

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

Mutagenese der Kapsel-O-Acetyltransferase OatC von Serogruppe C  
Meningokokken

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

Fabian Spielmann  
aus Thurnau

Würzburg, August 2010

Referent: Prof. Dr. med. U. Vogel

Koreferentin: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Kolb-Meurer

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25. November 2010

Der Promovend ist Arzt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Neisseria meningitidis</i> . . . . .	1
1.2	Kapselpolysaccharide von Meningokokken . . . . .	2
1.3	Kapsel-O-Acetylierung . . . . .	3
1.4	Ziele der vorliegenden Arbeit . . . . .	5
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>6</b>
2.1	Material . . . . .	6
2.1.1	Geräte . . . . .	6
2.1.2	Verbrauchsmaterial . . . . .	7
2.1.3	Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme . . . . .	7
2.1.4	Antikörper . . . . .	9
2.1.5	Puffer und Lösungen . . . . .	10
2.1.6	Bakterienstämme . . . . .	13
2.1.7	Nährmedien . . . . .	14
2.1.8	Kulturbedingungen . . . . .	14
2.1.9	Plasmide . . . . .	15
2.1.10	Oligonukleotide . . . . .	15
2.2	Methoden . . . . .	15
2.2.1	DNA-Methoden . . . . .	15
2.2.2	Immunoassays . . . . .	22
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1	Herstellung einer Meningokokkenmutante mit <i>oatC</i> -Deletion . . . . .	25
3.2	Schrittweise Verkürzung von OatC . . . . .	26
3.3	Gerichtete Mutagenese von OatC . . . . .	28
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>51</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 *Neisseria meningitidis*

Neisserien sind gram-negative Diplokokken. Sie gehören der Familie der *Neisseriaceae* an, zu der auch die Genera *Eikenella* und *Kingella* gezählt werden [40].

*N. meningitidis* gilt als wichtiger Erreger der bakteriellen Meningitis, die erstmals als eigenständiges Krankheitsbild 1805 von Vieusseux in Genf beschrieben wurde [97]. 1887 wurde *N. meningitidis* von Weichselbaum in Wien als Erreger nachgewiesen [104].

Bei der klassischen Meningokokken-Meningitis treten zwei bis sieben Tage nach Infektion sehr starke Kopfschmerzen mit Fieber und Erbrechen auf. Häufig sind die neurologischen Meningitiszeichen nach Kernig und Brudzinski positiv [51, 17]. Zusätzlich treten allgemeine Zeichen einer Sepsis auf (erhöhte oder erniedrigte Körpertemperatur, Tachykardie, Tachypnoe, Hypotonie, Multiorganversagen, Waterhouse-Friderichsen-Syndrom *etc.*) [82, 19].

Die phänotypische Klassifikation von Meningokokken erfolgt gewöhnlich nach der Kapselstruktur und gestattet eine Einteilung in 12 Serogruppen (A, B, C, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y, Z), wobei die klinisch bedeutsamsten Serogruppen A, B, C, W135 und Y sind [36]. Es kann darüber hinaus auch eine Einteilung nach genotypischen Kriterien vorgenommen werden, z. B. durch sog. *Multi Locus Sequence Typing (MLST)* [30].

Einen Überblick über die Klassifikationsmöglichkeiten von Meningokokken gibt Tabelle 1.

	Phänotyp	Genotyp
Kapsel	Serogruppe [72]	Serogenotyp [43]
PorA	Serosubtyp [64]	PorA-Genotyp (VR1, VR2) [85]
PorB	Serotyp [32]	PorB-Genotyp [81]
FetA	-	FetA-Genotyp [94]
Lipooligosaccharid	Immunotyp [32, 3, 2]	-
Stoffwechselfgene	MLEE [87, 21]	MLST [63]

Tabelle 1: Typisierung von Meningokokken.

Ein Häufigkeitsgipfel durch *N. m.* ausgelöster Meningitiden in Deutschland liegt bei 0-4 Jahren, ein weiterer bei 15-19 Jahren. Die überwiegende Anzahl von durch Meningokokken verursachten Hirnhautentzündungen wird hierzulande durch Sero-

gruppe B-Stämme ausgelöst, bei den Infektionen im Alter von 15-19 Jahren (und älter) spielt jedoch auch Serogruppe C eine wichtige Rolle [1]. Die Serogruppe A ist hauptsächlich verantwortlich für Meningitis-Epidemien im sog. "Meningitisgürtel", der sich südlich der Sahara befindet und sich von Senegal, Gambia und Guinea im Westen über Zentralafrika bis nach Äthiopien und Kenia erstreckt [4].

Studien an gesunden Probanden erbrachten durchschnittliche Trägerraten von ca. 10% für Meningokokken [24, 20, 91, 95].

## 1.2 Kapselpolysaccharide von Meningokokken

Allgemein wird angenommen, dass Kapselpolysaccharide von Bakterien zum einen gegen Austrocknung schützen, zum anderen die Interaktion des Bakteriums mit dem Wirtsorganismus beeinflussen [70]. Ihr Vorhandensein wird auch bei Meningokokken als sehr wichtiger Pathogenitätsfaktor angesehen. Es wird postuliert, dass die Kapsel Meningokokken ein längeres Überleben außerhalb des Wirtes ermöglicht [99], wobei es Gegenstand aktueller Forschung ist, inwieweit dies tatsächlich Einfluss auf die Übertragung hat, zu der es hauptsächlich durch langen und engen Körperkontakt kommt [35]. Studien mit bekapselten Serogruppe B Meningokokken ergaben, dass diese in der Lage sind, auf Glasoberflächen kaum länger als 20 Stunden zu überleben [92], auf porösen Oberflächen vermutlich deutlich länger [8]. Invasive Stämme sind in nahezu allen Fällen bekapselt [100]. Am Infektionsmodell der neugeborenen Ratte konnte gezeigt werden, dass Bekapselung eine unabdingbare Voraussetzung für das Überleben im immunkompetenten Wirtsorganismus ist [101]. Sie spielt auch eine wichtige Rolle für das intrazelluläre Überleben von Meningokokken [89].

Die Kapseln von Meningokokken der Serogruppen B, C, W135 und Y sind aus Sialinsäuren (PolySia) zusammengesetzt [36].

Als Sialinsäuren werden acetylierte Neuraminsäuren, z. B. N-Acetyl-Neuraminsäure und N-Glycolyl-Neuraminsäure [15], bezeichnet. Polysialinsäuren sind Homopolymere von Neuraminsäuren, im Falle der Serogruppe B und C Meningokokken N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) [61]. Die Neu5Ac-Monomere sind bei Serogruppe B Meningokokken  $\alpha(2-8)$ -, bei Serogruppe C Meningokokken  $\alpha(2-9)$ -verknüpft [14].

Die Verknüpfung wird durch die Polysialyltransferase SiaD (kodiert in der cps-Region A des Meningokokken-Genoms) katalysiert, die zunächst an Serogruppe B Meningokokken erforscht wurde [65, 28]. Die Neu5Ac-Monomere werden in einem vierstufigen Prozess in Cytidinmonophosphat-Neu5Ac (CMP-Neu5Ac) umgewandelt und  $\alpha(2-8)$ -verknüpft [37, 28]. Die Enzyme, die die jeweiligen Schritte katalysieren, werden durch die Gene *siaA*, *siaB*, *siaC* und *siaD* kodiert [37, 34, 28].

Während die Gene *siaA*, *siaB* und *siaC* bei den Serogruppen B, C, W135 und Y identisch sind, gibt es für die jeweiligen Serogruppen spezifische *siaD*-Gene und damit spezifische Polysialyltransferasen [36]: Die Serogruppen W135 und Y besitzen fast identische Gene [25]. Die Serogruppen B und C weisen relativ große Homologien in den *siaD*-Genen auf, es gibt jedoch praktisch keine Homologie zwischen den *siaD*-Genen der Serogruppen B und C bzw. W135 und Y [93, 25].

Außer in der Kapsel von Bakterien kommen Polysialinsäuren z. B. auch in neuralem und nicht-neuralem Gewebe und in bestimmten Tumorgeweben (z. B. bei neuroektodermalen Tumoren) vor.

### 1.3 Kapsel-O-Acetylierung

Während bei Serogruppe B-Meningokokken keine O-Acetylierung der Sialinsäure-Kapsel bekannt ist [36], konnte die O-Acetylierung des Kapselpolysaccharids bei den Meningokokken Serogruppen A [18], C [14], W135 [58] und Y [13] nachgewiesen werden.

Die O-Acetyltransferasen der Meningokokken-Serogruppen W135 und Y, von *E. coli* K1, *Campylobacter jejuni*, B-Streptokokken und *Staphylococcus aureus* Serotyp 5 gehören zu den sog. *Hexapeptide-Repeat-Acyltransferasen*, die sich durch Wiederholung von charakteristischen Hexapeptid-Motiven auszeichnen [26, 10, 48, 59]. Eine Untergruppe der *Hexapeptide-Repeat-Acyltransferasen* ist die Gruppe der NodL-LacA-CysE-Acyltransferasen, die nach den ersten drei entdeckten Mitgliedern benannt wurde [103, 27]: NodL (*Rhizobium leguminosarum*), LacA (*E. coli*) und CysE (*E. coli*). Mitglieder der Gruppe nutzen Acetyl-CoA als Acetylgruppen-Donor und haben ihr aktives Zentrum in der Nähe des Carboxy-Terminus (C-Terminus) [103, 27]. Die *Hexapeptide-Repeat-Acyltransferase* NeuO von *E. coli* K1 ist verantwortlich für die fakultative O-Acetylierung (an C-7 und C-9) der Bakterienkapsel [77, 26, 10], die aus  $\alpha(2-8)$ -verknüpften Homopolymeren von Neu5Ac besteht und den Hauptpathogenitätsfaktor darstellt [78, 60]. Untersuchungen ergaben, dass NeuO hoch spezifisch diese Kapselstruktur O-acetyliert. Als für die Funktion des Enzyms essentiell erwiesen sich His-119 und Trp-143, die als Teil des katalytischen Zentrums vermutet werden [10]. Kapsel-O-Acetylierung erhöht bei *E. coli* K1 die Resistenz des Bakteriums gegen Austrocknung und reduziert die Biofilmbildung [69]. Ein Einfluss der O-Acetylierung auf die Virulenz von *E. coli* K1 wird angenommen [31].

Ein bekannter Vertreter der NodL-LacA-CysE Acyltransferasen ist NeuD von *Campylobacter jejuni*. Das Enzym O-acetyliert terminal  $\alpha(2-8)$ -verknüpfte Sialinsäuren des Kapselpolysaccharids an C-9 [48]. Ebenfalls zur Gruppe der NodL-LacA-CysE

O-Acetyltransferasen gehört OatWY. Es ist bei den Meningokokken-Serogruppen W135 und Y für die O-Acetylierung von Neu5Ac an C-7 und C-9 verantwortlich [23]. Auch bei NeuD, der O-Acetyltransferase von B-Streptokokken wurden Sequenzhomologien mit den NodL-LacA-CysE O-Acetyltransferasen nachgewiesen [5, 59]. Des Weiteren gehört auch Cap5H, die O-Acetyltransferase von *S. aureus* Serotyp 5, zu den NodL-LacA-CysE O-Acetyltransferasen [12].

Keiner bisher bekannten Gruppe von O-Acetyltransferasen, jedoch der Enzym-Superfamilie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen, konnte MynC von Serogruppe A-Meningokokken zugeordnet werden, das das N-Acetyl-D-Mannosamin-1-Phosphat (ManNAc-1P) fakultativ an C-3 bzw. C-4 O-acetyliert [42]. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass sich in immunologischen Studien das de-O-acetylierte Serogruppe A-Kapselpolysaccharid als weit weniger immunogen als das O-acetylierte herausgestellt hat [11].

Über die epidemiologische und funktionelle Bedeutung der Kapsel-O-Acetylierung bei Serogruppe C Meningokokken ist bislang noch wenig bekannt. Untersuchungen in England 1999 ergaben, dass O-acetylierte in 3% der Fälle und de-O-acetylierte Stämme in 5% der Fälle pathogen waren [16]. Serogruppe C Meningokokken waren bei dieser Untersuchung insgesamt (pathogen und apathogen) zu 88% O-acetyliert [16].

Es gibt keine gesicherten Erkenntnisse über den Einfluss der O-Acetylierung auf die Virulenz von Serogruppe C-Meningokokken, in den 1970er Jahren diskutierte man diesen allerdings [41]. Schon seit den 1970er Jahren ist bekannt, dass de-O-acetylierte Meningokokken-Polysaccharide immunogener sind als O-acetylierte. Hierzu wurden Studien an Freiwilligen [41] und an Mäusen durchgeführt [67]. Der Grund für die schwächere Immunogenität O-acetylierter Polysaccharide könnte in einer fehlgerichteten Antikörper-Produktion aufgrund der O-Acetylierung liegen [39]. In einer Studie, in der Serum-Antikörper asymptomatischer Meningokokken-Träger (häufig de-O-acetylierte Stämme) und geimpfter Erwachsener (O-acetyliertes Polysaccharid) untersucht worden waren, zeigte sich eine Spezifität der Antikörperbildung für den O-Acetylierungs-Status des jeweiligen Antigens [6]. Bei Impfstudien an Kleinkindern mit einem de-O-acetylierten Tetanus-Toxin-Konjugatimpfstoff ergaben sich bereits nach der ersten Impfdosis doppelt so hohe IgG-Titer gegen de-O-acetyliertes Antigen im Vergleich zu den Titern gegen O-acetyliertes Antigen, und auch die Serum-Bakterizidie gegen de-O-acetylierte Stämme war im Vergleich mit O-acetylierten Stämmen deutlich erhöht [83]. Zu beachten ist allerdings, dass bei Konjugat-Impfstoffen die Wahl des konjugierten Proteins große Auswirkungen auf die Stärke der Immunantwort bei Kindern hat [84]. T-Zellen werden durch das

konjugierte Toxin besser aktiviert, dagegen erfolgt die Immunantwort auf unkonjugiertes Kapsel-Polysaccharid thymusunabhängig. Es zeigte sich kein Einfluss der O-Acetylierung auf die Aktivierung dendritischer Zellen [98].

Die O-Acetylierung der Serogruppe C-Kapsel wird von OatC katalysiert. Das kodierende Gen *oatC* (EMBL accession number AJ243686) wurde zum ersten Mal durch Claus et al. [23] beschrieben. Es ist im Downstream-Bereich des Kapselpolymerasesegens *siaD* lokalisiert und wird zusammen mit den Kapselsynthese-Genen *siaA-D* transkribiert [23]. Das *oatC*-Gen besteht aus 1380 Basenpaaren und kodiert für 460 Aminosäuren. OatC hat eine Proteingröße von ca. 53 kDa [23].

Bei manchen Serogruppe C Stämmen wurde beobachtet, dass die O-Acetylierung durch Transkriptionsfehler in homopolymeren DNA-Abschnitten phasenvariabel ist. Dies erklärt das Vorkommen de-O-acetylierter Serogruppe C Stämme und könnte einen Mechanismus für die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen sein [62]. Während die Kapsel-O-Acetyltransferasen der Serogruppen W135 und Y und diverser anderer Bakterienspezies (s. o.) zur Gruppe der *NodL-LacA-CysE*-Acetyltransferasen oder zur Übergruppe des Hexapeptide-Repeat-Acyltransferasen gehören, war zu Beginn dieser Dissertation keine Sequenzhomologie zwischen OatC und einer Enzymklasse bekannt [23].

Die Struktur und biochemische Funktion von OatC wurde unter Berücksichtigung von Daten der vorliegenden Arbeit in den Arbeitsgruppen Mühlenhoff (Abteilung für zelluläre Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) und Vogel (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg) geklärt [9].

## 1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, durch Genverkürzung, gerichtete Mutagenese und nachfolgende Analyse in Meningokokken *in vivo* relevante Enzymbereiche zu definieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

- Zentrifugen: Biofuge 15 (Heraeus, Hanau), Biofuge 15R (Heraeus, Hanau), Omnifuge 2.0 RS (Heraeus, Hanau), Kühlzentrifuge RC-5B (Sorvall Heraeus, Hanau), Ultrazentrifuge L7 (Beckman, München)
- Brutschränke: KB 500 (Heraeus, Hanau) , B5060 E-CO2 (Heraeus, Hanau)
- Schüttelinkubatoren: G25 (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA), KS 10 (Bühler, Tübingen)
- Speedvac-Zentrifuge: Speed Vac Plus SC110A (Savant, New York, USA)
- Heizblöcke: BT1 und BT3 (Grant Instruments, Cambridge, UK)
- Spektralphotometer: Hitachi U-2000 (Hitachi, San Jose, CA, USA), Nanodrop ND-1000 (PeqLab, Erlangen)
- Elektroporationsgerät: Pulse Controller und Gene-Pulser (Bio-Rad, München)
- Gelkammern (für Agarose-Gele): Biorad Subcell-GT (Bio-Rad, München), Herolab H6 (Herolab, Wiesloch)
- Gelkammern (für SDS-PAGE): Minigel-Twin (Biometra, Göttingen)
- Blotting-Kammer für Western-Blot: Mini Trans-Blot (Bio-Rad, München)
- Thermocycler: TRIO (Biometra, Göttingen) , Personal Cycler (Biometra, Göttingen)
- UV-Crosslinker: Stratalinker 1800 (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande)
- Hybridisierungsöfen: DUO-Therm OV5 (Biometra, Göttingen)
- Netzteile: Standard Power Pack P25 (Biometra, Göttingen), Biorad 3000X (Bio-Rad, München)
- DNA-Sequenziergerät: ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt)

- ELISA-Reader: Multiskan Ex (Thermo Scientific, München)
- Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme: Curix (Agfa)

### **2.1.2 Verbrauchsmaterial**

- Filterpapier (Bio-Rad, München)
- Nylonfiltermembranen (Southern-Blot, Colony-Blot; Macherey & Nagel, Düren)
- Nitrocellulose-Membranen: BA-85 (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Whatman-Papier (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Röntgenfilme (Fuji, Düsseldorf)
- 96-Well-ELISA-Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen)

### **2.1.3 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme**

- von AppliChem, Darmstadt
  - Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
- von Applied Biosystems, Darmstadt
  - AmpliTaq Gold DNA Polymerase
- von BioMérieux, Nürtingen
  - PolyViteX
  - Columbia-Agar (COS)
- von Eurogentec, Köln
  - SmartLadder
- von Merck, Darmstadt
  - Tween 20
- von New England Biolabs (NEB), Frankfurt a. M.

- ApaI, StuI, HincII, EcoRV, SalI, XhoI, BamHI, HpaII, XmnI
  - Calf Intestine Phosphatase (CIP)
  - T4-DNA-Polymerase
  - T4-DNA-Ligase
  - Taq Polymerase
  - ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175 kDa)
  - Biotinylierter Proteinmarker (#7727)
- von Qiagen, Hilden
    - QIAquick PCR Purification Kit
    - MinElute Gel Extraction Kit
    - QIAGEN Genomic Tips 100/G
- von Roche, Mannheim
    - DNA-Molekulargewichtsmarker III und VII, DIG-markiert
    - Blocking Reagent (Blockierungsreagenz)
    - Dinatrium-3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2-(5-chloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]-decan-4-yl]phenylphosphat (CSPD)
    - 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- Beta-D-Galactopyranosid (X-Gal)
    - 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)
    - Isopropyl  $\beta$ -D-1-Thiogalactopyranosid (IPTG)
- von Roth, Karlsruhe
    - dNTPs, lyophilisiert
    - Acrylamid
    - Agarose
    - Glycin
    - Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid, Bisacrylamid)
- von Sigma-Aldrich, München
    - Poly-D-Lysin

- Glutaraldehyd
  - Luminol
  - Dimethylsulfoxid (DMS)
  - Para-Hydroxycoumarinsäure
- von Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
    - QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit
- von Heirler Cenovis, Radolfzell
    - Magermilchpulver
- von der Apotheke der Universitätsklinik Würzburg
    - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 2.1.4 Antikörper

- *Neisseria meningitidis* Serogruppe C Antikörper mouse mAb924 (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg, [33])
- *Neisseria meningitidis* Serogruppe C O-Acetylierungs-Antikörper mouse mAb1125 (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg [9])
- PorA-Antikörper mouse mAbP1.2 (NIBSC, Hertfordshire, UK [80])
- QIAexpress mouse Anti-Penta-His Antikörper (Qiagen, Hilden)
- α-mouse IgG+M (H+L)-Pox (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK)
- Anti-DIG-AP-Antikörper (Roche, Karlsruhe)

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Allgemein	
Maleinsäurepuffer (1x)	0,1M Maleinsäure 0,15M NaCl Einstellung mit NaOH auf pH 7,5
PBS-Gebrauchslösung (1x)	10mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 140mM NaCl
SSC-Puffer (1x)	0,15M NaCl 0,015M Na-Citrat Einstellung mit HCl auf pH 7,0
TBE-Puffer (1x)	100mM Tris-Base 100mM Borsäure 2,5mM EDTA
SSPE (1x)	0,18M NaCl 5mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1mM EDTA
GEBS	20% Glycerin 50mM EDTA 0,5% N-Lauroylsarkosin 0,05% Bromphenolblau

CSPD-Nachweis	
Waschpuffer	0,3% Tween 20 in Maleinsäure-Puffer
Puffer 2 - Blockierungslösung	1% Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer
Antikörperlösung	10µl Anti-DIG-AP-Antikörper ad 100ml Puffer 2
Puffer 3 - Detektionspuffer	0,1M Tris-HCl, pH 9,5 0,1M NaCl

Colony Blot und DNA-DNA-Hybridisierung	
„HighSDS“- Hybridisierungslösung	7,5% SDS 50% Formamid 5ml SSC 50mM Na-Phosphat, pH 7,0 0,1% Sarkosyl 26ml Blockierungsreagenz
Lösungen für Colony-Blot	1.) 10% SDS 2.) 0,5M NaOH, 1,5M NaCl 3.) 1,5M NaCl, 0,5M TRIS 4.) 2x SSPE
Lösung zum Entfernen von Bakterienresten (Colony-Blot)	1mM EDTA 0,5% SDS 5x SSC
Lösungen zum stringenten Waschen	1.) 0,1% SDS, 2x SSC 2.) 0,1% SDS, 0,1x SSC

Blue-White-Screening	
Substratansatz für Nähragarplatten	50µl pro Platte: 6µl IPTG (1M) 8µl X-Gal (250mg/ml DMF) 36µl Dimethylformamid (DMF)

Southern-Blot	
Depurinierungslösung	0,25M HCl
Denaturierungslösung	0,5M NaOH 1,5M NaCl
Neutralisierungslösung	1M Tris-HCl 3M NaCl
Transferpuffer	10x SSPE

SDS-PAGE	
SDS-PAGE Trenngel (10%)	2ml Rotiphorese-Gel 30 2,5ml Aqua bidest. 1,5ml Lower-Tris 10µl Tetramethyldiamin (TEMED) 30µl Ammoniumperoxidisulfat (APS, 10%)
SDS-PAGE Sammelgel	0,375ml Rotiphorese-Gel 30 1,625ml Aqua bidest. 0,625ml Upper-Tris 10µl Tetramethyldiamin (TEMED) 17,5µl Ammoniumperoxidisulfat (APS)
SDS-PAGE Sample Solution	5ml β-Mercaptoethanol 2g SDS 12,5ml Glycerin Messerspitze Bromphenolblau ad 100ml TRIS-HCl (0,5M, pH 6,8)
Sammelgelpuffer pH 6,8 (Upper Tris)	30,3g Tris 2g SDS ad 500ml mit Aqua bidest. mit konz. HCl ad pH 6,8
Trenngelpuffer pH 8,8 (Lower Tris)	90,85g Tris 2g SDS ad 500ml mit Aqua bidest. mit konz. HCl ad pH 8,8

Western-Blot	
Elektrophorese-Puffer	30g Tris-Base 144g Glycin 50ml SDS (20%) ad 10l Aqua bidest.
Blot-Puffer, 10x Stocklösung	30g TRIS 144g Glycin ad 1000ml A. bidest.
Blot-Puffer, 1x	200ml Methanol 100ml 10x Stammlösung ad 1l Aqua dest.
Waschpuffer	0,1% Tween 20 1x PBS
Blockierungspuffer	0,1% Tween 20 5% Magermilch-Pulver 1x PBS

ECL Chemilumineszenz-Nachweis	
ECL-Entwicklungslösung A	200ml 0,1M Tris-HCl (pH 8,6) 50mg Luminol
ECL-Entwicklungslösung B	11mg para-Hydroxycoumarinsäure 10ml DMS (Dimethylsulfoxid)
ECL-Reagenz	4ml ECL-Entwicklungslösung A 400µl ECL-Entwicklungslösung B 1,2µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)

ELISA	
Poly-D-Lysin-Lösung	25µl Poly-D-Lysin ad 1ml PBS (1x)
Glutaraldehyd-Lösung	0,025% Glutaraldehyd 1x PBS
Absättigungslösung	1% BSA 1x PBS
Substratlösung	1mg ABTS ad 1ml ABTS-Substratpuffer (1x)
SDS-Lösung zum Stoppen	1% SDS

### 2.1.6 Bakterienstämme

<i>N. m.</i> WUE2120 (WUE2120)	<i>N. m.</i> , Serogruppe C, laboreigenes klinisches Isolat aus Bayern, 1997 [102]
<i>N. m.</i> MC58 (MC58)	<i>N. m.</i> , Serogruppe B, klinisches Isolat aus Großbritannien [66]
<i>N. m.</i> WUE2517	Kapsellose Mutante ( <i>siaD</i> <sup>-</sup> ) von WUE2120 [54]
<i>E. coli</i> DH5α	<i>E. coli</i> für Klonierungen (Invitrogen, Karlsruhe)

### 2.1.7 Nährmedien

GC-Agar (pH 7,2)	1,5% Proteose-Pepton 0,1% Stärke 0,4% Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2 0,5% NaCl 1,0% Bacto-Agar
Luria-Broth-Agar (LB-Agar, pH 7,5 )	1,0% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 1,0% NaCl 1,5% Bacto-Agar
SOB-Medium	2% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 10mM NaCl 2,5mM KCl
SOC-Medium	20mM Glucose 10mM MgSO <sub>4</sub> 10mM MgCl <sub>2</sub> 5ml SOB
Proteose-Pepton-Medium (PPM)	1,5% Proteose-Pepton 0,5% NaCl 0,05% Stärke 0,4% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,8 mit KOH
supplementiertes Proteose-Pepton-Medium (PPM+)	1% PolyViteX 0,042% NaHCO <sub>3</sub> 0,01M MgCl <sub>2</sub> ad 100ml Proteose-Pepton-Medium

Dem GC- und LB-Agar wurden ggf. Antibiotika in folgenden Konzentrationen hinzugefügt:

- Ampicillin: 100 µg/ml für *E. coli*
- Kanamycin: 30 µg/ml für *E. coli*, 100 µg/ml für Meningokokken
- Erythromycin: 350 µg/ml für *E. coli*, 7 µg/ml für Meningokokken

### 2.1.8 Kulturbedingungen

*E. coli* wurden bei 37°C trocken bebrütet, Meningokokken bei 37°C in feuchter Atmosphäre und unter Anreicherung von CO<sub>2</sub> (5% Partialdruck).

### 2.1.9 Plasmide

pBlueScript (pBS)	kommerzieller Klonierungsvektor (Stratagene, La Jolla, USA)[88]
pUC4K	Vektor mit Kanamycin-Resistenzkassette (GE Healthcare, München)[96]
pAP1His	pAP1-Vektor [56], eine modifizierte Variante des Vektors mit His-Tag wurde von Dr. Claus bereitgestellt
pET22b	kommerzieller Expressionsvektor, Träger für die mutierten <i>oatC</i> , die von der AG Mühlenhoff (MHH) bereitgestellt wurden (Novagen, Darmstadt)

### 2.1.10 Oligonukleotide

s. Tabelle 2.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 DNA-Methoden

**2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen** Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurde an einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260nm durchgeführt. Die Umrechnung erfolgte gemäß der Annahme, dass eine  $OD_{260}=1$  einer DNA-Konzentration von 50ng/ $\mu$ l entspreche. Zur ungefähren Abschätzung von DNA-Konzentrationen wurden DNA-Proben alternativ gelelektrophoretisch in einem Agarose-Gel zusammen mit einem Größenmarker, der definierte DNA-Mengen enthält, aufgetragen und das Ergebnis visuell beurteilt.

**2.2.1.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA** Nach Gießen eines geeigneten Gels bestehend aus Agarose-Pulver und 1x TBE-Puffer (0,8% Agarose zur Auftrennung größerer DNA-Fragmente >2kb, 1,5% für kleinere DNA-Fragmente <2kbp) erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in einer mit TBE-Puffer gefüllten Gelkammer bei einer Spannung von 180-200V. Als Größen- und Mengen-Referenz wurde zusätzlich zu den DNA-Proben ein Größenmarker mit definierten DNA-Mengen aufgetragen. Als Laufpuffer diente der TBE-Puffer. Den Proben wurde GEBS hinzugefügt.

	Sequenz (5'-3')	Gen	Lokalisation/Funktion	GenBank/EMBL Acc. No. / Position
FS1	GGGGGGGGGGCCCATCCAAATCAAAAAAAGCGTGAAG	<i>outC</i>	3' Downstream-Region Anfang (Apal-Schnittstelle)	NC_008767 61224-61203
FS2	GGGGGGGGGGCCGCATGATTTTGAATTCAGAG	<i>outC</i>	3' Downstream-Region Anfang (Apal-Schnittstelle)	NC_008767 60409-60430
FS3	CCTTTAAACTATTCAGGAGGGGGCTCTTATCCCATTAAC	<i>outC</i>	<i>outC</i> H399A Mutagenese-Primer	NC_008767 61431-61391
FS4	GTTAATGGATAAGAGAGCCCGCTCCTGAAATAGTTTAAAGG	<i>outC</i>	<i>outC</i> H399A Mutagenese-Primer	NC_008767 61414-61431
FS5	GGGGGGGGGGCCGTGATTTGATTCGATACACCATAC	<i>outC</i>	<i>outC</i> Upstream-Region (Apal-Schnittstelle)	NC_008767 63066-63045
FS6	GGGGGAGGCCCTAAGGTTTCAAAACGTATTTGATTTG	<i>outC</i>	<i>outC</i> KO inverse PCR Anfangsprimer (Stral-Schnittstelle)	NC_008767 62580-62603
FS7	GGGGGAGGCCCTCAATTCCTGATATGCGATTAC	<i>outC</i>	<i>outC</i> KO inverse PCR Endprimer (Stral-Schnittstelle)	NC_008767 61263-61242
FS8	GGGGGGGATATCTCAATCAAAACGTTTGAACCT	<i>outC</i>	<i>outC</i> Anfangsprimer (EcoRV-Schnittstelle)	NC_008767 44698-44682
FS9	GGGGGGGATATCTTAACATAAGAAATTTATGTAATCGC	<i>outC</i>	<i>outC</i> Verküenzungsprimer (EcoRV-Schnittstelle)	NC_008767 61225-61249
FS10	GGGGGGGATATCTTAAAAAATCTCATCCACAATACCTTG	<i>outC</i>	<i>outC</i> Verküenzungsprimer (EcoRV-Schnittstelle)	NC_008767 61273-61295
FS11	GGGGGGGATATCTTAGAAATCAGTGTGATTTCAAGT	<i>outC</i>	<i>outC</i> Verküenzungsprimer (EcoRV-Schnittstelle)	NC_008767 61321-61342
FS12	GGGGGGGATATCTTAAAAACCTTTTATTTTTCAGGAATTTGTT	<i>outC</i>	<i>outC</i> Verküenzungsprimer (EcoRV-Schnittstelle)	NC_008767 61369-61393
FS13	GGGGGGGATATCTTATGGATAGTTTAAAGGAATAATAGTA	<i>outC</i>	<i>outC</i> Verküenzungsprimer (EcoRV-Schnittstelle)	NC_008767 61420-61441
FS14	GATACCCCTTACATTCAGCCTTC	<i>outC</i>	<i>outC</i> 3' Downstream-Region	NC_008767 60826-60806
FS15	CTTAAGGCATTTATTCGCTATATC	<i>outC</i>	<i>outC</i> Primer zur vollständigen Seq.	NC_008767 62182-62161
FS16	ATTAAGGGATTTAGTAACCGC	<i>outC</i>	<i>outC</i> Nachweisprimer Mutation H31A	NC_008767 62535-62518
FS17	AATCTCAGCAAGATTTAAAGCG	<i>outC</i>	<i>outC</i> Nachweisprimer Mutation H111A	NC_008767 62296-62278
FS18	CCGATTATTTATCAATAATAGCG	<i>outC</i>	<i>outC</i> Nachweisprimer Mutation H183A	NC_008767 62081-62062
FS19	ATGAATTTGATCGCAGAGGGCG	<i>outC</i>	<i>outC</i> Nachweisprimer Mutation H267A	NC_008767 61826-61810
FS20	CCTTTAAACTATTCAGCAGCGC	<i>outC</i>	<i>outC</i> Nachweisprimer Mutation H399A	NC_008767 61431-61414
FS21	ATCCTGATATGGGATTTGGCG	<i>outC</i>	<i>outC</i> Nachweisprimer Mutation H456A	NC_008767 61259-61244
AP1	GGCATTTATCAGATATTTTGTTC		PAP1 Vektorprimer vor (3') der EcoRV-Schnittstelle	-
AP6	CGAAGTAAATAAGTCTAGTGTG		pAP1 Vektorprimer hinter (5') der EcoRV-Schnittstelle	-
Kanal	CACGAGGCAGACCTCAG		Sequenzierprimer aus Kanamycin-Resistenzgen nach 3' (pUC4K)	X06404 434-451
329	ACCATGATTACGGCAAGC		pBlueScript Vektorprimer (5'-3')	X52327 813-796
KB9	AATACGACTCACTAATAGGGC		pBlueScript Vektorprimer (3'-5')	X52327 627-646

Tablle 2: Übersicht über die verwendeten Primer. Referenzsequenzen aus der NCBI GenBank/EMBL-Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Für den Vektor AP1 existiert keine GenBank/EMBL-Referenz. Acc. No.: Accession Number.

**2.2.1.3 Aufreinigung von DNA mittels kommerzieller Reaktionskits** Zur Aufreinigung von DNA wurden folgende Systeme verwendet:

- Aufreinigung von PCR-Produkten: QIAquick PCR Purification Kit, MinElute PCR Purification Kit
- Gel-DNA-Extraktion: MinElute Gel Extraction Kit
- Präparation chromosomaler DNA aus Meningokokken: QIAGEN Genomic Tips 100/G
- Präparation von Plasmid-DNA: QIAprep Spin Miniprep Kit

Die Benutzung der jeweiligen Kits erfolgte nach den Protokollen des Herstellers.

**2.2.1.4 Restriktionsverdau** Zum Schneiden von DNA wurden Restriktionsendonukleasen nach den Empfehlungen des Herstellers (mitgelieferter oder kompatibler Puffer, ggf. Zugabe von bovinem Serumalbumin, Inkubationstemperatur) verwendet. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Hitze-Denaturierung des Enzyms nach Angaben des Herstellers, bzw. durch Aufreinigung mittels des QIAquick PCR Purification Kit, des MinElute Reaction Cleanup Kit, oder nach elektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsansatzes mittels des MinElute Gel Extraction Kit.

Ein XhoI-Verdau wurde beispielsweise nach folgendem Ansatz durchgeführt:

5µl (entsprechend ca. 0,5µg)	DNA
1µl	Puffer 2, 10x
1µl	BSA, 10x
1µl	XhoI
2µl	H <sub>2</sub> O

Tabelle 3: Ansatz für einen Verdau mit dem Enzym XhoI. Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C 1h lang inkubiert.

**2.2.1.5 5'-Dephosphorylierung von linearisierter DNA** Um zu verhindern, dass nach Aufspaltung der DNA die Enden im Ligationsansatz religieren, wurde Kälberdarmphosphatase (Calf Intestine Phosphatase, CIP) eingesetzt, die den 5'-Phosphatrest von DNA abspaltet. Das Enzym wurde zusammen mit den Restriktionsendonukleasen nach den Herstellerempfehlungen eingesetzt. Es wurde auf Kompatibilität der eingesetzten Puffer mit beiden Enzymen geachtet.

**2.2.1.6 DNA-Polishing** Um nach restriktionsenzymatischer Aufspaltung, die sog. „sticky ends“ mit 3'- oder 5'-Nukleotidüberhängen liefert, glatte Ende zu erhalten, wurde die T4-DNA-Polymerase benutzt. Diese wurde in einem separaten Schritt nach Aufreinigung des vorausgehenden Reaktionsansatzes nach den Empfehlungen des Herstellers (mitgelieferter Puffer, empfohlene Inkubationstemperatur von 12°C für 15min, Zugabe von BSA und dNTPs) angewendet. Die Reaktion wurde durch Denaturierung beendet (75°C, 20min).

**2.2.1.7 Fällung von Ligationsansätzen** Zur Aufreinigung des Ligationsansatzes und zum Entfernen enthaltener Salze, die aufgrund einer Erhöhung der Leitfähigkeit der Lösung eine erfolgreiche Elektroporation verhindern, wurde folgendermaßen vorgegangen: dem Ligationsansatz wurde zweimal hintereinander ein Gemisch von Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben, die sich ergebende Mischung zentrifugiert und die obere Phase abgenommen, in der sich die DNA vorwiegend befindet. Anschließend wurde der DNA-Lösung Ether hinzugegeben, die Mischung wurde nochmals zentrifugiert, nun die obere Ether-Phase verworfen und der Rest-Ether im Heizblock verdampft. Die Fällung erfolgte nach Hinzugabe von Acrylamid, 5M NaCl und Ethanol abs. bei ca. -80°C für mindestens 30min. Nach erneuter Zentrifugation und zweimaligem Waschen mit Ethanol (70%) bei 4°C wurde der verbleibende Ethylalkohol in einer Vakuum-Zentrifuge verdampft und die gereinigte DNA wurde in Aqua bidest. aufgenommen. Die Lösung konnte nun elektroporiert werden.

**2.2.1.8 Ligation** Zur Ligation von kompatiblen DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase in einer Über-Nacht-Reaktion bei 16°C mit dem mitgelieferten Ligase-Puffer angewandt. Das molare Verhältnis von Vektor- zu Insertions-DNA betrug eins zu drei (1:3). Die Aufreinigung des Ligationsansatzes erfolgte durch Phenolisieren und Fällern.

**2.2.1.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)** Die PCR-Reaktionen wurden mit der Taq-Polymerase und dem zugehörigen Puffer der Firma NEB durchgeführt. Bei der inversen PCR wurde die AmpliTaq Gold DNA Polymerase mit den zugehörigen Puffern eingesetzt, die sich durch eine besonders niedrige Fehlerrate auszeichnet. Die Desoxynukleotide (dNTP) lagen in der Reaktionslösung in einer Konzentration von 0,2mM vor, die Primer in einer Konzentration von 0,2µM.

Zur Bestimmung der Annealing-Temperatur (AT) wurde zunächst der Schmelzpunkt beider Primer nach der Formel

$$T_n =$$

$$(\text{AnzahlAdenosin} + \text{AnzahlThymidin}) * 2 + (\text{AnzahlGuanidin} + \text{AnzahlCytidin}) * 4$$

errechnet und anschließend vom niedrigeren der beiden Werte 4°C subtrahiert.

Der Thermocycler wurde folgendermaßen programmiert:

Initiale Denaturierung	95°C	10min	
Annealing	$T_n - 4^\circ\text{C}$	1min	
Extension	72°C	1min/kb	36 Wiederholungen
Denaturierung	94°C	1min	
Finales Annealing	$T_n - 4^\circ\text{C}$	1min	
Finale Extension	72°C	10min	

**2.2.1.10 Gerichtete Mutagenese** Zur Durchführung des gerichteten Austauschs einzelner Basenpaare in einem Plasmid wurde das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der Durchführung einer PCR mit Primern, die beide die gewünschte Mutation enthalten und sich je an gleicher Position der komplementären Stränge doppelsträngiger Plasmid-DNA anlagern. Die PCR wird mittels des im Kit mitgelieferten Enzyms PfuTurbo-DNA-Polymerase durchgeführt. Diese weist laut Angaben des Herstellers eine sechsfach höhere Zuverlässigkeit auf als die Taq-DNA-Polymerase und vermag die durch die Primer vorgegebene Mutation auf die von ihm synthetisierte DNA zu übertragen (vgl. Stratagene, Handbuch zum QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit).

Der Ansatz der Reaktion erfolgte mit unterschiedlichen Mengen des Ausgangs-Plasmids (5, 10, 25, 50ng) unter Zugabe des mitgelieferten Pfu-Puffers, der beiden die Mutation enthaltenden Primer, dNTPs (20mM) und der PfuTurbo-DNA-Polymerase. Nach initialer Denaturierung bei 95°C (30sec) wurden 16 Zyklen einer PCR-Reaktion (Denaturierung bei 95°C / 30sec, Anlagerung bei 55°C / 60sec, Extension bei 68°C / [2min pro kb des Plasmids]) im Thermocycler durchgeführt. Nach Aufreinigung des Produktes mittels des MinElute PCR Purification Kits (Elution mit Aqua bidest.) wurden 1 bis 2µl des aufgereinigten Produktes in *E. coli* DH5α mittels Elektroporation transformiert. Anschließend wurde das Plasmid mit der korrekten Mutation aus den Bakterien mittels des QIAprep Spin Miniprep Kit aufgereinigt.

**2.2.1.11 DNA-Transformation mittels Elektroporation** Bei der Elektroporation handelt es sich um ein erstmals von Neumann [75] und Zimmermann [106] entwickeltes Verfahren, bei dem durch elektrische Impulse die Zellwand von Bakterien für DNA durchgängig gemacht wird. 40 µl Bakteriensuspension von *E. coli* DH5α wurde nach langsamem Auftauen auf Eis 1-2µl des gefällten DNA-Ansatzes hinzugegeben, die Mischung wurde blasenfrei in eine Elektroporationsküvette einpipettiert und dann mit dem Elektroporationsgerät (400 Ohm Widerstand, 25µF Kapazität, 2,5 kV Spannung) einmalig ein Stromimpuls ausgeübt. Die Bakterien wurden sofort in vorgewärmtes SOC-Medium überführt und bei 37°C 1h inkubiert. Anschließend wurden je 10µl, 100µl und der Rest der Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platte, mit Zusatz von Antibiotikum bei geeigneten Resistenzmarkern, ausplattiert und bei 37°C bebrütet. Nach 16-24h konnten Einzelkolonien auf das Vorhandensein des eingebrachten Plasmids mittels PCR, DNA-DNA-Hybridisierung oder durch Sequenzierung überprüft werden.

**2.2.1.12 DNA-Transformation in Meningokokken** Zur Transformation von DNA in Meningokokken wurde zunächst der zu transformierende Stamm auf GC-Agar über Nacht angezüchtet. Nach Ansetzen einer Bakteriensuspension und Einstellung auf eine optische Dichte OD<sub>600</sub> von 0,1 wurde diese zunächst für 1h bei 37°C im Schüttelinkubator bebrütet, nach Hinzugabe von 100-200ng Plasmid für weitere 5-6h. Anschließend wurden je 10µl, 100µl und der Rest der Bakterien auf GC-Agar, mit Zusatz von Antibiotikum bei geeigneten Resistenzmarkern, ausplattiert und bei 37°C in CO<sub>2</sub>-reicher Atmosphäre für 16-24h bebrütet.

**2.2.1.13 Blue-White-Screening von Kolonien** Das sog. Blue-White-Screening [88] wird durchgeführt, um nach Klonierungen in den kommerziellen pBlueScript-Vektor (pBS) Insertionen in die Multiple Cloning Site (MCS) nachzuweisen. Die MCS des Vektors liegt innerhalb des lacZ-Gens des Vektors. Das lacZ-Gen kodiert für Teile einer Galaktosidase, die verantwortlich für die Umsetzung des dem Nährboden zugesetzten 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- Beta-D-Galactopyranosid (X-Gal) ist. Durch die Umsetzung von X-Gal färben sich Bakterienkolonien ohne Insertion in die MCS blau, bei Insertion bleiben die Kolonien weiß.

Zunächst wurden die Nährböden mit 50µl des X-Gal enthaltenden Substratansatzes vorbehandelt. Nach der Transformation des pBS-Vektors in *E. coli* DH5α wurde die Bakteriensuspension wie gewohnt ausplattiert. Die am nächsten Tag gewachsenen Kolonien wurden visuell beurteilt und, wenn sie weiß waren, genauer überprüft.

**2.2.1.14 Colony-Blot und DNA-DNA-Hybridisierung** Das Verfahren der DNA-DNA-Hybridisierung dient dem Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen in einem Bakterium: Eine während der Amplifikation durch Digoxigenin-dNTP markierte DNA-Sonde [45] bindet an denaturierte, komplementäre DNA. Ein spezifischer Antikörper, an den eine Peroxidase gekoppelt ist, bindet an das Digoxigenin. Nach Zugabe des Substrates CSPD wird Licht emittiert, welches ausreicht, um einen Röntgenfilm zu belichten.

Das Verfahren wurde als Selektionsverfahren nach Elektroporation verwendet. Hierzu wurde von den Platten zunächst durch Auflegen einer Nylonmembran auf den bewachsenen Agar ein Abklatsch der Kolonien erstellt. Nach Trocknung wurden die Bakterien in mehreren Schritten lysiert, die Membran wieder getrocknet, die Bakterien-DNA mittels UV-Licht auf der Membran fixiert (sog. UV-Crosslinking), die Bakterienreste entfernt und die DNA nochmals durch UV-Crosslinking fixiert.

Nach Vorbehandlung der Membranen mit HighSDS (Vorhybridisierung, 42°C) erfolgte die Hybridisierung in einer mit der Sonde versetzten High-SDS-Lösung bei 42°C über Nacht. Zur Entfernung überschüssiger DNA-Sonde folgten zwei weitere Waschstschritte bei 68°C (sog. stringentes Waschen).

Folgende Schritte wurden zum Nachweis des Digoxigenin durch Chemilumineszenz durchgeführt: Waschen, Blockieren unspezifischer Bindungsstellen für den Antikörper, Inkubation mit anti-DIG-Antikörper, Waschen, Puffer 3, CSPD (Substrat) in Puffer 3, Inkubation des Blots bei 37°C, Auflegen eines Films für ca. 15-20 min, Entwicklung in Filmentwicklungsmaschine.

**2.2.1.15 Southern-Blot** Der Southern-Blot diente in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis des *oatC*-Gens und der Kanamycin-Resistenzkassette in Meningokokken und *E. coli*. Zunächst wurde ein Restriktionsverdau und eine anschließende Gelelektrophorese mit DIG-markierten Größenmarkern durchgeführt. Nach Depurinierung und Denaturierung der DNA mit anschließender Neutralisierung wurde ein sog. „Transfer Sandwich“ aufgebaut: Das Agarose-Gel wurde unter der Nylonmembran zwischen einen Flüssigkeitsdonator (Filterpapier, das mit seinen Enden in 10x SSPE-Lösung liegt) und einen Flüssigkeitsakzeptor (Stapel von trockenen Papierhandtüchern) gelegt. Durch die Kapillarwirkung entstand ein Flüssigkeitsstrom durch das Gel, welcher die DNA über Nacht auf die Nylonmembran übertrug. Nach Trocknung wurde die DNA durch Crosslinking auf der Nylonmembran fixiert. Das weitere Procedere erfolgte analog zur DNA-DNA-Hybridisierung: Vorhybridisierung, Hybridisierung, stringentes Waschen, DIG-Nachweis mittels CSPD.

**2.2.1.16 Sequenzierung** Der aufgereinigten DNA (Plasmid oder PCR-Produkt) wurde ein den Leseanfangspunkt und die Leserichtung bestimmender Primer hinzugefügt. Die weitere Bearbeitung der DNA und die Sequenzierung nach Sanger [86] erfolgte auf einem ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) durch die zuständigen Mitarbeiter des Instituts (Bereich Molekularbiologie).

## 2.2.2 Immunoassays

### 2.2.2.1 SDS-PAGE und Western-Blot

**SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)** Durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [55] können Proteine allein nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Zunächst wurde nach Äquilibrierung und Abzentrifugation von Bakteriensuspensionen der Überstand verworfen. Zur Denaturierung wurden die verbleibenden Bakterienpellets in Sample Solution resuspendiert, kurz aufgeköcht, und dann in die Geltaschen einpipettiert. Während sich die Laufbande des Gels im Bereich des Sammelgels befand, wurde initial ein Strom von 10mA, ab Beginn des Trenngels von 20mA angelegt. Als Laufpuffer diente ein TRIS-Glycin-Puffer. Neben den Proben wurden außerdem ein mit bloßem Auge sichtbar und ein unsichtbarer, biotinylierter Größenmarker mit aufgetragen. Letzterer konnte bei der Entwicklung des Western-Blots auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

**Western-Blot** Das Prinzip des Westernblots beruht auf dem Nachweis geoelektrophoretisch getrennter Proteine mittels spezifischer Antikörper.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Western-Blot ein sog. His-Tag nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um eine Abfolge von (hier: fünf) Histidinen am Ende eines Proteins, im vorliegenden Fall des OatC, die mit Hilfe eines hierfür spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden können und so die Expression des Proteins belegen.

Zunächst wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Nach blasenfreiem Auflegen des Gels auf eine Nitrocellulose-Membran wurden die Proteine bei 300mA auf diese gebloftet. Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit Magermilchlösung wurde der Blot über Nacht mit dem ersten Antikörper ( $\alpha$ -Penta-His Antikörper) bei 4°C inkubiert, danach mit dem zweiten Antikörper ( $\alpha$ -mouse-IgG-Pox), welcher gegen den ersten gerichtet und an welchen eine Peroxidase gekoppelt ist. Durch Zugabe des ECL-Reagenz (sog. „enhanced chemoluminescent“)

als Substrat wurde eine enzymatische Reaktion gestartet, die ausreichend Licht zur Belichtung eines Röntgenfilms (Belichtungszeit ca. 2min) freisetzte.

Um die sich abzeichnenden Banden größenmäßig zuordnen zu können, wurde bereits bei der SDS-PAGE ein biotinylierter Marker mit aufgetragen. Zum Nachweis wurde ein  $\alpha$ -Biotin-Antikörper mit gekoppelter Peroxidase benutzt. Der Marker zeichnete sich auf diese Art zusammen mit den Expressionsbanden auf dem Röntgenfilm ab.

**2.2.2.2 Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (ELISA)** Der Enzyme Linked Immuno Sorption Assay (ELISA) [29] ist ein immunologisches, quantitatives Nachweisverfahren, bei dem die Bindung eines Antikörpers durch eine enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht wird: Der erste Antikörper bindet an das Antigen, das nachgewiesen werden soll. Der zweite Antikörper bindet an den ersten Antikörper. An den zweiten Antikörper ist ein Enzym (hier: Peroxidase) gekoppelt. Durch Umsetzung eines Substrates (hier: ABTS) durch das Enzym entsteht eine farbliche Veränderung, die photometrisch gemessen werden kann.

Der ELISA diente dem Nachweis des Kapselpolysaccharids (mAb 924 gerichtet gegen das Serogruppe C Polysaccharid, O-Acetylierung positiv oder negativ, mAb 1125 gerichtet gegen O-acetyliertes Serogruppe C Kapselpolysaccharid) und der PorA-Expression (mouse mAb P1.2 gerichtet gegen den PorA-Serosubtyp P1.2). Alle Inkubationsschritte wurden bei 37°C durchgeführt, mit Ausnahme der ABTS-Substratumsetzung (Raumtemperatur). Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte jeweils dreimaliges Waschen mit PBS. Zunächst wurden die ELISA-Platten 30min mit Poly-D-Lysin vorinkubiert. Die Bakteriensuspensionen wurden auf  $OD_{550}=0,1$  eingestellt, nach 1h Anlagerung wurden die Bakterien mit Glutaraldehyd abgetötet. Unspezifische Bindungsstellen wurden 30min mit BSA abgesättigt. Nach 45min Anlagerung des ersten (mouse mAb 924, 1125, P1.2) und 30min Anlagerung des zweiten Antikörpers ( $\alpha$ -mouse-Pox) wurde das Substrat ABTS auf die Platte gegeben und die Reaktion nach ca. 10min durch Zugabe von 1% SDS-Lösung gestoppt. Die entstandene Farbreaktion wurde bei 414nm im ELISA-Reader gemessen.

Als Leerwertkontrolle wurde auf jeder ELISA-Platte ein Feld genutzt, das anstelle der Bakteriensuspension nur mit PBS-Lösung inkubiert wurde. Die übrigen Bearbeitungsschritte entsprachen exakt denen der anderen Felder.

Die Messwerte wurden weiterhin für PorA normalisiert: Das Äußere-Membranprotein PorA sollte bei allen gemessenen Stämmen in gleichem Maße exprimiert werden. Indem nun die für die O-Acetylierung gemessenen Werte ins Verhältnis zur PorA Expression gesetzt wurden (Messwert für mAb 1125 geteilt durch Messwert für mAb P1.2), konnten geringe Schwankungen z. B. der optischen Dichte der Bakterien-

suspensionen oder der Konzentration des Kapselpolysaccharids in den Messproben, ausgeglichen werden. Es wurde darauf geachtet, dass die Antigenkonzentration eine Extinktion im sog. linearen Bereich der sigmoidförmigen ELISA-Reaktionskurve bewirkte. Auf diese Weise konnte die O-Acetylierung auch quantitativ beurteilt werden.

### 3 Ergebnisse

Zu Beginn dieser Dissertation konnte die Kapsel-O-Acetyltransferase OatC von Serogruppe C-Meningokokken keiner Enzymfamilie zugeordnet werden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die biochemische Einordnung von OatC weiter vorangetrieben werden. *In vitro*-Ergebnisse der Arbeitsgruppe von M. Mühlenhoff, Hannover, sollten *in vivo* bestätigt werden.

Zum einen wurden hierzu Verkürzungen des *oatC*-Gens hergestellt und in den Vektor pAP1His kloniert. Nach Transformation in eine zunächst hergestellte *oatC*-Deletionsmutante wurde die O-Acetylierung des Kapselpolysaccharids im ELISA bestimmt. Hierdurch konnten die für die Funktion relevanten Anteile der O-Acetyltransferase OatC vom Carboxy-Terminus her weiter eingegrenzt werden.

Zum anderen wurden OatC-Mutanten mit Punktmutationen von potentiell funktionsrelevanten Aminosäuren, die zum Teil freundlicherweise von der AG Mühlenhoff bereitgestellt wurden, in einen wildtypischen Serogruppe-C-Stamm (WUE2120) transformiert. Die O-Acetylierung der resultierenden Stämme wurde analog zum ersten Versuch im ELISA bestimmt.

#### 3.1 Herstellung einer Meningokokkenmutante mit *oatC*-Deletion

Um OatC-Varianten in Meningokokken *in trans* testen zu können, musste eine *oatC*-Deletionsmutante erstellt werden.

Die Deletion des *oatC*-Gens erfolgte, indem zunächst eine Kopie des *oatC*-Gens mit ca. 0,4kb *Upstream*- und ca. 0,8kb *Downstream*-Bereich mittels PCR aus WUE2120 amplifiziert wurde (Primer FS5 und FS2). Das entstandene Fragment wurde mit *Apa*I geschnitten und in die *Apa*I-Schnittstelle des pBS-Vektors kloniert. Aus dem entstandenen Konstrukt wurde nun das *oatC*-Gen mittels einer inversen PCR deletiert: Bei einer konventionellen PCR (mit der AmpliTaq Gold DNA Polymerase) wurden Primer verwendet (FS6, FS7), die das *oatC*-Gen flankierten, jedoch so gerichtet waren, dass sie nicht das *oatC*-Gen, sondern den gesamten Vektor unter Ausnahme des *oatC*-Gens amplifizierten. Das entstandene Konstrukt wies nun den *Upstream*- und *Downstream*-Bereich des *oatC*-Gens auf, nicht jedoch das Gen selbst. Um später selektieren zu können, wurde das Produkt der inversen PCR mit *Stu*I verdaut und mit einer mit *Hinc*II aus dem pUC4K-Vektor ausgeschnittenen Kanamycin-Resistenz ligiert.

Durch homologe Rekombination *in trans* nach Transformation des Plasmids wurde das *oatC*-Gen aus der chromosomalen DNA von WUE2120 deletiert.

Der Nachweis der Deletion erfolgte einerseits genomisch durch PCR, Sequenzierung und Southern-Blot, andererseits phänotypisch durch ELISA.

### 3.2 Schrittweise Verkürzung von OatC

Mittels eines in die *oatC*-Deletionsmutante eingebrachten Meningokokken-Expressionsvektors, in den verkürzte *oatC*-Kopien eingebracht wurden, sollte die Funktionsfähigkeit der O-Acetyltransferase bei C-terminaler Verkürzung untersucht werden.

Zunächst wurden das *oatC*-Gen aus WUE2120 mittels PCR amplifiziert. Am 5'-Ende des Gens setzte der Primer FS8 an, am 3'-Ende wurden die Primer FS9 bis FS13 verwendet, wobei das Produkt aus der PCR mit FS8/FS9 das intakte Gen lieferte und die Primer FS9 bis FS13 das Gen um je 48 Basenpaare verkürzten (s. Tabelle 2).

Die *oatC*-Verkürzungen wurden in den pAP1His-Vektor kloniert. Dieser Vektor basiert auf dem pAP1-Vektor [56] und wurde von Dr. Claus (Würzburg) dahingehend modifiziert, dass 5' von der EcoRV-Schnittstelle ein Hexa-His-Tag (sechs Histidine), mit vorausgehendem Startcodon eingefügt wurde [22]. Dieses His-Tag kann mittels eines Antikörpers detektiert werden und dient dem OatC-Proteinnachweis, da OatC-spezifische Antikörper fehlen.

Die PCR-Produkte wurden mit EcoRV geschnitten und in die EcoRV-Schnittstelle des pAP1His-Vektors kloniert. Klone mit aufgenommenem pAP1His-Vektor und eingefügtem *oatC*-Gen wurden mittels Erythromycin-Selektivagar und DNA-DNA-Hybridisierung (*oatC*-Sonde) selektiert. Die korrekte Insertion in den pAP1His-Vektor und die fehlerfreie Sequenz des *oatC*-Gens wurde mittels PCR (AP1/AP6 als Primer) und Sequenzierung überprüft.

Das fertige Konstrukt wurde in die *oatC*-Deletionsmutante transformiert.

Das eingebrachte *oatC*-Gen wurde mittels Southern-Blot nachgewiesen: Die gesamte DNA der Meningokokken wurde mit XmnI verdaut. Mit einer *oatC*-Sonde wurde eine Bande nachgewiesen, deren Größe der Zielgröße des entsprechenden XmnI-Fragments entsprach. Bei der *oatC*-Deletionsmutante ohne Plasmid konnte diese Bande nicht nachgewiesen werden. Hierdurch wurde gezeigt, dass nur eine Kopie des *oatC*-Gens (verkürzt oder unverkürzt) in den Meningokokken vorhanden war (s. Abb. 1).

Mittels Western-Blot wurde die OatC-Expression nachgewiesen. Als erster Antikörper wurde ein Anti-Penta-His-Antikörper verwendet, der die Expression von His-Tags nachweisen sollte. Auf Höhe der Zielgröße von 47,8kDa-54,9kDa konnte eine Bande nachgewiesen werden (s. Abb. 2).

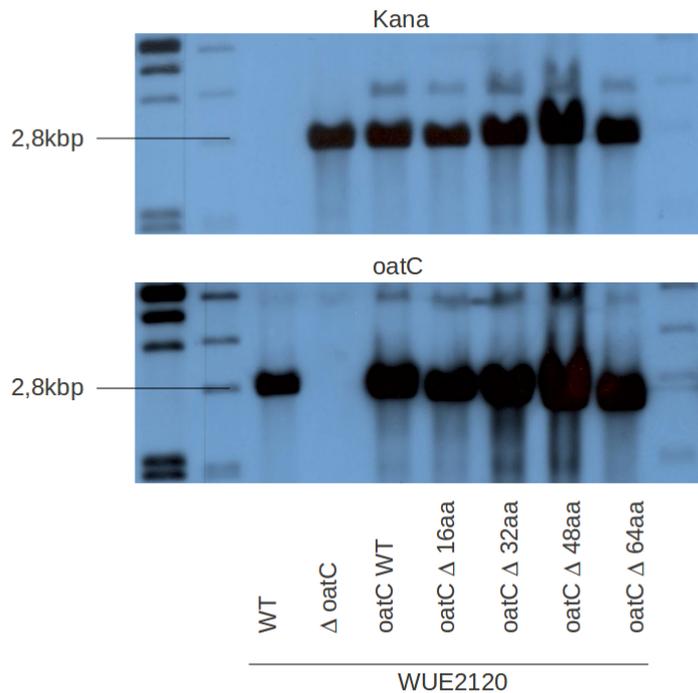


Abbildung 1: Southern-Blot der Meningokokkenstämmen mit Verkürzung von OatC zum Nachweis des *oatC*-Gens bzw. der Kanamycin-Resistenzkassette. DNA-Verdau mittels XmnI. Oben Nachweis der Kanamycin-Resistenzkassette, unten Nachweis des *oatC*-Gens. Stämme von links nach rechts: WUE2120 (Serogruppe C Wildtyp, WT),  $\Delta$ *oatC* (*oatC*-Deletionsmutante), Plasmid mit unverkürztem *oatC*-Gen (*oatC* WT), vier Verkürzungsmutanten (um je 48 bp, entsprechend 16 Aminosäuren).

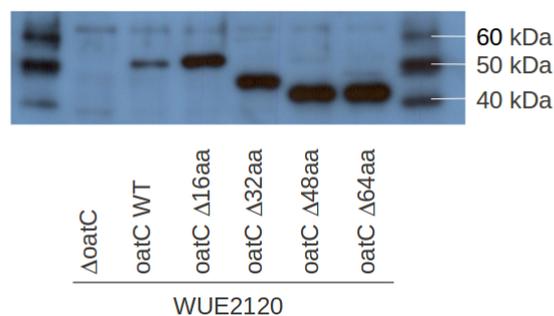


Abbildung 2: Expressionsnachweis von OatC bei den Verkürzungsmutanten mittels Western-Blot (Antikörper: Anti-Penta-His). Stämme von links nach rechts:  $\Delta$ *oatC* (*oatC*-Deletionsmutante), „wildtypische“ Verkürzungsmutante mit unverkürztem *oatC*-Gen (*oatC* WT), vier Verkürzungsmutanten (um je 16 Aminosäuren). Nur bei der *oatC*-Deletionsmutante kann erwartungsgemäß keine Proteinexpression nachgewiesen werden.

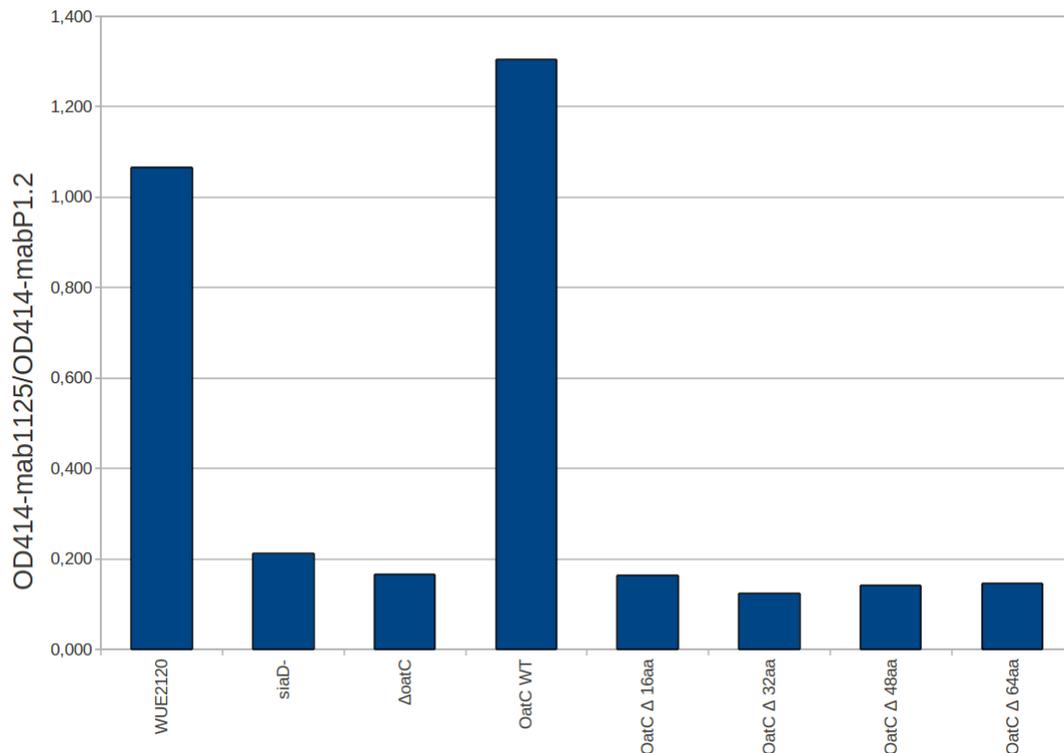


Abbildung 3: Expression von O-acetyliertem Kapselpolysaccharid (ELISA). Dargestellt sind die Reaktivitäten von *N. m.* Serogruppe C-Mutanten mit schrittweiser C-terminaler Verkürzung von OatC mit dem mAB1125, der für O-acetyliertes Serogruppe-C-Polysaccharid spezifisch ist. Die Daten wurden für die PorA-Expression normalisiert (s. Material und Methoden). Stämme von links nach rechts: WUE2120 (Serogruppe C Wildtyp), *siaD*- (WUE2517, *siaD*-Deletionsmutante),  $\Delta$ *oatC* (WUE4014, *oatC*-Deletionsmutante), „wildtypische“ Verkürzungsmutante mit unverkürztem *oatC*-Gen (WUE4020), vier Verkürzungsmutanten (WUE4021-WUE4024, Verkürzung um je 16 Aminosäuren).

Phänotypisch wurde die O-Acetylierung mittels ELISA nachgewiesen. Es zeigte sich, dass schon bei einer Verkürzung um 48bp (16 Aminosäuren) ein völliger Funktionsverlust der O-Acetyltransferase eintritt. Gemessen wurden die Serogruppe C-Polysaccharid-Expression (mAB 924), die Expression O-acetylierten Serogruppe C-Polysaccharids (mAB 1125) und die PorA-Expression (mAB P1.2) zur Normalisierung des Antigenauftrags (s. Abb. 3 und Tab. 4).

### 3.3 Gerichtete Mutagenese von OatC

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Auswirkung eines gezielten Austausches einzelner Aminosäuren von OatC untersucht werden. Mutiert wurden zunächst Histidinreste, da sich Histidine bei verschiedenen *NodL-LacA-CysE* O-Ace-

Stamm-Nr.	Beschreibung	C	A	P	Bemerkungen
WUE2120	WUE2120	+	+	+	Serogruppe C-Wildtyp
MC58	<i>N. m.</i> MC58	-	-	-	Serogruppe B-Kontrollstamm
WUE2517	WUE2120 <i>siaD</i> -	-	-	+	<i>siaD</i> -Deletionsmutante
WUE4014	WUE2120 $\Delta$ <i>oatC</i>	+	-	+	<i>oatC</i> -Deletionsmutante
WUE4020	WUE4014 pFS8/9	+	+	+	OatC unverkürzt
WUE4021	WUE4014 pFS8/10	+	-	+	OatC 16 AS verkürzt
WUE4022	WUE4014 pFS8/11	+	-	+	OatC 32 AS verkürzt
WUE4023	WUE4014 pFS8/12	+	-	+	OatC 48 AS verkürzt
WUE4024	WUE4014 pFS8/13	+	-	+	OatC 64 AS verkürzt

Tabelle 4: Expressionsnachweis mittels ELISA. C = Serogruppe C-Kapselpolysaccharid-Nachweis (mAB 924). A = Kapselpolysaccharid-O-Acetylierungs-Nachweis (mAB 1125). P = PorA-Expressionsnachweis (mAB P1.2).

tyltransferasen als funktionell wichtig herausgestellt hatten. Des Weiteren wurde der *in vivo*-Einfluss von weiteren Aminosäuren des OatC untersucht, die im Verlauf der Arbeit von den Kooperationspartnern in Hannover als kritisch für die Funktion der OatC *in vitro* identifiziert wurden.

Es sollte untersucht werden, wie sich der Austausch der Histidine 31, 111, 183, 267, 399, 456, des Serin 286 und des Asparagin 376 durch Alanin auswirkt. Durch Rekombination sollte das wildtypische *oatC*-Gen durch eine mutierte *oatC*-Variante ersetzt werden, so dass im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Verkürzungsexperimenten das Gen der O-Acetyltransferase durch den spezifischen Promotor exprimiert wird. Hierzu wurde ein Vektorkonstrukt entworfen, in das neben dem *oatC*-Gen auch der *oatC*-Downstream-Bereich eingefügt wurde. Dieser sollte die Rekombination erleichtern. Eine Kanamycin-Resistenzkassette, die nur bei genomischer Integration ihre Wirkung entfalten kann (der benutzte Vektor war kein Meningokokken-Expressionsvektor) sollte die Selektion ermöglichen.

Mutierte *oatC*-Varianten, die zum Austausch der einzelnen Histidine durch Alanin führten, (und ein Plasmid mit einem wildtypischen *oatC*-Gen) wurden von der AG Mühlenhoff als Ausgangsmaterial für die Erstellung der Klonierungsplasmide bereitgestellt. Mutanten mit Austausch des Serin 286 und Asparagin 376 wurden nachträglich von Dr. Claus hergestellt.

Die Mutation im *oatC*-Gen, die zum Austausch von Histidin 399 führt, musste neu kloniert werden, da von der AG Mühlenhoff bei dieser Mutation zu Selektions-

zwecken eine HpaII-Schnittstelle eingefügt worden war. Dies war für die geplante Klonierung ungünstig, da die *oatC*-Gene u. a. mit HpaII aus dem Ursprungsvektor ausgeschnitten werden sollten. Die erneute gerichtete Mutagenese des Histidin 399 wurde mittels der Primer FS3 und FS4 durchgeführt. Als Vorlage diente das Plasmid aus Hannover mit dem unmutierten *oatC*-Gen.

Im weiteren Verlauf wurde ein Vektorkonstrukt mit dem *oatC*-Downstream-Bereich und einer Kanamycin-Resistenzkassette auf der Basis des pBlueScript-Vektors kloniert. Hierzu wurde der *oatC*-Downstream-Bereich mittels der Primer FS1 und FS2 amplifiziert, mit ApaI geschnitten und in die ApaI-Schnittstelle des pBS-Vektors kloniert. Die Selektion entsprechender Klone erfolgte mittels Blue-White-Screening. Das neue Plasmid wurde pFS1/2 genannt und wurde mit anschließender PCR und Sequenzierung überprüft. Die Kanamycin-Resistenzkassette wurde aus dem pUC4K-Vektor mittels SalI ausgeschnitten und in die XhoI-Schnittstelle des Plasmids pFS1/2 kloniert. Klone mit Kanamycin-Resistenz wurden auf LB-Agar mit Kanamycin-Zugabe selektiert, anschließend wurden der korrekte Einbau der Resistenzkassette durch PCR (Kana1/FS2) bestätigt.

Die mutierten *oatC*-Varianten wurden aus ihren Ursprungsplasmiden mittels HpaII/BamHI ausgeschnitten. Nach DNA-Polishing mittels der T4 DNA-Polymerase wurden sie mit dem mit BamHI/EcoRV verdauten Plasmid pFS1/2 ligiert. Der Ligationsansatz wurde mittels Elektroporation in *E. coli* DH5 $\alpha$  eingebracht. Die Selektion positiver Klone, d. h. von Klonen mit korrekt inseriertem *oatC*-Gen erfolgte mittels DNA-DNA-Hybridisierung und PCR (329/KB9 und FS8/FS2). Das Ergebnis wurde durch DNA-Sequenzierung nochmals überprüft.

Nach Transformation der aus *E. coli* DH5 $\alpha$  aufgereinigten Plasmide in WUE2120 wurden Klone mittels PCR mit für die jeweilige Mutation spezifischen Primern (u. a. FS16-FS21) ausgewählt. Die Primer zeichneten sich dadurch aus, dass sie im Bereich der gewünschten Mutation ansetzten und die Mutation enthielten. Hierdurch erfolgte eine Bindung spezifisch an die DNA, die die Mutation enthielt. Das Ergebnis wurde durch Sequenzierung überprüft. Es lagen nun Klone vor, in deren genomischer DNA die Mutation und eine Kanamycin-Resistenz eingefügt war.

Nach restriktionsenzymatischem Verdau mit XmnI wurden sowohl die Kanamycin-Resistenzkassette als auch das *oatC*-Gen mittels Southern-Blot (s. Abb. 4) nachgewiesen. Erwartungsgemäß war beim Wildtyp (WUE2120) das XmnI-Fragment kleiner als bei den Mutanten.

Die Expression der OatC wurde mittels Western-Blot bestätigt. Als erster Antikörper wurde der Anti-Penta-His-Antikörper verwendet. Ein Hexa-His-Tag war bereits in den bereitgestellten *oatC*-Mutanten C-terminal integriert. Es zeigte sich eine

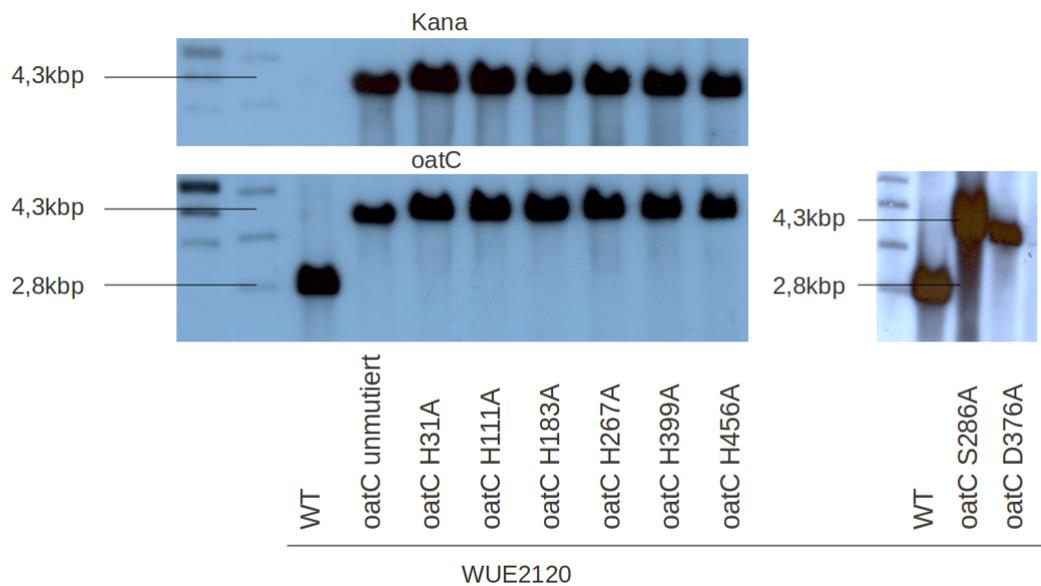


Abbildung 4: Southern-Blot der Meningokokkenstämmen mit spezifischer Punktmutation zum Nachweis des *oatC*-Gens bzw. der Kanamycin-Resistenzkassette. DNA-Verdau mittels XmnI. Stämme von links nach rechts: WUE2120 (Serogruppe C Wildtyp), *oatC*-Mutationen. Durch die Insertion der Kanamycin-Resistenzkassette sind die Banden beim *oatC*-Nachweis für die Mutations-Stämme größer als für den Serogruppe C Wildtyp. Analog erfolgte der Nachweis auch für die Mutationen S286A und D376A in einem separaten Southern-Blot.

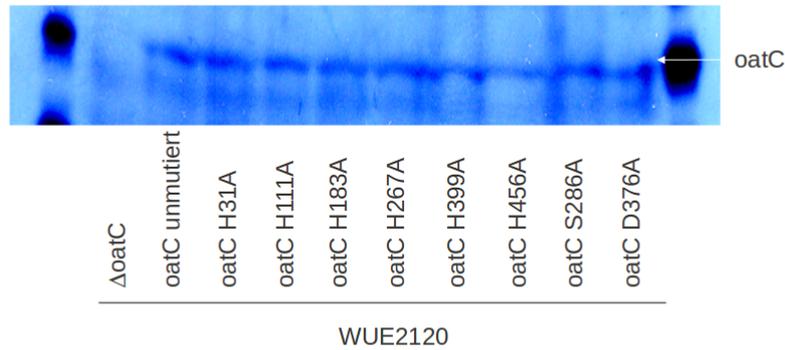


Abbildung 5: Expressionsnachweis von OatC mittels Western-Blot bei Meningokokkenstämmen mit spezifischer Punktmutation (Antikörper: Anti-Penta-His). Stämme von links nach rechts:  $\Delta oatC$  (*oatC*-Deletionsmutante), *oatC*-Mutationen. Nur bei der *oatC*-Deletionsmutante kann erwartungsgemäß keine Proteinexpression im erwarteten Größenbereich von ca. 50kDa nachgewiesen werden.

schwache, aber reproduzierbare Expression (s. Abb. 5).

Der Nachweis der O-Acetylierung erfolgte im ELISA. Es zeigte sich ein Funktionsausfall bei Mutation des Histidin 399, des Serin 286 und des Asparagin 376 (s. Abb. 6).

Für eine Zusammenfassung der Ergebnisse s. Tabelle 5.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Kapsel-O-Acetyltransferase OatC von Serogruppe C-Meningokokken, die vor Beginn der Arbeit keiner Enzymklasse zugeordnet werden konnte, mit Funktionsverlust auf C-terminale Trunkierung von 16 Aminosäuren reagiert. Desweiteren wurde belegt, dass *in vivo* die Mutation von drei Aminosäuren einer katalytischen Triade kritisch ist. Mit diesem Ergebnis konnten *in vitro*-Analysen der AG Mühlenhoff *in vivo* bestätigt werden.

Mühlenhoff *et al.* führten *in vitro* Versuche mit aufgereinigtem OatC und mit Bakterienlysaten rekombinanter *E. coli* durch. Sie untersuchten hierbei spektrophotometrisch und radiometrisch die Aktivität von wildtypischem OatC und OatC-Varianten mit spezifischem Austausch potentiell funktionsrelevanter Aminosäuren, die Akzeptor- und Donor-Substratspezifität von OatC, die Dimerisierung des En-

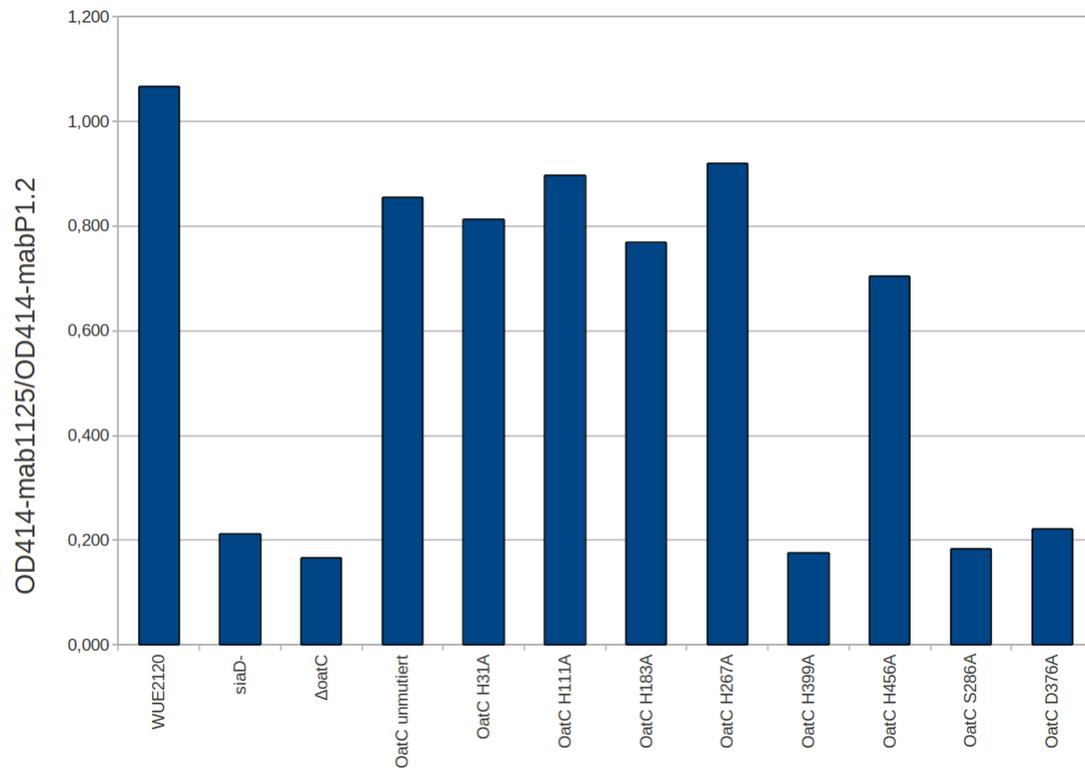


Abbildung 6: Expression von O-acetyliertem Kapselpolysaccharid (ELISA). Dargestellt sind die Reaktivitäten von WUE2120-Mutanten mit Aminosäure-Austausch an verschiedenen Positionen von OatC mit dem mAB1125, der für O-acetyliertes Serogruppe-C-Polysaccharid spezifisch ist. Die Daten wurden für die PorA-Expression normalisiert (s. Material und Methoden). Stämme von links nach rechts: WUE2120 (Serogruppe C Wildtyp), *siaD*- (WUE2517, *siaD*-Deletionsmutante),  $\Delta$ *oatC* (WUE4014, *oatC*-Deletionsmutante), „wildtypische“ OatC-Mutante (OatC unmutiert), OatC-Mutanten mit spezifischen Punktmutationen (OatC H31A - OatC D376A).

Stamm-Nr.	Beschreibung	C	A	P	Bemerkungen
WUE2120	WUE2120	+	+	+	Serogruppe C-Wildtyp
MC58	<i>N. m.</i> MC58	-	-	-	Serogruppe B-Kontrollstamm
WUE2517	WUE2120 <i>siaD</i> -	-	-	+	<i>siaD</i> -Deletionsmutante
WUE4014	WUE2120 $\Delta$ <i>oatC</i>	-	-	+	<i>oatC</i> -Deletionsmutante
WUE4005	<i>OatC</i> unmutiert	+	+	+	wildtypische Mutante
WUE4006	<i>OatC</i> H31A	+	+	+	
WUE4007	<i>OatC</i> H111A	+	+	+	
WUE4008	<i>OatC</i> H183A	+	+	+	
WUE4009	<i>OatC</i> H267A	+	+	+	
WUE4010	<i>OatC</i> H399A	+	-	+	
WUE4011	<i>OatC</i> H456A	+	+	+	
WUE4036	<i>OatC</i> S286A	+	-	+	
WUE4037	<i>OatC</i> D376A	+	-	+	

Tabelle 5: Expressionsnachweis mittels ELISA. C = Serogruppe C-Kapselpolysaccharid-Nachweis (mAB 924). A = Kapselpolysaccharid-O-Acetylierungs-Nachweis (mAB 1125). P = PorA-Expressionsnachweis (mAB P1.2).

zyms und die Bildung eines Acetyl-Enzym-Intermediates während des Reaktionsablaufs [9]. *In vitro* erwies sich OatC als substratspezifisch für  $\alpha(2-9)$ -verknüpfte Polysialinsäuren und für Acetyl-CoA. OatC bildete Dimere. Der Austausch von Histidin 456 durch Alanin ging mit einem Rückgang der Enzymaktivität auf 70% der wildtypischen Aktivität, der Austausch von Histidin 399 durch Alanin mit einem vollständigen Funktionsverlust einher [9].

OatC weist keine Sequenzhomologien zur Gruppe der *Hexapeptide-Repeat-Acyltransferasen* auf, insbesondere nicht zu NeuO [26] (*E. coli* K1), OatWY [23] (*N. m.* Serogruppen W und Y) und NeuD [59, 48] (Streptokokken, *Campylobacter jejuni*). Gemeinsam ist dieser Gruppe zum einen die Nutzung von Acetyl-CoA als Acetylgruppen-Donor [71], zum anderen die Lage des aktiven Zentrums am Carboxy-Terminus [23]. Untersuchungen in Hannover hatten bereits eine (weitgehende) Spezifität von OatC für den Acetylgruppen-Donor Acetyl-CoA ergeben [9]. Zunächst sollte geprüft werden, ob eine C-terminale Verkürzung von OatC zu einem Funktionsverlust des Enzyms *in vivo* führt.

In einer *oatC*-negativen Mutante des Stammes WUE2120 wurden OatC und Varianten mit C-terminaler Verkürzung *in trans* exprimiert. Die Expression *in trans* wurde für diesen Teil der Arbeit gewählt, da der *porA*-Promotor des Vektors pAP1 eine kräftige Proteinexpression erwarten ließ.

Untersuchungen der OatC-Verkürzungen zeigten einen eindeutigen Funktionsausfall des Enzyms ab der ersten Verkürzung von 16 Aminosäuren, während die Positivkontrolle eine Kapsel-O-Acetylierung aufwies. Es ergeben sich nun einige Hypothesen zur Erklärung der Ergebnisse:

1. Zunächst besteht die Möglichkeit, dass die Proteinfaltung von OatC durch die C-terminale Verkürzung verändert wurde.
2. Weiterhin könnte die katalytische Domäne des Enzyms sehr nah am C-Terminus liegen. Letztere Annahme erscheint aufgrund weiterführender Untersuchungen wohl eher unwahrscheinlich (s. u.).
3. Man könnte auch annehmen, dass der C-terminale Bereich des Enzyms um His-456 an der Substratbindung beteiligt ist. OatC besteht aus 460 Aminosäuren. Der Bereich um His-456 wurde also mit der ersten C-terminalen Verkürzung entfernt. Bei einer Vielzahl von O-Acetyltransferasen spielt die Aminosäure Histidin eine wichtige Rolle bei der Substratbindung und -umsetzung [46, 47, 49, 50, 105]. *In vitro*-Studien in Hannover ergaben allerdings, dass ein Einzelaustausch von His-456 (s. u.) die Aktivität des Enzyms auf 70% vermindert, interessanterweise jedoch nicht vollkommen ausschaltet [9].

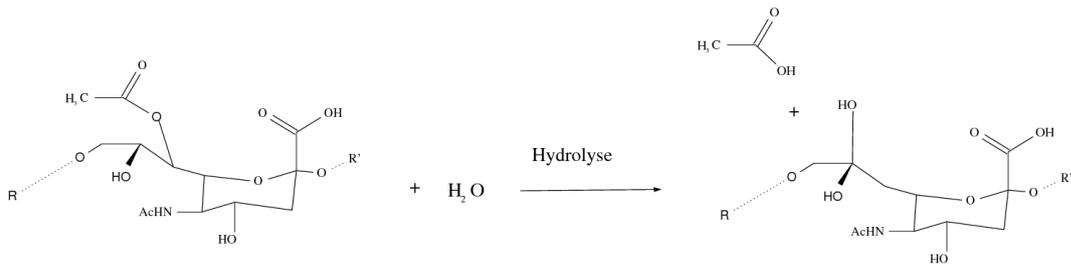


Abbildung 7: Hydrolyse der O-Acetylierung einer Polysialinsäure.

Von vielen O-Acetyltransferasen weiß man, dass der Aminosäure Histidin eine wichtige Rolle bei der Katalyse zukommt [46, 47, 49, 50, 105].

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen eines gezielten Austausches je eines der insgesamt sechs in OatC kodierten Histidine, also nicht nur His-456, sondern auch des His-31, His-111, His-183, His-267 und His-399 durch Alanin *in vivo* untersucht. Es ergab sich, dass es nur bei Histidin 399 zu einem Funktionsverlust kam. In den *in vitro*-Versuchen der AG Mühlenhoff stellte sich ebenfalls nur Histidin 399 als funktionskritisch heraus [9]. Während sich *in vitro* Hinweise auf eine verminderte Aktivität der OatC-Variante mit Austausch des Histidins 456 ergaben [9], konnte dies in den *in vivo*-Versuchen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Diese Diskrepanz könnte an den unterschiedlichen methodischen Zugängen liegen. Während die *in vitro*-Untersuchung eher als quantitativ zu beurteilen ist, ist die Untersuchung *in vivo* eher qualitativ zu werten.

Wie bereits oben erwähnt, wurde es aufgrund fehlender charakteristischer Sequenzhomologien für wenig wahrscheinlich angesehen, dass OatC zur Gruppe der Hexapeptide-Repeat-Acyltransferasen bzw. zur Gruppe der *NodL-LacA-CysE* O-Acetyltransferasen gehört. Bisherige Sequenzanalysen hatten keine Homologien mit bekannten O-Acetyltransferasen ergeben. Die AG Mühlenhoff suchte nach Homologien mit Enzymen, die die Umkehrreaktion katalysieren. Es handelt sich hierbei um die Hydrolyse einer Esterbindung (s. Abb. 7).

Auf diesem Weg konnten strukturelle Ähnlichkeiten von OatC mit der Superfamilie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen nachgewiesen werden.  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen katalysieren zahlreiche unterschiedliche Reaktionen und treten z. B. als Proteasen, Lipasen, Esterasen, Dehalogenasen, Haloperoxidasen, Lyasen und Epoxid-Hydrolasen auf [7, 38, 47, 53, 57, 68, 73, 90, 79]. Es handelt sich um eine sehr heterogene Gruppe von Enzymen mit gewöhnlicherweise nur geringen Sequenzhomologien, die zum ersten Mal 1992 durch Ollis et al. beschrieben wurde [76]. Hauptsächlich zeichnen sie sich durch folgende Merkmale aus:

- Die charakteristische und namensgebende  $\alpha/\beta$ -Faltung der Proteine, eine acht-

MSINTFETFIYELYQSTNFAEIARITGFSNHKALNLE  
TIRMMAISCFKTKNTTKCIELSEYFNEKSDIKDFFI  
EILAECYFLQNDLVKSLENYEKALLLNPKLISARFKH  
MCLKYRLFNELDSTTF SKYEIESQQKKISNLRIIAY  
IQLKEKKYFKAYNNLKLLELNKSPFYPDYLSIIHAI  
ENLEYSKQSQNTKKELTEYIKISKAIALKSEFVCNGS  
NNLFVTLSPATGFVLKKYNYPADKLCFIDNTNTYYTF  
AYELIAEHIIISLVKKYKYENISII **GSSXGG**TATIILL  
NLLQTALPNTTICAVSCSPQIQIFPFNKNLTIPSYQK  
FAEYFSYNSILESKCAQAQKLNFDILYRNKLTIFYG  
DKFKMDAQEVSTIRPINNTTIIPLNYSGHGSLIPLTI  
PENKSFDELKQKYSKLEIDTDFQALGGNNLSSIVDEI  
FEIYSNPDMRLHKFLC

Abbildung 8: Proteinsequenz von OatC. Markiert ist das nucleophile Ellenbogen-Motiv (GXSXGG), in dessen Mitte sich das Serin 286 befindet.

strängige parallele  $\alpha/\beta$ -Faltung [44]. Ein in der Literatur häufig verwendeter Prototyp einer  $\alpha/\beta$ -Hydrolase mit charakteristischer Faltung ist beispielsweise die Carboxylesterase von *Pseudomonas fluorescens* [52].

- Eine katalytische Triade, die aus einem Nucleophil, einer sauren Aminosäure, typischerweise Aspartat bzw. Glutamat, und Histidin besteht [74].
- Ein nucleophiles Ellenbogen-Motiv nach dem  $\beta$ 5-Strang. Es handelt sich hierbei um einen hochkonservierten Bereich [76].

In OatC konnte ein sog. nucleophiles Ellenbogen-Motiv nachgewiesen werden (GXS<sup>286</sup>XGG, s. Abb. 8) [9], das typisch für  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen ist. Durch weitere Sequenzanalysen konnte belegt werden, dass OatC auch mit großer Wahrscheinlichkeit eine  $\alpha/\beta$ -Faltung annimmt [9]. Weiterführende Sequenzanalysen, in denen gezielt nach in Frage kommenden Aminosäuren gesucht wurde, ergaben Serin 285, Serin 286, Glutamat 336, Glutamat 345, Aspartat 359, Aspartat 371, Aspartat 376, Aspartat 379 und Histidin 399 als potentielle Mitglieder der katalytischen Triade.

Durch die Ergebnisse der AG Mühlenhoff und dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Serin 286, Aspartat 376 und Histidin 399 für die Funktion von OatC *in vi-*

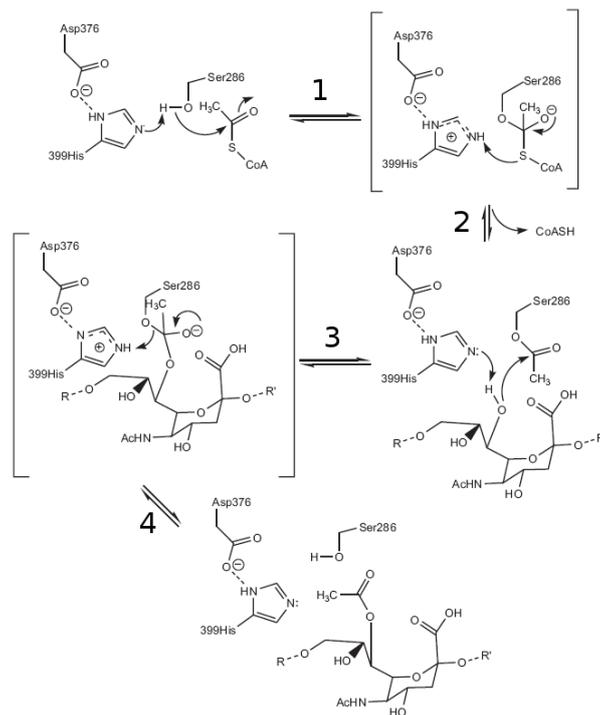


Abbildung 9: Reaktionsablauf der O-Acetylierung des Serogruppe C Kapselpolysaccharids durch OatC. (Darstellung nach Bergfeld et al. (2009) [9])

*tro* und *in vivo* kritisch sind. Dies stützt die Hypothese, dass hier eine katalytische Triade vorliegt. Es deutet also vieles darauf hin, dass es sich bei OatC um eine  $\alpha/\beta$ -Hydrolase handelt.

Aufgrund der *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnisse wurde nun folgender Reaktionsablauf angenommen [9] (s. Abb. 9):

Die negativ geladene Carboxylgruppe von Aspartat 376 bildet eine Salzbrücke mit dem N $\delta$ 1 des Histidin 399. Das N $\epsilon$ 2 des Imidazolringes kann nun ein Proton von Serin 286 abziehen. Dieses wird hierdurch negativ geladen und kann einen nucleophilen Angriff auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom von Acetyl-CoA starten (Schritt 1). In einem Zwischenschritt entsteht ein AcetylCoA-Enzym-Intermediat, bei dem die Acetylgruppe kovalent an Serin 286 gebunden ist (Schritt 2). Dieses Intermediat wurde biochemisch nachgewiesen [9]. Histidin 399 zieht nun vom designierten Akzeptor der Acetylgruppe, Neu5Ac, mit seinem basischen Imidazolring von der Hydroxylgruppe an C7 bzw. C8 ab (Schritt 3). Nun greift das Carbonyl-Kohlenstoffatom der Acetylgruppe in einem nucleophilen Angriff das Sauerstoffatom an C7 bzw. C8 an und die Acetylgruppe wird so mit Neu5Ac verbunden (Schritt 4). Im letzten Schritt der Reaktion kehrt Serin 286 in seinen protonierten Zustand zurück und die Reaktion kann erneut beginnen (Schritt 5).

## 5 Zusammenfassung

OatC ist die O-Acetyltransferase von Serogruppe C Meningokokken. Sie katalysiert die O-Acetylierung der Sialinsäurekapsel. Das Enzym konnte vor Beginn dieser Arbeit keiner bekannten Gruppe von Enzymen zugeordnet werden. Durch *in vivo*-Versuche und *in vitro*-Studien sollten weitere Erkenntnisse zu Lage und Struktur des aktiven Zentrums von OatC gewonnen werden.

Die vorliegende Arbeit besteht aus drei Teilen:

1. Es sollte eine Meningokokken-Mutante mit einer Deletion des *oatC*-Gens hergestellt werden.
2. Das *oatC*-Gen sollte schrittweise verkürzt und in trans auf dem pAP1His Vektor in die *oatC*-Deletionsmutante eingebracht werden.
3. Gerichtete Mutagenese von Histidinresten, Serin 286 und Aspartat 376 sollte Aussagen über die *in vivo*-Relevanz der Aminosäuren ermöglichen.

Die Mutanten wurden im ELISA auf Ihren O-Acetylierungsstatus hin überprüft. Die *oatC*-Deletionsmutante war erwartungsgemäß negativ. Bereits die erste Verkürzung von OatC um 16 Aminosäuren führte zu einem vollständigen Verlust der O-Acetylierung, der Austausch der Aminosäuren Histidin 399, Serin 286 und Aspartat 376 durch gerichtete Mutagenese ebenfalls.

Wir spekulieren, dass der Verlust des C-Terminus zu einer veränderten Proteinfaltung führt oder eine katalytische Funktion des Histidin 456 eliminiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass OatC der Gruppe der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen zugeordnet werden kann (s. a. Bergfeld et al. 2009 [9]). Das katalytische Zentrum besteht aus Serin 286, Aspartat 376 und Histidin 399. Der Bereich um Histidin 456 beeinflusst die Funktion erheblich.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Bericht des Nationalen Referenzzentrums für Meningokokken für das Jahr 2009. [http://www.meningococcus.uni-wuerzburg.de/startseite/berichte/daten\\_2009/](http://www.meningococcus.uni-wuerzburg.de/startseite/berichte/daten_2009/), 2009.
- [2] ABDILLAHI, H., CROWE, B. A., ACHTMAN, M., AND POOLMAN, J. T. Two monoclonal antibodies specific for serotype 4 antigen of *Neisseria meningitidis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7, 2 (1988), 293–6.
- [3] ABDILLAHI, H., AND POOLMAN, J. T. Typing of group-B *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies in the whole-cell ELISA. *J. Med. Microbiol.* 26, 3 (1988), 177–80.
- [4] AGUADO, T., BERTHERAT, E., DJINGAREY, M., KANDOLO, D., KIENY, M. P., KONDE, K., LAFORCE, F. M., NELSON, C. B., PEREA, W., AND PRÉZIOSI, M. P. Meningococcal meningitis. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 1 (2005), 10–1.
- [5] ANNUNZIATO, P. W., WRIGHT, L. F., VANN, W. F., AND SILVER, R. P. Nucleotide sequence and genetic analysis of the *neuD* and *neuB* genes in region 2 of the polysialic acid gene cluster of *Escherichia coli* K1. *J. Bacteriol.* 177, 2 (1995), 312–9.
- [6] ARAKERE, G., AND FRASCH, C. E. Specificity of antibodies to O-acetyl-positive and O-acetyl-negative group C meningococcal polysaccharides in sera from vaccinees and carriers. *Infect Immun* 59, 12 (1991), 4349–56.
- [7] ARGIRIADI, M. A., MORISSEAU, C., HAMMOCK, B. D., AND CHRISTIANSON, D. W. Detoxification of environmental mutagens and carcinogens: structure, mechanism, and evolution of liver epoxide hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 19 (1999), 10637–42.
- [8] BERGER, U., AND DORING, M. T. Resistance of human *Neisseria* species against desiccation. *Arch Hyg Bakteriol* 153, 6 (1969), 556–9.
- [9] BERGFELD, A. K., CLAUS, H., LORENZEN, N. K., SPIELMANN, F., VOGEL, U., AND MÜHLENHOFF, M. The polysialic acid-specific O-acetyltransferase OatC from *Neisseria meningitidis* serogroup C evolved apart from other bacterial sialate O-acetyltransferases. *J. Biol. Chem.* 284, 1 (2009), 6–16.

- [10] BERGFELD, A. K., CLAUS, H., VOGEL, U., AND MUHLENHOFF, M. Biochemical characterization of the polysialic acid-specific O-acetyltransferase NeuO of *Escherichia coli* K1. *J Biol Chem* 282, 30 (2007), 22217–27.
- [11] BERRY, D. S., LYNN, F., LEE, C. H., FRASCH, C. E., AND BASH, M. C. Effect of O acetylation of *Neisseria meningitidis* serogroup A capsular polysaccharide on development of functional immune responses. *Infect Immun* 70, 7 (2002), 3707–13.
- [12] BHASIN, N., ALBUS, A., MICHON, F., LIVOLSI, P. J., PARK, J. S., AND LEE, J. C. Identification of a gene essential for O-acetylation of the *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide. *Mol. Microbiol.* 27, 1 (1998), 9–21.
- [13] BHATTACHARJEE, A. K., AND JENNINGS, H. J. Determination of the linkages in some methylated, sialic acid-containing, meningococcal polysaccharides by mass spectrometry. *Carbohydr Res* 51, 2 (1976), 253–61.
- [14] BHATTACHARJEE, A. K., JENNINGS, H. J., KENNY, C. P., MARTIN, A., AND SMITH, I. C. Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance. *J Biol Chem* 250, 5 (1975), 1926–32.
- [15] BLIX, F. G., GOTTSCHALK, A., AND KLENK, E. Proposed Nomenclature in the Field of Neuraminic and Sialic Acids. *Nature* 179, 4569 (1957), 1088.
- [16] BORROW, R., LONGWORTH, E., GRAY, S. J., AND KACZMARSKI, E. B. Prevalence of de-O-acetylated serogroup C meningococci before the introduction of meningococcal serogroup C conjugate vaccines in the United Kingdom. *FEMS Immunol Med Microbiol* 28, 3 (2000), 189–91.
- [17] BRUDZINSKI, J. Un signe nouveau sur les membres inférieurs dans les méningites chez les enfants (signe de la nuque). *Arch Méd Enfant* 12 (1909), 745–752.
- [18] BUNDLE, D. R., SMITH, I. C., AND JENNINGS, H. J. Determination of the structure and conformation of bacterial polysaccharides by carbon 13 nuclear magnetic resonance. Studies on the group-specific antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups A and X. *J. Biol. Chem.* 249, 7 (1974), 2275–81.
- [19] C., F. Nebennierenapoplexie bei kleinen Kindern. *Jahrbuch für Kinderheilkunde*, 87 (1918), 109–125.

- [20] CARTWRIGHT, K. A., STUART, J. M., JONES, D. M., AND NOAH, N. D. The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect* 99, 3 (1987), 591–601.
- [21] CAUGANT, D. A., FRØHOLM, L. O., BØVRE, K., HOLTEN, E., FRASCH, C. E., MOCCA, L. F., ZOLLINGER, W. D., AND SELANDER, R. K. Intercontinental spread of *Neisseria meningitidis* clones of the ET-5 complex. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53, 6 (1987), 389–94.
- [22] CLAUS, H. 2008.
- [23] CLAUS, H., BORROW, R., ACHTMAN, M., MORELLI, G., KANTELBERG, C., LONGWORTH, E., FROSCH, M., AND VOGEL, U. Genetics of capsule O-acetylation in serogroup C, W-135 and Y meningococci. *Mol Microbiol* 51, 1 (2004), 227–39.
- [24] CLAUS, H., MAIDEN, M. C., WILSON, D. J., MCCARTHY, N. D., JOLLEY, K. A., URWIN, R., HESSLER, F., FROSCH, M., AND VOGEL, U. Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis* 191, 8 (2005), 1263–71. Claus, Heike Maiden, Martin C J Wilson, Daniel J McCarthy, Noel D Jolley, Keith A Urwin, Rachel Hessler, Frank Frosch, Matthias Vogel, Ulrich Research Support, Non-U.S. Gov't United States The Journal of infectious diseases *J Infect Dis*. 2005 Apr 15;191(8):1263-71. Epub 2005 Mar 15.
- [25] CLAUS, H., VOGEL, U., MUHLENHOFF, M., GERARDY-SCHAHN, R., AND FROSCH, M. Molecular divergence of the sia locus in different serogroups of *Neisseria meningitidis* expressing polysialic acid capsules. *Mol Gen Genet* 257, 1 (1997), 28–34.
- [26] DESZO, E. L., STEENBERGEN, S. M., FREEDBERG, D. I., AND VIMR, E. R. *Escherichia coli* K1 polysialic acid O-acetyltransferase gene, neuO, and the mechanism of capsule form variation involving a mobile contingency locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15 (2005), 5564–9.
- [27] DOWNIE, J. A. The nodL gene from *Rhizobium leguminosarum* is homologous to the acetyl transferases encoded by lacA and cysE. *Mol Microbiol* 3, 11 (1989), 1649–51.
- [28] EDWARDS, U., MULLER, A., HAMMERSCHMIDT, S., GERARDY-SCHAHN, R., AND FROSCH, M. Molecular analysis of the biosynthesis pathway of

- the alpha-2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Mol Microbiol* 14, 1 (1994), 141–9. Edwards, U Muller, A Hammerschmidt, S Gerardy-Schahn, R Frosch, M Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't England Molecular microbiology *Mol Microbiol*. 1994 Oct;14(1):141-9.
- [29] ENGVALL, E., AND PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 9 (1971), 871.
- [30] FOX, A. J., TAHA, M. K., AND VOGEL, U. Standardized nonculture techniques recommended for European reference laboratories. *FEMS Microbiol Rev* 31, 1 (2007), 84–8.
- [31] FRASA, H., PROCEE, J., TORENSMA, R., VERBRUGGEN, A., ALGRA, A., ROZENBERG-ARSKA, M., KRAAIJEVELD, K., AND VERHOEF, J. *Escherichia coli* in bacteremia: O-acetylated K1 strains appear to be more virulent than non-O-acetylated K1 strains. *J Clin Microbiol* 31, 12 (1993), 3174–8.
- [32] FRASCH, C. E., ZOLLINGER, W. D., AND POOLMAN, J. T. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev. Infect. Dis.* 7, 4 (1985), 504–10.
- [33] FROSCH, M., GÖRGEN, I., BOULNOIS, G. J., TIMMIS, K. N., AND BITTERSUERMANN, D. NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of *Escherichia coli* K1 and group B meningococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4 (1985), 1194–8.
- [34] FROSCH, M., AND MULLER, A. Phospholipid substitution of capsular polysaccharides and mechanisms of capsule formation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 8, 3 (1993), 483–93.
- [35] FROSCH, M., AND U., V. Response from Frosch and Vogel to: Meningococcal disease: epidemiology and pathogenesis. *Trends Microbiol* 4, 12 (1996), 469–70.
- [36] FROSCH, M., AND VOGEL, U. Structure and Genetics of the Meningococcal Capsule. In *Handbook of Meningococcal Disease*, M. Frosch and M. C. Maiden, Eds. Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- [37] FROSCH, M., WEISGERBER, C., AND MEYER, T. F. Molecular characterization and expression in *Escherichia coli* of the gene complex encoding the

- polysaccharide capsule of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5 (1989), 1669–73.
- [38] FUJINO, S., AKIYAMA, D., AKABOSHI, S., FUJITA, T., WATANABE, Y., AND TAMAI, Y. Purification and characterization of phospholipase B from *Candida utilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 2 (2006), 377–86.
- [39] FUSCO, P. C., FARLEY, E. K., HUANG, C. H., MOORE, S., AND MICHON, F. Protective meningococcal capsular polysaccharide epitopes and the role of O acetylation. *Clin Vaccine Immunol* 14, 5 (2007), 577–84.
- [40] GARRITY, G. M., Ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2 (Parts A, B & C; Three-Volume Set)*, 2nd ed. Springer, 8 2005.
- [41] GLODE, M. P., LEWIN, E. B., SUTTON, A., LE, C. T., GOTSCHLICH, E. C., AND ROBBINS, J. B. Comparative immunogenicity of vaccines prepared from capsular polysaccharides of group C *Neisseria meningitidis* O-acetyl-positive and O-acetyl-negative variants and *Escherichia coli* K92 in adult volunteers. *J Infect Dis* 139, 1 (1979), 52–9.
- [42] GUDLAVALLETI, S. K., DATTA, A. K., TZENG, Y. L., NOBLE, C., CARLSON, R. W., AND STEPHENS, D. S. The *Neisseria meningitidis* serogroup A capsular polysaccharide O-3 and O-4 acetyltransferase. *J Biol Chem* 279, 41 (2004), 42765–73.
- [43] GUIVER, M., AND BORROW, R. PCR Diagnosis. 23.
- [44] HEIKINHEIMO, P., GOLDMAN, A., JEFFRIES, C., AND OLLIS, D. L. Of barn owls and bankers: a lush variety of alpha/beta hydrolases. *Structure* 7, 6 (1999), R141–6.
- [45] HILSE, R., HAMMERSCHMIDT, S., BAUTSCH, W., AND FROSCH, M. Site-specific insertion of IS1301 and distribution in *Neisseria meningitidis* strains. *J. Bacteriol.* 178, 9 (1996), 2527–32.
- [46] HODAWADEKAR, S. C., AND MARMORSTEIN, R. Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* 26, 37 (2007), 5528–40.
- [47] HOLMQUIST, M. Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr Protein Pept Sci* 1, 2 (2000), 209–35.

- [48] HOULISTON, R. S., ENDTZ, H. P., YUKI, N., LI, J., JARRELL, H. C., KOGA, M., VAN BELKUM, A., KARWASKI, M. F., WAKARCHUK, W. W., AND GILBERT, M. Identification of a sialate O-acetyltransferase from *Campylobacter jejuni*: demonstration of direct transfer to the C-9 position of terminalalpha-2, 8-linked sialic acid. *J Biol Chem* 281, 17 (2006), 11480–6.
- [49] JOGL, G., HSIAO, Y. S., AND TONG, L. Structure and function of carnitine acyltransferases. *Ann N Y Acad Sci* 1033 (2004), 17–29.
- [50] JOHNSON, C. M., RODERICK, S. L., AND COOK, P. F. The serine acetyltransferase reaction: acetyl transfer from an acylpantothenyl donor to an alcohol. *Arch Biochem Biophys* 433, 1 (2005), 85–95.
- [51] KERNIG, V. M. Über ein Krankheitssymptom der akuten Meningitis. *St. Petersburger Med Wochenschr* 7 (1882).
- [52] KIM, K. K., SONG, H. K., SHIN, D. H., HWANG, K. Y., CHOE, S., YOO, O. J., AND SUH, S. W. Crystal structure of carboxylesterase from *Pseudomonas fluorescens*, an alpha/beta hydrolase with broad substrate specificity. *Structure* 5, 12 (1997), 1571–84.
- [53] KOLKENBROCK, S., PARSHAT, K., BEERMANN, B., HINZ, H.-J., AND FETZNER, S. N-acetylanthranilate amidase from *Arthrobacter nitrogua-jacolicus* Rü61a, an alpha/beta-hydrolase-fold protein active towards arylacylamides and -esters, and properties of its cysteine-deficient variant. *J. Bacteriol.* 188, 24 (2006), 8430–40.
- [54] KURZAI, O., SCHMITT, C., CLAUS, H., VOGEL, U., FROSCH, M., AND KOLB-MÄURER, A. Carbohydrate composition of meningococcal lipopolysaccharide modulates the interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Cell. Microbiol.* 7, 9 (2005), 1319–34.
- [55] LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 5259 (1970), 680–5.
- [56] LAPPANN, M., HAAGENSEN, J. A., CLAUS, H., VOGEL, U., AND MOLIN, S. Meningococcal biofilm formation: structure, development and phenotypes in a standardized continuous flow system. *Mol Microbiol* 62, 5 (2006), 1292–309.
- [57] LEE, L.-C., LEE, Y.-L., LEU, R.-J., AND SHAW, J.-F. Functional role of catalytic triad and oxyanion hole-forming residues on enzyme activity of

- Escherichia coli thioesterase I/protease I/phospholipase L1. *Biochem. J.* 397, 1 (2006), 69–76.
- [58] LEMERCINIER, X., AND JONES, C. Full <sup>1</sup>H NMR assignment and detailed O-acetylation patterns of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine production. *Carbohydr Res* 296 (1996), 83–96.
- [59] LEWIS, A. L., HENSLER, M. E., VARKI, A., AND NIZET, V. The group B streptococcal sialic acid O-acetyltransferase is encoded by neuD, a conserved component of bacterial sialic acid biosynthetic gene clusters. *J Biol Chem* 281, 16 (2006), 11186–92.
- [60] LEYING, H., SUERBAUM, S., KROLL, H. P., STAHL, D., AND OPFERKUCH, W. The capsular polysaccharide is a major determinant of serum resistance in K-1-positive blood culture isolates of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 58, 1 (1990), 222–7.
- [61] LIU, T. Y., GOTSCHLICH, E. C., DUNNE, F. T., AND JONSSON, E. K. Studies on the meningococcal polysaccharides. II. Composition and chemical properties of the group B and group C polysaccharide. *J Biol Chem* 246, 15 (1971), 4703–12.
- [62] LONGWORTH, E., FERNSTEN, P., MININNI, T. L., VOGEL, U., CLAUS, H., GRAY, S., KACZMARSKI, E., AND BORROW, R. O-Acetylation status of the capsular polysaccharides of serogroup Y and W135 meningococci isolated in the UK. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32, 2 (2002), 119–23.
- [63] MAIDEN, M. C., AND FROSCHE, M. Molecular techniques for the investigation of meningococcal disease epidemiology. *Mol. Biotechnol.* 18, 2 (2001), 119–34.
- [64] MAIDEN, M. C. J., SUKER, J., MCKENNA, A. J., BYGRAVES, J. A., AND FEAVERS, I. M. Comparison of the class 1 outer membrane proteins of eight serological reference strains of *Neisseria meningitidis*. *Molecular Microbiology* 5, 3 (1991), 727.
- [65] MASSON, L., AND HOLBEIN, B. E. Physiology of sialic acid capsular polysaccharide synthesis in serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 154, 2 (1983), 728–36.
- [66] MCGUINNESS, B. Point mutation in meningococcal por A gene associated with increased endemic disease. *The Lancet* 337, 8740 (1991), 514.

- [67] MICHON, F., HUANG, C. H., FARLEY, E. K., HRONOWSKI, L., DI, J., AND FUSCO, P. C. Structure activity studies on group C meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines: effect of O-acetylation on the nature of the protective epitope. *Dev Biol (Basel)* 103 (2000), 151–60.
- [68] MIRZA, I. A., NAZI, I., KORCZYNSKA, M., WRIGHT, G. D., AND BERGHUIS, A. M. Crystal structure of homoserine transacetylase from *Haemophilus influenzae* reveals a new family of alpha/beta-hydrolases. *Biochemistry* 44, 48 (2005), 15768–73.
- [69] MORDHORST, I., CLAUS, H., EWERS, C., LAPPANN, M., SCHOEN, C., ELIAS, J., BATZILLA, J., DOBRINDT, U., WIELER, L., BERGFELD, A., MÜHLENHOFF, M., AND VOGEL, U. O-acetyltransferase gene *neuO* is segregated according to phylogenetic background and contributes to environmental desiccation resistance in *Escherichia coli* K1. *Environ. Microbiol.* (2009).
- [70] MOXON, E. R., AND KROLL, J. S. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 150 (1990), 65–85.
- [71] MURRAY, I. A., AND SHAW, W. V. O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1 (1997), 1–6.
- [72] NA, V. *Development of Meningococcal Serogroups*, vol. 2. CRC Press Inc., 1987, pp. 33–37.
- [73] NANDHAGOPAL, N., YAMADA, A., HATTA, T., MASAI, E., FUKUDA, M., MITSUI, Y., AND SENDA, T. Crystal structure of 2-hydroxyl-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HPDA) hydrolase (BphD enzyme) from the *Rhodococcus* sp. strain RHA1 of the PCB degradation pathway. *J. Mol. Biol.* 309, 5 (2001), 1139–51.
- [74] NARDINI, M., AND DIJKSTRA, B. W. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* 9, 6 (1999), 732–7.
- [75] NEUMANN, E., AND ROSENHECK, K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J Membr Biol* 10, 3 (1972), 279–90.
- [76] OLLIS, D. L., CHEAH, E., CYGLER, M., DIJKSTRA, B., FROLOW, F., FRANKEN, S. M., HAREL, M., REMINGTON, S. J., SILMAN, I., AND SCHRAG, J. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 5, 3 (1992), 197–211.

- [77] ORSKOV, F., ORSKOV, I., SUTTON, A., SCHNEERSON, R., LIN, W., EGAN, W., HOFF, G. E., AND ROBBINS, J. B. Form variation in *Escherichia coli* K1: determined by O-acetylation of the capsular polysaccharide. *J Exp Med* 149, 3 (1979), 669–85.
- [78] PLUSCHKE, G., MAYDEN, J., ACHTMAN, M., AND LEVINE, R. P. Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 *Escherichia coli* to complement-mediated killing. *Infect. Immun.* 42, 3 (1983), 907–13.
- [79] POLGÁR, L. The catalytic triad of serine peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 19-20 (2005), 2161–72.
- [80] POOLMAN, J. T., KRIZ-KUZEMENSKA, P., ASHTON, F., BIBB, W., DANKERT, J., DEMINA, A., FRØHOLM, L. O., HASSAN-KING, M., JONES, D. M., AND LIND, I. Serotypes and subtypes of *Neisseria meningitidis*: results of an international study comparing sensitivities and specificities of monoclonal antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 1 (1995), 69–72.
- [81] R, U. *Variation in meningococcal PorB proteins*. PhD thesis, Stoke-on-Trent, UK, 1998.
- [82] R., W. A case of suprarenal apoplexy. *Lancet* 1 (1911), 577–578.
- [83] RICHMOND, P., BORROW, R., FINDLOW, J., MARTIN, S., THORNTON, C., CARTWRIGHT, K., AND MILLER, E. Evaluation of De-O-acetylated meningococcal C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine in infancy: reactogenicity, immunogenicity, immunologic priming, and bactericidal activity against O-acetylated and De-O-acetylated serogroup C strains. *Infect Immun* 69, 4 (2001), 2378–82.
- [84] RICHMOND, P., BORROW, R., GOLDBLATT, D., FINDLOW, J., MARTIN, S., MORRIS, R., CARTWRIGHT, K., AND MILLER, E. Ability of 3 different meningococcal C conjugate vaccines to induce immunologic memory after a single dose in UK toddlers. *J. Infect. Dis.* 183, 1 (2001), 160–3.
- [85] RUSSELL, J. E., JOLLEY, K. A., FEAVERS, I. M., MAIDEN, M. C. J., AND SUKER, J. PorA variable regions of *Neisseria meningitidis*. *Emerging Infect. Dis.* 10, 4 (2004), 674–8.
- [86] SANGER, F., NICKLEN, S., AND COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 12 (1977), 5463–7.

- [87] SELANDER, R. K., CAUGANT, D. A., OCHMAN, H., MUSSER, J. M., GILMOUR, M. N., AND WHITTAM, T. S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 5 (1986), 873–84.
- [88] SHORT, J. M., FERNANDEZ, J. M., SORGE, J. A., AND HUSE, W. D. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* 16, 15 (1988), 7583–600.
- [89] SPINOSA, M. R., PROGIDA, C., TALA, A., COGLI, L., ALIFANO, P., AND BUCCI, C. The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells. *Infect Immun* 75, 7 (2007), 3594–603.
- [90] SRIVATSAN, M. An analysis of acetylcholinesterase sequence for predicting mechanisms of its non-catalytic actions. *Bioinformatics* 1, 8 (2006), 281–4.
- [91] STEPHENS, D. S. Uncloaking the meningococcus: dynamics of carriage and disease. *Lancet* 353, 9157 (1999), 941–2.
- [92] SWAIN, C. L., AND MARTIN, D. R. Survival of meningococci outside of the host: implications for acquisition. *Epidemiol Infect* 135, 2 (2007), 315–20.
- [93] SWARTLEY, J. S., MARFIN, A. A., EDUPUGANTI, S., LIU, L. J., CIESLAK, P., PERKINS, B., WENGER, J. D., AND STEPHENS, D. S. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1 (1997), 271–6.
- [94] THOMPSON, E. A. L. Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. *Microbiology* 149, 7 (2003), 1849.
- [95] VAN DEUREN, M., BRANDTZAEG, P., AND VAN DER MEER, J. W. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* 13, 1 (2000), 144–66.
- [96] VIEIRA, J., AND MESSING, J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19, 3 (1982), 259–68.
- [97] VIEUSSEUX, M. Memoire sur la maladie qui a régné à Genève au printemps de 1805. *J Méd Chir Pharmacol* 11 (1806), 163–182.
- [98] VILLWOCK, A., SCHMITT, C., FROSCH, M., AND KURZAI, O. Capsule acetylation does not impair recognition of serogroup C, W-135 and Y meningococci by human dendritic cells. *Int J Med Microbiol* 298, 7-8 (2008), 591–7.

- [99] VIRJI, M. Meningococcal disease: epidemiology and pathogenesis. *Trends Microbiol* 4, 12 (1996), 466–9.
- [100] VOGEL, U., AND CLAUS, H. Genetik der Kapselpolysaccharide bei Meningokokken. *Hygiene und Mikrobiologie* 7 (2003), 61–64.
- [101] VOGEL, U., HAMMERSCHMIDT, S., AND FROSCH, M. Sialic acids of both the capsule and the sialylated lipooligosaccharide of *Neisseria meningitis* serogroup B are prerequisites for virulence of meningococci in the infant rat. *Med Microbiol Immunol* 185, 2 (1996), 81–7.
- [102] VOGEL, U., MORELLI, G., ZURTH, K., CLAUS, H., KRIENER, E., ACHTMAN, M., AND FROSCH, M. Necessity of molecular techniques to distinguish between *Neisseria meningitidis* strains isolated from patients with meningococcal disease and from their healthy contacts. *J Clin Microbiol* 36, 9 (1998), 2465–70.
- [103] VUORIO, R., HIRVAS, L., AND VAARA, M. The Ssc protein of enteric bacteria has significant homology to the acyltransferase Lpxa of lipid A biosynthesis, and to three acetyltransferases. *FEBS Lett.* 292, 1-2 (1991), 90–4.
- [104] WEICHELBAUM, A. Über die Ätiologie der akuten Meningitis cerebrospinalis. *Fortschr Med* 5 (1887), 573–583.
- [105] WESTWOOD, I. M., KAWAMURA, A., FULLAM, E., RUSSELL, A. J., DAVIES, S. G., AND SIM, E. Structure and mechanism of arylamine N-acetyltransferases. *Curr Top Med Chem* 6, 15 (2006), 1641–54.
- [106] ZIMMERMANN, U., PILWAT, G., AND RIEMANN, F. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys J* 14, 11 (1974), 881–99.

## 7 Abkürzungen

Asp: Aspartat

Aqua dest.: Aqua destillata

CMP-Neu5Ac: Cytidinmonophosphat-5-N-Acetylneuraminsäure

C-Terminus: Carboxy-Terminus

CoA: Co-Enzym A

*E. coli*: *Escherichia coli*

His: Histidin

ManNAc-1P: N-Acetyl-D-Mannosamin-1-Phosphat

Neu5Ac: 5-N-Acetylneuraminsäure

*N. m.*: *Neisseria meningitidis*

*PolySia*: Polysialinsäure(n)

Ser: Serin

Trp: Tryptophan

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Bergfeld, A. K., Claus, H., Lorenzen, N. K., Spielmann, F., Vogel, U., and Mühlenhoff, M. The polysialic acid-specific O-acetyltransferase OatC from *Neisseria meningitidis* serogroup C evolved apart from other bacterial sialate O-acetyltransferases. *J. Biol. Chem.* 284, 1 (2009), 6–16.

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Ulrich Vogel für die Überlassung und intensive Betreuung meiner Arbeit und Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Heike Claus für die Einarbeitung in das Labor, die hilfreichen Ratschläge und Diskussionen und ihr unermüdliches Engagement, wann immer ich ihre Hilfe benötigte.

Prof. Dr. med. Matthias Frosch möchte ich danken, dass ich die Arbeit an seinem Institut durchführen durfte.

Dr. rer. nat. Martina Mühlhoff und Dr. rer. nat. Anne Bergfeld von der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich für die Überlassung von Neisserien-Stämmen und die gute Zusammenarbeit im Rahmen des gemeinsamen, von der DFG geförderten, Forschungsprojektes „Funktionelle Charakterisierung der Polysialinsäure-modifizierenden O-Acetyltransferasen von *Neisseria meningitidis* und *Escherichia coli* K1“.

## Lebenslauf

Geboren wurde ich am 10. Februar 1985 in Kulmbach als zweiter Sohn des Allgemeinarztes Dr. Fritz-Martin Spielmann und der Neurologin und Psychiaterin Dr. Sigrid Spielmann-Knappe. Nach vier Volksschuljahren besuchte ich von 1995 bis 2003 das Markgraf-Georg-Friedrich-Gymnasium in Kulmbach. Kurz nach dem Abitur wurde ich für neun Monate zum Wehrdienst einberufen. Im April 2004 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin in Würzburg. Im März 2006 bestand ich den Ersten Abschnitt, im Mai 2010 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und erhielt am 17. Mai 2010 die Approbation als Arzt. Seit 1. Juli 2010 bin ich an der Neurologischen Universitätsklinik Erlangen als Assistenzarzt tätig.

Erlangen, 27. November 2010

Fabian Spielmann