gewaschen und erneut zentrifugiert. Es folgte die Resuspension der Zellen in 10 ml 10 % Glycerin mit anschließender Zentrifugation. Das Pellet wurde in 1,5 ml kaltem 10 % Glycerin aufgenommen, auf Eis aliquotiert (je 40 µl) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren für die Lagerung bei -70°C.

4.10.6 Elektroporation von *E. coli* Zellen

Die elektrokompenten *E. coli* Zellen (siehe 4.10.5) wurden langsam auf Eis aufgetaut (40 µl Aliquots). Zu diesen Bakterien wurde die zu transformierende DNA (max. Volumen von 2 µl) pipettiert und luftblasenfrei in eine gekühlte Elektroporationsküvette mit dem Elektrodenabstand 0,2 cm überführt. Die Elektroporation erfolgte in einem Elektroporationsgerät bei folgenden Einstellungen: 2,5 kV, 25 µF und 400 Ω. Die Bakterien wurden anschließend sofort in 1 ml vorgewärmtes (37°C) SOC-Medium gegeben und bei 37°C und 200 rpm geschüttelt.

Nach 1 h wurden die Bakterien auf antibiotikahaltigem LB-Agar ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

4.10.7 Transformation von *N. meningitidis*

N. meningitidis ist natürlich kompetent, daher ist keine Elektroporation notwendig. Bakterien einer ÜN-Kultur wurden in 5 ml PPM⁺ eingerieben und eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C und 200 rpm wurde die Bakterien-suspension erneut auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Dem Transformationsansatz von 1 ml wurde 100-200 ng des zu transformierenden Plasmids zugegeben und 5-6 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz abzentrifugiert, ca. 800 µl des Überstandes verworfen und die Bakterien in dem restlichen Medium resuspendiert. Aliquots dieser Bakterien-suspension wurden auf antibiotikahaltigem GC-Agar ausgestrichen und ÜN bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

4.11 Molekularbiologische Methoden

4.11.1 Isolation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde entweder der QIAprep Spin Miniprep oder der QIAGEN Plasmid Midi Kit verwendet. Die Plasmidpräparation erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers.

4.11.2 Isolation chromosomaler DNA

Meningokokken von zwei GC-Agarplatten wurden in 5 ml PBS eingerieben und die Bakterien-zellzahl bestimmt (siehe 4.10.3). Für die DNA-Isolation wurden $1,5 \times 10^{10}$ Bakterienzellen verwendet und für 10 min bei 4000 rpm (Megafuge 1.0 R) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 7 ml Puffer B1 und 14 µl RNase-Lösung (100 mg/ml) aufgenommen. Nach der Zugabe von 160 µl Lysozym (100 mg/ml) wurde die Lösung für 30 min bei 37°C inkubiert, gefolgt von einer 1 h Lagerung bei -70°C. Nachdem die Lösung bei 50°C im Wasserbad aufgetaut war, wurden 200 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) und 2,4 ml Puffer B2 hinzugefügt. Diese Mischung wurde sorgfältig gemischt und bei 50°C für 1 h inkubiert. 15 ml Puffer QBT wurde hinzugegeben und die chromosomale DNA mit dem QIAGEN Genomic-tip 100/G Kit den

Herstellerangaben entsprechend isoliert. Das resultierende DNA-Pellet wurde bei 37°C getrocknet und in 100 µl TE resuspendiert. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde durch Messung der OD₂₆₀ bestimmt.

4.11.3 PCR

Die PCR wurde zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen (AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase) und zur Überprüfung von Mutanten (Taq-Polymerase) unter Beachtung der Herstellerangaben durchgeführt. Als Template in einem PCR-Ansatz von 50 µl wurde entweder 20 ng chromosomale DNA, 10 ng Plasmid-DNA oder ein kleiner Teil einer Bakterienkolonie verwendet. Des Weiteren wurden Oligonukleotide (je 20 µM), dNTPs (2 µM je dNTP), Polymerasepuffer (10 x) und Polymerase (5 U/µl) den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt. Das PCR-Programm wurde durch eine initiale Denaturierung für 10 min bei 94°C oder 95°C (je nach verwendeter Polymerase) eingeleitet. Der PCR-Zyklus startete mit der Primeranlagerung (1 min) bei der für die spezifischen Oligonukleotide notwendigen Temperatur. Es folgte die Primerverlängerung (1 min/1 kb großes Fragment) bei 72°C und ein Denaturierungsschritt (1min). Die Anzahl der Zyklen betrug 36.

4.11.4 Gelelektrophoretische Trennung von DNA in Agarosegelen

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten in Abhängigkeit ihrer Größe wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Konzentration der Agarose variierte je nach Anwendung zwischen 0,8 und 1,5 %. Als Laufpuffer diente TBE (1 x). Die DNA-Proben wurden mit GEBS Puffer versetzt bei einer Spannung von 180-200 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der SmartLadder™ verwendet. Nach der Gelelektrophorese wurde die DNA im Gel in einem 0,1 % Ethidiumbromidbad gefärbt und mit UV-Licht sichtbar gemacht. DNA-Fragmente konnten aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert werden.

4.11.5 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern eingesetzt. Wenn erforderlich, wurden zwei Enzyme im Verdau eingesetzt. Ein

Standard-Restriktionsansatz enthielt die zu schneidende DNA (1-2 µg), 1 µl Restriktionsendonuklease/n (20 U/µl) und 2 µl Puffer (10 x). Bei einigen Enzymen musste zusätzlich 2 µl BSA (10 x) hinzugegeben werden. Dieser Ansatz wurde mit Wasser auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und für 2 h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Zum Verdau chromosomaler DNA für den Southern Blot (siehe 4.11.9) wurden 2-3 µg DNA eingesetzt und ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

4.11.6 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Beim Schneiden eines Vektors mit einem Restriktionsenzym (siehe 4.11.5) entstehen zwei kompatible Enden, die wieder miteinander ligieren können. Die Hydrolyse der 5'-Phosphatreste durch CIP (*calf intestine phosphatase*) verringert die Religationsrate des Vektors. Da das Enzym mit den meisten Restriktionsendonuklease-Puffern kompatibel ist, fand die Dephosphorylierung parallel zum und nach dem Restriktionsverdau statt. Während der zweistündigen Restriktion bei 37°C wurde 1 µl CIP zum Ansatz hinzu gegeben. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme bei 80°C für 20 min deaktiviert. Es folgte eine erneute Zugabe von 1 µl CIP und die Inkubation bei 37°C für 45 min. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

4.11.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation der DNA-Fragmente wurde ÜN bei 16°C durchgeführt. Ein Reaktionsansatz von 10 µl enthielt dabei 1 µl T4-Ligase (400 U/µl) und 1 µl Ligasepuffer (10 x). Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert sollte 1:3 bis 1:5 betragen.

4.11.8 Aufreinigung von Ligationsansätzen für die Elektroporation

Um salzfreie DNA für die Elektroporation gewinnen zu können, wurden die Ligationsansätze mit der Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (P/C/I)-Methode aufgereinigt. Dazu wurde der Ligationsansatz zunächst mit Aqua dest. auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt, mit 250 µl P/C/I versetzt, gemischt und bei 13000 rpm und RT für 2 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase des Gemisches, die die Plasmid-DNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu der unteren P/C/I-Phase wurden 50 µl Aqua dest. gegeben, und der Ansatz wurde erneut gemischt und zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde

zu der bereits erhaltenen Plasmidlösung pipettiert. Durch die Zugabe von 150 µl Diethylether wurde die DNA extrahiert und das Gemisch für 5 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Die obere Etherphase wurde verworfen, und die untere Phase zur vollständigen Entfernen des Ethers für 15 min bei 37° C im Thermoblock inkubiert. Die Zugabe von 15 µl Acrylamidlösung (1/10 Volumen), 15 µl NaCl-Lösung (1/10 Volumen) und 540 µl kaltem Ethanol (-20°C, dreifache Volumen) gefolgt von der Inkubation für 30 min bei -80°C bewirkten die Fällung der Plasmid-DNA. Das Gemisch wurde anschließend für 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 70 %-igen Ethanol (4°C) für 15 min bei 13000 rpm und 4°C gewaschen. Der Alkohol wurde abgekippt, das Pellet im Vakuumverdampfer getrocknet und abschließend in 5 µl Aqua dest. aufgenommen.

4.11.9 Southern Blot

Chromosomale DNA wurde ÜN mit den gewünschten Restriktionsendonukleasen geschnitten (siehe 4.11.5) und anschließend elektrophoretisch in einem Agarosegel (0,8 %) aufgetrennt (siehe 4.11.4). Zur Depurinierung der DNA wurde das Agarosegel nach dem Gellauf 20 min in 0,25 M HCl geschwenkt. Anschließend wurde das Gel 30 min in Denaturierungslösung und weitere 30 min in Neutralisierungslösung schüttelnd inkubiert. Der Kapillartransfer der DNA aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran erfolgte bei RT über 4 h unter Verwendung von 10 x SSPE. Im weiteren Verlauf wurde die Nylonmembran luftgetrocknet und die DNA durch UV-Licht irreversibel an die Membran gebunden.

4.11.9.1 Herstellung Digoxygenin (DIG)-markierter DNA-Sonden

Zur Herstellung spezifischer Sonden für die Hybridisierung (siehe 4.11.9.2) wurde die zur Markierung vorgesehene lineare DNA (10 ng-3 µg) mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 µl aufgefüllt und für 10 min bei 100°C denaturiert, es folgte die sofortige Abkühlung auf Eis. Es wurden 2 µl Hexanukleotidgemisch (10x), 2 µl dNTP-Markierungsgemisch und 1 µl Klenow-Enzym hinzugegeben und der Ansatz ÜN bei 37°C inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde mit 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8) gestoppt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 2,5 µl Natriumacetat (3 M, pH 4,5) und 75 µl eiskaltem Ethanol sowie durch anschließende Inkubation bei -70°C für 30 min. Der Ansatz wurde bei 4°C zentrifugiert, das DNA-Pellet mit kaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (10/1)

gelöst. Zur Quantifizierung der DIG-markierten DNA wurde ein Dot-Blot hergestellt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der markierten DNA sowie der Kontroll-DNA auf eine Nylonmembran getropft, mit UV-Licht irreversibel an die Membran gebunden und mittels Chemilumineszenz (siehe 4.11.9.3) quantifiziert.

4.11.9.2 DNA-Hybridisierung

Um unspezifische Bindungen der Sonden-DNA zu verhindern, wurde die Nylonmembran 1 h bei 42°C in 10 ml Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Derweilen wurden weiteren 10 ml Hybridisierungslösung 100 ng Sonden-DNA (siehe 4.11.9.1) zugesetzt. Dieser Ansatz wurde zur Denaturierung der dsDNA 10 min aufgekocht und anschließend auf Eis gestellt. Die Vorhybridisierungslösung wurde durch die Hybridisierungslösung ersetzt und die Membran ÜN bei 42°C inkubiert.

4.11.9.3 Nachweis DIG-markierter DNA mittels Chemilumineszenz

Beim Nachweis DIG-markierte DNA mittels Chemilumineszenz wandelt die Alkalische Phosphatase, die an DIG-spezifische Antikörper gekoppelt ist, CSPD in ein lumineszierendes Produkt um. Die entstehende Lichtemission wird mit einem Röntgenfilm nachgewiesen. Zunächst wurde die Nylonmembran zweimal 5 min in Lösung 1 (2 x SSC/0,1 % SDS) bei RT gewaschen. Anschließend erfolgten zwei weitere Waschschrte von 15 min in Lösung 2 (0,1 x SSC/0,1 % SDS) bei 68°C. Alle weiteren Schritte erfolgten bei RT. Zunächst wurde die Membran für 1-5 min in Waschpuffer geschwenkt, gefolgt von 30 min in Puffer 2. Nach einer 30 min Inkubation mit dem anti-DIG-Antikörper in Puffer 2 (1:10000) schlossen sich zwei Waschschrte von 15 min im Waschpuffer an. Vor der Inkubation der Membran für 5 min in Puffer 3 mit CSPD (1:100) wurde diese noch 5 min in Puffer 3 geschwenkt. Abschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie gewickelt und für 15 min bei 37°C gelagert, bevor der Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt wurde.

4.11.10 DNA-Sequenzierung

Als Template für die DNA-Sequenzierung dienten entweder 0,4 µg Plasmid-DNA (siehe 4.11.1) oder 0,1 µg lineare DNA z.B. PCR-Produkte (siehe 4.11.3). Zu einem Ansatz wurden 2 µl 5 x Sequenzierpuffer und 10 pmol Primer hinzugegeben und mit dest. Wasser auf ein

Volumen von 9 µl aufgefüllt. Die Sequenzierung mit dem ABI Prism 3130 DNA-Sequenzierautomat wurde vom DNA-Labor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie durchgeführt.

4.12 Konstruktion von Mutanten in *N. meningitidis*

Oligonukleotide und Plasmide, die zur Herstellung von Mutanten und Komplementanten in *N. meningitidis* verwendet wurden, sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 dargestellt.

4.12.1 Deletion des *mntC*-Gens

Das *mntC*-Gen (NMB0586, 915 bp) des Stammes WUE3671, jeweils mit 500 bp der *upstream*- und *downstream*-Bereiche, wurde mit den Primern TA77 und TA78 amplifiziert (1841 bp) und in den Vektor pBluescript II SK+ kloniert. Das entstandene Plasmid pTA5 diente als Template für eine inverse PCR mit den Primern TA79/TA80, die am 5'- und 3'-Ende von *mntC* lagen. Das PCR-Produkt wurde mit der Restriktionsendonuklease NsiI geschnitten und mit der PstI-verdauten Kanamycin-Kassette aus pUC4K ligiert. Das resultierende Plasmid wurde pTA6 genannt und in die Stämme WUE3671 und MC58 transformiert (siehe 4.10.7). Zur Komplementation wurde das *mntC*-Gen mit den Primern TA81 und TA82 amplifiziert (Template: Koloniematerial vom Stamm WUE3671) und das PCR-Produkt mit dem SpeI- und EcoRI-verdauten Plasmid pAP2-1 ligiert. Dabei entstand das Plasmid pTA7. Die Deletion des *mntC*-Gens und die anschließende Komplementation der *mntC*-Inaktivierung wurden mit PCR und Southern Blot-Hybridisierung überprüft.

4.12.2 Deletion des *pldA*-Gens

Es wurde ein 2171 bp DNA-Fragment, welches das *pldA*-Gen des Stammes MC58 enthielt, mit den Primern TA3 und TA4 amplifiziert und in den Vektor pBluescript II SK+ kloniert. Es entstand das Plasmid pTA1. Unter Verwendung der Primer TA1-R und TA2-R wurde eine inverse PCR durchgeführt (Template pTA1) und das PCR-Produkt mit dem PstI geschnittenen DNA-Fragment von pUC4K ligiert. Dieses Fragment enthielt eine Kanamycin-Kassette. Das entstandene Plasmid pTA2 wurde in die Meningokokkenstämme WUE3671, MC58 und 2120 transformiert, um eine *pldA*-Mutante zu erhalten. Zur Komplementation der *pldA*-Deletion

wurde das *pldA*-Gen (Primer TA5 und TA6) in den SpeI und EcoRI geschnittenen pAP2-1 Vektor gebracht. Das entstandene Plasmid bekam den Namen pTA3. Alle Mutanten und Komplementanten wurden durch PCR und Southern Blot-Hybridisierung bestätigt. Zusätzlich wurde die *pldA*-Deletion und Komplementierung phänotypisch mit dem Autolyse-Assay überprüft (siehe 4.14.2).

4.13 Proteinbiochemische Methoden

4.13.1 Präparation vom Gesamtzellprotein aus *N. meningitidis*

Bei dieser Proteinpräparation modifiziert nach Bernardini (Bernardini *et al.*, 2004) wurden die Bakterien (Biofilm eines 30 cm Schlauchabschnitts, 30 ml planktonische Kultur mit OD 0,8) zunächst für 10 min bei 4000 rpm (Megafuge 1.0 R) und 5°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 10 ml PBS (1 x) mit 400 µl Protease Inhibitor resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 5°C). Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Die Bakterien wurden in 1 ml Reswelling-Puffer aufgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 0,66 µl Benzonase und 2 µl 1 M MgSO₄-Lösung erfolgte eine Inkubation bei RT für 30 min. Die Suspension wurde für mindestens 1,5 h bei 12000 rpm und 15°C (Biofuge 15R) zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 4.13.3). Die Modifikationen in diesem Protokoll betreffen die Zusammensetzung des Reswelling-Puffers, bei dem 8 M Harnstoff anstelle von 7 M Harnstoff verwendet wurde.

4.13.2 Präparation vom Gesamtzellprotein mit mechanischem Zellaufschluss

Bei dieser Methode zur Proteinpräparation wurden die Meningokokken (Biofilm eines 30 cm Schlauchabschnitts, 30 ml planktonische Kultur mit OD 0,8) zunächst für 15 min bei 4000 rpm (Megafuge 1.0 R) und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet 2 x mit 5 ml PBS (1 x) gewaschen (5 min, 4000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde in 800 µl Tris-Puffer aufgenommen, mit 100 µl Protease Inhibitor versetzt und in Lysing Matrix B Tubes überführt. Es folgte der mechanische Aufschluss der Zellen in der Fast Prep 120 bei maximaler Geschwindigkeit (6,5) für 6 x 30 s, wobei die Zellen zwischen den einzelnen

Behandlungen für 1 min auf Eis gestellt wurden. Nach dem Zellaufschluss wurden ca. 90 µl DNase/RNase-Mix (1/10 Volumen) zugegeben und alles bei RT für 10 min inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm, 4 °C) wurden die Zelltrümmer entfernt und 650 µl des Überstandes in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 340 mg Harnstoff und 122 mg Thioharnstoff vorgelegt waren. Nach einer 30 min Inkubation bei RT wurden die Proteine ÜN mit 12 % TCA im Kühlschrank gefällt. Am nächsten Tag wurden die Proteine zunächst durch Zentrifugation (20 min, 14.000 rpm, 4 °C) geerntet und anschließend 3 x mit 100 µl eiskaltem Aceton gewaschen (5 min, 14.000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde für 5 min bei 30 °C im Heizblock getrocknet, und die Proteine durch die Zugabe von 90 µl Harnstoffpuffer und 10 µl CHAPS-Lösung (400 mg/ml) ÜN im Kühlschrank gelöst.

4.13.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem Roti-Nanoquant Kit (Variante des Bradford-Assays) durchgeführt, der einen Nachweis von 200 ng und mehr Protein ermöglicht. Die Messung erfolgte bei zwei Wellenlängen, 570 und 450 nm. Zunächst wurde eine BSA-Verdünnungsreihe von 100, 80, 60, 50, 40, 30 und 20 µg/ml, sowie Verdünnungsstufen der zu untersuchenden Proben, erstellt. 50 µl der BSA-Verdünnungen, bzw. der Proben, wurden mit 200 µl 1 x Roti-Nanoquant versetzt (Dreifachbestimmung, Reaktion in Mikrotiterplatten). Nach einer kurzen Inkubation von 5 min bei RT wurde die Absorption bei 570 nm und 450 nm mit Hilfe eines ELISA-Readers bestimmt, als Leerwert diente 250 µl Aqua dest. Von jedem Standard und jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Quotient 570 nm/450 nm wurde für jede Probe gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen.

4.13.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Bakterien einer ÜN Kultur wurden in PBS (1 x) resuspendiert und eine OD600 von 0,2 eingestellt. 1 ml dieser Suspension wurde bei RT zentrifugiert und das Pellet in 25 µl Sample Solution aufgenommen. Pro Spur wurden in der SDS-PAGE 10 µl eingesetzt, wenn das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt wurde (siehe 4.13.4.1). Zur weiteren Verwendung im Western Blot (siehe 4.13.5) wurden die Spuren mit 2,5 µl beladen.

Die Analyse von Proteinen erfolgte in der SDS-PAGE. Dazu wurden je nach Proteingröße Polyacrylamidgele mit einer Polyacrylamid-Endkonzentration von 10-12,5 % angefertigt. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden mit Sample Solution versetzt, aufgeköcht und in die mit Elektrophorese Puffer gespülten Taschen eingefüllt. Die Proteinauftrennung erfolgte im Sammelgel bei 10 mA/Gel und im Trenngel bei 20 mA/Gel für ca. 1-2 h. Das Pipettierschema der Polyacrylamid-Gele ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 9. Pipettierschema der Polyacrylamid-Gele

Trenngel	10 %	12,5 %	Sammelgel	
Polyacrylamid (30 %)	2 ml	2,5 ml	Polyacrylamid (30 %)	0,375 ml
Lower Tris	1,5 ml	1,5 ml	Upper Tris	0,625 ml
Aqua dest.	2,5 ml	2 ml	Aqua dest.	1,625 ml
TEMED	10 µl	10 µl	TEMED	10 µl
APS (10 %)	30 µl	30 µl	APS (10 %)	17,5 µl

4.13.4.1 Färbemethoden für Polyacrylamidgele mit Coomassie Brilliant Blau

Mit der Coomassie-Färbung wurden die Proteine in den Polyacrylamidgelen fixiert und gefärbt. Dabei wurde das Gel für 10 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend so lange in der Entfärbelösung inkubiert, bis Banden klar erkennbar waren. Im Folgenden wurde das Gel in mit 5 % Glycerin versetztem Aqua dest. benetzt, in Einmachfolie eingeschlagen und zum Trocknen in einem Trockenrahmen eingespannt.

4.13.4.2 Färbemethoden für Polyacrylamidgele mit Silberfärbung

Das Protokoll für die Silberfärbung wurde modifiziert nach (Heukeshoven & Dernick, 1988). Zur Fixierung wurde das Gel ÜN bei RT in der Fixierungslösung schüttelnd inkubiert und am folgenden Tag 2 h in der Inkubationslösung geschwenkt. Anschließend wurde es dreimal für 20 min mit Aqua dest. gewaschen, gefolgt von der 30 min Anfärbung der Proteine im Gel durch die Färbelösung. Danach folgten die Spülung (1 min) und die Entwicklung (2-3 min). Um eine starke Hintergrundfärbung zu verhindern, war es bei diesen Schritten wichtig, zunächst nur ca. 1/4 der Lösung auf das Gel zu gießen und durch kurzes Schwenken das Gel auszuwaschen. Die verwendete Lösung wurde verworfen und der Rest der Lösung hinzugegeben. Die Gele wurden so lange in der Entwicklungslösung inkubiert, bis die Banden

sichtbar wurden. Dann wurde der Entwicklungsprozess durch die Zugabe der Stopplösung (mindestens 20 min) beendet.

4.13.5 Western Blot

Die in der SDS-PAGE (siehe 4.13.4) aufgetrennten Proteine wurden im Western Blot mit Hilfe eines elektrischen Feldes an eine Nitrozellulose-Membran gebunden (mittels Tankblot-Verfahren für 1 h bei 300 mA, in Laufpuffer). Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulose-Membran 1 h bei RT in PBS-T/5 % Magermilchpulver inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Erstantikörper (in PBS-T/1 % Magermilch) ÜN bei 4°C geschwenkt. Es folgten zwei Waschschriffe mit PBS-T für 5 min bei RT und die Inkubation des mit Meerrettichperoxidase (Pox) gekoppelten Sekundärantikörpers in PBS-T für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen in PBS-T (je 5 min) wurde der Blot mit dem ECL-Chemilumineszenz-Detektionssystem entsprechend der Herstellerangaben entwickelt.

4.13.6 LPS-Analysen

4.13.6.1 LPS-Schnellpräparation

Meningokokken wurden ÜN auf GC-Agar angezogen und Bakterien aus der 3. Fraktion mit einem feuchten Tupfer in 1 ml PBS (1 x) eingerieben. Eine OD₆₀₀ von 0,6 wurde eingestellt und 1 ml der Suspension für 2 min bei 13000 rpm (Biofuge 15) und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl Lysepuffer gelöst, für 10 min gekocht und bei 60°C (Wasserbad) langsam abgekühlt. Nach der Zugabe von 10 µl Proteinase K/Lysepuffer-Mischung wurde die Probe für 1 h bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

4.13.6.2 Tricin-Gelsystem

Zur Auftrennung von niedermolekularen Proteinen (1-20 kDa) und Lipopolysaccharid (LPS) wurde ein Tricin-Gelsystem (Schagger & von Jagow, 1987) verwendet. Tricin-Ionen im Kathodenpuffer dieses Systems wirken als Folgeion anstelle von Glycin und sorgen für eine bessere Auftrennung kleiner Proteine. Vor dem Aufkochen und Auftragen einer 1,5 µl LPS Probe wurde die gleiche Menge an Tricin Sample Solution zugegeben. Für den Gellauf wurde der Kathodenpuffer in den Innenbereich der Gelkammer gefüllt und der Anodenpuffer

außen zugegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 V (bis zum Sammelgel) bzw. 110 V für 4-6 h. Die Pipettierschema der Polyacrylamid-Gele ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 10. Pipettierschema der Polyacrylamid-Gele im Tricin-Gelsystem

Trenngel		Sammelgel	
AA-BA-Mix (für Trenngel)	2,5 ml	AA-BA-Mix (für Sammelgel)	0,25 ml
ddH ₂ O	1,5 ml	ddH ₂ O	2,1 ml
Gelpuffer	2,5 ml	Gelpuffer	0,78 ml
Glycerin (87 %)	1,0 ml		
TEMED	7,5 µl	TEMED	3 µl
APS (10 %)	75 µl	APS (10 %)	30 µl

4.13.6.3 LPS-Silberfärbung

Bei der LPS-Silberfärbung nach (Tsai & Frasch, 1982) war es notwendig, alle Lösungen mit 1 x Plastikmaterial in ddH₂O anzusetzen. Bei jedem Schritt wurde eine neue, unbenutzte Schale verwendet. Zunächst wurde das Gel mindestens 1 h bei RT (oder ÜN bei RT) im Fixierer inkubiert und danach 5 min im Oxidierer geschwenkt. Es folgten drei 15 min Waschschrte in ddH₂O. Nach der Anfärbung der Proteine mit frisch zubereiteter Silbernitratlösung (Inkubation von 10 min) wurde das Gel kurz mit ddH₂O gespült und erneut dreimal 10 min mit ddH₂O gewaschen. Die Entwicklung in Formaldehyd-Entwickler wurde so lange durchgeführt, bis alle Banden zu sehen waren. Durch die Inkubation in 5 % Essigsäure wurde die Reaktion abgestoppt.

4.13.7 2D-Gelelektrophorese

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE) werden zur Auftrennung von Proteinen zwei voneinander unabhängige Kriterien verwendet: Durch die Trennung anhand des Molekulargewichtes auf der einen und des isoelektrischen Punktes auf der anderen Seite können hunderte Genprodukte aus Gesamtzellextrakten simultan auf einem Gel untersucht werden.

4.13.7.1 Rehydrieren

Für die isoelektrische Fokussierung wurden IPG-Streifen (ReadyStrip™ IPG Strips, 17 cm, pH-Gradient von pH 3-10) verwendet. Diese mussten zunächst mit der Proteinlösung in der PROTEAN® IEF CELL von Bio-Rad rehydriert werden. Die Proteinprobe (400 µg) wurde dazu mit Reswelling-Puffer (siehe 4.13.1, versetzt mit Bromphenolblau) auf ein Volumen von 300 µl gebracht und gleichmäßig in der IEF-Kammer verteilt. Ein IPG-Streifen wurde mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei aufgelegt und das Programm „Passives Rehydrieren“ der IEF-Kammer gestartet. Nach 30 min wurde der Streifen mit Mineralöl überschichtet und die Rehydrierung ÜN durchgeführt. Am nächsten Tag wurde der Streifen entnommen und das Mineralöl entfernt.

Für Proteinproben, die unter Verwendung eines mechanischen Zellaufschlusses (siehe 4.13.2) gewonnen wurden, wurde anstelle des Reswelling-Puffers die Rehydratisierungslösung verwendet, um die Probe auf ein finales Volumen von 300 µl zu bringen.

4.13.7.2 Fokussieren

Die Auftrennung der Proteine in Abhängigkeit ihres isoelektrischen Punktes fand ebenfalls in der PROTEAN® IEF CELL statt (Gorg *et al.*, 1988). Dazu wurden zunächst Filterpapier-Stücke (0,5 x 1 cm) mit Aqua dest. getränkt und über beide Elektroden einer IEF-Kammer gelegt. Darauf wurde der mit Proteinlösung gesättigte IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten gelegt. Um diesen vor Austrocknung bzw. der Auskristallisierung des Harnstoffes zu schützen, erfolgte einer Überschichtung mit 2 ml Mineralöl. Nach dem Schließen der Kammer wurde die Fokussierung mit folgenden Parametern bei konstanten 20°C durchgeführt: 150 V für 2 h, 300 V für 2 h, 500 V für 2 h, 1000 V für 3 h, 4000 V für 3 h und dann 6000 V bis zum Erreichen von 50 kVh. Nach der Fokussierung ÜN wurden die IPG-Streifen vom Mineralöl gereinigt, in Alufolie eingeschlagen und bis zur weiteren Verwendung in der SDS-PAGE bei -20 °C gelagert.

4.13.7.3 Äquilibrieren

Unmittelbar vor der elektrophoretischen Auftrennung der isoelektrisch fokussierten Proteine erfolgte die Äquilibrierung. Dazu wurde der IPG-Streifen im ersten Schritt 15 min in Äquilibrierungslösung mit 2 % (w/v) DDT (0,5 g in 25 ml) geschwenkt. Im zweiten Schritt, ebenfalls 15 min, enthielt die Äquilibrierungslösung 260 mM Jodacetamid (0,625 g in 25 ml).

4.13.7.4 Zweite Dimension der 2-DE: SDS-PAGE

Für die Durchführung der zweiten Dimension wurde die große PROTEAN® II xi-Zelle von Bio-Rad verwendet. Es wurden 12 % SDS-PAGE Gele ohne Sammelgel genutzt. Beim Gießen der SDS-PAGE Gele konnten durch die Verwendung einer großen Gelgießkammer gleichzeitig bis zu 12 Gele gegossen werden. Damit die IPG-Streifen später auf die Gele platziert werden konnten, wurde die Kammer nur bis ca. 2 cm unter den Rand befüllt. Diesem Schritt folgte das Bedecken der Gele mit Butanol, um eine glatte Gekante zu erhalten. Die Polymerisation erfolgte ÜN bei 4°C. Vor der Verwendung wurden die Gele mit Elektrodenpuffer (1 x) überschichtet und die äquilibrierten IPG-Streifen in demselben Puffer geschwenkt und luftblasenfrei auf die gerade Gekante gelegt. Anschließend wurde der überschüssige Elektrodenpuffer abgenommen und ein mit 15 µl Prestained Protein Marker getränktes Filterpapier neben dem Streifen platziert. Es folgte eine Fixierung des IPG-Streifens und des getränkten Filterpapiers mit heißer 0,5 % (w/v) Agarose in Elektrodenpuffer (1 x). Nach dem Erstarren der Agarose wurde das SDS-Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt, diese mit Elektrodenpuffer (1 x) befüllt und die Auftrennung mit 16 mA/Gel gestartet. Nach 30 min wurde die Stromstärke auf 24 mA/Gel erhöht und die Auftrennung solange fortgesetzt, bis die Bromphenol-Lauffront das Gelende erreicht hatte. Die Gelkassette wurde daraufhin vorsichtig mit einem Spatel geöffnet und das Gel entnommen.

Tabelle 11. Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele für die 2D-Gelelektrophorese

Trenngel 12 %	Anzahl der Gele			
	2	4	6	8
Acrylamid/Bis-Lösung (37, 5:1)	40 ml	100 ml	150 ml	200 ml
Trenngelpuffer pH 8,8	25 ml	62,5 ml	93,75 ml	125 ml
Aqua dest.	34 ml	85 ml	127,5 ml	170 ml
SDS-Lösung (10 %)	1 ml	2,5 ml	3,75 ml	5 ml
Endvolumen	100 ml	250 ml	375 ml	500 ml
TEMED	50 µl	125 µl	187,5 µl	250 µl
APS (40 %)	150 µl	375 µl	562,5 µl	750 µl

4.13.7.5 Färbung mit Coomassie Brilliant Blau

Zur Visualisierung der Proteine wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Dazu wurden die Gele drei Tage in der Färbelösung geschwenkt und anschließend mit dest. Wasser 2-3 Tage entfärbt. Das Wasser wurde in diesen Tagen mehrfach gewechselt.

4.13.7.6 Bilderfassung und Auswertung

Zur Auswertung der Gele wurden diese zunächst mit Hilfe des GS-800 Calibrated Densitometer eingescannt und durch die Verwendung der PDQuest™ Advanced Software (Version 8.0, Bio-Rad) ausgewertet. Dieses Programm erlaubt Spoterkennung, Quantifizierung, Gelvergleich und statistische Datenanalyse. Die Berechnung der statistischen Signifikanz (Student's t-Test) und die Normalisierung der Daten („*Local regression model*“) erfolgte automatisch über die Software PDQuest™ Advanced. Um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten, wurden mindestens zwei technische Replikate von mindestens sechs biologischen Replikaten jeder untersuchten Gruppe benötigt.

4.13.8 Identifizierung von Proteinen aus den 2D Gelen mittels Nano-HPLC mit MS-Kopplung (Nano-LC-MS/MS)

Diese Methode wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Albert Sickmann am RVZ in Würzburg durchgeführt. Bei der Nano-LC-MS/MS wird eine Nano-HPLC (Nano-High Performance Liquid Chromatographie) mit einem Massenspektrometer (MS) gekoppelt. In dieser Arbeit wurden die Analysen mit dem Qtrap4000 der Firma Applied Biosystems durchgeführt oder dem LTQ Orbitrap XL mass analyzer von Thermo Scientific, der an ein Ultimate 3000 Nano-HPLC System (Dionex) gekoppelt war.

Die zu untersuchenden Proteinspots wurden aus dem 2D-Gel mit Hilfe eines automatischen Spotpickers ausgeschnitten. Nach einem Trypsin-Verdau (Reinders *et al.*, 2007) wurden die zu identifizierenden Peptide zuerst auf einer Umkehrphase (Reversed Phase; RP)-Anreicherungssäule (Synergi HydroRP, 4 µm Partikelgröße, 80 Å Porengröße, 2 cm, Phenomenex) mit einem Innendurchmesser von 100 µm in 0,1 % Trifluoressigsäure vorkonzentriert. Anschließend wurden die Peptide auf einer RP-Säule (Synergi HydroRP, 2 µm Partikelgröße, 80 Å Porengröße, 30 cm, Phenomenex) mit einem Innendurchmesser von 75 µm getrennt. Dazu wurde eine 40 minütige binäre Gradientenelution (Lösungsmittel A: 0,1 % Formaldehyd, Lösungsmittel B: 0,1 % Formaldehyd, 84 % Acetonitril) angewandt, wobei das Lösungsmittel B von 5 % bis 50 % bei einer Flussrate von 270 nl/min bei 60°C verwendet wurde.

Beim Qtrap4000 wurden die Proben anschließend in einem Massenspektrometer (350-2000 m/z) vermessen und die vier stärksten Signale in der MS/MS verwendet, wobei der dynamische Ausschluss aktiviert wurde. Die Rohdaten wurden unter Verwendung von

Analyst 1.4 mit dem mascot.dll plug-in 1.6b5 ins mgf Format umgewandelt. Für die LTQ Orbitrap XL-Messungen wurden die MS-Messungen bei einer Auflösung von 60.000 durchgeführt und die fünf stärksten Signale der MS/MS in Verbindung mit der Funktion des dynamischen Ausschlusses unterzogen. Die Rohdaten wurden unter Verwendung von extract_msn (Teil des Bioworks Pakets) in das mgf Format umgewandelt.

Die Auswertung der generierten Spektren erfolgte durch den Vergleich mit der NCBI Datenbank (November 2008) gegen MC58 (2018 Sequenzen) oder Proteobacteria (2113661 Sequenzen) Dies erfolgte über das Programm Mascot 2.2. Die folgenden Parameter wurden verwendet: Trypsin als Protease mit einem Maximum von einer verpassten Schnittstelle, die MS-Toleranz betrug 10 ppm (Orbitrap XL) oder 0,4 Da (Qtrap4000), die MS/MS-Toleranz betrug 0,5 Da (Orbitrap XL) oder 0,4 Da (Qtrap4000), Oxidation von Met (+15,99 Da) als variable und Carbamidomethylation von Cys (+57,02 Da) als feste Modifikation, und ¹³C wurde als 1 festgelegt. Nur Peptide mit einem Mascot Score von über 30 (zweimalige manuelle Validierung) wurden in die weitere Auswertung einbezogen. Zugehörige emPAI (*exponentially modified protein abundance index*) Werte wurden aus Mascot entnommen.

4.13.9 Spectral Counting

Diese Methode wurde von Dr. René P. Zahedi der Arbeitsgruppe von Prof. Albert Sickmann am ISAS in Dortmund durchgeführt. Spectral counting zur Bestimmung von Proteinverteilungen innerhalb einer einzelnen Probe und Veränderungen des Proteingehaltes in verschiedenen Proben basiert auf dem emPAI (*exponentially modified protein abundance index*) (Ishihama *et al.*, 2005). Für diesen Index wird die Nummer der in der LC-MS/MS identifizierten Peptide eines Proteins mit der theoretisch vorhandenen Peptidnummer normalisiert (Rappsilber *et al.*, 2002) und anschließend modifiziert, indem man die exponentiellen PAI (*protein abundance index*) Werte minus 1 verwendet. Der Wert ist proportional zum Anteil des untersuchten Proteins in einer Proteinmischung. Durch den Vergleich des emPAI eines Proteins in verschiedenen Proben ist eine Aussage über die Zu- oder Abnahme des Proteins möglich (Ishihama *et al.*, 2005). Zur Vorbereitung dieser Methode wurden die zu untersuchenden Proteinspots im 2D-Gel per Hand gepickt, da kein automatischer Spotpicker zur Verfügung stand, und auf Trockeneis nach Dortmund zur weiteren Analyse geschickt.

4.14 Phänotypische Tests

4.14.1 Nachweis der Empfindlichkeit gegenüber Paraquat (Paraquat-Assay)

Bakterien einer ÜN Kultur wurden für den Paraquat-Assay (Soler-Garcia & Jerse, 2004) in NaCl-Lösung (0,85 %) eingerieben und auf eine Anzahl von 3×10^8 Bakterien/ml eingestellt. Diese Bakterienkonzentration erlaubt nach Aufnahme in einen Wattetupfer und Ausstreichen auf eine Agar-Platte die Herstellung eines konfluenten Bakterienrasens nach ÜN Inkubation. Kleine Filterpapier-Plättchen (\varnothing 6 mm), die mit 10 μ l einer 100 mM Paraquat-Lösung versetzt waren, wurden auf die Agar-Platten gelegt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde der Durchmesser (mm) der Zone gemessen, in der kein Bakterienwachstum zu beobachten war. Es wurden je drei unabhängige Replikate erstellt.

4.14.2 Bestimmung der Autolyse bei *N. meningitidis* (Autolyse-Assay)

Im Autolyse-Assay (Bos *et al.*, 2005) wurden die Bakterien einer ÜN-Kultur in PPM⁺ Medium eingerieben. In einem 2 ml Ansatz in 12 ml sterile Plastikröhrchen mit Rundboden wurde eine OD₆₀₀ von 2,5 eingestellt und diese Suspension bei RT über drei Tage stehen gelassen. Alle 24 h wurden 100 μ l abgenommen und die OD₆₀₀ gemessen, die vorher sorgfältig gemischt wurde. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen erstellt.

4.15 Datenauswertung

4.15.1 Statistik

Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte in den verschiedenen funktionellen Tests mit dem Student's t-Test.

4.15.2 DNA-Sequenzanalyse

Die Programme EditSeq und MegAlign (DNASar, Madison, WI, USA) wurden für die Analyse und Auswertung von DNA-Sequenzdateien verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Biofilmbildung des *N. meningitidis* Stammes WUE3671

Der erste Schritt dieser Arbeit war die Etablierung eines Biofilm-Flusssystems, mit dem eine ausreichende bakterielle Biomasse für eine anschließende Proteomanalyse gewonnen werden konnte. Das ausschließlich verwendete Flusssystem bestand aus Silikonschläuchen, die mit einem PharMed® Pumpenschlauch (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Germany) verbunden waren. Dieser Pumpenschlauch wurde in eine BVP Schlauchpumpe eingespannt (BVP Standard, MS/CA 8-6; Ismatec). Der Biofilm wurde aus einem definierten Teil des Flusssystems (30 cm Länge, Innendurchmesser von 8,0 mm) geerntet. Dabei erhielt man ca. 15 ml Biofilm-Bakteriensuspension.

Die Biofilmbildung von Meningokokken wurde in einem Minimalmedium mit definierter Zusammensetzung durchgeführt, das sich durch seine hohe Reproduzierbarkeit der Biofilmbildung auszeichnet. Dieses modifizierte *Neisseria Defined Medium* (NDM) (Archibald & DeVoe, 1978, Lappann *et al.*, 2006) wurde auch zur Anzucht der Bakterien in der planktonischen Kultur verwendet. Es erlaubt die äußerst zuverlässige Kultur über > 48 h durch die Zugabe von NaHCO₃ und Polyvitex.

5.1.1 Stammauswahl

In Standard-Biofilmversuchen sind unbekapselte Meningokokken in der Lage, Biofilme zu bilden. Dazu sind bekapselte Meningokokken nicht fähig (Yi *et al.*, 2004, Lappann *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurde ein konstitutiv unbekapselter *N. meningitidis* Trägerstamm, ein *capsule null locus* (cni) Stamm, verwendet. Stamm WUE3671 wurde 2005 in Deutschland aus dem Rachenabstrich einer gesunden weiblichen Trägerin isoliert (Vogel, nicht publiziert), ein homologes Serum der Trägerin liegt vor. Dieser Stamm zeichnete sich durch die ausgeprägte Stärke der Biofilmbildung aus mit einer Biomasse von etwa 0,5 g (n = 26) nach einem Wachstum von 24 h im Biofilm-Flusssystem (Abbildung 4). Der unbekapselte Meningokokkenstamm MC58*siaD*- erreichte dahingegen in den unabhängigen Experimenten nur eine Biomasse von durchschnittlich 0,26 g (n = 3).

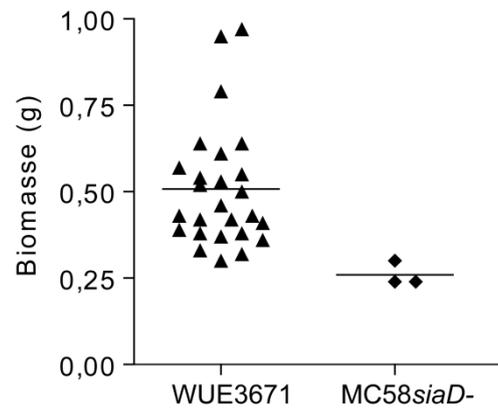


Abbildung 4. Resultierende Biomasse in g nach 24 h Biofilmbildung von *N. meningitidis* WUE3671 und MC58siaD- im Biofilm-Flusssystem. Die Grafik zeigt die Einzel- und Mittelwerte von 26 bzw. 3 unabhängigen Experimenten.

5.1.2 Planktonische Kultur

Eine planktonische Kultur wurde zum einen zur Inokulation des Biofilm-Flusssystems, zum anderen als Vergleichspopulation bei der Proteomanalyse genutzt. Zunächst wurde getestet, mit welcher Bakteriendichte von *N. meningitidis* WUE3671 ein optimales Wachstum zu erreichen war (Abbildung 5, A). Dazu wurden Kulturen mit einer OD_{600} von 0,1-0,4 für 8 h bei 37°C geschüttelt. Es zeigte sich, dass eine Anfangs-OD von 0,1 und 0,2 für ein reproduzierbares Wachstum in modifiziertem NDM ausreichend war, da nach 8 h eine OD von 0,8 erreicht wurde. Für alle weiteren Versuche wurde daher eine Anfangs-OD von 0,2 eingestellt und die Meningokokken bis zu einer OD von 0,8-0,9 (frühe exponentielle Phase) geschüttelt. Dieser Wert wurde nach ca. 7 h erreicht (Abbildung 5, B).

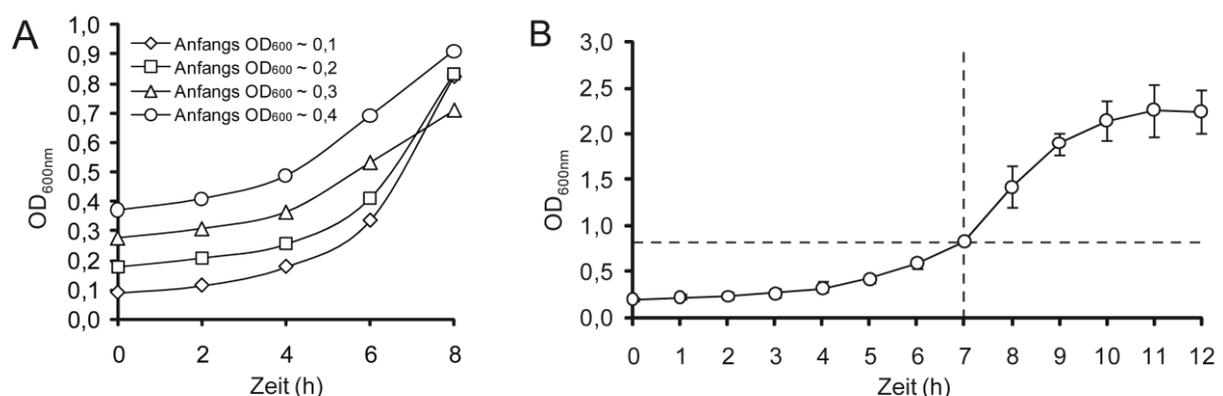


Abbildung 5. Wachstumskurve von *N. meningitidis* WUE3671 in NDM. (A) Wachstum über 8 h in NDM zur Bestimmung der optimalen Anfangs- OD_{600} . Die Grafik zeigt die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten. (B) Wachstum über 12 h in NDM bei einer Initialen OD von 0,2. Die Grafik zeigt die Mittelwerte von sieben unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichungen.

5.1.3 Biofilmbildung im Flusssystem

Die Biofilmbildung von *N. meningitidis* WUE3671 im Flusssystem erfolgte für 24 oder 48 h. Nach diesem Zeitraum wurde der Biofilm geerntet und neben der Biomasse (Nassgewicht) eine CFU-Bestimmung durchgeführt. Die Biomasse nahm während der Biofilmbildung von 0,5 g (24 h) auf ca. 0,8 g (48 h) um etwa 60 % zu, wohingegen die CFU/ml nach 24 h ein Plateau erreichten (Abbildung 6). Von 24 h zu 48 h Biofilmbildung kam es somit zu einer deutlichen Zunahme der Biomasse bei gleichbleibender Lebendzellzahl, was auf ein Angleichen von Proliferations- und Absterberate im 48 h Biofilm hindeutet.

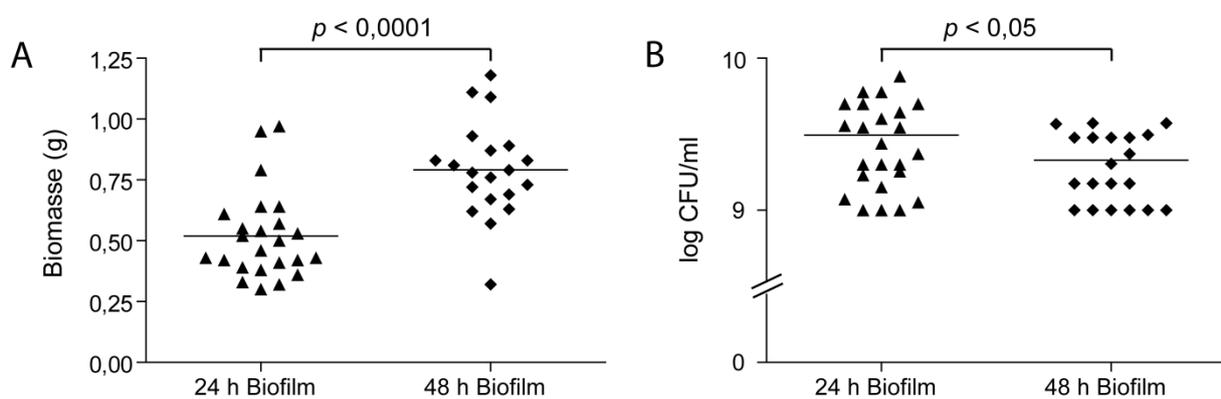


Abbildung 6. Biofilmbildung von *N. meningitidis* WUE3671 nach 24 h/48 h Wachstum im Flusssystem. (A) Biomasse in g, (B) CFU/ml. Die Grafik zeigt die Einzel- und Mittelwerte von 24 (24 h) bzw. 20 (48 h) unabhängigen Experimenten. Die Daten der Biomassebestimmung des 24h Biofilms wurden schon zur Erstellung von Abbildung 4 verwendet. Die statistische Analyse erfolgte über den Student's t-Test.

Diese Hypothese konnte durch licht- und elektronenmikroskopische Analysen der WUE3671 Biofilme bestätigt werden. In einer lichtmikroskopischen Übersicht konnte eine über die Zeit zunehmende Schichtdicke des Biofilms beobachtet werden (Abbildung 7, A und E). Bei einer genaueren Betrachtung der verschiedenen Biofilmregionen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie zeigte sich in der dem Medium zugewandten, apikalen Region sowohl bei 24 h, als auch bei 48 h Biofilmen eine nahezu identische Anzahl vitaler Meningokokken (Abbildung 7, B und F). Dies änderte sich bei der Betrachtung der basalen Biofilmregion. Beim 24 h Biofilm zeigten sich fast ausschließlich vitale Bakterien, wohingegen beim 48 h Biofilm eine verstärkte Anzahl an Zellen mit avitalem Erscheinungsbild zu finden waren (Abbildung 7, C-D und G-H). Diese Zellen variierten in ihrer Größe und erschienen teilweise balloniert. In

einigen Fällen verloren sie an elektronendichtem Material. Im 48 h Biofilm beherrschten diese ballonierten Gebilde, die möglicherweise von Membranen umgrenzt sind, die Szenerie.

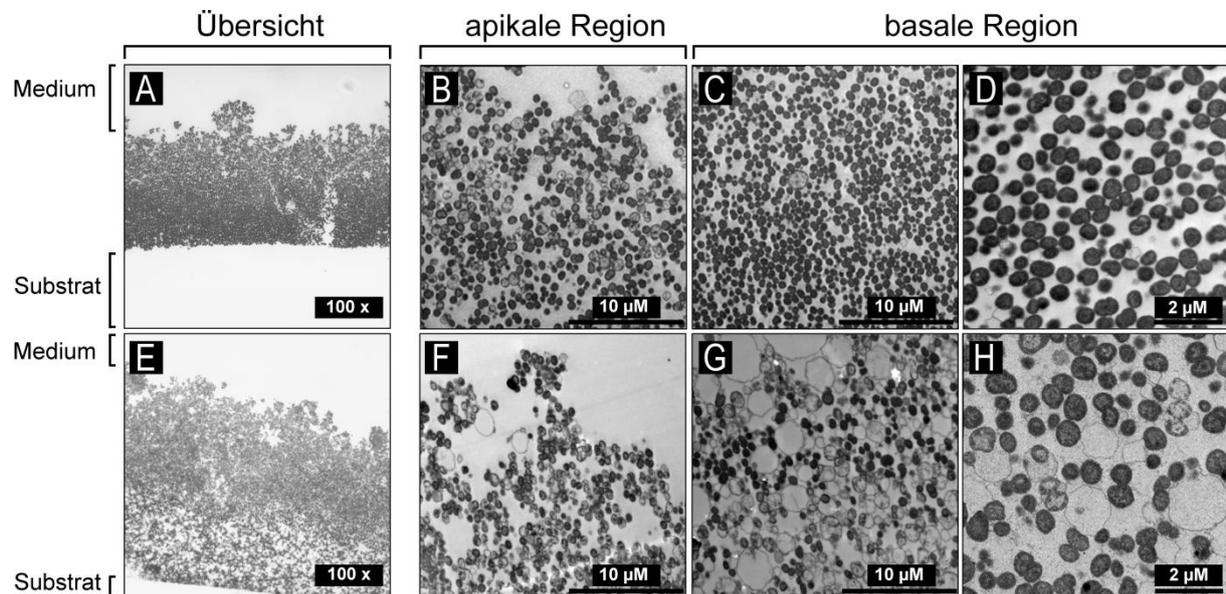


Abbildung 7. Mikroskopische Aufnahmen von *N. meningitidis* Biofilmen. 24 h (A-D) und 48 h (E-H) alte Biofilme wurden mit Lichtmikroskopie (100x; A, E) und Transmissionselektronenmikroskopie (B-D, F-G) untersucht.

In den 24 h und 48 h Biofilmen von WUE3671 war mittels Elektronenmikroskopie eine sehr große Anzahl äußerer Membranvesikel (Blebs) darstellbar. Es handelt sich hierbei um Abschnürungen der äußeren Gram-negativen Zellmembran, die entweder an der Zellmembran vitaler Meningokokken assoziiert bleiben (einzeln oder in größeren Ansammlungen) oder von der Bakterienoberfläche freigesetzt werden. Blebs zeigten sich sowohl in Kugelform (*spherical bleb*) als auch in Schlauchform (*tubular bleb*) (Abbildung 8, C und E). Die durchschnittliche Größe der einzelnen Blebs betrug etwa 35 nm. In den 48 h Biofilmen waren ähnliche Strukturen von ungewöhnlicher Größe zu finden (Abbildung 8, G-H). Ihre Identität ist unklar, sie lagen zellassoziiert vor.

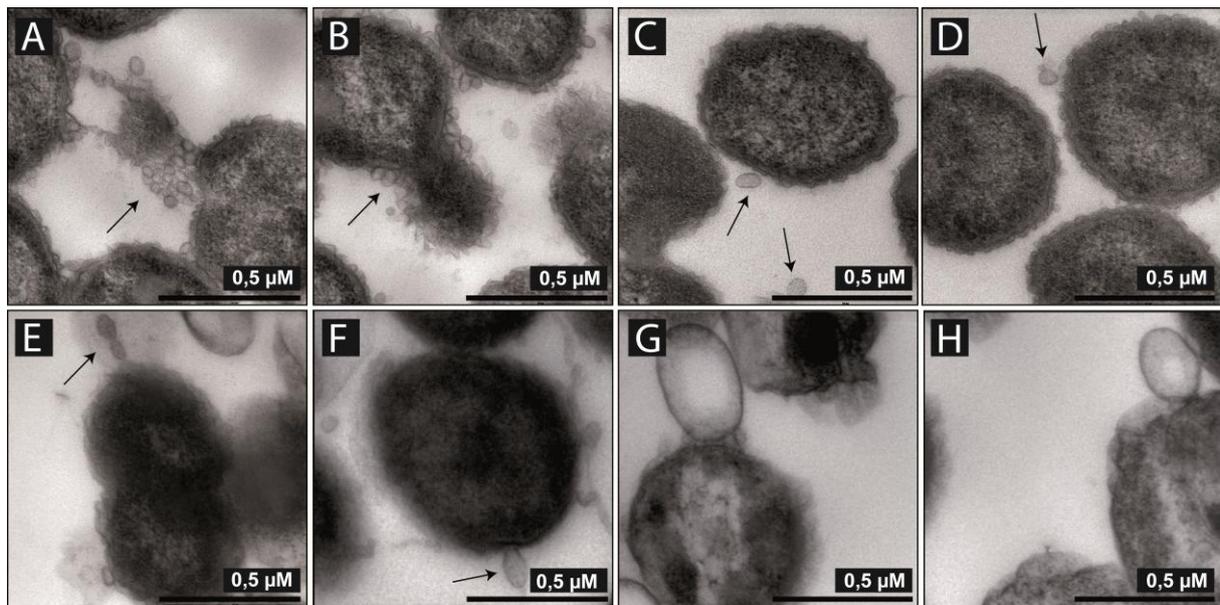


Abbildung 8. Blebbildung von Meningokokken in Biofilmen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 24 h (A-D) und 48 h (E-H) Biofilmen. Die Pfeile markieren Blebs.

5.2 Vergleich der Expression wesentlicher Strukturen der äußeren Membran von *N. meningitidis* WUE3671

5.2.1 Untersuchung von PorB, Opa, Opc und FetA

Durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern wurde die Expression einzelner Proteine im Biofilm genauer untersucht. Dazu wurden 2,5 ng Gesamtzellprotein von je zwei unabhängigen Proteinproben jeder untersuchten Gruppe (planktonische Zellen, 12 h Biofilm, 24 h Biofilm und 48 h Biofilm) im Western Blot analysiert (Abbildung 9). Es zeigte sich, dass das Porin PorB (NMB2039) eines der vorherrschenden Proteine auf der Zelloberfläche von Meningokokken, bei planktonischen und Biofilmzellen in vergleichbaren Mengen vorhanden war. Dahingegen wurden die integralen Adhäsine Opa und Opc (*outer membrane opacity proteins*) und der eisenregulierte TonB-abhängige Enterobactin-Rezeptor FetA (NMB1988, früher FrpB) im Biofilm herunterreguliert.

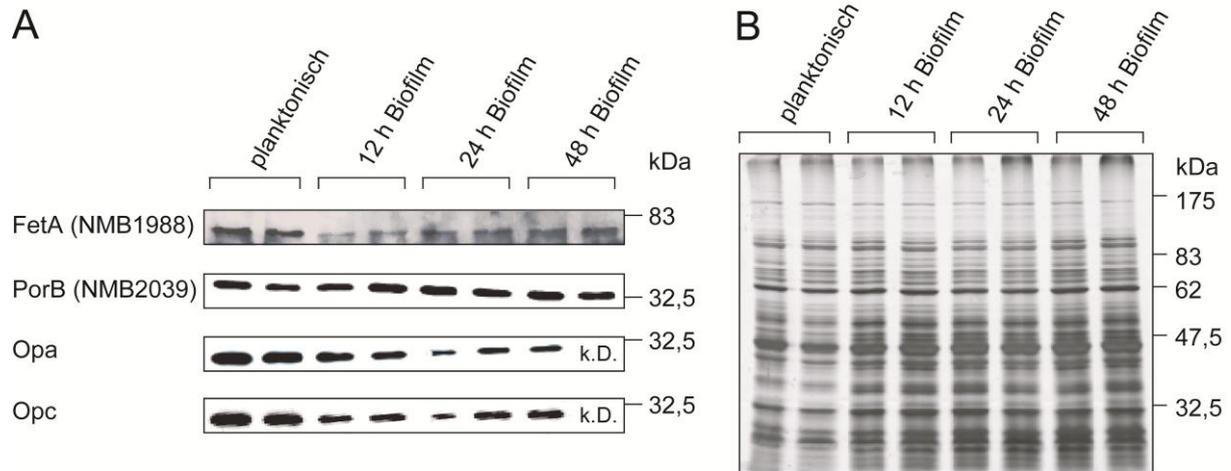


Abbildung 9. Expression von Oberflächenproteinen in planktonischen Zellen und Biofilmen. (A) Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen FetA, PorB, Opa und Opc. Es wurden je zwei unabhängige Proteinproben pro Gruppe (planktonische Zellen, 12 h, 24 h und 48 h Biofilm) verglichen. Bei der Analyse mit Opa und Opc fehlt das zweite Replikate beim 48 h Biofilm (k.D., keine Daten). (B) Silbergefärbtes Normalisierungsgel.

5.2.2 Analyse des Lipopolysaccharids (LPS)

Neben äußeren Membranproteinen (*outer membrane proteins*, OMP), Pili und der Polysaccharidkapsel spielt das Lipopolysaccharid (LPS) eine wichtige Rolle in der Adhärenz und Invasion von *N. meningitidis*. Zur Untersuchung des LPS in Meningokokken-Biofilmen wurden vier planktonische Proben mit vier 48 h Biofilm Proben verglichen. Dazu wurde LPS in einem Tricin-Gel mit einer LPS-Silberfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 10). Es zeigte sich jedoch in diesem semiquantitativen Verfahren kein Unterschied im LPS von Biofilmen und planktonischen Zellen.

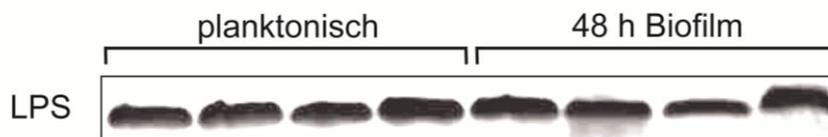


Abbildung 10. Vergleich des Lipopolysaccharids von WUE3671 in planktonischen Zellen und in Zellen des 48 h Biofilms. Die Analyse erfolgte in silbergefärbten Tricin-Gele. Es wurden je vier unabhängige LPS-Proben pro Gruppe untersucht.

5.3 Vergleichende Proteomanalyse

5.3.1 Auswahl einer geeigneten Proteinpräparation

Um den Vorteil der hohen Auflösung in der 2D-Gelelektrophorese (2-DE) nutzen zu können, müssen die Proteine der zu untersuchenden Probe gelöst, denaturiert, disaggregiert und reduziert werden (Gorg *et al.*, 2004). Nur durch die komplette Auflösung aller molekularen Wechselwirkungen wird sichergestellt, dass jeder Spot im Gel ein individuelles Polypeptid repräsentiert. Es gibt jedoch kein universell anwendbares Protokoll, um diese Bedingungen zu erfüllen. Somit muss, je nach zu untersuchender Probe, das Protokoll entsprechend angepasst werden. Die Probenverarbeitung sollte so einfach wie möglich sein, um die Reproduzierbarkeit zu erhöhen. Zusätzlich sollten Proteinmodifikationen während der Probenverarbeitung minimiert werden, da sie zu Artefakten im 2D-Gel führen (Gorg *et al.*, 2004). Zu den wichtigsten Schritten der Probenpräparation gehören der Zellaufschluss, die Inaktivierung oder Entfernung von störenden Substanzen (Proteasen, Nukleinsäuren, Salzen) und die Solubilisation der Proteine (Herbert, 1999, Rabilloud, 1999, Shaw & Riederer, 2003). In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Protokolle zur Präparation des Gesamtzellproteoms ausgetestet. Als Qualitäts-Auswahlkriterium wurden in der 2D-Gelelektrophorese Proteinauftrennung, Anzahl der Proteinspots und Streifenbildung, die ein Hinweis auf störende Substanzen in der Probe ist, beurteilt (Abbildung 11). Für die Präparation wurden 48 h Biofilme von *N. meningitidis* WUE3671 verwendet. Beim ersten Ansatz handelte es sich um den ProteoExtract® Complete Bacterial Proteome Extraction Kit. Dieser Kit ist speziell für die anschließende 2D-Gelelektrophorese konzipiert und verspricht eine wenig aufwendige Extraktion des Gesamtzellproteins von Bakterien. Das Ergebnis war jedoch in allen drei untersuchten Kriterien nicht überzeugend (Abbildung 11, A). Beim zweiten Protokoll handelte es sich um eine Methode unter Verwendung eines mechanischen Zellaufschlusses. Die Proteine wurden mit 12 % TCA gefällt. Hier zeigte sich eine bessere Auftrennung, mehr definierte Proteinspots als mit der ersten Methode und nur wenige Streifen (Abbildung 11, B). Das beste Ergebnis konnte jedoch mit der dritten Proteinpräparation erzielt werden (Abbildung 11, C). Die verwendete Methode war zur Erstellung einer Proteomkarte von *N. meningitidis* Serogruppe A Stamm Z4970 (Bernardini *et al.*, 2004) verwendet worden und wurde für die Anwendung in dieser Arbeit leicht modifiziert. Es konnten in der 2-DE mit dieser Proteinpräparation deutlich mehr Proteinspots nachgewiesen werden als mit der

zweiten Methode. Auch die weiteren untersuchten Kriterien hinsichtlich der Auftrennung und der Streifen-Bildung zeigten überzeugende Ergebnisse.

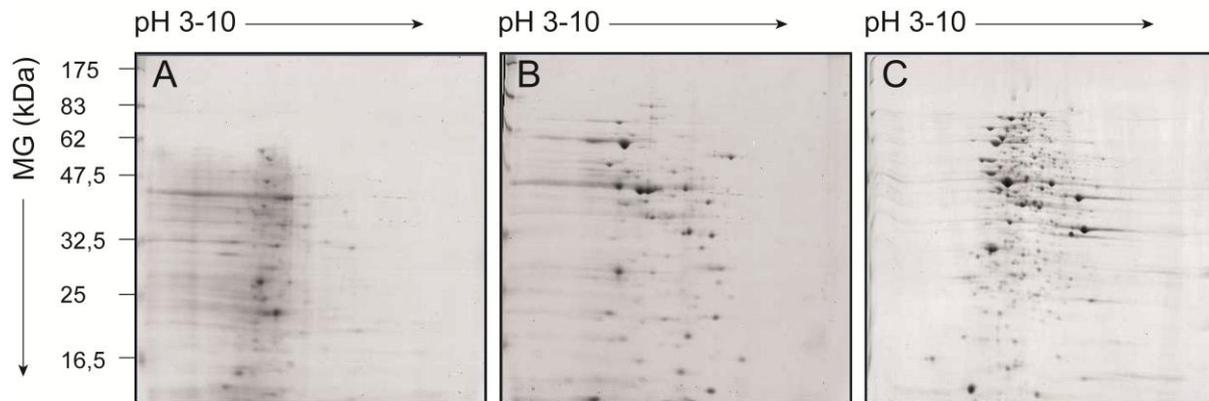


Abbildung 11. 2D-Gelbilder verschiedener Proteinpräparationen. (A) Proteo Extract[®] Kit, (B) Methode unter Verwendung eines mechanischen Zellaufschlusses, (C) Proteinpräparation nach (Bernardini *et al.*, 2004).

5.3.2 Optimierung der 2D-Gelelektrophorese

Neben der Optimierung der Proteinpräparation können noch andere Bedingungen zu besseren Ergebnissen bei der 2D-Gelelektrophorese beitragen. Neben der Auswahl des pH-Bereichs der IPG (*i*mmobilized *p*H *g*radient) - Streifen gehört dazu auch die Wahl der passenden Rehydratisierungsmethode (Einquell-Methode/Sample-Cup-Methode). In dieser Arbeit wurde die Einquell-Methode verwendet, die einige Vorteile gegenüber der Sample-Cup-Methode aufweist. Es sind größere Probenvolumina applizierbar, es entstehen keine Präzipitate am Auftragspunkt der Probe und diese Methode ist technisch leicht durchführbar. Auch die isoelektrische Fokussierung selbst bietet viele Möglichkeiten zur optimalen Anpassung des Protokolls an die zu untersuchende Proteinprobe. Je nach Probe, gewähltem pH-Bereich der IPG-Streifen und Rehydratisierungsmethode bieten unterschiedliche Einstellungen ein besseres Ergebnis. Für diese Arbeit wurden sechs verschiedene Protokolle ausgetestet, bis ein optimales Ergebnis erzielt wurde.

5.3.3 Computergestützte Auswertung mit PDQuestTM Advanced

Ziel der 2D-Gelelektrophorese ist der Nachweis unterschiedlich exprimierter Proteinspots, um diese dann im weiteren Verlauf durch Massenspektrometrie identifizieren zu können.

Der Gelvergleich erfolgt mit Hilfe einer computergestützten Auswertung, in dieser Arbeit mit der Software PDQuest™ Advanced (Bio-Rad). Auch wenn die verwendete Software die Analyse sehr erleichterte, wurde jeder in Frage kommende Proteinspot manuell, in sämtlichen Gelen, hinsichtlich der richtigen Zuordnung überprüft (Abbildung 12, B und C). In dieser Arbeit wurden mindestens zwei technische Replikate von mindestens sechs biologischen Replikaten jeder Gruppe (planktonische Zellen, 24 h Biofilm, 48 h Biofilm) untersucht, damit die computergestützte Auswertung statistisch signifikante Ergebnisse liefern konnte. Exemplarisch stellt Abbildung 12 den Auswertungsvorgang für den Spot 4 dar, der im 48 h Biofilm um das 2,35-fache hochreguliert war.

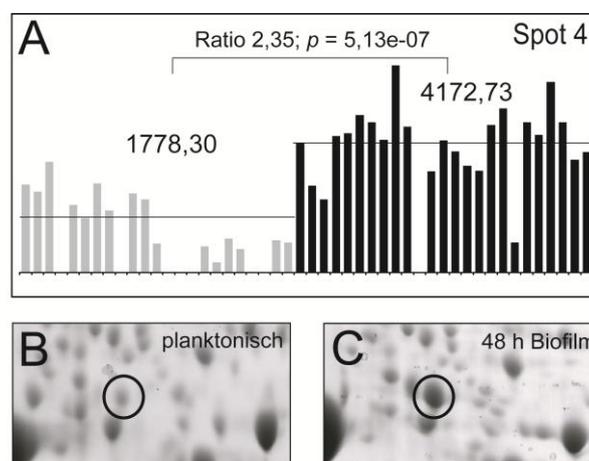


Abbildung 12. Beispiel zur Auswertung der 2D-Gelelektrophorese durch die PDQuest™ Advanced Software (Version 8.0, Bio-Rad). (A) Modifiziertes Histogramm für den Spot 4. Die einzelnen Balken zeigen die Spotintensität in einem Gel an (grau, planktonische Gruppe; schwarz, 48 h Biofilm Gruppe). Die Zahlen über den beiden Gruppen zeigen die mittlere Spotintensität in allen Gelen einer Gruppe an (diese wird vom Programm nur grob dargestellt und muss daher „per Hand“ nachbestimmt werden). Exemplarisch ist Spot 4 in einem Gel der planktonischen Gruppe (B) und der 48 h Biofilm Gruppe (C) dargestellt.

5.3.4 2D-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese wurde das Gesamtzellproteom von 24 h und 48 h Biofilmen von *N. meningitidis* WUE3671 mit dem des planktonischen Inokulums nach 7 h Kultur in modifiziertem NDM verglichen. Die computergestützte Analyse mit der Software PDQuest™ Advanced (Version 8.0, Bio-Rad) ermittelte eine maximale Anzahl von ca. 700 Proteinspots, die mittels visueller Inspektion einzelner Gele nicht differenziert werden konnten (Abbildung 13). Proteine mit einer mindestens 2-fachen ($p < 0,05$) absoluten Veränderung der Spotintensität wurden als unterschiedlich exprimiert angesehen und weiter untersucht. Insgesamt zeigte sich bei 17 Proteinspots eine unterschiedliche Expression in

mindestens einer der beiden Biofilmbedingungen. Das waren etwa 2,4 % aller dargestellten Spots. Von diesen Proteinen zeigten 12 eine erhöhte Expression und 5 eine verminderte Expression im Biofilm. In Abbildung 13 sind nur die Proteinspots markiert, bei denen eine Identifizierung durch die Massenspektrometrie möglich war ($n = 12$).

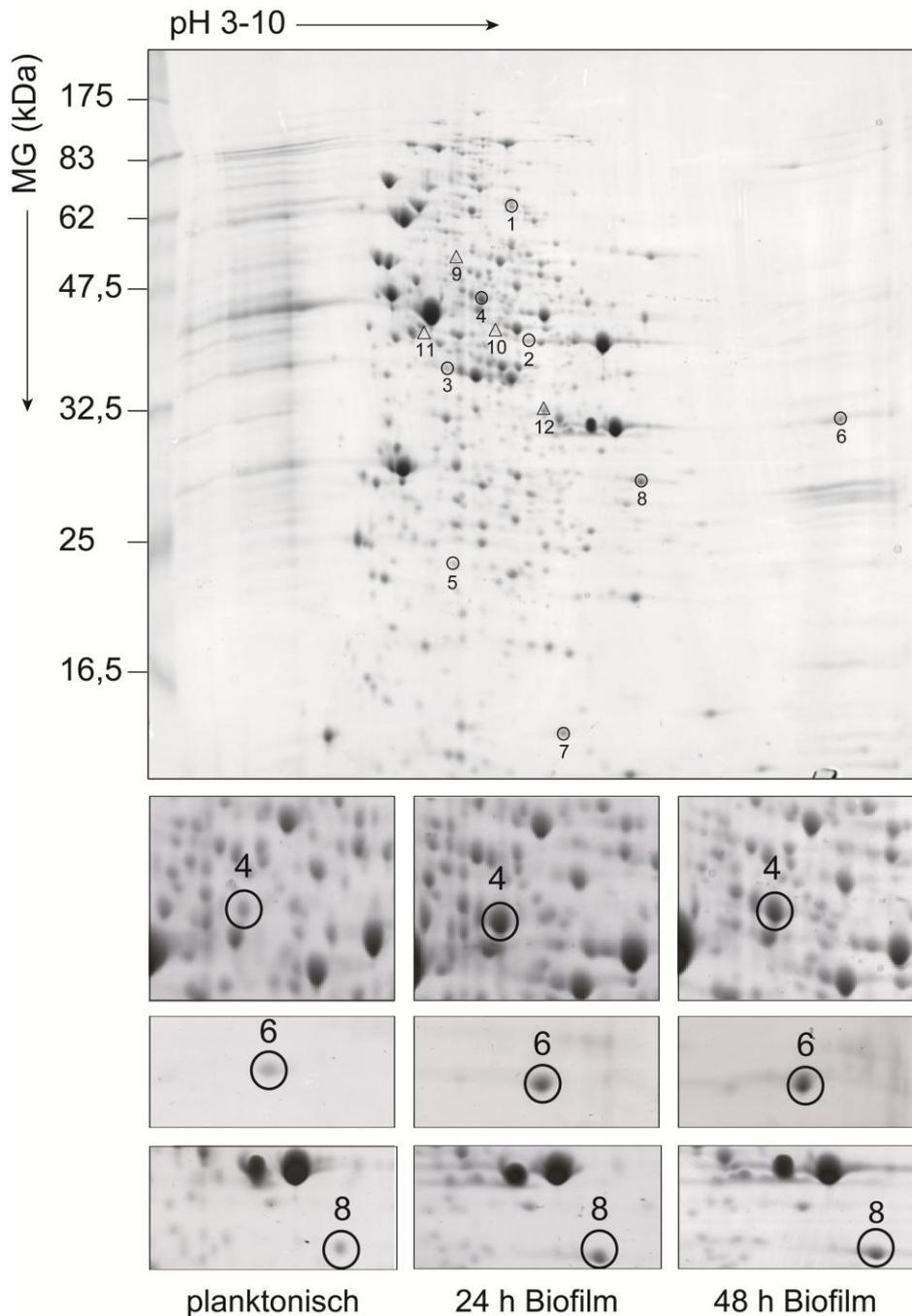


Abbildung 13. 2D-Gelelektrophorese des Gesamtzellproteoms eines 48 h Biofilms von *N. meningitidis* WUE3671. Im Biofilm (24 h/48 h) hochregulierte Proteine sind durch Kreise gekennzeichnet, wohingegen herunterregulierte Proteine durch Dreiecke markiert sind. Nur die Proteine ($n = 12$), die durch LC-MS/MS identifiziert wurden, sind markiert. Die unteren Abbildungen zeigen exemplarisch, anhand von Spot 4, 6 und 8, die Expressionsunterschiede in planktonischen Zellen und Biofilmen in je einem repräsentativen Gel.

5.3.5 Massenspektrometrie und Spectral Counting

Durch die Anwendung der LC-MS/MS konnten 12 der regulierten 17 Proteine identifiziert werden (Tabelle 12). Acht der identifizierten Proteine waren im Biofilm hochreguliert und vier Proteine herunterreguliert. Die meisten Veränderungen zeigten sich schon nach einem Biofilmwachstum von 24 h. LeuA (NMB1070) war vorübergehend im 24 h Biofilm hochreguliert, diese Regulation nahm jedoch nach 48 h wieder deutlich ab. Zwei der hochregulierten Proteine spielen eine Rolle im Schutz gegen oxidativen Stress, MntC (NMB0586) und SodC (NMB1398). MntC ist das periplasmatische substratbindende Protein eines Mn/Zn ABC-Transporters (MntABC), welcher in *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* im oxidativen Schutz involviert ist (Tseng *et al.*, 2001, Seib *et al.*, 2004). Die Cu-Zn-Superoxiddismutase SodC ist in *N. meningitidis* für den Schutz der Bakterien gegen exogene Superoxidanionradikale verantwortlich (Wilks *et al.*, 1998). Die oxidierte Form des Enzyms reagiert mit dem hoch reaktiven Superoxidion und führt zur Bildung von Sauerstoff. Die entstandene reduzierte Form des Enzyms reagiert weiter mit einem zweiten Superoxidion und zwei Protonen, dabei entsteht Wasserstoffperoxid und die oxidierte Form des Enzyms (McCord & Fridovich, 1969). Wasserstoffperoxid wird durch die Reaktion der Enzyme Katalase und Peroxidase entfernt. Weitere im Biofilm hochregulierte Proteine sind im Aminosäure-Metabolismus involviert (LeuA, AspC). LeuA (2-Isopropylmalat Synthase, NMB1070) katalysiert den ersten Schritt im Isopropylmalat Weg, der zur Synthese von Leucin führt. AspC (Aspartat-Aminotransferase, NMB0540) ist ein multifunktionelles Enzym, das an der Synthese von Aspartat, Tyrosin und Phenylalanin beteiligt ist (Gelfand & Steinberg, 1977, Jantama *et al.*, 2008). Zwei hochregulierte Proteine sind am Kohlenhydrat-Metabolismus beteiligt. GapA-2 (Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase, GAPDH, NMB2159) katalysiert die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat mit der simultanen Produktion von NADH (Grifantini *et al.*, 2002). Im Stärke- und Saccharose-Metabolismus wandelt PgmB (Beta-Phosphoglucomutase, NMB0391) in einer reversiblen Reaktion Glucose-1-phosphat zu Beta-Glucose-6-phosphat um. Die Zink-enthaltende Alkoholdehydrogenase (NMB0604) ist eine (R,R)-Butandiol Dehydrogenase, die die reversible Reduktion von Acetoin zu 2,3-Butandiol im Butansäure-Metabolismus katalysiert.

Das Zellteilungsprotein FtsZ (NMB0427) war in der Biofilmbildung herunterreguliert. Weitere herunterregulierte Proteine sind im Kohlenhydrat-Metabolismus beteiligt. Sowohl AldA als

auch AckA-2 sind Teil des Pyruvat-Metabolismus. AldA (Aldehyddehydrogenase A, NMB1968) katalysiert die Oxidation von Aldehyden, und AckA-2 (Acetatkinase, NMB1518) ist für die reversible Reaktion von Acetylphosphat und ADP zu Acetat und ATP verantwortlich (Rose *et al.*, 1954). SucD die Alpha-Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase (NMB0960) ist am Citratzyklus beteiligt und katalysiert die reversible Bildung von Succinat und Coenzyme-A ausgehend von Succinyl-CoA.

Eine zusätzliche Bestätigung der Identität der Spot-Hauptkomponente wurde durch empAI-basierendes Spectral Counting erreicht (Tabelle 13). Diese Methode wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Sickmann durchgeführt. Durch den Umzug der Arbeitsgruppe nach Dortmund stand leider für das Ausschneiden der Proteinspots kein automatischer Spotpicker mehr zur Verfügung, so dass per Hand gepickt werden musste. Durch die Analyse von 9 der 12 in der 2D-Gelelektrophorese regulierten Proteine über Spectral Counting ließ sich die Regulation von 7 Proteinen bestätigen. Dies war für FtsZ (NMB0427) und SucD (NMB0960) nicht möglich. Hier konnte nur die Proteinidentität des Spots bekräftigt werden.

Tabelle 12. Differenziell exprimierte Proteine im Meningokokken-Biofilm, identifiziert durch 2-DE/MS.

Spot Nr. ^{a)}	2D-Gelelektrophorese		Massenspektrometrie				Allgemeine Informationen				
	24h Biofilm	48h Biofilm	Score	Queries matched	% Sequence coverage	Protein Name	Gen Symbol	NMB Nr.	MG (kDa)/pI	Vorhergesagte Funktion	
1	+2,12	+1,33	895	46	30	2-Isopropylmalat Synthase	<i>leuA</i>	1070	55,4/5,7	Aminosäure-Biosynthese: Pyruvat Familie	
2	+1,58	+2,32	626	27	31	Aspartat-Aminotransferase	<i>aspC</i>	0540	43,9/7,0	Aminosäure-Biosynthese: Aspartat Familie	
3	+2,8	+4,56	470	33	26	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	<i>gapA-2</i>	2159	35,8/5,3	Energie-Metabolismus: Glycolyse/Gluconeogenese	
4	+2,26	+2,35	2110	45	26	Alkoholdehydrogenase, Zink-haltig	-	0604	37,9/5,6	Energie-Metabolismus: Fermentation	
5	+2,07	+1,94	265	8	12	Beta-Phosphoglucomutase	<i>pgmB</i>	0391	23,7/4,8	Energie-Metabolismus: Zucker	
6	+1,88	+3,2	615	34	39	ABC Transporter, periplasmatisches Substrat-bindendes Protein	<i>mntC</i>	0586	33,3/9,6	Zelluläre Prozesse: Detoxifikation	
7	+1,97	+2,8	272	5	17	Cu-Zn-Superoxiddismutase	<i>sodC</i>	1398	19,5/6,6	Zelluläre Prozesse: Detoxifikation	
8	+2,14	+2,6	1367	33	38	Konserviertes hypothetisches Protein	-	1475	30,2/7,8	Hypothetisches Protein	
9	-2,65	-1,94	196	3	6	Aldehyddehydrogenase A	<i>aldA</i>	1968	52,3/4,9	Energie-Metabolismus: Fermentation	
10	-1,59	-2,18	459	20	20	Acetatkinase	<i>ackA-2</i>	1518	42,4/6,1	Energie-Metabolismus: Fermentation	
11	-1,26	-4,14	326	7	18	Zellteilungsprotein	<i>ftsZ</i>	0427	41,5/4,7	Zelluläre Prozesse: Zellteilung	
12	-1,43	-2,11	685	39	45	Succinyl-CoA Synthetase, Alpha-Untereinheit	<i>sucD</i>	0960	30,5/6,4	Energie-Metabolismus: Citratzyklus	

a) Zugehörige Spot Nummer in 2D-Gel Abbildung 13

Tabelle 13. Differenziell exprimierte Proteine im Meningokokken-Biofilm, untersucht mit Spectral Counting.

Spot Nr. ^{a)}	Protein Name	Gen Symbol	NMB Nr.	emPAI Replik 1 ^{b) c)}			emPAI Replik 2			Expression		Fazit	
				plankt.	24h BF	48h BF	plankt.	24h BF	48h BF	Spectral Counting	2-DE		
1	2-Isopropylmalat Synthase	<i>leuA</i>	1070	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	↑	-
2	Aspartat-Aminotransferase	<i>aspC</i>	0540	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	↑	-
3	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	<i>gapA-2</i>	2159	6,31	8,86	9,89	7,08	(2,75)	(1,64)		↑	↑	2-DE bestätigt
4	Alkoholdehydrogenase, Zink-haltig	-	0604	15,56	18,78	(-)	3,91	10,07	18,97		↑	↑	2-DE bestätigt
5	Beta-Phosphoglucomutase	<i>pgmB</i>	0391	4,59	4,59	11,72	4,18	7,12	5,02		↑	↑	2-DE bestätigt
6	ABC Transporter, periplasmatisches Substrat-bindendes Protein	<i>mntC</i>	0586	9,67	(-)	17,28	9,67	(-)	(-)		↑	↑	2-DE bestätigt
7	Cu-Zn-Superoxidismutase	<i>sodC</i>	1398	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		-	↑	-
8	Konserviertes hypothetisches Protein	-	1475	6,38	12,29	25,91	20,27	(-)	(-)		↑	↑	2-DE bestätigt
9	Aldehyddehydrogenase A	<i>aldA</i>	1968	14,57	2,21	n.d.	4,56	2,38	n.d.		↓	↓	2-DE bestätigt
10	Acetatkinase	<i>ackA-2</i>	1518	12,62	3,56	n.d.	7,94	5,94	n.d.		↓	↓	2-DE bestätigt
11	Zellteilungsprotein	<i>ftsZ</i>	0427	44,20	72,70	112,30	32,99	55,94	133,56		↑	↓	inkonsistent; Hauptkomponente bestätigt
12	Succinyl-CoA Synthetase, Alpha-Untereinheit	<i>sucD</i>	0960	14,99	27,85	71,95	13,39	25,73	(13,39)		↑	↓	inkonsistent; Hauptkomponente bestätigt

a) Zugehörige Spot Nummer in 2D-Gel Abbildung 13

b) n.d., nicht durchgeführt

c) () Klammern zeigen methodische Probleme bei der Messung einzelner Proben an.

5.3.6 Bestätigung der mittels 2-DE identifizierten regulierten Proteine durch die Verwendung spezifischer Antiseren

Für die Überprüfung der Expression im Western Blot mit spezifischen Antiseren (bereitgestellt von M. Pizza, Novartis Vaccines, Italien) wurde Gesamtzellprotein eingesetzt (Abbildung 9, B). Planktonische Zellen wurden mit 48 h Biofilmen verglichen (je zwei unabhängige Proteinproben).

Das konservierte hypothetische Protein NMB1475 wurde in der 2D-Gelelektrophorese als hochreguliert identifiziert. Die Western Blot Analyse bestätigte die erhöhte Expression des Proteins im 48 h Biofilm. Für SdhA, ein Enzym des Citratzyklus war ebenfalls spezifisches Antiserum vorhanden. Im Western Blot zeigte sich, dass SdhA, die Flavoprotein-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase (NMB0950), im 48 h Biofilm herunterreguliert war. Die aus vier Untereinheiten bestehende Succinat-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat und die Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol. In der 2D-Gelelektrophorese wurde SdhA nicht als reguliert identifiziert. Diese Beobachtung ist interessant, da in der 2D-Gelelektrophorese SucD, die Alpha-Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase (NMB0960), ebenfalls ein Enzym des Citratzyklus, als herunterreguliert identifiziert wurde. Für SucD war jedoch kein Antiserum zur Bestätigung im Western Blot erhältlich. Durch die verminderte Expression von zwei Enzymen des Citratzyklus, SdhA und SucD, kann man darauf schließen, dass es zu einer reduzierten Aktivität des Citratzyklus im Biofilm kommt.

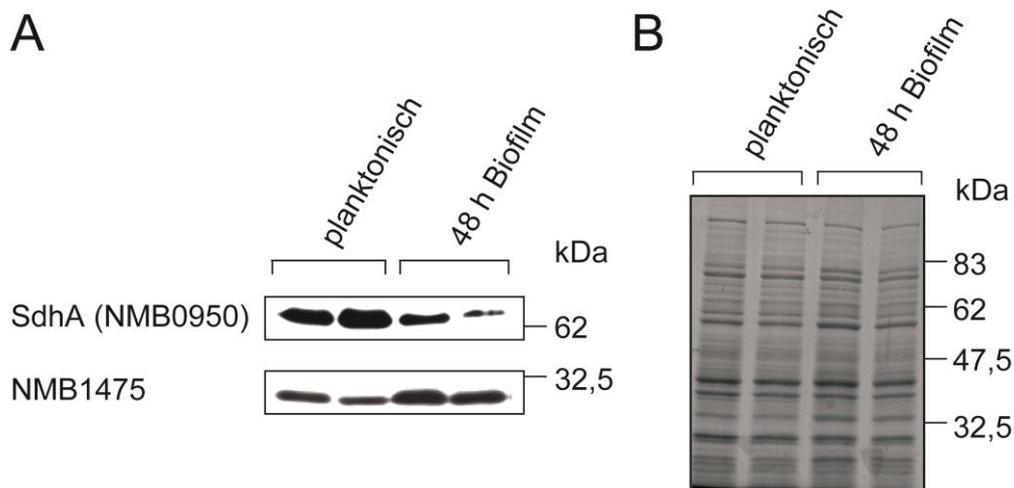


Abbildung 14. Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen NMB1475 und SdhA. (A) Das Gesamtzellprotein von planktonischen Zellen wurde mit dem von 48 h Biofilmen verglichen. (B) Coomassiegefärbtes Normalisierungsgel.

5.4 Untersuchungen zu MntC (NMB0586)

5.4.1 Sequenzanalyse von MntC

Das periplasmatische substratbindende Protein MntC (NMB0586) des Mn/Zn Transporters MntABC war in der 2D-Gelelektrophorese im 48 h Biofilm 3,2-fach hochreguliert. Zunächst wurde der *mntC*-Genbereich des Stammes WUE3671 sequenziert. Geeignete Primer wurden anhand publizierter Neisserien-Genomsequenzen ausgewählt. Die WUE3671 *mntC*-Sequenz wurde in der EMBL Nukleotidsequenz-Datenbank deponiert (FN806852).

Der Vergleich der MntC DNA- und Proteinsequenzen von WUE3671 mit GenBank Datenbankeinträgen zeigte eine 100 % Übereinstimmung mit der DNA-Sequenz des *N. meningitidis* cnl Stammes α 14 (Tabelle 14), während die Übereinstimmungen mit anderen Neisseria Stämmen bei 94-99 % lag.

In der Proteinsequenz von MntC zeigte sich das histidinreiche Metallbindungsmotiv (repetitive HDH Sequenzen), durch das sich einige Proteine der Superfamilie der periplasmatischen metallbindenden Proteine auszeichnen (Abbildung 15). Dieser Sequenzbereich wies in den Neisserien Stämmen leichte Polymorphismen auf.

Tabelle 14. Sequenzhomologien von *mntC*/MntC aus *N. meningitidis* WUE3671 mit anderen Neisserien

Gen	Stamm	Serogruppe	Sequenztyp	Identität (bp)	Identität (AS)
NMO_0471	<i>N.m.</i> α 14	cnl	53	915/915 (100 %)	304/304 (100 %)
NMW_0142	<i>N.m.</i> α 275	W-135	22	913/915 (99 %)	303/304 (99 %)
NME_0078	<i>N.m.</i> α 153	29E	60	892/915 (97 %)	300/304 (98 %)
NMCC_0532	<i>N.m.</i> 053442	C	4821	884/915 (96 %)	300/304 (98 %)
NMC_0528	<i>N.m.</i> FAM18	C	11	892/915 (97 %)	300/304 (98 %)
NMB_0586	<i>N.m.</i> MC58	B	74	885/915 (96 %)	297/304 (97 %)
NMA_0789	<i>N.m.</i> Z2491	A	4	880/927 (94 %)	292/308 (94 %)
NGO_0168	<i>N.g.</i> FA1090			860/916 (93 %)	285/308 (92 %)
NGK_0220	<i>N.g.</i> NCCP11945			859/928 (92 %)	291/304 (95 %)

<i>mntC</i>	(WUE3671)	MKHLKLTLIAALLTTAATAAPLPVVTFSFILGDVAKQIGGERVSIQSLVGANQDTHAYHMTSSDIKKIRSAKLVLLNGLG
NMO_0471	(α14)	MKHLKLTLIAALLTTAATAAPLPVVTFSFILGDVAKQIGGERVSIQSLVGANQDTHAYHMTSSDIKKIRSAKLVLLNGLG
NMW_0142	(α275)	MKHLKLTLIAALLTTAATAAPLPVVTFSFILGDVAKQIGGERVSIQSLVGANQDTHAYHMTSSDIKKIRSAKLVLLNGLG
NME_0078	(α153)	MKHLKLTLIAALLTTAATAAPLPVVTFSFILGDVAKQIGGERVSIQSLVGANQDTHAYHMTSGDIKKIRSAKLVLLNGLG
NMCC_0532	(053442)	MKHLKLTLIAALLTTAATAAPLPVVTFSFILGDVAKQIGGERVSIQSLVGANQDTHAYHMTSGDIKKIRSAKLVLLNGLG
NMC_0528	(FAM18)	MKHLKLTLIAALLTTAATAAPLPVVTFSFILGDVAKQIGGERVSIQSLVGANQDTHAYHMTSGDIKKIRSAKLVLLNGLG
NMB_0586	(MC58)	MKHLKLTLIAALLTTAATAAPLPVVTFSFILGDVAKQIGGERVSIQSLVGANQDTHAYHMTSGDIKKIRSAKLVLLNGLG
NMA_0789	(Z2491)	MKHLKLTLIAALLTTAATAAPLPVVTFSFILGDVAKQIGGERVSIQSLVGANQDTHAYHMTSGDIKKIRSAKLVLLNGLG
NGO_0168	(FA1090)	MKHLKLTLIAALLTTAATAAPLPVVTFSFILGDVAKQIGGERVAVQSLVGANQDTHAYHMTSGDIKKIRSAKLVLLNGLG
NGK_0220	(NCCP11945)	MKHLKLTLIAALLTTAATAAPLPVVTFSFILGDVAKQIGGERVAVQSLVGANQDTHAYHMTSGDIKKIRSAKLVLLNGLG
<i>mntC</i>	(WUE3671)	LEADVQRAVKQSKVSYAEATKGIQPLKAEEEGGHHHDHDDHDEGHHHDHGEFDPHVWNDPVLMSAYAQNVAEALI
NMO_0471	(α14)	LEADVQRAVKQSKVSYAEATKGIQPLKAEEEGGHHHDHDDHDEGHHHDHGEFDPHVWNDPVLMSAYAQNVAEALI
NMW_0142	(α275)	LEADVQRAVKQSKVSYAEATKGIQPLKAEEEGGHHHDHDDHDEGHHHDHGEFDPHVWNDPVLMSAYAQNVAEALI
NME_0078	(α153)	LEADIQRAVKQSKVSYAEATKGIQPLKAEEEGGHHHDHDDHDEGHHHDHGEFDPHVWNDPVLMSAYAQNVAEALI
NMCC_0532	(053442)	LEADVQRAVKQSKVSYAEATKGIQPLKAEEEGGHHHDHDDHDEGHHHDHGEFDPHVWNDPVLMSAYAQNVAEALI
NMC_0528	(FAM18)	LEADIQRAVKQSKVSYAEATKGIQPLKAEEEGGHHHDHDDHDEGHHHDHGEFDPHVWNDPVLMSAYAQNVAEALI
NMB_0586	(MC58)	LEADVQRAVKQSKVSYAEATKGIQPLKAEEEGGHHHDHDDHDEGHHHDHGEFDPHVWNDPVLMSAYAQNVAEALI
NMA_0789	(Z2491)	LEADIQRAVKQSKVSYAEATKGIQPLKAEEEGGHHHDHDDHDEGHHHDHGEFDPHVWNDPVLMSAYAQNVAEALI
NGO_0168	(FA1090)	LEADIQRAVKQSKVSYAEATKGIQPLKAEEEGGHHHDHDDHDEGHHHDHGEFDPHVWNDPVLMSAYAQNVAEALI
NGK_0220	(NCCP11945)	LEADIQRAVKQSKVSYAEATKGIQPLKAEEEGGHHHDHDDHDEGHHHDHGEFDPHVWNDPVLMSAYAQNVAEALI
<i>mntC</i>	(WUE3671)	KADPEGVVYQORLGNQYQMLKKLHSDAQAAFNAVPAAKRKVLTGHDAFSYMGKRYHIEFTIAPQVSSAEPSAKQVAAI
NMO_0471	(α14)	KADPEGVVYQORLGNQYQMLKKLHSDAQAAFNAVPAAKRKVLTGHDAFSYMGKRYHIEFTIAPQVSSAEPSAKQVAAI
NMW_0142	(α275)	KADPEGVVYQORLGNQYQMLKKLHSDAQAAFNAVPAAKRKVLTGHDAFSYMGKRYHIEFTIAPQVSSAEPSAKQVAAI
NME_0078	(α153)	KADPEGVVYQORLGNQYQMLKKLHSDAQAAFNAVPAAKRKVLTGHDAFSYMGKRYHIEFTIAPQVSSAEPSAKQVAAI
NMCC_0532	(053442)	KADPEGVVYQORLGNQYQMLKKLHSDAQAAFNAVPAAKRKVLTGHDAFSYMGKRYHIEFTIAPQVSSAEPSAKQVAAI
NMC_0528	(FAM18)	KADPEGVVYQORLGNQYQMLKKLHSDAQAAFNAVPAAKRKVLTGHDAFSYMGKRYHIEFTIAPQVSSAEPSAKQVAAI
NMB_0586	(MC58)	KADPEGVVYQORLGNQYQMLKKLHSDAQAAFNAVPAAKRKVLTGHDAFSYMGKRYHIEFTIAPQVSSAEPSAKQVAAI
NMA_0789	(Z2491)	KADPEGVVYQORLGNQYQMLKKLHSDAQAAFNAVPAAKRKVLTGHDAFSYMGKRYHIEFTIAPQVSSAEPSAKQVAAI
NGO_0168	(FA1090)	KADPEGVVYQORLGNQYQMLKKLHSDAQAAFNAVPAAKRKVLTGHDAFSYMGKRYHIEFTIAPQVSSAEPSAKQVAAI
NGK_0220	(NCCP11945)	KADPEGVVYQORLGNQYQMLKKLHSDAQAAFNAVPAAKRKVLTGHDAFSYMGKRYHIEFTIAPQVSSAEPSAKQVAAI
<i>mntC</i>	(WUE3671)	IRQIKREGIKAVFTENIKDTRMVDRIAKETGVNVSGKLYSDALGNAPADTYIGMYRHNIKALTNAMKQ
NMO_0471	(α14)	IRQIKREGIKAVFTENIKDTRMVDRIAKETGVNVSGKLYSDALGNAPADTYIGMYRHNIKALTNAMKQ
NMW_0142	(α275)	IRQIKREGIKAVFTENIKDTRMVDRIAKETGVNVSGKLYSDALGNAPADTYIGMYRHNIKALTNAMKQ
NME_0078	(α153)	IRQIKREGIKAVFTENIKDTRMVDRIAKETGVNVSGKLYSDALGNAPADTYIGMYRHNIKALTNAMKQ
NMCC_0532	(053442)	IRQIKREGIKAVFTENIKDTRMVDRIAKETGVNVSGKLYSDALGNAPADTYIGMYRHNIKALTNAMKQ
NMC_0528	(FAM18)	IRQIKREGIKAVFTENIKDTRMVDRIAKETGVNVSGKLYSDALGNAPADTYIGMYRHNIKALTNAMKQ
NMB_0586	(MC58)	IRQIKREGIKAVFTENIKDTRMVDRIAKETGVNVSGKLYSDALGNAPADTYIGMYRHNIKALTNAMKQ
NMA_0789	(Z2491)	IRQIKREGIKAVFTENIKDTRMVDRIAKETGVNVSGKLYSDALGNAPADTYIGMYRHNIKALTNAMKQ
NGO_0168	(FA1090)	IRQIKREGIKAVFTENIKDTRMVDRIAKETGVNVSGKLYSDALGNAPADTYIGMYRHNIKALTNAMKQ
NGK_0220	(NCCP11945)	IRQIKREGIKAVFTENIKDTRMVDRIAKETGVNVSGKLYSDALGNAPADTYIGMYRHNIKALTNAMKQ

Abbildung 15. Vergleich der *mntC* Proteinsequenz in Stämmen von *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae*. Grau hinterlegt ist das histidinreiche Metallbindungsmotiv (repetitive HDH Sequenzen).

5.4.2 Herstellung von *mntC* Knock-out Mutanten

Um die Bedeutung von *MntC* in der Biofilmbildung genauer zu untersuchen, wurden Knock-out Mutanten in *N. meningitidis* WUE3671 und MC58*siaD*- generiert. Aus unbekanntem Gründen war eine Komplementierung des *mntC* Knock-outs in WUE3671, im Gegensatz zum Stamm MC58*siaD*-, nicht möglich. Die entstandenen Mutanten wurden mittels PCR, Sequenzierung und Southern Blot überprüft. Zusätzlich wurde die Empfindlichkeit der Mutanten gegenüber Paraquat untersucht. Es ist beschrieben, dass *mntC*-Mutanten anfälliger gegen Paraquat sind (Tseng *et al.*, 2001), das bei Zellkontakt einen Redoxzyklus durchläuft und infolgedessen zur Produktion von Superoxid, einem der bedeutendsten reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), führt.

Dies konnte sowohl für die *mntC*-Mutante von WUE3671 (Abbildung 16, A) als auch für MC58*siaD*- bestätigt werden (Abbildung 16, B). Im Stamm WUE3671 war der Effekt der *mntC*-Mutation jedoch weniger stark ausgeprägt als in MC58*siaD*-. Die Inhibitionszone des Paraquats nahm in der Mutante von WUE3671 um nur 4 mm zu, in MC58*siaD*- hingegen um 13 mm. Um zu überprüfen, ob dies auf den Stammhintergrund (*cnl*, ST-845) von WUE3671 zurückzuführen ist, wurden von den *N. meningitidis* *cnl* Stämmen α 30, α 62 und α 458 (alle ST-845) ebenfalls *mntC*-Mutanten erstellt. Es zeigte sich, dass der Sequenztyp keinen Einfluss auf die Sensibilität gegen Paraquat hatte (Abbildung 16, C-E). Die *mntC*-Komplementation war in MC58*siaD*-/*mntC*- möglich und funktionell erfolgreich.

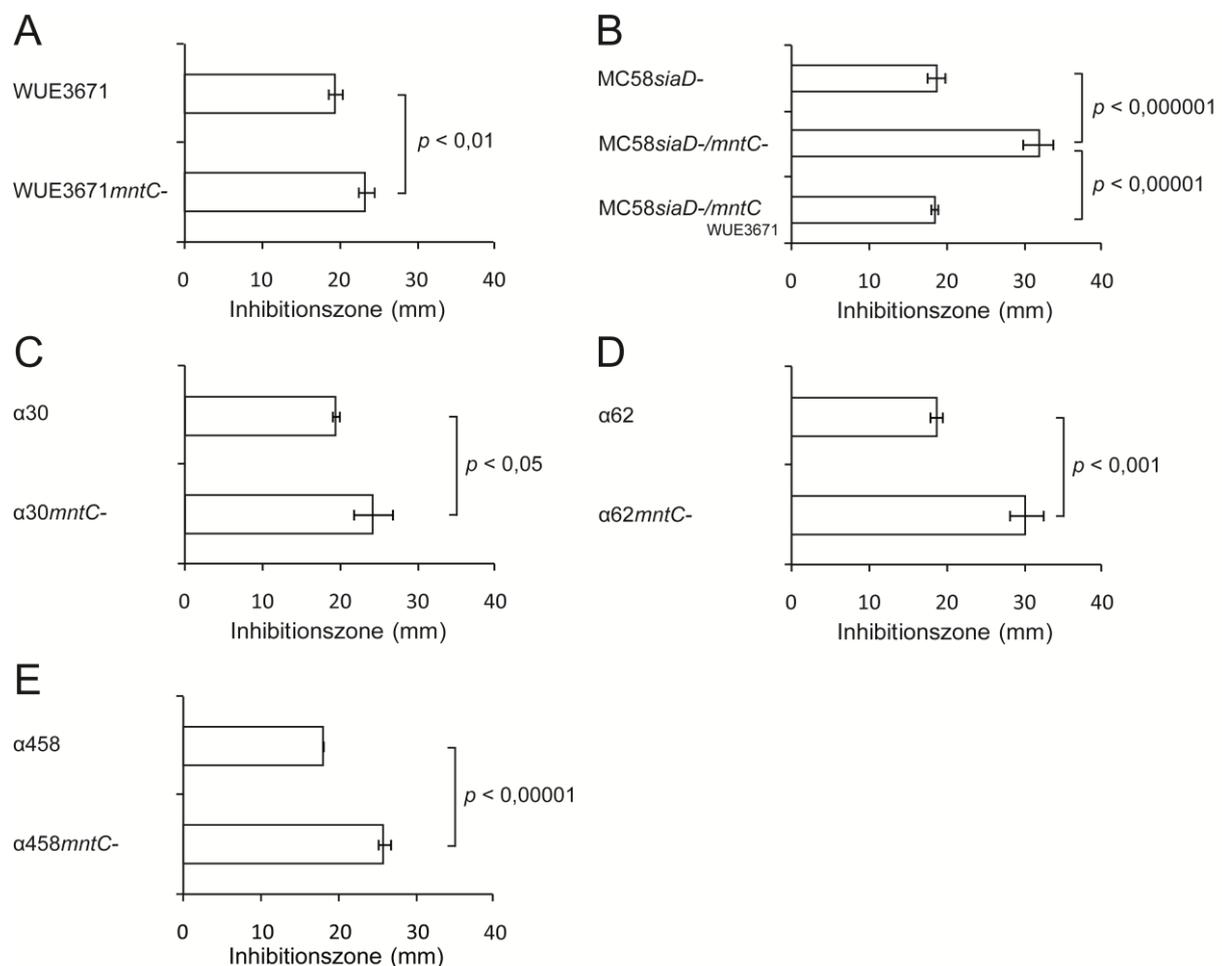


Abbildung 16. Paraquat-Assay. Es wurden parentale Bakterien mit den *mntC*-Mutanten und in MC58*siaD*- mit den Komplementanten verglichen. (A) WUE3671, (B) MC58*siaD*-, (C) α 30, (D) α 62 und (E) α 458. Die Grafiken zeigen die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichungen. Die statistische Analyse erfolgte über den Student's t-Test.

5.4.3 Wachstumsverhalten der *mntC*-Mutanten

Die Proteomanalyse von Meningokokken-Biofilmen zeigte, dass MntC in Biofilmen verstärkt exprimiert wurde. Um zu überprüfen, ob eine *mntC*-Mutation funktionelle Auswirkungen auf die Biofilmbildung hat, wurde das Wachstumsverhalten von *mntC*-Mutanten im Biofilm und in der planktonischen Kultur untersucht. Es zeigte sich für planktonische Kulturen, dass die *mntC*-Mutanten von WUE3671 und MC58*siaD*- hinsichtlich ihrer Verdopplungszeit leicht beeinträchtigt waren. Die Beeinträchtigung war bei WUE3671*mntC*- stärker als bei MC58*siaD*-/*mntC*-, jedoch wurde auch hier nach 12 h eine OD₆₀₀ von über 1,5 erreicht. Die *mntC*-Komplementation in MC58*siaD*-/*mntC*- konnte das leichte Wachstumsdefizit kompensieren (Abbildung 17).

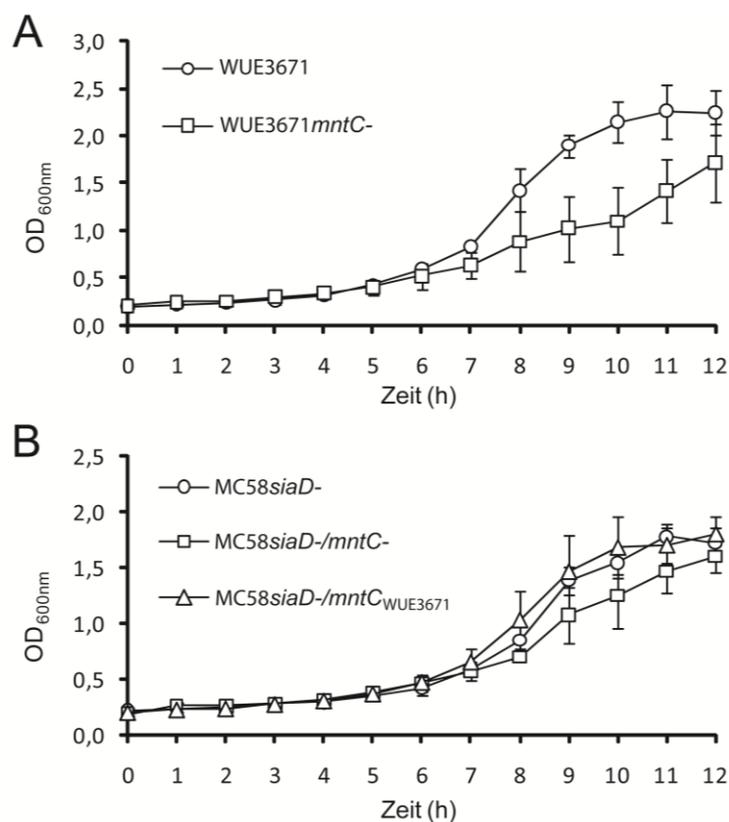


Abbildung 17. Wachstumskurven der *mntC*-Mutanten in den Stämmen WUE3671 (A) und MC58*siaD*- (B). Die Grafiken zeigen die Mittelwerte von sieben unabhängigen Experimenten in WUE3671 und drei unabhängigen Experimenten in MC58*siaD*-. Die Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

Die Biofilmbildung der *mntC*-Mutanten von WUE3671 und MC58*siaD*- wurde im Biofilm-Flusssystem nach 24 h untersucht. Sowohl die visuelle Beobachtung des Flusssystem als auch die Bestimmung der Biomasse zeigte, dass die Biofilmbildung der Mutanten in beiden Stämmen fast komplett aufgehoben war (Abbildung 18, A und B). Die *mntC*-Komplementation *in trans* im MC58*siaD*-/*mntC*- stellte den parental Zustand wieder her. Auch die CFU-Bestimmung zeigte eine deutliche Reduktion in der Lebendzellzahl der *mntC*-Mutanten (Abbildung 18, C und D).

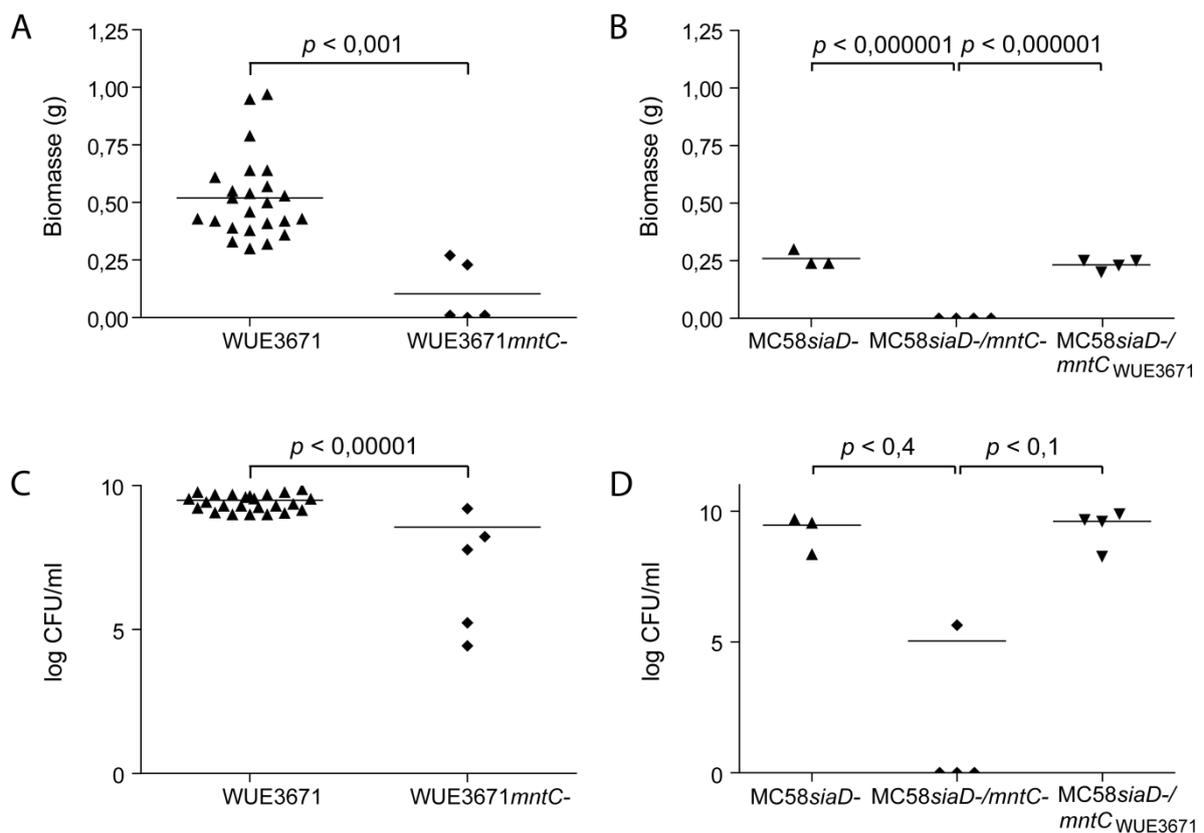


Abbildung 18. Biofilmbildung der *mntC*-Mutanten im Vergleich zum parental Stamm nach 24 h Wachstum im Flusssystem. (A+B) Biomasse in g, (C+D) CFU-Bestimmung. Die Grafiken von WUE3671 (A+C) zeigen die Einzel- und Mittelwerte von 24 bzw. 5 unabhängigen Experimenten und die Grafiken von MC58*siaD*- (B+D) von 3 bzw. 4 unabhängigen Experimenten. Die Daten der Biomassebestimmung von WUE3671 und MC58*siaD*- wurden schon zur Erstellung von Abbildung 4 und die Daten von WUE3671 (Biomasse, CFU) in Abbildung 6 verwendet. Die statistische Analyse erfolgte über den Student's t-Test.

5.4.4 MntC und OMPLA-vermittelte Autolyse

In *mntC*-Mutanten von *N. meningitidis* ist die Biofilmbildung stark reduziert. Jedoch ist nicht klar, ob MntC in der initialen Biofilmbildung benötigt wird oder erst in einer späteren Phase dieses Prozesses. In der späten stationären Phase ist das durch *pldA* kodierte Autoysin OMPLA (*outer membrane phospholipase A*, NMB0464) funktionell (Bos *et al.*, 2005). Eventuell werden durch die Autolyse der Bakterien endogen produzierte ROS vermehrt in die Umgebung freigesetzt, die den Biofilm schädigen können. Daher könnte die Bedeutung von MntC in der Biofilmbildung in der Inaktivierung der durch die OMPLA-vermittelte Autolyse freigesetzten ROS zu suchen sein. Auf der anderen Seite könnten die ROS auch die Autolyse der Bakterien vermehrt anregen. MntC könnte diesen Prozess, durch das Abfangen der ROS, reduzieren. Um dies zu untersuchen sollten Autolyse-Assays mit den *mntC*-Mutanten und den parental Stämmen durchgeführt werden. Zur Validierung des Autolyse-Assays wurden *pldA* (OMPLA) - Mutanten verwendet.

5.4.4.1 Herstellung von *pldA*-Mutanten

Es wurden *pldA*-Mutanten von den *N. meningitidis* Stämmen WUE3671 und MC58*siaD*- hergestellt. Der *N. meningitidis* Stamm 2120*siaD*- exprimiert selbst kein funktionelles OMPLA aufgrund einer Punktmutation im *pldA* und ist daher nicht autolytisch. In den Stämmen MC58*siaD*- und 2120*siaD*- war eine Komplementierung der *pldA*-Inaktivierung mit *pldA* aus MC58*siaD*- erfolgreich. Dies war, wie bei der *mntC*-Komplementation (siehe 5.4.2), aus unbekanntem Gründen im Stamm WUE3671 nicht möglich. Die entstandenen Mutanten und Komplementanten wurden mittels PCR, Sequenzierung und Southern Blot überprüft. Zusätzlich wurde die *pldA*-Inaktivierung phänotypisch durch einen Autolyse-Assay kontrolliert.

In den Meningokokkenstämmen WUE3671 und MC58*siaD*- ist eine Autolyse der Bakterien durch die Abnahme der OD₆₀₀ nach 24 bzw. 48 h eindeutig zu erkennen (Abbildung 19, A und B). Dabei zeigte MC58*siaD*- eine deutlich stärkere Lyse der Zellen. Die *pldA*-Mutation führte in beiden Stämmen dazu, dass keine Zellyse zu beobachten war. Der Ursprungszustand wurde durch die *pldA*-Komplementation in MC58*siaD*-/*pldA*- wiederhergestellt. Der Genotyp des nicht autolytischen *N. meningitidis* Stammes 2120*siaD*- bestätigte sich im Autolyse-Assay (Abbildung 19, C). Durch das Einbringen von *pldA* aus MC58*siaD*- in den Stamm 2120*siaD*-

konnte ein konstitutiv OMPLA-exprimierender Stamm hergestellt werden. Dieser Stamm zeigte eine deutliche OMPLA-vermittelte Zellyse.

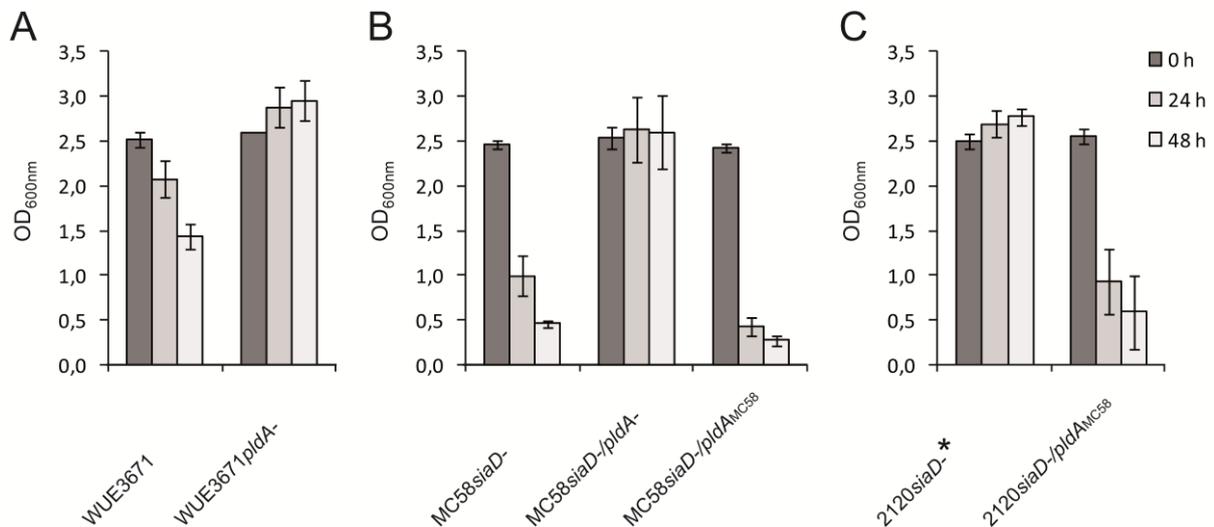


Abbildung 19. Autolyse-Assay zur phänotypischen Überprüfung der *pldA*-Mutanten. Es wurden parentale Bakterien mit den *pldA*-Mutanten und bei MC58*siaD*- und 2120*siaD*- mit den Komplementanten verglichen. (A) WUE3671, (B) MC58*siaD*-, (C) 2120*siaD*-. Die Grafiken zeigt die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichungen. * Der Stamm 2120*siaD*- weist kein funktionelles OMPLA auf.

5.4.4.2 OMPLA-vermittelte Autolyse und oxidativer Stress

Die folgenden Experimente sollten klären, ob es durch die *mntC*-Mutation und die damit verbundene reduzierte Fähigkeit der Meningokokken mit oxidativem Stress durch ROS umzugehen zu einer erhöhten OMPLA-vermittelten Autolyse kommt. Um dies zu ermitteln, wurden die *mntC*-Mutanten von WUE3671 und MC58*siaD*- im Autolyse-Assay getestet. Hier wurden zusätzlich zu den 0 h, 24 h und 48 h Werten auch 6 h und 12 h Werte entnommen. Es zeigte sich, dass in WUE3671*mntC*- eine signifikant verstärkte Autolyse im Vergleich zum WT auftrat (Abbildung 20, A). Dies konnte im MC58*siaD*- jedoch nicht beobachtet werden, die Autolyse war sowohl im parentalen Stamm, der *mntC*-Mutante und der Komplementante identisch (Abbildung 20, B). Durch die CFU-Bestimmung von MC58*siaD*- und der *mntC*-Mutante nach 24 h im Autolyse-Assay zeigte sich allerdings sehr deutlich, dass in der *mntC*-Mutante die Vitalität reduziert war (Abbildung 20, C). Die Bakterienzahlen fielen von durchschnittlich 4,5 auf 2,3. Nach 48 h konnten durch die CFU-Bestimmung keine lebenden Meningokokken mehr nachgewiesen werden.

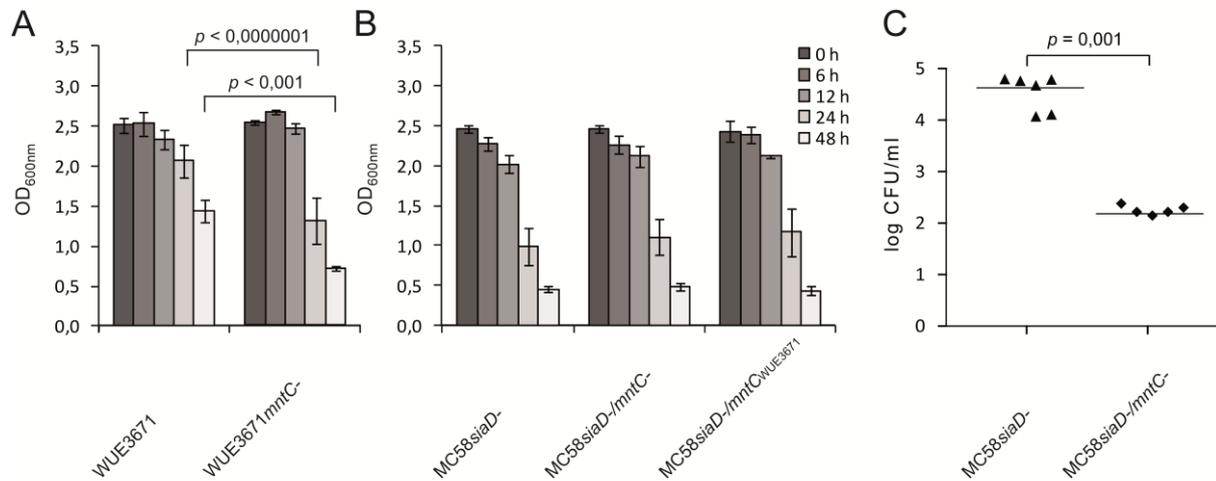


Abbildung 20. Autolyse-Assay und CFU-Bestimmung der *mntC*-Mutanten. Es wurden WT Bakterien mit den *mntC*-Mutanten und Komplementanten hinsichtlich der Autolysefähigkeit nach 0, 6, 12, 24 und 48 h verglichen, (A) WUE3671, (B) MC58*siaD*⁻. Die Grafiken zeigen die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichungen. Die statistische Analyse erfolgte über den Student's t-Test. (C) Im Stamm MC58*siaD*⁻ wurde zusätzlich eine CFU-Bestimmung der Bakterien (nach 24 h) des Autolyse-Assays durchgeführt. Die Grafiken zeigen die Einzel- und Mittelwerte von sechs unabhängigen Experimenten als log₁₀ der CFU/ml.

6 Diskussion

6.1 Biofilmbildung von *N. meningitidis* WUE3671 im Flusssystem

In dieser Arbeit wurde das Proteomprofil von *N. meningitidis* Biofilmen untersucht. In Standard-Biofilmassays sind unbekapselte Meningokokken in der Lage, Biofilme zu bilden, bekapselte Bakterien waren dazu nicht fähig (Yi *et al.*, 2004, Lappann *et al.*, 2006). Zudem sind Gene, die an der Kapselsynthese beteiligt sind, in einer Transkriptomstudie mit Meningokokken-Biofilmen (48 h) herunterreguliert (O'Dwyer *et al.*, 2009). Durch die Verwendung eines Biofilmmodells mit SV-40 transformierten humanen bronchialen Epithelzellen konnte die Biofilmbildung auch für bekapselte Meningokokken beschrieben werden (Neil *et al.*, 2009, Neil & Apicella, 2009). Diese Beobachtung scheint jedoch spezifisch für das verwendete System zu sein. Des Weiteren sind zellkulturbasierte Systeme für eine Proteomanalyse nicht praktikabel, da bakterielle Biomasse in ausreichend reiner Form nur schwer zu generieren ist. Aus diesen Gründen wurde für die vergleichende Proteomanalyse ein konstitutiv unbekapselter *capsule null locus* (*cnl*) *N. meningitidis* Trägerstamm verwendet. Diese Variante ist charakteristisch für eine beträchtliche Anzahl von Trägerisolaten. In einer Studie des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg zeichneten sich mehr als 16 % ($n = 136$) aller Trägerisolate ($n = 830$) durch einen *capsule null locus* aus (Claus *et al.*, 2002). Des Weiteren waren 166 (31 %) aller 538 Stämme, die Kapselsynthesegene der Serogruppen B, C, W-135 und Y trugen, aufgrund von Phasenvariation, Deletion und Insertion unbekapselt (Weber *et al.*, 2006). Der *cnl* Trägerstamm WUE3671 wurde ausgewählt, da es sich um einen sehr guten Biofilmbildner handelte. WUE3671 bildete fast doppelt so viel Biomasse im Biofilm-Flusssystem wie der routinemäßig verwendete Stamm MC58*siaD*-. WUE3671 wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal für Biofilmexperimente verwendet. Es ergaben sich im Verlauf der Experimente nicht vorhersehbare Probleme mit diesem Stamm, der aus unbekanntem Gründen nicht *in trans* mit Hilfe des Plasmids pAP2-1 komplementierbar war.

Proteomanalysen von Biofilmen wurden mit verschiedenen Biofilmmodellen durchgeführt (siehe Tabelle 1). Bei Flusssystemen mit Silikonschläuchen handelt es sich um ein gut etabliertes System bei verschiedenen Mikroorganismen (Sauer & Camper, 2001, Sauer *et al.*, 2002, De Vriendt *et al.*, 2005, Southey-Pillig *et al.*, 2005, Patrauchan *et al.*, 2007, Mikkelsen

et al., 2007). Dieses System kann einen kontinuierlichen Nährstofffluss über einen längeren Zeitraum gewährleisten. Zudem ist es möglich, große Mengen an bakterieller Biomasse in reiner Form zu gewinnen. Daher wurde für die Proteomanalyse von Meningokokken-Biofilmen ein solches Flusssystem entwickelt, mit dem die Biofilmbildung über einen Zeitraum von bis zu 48 h untersucht werden konnte. Dabei zeigte sich, dass die Biomasse im Zeitraum von 24 h bis 48 h deutlich zunahm, wohingegen die Lebendzellzahl (CFU/ml) nach 24 h stagnierte. Im 48 h Biofilm fand sich ein großer Anteil an toten Bakterien. Interessanterweise waren im 48 h Biofilm mikroskopisch deutlich zwei Schichten zu erkennen, eine apikale Region mit überwiegend vitalen Bakterien und eine basale Region mit überwiegend tot erscheinenden Meningokokken. Diese Strukturierung war nicht überraschend. Durch die Stoffwechselaktivität der Bakterien im Biofilm, zusammen mit Diffusionsprozessen, kommt es zu einem Gradienten u.a. von Sauerstoff, Nährstoffen und bakteriellen Stoffwechselprodukten (Ramsing *et al.*, 1993, Xu *et al.*, 1998, Werner *et al.*, 2004, Borriello *et al.*, 2004, Rani *et al.*, 2007). Die Bakterien reagieren auf diese Gradienten und es kommt zu einer deutlichen strukturellen, chemischen und biologischen Heterogenität [Übersicht in (Stewart & Franklin, 2008)]. Mit zunehmender Biofilmtiefe nimmt z.B. die Konzentration an Sauerstoff und Nährstoffen ab, Stoffwechselprodukte der Bakterien nehmen zu. Daher ist die steigende Anzahl avitaler Meningokokken in der unteren Schicht des Biofilms nicht überraschend. Der mikroskopisch dokumentierte Befund der Strukturierung des Biofilms führt sogleich zu einer wesentlichen Limitation aller Proteom- und Transkriptomanalysen. Aufwändige Verfahren sind notwendig, um die Lokalisation der Beobachtungen im Nachgang aufzuklären. Die genauere Betrachtung der WUE3671 Biofilme in der Elektronenmikroskopie zeigte zudem die Bildung von Vesikeln der äußeren Membran, den sogenannten „Blebs“. Diese Blebs werden von der äußeren Membran vieler, sich im Wachstum befindender, Gram-negativer Bakterien freigesetzt (Devoe & Gilchrist, 1973, Hoekstra *et al.*, 1976, Munford *et al.*, 1982, Kadurugamuwa & Beveridge, 1997, Beveridge, 1999). Meningokokkenblebs wurden *in vitro* und *in vivo* bei Patienten mit Meningokokken Sepsis identifiziert (Devoe & Gilchrist, 1973, Namork & Brandtzaeg, 2002). Auch in Biofilmen von *P. aeruginosa* und *Haemophilus influenzae* konnte die Blebbildung beobachtet werden (Beveridge *et al.*, 1997, Moxon *et al.*, 2008). Es handelt sich dabei um kleine Abschnürungen der Gram-negativen Zellmembran, die neben äußeren Membranproteinen (*outer membrane proteins*, OMP), Lipopolysacchariden (LPS) und Phospholipiden auch Bestandteile des

Periplasmas enthalten. Die Freisetzung von Blebs legt die Hypothese nahe, dass Blebs an der Ausbildung der extrazellulären Matrix von Meningokokken beteiligt sind.

6.2 Proteomanalyse von Meningokokken-Biofilmen

Die Auswahl einer geeigneten Proteinpräparation für den *N. meningitidis* Stamm WUE3671 war die Voraussetzung für eine erfolgreiche Proteomanalyse. Zu diesem Zweck wurden drei Protokolle hinsichtlich ihrer Proteinauftrennung, der Anzahl der Proteinspots und der Streifenbildung in der 2D-Gelelektrophorese untersucht. Der ProteoExtract® Complete Bacterial Proteome Extraction Kit war nicht geeignet, da alle drei Kriterien nur mangelhaft erfüllt wurden. Die Präparation des Gesamtzellproteins durch die beiden anderen Protokolle variierte in der unterschiedlichen Methodik des Zellaufschlusses und in der Zusammensetzung des Solubilisierungspuffers. Das beste Resultat lieferte die Präparation des Gesamtzellproteins nach Bernardini (Bernardini *et al.*, 2004). Hier enthielt der Solubilisierungspuffer (Reswelling-Puffer) neben dem am häufigsten zur Zerstörung von Wasserstoffbrückenbindungen verwendeten Chaotrop Harnstoff auch Thioharnstoff, das bei der Solubilisierung von ansonsten unlöslichen Proteinen hilft. Zur Zerlegung von Disulfidbrücken wurde zusätzlich zum Dithiothreitol das effizientere Tributylphosphan verwendet, zudem diente das Detergent ASB-14 der besseren Solubilisierung von Membranproteinen (Herbert *et al.*, 1998, Chevallet *et al.*, 1998). Neben der Etablierung der Proteinpräparation war auch die Optimierung der 2D-Gelelektrophorese hinsichtlich der Wahl des pH-Bereichs, der IPG (*immobilized pH gradient*)-Streifen, der Rehydratisierungsmethode und der Fokussierungsbedingungen notwendig. Da die isoelektrische Fokussierung von der zu untersuchenden Probe und dem verwendeten Puffer abhängig war, wurden sechs verschiedene Protokolle ausgetestet, um ein bestmögliches Ergebnis zu erreichen. Zudem wurde die Einquell-Methode für die Rehydratisierung verwendet und IPG-Streifen mit einem breiten pH-Bereich (pH 3-10) gewählt, da diese die Darstellung der Mehrheit aller Proteine in einem Gel ermöglichten. Zwar hätte durch die Wahl schmalere pH-Bereiche möglicherweise eine bessere Auflösung erreicht werden können, ein Protein wie MntC (pI 9,6) wäre bei einem pH-Gradienten von 4-7 allerdings nicht detektiert worden.

Nach den erfolgreichen Etablierungsprozessen wurde das Gesamtzellproteom von 24 h und 48 h Biofilmen mit dem einer planktonischen Kultur in der frühen exponentiellen Phase

verglichen. Mit ca. 700 vom Computerprogramm PDQuest™ Advanced detektierten Proteinspots konnte dabei eine große Anzahl an Proteinen durch die 2D-Gelelektrophorese sichtbar gemacht und untersucht werden. Dies ist ein guter Wert für die Proteomanalyse eines Bakteriums mit nur 2 Mb Genomgröße. In anderen Studien mit bakteriellen Biofilmen wurden durchschnittlich zwischen 500 und 1200 Spots nachgewiesen (Steyn *et al.*, 2001, Tremoulet *et al.*, 2002, Vilain *et al.*, 2004, Luppens & ten Cate, 2005, Vilain & Brozel, 2006, Benard *et al.*, 2009, Nigaud *et al.*, 2010). Es zeigte sich in den Meningokokken-Biofilmen eine mindestens 2-fach unterschiedliche Expression in 2,4 % aller dargestellten Spots im Vergleich zur planktonischen Kultur. In der Literatur sind sehr unterschiedliche Angaben zum Prozentsatz der Proteomalteration während des Biofilmwachstums verschiedener Bakterien zu finden (Collet *et al.*, 2008). Die Werte variieren zwischen 2,2 % in *E. coli* und 39 % in *Pseudomonas putida* (Tremoulet *et al.*, 2002, Sauer *et al.*, 2002). Diese deutlich unterschiedlichen Werte könnten dadurch zustande kommen, dass in den Studien Biofilme und planktonische Zellen unter nicht vergleichbaren Bedingungen kultiviert wurden.

Von den 17 im Biofilm regulierten Proteinen wurden aus methodischen Gründen nur 12 mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert. Hiervon waren 8 Proteine im Biofilm hochreguliert und 4 Proteine herunterreguliert. Die Ergebnisse der Massenspektrometrie wurden für 9 Spots durch eine zweite unabhängige Methode, dem Spectral Counting, überprüft. Die Analyse der Proteinspots ergab eine Bestätigung der Hauptkomponente des Spots und in sieben Fällen auch eine Bestätigung der Regulation. Für NMB1475 erfolgte eine weitere Bestätigung durch die Verwendung von spezifischem Antiserum im Western Blot. Zudem wurde durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern und Antiseren gegen wesentliche Oberflächenstrukturen der äußeren Bakterienmembran wie FetA, Opa, Opc, PorB, LPS und gegen SdhA, ein Enzym des Citratzyklus, die Expression im Biofilm untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst. In dieser Tabelle sind auch Ergebnisse einer Transkriptomstudie einer NMB0573 Knock-out Mutante von *N. meningitidis* MC58 gezeigt (Ren *et al.*, 2007).

Tabelle 15. Zusammenfassung der Ergebnisse der vergleichenden Proteomanalyse von *N. meningitidis* WUE3671 und der Transkriptomstudie einer NMB0573 Knock-out Mutante (Ren *et al.*, 2007)

Spot Nr. ^{a)}	Protein/Oberflächenstruktur	NMB Nr.	Expression ^{b)}			NMB0573 Knock-out (Ren <i>et al.</i> , 2007)
			2-DE	WB	Spectral Counting	
1	2-Isopropylmalat Synthase (<i>leuA</i>)	1070	↑		n.d.	-
2	Aspartat-Aminotransferase (<i>aspC</i>)	0540	↑		n.d.	-
3	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (<i>gapA-2</i>)	2159	↑		↑ (Regulation bestätigt)	-
4	Alkoholdehydrogenase, Zink-haltig	0604	↑		↑ (Regulation bestätigt)	↓
5	Beta-Phosphoglucomutase (<i>pgmB</i>)	0391	↑		↑ (Regulation bestätigt)	-
6	ABC Transporter, periplasmatisches Substrat-bindendes Protein (<i>mntC</i>)	0586	↑		↑ (Regulation bestätigt)	-
7	Cu-Zn-Superoxiddismutase (<i>sodC</i>)	1398	↑		n.d.	
8	Konserviertes hypothetisches Protein	1475	↑	↑	↑ (Regulation bestätigt)	-
9	Aldehyddehydrogenase A (<i>aldA</i>)	1968	↓		↓ (Regulation bestätigt)	↓
10	Acetatkinase (<i>ackA-2</i>)	1518	↓		↓ (Regulation bestätigt)	-
11	Zellteilungspotein (<i>ftsZ</i>)	0427	↓		↑ (inkonsistent; Hauptkomponente bestätigt)	↓
12	Succinyl-CoA Synthetase, Alpha-Untereinheit (<i>sucD</i>)	0960	↓		↑ (inkonsistent; Hauptkomponente bestätigt)	↓
	• TonB-abhängiger Enterobactin-Rezeptor (<i>fetA</i>)	1988		↓		-
	• Succinat-Dehydrogenase, Flavoprotein-Untereinheit (<i>sdhA</i>)	0950		↓		↓
	• Opa			↓		↓
	• Opc			↓		↓
	• PorB			-		↓
	• Lipopolysaccharid			-		-

a) Zugehörige Spot Nummer in 2D-Gel Abbildung 13

b) WB, Western Blot mit spezifischem Antiserum; n.d., nicht durchgeführt; ↑, Hochregulation im Biofilm; ↓, Herunterregulation im Biofilm; -, nicht reguliert

6.2.1 Veränderung der Proteinexpression aufgrund von nutritiven Anpassungen im Biofilm

Meningokokken im Biofilm müssen sich an die Nährstoffverfügbarkeit anpassen können. In Abhängigkeit vom Vorhandensein von Nährstoffen, besonders Leucin und Methionin, wirkt NMB0573, ein Homolog des *Feast/Famine*-Regulators Lrp, als Transkriptionsaktivator. Lrp (*leucine-responsive regulatory protein*) ist ein globaler Regulator, der in *E. coli* gut beschrieben ist [Übersicht in (Calvo & Matthews, 1994)]. Normalerweise bindet NMB0573 an die DNA in einem Komplex mit den Liganden Leucin oder Methionin. In Abwesenheit der Aminosäuren ist die DNA-Bindung des Aktivators und somit die Transkription vermindert. Daraus ergeben sich hauptsächlich Veränderungen hinsichtlich von Oberflächenproteinen sowie von Komponenten des aeroben Metabolismus bzw. des Citratzyklus (Ren *et al.*, 2007). Interessanterweise wurden in dieser Arbeit Proteine identifiziert, die im Biofilm herunterreguliert waren und deren Gene dem NMB0573-Regulon zugeordnet werden konnten. Diese Gene waren in der Transkriptomanalyse einer NMB0573 Knock-out Mutante

von *N. meningitidis* MC58, die eine Mangelsituation der intrazellulären Aminosäuren Leucin und Methionin nachgeahmt, herunterreguliert (Ren *et al.*, 2007). Im Meningokokken-Biofilm konnte eine Reduktion der Expression der Adhäsine Opa und Opc nachgewiesen werden. Warum das Oberflächenprotein PorB, das auch zum NMB0573-Regulon gehört, im Biofilm nicht herunterreguliert ist, ist unklar. Gegebenenfalls müssen für dieses stark exprimierte Protein sensitivere Assays wie z.B. metabolisches Labeling verwendet werden. Der TonB-abhängige Enterobactin-Rezeptor FetA (NMB1988, früher FrpB) war ebenfalls im Meningokokken-Biofilm herunterreguliert. FetA ist bei ausreichender Eisenversorgung kaum exprimiert. Hierfür wird der negative Regulator Fur (*ferric uptake regulator*) verantwortlich gemacht (Thomas & Sparling, 1996). Andere Gene des großen Fur-Regulons waren jedoch im Biofilm nicht verändert. Es ist attraktiv zu spekulieren, dass FetA als äußeres Membranprotein durch den globalen Regulator NMB0573 reguliert ist, zumal dieser Lrp-ähnliche Regulator offensichtlich an der Regulation einiger in dieser Arbeit gefundener Proteine beteiligt ist. Allerdings wurde keine Zugehörigkeit dieses Proteins zum NMB0573-Regulon identifiziert (Ren *et al.*, 2007). Dahingegen werden durch NMB0573 Enzyme des Citratzyklus reguliert (Ren *et al.*, 2007). Dazu gehören unter anderem auch die im Meningokokken-Biofilm herunterregulierte Flavoprotein-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase SdhA und SucD, die Alpha-Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase. Interessanterweise sind diese Enzyme auch unter sauerstoffarmen Bedingungen herunterreguliert (siehe 6.2.2). Somit ist es wahrscheinlich, dass unterschiedliche Faktoren gemeinsam das Biofilmproteom von Meningokokken beeinflussen. Eine Analyse der globalen Regulatoren der Genexpression von Meningokokken soll in Zukunft erfolgen. Ein weiteres Protein, das unter der Regulation von NMB0573 steht, ist FtsZ (NMB0427). Dieses essentielle Zellteilungsprotein ist das zentrale Protein des zytokinetischen Ringes (Z-Ring) und lenkt die Zellteilung in Bakterien (Bi & Lutkenhaus, 1991). Wie Tubulin, zu dem FtsZ eine schwache Sequenzhomologie aufweist, ist dieses Protein eine GTPase, die GTP-abhängig Filamente ausbildet, deren Dynamik und Morphologie den Tubulinfilamenten gleicht (Lowe & Amos, 1998, Lowe *et al.*, 2004). Da die FtsZ Expression unter der Kontrolle von NMB0573 steht und somit unter Leucin- oder Methioninmangel herunterreguliert ist, liegt die Vermutung nahe, dass diese Bedingungen im Meningokokken-Biofilm zu einer reduzierten Zellteilung führen. In Biofilmen ist dies vor allem in den tieferen Schichten der Fall, wo sich u.a. durch limitierte Versorgung mit Nährstoffen metabolisch inaktive Zellen befinden (Sternberg *et al.*, 1999). Es ist

anzunehmen, dass die teilweise balloniert erscheinenden Zellen in der basalen Region des Biofilms nicht nur auf Vitalitätsverlust, sondern auch auf Zellteilungsreduktion zurückzuführen sind.

Für einen Mangel an Nährstoffen wie Leucin spricht indirekt auch, dass durch die 2D-Gelelektrophorese im Biofilm von Meningokokken eine erhöhte Expression von LeuA (2-Isopropylmalat Synthase, NMB1070) gezeigt werden konnte. Dieses Enzym katalysiert den ersten Schritt im Isopropylmalatweg, der zur Synthese von Leucin führt. Neben LeuA war in Biofilmen von *N. meningitidis* ein weiteres Enzym der Aminosäure-Biosynthese hochreguliert. Die Aspartat-Aminotransferase AspC (NMB0540) wird um das 2,32-fache im 48 h Biofilm hochreguliert. LeuA und AspC werden jedoch nicht vom globalen Regulator NMB0573 beeinflusst. Allerdings wurde in Biofilmen von *Staphylococcus xylosus* eine erhöhte Expression der Aspartat-Aminotransferase und anderer Enzyme, die an der Aminosäure-Biosynthese beteiligt sind, beobachtet (Planchon *et al.*, 2009), ebenso in der Transkriptomanalyse von *N. meningitidis* MC58 Biofilmen (O'Dwyer *et al.*, 2009). Unter natürlichen Kulturbedingungen wird Leucin und Aspartat in ausreichenden Mengen von den Meningokokken gebildet. Daher lässt sich der Mangel an selbst synthetisierten Aminosäuren im Biofilm eventuell durch die metabolischen Umgestaltungen in den tieferen Schichten des Biofilms erklären.

6.2.2 Verfügbarkeit von Sauerstoff im Biofilm

Die Verfügbarkeit von Sauerstoff und Kohlenstoffquellen ist ein entscheidender Faktor in bakteriellen Biofilm, vor allem in den tieferen Biofilmschichten. Zudem wird darüber der Status des Citratzyklus beeinflusst (Gray *et al.*, 1966, Spencer & Guest, 1987). In der Abwesenheit von Sauerstoff sind viele Enzyme des Citratzyklus inhibiert, was sich am eindrucksvollsten anhand der Succinat-Dehydrogenase und des Succinyl-CoA Synthetase Komplexes zeigt [Übersicht in (Wolfe, 2005)]. Diese Enzyme sind auch in Gegenwart eines Überschusses an Glucose inhibiert, dann aber weniger stark [Übersicht in (Wolfe, 2005)]. Interessanterweise zeigt sich in Meningokokken-Biofilmen eine deutlich verringerte Expression der Succinat-Dehydrogenase SdhA (Nachweis im Western Blot) und von SucD, der Alpha-Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase (Nachweis in der 2-DE). Dieses Ergebnis deutet indirekt auf sauerstoffarme Bedingungen im Biofilm hin. Neben der Herunterregulation von Enzymen des Citratzyklus wurde in *E. coli* K12 unter mikroaeroben

Bedingungen eine Hochregulation von glykolytischen Enzymen wie der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) beobachtet (Peng & Shimizu, 2003). Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat mit der simultanen Produktion von NADH. Auch in Biofilmen von *N. meningitidis* WUE3671 konnten wir eine deutliche Hochregulation dieses Enzyms um das 2,8-fache im 24 h Biofilm und um das 4,56-fache im 48 h Biofilm im Vergleich zur planktonischen Kultur zeigen. Diese erhöhte Expression von GAPDH in der Proteomanalyse mit WUE3671 lässt sich durch die sauerstoffarmen Bedingungen in den tieferen Schichten des Biofilms erklären (Xu *et al.*, 1998, Rani *et al.*, 2007). In *N. meningitidis* ist jedoch der glykolytische Weg nach Embden-Meyerhof-Parnas aufgrund des fehlenden Phosphofruktokinase-Gens nicht funktionell und der Glucose Katabolismus verläuft alternativ über den Entner-Douderoff-Weg und den Pentose-Phosphat-Weg (Baart *et al.*, 2007). GAPDH war nicht nur in der Proteomanalyse von Meningokokken-Biofilmen hochreguliert, diese Regulation zeigte sich auch in Biofilmen von *P. aeruginosa* (Sauer *et al.*, 2002, Southey-Pillig *et al.*, 2005), *Porphyromonas gingivalis* (Ang *et al.*, 2008), *S. xylosus* (Planchon *et al.*, 2009), *Salmonella enterica* (Mangalappalli-Illathu *et al.*, 2008) und in einer Transkriptomanalyse von *N. meningitidis* MC58 Biofilmen. Des Weiteren wäre es interessant zu ermitteln, ob GAPDH nach der erhöhten Expression im Biofilm oberflächenassoziiert vorliegt und ob es als Adhäsine die Bindung der Biofilme an Epithelien vermittelt. Denn zusätzlich zu seiner metabolischen Funktion ist die GAPDH für seine „moon-lighting“-Funktionen bekannt (Tunio *et al.*, 2010). So wurde oberflächenassoziiertes GAPDH u.a. als Wirtszell-Adhäsine von *Mycoplasma genitalium* identifiziert (Alvarez *et al.*, 2003).

Eine Adaption an sauerstofflimitierte Bedingungen erfolgt in *N. meningitidis* auch durch den globalen Transkriptionsaktivator FNR (*fumarate and nitrate reduction regulator*). Dessen Regulon umfasst in Meningokokken 11 Gene, zu denen u.a. auch das Gen für die β -Phosphoglucomutase (*pgmB*) gehört (Bartolini *et al.*, 2006). Sauerstoffmangel könnte somit die erhöhte Expression von PgmB im Meningokokken-Biofilm erklären.

Unter microaeroben Bedingungen sind in der Regel auch Enzyme, die an der Fermentation beteiligt sind, hochreguliert (Peng & Shimizu, 2003). Dies deckt sich mit der erhöhten Expression der Zink-enthaltenden Alkoholdehydrogenase (NMB0604) im Biofilm von *N. meningitidis* WUE3671. Hier stieg die Expression im 24 h Biofilm um das 2,16-fache und im 48 h Biofilm um das 2,35-fache. Im Gegensatz dazu sind die Proteine AldA

(Aldehyddehydrogenase A, NMB1968) und AckA-2 (Acetatkinase, NMB1518) in geringeren Mengen im Biofilm exprimiert als in der planktonischen Kultur. Vielleicht können diese widersprüchlichen Ergebnisse durch die verschiedenen Schichten des Biofilms erklärt werden, in denen die Bakterien in einer Vielzahl unterschiedlicher Aktivitätszustände vorliegen. Die Regulation von AldA steht zudem unter der Kontrolle des globalen Regulators NMB0573, wodurch eine verminderte Expression auf Nährstoffmangel hindeutet (siehe 6.2.1) (Ren *et al.*, 2007). Die Zink-enthaltende Alkoholdehydrogenase gehört ebenfalls zum NMB0573-Regulon, verhält sich jedoch nicht dementsprechend, da es im Biofilm nicht herunterreguliert ist. Die Vermutung liegt nahe, dass konkurrierende Regulons eine Rolle spielen. Für die Plausibilität unserer Ergebnisse spricht, dass auch in der vergleichenden Proteomanalyse von *Staphylococcus aureus* Biofilmen mit planktonischen Zellen die Proteine AldA und AckA in Biofilmen weniger stark exprimiert wurden (Resch *et al.*, 2006).

6.2.3 Verstärkung des Schutzes gegen oxidativen Stress im Biofilm

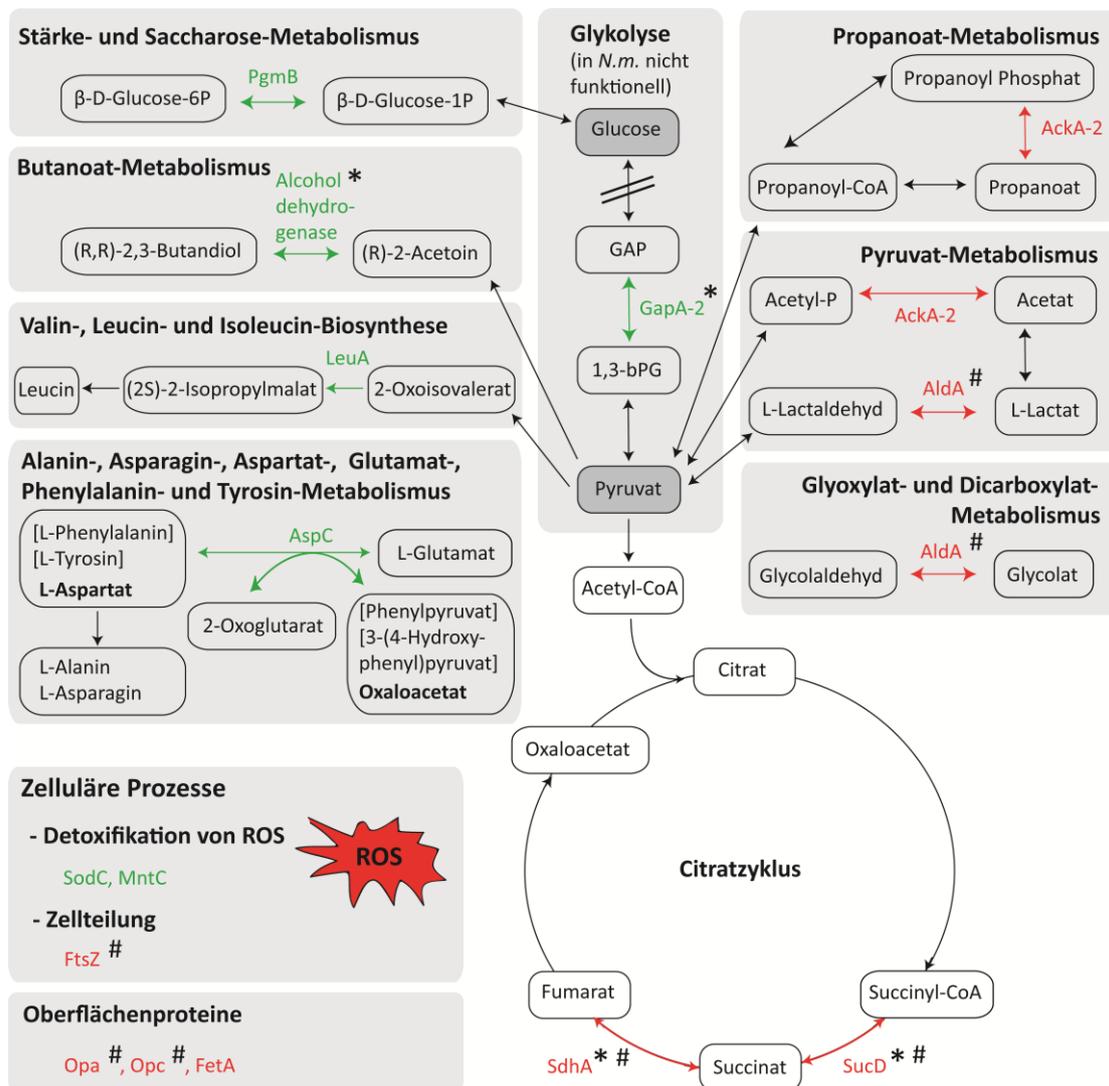
Neben der periplasmatischen Cu-Zn-Superoxiddismutase SodC ist auch MntC, die periplasmatische Komponente des Mn/Zn ABC-Transporters MntABC, in Biofilmen von *N. meningitidis* WUE3671 in größerem Ausmaß exprimiert als in der planktonischen Kultur. SodC und MntC gehören zur Gruppe der Enzyme, die in Meningokokken zum Schutz vor oxidativem Stress vorhanden sind. Dies deutet darauf hin, dass die Bakterien in den *in vitro* Biofilmen vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt sind. ROS schädigen sowohl Proteine und Nukleinsäuren wie auch Lipide und sind ein unvermeidbares Nebenprodukt des aeroben Lebensstils [Übersicht in (Storz & Imlay, 1999)]. Sie werden zum einen durch die bakterielle aerobe Atmung produziert und sind zum anderen ein Teil der Immunantwort des Menschen. Der Schutz der Bakterienzellen gegen ROS besteht aus enzymatischen und nichtenzymatischen Antioxidantien. In Meningokokken umfassen die Schutzmechanismen neben SodC und MntC auch die Enzyme Katalase, Peroxidase und die eisenhaltige Superoxiddismutase SodB (Archibald & Duong, 1986, Wilks *et al.*, 1998, Tettelin *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu *N. gonorrhoeae*, wo der Schutz gegen H₂O₂ vorrangig zu sein scheint, ist in *N. meningitidis* der Schutz gegen Superoxidanionradikale (O₂⁻) von größerer Bedeutung (Seib *et al.*, 2004). Es wird spekuliert, dass diese unterschiedlichen Schutzstrategien der Gonokokken und Meningokokken die Adaption an die verschiedenen Lebensräume der Bakterien und deren ROS-Gehalt widerspiegeln (Seib *et al.*, 2004). Es gibt jedoch keine Studie, die das genaue

quantitative Vorkommen der ROS im Nasenrachenraum untersucht. Proteom- und Transkriptomanalysen von Biofilmen verschiedener Mikroorganismen, ebenso wie von Meningokokken-Biofilmen, zeigen eine erhöhte Expression von Proteinen, die in die oxidativen Stressabwehr involviert sind (Sauer *et al.*, 2002, Tremoulet *et al.*, 2002, Ram *et al.*, 2005, Murphy *et al.*, 2005, Resch *et al.*, 2005, Sampathkumar *et al.*, 2006, Resch *et al.*, 2006, Falsetta *et al.*, 2009, Martinez-Gomariz *et al.*, 2009, Nigaud *et al.*, 2010). Daher scheint die erhöhte Expression dieser Proteine ein generelles Prinzip in Biofilmen zu sein.

Die Superoxiddismutase SodC ist im Meningokokken-Biofilm um das 1,97-fache (24 h Biofilm) bzw. 2,8-fache (48 h Biofilm) im Vergleich zur planktonischen Kontrolle hochreguliert. Dieses periplasmatische Enzym spielt in Meningokokken eine Rolle in der Abwehr exogen produzierter Superoxidanionradikale, die durch den oxidativen/respiratorischen Burst von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen bei der Phagozytose entstehen (Wilks *et al.*, 1998). Die erhöhte Expression von SodC in unserem *in vitro* Biofilmmodell muss das Resultat von endogen produzierten Superoxidanionradikalen sein, die durch den Zelltod von Meningokokken und/oder Autolyse freigesetzt werden. Daher kann spekuliert werden, ob in Meningokokken-Biofilmen durch eine Zellfraktion ROS freigesetzt werden, die zu einem Trainingseffekt zum Schutz gegen den phagozytischen oxidativen Burst führen.

In Meningokokken-Biofilmen wurde auch eine erhöhte Expression von MntC beobachtet. Im 24 h Biofilm stieg die Expression im Vergleich zur planktonischen Kontrolle um das 1,88-fache und im 48 h Biofilm um das 2,3-fache. Das MntC kodierende Gen war auch in Transkriptomanalysen von *N. meningitidis* MC58 Biofilmen hochreguliert (O'Dwyer *et al.*, 2009). MntC ist an der oxidativen Stressabwehr von *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* beteiligt (Seib *et al.*, 2004, Tseng *et al.*, 2001). In Gonokokken vermittelt die Akkumulation von Mangan über den MntABC-Transporter einen manganabhängigen Schutz vor O_2^- und H_2O_2 . Dieser Mechanismus ist unabhängig von SodB und Katalase (Seib *et al.*, 2004, Tseng *et al.*, 2001). In anderen untersuchten Bakterien ist das MntABC-Homolog mit dem Transkriptionsfaktor MntR assoziiert, der in Gonokokken fehlt (Que & Helmann, 2000, Horsburgh *et al.*, 2002, Schmitt, 2002). Die Regulation der MntABC-Expression erfolgt in *N. gonorrhoeae* stattdessen über Mangan und PerR, einen manganabhängigen Repressor der Fur (*ferric iron uptake regulator*) Familie (Wu *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass die Sensitivität von *N. gonorrhoeae* zu Mangan mit der Abwesenheit einer strengen Kontrolle

des MntABC-Transporters durch ein MntR-Homolog zusammenhängt (Wu *et al.*, 2006). In *N. meningitidis* ist MntR ebenfalls nicht beschrieben, zudem brachte eine BLAST Suche keine Übereinstimmungen der MntR-Sequenz in bekannten Meningokokkengenomenen. Der Regulator PerR ist in *N. meningitidis* noch nicht beschrieben worden, jedoch konnte in NMB1266 eine große Sequenzhomologie nachgewiesen werden (Tettelin *et al.*, 2000). Der Schutz gegen oxidativen Stress in Meningokokken über MntC ist jedoch nicht manganabhängig, der genaue Mechanismus ist unbekannt (Seib *et al.*, 2004).



Legende:
 Grün = Protein im Biofilm hochreguliert
 Rot = Protein im Biofilm herunterreguliert
 Schwarze Pfeile = umfassen zum Teil mehrere Reaktionen, die von mehreren Enzymen katalysiert werden
 * = Sauerstoffmangel
 # = möglicherweise reguliert durch NMB0573

Abkürzungen:
 1,3-bPG = 1,3-Bisphosphoglycerat
 β-D-Glucose-1P = β-D-Glucose-1-phosphat
 β-D-Glucose-6P = β-D-Glucose-6-phosphat
 CoA = Coenzym A
 GAP = Glycerinaldehyd-3-phosphat
 ROS = Reaktive Sauerstoff Spezies

Abbildung 21. Funktionelle Zuordnung der im Meningokokken-Biofilm regulierten Proteine. Nicht eingezeichnet ist das hypothetische Protein NMB1475.

6.3 Untersuchungen zum periplasmatischen substratbindenden Protein MntC des MntABC-Transporters

Das periplasmatische substratbindende Protein MntC des Mangan/Zink Transporters MntABC wurde im Meningokokken-Biofilm vermehrt exprimiert. ABC-Transporter nutzen die Energie, die aus der Hydrolyse von ATP entsteht, für den Transport diverser Substrate gegen einen Konzentrationsgradienten. Die Transporter bestehen typischerweise aus zwei Transmembrandomänen (z.B. MntB) und zwei peripheren Membranproteinen, die ATP binden und hydrolysieren (z.B. MntA) [Übersicht in (Higgins, 1992)]. Man kann ABC-Transporter je nach Transportrichtung der Substrate in zwei Gruppen einteilen [Übersicht in (Davidson *et al.*, 2008)]. Bei MntABC handelt es sich um einen Importer, der zusätzlich ein periplasmatisches substratbindendes Protein (MntC) besitzt, mit dem das Substrat mit hoher Affinität gebunden und zur Transmembrandomäne dirigiert wird (Oldham *et al.*, 2008) (Abbildung 22). MntC gehört zur Superfamilie der periplasmatischen metallbindenden Proteine, die durch ihre Faltung und den Mechanismus ihrer Ligandenbindung charakterisiert sind (Tseng *et al.*, 2001). Zu dieser Familie gehören auch TroA (*Treponema pallidum*), ZnuA (*Synechocystis* sp.) und PsaA (*Streptococcus pneumoniae*) (Lawrence *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 1999, Banerjee *et al.*, 2003). Ein typisches Protein dieser Familie besteht aus zwei kugligen Subdomänen, die durch eine einzelne Helix miteinander verbunden sind. In der Spalte zwischen den Subdomänen kann das Metallion binden.

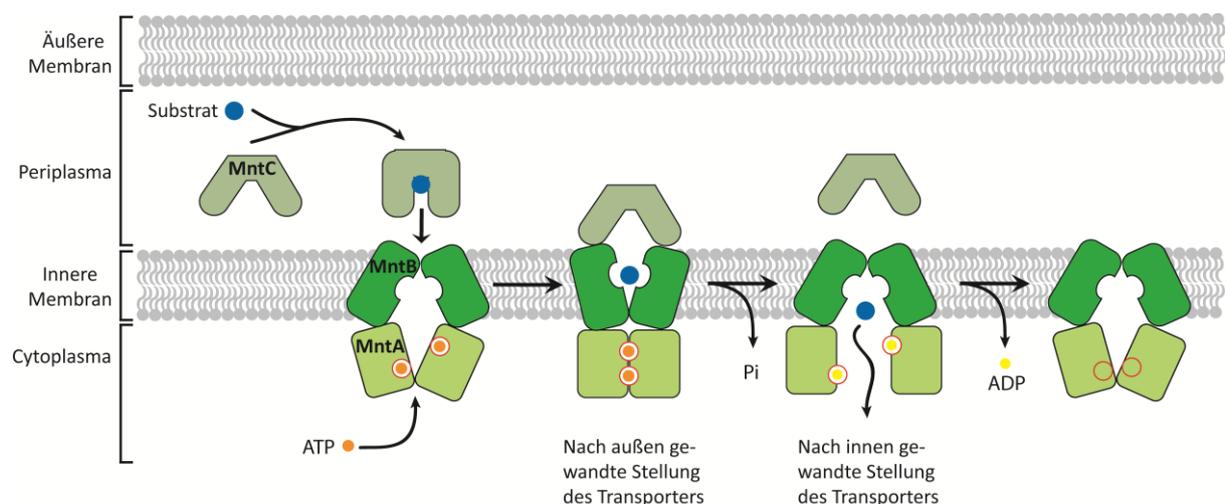


Abbildung 22. Schematische Darstellung des Transportmechanismus des Mn/Zn Transporters MntABC [modifiziert nach (Oldham *et al.*, 2008)]

6.3.1 Bedeutung von MntC in der Biofilmbildung von *N. meningitidis*

Um die Bedeutung des im Biofilm hochregulierten Proteins MntC für die Biofilmbildung von *N. meningitidis* zu klären, wurde eine *mntC*-Mutante von WUE3671 hergestellt. Aufgrund der zu erwartenden reduzierten Resistenz gegenüber oxidativem Stress, wurde der Phänotyp dieser Mutante im Paraquat-Assay verifiziert. Die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Paraquat konnte bestätigt werden, jedoch war die Zunahme der Inhibitionszone um nur 4 mm bei diesem Stamm sehr gering (siehe 5.4.2). Daher, und weil eine Komplementierung der *mntC*-Mutation im Stamm WUE3671 aus unbekanntem Gründen nicht möglich war, wurde zudem eine *mntC*-Mutante im Stamm MC58*siaD*- hergestellt. Dieser Stamm zeigte mit einer Zunahme der Inhibitionszone um 13 mm und einer funktionierenden Komplementierung die erwarteten Eigenschaften. Aus diesem Grund wurde der Stamm MC58*siaD*- in allen weiteren Versuchen zusätzlich zu WUE3671 getestet. Warum eine Komplementierung in WUE3671 nicht möglich war, konnte nicht geklärt werden. Eine Komplementierung *in trans* war auch mit dem *pldA*-Gen in diesem Stamm unmöglich (siehe 5.4.4.1). Bei diesem Gen wurde neben einer Konstruktion mit dem Vektor pAP2-1 zusätzlich auch der Vektor pHc7 verwendet, aber auch hier war eine Komplementation nicht erfolgreich. Jedoch konnte durch die Komplementation eines weiteren Gens (*sodB*) mit dem Vektor pAP2-1 in WUE3671 gezeigt werden, dass es sich um kein generelles Problem des Stammes handelt (Daten nicht gezeigt). Auch die Größe der Gene kann als Ursache ausgeschlossen werden, da die Gene mit 588 bp (*sodB*), 915 bp (*mntC*) und 1149 bp (*pldA*) eine Größe haben, die problemlos verwendet werden kann.

Durch die zusätzliche Herstellung von *mntC*-Mutanten in cnl Stämmen des gleichen Sequenztyps (ST-845) wie WUE3671 (α 30, α 62 und α 458) sollte geklärt werden, ob die sehr geringe Zunahme der Inhibitionszone im Paraquat-Assay auf den Stammhintergrund (klonale Linie) von WUE3671 zurückzuführen ist. Es zeigte sich, dass der Stammhintergrund keinen Einfluss auf die Stärke der Paraquat-Sensibilität hat (siehe 5.4.2). Möglicherweise besitzt WUE3671 dominante und MntC unabhängige Mechanismen der ROS-Abwehr.

In der Biofilmbildung von *N. meningitidis* WUE3671 und MC58*siaD*- spielte MntC eine wichtige Rolle, da die *mntC*-Mutanten nahezu keinen Biofilm im Flusssystem mehr ausbildeten. Dieser Defekt konnte durch die Komplementation *in trans* in MC58*siaD*- kompensiert werden. Da die untersuchten *mntC*-Mutanten jedoch hinsichtlich ihres Wachstums in der planktonischen Kultur kaum beeinträchtigt waren (siehe 5.4.3), ist dieser

Wachstumsdefekt zumindest teilweise biofilmspezifisch. Auch bei *mntC*-Mutanten in *N. gonorrhoeae* konnte eine reduzierte Fähigkeit zur Biofilmbildung festgestellt werden, jedoch wurde nur eine *mntC*-Mutante überprüft, eine Komplementation fehlt (Lim *et al.*, 2008). Die *mntC*-Mutante in Gonokokken war ebenfalls sensibler gegenüber Paraquat und akkumulierte weniger Mangan als der WT (Tseng *et al.*, 2001). In Gonokokken vermittelt die Akkumulation von Mangan über den MntABC-Transporter einen manganabhängigen Schutz gegen O_2^- und H_2O_2 . Dieser Mechanismus ist unabhängig von SodB und Katalase (Seib *et al.*, 2004, Tseng *et al.*, 2001). Des Weiteren zeigten die *mntC*-Mutanten in Gonokokken ein reduziertes intrazelluläres Überleben in primären Epithelzellen (Lim *et al.*, 2008). Warum jedoch *in vivo* das Überleben von *mntC*-Mutanten in Mäusen, die zu keinem phagozytischen respiratorischen Burst mehr fähig waren, vermindert war, lässt sich schwer erklären (Wu *et al.*, 2009). Diese Beobachtung widerspricht der Vermutung, dass MntC ausschließlich über MntABC zum Schutz gegen den oxidativen Burst dient. Es wird jedoch vermutet, dass MntC die Biofilmbildung in Gonokokken erleichtert, was somit die Kolonisation in Mäusen beeinflusst (Wu *et al.*, 2009). Dies würde das verminderte Überleben der *mntC*-Mutante erklären. In Meningokokken ist der Schutz gegen oxidativen Stress über MntC, im Gegensatz zu Gonokokken, nicht manganabhängig. Der genaue Mechanismus ist jedoch nicht bekannt (Seib *et al.*, 2004). Abgesehen von der unterschiedlichen Wirkungsweise von MntC im Schutz gegen oxidativen Stress scheint MntC auch in Meningokokken die Biofilmbildung positiv zu beeinflussen. ABC-Transporter in anderen Organismen scheinen auch wichtig für die Biofilmbildung zu sein. In *Streptococcus pneumoniae* wiesen Knock-out Mutanten aller drei Komponenten eines Metallaufnahmesystems (AdcCBA) in Flusszellen einen Biofilmdefizienten Phänotyp auf (Mitrakul *et al.*, 2005). Mutationen von Genen des Pst-Transporters in *Pseudomonas aureofaciens* (*pstC*, *pstA*) und *Proteus mirabilis* (*pstS*, *pstA*) führten ebenfalls zu Defekten in der Biofilmbildung (Monds *et al.*, 2001, O'May *et al.*, 2009). Zudem waren die *pstS*- und *pstA*-Mutanten dieses Phosphattransporters in einem Mausmodell für Harnwegsinfektionen vermindert virulent (O'May *et al.*, 2009). All dies deutet darauf hin, dass ABC-Transporter über ihre wichtige Rolle in der Biofilmbildung auch eine bedeutende Funktion in der Wirtskolonisation übernehmen.

6.3.2 Rolle von MntC und OMPLA in der Biofilmbildung

In dieser Arbeit mit Meningokokken-Biofilmen konnte eine erhöhte Expression von Proteinen nachgewiesen werden, die in den Schutz gegen oxidativen Stress durch ROS involviert sind (MntC, SodC). Auch aus anderen Studien ist bekannt, dass Biofilme oxidativem Stress unterworfen sind und die bakteriellen Abwehrmechanismen aktivieren (Sauer *et al.*, 2002, Tremoulet *et al.*, 2002, Murphy *et al.*, 2005, Ram *et al.*, 2005, Sampathkumar *et al.*, 2006, Martinez-Gomariz *et al.*, 2009, Falsetta *et al.*, 2009, Nigaud *et al.*, 2010). Es ist jedoch unklar, ob MntC für die initiale Biofilmbildung benötigt wird oder erst in einer späteren Phase von Bedeutung ist.

Es ist bekannt, dass es bei Meningokokken in der stationären Phase zu einer OMPLA-vermittelten Autolyse kommt (Bos *et al.*, 2005). Das durch *pldA* kodierte Autolysin OMPLA (*outer membrane phospholipase A*) ist in Gram-negativen Bakterien weit verbreitet und liegt unter normalen Bedingungen als inaktives Monomer in der äußeren Membran vor (Brok *et al.*, 1998). Die OMPLA-Aktivierung durch Dimerisierung erfolgt in Meningokokken u.a. in der stationären Phase, jedoch nicht in der exponentiellen Wachstumsphase (Dekker *et al.*, 1997, Snijder *et al.*, 1999, Bos *et al.*, 2005). Durch die Autolyse der Bakterien wird DNA freigesetzt, die der mechanischen Stabilisierung des Biofilms von Meningokokken dient (Lappann *et al.*, 2010). Somit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass in Biofilmen von *N. meningitidis* sowohl der Schutz gegen ROS als auch die OMPLA-vermittelte Autolyse eine wichtige Rolle spielen und dass diese beiden Faktoren zueinander in Wechselwirkung stehen könnten (Abbildung 23). Folgende Fragen wurden daher entwickelt und in dieser Arbeit in Pilotstudien einleitend bearbeitet. Kommt es durch die OMPLA-vermittelte Autolyse zu einer erhöhten Freisetzung von endogen produzierten ROS und somit zu einem erhöhten oxidativen Stress im Biofilm? Ist die erhöhte Expression von MntC im Biofilm eine Folge der ROS-Freisetzung durch Autolyse? Löst auf der anderen Seite verminderte ROS Abwehr die Autolyse aus?

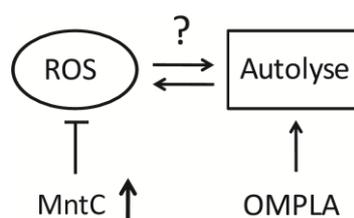


Abbildung 23. Modell zur Rolle von MntC und OMPLA in Biofilmen von *N. meningitidis*.

Um zu klären, ob die erhöhte ROS-Konzentration der *mntC*-Mutanten die OMPLA-vermittelte Autolyse der Meningokokken auslöst, wurden die *mntC*-Mutanten von WUE3671 und MC58*siaD*- im Autolyse-Assay getestet, der zuvor durch *pldA*-Mutanten validiert wurde. Es zeigte sich, dass in WUE3671*mntC*- eine signifikant verstärkte Autolyse im Vergleich zum WT auftrat. Dies konnte im MC58*siaD*- jedoch nicht beobachtet werden, die Autolyse war sowohl im parentalen Stamm, der *mntC*-Mutante und der Komplementante identisch. In diesem Ansatz zeigte sich allerdings eine Schwäche des Autolyse-Assays. Wenn eine bestimmte optische Dichte (OD 0,5-1,0) unterschritten wurde, war keine genauere Differenzierung der Werte mehr möglich. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Autolyse-Assay für grobe Messungen (Autolyse ja/nein) gut geeignet ist, aber keine quantitativen Aussagen erlaubt. Um zu testen, ob es bei der *mntC*-Mutante von MC58*siaD*- zu einem erhöhten Absterben der Bakterien, z.B. durch ROS kam, wurden daher WT und *mntC*-Mutanten aus dem Autolyse-Assay nach 24 h entnommen und eine CFU-Bestimmung durchgeführt. Dabei zeigt sich sehr deutlich, dass in der *mntC*-Mutante bereits nach 24 h eine signifikant verminderte Lebenszellzahl anzutreffen war. Es bleibt zu untersuchen, ob die verstärkte Autolyse, bzw. das verstärkte Absterben der Bakterien in den *mntC*-Mutanten, auf eine ROS induzierte, vorzeitige Aktivierung der präformierten OMPLA zurückzuführen ist. Dies könnte eventuell durch die Verwendung eines induzierbaren Promoters für *mntC* untersucht werden. Wenn MntC, durch das Abfangen der ROS, der Autolyse der Meningokokken entgegenwirkt, könnte dies eine erhöhte Expression von MntC im Biofilm erklären. Dies würde für eine Rolle von MntC in einer späten Phase der Biofilmbildung sprechen.

Um die Hypothese zu überprüfen, dass es durch die OMPLA-vermittelte Autolyse zu einer erhöhten Freisetzung von endogen produzierten ROS kommt, wäre es notwendig, die ROS-Konzentration im Autolyse-Assay vom WT und den *pldA*-Mutanten zu bestimmen. Zudem wäre die Messung der ROS-Konzentration im Biofilm über die Zeit interessant. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

6.4 Fazit und Einschränkungen der Proteomanalyse

Die Proteomanalyse von Meningokokken-Biofilmen des Stammes WUE3671 wies auf der einen Seite auf eine Anpassung der Bakterien durch ROS verursachten oxidativen Stress und auf der anderen Seite auf sauerstoffarme Bedingungen hin. Während die endogene Produktion von ROS die Bakterien im Biofilm trainieren kann, um mit den Faktoren des menschlichen Immunsystems zurechtzukommen, ist die Adaption an eine mikroaerobe Umgebung ein mögliches Modell für Vorgänge bei der Kolonisation des Wirtes. Zudem wurden Veränderungen des Metabolismus als Folge eines Nährstoffmangels im Biofilm beobachtet. Dies dürfte, ebenso wie der Sauerstoffmangel, vor allem ein Problem in den tieferen Schichten des Biofilms sein. Die Topologie dieser Anpassungen muss jedoch in weiteren Studien genauer untersucht werden.

Biofilme weisen eine bemerkenswerte strukturelle, chemische und biologische Heterogenität als Konsequenz von Gradienten in der Verteilung von Nährstoffen, Signalverbindungen und bakteriellen Abfallprodukten auf [Übersicht in (Stewart & Franklin, 2008)]. Die mikroskopischen Analysen der *N. meningitidis* WUE3671 Biofilme bestätigen diese Beobachtungen. In den meisten Transkriptom- und Proteomanalysen von Biofilmen wird das gesamte Biofilmmaterial, ungeachtet der verschiedenen Subpopulationen, untersucht. Es wäre wünschenswert, die unterschiedlichen Subpopulationen des Biofilms zu identifizieren, zu separieren und getrennt zu analysieren, doch diese Dissektion ist in der Praxis nur schwer durchführbar (An & Parsek, 2007). Somit müssen die Ergebnisse, die durch die Analyse des gesamten Biofilms gewonnen wurden, im Sinne eines Ringschlusses durch Visualisierung im Biofilm verifiziert werden. Eine Möglichkeit wäre die Untersuchung der Meningokokken-Biofilme mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), indem man immunogoldmarkierte Antikörper gegen die im Biofilm regulierten Proteine verwendet und genau bestimmt, in welcher Schicht des Biofilms eine Regulation stattfindet (Webster *et al.*, 2006). „Single-Cell“ Proteom- und Transkriptomanalysen, durch die eine einzelne Zelle untersucht werden können, werden es in Zukunft erlauben, gezielte Bereiche des Biofilms mit hoher Sensitivität zu beleuchten (Newman *et al.*, 2006, Lao *et al.*, 2009, Tang *et al.*, 2009, Tang *et al.*, 2010). Eine weit verbreitete Einschränkung der Transkriptom- und Proteomanalysen von Biofilmen ist die Auswahl einer adäquaten Kontrolle. In verschiedenen Studien wurden sowohl planktonische Kulturen in verschiedenen Wachstumsphasen (exponentiell, stationär) als auch auf Platte gewachsene Bakterien (Mikkelsen *et al.*, 2007, O'Dwyer *et al.*, 2009)

verwendet. Jede dieser Kontrollgruppen hat seine eigenen Vor- und Nachteile, jedoch kann keine die verschiedenen dynamischen Gradienten, die in einem Biofilm vorherrschen, reproduzieren (An & Parsek, 2007). In dieser Arbeit wurden Meningokokken in der frühen exponentiellen Phase zur Inokulation des Biofilms und gleichzeitig als Vergleichsgruppe für die Biofilme verwendet. Daher demonstrieren die Ergebnisse die metabolischen Veränderungen der Bakterien im Verlauf der Biofilmbildung. Wir haben uns aufgrund von gänzlich unterschiedlichen Voraussetzungen und Bedingungen des Wachstums gegen die Verwendung von planktonischen Bakterien nach gleicher Kulturdauer (24 h oder 48 h) entschieden. Zukünftige Studien mit gelfreien, direkt massenspektrometrischen Analysen könnten einen Vergleich von mehreren Umwelteinflüssen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermöglichen (Wolff *et al.*, 2006). Dies ist mit gelbasierten Systemen nur eingeschränkt zu leisten. Durch den Einsatz innovativer Technologien können in Zukunft zudem Proteinphosphorylierungen und äußere Membranproteine untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

- Abel, A., S. Sanchez, J. Arenas, M. T. Criado & C. M. Ferreira, (2007) Bioinformatic analysis of outer membrane proteome of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*. *Int Microbiol* **10**: 5-11.
- Alvarez, R. A., M. W. Blaylock & J. B. Baseman, (2003) Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Mycoplasma genitalium* binds mucin. *Mol Microbiol* **48**: 1417-1425.
- An, D. & M. R. Parsek, (2007) The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. *Curr Opin Microbiol* **10**: 292-296.
- Andersen, J., L. Berthelsen, B. Bech Jensen & I. Lind, (1998) Dynamics of the meningococcal carrier state and characteristics of the carrier strains: a longitudinal study within three cohorts of military recruits. *Epidemiol Infect* **121**: 85-94.
- Ang, C. S., P. D. Veith, S. G. Dashper & E. C. Reynolds, (2008) Application of 16O/18O reverse proteolytic labeling to determine the effect of biofilm culture on the cell envelope proteome of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Proteomics* **8**: 1645-1660.
- Archibald, F. S. & I. W. DeVoe, (1978) Iron in *Neisseria meningitidis*: minimum requirements, effects of limitation, and characteristics of uptake. *J Bacteriol* **136**: 35-48.
- Archibald, F. S. & M. N. Duong, (1986) Superoxide dismutase and oxygen toxicity defenses in the genus *Neisseria*. *Infect Immun* **51**: 631-641.
- Baart, G. J., B. Zomer, A. de Haan, L. A. van der Pol, E. C. Beuvery, J. Tramper & D. E. Martens, (2007) Modeling *Neisseria meningitidis* metabolism: from genome to metabolic fluxes. *Genome Biol* **8**: R136.
- Banerjee, S., B. Wei, M. Bhattacharyya-Pakrasi, H. B. Pakrasi & T. J. Smith, (2003) Structural determinants of metal specificity in the zinc transport protein ZnuA from *Synechocystis* 6803. *J Mol Biol* **333**: 1061-1069.
- Bartolini, E., E. Frigimelica, S. Giovinazzi, G. Galli, Y. Shaik, C. Genco, J. A. Welsch, D. M. Granoff, G. Grandi & R. Grifantini, (2006) Role of FNR and FNR-regulated, sugar fermentation genes in *Neisseria meningitidis* infection. *Mol Microbiol* **60**: 963-972.
- Basler, M., I. Linhartova, P. Halada, J. Novotna, S. Bezouskova, R. Osicka, J. Weiser, J. Vohradsky & P. Sebo, (2006) The iron-regulated transcriptome and proteome of *Neisseria meningitidis* serogroup C. *Proteomics* **6**: 6194-6206.
- Beenken, K. E., P. M. Dunman, F. McAleese, D. Macapagal, E. Murphy, S. J. Projan, J. S. Blevins & M. S. Smeltzer, (2004) Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* **186**: 4665-4684.
- Beloin, C., J. Valle, P. Latour-Lambert, P. Faure, M. Kzreminski, D. Balestrino, J. A. Haagensen, S. Molin, G. Prensier, B. Arbeille & J. M. Ghigo, (2004) Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol* **51**: 659-674.
- Benard, L., P. Y. Litzler, P. Cosette, J. F. Lemeland, T. Jouenne & G. A. Junter, (2009) Proteomic analysis of *Staphylococcus aureus* biofilms grown in vitro on mechanical heart valve leaflets. *J Biomed Mater Res A* **88**: 1069-1078.
- Bernardini, G., S. Arena, D. Braconi, A. Scaloni & A. Santucci, (2007) Novel identification of expressed genes and functional classification of hypothetical proteins from *Neisseria meningitidis* serogroup A. *Proteomics* **7**: 3342-3347.
- Bernardini, G., G. Renzone, M. Comanducci, R. Mini, S. Arena, C. D'Ambrosio, S. Bambini, L. Trabalzini, G. Grandi, P. Martelli, M. Achtman, A. Scaloni, G. Ratti & A. Santucci,

- (2004) Proteome analysis of *Neisseria meningitidis* serogroup A. *Proteomics* **4**: 2893-2926.
- Beveridge, T. J., (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* **181**: 4725-4733.
- Beveridge, T. J., S. A. Makin, J. L. Kadurugamuwa & Z. Li, (1997) Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol Rev* **20**: 291-303.
- Bi, E. F. & J. Lutkenhaus, (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**: 161-164.
- Bjarnsholt, T., P. O. Jensen, M. Burmolle, M. Hentzer, J. A. Haagensen, H. P. Hougen, H. Calum, K. G. Madsen, C. Moser, S. Molin, N. Hoiby & M. Givskov, (2005) *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology* **151**: 373-383.
- Blackwell, C. C., D. M. Weir, V. S. James, W. T. Todd, N. Banatvala, A. K. Chaudhuri, H. G. Gray, E. J. Thomson & R. J. Fallon, (1990) Secretor status, smoking and carriage of *Neisseria meningitidis*. *Epidemiol Infect* **104**: 203-209.
- Borriello, G., E. Werner, F. Roe, A. M. Kim, G. D. Ehrlich & P. S. Stewart, (2004) Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2659-2664.
- Bos, M. P., B. Tefsen, P. Voet, V. Weynants, J. P. van Putten & J. Tommassen, (2005) Function of neisserial outer membrane phospholipase a in autolysis and assessment of its vaccine potential. *Infect Immun* **73**: 2222-2231.
- Branda, S. S., S. Vik, L. Friedman & R. Kolter, (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**: 20-26.
- Brok, R. G., A. P. Boots, N. Dekker, H. M. Verheij & J. Tommassen, (1998) Sequence comparison of outer membrane phospholipases A: implications for structure and for the catalytic mechanism. *Res Microbiol* **149**: 703-710.
- Calvo, J. M. & R. G. Matthews, (1994) The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **58**: 466-490.
- Cartwright, K. A., J. M. Stuart, D. M. Jones & N. D. Noah, (1987) The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect* **99**: 591-601.
- Caugant, D. A., E. A. Hoiby, P. Magnus, O. Scheel, T. Hoel, G. Bjune, E. Wedege, J. Eng & L. O. Froholm, (1994) Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J Clin Microbiol* **32**: 323-330.
- Chevallet, M., V. Santoni, A. Poinas, D. Rouquie, A. Fuchs, S. Kieffer, M. Rossignol, J. Lunardi, J. Garin & T. Rabilloud, (1998) New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**: 1901-1909.
- Christodoulides, M., J. S. Everson, B. L. Liu, P. R. Lambden, P. J. Watt, E. J. Thomas & J. E. Heckels, (2000) Interaction of primary human endometrial cells with *Neisseria gonorrhoeae* expressing green fluorescent protein. *Mol Microbiol* **35**: 32-43.
- Claus, H., M. C. Maiden, R. Maag, M. Frosch & U. Vogel, (2002) Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology* **148**: 1813-1819.
- Claus, H., M. C. Maiden, D. J. Wilson, N. D. McCarthy, K. A. Jolley, R. Urwin, F. Hessler, M. Frosch & U. Vogel, (2005) Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis* **191**: 1263-1271.

- Collet, A., P. Cosette, C. Beloin, J. M. Ghigo, C. Rihouey, P. Lerouge, G. A. Junter & T. Jouenne, (2008) Impact of rpoS deletion on the proteome of Escherichia coli grown planktonically and as biofilm. *J Proteome Res* **7**: 4659-4669.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber & G. James, (1994) Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* **176**: 2137-2142.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart & E. P. Greenberg, (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Danielson, L. & E. Mann, (1806) A history of a singular and very noted disease, which lately made its appearance in Medfield. *Medical and Agricultural Register* **1**: 65-69.
- Davidson, A. L., E. Dassa, C. Orelle & J. Chen, (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 317-364, table of contents.
- Davies, D., (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* **2**: 114-122.
- De Vriendt, K., S. Theunissen, W. Carpentier, L. De Smet, B. Devreese & J. Van Beeumen, (2005) Proteomics of Shewanella oneidensis MR-1 biofilm reveals differentially expressed proteins, including AggA and RibB. *Proteomics* **5**: 1308-1316.
- Deghmane, A. E., D. Giorgini, M. Larribe, J. M. Alonso & M. K. Taha, (2002) Down-regulation of pili and capsule of Neisseria meningitidis upon contact with epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein. *Mol Microbiol* **43**: 1555-1564.
- Deghmane, A. E., D. Giorgini, L. Maigne & M. K. Taha, (2004) Analysis in vitro and in vivo of the transcriptional regulator CrgA of Neisseria meningitidis upon contact with target cells. *Mol Microbiol* **53**: 917-927.
- Deghmane, A. E., S. Petit, A. Topilko, Y. Pereira, D. Giorgini, M. Larribe & M. K. Taha, (2000) Intimate adhesion of Neisseria meningitidis to human epithelial cells is under the control of the crgA gene, a novel LysR-type transcriptional regulator. *EMBO J* **19**: 1068-1078.
- Dehio, C., S. D. Gray-Owen & T. F. Meyer, (1998) The role of neisserial Opa proteins in interactions with host cells. *Trends Microbiol* **6**: 489-495.
- Dekker, N., J. Tommassen, A. Lustig, J. P. Rosenbusch & H. M. Verheij, (1997) Dimerization regulates the enzymatic activity of Escherichia coli outer membrane phospholipase A. *J Biol Chem* **272**: 3179-3184.
- Delany, I., R. Grifantini, E. Bartolini, R. Rappuoli & V. Scarlato, (2006) Effect of Neisseria meningitidis fur mutations on global control of gene transcription. *J Bacteriol* **188**: 2483-2492.
- Delany, I., R. Rappuoli & V. Scarlato, (2004) Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in Neisseria meningitidis. *Mol Microbiol* **52**: 1081-1090.
- Devoe, I. W. & J. E. Gilchrist, (1973) Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of Neisseria meningitidis. *J Exp Med* **138**: 1156-1167.
- Dolan-Livengood, J. M., Y. K. Miller, L. E. Martin, R. Urwin & D. S. Stephens, (2003) Genetic basis for nongroupable Neisseria meningitidis. *J Infect Dis* **187**: 1616-1628.
- Donlan, R. M., (2000) Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J* **46**: S47-52.
- Donlan, R. M. & J. W. Costerton, (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**: 167-193.
- Elias, J., D. Harmsen, H. Claus, W. Hellenbrand, M. Frosch & U. Vogel, (2006) Spatiotemporal analysis of invasive meningococcal disease, Germany. *Emerg Infect Dis* **12**: 1689-1695.

- Exley, R. M., R. Sim, L. Goodwin, M. Winterbotham, M. C. Schneider, R. C. Read & C. M. Tang, (2009) Identification of meningococcal genes necessary for colonization of human upper airway tissue. *Infect Immun* **77**: 45-51.
- Falsetta, M. L., T. B. Bair, S. C. Ku, R. N. Vanden Hoven, C. T. Steichen, A. G. McEwan, M. P. Jennings & M. A. Apicella, (2009) Transcriptional profiling identifies the metabolic phenotype of gonococcal biofilms. *Infect Immun* **77**: 3522-3532.
- Feil, E. J., M. C. Maiden, M. Achtman & B. G. Spratt, (1999) The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol* **16**: 1496-1502.
- Ferrari, G., I. Garaguso, J. Adu-Bobie, F. Doro, A. R. Taddei, A. Biolchi, B. Brunelli, M. M. Giuliani, M. Pizza, N. Norais & G. Grandi, (2006) Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis* delta *gna33* mutant: proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles. *Proteomics* **6**: 1856-1866.
- Finlay, B. B. & S. Falkow, (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 136-169.
- Gelfand, D. H. & R. A. Steinberg, (1977) *Escherichia coli* mutants deficient in the aspartate and aromatic amino acid aminotransferases. *J Bacteriol* **130**: 429-440.
- Goldschneider, I., E. C. Gotschlich & M. S. Artenstein, (1969a) Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* **129**: 1307-1326.
- Goldschneider, I., E. C. Gotschlich & M. S. Artenstein, (1969b) Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *J Exp Med* **129**: 1327-1348.
- Gorg, A., W. Postel & S. Gunther, (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **9**: 531-546.
- Gorg, A., W. Weiss & M. J. Dunn, (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**: 3665-3685.
- Gray-Owen, S. D. & A. B. Schryvers, (1996) Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol* **4**: 185-191.
- Gray, C. T., J. W. Wimpenny & M. R. Mossman, (1966) Regulation of metabolism in facultative bacteria. II. Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the formation of Krebs cycle enzymes in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **117**: 33-41.
- Grifantini, R., E. Bartolini, A. Muzzi, M. Draghi, E. Frigimelica, J. Berger, F. Randazzo & G. Grandi, (2002) Gene expression profile in *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* upon host-cell contact: from basic research to vaccine development. *Ann N Y Acad Sci* **975**: 202-216.
- Grifantini, R., S. Sebastian, E. Frigimelica, M. Draghi, E. Bartolini, A. Muzzi, R. Rappuoli, G. Grandi & C. A. Genco, (2003) Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9542-9547.
- Gruber, T. M. & C. A. Gross, (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**: 441-466.
- Gunesekere, I. C., C. M. Kahler, D. R. Powell, L. A. Snyder, N. J. Saunders, J. I. Rood & J. K. Davies, (2006) Comparison of the RpoH-dependent regulon and general stress response in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **188**: 4769-4776.
- Hammerschmidt, S., R. Hilse, J. P. van Putten, R. Gerardy-Schahn, A. Unkmeir & M. Frosch, (1996a) Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO J* **15**: 192-198.

- Hammerschmidt, S., A. Muller, H. Sillmann, M. Muhlenhoff, R. Borrow, A. Fox, J. van Putten, W. D. Zollinger, R. Gerardy-Schahn & M. Frosch, (1996b) Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol* **20**: 1211-1220.
- Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Harmsen, M., M. Lappann, S. Knochel & S. Molin, (2010) Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 2271-2279.
- Harrison, L. H., C. L. Trotter & M. E. Ramsay, (2009) Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine* **27 Suppl 2**: B51-63.
- Herbert, B., (1999) Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **20**: 660-663.
- Herbert, B. R., M. P. Molloy, A. A. Gooley, B. J. Walsh, W. G. Bryson & K. L. Williams, (1998) Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis* **19**: 845-851.
- Heukeshoven, J. & R. Dernick, (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**: 28-32.
- Heurlier, K., M. J. Thomson, N. Aziz & J. W. Moir, (2008) The nitric oxide (NO)-sensing repressor NsrR of *Neisseria meningitidis* has a compact regulon of genes involved in NO synthesis and detoxification. *J Bacteriol* **190**: 2488-2495.
- Higgins, C. F., (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113.
- Hilse, R., S. Hammerschmidt, W. Bautsch & M. Frosch, (1996) Site-specific insertion of IS1301 and distribution in *Neisseria meningitidis* strains. *J Bacteriol* **178**: 2527-2532.
- Hobbs, M., E. S. Collie, P. D. Free, S. P. Livingston & J. S. Mattick, (1993) PilS and PilR, a two-component transcriptional regulatory system controlling expression of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **7**: 669-682.
- Hoch, J. A., (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**: 165-170.
- Hoekstra, D., J. W. van der Laan, L. de Leij & B. Witholt, (1976) Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **455**: 889-899.
- Holbein, B. E., (1980) Iron-controlled infection with *Neisseria meningitidis* in mice. *Infect Immun* **29**: 886-891.
- Hopman, C. T., D. Speijer, A. van der Ende & Y. Pannekoek, (2010) Identification of a novel anti-sigmaE factor in *Neisseria meningitidis*. *Bmc Microbiol* **10**: 164.
- Horsburgh, M. J., S. J. Wharton, A. G. Cox, E. Ingham, S. Peacock & S. J. Foster, (2002) MntR modulates expression of the PerR regulon and superoxide resistance in *Staphylococcus aureus* through control of manganese uptake. *Mol Microbiol* **44**: 1269-1286.
- Ieva, R., D. Roncarati, M. M. Metruccio, K. L. Seib, V. Scarlato & I. Delany, (2008) OxyR tightly regulates catalase expression in *Neisseria meningitidis* through both repression and activation mechanisms. *Mol Microbiol* **70**: 1152-1165.
- Ishihama, Y., Y. Oda, T. Tabata, T. Sato, T. Nagasu, J. Rappsilber & M. Mann, (2005) Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute

- protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics* **4**: 1265-1272.
- Jamet, A., C. Rousseau, J. B. Monfort, E. Frapy, X. Nassif & P. Martin, (2009) A two-component system is required for colonization of host cells by meningococcus. *Microbiology* **155**: 2288-2295.
- Jamet, A., C. Rousseau, J. B. Monfort, X. Nassif & P. Martin, (2010) Identification of a novel transcriptional regulator involved in pilC1 regulation in *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Lett* **304**: 140-147.
- Jantama, K., X. Zhang, J. C. Moore, K. T. Shanmugam, S. A. Svoronos & L. O. Ingram, (2008) Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **101**: 881-893.
- Jesaitis, A. J., M. J. Franklin, D. Berglund, M. Sasaki, C. I. Lord, J. B. Bleazard, J. E. Duffy, H. Beyenal & Z. Lewandowski, (2003) Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J Immunol* **171**: 4329-4339.
- Johansson, L., A. Rytönen, P. Bergman, B. Albiger, H. Kallstrom, T. Hokfelt, B. Agerberth, R. Cattaneo & A. B. Jonsson, (2003) CD46 in meningococcal disease. *Science* **301**: 373-375.
- Jolley, K. A., C. Brehony & M. C. Maiden, (2007) Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 89-96.
- Jolley, K. A., D. J. Wilson, P. Kriz, G. McVean & M. C. Maiden, (2005) The influence of mutation, recombination, population history, and selection on patterns of genetic diversity in *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol* **22**: 562-569.
- Kadurugamuwa, J. L. & T. J. Beveridge, (1997) Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J Antimicrob Chemother* **40**: 615-621.
- Kallstrom, H., M. K. Liszewski, J. P. Atkinson & A. B. Jonsson, (1997) Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **25**: 639-647.
- Lao, K. Q., F. Tang, C. Barbacioru, Y. Wang, E. Nordman, C. Lee, N. Xu, X. Wang, B. Tuch, J. Bodeau, A. Siddiqui & M. A. Surani, (2009) mRNA-sequencing whole transcriptome analysis of a single cell on the SOLiD system. *J Biomol Tech* **20**: 266-271.
- Lappann, M., H. Claus, T. van Alen, M. Harmsen, J. Elias, S. Molin & U. Vogel, (2010) A dual role of extracellular DNA during biofilm formation of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*.
- Lappann, M., J. A. Haagensen, H. Claus, U. Vogel & S. Molin, (2006) Meningococcal biofilm formation: structure, development and phenotypes in a standardized continuous flow system. *Mol Microbiol* **62**: 1292-1309.
- Lappann, M. & U. Vogel, (2010) Biofilm formation by the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Med Microbiol Immunol*.
- Lawrence, M. C., P. A. Pilling, V. C. Epa, A. M. Berry, A. D. Ogunniyi & J. C. Paton, (1998) The crystal structure of pneumococcal surface antigen PsaA reveals a metal-binding site and a novel structure for a putative ABC-type binding protein. *Structure* **6**: 1553-1561.
- Lee, Y. H., R. K. Deka, M. V. Norgard, J. D. Radolf & C. A. Hasemann, (1999) *Treponema pallidum* TroA is a periplasmic zinc-binding protein with a helical backbone. *Nat Struct Biol* **6**: 628-633.

- Lim, K. H., C. E. Jones, R. N. vanden Hoven, J. L. Edwards, M. L. Falsetta, M. A. Apicella, M. P. Jennings & A. G. McEwan, (2008) Metal binding specificity of the MntABC permease of *Neisseria gonorrhoeae* and its influence on bacterial growth and interaction with cervical epithelial cells. *Infect Immun* **76**: 3569-3576.
- Lissenden, S., S. Mohan, T. Overton, T. Regan, H. Crooke, J. A. Cardinale, T. C. Householder, P. Adams, C. D. O'Conner, V. L. Clark, H. Smith & J. A. Cole, (2000) Identification of transcription activators that regulate gonococcal adaptation from aerobic to anaerobic or oxygen-limited growth. *Mol Microbiol* **37**: 839-855.
- Lowe, J. & L. A. Amos, (1998) Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**: 203-206.
- Lowe, J., F. van den Ent & L. A. Amos, (2004) Molecules of the bacterial cytoskeleton. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**: 177-198.
- Luppens, S. B. & J. M. ten Cate, (2005) Effect of biofilm model, mode of growth, and strain on streptococcusmutans protein expression as determined by two-dimensional difference gel electrophoresis. *J Proteome Res* **4**: 232-237.
- Mah, T. F., B. Pitts, B. Pellock, G. C. Walker, P. S. Stewart & G. A. O'Toole, (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* **426**: 306-310.
- Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman & B. G. Spratt, (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3140-3145.
- Mangalappalli-Illathu, A. K., J. R. Lawrence, G. D. Swerhone & D. R. Korber, (2008) Architectural adaptation and protein expression patterns of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms under laminar flow conditions. *Int J Food Microbiol* **123**: 109-120.
- Martinez-Gomariz, M., P. Perumal, S. Mekala, C. Nombela, W. L. Chaffin & C. Gil, (2009) Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*. *Proteomics* **9**: 2230-2252.
- Marzoa, J., S. Sanchez, C. M. Ferreiros & M. T. Criado, (2010) Identification of *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle complexes using 2-D high resolution clear native/SDS-PAGE. *J Proteome Res* **9**: 611-619.
- McCord, J. M. & I. Fridovich, (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**: 6049-6055.
- Mellin, J. R., S. Goswami, S. Grogan, B. Tjaden & C. A. Genco, (2007) A novel fur- and iron-regulated small RNA, NrrF, is required for indirect fur-mediated regulation of the *sdhA* and *sdhC* genes in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **189**: 3686-3694.
- Mendum, T. A., J. Newcombe, C. L. McNeilly & J. McFadden, (2009) Towards the immunoproteome of *Neisseria meningitidis*. *PLoS One* **4**: e5940.
- Mignogna, G., A. Giorgi, P. Stefanelli, A. Neri, G. Colotti, B. Maras & M. E. Schinina, (2005) Inventory of the proteins in *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *J Proteome Res* **4**: 1361-1370.
- Mikkelsen, H., Z. Duck, K. S. Lilley & M. Welch, (2007) Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**: 2411-2416.
- Mitrakul, K., C. Y. Loo, C. Gyurko, C. V. Hughes & N. Ganeshkumar, (2005) Mutational analysis of the *adcCBA* genes in *Streptococcus gordonii* biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol* **20**: 122-127.

- Monds, R. D., M. W. Silby & H. K. Mahanty, (2001) Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. *Mol Microbiol* **42**: 415-426.
- Moreno-Paz, M., M. J. Gomez, A. Arcas & V. Parro, (2010) Environmental transcriptome analysis reveals physiological differences between biofilm and planktonic modes of life of the iron oxidizing bacteria *Leptospirillum* spp. in their natural microbial community. *BMC Genomics* **11**: 404.
- Moscoso, M., E. Garcia & R. Lopez, (2006) Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J Bacteriol* **188**: 7785-7795.
- Moxon, E. R., W. A. Sweetman, M. E. Deadman, D. J. Ferguson & D. W. Hood, (2008) *Haemophilus influenzae* biofilms: hypothesis or fact? *Trends Microbiol* **16**: 95-100.
- Munford, R. S., C. L. Hall, J. M. Lipton & J. M. Dietschy, (1982) Biological activity, lipoprotein-binding behavior, and in vivo disposition of extracted and native forms of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharides. *J Clin Invest* **70**: 877-888.
- Murphy, T. F., C. Kirkham, S. Sethi & A. J. Lesse, (2005) Expression of a peroxiredoxin-glutaredoxin by *Haemophilus influenzae* in biofilms and during human respiratory tract infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **44**: 81-89.
- Namork, E. & P. Brandtzaeg, (2002) Fatal meningococcal septicaemia with "blebbing" meningococcus. *Lancet* **360**: 1741.
- Neil, R. B. & M. A. Apicella, (2009) Role of HrpA in biofilm formation of *Neisseria meningitidis* and regulation of the hrpBAS transcripts. *Infect Immun* **77**: 2285-2293.
- Neil, R. B., J. Q. Shao & M. A. Apicella, (2009) Biofilm formation on human airway epithelia by encapsulated *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Microbes Infect* **11**: 281-287.
- Newcombe, J., L. J. Eales-Reynolds, L. Wootton, A. R. Gorringer, S. G. Funnell, S. C. Taylor & J. J. McFadden, (2004) Infection with an avirulent *phoP* mutant of *Neisseria meningitidis* confers broad cross-reactive immunity. *Infect Immun* **72**: 338-344.
- Newman, J. R., S. Ghaemmaghami, J. Ihmels, D. K. Breslow, M. Noble, J. L. DeRisi & J. S. Weissman, (2006) Single-cell proteomic analysis of *S. cerevisiae* reveals the architecture of biological noise. *Nature* **441**: 840-846.
- Nigaud, Y., P. Cosette, A. Collet, P. C. Song, D. Vaudry, H. Vaudry, G. A. Junter & T. Jouenne, (2010) Biofilm-induced modifications in the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells. *Biochim Biophys Acta*.
- O'Dwyer, C. A., M. S. Li, P. R. Langford & J. S. Kroll, (2009) Meningococcal biofilm growth on an abiotic surface - a model for epithelial colonization? *Microbiology* **155**: 1940-1952.
- O'May, G. A., S. M. Jacobsen, M. Longwell, P. Stoodley, H. L. Mobley & M. E. Shirtliff, (2009) The high-affinity phosphate transporter Pst in *Proteus mirabilis* HI4320 and its importance in biofilm formation. *Microbiology* **155**: 1523-1535.
- O'Toole, G. A. & R. Kolter, (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**: 449-461.
- Oldham, M. L., A. L. Davidson & J. Chen, (2008) Structural insights into ABC transporter mechanism. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 726-733.
- Overton, T. W., R. Whitehead, Y. Li, L. A. Snyder, N. J. Saunders, H. Smith & J. A. Cole, (2006) Coordinated regulation of the *Neisseria gonorrhoeae*-truncated denitrification pathway by the nitric oxide-sensitive repressor, NsrR, and nitrite-insensitive NarQ-NarP. *J Biol Chem* **281**: 33115-33126.

- Pareja, E., P. Pareja-Tobes, M. Manrique, E. Pareja-Tobes, J. Bonal & R. Tobes, (2006) ExtraTrain: a database of Extragenic regions and Transcriptional information in prokaryotic organisms. *Bmc Microbiol* **6**: 29.
- Patrauchan, M. A., S. Sarkisova, K. Sauer & M. J. Franklin, (2005) Calcium influences cellular and extracellular product formation during biofilm-associated growth of a marine *Pseudoalteromonas* sp. *Microbiology* **151**: 2885-2897.
- Patrauchan, M. A., S. A. Sarkisova & M. J. Franklin, (2007) Strain-specific proteome responses of *Pseudomonas aeruginosa* to biofilm-associated growth and to calcium. *Microbiology* **153**: 3838-3851.
- Pawlowski, K., U. Klosse & F. J. de Bruijn, (1991) Characterization of a novel Azorhizobium caulinodans ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. *Mol Gen Genet* **231**: 124-138.
- Peltola, H., (1983) Meningococcal Disease - Still with Us. *Reviews of Infectious Diseases* **5**: 71-91.
- Peng, L. & K. Shimizu, (2003) Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 163-178.
- Planchon, S., M. Desvaux, I. Chafsey, C. Chambon, S. Leroy, M. Hebraud & R. Talon, (2009) Comparative subproteome analyses of planktonic and sessile *Staphylococcus xylosum* C2a: new insight in cell physiology of a coagulase-negative *Staphylococcus* in biofilm. *J Proteome Res* **8**: 1797-1809.
- Pollard, A. J. & C. Frasch, (2001) Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* **19**: 1327-1346.
- Prince, A. S., (2002) Biofilms, antimicrobial resistance, and airway infection. *N Engl J Med* **347**: 1110-1111.
- Qin, Z., Y. Ou, L. Yang, Y. Zhu, T. Tolker-Nielsen, S. Molin & D. Qu, (2007) Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **153**: 2083-2092.
- Que, Q. & J. D. Helmann, (2000) Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Mol Microbiol* **35**: 1454-1468.
- Rabilloud, T., (1999) Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline. *Methods Mol Biol* **112**: 9-19.
- Ram, R. J., N. C. Verberkmoes, M. P. Thelen, G. W. Tyson, B. J. Baker, R. C. Blake, 2nd, M. Shah, R. L. Hettich & J. F. Banfield, (2005) Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science* **308**: 1915-1920.
- Ramsing, N. B., M. Kuhl & B. B. Jorgensen, (1993) Distribution of sulfate-reducing bacteria, O₂, and H₂S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3840-3849.
- Rani, S. A., B. Pitts, H. Beyenal, R. A. Veluchamy, Z. Lewandowski, W. M. Davison, K. Buckingham-Meyer & P. S. Stewart, (2007) Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol* **189**: 4223-4233.
- Rappsilber, J., U. Ryder, A. I. Lamond & M. Mann, (2002) Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res* **12**: 1231-1245.
- Reinders, J., K. Wagner, R. P. Zahedi, D. Stojanovski, B. Eyrich, M. van der Laan, P. Rehling, A. Sickmann, N. Pfanner & C. Meisinger, (2007) Profiling phosphoproteins of yeast

- mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1896-1906.
- Ren, J., S. Sainsbury, S. E. Combs, R. G. Capper, P. W. Jordan, N. S. Berrow, D. K. Stammers, N. J. Saunders & R. J. Owens, (2007) The structure and transcriptional analysis of a global regulator from *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem* **282**: 14655-14664.
- Resch, A., S. Leicht, M. Saric, L. Pasztor, A. Jakob, F. Gotz & A. Nordheim, (2006) Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics* **6**: 1867-1877.
- Resch, A., R. Rosenstein, C. Nerz & F. Gotz, (2005) Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2663-2676.
- Rock, J. D., M. J. Thomson, R. C. Read & J. W. Moir, (2007) Regulation of denitrification genes in *Neisseria meningitidis* by nitric oxide and the repressor NsrR. *J Bacteriol* **189**: 1138-1144.
- Rose, I. A., M. Grunberg-Manago, S. R. Korey & S. Ochoa, (1954) Enzymatic phosphorylation of acetate. *J Biol Chem* **211**: 737-756.
- Rosenstein, N. E., B. A. Perkins, D. S. Stephens, T. Popovic & J. M. Hughes, (2001) Meningococcal disease. *N Engl J Med* **344**: 1378-1388.
- Sampathkumar, B., S. Napper, C. D. Carrillo, P. Willson, E. Taboada, J. H. Nash, A. A. Potter, L. A. Babiuk & B. J. Allan, (2006) Transcriptional and translational expression patterns associated with immobilized growth of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* **152**: 567-577.
- Sauer, K., (2003) The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol* **4**: 219.
- Sauer, K. & A. K. Camper, (2001) Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J Bacteriol* **183**: 6579-6589.
- Sauer, K., A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton & D. G. Davies, (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**: 1140-1154.
- Schagger, H. & G. von Jagow, (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368-379.
- Schauder, S., L. Penna, A. Ritton, C. Manin, F. Parker & G. Renaud-Mongenie, (2005) Proteomics analysis by two-dimensional differential gel electrophoresis reveals the lack of a broad response of *Neisseria meningitidis* to in vitro-produced AI-2. *J Bacteriol* **187**: 392-395.
- Schembri, M. A., K. Kjaergaard & P. Klemm, (2003) Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* **48**: 253-267.
- Schielke, S., M. Frosch & O. Kurzai, (2010a) Virulence determinants involved in differential host niche adaptation of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Med Microbiol Immunol*.
- Schielke, S., C. Huebner, C. Spatz, V. Nagele, N. Ackermann, M. Frosch, O. Kurzai & A. Schubert-Unkmeir, (2009) Expression of the meningococcal adhesin NadA is controlled by a transcriptional regulator of the MarR family. *Mol Microbiol* **72**: 1054-1067.
- Schielke, S., C. Schmitt, C. Spatz, M. Frosch, A. Schubert-Unkmeir & O. Kurzai, (2010b) The transcriptional repressor FarR is not involved in meningococcal fatty acid resistance mediated by the FarAB efflux pump and dependent on lipopolysaccharide structure. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3160-3169.

- Schmitt, M. P., (2002) Analysis of a DtxR-like metalloregulatory protein, MntR, from *Corynebacterium diphtheriae* that controls expression of an ABC metal transporter by an Mn(2+)-dependent mechanism. *J Bacteriol* **184**: 6882-6892.
- Schoen, C., J. Blom, H. Claus, A. Schramm-Gluck, P. Brandt, T. Muller, A. Goesmann, B. Joseph, S. Konietzny, O. Kurzai, C. Schmitt, T. Friedrich, B. Linke, U. Vogel & M. Frosch, (2008) Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3473-3478.
- Schoen, C., H. Tettelin, J. Parkhill & M. Frosch, (2009) Genome flexibility in *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* **27 Suppl 2**: B103-111.
- Schryvers, A. B. & G. C. Gonzalez, (1989) Comparison of the abilities of different protein sources of iron to enhance *Neisseria meningitidis* infection in mice. *Infect Immun* **57**: 2425-2429.
- Schryvers, A. B. & L. J. Morris, (1988a) Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **56**: 1144-1149.
- Schryvers, A. B. & L. J. Morris, (1988b) Identification and characterization of the transferrin receptor from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **2**: 281-288.
- Schryvers, A. B. & I. Stojiljkovic, (1999) Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **32**: 1117-1123.
- Schwartz, B., P. S. Moore & C. V. Broome, (1989) Global epidemiology of meningococcal disease. *Clin Microbiol Rev* **2 Suppl**: S118-124.
- Seib, K. L., H. J. Tseng, A. G. McEwan, M. A. Apicella & M. P. Jennings, (2004) Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: distinctive systems for different lifestyles. *J Infect Dis* **190**: 136-147.
- Seib, K. L., H. J. Wu, S. P. Kidd, M. A. Apicella, M. P. Jennings & A. G. McEwan, (2006) Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a system tailored for a challenging environment. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 344-361.
- Seib, K. L., H. J. Wu, Y. N. Srikhanta, J. L. Edwards, M. L. Falsetta, A. J. Hamilton, T. L. Maguire, S. M. Grimmond, M. A. Apicella, A. G. McEwan & M. P. Jennings, (2007) Characterization of the OxyR regulon of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **63**: 54-68.
- Serra, D. O., G. Lucking, F. Weiland, S. Schulz, A. Gorg, O. M. Yantorno & M. Ehling-Schulz, (2008) Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics* **8**: 4995-5010.
- Shaw, M. M. & B. M. Riederer, (2003) Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **3**: 1408-1417.
- Sim, R. J., M. M. Harrison, E. R. Moxon & C. M. Tang, (2000) Underestimation of meningococci in tonsillar tissue by nasopharyngeal swabbing. *Lancet* **356**: 1653-1654.
- Sjolinder, H. & A. B. Jonsson, (2007) Imaging of disease dynamics during meningococcal sepsis. *PLoS One* **2**: e241.
- Snijder, H. J., I. Ubarretxena-Belandia, M. Blaauw, K. H. Kalk, H. M. Verheij, M. R. Egmond, N. Dekker & B. W. Dijkstra, (1999) Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature* **401**: 717-721.
- Soler-Garcia, A. A. & A. E. Jerse, (2004) A *Neisseria gonorrhoeae* catalase mutant is more sensitive to hydrogen peroxide and paraquat, an inducer of toxic oxygen radicals. *Microb Pathog* **37**: 55-63.

- Southey-Pillig, C. J., D. G. Davies & K. Sauer, (2005) Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **187**: 8114-8126.
- Spencer, M. E. & J. R. Guest, (1987) Regulation of citric acid cycle genes in facultative bacteria. *Microbiol Sci* **4**: 164-168.
- Spurr, A. R., (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* **26**: 31-43.
- Stephens, D. S., (1999) Uncloaking the meningococcus: dynamics of carriage and disease. *Lancet* **353**: 941-942.
- Stephens, D. S., (2007) Conquering the meningococcus. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 3-14.
- Sternberg, C., B. B. Christensen, T. Johansen, A. Toftgaard Nielsen, J. B. Andersen, M. Givskov & S. Molin, (1999) Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4108-4117.
- Stewart, P. S. & J. W. Costerton, (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**: 135-138.
- Stewart, P. S. & M. J. Franklin, (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**: 199-210.
- Steyn, B., M. C. Oosthuizen, R. MacDonald, J. Theron & V. S. Brozel, (2001) The use of glass wool as an attachment surface for studying phenotypic changes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **1**: 871-879.
- Stoodley, P., S. Wilson, L. Hall-Stoodley, J. D. Boyle, H. M. Lappin-Scott & J. W. Costerton, (2001) Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5608-5613.
- Storz, G. & J. A. Imlay, (1999) Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* **2**: 188-194.
- Stuart, J. M., K. A. Cartwright, J. A. Dawson, J. Rickard & N. D. Noah, (1988) Risk factors for meningococcal disease: a case control study in south west England. *Community Med* **10**: 139-146.
- Sutherland, I. W., (2001) The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* **9**: 222-227.
- Tang, F., C. Barbacioru, E. Nordman, B. Li, N. Xu, V. I. Bashkirov, K. Lao & M. A. Surani, (2010) RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. *Nat Protoc* **5**: 516-535.
- Tang, F., C. Barbacioru, Y. Wang, E. Nordman, C. Lee, N. Xu, X. Wang, J. Bodeau, B. B. Tuch, A. Siddiqui, K. Lao & M. A. Surani, (2009) mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* **6**: 377-382.
- Tettelin, H., N. J. Saunders, J. Heidelberg, A. C. Jeffries, K. E. Nelson, J. A. Eisen, K. A. Ketchum, D. W. Hood, J. F. Peden, R. J. Dodson, W. C. Nelson, M. L. Gwinn, R. DeBoy, J. D. Peterson, E. K. Hickey, D. H. Haft, S. L. Salzberg, O. White, R. D. Fleischmann, B. A. Dougherty, T. Mason, A. Ciecko, D. S. Parksey, E. Blair, H. Cittone, E. B. Clark, M. D. Cotton, T. R. Utterback, H. Khouri, H. Qin, J. Vamathevan, J. Gill, V. Scarlato, V. Masignani, M. Pizza, G. Grandi, L. Sun, H. O. Smith, C. M. Fraser, E. R. Moxon, R. Rappuoli & J. C. Venter, (2000) Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* **287**: 1809-1815.
- Thomas, C. E. & P. F. Sparling, (1996) Isolation and analysis of a fur mutant of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **178**: 4224-4232.
- Thompson, E. A., I. M. Feavers & M. C. Maiden, (2003) Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. *Microbiology* **149**: 1849-1858.

- Tremoulet, F., O. Duche, A. Namane, B. Martinie & J. C. Labadie, (2002) Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. *FEMS Microbiol Lett* **210**: 25-31.
- Trotter, C. L., M. Chandra, R. Cano, A. Larrauri, M. E. Ramsay, C. Brehony, K. A. Jolley, M. C. Maiden, S. Heuberger & M. Frosch, (2007) A surveillance network for meningococcal disease in Europe. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 27-36.
- Tsai, C. M. & C. E. Frasch, (1982) A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **119**: 115-119.
- Tseng, H. J., A. G. McEwan, M. A. Apicella & M. P. Jennings, (2003) OxyR acts as a repressor of catalase expression in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **71**: 550-556.
- Tseng, H. J., Y. Srikhanta, A. G. McEwan & M. P. Jennings, (2001) Accumulation of manganese in *Neisseria gonorrhoeae* correlates with resistance to oxidative killing by superoxide anion and is independent of superoxide dismutase activity. *Mol Microbiol* **40**: 1175-1186.
- Tully, J., R. M. Viner, P. G. Coen, J. M. Stuart, M. Zambon, C. Peckham, C. Booth, N. Klein, E. Kaczmarek & R. Booy, (2006) Risk and protective factors for meningococcal disease in adolescents: matched cohort study. *BMJ* **332**: 445-450.
- Tunio, S. A., N. J. Oldfield, A. Berry, D. A. Ala'aldeen, K. G. Wooldridge & D. P. Turner, (2010) The moonlighting protein fructose-1, 6-bisphosphate aldolase of *Neisseria meningitidis*: surface localization and role in host cell adhesion. *Mol Microbiol*.
- Tzeng, Y. L., C. M. Kahler, X. Zhang & D. S. Stephens, (2008) MisR/MisS two-component regulon in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **76**: 704-716.
- Tzeng, Y. L. & D. S. Stephens, (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microbes Infect* **2**: 687-700.
- Uli, L., L. Castellanos-Serra, L. Betancourt, F. Dominguez, R. Barbera, F. Sotolongo, G. Guillen & R. Pajon Feyt, (2006) Outer membrane vesicles of the VA-MENGO-BC vaccine against serogroup B of *Neisseria meningitidis*: Analysis of protein components by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **6**: 3389-3399.
- Unkmeir, A., K. Latsch, G. Dietrich, E. Wintermeyer, B. Schinke, S. Schwender, K. S. Kim, M. Eigenthaler & M. Frosch, (2002) Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol Microbiol* **46**: 933-946.
- Vieusseux, M., (1805) Mémoire sur la maladie qui a régné à Genève au printemps de 1805. *J Med Chir Pharm* **11**: 163-182.
- Vilain, S. & V. S. Brozel, (2006) Multivariate approach to comparing whole-cell proteomes of *Bacillus cereus* indicates a biofilm-specific proteome. *J Proteome Res* **5**: 1924-1930.
- Vilain, S., P. Cosette, I. Zimmerlin, J. P. Dupont, G. A. Junter & T. Jouenne, (2004) Biofilm proteome: homogeneity or versatility? *J Proteome Res* **3**: 132-136.
- Vipond, C., J. Suker, C. Jones, C. Tang, I. M. Feavers & J. X. Wheeler, (2006) Proteomic analysis of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine prepared from the group B strain NZ98/254. *Proteomics* **6**: 3400-3413.
- Vogel, U., S. Hammerschmidt & M. Frosch, (1996) Sialic acids of both the capsule and the sialylated lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup B are prerequisites for virulence of meningococci in the infant rat. *Med Microbiol Immunol* **185**: 81-87.
- Vogel, U., A. Weinberger, R. Frank, A. Muller, J. Kohl, J. P. Atkinson & M. Frosch, (1997) Complement factor C3 deposition and serum resistance in isogenic capsule and

- lipooligosaccharide sialic acid mutants of serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **65**: 4022-4029.
- Waite, R. D., A. Paccanaro, A. Papakonstantinou, J. M. Hurst, M. Saqi, E. Littler & M. A. Curtis, (2006) Clustering of *Pseudomonas aeruginosa* transcriptomes from planktonic cultures, developing and mature biofilms reveals distinct expression profiles. *BMC Genomics* **7**: 162.
- Waite, R. D., A. Papakonstantinou, E. Littler & M. A. Curtis, (2005) Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* growth: comparison of gene expression in planktonic cultures and developing and mature biofilms. *J Bacteriol* **187**: 6571-6576.
- Wallis, M. A. & R. L. Griffin, (1973) A routine method for embedding animal tissues in Spurr resin for electron microscopy. *J Clin Pathol* **26**: 77-78.
- Weber, M. V., H. Claus, M. C. Maiden, M. Frosch & U. Vogel, (2006) Genetic mechanisms for loss of encapsulation in polysialyltransferase-gene-positive meningococci isolated from healthy carriers. *Int J Med Microbiol* **296**: 475-484.
- Webster, P., S. Wu, G. Gomez, M. Apicella, A. G. Plaut & J. W. S. Geme, (2006) Distribution of bacterial proteins in biofilms formed by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *J Histochem Cytochem* **54**: 829-842.
- Weichselbaum, A., (1887) Ueber die aetiologie der akuten meningitis cerebro-spinalis. *Fortschr Med* **5**: 573-583.
- Werner, E., F. Roe, A. Bugnicourt, M. J. Franklin, A. Heydorn, S. Molin, B. Pitts & P. S. Stewart, (2004) Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6188-6196.
- West, N. P., P. J. Sansonetti, G. Frankel & C. M. Tang, (2003) Finding your niche: what has been learnt from STM studies on GI colonization. *Trends Microbiol* **11**: 338-344.
- Wheeler, J. X., C. Vipond & I. M. Feavers, (2007) Exploring the proteome of meningococcal outer membrane vesicle vaccines. *Proteomics Clin. Appl.* **1**: 1198-1210.
- Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas & J. S. Mattick, (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**: 1487.
- Whiteley, M., M. G. Banger, R. E. Bumgarner, M. R. Parsek, G. M. Teitzel, S. Lory & E. P. Greenberg, (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**: 860-864.
- Wilks, K. E., K. L. Dunn, J. L. Farrant, K. M. Reddin, A. R. Gorringer, P. R. Langford & J. S. Kroll, (1998) Periplasmic superoxide dismutase in meningococcal pathogenicity. *Infect Immun* **66**: 213-217.
- Williams, J. N., P. J. Skipp, H. E. Humphries, M. Christodoulides, C. D. O'Connor & J. E. Heckels, (2007) Proteomic analysis of outer membranes and vesicles from wild-type serogroup B *Neisseria meningitidis* and a lipopolysaccharide-deficient mutant. *Infect Immun* **75**: 1364-1372.
- Williams, J. N., P. J. Skipp, C. D. O'Connor, M. Christodoulides & J. E. Heckels, (2009) Immunoproteomic analysis of the development of natural immunity in subjects colonized by *Neisseria meningitidis* reveals potential vaccine candidates. *Infect Immun* **77**: 5080-5089.
- Wolfe, A. J., (2005) The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 12-50.
- Wolff, S., A. Otto, D. Albrecht, J. S. Zeng, K. Buttner, M. Gluckmann, M. Hecker & D. Becher, (2006) Gel-free and gel-based proteomics in *Bacillus subtilis*: a comparative study. *Mol Cell Proteomics* **5**: 1183-1192.
- Wu, H., A. A. Soler-Garcia & A. E. Jerse, (2009) A strain-specific catalase mutation and mutation of the metal-binding transporter gene *mntC* attenuate *Neisseria*

- gonorrhoeae in vivo but not by increasing susceptibility to oxidative killing by phagocytes. *Infect Immun* **77**: 1091-1102.
- Wu, H. J., K. L. Seib, Y. N. Srikhanta, S. P. Kidd, J. L. Edwards, T. L. Maguire, S. M. Grimmond, M. A. Apicella, A. G. McEwan & M. P. Jennings, (2006) PerR controls Mn-dependent resistance to oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **60**: 401-416.
- Xu, K. D., P. S. Stewart, F. Xia, C. T. Huang & G. A. McFeters, (1998) Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4035-4039.
- Yasuda, H., Y. Ajiki, J. Aoyama & T. Yokota, (1994) Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in-vitro bacterial biofilm models. *J Med Microbiol* **41**: 359-367.
- Yi, K., A. W. Rasmussen, S. K. Gudlavalleti, D. S. Stephens & I. Stojiljkovic, (2004) Biofilm formation by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **72**: 6132-6138.
- Yi, K., D. S. Stephens & I. Stojiljkovic, (2003) Development and evaluation of an improved mouse model of meningococcal colonization. *Infect Immun* **71**: 1849-1855.
- Zarantonelli, M. L., M. Szatanik, D. Giorgini, E. Hong, M. Huerre, F. Guillou, J. M. Alonso & M. K. Taha, (2007) Transgenic mice expressing human transferrin as a model for meningococcal infection. *Infect Immun* **75**: 5609-5614.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

2-DE	2D-Gelelektrophorese	mg	Milligramm
Å	Ångström	µg	Mikrogramm
ABC	ATP-binding-cassette	ml	Milliliter
absol.	absolut	µl	Mikroliter
ad	auffüllen bis	mm	Millimeter
ADP	Adenosindiphosphat	µm	Mikrometer
APS	Ammoniumsulfat	mM	millimolar
AS	Aminosäure	µM	mikromolar
ASB-14	Amidosulfobetaine-14	min	Minute
ATP	Adenosintriphosphat	MS	Massenspektrometrie
bp	Basenpaare	MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
BSA	Bovines Serumalbumin	NaCaCo	Natriumcacodylat
bzw.	beziehungsweise	NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (ox.)
°C	Grad Celsius	NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (red.)
ca.	circa	n.d.	nicht durchgeführt
CFU	<i>colony forming units</i> , koloniebildende Einheiten	NDM	<i>Neisseria Defined Medium</i>
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>	nm	Nanometer
cm	Zentimeter	OD	optische Dichte
cnl	<i>capsule null locus</i> , Kapsel Null Lokus	Ω	Ohm
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	p.a.	<i>pro analysis</i>
dest.	destilliert	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBS	<i>Phosphate buffered sialine</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA	pI	isoelektrischer Punkt
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	pox	Meerrettichperoxidase
emPAI	<i>exponentially modified protein abundance index</i>	PP	Polypropylen
g	Gramm	PPM	Proteose-Pepton-Medium
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	RNA	Ribonukleinsäure
GC	Gonokokken	ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
GFP	grün fluoreszierendes Protein	rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
h	Stunde	RT	Raumtemperatur
IEF	isoelektrische Fokussierung	s, sec	Sekunde
IPG	<i>immobilized pH gradient</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
kb	Kilobasenpaare	ST	Sequenztyp
k.D.	keine Daten	TCA	<i>trichloroacetic acid</i> , Trichloressigsäure
kDa	Kilo-Dalton	TEMED	Tetramethylethyldiamin
konz.	konzentriert	TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
kV	Kilo-Volt	U	Units
l	Liter	ÜN	über Nacht
LPS	Lipopolysaccharid	u.a.	unter anderem
µF	Mikro-Farad	UV	ultraviolett
		V	Volt
		WT	Wildtyp

8.2 Danksagung

Ich danke allen, die diese Arbeit durch Diskussionen und durch technische und freundschaftliche Unterstützung überhaupt erst möglich gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt...

Herrn Prof. Dr. Ulrich Vogel für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, die Betreuung meiner Doktorarbeit und die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Vielen Dank für das stetige Interesse an meiner Arbeit.

Frau PD Dr. Heike Claus für die ausgezeichnete Betreuung während meiner Zeit im Labor, die hilfreichen Anmerkungen zu dieser Arbeit und die immerwährende Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Kreft für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Matthias Frosch für die Möglichkeit am IHM Würzburg zu promovieren.

Herrn Prof. Dr. Thomas Hünig als Sprecher des Graduiertenkollegs „Immunomodulation“ für die Finanzierung dieser Arbeit und die Ausbildung in der Immunologie.

Frau Prof. Dr. Heidrun Moll für die Teilnahme am Promotionskomitee der GSLS.

Herrn Prof. Dr. Albert Sickmann und seinen Mitarbeitern Dr. René Zahedi und Dr. Katrin Lokaj für die Durchführung der Massenspektrometrie und des Spectral Countings.

Herrn Prof. Dr. Rudolf Martini für die Möglichkeit, licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen der Biofilme zu machen. Vielen Dank an Dr. Stefan Fischer, Janos Groh und Heinrich Blazyca für die technische Hilfe.

allen aktuellen (Angelika, Anna-Lena, Cacho, Christina, Frank, Ines, Johannes, Kerstin, Marie-Christin, Martin und Sophia) und ehemaligen (Evelyn, Isabell) Mitgliedern der AG Vogel für ein tolles Arbeitsklima. Ein besonderer Dank gilt Martin für die Diskussionen und Anregungen zum Thema Biofilme.

den weiteren Mitarbeitern des IHM Würzburg für die nette Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank gilt Nina Trzeciak, Kathi Engelhard und der AG Brehm (ich war sehr gerne ein „Echi Plus“). Das Schafkopfspielen in der Mittagspause mit Sabine Lorenz, Sarah Hemer, Moni Bergmann, Verena Germeldin und Stephanie Schielke hat mir viel Spaß gemacht, ebenso wie die „Erste Würzburger Kochrunde“ mit Stephanie Schielke, Andrea Villwock und Iwona Wozniok.

den Mitgliedern des Graduiertenkollegs „Immunomodulation“ für den tiefen Einblick in die Immunologie und die entstandenen Freundschaften, besonders mit Elisa Monzón-Casanova und Christiane Hammerschmidt-Kamper.

meinen Freunden in Rheine, Münster und Berlin für die moralische Unterstützung und ihr Verständnis auch über 400 km Entfernung.

Sarah Hemer, Sabine Lorenz und Stephanie Schielke für eine Freundschaft, die ich nicht mehr missen will.

meinem Freund Sebastian für die wunderschönen Wochenenden und vieles mehr.

meiner Familie für die liebevolle Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen. Besonders danke ich meinem Bruder Helge und seiner Freundin Nadine für Rat und Tat in allen Lebenslagen und vor allem meinen Eltern, da sie immer für mich da waren und an mich geglaubt haben!

Vielen Dank!

8.4 Publikationen

Ergebnisse, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation erarbeitet wurden, sind zum Teil publiziert oder zur Veröffentlichung eingereicht worden:

van Alen T, Claus H, Zahedi R, Lappann M, Groh J, Blazyca H, Sickmann A, Vogel U. (2010) Comparative proteomic analysis of biofilm and planktonic cells of *Neisseria meningitidis*. Eingereicht, in Revision.

Lappann M, Claus H, van Alen T, Harmsen M, Elias J, Molin S, Vogel U. (2010) A dual role of extracellular DNA during biofilm formation of *Neisseria meningitidis*. *Molecular Microbiology* **75**, 1355-1371.

Zusätzlich wurden Inhalte dieser Arbeit auf Tagungen (Vorträge und Poster) vorgestellt.

Vorträge

Vogel U, Lappann M, van Alen T. Molecular mechanisms of biofilm formation in *Neisseria meningitidis* (A-10), SFB 479 im Rahmen des Mikrobiologischen Kolloquiums. Würzburg, Deutschland. 07/2008

van Alen T, Claus H, Lappann M, Denker K, Sickmann A, Vogel U. Changes in the proteome of *Neisseria meningitidis* during biofilm formation. 2nd Network Meeting Würzburg (GK 520), Tübingen (GK 794) & Erlangen (GK 592). Wildbad, Rothenburg ob der Tauber, Deutschland. 06/2008

van Alen T, Claus H, Lappann M, Vogel U. Searching for antigens: Proteome analysis of meningococcal biofilms. 1st Network Meeting Würzburg (GK 520), Tübingen (GK 794) & Erlangen (GK 592). Kloster Banz, Deutschland. 05/2007

Poster

van Alen T, Claus H, Zahedi R, Lappann M, Martini R, Denker K, Sickmann A, Vogel U. Comparative proteomic analysis of biofilm and planktonic cells of *Neisseria meningitidis*. 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Hannover, Deutschland. 03/2010

van Alen T, Claus H, Lappann M, Denker K, Zahedi R, Sickmann A, Vogel U. Proteomic changes in *Neisseria meningitidis* biofilms revealed upregulation of *mntC*. 4th Network Meeting Würzburg (GK 520), Tübingen (GK 794) & Erlangen (GK 592). Kloster Schöntal, Deutschland. 11/2009

van Alen T, Claus H, Lappann M, Denker K, Sickmann A, Vogel U. Comparative proteome analysis of *Neisseria meningitidis* biofilm and planktonic cells. 3. Kongress der Europäischen Mikrobiologen (FEMS). Göteborg, Schweden. 07/2009

van Alen T, Claus H, Lappann M, Denker K, Sickmann A, Vogel U. Changes in the proteome of *Neisseria meningitidis* during biofilm formation. 4. Internationale Studenten Symposium. Würzburg, Deutschland. 03/2009

van Alen T, Lappann M, Claus H, Denker K, Sickmann A, Vogel U. Quantitative proteome analysis of *Neisseria meningitidis* biofilms. 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Dresden, Deutschland. 09/2008

van Alen T, Claus H, Lappann M, Denker K, Sickmann A, Vogel U. Life in a sessile community: how protein expression changes during meningococcal biofilm formation. International Pathogenic *Neisseria* Conference (IPNC). Rotterdam, Niederlande. 09/2008