

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

**Analyse des Hitzeschocks bei
Neisseria meningitidis mit
DNA-Microarrays**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Matthias Guckenberger
aus Zellingen

Würzburg, Juli 2003

Referent: Prof. Dr. med. M. Frosch
Korreferent: Prof. Dr. Dr. h. c. J. Hacker
Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.2004

Der Promovend ist Arzt

**Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet.**

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	HISTORISCHE ANMERKUNGEN ZU NEISSERIA MENINGITIDIS	1
1.2	EPIDEMIOLOGIE DER N. MENINGITIDIS INFEKTION	1
1.3	KLINIK DER N. MENINGITIDIS INFEKTION	2
1.4	MENINGOKOKKEN – IMPFSTOFFE	3
1.5	PATHOLOGIE DER N. MENINGITIDIS INFEKTION	6
1.5.1	<i>Ig-A Protease</i>	7
1.5.2	<i>Pili</i>	7
1.5.3	<i>Kapselpolysaccharid</i>	8
1.5.4	<i>Lipooligosaccharid</i>	9
1.5.5	<i>Outer membrane Proteine</i>	9
1.6	N. MENINGITIDIS-GENOMFORSCHUNG	10
1.6.1	<i>DNA Mikroarray Technologie</i>	10
1.6.1.1	Entwicklung der DNA Mikroarray Technologie	10
1.6.1.2	Anwendungsmöglichkeiten der DNA Mikroarray Technologie	11
1.6.1.2.1	Grundsätzliche Einsatzbereiche	11
1.6.1.2.2	Anwendungsmöglichkeiten der DNA Mikroarrays in der Mikrobiologie	12
1.6.1.3	Technische Grundlagen einer Genexpressionsanalyse mit DNA Mikroarrays	14
1.7	HITZESCHOCK ALS MÖGLICHER PATHOGENITÄTSFAKTOR VON NEISSERIA MENINGITIDIS	15
1.8	DIE HITZESCHOCK-REAKTION: REGULATION UND FUNKTION	16
1.8.1	<i>Allgemeines</i>	16
1.8.2	<i>Regulation des Hitzeschocks bei E. coli</i>	17
1.8.2.1	σ^{32} Regulon	17
1.8.2.1.1	Hitzeschock-Proteine des σ^{32} Regulon	17
1.8.2.1.2	Zeitlicher Ablauf der Hitzeschock Reaktion	19
1.8.2.1.3	Transkriptionelle Regulation der σ^{32} Synthese	19
1.8.2.1.4	Translationelle Regulation der σ^{32} Synthese	20
1.8.2.1.5	Regulation der σ^{32} Stabilität	21
1.8.2.1.6	Regulation der σ^{32} Aktivität	22
1.8.2.2	σ^E Regulon	22
1.8.2.3	Zusammenfassung der Hitzeschock Regulation bei <i>E. coli</i>	23
1.9	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	24
2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	MATERIAL	25
2.1.1	<i>Geräte</i>	25
2.1.2	<i>Computer</i>	26
2.1.2.1	Hardware	26
2.1.2.2	Software	26
2.1.3	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	26
2.1.4	<i>Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme</i>	27
2.1.5	<i>Bakterienstämme</i>	28
2.1.6	<i>Plasmide</i>	28
2.1.7	<i>Oligonukleotide</i>	29
2.1.8	<i>Puffer und Lösungen</i>	29

2.1.9	<i>Nährmedien und Agarplatten</i>	29
2.1.9.1	Nährmedien	29
2.1.9.2	Agarplatten	30
2.1.9.3	Kulturbedingungen	30
2.1.9.4	Antibiotikazusätze	30
2.2	METHODEN	31
2.2.1	<i>DNA-Isolation</i>	31
2.2.1.1	DNA Isolation mittels QIAamp DNA mini Kit	31
2.2.2	<i>RNA-Isolation</i>	31
2.2.2.1	Allgemeine Grundlagen zur RNA-Isolation.....	31
2.2.2.2	Bakterienkultur zur RNA-Isolation	32
2.2.2.3	Protokoll der RNA-Isolation	32
2.2.2.4	Abschließender DNA-Verdau	33
2.2.3	<i>Auftrennung und Analyse von Nukleinsäuren</i>	33
2.2.3.1	Agarosegelelektrophorese	33
2.2.3.1.1	Agarosegel.....	33
2.2.3.1.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	34
2.2.3.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.2.3.3	Qualitative und Quantitative Analyse von DNA / RNA	35
2.2.4	<i>Enzymatische Bearbeitung von DNA</i>	36
2.2.4.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	36
2.2.4.2	Ligation von DNA - Molekülen	36
2.2.4.3	Amplifikation von DNA Fragmenten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion.....	37
2.2.4.3.1	PCR Reaktionsansatz	37
2.2.4.3.2	Reaktionsablauf im PCR Cycler.....	37
2.2.4.3.3	Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem Quiagen PCR Purifikation Kit.....	38
2.2.5	<i>In vitro Transkription</i>	38
2.2.6	<i>Reverse Transkription mit Fluoreszenz-Labeling</i>	39
2.2.7	<i>RT-PCR</i>	40
2.2.7.1	Semiquantitative RT-PCR.....	41
2.2.8	<i>Konstruktion der DNA Mikroarrays</i>	42
2.2.8.1	Herstellung der PCR-Slides.....	42
2.2.8.2	Hybridisierung der PCR Slides	43
2.2.8.3	Scannen und Auswerten der DNA Microarrays	43
3	ERGEBNISSE	45
3.1	HERSTELLUNG DER <i>N. MENINGITIDIS</i> SPEZIFISCHEN PCR PROBEN FÜR DIE DNA MIKROARRAYS	45
3.2	KONSTRUKTION INTERNER STANDARDS	48
3.3	DESIGN DER DNA MIKROARRAY SLIDES	49
3.4	SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT DER DNA MIKROARRAY TECHNOLOGIE	50
3.4.1	<i>Reproduzierbarkeit der reversen Transkription und der DNA Mikroarrays</i> . 50	
3.4.2	<i>Reproduzierbarkeit von Wachstum und RNA-Isolation aus <i>N. meningitidis</i></i> . 57	
3.5	ANALYSE DER HITZESCHOCK-ANTWORT BEI <i>N. MENINGITIDIS</i> MIT DNA MIKROARRAYS	63
3.6	BESTÄTIGUNG DER DNA MIKROARRAY-EXPERIMENTE MIT RT-PCR	66
3.7	TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER HITZESCHOCK- ANTWORT VON <i>N. MENINGITIDIS</i>	72
3.8	PHÄNOTYPISCHE BESTÄTIGUNG DER ERGEBNISSE AUS DEN DNA MIKROARRAY EXPERIMENTEN	78

4	DISKUSSION	81
4.1	ETABLIERUNG UND STANDARDISIERUNG DER DNA MIKROARRAY TECHNIK	81
4.2	HITZESCHOCK-EXPERIMENTE.....	86
4.3	PHÄNOTYPISCHE BESTÄTIGUNG DER DNA MIKROARRAYS	91
4.4	AUSBLICK AUF ZUKÜNFTIGE EINSATZMÖGLICHKEITEN DER DNA MIKROARRAYS	92
4.5	ZUSAMMENFASSUNG	94
5	ANHANG	95
5.1	LISTE DER N. MENINGITIDIS ORFs	95
5.2	PRIMER NEISSERIA MENINGITIDIS.....	97
5.3	PRIMER ZUR HERSTELLUNG DER INTERNEN STANDARDS	100
6	LITERATURVERZEICHNIS	101
	DANKSAGUNG	115
	LEBENS LAUF	117

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CFU	Colony forming unit (Kolonie bildende Einheit)
cRNA	copy-RNA (Kopie- Ribonukleinsäure)
Crp	catabolite gene repressor protein
CTP	Cytosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
ELISA	Enzyme enhanced immunoabsorbent assay
Fv	Fluoreszenzverhältnis
GTP	Guanosintriphosphat
HSP	Hitzeschock-Protein
IL	Interleukin
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	messenger-RNA (Nachrichten- Ribonukleinsäure)
Mw	Mittelwert
N	Anzahl
NM	Neisseria meningitidis
OD	Optische Dichte
OMP	Outer membrane protein (Außenmembranprotein)
OMV	Outer membrane vesicle (Außenmembranvesikel)
ORF	Open reading frame (offenes Leseraster)
P	Promotor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA Polymerase
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
ssDNA	Einzelsträngige DNA
Stabw	Standardabweichung
T	Temperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
TTP	Thymidintriphosphat
UTP	Uraciltriphosphat

1 Einleitung

1.1 Historische Anmerkungen zu *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis und *Neisseria gonorrhoea* gehören zur Gattung *Neisseria*. Diese gramnegativen, unbeweglichen und sporenlösen Kokken werden mit den Gattungen *Actinobacter*, *Barnhamella*, *Klingella* und *Moraxella* zur Familie der *Neisseriaceae* zusammengefasst, die wiederum der β -Subklasse der Proteobakterien angehören (Stackebrandt *et al.*, 1988).

Die Gattung *Neisseria* wurde nach Albert Neisser benannt, der 1879 die Diplokokken in Leukozyten aus Urethralesekret von Patienten mit Gonorrhoe entdeckte (Jones *et al.*, 1990).

Im Jahre 1805 wurde die epidemische Meningitis zuerst von Viessieux in Genf beschrieben. Während des 19. Jahrhunderts kam es wiederholt zu epidemischen Ausbrüchen, besonders unter Kindern und Soldaten in Kasernen. Im Jahre 1887 gelang es dem österreichischen Arzt Weichselbaum schließlich als Erstem, den Erreger aus *Liquor cerebrospinalis* zu isolieren und im Detail darzustellen (Weichselbaum, 1887).

Begründet durch die Isolation von Meningokokken bei 31 von 34 Fällen mit *Meningitis cerebrospinalis* postulierten Councilman und seine Mitarbeiter diesen Organismus als verursachenden Erreger (Councilman *et al.*, 1898).

1.2 Epidemiologie der *N. meningitidis* Infektion

Meningokokken sind ausschließlich humanpathogen, werden durch Tröpfchen übertragen und besiedeln als Kommensalen die Schleimhaut des oberen Respirationstraktes. Die Rate der symptomlosen Meningokokkenträger ist stark altersabhängig: Bei Kindern unter 4 Jahren sind nur in ca. 1% Meningokokken auf der Schleimhaut des oberen Respirationstraktes nachweisbar. Diese Besiedlungsrate steigt bis zum 20. Lebensjahr auf fast 25% um dann wieder im Laufe des Lebens langsam abzufallen (Cartwright, 1995). Während Epidemien kann die Zahl auf 100% ansteigen (DeVoe, 1982).

Weltweit werden jährlich mehr als 500.000 Erkrankungsfälle gezählt (Tikhomirov *et al.*, 1997). In den Industrieländern ist die Inzidenz mit 1–10 Fällen/100.000 Einwohner/Jahr gering (Cartwright, 1995) verglichen mit den 1.000 Fällen/100.000 Einwohnern/Jahr im Rahmen von Epidemien in Afrika (Weekly epidemiological record,

1999). Von den fünf klinisch relevanten Serogruppen (A, B, C, W₁₃₅, Y) ist besonders Serogruppe A für diese alle 8–10 Jahre periodisch aufbrechenden großen Epidemien in China, dem mittleren Osten, Südamerika und besonders im Meningitisgürtel Afrikas verantwortlich (Jones *et al.*, 1990; Achtmann *et al.*, 1988, 1991, 1992). Bei der größten Epidemie in den Jahren 1996 bis 1997 erkrankten mehr als 300.000 Menschen in den südlich der Sahara gelegenen Ländern Afrikas, 30.000 Menschen starben an der Meningitis bzw. der Meningokokkensepsis (Tikhomirov *et al.*, 1997). Obwohl im Meningitisgürtel die Serogruppe A der dominante Erreger ist, wurde kürzlich eine Häufung von Serogruppe W₁₃₅ – Infektionen in Burkina Faso beobachtet (Decosas *et Koama*, 2002).

In den Industrieländern Europas und den USA hingegen spielt die Serogruppe A nur eine untergeordnete Rolle (< 2%). Bei zwei Drittel der Erkrankungen hingegen kann Serogruppe B isoliert werden, gefolgt von Serogruppe C mit fast 30% der Fälle (Conolly and Noah, 1999).

In Deutschland wurden für das Jahr 1999 718 Erkrankungsfälle mit Meningokokken–Meningitis registriert, 42 Sterbefälle wurden dem Robert Koch Institut mitgeteilt. Im Jahr 2000 wurden 756, im Jahr 2001 776 Krankheitsfälle gemeldet. Die Altersverteilung weist zwei Inzidenzgipfel auf, erstens bei Kleinkindern (erstes bis viertes Lebensjahr) und zweitens bei Jugendlichen vom 15. bis 19. Lebensjahr (Epidemiologisches Bulletin, 2000).

1.3 Klinik der *N. meningitidis* Infektion

Die Klinik der Meningokokken-Meningitis ist durch einen plötzlichen Beginn und einen schnell voranschreitenden Verlauf charakterisiert. Nach kurzer Inkubationszeit von zwei bis vier Tagen wird die akut eitrige Meningitis manifest mit den klassischen Symptomen Kopfschmerz, Erbrechen, hohes Fieber und Nackensteifigkeit. Dazu kommen je nach Ausdehnung der Entzündung weitere neurologische Symptome (z.B. Bewusstseinstörungen, Hirnnervenausfälle). Die Erkrankung kann jedoch auch als foudroyante Allgemeininfektion verlaufen, bei der die Patienten an einer Sepsis mit Schocksymptomatik erkranken, bevor sich eine Meningitis ausbilden kann. Bei einer Sepsis ist die Mortalität mit 15-25% trotz moderner Antibiotikatherapie und intensivmedizinischer Behandlung noch immer sehr hoch (Schmutzhard; <http://www.intensiv-innsbruck.at>). Eine besondere Form der foudroyant verlaufenden

Meningokokkensepsis ist das Waterhouse-Friedrichsen-Syndrom, bei dem es gleichzeitig zu Nebennierenversagen kommt. Es stehen massive Blutungen im Vordergrund, durch endotoxinbedingte Verbrauchskoagulopathie sowie durch direkte Gefäßschädigung verursacht. Diese Blutungen können die Haut, aber auch innere Organe betreffen. Die Erkrankung ist schon bei Verdacht meldepflichtig.

Da Meningokokken-Erkrankungen meist schwere Krankheitsbilder darstellen, ist bei klinischem Verdacht eine schnell einsetzende Diagnostik und Therapie erforderlich. Bei Verdacht auf eine Meningokokken-Infektion sind daher der mikroskopische Nachweis des Erregers (gefärbter Ausstrich) in Liquor, die Suche nach typischen Hauteffloreszenzen und die kulturelle Anzucht des Erregers aus Liquor, Blutkulturen und aus Hauteffloreszenzen vordringlich anzuwendende Untersuchungsverfahren. Zusätzlich kann ein Antigennachweis in Nativliquor, Serum und Urin durch Latexagglutination, Koagglutination, ELISA und Immunelektrophorese durchgeführt werden. Diese Methoden besitzen jedoch eine eingeschränkte Aussagekraft. Weiterhin kann bei negativer Anzucht eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis der Meningokokken-DNA im Liquor und im Blut (vorzugsweise EDTA-Blut) veranlasst werden. Sie besitzt eine hohe Sensitivität und Spezifität. Mit dieser Methode lassen sich auch Serogruppe und Serotyp des Erregers bestimmen.

Bei Meningokokken-Infektionen ist Penicillin G das Antibiotikum der Wahl. Allerdings wird zunehmend aus dem Ausland, insbesondere aus Afrika und Spanien, über Penicillin-G-intermediär-empfindliche Meningokokken berichtet. Bei Penicillin-resistenten Stämmen sollte eine Therapie mit Cephalosporinen der 3. Generation durchgeführt werden.

Für enge Kontaktpersonen zu einem Fall einer invasiven Meningokokken-Infektion wird eine Rifampicin-Prophylaxe empfohlen. Da bei Schwangeren die Gabe von Rifampicin kontraindiziert ist, ist bei ihnen Ceftriaxon Mittel der ersten Wahl.

1.4 Meningokokken – Impfstoffe

Obwohl die Inzidenz einer Meningokokken-Infektion in Deutschland mit derzeit 1/100.000, verbunden mit der hohen Letalität von zirka zehn Prozent, die Entwicklung und allgemeine Anwendung eines Impfstoffes rechtfertigen würde, ist ein Impfstoff, der alle Altersgruppen gegen Infektionen mit Meningokokken zuverlässig schützt, nicht verfügbar (Frosch, 1999). Derzeit sind Impfstoffe auf Basis gereinigter Kapselpoly-

saccharide gegen die Serogruppen A/C und A/C/W₁₃₅/Y in Deutschland registriert. Diese Polysaccharid-Impfstoffe rufen allerdings nur eine T-Zell unabhängige Immunreaktion hervor, so dass der Impfschutz nur von kurzer Dauer und zudem stark altersabhängig ist. Gegen Serogruppe C Polysaccharide bleibt bei den besonders gefährdeten Kindern unter 18 Monaten die Immunantwort völlig aus. Ein Booster-Effekt nach Sekundärimmunisierung ist mit diesen Impfstoffen nicht auslösbar.

Ein alternativer Ansatz besteht darin, analog zu den Vakzinen gegen *Haemophilus influenza* Typ B, die Polysaccharide an Trägerproteine zu koppeln, um so eine T-Zell Antwort auszulösen. Durch die generelle Anwendung eines solchen Konjugat-Impfstoffes konnte *Haemophilus influenza* Typ b als Verursacher der bakteriellen Meningitis stark zurückgedrängt werden. (Murphy *et al.*, 1993). Auf dem Markt erhältlich ist bereits ein C-Polysaccharid-Konjugat-Impfstoff, der im Gegensatz zu den reinen Polysacchariden eine T-Zell abhängige Immunantwort auslöst. Dadurch ist der Impfstoff bereits im Kleinkindalter immunogen und induziert einen lange anhaltenden Impfschutz gegen die Serogruppe C (Goldblatt, 1998; Jódar *et al.*, 2002). In Entwicklung ist des Weiteren ein tetravalenter Konjugat-Impfstoff gegen die Serogruppen A, C, Y und W₁₃₅. Im Test bei gesunden Erwachsenen erwies sich dieser Impfstoff, bei dem die Kapselpolysaccharide an das Diphtherie Toxoid gebunden sind, bereits als sicher und immunogen (Campbell *et al.*, 2002).

Bezüglich der Impfung gegen Meningokokken werden nach den aktuellen Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) (Stand: Juli 2002) z.B. bei Personen mit angeborenen oder erworbenen Immundefekten mit T- und/oder B-zellulärer Restfunktion und bei gefährdetem Laborpersonal sowohl der 4-valente Polysaccharid-Impfstoff (PS-Impfstoff) als auch ein konjugierter MenC-Impfstoff in Kombination eingesetzt.

C-Polysaccharid-Konjugat Impfstoffe werden dagegen in England bereits routinemäßig flächendeckend eingesetzt (Wildes *et al.*, 2002). Als problematisch ist hier sicherlich zu sehen, dass durch diese Maßnahmen ein Selektionsdruck zu der Serogruppe B erzeugt werden könnte. Gegen diese in Europa vorherrschende Serogruppe B konnte jedoch bisher aufgrund der Immuntoleranz gegen die Kapselpolysaccharide kein wirksamer Impfstoff hergestellt werden (Pizza *et al.*, 2000). Der Versuch, durch Modifikationen in

der chemischen Struktur des α -2,8 N-Acetylneuraminsäure-Polymers diese Immuntoleranz zu umgehen, birgt die Gefahr der Ausbildung einer Autoimmunität.

Wegen der beschriebenen Schwierigkeiten mit den Kapselpolysacchariden wurden subkapsulär gelegene Strukturen, wie das Lipooligosaccharid (LOS) oder Proteine der äußeren Membran als Kandidaten für neue Vakzine getestet. Außenmembranvesikel, die als Vakzine gegen *N. meningitidis* Serogruppe B getestet wurden, enthielten unter anderem die beiden Porine PorA und PorB. Die bakteriziden Antikörper beim Einsatz dieser OMV waren hauptsächlich gegen PorA gerichtet (Rosenqvist *et al.*, 1995). Allerdings kann durch die große Antigenvielfalt der Zielproteine immer nur eine typenspezifische Immunität erzeugt werden, da im *porA* Gen variable Regionen existieren, die durch horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Stämmen ausgetauscht werden können. Ein Lösungsansatz ist der Versuch, genetisch veränderte Meningokokken zu konstruieren, die mehrere auf die lokale epidemiologische Situation abgestimmte PorA-Serotypen exprimieren (van der Voort *et al.*, 1996). Dies hätte allerdings zur Konsequenz, dass für die verschiedenen Regionen Deutschlands und Europas individuell maßgeschneiderte Impfstoffe hergestellt werden müssten. Neuere Vakzinekandidaten wie TbpB (transferrin binding protein B) oder NspA (Neissera surface protein A) konnten den hohen Erwartungen nicht vollständig gerecht werden (Jódar *et al.*, 2002). Antikörper gegen konservierte antigene Strukturen bewiesen bisher nicht ihre protektive Fähigkeit (Poolman *et al.*, 1983; Saukkonen *et al.*, 1987; Bhattacharjee *et al.*, 1990).

Die Kolonisation des Nasopharynx durch Meningokokken korreliert mit dem Erwerb einer Immunität und der Induktion bakterizider Antikörper. Die Entwicklung eines Meningokokken-Impfstoffes könnte dieser Beobachtung Rechnung tragen (Frosch, 1999). Neue Angriffspunkte für die Vakzine-Entwicklung erhofft man sich des Weiteren aus den Entschlüsselungen von zwei vollständigen *N. meningitidis* Genomsequenzen (Parkhill *et al.*, 2000; Tettelin *et al.*, 2000).

1.5 Pathologie der *N. meningitidis* Infektion

Ein besseres Verständnis der Faktoren, die es dem Erreger ermöglichen, der Abwehr des Körpers zu entgehen und eine Infektion auszulösen, wird als die grundlegende Voraussetzung angesehen, neue Wege und Strategien zur Prävention und Heilung dieser Krankheit finden zu können.

Obwohl Meningokokken meist nur harmlose Kommensalen der Schleimhaut im oberen Respirationstrakt sind, kommt es unter bestimmten, noch nicht ganz verstandenen Bedingungen zu einer Infektion. Der Pathomechanismus dieser Hirnhautentzündung setzt sich aus mehreren sequentiellen Schritten zusammen. Initial erfolgt das Anheften an das Nasenepithel, nach dem Durchdringen dieser Barriere erhält das Bakterium Anschluss an den Blutkreislauf und muss nun noch die Blut-Hirn-Schranke überwinden, um dann schließlich im zentralen Nervensystem die Entzündungsreaktion auszulösen (Cartwright *et AlaAldeen*, 1997).

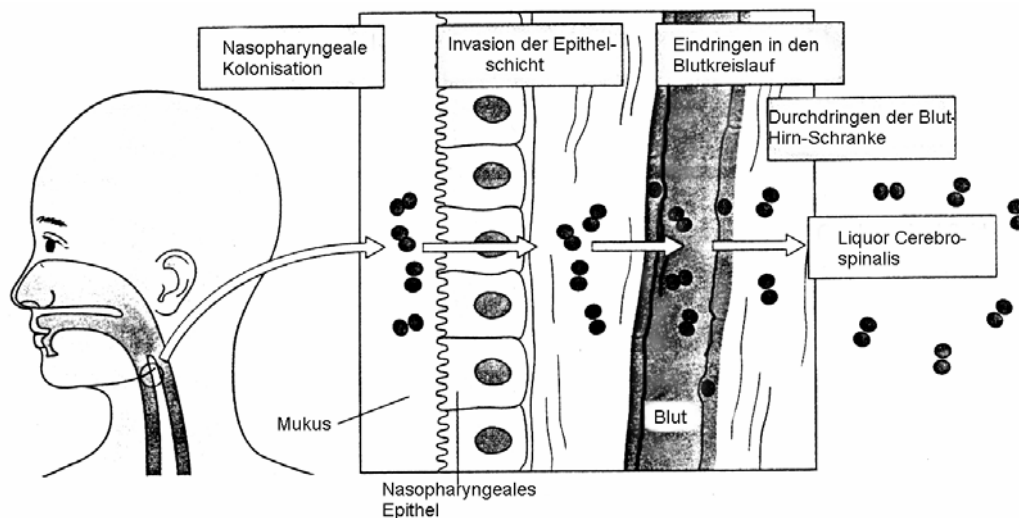


Abbildung 1. Pathogenese der Meningitis durch *N. meningitidis*: 1. Nasopharyngeale Kolonisation 2. Durchdringen der Epithelschicht 3. Invasion in den Blutkreislauf 4. Durchdringen der Blut-Hirn-Schranke (modifiziert nach Virji, 1998).

Sun (Sun *et al.*, 2000) konnte über Mutationsanalysen 73 Gene identifizieren, die für eine Bakteriämie von *N. meningitidis* essentiell sind, dabei wurden acht bekannte Pathogenitätsfaktoren bestätigt. Wann welche Pathogenitätsfaktoren aktiviert werden und was ihre Funktion ist kann mittels der verwendeten signature-tagged-mutagenesis Technik allerdings nur sehr schwer oder gar nicht beantwortet werden.

Im Folgenden sollen kurz die wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *Neisseria meningitidis* vorgestellt werden. Bei den Pathogenitätsfaktoren von *Neisseria meningitidis* lassen sich sezernierte Virulenzfaktoren von Oberflächenstrukturen unterscheiden. Die wichtigsten Virulenzfaktoren auf der Oberfläche des Bakteriums sind die Pili, die Kapselpolysaccharide, die Außenmembranproteine (OMP) und das Lipooligosaccharid. Als Grundlage zur phänotypischen Klassifikation der Meningokokken werden die drei letzt genannten herangezogen, wodurch sich folgendes Klassifikationssystem ergibt:

Einteilung	Grundlage	Anzahl der Gruppen / Typen	Namen
Serogruppen	Kapselpolysaccharid	12	A, B, C, E, H, I, K, L, W ₁₃₅ , X, Y, Z
Serotypen	OMP Klassen 2/3	20	1, 2a, 2b, 2c, ...21
Subserotypen	OMP Klassen 1	10	P1.1, P1.2,.....P1.10
Immuntypen	Lipooligosaccharid	12	L1 – L12

Tabelle 1: Phänotypisches Klassifikations-System von *Neisseria meningitidis* (nach Verheul *et al.*, 1993)

1.5.1 Ig-A Protease

Die Ig-A Protease, welche von den Meningokokken sezerniert wird, spaltet sekretorisches Ig-A auf den Schleimhäuten in die Fab- und Fc- Fragmente des Antikörpers (Meyer, 1989). Dieses Enzym verhindert also die Abtötung des Bakteriums auf den Schleimhäuten und durchbricht damit einen der ersten Abwehrmechanismen.

1.5.2 Pili

Ein wichtiger Pathogenitätsfaktor der Meningokokken sind die Pili. Es können zwei verschiedene Klassen von Pili bei *Neisseria meningitidis* unterschieden werden, Klasse 1 und Klasse 2, die beide zur Methylphenylalanin Pili Familie, den Typ IV Pili, gehören (Virji *et al.*, 1989; Parge *et al.*, 1995). Typ IV Pili werden bei vielen pathogenen gramnegativen Bakterien, z.B. *Pseudomonas aeruginosa* und *Vibrio cholerae*, gefunden.

Essentiell sind diese Typ IV Pili z.B. für die Invasion ins menschliche Zentralnervensystem durch die Blut-Hirn-Schranke, eine einzellige, mit tight-junctions

abgedichtete Endothelschicht, hindurch (Nassif *et al.*, 2002). Neben ihrer Funktion beim Anheften des Erregers an die Zelloberfläche sind die Pili auch bei dem Prozess der DNA-Aufnahme im Rahmen der Transformation beteiligt (Fussenegger *et al.*, 1997).

Die Pili setzen sich größtenteils aus 15-20 kd großen Proteinbausteinen zusammen, kodiert vom *pilE* Lokus (Stephens *et al.*, 1985). Durch homologe Rekombination zwischen dem exprimierten Pilin Lokus (*pilE*) und verschiedenen stillen Pilin Loci (*pilS*) und durch intragenische Rekombination innerhalb der *pilE* Genen können Pili mit unterschiedlichen antigenen Eigenschaften hergestellt werden (gezeigt bei *N. gonorrhoea*) (Gibbs *et al.*, 1989).

1.5.3 Kapselpolysaccharid

Zu den Pathogenitätsfaktoren von *Neisseria meningitidis* gehört weiter das Exopolysaccharid, das den Erreger als Kapsel umhüllt und schützt. Wie schon geschrieben, bildet die unterschiedliche chemische Zusammensetzung der Kapsel die Grundlage für die Klassifikation in die zwölf Serogruppen A, B, C, E, H, I, K, L, W₁₃₅, X, Y, Z (Vedros, 1987). Neben *N. meningitidis* exprimieren auch weitere bakterielle Meningitiserreger ein saures Kapselpolysaccharid, wie z.B. *E. coli* (Boulnois *et al.*, 1987; Frosch *et al.*, 1987). Die Kapselpolysaccharide von *N. meningitidis* Serogruppe B und *E. coli* K1 sind immunologisch und chemisch identisch (Kasper *et al.*, 1973) sowie die Kapselpolysaccharid-Synthese-Gene in der DNA Sequenz zu 30% übereinstimmend (Frosch *et al.*, 1991).

Bei den Serogruppen B und C besteht die Polysaccharid-Kapsel aus homopolymerer N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc), die α -2,8 bzw. α -2,9 glykosidisch verknüpft sind (Bhattacharjee *et al.*, 1975, Liu *et al.*, 1971). Heteropolymere, N-Acetylneuraminsäure α -2,6 glykosidisch mit Glukose bzw. Galaktose, bilden die Kapsel der Serogruppen W₁₃₅ und Y (Griffis *et al.*, 1991). Die Kapsel der Serogruppe A ist aus einem homopolymer α -2,6 glykosidisch verknüpften Acetylmannosamin-1-Phosphat Zucker aufgebaut.

Die Kapsel schützt das Bakterium unter anderem vor einer Komplementaktivierung und nachfolgender Lyse und vor Phagozytose (Vogel *et al.*, 1999; Yih-Ling Tzeng *et al.*, 2000). Die α -2,8 glykosidisch verknüpfte Polysialinsäurekapsel der Serogruppe B ist darüber hinaus ein Paradebeispiel für molekulare Mimikry, da chemisch und immunologisch identische Strukturen auf humanen Zellen wiedergefunden werden (Griffiss *et*

al., 1991). Diese molekulare Mimikry verhindert wie schon erwähnt die Ausbildung einer Immunantwort gegen die Kapsel der Serogruppe B.

1.5.4 Lipooligosaccharid

Als weiterer wichtiger Virulenzfaktor macht das Lipooligosaccharid (LOS) von Neisserien einen Großteil der Pathogenität aus. Es wird sowohl von *Neisseria meningitidis* als auch von *Neisseria gonorrhoea* gebildet. Strukturell ist das LOS der Meningokokken mit dem Lipopolysaccharid (LPS) vieler gramnegativer Bakterien verwandt: Das Lipooligosaccharid besteht aus einem Lipid A Anteil und einem kleinen Oligosaccharid aus bis zu zehn Monosacchariden, es besitzt aber keine repetitiven O-Antigene (Griffiss *et al.*, 1988).

Das LOS ist hauptverantwortlich für die Entzündungsreaktion des Organismus bei einer Infektion durch *Neisseria meningitidis*. Durch Sialylierung des LOS trägt diese Struktur außerdem zum Schutz vor Phagozytose bei. Dabei sind die Expression der Kapsel und die Sialylierung des LOS zwei unabhängige Schutzmechanismen (Jones *et al.*, 1992; Unkmeir *et al.*, 2002a).

1.5.5 Outer membrane Proteine

Zu dieser Gruppe der Proteine gehören die beiden Porine PorA und PorB, gegen die im Rahmen einer Meningokokken-Infektion bakterizide Antikörper gebildet werden (Lehmann *et al.*, 1999). Aufgabe der Porine ist der Austausch zwischen Periplasma und der Umwelt, sie überbrücken also die äußere Membran bei gramnegativen Bakterien.

Die Proteine der Opa-Familie wirken als Adhäsine (Virji *et al.*, 1993 und 1994). Daneben sind sie für das opaque Aussehen der Meningokokken-Kolonien auf Nährböden verantwortlich. Opc ist an dem Anheften an eukaryontische Zellen beteiligt und ist ebenfalls Ziel von bakteriziden Antikörpern. Ein zellulärer Rezeptor für Opc ist das Heparin Sulfat Proteoglykan (de Vries *et al.*, 1998). Über Serumfaktoren wie Fibronectin vermittelt Opc auch die Bindung der Meningokokken an Endothelzellen (Virji *et al.*, 1994; Unkmeir *et al.*, 2002b).

1.6 *N. meningitidis*-Genomforschung

Die komplette Sequenzierung der Genome zweier verschiedener *N. meningitidis* Stämme, eines Serogruppe A und eines Serogruppe B Stammes, im Jahr 2000 (Parkhill *et al.*, 2000; Tettelin *et al.*, 2000) eröffnet der Forschung völlig neue Möglichkeiten. Insgesamt konnten im Genom von *N. meningitidis* MC58, einem Ringchromosom, 2154 verschiedene Gene identifiziert werden, die Funktion von 650 Genen ist aber immer noch völlig unbekannt. Im Genom von *N. meningitidis* Serogruppe A (*N. meningitidis* Z2491) wurden 2330 Gene gezählt (www.tigr.org). Die Kenntnis des Genoms, einer Sequenz von ca. 2,28 Millionen Nukleotiden, ist für sich alleine aber nicht ausreichend. Eine DNA Sequenz sagt wenig darüber aus, was die Aufgabe eines Gens ist, wie eine Zelle funktioniert, wie aus Zellen ein Organismus gebildet wird oder wie es schließlich zur Entstehung von Krankheiten kommt (Lockhart *et al.*, 2000). Zwar können über Computerprogramme 99% der kodierenden Regionen gefunden werden (Delcher *et al.*, 1999) und durch vergleichende Sequenzanalysen mit anderen Bakterien die Funktion von ca. 50% der ORFs identifiziert werden, man geht aber davon aus, dass etwa ein Viertel der ORFs einer Spezies einzigartig ist (Claire *et al.*, 2000). Die nächsten logischen Schritte in dieser Entwicklung sind daher die Untersuchung des Genoms auf transkriptioneller Ebene, des Genexpressionsmusters als Transkriptom, und schließlich der Genprodukte als Proteom.

1.6.1 DNA Mikroarray Technologie

1.6.1.1 Entwicklung der DNA Mikroarray Technologie

Die technische Grundlage für die DNA Mikroarrays wurde von E. M. Southern vor einem Viertel Jahrhundert gelegt. Mit der nach ihm benannten Technik des Southern Blots konnten erstmals DNA Fragmente einer spezifischen Sequenz identifiziert werden (Southern, 1975). Zwei Schlüsseltechniken gestatteten die Entwicklung der Mikroarrays (Lander, 1999). Erstens erlaubte das Fixieren von Nukleinsäuren auf festen Materialien, wie z.B. Glas, eine Miniaturisierung des Versuchsaufbaues, wodurch zehntausende Proben auf einen Glasobjektträger gespottet werden können. Zweitens ist es heute möglich, die Proben, PCR-Produkte oder Oligonukleotide, in großem Maßstab

maschinell zu produzieren. Ohne die gewaltigen Fortschritte in der Mikrotechnik und der Datenverarbeitung hätte diese Entwicklung natürlich so nicht ablaufen können.

1.6.1.2 Anwendungsmöglichkeiten der DNA Mikroarray Technologie

1.6.1.2.1 Grundsätzliche Einsatzbereiche

Grundsätzlich bietet die DNA Mikroarray Technologie hauptsächlich zwei Anwendungsbereiche (Lander, 1999). Arrays können zum einen verwendet werden, um die DNA direkt zu untersuchen, z.B. zur Identifikation von Mutationen oder Polymorphismen. Der Schwerpunkt liegt momentan aber in der Erforschung der RNA-Expression. Über Transkriptionsanalysen erhofft man sich Antworten auf Fragen z.B. nach der Funktion von Genen oder ihrer Steuerung. Bei der Analyse der mRNA treten aber auch Fragen und Schwierigkeiten auf. So ist im Gegensatz zum Genom das Transkriptom hoch dynamisch und ändert sich schnell und stark bei Änderungen der Zellumgebung, sogar während des normalen Zellzyklus (Lockhart *et al.*, 2000). Zu bedenken ist weiter, dass die mRNA nicht das endgültige Produkt der Gene darstellt. Die Transkription ist aber der erste, essentielle Schritt auf dem Weg zum Protein. Außerdem geht bei den meisten Genen eine gesteigerte Transkription, eine gesteigerte Synthese der mRNA, mit einer erhöhten Produktion des Proteins einher (Lockhart *et al.*, 2000).

Die DNA Mikroarray Technologie hat in der Forschung sehr vieler medizinischer Fachrichtungen Einzug erhalten. Man erhofft sich durch den Einsatz dieser Technik ein besseres Verständnis der genetischen Grundlagen und der molekularen Mechanismen, die zu einer Krankheit führen. Ziel ist die Umsetzung dieser Kenntnisse in neue Therapien. In der Krebsforschung erwartet man Antworten z.B. auf die Fragen, wie es zu der Entartung von Zellen kommt und welche Gene an diesem Prozess beteiligt sind (Rew, 2001). In der Pharmakologie sucht man mit Hilfe der DNA Mikroarrays nach Angriffspunkten für neue Medikamente (Zanders, 2001). Durch Expressionsanalysen von Adipozyten erhofft man sich ein besseres Verständnis der Pathogenese des Diabetes mellitus (Nadler *et al.*, 2001). In der Psychiatrie sollen DNA Mikroarrays helfen, der Ursache der Schizophrenie auf den Grund zu gehen (Mirnics *et al.*, 2001).

Während die DNA Mikroarray Technik in der Forschung mittlerweile etabliert ist, hat die Komplexität dieser neuen Technologie den Weg in die klinische Praxis bisher

versperrt, obwohl sich auch dort zahlreiche Einsatzbereiche anbieten. In der Onkologie ist eine exakte Typisierung von Karzinomen zur Risikoabschätzung und Planung einer Chemotherapie mit DNA Mikroarrays denkbar. Durch diese genaue genetische Charakterisierung von Karzinomen soll eine individuell abgestimmte Therapie in Zukunft ermöglicht werden (Rew, 2001). In der Transfusionsmedizin sollen einmal mittels DNA Mikroarrays in einem einzigen Test Empfänger- und Spenderblut jeweils umfassend auf Transfusionsrisiken untersucht werden können (Petrik *et al.*, 2001).

1.6.1.2.2 Anwendungsmöglichkeiten der DNA Mikroarrays in der Mikrobiologie

Die DNA Mikroarray Technologie hat sich äußerst schnell in der Mikrobiologie etabliert. Von weltweit ca. 300 Veröffentlichungen mit der Technik der Mikroarrays im Jahr 2000 entfielen ca. ein sechstel auf die Mikrobiologie (Lucchini *et al.*, 2001). Ein wesentlicher Grund für die breite Anwendung dieser Technik ist das schnelle Fortschreiten der Genomsequenzierung verschiedenster Mikroorganismen. Bis Januar 2003 waren weltweit die Genomsequenzen von 91 Mikroorganismen veröffentlicht (www.tigr.org/tdb/mdb/mdbcomplete.html), weitere waren in Arbeit.

DNA Mikroarrays sind das ideale Werkzeug zur Erforschung der Genregulation auf transkriptioneller Ebene (Lockhart *et al.*, 2000; Cummings *et al.*, 2000; Rappuoli *et al.*, 2000). Das erste globale Transkriptionsprofil wurde von *Saccharomyces cerevisiae* im Jahre 1997 erstellt (DeRisi *et al.*, 1997). Diese Hefe ist der Mikroorganismus, der am intensivsten mit DNA Mikroarrays untersucht wurde. Bei unterschiedlichen Mikroorganismen, z.B. *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenza*, wurde die Veränderung des Transkriptom als Reaktion auf verschiedenste Umweltreize hin untersucht, z.B. Hitze- oder Kälteschock, aerobes oder anaerobes Wachstum, osmotischer Stress und Quorum sensing (Lucchini *et al.*, 2001). Bei dieser Art von Experiment können Gene mit ähnlichen oder gleichen Expressionsprofilen in Clustern zusammengefasst werden. Aufgrund der Beobachtung, dass miteinander verwandte Gene ein ähnliches Expressionsmuster zeigen, kann durch den Vergleich von Genen mit bereits bekannter Funktion und Genen unbekannter Funktion aus einem Cluster auf die Funktion des unbekanntes Gens geschlossen werden (Eisen *et al.*, 1998).

Die Analyse der Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen ist ein weiterer wichtiger Einsatzbereich der DNA Mikroarray Technologie in der Mikrobiologie. Während die transkriptionellen Reaktionen von Wirtszellen auf eine Infektion z.B. mit *Listeria monocytogenes* (Cohen *et al.*, 2000) oder *Salmonella enterica* (Eckmann *et al.*, 2000) schon erfolgreich analysiert werden konnten, ist die des Mikroorganismus in einem solchen Infektionsversuch noch nicht so gut untersucht. Hauptproblem war bisher die Gewinnung einer ausreichenden Menge an mikrobieller Proben-RNA aus dem experimentellen Ansatz. Durch die Verwendung von Genom-spezifischen Primern für die reverse Transkription konnte die notwendige Menge an RNA schon deutlich gesenkt werden (Talaat *et al.*, 2000). Ziel dieser Infektionsversuche ist unter anderem die Suche nach bisher unbekanntem Pathogenitätsfaktoren. Eriksson *et al.* gelang die Pionierarbeit, die Reaktion eines bakteriellen Pathogens auf die Infektion einer Säugetierzelle auf Genombasis zu messen. Untersucht wurde das Transkriptionsprofil von intrazellulären *Salmonella enterica* während einer Infektion von Makrophagen. Die Funktion fast der Hälfte der *in vivo* regulierten Gene ist bisher unbekannt (Eriksson *et al.*, 2003).

In Zukunft interessiert natürlich der dynamische Prozess einer solchen Infektion: Wie greifen die Meningokokken die humanen Zellen an, wie verteidigen sich die Wirtszellen gegen diesen Angriff und wie reagieren die Bakterien wiederum darauf. Die DNA Mikroarray Technologie verspricht in einem einzigen Experiment diese hochkomplexe Interaktion zwischen Wirt und Pathogen auf transkriptioneller Ebene zu erfassen (Craig *et al.*, 2000).

Des Weiteren werden DNA Mikroarrays in der Genotypisierung eingesetzt. Durch lateralen Gentransfer können selbst nah verwandte Serovare eines Bakteriums stark in der Pathogenität variieren, z.B. durch die Aufnahme heterologer DNA in das Genom (sogenannte Pathogenitätsinseln) (Groisman & Ochman, 1997). Selbst Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (engl. Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) können mit hochauflösenden Oligonukleotid Mikroarrays detektiert werden. DNA Mikroarrays erlauben hier die exakte Typisierung des gesamten Genoms eines Bakteriums und sollen somit in Zukunft einerseits eine genaue Gefahreinschätzung der Infektion, andererseits eine exakte Resistenzbestimmung des Keims für die Antibiotikatherapie erlauben. DNA Mikroarrays bieten sich deshalb als ideales Werkzeug für epidemiologische Untersuchungen an.

Die hier aufgezählten Anwendungsmöglichkeiten sind natürlich nicht vollständig. Der Einsatz der DNA Mikroarray Technik in der Mikrobiologie wird nur durch unsere begrenzte Vorstellungskraft und Kreativität limitiert (Lucchini *et al.*, 2001).

1.6.1.3 Technische Grundlagen einer Genexpressionsanalyse mit DNA Mikroarrays

DNA Mikroarrays bestehen einmal aus DNA-Proben, die in kleinsten Mengen auf einen Träger, z.B. einen speziell beschichteten Glasobjektträger, aufgebracht werden. Diese Proben können PCR-Produkte oder Oligonukleotide sein, jeweils spezifisch für ein Gen oder eine bestimmte DNA-Sequenz. Aus zwei getrennten Bakterienkulturen, erstens unter jeder beliebigen experimentellen Bedingung gewachsen, zweitens unter Standardbedingung gewachsen, wird die RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Dabei werden jeweils verschiedenen fluoreszierende Farbstoffe eingebaut. Diese Sonden werden zusammen in äquivalenten Mengen auf einen Glasobjektträger gegeben und hybridisieren kompetitiv an die aufgespotteten DNA-Proben. Die Rohdaten bei DNA Mikroarrays bestehen aus gescannten monochromatischen Bildern der hybridisierten Mikroarray Slides, auf welchen jeder Spot eine aufgespottete Probe repräsentiert. Den Spots wird das entsprechende Gen zugeordnet und die Fluoreszenzintensität getrennt in beiden Farbkanälen über jedem Spot gemessen. Durch den Vergleich der gemessenen Fluoreszenzintensitäten aus beiden Farbkanälen errechnet eine Auswertungssoftware nach einer Normalisierung der Daten das Fluoreszenzverhältnis, welches wiederum den Rückschluss auf die Änderung der Expression erlaubt (Brazma *et al.*, 2000). Es kann keine Aussage über den absoluten Wert der Expression getroffen werden, sondern immer nur über den Unterschied im Expressionsmuster zwischen den beiden verglichenen Kulturbedingungen.

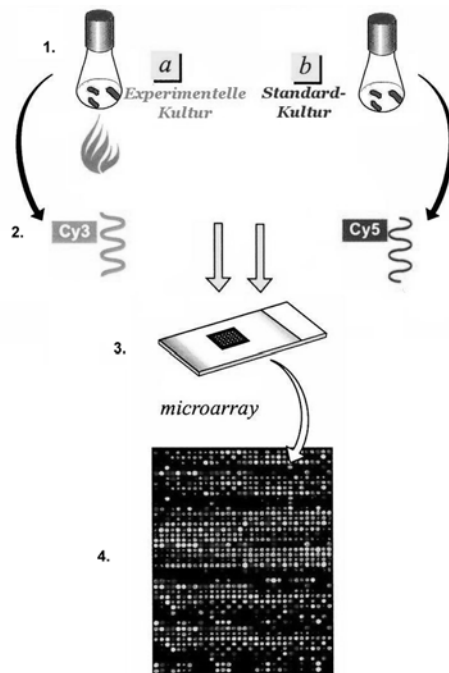


Abbildung 2. Prinzipielle Funktionsweise der DNA Mikroarrays: 1. RNA Isolation; 2. Reverse Transkription in cDNA mit Einbau von Fluoreszierenden Farbstoffen; 3. Kompetitive Hybridisierung der cDNA Sonden an die DNA Proben; 4. Scannen der Glasobjektträger und Auswertung über Analyse der Fluoreszenzintensitäten (modifiziert nach Rappuoli, 2000).

1.7 Hitzeschock als möglicher Pathogenitätsfaktor von *Neisseria meningitidis*

Wie schon geschrieben wird *N. meningitidis* bei den verschiedenen Stadien der Infektion vom Nasenepithel über das Blut und die Blut-Hirn-Schranke ins zentrale Nervensystem mit unterschiedlichsten, rasch wechselnden Umweltbedingungen konfrontiert und muss gleichzeitig den Angriffen des Immunsystems entkommen. Das vorherrschende Milieu bei den Infektionsstadien entspricht natürlich nicht immer den optimalen Wachstumsbedingungen von *N. meningitidis*. Es ist daher durchaus vorstellbar, dass bei großen Abweichungen von diesem Optimum eine Stressreaktion induziert wird. Diese Stressreaktion, allgemein als Hitzeschock-Reaktion bezeichnet, könnte z.B. bei einem Fieber, oft über 39°C, im Rahmen einer Sepsis (Jamuna *et al.*, 2000) dem Bakterium das Überleben sichern und somit auch als Pathogenitätsfaktor fungieren.

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über den Hitzeschock, besonders über seine Regulation, geben. Da diese Stressreaktion bei *Neisseria meningitidis* nur sehr schlecht untersucht ist, wird *Escherichia coli*, ein γ Proteobakterium, als Beispiel zitiert.

1.8 Die Hitzeschock-Reaktion: Regulation und Funktion

1.8.1 Allgemeines

Jeder Organismus hat sich im Laufe der Evolution an bestimmte Umweltbedingungen adaptiert, unter welchen er am besten gedeihen kann. Abweichungen vom Optimum, die daraus folgenden Belastungen des Organismus und dessen Reaktionen werden als Stress bezeichnet. Der Begriff Stress (lat. *stringere*) lässt sich mit Zwangslage, Bedrängnis, auch physikalische Beanspruchung erklären. Dieser Begriff wird häufig sowohl für den einwirkenden Störfaktor (z.B. Hitzestress) als auch für die Antwort beziehungsweise den inneren Belastungszustand des Organismus verwendet (Zoeger *et al.*, 1992).

Diese Stressantwort ist hochkonserviert in allen bisher untersuchten Organismen. Das betrifft sowohl den Mechanismus der Geninduktion (Sorger, 1991; Morimoto *et al.*, 1994; Nover & Scharf, 1997; Schöffl *et al.*, 1998), als auch die wesentlichen Eigenschaften der Hitzeschock-Proteine. Neben erhöhten Temperaturen gibt es andere Stressfaktoren, die nach dem Expressionsmuster der daraufhin synthetisierten Proteine in zwei Gruppen von Induktoren unterteilt werden können (Nover, 1990):

- a) Induktoren, die offenbar über das selbe Signalsystem wirken und das ganze Spektrum der beim Hitzeschock exprimierten Proteine induzieren (dazu gehören zum Beispiel Schwermetalle, Ethanol, Aminosäureanaloga).
- b) Spezifische Induktoren, die einzelne Hitzeschock-Proteine induzieren und deren Wirkung auf einzelne Organismen beschränkt ist (zum Beispiel K⁺-Ionophoren bei *Drosophila*, Nikotin bei Säugern).

Aufgabe der Hitzeschock-Reaktion ist die schnelle Induktion der Produktion von sogenannten Hitzeschock-Proteinen (Zusammenfassungen in Hightower & Nover, 1991; Nover, 1991; Pechan, 1991; Morimoto *et al.*, 1994; Nover & Scharf, 1997). Diese Proteine sollen den Schaden, den die Zelle durch den Stressreiz erfahren hat, beheben bzw. minimieren. HSP werden aber nicht nur bei einem Stressreiz benötigt, sondern übernehmen auch unter normalen Wachstumsbedingungen wichtige Aufgaben bei der Proteinfaltung, der Protein Reparatur und dem Abbau (Yura *et al.*, 1999; Arsene *et al.*, 2000).

1.8.2 Regulation des Hitzeschocks bei *E. coli*

Zwei große Regulationssysteme kontrollieren bei *E. coli* die Geninduktion im Rahmen des Hitzeschocks. Bei beiden handelt es sich um alternative Sigma Faktoren, σ^{32} und σ^E . Diese Art der Genregulation wurde im Rahmen der Hitzeschock Forschung erstmals bei Bakterien beschrieben (Grossman *et al.*, 1984; Landick *et al.*, 1984; Yura *et al.*, 1984). Die Sigma–Untereinheit bindet an den $\alpha_2\beta\beta'$ -Kern der bakteriellen RNA–Polymerase und ermöglicht damit die Anlagerung des Enzyms an die DNA und die Initiation der Transkription (Streyer, 1996). Die verschiedenen Sigma–Untereinheiten unterscheiden sich hinsichtlich der Affinität für die von ihnen erkannten Promotor-Sequenzen. So können je nach Umweltbedingung unterschiedliche Gene exprimiert werden. *Escherichia coli* besitzt mindestens sieben Sigma-Faktoren (Helmann und Chamberlin, 1988; Maeda *et al.*, 2000). Unter Normalbedingungen ist hauptsächlich σ^{70} aktiv, der für die Expression der sogenannten *House-Keeping* Gene (Burton *et al.*, 1981; Kumar *et al.*, 1994) sorgt. σ^{32} dagegen ist besonders wichtig bei der Bewältigung von zytoplasmatischem Proteinschaden, σ^E schützt die Zelle gegen extrazytoplasmatischen Stress und bei extrem hohen Temperaturen (Stolz *et Hengge-Aronis*, 2000).

Promoter	Sequenz -35	Sequenz -10
σ^{70}	TTGACA (16-18bp)	TATAAT
σ^{32}	CTTGAA (13-17bp)	CCCCAT-T
σ^E	GAACTT (16bp)	TCTGA

Tabelle 2. *E. coli* Promotor Consensus Sequenzen für σ^E , σ^{32} und σ^{70}

1.8.2.1 σ^{32} Regulon

1.8.2.1.1 Hitzeschock-Proteine des σ^{32} Regulon

Generell werden die Hitzeschock-Proteine nach dem Molekulargewicht in verschiedene Familien unterteilt (Ubiquitinfamilie, HSP20, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP110). Die Mehrzahl dieser Hitzeschock-Proteine gehört bei Bakterien zum σ^{32} Regulon. Dieses Regulationssystem besteht aus mindestens 30 Hitzeschock-Proteinen (Gross *et al.*, 1996; Missiakas *et al.*, 1996), deren Promotoren von σ^{32} erkannt werden (Cowing *et al.*, 1985).

Der Name Hitzeschock-Proteine ist ein historisch gewachsener Begriff, da diese Proteine zuerst bei diesem Stressreiz beobachtet wurden. Wie schon erwähnt, sind sie aber auch unter normalen Wachstumsbedingungen für das Überleben der Zelle essentiell. Die Wichtigkeit von σ^{32} konnte mit $\Delta rpoH$ Mutanten (σ^{32} wird durch *rpoH* kodiert) gezeigt werden, die nur bei Temperaturen bis maximal 20°C wachsen konnten (Kusukawa *et al.*, 1988). Überproduktion von DnaJ-DnaK und GroEL-GroES-GrpE, der wichtigsten Proteine aus dem σ^{32} Regulon, hebt dieses Defizit aber fast vollkommen auf (Kusukawa *et al.*, 1988).

Die Mehrzahl der Hitzeschock-Proteine sind im Proteinstoffwechsel, besonders der Proteinfaltung und dem Abbau von defekten Proteinen, aktiv (Stolz *et Hengge-Aronis*, 2000). Die Induktion dieser Proteine bei einem Stressreiz erklärt sich daraus, dass bei einer Temperaturerhöhung auf über 42°C vermehrt fehlgefaltete oder defekte Proteine anfallen (Voet, D. *et Voet*, J., 1995). Im Einzelnen besteht die Gruppe der Hitzeschock-Proteine aus den Chaperonen (z.B. GroEL-GroES, DnaJ-DnaK-GrpE), ATP-abhängigen Proteasen (z.B. Clp, FtsH, Lon) und Peptidyl-Prolyl Isomerasen (Gross *et al.*, 1996). Daneben gibt es noch weitere HSP mit zum Teil unbekannter Funktion.

Die Chaperone GroEL/GroES sollen hier exemplarisch näher beschrieben werden. Chaperone unterstützen andere Proteine bei der Faltung in die korrekte Tertiärstruktur (Streyer, 1996; Alberts *et al.*, 1994). Obwohl die Tertiärstruktur eigentlich durch die Aminosäuresequenz festgelegt ist, kann die Faltung in der Zelle durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen gestört werden. GroEL besteht aus zwei heptameren Ringen und ist wie alle Chaperone eine langsame ATPase. In seiner Funktion ist GroEL auf GroES, einen einzelnen heptameren Ring, angewiesen, die einen 1:1 Komplex bilden. Bei den verschiedenen Schritten der Spaltung von ATP in ADP + P ändert sich jeweils durch Konformationsänderungen die Affinität von GroEL zu seinem Partner GroES und zu ungefalteten Proteinen, die im Lumen von GroEL gebunden werden (Martin *et al.*, 1993). In einem Zyklus werden von GroEL die denaturierten oder ungefalteten Proteine und GroES gebunden und wieder entlassen. Zu nativen Proteinen hat GroEL eine sehr geringe Affinität. Die Chaperone sind also nicht aktiv an der Faltung beteiligt, sondern verschaffen dem Protein während der langsamen Spaltung von ATP nur Zeit, sich in einer geschützten Umgebung selbst korrekt nach der Thermodynamik zu falten. Bei Temperaturerhöhung steigt die Konzentration fehl-

gefalteter oder denaturierter Proteine stark an – es kommt also zu einem vermehrten Bedarf an den Funktionen der Chaperone im Vergleich zur Standardbedingung.

1.8.2.1.2 Zeitlicher Ablauf der Hitzeschock Reaktion

Bei einer Temperaturerhöhung von 30°C auf 42°C kommt es fast augenblicklich zu einer Steigerung der HSP Produktion mit einem Maximum (10 bis 15-fach) innerhalb von 5 Minuten (Herendeen *et al.*, 1979; Yamamori *et al.*, 1980). Auf diese extrem schnelle Induktion folgt eine Adaptationsphase mit einem Abfall der HSP auf ein neues Steady State (das 2 bis 3-fache des Ausgangsniveaus) für 20 bis 30min. Bei extremen Temperaturenerhöhungen auf 50°C sistiert die Produktion der meisten Proteine, durch Inaktivierung von σ^{70} (Blaszczak *et al.*, 1995), während die Produktion von HSP über σ^{32} und besonders σ^E weiter steigt oder zumindest aufrechterhalten wird (Herendeen *et al.*, 1979; Lemaux *et al.*, 1979).

Wie diese extrem schnelle Induktion des Hitzeschocks gesteuert wird, war lange unbekannt. Im Folgenden soll die Regulation dieser hoch komplexen Reaktion näher beleuchtet werden. Die Synthese der HSP wird über vier Mechanismen reguliert: Transkription, Translation, Stabilität und Aktivität von σ^{32} .

1.8.2.1.3 Transkriptionelle Regulation der σ^{32} Synthese

Mindestens vier Promotoren sind an der Transkription von σ^{32} beteiligt: P1, P4 und P5 werden von RNAP- σ^{70} , P3 dagegen von RNAP- σ^E erkannt (Erickson *et al.*, 1987, Nagai *et al.*, 1990). Unter Standardbedingungen sind P1 und P4 konstitutiv aktiv. P3, von RNAP- σ^E erkannt, ist nur bei sehr hohen Temperaturen (45 – 50°C) aktiv, und ermöglicht so die Transkription von *rpoH* auch unter extremen Bedingungen, unter denen σ^{70} inaktiv wird (Erickson *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1989a). P5 steht unter Kontrolle eines Crp (catabolite gene repressor protein) und benötigt zur Aktivierung noch cAMP. Bei Glukosemangel, begleitet von einem cAMP Anstieg, kommt es über diesen Promoter zu einer Steigerung der *rpoH* Transkription (Bukau *et al.*, 1993). Eine Theorie geht davon aus, dass auch bei Nährstoffmangel Hitzeschock-Proteine benötigt werden. Die Funktion der Hitzeschock-Proteine in dieser Situation ist aber nicht bekannt. Darüber hinaus sind weitere Faktoren an der komplexen Initiation beteiligt (Wang *et al.*, 1989b; Kallipolitis *et al.*, 1998).

Die Transkription von *rpoH* wird unter Standardbedingungen durch die Promotoren P1 und P4 auf einem konstanten Niveau gehalten (Arsène *et al.*, 2000), es wird also immer ein basaler Level an *rpoH* mRNA aufrechterhalten. Aber nur ein geringer Teil dieser *rpoH* mRNA wird translatiert, bei einem Stressreiz steht so aber sofort genügend mRNA für eine schnelle σ^{32} Produktion zur Verfügung.

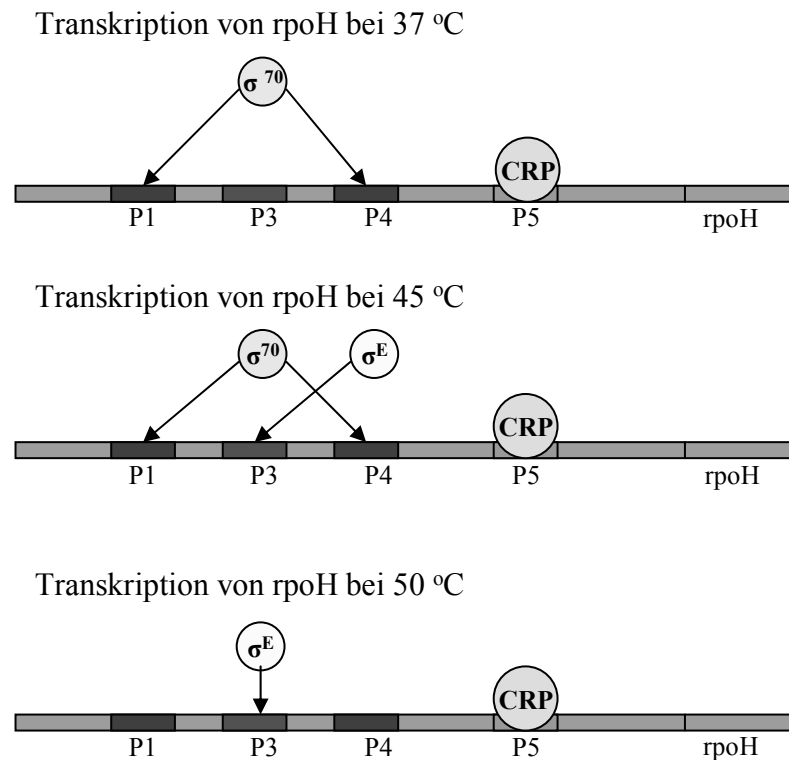


Abbildung 3: Transkriptionelle Regulation der σ^{32} Synthese:

- 37°C: Unter Standardbedingungen sind nur P1 und P4, von RNAP- σ^{70} erkannt, aktiv. P5 wird von einem catabolite gene repressor protein blockiert, P3 ist unter Standardbedingungen inaktiv.
- 45°C: Bei einem Hitzeschock bleiben P1 und P4 zunächst weiterhin aktiv, zusätzlich wird bei diesen hohen Temperaturen die Transkription von *rpoH* durch RNAP- σ^E , das an P3 bindet, gesteigert.
- 50°C: Bei extrem hohen Temperaturen, bei welchen RNAP- σ^{70} inaktiv wird, wird die Transkription von *rpoH* durch RNAP- σ^E aufrechterhalten.

1.8.2.1.4 Translationelle Regulation der σ^{32} Synthese

Zahlreiche Versuche wiesen auf eine hitzevermittelte Induktion der σ^{32} Synthese über verstärkte Translation hin (Straus *et al.*, 1987; Kamath-Loeb *et al.*, 1991; Nagai *et al.*, 1991):

1. Die Synthesesteigerung von σ^{32} folgt sofort auf den Hitzeschock, die *rpoH* mRNA Menge steigt erst später.
2. Die Hitze induzierte Steigerung der σ^{32} Synthese lässt sich durch Rifampicin, ein Antibiotikum, welches die bakterielle RNA-Polymerase inhibiert, nicht hemmen.

Eine transkriptionelle Regulation kann also nicht für die Synthesesteigerung verantwortlich sein.

Durch Analysen von Deletionen und Punktmutationen innerhalb des *rpoH* Gens konnten zwei 5' terminal gelegene Regionen identifiziert werden, die an der Thermoregulation beteiligt sind. Veränderungen in diesen beiden Bereichen, Region A (nt 6 – 20) und Region B (nt 112 – 208), führen zu konstitutiv hoher Synthese von σ^{32} (Nagai *et al.*, 1991, Yuzawa *et al.*, 1993).

Die mRNA ist direkt, ohne zusätzliche regulatorische Faktoren, für die translationelle Thermoregulation der σ^{32} Synthese verantwortlich. Analysen der Sekundärstruktur der mRNA zeigten Basenpaarungen zwischen den Regionen A und B (Morita *et al.*, 1999a), die eine Bindung des Ribosoms und damit die Translation verhindern. Erst bei einer Erhöhung der Temperatur im Rahmen des Hitzeschocks kommt es zum Schmelzen der Sekundärstruktur und das Ribosom kann sich an die mRNA anlagern (Morita *et al.*, 1999b). Die mRNA fungiert durch ihre Sekundärstruktur also direkt als Thermosensor. Dieser Mechanismus erklärt mit dem schnellen Anstieg der σ^{32} Synthese auf den Stressreiz.

1.8.2.1.5 Regulation der σ^{32} Stabilität

σ^{32} ist unter normalen Bedingungen bei 30°C instabil, bei einer Temperaturerhöhung auf 42°C kommt es aber zu einer vorübergehenden Stabilisierung des Proteins für ca. 4-5min (Straus, *et al.*, 1987). Da Mutationen in den Chaperonen DnaJ, DnaK und GrpE zu einer dauerhaften Stabilisierung des σ -Faktors führten (Tilly *et al.*, 1989; Straus *et al.*, 1990), lag die Vermutung nahe, diese HSP seien als Produkte der Hitzeschock-Reaktion direkt an der Regulation beteiligt.

Die Region C (AA 122-144) von σ^{32} spielt für die Instabilität unter Normalbedingungen eine entscheidende Rolle (Nagai *et al.*, 1994). Auffällig war besonders ein neun Aminosäuren kurzes Segment, *rpoH* Box (AA 132 -144) genannt, das in σ^{32} Homologa hoch konserviert ist (Nakahigashi *et al.*, 1995). Verschiedene Versuche deuten darauf hin, dass sowohl DnaK als auch die RNAP an diese Region binden (McCarty *et al.*, 1996; Joo *et al.*, 1998). Die Bindung der RNAP schützt σ^{32} vor dem Angriff durch FtsH, einer Protease, die an dem Abbau von σ^{32} beteiligt ist (Tomoyasu *et al.*, 1995; Herman *et al.*, 1995). Die Rolle des Chaperons scheint sich darauf zu beschränken, die kompetitive Bindung der schützenden RNAP zu verhindern (Blaszczak *et al.*, 1999).

Wenn also im Falle eines Stressreizes die Chaperone an beschädigte Proteine binden, wird der Weg frei für die RNAP und der Abbau von σ^{32} wird inhibiert. Wenn wieder genügend Chaperone frei sind, der Stressreiz also unter Kontrolle ist, wird σ^{32} wieder vorwiegend abgebaut, weitere HSP werden nicht benötigt.

1.8.2.1.6 Regulation der σ^{32} Aktivität

Der Einfluss der σ^{32} Aktivität auf die Hitzeschock Regulation ist hauptsächlich auf die schnelle Beendigung der HSP Synthese während der Adaptationsphase beschränkt (Yura *et al.*, 1993). DnaJ, DnaK und GrpE sind für die Inaktivierung essentiell (Straus *et al.*, 1989). In Form eines Zyklus binden sie, wenn die Zahl der denaturierten Proteine nach dem Hitzeschock wieder abgenommen hat und die Chaperone damit frei sind, an σ^{32} und versperren damit der core-RNAP den Zugang zum Sigmafaktor (Gamer *et al.*, 1996). Dieser Zyklus ist dem Aktionszyklus des DnaK Systems bei der Proteinfaltung sehr ähnlich (Gamer *et al.*, 1996; Bukau *et al.*, 1999): Als erstes bindet DnaJ an σ^{32} , was wiederum die Bindung von DnaK-ATP erleichtert. Dieser Komplex ist für die Inaktivierung verantwortlich. Nach ATP Hydrolyse in ADP + P lagert sich GrpE an (DnaK-ADP)-DnaJ- σ^{32} an, stimuliert die Freisetzung des ADP und führt über Bindung von ATP an DnaK zur Auflösung des Komplexes.

1.8.2.2 σ^E Regulon

Der P3 Promotor von *rpoH* wird im Gegensatz zu den anderen drei Promotoren erst bei Temperaturen von 45–50°C aktiv. Er steht unter der Kontrolle eines zweiten alternativen Sigmafaktors σ^E (Erickson *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1989). Das σ^E Regulon wird durch fehlgefaltete oder defekte Proteine in der Zellhülle und dem periplasmatischen Raum induziert (Mecenas *et al.*, 1993; Missiakas *et al.*, 1996), ist also zur Bewältigung von extrazytoplasmatischem Stress verantwortlich. Entgegen ersten Annahmen ist auch σ^E für normales Wachstum essentiell (De Las Penas *et al.*, 1997a). Ein membrangebundener anti- σ Faktor, RseA (De Las Penas *et al.*, 1997b), und der Cpx two-component signal transduction pathway (Danese *et al.*, 1997) sind wesentliche Steuerelemente dieses Regulons.

1.8.2.3 Zusammenfassung der Hitzeschock Regulation bei *E. coli*

Unter normalen Bedingungen wird im σ^{32} Regulon durch die relativ konstante Transkription von *rpoH* ein basaler Spiegel an σ^{32} aufrechterhalten. Die *rpoH* mRNA wird aber nur schlecht translatiert und der Sigmafaktor ist durch den schnellen Abbau sehr instabil. Bei einem Stressreiz kommt es zur Denaturierung zellulärer Proteine, deren Rückfaltung durch die Chaperone katalysiert werden muss. Diese, da gebunden, können nun nicht mehr zum Abbau von σ^{32} führen, die HSP Synthese steigt rasch an. Zudem kann die *rpoH* mRNA nun auch translatiert werden, womit die Menge des Sigmafaktors zunimmt. Schon nach wenigen Minuten sind genügend HSP vorhanden, die nun im Sinne einer negativen Rückkoppelung die Aktivität von σ^{32} hemmen und den Abbau stimulieren. Zum einen ist es der Temperaturanstieg direkt, der den Hitzeschock auslöst, zum anderen sind es die zellulären Folgen dieser Stressreaktion in Form von denaturierten Proteinen.

Das σ^E Regulon schützt gegen extrazytoplasmatischen Stress.

Die Steuerung des Hitzeschocks über *rpoH* ist bei gramnegativen Bakterien weit verbreitet (Takashi *et al.*, 1999). So konnten nicht nur bei γ - (z.B. *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*), sondern auch bei α - (z.B. *Rickettsia prowazekii*) und β - Proteobakterien (z.B. *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoea*) *rpoH* Analoga gefunden werden. Die grundlegende Strategie der Hitzeschock Antwort scheint immer gleich zu sein, auch wenn sich die einzelnen Steuerungsmechanismen im Detail unterscheiden. Grampositive Bakterien nutzen zum Teil andere Regulationsstrategien.

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Obwohl die Hitzeschock-Reaktion bei *Neisseria meningitidis* ein wichtiger Pathogenitätsfaktor sein könnte, z.B. bei der Induktion von Fieber im septischen Infekt, ist dieser ubiquitäre und fundamentale Mechanismus bisher fast unerforscht geblieben (Arakere *et al.*, 1993). Bei Gonokokken, mit den Meningokokken sehr nahe verwandt, konnten sowohl durch Stressreize induzierbare Proteine, z.B. groEL/groES, (Klimpel *et al.*, 1989a; Woods *et al.*, 1990; Pettit *et al.*, 1996) als auch σ^{32} (Klimpel *et al.*, 1989b) identifiziert werden. Mit der Sequenzierung des Genoms von *N. meningitidis* konnten über Homologievergleiche viele der bekannten HSP identifiziert werden (Tettelin *et al.*, 2000), über die Regulation des Hitzeschock und seine Rolle im Rahmen der Infektion kann mittels Homologievergleichen jedoch keine eindeutige Aussage gemacht werden. Ziel dieser Arbeit ist daher die Untersuchung der Hitzeschock-Reaktion bei *Neisseria meningitidis* mittels DNA Mikroarray Technologie. Es soll der Einfluss eines thermalen Stressreizes auf die Transkription von Hitzeschock-Genen und von Genen, die eigentlich durch einen Stressreiz nicht beeinflusst werden sollten, wie z.B. Transformation und Stoffwechsel, analysiert werden. Gleichzeitig soll die neue Technik der DNA Mikroarrays für *Neisseria meningitidis* etabliert werden, um diese zukunftssträchtige Technologie in späteren Versuchen zur genauen Untersuchung des Pathomechanismus der Neisserieninfektion nutzen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Array System

Affymetrix 417™ Arrayer (MWG Biotech, München)

Affymetrix 418™ Scanner (MWG Biotech, München)

Brutschränke

KB 500 (Heraeus, Hanau)

B5060 E-CO₂ (Heraeus, Hanau)

Elektrophoresekammern

DNA Subcell™ (BioRad, München)

Wide Mini-Subcell™ (BioRad, München)

Fastprep Beater

Fastprep 120 (Savant, Framingdale, NY, USA)

Heizblöcke

BT1 und BT3 (Grant Instruments, Cambridge, UK)

Hybridisierungsöfen

DUO-Therm OV5 (Biometra, Göttingen)

Hybridisierungskammern

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

Schüttelinkubatoren

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

KS 10 (Bühler, Tübingen)

Spannungsgeräte

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

Power Supply 3000Xi (BioRad, München)

Spektrophotometer

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

ThermoCycler

TRIO (Biometra, Göttingen)

Personal Cycler (Biometra, Göttingen)

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

UV Crosslinker

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

Vacuumzentrifuge

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

Zentrifugen

Biofuge 15 (Heraeus, Hanau)

Biofuge 15R (Heraeus, Hanau)

Omnifuge2.0 RS (Heraeus, Hanau)

Kühlzentrifuge RC-5B (Sorvall Heraeus, Hanau)

Ultrazentrifuge L7 (Beckman, München)

Tisch-Ultrazentrifuge TL-100 (Beckman, München)

2.1.2 Computer

2.1.2.1 Hardware

Dell Dimension XPS 450, Windows 98

2.1.2.2 Software

Imagene 4.0 (BioDiscovery, Inc.)

GMS Scanner Software 1.51 (Genetic Microsystems, Inc.)

Arrayer Version 1.50 (Genetic Microsystems, Inc.)

Office XP Professional

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

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

15-ml-Röhrchen, steril (Greiner, Nürtingen)

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

CMT-GAPS[™] – Coated Slides (Corning, Wiesbaden)

FastRNA Tubes Blue (Q biogene, Heidelberg)

PS-Mikrotiterplatte 96 K, (Greiner, Nürtingen)

Spritzen und Kanülen (Braun Melsungen AG, Melsungen)

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

2.1.4 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme

von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Ficoll 400

FluoroLink Cy3-dCTP

FluoroLink Cy3-dUTP

FluoroLink Cy5-dCTP

FluoroLink Cy5-dUTP

von Applicam, Darmstadt

Albumin - Fraktion V, pH 7,0

von Bayer, Leverkusen

Ampicillin (Binotal[®])

von bioMérieux, MarCy l'Etoile, Frankreich

PolyVitex (Vitaminlösung für Flüssigmedien)

von Difco Laboratories, Augsburg

Bacto-Trypton

GC-Medium Base

Hefeextrakt

Proteose-Pepton

von Life Technologies, Karlsruhe

dATP, dCTP, dGTP, dTTP

DTT

LB Agar (Lennox L Agar)

LB Broth Base (Lennox L Broth Base)

Random Primer Mix

RNaseOut[™] RNase Inhibitor

rNTP – Mix (10mM)

SuperScript[™] II RNase H⁻ Reverse Transcriptase

T7 RNA Polymerase

5 × First Strand Buffer

5 × Transkriptionspuffer (T7)

von Merck, Darmstadt

Ethanol absolute, 99,8 %

von Perkin Elmer, Weiterstadt

AmpliTa[®]

MgCl₂, 25mM

10 × PCR Puffer

von Qiagen, Hilden

QIAamp DNA Mini Kit

QIAquick Gel Extraction Kit

QIAquick PCR Purification Kit

Qiagen Plasmid Midi Kit

RNeasy[®], mini, midi Kit

von Promega, Mannheim

100bp DNA Ladder

1kp DNA Ladder

von Roche, Mannheim

DNase I, RNase frei

von Roth, Karlsruhe

Agarose NEEO

von Sigma Chemical Co., Steinheim

2 – Mercaptoethanol

Diethyl Pyrocarbonate

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

2.1.5 Bakterienstämme

Neisseria meningitidis Serogruppe B, Stamm MC58; klinisches Isolat 1985 in Großbritannien

2.1.6 Plasmide

Name	Herkunft	Beschreibung	Referenz
PcDNA3	Invitrogen	Ap ^R , P _{CMV} , P _{SV40-neo}	-
pHC 6.3	Dr. Heike Claus	Kan ^R in <i>hrtA</i> Locus	Claus <i>et al.</i> , 1998

Tabelle 3. Verwendete Plasmide

2.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert. Die vollständige Liste der verwendeten Oligonukleotide ist im Anhang zu finden.

2.1.8 Puffer und Lösungen

20 x SSC

3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat
pH 7,0

2 x YT-Medium

Bacto-Trypton	16,0 g
Yeast-Extract	10,0 g
NaCl	10,0 g
H ₂ O	ad 1,0 l

2.1.9 Nährmedien und Agarplatten

2.1.9.1 Nährmedien

Luria-Broth-Medium (LB-Medium)

1,0 % Bacto-Trypton
0,5 % Hefeextrakt
1,0 % NaCl
pH 7,5

PPM-Medium

1,5 % Proteose-Pepton
0,5 % NaCl
0,05 % Stärke
0,4 % KH₂PO₄
0,1 % K₂HPO₄
pH 7,8 (mit KOH)

PPM-Medium, supplementiert

PPM-Medium	0,01 M MgCl
	0,042 % NaHCO ₃
	1 % (v/v) PolyVitex

2.1.9.2 Agarplatten

LB-Agar

LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar

GC-Agar

1,5 % Proteose-Pepton
0,1 % Stärke
0,4 % K-Phosphat
0,5 % NaCl
1,0 % Bacto-Agar
pH 7,2

2.1.9.3 Kulturbedingungen

Alle Inkubationen von Bakterien finden bei 37°C statt. Neisserien-Kulturen werden auf, mit Faktor VX supplementiertem, GC-Agar in einem CO₂-Brutschrank (5% CO₂-Atmosphäre) inkubiert. *E. coli* wird auf LB-Agar inkubiert. Bei rekombinanten Bakterienstämmen werden dem Medium die zur Selektion notwendigen Antibiotika zugesetzt.

2.1.9.4 Antibiotikazusätze

Bei Zusatz von Antibiotika werden folgende Konzentrationen verwendet:

Kanamycin	100 µg/ml für <i>N. meningitidis</i>
Ampicillin	100 µg/ml für <i>E. coli</i>

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolation

2.2.1.1 DNA Isolation mittels QIAamp DNA mini Kit

Die Isolation von genomischer DNA aus Bakterien erfolgt mit dem QIAamp DNA mini Kit. Die Technik dieses Kits beruht auf der Adsorption von DNA an eine QIAamp Silicagel-Membran in den Spinsäulen, dem Abwaschen aller übrigen Kontaminationen und schließlich der Elution der gereinigten DNA in Wasser. Aus 10^7 Zellen können bis zu 50µg DNA isoliert werden.

Am Tag vor der DNA-Isolation wird eine 10ml Flüssigkultur angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Morgen wird damit eine neue Flüssigkultur überimpft, weiter inkubiert, und bei einer OD_{600nm} von ca. 1,5–2,0 erfolgt die DNA-Isolation gemäß den Spezifikationen des Herstellers.

Die DNA-Ausbeute kann durch Messung im Spektralphotometer bestimmt werden. Anschließend werden Menge und Qualität der DNA zusätzlich auf einem Agarosegel überprüft.

2.2.2 RNA-Isolation

2.2.2.1 Allgemeine Grundlagen zur RNA-Isolation

RNA ist im Gegensatz zur DNA ein sehr instabiles Molekül. Sowohl in der Zelle als auch überall sonst sind es besonders RNasen, die für den schnellen Abbau verantwortlich sind. Bei Arbeiten mit RNA ist es deshalb erforderlich, besondere Vorkehrungen zu treffen.

- Die verwendeten Pipettenspitzen werden mit Pinzette gesteckt und zweimal autoklaviert.
- Bei allen Arbeiten mit RNA empfiehlt sich das Anziehen von zwei paar Handschuhen übereinander.
- Die Eppendorfgefäße zur Aufbewahrung der RNA werden vom Hersteller RNase frei geliefert.

- Alle Chemikalien und Lösungen zur Arbeit mit RNA werden entweder vom Hersteller RNase frei geliefert oder mit DEPC behandelt (mit 0,1% DEPC versetzt, über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert).

Die RNA-Isolation wurde nach einem Protokoll von Dietrich *et al.*, 2000 durchgeführt. Dieses Protokoll verbindet einen mechanischen Aufschluss der Zellen mit dem Fastprep System von Qiagen mit einer anschließenden Aufreinigung der RNA über das RNeasy System von Qiagen.

2.2.2.2 Bakterienkultur zur RNA-Isolation

Der Bakterienstamm wird auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird von der Platte eine Flüssigkultur angeimpft und im Schüttelinkubator belassen bis sie eine optische Dichte von OD_{600nm} von 1,0 erreicht. Es wird nun damit wieder eine neue Flüssigkultur auf eine OD_{600nm} von 0,1 überimpft und die Bakterienkultur bis zum Erreichen der mittleren logarithmischen Wachstumsphase kultiviert ($OD_{600nm} = 0,5 / 5 \times 10^8$ CFU/ml). Dieses Procedere gewährleistet eine RNA-Isolation aus einer Bakterienkultur in gut reproduzierbarer logarithmischer Wachstumsphase.

2.2.2.3 Protokoll der RNA-Isolation

Die Bakterienkultur mit einem Volumen von 10ml in einem 50ml Greiner Röhrchen wird mit $6000 \times g$ bei $4^\circ C$ für 5min zu einem Zellpellet abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet (bis zu 1×10^9 Bakterien) wird in $1050 \mu l$ RLT Puffer (Qiagen, Hilden), mit 0,1% 2-Mercaptoethanol versetzt, resuspendiert und in ein FastRNA Tube Blue überführt. Die Tubes werden in den FastPrep FP120 eingespannt und 45sec. lang mit Geschwindigkeitsstufe 6,5 prozessiert. Zwischen Silica Partikeln werden die Bakterien hierbei aufgerieben und die RNA freigesetzt. Die Pufferlösung stabilisiert die RNA und inaktiviert gleichzeitig die Nukleasen. Nach Abzentrifugieren (1min mit $8000 \times g$ und $4^\circ C$) wird der Überstand mit 0,7 Volumina EtOH versetzt und kurz geschüttelt. Diese Probe kann nun mit dem Qiagen RNeasy midi Kit nach Protokollhandbuch weiter verarbeitet werden und die RNA nach den Waschschrritten mit $400 \mu l$ RNase freiem Wasser eluiert werden. Die Bindungskapazität einer Spinsäule dieses Systems liegt bei 1mg RNA.

2.2.2.4 Abschließender DNA-Verdau

Um noch eventuelle Verunreinigungen durch restliche DNA zu entfernen, welche die spätere reverse Transkription stören und die Ergebnisse verfälschen könnten, wird im Anschluss an die RNA-Isolation noch ein DNA-Verdau durchgeführt.

500 µl Ansatz:

- | | |
|--|------------|
| - MgSO ₄ (DEPC behandelt) 0,5 M | 50 µl |
| - Na-Acetat (DEPC behandelt) 1,0 M | 50 µl |
| - DNase (10U/µl) | 10 µl |
| - RNA aus vorheriger Isolation | 350-380 µl |
| - Wasser (DEPC behandelt) | ad 500 µl |

Nach Inkubation von 60min Dauer bei 37°C wird die RNA noch einmal mit dem Qiagen RNeasy midi Kit aufgereinigt.

2.2.3 Auftrennung und Analyse von Nukleinsäuren

2.2.3.1 Agarosegelelektrophorese

Eine Standardmethode zur Auftrennung und Analyse von DNA-Molekülen verschiedener Größe ist die Elektrophorese im Agarosegel. In dem Netzwerk aus den Zuckermolekülen bewegen sich die DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld. Der Laufwiderstand ist hierbei umso höher, je größer die DNA-Fragmente sind. Eine effiziente Trennung erhält man, wenn die Konzentration der Agarose der DNA-Fragmentgröße angepasst wird. Je höher die Konzentration der Agarose, desto enger ist das Netzwerk der Agarosemoleküle und desto kleinere DNA-Fragmente können aufgetrennt und analysiert werden. Folgende Agarosekonzentrationen werden gewählt:

- z. B. 0,8 % Agarose für DNA der Größe 0,8 - 12 kb
1,0 % Agarose für DNA der Größe 0,5 - 10 kb
1,5 % Agarose für DNA der Größe 0,2 - 3 kb

2.2.3.1.1 Agarosegel

Die entsprechende Menge Agarose kocht man in 1x TAE-Puffer ca. 5min auf, lässt sie auf 50°C abkühlen und gießt die gelöste Agarose zügig in eine horizontale Gelkammer. Den Gelkamm für die Geltaschen steckt man nun in die noch flüssige Agarose. Die erstarrte Agarose wird dann mit 1x TAE-Puffer mit Ethidiumbromidlösung in einer

Endkonzentration von 3µg/ml bedeckt (ca. 0.5cm). Die DNA-Proben werden mit DNA-Auftragspuffer versetzt und neben DNA-Fragmenten definierter Grösse, 100bp DNA Ladder oder 1kp DNA Ladder, in die Geltaschen gefüllt. Anschließend führt man die Elektrophorese mit maximal 200V / 200mA durch. Die Gele können anschließend unter UV-Licht analysiert und gegebenenfalls photographiert werden (Sony-Videoprinter).

50 × TAE-Puffer	2.0 M	Tris-Base
	57.1 ml	Eisessig
	50.0 mM	EDTA
	H ₂ O ad 1.0 l	
	pH 8.3	
10× DNA-Auftragspuffer	0.2%	Bromphenolblau
	0.2 M	EDTA
	50%	Glyzerin

2.2.3.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA wird mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) durchgeführt. Das Verfahren basiert auf der selektiven Bindung der DNA an Silikagel-Membranen in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen.

Unter UV-Licht wird die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und nach Protokoll aus dem Agarosegel aufgereinigt. Pro Spinsäule kann 400mg Agarosegel (in TAE oder TBE) mit DNA der Größe von 70bp bis 4kbp verarbeitet werden.

2.2.3.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

RNA ist im Vergleich zu DNA sehr instabil. Besonders die ubiquitär vorhandenen RNasen sind für den schnellen Abbau der RNA verantwortlich. Bei dem Auftragen auf ein einfaches Agarosegel wird ein großer Teil der RNA durch diese Enzyme abgebaut und eine exakte Analyse daher nur schwer möglich. In einem denaturierenden Agarosegel dagegen verlieren alle Proteine, einschließlich der RNase, durch die denaturierende Wirkung von Formaldehyd ihre Funktion und die RNA ist somit vor einem Abbau geschützt.

Ca. 10µg RNA werden mit 2,5µl 20 % Ficoll-Orange G - Lösung und 12µl [Formamid : Formaldehyd : 10×DNA Laufpuffer (2:2:1)] versetzt. Nach 5minütiger Denaturierung bei 65°C werden die Proben in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, das mit 1×Laufpuffer und 0,65% Formaldehyd sowie Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 3µg/ml hergestellt worden ist. Die Elektrophorese erfolgt in 1× Laufpuffer bei 60V bis die Orange G - Front 2/3 des Geles durchwandert hat.

20 % Ficoll-Orange G 2 g Ficoll 400
 eine Spatelspitze Orange G
 ddH₂O Ad 10 ml

2.2.3.3 Qualitative und Quantitative Analyse von DNA / RNA

Zur Bestimmung der Konzentrationen sowie der Reinheit von DNA- und RNA-Lösungen werden photometrische Messungen bei 260nm und 280nm in 1-ml-Quarzküvetten durchgeführt. Eine OD_{260nm} von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50µg/ml, bei einzelsträngiger DNA und RNA 40µg/ml und bei Oligonukleotiden 30 µg/ml. Das Verhältnis OD_{260nm} zu OD_{280nm} gibt Aufschluss über die Reinheit bezüglich Kontamination mit Proteinen und sollte 1,8 - 2,0 betragen. Sind größere Proteinmengen in der Lösung vorhanden, steigt die OD_{280nm} und das Verhältnis wird kleiner.

Eine weniger genaue Konzentrationsbestimmung erfolgt im Anschluß an die Gelelektrophorese durch eine visuelle Beurteilung der Intensität der Nukleinsäure-Banden im Vergleich zu Marker-Banden mit einer definierten Auftragsmenge.

Ein Qualitätsparameter der isolierten RNA ist das Verhältnis 16S : 23S rRNA. Die Abwesenheit verunreinigender DNA wurde stets durch PCR Kontrolle mit den spezifischen Primern der ORFs NMB0829 (*hsdM*) and NMB0950 (*sdhA*) überprüft:

HsdM Forward: 5'-TTTCCGGCAGAGGCCGCG-3'

HsdM Reverse: 5'-TCAATTTACGCCGCAGCCG-3'

SdhA Forward: 5'-GGAAACCTTTGCCTGCTAAT-3'

SdhA Reverse: 5'-ATAAACGCGCTTGGCCGGTTT-3'

2.2.4 Enzymatische Bearbeitung von DNA

2.2.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsendonukleasen sind Enzyme prokaryontischer Herkunft, die spezifische Nukleotidfolgen innerhalb der doppelsträngigen DNA erkennen und spalten. Dies geschieht durch Aufbrechen von je einer Phosphodiesterbindung auf jedem der beiden Stränge. Die Zusammensetzung der Inkubationspuffer und die Reaktionsbedingungen für die einzelnen Restriktionsenzyme können den Katalogen der Herstellerfirmen entnommen werden. Die Spaltansätze haben üblicherweise ein Endvolumen von 20µl und enthalten 0.5 bis 1.0µg DNA.

2.2.4.2 Ligation von DNA - Molekülen

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen einem 5'-endständigen Phosphat und einer 3'-endständigen Hydroxylgruppe. Als Substrat können verschiedene doppelsträngige Nukleinsäuremoleküle verwendet werden:

- DNA mit überstehenden Enden
- glattendige DNA
- "nicked" DNA

Reaktionsansatz für Ligation zweier verschiedener DNA-Moleküle mit überstehenden Enden:

- | | |
|-------------------------|----------|
| - Vektor-DNA | 0.5 µg |
| - Insert-DNA | 1.5 µg |
| - 10× Ligase Puffer | 2.0 µl |
| - T4-Ligase (1 Unit/µl) | 1.0 µl |
| - H ₂ O | ad 20 µl |

Die Inkubation erfolgt bei 16°C über Nacht.

2.2.4.3 Amplifikation von DNA Fragmenten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine enzymatische Methode zur Amplifizierung von definierten DNA-Fragmenten. Das Prinzip beruht auf einer zyklischen, automatisierten Wiederholung von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Primer-Extension zweier Oligonukleotide. Die Sequenz der Oligonukleotide ist komplementär zum jeweiligen Strang des Templates und ihre 3'OH-Gruppen weisen aufeinander zu, so dass die dazwischenliegende DNA-Sequenz vervielfältigt werden kann. Die Automatisierung dieses Vorganges wurde durch die Entdeckung hitzestabiler DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien ermöglicht (z.B. Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, Tfl-Polymerase aus *Thermus flavus*, Tth-Polymerase aus *Thermus thermophilus*). Diese Polymerasen sind auch nach mehrfachem Erhitzen und Abkühlen noch aktiv.

2.2.4.3.1 PCR Reaktionsansatz

In einem PCR Reaktionsgefäß werden folgende Komponenten auf Eis zusammen pipettiert:

- 10× PCR-Puffer	10 µl
- Primer I (100 pmol/µl)	1 µl
- Primer II (100 pmol/µl)	1 µl
- dsDNA als Template	5 ng
- dNTP (4 mM) (äquimolarer dATP, dCTP, dGTP und dTTP Mix)	5 µl
- Taq - Polymerase	1.5-2.5 U
- H ₂ O	ad 100 µl

2.2.4.3.2 Reaktionsablauf im PCR Cycler

Die Amplifizierung erfolgt in einem PCR-Gerät mit folgendem Programm:

Zunächst wird das Reaktionsgemisch für 3min auf 94°C erhitzt (Denaturierung evtl. vorhandener Nukleasen).

Der folgende Zyklus wird in der Regel 30-mal wiederholt:

1. Denaturierung der dsDNA; 1min, 95°C
2. Hybridisierung der Primer an die ssDNA; 1 min, 45-62°C

$$T = [2 \times (N(A)+N(T))] + [3 \times (N(C)+N(G))] \text{ } ^\circ\text{C}$$

3. Elongation der Primer; 1-2 min (je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments), 72°C

Abschließend 3-5 min Elongation bei 72°C

Bei jedem Zyklus des Reaktionsablaufes kommt es exponentiell zu einer Verdoppelung der zu amplifizierenden DNA.

5-10µl des Reaktionsansatzes werden nach Beendigung der Reaktion zur quantitativen und qualitativen Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.4.3.3 Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem Quiagen PCR Purifikation Kit

Auch das Qiagen PCR Purifikation Kit beruht auf der selektiven Bindung der zu isolierenden Substanz, hier der PCR-Produkte, an eine spezifische Membran aus Silicagel in den Spin Columns. In der Regel kann ein 100µl PCR Reaktionsansatz mit einer Säule aufgereinigt werden. Mit diesem Kit kann auch cDNA nach reverser Transkription aufgereinigt werden.

2.2.5 *In vitro* Transkription

Prinzipiell kann jede beliebige DNA durch eine RNA-Polymerase in RNA transkribiert werden, Voraussetzung ist allerdings das Vorhandensein einer Bindungsstelle für die RNA-Polymerase. Um eine hohe und effiziente Transkriptionsrate zu erreichen, wird die Template-DNA in einen Vektor kloniert, stromabwärts einer Bindungsstelle für die RNA-Polymerase. Nach der Klonierung wird das Plasmid am 3` Ende der eingebauten DNA geschnitten, um die *in vitro* Transkription dort zu stoppen.

In RNase freien Gefäßen wird der 100µl Ansatz der *in vitro* Transkription zusammen pipettiert:

- Template DNA 4 µg
- 5 × Transkriptionspuffer (T7) 20µl
- rNTP – Mix (10mM) 4µl
- DTT (0,1 M) 30µl
- T7 RNA Polymerase (50 U / µl) 0,8µl
- DEPC H₂O ad 100µl

Der Ansatz wird 30min bei 37°C inkubiert. Zugabe von 10U DNase I und anschließende Inkubation für weitere 15min bei 37°C sorgt für den Abbau der Template DNA, so dass die transkribierte RNA nach Aufreinigung mit dem Qiagen RNeasy Kit in reiner Form vorliegt und z.B. als interner Standard einer RT-Reaktion beigefügt werden kann.

2.2.6 Reverse Transkription mit Fluoreszenz-Labeling

Über eine reverse Transkription wird die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben, wobei in dieser Reaktion fluoreszierende Nukleotidanaloga eingebaut werden. Diese einzelsträngige cDNA wird dann nach Aufreinigung zur Hybridisierung auf DNA Mikroarrays eingesetzt. Die reverse Transkription der Kontroll-RNA und der experimentellen RNA wird mit unterschiedlich fluoreszierenden Nukleotidanaloga, Cy3 bzw. Cy5, durchgeführt, da diese beiden Sonden später zusammen auf einen Mikroarray gegeben werden und kompetitiv an die aufgespotteten Proben binden.

Weil weniger als 10% der isolierten bakteriellen RNA verwertbare mRNA ist (der Großteil ist ribosomale RNA) und poly-T-Primer aufgrund der fehlenden Polyadenylierung bei Bakterien nicht einsetzbar sind, müssen zu den Random Primern noch spezifische Primer hinzugenommen werden (Talaat *et al.*, 2000). Eingesetzt wird ein Mix der 59 R (reversen) *Neisseria meningitidis* Primer der PCR Reaktion, die in DEPC Wasser gelöst sind und RNase frei behandelt wurden ($c_{\text{aller Primer}} = 100 \text{ pmol}/\mu\text{l}$; $c_{\text{eines einzelnen Primers}} = 1,7 \text{ pmol}/\mu\text{l}$).

Zur späteren Qualitätskontrolle werden *in vitro* Transkripte von *Saccharomyces* Genen als interne Standards der Reaktion zugegeben.

In RNase freien Gefäßen wird der 40µl RT Ansatz zusammen pipettiert:

- RNase out (40U/µl)	1 µl
- dATP	0,5 mM
- dGTP	0,5 mM
- dTTP	0,5 mM
- dCTP	0,2 mM
- DTT	10 mM
- SuperScript™ II (200U /µl)	1 µl
- FluoroLink Cy3-dCTP bzw. Cy5-dCTP	2 nmol
- RNA	10 µg
- Random Primer Mix	4 nmol
- Spezifische Primer (100 pmol/µl)	3 µl
- Interne Standards	10 ng
- DEPC Wasser	ad 40 µl

Die RNA wird zusammen mit den Primern und den internen Standards 5 Minuten lang auf 70°C erhitzt und auf Eis abgekühlt, bevor die übrigen Komponenten zugegeben werden. Die RT Reaktion läuft zuerst für 10min bei 25°C, anschließend noch einmal zwei Stunden bei 42°C.

Da die fluoreszierenden Cy-Farbstoffe sehr lichtempfindlich sind, sollte der Reaktionsansatz möglichst unter Ausschluss von Tageslicht zusammen pipettiert werden und die Reaktion im Dunkeln ablaufen.

Nach der RT wird die RNA durch alkalische Hydrolyse mit 60µl 0,1N NaOH abgebaut (10min bei 70°C), anschließend die Lösung mit HCl wieder neutralisiert. Die markierte cDNA wird zum Ende mit dem Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen) nach Handbuch aufgereinigt.

2.2.7 RT-PCR

Die RT-PCR wird in zwei getrennten Reaktionsschritten durchgeführt.

Im ersten Schritt wird 1µg isolierter RNA nach folgendem Protokoll in cDNA umgeschrieben.

In RNase freien Gefäßen wird der 40µl RT Ansatz zusammen pipettiert:

- RNase out (40U/µl)	1 µl
- dATP	0,5 mM
- dGTP	0,5 mM
- dTTP	0,5 mM
- dCTP	0,5 mM
- DTT	10 mM
- SuperScript™ II (200U /µl)	1 µl
- RNA	10 µg
- Random Primer Mix	4 nmol
- Spezifische Primer (100 pmol/µl)	3 µl
- DEPC Wasser	ad 40 µl

Als Primer werden wieder random und spezifische Primer verwendet. Die spezifischen Primer bestehen aus einem Mix der R (reversen) *N. meningitidis* Primer der zu untersuchenden Gene. Die RNA wird zusammen mit den Primern und den internen Standards 5min lang auf 70°C erhitzt und auf Eis abgekühlt, bevor die übrigen Komponenten dazugegeben werden. Die RT-Reaktion läuft zuerst für 10min bei 25°C, anschließend noch einmal zwei Stunden bei 42°C. Nach der reversen Transkription erfolgt wieder alkalische Hydrolyse der RNA und Aufreinigung über Qiaquick PCR Purification Kit.

Im zweiten Schritt wird 1µl der aufgereinigten cDNA als Template für PCR-Reaktionen im 50µl Ansatz mit folgenden Bedingungen eingesetzt: 95°C für 3 min; 18, 20, 22 und 24 Zyklen: 95°C für 1 min; 58°C für 1 min; 72°C für 1 min; letzte Elongation: 72°C für 3 min. Neben der Variation der Zyklenanzahl werden noch unterschiedliche Mengen an cDNA als Template bei konstanter Zyklenanzahl eingesetzt. Die PCR-Produkte werden über Agarose Gelelektrophorese mit 1,5% Agarose analysiert.

2.2.7.1 Semiquantitative RT-PCR

Mittels RT-PCR kann eine semiquantitative Aussage über einen Unterschied an mRNA Menge eines Gens zwischen zwei Kulturen getroffen werden. Dazu wird unter qualitativ

und quantitativ gleichen Bedingungen aus zwei verschiedenen Bakterienkulturen RNA isoliert und eine RT-PCR der isolierten RNA-Proben nach obigem Muster durchgeführt. Durch Vergleich der synthetisierten Mengen an PCR-Produkten kann ein Rückschluss auf einen Unterschied der Transkriptionsaktivität eines Gens zwischen beiden Kulturen getroffen werden.

2.2.8 Konstruktion der DNA Mikroarrays

2.2.8.1 Herstellung der PCR-Slides

Die Herstellung der PCR-Slides gliedert sich in drei Schritte.

Im ersten Schritt werden die PCR-Produkte, welche die in dieser Arbeit zu untersuchenden ORFs repräsentieren, mit dem Affimertrix 417TM Arrayer auf die CMT-GAPSTM-Coated Slides aufgespottet. Die PCR-Produkte liegen mit einer Konzentration von ca. 0,1 µg/µl in 3×SSC in einer 96-well Mikrotiterplatte vor. Der Arrayer arbeitet mit der ring-and-pin-technology. Mit vier Ringen taucht der Arrayer in die PCR-Produkte ein und nimmt damit die Proben auf. Mit den Nadeln stößt er dann durch die Ringe und damit durch die Proben und überträgt so eine kleinste Mengen an Probenvolumen, ca. 35-50pl, auf die Slides (je fünfmal pro Probe und Spot). Jeder Spot hat eine ungefähre Größe von 150µm im Durchmesser, die einzelnen Spots werden mit einem Abstand von 375µm nebeneinander aufgebracht. Aus statistischen Gründen wird jedes PCR-Produkt mit 10 Spots auf einen Slide aufgetragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte bei diesem Arbeitsschritt 60-70% betragen, um ein Antrocknen der Probe an dem Ring oder der Nadel zu verhindern.

Die Fixierung der aufgespotteten DNA erfolgt über UV-Crosslink im Stratalinker[®] 1800 mit dem Auto-Crosslink Programm. Auf der Oberfläche der CMT-GAPSTM – Coated Slides sind lineare primäre Amine kovalent an die Oberfläche gebunden. Diese Amine tragen bei neutralem pH eine positive Ladung, an welche sich die native DNA der PCR-Proben anlagert. Mit der UV-Bestrahlung kommt es über den Zwischenschritt von freien Radikalen schließlich zur kovalenten Bindung der Thymidin Reste an die Amine.

Im Wasserbad bei 95°C für 2min wird die doppelsträngige DNA auf den Slides in Einzelstränge getrennt, darauf für eine Minute in 95% EtOH überführt und durch

Zentrifugation (800xg, 2min) in einem 50ml Greiner Röhrchen getrocknet. Die Slides können nun bis zur Hybridisierung aufbewahrt werden.

2.2.8.2 Hybridisierung der PCR Slides

Vor der Hybridisierung müssen die PCR-Slides noch prähybridisiert werden. Dafür werden sie für 20min in 3xSSC, 0,1% SDS und 10mg/ml bovine serum albumine (BSA) bei 50°C inkubiert. Nach zwei Waschschritten von je einer Minute in Wasser und darauf in Isopropanol und anschließendem Trockenzentrifugieren sind die Slides gebrauchsfertig.

Die beiden cDNA-Sonden, die miteinander verglichen werden sollen, werden vereinigt und in der Speed Vac auf ein Volumen von ca. 30µl eingedampft. Die Sonde wird auf 3xSSC und 0,1% SDS mit einem Endvolumen von 50µl eingestellt und für eine Minute auf 95°C erhitzt und dann sofort auf Eis abgekühlt.

Die Sonde wird nun auf die PCR-Slides pipettiert und mit einem Deckgläschen bedeckt. In der Corning CMT™ –Hybridization Chamber erfolgt die Hybridisierung bei 50°C in einem Wasserbad für 16h. Mit 2x10 µl Wasser, in die Hybridisierungskammer pipettiert, herrschen dort konstante Bedingungen, die eine reproduzierbare Bindung der cDNA ermöglichen.

Nach 16h müssen die Slides noch in drei Schritten gewaschen werden. Zuerst in 0,1xSSC und 0,1% SDS für 5min und darauf noch zweimal je 5min in 0,1xSSC. Nach dem Trocknen können die Slides eingescannt werden.

2.2.8.3 Scannen und Auswerten der DNA Microarrays

Die Slides werden mit dem GMS 418 Array Scanner in beiden Farbkanälen, 532nm Wellenlängen für Cy3 und 635nm für Cy5, eingelesen. Die Auswertung der beiden Bilddateien erfolgt mit Imagene 4.0 nach Anleitung mit folgenden Einstellungen:

Normalisierung: über den ganzen Slide

Background: lokaler Background

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der *N. meningitidis* spezifischen PCR Proben für die DNA Mikroarrays

Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurden im Jahr 2000 die kompletten Genomsequenzen zweier verschiedener *N. meningitidis* Stämme, eines Serogruppe A und eines Serogruppe B Stammes, publiziert (Parkhill *et al.*, 2000; Tettelin *et al.*, 2000). Während für die Serogruppe A bereits ein wirksamer Impfstoff zur Verfügung steht, ist dieser große klinische Fortschritt für die Serogruppe B, die für ca. zwei Drittel aller Infektionen in den Industriestaaten Europas und den USA verantwortlich ist (Conolly and Noah, 1999), bisher noch nicht erreicht. Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit ein Stamm der Serogruppe B verwendet: *Neisseria meningitidis*, MC 58. Dabei handelt es sich um einen Stamm, der 1985 in Großbritannien klinisch isoliert wurde. Das Genom von NM MC58 liegt sequenziert bei *The Institute for Genomic Research* vor (www.tigr.org).

Das Genom von *Neisseria meningitidis* beinhaltet etwa 2158 kodierende Regionen. Eine biologische Funktion konnte bisher 1158 (53.7%) dieser Regionen mittels Vergleichsanalysen zugeordnet werden (Tettelin *et al.*, 2000). Aus den 1158 ORFs wurden in dieser Arbeit 59 ORFs ausgewählt, deren Funktion und Verhalten beim Hitzeschock mittels DNA Mikroarrays untersucht werden sollten. 15 von diesen ORFs sollten gemäß den Vergleichsanalysen bei TIGR eine Rolle bei der Hitzeschock-Reaktion spielen, also entweder an der Steuerung beteiligt sein und / oder bei der Hitzeschock-Reaktion induziert werden. Darunter waren die Chaperone DnaJ/DnaK, GroEL/GroES und HscA. Ebenfalls einbezogen wurden die beiden Sigmafaktoren σ^{32} und σ^{70} . Daneben wurden aber auch ORFs aus verschiedenen anderen Kategorien ausgewählt, von denen bisher nicht bekannt war, dass sie durch einen Stressreiz beeinflusst werden: Gene, die bei der Transformation, also der Aufnahme von freier DNA ins Bakterium, aktiv sind oder für Restriktionsenzyme kodieren. Schließlich wurden Stoffwechselfgene, sowohl des aeroben als auch des anaeroben Stoffwechsels, und die NO-Reduktase untersucht. Die in dieser Arbeit analysierten Gene sind in der Anlage vollständig aufgeführt.

Von diesen 59 ORFs wurden mittels PCR interne Fragmente amplifiziert, die dann als Proben für die DNA Mikroarrays verwendet werden können. Die Primer für die PCR

wurden gemäß der veröffentlichten Sequenzen von NM MC58 bei www.TIGR.org gesetzt. Die Länge der amplifizierten internen Fragmente betrug zwischen 290 bp bis 560 bp, im Durchschnitt 474 bp. Die durchschnittliche Länge der Primer betrug 20 Basen mit einer durchschnittlichen Annealing-Temperatur von 58°C bei der PCR. Beim Setzen der Primer wurden Regionen mit palindromer Struktur gemieden, um Basenpaarungen innerhalb der Primer zu vermeiden. Die Primer wurden schließlich auf Homologien zum NM MC58 Genom überprüft, um Kreuzhybridisierungen mit anderen Regionen zu vermeiden – alle Primer zeigten keine Homologien außer innerhalb der gewünschten ORFs. Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, synthetisiert.

Zuerst wurde die minimal nötige Menge von genomischer Template-DNA, aus *N. meningitidis* MC 58 isoliert, für eine PCR-Reaktion ermittelt, da die ORF-spezifischen, doppelsträngigen PCR-Produkte später als Proben für die DNA Mikroarrays eingesetzt werden. Größere Reste an Template-DNA könnten bei der Analyse unerwünschte Kreuzhybridisierungen verursachen und damit die Ergebnisse der DNA Mikroarray Versuche beeinflussen. Hierfür wurden mit den Primern von NM 0018 und NM 0027 je vier PCR Reaktionen, im 50 µl Ansatz unter Standard Bedingungen, mit 1ng, 5 ng, 10 ng und 100ng genomischer DNA als Template durchgeführt.

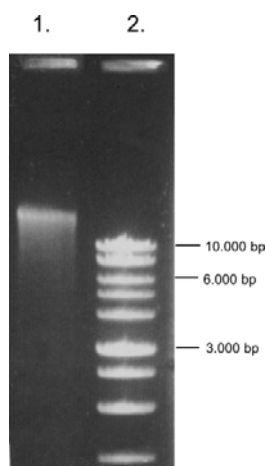


Abbildung 4. Isolation von genomischer DNA aus *N. meningitidis*:

1. Isolierte genomische DNA
2. 1kb DNA Ladder (Molekulargewichtsstandard)

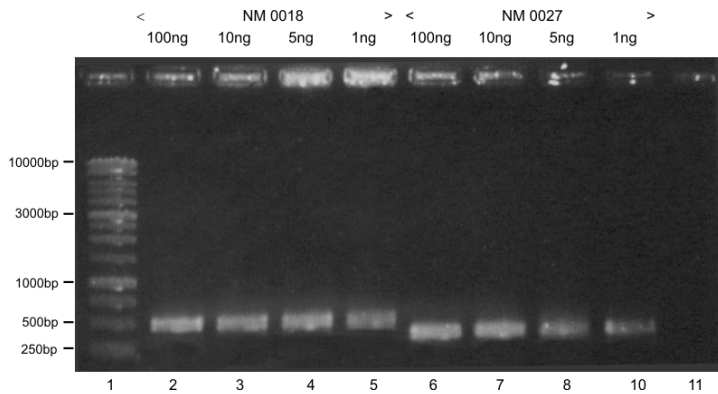


Abbildung 5. Austesten der minimal nötigen Menge für die PCR-Amplifikation der NM ORFs:

- Bahn 1: 1kb DNA Ladder
- Bahn 2-5: PCR-Amplifikation von NM 0018 mit den Mengen an genomischer DNA, wie im Bild angegeben
- Bahn 6-10: PCR-Amplifikation von NM 0027 mit den Mengen an genomischer DNA, wie im Bild angegeben
- Bahn 11: Negativkontrolle mit den Primern von NM 0027 und Wasser als Template

Aufgetragen wurden jeweils 10µl des 50µl PCR-Ansatzes. Bereits durch die Steigerung der Templatemenge von 5ng auf 10ng konnte die Ausbeute nicht mehr gesteigert werden, deshalb wurden 2ng genomischer DNA als Template für den 50µl PCR-Ansatz als Standard für die weiteren Versuche festgelegt.

Im 100µl PCR Reaktionsansatz wurden schließlich 4ng genomischer DNA als Template verwendet. Als PCR-Bedingungen wurde eine Annealing-Temperatur von 58°C für 1min bei einer Zyklenanzahl von 30 gewählt. Die PCR-Produkte wurden mit dem Qiaquick PCR purification kit aufgereinigt und 7,5µl der gesamten 100µl zur Qualitätskontrolle auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen. Alle PCR-Produkte in dieser Arbeit zeigten die korrekte Länge und erschienen als Einzelbanden im Gel.

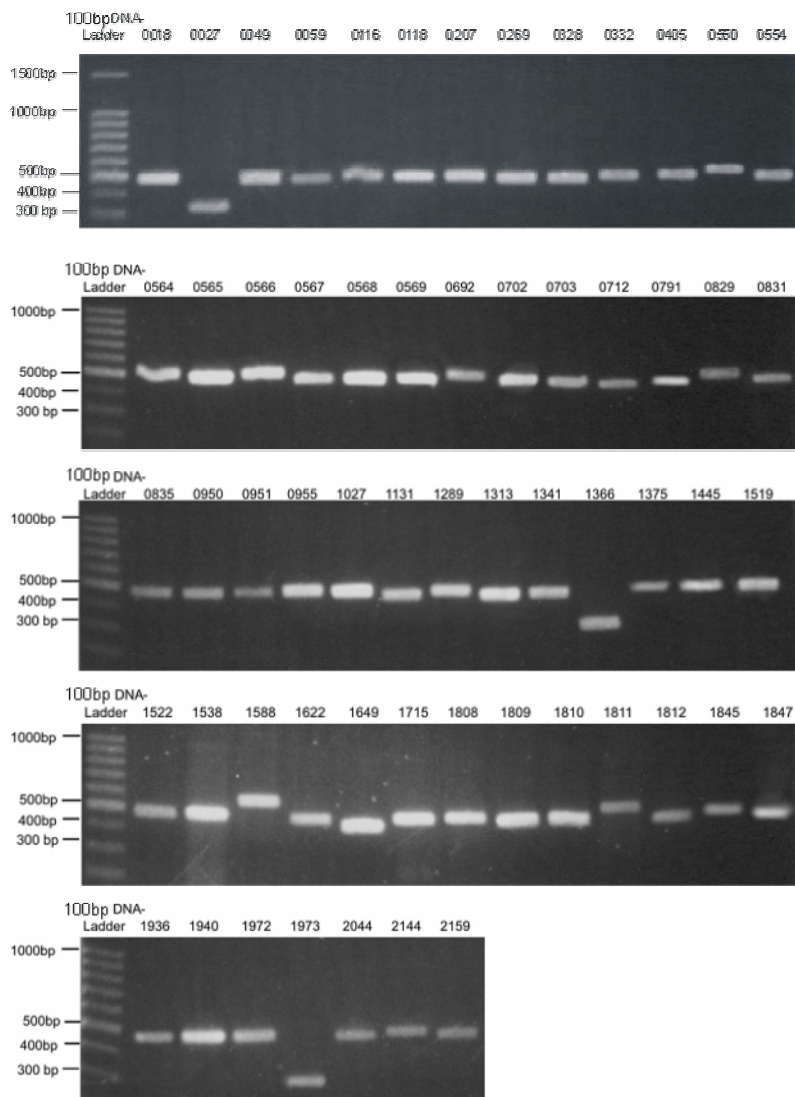


Abbildung 6. PCR-Amplifikation der 59 NM ORFs: Aufgetragen wurden jeweils 10 μ l eines 100 μ l PCR-Ansatzes. Die Banden sind nach den NM ORF Nummern benannt. Alle PCR-Produkte zeigten die korrekte Länge und erschienen als Einzelbanden im Gel.

3.2 Konstruktion interner Standards

Zusätzlich wurden auf der Basis von vier *Saccharomyces* Genen [*chs1* (*sacc1*), *gas1* (*sacc2*), *fks1* (*sacc3*), *chs2* (*sacc4*)] interne Standards hergestellt, die keinerlei Homologien mit dem *N. meningitidis* Genom zeigten. Diese internen Standards erlauben die Kontrolle der Sensitivität und Reliabilität der DNA Mikroarray Experimente. Interne Fragmente der vier *Saccharomyces* Gene (Länge zwischen 590bp und 1020bp) wurden jeweils in den Vektor pCDNA3 (In vitrogen, Groningen, Niederlande) kloniert (Guckenberger *et al*, 2002). Mittels PCR wurden die internen Fragmente amplifiziert und als Proben zusätzlich auf die DNA Mikroarray Slides aufgespottet. Die klonierten Plasmide wurden hierfür als Template mit den Primern

Sacc1 bis Sacc4 in PCR-Reaktionen mit Standardbedingungen eingesetzt. Des Weiteren wurden die internen Standards mit der T7 Polymerase *in vitro* nach dem Protokoll aus Material und Methoden transkribiert. Die klonierten Plasmide wurden dafür stromabwärts der eingefügten internen Fragmente mit XhoI geschnitten und nach einer Aufreinigung mit dem PCR purification Kit von Qiagen als Template für die *in vitro* Transkription verwendet.

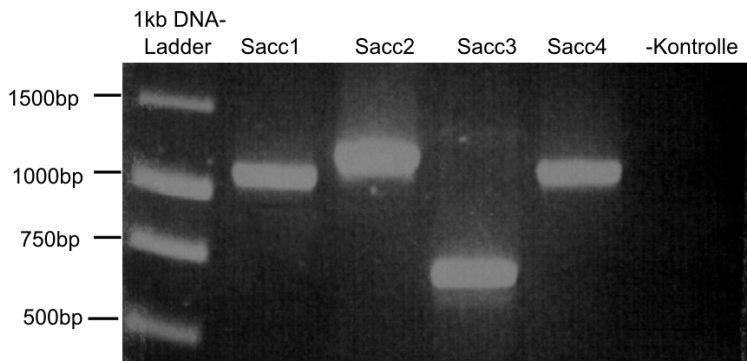


Abbildung 7. PCR-Amplifikation der vier *Saccharomyces* ORFs: Aufgetragen wurden jeweils 10µl eines 100µl PCR-Ansatzes. Alle vier PCR-Produkte zeigten die korrekte Länge und erschienen als Einzelbänder im Gel. Die negativ Kontrolle enthielt Wasser als Template.

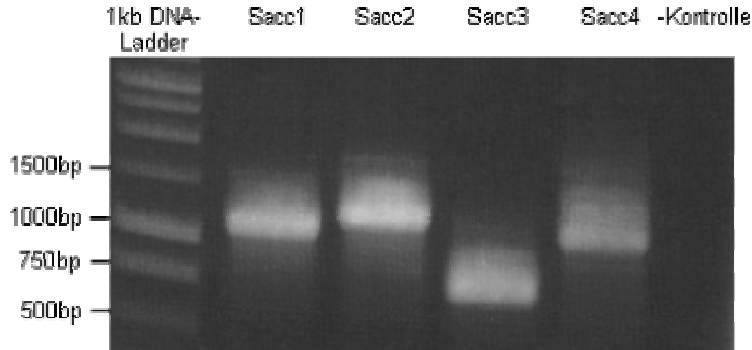


Abbildung 8: *In vitro* Transkripte der 4 *Saccharomyces* ORFs: Aufgetragen wurden jeweils 10µl eines 100µl *in vitro* Transkriptions-Ansatzes. Die negativ Kontrolle enthielt Wasser als Template.

3.3 Design der DNA Mikroarray Slides

Die 59 PCR-Proben wurden zusammen mit den PCR-Produkten der vier *Saccharomyces* Gene Sacc1, Sacc2, Sacc3 und Sacc4 in einer Konzentration von jeweils ca. 100ng/µl und einer Probe genomischer DNA von NM MC58 in 3 × SSC mit dem Affymetrix 417TM Arrayer auf CMT-GAPSTM – Coated Slides aufgespottet. Die Bedingungen für die Herstellung der Arrays sind unter Material und Methoden detailliert beschrieben. Von jeder Probe wurden jeweils zehn Spots aufgetragen. Zum einen gewährte dies eine bessere statistische Auswertung und zum anderen kann ein

ORF so auch dann noch ausgewertet werden, wenn einer oder mehrere Spots durch einen Schmutzpartikel verdeckt werden.

3.4 Sensitivität und Spezifität der DNA Mikroarray Technologie

3.4.1 Reproduzierbarkeit der reversen Transkription und der DNA Mikroarrays

Am Anfang der Arbeit mit dieser neuen Technik wurden die Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit der DNA Mikroarrays für Transkriptionsanalysen bei *N. meningitidis* untersucht. In den ersten Versuchen wurden hierfür RNA-Split Experimente durchgeführt. Die Mikroarrays wurden hergestellt, wie im Material & Methoden Teil beschrieben. Aus einer einzigen *N. meningitidis* Flüssigkultur, unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO₂ gewachsen, wurde in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm} = 0.5 / 5 \times 10^8$ CFU/ml) die RNA isoliert und in zwei gleiche Hälften geteilt.

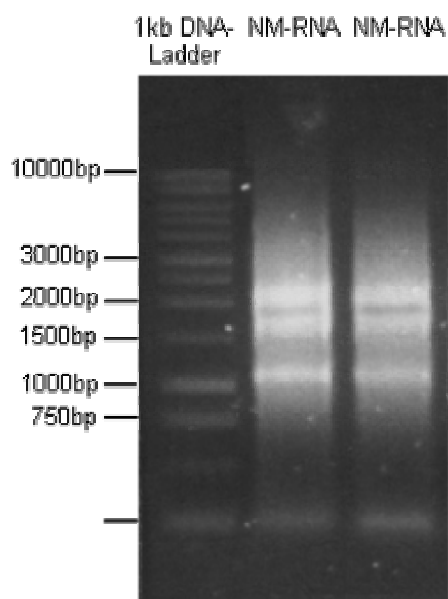


Abbildung 9. RNA-Isolation aus *Neisseria meningitidis*: Aus einer 10ml Flüssigkultur mit OD_{600nm} von 0,5 wurde unter Verwendung des Qiagen RNeasy midi kits die RNA isoliert, anschließend ein DNA-Verdau durchgeführt und letztlich wieder mit dem RNeasy Kit aufgereinigt. Von dem 500µl Eluat wurden jeweils 7,5µl aufs Gel aufgetragen.

Zu den beiden RNA-Hälften wurden *in vitro* Transkripte der vier *Saccharomyces* Gene in genau definierten Verhältnissen zugegeben und anschließend erfolgte eine getrennte reverse Transkription mit dem Einbau der Farbstoffe Cy3 bzw. Cy5.

	<i>in vitro</i> Transkript sacc 1	<i>in vitro</i> Transkript sacc 2	<i>in vitro</i> Transkript sacc 3	<i>in vitro</i> Transkript sacc 4
RT mit Cy3	3	1	1	1
RT mit Cy5	1	1	1	3

Tabelle 4. Zu den beiden geteilten RNA Hälften, die mit Cy3 bzw. Cy5 revers transkribiert wurden, wurden *in vitro* Transkripte der *Saccharomyces* Gene in genau definierten Verhältnissen zugegeben

Die synthetisierten cDNA-Sonden wurden anschließend wieder vereinigt und zusammen auf einen Mikroarray Slide zum Hybridisieren gegeben. Nach dem Hybridisieren wurden die Slides im Affymetrix 418™ Scanner mit den Wellenlängen von 532nm für Cy3 und 635nm für Cy5 eingelesen. Bei der Auswertung mit dem Softwarepaket ImaGene 4.0 konnten die fluoreszierenden Spots sehr gut vom Hintergrund abgegrenzt und damit auch ausgewertet werden. Die Fluoreszenzintensität des Hintergrundes war sehr niedrig. Die Fluoreszenzintensität des am schwächsten fluoreszierenden Spots war noch etwa doppelt so hoch wie die Fluoreszenzintensität des Hintergrundes. Dies zeigte, dass die RNA aus *N. meningitidis* nach der Isolation noch intakt war und erfolgreich in cDNA umgeschrieben werden konnte. Die eingesetzte Menge an RNA von 10µg war für die RT und die anschließende Hybridisierung der cDNA ausreichend. Die Protokolle aus Material & Methoden konnten für die weiteren Versuche unverändert eingesetzt werden.

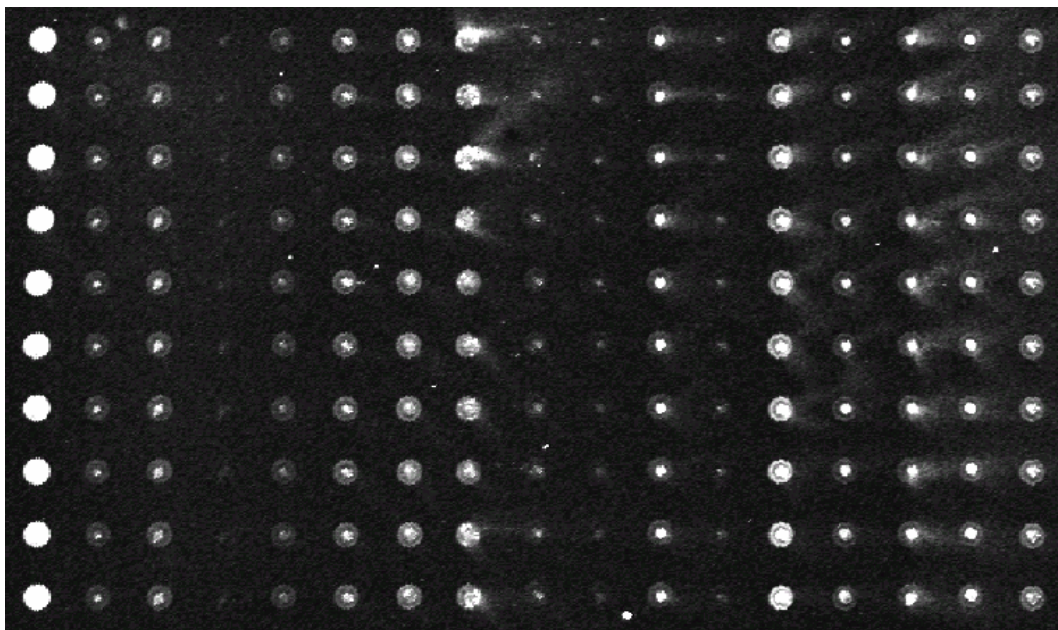


Abbildung 10. Eingesanntes Bild eines Ausschnittes eines DNA Mikroarray Bildes: Horizontal sind die verschiedenen NM PCR-Produkte, vertikal die 10 Replikas aufgespottet.

Das Programm ImaGene 4.0 bietet zur Auswertung verschiedene statistische Modi an, die in diesem Experiment miteinander verglichen wurden. Bei einem Spot, mit der Fläche X und der Fluoreszenz Y, kann das Programm den Mittelwert, den Medianwert und die Totalsumme der Fluoreszenz in der definierten Fläche messen. Für jedes Gen wurde anschließend das durchschnittliche Fluoreszenzverhältnis zwischen den beiden Fluoreszenzkanälen als Mittelwert aus den zehn repetitiven Spots ausgerechnet. Da bei diesem Versuchsaufbau die RNA aus einer einzigen Bakterienkultur gegeneinander ausgewertet wurde, sollte das Fluoreszenzverhältnis aller ORFs von *N. meningitidis* 1 : 1 betragen. Zusätzlich sollte erkennbar sein, dass die *Saccharomyces in vitro* Transkripte *sac1* und *sacc4* in den Verhältnissen 3:1 bzw 1:3, *sacc2* und *sacc3* im Verhältnissen 1:1 den ursprünglichen RNA Hälften zugegeben wurden. Über alle *N. meningitidis* ORFs gemittelt konnten folgende Ergebnisse gemessen werden:

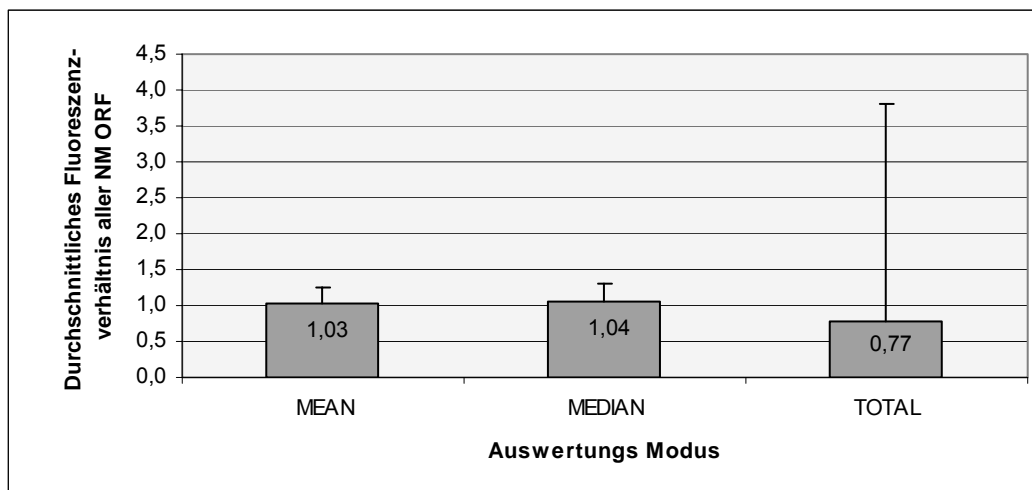


Diagramm 1. Abhängigkeit der Auswertungsqualität der NM Gene vom Rechenmodus: Bei dem RNA-Split Experiment wurde eine RNA-Probe in zwei Hälften geteilt und diese beiden Hälften in einem DNA Mikroarray Experiment miteinander verglichen. Der Erwartungswert für das Fluoreszenzverhältnis jedes ORFs und damit auch für den Mittelwert der Fluoreszenzverhältnisse aller ORFs ist daher gleich 1. Es werden hier die drei statistischen Auswertungsmöglichkeiten der Software ImaGene 4.0 miteinander verglichen, für jeden Spot entweder den Mittelwert, den Medianwert und den Totalwert der Fluoreszenz zu errechnen. Die Methoden Mittelwert und Medianwert lieferten mit 1,03 bzw. 1,04 bei einem Erwartungswert von 1,00 sehr gute Ergebnisse, die Standardabweichung war mit 0,23 bzw. 0,27 klein. Die Rechenmethode der Totalwerte war deutlich unterlegen.

Gleichzeitig zeigten sich bei den *Saccharomyces* Genen folgende Werte:

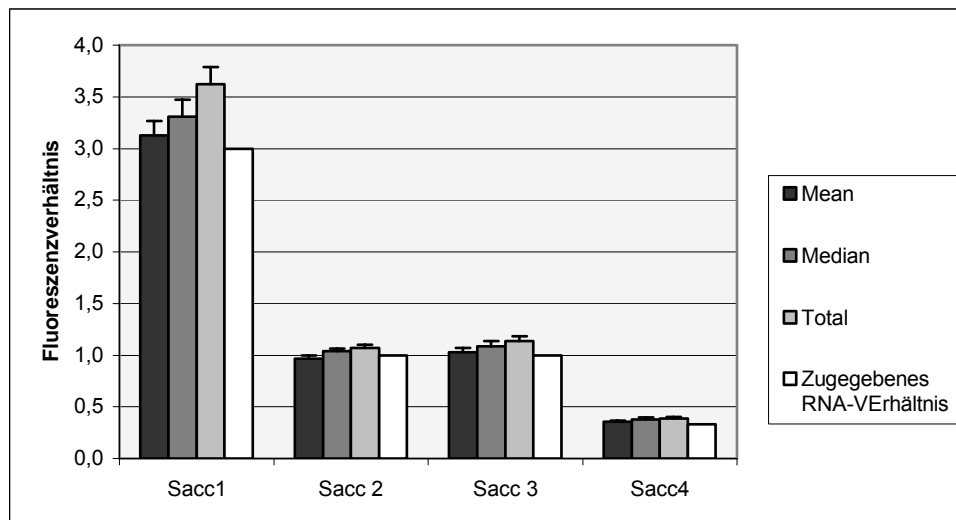


Diagramm 2. Abhängigkeit der Auswertungsqualität der *Saccharomyces* Gene vom Rechenmodus: Im gleichen RNA-Split Experiment wurden den beiden RNA Hälften vor der reversen Transkription noch *in vitro* Transkripte der *Saccharomyces* Gene in genau definierten Verhältnissen zugegeben. Wieder wurden die drei Auswertungsmodi miteinander verglichen, wobei hier alle drei Rechenmöglichkeiten sehr gute Werte ergaben: Die zugegebenen RNA-Verhältnisse wurden außerordentlich genau detektiert.

Während die beiden Modi Mean (durchschnittliches Fluoreszenzverhältnis aller ORFs: 1,03 bei einer Standardabweichung von 0,23) und Median (durchschnittliches Fluoreszenzverhältnis aller ORFs: 1,04 bei einer Standardabweichung von 0,27) das erwartete Fluoreszenzverhältnis von 1:1 über die ORFs von *N. meningitidis* sehr gut widerspiegeln, war dies bei der Auswertung der totalen Fluoreszenz nur mangelhaft (durchschnittliches Fluoreszenzverhältnis aller ORFs: 0,77 bei einer Standardabweichung von 3,05). Die zugegebenen *Saccharomyces in vitro* Transkripte wurden in den unterschiedlichen Verhältnissen von allen drei Modi sicher erkannt. Für die weiteren Versuche wurde aufgrund der besseren Ergebnisse in diesem RNA-Split Experiment der Modus Mean gewählt.

Der Unterschied zwischen den Transkriptionsprofilen von zwei *N. meningitidis* RNA-Proben, die in einem DNA Mikroarray Experiment miteinander verglichen werden, lässt sich sehr gut an den Scatterplot Darstellungen aus der Auswertungssoftware ImaGene 4.0 demonstrieren. In den Scatterplots werden alle ORFs mit den jeweils zehn Wiederholungen je Gen (zehn Spots pro Gen auf einem Slide) in ein Koordinatensystem eingetragen: Die Fluoreszenzintensität der Standardkultur auf der X-Achse und die Fluoreszenzintensität der experimentellen Kultur auf der Y-Achse. Alle Spots, die auf der Ausgleichsgeraden liegen, sind in ihrer Expression unverändert und haben damit ein

Fluoreszenzverhältnis von eins. Alle ORFs oberhalb der Geraden haben ein Fluoreszenzverhältnis größer als 1, alle ORFs unterhalb der Geraden haben ein Fluoreszenzverhältnis kleiner als 1. Wie bei dem Scatterplot des RNA-Split Experimentes (nur die NM ORFs sind dargestellt) klar zu erkennen, liegen alle ORFs auf oder zumindest knapp neben der Geraden mit dem Fluoreszenzverhältnis 1 : 1.

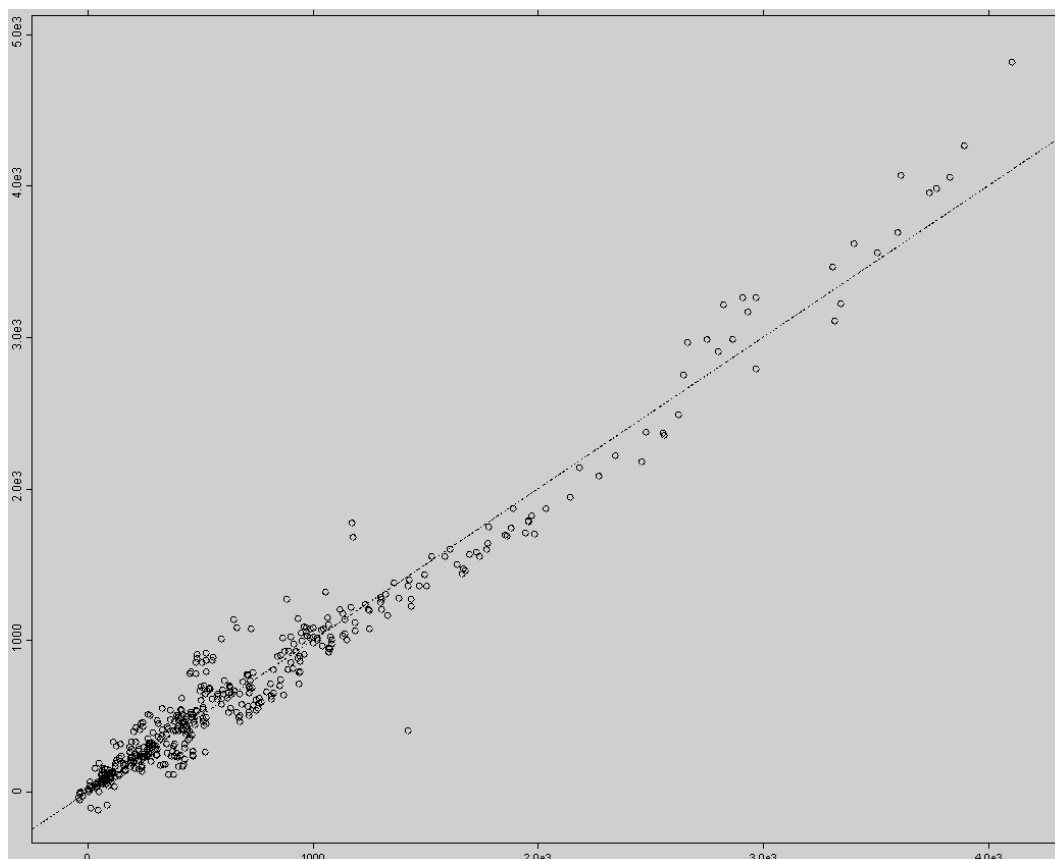


Abbildung 11. Die Ergebnisse des DNA Mikroarray Experimentes können im Scatterplot der Auswertungssoftware ImaGene 4.0 übersichtlich visualisiert werden. Jeder Punkt auf dem Scatterplot entspricht der Auswertung eines Spots auf dem Slide. Aufgetragen werden die Fluoreszenzintensität der Standardkultur auf der X-Achse und die Fluoreszenzintensität der experimentellen Kultur auf der Y-Achse. Die Ausgleichsgerade symbolisiert ein Fluoreszenzverhältnis von 1. Der Scatterplot für das RNA-Split Experiment zeigt hier deutlich, dass alle Spots nahe oder auf der Ausgleichsgeraden liegen, und damit ein Fluoreszenzverhältnis von ca. 1 haben.

Weiterhin wurde in diesem RNA-Split Versuch der Frage nachgegangen, welchen Einfluss die Fluoreszenzintensität eines Spots auf die Auswertung hat, ob sich z.B. stark fluoreszierende Spots besser auswerten lassen als schwache. Hierfür wurden die ORFs in vier Cluster unterteilt. Kriterium für diese Einteilung war die mittlere Fluoreszenzintensität über die zehn Replikate; die ORFs in Cluster #1 zeigten die niedrigste Fluoreszenzintensität, die ORFs in Cluster #4 zeigten die höchste

Fluoreszenzintensität. Es wurden die durchschnittlichen Fluoreszenzverhältnisse der ORFs innerhalb der vier Cluster und deren Standardabweichung berechnet:

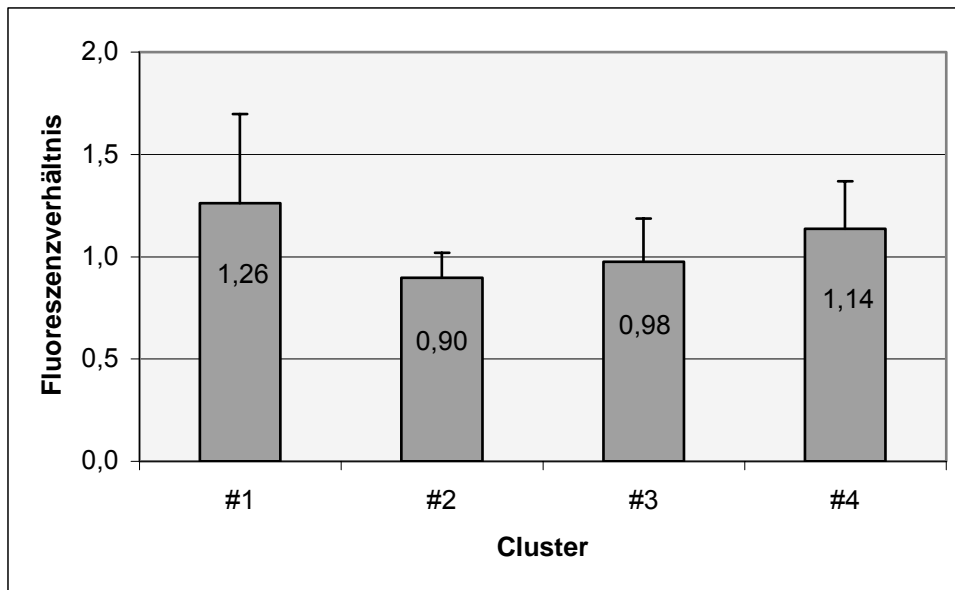


Diagramm 3. Einfluss der absoluten Fluoreszenzintensität auf die Qualität der Auswertung: Anhand des RNA-Split Experimentes wurde untersucht, ob die absolute Fluoreszenzintensität eines Spots einen Einfluss auf die Qualität der Auswertung hat. Die Spots wurden hierfür in vier Cluster unterteilt, in Cluster #1 sind die Spots mit der geringsten, in Cluster #4 die Spots mit der höchsten Fluoreszenzintensität. Aufgetragen sind hier das gemittelte Fluoreszenzverhältnis und die Standardabweichung der Fluoreszenzverhältnisse innerhalb der Cluster. Außer bei Cluster #1 sind die Werte nahe dem Erwartungswert von 1,0, bei jeweils geringer Standardabweichung. Der Wert von Cluster #1 wird aber durch die Spots eines ORFs verfälscht, die vom Hintergrund nur schwer abzugrenzen waren und damit auch nicht sicher ausgewertet werden konnten.

Während die Cluster #2, #3 und #4 Fluoreszenzverhältnisse nahe von 1,0 und nur geringe Standardabweichungen (#2: 0,12; #3: 0,21; #4: 0,23) zeigten, waren die Werte für Cluster #1 mit der niedrigsten Fluoreszenzintensität am schlechtesten (Mw: 1,26; Stabw: 0,43). Dies war aber zum großen Teil auf den ORF mit der geringsten Fluoreszenzintensität (NM 835) zurückzuführen, dessen Werte weit vom Erwartungswert abwichen (durchschnittliches Fluoreszenzverhältnis von 2,68; Standardabweichung der Fluoreszenzverhältnisse von 5,88). Ohne diesen Wert läge die durchschnittliche Fluoreszenzintensität in Cluster #1 bei 1,16 mit einer Stabw von 0,20. Weiterhin wurde untersucht, ob sich bei ORFs mit geringer Fluoreszenzintensität die Fluoreszenzverhältnisse innerhalb der zehn Replikate stärker unterscheiden als bei hoher Fluoreszenzintensität. Es wurden hierfür die Standardabweichungen der Fluoreszenzverhältnisse innerhalb der 10 Replikate für jedes ORF errechnet, und die Ergebnisse wieder für jedes der vier Cluster gemittelt:

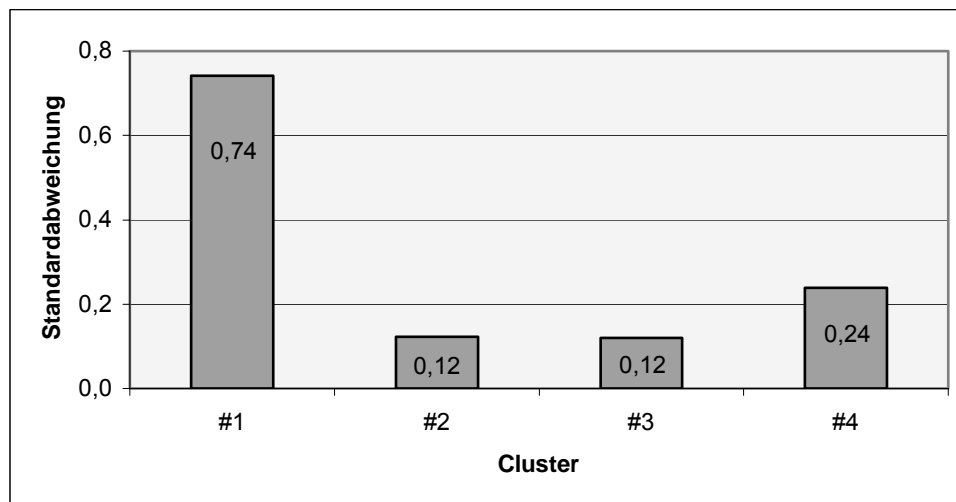


Diagramm 4. Einfluss der absoluten Fluoreszenzintensität auf die Stabw der Fluoreszenzverhältnisse innerhalb der 10er Replikate je ORF: Um zu sehen, ob die absolute Fluoreszenzintensität der Spots einen Einfluss darauf hat, wie stark sich die Fluoreszenzverhältnisse innerhalb der 10 Replikate je ORF unterscheiden, wurden hier die Standardabweichungen der Fluoreszenzverhältnisse der 10 Replikate für jedes der vier Cluster gemittelt. Während sich bei den Clustern #2 bis #4, also bei den Clustern mit höherer Fluoreszenzintensität, die Fluoreszenzverhältnisse innerhalb der 10 Replikate je ORF nur gering unterschieden, zeigte Cluster #1 (geringste absolute Fluoreszenzintensität) eine hohe mittlere Standardabweichung der 10 Replikate.

Die Fluoreszenzverhältnisse der zehn Replikate pro ORF zeigten in den Clustern #2, #3 und #4 nur geringe Standardabweichungen. In Cluster #1 hingegen war die durchschnittliche Standardabweichung der Fluoreszenzverhältnisse in den 10er Replikaten mehr als viermal größer als in den übrigen Clustern. Selbst wenn hier aber wieder der ORF mit der geringsten Fluoreszenzintensität NM 835 aus der Rechnung genommen würde, wäre die Standardabweichung mit 0,38 immer noch deutlich höher als bei den Clustern mit höherer Fluoreszenzintensität.

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass bei diesem Experiment auch diejenigen ORFs sicher ausgewertet werden konnten, die nur eine geringe absolute Fluoreszenzintensität zeigten. Allerdings zeigte die hohe Standardabweichung der Fluoreszenzverhältnisse innerhalb der 10 Replikate bei diesen schwach fluoreszierenden Spots, dass ein einzelner Spot je ORF nicht ausreichend wäre. Für die weiteren Experimente wurde daher das Arraydesign mit 10 Replikaten je ORF beibehalten.

3.4.2 Reproduzierbarkeit von Wachstum und RNA-Isolation aus *N. meningitidis*

Ein zweiter wichtiger Parameter für die Qualität der DNA-Mikroarrays ist die Reproduzierbarkeit der Kulturbedingungen von *N. meningitidis* und der RNA-Isolation. In einem zweiten Set an Experimenten wurden *N. meningitidis* Flüssigkulturen an drei verschiedenen Tagen unter identischen Standardbedingungen angelegt und diese dann mittels DNA Mikroarrays gegeneinander ausgewertet. Die RNA wurde jeweils in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm} = 0,5$) isoliert. Mit den drei RNA Proben wurden drei DNA Mikroarray Hybridisierungen durchgeführt.

	RT mit Cy3	RT mit Cy5
Hybridisierung 1	RNA aus Kultur von Tag 1	RNA aus Kultur von Tag 2
Hybridisierung 2	RNA aus Kultur von Tag 1	RNA aus Kultur von Tag 3
Hybridisierung 3	RNA aus Kultur von Tag 2	RNA aus Kultur von Tag 3

Tabelle 5. Schema der DNA-Mikroarray Hybridisierungen mit den an drei verschiedenen Tagen isolierten RNA-Proben

Es sollte untersucht werden, ob *N. meningitidis* unter den Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂-Gehalt, in mittlerer logarithmischer Wachstumsphase) immer ein reproduzierbares Transkriptionsprofil zeigt und eine solche Kultur somit als Standard gegen Kulturen unter experimentellen Bedingungen, zum Beispiel Hitzeschock, herangezogen werden kann. Wie bei dem RNA-Split auch sollte das Fluoreszenzverhältnis aller ORFs von *N. meningitidis* 1 : 1 betragen, da die Kulturen unter identischen Standardbedingungen gewachsen waren und die anschließende RNA-Isolation ebenfalls standardisiert ist. Errechnet wurde der Mittelwert und die Standardabweichungen der Fluoreszenzverhältnisse über alle *N. meningitidis* ORFs. Mittels dieser Standardabweichungen sollte ein Konfidenzintervall definiert werden, innerhalb dessen mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens X% davon ausgegangen werden konnte, dass sich die Fluoreszenzintensitäten eines ORFs von zwei verschiedenen Proben nicht signifikant von einander unterscheiden. Wenn dagegen das Fluoreszenzverhältnis außerhalb dieses Konfidenzintervalles liegt, dann muss davon ausgegangen werden, dass die beiden Fluoreszenzintensitäten nicht identisch sind, sich also signifikant unterscheiden. Als Signifikanzniveau wurde eine Wahrscheinlichkeit von mindestens

99% gewählt. Das Signifikanzniveau wurde hier bewusst hoch angesetzt, um die Zahl der falsch Positiven möglichst klein zu halten. Die Gefahr, richtig positive nicht zu erkennen, wird dadurch zwar größer, allerdings ist die biologische Aussagekraft eines solchen knapp positiven Wertes immer fraglich und auch nur schwer mit einer anderen Methode zu beweisen. Auf Kosten der Sensitivität wurde der Spezifität eine etwas höhere Bedeutung zugemessen.

ImaGene 4.0 lieferte bei der Auswertung die Fluoreszenzverhältnisse in folgender Form: Bei Fluoreszenzverhältnissen größer als 1 ist die Fluoreszenzintensität der experimentellen Probe im Zähler des Bruches größer als die Fluoreszenzintensität der Standardprobe im Nenner, bei Ergebnissen kleiner als 1 umgekehrt. Diese Werte konnten für die Berechnung des Konfidenzintervalles mittels der Standardabweichungen so nicht verwendet werden, sondern es musste der Logarithmus der Fluoreszenzverhältnisse gebildet werden. Bei Verwendung des Logarithmus mit der Basis 2 ergibt sich bei nachstehenden fiktiven Zahlen folgende Rechenergebnisse:

Fluoreszenzverhältnis (Fv)	1:1= 1	2:1= 2	4:1= 4	1:2= 0,5	1:4= 0,25
log₂(Fv)	0	1	2	-1	-2

Tabelle 6. Beziehung zwischen dem Fluoreszenzverhältnis (Fv), wie es die Auswertungssoftware ImaGene 4.0 als Endergebnis ausgibt, und dem log₂(Fv).

Die Auswertung der drei DNA Mikroarray Hybridisierungen zeigte folgende Ergebnisse in Tabelle 7. Es wurde für jede Hybridisierung einzeln der Mittelwert der Fluoreszenzverhältnisse über alle *N. meningitidis* ORFs [Mw log₂(F_{VORF})] und deren Standardabweichung [Stabw log₂(F_{VORF})] berechnet:

	Mw log₂(F_{VORF})	Stabw log₂(F_{VORF})
Hybridisierung 1	0,04	0,55
Hybridisierung 2	-0,04	0,39
Hybridisierung 3	0,01	0,39

Tabelle 7. Auswertung der drei DNA Mikroarray Hybridisierungen: In jeder Hybridisierung wurde zuerst für jeden ORF der log₂(F_{VORF}) errechnet und daraus der Mittelwert (Mw) und die Standardabweichung (Stabw) über alle ORFs der jeweiligen Hybridisierung.

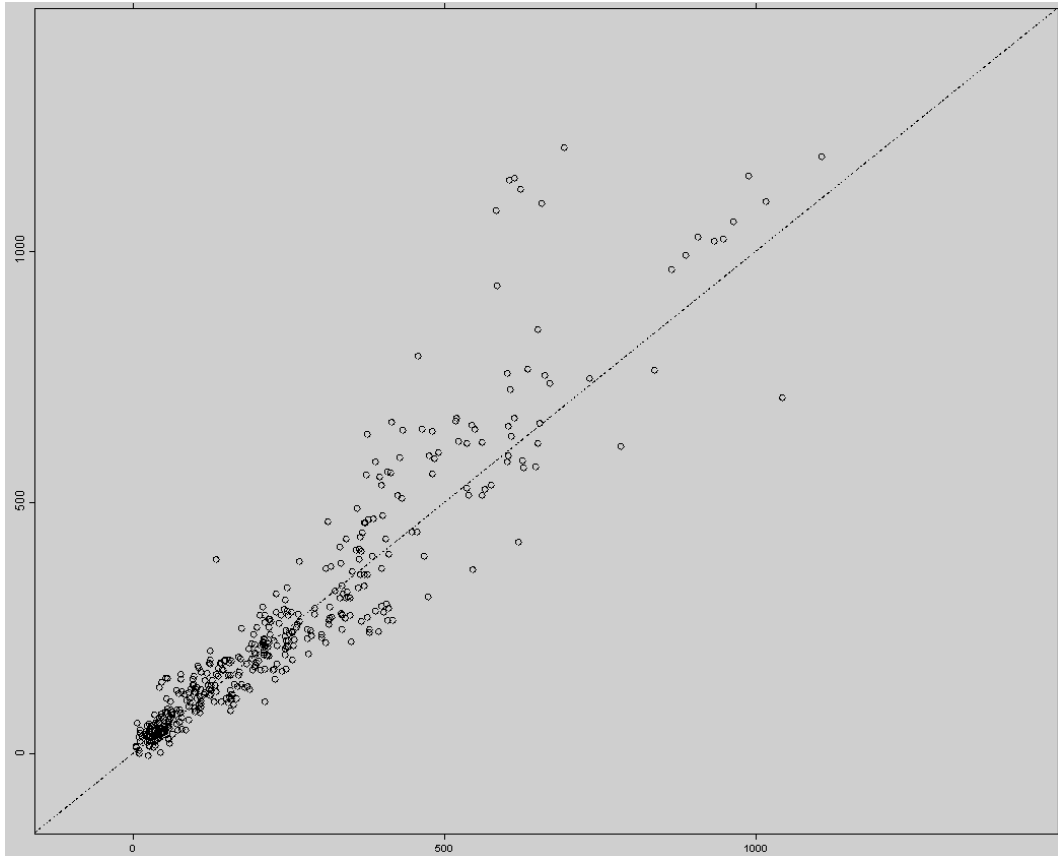


Abbildung 12. Scatterplot der Hybridisierung, bei der die RNA aus der Kultur von Tag 1 mit der RNA aus der Kultur von Tag 2 verglichen wurde.

Die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzverhältnisse (im logarithmischen Maßstab) für jedes ORF über alle drei Experimente zeigte die erwartete Normalverteilung um den Erwartungswert 0.

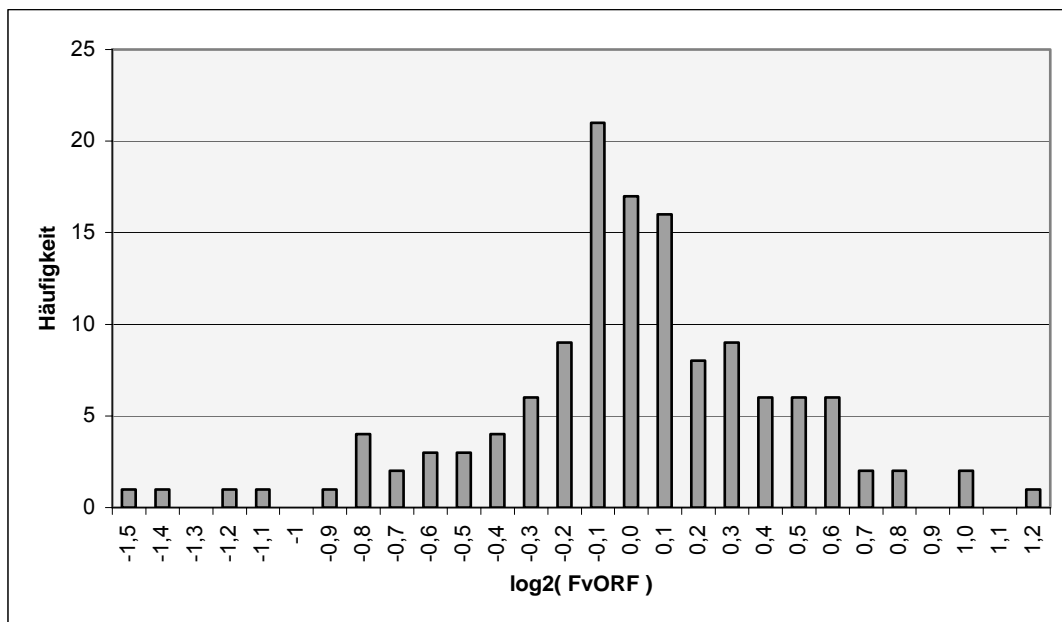


Diagramm 5. Häufigkeitsverteilung von $\log_2(Fv_{ORF})$ für alle ORFs aus den drei Hybridisierungen: In dieser Häufigkeitsverteilung sind die $\log_2(Fv_{ORF})$ aller ORFs aus allen drei Hybridisierungen jeweils einzeln eingeflossen. Die Häufigkeitsverteilung ähnelt einer Normalverteilung um den Erwartungswert 0.

Der Mittelwert über die Standardabweichungen der Fluoreszenzverhältnisse betrug 0,44 bei den drei Hybridisierungen. Bei einem Signifikanzniveau von 99% ist in einer Normalverteilung das Konfidenzintervall mit der 2,58 fachen Standardabweichung um den Erwartungswert definiert. Da der Erwartungswert eines nicht deregulierten ORFs immer bei 0 (entspricht dem Fluoreszenzverhältnis 1:1=1) liegt, war das Konfidenzintervall hier -1,14 bis +1,14. Dieser Wert musste nun noch aus dem logarithmischen System rückgerechnet werden ($y = 2^x$), so dass sich letztlich folgende Zahlen für dieses Experimentaldesign ergaben: Wenn ein ORF ein Fluoreszenzverhältnis zwischen 0,45 bis 2,20 zeigt, so ist dieser ORF auf einem Signifikanzniveau von 99% nicht dereguliert. Wenn ein ORF ein Fluoreszenzverhältnis außerhalb dieses Bereichs hat, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass er nicht dereguliert ist kleiner als 1%. Bei den folgenden Berechnungen wurden die drei Hybridisierungen nicht mehr als getrennte Experimente angesehen, sondern als Wiederholungen eines Experimentes. Für jeden ORF wurde hierfür der Mittelwert der Fluoreszenzverhältnisse aus den getrennten Hybridisierungen errechnet.

Zuerst wurden je zwei Hybridisierungen als ein Experiment gewertet. Es wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

	Hybridisierungen 1	Hybridisierungen 2	Hybridisierungen 3
Berechnung 1	X	X	
Berechnung 2	X		X
Berechnung 3		X	X

Tabelle 8. In den Berechnungen eins, zwei und drei wurden die drei Hybridisierungen nicht als drei getrennte Versuche gewertet, sondern jeweils zwei Hybridisierungen als Wiederholungen eines Experimentes. Dabei wurden nach dem obigen Schema die Mittelwerte aus je zwei Hybridisierungen berechnet. „Berechnung 1“ z.B. simuliert ein Experiment mit den beiden Wiederholungen „Hybridisierungen 1“ und „Hybridisierungen 2“.

Für jedes ORF wurde der Mittelwert der Fluoreszenzverhältnisse (im \log_2) aus beiden Hybridisierung berechnet, bei „Berechnung 1“ also der Mittelwert aus „Hybridisierungen 1“ und „Hybridisierungen 2“, und daraus anschließend für jede Berechnung einzeln das durchschnittliche Fluoreszenzverhältnis (im \log_2) über alle ORFs und dessen Standardabweichung:

	Mw $\log_2(FV_{ORF})$	Stabw $\log_2(FV_{ORF})$
Berechnung 1	0,02	0,37
Berechnung 2	0,04	0,40
Berechnung 3	0,01	0,25

Tabelle 9. Ergebnisse der Berechnungen, die jeweils zwei Hybridisierungen als Wiederholungen eines Experimentes werten.

Gemittelt über die drei Berechnungen betrug die durchschnittliche Standardabweichung bei zwei Wiederholungen des Versuches pro Experiment nur noch 0,34 im Gegensatz zu 0,44 bei einer Wiederholung pro Experiment. Mit dieser Standardabweichung von 0,34 konnte das Konfidenzintervall bei zwei Wiederholungen pro Experiment auf 0,5 bis 2,01 eingengt werden, bei gleichem Signifikanzniveau von 99 %.

Im letzten Schritt wurden alle drei Hybridisierungen als Wiederholungen eines einzelnen Versuches angesehen. Wieder wurde für jeden ORF der Durchschnitt der Fluoreszenzverhältnisse aus den drei Hybridisierungen errechnet. Es zeigte sich folgende Häufigkeitsverteilung von $\log_2(FV_{ORF})$:

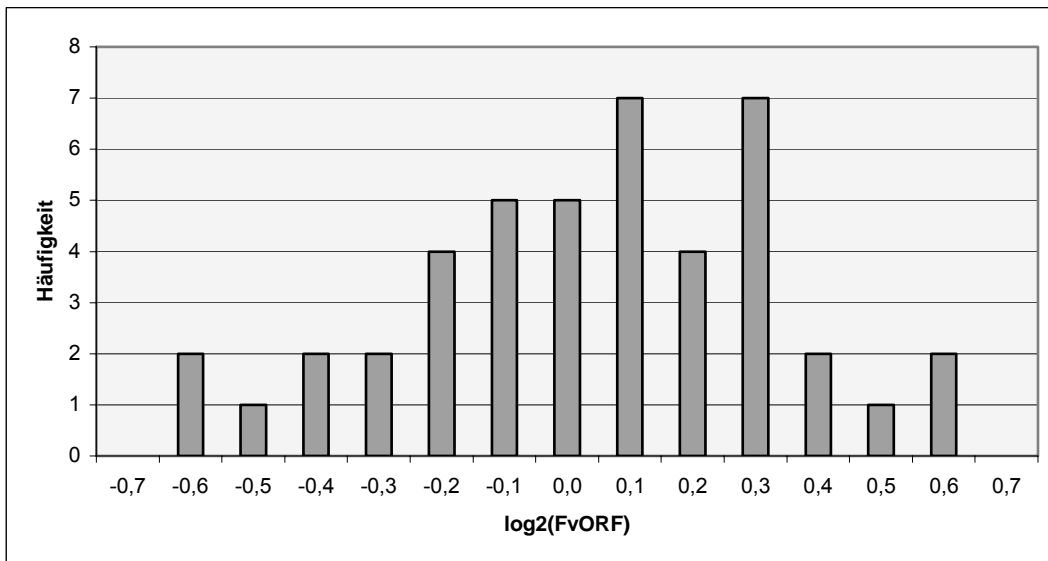


Diagramm 6. Häufigkeitsverteilung von $\log_2(FV_{ORF})$ bei drei Wiederholungen pro Experiment: Bei dem Versuchsdesign, das aus allen drei Hybridisierungen die Durchschnittswerte bildete, die drei Hybridisierungen also als Wiederholungen eines Experimentes wertete, zeigte sich folgende Häufigkeitsverteilung, die wiederum einer Normalverteilung entsprach.

Bei einem Mittelwert der $\log_2(FV_{ORF})$ über alle drei Hybridisierungen von 0,04, also wieder fast dem Erwartungswert von 0 (entspricht dem Fluoreszenzverhältnis von 1:1), betrug die Standardabweichung 0,29. Durch die Wiederholungen der Versuche in einem Experiment und eine anschließende statistische Auswertung ließ sich also die Standardabweichung von 0,44 für eine Wiederholung über 0,34 für zwei Wiederholungen auf schließlich 0,29 bei drei Wiederholungen senken.

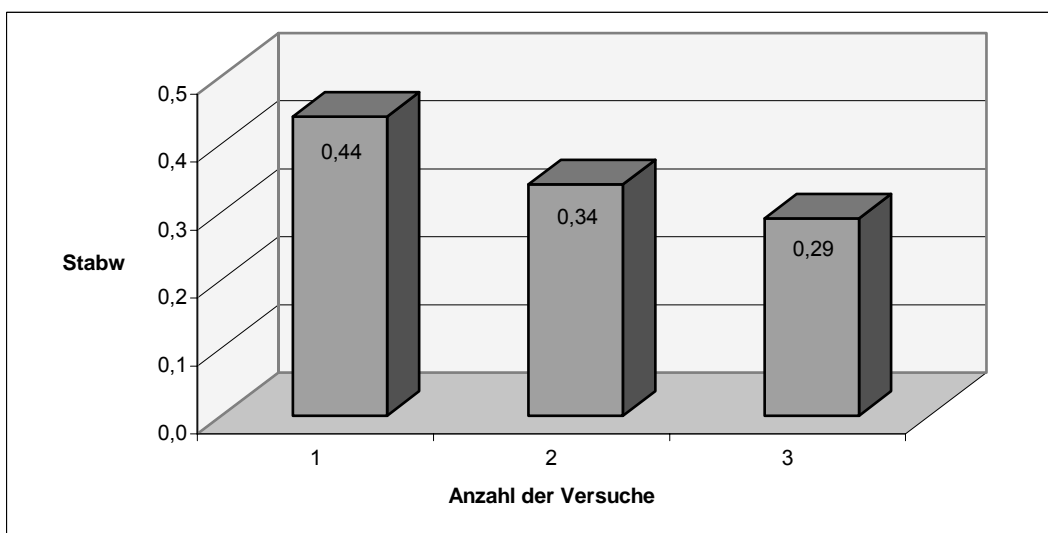


Diagramm 7. Abhängigkeit der Stabw von der Anzahl der Versuche pro Experiment: Wie im Diagramm zu sehen konnte durch einfaches Wiederholen des Experimentes die Standardabweichung über die Fluoreszenzverhältnisse aller 59 NM ORFs von 0,44 bei einer Wiederholung, über 0,34 bei zwei Wiederholungen, auf schließlich 0,29 bei drei Wiederholungen gesenkt werden.

Diese Senkung der Standardabweichung auf 0,29 war natürlich wieder verbunden mit einer Einengung des Konfidenzintervalles auf 0,6 bis 1,7 bei gleich gebliebenem Signifikanzniveau von 99%. Einer Absenkung der Standardabweichung bzw. Einengung des Konfidenzintervalles folgt eine Verbesserung sowohl der Sensitivität als auch der Spezifität. Für alle weiteren Versuche wurde bei mindestens zwei Wiederholungen eines Versuches pro Experiment und einem Signifikanzniveau von mindestens 99% ein Konfidenzintervall von 0,5–2,0 definiert. Bei drei Wiederholungen pro Experiment entspricht dieses Konfidenzintervall einem Signifikanzniveau von 99,9%. Alle ORFs mit einem Fluoreszenzverhältnis außerhalb dieses Bereiches werden als dereguliert gewertet.

3.5 Analyse der Hitzeschock-Antwort bei *N. meningitidis* mit DNA Mikroarrays

Nach Überprüfung von Sensitivität und Spezifität der DNA Mikroarray Technologie konnte in den nächsten Experimenten die Hitzeschock-Reaktion von *N. meningitidis* untersucht werden.

Auf die DNA Mikroarray Slides waren alle 59 amplifizierten PCR-Produkte der NM ORFs zusammen mit den PCR-Produkten der vier internen Standards, den *Saccharomyces* Genen, und einer Probe genomischer DNA aufgespottet worden. Die Meningokokken wurden in PPM+ Flüssigkultur bei konstanten 37°C bis zum Erreichen der mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm} = 0,5$) kultiviert und dann in zwei Kulturen gleicher Volumina geteilt. Während die eine Kultur (HS+) für 6min einer Temperatur von 43,5°C ausgesetzt wurde, verblieb die Kontrolle (HS-) bei 37°C. Aus beiden Kulturen wurde 15min nach Beginn dieses Hitzeschocks getrennt die RNA isoliert. Die RNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben, wobei die beiden Sonden mit den Farbstoffen Cy3 bzw. Cy5 verschieden markiert wurden. Vor der RT wurden der RNA wieder *in vitro* Transkripte der *Saccharomyces* Gene in folgenden Verhältnissen zugesetzt:

	Sacc1	Sacc2	Sacc3	Sacc4
HS +	1	3	1	1
HS -	1	1	3	1

Tabelle 10. Als interne Standards wurden den beiden RNA-Proben, HS+ und HS-, die vier *in vitro* Transkripte der *Saccharomyces* Gene in obigen Verhältnissen zugesetzt.

Beide Sonden wurden schließlich wieder vereinigt und zusammen auf einen Mikroarray Slide gegeben. Dieses Experiment wurde insgesamt dreimal mit identischem Procedere durchgeführt. Dabei wurden die Versuche von Beginn an getrennt durchgeführt, es wurden also drei getrennte Kulturen angelegt, die auch getrennt weiterverarbeitet wurden. Die Daten der drei einzelnen Versuche wurden statistisch zusammen als Wiederholungen des einen Experimentes „Hitzeschock bei 43,5°C“ ausgewertet. Alle *N. meningitidis* ORFs mit einem Fluoreszenzverhältnis außerhalb 0,5 bis 2,0 wurden auf einem Signifikanzniveau von 99,9% als dereguliert gewertet.

Das durchschnittliche Fluoreszenzverhältnis der *N. meningitidis* ORFs betrug 1,19 bei einer Standardabweichung von 0,94. Die hohe Standardabweichung zeigte an, dass die Fluoreszenzverhältnisse vieler ORFs vom Erwartungswert 1 abwichen, sich die beiden verglichenen RNA-Proben also deutlich unterschieden. Auch die optische Auswertung mittels Scatterplot wies auf eine stärkere Veränderung des Transkriptionsprofils hin.

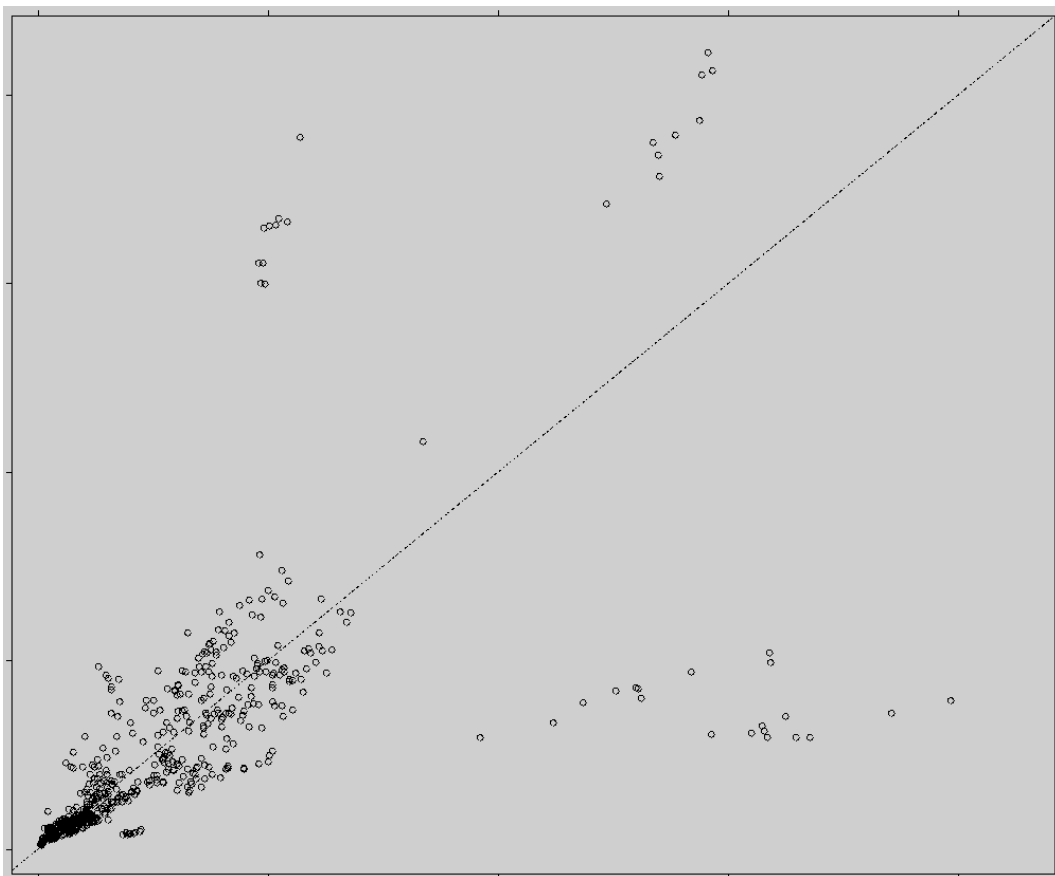


Abbildung 13. Scatterplot des DNA Mikroarray Experimentes, bei dem eine Standardkultur mit einer Kultur verglichen wurde, die für 6min einem Hitzeschock von 43,5°C ausgesetzt war. Im Gegensatz zu den Versuchen zur Standardisierung der DNA Mikroarrays ist hier auffällig, dass einige Spots, einige ORFs, deutlich von der Ausgleichsgeraden abweichen.

Zuerst wurde mittels der beigefügten internen Standards, der *in vitro* Transkripte der *Saccharomyces* Gene, die Qualität dieses Versuches kontrolliert. Über der genomischen DNA wurde ein Fluoreszenzverhältnis von ca. 1:1 erwartet.

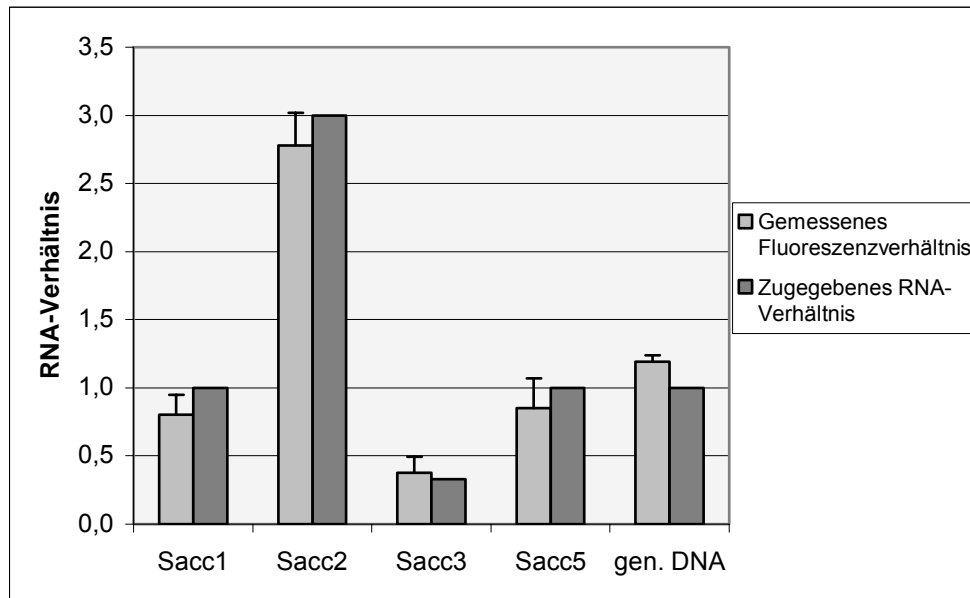


Diagramm 8. Qualitätskontrolle des Hitzeschock-Versuches mit 43,5°C: Bei allen internen Standards zur Qualitätskontrolle lagen die gemessenen Fluoreszenzverhältnisse sehr nahe an dem Erwartungswert.

Die Verhältnisse der zugegebenen *in vitro* Transkripte der internen Standards konnten in diesem Versuch sehr gut wiedergefunden werden. Sowohl deregulierte als auch nicht deregulierte ORFs sollten in diesem Experiment sicher erkannt werden können.

Von den 59 *N. meningitidis* ORFs zeigten 54 (92%) ein Fluoreszenzverhältnis innerhalb des Konfidenzintervalles von 0,5 bis 2,0, wohingegen bei zwei ORFs (3%) ein Fluoreszenzverhältnis von kleiner als 0,5 gemessen werden konnte. Bei drei ORFs (5%) lag das Fluoreszenzverhältnis über der Grenze von 2,0. Die drei hochregulierten Gene stammen aus der Kategorie der Hitzeschock-Gene, im Einzelnen waren dies die Chaperon kodierenden ORFs *groEL/groES* (NM 1972 / NM 1973) und *dnaK* (NM 0554).

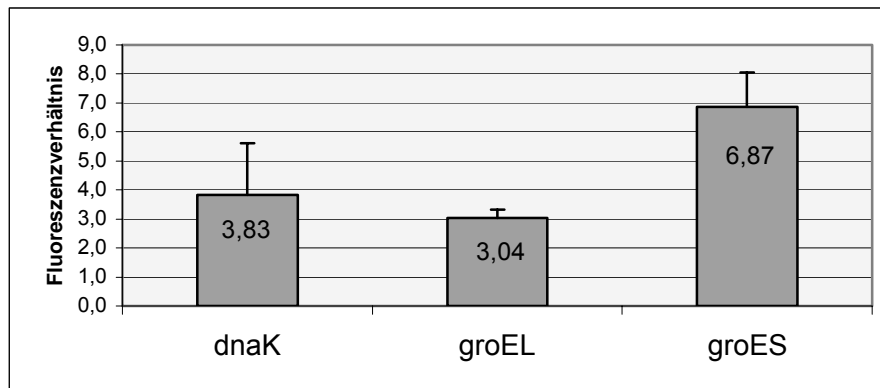


Diagramm 9. Hochregulierte ORFs bei einem Hitzeschock von 43,5°C: Bei dem Hitzeschock von 43,5°C wurden unter den 59 NM ORFs drei Gene mit einem Fluoreszenzverhältnis über dem Grenzwert von 2,0 gefunden, die Chaperone *groEL/groES* (NM 1972/NM 1973) und *dnaK* (NM 0554).

Die übrigen ORFs aus der Kategorie der Hitzeschock-Gene, darunter *dnaJ* und die beiden Sigmafaktoren *rpoD* und *rpoH* zeigten keine signifikante Deregulation.

Die ORFs mit einem Fluoreszenzverhältnis kleiner als 0,5 sind an der Aufnahme freier DNA ins Bakterium, am Prozess der Transformation, beteiligt (*pilO*; NM 1810) beziehungsweise im Energie Metabolismus aktiv (F1 Subunit der ATP Synthase; *atpA*; NM 1936).

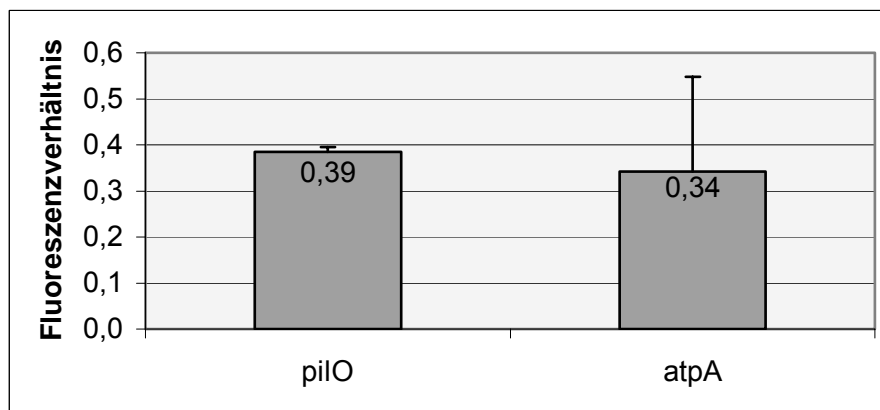


Diagramm 10. Herunterregulierte ORFs bei einem Hitzeschock von 43,5°C: Bei dem Hitzeschock von 43,5°C wurde die Transkription zweier Gene signifikant reduziert. Dies waren *pilO* (NM 1810) und *atpA* (NM 1936).

3.6 Bestätigung der DNA Mikroarray-Experimente mit RT-PCR

Da die Daten des Hitzeschock-Experimentes mit der neuen Technik, den DNA Mikroarrays, gewonnen wurden, war es nötig, sie mit einer unabhängigen, etablierten Methode zu verifizieren. Es wurde die semiquantitative RT-PCR ausgewählt. Bestätigt werden sollten sowohl zwei ORFs, die keine Deregulation auf den DNA Mikroarrays zeigten [NM 1341 (*pdhA*) und NM 0207 (*gapA-I*)], als auch zwei ORFs mit einem

Fluoreszenzverhältnis außerhalb des Konfidenzintervalls [NM 0554 (*dnaK*) und 1973 (*groES*)]. Aus der RNA des vorherigen Hitzeschock-Experimentes, HS⁺ und HS⁻, wurde je ein 1 µg zur reversen Transkription nach Protokoll eingesetzt. Zu den beiden RNA-Proben war vorher wieder ein *Saccharomyces in vitro* Transkript *sacc1* im Verhältnis 1:4 zugegeben worden. Im zweiten Schritt der RT-PCR wurde die synthetisierte cDNA als Template für PCR-Reaktionen eingesetzt. Mit identischen Mengen an Template wurden die vier zu bestätigenden ORFs und zusätzlich das *Saccharomyces in vitro* Transkript mittels PCR amplifiziert: 18, 20, 22 und 24 Reaktionszyklen wurden jeweils durchgeführt. Bei jedem Reaktionszyklus der PCR sollte im exponentiellen Teil der Reaktion die DNA-Menge verdoppelt werden. Identische Mengen an PCR-Produkt aus den insgesamt acht Reaktionsansätzen pro ORF wurden auf ein Agarosegel aufgetragen. Durch Vergleich der Bandenstärken bei den verschiedenen Zyklenanzahlen konnte semiquantitativ auf den relativen Mengenunterschied der synthetisierten DNA und damit der cDNA Template-Menge zwischen HS⁺ und HS⁻ geschlossen werden. Diese wiederum erlaubte den Rückschluss auf das ursprüngliche mRNA Mengenverhältnis in den HS⁺ und HS⁻ RNA Proben.

Zu Abbildungen 14-17: Semiquantitative RT-PCR von NM 1973, 0554, 0207 und 1341

Bahn 1: 1kb DNA-Ladder

Bahn 2: positiv Kontrolle (NM genomische DNA als Template)

Bahn 3: negativ Kontrolle (Wasser als Template)

Bahn 4 bis 11: identische Mengen an cDNA, sowohl von HS⁺ als auch HS⁻, wurden als Template für PCR-Reaktionen bei jeweils 18, 20, 22, und 24 Zyklen eingesetzt. Bei der PCR-Amplifikation kommt es während jedem Zyklus zur Verdopplung der DNA Synthese Produkte. Im Anschluss an die Amplifikation wurden jeweils identische Mengen aller PCR-Produkte, 10 µl des 50 µl PCR-Ansatzes, auf ein Gel aufgetragen.

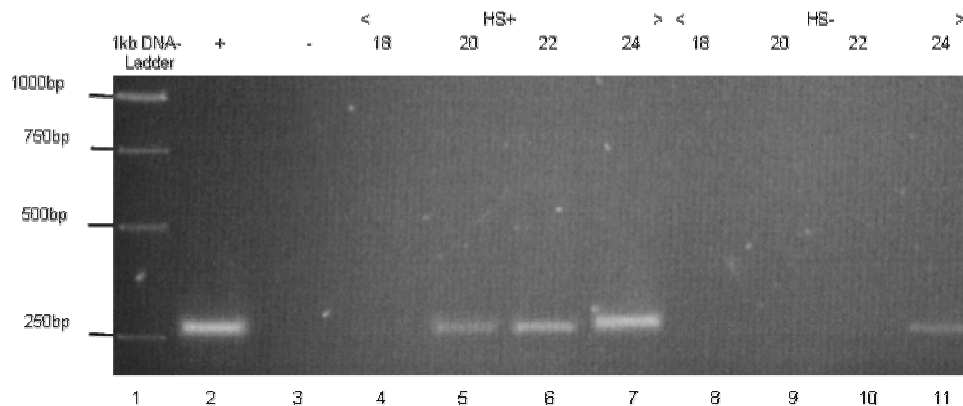


Abbildung 14. RT-PCR von NM 1973: Bei HS⁺ war nach 20 Zyklen, bei HS⁻ erst nach 24 Zyklen die erste Bande zu erkennen. Die Banden auf Bahn 5 und Bahn 11 zeigten gleiche Intensität auf dem Gel. In den ursprünglich isolierten RNA-Proben sollte daher in der HS⁺ Probe ca. 8-mal mehr NM 1973 mRNA vorhanden gewesen sein wie in der HS⁻ Probe.

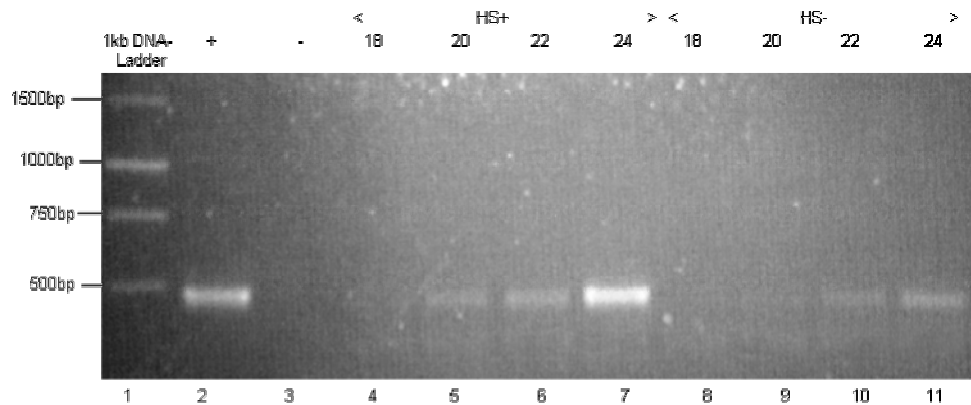


Abbildung 15. RT-PCR von NM 0554: Während sich bei HS+ bereits nach 20 Zyklen die erste Bande zeigte, erschien sie bei HS- erst nach 22 Zyklen, die Banden der Bahnen 5 und 6 bei HS+ entsprechen den Banden der Bahnen 10 und 11 bei HS-. Die mRNA Mengen von NM 0554 sollten daher in dem Verhältnis von 4:1 (HS+ : HS-) vorgelegen haben.

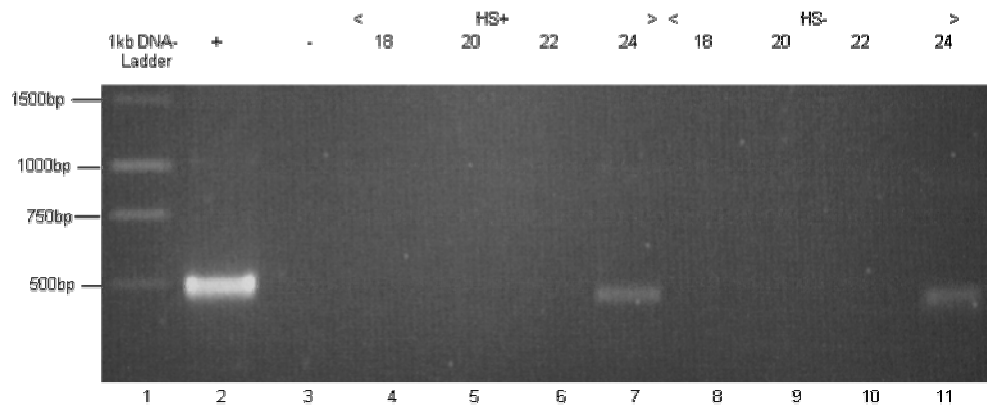


Abbildung 16. RT-PCR von NM 0207: Sowohl bei HS+ als auch bei HS- erschienen nach 24 Zyklen jeweils die erste Bande, die gleich intensiv sind. In den ursprünglich isolierten RNA-Proben sollten daher gleiche Mengen an mRNA von NM 0207 gewesen sein.

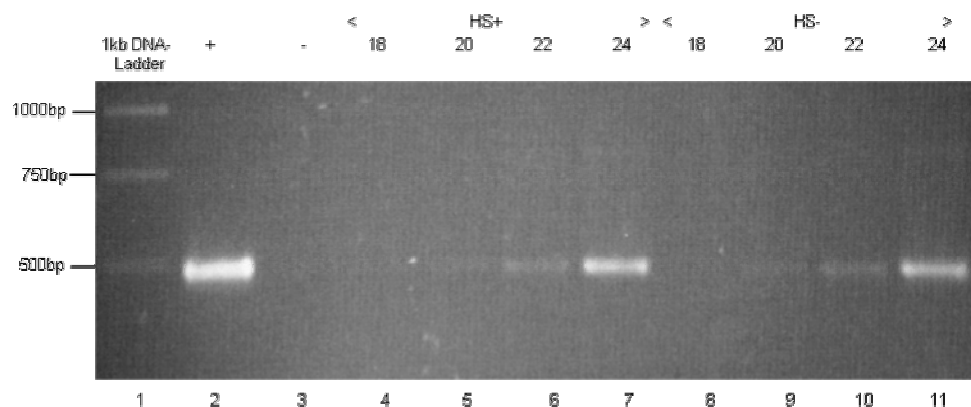


Abbildung 17. RT-PCR von NM 1341: Sowohl bei HS+ als auch bei HS- zeigen sich nach 22 Zyklen die ersten deutlich abgrenzbaren Banden, die gleich intensiv sind. Das mRNA-Verhältnis von NM1341 sollte daher 1:1 zwischen HS+ und HS- gewesen sein.

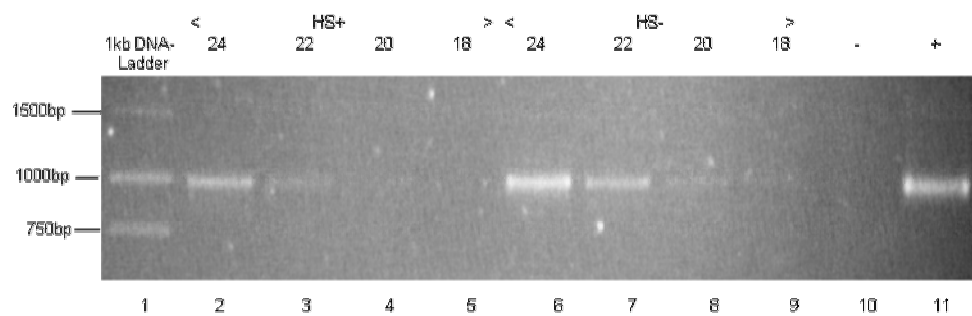


Abbildung 18. Semiquantitative RT-PCR von Sacc1:

Bahn 1: 1kb DNA-Ladder

Bahn 2 bis 9: Identische Mengen an Sacc1 *in vitro* Transkripte wurden den RNA-Proben HS+ und HS- zugesetzt, in cDNA revers transkribiert und als Template für PCR-Reaktionen bei jeweils 18, 20, 22, und 24 Zyklen eingesetzt. Nach der Amplifikation wurden jeweils identische Mengen aller PCR-Produkte, 10µl des 50µl PCR-Ansatzes, auf ein Gel aufgetragen.

Bahn 10: negativ Kontrolle (Wasser als Template)

Bahn 11: positiv Kontrolle (*Saccharomyces* genomische DNA als Template)

Bei HS+ ist nach 24 Zyklen die erste deutlich abgrenzbare Bande zu erkennen, bei HS- schon nach 22 Zyklen. Die Bande der Bahn 2 entspricht in der Intensität der Bande der Bahn 7. In der HS- Probe sollte daher 4-mal so viel Sacc1 *in vitro* Transkript gewesen sein wie in der HS+ Probe.

Über diese semiquantitative RT-PCR mit unterschiedlichen Zyklenanzahlen konnte sowohl das genaue Ausmaß der Deregulation von NM 0554 und 1973 als auch die fehlende Deregulation von NM 1341 und 0207 aus dem DNA Mikroarray Experiment bestätigt werden. Ebenfalls konnte der zugegebene interne Standard *sacc1* in dem Verhältnis von ca. 1 zu 4 wieder gefunden werden.

Neben der Variation der Zyklenanzahl wurde die semiquantitative RT-PCR für NM 1341 und NM 0554 noch mit unterschiedlichen Mengen an cDNA Template bei gleicher Zyklenanzahl durchgeführt. Es wurden jeweils PCR-Reaktionen mit 1µl, ½µl, ¼µl, 1/8µl und 1/16µl HS+ als auch HS- cDNA als Template bei 24 Zyklen durchgeführt.

Abbildung 19-21. Semiquantitative RT-PCR von NM 0554, 1341 und Sacc1

Bahn 1: 1kb DNA-Ladder

Bahn 2: positiv Kontrolle (genomische DNA als Template)

Bahn 3: negativ Kontrolle (Wasser als Template)

Bahn 4 bis 11: identische Mengen an RNA-Proben von HS+ und HS- wurden inklusive der beigegebenen Sacc1 *in vitro* Transkripte (Verhältnis 1:4 von HS+ zu HS-) in cDNA revers transkribiert und jeweils 1µl, 1/2µl, 1/4µl, 1/8µl und 1/16µl dieser cDNA als Template für PCR-Reaktionen im 50µl Ansatz bei 24 Zyklen zur Amplifikation eingesetzt. Aufgetragen wurden jeweils 10µl des PCR-Produktes.

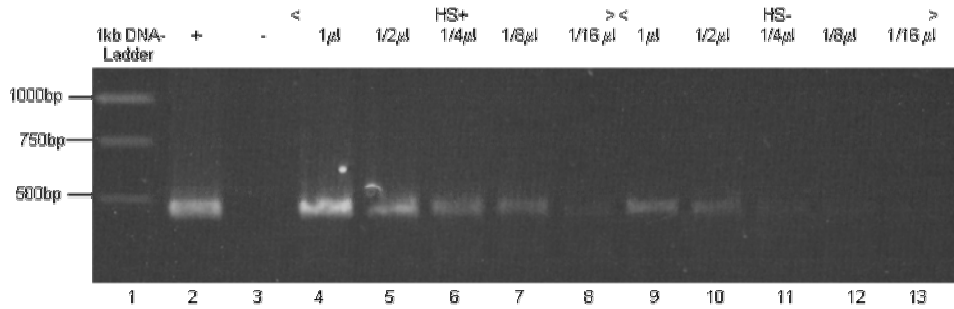


Abbildung 19. RT-PCR von NM 0554: Die Banden der Bahnen 6 und 7 bei HS+ entsprechen in der Intensität den Banden 9 und 10 bei HS-. Daraus kann auf eine vierfache Hochregulation von NM 0554 bei dem Hitzeschock geschlossen werden.

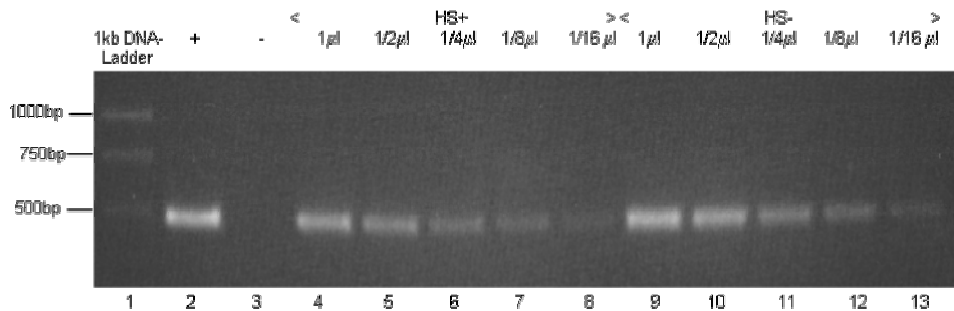


Abbildung 20. RT-PCR von NM 1341: Alle Banden mit gleicher Einsatzmenge an cDNA zeigen gleiche Intensität auf dem Gel, bei 1/16µl Templatemenge ist jeweils keine Bande mehr zu erkennen. Von einer Deregulation im Hitzeschock kann also nicht ausgegangen werden.

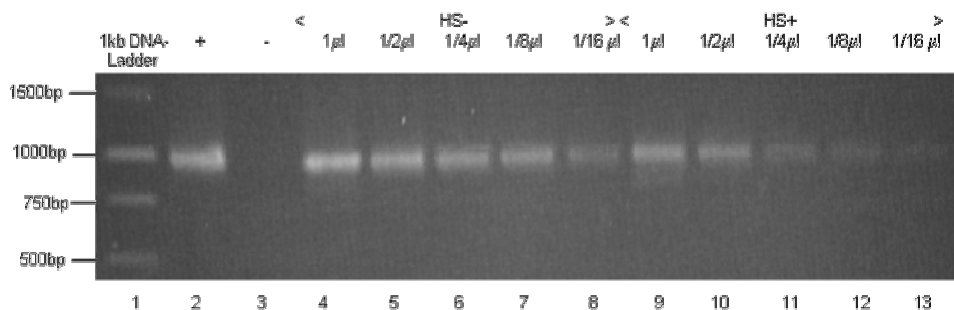


Abbildung 21. RT-PCR von Sacc1: Die Banden der Bahnen 6 und 7 bei HS- entsprechen in der Intensität den Banden 9 und 10 bei HS+. Daraus ergibt sich wieder das zugegebene Verhältnis von 4:1 bei HS-:HS+.

Auch hier konnten wieder die Ergebnisse aus den DNA Mikroarray Experimenten bei einem Hitzeschock mit 43,5°C bestätigt werden. Die semiquantitative RT-PCR zeigte für den ORF NM 1341 keine Deregulation an, während für NM 0554 über das Agarosegel ein Verhältnis der mRNA Menge zwischen HS+ zu HS- von ca. 4 zu 1 abgeschätzt werden konnte. Dies stimmte sehr gut mit dem im Arrayexperiment gemessenen Verhältnis von 3,83 überein. Das im Verhältnis 1:4 zugegebene *in vitro* Transkript *sacc1* konnte ebenfalls mit der RT-PCR bestätigt werden.

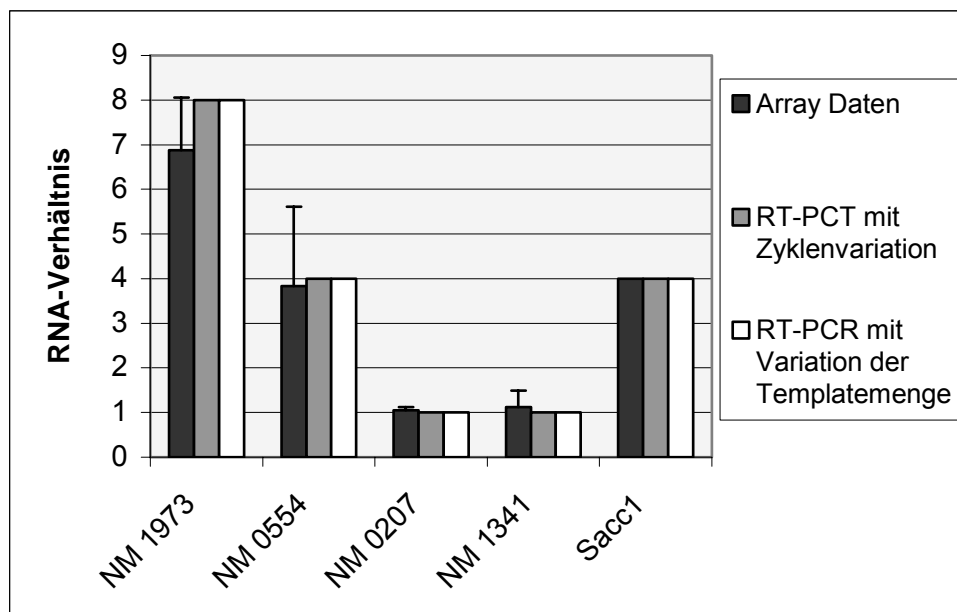


Diagramm 11. Vergleich der Array- mit den RT-PCR Daten: Der Vergleich der Hitzeschock Daten aus der Array Auswertung mit den Daten der RT-PCR zeigt eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse. Bei Sacc 1 wurden die Daten der RT-PCT mit dem zugegebenen RNA-Verhältnis verglichen, zur besseren Übersicht wurden hier die Ergebnisse invers ($y=1/x$) dargestellt.

Letztendlich bestätigten die Ergebnisse aus der RT-PCR die DNA Mikroarray Technologie. Beide Methoden zeigten übereinstimmend eine Deregulation von *dnaK* mit ca. 4 und von *groES* mit ca. 8 bei einem Hitzeschock von 43,5°C, wobei NM 1341 und NM 0207 von diesem Stressreiz unbeeinflusst blieben.

3.7 Temperaturabhängigkeit der Hitzeschock- Antwort von *N. meningitidis*

Nachdem eine Hitzeschock-Reaktion bei *N. meningitidis* nachgewiesen werden konnte, sollte in dieser Arbeit weiter untersucht werden, ob und wenn ja wie die Hitzeschock-Antwort von der Intensität des Stressreizes, das heißt von der Höhe der Temperatur, abhängt. Dazu wurden *N. meningitidis* Kulturen wie in den vorherigen Versuchen kultiviert und bei einer optischen Dichte von $OD_{600nm} = 0,5$ gesplittet. Eine Hälfte wurde für 6min einem thermischen Stressreiz ausgesetzt, die andere wurde bei konstanten 37°C weiterkultiviert. Als Temperaturen im Hitze-Stress wurden 41°C, 42°C und 45°C gewählt. Aus den Kulturen wurde 15min nach Beginn des Stressreizes die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit der Kultur verglichen, die bei 37°C belassen wurde. Den isolierten RNA-Proben waren zur Qualitätskontrolle wieder die *Saccharomyces in vitro* Transkripte *sacc1*, *sacc2*, *sacc3* und *sacc4* in jeweils verschiedenen Verhältnissen zugegeben worden (1:1 ; 3:1 ; 1:3 ; 1:0). Die Experimente mit den verschiedenen Temperaturen wurden zur besseren statistischen Auswertung jeweils dreimal durchgeführt.

Am Anfang wurde wieder die Qualität mittels der beigefügten *in vitro* Transkripte überprüft. In allen Hybridisierungen wurden die internen Standards in den vorher zugegebenen Verhältnissen wiedergefunden. Bei Zugabe eines internen Standards in nur eine der Proben, die miteinander verglichen wurden, lagen die Fluoreszenzverhältnisse zwischen 50 und 100.

Beim Hitzeschock mit 41°C konnten bei einem Konfidenzintervall von 0,5 bis 2,0 keine deregulierten ORFs gefunden werden. Das maximale Fluoreszenzverhältnis wurde mit 1,76 bei dem Disulfide Interchange Protein (*dsbD*; NM 1519), einem Hitzeschock-Gen gemessen, das niedrigste mit 0,72 bei einem Typ II Restriktionsenzym kodierenden Gen (NM 1289). Der Mittelwert der Fluoreszenzverhältnisse über alle NM ORFs betrug 1,20 bei einer Standardabweichung von 0,28.

Bei dem Hitzeschock mit 42°C wurden dagegen fünf deregulierte ORFs identifiziert. Es handelte sich dabei um die gleichen ORFs wie bei dem Experiment mit 43,5°C im Hitzeschock: *dnaK*, *groEL* und *groES* waren induziert und *pilO* und *atpA* reprimiert. Die Deregulation dieser ORFs konnte also auch bei niedrigerer Temperatur bestätigt werden. Bei einem Mittelwert der Fluoreszenzverhältnisse über aller NM ORFs von 1,11 betrug die Standardabweichung 0,56.

	<i>dnaK</i>	<i>groEL</i>	<i>groES</i>	<i>pilO</i>	<i>atpA</i>
Fluoreszenzverhältnis bei Hitzeschock mit 42 °C	2,22	2,64	2,91	0,39	0,43

Tabelle 11. Deregulierte ORFs bei einem Hitzeschock von 42°C.

Eine Erhöhung der Temperatur auf 45°C beim Hitzeschock führte zu einer sehr starken Veränderung des Transkriptionsprofils bei *N. meningitidis*. Der Mittelwert über alle ORFs lag bei 1,40 mit einer sehr hohen Standardabweichung von 1,41.

Schon die Standardabweichung der Fluoreszenzverhältnisse über alle 59 NM ORFs zeigte eine zunehmend stärkere Beeinflussung der Homöostase von *N. meningitidis* mit steigender Temperatur an. Während bei 41°C die Standardabweichung noch bei 0,28 lag, kletterte diese mit steigender Temperatur über 42°C mit 0,56 , 43,5°C mit 0,94 und 45°C auf schließlich 1,41.

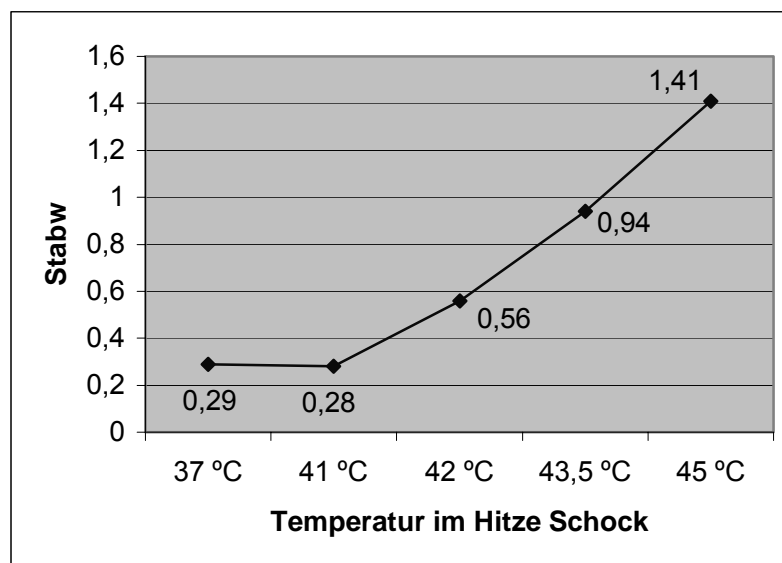


Diagramm 12. Abhängigkeit der Stabw über alle NM ORFs von der Temperatur: Mit steigender Temperatur kam es zu einer Zunahme der Standardabweichung der Fluoreszenzverhältnisse über alle Nm ORFs. Dies zeigt, dass mit steigender Temperatur das Transkriptionsprofil von *N. meningitidis* stärker verändert wurde.

Auch der Vergleich der Scatterplots bei den verschiedenen Temperaturen im Hitzeschock zeigte sehr deutlich die zunehmende Beeinflussung des Transkriptionsprofils mit steigender Temperatur im Hitzeschock.

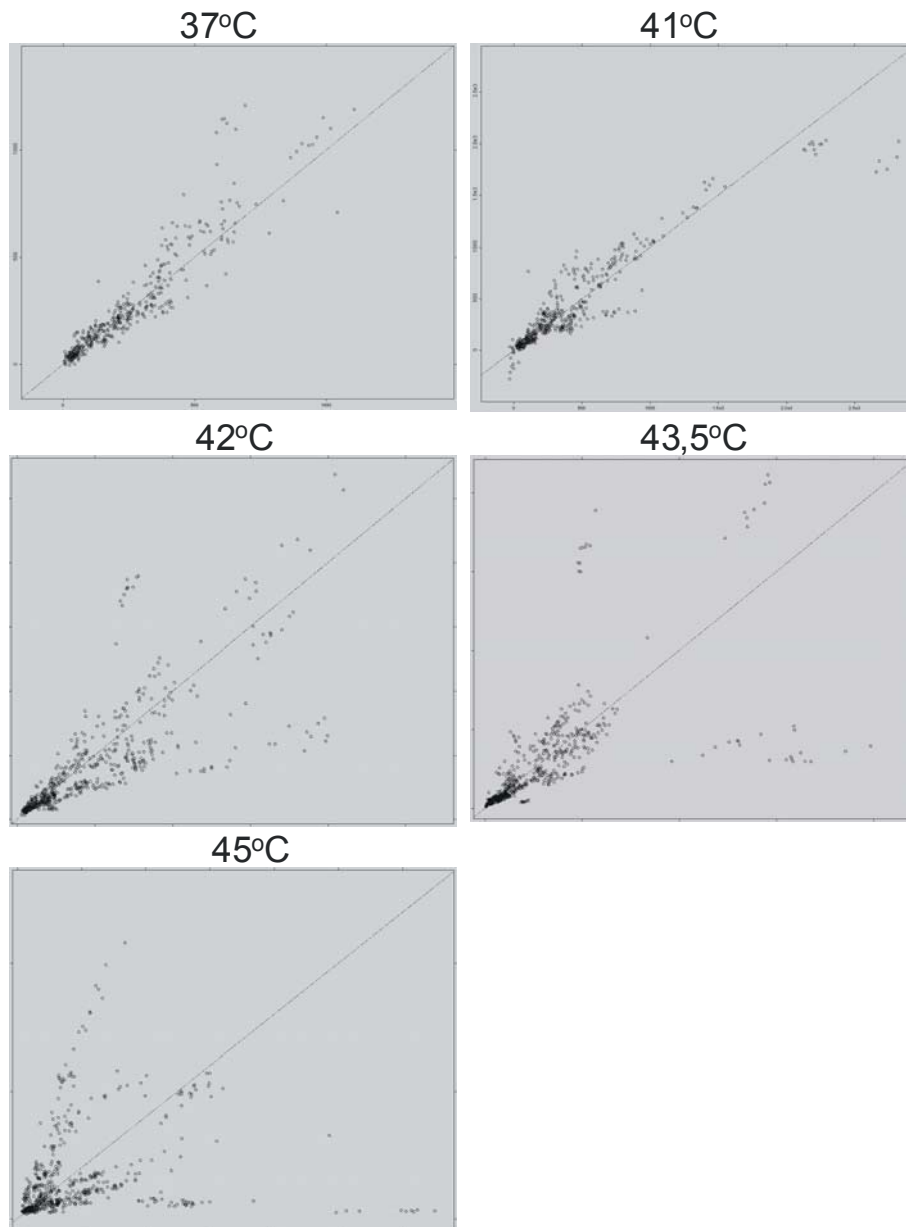


Abbildung 22. Der Vergleich der Scatterplots bei den verschiedenen Temperaturen im Hitzeschock zeigt sehr deutlich die zunehmende Beeinflussung des Transkriptionsprofils von *N. meningitidis* mit steigender Temperatur im Hitzeschock.

Insgesamt konnten bei dem Hitzeschock der Neisserien mit 45°C acht ORFs mit einem Fluoreszenzverhältnis von größer als 2,0 gemessen werden. Darunter waren wieder, wie erwartet, die drei Hitzeschock-Gene aus den Experimenten mit 42°C und 43,5°C: *dnaK*, *groEL* und *groES*. Zusätzlich waren bei diesem stärkeren Stressreiz noch folgende fünf weitere ORFs hochreguliert: *dnaJ*, die beiden Sigmafaktoren *rpoD* und *rpoH*, eine Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase und Thioredoxin. Alle hochregulierten Gene kodieren für Hitzeschock-Proteine oder sind an der Hitzeschock-Reaktion beteiligt.

Gen Name	<i>dnaJ</i>	<i>dnaK</i>	<i>thioredoxin</i>	<i>groEL</i>	<i>groES</i>	<i>rpoH</i>	<i>rpoD</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase
ORF	59	554	1366	1972	1973	712	1538	791
Fluoreszenz-verhältnis	2,14	8,03	4,27	6,51	4,75	2,42	2,83	1,94

Tabelle 12. Hochregulierte Gene bei einem Hitzeschock von 45°C

Wie aus der zunehmenden Standardabweichung bereits zu erwarten, war das Ausmaß der Deregulation bei allen ORFs in hohem Maße von der Temperatur abhängig. Mit steigender Temperatur kam es auch zu einer zunehmenden Deregulation der Hitzeschock Gene.

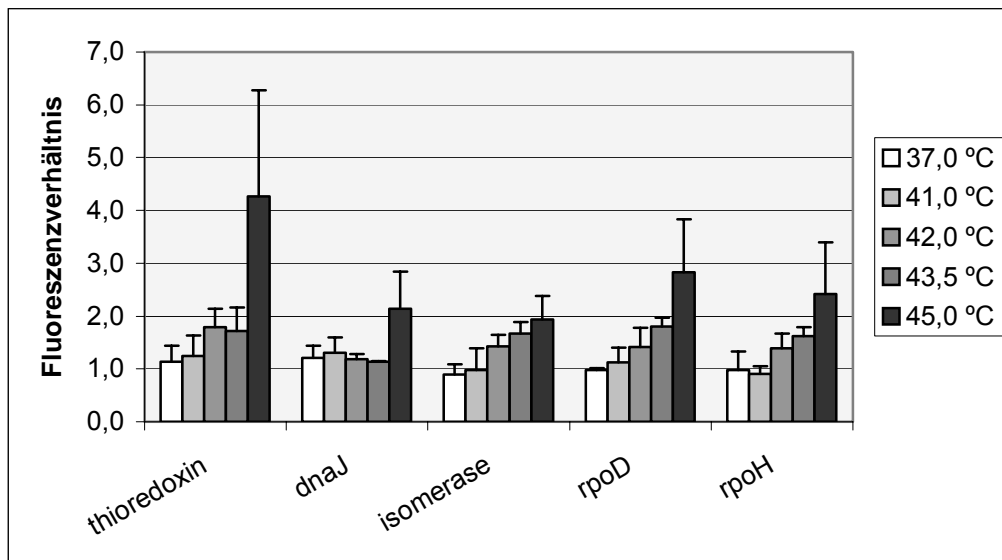


Diagramm 13. Temperatur-Abhängigkeit der Transkription der Hitzeschock-Gene: Wie hier im Diagramm zu sehen, folgte meist einer steigenden Temperatur eine zunehmende Deregulation der Hitzeschock-Gene.

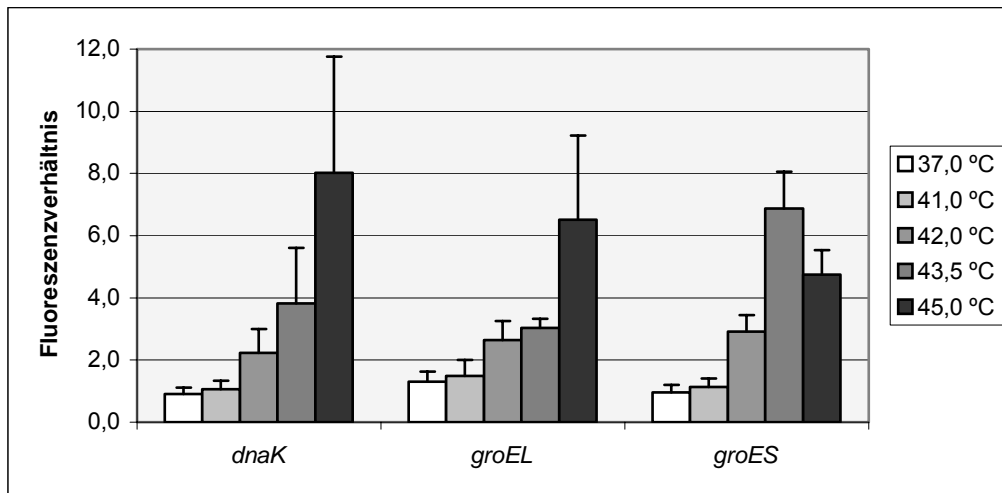


Diagramm 14. Temperatur-Abhängigkeit der Transkription der Hitzeschock-Gene: Auch dieses Diagramm zeigt deutlich, dass es mit steigender Temperatur zu einer zunehmenden Deregulation der Hitzeschock-Gene *dnaK* und *groEL* kam, *groES* dagegen zeigt ein anderes Transkriptionsmuster.

Weiterhin wurden 16 ORFs identifiziert, deren Fluoreszenzverhältnis kleiner war als 0,5. Auch hier konnten die zwei ORFs, *atpA* und *pilO*, aus den Experimenten mit 42°C und 43,5°C bestätigt werden. Die 16 ORFs umfassten die Gene *pilM* bis *pilQ* (NM 1808 bis NM 1812), wichtig für den Prozess der Transformation, und die sechs Untereinheiten der Na⁺ - transportierenden NADH-Quinone Reduktase (NM 564 bis NM 569), welche im Elektronentransport aktiv ist. Die Untereinheiten A und B der ATP-Synthase (NM 1936 und NM 1940) und drei weitere ORFs, *sdhA*, *sdhB* und *sucA* (NM 950, NM951 und NM955), stammen aus dem Bereich des Energiemetabolismus. Im Detail wurden folgende Fluoreszenzverhältnisse gemessen:

Gen Name	<i>pilM</i>	<i>pilN</i>	<i>pilO</i>	<i>pilP</i>	<i>pilQ</i>	<i>sdhA</i>	<i>sdhB</i>	<i>sucA</i>
ORF	1808	1809	1810	1811	1812	950	951	955
Fluoreszenzverhältnis	0,44	0,44	0,21	0,39	0,38	0,33	0,23	0,45

Tabelle 13. Liste der herunterregulierten Gene bei einem Hitzeschock von 45°C

Gen Name	<i>nqrF</i>	<i>nqrE</i>	<i>nqrD</i>	<i>nqrC</i>	<i>nqrB</i>	<i>nqrA</i>	<i>atpA</i>	<i>atpB</i>
ORF	564	565	566	567	568	569	1936	1940
Fluoreszenzverhältnis	0,28	0,39	0,56	0,33	0,44	0,38	0,55	0,48

Tabelle 13. Liste der herunterregulierten Gene bei einem Hitzeschock von 45°C

Auch bei den herunterregulierten Genen nahm in den meisten Fällen mit steigender Temperatur die Deregulation zu. Außer bei *atpA* zeigten allen ORFs die stärkste Deregulation bei 45°C. Diese eine Ausnahme wird aber dadurch relativiert, dass das Fluoreszenzverhältnis bei 45°C von 0,55, formal also nicht dereguliert, eine mit 0,29 sehr hohe Standardabweichung zwischen den Wiederholungen des Hitzeschock-Experimentes mit 45°C hatte.

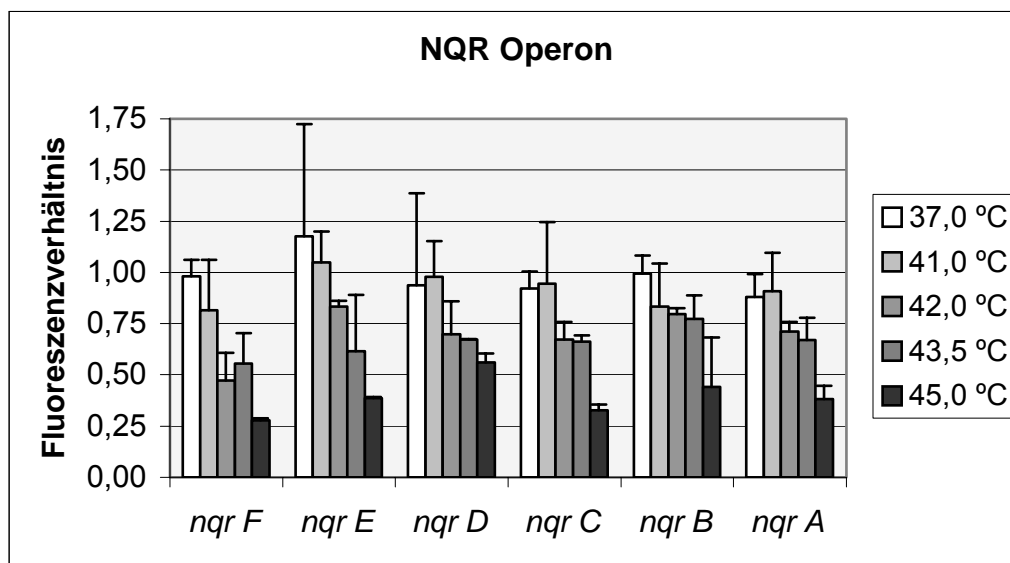


Diagramm 15

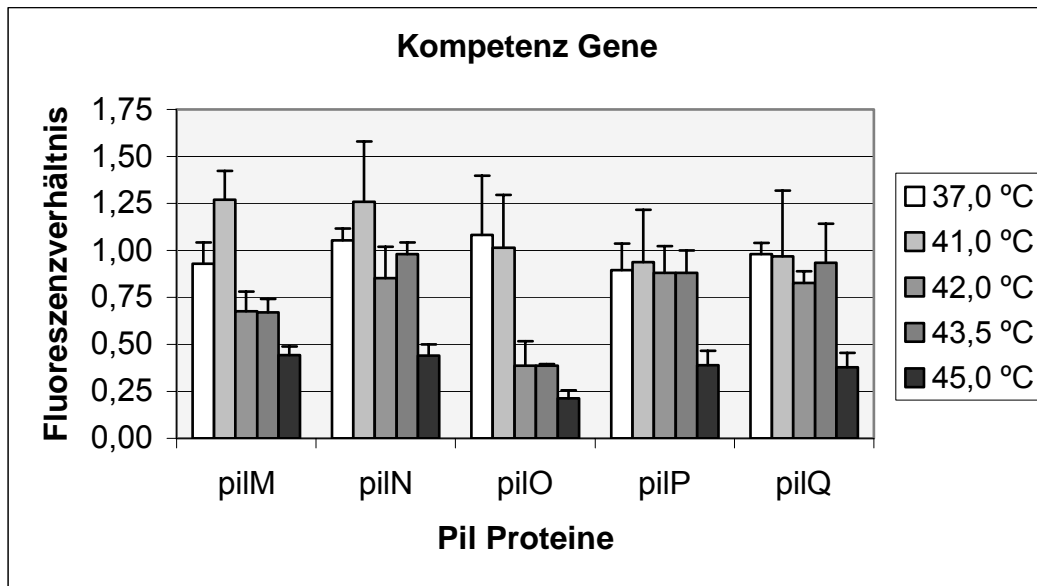


Diagramm 16

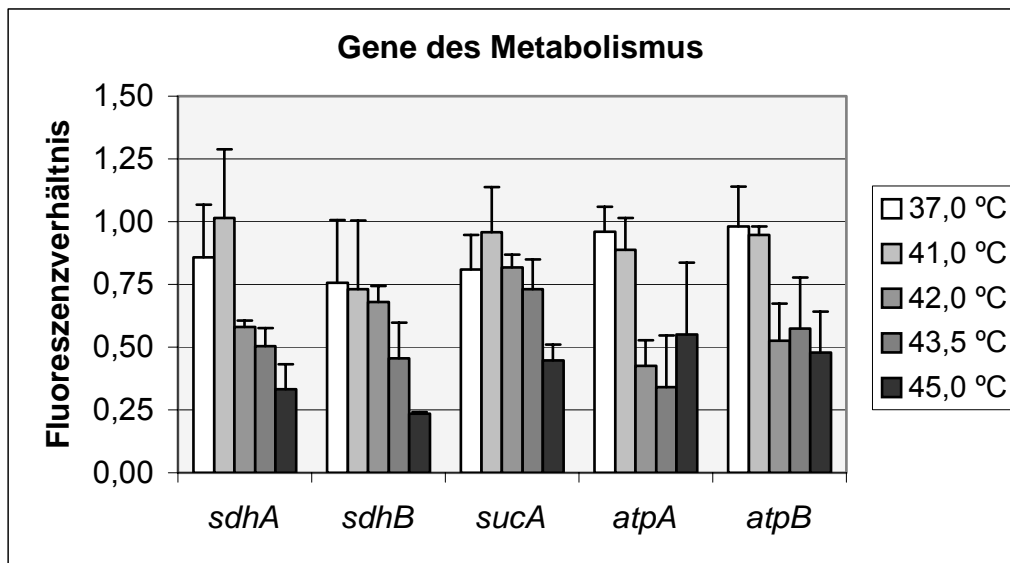


Diagramm 17

Diagramm 15-17. Wie bei den Hitzeschock-Genen war auch bei den herunterregulierten ORFs das Ausmaß der Deregulation von der Höhe der Temperatur im Hitzeschock abhängig. Mit steigender Temperatur war eine zunehmende Deregulation festzustellen.

3.8 Phänotypische Bestätigung der Ergebnisse aus den DNA Mikroarray Experimenten

Bei den Hitzeschock-Experimenten konnten zahlreiche deregulierte Gene identifiziert werden. Während von allen hochregulierten ORFs bereits bekannt war, dass sie an der Hitzeschock-Reaktion beteiligt sind, war eine Beeinflussung des *pil* Operons durch

einen solchen Stressreiz bisher nicht nachgewiesen worden. Die *pil* Gene (NM 1808 bis NM 1812) sind essentiell für die Biogenese der Typ IV Pili, was für zahlreiche gramnegative Bakterien gezeigt wurde (Yoshihara *et al.*, 2000; Roine *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1995). Dies wurde für *Neisseria gonorrhoeae* bestätigt (Drake *et al.*, 1997; Drake *et al.* 1995). Neben ihrer Funktion in der Zellinteraktion sind Typ IV Pili für den ersten Schritt der Transformation, die Bindung der freien DNA, verantwortlich (Facijs *et al.*, 1996). In den Hitzeschock-Experimenten bei *Neisseria meningitidis* mit 45°C konnte eine signifikante Herunterregulation dieses *pil* Genkomplexes gemessen werden. Mit der Herunterregulation der *pil* Gene sollte theoretisch auch eine verminderte Synthese der Typ IV Pili einhergehen. Folglich sollte damit während des Hitzeschocks auch die gesamte Transformationsaktivität der Neisserien vermindert sein. Die Fähigkeit, freie DNA aus der Umgebung ins Bakterium aufzunehmen und ins Genom zu integrieren wäre damit vermindert. Diese Hypothese beruhte einzig auf den Daten aus den DNA Mikroarray Experimenten. Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob dieser Schluss von einem gemessenen Fluoreszenzverhältnis auf eine tatsächliche phänotypische Veränderung bei *N. meningitidis* möglich ist.

Hierfür wurde mit identischem Procedere, wie bei den DNA Mikroarray Experimenten, eine Flüssigkultur von *N. meningitidis* angelegt und bei Erreichen der mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm} = 0,5$) diese Kultur in zwei Hälften gesplittet. Eine Kulturhälfte wurde einem Hitzeschock von 45°C ausgesetzt, während die andere bei konstanten 37°C weiterkultiviert wurde. Diesen Flüssigkulturen wurden 20min nach dem Hitzeschock identische Mengen (1µg Plasmid DNA/1ml Flüssigkultur) von dem Plasmid pHC 6.3 mit einer Kanamycin Kasette im *hrtA* Locus (beschrieben in Claus *et al.*, 1998) zugegeben und die Kulturen für weitere drei Stunden im Schüttelinkubator belassen. Anschließend wurden die Kulturen jeweils in verschiedenen Verdünnungsstufen sowohl auf GC Agar ohne Antibiotikazusatz als auch auf GC Agar plus Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Anzahl aller CFUs (Kolonie bildenden Einheiten) und der Kanamycin-resistenten CFUs bestimmt.

Durch Ausplattieren einer ursprünglichen *N. meningitidis* Kultur, der kein Plasmid zugegeben wurde, konnte vorher bewiesen werden, dass die Meningokokken nicht schon *per se* resistent gegen Kanamycin waren. Durch Division von $C_{\text{transformiert}}$ durch

C_{gesamt} wurde die Transformationsrate errechnet. In einem zweiten, identisch aufgebauten Experiment wurde die Plasmid DNA erst 60min nach dem Hitzeschock zugegeben. Folgende Ergebnisse konnten ermittelt werden.

	Zugabe der Plasmid DNA 20min post HS		Zugabe der Plasmid DNA 60min post HS	
	HS+	HS-	HS+	HS-
C_{gesamt} (1/ml)	$9,63 \times 10^8$	$3,65 \times 10^9$	$1,74 \times 10^9$	$4,46 \times 10^9$
$C_{\text{transformiert}}$ (1/ml)	$7,09 \times 10^5$	$2,08 \times 10^7$	$1,56 \times 10^4$	$1,29 \times 10^5$
Transformationsrate	$7,37 \times 10^{-4}$	$5,69 \times 10^{-3}$	$8,94 \times 10^{-6}$	$2,90 \times 10^{-5}$

Tabelle 14. Absolutwerte der Auszählungen der CFUs

Diese Absolutwerte zeigten erstens einen deutlichen Abfall der Transformationsraten zwischen Zugabe der Plasmid DNA 20min und 60min nach dem Stressreiz. Die Absolutzahl der Meningokokken hatte sich in diesen 40min kaum verändert, die Kulturen waren also in der stationären Wachstumsphase. Neben dem Wachstum ist in dieser stationären Phase auch allgemein der Stoffwechsel der Bakterien reduziert. Der gedrosselte Metabolismus, aufgrund des limitierten Nährstoffangebotes, könnte den Vorgang der Transformation in gleicher Weise betreffen und die geringere absolute Transformationsrate des späteren Zeitpunktes erklären.

In diesem Experiment sollte der Einfluss des Hitzeschocks auf die Transformationsrate untersucht werden. Hierfür wurde jeweils die Transformationsrate der HS+ Kultur durch die Transformationsrate der HS- Kultur geteilt. Bei dem Versuch mit Zugabe der DNA 20min post HS ergab sich ein Quotient von 0,13. Die Transformationsrate wurde also durch den thermischen Stressreiz um den Faktor von ca. zehn vermindert. Bei dem zweiten Versuch mit später beigefügter DNA ging dieser Quotient auf 0,31 zurück. Auch hier führte der Hitzeschock zu einer geringeren Aufnahme von DNA; das Ausmaß war aber kleiner. Letztendlich konnten in diesem Versuch die Ergebnisse der DNA Mikroarray Experimente phänotypisch bestätigt werden. Der Herunterregulation der *pil* Gene bei einem Hitzeschock mit 45°C folgte eine verminderte Transformationsrate, die vor allem in kurzem Abstand zum Hitzeschock ausgeprägt war.

4 Diskussion

In der postgenomischen Ära, nach der Ermittlung der Genomsequenzen von zahlreichen Bakterien und sogar des gesamten menschlichen Genoms, ist die DNA Mikroarray Technologie zur Methode der Wahl für die funktionelle Genomforschung geworden (Timothy *et al.*, 2001). DNA Mikroarrays wurden bereits für *in vitro* Gen-Expressionsuntersuchungen von *Escherichia coli* (Khodursky *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001a; Wei *et al.*, 2001b), *Streptococcus pneumoniae* (de Saizieu *et al.*, 1998), *Haemophilus influenza* (de Saizieu *et al.*, 1998) und *Mycobacterium tuberculosis* (Wilson *et al.*, 1999) etabliert. Neben der Analyse der Bakterien selbst rückt die komplexe Interaktion zwischen Wirtszelle und Bakterium in den Mittelpunkt der Forschung. Die transkriptionelle Antwort zahlreicher verschiedener Zellen auf eine Infektion mit *Salmonella* (Rosenberger *et al.*, 2000; Eckmann *et al.*, 2000), *Listeria* (Cohen *et al.*, 2000), *Bordetella* (Belcher *et al.*, 2000) und *Pseudomonas* (Ichikawa *et al.*, 2000) ist bereits analysiert worden. Über die bakterielle Reaktion während dieser Interaktion gibt es noch sehr wenige Arbeiten. Eriksson *et al.* untersuchten das Transkriptionsprofil von intrazellulären *Salmonella enterica* während einer Infektion von Makrophagen (Eriksson *et al.*, 2003).

Ziel dieser Arbeit war es, die DNA Mikroarray Technologie erstmals für die Untersuchung des Transkriptoms von *N. meningitidis* zu etablieren. Es sollte der Einfluss eines thermischen Stressreizes, eines Hitzeschocks, auf die Expression von 59 Genen erforscht werden.

4.1 Etablierung und Standardisierung der DNA Mikroarray

Technik

Besonderer Wert wurde am Anfang der Arbeit auf die Etablierung und Standardisierung dieser komplexen Technik gelegt. Die Notwendigkeit dieser Vorarbeiten wird oft unterschätzt und verkannt (Lee *et al.*, 2000; Tseng *et al.*, 2001). In den ersten Experimenten sollten daher die Grenzen der Technik identifiziert und die Aussagekraft der Ergebnisse quantifiziert werden. Neben dem Experimentellen, also z.B. der RNA-Isolation, reverser Transkription und Hybridisierung, muss auch die anschließende Auswertung in diese Analysen einbezogen werden. Obwohl es mittlerweile eine

Vielzahl von Auswertungssoftwarepaketen gibt, hat sich eine allgemein akzeptierte Auswertungsroutine bisher aber noch nicht herauskristallisiert (Hughes *et al.*, 2001).

Am Anfang wurden die Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit der DNA Mikroarrays für Transkriptionsanalysen bei *N. meningitidis* untersucht. Es wurden RNA-Split Experimente durchgeführt, in welchen identische RNA-Proben miteinander verglichen wurden; der Erwartungswert der Fluoreszenzverhältnisse bei allen ORFs war daher 1. Die Fluoreszenzverhältnisse der 59 ORFs bewegten sich bei diesem Experiment zwischen maximalen 1,71 und minimalen 0,68, bei einem Mittelwert von 1,03. Die Standardabweichung vom Logarithmus der Fluoreszenzverhältnisse über alle ORFs betrug dabei 0,28. Diese Standardabweichung drückt den Fehler aus, der durch das getrennte Umschreiben einer ursprünglich identischen RNA Probe, die anschließende Hybridisierung auf dem Slide und letztendlich durch die Auswertung auftritt. Auf einem Signifikanzniveau von 99% ist das Konfidenzintervall bei normalverteilten Werten mit der 2,58-fachen Standardabweichung um den Erwartungswert definiert. Dies ergab bei diesem RNA-Split Experiment ein Konfidenzintervall von 0,60 bis 1,66. Alle ORFs mit einem Fluoreszenzverhältnis außerhalb dieses Bereiches wären mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% dereguliert. Bei dem RNA-Split Experiment wäre bei diesem Konfidenzintervall ein ORF fälschlich als dereguliert gewertet worden. In der Literatur wird das Konfidenzintervall überwiegend mit 0,5 bis 2,0 festgelegt (Lockhart *et al.*, 2000; Rimini *et al.*, 2000). Kein ORF in dem RNA-Split Experiment zeigte ein Fluoreszenzverhältnis außerhalb von 0,5 bis 2,0. Übertragen auf das RNA-Split Experiment entspricht dieses Intervall einem Signifikanzniveau von sehr hohen ca. 99,9%.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch Spots mit einer Fluoreszenzintensität, die wenigstens doppelt so hoch ist wie die des Hintergrundes, noch gut ausgewertet werden können. Allerdings war bei diesen schwach fluoreszierenden Spots die Standardabweichung innerhalb der zehn Replikate pro ORF auf dem Slide mehr als dreimal so groß wie bei höherer Fluoreszenzintensität, der Durchschnittswert der Fluoreszenzverhältnisse der zehn Replikate wurde dadurch aber kaum beeinflusst. Dies zeigt, dass zehn Replikate pro ORF bei einer hohen Fluoreszenzintensität nicht nötig sind, sie allerdings gerade bei schwach fluoreszierenden ORFs die statistische Auswertung erheblich verbessern.

Den beiden gesplitteten RNA-Proben, die miteinander verglichen wurden, waren vor der reversen Transkription noch *in vitro* Transkripte von *Saccharomyces cerevisiae* als interne Standards beigefügt worden. Zwei *in vitro* Transkripte wurden im Verhältnis 1:1 den beiden RNA-Proben, die anderen beiden im Verhältnis 1:3 bzw. 3:1 beigefügt. Hiermit sollte kontrolliert werden, ob mit der DNA Mikroarray Technik auch deregulierte Gene sicher identifiziert werden können, bzw. ob die Technik die tatsächlichen RNA-Mengenverhältnisse korrekt widerspiegelt.

Tatsächlich wurden die vier internen Standards in den zugegebenen Verhältnissen detektiert. Die exakte Übereinstimmung von mRNA-Verhältnis zu Fluoreszenzverhältnis konnte in der veröffentlichten Literatur nicht gefunden werden. Ein Axiom der DNA Mikroarray Technik ist der lineare Zusammenhang zwischen mRNA-Verhältnis und Fluoreszenzverhältnis. Der lineare Zusammenhang konnte von Pollack (Pollack *et al.*, 1999) bei mRNA-Verhältnissen von 1:1 bis zu 5:1 sehr klar gezeigt werden. Allerdings war die Steigung der Geraden, mRNA-Verhältnis gegen Fluoreszenzverhältnis aufgetragen, nicht gleich eins. Einer Verdoppelung des mRNA-Verhältnisses folgte nicht eine Verdoppelung des Fluoreszenzverhältnisses. Die Abweichung von der erwarteten Steigung von eins erklärt Pollack mit Kreuzhybridisierungen. Einschränkend muß angefügt werden, dass diese lineare Beziehung nur dann gilt, wenn die Bindungskapazität der DNA-Proben auf dem Slide für die markierte cDNA noch im linearen Bereich ist, also noch nicht im Sättigungsbereich ist. In weiteren Versuchen wurde deshalb ein interner Standard nur in eine der beiden RNA-Proben gegeben und nicht in die andere. Mathematisch hätte hier ein Fluoreszenzverhältnis von $1/0 = \infty$ gemessen werden müssen, stattdessen betrug das durchschnittliche Fluoreszenzverhältnis aber nur 75. Die Funktion aus mRNA-Verhältnis und Fluoreszenzverhältnis für die internen Standards stellte folglich eine Gerade mit der Steigung gleich eins dar, die sich dann aber abflacht und asymptotisch einem maximalen Fluoreszenzverhältnis von ca. 75 nähert. Der Wert des maximal messbaren Fluoreszenzverhältnisses ist für jeden ORF allerdings verschieden und hängt von zahlreichen Faktoren ab, z.B. der absoluten Fluoreszenzintensität, dem Background zwischen den Spots auf dem Slide und dem Ausmaß der Kreuzhybridisierung. In dieser Arbeit wurde die Laserintensität beim Scannen der Slides so gewählt, dass alle Spots eine Fluoreszenzintensität im linearen Bereich aufwiesen.

Zwei weitere potentielle Fehlerquellen sind die Reproduzierbarkeit der Kulturbedingungen von *N. meningitidis* und die RNA-Isolation. In den folgenden Experimenten wurde an drei verschiedenen Tagen aus *N. meningitidis*, jeweils unter identischen Standardbedingungen gewachsen, die RNA isoliert und diese drei RNA-Proben in drei Versuchen jeweils miteinander verglichen. In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob die *N. meningitidis* Standardkultur auch wirklich ein konstantes Expressionsmuster zeigt und so als Standard gegen experimentelle Kulturen verwendet werden kann und ob gleichzeitig die RNA-Isolation reproduzierbare Ergebnisse liefert. Der Erwartungswert aller NM ORFs war natürlich auch hier wieder gleich 1. Bei der Auswertung dieses Experimentes wurden

1. die drei Hybridisierungen als getrennte Experimente betrachtet.
2. jeweils zwei Hybridisierungen als Wiederholungen eines Experimentes gewertet und damit statistisch die Durchschnittswerte der Fluoreszenzverhältnisse der beiden Wiederholungen errechnet.
3. alle drei Hybridisierungen als Wiederholungen eines Experimentes gewertet.

Die Fluoreszenzverhältnisse bewegten sich bei der ersten, getrennten Form der Auswertung zwischen maximalen 2,3 und minimalen 0,35. Die durchschnittliche Standardabweichung über alle ORFs lag mit 0,44 erwartungsgemäß über der aus dem RNA-Split Experiment mit 0,28. Bei diesem Experimentaldesign mit nur einer einzigen Wiederholung des Versuches und einem Konfidenzintervall von 0,5 bis 2,0 wären ca. 4% der ORFs fälschlicherweise als dereguliert identifiziert worden. Dies wäre ein inakzeptabel hoher Anteil an falsch Positiven, die Spezifität wäre deutlich zu gering. Bei einem Experiment auf Genombasis würden so ca. 90 ORFs falsch positiv gewertet werden. Der größere Fehler in Form der Standardabweichung im Vergleich zum RNA-Split Experiment ist mit den getrennten Kulturen und den anschließend getrennten RNA-Isolationen zu begründen. Die beiden zusätzlichen experimentellen Schritte bergen Fehlerquellen. Diese höhere Standardabweichung konnten auch in den Arbeiten von Wodicka und Richmond gefunden werden (Wodicka *et al.*, 1997; Richmond *et al.*, 1999).

Bei der zweiten Auswertung wurden jeweils zwei Hybridisierungen als Wiederholungen eines Experimentes gewertet. Diese Auswertung simulierte ein Experiment, das zweimal wiederholt wird und bei dem jeweils die Durchschnittswerte der Fluoreszenz-

verhältnisse aus beiden Wiederholungen als Endergebnis gebildet werden. Durch diese einfache Wiederholung konnte die Standardabweichung über alle ORFs von 0,44 auf 0,34 gesenkt werden. Die Fluoreszenzverhältnisse bewegten sich zwischen 0,49 und 1,86, 0,5% der ORFs wären bei diesem Experimentaufbau falsch als dereguliert gewertet worden.

In der dritten Auswertung wurden schließlich die drei Hybridisierungen als Wiederholungen eines einzigen Experimentes gewertet. Für jeden ORF wurde die durchschnittliche Fluoreszenzaktivität aus den drei Wiederholungen und daraus wieder die Standardabweichung über alle ORFs berechnet. Die Fluoreszenzverhältnisse bewegten sich nun nur noch zwischen 0,64 und 1,55 bei einer Standardabweichung über allen ORFs von 0,29. Alle ORFs wurden jetzt korrekt als nicht dereguliert erkannt. Durch dieses dreimalige Wiederholen eines Versuches konnte die Standardabweichung als Fehlerindikator auf 0,29 gesenkt werden und ist damit praktisch identisch mit der Standardabweichung aus dem RNA-Split Experiment mit 0,28.

Der zusätzliche Fehler durch die getrennten *N. meningitidis* Kulturen und die getrennten RNA-Isolationen kann folglich durch ein Experimentaldesign mit jeweils drei Versuchen ausgeglichen werden. Die Notwendigkeit, ein Experiment mehrfach zu wiederholen, haben bereits Brazma und Lee in ihren Arbeiten betont (Brazma *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000). Wie in dieser Arbeit hier empfiehlt auch Lee mindestens drei Wiederholungen eines Experimentes. Als Konfidenzintervall wurde auf Grundlage dieser Daten der Bereich von 0,5 bis 2,0 festgelegt. Alle ORFs mit einem Fluoreszenzverhältnis außerhalb von 0,5 bis 2,0 sind bei drei Versuchen pro Experiment mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9 % dereguliert.

Wie auch schon im Ergebnisteil erwähnt, wurde hier die Spezifität mit dem Signifikanzniveau von 99,9% bewusst sehr hoch angesetzt. Die Gefahr, positiv deregulierte ORFs nicht zu erkennen, ist dadurch zwar größer, die Sensitivität kleiner. Allerdings ist die biologische Aussagekraft eines solchen nur knapp deregulierten Genes immer fraglich und auch nur schwer mit einer anderen Methode zu beweisen. In den folgenden HitzeschockExperimenten sollte es die Technologie gestatten, deregulierte ORFs sicher zu erkennen und von den nicht deregulierten zu unterscheiden.

4.2 Hitzeschock-Experimente

Nach Etablierung der DNA Mikroarray Technologie für *N. meningitidis* wurde die Reaktion dieses Bakteriums auf einen Hitzeschock untersucht. Der Hitzeschock ist eine unter vielen verschiedenen Organismen hoch konservierte Reaktion, die es einer Zelle erlaubt, sich schnell an Veränderungen der Umwelt anzupassen und so unter dieser Stresssituation das Überleben zu sichern. Die Hitzeschock-Reaktion bei *N. meningitidis* ist bisher kaum erforscht. In der stationären Wachstumsphase konnte eine erhöhte Menge von GroEL gemessen werden (Arakere *et al.*, 1993). Bei *N. gonorrhoea* existieren Arbeiten über die Hitzeschock-Reaktion auf Protein- (Arakere *et al.*, 1993) und Transkriptionsebene (Klimpel *et al.*, 1989; Woods *et al.*, 1990).

Es sollte in dieser Arbeit der Einfluss eines thermischen Stress Reizes auf die Expression der 59 ausgewählten *N. meningitidis* ORFs gemessen werden. Dazu wurde in vier Experimenten durch Temperatursteigerungen von der Standardtemperatur von 37°C auf 41°C, 42°C, 43,5°C und 45°C ein Hitzeschock ausgelöst und beobachtet, ob es dadurch zu einer Veränderung des Expressionsmusters kommt.

Als ein Indikator für das Ausmaß der Veränderung des Transkriptionsprofils stellte sich die Standardabweichung über alle ORFs heraus. Diese Standardabweichung drückt aus, wie stark die 59 ORFs in ihrer Gesamtheit von dem Fluoreszenzverhältnis 1 abweichen. Mit zunehmend höherer Temperatur kam es zu einer höheren Standardabweichung. Die beinahe identische Standardabweichung bei Standardtemperatur 37°C und bei 41°C zeigt, dass ein Temperatursprung auf 41°C noch keine Anpassungsreaktionen bei *N. meningitidis* hervorruft, die Temperatur also nicht ausreicht, um eine Stress-Reaktion zu induzieren. Ab 42°C kam es aber zu einer zunehmenden Änderung der Expression der 59 untersuchten Gene, die Standardabweichung über alle ORFs stieg stetig an. Das heißt die Intensität des Hitzeschocks und die damit notwendige Anpassungsreaktion nahm also mit steigender Temperatur von 42°C auf 45°C zu.

Während bei 41°C kein ORF signifikant dereguliert war, konnten bei 42°C und 43,5°C drei hochregulierte und bei 45°C sogar acht hochregulierte ORFs identifiziert werden. Ab 42°C kommt es zu einer gesteigerten Denaturierung und Fehlfaltung von Proteinen (Voet, D. *et Voet*, J., 1995). Diese Proteine lösen die Hitzeschock-Reaktion mit aus, was sehr genau mit der beginnenden Veränderung des Transkriptionsprofils bei 42°C in den Versuchen bei *N. meningitidis* übereinstimmt.

Von allen hochregulierten Genen war bereits aus anderen Bakterien bekannt, dass sie typischerweise bei einem Hitzeschock induziert werden (Stolz *et Hengge-Aronis*, 2000). Im Einzelnen handelte es sich bei den hochregulierten ORFs um die Chaperon kodierenden Gene *groEL/groES* und *dnaJ/dnaK*, die Sigmafaktor kodierenden Gene *rpoD* und *rpoH*, sowie die Thioredoxin und eine Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase kodierenden Gene. Alle in dieser Arbeit gefundenen hochregulierten ORFs sind bei *E. coli* im Hitzeschock (Craig *et al.*, 1999) bestätigt worden. Umgekehrt war kein ORF, der in dieser Arbeit bei *N. meningitidis* nicht dereguliert war, in *E. coli* auf Gesamtgenombasis von Craig als dereguliert gefunden worden. Insgesamt wurden bei *E. coli* 119 ORFs in ihrer Expression durch den Stressreiz beeinflusst: 77 wurden hoch-, 42 wurden herunterreguliert. Die meisten dieser deregulierten Gene wurden mit zwei verschiedenen Methoden bestätigt: DNA Mikroarray Technik und Arrays auf Nylonmembranen mit radioaktiv markierten Sonden. Die DNA Mikroarray Technik zeigte dabei besser reproduzierbare Ergebnisse (Craig *et al.*, 1999). Insgesamt bestätigt dieser Vergleich zwischen *E. coli* und *N. meningitidis* die Ergebnisse aus den Experimenten dieser Arbeit.

Im Rahmen der Etablierung der DNA Mikroarrays für *N. meningitidis* wurden die gewonnenen Daten mit einer zweiten unabhängigen Technik verifiziert. In der Regel werden Northern Blots oder RT-PCR hierfür verwendet (Pollack *et al.*, 1999; Rimini *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2000). Die RT-PCR bestätigte für die beiden house keeping Gene *pdhA* (NM 1341) und *gapA-1* (NM 0207) die fehlende Deregulation bei einem Hitzeschock. *GroES* (NM 1973) und *dnaK* (NM 0554) zeigten auch in der RT-PCR eine Hochregulation nach dem Stressreiz. Das Ausmaß der Deregulation auf den DNA Mikroarrays und in der RT-PCR war fast identisch. Auch ein *Saccharomyces in vitro* Transkript, das vor der reversen Transkription den beiden RNA-Proben in dem Verhältnis von 1:4 beigefügt wurde, konnte in der RT-PCR im exakten Mengenverhältnis bestimmt werden. Die RT-PCR bewies damit die hohe Qualität und sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus den DNA Mikroarray Experimenten. Auffällig ist die steigende Deregulation der Hitzeschock-Gene mit höher werdender Temperatur. Eine Ausweitung der Anpassungsreaktion ist bei einem stärker werdenden Stressreiz mit größer werdendem Zellschaden physiologisch sinnvoll und einleuchtend. Die Produktionssteigerung der Hitzeschock-Proteine soll das Überleben der Zelle durch

Reparatur der Schäden sichern. Für die vermehrt anfallenden fehlgefalteten und denaturierten Proteine bei höheren Temperaturen werden beispielsweise mehr Chaperone, *groEL/groES* und *dnaJ/dnaK*, benötigt, die eine korrekte Faltung von Proteinen katalysieren.

Interessanterweise zeigt das Operon aus *groEL* und *groES* ein anderes Muster der Hochregulation als die übrigen Hitzeschock-Gene. Während das Fluoreszenzverhältnis von *groES* schon bei 43,5°C mit 6,87 maximal dereguliert ist, sinkt es bei 45°C auf nur noch 4,75 ab. *GroEL* dagegen zeigt die maximale Hochregulation erst bei 45°C mit 6,51, bei 43,5°C beträgt das Fluoreszenzverhältnis 3,83. Dieses unerwartete Ergebnis kann vielleicht durch eine Synthese von zwei verschiedenen Transkripten erklärt werden. Bei *N. gonorrhoea* konnten nach einem Hitzeschock zwei Transkripte des *groEL/groES* Operons beobachtet werden, ein vollständiges *groES-groEL* Transkript und ein kürzeres *groES* Transkript, welches das Ergebnis einer vorzeitigen Termination der Transkription an einem inverted repeat zwischen den beiden Genen sein kann (Tauschek *et al.*, 1997). Die Analyse der Sequenz zwischen *groES* und *groEL* mit mfold, Version 2.3 (<http://bioweb.pasteur.fr>) zeigte ebenfalls die Existenz eines solchen inverted repeats. Die von mfold als energetisch am stabilsten berechnete Sekundärstruktur dieser Sequenz ist im Anhang abgebildet. Dieser inverted repeat könnte die Ursache für die unterschiedliche Expression von *groEL* und *groES* sein.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden die Promotoren der meisten Hitzeschock-Gene, darunter von *groEL/groES* und *dnaJ/dnaK*, von σ^{32} erkannt, einer Sigma-Untereinheit der RNA-Polymerase. σ^{32} spielt bei der Kontrolle der Hitzeschock-Reaktion eine entscheidende Rolle: Bei einem Hitzeschock steigt die intrazelluläre Menge von σ^{32} an. σ^{32} erkennt die Promotoren der Hitzeschock-Proteine, ermöglicht so die Initiation deren Transkription und steigert damit insgesamt die Synthese der Hitzeschock-Proteine. Die Regulation der σ^{32} Aktivität erfolgt aber nur zu einem sehr geringen Anteil über die Transkription, sondern hauptsächlich über eine vermehrte Translation der *rpoH* mRNA und gesteigerte Stabilität von Sigma 32 bei steigenden Temperaturen. Erst bei sehr hohen Temperaturen kommt es über σ^E , der einen der vier Promotoren von *rpoH* erkennt, auch zu einer Ausdehnung der Transkription von *rpoH*. Diese Regulation ist sehr gut in den Hitzeschock-Experimenten mit *N. meningitidis* nachzuvollziehen. Obwohl bei den Temperaturen 42°C und 43,5°C die Hitzeschock-

Reaktion schon deutlich zu erkennen ist, zeigt *rpoH* noch keine Deregulation. Erst bei 45°C kommt es zu einer Hochregulation des Sigmafaktors. Durch eine alleinige Regulation des Hitzeschocks über die Transkription von *rpoH* wären diese Daten nicht zu erklären gewesen.

Obwohl dieser Regulationsmechanismus von *E. coli* bekannt ist, konnte der Beginn der transkriptionellen Hochregulation von *rpoH* erst ab 45°C nicht erwartet werden. *N. meningitidis* ist ausschließlich humanpathogen, sollte daher Temperaturen von über 42°C so gut wie nie ausgesetzt sein, insbesondere da am Besiedlungsort der Schleimhaut im oberen Respirationstrakt die Temperatur sogar noch geringer als die üblicherweise gemessene Körpertemperatur ist. Eine Antwort auf diese Frage könnte sein, dass die Hitzeschock-Reaktion phylogenetisch sehr alt und die Steuerung dieser Stressantwort hoch konserviert ist. Eine Adaptation an den speziellen Lebensraum und die Lebensbedingungen von *N. meningitidis* hätte somit nicht stattgefunden.

Obwohl die Hitzeschock-Regulation seit vielen Jahren intensiv erforscht wird, konnten in dieser Arbeit 16 Gene gefunden werden, von welchen eine Veränderung der Expression nicht *a priori* erwartet wurde. Dabei handelt es sich um Gene, die durch den Stressreiz herunterreguliert wurden. Die 16 ORFs umfassten die Gene *pilM* bis *pilQ* (NM 1808 bis NM 1812), die am Prozess der Pilus-Bildung beteiligt sind, und die sechs Untereinheiten der Na⁺-transportierenden NADH-Quinone Reduktase (NM 0564 bis NM 0569), welche im Elektronen-Transport aktiv sind. Die Untereinheiten A und B der ATP-Synthase (NM 1936 und NM 1940) stammen aus der Kategorie des Energie Metabolismus, *sdhA*, *sdhB* und *sucA* (NM 0950, NM 0951 und NM 0955) aus dem Zitratzyklus. Auch bei den herunterregulierten Genen nahm in den meisten Fällen mit steigender Temperatur die Deregulation zu.

Das Transkriptionsmuster der ORFs innerhalb der verschiedenen Operons zeigte eine auffallende Ähnlichkeit. In den herunterregulierten Operons (*nqrA-F*, *sdhA/B*, *atpA/B*, *pilM-Q*) stimmten die Fluoreszenzverhältnisse der einzelnen ORFs bei den verschiedenen Temperaturen sehr genau überein. Dies entspricht der theoretischen Erwartung an Gene, die alle einen gemeinsamen Promotor haben und damit auch jeweils zusammen transkribiert werden. Die hohe Reproduzierbarkeit und Präzision der DNA Mikroarray Technologie wird dadurch einmal mehr bewiesen.

Wie oder warum die Expression von zahlreichen ORFs im Hitzeschock vermindert wird, ist bisher nicht bekannt. Theoretisch kann einmal eine verminderte Transkription der ORFs und zweitens ein beschleunigter Abbau der mRNA für diesen Effekt verantwortlich sein. Allerdings wurde für *E. coli* gezeigt, dass ein beschleunigter Abbau der mRNA nicht als Regulationsmechanismus für die Minderexpression von Genen im Hitzeschock verantwortlich ist (Henry *et al.*, 1992). Es handelt sich wahrscheinlich auch nicht um einen reinen Verdrängungsmechanismus des konstitutiven Sigmafaktors σ^{70} durch den vermehrt synthetisierten Sigmafaktor σ^{32} , obwohl die verschiedenen Sigmafaktoren im Zytoplasma um das RNA-Polymerase Kernenzym konkurrieren (Seiffert, 1998). Diese Theorie erklärt nämlich nicht die Tatsache, dass die Mehrzahl der 59 untersuchten ORFs in ihrer Expression nicht beeinträchtigt wurde.

Eine Überproduktion von Proteinen ruft bei *E. coli* eine Verminderung der Wachstumsrate hervor (Dong *et al.*, 1995). Über welche Mechanismen es zu dieser Wachstumshemmung kommt ist unbekannt. Oh *et al.* untersuchten daher mit DNA Mikroarrays die Auswirkung einer Überproduktion von dem löslichen, nicht toxischen Protein LuxA in *E. coli* auf die Expression von 132 Genen (in der Mehrzahl Stoffwechselgene der Glykolyse, des Zitratzyklus, der Biosynthese und der Atmungskette) (Oh *et al.*, 2000). Eine Proteinüberproduktion führte unter anderem zu einer Hochregulation von *dnaJ*, *dnaK* und anderen Hitzeschock-Proteinen. Dies und die Induktion von σ^E zeigten, dass eine Überproduktion von LuxA einen Stressreiz, also eine Hitzeschock-Reaktion in den Bakterien induziert. Die Tatsache, dass eine Hitzeschock-Reaktion durch den Anstieg der intrazellulären Spiegel nicht gefalteter Proteine ausgelöst werden kann, wurde bereits von Parsell *et al.* 1989 gezeigt. Im Rahmen dieser Stressreaktion bei *E. coli* konnte bestätigend zu den Hitzeschock-Versuchen bei *N. meningitidis* auch eine Herunterregulation von *sucA* und *atpA* gefunden werden. Die übrigen herunterregulierten ORFs bei *N. meningitidis* konnten durch die Arbeit von Oh leider nicht bestätigt werden, da sie nicht unter den 132 untersuchten Genen waren. Insgesamt bestätigt die Arbeit von Oh *et al.* die beobachtete Herunterregulation von Stoffwechselgenen bei *N. meningitidis* im Hitzeschock. Weder die Hitzeschock-Reaktion noch irgendein anderes bekanntes Regulationssystem erklärt aber hinreichend diesen hoch komplexen Vorgang (Oh *et al.*, 2000).

4.3 Phänotypische Bestätigung der DNA Mikroarrays

Auch die *pil* Gene *pilM* bis *pilQ* wurden bei den Hitzeschock-Experimenten herunterreguliert. Sie zeigten wie die anderen deregulierten Gene eine mit steigender Temperatur im Hitzeschock zunehmende Deregulation. Dies deutet zumindest darauf hin, dass die Hitzeschock-Reaktion ursächlich an der verminderten Expression der *pil* Gene beteiligt ist. In der Literatur ist bisher nichts über einen Einfluss des Hitzeschocks auf die Transformation bekannt. Die *pil* Gene (NM 1808 bis NM 1810) sind zwar nicht aktiv am Prozess der Transformation, also der Aufnahme freier DNA ins Bakterium beteiligt (www.tigr.org), dafür aber essentiell für die Biogenese der Typ IV Pili in zahlreichen gramnegativen Bakterien (Yoshihara *et al.*, 2000; Roine *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1995). Typ IV Pili sind für den ersten Schritt der Transformation, die Bindung der freien DNA, verantwortlich (Facijs *et al.*, 1996). Mit einer verminderten Synthese der Typ IV Pili sollte daher auch eine verminderte Transformationsaktivität einhergehen. Die übrigen untersuchten Gene, die aktiv an der Transformation beteiligt sind, wurden durch den Hitzeschock aber nicht beeinflusst: PilC und PilE bilden den Typ IV Pilus und sind für die Bindung und den Transport der DNA über die äußere Membran zuständig, ComL für den anschließenden Transport durch die Mureinschicht. ComA transferiert die DNA über die zytoplasmatische Membran ins Zytosol, wo RecA für die Rekombination der aufgenommenen DNA verantwortlich ist (Facijs *et al.*, 1996).

Es stellte sich nun die Frage, die bei der Etablierung von DNA Mikroarrays letztendlich auftritt: Kann von einer gemessenen Änderung des Expressionsmusters auf mRNA Basis auf eine Veränderung des Phänotypes geschlossen werden? Um diese Fragen beantworten zu können, wurde der Einfluss eines Hitzeschocks auf die Transformationsaktivität von *N. meningitidis* phänotypisch untersucht. Tatsächlich wurde durch einen Hitzeschock mit 45°C die Transformationsaktivität von *N. meningitidis* auf nur noch ein Zehntel herabgesetzt, verglichen mit einer Kultur, die keinem Hitzeschock ausgesetzt worden war. Diese hoch signifikante Änderung der Transformationsaktivität belegte die Daten aus den DNA Mikroarray Experimenten deutlich. Die Herleitung, dass eine Herunterregulation der *pilM-Q* Gene mit einer verminderten Transformationsaktivität einhergehen müsste, stellte sich als korrekt heraus.

Der Hitzeschock stellt nur einen zeitlich begrenzten Stressreiz dar. Die Auswirkungen auf die Physiologie der Zelle oder des Bakteriums sind daher ebenfalls begrenzt. Mit

zunehmender Dauer werden die Schäden des Hitzeschocks repariert und das Bakterium kehrt langsam in den Zustand vor dem Reiz zurück. Während die maximale Produktion der Hitzeschock-Proteine bereits nach weniger als zehn Minuten erreicht ist, fällt sie auch schon wieder nach ca. 30min stark ab (Lemaux *et al.*, 1978; Herendeen *et al.*, 1979). Dieser zeitliche Verlauf sollte auch bei der Transformationsaktivität nach einem Hitzeschock nachweisbar sein. Bei einer Zugabe der zu transformierenden DNA schon 20min nach dem Hitzeschock wurde eine Verminderung der Transformationsaktivität auf 10% gemessen. In einem zweiten Experiment wurde die DNA daraufhin erst 60min nach dem Hitzeschock zugegeben. Wie zu erwarten, war der Einfluss des Stressreizes nicht mehr so stark nachweisbar wie noch 40min vorher. Die Transformationsaktivität war wieder auf 30% einer vergleichbaren Kultur ohne Hitzeschock angestiegen. Dieser zeitliche Verlauf korreliert also erwartungsgemäß mit dem des Hitzeschocks.

4.4 Ausblick auf zukünftige Einsatzmöglichkeiten der DNA

Mikroarrays

In den nächsten Schritten stand die Etablierung der DNA Mikroarray Technik auf Basis des gesamten Genoms von *N. meningitidis* an (Guckenberger *et al.*, 2002). Die Hitzeschock-Reaktion ist bereits bei einigen Bakterien auf Genombasis mit DNA Mikroarrays untersucht worden. Bei *E. coli* konnten 119 Gene gefunden werden, die durch einen Hitzeschock von 50°C in der Transkription beeinflusst werden, 77 wurden induziert und 42 reprimiert (Richmond *et al.*, 1999). Gruppe A Streptokokken reagierten auf eine Temperatursteigerung von 29°C auf 37°C mit einer Deregulation von 9% aller ORFs (Smoot *et al.*, 2001). Mit cDNA Mikroarrays auf Nylonmembranen konnten bei *Bacillus subtilis* 125 durch Stress induzierbare Gene nachgewiesen werden (Peterson *et al.*, 2001). Interessant wäre ein Vergleich der Hitzeschock-Reaktion auf Genombasis zwischen *N. meningitidis* und den anderen genannten Bakterien. Durch die Untersuchung der Transkriptionsmuster von Deletionsmutanten, z.B. $\Delta rpoH$, könnte der selektive Einfluss verschiedener Gene auf die Steuerung des Hitzeschocks gemessen werden. Weitere Informationen über die Steuerung dieser komplexen zellulären Reaktion kann die Analyse des Proteoms im Hitzeschock, besonders im Vergleich mit dem Transkriptom, einbringen.

Ein Schwerpunkt der Anwendung der DNA Mikroarray Technik bei *Neisseria meningitidis* wird die Suche nach bisher unbekanntem Pathogenitätsfaktoren sein. Wells *et al.* studierten mittels Mikroarrays die differentielle Expression von 3.528 Genen in Arachnoidalzellen Zellen bei einer Infektion mit *N. meningitidis* (Wells *et al.*, 2001). Sie fanden dabei eine Hochregulation von verschiedenen Interleukinen (IL-6 und IL-8) und von TNF α und konnten damit eine zytoprotektive Reaktion von humanen Zellen auf eine Infektion mit pathogenen Bakterien beweisen. Im Mittelpunkt steht nun die Frage, wie die Meningokokken bei einer Infektion von arachnoidalen, endothelialen oder epithelialen Zellen vorgehen, welche Gene hier aktiv sind.

Diese Pathogenitätsfaktoren stellen natürlich potentielle Angriffspunkte für neue Impfstoffe dar (Ivanov *et al.*, 2000). Einmal könnten die gefundenen Pathogenitätsfaktoren direkt als Protein-Impfstoffe getestet werden. Über Computeranalysen ließen sich aus den Pathogenitätsfaktoren diejenigen herausfiltern, die wahrscheinlich an der Oberfläche der Bakterien lokalisiert sind. Die sichere Expression des Pathogenitätsfaktors während einer Infektion und die Erreichbarkeit des Pathogenitätsfaktors an der Oberfläche des Bakteriums für Antikörper sollten es dieser neuen Methode der Impfstoffforschung ermöglichen, Vakzinekandidaten zu finden, die bakterizide Antikörper induzieren können. Allerdings müssten diese neuen Vakzinekandidaten dann noch beweisen, dass sie zwischen den verschiedenen Stämmen von *N. meningitidis* konserviert und damit antigenetisch identisch sind.

Ein alternativer Ansatz in der Impfstoffforschung wäre die Konstruktion von *N. meningitidis* Deletionsmutanten, welchen essentielle Pathogenitätsfaktoren für die Infektion der Meningen und für die Induktion von Sepsis fehlen würden, die aber immer noch infektiös wären. Diese Stämme könnten als Lebendvakzine einen Impfschutz gegen die Serogruppe B induzieren, ohne klinische Krankheitssymptome zu verursachen. Dabei müsste natürlich unter anderem sichergestellt sein, dass diese Mutante die fehlenden Pathogenitätsfaktoren nicht wieder z.B. durch Transformation aufnehmen kann.

4.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend gelang es in dieser Arbeit, die DNA Mikroarray Technologie für die Untersuchung des Transkriptoms bei *Neisseria meningitidis* zu etablieren. Die RNA Expressionsanalysen erlaubten nicht nur eine sichere Unterscheidung deregulierter Gene von Genen mit konstanter Expression, sondern es konnte auch das Ausmaß der Deregulation bestimmt werden. Die Daten der DNA Mikroarray Experimente wurden mit der etablierten Technik der RT-PCR exakt bestätigt. Bei den Hitzeschock-Versuchen mit *Neisseria meningitidis* konnten zahlreiche ORFs als Hitzeschock-Gene identifiziert werden. Die Funktion dieser Gene, darunter *groEL/groES* und *dnaJ/dnaK*, war bereits bei anderen Organismen beschrieben worden, was die Qualität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unterstreicht. Es konnte gezeigt werden, dass die Intensität des Hitzeschocks und damit die Deregulation der Hitzeschock-Gene mit steigender Temperatur zunimmt. Daneben wurde erstmals die transkriptionelle Beeinflussung von Genen aus dem Bereich der Transformation durch einen Hitzeschock gefunden. Diese Daten konnten durch einen phänotypischen Nachweis der Verminderung der Transformationsaktivität von Meningokokken nach einem Hitzeschock bestätigt werden. Diese neue Technik wird eine der Schlüsseltechnologien für die Forschung in der postgenomischen Ära sein. Viele Fragen in dem noch lückenhaften Wissen über die Pathologie von *Neisseria meningitidis* sollten sich in Zukunft mit Hilfe der DNA Mikroarrays beantworten lassen.

5 Anhang

5.1 Liste der *N. meningitidis* ORFs

Hitzschock Gene

<i>Gen-Locus in NM B MC58</i>	Gen-Name
<i>NMB 0027</i>	FkbP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (<i>fbp</i>)
<i>NMB 0059</i>	heat shock protein (<i>dnaJ</i>)
<i>NMB 0550</i>	thiol:disulfide interchange protein (<i>dsbC</i>)
<i>NMB 0554</i>	heat shock protein 70 (<i>dnaK</i>)
<i>NMB 0791</i>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
<i>NMB 1027</i>	dnaJ protein, truncation
<i>NMB 1131</i>	chaperone protein HscA (<i>hscA-I</i>)
<i>NMB 1313</i>	trigger factor (<i>tig</i>)
<i>NMB 1366</i>	thioredoxin
<i>NMB 1519</i>	thiol:disulfide interchange protein (<i>dsbD</i>)
<i>NMB 1522</i>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FkbP-type (<i>slyD</i>)
<i>NMB 1649</i>	disulfide bond formation protein B (<i>dsbB</i>)
<i>NMB 1845</i>	thioredoxin
<i>NMB 1972</i>	heat shock protein (<i>groEL</i>)
<i>NMB 1973</i>	chaperonin (<i>groES</i>)

Kompetenz Gene

<i>NMB 0018</i>	pilin PilE (<i>pilE</i>)
<i>NMB 0049</i>	pilC2 protein, authentic frameshift (<i>pilC2</i>)
<i>NMB 0116</i>	DNA processing chain A (<i>dprA</i>)
<i>NMB 0118</i>	DNA topoisomerase(<i>topA</i>)
<i>NMB 0269</i>	competence protein
<i>NMB 0329</i>	type IV pilus assembly protein (<i>pilF</i>)
<i>NMB 0332</i>	type IV prepilin peptidase (<i>pilD</i>)
<i>NMB 0405</i>	competence protein (<i>comM</i>)
<i>NMB 0692</i>	tpc protein (<i>tpc</i>)
<i>NMB 0702</i>	competence protein A (<i>comA</i>)
<i>NMB 0703</i>	competence protein L (<i>comL</i>)
<i>NMB 1445</i>	recA protein (<i>recA</i>)
<i>NMB 1715</i>	multiple transferable resistance system protein MtrD (<i>mtrD</i>)
<i>NMB 1808</i>	pilM protein (<i>pilM</i>)
<i>NMB 1809</i>	pilN protein (<i>pilN</i>)
<i>NMB 1810</i>	pilO protein (<i>PilO</i>)
<i>NMB 1811</i>	pilP protein (<i>pilP</i>)
<i>NMB 1812</i>	pilQ protein (<i>pilQ</i>)
<i>NMB 1847</i>	pilC1 protein, authentic frameshift (<i>pilC1</i>)

Restriktions- Modifikations- Gene

NMB 0829	type I restriction enzyme EcoR124II M protein (<i>hsdM</i>)
NMB 0831	type I restriction enzyme S protein, degenerate
NMB 0835	type I restriction enzyme EcoR124II R protein
NMB 1289	type II restriction enzyme
NMB 1375	modification methylase, putative, authentic frameshift

Energie Metabolismus

NMB 0207	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (<i>gapA-1</i>)
NMB 0950	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit (<i>sdhA</i>)
NMB 0951	succinate dehydrogenase, iron-sulfur protein (<i>sdhB</i>)
NMB 0955	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component (<i>sucA</i>)
NMB 1341	pyruvate-dehydrogenase (<i>pdhA</i>)
NMB 1936	ATP synthase F1 subunit (<i>atpA</i>)
NMB 1940	ATP synthase F0 subunit (<i>atpB</i>)
NMB 2159	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (<i>gapA-2</i>)

Sigmafaktoren

NMB 1538	RNA polymerase sigma-70 factor (<i>rpoD</i>)
NMB 0712	RNA polymerase sigma-32 factor (<i>rpoH</i>)
NMB 2144	sigma faktor

NQR-Operon

NMB 0564	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase, subunit F (<i>nqrF</i>)
NMB 0565	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase, subunit E (<i>nqrE</i>)
NMB 0566	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase, subunit D (<i>nqrD</i>)
NMB 0567	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase, subunit C (<i>nqrC</i>)
NMB 0568	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase, subunit B (<i>nqrB</i>)
NMB 0569	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase, subunit A (<i>nqrA</i>)

NOR

NMB 1622	nitric oxide reductase (<i>norB</i>)
----------	--

Weitere Gene

NMB 2044	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (<i>ptsI</i>)
NMB 1588	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase (<i>pgsA</i>)

Die Namen der Gene sind im original Englischen belassen, da sich aus ihnen die Abkürzungen ergeben.

5.2 Primer *Neisseria meningitidis*

Oligoname	Oligonukleotid Sequenz (in 5' → 3' - Richtung)	Länge PCR Produkt (bp)
NMB0018F	CCCTTATCGAGCTGATGATTG	480
NMB0018R	GCTGGCATCACTTGCGTCG	
NMB0027F	ATGGGCGGCCTGATTATTGA	350
NMB0027R	TTCGTACACTTTCAGCAGCT	
NMB0049F	CATTCAACAAAGAAGAAAAAGAC	480
NMB0049R	AGACGTTTCCCTGTTTGATG	
NMB0059F	CGGTCAAGACGGTGGAAGT	480
NMB0059R	TCGCGCAGCTTGTCTAAAAA	
NMB0116F	TGGTTGAAGCCGCGTTGGAA	480
NMB0116R	GTTCCGGATACGCTGGTATCT	
NMB0118F	GTCGTTTTGTTGCGTGTGCC	480
NMB0118R	GGGCGGTTCAATCTGTTCTT	
NMB0207F	ATCCACGCGCTGACCAACGA	480
NMB0207R	TTGAGCGGGCGCACTTCAAG	
NMB0269F	TGCATTACGAACCGCCCGTC	480
NMB0269R	ATTGGCGTGCGTGCCAGCGT	
NMB0329F	TGCGATTAAGGCGGCACAA	480
NMB0329R	GCCGTTACCTCTTCCAATGA	
NMB0332F	CCTGGCAATACGGCTGGTCT	480
NMB0332R	CAGCACCGGATGGGTCAG	
NMB0405F	GCCGTCTATCCTGCCAAATT	480
NMB0405R	CCTATGGCTTTCATGACGTGG	
NMB0550F	GGCAGATTATCTACACCGAT	480
NMB0550R	GCGGATGATTTCTCCAGTT	
NMB0554F	CGAAGTAACCTTCGACATCG	480
NMB0554R	AAAGTCGGCATCTACGACAT	
NMB0564F	AAATGTCGTCTACATCTGG	480
NMB0564R	ACCGCCGAAATCGTCCAAGA	
NMB0565F	ATGGAACACTATTTGAGCCTC	480
NMB0565R	GGTAATGCCCGCCAAAGC	
NMB0566F	CCATCGTGATGGGTATTTCC	480
NMB0566R	TTCCTCCGCCTGTTCCGGTT	
NMB0567F	CTGCCCAAAGCATCCGCATC	480
NMB0567R	TGCGCTCCTGCTGATTTCAA	
NMB0568F	AACCATCACTTGGATGGACG	480
NMB0568R	CCATTGCTGCGCGCCTTTCT	

NMB0569F	CTGCGGGCGAATTGGTTGAC	480
NMB0569R	GCCTTCCTTCTCAATGGTTTC	
NMB0692F	AGCGGAACGCACTGCCAAAG	480
NMB0692R	CGTTACCTGACCGGCGATAC	
NMB0702F	TTATGAGGGGGCGCGGCATT	480
NMB0702R	CTGCCAATAGAATTTATACCC	
NMB0703F	GGACTACGCGCTATACCTGC	480
NMB0703R	GTGCCAGTAACGCCACCAGG	
NMB0712F	CACCACCAAACCGCAACGCA	480
NMB0712R	ACCGCTTCGGCTTCTTCGGT	
NMB0791F	TGATTATCCTGCACACCAAC	500
NMB0791R	TACCGCTTCGGCTTTAATGAT	
NMB0829F	AATCCGCCTTATTCCATCAAC	480
NMB0829R	TTCGCGTGTGTCTTCGGCT	
NMB0831F	GCTGGAGGCGACGTACCAAA	480
NMB0831R	GAAGCTCAACAACCTGCCCGC	
NMB0835F	GAGGTGGATTTGCTCAAATC	480
NMB0835R	CGGTCCCTATTCCGGCAAAC	
NMB0950F	GGAAACCTTTGCCTGCTAAT	480
NMB0950R	ATAAACGCGCTTGGCCGGTTT	
NMB0951F	GGCGTGTTTGACCGATCTGC	480
NMB0951R	CGGCCCGTTTCAACATAATC	
NMB0955F	CCGCTGGTGATTTTCATGTC	480
NMB0955R	CAATGCCAAAGCGTCTTCAA	
NMB1027F	AAACGGATGCAATACGACGC	480
NMB1027R	GCGGTAGAAATACCAGACGT	
NMB1131F	GCGGCATTCCGCCTATGGC	480
NMB1131R	CGACACTCTGGCCTGTCAGC	
NMB1289F	CTGATTTGGATAGCTTCATT	480
NMB1289R	ACTAACCTGCTGAGACTTTATA	
NMB1313F	AACGCCGCGTAAACGAACAA	480
NMB1313R	GCTTGCGCGCCCATCACTTC	
NMB1341F	TTGATGGGCTCCGGTACCAT	480
NMB1341R	GCGTTTCCAGCTAGGAGCTGA	
NMB1366F	ATGAGCAGCGAATTGATTGTA	330
NMB1366R	GGCGATAGAGGCTTCGACAA	
NMB1375F	GAACCGCCAATATATCGGTA	480
NMB1375R	TTCGCCATCTTTTTCTCCG	
NMB1445F	GTGTTCATCAACCAATCCG	480
NMB1445R	TTCTTCGGGGCGTTCGCCGT	
NMB1519F	TCGCATTGGGCGGTATATTG	480
NMB1519R	GCGGTTTTGTTACATACCACT	
NMB1522F	TGGCTATCGTGAAAAATTCC	480
NMB1522R	GTGGTGGTGATGACCGTGCG	
NMB1538F	CCATCAACAAGATGAACCGC	480
NMB1538R	CAGCTTGCTGTCTTCGCTGTCC	
NMB1588F	ATGCCTTGAATCTCCCAT	560

NMB1588R	GCGGATTTCTTTCCACGCCAT	
NMB1622F	CCTGCGTTGGCCGCTGATGT	480
NMB1622R	CCGAATACGATTTTAGTGCC	
NMB1649F	AGCCGTTTGGCTGCTGTTT	430
NMB1649R	CCAAACCGTCAGGACAACC	
NMB1715F	GTGCGGCTGCGGGCGTAA	480
NMB1715R	ATGTTGGCTGTCGTCCGAAC	
NMB1808F	GTCGCCATTTTCGGCGTATA	480
NMB1808R	TAATCCCCGTACCGCAAAC	
NMB1809F	CAACCTACCTGTTTATCGAC	480
NMB1809R	TTGCCTCCTGTGCGTTTCCC	
NMB1810F	CCTGCCAGGCTTTTTATCG	480
NMB1810R	GGATTGCCGCCGTTTTCC	
NMB1811F	ATGAAACACTATGCCTTACTC	480
NMB1811R	TTGTTCTGCGGCAGGTGCTG	
NMB1812F	AAAACGCTTGCCAATCCGCG	480
NMB1812R	ATAGCGCAGGCTGTTGCCGG	
NMB1845F	AAAAGAACTGCTTTCGGGC	480
NMB1845R	ACCGAAAACATCCGCTGAA	
NMB1847F	CCGCCTTTGTAACCATCCGC	480
NMB1847R	GAAGAAGACTTCACGCCAGCTGATTCGT	
NMB1936F	TCTTGGAACCGACCTCTTC	480
NMB1936R	GCCTGATAGGCGTAAGAAGA	
NMB1940F	GATTTGCTGCCGATGGTATG	485
NMB1940R	CATCATGTGCCTGTCCGAT	
NMB1972F	GTCGGTGCCGCGACCGAAGT	480
NMB1972R	CATCATGCCGCCCATACCAC	
NMB1973F	ATGACCATCCGTCTTTACA	290
NMB1973R	TTTTTCAACGATGCCGAAAATA	
NMB2044F	TCGGCATCGGCTGTATGATT	480
NMB2044R	TTCCGCCCTTGAAGTCGG	
NMB2144F	GGCTGAAGATTTAGTGCAGG	480
NMB2144 R	CTTCGGGTTTTCTTGGTTGA	
NMB2159F	GGTCTGATGACCACCATCCA	480
NMB2159R	GCCTGCGAAGTATTCAAAG	

5.3 Primer zur Herstellung der internen Standards

Gen	Oligoname	Oligonukleotid Sequenz (in 5' → 3' - Richtung)	Länge PCR Produkt (bp)
CHS1	Sacc1F	TGATCAAATAAGCGGCCGCGAAATGAATATC	980
	Sacc1R	TTTATCAATAGTCTCGAGATCATCGTACTC	
GAS1	Sacc2F	CTTTCAAAGTTAGCGGCCGCTGCTGCTTTTTT	1060
	Sacc2R	ACAAGCCTCCGTCTCGAG7rGGTGGTAATT	
FKS1	Sacc3F	TATCAGGGCCAAGCGGCCGCTACCCAGGGACC	590
	Sacc3R	TCAGGAGACATTCTCGAGGACC	
CHS2	Sacc4F	CTAACGTTTTCCGCGGCCCGCCGCATCTCCT	1020
	Sacc4R	CGTTGATAGAGACTCGAGTTGTCAATTCAA	

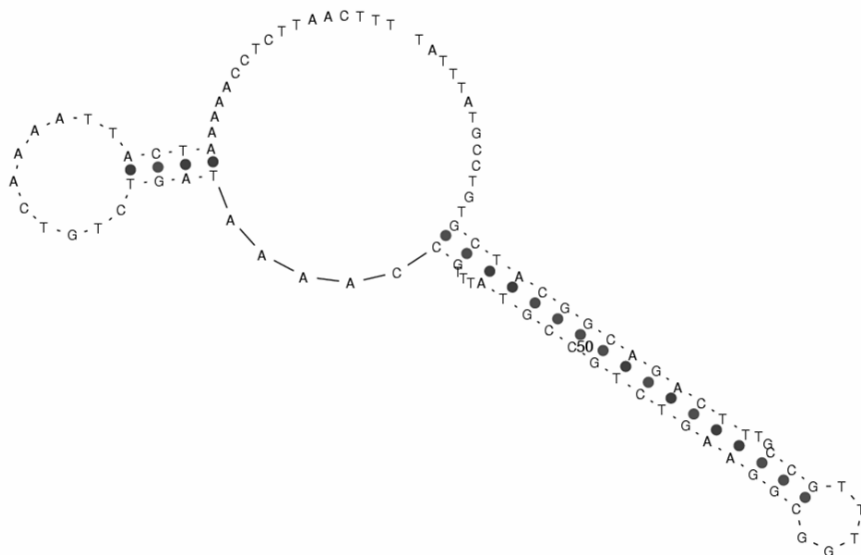


Abbildung 23. Von mfold berechnete Sekundärstruktur der Sequenz zwischen NM 1972 und 1973

6 Literaturverzeichnis

Arakere G, Kessel M, Nguyen N, Frasch CE. Characterization of a stress protein from group B *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 175(1993) 3664-3668

Arsene F., Tomoyasu T., Bukau B. The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol.* 55 (2000) 3-9

Belcher, C.E., Drenkow, J., Kehoe, B., Gingeras, T.R., McNamara, N., Lemjabbar, H., Basbaum, C. and Relman, D.A. From the cover: the transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (2000) 13847-52.

Bhattachajee AK, Jennings HJ, Kenny CP, Martin A and Smith ICP. Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with ¹³C-nuclear magnetic resonance. *J Biol Chem.* 250 (1975) 1926-1932.

Blake M.S., Gotschlich E.C., in: Inouy E.M. (Ed.), *Bacterial outer membranes as model Systems*, John Wiley & Sons, New York (1987) 377-400

Blaszczak, A., M. Zylicz, C. Georgopoulos, and K. Liberek. Both ambient temperature and the DnaK chaperone machine modulate the heat shock response in *Escherichia coli* by regulating the switch between σ^{70} and σ^{32} factors assembled with RNA polymerase. *EMBO j.* 14 (1995) 5085-5093

Blaszczak, A., C. Georgopoulos, and K. Liberek. On the mechanism of FtsH-dependent degradation of the σ^{32} transcriptional regulator of *Escherichia coli* and the role of the DnaK chaperone machine. *Mol. Microbiol.* 31 (1999) 157-166.

Boulnois GJ, Roberts IS, Hodge R, Hardy KR, Jann KB, Timmis KN. Analysis of the K1 capsule biosynthesis genes of *Escherichia coli*: definition of three functional regions for capsule production. *Mol Gen Genet* 208 (1987) 242-246

Brazma A, Vilo J. Gene expression data analysis. *FEBS Lett* 480 (2000) 17-24

Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Roberts, Keith Roberts James D. Watson. *Molecular Biology of the Cell* 3rd edition, Garland Pub (1994) 3-32

Bukau, B. *Molecular Chaperones and Folding Catalysts Regulation, Cellular Function and Mechanisms*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, (1999) 690

Bukau B. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol.* 9 (1993) 671-680.

Burton, Z., R. R. Burgess, J. Lin, D. Moore, S. Holder, und C. A. Gross. The nucleotide sequence of the cloned *rpoD* gene for the RNA polymerase sigma subunit from *E. coli* K12. *Nucleic Acids Res* 12 (1981) 2889-2903

Campbell JD, Edelman R, King JC Jr, Papa T, Ryall R, Rennels MB. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of a tetravalent meningococcal polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine given to healthy adults. *J Infect Dis* 12 (2002) 1848-1851

- Cartwright K. Meningococcal carriage and disease. In: Cartwright K (ed). Meningococcal disease. Chichester: John Wiley and Sons Ltd. (1995) 115-146
- Cartwright K., and D. A. AlàAldeen. Neisseria meningitidis: clinical aspects. J. Infect. 34 (1997) 15 – 19
- Claassen I, Meylis J, van der Ley P, Peeters C, Brons H, Robert J, Borsboom D, van der Ark A, van Straaten I, Roholl P, Kuipers B, Poolman J. Production, characterization and control of a Neisseria meningitidis hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. Vaccine 14 (1996) 1001-1008
- Claire M. Fraser, Jonathan A. Eisen & Steven L. Salzberg. Microbial genome sequencing. Nature. 406 (2000) 799 – 803
- Claus H, Frosch M, Vogel U. Identification of a hotspot for transformation of Neisseria meningitidis by shuttle mutagenesis using signature-tagged transposons. Mol Gen Genet 259 (1998) 363-371
- Cohen,P., Bouaboula,M., Bellis,M., Baron,V., Jbilo,O., Poinot-Chazel,C., Galiegue,S., Hadibi,E.H. and Casellas, P. Monitoring cellular responses to Listeria monocytogenes with oligonucleotide arrays. J. Biol. Chem. 275 (2000) 11181-11190.
- Connolly, M. and Noah, N. Is group C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993-6. Epidemiol.Infect. 122 (1999) 41-49.
- Councilman, W.T., Mallory, F.B. and Wright, J.H.. Epidemic cerebro-spinal meningitis and its relation to other forms of meningitis. Report of the State Board of Health of Massachusetts, Boston (1898) 1- 178
- Cowing, D. W., J. C. A. Bardwell, E. A. Craig, C. Woolford, R. W. Hendrix, and C. A. Gross. Consensus sequence for Escherichia coli heat shock gene promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 2679-2683
- Cummings CA, Relman DA. Using DNA microarrays to study host-microbe interactions. Emerg Infect Dis 6 (2000) 513-525
- Danese, P., and T. Silhavy. The σ^E and Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in Escherichia coli. Genes Dev. 11 (1997)1183-1193.
- De Las Penas, A., L. Connolly, and C. A. Gross. σ^E is an essential sigma factor in Escherichia coli. J. Bacteriol. 179 (1997a) 6862-6864.
- De Las Penas, A., L Connolly, and C. A. Gross. The sigma E-mediated response to extracytoplasmic stress in F, Escherichia coli is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigma E. Mol. Microbiol. 24 (1997b) 373-385.
- de Saizieu,A., Certa,U., Warrington,J., Gray,C., Keck,W. and Mous, J. Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. Nat. Biotechnol. 16 (1998) 45-48

- de Vries FP, Cole R, Dankert J, Frosch M, van Putten JP. Neisseria meningitidis producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Mol Microbiol* 27 (1998) 1203-1212
- Decosas J, Koama JB. Chronicle of an outbreak foretold: meningococcal meningitis W135 in Burkina Faso. *Lancet Infect Dis* 12 (2002) 763-765
- Delcher, A.L., Harmon, D., Kasif, S., Whithe, O., & Salzburger, S.L. Improved microbial gene identification with Glimmer. *Nucleic Acid Res.* 27 (1999) 4636 - 4641
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278 (1997) 680-686
- DeVoe, I.W. The meningococcus and mechanism of pathogenicity. *MicrobiolRev.* 46 (1982) 162-190
- Dietrich G, Schaible UE, Diehl KD, Mollenkopf H, Wiek S, Hess J, Hagens K, Kaufmann SH, Knapp B. Isolation of RNA from mycobacteria grown under in vitro and in vivo conditions. *FEMS Microbiol Lett* 2000 (186) 177-180
- Dong, H., Nilsson, L., and Kurland, C. G. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J. Bacteriol.* 177 (1995) 1497-1504.
- Drake SL, Koomey M. The product of the pilQ gene is essential for the biogenesis of type IV pili in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 18 (1995) 975-986
- Drake SL, Sandstedt SA, Koomey M. PilP, a pilus biogenesis lipoprotein in *Neisseria gonorrhoeae*, affects expression of PilQ as a high-molecular-mass multimer. *Mol Microbiol* 23 (1997) 657-668
- Eckmann,L., Smith,J.R., Housley,M.P., Dwinell,M.B. and Kagnoff,M.F. Analysis by high density cDNA arrays of altered gene expression in human intestinal epithelial cells in response to infection with the invasive enteric bacteria *Salmonella*. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 14084-14094
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 14863-14868
- Epidemiologisches Bulletin. Robert Koch Institut. Nr. 35 (2000)
- Erickson, J. W., V. Vaughn, W. A. Walter, F. C. Neidhardt, and C. A. Gross. Regulation of the promoters and transcripts of rpoH, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. *Genes Dev.* 1 (1987) 419-432.
- Erickson, J. W., and C. A. Gross. Identification of the σ^E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate σ factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev.* 3 (1989)1462-1471.

- Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton JC. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 1 (2003) 103-118
- Facijs D, Fussenegger M, Meyer TF. Sequential action of factors involved in natural competence for transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Microbiol Lett* 137 (1996) 159-164
- Frosch M, Roberts I, Gorgen I, Metzger S, Boulnois GJ, Bitter-Suermann D. Serotyping and genotyping of encapsulated *Escherichia coli* K1 sepsis isolates with a monoclonal IgG anti K1 antibody and K1 gene probes. *Microb Pathog* 5 (1987) 319-326
- Frosch, M., Edwards, U., Bousset, K., Krauß, B., and Weisgerber, C. Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gramnegative bacteria expressing group B H capsular polysaccharide. *Mol. Microbiol* 5 (1991) 1251-1263.
- Fussenegger M, Rudel T, Barten R, Ryll R, Meyer TF. Transformation competence and type-4 pilus biogenesis in *Neisseria gonorrhoeae*-a review. *Gene* 192 (1997)125-134
- Gamer, J., Multhaup G., Tomoyasu J., McCarty, J.S., Rüdiger, S., Schönfeld H.-J., Schirra, C., Bujard, H. and Bukau, B. A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor σ^{32} . *EMBO J.* 15 (1996) 607-617
- Gibbs C.P., Reimann BY, Schultz E., Kaufmann A., Haas R., Meyer TT., Reassortment of pilin genes in *Neisseria gonorrhoeae* occurs by two distinct mechanisms, *Nature* 338 (1989) 651-652.
- Gisela Storz et Regine Hengge-Aronis. *Bacterial Stress Responses* 1st edition, Amer Society for Microbiology (2000)
- Goldblatt D. Immunisation and the maturation of infant immune responses. *Dev Biol Stand* 95 (1998) 125-132
- Griffiss JM, Schneider H, Mandrell RE, Yamasaki R, Jarvis GA, Kim JJ, Gibson BW, Hamadeh R, Apicella MA. Lipooligosaccharides: the principal glycolipids of the neisserial outer membrane. *Rev Infect Dis* 10 (1988) 287-295
- Griffiss JM, Yamasaki R, Estabrook M, Kim JJ. Meningococcal molecular mimicry and the search for an ideal vaccine. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85 Suppl 1 (1991) 32-36
- Groisman EA, Ochman H. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* 5 (1997) 343-349
- Gross, C. A. Function and regulation of the heat shock proteins, In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C. (1996) 1382-1399

- Grossman, A. D., J. W. Erickson, and C. A. Gross. The *htpR* gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters. *Cell* 38(1984)383-390.
- Guckenberger M, Kurz S, Aepinus C, Theiss S, Haller S, Leimbach T, Panzner U, Weber J, Paul H, Unkmeir A, Frosch M, Dietrich G. Analysis of the heat shock response of *Neisseria meningitidis* with cDNA- and oligonucleotide-based DNA microarrays. *J Bacteriol* 9 (2002) 2546-2551
- Helmann, J. D. und M. J. Chamberlin.. Structure and function of bacterial sigmafactors. *Annu Rev Biochem* 57 (1988) 839-872
- Hendrick JP, Hartl FU. The role of molecular chaperones in protein folding. *FASEB J* 15 (1995) 1559-1569
- Henry MD, Yancey SD, Kushner SR. Role of the heat shock response in stability of mRNA in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 174 (1992) 743-748
- Herendeen, S. L., R. A. VanBogelen, and F. C. Neidhardt. Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* 139 (1979) 185-194
- Herman C., D. Thevenet, R. D' Ari, and P. Bouloc. Degradation of σ^{32} , the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 3516-3520.
- Hughes TR, Shoemaker DD. DNA microarrays for expression profiling. *Curr Opin Chem Biol* 5 (2001) 21-25
- Ichikawa, J.K., Norris, A., Banger, M.G., Geiss, G.K., van't Wout, A.B., Bumgarner, R.E. and Lory, S. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with epithelial cells: identification of differentially regulated genes by expression microarray analysis of human cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 15 (2000) 9659-9664.
- Ivanov I, Schaab C, Planitzer S, Teichmann U, Machl A, Theml S, Meier-Ewert S, Seizinger B, Loferer H. DNA microarray technology and antimicrobial drug discovery *Pharmacogenomics* 1 (2000) 169-178.
- Jamuna R, Srinivasan S, Harish BN. Factors predicting occult bacteremia in young children. *Indian J Pediatr* 10 (2000) 709 – 711
- Jodar L, Feavers IM, Salisbury D, Granoff DM. Development of vaccines against meningococcal disease. *Lancet* 359 (2002) 1499-1508
- Jones DM, Jephcott AE. *Neisseria*, *Branhamella*, *Moraxella*, *Kingella*. In: Parker MT, Collier LH (eds). *Principles of bacteriology, virology and immunity*. Parker MT, Duerden BI (eds), London: Edward Arnold. Vol 2 (1990) 303-320
- Jones DM, Borrow R, Fox AJ, Gray S, Cartwright KA, Poolman JT. The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. *Microb Pathog* 13 (1992) 219-224

- Joo, D. M., A. Nolte, R. Calendar, Y.-N. Zhou, and D. J. Jin. Multiple regions on the *Escherichia coli* heat shock transcription factor σ^{32} determine core RNA polymerase binding specificity. *J. Bacteriol.* 180 (1998) 1095-1102.
- Kallipolitis, B. H., and P. Valentin-Hansen. Transcription of *rpoH*, encoding the *Escherichia coli* heat-shock regulator σ^{32} , is negatively controlled by the cAMP-CRP/CytR nucleoprotein complex. *Mol. Microbiol.* 29 (1998) 1091-1099
- Kamath-Loeb, A. S., and C. A. Gross. Translational regulation of σ^{32} synthesis. requirement for an internal control Element. *J. Bacteriol.* 173 (1991)3904-3906.
- Kasimoglu E, Park SJ, Malek J, Tseng CP, Gunsalus RP. Transcriptional regulation of the proton-translocating ATPase (*atpIBEFHAGDC*) operon of *Escherichia coli*: control by cell growth rate. *J Bacteriol* 178 (1996) 5563-5567
- Kasper, D.L., Winkelhake, J.L., Zollinger, B.L., Brandt, B.L., and Artenstein, M.S. Immunological similarity between polysaccharide antigens of *Escherichia coli* 07:KI(L):N.M. and group B *Neisseria meningitidis*. *J. Immunol.* 110 (1973) 262-268.
- Khodursky, A.B., Peter, B.J., Cozzarelli, N.R., Botstein, D., Brown, P.O. and Yanofsky, C. DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97 (2000) 12170-12175.
- Klimpel KW, Clark VL. The heat shock response of type 1 and type 4 gonococci. *Sex Transm Dis* 16(1989a)141-147
- Klimpel KW, Lesley SA, Clark VL. Identification of subunits of gonococcal RNA polymerase by immunoblot analysis: evidence for multiple sigma factors. *J Bacteriol* 171 (1989b) 3713-3718
- Kumar, A., B. Grimes, N. Fujita, K. Makino, R. A. Malloch, R. S. Hayward, and A. Ishihama. Role of the sigma 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase in transcription activation. *J Mol Biol* 235 (1994) 405-413
- Kusukawa, N., and T. Yura. Heat shock protein GroE of *Escherichia coli*: key protective roles against thermal stress. *Genes Dev.* 2 (1988) 874-882
- Lander ES. Array of hope. *Nat Genet* 21 (1999) 3-4
- Landick, R, V. Vaughn, E. T. Lau, PL A. VanBogelen, J. W. Erickson, and F. C. Neidhardt. Nucleotide sequence of the heat shock regulatory gene of *E. coli* suggests its protein product may be a transcription factor. *Cell* 38 (1984)175-182
- Lee, M.L., Kuo, F.C., Whitmore, G.A. and Sklar, J. Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97 (2000) 9834-9839

- Lehmann A.K., Halstensen A., Aaberge I.S., Holst J., Michaelsen T.E., Sornes S., Wetzler I.M., Guttormsen H., Human opsonins induced during meningococcal disease recognize outer membrane proteins PorA and PorB, *Infect. Immun.* 67 (1999) 2552-2560.
- Lemaux, P. G., S. L. Herendeen, P. L. Bloch, and F. C. Neidhardt Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. *Cell* 13 (1978)427-434.
- Liu T-Y, Gotschlich EC, Dunne FT and Jonssen EK Studies on the meningococcal polysaccharids. II. Composition and chemical properties of the group B and group C polysaccharides. *JBiol. Chem.* 246 (1971) 4703 -4712.
- Lockhart DJ, Winzler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature.* 405 (2000) 827-836
- Lucchini S, Thompson A, Hinton JC. Microarrays for microbiologists. *Microbiology* 147 (2001) 1403-1414
- Maeda, H., M. Jishage, T. Nomura, N. Fujita, and A. Ishihama. Two extracytoplasmic function sigma subunits, sigma(E) and sigma(FecI), of *Escherichia coli*: promoter selectivity and intracellular levels. *J Bacteriol* 182 (2000) 1181-1184
- Martin PR, Watson AA, McCaul TF, Mattick JS. Characterization of a five-gene cluster required for the biogenesis of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 16 (1995) 497-508
- Martin, J, Mayhew, M, Langer, T, Hartl, F. The Reaction Cycle of GroEL and GroES in Chaperone-Assisted Protein Folding. *Nature* 366 (1993) 228-233
- McCarty, J. S., S. Rudiger, H. J. Schonfeld, J. Schneider Mergener, K. Nakahigashi, T. Yura, and B. Bukau. Regulatory region C of the *E. coli* heat shock transcription factor, σ^{32} , constitutes a DnaK binding site and is conserved among eubacteria. *J. Mol. Biol.* 256 (1996) 829-837.
- Meccas, J., P. E. Rouviere, J. W. Erickson, T. Donohue, and C. A. Gross. The activity of σ^E , an *Escherichia coli* heat inducible σ -factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* 7 (1993) 2619-2628.
- Meyer, T.F. Pathogenic *Neisseria*-model of bacterial virulence and genetic flexibility. *Infect.Immun.* 17 (1989) 113-123
- Mirnic K, Middleton FA, Lewis DA, Levitt P. Analysis of complex brain disorders with gene expression microarrays: schizophrenia as a disease of the synapse. *Trends Neurosci.* 24 (2001) 479-486.
- Missiakas, D., J. M. Botton, and S. Raina. New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Mol. Microbiol.* 21 (1996) 871-884.

- Morimoto, R. I., Tissieres, A. und Georgopoulos, C. Progress and Perspectives on the Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. In: The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1994) 1-36.
- Morita, M., M. Kanemori, H. Yanagi, and T. Yura. Heat-induced synthesis of σ^{32} in Escherichia coli: structural and functional dissection of rpoH mRNA secondary structure. J. Bacteriol. 181 (1999a) 401-410.
- Morita, M. T., Y. Tanaka, T. Kodama, Y. Kyogoku, H. Yanagi, and T. Yura. Translational induction of heat shock transcription factor σ^{32} : evidence for a built-in RNA thermosensor. Genes Dev. 13 (1999b) 655-665.
- Moxon R, Rappuoli R. Bacterial pathogen genomics and vaccines. Br Med Bull 62 (2002) 45-58
- Muller A, Gunther D, Dux F, Naumann M, Meyer TF, Rudel T. Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. EMBO J 18 (1999) 339-352
- Murphy TV, White KE, Pastor P, Gabriel L, Medley F, Granoff DM, Osterholm MT. Declining incidence of Haemophilus influenzae type b disease since introduction of vaccination. JAMA 2 (1993) 246-248
- Nadler ST, Attie AD. Please pass the chips: genomic insights into obesity and diabetes. J Nutr 131 (2001) 2078-2081.
- Nagai, H., R. Yano, J. W. Erickson, and T. Yura. Transcriptional regulation of the heat shock regulatory gene rpoH in Escherichia coli: involvement of a novel catabolite-sensitive promoter. J. Bacteriol. 172 (1990) 2710-2715.
- Nagai, H., H. Yuzawa, and T. Yura. Interplay of two cis-acting mRNA regions in translational control of σ^{32} synthesis during the heat shock response of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991)10515-10519.
- Nagai, H., H. Yuzawa, M. Kanemori, and T. Yura. A distinct segment of the σ^{32} polypeptide is involved in DnaK mediated negative control of the heat shock response in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994)10280-10284.
- Nakahigashi, K., H. Yanagi, and T. Yura. Isolation and sequence analysis of rpoH genes encoding σ^{32} homologs from gram-negative bacteria: conserved mRNA and protein segments for heat shock regulation. Nucleic Acids Res. 23 (1995) 43 83-4390.
- Nassif X, Bourdoulous S, Eugene E, Couraud PO. How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier? Trends Microbiol 5 (2002) 227-232
- Nover, L. (ed.). Heat Shock Response of Eukaryotic Cells. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. (1984).
- Nover, L. Molekulare Zellbiologie der Hitzestreßantwort, Teil I. Naturwissenschaften 77 (1990) 310-316.
- Nover, L. Molekulare Zellbiologie der Hitzestreßantwort, Teil II. Naturwissenschaften 77 (1990) 359-365.

- Nover, L. Heat Shock Response. CRC Press, Boca Raton. (1991)
- Nover, L. und Scharf, K. D. Heat stress proteins and transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.* 53 (1997) 80-103.
- Oh M, Liao J. DNA Microarray Detection of Metabolic Responses to Protein Overproduction in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* 2 (2000) 201-209
- Parge H.E., Forest KX., Hickey M.J., Christensen D.A., Getzoff E.D., Tainer J.A., Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution, *Nature* 378 (1995) 32-38.
- Parkhill, J., M. Achtman, K. D. James, S. D. Bentley, C. Churcher, S. R. Klee, G. Morelli, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. M. Davies, P. Davis, K. Devlin, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, S. Leather, S. Moule, K. Mungall, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, S. Whitehead, B. G. Spratt, and B. G. Barrell. 2000. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. *Nature* 404 (2000) 502 – 506
- Parsell, D. A., and PL T. Sauer. Induction of a heatshock-like response by unfolded protein in *Escherichia coli*: dependence on protein level not protein degradation. *Genes Dev.* 3 (1989) 1226-1232.
- Pechan, P. M. Heat shock proteins und cell proliferation. *FEBS Lett.* 280 (1991) 1-4.
- Peterson A, Brigulla M, Haas S, Hoheisel J D, Völker U and M Hecker. Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183 (2001) 5617-5631.
- Petrik J. Microarray technology: the future of blood testing? *Vox Sang* 80 (2001) 1-11
- Pettit RK, Filiatrault MJ, Martin ES. Alteration of gonococcal protein expression in acidic culture. *Infect Immun* 64 (1996)1039-1042
- Pizza, M., V. Scarlato, V. Masignani, M. M. Giuliani, B. Arico, M. Comanducci, G. T. Jennings, L. Baldi, E. Bartolini, B. Capecchi, C. L. Galeotti, E. Luzzi, R. Manetti, E. Marchetti, M. Mora, S. Nuti, G. Ratti, L. Santini, S. Savino, M. Scarselli, E. Storni, P. Zuo, M. Broecker, E. Hundt, B. Knapp, E. Blair, T. Mason, H. Tettelin, D. W. Hood, A. C. Jeffdes, N. J. Saunders, D. M. Granoff, J. C. Venter, E. R. Moxon, G. Grandi, and R. Rappuoli. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 287 (2000) 1816 - 1820.
- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 23 (1999) 41-46
- Poolman JT, Hopman CT, Zanen HC. Immunogenicity of meningococcal antigens as detected in patient sera. *Infect Immun* 40 (1983) 398-406
- Rappuoli, R. Pushing the limits of cellular microbiology: microarrays to study bacteria-host cell intimate contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97 (2000) 13467-13469

- Rew DA. DNA microarray technology in cancer research. *Eur J Surg Oncol* 27 (2001) 504-508
- Richmond,C.S., Glasner,J.D., Mau,R., Jin,H. and Blattner,F.R. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 3821-3835.
- Rimini R, Jansson B, Feger G, Roberts TC, de Francesco M, Gozzi A, Faggioni F, Domenici E, Wallace DM, Frandsen N, Polissi A. Global analysis of transcription kinetics during competence development in *Streptococcus pneumoniae* using high density DNA arrays. *Mol Microbiol* 36 (2000) 1279-1292
- Roine E, Nunn DN, Paulin L, Romantschuk M. Characterization of genes required for pilus expression in *Pseudomonas syringae* pathovar phaseolicola. *J Bacteriol* 178 (1996) 410-417
- Rosenberger,C.M., Scott,M.G., Gold,M.R., Hancock,R.E. and Finlay,B.B. *Salmonella typhimurium* infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. *J. Immunol.* 164 (2000) 5894-5904.
- Rosenqvist E, Hoiby EA, Wedege E, Bryn K, Kolberg J, Klem A, Ronnild E, Bjune G, Nokleby H. Human antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine. *Infect Immun* 12 (1995) 4642-4652
- Saukkonen K, Abdillahi H, Poolman JT, Leinonen M. Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development. *Microb Pathog* 3 (1987) 261-267
- Schmutzhard. Die akute Meningitis
www.intensiv-innsbruck.at/education/meningitis_schmutzhard.htm
- Schöffl, F., Prandl, R. und Reindl, A. Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol.* 117 (1998) 1135-1141.
- Seiffert. *Lehrbuch der Genetik*, 4. Auflage. Gustav Fischer Verlag. (1998) 86-87.
- Smoot, L. M., Smoot, J. C., Graham, M. R., Somerville, G. A. Sturdevant, D. E., Migliaccio, C. A. L. Sylva, G. L. and J. M. Musser. Global differential gene expression in response to growth temperature alteration in group A *Streptococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98 (2001) 10416-10421.
- Sorger, P. K. Heat Shock Factor and the Heat Shock Response. *Cell* 65 (1991) 363-366.
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. 1975. *Biotechnology* 24 (1992) 122-139
- Stackebrandt, E., Murray, R.G.E. and Trüper, H.G. *Proteobacteria classis nov.*, a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *Int.J.Syst.Bacteriol.* 38 (1988) 321-325.

- Stephens DS, Whitney AM, Rothbard J, Schoolnik GK. Pili of *Neisseria meningitidis*. Analysis of structure and investigation of structural and antigenic relationships to gonococcal pili. *J Exp Med* 161(1985) 1539-1553
- Straus, D. B., W. A. Walter, and C. A. Gross. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32} . *Nature* 329 (1987) 348-351.
- Straus, D. B., W. A. Walter, and C. A. Gross. The activity of σ^{32} is reduced under conditions of excess heat shock protein production in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 3 (1989) 2003-2010.
- Straus, D., W. Walter, and C. A. Gross. DnaK, DnaJ, and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of σ^{32} . *Genes Dev.* 4 (1990) 2202-2209.
- Streyer L. *Biochemie*, 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg – Berlin – Oxford. (1996) 886 – 889
- Takashi Yura & Kenji Nakahigashi. Regulation of heat-shock response. *Curr Opin Microbiol.* 2 (1999) 153-158
- Talaat AM, Hunter P, Johnston SA. Genome-directed primers for selective labeling of bacterial transcripts for DNA microarray analysis. *Nat Biotechnol* 18 (2000) 679-682
- Tauschek M, Hamilton CW, Hall LA, Chomvarin C, Fyfe JA, Davies JK. Transcriptional analysis of the groESL operon of *Neisseria gonorrhoeae*. *Gene* 189(1997)107-112
- Tettelin, H., N. J. Saunders, J. Heidelberg, A. C. Jeffries, K. E. Nelson, J. A. Eisen, K. A. Ketchum, D. W. Hood, J. F. Peden, R. J. Dodson, W. C. Nelson, M. L. Gwinn, R. DeBoy, J. D. Peterson, E. K. Hickey, D. H. Haft, S. L. Salzberg, O. White, R. D. Fleischmann, B. A. Dougherty, T. Mason, A. Ciecko, D. S. Parksey, E. Blair, H. Cittone, E. B. Clark, M. D. Cotton, T. R. Utterback, H. Khouri, H. Qin, J. Vamathevan, J. Gill, V. Scarlato, V. Masignani, M. Pizza, G. Grandi, L. Sun, H. O. Smith, C. M. Fraser, E. R. Moxon, R. Rappuoli, and J. C. Venter. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* 287 (2000) 1809 – 1815
- Tikhomirov E., Santamaria M., Esteves K., Meningococcal disease: public health burden and control, *Wld Hlth Statist. Quart.* 50 (1997).
- Tilly, K., J. Spence, and C. Georgopoulos. Modulation of stability of the *Escherichia coli* heat shock regulatory factor σ^{32} . *J. Bacteriol.* 171 (1989)1585-1589.
- Tomoyasu, T., J. Gamer, B. Bukau, M. Kanemori, H. Mori, A. J. Rutman, A. B. Oppenheim, T. Yura, K. Yamanaka, H. Niki, S. Hiraga, and T. Ogura. *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor σ^{32} . *EMBO J.* 14 (1995) 2551-2560.

- Tseng GC, Oh MK, Rohlin L, Liao JC, Wong WH. Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res* 29 (2001) 2549-57
- Unkmeir A, Kammerer U, Stade A, Hubner C, Haller S, Kolb-Maurer A, Frosch M, Dietrich G. Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human dendritic cells. *Infect Immun* 5 (2002a) 2454-2462
- Unkmeir A, Latsch K, Dietrich G, Wintermeyer E, Schinke B, Schwender S, Kim KS, Eigenthaler M, Frosch M. Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol Microbiol* 46 (2002b) 933-946
- van der Voort ER, van der Ley P, van der Biezen J, George S, Tunnela O, van Dijken H, Kuipers B, Poolman J. Specificity of human bactericidal antibodies against PorA P1.7,16 induced with a hexavalent meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun* 63 (1996) 2745-2751
- Vedros, N.A. Development of meningococcal serogroups. In N.A. Vedros (ed.). *Evolution of meningococcal disease*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla. 2 (1987) 33-38.
- Verheul A.F.M., Snippe, H., and Poolman, J.P. Meningococcal Lipopolysaccharides: Virulence Faktor and and potential Vaccine Component. *Microbiol. Reviews* 57 (1993) 34-49
- Virji M.H.J., Potts W.J., Hart C.A., Saunders J.R., Identification of epitopes recognized by monoclonal antibodies SMI, and SM2 which react with all pili of *Neisseria gonorrhoeae* but which differentiate between two structural classes of pili expressed by *Neisseria meningitidis* and the distribution of their encoding sequences in the genomes of *Neisseria* spp., *J. Gen. Microbiol.* 135 (1989) 3239-3245.
- Virji, M., Kayhty, H., Ferguson, D.J.P., Alexandrescu, C., Heckels, J.E. and Moxon, E.R. The role of pili in the interaction of pathogenic *Neisseria* with cultured human endothelial cells. *Mol. Microbiol.* 5 (1991) 1831-1841.
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D.J.P., Achtman, M., and Moxon, E.R. Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol. Microbiol.* 10 (1993) 499-510.
- Virji, M., Makepeace, K. and Moxon, E.R. Distinct mechanisms of interactions of Opc-expressing meningococci at apical and basolateral surfaces of human endothelial cells; the role of integrins in apical interactions. *Mol. Microbiol.* 14 (1994) 173-184.
- Virji, M. Glycosylation of the Meningococcus pilus protein. *Am. Soc. Microbiol. News* 64 (1998) 398-405.
- Voet, D., Voet, J. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995.
- Vogel U., Frosch M., Mechanisms of neisserial serum resistance, *Mol. Microbiol.* 32 (1999) 1133-1139,

- Wang, Q., and J. M. Kaguni. A novel sigma factor is involved in expression of the rpoH gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171 (1989a) 4248-4253
- Wang, Q., and J. M. Kaguni. DnaA protein regulates transcription of the rpoH gene of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264 (1989b) 7338-7344
- Weekly epidemiological record. WHO, Geneva. 36 (1999) 297-303.
- Wei, Y., Lee, J.M., Richmond, C., Blattner, F.R., Rafalski, J.A. and LaRossa, R.A. High-density microarray-mediated gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183 (2001) 545-556.
- Weichselbaum, A.. Ueber die Aetiologie der akuten Meningitis cerebrospinalis. *Fortschr. Med.* 5 (1887) 573-583
- Wells DB, Tighe PJ, Wooldridge KG, Robinson K, Ala' Aldeen DA. Differential gene expression during meningeal-meningococcal interaction: evidence for self-defense and early release of cytokines and chemokines. *Infect Immun* 69 (2001) 2718-2722
- Wildes SS, Tunkel AR. Meningococcal vaccines: a progress report. *BioDrugs* 5 (2002) 321-329
- Wilson, M., DeRisi, J., Kristensen, H.H., Imboden, P., Rane, S., Brown, P.O. and Schoolnik, G.K. Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (1999) 12833-12838.
- Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M.H. and Lockhart, D.J. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 1359-1367
- Woods ML, Bonfiglioli R, McGee ZA, Georgopoulos C. Synthesis of a select group of proteins by *Neisseria gonorrhoeae* in response to thermal stress. *Infect Immun* 58 (1990) 719-725
- www.tigr.org
- Yamamori, T., and T. Yura. Temperature-induced synthesis of specific proteins in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional control. *J. Bacteriol* 142 (1980) 843-851
- Yao-Hui Sun, Sharmila Bakshi, Roland Charlmers & Christoph M. Tang. Function genomics of *Neisseria meningitidis* pathogenesis. *Nat Med.* 11 (2000) 1269-1273
- Yih-Ling Tzeng, David S. Stephens. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microbes and Infection.* 2 (2000) 687 – 700
- Yoshihara S, Geng X, Okamoto S, Yura K, Murata T, Go M, Ohmori M, Ikeuchi M. Mutational analysis of genes involved in pilus structure, motility and transformation competency in the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 42 (2001) 63-73

Yura, T., T. Tobe, K. Ito, and T. Osawa. Heat shock regulatory gene (htpR) of *Escherichia coli* is required for growth at high temperature but is dispensable at low temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984). 6803-6807.

Yura, T., H. Nagai, and H. Mori. Regulation of heat shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 47 (1993) 321-350.

Yuzawa, H., H. Nagai, H. Mori, and T. Yura. Heat induction of σ^{32} synthesis mediated by mRNA secondary structure: a primary step of the heat shock response in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 5449-5455.

Zanders ED. Gene expression analysis as an aid to the identification of drug targets. *Pharmacogenomics* 1 (2000) 375-384

Zoeger, D., Beyersmann, D., Rensing, L., und Hagemann, M. Streßverarbeitung in der Zelle. *Naturwiss. Rundsch.* 45 (1992) 9-16.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Frosch sehr herzlich für die Überlassung des Themas danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Dietrich für die außerordentlich intensive und engagierte Betreuung dieser Arbeit. Seine immer motivierende Unterstützung hat entscheidend zum Erfolg dieser Promotion beigetragen.

Danken möchte ich des weitern allen Labormitarbeitern der *N. meningitidis* Arbeitsgruppe am Institut für Hygiene und Mikrobiologie für die praktische Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Lebenslauf

Name: Guckenberger
Vorname: Matthias
Geburtsdatum: 16.07.76
Geburtsort: Hammelburg
Eltern: Dr. Horst Guckenberger
Brigitte Guckenberger, geb. Schuhmann

Ausbildung:

Sep. 1983 – Juli 1987 - Grundschule Zellingen
Sep. 1987 – Juli 1996 - Johann - Schöner - Gymnasium Karlstadt

Juli 1996 – April 1997 - Wehrdienst als Sanitäter

Mai 1997 - Beginn des Medizinstudiums an der Julius - Maximilians - Universität in Würzburg
April 1999 - Ärztliche Vorprüfung
März 2000 - 1. Staatsexamen
März 2002 - 2. Staatsexamen
Juni 2003 - 3. Staatsexamen

Seit Juli 2003 - AIP in der Klinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg

Zellingen, den 01.07.2003

Guckenberger Matthias

