

Analyse des Transkriptionsprofils von *Neisseria meningitidis* während der Infektion von Epithel- und Endothelzellen unter Verwendung der Mikroarraytechnologie

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

vorgelegt von
Claudia Hübner
geb. in Köthen/Anhalt

Würzburg 2004

Eingereicht am: 26.10.2004

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. U. Scheer

Gutachter: Prof. Dr. M. Frosch

Gutachter: Prof. Dr. J. Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

1	EINLEITUNG.....	1-1
1.1	Allgemeines zu <i>Neisseria meningitidis</i>	1-1
1.2	Zelluläre Interaktion - Adhäsion und Invasion	1-3
1.2.1	Typ IV Pili	1-4
1.2.2	Opa-Proteine	1-5
1.2.3	Opc-Proteine	1-5
1.2.4	Porine	1-7
1.2.5	Andere bakterielle Komponenten.....	1-7
1.2.5.1	Die Polysaccharidkapsel	1-8
1.2.5.2	Das Lipooligosaccharid (LOS).....	1-9
1.3	Zelluläre Interaktion – Analyse mittels Mikroarray.....	1-11
1.4	Zielsetzung	1-12
2	MATERIALIEN.....	2-13
2.1	Geräte.....	2-13
2.2	Verbrauchsmaterial	2-14
2.2.1	Allgemein.....	2-14
2.2.2	Reaktionskits	2-15
2.2.3	Chemikalien	2-15
2.2.4	Enzyme und andere Reagenzien.....	2-16
2.2.5	Antikörper	2-17
2.2.5.1	Antikörper für Western-Blot.....	2-17
2.2.5.2	Antikörper für Kapselpolysaccharid-ELISA	2-18
2.2.6	Größenstandards.....	2-18
2.3	Lösungen und Puffer.....	2-18
2.4	Vektoren.....	2-20
2.5	Primer	2-21
2.6	Bakterienstämme	2-24
2.7	Stammhaltung und Konservierung	2-25
2.8	Antibiotika	2-26
2.9	Zelllinien	2-27
2.10	Zellkultur	2-28
3	METHODEN.....	3-29
3.1	Infektionsversuche	3-29
3.1.1	Adhäsion- und Invasionsversuche an HEp-2 und HBMEC Zellen	3-29
3.1.2	Isolierung der zell-adhärenenten Bakterien.....	3-30
3.1.3	Messung der Cytotoxizität im Zellkulturmodell	3-30

3.2	RNA-Isolierung	3-31
3.2.1	Isolierung der RNA von zell-adhärenenten Bakterien	3-31
3.2.2	Isolierung der Kontroll-RNA für den Mikroarray	3-32
3.2.3	RNA-Isolierung aus Flüssigkulturen	3-32
3.2.4	Qualifizierung und Quantifizierung der isolierten RNA	3-32
3.2.4.1	DNase – Behandlung	3-32
3.2.4.2	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	3-33
3.2.4.3	Quantifizierung der RNA	3-34
3.2.4.4	Qualifizierung der RNA mittels denaturierender Gelelektrophorese	3-34
3.3	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	3-34
3.4	Auftrennung der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	3-35
3.5	Methoden zur Untersuchung der bakteriellen Transkription	3-36
3.5.1	Mikroarrays	3-36
3.5.1.1	Konstruktion der Gesamt-Genom-DNA Mikroarrays	3-36
3.5.1.2	Reverse Transkription unter gleichzeitigem Einbau der Farbstoffe Cy3 und Cy5 (Labelling).....	3-38
3.5.1.3	Hybridisierung der Slides	3-39
3.5.1.4	Waschen der Slides	3-40
3.5.1.5	Scannen und Auswertung	3-41
3.5.2	Real-time quantitative PCR mit dem Light-Cycler	3-41
3.6	DNA-Präparation	3-42
3.6.1	Midipräparation von Plasmid-DNA	3-42
3.6.2	Minipräparation von Plasmid-DNA	3-43
3.6.3	Präparation genomischer DNA	3-43
3.6.4	Isolierung von DNA aus Agarosegelen und aus PCR-Ansätzen	3-44
3.6.4.1	PCR Purification	3-44
3.6.4.2	Gel Extraktion	3-44
3.6.5	Quantifizierung der DNA mittels Absorptionsspektrometrie	3-44
3.7	Klonierungsmethoden	3-45
3.7.1	Spalten von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen	3-45
3.7.2	Dephosphorylierung der Vektor-DNA	3-45
3.7.3	Auffüllen überhängender 5'-DNA-Enden und Abbau überhängender 3'-DNA-Enden	3-45
3.7.4	Phosphorylierung von PCR-Produkten	3-46
3.7.5	Ligation von DNA mit glatten Enden	3-46
3.7.6	Transformation	3-47
3.7.6.1	Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation	3-47
3.7.6.2	Elektroporation von <i>E. coli</i>	3-47
3.7.6.3	Transformation von Meningokokken	3-47
3.8	DNA-Nachweis und–Analyse	3-48
3.8.1	Herstellung und Markierung der Sonden	3-48
3.8.2	Southern Blot	3-48
3.8.3	DNA Hybridisierung	3-49
3.8.4	Nachweis der markierten DNA	3-49
3.8.5	Automatisierte Sequenzierung von DNA	3-50
3.9	Quantifizierung von Proteinen und Polysacchariden	3-50
3.9.1	Kapselpolysaccharid-ELISA (Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay)	3-50
3.9.2	Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	3-51
3.9.3	Western Blot	3-52
3.9.4	Färbung der Proteine mittels Coomassie	3-53
3.10	Proteinexpression	3-53
3.11	Aufreinigung von rekombinanten Proteinen mit einem 6xHis-Motiv	3-54

3.12	Quantifizierung von LPS (Lipooligosaccharide)	3-55
3.12.1	Präparation von LPS	3-55
3.12.2	Tricin-Gelsystem zur Auftrennung von LPS.....	3-55
3.12.3	Silberfärbung und Entwicklung der LPS-Gele.....	3-56
3.13	Bakterizidie-Test	3-56
3.14	Testung der Antibiotikaresistenz	3-57
4	ERGEBNISSE	4-58
4.1	Transkriptomanalyse	4-58
4.1.1	Ermittlung der veränderten Anzahl der zell-adhärenenten Bakterien	4-58
4.1.2	Isolierung der zell-adhärenenten Bakterien.....	4-59
4.1.2.1	Isolierung der an HEp-2 adhärenenten Bakterien.....	4-59
4.1.2.2	Isolierung der an HBMEC adhärenenten Bakterien	4-60
4.1.3	Transkriptomanalyse von Meningokokken während der Infektion mit HEp-2 Zellen.....	4-61
4.1.4	Analyse des Transkriptom von Meningokokken während der Infektion mit HBMEC Zellen.....	4-65
4.1.5	Globale Analyse der differentiell regulierten Gene während der Interaktion mit Epithel- und Endothelzellen.....	4-65
4.1.6	Validierung spezifischer Veränderungen durch RT-PCR	4-69
4.2	Untersuchung einzelner differentiell regulierter Gene	4-70
4.2.1	Charakterisierung des induzierten ORF's NMB1527 (<i>rfaF</i>).....	4-70
4.2.1.1	Klonierung des ORF's NMB1527	4-70
4.2.1.2	Überprüfung der chromosomalen Insertion der Kanamycinkassette in den ORF NMB1527.....	4-71
4.2.1.3	Bestätigung der Deletion mittels RT-PCR.....	4-72
4.2.1.4	Überprüfung der nach Zellkontakt detektierten Induktion von <i>rfaF</i> mittels RT-PCR.....	4-72
4.2.1.5	Analyse der Oberflächenstrukturen der Stämme MC58 <i>rfaF</i> und MC58 <i>siaD</i> , <i>rfaF</i>	4-73
4.2.1.6	Funktionelle Analyse der LPS-Struktur von MC58 <i>rfaF</i> und MC58 <i>siaD</i> , <i>rfaF</i>	4-74
4.2.1.7	Kapselpolysaccharid-ELISA der Stämme MC58 <i>rfaF</i> und MC58 <i>siaD</i> , <i>rfaF</i>	4-75
4.2.1.8	Die Bedeutung von <i>rfaF</i> für die Vermittlung der Serumresistenz.....	4-76
4.2.1.9	Testung der Stämme MC58 <i>rfaF</i> und MC58 <i>siaD</i> , <i>rfaF</i> im Zellkulturmodell	4-77
4.2.1.10	Replikation der <i>rfaF</i> negativen Stämme in der Gegenwart von humanen Zellen	4-79
4.2.1.11	Konstruktion von <i>opc</i> , <i>rfaF</i> defizienten Mutanten des Serogruppe B Stammes MC58.....	4-80
4.2.1.12	Genomische Analyse der <i>opc</i> negativen <i>rfaF</i> -Mutanten mittels Southern-Blot	4-81
4.2.1.13	Analyse der Oberflächenstrukturen der <i>opc</i> negativen Stämme	4-82
4.2.1.14	Funktionelle Analyse der LOS-Struktur der <i>opc</i> negativen Stämme	4-82
4.2.1.15	Testung der <i>opc</i> , <i>rfaF</i> negativen Stämme im Zellkulturmodell	4-83
4.2.2	Charakterisierung des induzierten ORF's NMB1843	4-84
4.2.2.1	Klonierung des ORF's NMB1843	4-84
4.2.2.2	Überprüfung der chromosomalen Insertion der Kanamycinkassette in den ORF NMB1843.....	4-85
4.2.2.3	Überprüfung der nach Zellkontakt detektierten Induktion von NMB1843 mittels RT-PCR.....	4-85
4.2.2.4	Transkriptionale Aktivität von MC58 Δ NMB1843 vs. MC58WT	4-86
4.2.2.5	Analyse der Genregulation der Mutante MC58 Δ NMB1843 durch RT-PCR	4-89
4.2.2.6	Darstellung des Expressionsprofils der Mutante MC58 Δ NMB1843.....	4-90
4.2.2.7	Identifizierung des für die Mutante MC58 Δ NMB1843 spezifischen Protein von 210 kDa	4-90
4.2.2.8	Expression des Regulatorproteins NMB1843 als terminales His-Tag Fusionsprotein	4-91
4.2.2.9	Das rekombinate Regulatorprotein lässt sich mittels Ni – Granulat aufreinigen.....	4-93
4.2.2.10	Analyse der Antibiotikaresistenz in <i>Neisseria meningitidis</i>	4-94
4.2.3	Charakterisierung des induzierten ORF's NMB1646	4-95
4.2.3.1	Klonierung des ORFs NMB1646	4-95
4.2.3.2	Überprüfung der chromosomalen Insertion der Kanamycinkassette in den ORF NMB1646.....	4-95
4.2.3.3	Überprüfung der nach Zellkontakt detektierten Induktion von NMB1646 mittels RT-PCR.....	4-96
4.2.3.4	Testung der Stämme MC58 <i>hem</i> und MC58 <i>siaD</i> , <i>hem</i> im Zellkulturmodell	4-97
4.2.3.5	Bestimmung der Hämolyse assoziierten Zytotoxizität	4-98

5	DISKUSSION	5-100
5.1	Transkriptomanalyse von <i>N. meningitidis</i> während der Interaktion mit humanen Zellen	5-100
5.2	Charakterisierung einzelner im Mikroarray induzierter Gene	5-103
5.2.1	<i>RfaF</i> - eine LPS-Heptosyl-II-transferase.....	5-103
5.2.2	Der ORF NMB1843 - ein Transkriptionsregulator aus der marR-Familie	5-107
5.2.3	Der ORF NMB1646 - ein putatives Hämolysin.....	5-111
6	ZUSAMMENFASSUNG	6-113
7	SUMMARY	7-114
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	8-115
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9-130

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zu *Neisseria meningitidis*

Das Bakterium *Neisseria meningitidis*, ein gram-negativer, aerober, unbeweglicher, pleomorpher Diplokokkus, gehört zu der Familie *Neisseriaceae*. Zu dieser Familie werden neben den beiden humanpathogenen Spezies *N. meningitidis* (Meningokokken) und *N. gonorrhoeae* (Gonokokken) auch noch eine Vielzahl apathogener Spezies zugeordnet, die zur Normalflora des Rachenraumes gehören, wie z.B. *N. lactamica*, *N. mucosa* und *N. sicca*. *N. meningitidis* wächst auf bluthaltigen Medien, Kohlendioxid fördert das Wachstum.

Mit weltweit jährlich 500.000 Erkrankungen (Wilder-Smith und Memish, 2003) ist *Neisseria meningitidis* der häufigste Erreger einer bakteriellen Meningitis. In Deutschland sind Meningokokken derzeit für 45% aller erfassten Fälle verantwortlich (Frosch, 1999). Mit jährlich durchschnittlich 750 Meningitis-Erkrankungen (0,97 pro 100.000 Bevölkerung) und davon durchschnittlich 75 tödlichen Verläufen (Letalität 9,9%) stellen Meningokokken-Meningitiden ein bedeutsames Gesundheitsproblem in Deutschland dar. Etwa 40% der Erkrankungen in Deutschland betreffen Kinder unter 5 Jahren, ein zweiter Morbiditätsgipfel (ca. 20% der Erkrankungen) liegt im Jugendlichenalter (Jahresbericht des Nationalen Referenzzentrum für Meningokokken, Würzburg; <http://www.meningococcus.de/>). Besonders gefährdet sind Kinder zwischen 6 Monaten und 2 Jahren (Morley und Pollard, 2001), da sie keine natürliche Immunität besitzen. Davor gewährleisten maternale bakterizide Antikörper den Schutz des Neugeborenen. Diese (Leih)immunität verschwindet in den ersten 6 Lebensmonaten und entwickelt sich erst im Laufe der Kindheit erneut, vermutlich durch Besiedlung mit dem apathogenen Keim *Neisseria lactamica*, der die Bildung von kreuzprotektiven Antikörpern induziert und somit eine Immunität gegenüber Meningokokken verleiht (Gold *et al.*, 1978).

Das klinische Erscheinungsbild einer Meningokokken-Meningitis ist durch ein plötzliches Auftreten von starken Kopfschmerzen, Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Lichtempfindlichkeit und Nackenstarre charakterisiert. Neurologische Anzeichen umfassen Benommenheit, Delirium und schließlich Koma. Die Freisetzung großer Mengen Endotoxin (Meningokokken-Sepsis) führt zu einer Aktivierung des Komplementsystems, was schwerwiegende Einblutungen in Haut, Nebennieren, Herzbeutel und anderen Organen zur Folge haben kann (Waterhouse-Friedrichsen-Syndrom). Diese sogenannte fulminante Meningokokken-Sepsis ist mit einer Letalitätsrate von 40% die schwerste Form der Erkrankung und kann unbehandelt binnen weniger Stunden zum Tode führen. Bei 11% bis 19% der Überlebenden treten schwere neurologische Folgeschäden einschließlich Taubheit, Sprachstörungen, mentaler Retardation, Amputation von Gliedmaßen und schweren Hautläsionen auf (Wilder-Smith und Memish, 2003). Erstmals nachgewiesen und isoliert wurden Meningokokken 1887 (Weichselbaum, 1887), nachdem bereits 1805 die durch sie verursachte Meningitis epidemica als eigenes Krankheitsbild beschrieben worden war (Vieusseux, 1806).

Meningokokkeninfektionen sind auf den Menschen beschränkt. Das natürliche Habitat der Bakterien ist der Nasopharynx. Die Übertragung der Keime von Mensch zu Mensch erfolgt entweder durch Tröpfcheninfektion oder durch direkten bzw. indirekten oralen Kontakt und führt gewöhnlich zu symptomlosen Keimträgertum. Je nach Altersstufe und epidemiologischer Situation sind bis zu 30% Keimträger in der Bevölkerung anzutreffen,

doch nur in 1-10 Fällen/100.000 Einwohner/Jahr kommt es zu einem Ausbruch der Erkrankung (Jones, 1995; Cartwright, 1995). Meningokokken werden deshalb als Kommensalen des Nasen-Rachen-Raumes angesehen, die nur bei einer Störung des Erreger-Wirt-Gleichgewichts zu einer Infektion führen. Anders stellt sich die Situation in den Entwicklungsländern dar. Im sogenannten Meningitis-Gürtel in Afrika (erstreckt sich von Eritrea und Äthiopien im Osten bis nach Gambia im Westen) sowie in China treten in Abständen von 5-10 Jahren Epidemien auf, bei denen bis zu 1000 Personen/100.000 Einwohner im Jahr erkranken.

Zu den wichtigsten Faktoren, die für die Virulenz von Meningokokken verantwortlich sind, gehört ein vom Erreger exprimiertes saures Exopolysaccharid. Dieses Oberflächenantigen umgibt das Bakterium in Form einer Kapsel. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Kapselpolysaccharide bildet die Grundlage für die Einteilung der Meningokokken in zwölf Serogruppen: A, B, C, 29E, H, I, K, L, W-135, X, Y und Z (Vedros, 1987). Klinische Relevanz besitzen nur die Serogruppen A, B, C, W-135 und Y. Die weitere Klassifizierung beruht auf antigenetischen Varianzen in den als selektive Anionenkanäle fungierenden Außenmembranproteinen PorB (Serotyp) und PorA (Subtyp) (Frasch *et al.*, 1985) sowie auf der Struktur der bakteriellen Außenmembran, anhand derer eine Einteilung in 12 Immuntypen erfolgt (Morley und Pollard, 2001). Auf genotypischer Ebene ergänzen neuentwickelte Methoden der DNA-Feintypisierung die beschriebene phänotypische Klassifizierung und ermöglichen exakte Aussagen über die evolutionären Veränderungen innerhalb der Populationsstruktur von *Neisseria meningitidis*. Die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST), bei dem aus sieben „housekeeping“-Genen ein ca. 550 bp langer Bereich sequenziert wird (Maiden *et al.*, 1998) ist die gängigste Methode der DNA-Typisierung. Zur Analyse werden häufig Stoffwechsel-Allele herangezogen. Die Multilokus-Sequenztypisierung hat sich zu einem Standard in der Typisierung genetisch variabler Bakterienarten entwickelt.

Bei Erkrankungen in Europa, Nordamerika und Neuseeland sind Meningokokken der Serogruppe B und C die häufigsten Verursacher von Meningokokken-Sepsis und – Meningitis (Großbritannien 4-5/100.000, USA 1/100.000 und Neuseeland 20/100.000) (Wilder-Smith und Memish, 2003). In Deutschland wurden von 1993-2001 durchschnittlich 73% der Erkrankungen durch die Serogruppe B und 21% durch die Serogruppe C bedingt (Nationales Referenzzentrum für Meningokokken, Würzburg). Dagegen sind Meningokokken der Serogruppe A, die in den Industrienationen eine untergeordnete Rolle spielen, die häufigsten Erreger von Meningokokkenepidemien in Afrika und China (Wang *et al.*, 1992). Eine steigende Inzidenz lässt sich für Erkrankungen mit den sonst weniger relevanten Serogruppen Y und W135 verzeichnen. So sind 39% der Meningokokkenerkrankungen in den USA auf Erreger der Serogruppe Y zurückzuführen (Raghunathan *et al.*, 2004). Meningokokken der Serogruppe W135 waren für 3 Ausbrüche in den Jahren 2000, 2001 und 2002 in Saudi Arabien im Gefolge der Hadsch, der jährlichen Pilgerfahrt nach Mekka, verantwortlich (Jacobson *et al.*, 2003).

Essential für die Pathogenese ist die bakterielle Interaktion mit der Wirtszelle. Der Erfolg von *Neisserien* bei der Kolonisierung ihres Habitates, lässt sich zu einem großen Teil auf ihre Fähigkeit zurückführen, ihre Oberflächenstrukturen zu variieren und dadurch der Abwehr des Immunsystems zu entgehen. Diese Variation hat auch Auswirkungen auf das pathogene Potential der Bakterien, so z.B. auf die Adhärenz, Invasion und Transzytose durch die mukosale Membran. Daher ist die Aufklärung der bakteriellen Interaktion mit der Wirtszelle auf molekularer und zellulärer Ebene von großem Interesse.

1.2 Zelluläre Interaktion - Adhäsion und Invasion

Vorraussetzung für die Kolonisation des Nasopharynx ist die Adhäsion der Mikroorganismen an die Mukosa. Die primäre Kolonisierung der Wirtszelle erfolgt mittels Typ IV Pili, Oberflächen assoziierte Filamente der bakteriellen Zelle (Stephens und McGee, 1981; Merz *et al.*, 1996; Mosleh *et al.*, 1997). In den ersten Stunden der Infektion adhären Meningokokken in Mikrokolonien bestehend aus 10-100 Diplokokken (Merz und So, 2000). Diese frühe Phase der Adhärenz, auch „*initial adhesion*“ genannt, ist begleitet von einer Elongation der wirtseigenen Mikrovilli in Richtung der bakteriellen Erreger (Pujol *et al.*, 1999; Shaw und Falkow, 1988). Aufgrund der Pilus-vermittelten Adhäsion kommt es in der Wirtszelle zu einer Reihe von Umordnungen, die das kortikale Zytoskelett und die Plasmamembran betreffen (Merz und So, 2000). Diese Umordnungen beinhalten die Akkumulation von Phosphotyrosinen, Aktin und einem Set transmembraner Glykoproteine an die Anheftungsstelle der Bakterien (Merz *et al.*, 1999; Merz und So, 1997). Weiterhin kommt es zu einem Einstrom von Ca^{2+} Ionen (Kallstrom *et al.*, 1998). Die zelluläre Anheftung der Pili stellt das Signal für diesen Ioneneinstrom dar. Diese Prozesse führen zu einer Umlagerung des lysomalen Membranproteins LAMP1 und zur Freisetzung des lysomalen Inhaltes in den extrazellulären Raum (Merz und So, 2000).

Nach einem Zeitraum von 6-18 h assoziieren die Bakterien eng mit der Plasmamembran der jeweiligen Wirtszelle (Merz und So, 2000). Diese Phase der Adhärenz wird als „*intimate adhesion*“ bezeichnet. Zu diesem Zeitpunkt, lagern die Membranen des Bakteriums und der Wirtszelle so eng beieinander, dass sie häufig in Elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht klar abgegrenzt werden können (Shaw und Falkow, 1988). Möglicherweise handelt es sich um eine Fusion der beiden Membranen (Apicella *et al.*, 1996). Die Kontaktregion zwischen Bakterium und Wirt vergrößert sich zunehmend und die Bakterien werden schließlich von der Wirtszelle phagozytiert (Apicella *et al.*, 1996; Shaw und Falkow, 1988). Dieser Prozess ist unter anderen von 2 Proteinen der äußeren Membran abhängig, den Opa- und Opc-Protein. Opa-Proteine binden an Mitglieder der CEACAM-Familie und Opc bindet an Heparansulfate von Proteoglykan-Molekülen (Dehio *et al.*, 1998; Nassif *et al.*, 1999). Die Opa- und Opc- vermittelte bakterielle Aufnahme erfolgt nur bei nicht bekapselten Erregern. Meningokokken müssen daher in der Lage sein ihre Kapselexpression reversibel an- oder abzuschalten. Diese Eigenschaft der variablen Genexpression wird als Phasenvariation bezeichnet. Die häufigste Form der Phasenvariation beruht auf der variierenden Anzahl von Nukleotiden oder Oligonukleotid-Motiven. Diese sind entweder innerhalb des Gens lokalisiert, so dass Varianzen in der Länge der Sequenzwiederholung den translationalen Leserahmen verändern, oder innerhalb des Promotorbereiches, wo sie sich positiv oder negativ auf die Transkription auswirken. Gehäuft treten diese Mutationen in Form von Insertionen oder Deletionen einzelner Nukleotide oder Oligonukleotidmotive während der DNA-Replikation oder bei DNA-Reperaturvorgängen auf. Dieser auch als „*slipped-strand mispairing*“ bezeichnete Mechanismus ist u.a. für die Kapselexpression von Meningokokken beschrieben (Hammerschmidt *et al.*, 1996b). Die Phasenvariation erleichtert die Adaption einer bakteriellen Population an ein verändertes Milieu und stellt ein Schlüsselereignis in der Pathogenese dar (Moxon *et al.*, 1994). Neben der Variabilität der Kapselexpression unterliegen weitere virulenzassoziierte Gene einer Phasenvariation, unter anderen Pili (Stephens und McGee, 1981; Virji *et al.*, 1991; Rudel *et al.*, 1995), Opa, Opc, PorA und Eisen-bindende Proteine (Stern *et al.*, 1984 und 1986; Achtmann *et al.*, 1988; Virji *et al.*, 1992; Sarkari *et al.*, 1994; van der Ende *et al.*, 1995; Saunders *et al.*, 2000) sowie Biosynthesegene des Lipopolysaccharids (Apicella *et al.*, 1987; Jennings *et al.*, 1999; Saunders *et al.*, 2000).

Nach der Anheftung an die nasopharyngeale Schleimhaut durchqueren die Meningokokken die Epithelzellen des Nasopharynx. Dies geschieht eventuell durch Transzytose und könnte durch Schleimhautschädigungen – bedingt durch andere Pathogene – unterstützt werden. Innerhalb von 24 h werden die Mikroorganismen in der Submukosa in der Nähe von lokalen Immunzellen und Gefäßen beobachtet. In den meisten Fällen verläuft diese nasopharyngeale Infektion subklinisch.

Nach der Schleimhautpenetration und der Reaktivierung der Kapsel durch Phasenvariation, bekommt das Bakterium Zugang zum Blutkreislauf. Für ein Überleben im Blut ist der Besitz einer Kapsel essentiell. So sind Isolate invasiver Meningokokkenerkrankungen generell bekapselt (Devoe und Gilchrist, 1975). Im Gefäßsystem werden die Meningokokken entweder durch ein Zusammenspiel von bakteriziden Serumantikörpern, Komplementfaktoren und phagozytierenden Zellen abgetötet, oder sie vermehren sich und leiten damit die bakteriämische Phase ein. Dies hängt von Defizienzen im Abwehrsystem (Fehlen von bakteriziden Antikörpern, Komplementdefekte) (Vogel und Frosch 1999; Hammerschmidt *et al.*, 1996a) und von noch unbekanntem Faktoren ab.

In manchen Fällen bleiben die Meningokokken auf den Blutkreislauf beschränkt, d.h. es entwickelt sich keine Entzündung der Hirnhäute. Die Vermehrung der Meningokokken im Blut (Sepsis) ist ebenfalls lebensbedrohlich. Wie Meningokokken die Blut-Hirnschranke (BHS) überwinden, ist bis heute noch ungeklärt. Die Blut-Hirn – Schranke zwischen Kapillarenendothel und zentralnervösem Extrazellularraum wird aus Endothelzellen der Kapillaren, den Perizyten und den Astrozyten gebildet. Die wichtigsten Mitspieler im Arrangement der BHS sind die Endothelzellen, welche die Gefäßwände auskleiden und mit dem Blutstrom in unmittelbarem Kontakt stehen. Diese Zellen sind an ihren äußeren Schichten in sogenannten *tight junctions* miteinander verschmolzen. Diesen lückenlosen Verband können weder Blutzellen, noch lösliche Bestandteile des Blutes über 20 kDa frei passieren. Einige für die zelluläre Interaktion von Wirtszellrezeptoren essentielle bakterielle Faktoren, sowohl bei Endothel-, als auch bei Epithelzellen, wurden bereits identifiziert. Dabei handelt es sich um bakterielle Oberflächenbestandteile, wie z.B. die Außenmembranproteine Opa und Opc, Porine, Lipooligosacchride und Typ IV Pili (Pron *et al.*, 1997; Virji *et al.*, 1991; Unkmeir *et al.*, 2002). Die wichtigsten Schritte der bakteriellen Zellinteraktion sind schematisch in Abbildung 1.2. dargestellt.

1.2.1 Typ IV Pili

Typ IV Pili sind essentiell für die primäre Kolonisierung der Wirtszelle (Kellogg *et al.*, 1968; Swanson, 1973). So weisen Meningokokkenisolate aus dem Nasopharynxbereich von asymptomatischen Trägern sowie von Patienten mit dem Erkrankungsbild einer Sepsis bzw. Meningitis immer Pili auf (Stephens und McGee, 1981; Stephens *et al.*, 1983). Neben der Bedeutung bei der bakteriellen Interaktion mit dem Wirt, sind Pili auch noch für die Aufnahme exogener DNA, für die Autoagglutination sowie für die gleitende Motilität verantwortlich (Ryll *et al.*, 1997; Fussenegger *et al.*, 1997; Merz *et al.*, 2000). Bei der Pilisynthese sind mindestens 22 Genprodukte involviert (Mattick *et al.*, 1996). Jede Pilusfaser besteht aus kleinen Untereinheiten von Pilin (PilE), die antigenetisch variabel sind (Meyer *et al.*, 1984). Diese Variablen resultieren aus einem einseitigem Austausch sogenannter Minikassetten von einem oder mehreren stiller Genorte (insgesamt 17) auf das *pilE*-Gen (Seifert *et al.*, 1994; Haas *et al.*, 1992). Durch die Rekombination dieser stillen Genorte mit dem Expressionsgen entstehen eine Vielzahl neuer Expressionsgene. Für die Pilusvermittelte Adhärenz ist vermutlich PilC verantwortlich, ein 110 kDa Protein, das an der

Pilusspitze lokalisiert ist. Dieses Protein unterliegt ebenso wie PilE der Phasenvariation. Dieser Mechanismus beruht bei PilC auf Veränderungen in der Anzahl von Guanidin-Resten innerhalb eines Polyguanidin-Stranges in der Signalpeptid-Sequenz (Jonsson *et al.*, 1991). Meningokokken können bis zu 2 PilC-Proteine exprimieren, wobei nur PilC1 adhäsiv ist (Rudel *et al.*, 1995). Als zellulärer Rezeptor dient vermutlich CD46, ein Membranprotein (Kallstrom und Johnson 1998). CD46 ist ein C3b/C4b bindendes Glykoprotein, das in der Aktivierung und Depositionierung von Komplement involviert ist und dadurch die Zelle vor Schäden durch das Komplementsystem bewahrt (Liszewski *et al.*, 1991). Dieser Rezeptortyp wird, mit der Ausnahme von Erythrozyten, auf fast allen humanen Zell- und Gewebetypen exprimiert (Seya *et al.*, 1995).

1.2.2 Opa-Proteine

Eine weitere wichtige Gruppe von Adhäsinen werden von der *opa*-Multigenfamilie kodiert, Außenmembranproteinen, mit einer durchschnittlich Größe von 28 kDa. Sie werden von der Mehrzahl der Meningokokken- und Gonokokkenstämme exprimiert, wobei sich große strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den Spezies zeigen. Opa Proteine wurden ursprünglich identifiziert, weil ihre Expression die Farbe und die Klarheit von Gonokokkenkolonien verändert (Swanson, 1978).

Ein einzelner Meningokokkenstamm kann zwischen 3-4 unterschiedliche chromosomale Allele besitzen, die für einzelne Opa-Varianten kodieren (Dehio *et al.*, 1998; Nassif *et al.*, 1999). Alle Opa-Proteine werden phasenvariabel exprimiert. Die Phasenvariation lässt sich auf Variationen in der Länge von im Strukturgen lokalisierten Sequenzwiederholungen (hier CTCTT) zurückführen (Stern *et al.*, 1984 und 1986). Durch Deletionen oder Insertionen kommt es somit zur Verschiebung im Leseraster (Robertson und Meyer, 1992). Es existiert daher eine heterogene Population, die kein Opa-Protein, eines oder aber mehrere Opa-Proteine exprimieren. Weiterhin ist sowohl eine Rekombination innerhalb eines Stammes, als auch eine Rekombination zwischen verschiedenen Stämmen möglich. Auf diese Weise wird eine große Anzahl unterschiedlicher Allele generiert, die innerhalb der einzelnen Stämme unterschiedlich verteilt sein können (Hobbs *et al.*, 1998; Morelli *et al.*, 1997). Opa-Proteine vermitteln die bakterielle Interaktion mit Epithelzellen, Neutrophilen, und im geringeren Umfang auch mit Endothelzellen (Virji *et al.*, 1993 und 1996). Die Opa-vermittelte Adhärenz kann allerdings nur vor einem kapselfreien Hintergrund stattfinden (Virji *et al.*, 1993; de Vries *et al.*, 1998). Als Rezeptoren dienen Mitglieder aus der CD66-Familie (Virji *et al.*, 1996). Auch vermögen einige Opa-Proteine, unabhängig von der Expression anderer Adhäsine, mit Heparansulfat-Proteoglykanen auf Epithelzellen zu interagieren (de Vries *et al.*, 1998; Virji *et al.*, 1993).

1.2.3 Opc-Proteine

Opc-Proteine sind Außenmembranproteine, die eine ähnliche Größe und physikalische Eigenschaften wie die Opa-Proteine aufweisen, sich jedoch in ihrer sekundären Struktur, den korrespondierenden Genen und ihrer Antigenität deutlich von diesen unterscheiden (Olyhoek *et al.*, 1991; Merker *et al.*, 1997; Achtman *et al.*, 1988). Opc-Proteine unterliegen ebenfalls der Phasenvariation, diese wird allerdings, im Gegensatz zu den Opa-Proteinen, auf transkriptionaler Ebene kontrolliert, durch Insertionen bzw. Deletionen in einem hochpolymeren Polycystidin-Strang innerhalb der Promotorregion des *opc*-Gens (Sarkarki *et*

al., 1994). Dies kann zu einer starken, geringen oder fehlenden Expression des *opc*-Gens führen. Opc-Proteine vermitteln die bakterielle Adhärenz und Invasion an Epithelzellen, ohne dass es dabei der Anwesenheit weiterer Faktoren bedarf. Als mögliche Rezeptoren wurden Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) identifiziert (de Vries *et al.*, 1998). Im Gegensatz zur Opc-vermittelten Internalisierung in Epithelzellen, die nur bei nicht bekapselten Meningokokken beobachtet wird, werden auch bekapselte Meningokokken Opc-abhängig in zerebralmikrovaskulären Endothelzellen (HBMEC) internalisiert (Unkmeir *et al.*, 2002). Dagegen findet die bakterielle Aufnahme in peripheren Endothelzellen (Huvec) vor einem kapselnegativen Hintergrund statt (Virji *et al.*, 1995). Opc-exprimierende Meningokokken interagieren mit dem Serum-Glykoprotein Vitronektin (Huvec) bzw. Fibronektin (HBMEC) (Virji *et al.*, 1992; Unkmeir *et al.*, 2002). Diese fungieren als Brückenmoleküle und vermitteln die Bindung von Opc an $\alpha_V\beta_3$ - (Vitronektin) bzw. $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-Rezeptoren (Fibronektin) auf der Apikalseite von Endothelzellen (Virji *et al.*, 1994; Unkmeir *et al.*, 2002).

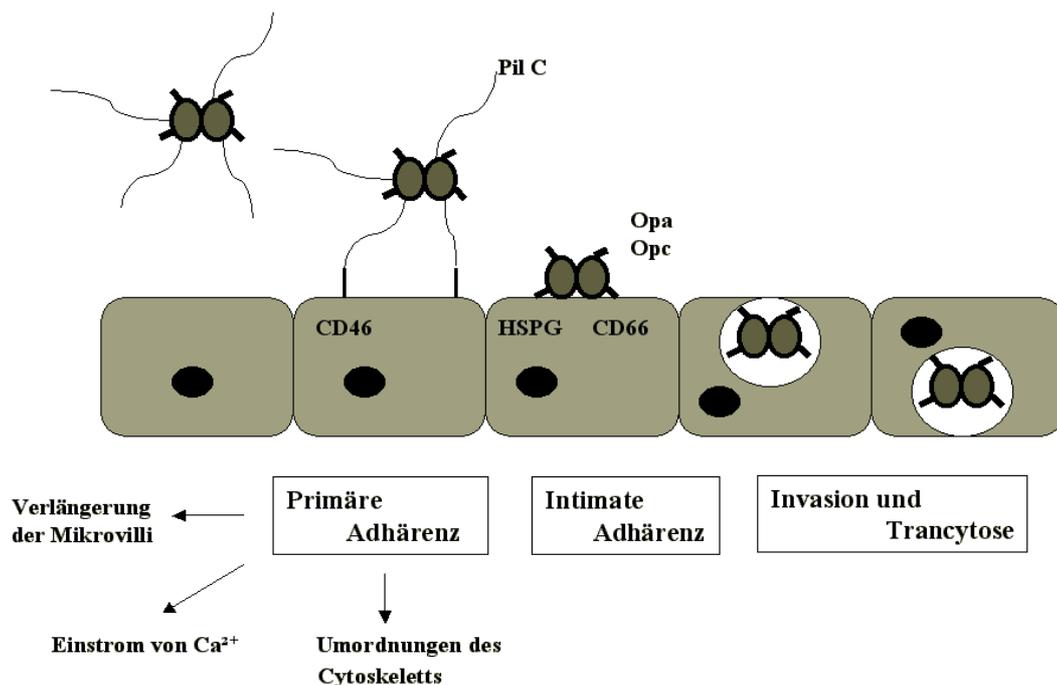


Abb. 1.2: Modell der Interaktion zwischen pathogenen *Neisserien* mit der Wirtszelle während der Kolonisierung der Mukosa des Nasopharynx (Dehio *et al.*, 1998).

1.2.4 Porine

Porine stellen eine der Hauptkomponenten der bakteriellen Außenmembran dar. Meningokokken exprimieren zwei Porine: PorA und PorB (Hitchcock, 1989). Diese ~ 30 kDa großen Proteine bilden selektive Anionen-Kanäle, die essentiell für das Überleben der Bakterien sind (Barlow *et al.*, 1989; Gotschlich *et al.*, 1987; Suker *et al.*, 1994; van der Ley *et al.*, 1991). Sie weisen eine starke antigenetische Variabilität auf, die als Basis für die Serotypisierung dient (Frasch *et al.*, 1985). Die Expression der Porine korreliert mit der Anwesenheit von 11 (optimale Transkription), 10 oder 9 (keine Transkription) Guanidinresten innerhalb eines Polyguanidinstranges in der Promotorregion (van der Ende *et al.*, 1995).

Porine sind in der Lage sich spontan als funktionelle Ionenkanäle in die Plasmamembran der eukaryotischen Zelle zu translokalisieren. Dies führt zu einer flüchtigen Veränderung des Membranpotentials und beeinflusst die zelluläre Signalweitergabe (Lynch *et al.*, 1984; Ulmer *et al.*, 1992). Des Weiteren ist für Gonokokken beschrieben, dass PorB1 in der Lage ist, die bakterielle Invasion vor einem Opa-negativen Hintergrund zu vermitteln (van Putten *et al.*, 1998). Dieser Reaktionsweg scheint unabhängig von dem zu sein, der durch Opa induziert wird. Es existieren jedoch Daten, die belegen das PorB auch in der OpaA vermittelten Invasion involviert ist (Bauer *et al.*, 1999). Die Rolle der Porine bei der zellulären Interaktion mit Meningokokken ist noch nicht geklärt. Möglicherweise kommt ihnen eine Bedeutung bei der Reorganisation des wirtseigenen Zytoskeletts zu (Pujol *et al.*, 2000). Porine sind des Weiteren starke Adjuvanzien und aktivieren B-Zellen durch Interaktion mit dem B-Zellrezeptor CD40. Die Aktivierung von Immunzellen erhöht gleichzeitig deren apoptotisches Potential. Porine binden an Spannungs-abhängige Anionenkanäle der mitochondrialen Zellmembran (VDAC). Die Bindung von PorB führt zur Stabilisierung der Mitochondrienmembran und schützt die Zelle vor dem programmierten Zelltod, indem die Freisetzung von Cytochrome c in das Cytosol, einem Apoptose stimulierenden Agens, verhindert wird (Massari *et al.*, 2000 und 2003). Freies Cytochrom c führt zur Aktivierung einer Reihe von Enzymen, die unter dem Begriff Caspasen zusammengefasst werden, und die eine Kaskade von Reaktionen initiieren, die in dem Untergang der betreffenden Zelle gipfeln. Die Freisetzung von Cytochrome c kann auch durch Mitglieder der Bcl2-Familie verhindert werden, die ebenfalls mit VDAC interagieren (Yang *et al.*, 1997). Auch für Porine von Gonokokken wurde eine Interaktion mit Mitochondrien beschrieben, die allerdings zu einer Induktion der Apoptose führt (Muller *et al.*, 1999).

1.2.5 Andere bakterielle Komponenten

Einige bakterielle Komponenten haben einen modulierenden Einfluss auf die Interaktion mit der Wirtszelle. Die Expression einer Kapsel sowie bestimmte strukturelle Varianten des Lipooligosaccharidanteils inhibieren die HSPG- spezifische Opa und Opc vermittelte bakterielle Interaktion mit der Wirtszelle (Dehio *et al.*, 1998). Die CD66- spezifische Bindung von Opa erfolgt zwar auch vor einem bekapselten Hintergrund, sie wird aber durch die Abwesenheit der Kapsel verstärkt (Virji *et al.*, 1996). In beiden Fällen sind die anti-adhäsiven Eigenschaften zurückzuführen auf die negativ geladenen Kohlenhydrate der Sialinsäure (Merz und So, 2000). Dies verleiht den Bakterien außerdem eine Resistenz gegenüber der komplementvermittelten Erregerelimination und der Aufnahme durch professionelle Phagozyten (Vogel und Frosch, 1999).

1.2.5.1 Die Polysaccharidkapsel

Die Kapseln der einzelnen Serogruppen differenzieren in ihrer chemischen Struktur und ihren antigenetischen Eigenschaften. Das Hauptmolekül der Serogruppe A Kapsel ist N-Acetylmannosamin-1-Phosphat (Griffis *et al.*, 1991), wohingegen die Kapseln der Serogruppen B, C, Y und W135 aus N-Acetyl-Neuraminsäure (=Sialinsäure) aufgebaut sind. Die Kapseln der Serogruppen W135 und Y sind Heteropolymere aus α -2,6-verknüpften Sialinsäuren und Glukose bzw. Galaktose (Bhattacharjee *et al.*, 1976). Die Kapseln der beiden Serogruppen B und C unterscheiden sich in der Art der Verknüpfung der langkettigen Sialinsäurepolymere (Serogruppe B: α -2,8-Verknüpfung bzw. Serogruppe C: α -2,9-Verknüpfung) (Jennings *et al.*, 1977). Des Weiteren weist die Kapsel der Serogruppe B gegenüber den Kapseln der Serogruppen C, W135 und Y keine O-Acetylierung auf (Claus *et al.*, 2004). Diese beiden Unterschiede bedingen eine strukturelle Ähnlichkeit der Serogruppe B Polysaccharidkapsel mit den neuronalen Adhäsionsmolekül NCAM. Als Folge dieses antigenen Mimikry wird die Kapsel vom Immunsystem nicht erkannt (Finne *et al.*, 1987). Meningokokken der Gruppen A und C induzieren Antikörper gegen ihre Kapsel-Polysaccharide, welche die Bakterien opsonisieren und durch Phagozytose und/oder Komplement-abhängige Lyse eliminieren. Mit Ausnahme der Serogruppe B, welche beim Menschen wenig immunogen ist (Frasch, 1989), sind die Polysaccharidkapseln der Meningokokken gute Immunogene und dienen der Impfstoffherstellung.

Die Kapselgene sind innerhalb eines Kapselgenkomplexes (*cps*) zusammengefasst (Frosch *et al.*, 1989). Dieser kodiert für alle Enzyme, die für die Biosynthese der Kapsel und deren Expression an der Zelloberfläche notwendig sind. Der Kapselgenkomplex setzt sich aus 5 funktionellen Regionen zusammen. Region A besteht aus den Genen *siaA* (N-acylglucoamine 2-epimerase), *siaB* (CMP-NeuNAc-Synthase), *siaC* (NeuNAc-condensing Enzym) und *siaD* (Polysialyltransferase), die für die Biosynthese der Kapsel verantwortlich sind (Petersen *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 1994). Diese aus mehr als 300 Neuraminsäure-Bausteinen bestehende Kapsel wird intrazellulär synthetisiert. Um an die Zelloberfläche zu gelangen, muss die synthetisierte Polysialinsäure am reduzierten Ende mit Phospholipid substituiert werden. Dies wird über die Genprodukte der Regionen B und C ermöglicht. Die Region B kodiert für die beiden hydrophoben Enzyme LipA und LipB, welche für die Modifikation des Kapselpolysaccharids mit einem Phospholipid verantwortlich sind (Frosch und Müller, 1993). Die Region C enthält 4 Gene, die für die Transportproteine CtrA, CtrB, CtrC und CtrD kodieren, welche am Transport der lipidsubstituierten Polysialinsäure vom Zytoplasma zur Zelloberfläche beteiligt sind. Das Transportprotein CtrA ist in der Außenmembran lokalisiert (Frosch *et al.*, 1992), die Proteine CtrB und CtrC sind Bestandteil der Zytoplasmamembran. Die Region D enthält Gene, die unter anderen in die Modifizierung des Lipooligosaccharids von Meningokokken involviert sind (*galE*, *rfbB*, *rfbA* und *rfbC*). Das Gen *galE* kodiert für eine UDP-Glukose-4-Epimerase, welche die Umwandlung von UDP-Glukose zu UDP-Galaktose und umgekehrt sialysiert. Die Gene *rfbA-rfbC* weisen Homologien zu Enzymen bei *Salmonella typhimurium* auf, die an der Biosynthese der Rhamnose beteiligt sind, ihre Funktion bei Meningokokken ist noch ungeklärt (Hammerschmidt *et al.*, 1994). Die ursprünglich formulierte Hypothese einer regulatorischen Funktion der Region E bedarf noch der Bestätigung (Frosch *et al.*, 1989).

Meningokokken sind in der Lage ihre Kapsel phasenvariabel zu exprimieren. Eine reversible Abschaltung der Kapsel begünstigt die bakterielle Aufnahme durch die Wirtszelle. Zwei Mechanismen sind beschrieben, die zu einer modifizierten Kapselexpression führen. Die

Inaktivierung des *siaA*-Gens durch Insertion bzw. Exzision eines mobilen Insertionssequenzelements IS1301 und die Insertion bzw. Deletion eines Cysteinrestes innerhalb eines Polycysteinstranges im *siaD*-Gen. Letzteres führt zu einer Verschiebung des Leserasters und einem verfrühten Abbruch der Translation. Beide Mechanismen resultieren in einem kapselnegativen Phänotyp (Hammerschmidt *et al.*, 1996b, 1996c).

1.2.5.2 Das Lipooligosaccharid (LOS)

Das Lipooligosaccharid besteht aus einem Lipid A-Anteil und einem kleinen Oligosaccharid aus bis zu 10 Monosacchariden. Im Vergleich zum Lipooligosaccharid der Enterobacteriaceae fehlen die O-spezifischen Seitenketten (Jennings *et al.*, 1983). Das Lipid A ist über zwei Moleküle 2-Keto-3-Deoxyoctansäuren (KDO) mit der inneren Kernregion verbunden.

Das bakterielle LOS unterscheidet sich bei den einzelnen Meningokokkenisolaten hinsichtlich der Zusammensetzung der Monosaccharide, der Art der Verknüpfung, den Gehalt an zusätzlichen Phosphoethanolamingruppen und durch die O-Acetylierung. Gemeinsam ist den LOS-Varianten die innere Kernregion, die als Grundstruktur zwei Heptosen umfasst. Eine dieser Heptosen ist durch N-Acetylglucosamin substituiert. An die andere Heptose schließt sich bei einigen Lipooligosacchariden eine terminale Zuckerstruktur aus vier Zuckern an. Bei dieser sogenannten Lacto-*N*-neotetraose Struktur (α -Kette) handelt es sich um ein Tetrasaccharid, bestehend aus folgenden β -glykosidisch verknüpften Zuckern: Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc. Ein Locus, bestehend aus drei Genen (*lgtA*, *lgtB* und *lgtE*), ist für die Ausbildung dieser Struktur in den Immunotypen L2 –L5, L7 und L9 verantwortlich (Gamian *et al.*, 1992, Jennings *et al.*, 1983, 1995b und 1999). Meningokokken sind in der Lage ihre terminale LPS Struktur phasenvariabel zu exprimieren, und verfügen daher über ein Repertoire verschiedener Immunotypen. Diese Variationen resultieren aus Mutationen innerhalb eines hochpolymeren Stranges aus bis zu 17 Guanidinresten im *lgtA*-Gen. Die *lgtA* Expression vermittelt den Wechsel zwischen den Immunotypen L3 mit exprimierter Lacto-*N*-neotetraose Struktur und L8 (keine Lacto-*N*-neotetraose Struktur) (Jennings *et al.*, 1995b und 1999; Berrington *et al.*, 2002). Die Immunotypen L1, L10, L11 und L12 exprimieren diese Struktur (Tsai und Civin, 1991; Kim *et al.*, 1994) ebenfalls nicht. Die Präsenz von 5 Guanidinresten korreliert in einem Phänotyp der nicht in der Lage ist ein verkürztes Lipooligosaccharid auszubilden (Immunotypen L2, L4, L5 und L6) (Jennings *et al.*, 1999). Neben der Lacto-*N*-neotetraose Struktur existiert in den Immunotypen L2, L5 und L6 eine weitere Kette aus einer Glukoseeinheit (β -Kette), die an die zweite Heptose der Kernstruktur addiert ist. Voraussetzung für diesen Transfer ist ein aktives *lgtG*-Gen. Auch dieses Gen wird phasenvariabel kontrolliert und erlaubt den Wechsel zwischen dem L2-Immunotyp und dem L3-Immunotyp (Jennings *et al.*, 1999). Für die Synthese der L1 Struktur ist das *lgtC*-Gen, das für eine α 1-4-Galaktosyltransferase kodiert, verantwortlich. Die Phasenvariabilität von *lgtC* erleichtert den Wechsel zwischen der L1 und der L8 Struktur (Jennings *et al.*, 1999).

Aufgrund der chemischen Identität mit terminalen Tetrasacchariden in Synthesestufen menschlicher Blutgruppenantigenen (Mandrell *et al.*, 1988) und Oberflächenstrukturen humaner Erythrozyten, Lymphocyten und Granulocyten stellt der Lacto-*N*-neotetraose Anteil ein weiteres Beispiel „molekularen Mimikry“ dar (Mandrell *et al.*, 1990; Tsai und Civin, 1991). Außerdem können sowohl Gonokokken als auch Meningokokken ihre LOS-Struktur durch Addition einer terminalen Sialinsäure modifizieren. Die Synthese von Sialinsäure ist auf Meningokokken beschränkt. Gonokokken müssen auf das durch den Wirt bereitgestellte Cystidin-5'-monophosphat-N-Acetylneuraminsäure (CMP-NANA) als Sialinsäuredonor

zurückgreifen (Mandrell und Apicella, 1993; van Putten, 1993). Die Sialysierung wird durch eine bakterieneigene Sialyltransferase katalysiert. Bei der LOS-Sialysierung handelt es sich ebenfalls um einen variablen Phänotyp (Merz und So, 2000). So resultiert der Wechsel zwischen den Immunotypen L3 (Sialysierung) und L8 (keine Sialysierung) in einer Modulation der LOS-Sialysierung. Ein Resultat der LOS-Sialysierung ist, neben einer erhöhten Resistenz gegenüber Komponenten des Immunsystems, eine verminderte Interaktion mit den Wirtszellen (van Putten, 1993; van Putten *et al.*, 1995; Virji *et al.* 1993, 1995). Des Weiteren kann gereinigtes LOS eine Vielzahl von unterschiedlichen Wirtszellen aktivieren und verfügt außerdem über ein stark zytotoxisches Potential (Merz und So, 2000). Durch dieses Endotoxin werden Makrophagen aktiviert, die TNF-alpha ausschütten. Das wiederum hat systemisch pleiotrope Wirkungen: es verursacht Fieber, entzündet die Gefäßwände, stört das Gerinnungssystem und führt zu Blutungen. Auch wird eine mögliche Funktion als Adhäsion für die nicht sialysierte Form der Lacto-N-neotetraose Struktur in der Abwesenheit der Hauptadhäsine Opa, Opc und Pili diskutiert, da eine Interaktion von Gonokokken-LOS mit Asialoglykoproteinen-Rezeptoren auf der Oberfläche von menschlichen Leberzellen beobachtet wurde (Porat *et al.*, 1995 a, b).

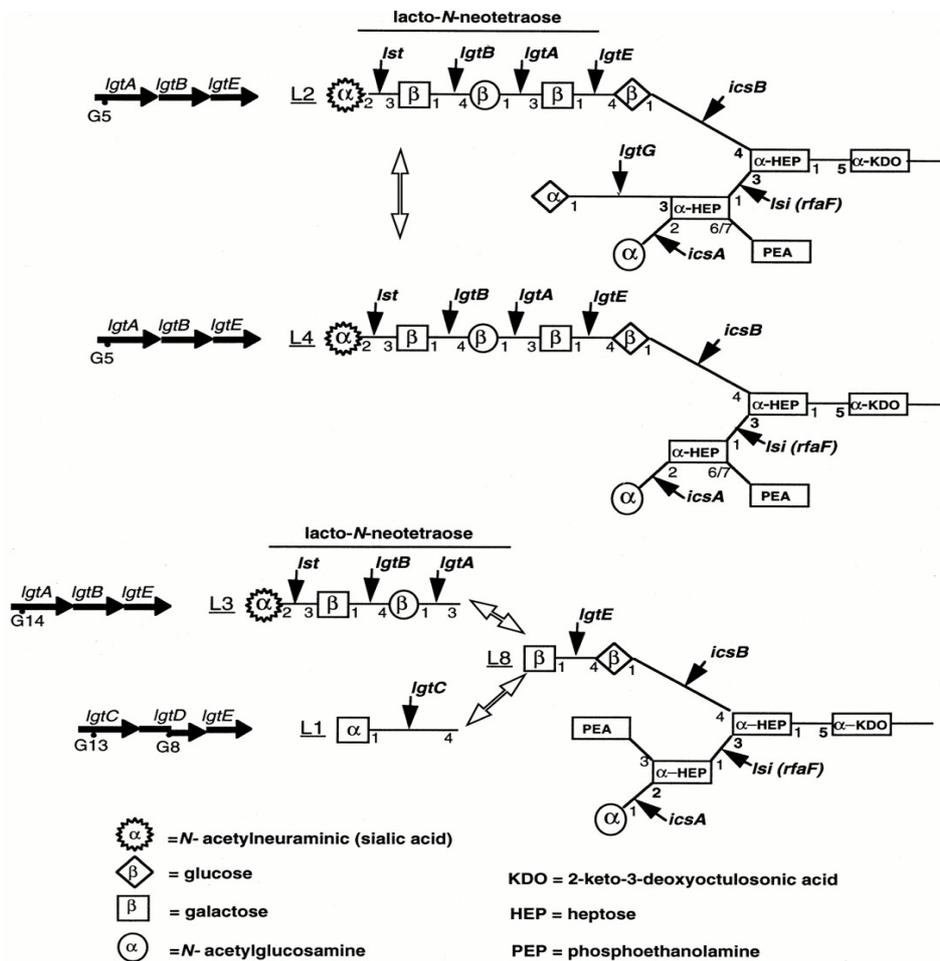


Abb. 1.2.5: Primäre LOS-Struktur der Immunotypen L1, L2, L3, L4 und L8 von *Neisseria meningitidis*. Offene Pfeile zeigen die Phasenvariation zwischen den Strukturen an. Die Anzahl der Guanidinreste im Polyguanidinstrang der phasenvariablen Genen *IgtA*, *IgtC* und *IgtD* sind mit angegeben (Jennings *et al.*, 1999).

1.3 Zelluläre Interaktion – Analyse mittels Mikroarray

Untersuchungen haben gezeigt, dass im Nasopharynx in der Regel unbekapselte Erreger isoliert werden können, wohingegen Isolate aus der Blutbahn oder dem Liquor zumeist bekapselt sind (Devoe und Gilchrist, 1975). Diese Beobachtungen führen zu der Hypothese, dass die Kapsel nach einem Kontakt mit der Mukosa möglicherweise herunterreguliert wird, um nach Passage des Nasopharynxepithels im Blutstrom wieder reexprimiert zu werden (Stephens *et al.*, 1993, Virji *et al.*, 1993). So konnte das Regulatorprotein CrgA identifiziert werden, das die bakteriellen Oberflächenstrukturen Pili und Kapsel herunterreguliert (Deghmane *et al.*, 2000). Eine Inaktivierung dieses Gens führt zu einer Reduktion der bakteriellen Adhärenz an Epithelzellen. Auch sind diese Bakterien nicht mehr zur engen Zellkontaktaufnahme, der sogenannten „*intimate adhesion*“, mit der Wirtszelle in der Lage. Trotz solcher Fortschritte, wie die Entdeckung des Transkriptionsregulators *crgA*, ist das Verständnis um die molekularen Vorgänge während der Infektion, speziell Adhärenz und Invasion, immer noch sehr lückenhaft. Neue Technologien, wie z.B. die Mikroarray-Technologie, sowie die komplette Sequenzinformation der Meningokokkenstämme MC58 (Serogruppe B) und Z2491 (Serogruppe A) erleichtern die Aufklärung des komplexen Wechselspiels zwischen Bakterium und Wirt (Tettelin *et al.*, 2000; Parkhill *et al.*, 2000).

Mikroarrays erlauben es, Aussagen über die Genexpression unter ausgewählten Umweltbedingungen zu treffen (u.a. Temperatur, Salzgehalt, Wachstum in verschiedenen Medien, Zellkontakt, Anwesenheit von Mutagenen, z.B. DNA schädigende Agenzien) (Lucchini *et al.*, 2001). Das Prinzip der Technik entspricht einem reversen Southern-Blot (Southern, 1975). Gen-spezifische Proben werden auf einer Membran immobilisiert und mit einer markierten Zielpopulation genomischer oder cDNA hybridisiert (Kurian *et al.*, 1999). Jedoch, anders als beim *dot-blot*, bei dem eine Membran als Trägersubstanz verwendet wird, deren Fassungsvermögen maximal 700 einzelne Gen-Spots umfasst (Fodor *et al.*, 1991), dienen als Matrix für Mikroarrays Glas- oder Silikonsubstrate. Auch kann eine größere Anzahl von Genen detektiert werden. So wurden bereits Mikroarrays mit einem Fassungsvermögen von bis zu 400.000 Proben pro Slide konstruiert (Dhimann *et al.*, 2002). Anwendungen finden Mikroarrays in der Diagnostik und der Transkriptions- und Sequenzanalyse. Vermehrt werden Mikroarrays verwendet, um die Interaktion zwischen Wirt und Pathogen, entweder auf der Wirtsebene oder auf der Ebene des Erregers, aufzuklären. So wurden Mikroarrays eingesetzt, um die transkriptionellen Veränderungen in Monocyten nach der Infektion mit verschiedenen *Salmonella* Stämmen (Detweiler *et al.*, 2001) zu untersuchen. Auch konnte mit dieser Technologie gezeigt werden, dass bestimmte Virulenzkomponenten für die Induktion einer Vielzahl von Genen in den entsprechenden Wirtszellen verantwortlich sind (Doran *et al.*, 2003). Weiterhin konnte mittels Mikroarrayanalyse demonstriert werden, dass die transkriptionelle Aktivität einzelner bakterieller Gene während der Infektion stark Erreger spezifisch ist. So wurden bei einem pathogenen Meningokokkenstamm während der epithelialen Interaktion andere Gene aktiviert, als bei einer Infektion mit dem Kommensalen *Neisseria lactamica* (Griffantini *et al.*, 2002). Dies kann zur Identifizierung neuer bisher noch unbekannter Virulenzgene führen, die für die Pathogenität von *Neisseria meningitidis* verantwortlich sind. Auch ein Einblick in eine wichtige biologische Fragestellung, bezüglich dem unterschiedlichen pathogenen Potential zweier in dem selben Habitat lokalisierter verwandter Bakterienspezies (hier *N. meningitidis* und *N. lactamica*), kann vermittelt werden. Des Weiteren können die mittels Mikroarray detektierten Gene einen ersten Schritt in Richtung Entwicklung neuer Impfstoffkandidaten darstellen.

1.4 Zielsetzung

Neisseria meningitidis, der Verursacher von Sepsis und Meningitis, interagiert während der Infektion mit verschiedenen Zelloberflächen des Wirtes. Die Anpassung an die spezifischen Milieubedingungen im Wirtsorganismus ist daher ein essentieller Schritt in der Pathogenese. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von genomweiten transkriptionellen Interaktionsmechanismen in *Neisseria meningitidis* nach Kontakt mit Epithel- und Endothelzellen mittels der Mikroarray-Technologie. Diese beiden Interaktionsvorgänge stellen ein Schlüsselereignis in der bakteriellen Pathogenese dar. Einige Faktoren, die in der Adhärenz eine wichtige Rolle spielen, sind bereits bekannt. Dazu gehören unter anderen die Außenmembranproteine Opa und Opc, Porine, Lipooligosaccharide und Typ IV Pili. Es sind jedoch noch nicht alle Gene, die in dem komplexen Zusammenspiel von Erreger und Wirt involviert sind, identifiziert. Wichtig für diese Studien auf transkriptioneller Ebene ist eine vollständige Trennung der adhärenenten Meningokokken von der zellulären Oberfläche des Wirtes. Daher musste in einem ersten Schritt eine effiziente Abwaschmethode für den Erreger von der Wirtsoberfläche entwickelt werden. Anschließend sollte die RNA von den so gewonnenen adhärenenten Bakterien isoliert und in cDNA umgeschrieben werden. Diese cDNA stellte dann die Ausgangsbasis für den Mikroarray dar. Die mittels Mikroarray gewonnenen Daten sollten für einige Gene durch Verwendung eines unabhängigen Systems, einer *real time* PCR unter Verwendung der *Light Cycler*-Technologie, nochmals bestätigt werden. Abschließend sollten einige im Mikroarray differentiell regulierte Gene nochmals näher charakterisiert werden, um ihre Rolle in der zellulären Interaktion zu klären. Dies beinhaltete die Konstruktion von Mutanten und die sich anschließende phäno- und genotypische Charakterisierung, sowie Infektionsstudien an Epithel- und Endothelzellen. Ziel dieser Arbeit ist es, neben bekannten Faktoren, die in der zellulären Interaktion eine Rolle spielen, neue noch unbekannte Faktoren aufzudecken.

2 Materialien

2.1 Geräte

Brutschränke	BB6060 (Heraeus, Hanau) BB6220 (Heraeus, Hanau) B5060 EC/CO ₂ (Heraeus, Hanau)
Elektrophoresekammern	MIDI 1-Elektrophorese-Kammer (Roth, Karlsruhe) MAXI-Elektrophorese-Kammer (Roth, Karlsruhe) Sub Cell [®] GT (Biorad, München) Minigel-Twin (Biometra, Göttingen) Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Biorad, München)
ELISA-Reader	Titertek Multiskan [®] MCC/340 (Flow Laboratories)
Gel-Dokumentationssystem	Gel-Kamera Herolab UVT-28 MP/ICU-1 (Herolab, Wiesloch)
Gerät zur Elektroporation	Gene Pulser [™] (Biorad, München)
Heizblöcke	BT1 und BT3 (Grant Instruments, Cambridge; UK)
Hybridisierungsoffen	DUO-Therm OV5 (Biometra, Göttingen)
Schüttler	PHERO-Shaker (Biotech Fischer GmbH, Reiskirchen)
Schüttelinkubatoren	Certomat [®] U (VWR International GmbH, Darmstadt) FastPrep FP120 Schüttler (Savant Farmingdale, NY, USA) Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
Sequenziergerät	ABJ Prism 377 DNA Sequenzer (Perkin Elmer, Weiterstadt)
Spannungsgeräte	Standard Power Pack P25 (Biometra, Göttingen) Power Supply 200/2.0 (Biorad, München) Power Supply 3000Xi (Biorad, München)

Spektrophotometer	RNA/DNA Calculator Gene Quant pro (Biochrom, Berlin)
Thermocycler	LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim) T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen) Primus 96 plus (MWG Biotech AG, Ebersberg)
Ultraschallgerät	Branson Sonifer® Cell Disrupter B-15p (Branson, Genf, Schweiz)
UV <i>Crosslinker</i>	Stratagene® 1800 (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande)
Wasserbäder	Wasserbad mit Schrägdeckel WB 10 (Roth, Karlsruhe)
Zentrifugen	Biofuge pico (Heraeus, Hanau) Megafuge 1.0 R (Heraeus, Hanau) Savant Speed Vac Plus SC110 (GMI, Albertville, Minnesota, USA)

2.2 Verbrauchsmaterial

2.2.1 Allgemein

Ambion, Inc. RNA Company, Austin, Texas, USA
RNA`se freie 1,5 ml Mikrotubes

Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Column PD-10 Empty, Chromatografische Säulen

Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig
Röntgenfilm Hyperfilm™ – MP

BIO 101 Inc., La Jolla, CA, USA
FastRNA Blue Röhrchen

Corning, New York, USA
Hybridisierungskammern

Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Gefäße 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml

Eurogentec, Seraing, Belgien
Elektroporationsküvetten

Machery & Nagel, Düren
Positiv geladene Nylonmembran

Noras GmbH Labor- und Medizintechnik, Würzburg
Halbmikroküvetten
Mikrotiterplatten 24 well
Mikrotiterplatten 96 well
PPN-Röhrchen steril-17/100 mm

2.2.2 Reaktionskits

Invitrogen, Groningen, Niederlande
Topo-TA Cloning[®] Kit
pBAD Topo-TA Expression[®] Kit
ProBond[™] Nickel-Chelating Resin

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DIG DNA Labeling Kit
DIG Luminescent Detection Kit
Light Cycler-DNA Master SYBR Green I Kit

Qiagen, Hilden
Genomic-tip 100 Kit
QIAprep Spin Miniprep Kit
Qiagen Plasmid Midi Kit
QIAquick Gel Extraktion Kit
QIAquick PCR Purification Kit
RNeasy Minikit
RNeasy Midikit

Sigma, Taufkirchen
Toxicology Assay Kit

2.2.3 Chemikalien

Ammoniumpersulfat (APS)
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)
X-Gal

(AppliChem, Darmstadt)

Polyvitex

(bio Merieux, Marcy l'Etoile,
Frankreich)

Agarose NEE0 Polyacrylamid 30% TEMED	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
ATP	(Epicentre Technologies, Madison, Wisconsin, USA)
Bacto-Trypton GC-Medium Base Hefeextrakt Proteose-Pepton	(Difco Laboratories, Augsburg)
Arabinose Stärke	(Fluka-Chemie-GmbH, Buchs, Schweiz)
LB-Agar (Lennox L-agar) LB Broth Base (Lennox L Broth Base)	(Life Technologies, Karlsruhe)
Ethidiumbromid Glycerin 87% Imidazol 2-Mercaptoetanol Tween® 200	(Merck-Schuchhardt, Darmstadt)
DEPC Dimethyl-Sulphoxid (DMSO)	(Sigma, Taufkirchen)
Gelantine Saponin	(SERVA Elektrophoresis GmbH Heidelberg)

Alle weiteren Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt oder Serva Heidelberg bezogen.

2.2.4 Enzyme und andere Reagenzien

Amersham Pharmacia, Freiburg

Cy3- bzw. Cy5-dCTP

Becton Dickinson, Bedford, Mass., USA

Müller Hinton Blutagar Platten

Gibco Life Technologies, Karlsruhe

Coomassie Brilliant Blue®-250

DTT (Diothiothreitol)

dNTP für cDNA Synthese (ATP, CTP, GTP und TTP)

RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor

Superscript II RNase H⁻ Reverse Transkriptase

Trypsin-EDTA

Eurogentec, Seraing, Belgien
EGT-Hybridisierungspuffer

dCTP (für cDNA Synthese Eurogentec-Slide)
dNTP-dCTP (für cDNA Synthese Eurogentec-Slide)

Invitrogen, Groningen, Niederlande
Random Primers

New England Biolabs (NEB), Frankfurt/Main

diverse Restriktionsendonukleasen
alkalische Phosphatase CIP
T4 DNA-Ligase
T4 Polynukleotidkinase
T4 Polymerase

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

DNase freie Rnase
ABTS Tabletten

Promega Corporation Madison, Wisconsin, USA

dNTP für PCR (ATP, CTP, GTP und TTP)
25 mM MgCl₂
10x Reaktionspuffer
Taq-Polymerase

Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena

QMT Blocking Solution

Serva Feinbiochemics Heidelberg/New York

Lysozym (183000U/mg)
Serva Blue G

2.2.5 Antikörper

2.2.5.1 Antikörper für Western-Blot

1. Antikörper

(verdünnt 1:1000) opa 4B12/C11 IgG₂-AK
(verdünnt 1:1000) Opc B306 IgG₁-AK
(Giovanni Morelli, MPIMG1-Referenzzentrum, Berlin)

(verdünnt 1:4000) Pili SM1
(Virji Mumtaz, Department of Pathology and
Microbiology, Bristol, UK)

(verdünnt 1:5000) Anti-Thio™
(Invitrogen, Groningen, Niederlande)

2. Antikörper

(verdünnt 1:2500) alkalische Phosphatase IgG/IgM Konjugat
(verdünnt 1:2500) α-Maus IgG+M (H+L)Pox
(Dianova GmbH, Hamburg)

2.2.5.2 Antikörper für Kapselpolysaccharid-ELISA

1. Antikörper

(verdünnt 1:4000 in 1% BSA/PBS) Kapsel B Maus mAB 735
(Frosch *et al.*, 1989)

2. Antikörper

(verdünnt 1:2500 in 1% BSA/PBS) α-Maus IgG+M (H+L)Pox
(Dianova GmbH, Hamburg)

2.2.6 Größenstandards

Precision Plus Protein™ Standards 4110028 Rev A (Biorad, München)

DIG III Marker (Eurogentec, Seraing, Belgien)
Smart-Ladder

1kb DNA Ladder (Promega Corporation Madison,
Wisconsin, USA)

2.3 Lösungen und Puffer

DEPC-H₂O 250 ml H₂O (Ampuwa)
250 µl DEPC
(Inkubation über Nacht im 37°C Brutschrank)
(2x autoklavieren)

10x Gelladungspuffer 50% Glyzerin
(Agarosegele) 1 mM EDTA
0,4% Bromphenolblau

10x Lämmli 30 g Tris
144 g Glycin
addiert auf 1 l H₂O (pH 8,7)

10x MOPS*	0,4 M MOPS 0,1 M Natriumacetat 10 mM EDTA pH 8,0 pH 7,0 (Einstellung mit 2N NaOH) * lichtgeschützt lagern
20x SSC	3,0 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
20x SSPE	3,6 M NaCl 0,2 M NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O pH 7,4 20 mM EDTA
10x PBS	10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4 140 mM NaCl
10x TAE	400 mM Tris/HCl, pH 8,0 200 mM Natriumacetat 20 mM EDTA pH 8,0
10x TBE	890 mM Tris-Base 890 mM Borsäure 20 mM EDTA pH 7,2-7,8 (Einstellung bei 50°C)
1x TE	1 mM EDTA 10 mM Tris/HCl pH 8,0
Upper Tris	30,3 g Tris in 400 ml H ₂ O lösen pH 6,8 (mit HCl) 10 ml 20% SDS Auffüllen auf 500 ml mit H ₂ O
Lower Tris	90,85 g Tris in 400 ml H ₂ O lösen pH 8,8 (mit HCl) 10 ml 20% SDS Auffüllen auf 500 ml mit H ₂ O

2.4 Vektoren

pTL1 (Unkmeir *et al.*, 2002), Größe: 2975 bp

Derivat des pBluescript (Invitrogen, Groningen, Niederland). Verfügt über eine *Neisseria* uptake sequence (5'- TCGAGAAGTCTGCCG – 3'). Diese ist in die *SacI*-Schnittstelle des Vektors kloniert und liefert die Voraussetzung für eine erfolgreiche Transformation in Meningokokken. Durch ein im Vektor befindliches Ampicillin-Resistenzgen ist zusätzlich eine antibiotische Selektion möglich.

pCR[®]II Vektor (Invitrogen), Größe: 3948 bp

linearisierter Vektor mit 3' - Thymidin – Überhängen zur Klonierung von PCR-Produkten mit 3' - Adenosin – Überhängen. Charakterisierung des Vektors: *f1 ori*, *pUC ori*, *lacZ*, multiple Klonierungsregion (MCS) flankiert vom T7-RNA-Promotor und Sp6 Promotor, Amp^R, Kan^R.

pCR[®]2.1.-TOPO (Invitrogen), Größe: 4000 bp

linearisierter Vektor mit 3' - Thymidin – Überhängen zur Klonierung von PCR-Produkten mit 3' - Adenosin – Überhängen. Charakterisierung des Vektors: *f1 ori*, *ColE1 ori*, *lacZ*, multiple Klonierungsregion (MCS) flankiert vom T7-RNA-Promotor, Amp^R, Kan^R.

pBAD/Thio-TOPO[®](Invitrogen), Größe: 4454 bp

linearisierter Vektor mit 3' - Thymidin – Überhängen zur Klonierung und regulierter Expression von Taq-amplifizierten PCR-Produkten mit 3' - Adenosin – Überhängen. Charakterisierung des Vektors: Arabinose O1/O2 Operator, Arabinose Promotor, Ribosome Bindungsstelle (RBS), His-Patch Thioredoxin ORF, V5 Epitop, Klonierungsregion flankiert von der Erkennungssequenz der Entereokinase und dem V5 Epitop, Polyhistidin Region, *pUC ori*, *araC*, Amp^R.

pHP 45 Ω (Prentki und Kirsch, 1984)

Derivat von pKTH604, mit dem omega (Ω) Element aus R100.1 und synthetischen Polylinkern von pBR322. Das Ω Fragment enthält ein Antibiotikaresistenzgen (Spectinomycin), flankiert von kurzen sich wiederholenden Sequenzen mit Signalen für die Termination der Translation.

pUC4K (Pharmacia /accession no.X06404), Größe: 3980 bp

enthält ein Aminoglycosid 3-phosphotransferase-Gen aus dem Transposon Tn903, das zur Kanamycin-, Neomycin- und G-418-Resistenz in einer Vielzahl von Wirtszellen führt und mit *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I, *Sal*I bzw. *Hinc*II herausgeschnitten werden kann.

Die ersten vier Vektoren enthalten neben regulatorischen Sequenzen auch die kodierende Information für die ersten 146 Aminosäuren des β-Galaktosidasegens (*lacZ*). In diese Region ist ein Polylinker inseriert, der den Leserahmen nicht zerstört. Vektoren dieses Types werden in Wirtszellen benutzt, die nur für den carboxyterminalen Teil des Enzyms kodieren. Die β-Galaktosidase des Wirtes und die des Plasmides selbst sind nicht aktiv. Sie können aber

assoziiieren und so ein enzymatisch aktives Protein bilden (α -Komplementation). Die daraus resultierenden Lac⁺- Bakterien bilden in der Anwesenheit des chromogenischen Substrates X-Gal blaue Kolonien. Eine Insertion fremder DNA in den Polylinker führt in den meisten Fällen zur Produktion eines aminoterminalen Fragmentes, das nicht zur α -Komplementation befähigt ist. Bakterien mit diesen rekombinaten Plasmiden bilden weiße Kolonien.

2.5 Primer

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Primer für den Vektor pTL1

329 5'- ACCATGATTACGCCAAGC - 3' Pos. 813-796
KB9 5'- AATACGACTCACTATAGGGC - 3' Pos. 617-646

Primer für den Vektor pBAD/Thio-TOPO[®]

Trxfwd 5'- TTCCTCGACGCTAACCTG - 3' Pos. 655-672
pBadrev 5'- ATTTAATCTGTATCAGGC - 3' Pos. 854-871

Primer für die Kanamycin-Resistenzkassette aus pUC4K

PUC4KF 5'- AACATAAAACTGTCTGCTTA - 3' Pos. 1644-1624
PUCKR 5'- CAATTCTGATTAGAAAACTC - 3' Pos. 711-730
SeqPUCKF/R 5'- TCGCACCTGATTGCCCGACATT - 3' Pos. 1443-1421

Primer für die Spectinomycin -Resistenzkassette aus pHP45 Ω

Smr-fwd 5'- TTATTTGCCGACTACCTTGGT - 3'
Smr-rev 5'- ATGCGCTCACGCAACTGGT - 3'

Primer für die Reinheitskontrolle der isolierten RNA

a) Nachweis bakterieller chromosomaler DNA

ORF NMB0829 (*hsdM*)

NMB829F 5'- AATCCGCCTTATTCCATCAAC - 3' Pos. 853.274-853.295
NMB829R 5'- TTCGCGTGTGTCTTCGGCT- 3' Pos. 853.274-853.295

ORF NMB1972 (*groEL*)

NMB1972F 5'- GTCGGTGCCGCGACCGAAGT - 3' Pos. 207.0312-207.0292
NMB1972R 5'- CATCATGCCGCCCATACCAC - 3' Pos. 206.9797-206.9817

b) Nachweis humaner zellulärer DNA

ORF XM_004814 (*ACTB*)

AktinF 5'- ATCATGTTTGAGACCTTCAAC - 3'
AktinR 5'- AAATAAAGCCTGCCAATCTC - 3'

Primer für die Klonierungen in pTL1

ORF NMB1527 (*rfaF*)

rfaFpTLF 5'- ATGTCCATCAAATCCTGAT - 3' Pos. 157.8175-157.8155

rfaFpQER 5'- GCTTCATACCGCCTCTTCAACCGC - 3' Pos. 157.7168-157.7186

ORF NMB1646

NMB1646fpro 5'- TATACAGGCGAACGCTTCAATACT - 3' Pos.171.3344-171.3368

PQEHIII1646R 5'- GATTACGTAACCGTACACGCTG - 3' Pos.171.3964-171.3942

ORF NMB1843

NMB1843proFV 5'- CCTACCCAATCAAACATGCG - 3' Pos.194.3841-194.3821

NMB1843rev 5'- TATAAGGTCCATGCTGCACACAA
GGCATCC - 3'

Primer für die Klonierungen in pBAD/Thio-TOPO[®]

ORF NMB1843

1843for 5'- CCTACCCAATCAAACATGCG - 3' Pos.194.3841-194.3821

1843Rneu 5'- CGAGTTCAACGCATCCTC - 3' Pos.194.3386-194.3404

Primer für die quantitative RT-PCR mittels *Light Cycler*

ORF NMB0497

NMB0497hemF 5'- TTTGAGCATGTTCTTGAGGGG - 3' Pos. 526.583-526.603

NMB0497hemR 5'- ATTGTAGTTGTGGGTTGTC - 3' Pos. 526.721-526.740

ORF NMB1527 (*rfaF*)

NMB1527For 5'- ACGCAGGCTGGATAAGGAACGTCTG-3' Pos.157.7865-157.7840

NMB1527Rev 5'- TCGGCAAATGCCTTGTCGGCCAAC-3' Pos.157.7587-157.7612

ORF NMB1646

NMB1646P1 5'- CTGATTGCCGGAAGCTACACACCG-3' Pos.171.3589-171.3613

NMB1646P2 5'- TACCGCCAAGACCATCCAACCCATG-3' Pos.171.3759-171.3734

ORF NMB1779

NMB1779hemF 5' - GGCGTAAGCGAACAGGAGAT - 3' Pos.186.7302-186.7282

NMB1779hemR 5' - TGTCCATCGTGCTTGAGTTG - 3' Pos.186.7445-186.7466

ORF NMB1843

NMB1843P1 5'- TCGGTCTGATACAGGCAAGGGAAGC - 3' Pos.194.3798-194.3773

NMB1843P2 5'- AACACGTCGTTGGTCGTTGGAAGGT - 3' Pos.194.3588-194.3613

ORF NMB1994 (*nadA*)

LC1994 for 5'- CAGACACTGATGCCGCTTTA- 3' Pos.210.0747-210.0767

LC1994rev 5'- GGCGATATCGTTGAATGCTT - 3' Pos.210.0938-210.0958

*Primer für die Klonierungen in den pCR[®] II Vektor bzw. pCR[®] 2.1.-TOPO Vektor

ORF NMB0070 (*synX*)

NMB0070F 5'- CACCCTCCCATCCTTAGAAGAAGTC - 3' Pos.79758-79734

NMB0070R 5'- CAGAATACTTTCAGTGCCAGTGTCA - 3' Pos.79519-79544

ORF NMB0073 (*ctrC*)

NMB73 1 5'- TTTGGATACCATCTTGGCGCGCATG - 3' Pos.83068-83093

NMB73 2 5'- AGCCATCAAAAGCCAAGCCATCAGC - 3' Pos.83218-83193

ORF NMB0162 (*secY*)

SecyF 5'- GGTAGGGCGGGTAGTCAAATACGC - 3' Pos.161.398-161.423

SecyR 5'- AAGCCATATACAGCAATTGACCGTG - 3' Pos.161.534-161.509

ORF NMB0200

NMB0200F 5'- TTAACTGGTTCGCCAAAACACAGG - 3' Pos. 203.308-203.283

NMB0200R 5'- GTCAGTTCAATAGGGCAAGTTGCTC - 3' Pos. 203.468-203.443

ORF NMB0535 (*gluP*)

glupF 5'- TGTCTTACGTTTCAGGCGATG - 3' Pos.556.122-556.142

glupR 5'- CCCAAAATACCGCGTAAGA - 3' Pos.556.320-556.300

ORF NMB0700 (*iga*)

igaF 5'- AGGAAGAAGAGCACCGTCAA - 3' Pos.727.085-727.065

igaR 5'- ACCAGTCCGGATTATGCAAG - 3' Pos.726.868-726.888

ORF NMB0985

NMB0985F 5'- AGGTAACCCACACGGCAAACCGCAT - 3' Pos.100.1781-100.1806

NMB0985R 5'- CGCAATCTGCAACGCAGCAACCAGT - 3' Pos.100.2232-100.2207

ORF NMB1034 (*leuD*)

lm DF 5'- GCAAATCCTGTTGACGCGTAA - 3' Pos.104.6593-104.6571

lm DR 5'- GGTAATGTCAAATGTGAACGTTTCG - 3' Pos.104.6336-104.6311

ORF NMB1398 (*sodC*)

NMB1398F 5'- ATTGACAGCTGGTTTtaggcgc - 3' Pos.142.7362-142.7383

NMB1398R 5'- GTGGAGCTGGATGATCGGAGT - 3' Pos.142.7602-142.7581

ORF NMB1857 (*mdaB*)

NMA0600N1 5'- CATTCTCACGGCGGGTTAAACCGTA - 3' Pos.196.1088-196.1113

NMA0600N2 5'- TAGAGTTTGCCGTGTCCAGCGGTA - 3' Pos.196.1331-196.1307

ORF NMB2052 (*petB*)

NMB02052F 5'- TGAAAACGGTGTCCCTCTAGATGGC - 3' Pos.217.5589-217.5564

NMB02052R 5'- ACACCCCATACCTGAGTACCGGCAA - 3' Pos.217.4873-217.4848

*Die aufgelisteten Primer dienen des weiteren auch für die quantitative PCR mit dem *Light Cycler*.

2.6 Bakterienstämme

Die Tabelle 2.6. gibt einen kurzen Überblick über die im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Bakterienstämme und deren Charakteristika.

Organismus	Stamm	Charakteristika	Referenz
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ ,m _k ⁻) <i>supE44 thi-1 λ recA1 gyrA1</i> <i>relA1 Δ(lacZYA-argF)U169</i> <i>deoR Φ80dlacZΔM15</i>	Hannahan, 1983
<i>Escherichia coli</i>	TOP10F'	F' { <i>lacI^q Tn10</i> (Tet ^R)} <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1</i> <i>araD139 Δ(ara-leu)7697 galU</i> <i>galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>Neisseria meningitidis</i>	MC58	B:15:P1.7,16; ET-5 Komplex	Klinisches Isolat aus Großbritannien, 1985, von E.R. Moxon, Oxford Virji <i>et al.</i> , 1991
<i>Neisseria meningitidis</i>	MC58 <i>opc</i>	Inaktivierung des <i>opc</i> -Gens durch Insertion einer Antibiotikaresistenzkassette	Unkmeir <i>et al.</i> , 2002
<i>Neisseria meningitidis</i>	MC58 <i>siaD</i>	Inaktivierung des <i>siaD</i> -Gens durch Insertion einer Antibiotikaresistenzkassette	Unkmeir <i>et al.</i> , 2002
<i>Neisseria meningitidis</i>	MC58 <i>siaD</i> <i>opc</i>	Inaktivierung des <i>siaD</i> - und <i>opc</i> -Gens durch Insertion einer Antibiotikaresistenzkassette	Unkmeir <i>et al.</i> , 2002

Tab. 2.6.: Bakterienstämme

2.7 Stammhaltung und Konservierung

Die Meningokokken wurden für die einzelnen Experimente auf GC-Agar fraktioniert ausgestrichen und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre über Nacht inkubiert. Die weitere Kultivierung der Bakterien erfolgte dann für ~ 2 h in 10 ml supplementierten PPM Medium (Schüttelinkubator, 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre) bis zur gewünschten optischen Dichte.

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

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

PPM⁺ Medium: 50 ml PPM
(supplementiert) 250 µl 2 M MgCl₂
 250 µl 8,4% NaHCO₃
 500 µl Polyvitex

Für die Gewinnung der Plasmid-DNA wurden die verwendeten *E. coli*-Stämme in LB Medium unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika bei 37°C als Schüttelkultur über Nacht inkubiert.

LB Medium: 1,0% Baktotryptone
 0,5% Hefeextrakt
 1,0% NaCl
 1,5% Bacto-Agar (nur bei Platten)

Die Kultivierung der *E. coli*-Transformanden erfolgte in ~1 ml SOC Medium für 1 h bei 37°C.

SOC Medium: SOB Medium
 20 mM Glucose
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄

SOB Medium: 2,0% Baktotryptone
 0,5% Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl

Die Selektion der gewünschten Transformanden nach der Klonierung erfolgte durch die Blau-Weiß-Selektion (siehe 2.4.) auf mit IPTG versetzten X-Gal Platten.

X-Gal Platten: 200 ml LB-Agar
200 µl X-Gal* (8 mg X-Gal auf 200 µl DMF)
100 µl IPTG (18 mg IPTG auf 200 µl Aqua dest.)

* lichtgeschützt lagern

Es wurden außerdem von allen Stämmen und Klonen Gefrierkulturen angefertigt und diese bei -70°C gelagert.

Einfriermedium: 400 ml Standard I – Nährbouillon (12,5 g in 500 ml H₂O lösen)
100 ml Glycerin

Glycerinkonserve: Pellet von 1 ml Zellen
1 ml Einfriermedium

2.8 Antibiotika

Bei Zusatz von Antibiotika wurden folgende Konzentrationen verwendet:

Grünenthal GmbH, Aachen

Ampicillin 100 µg/ml für *E. coli*

Sigma, Taufkirchen

Kanamycin 30 µg/ml für *E. coli* und 100 µg/ml für Neisserien

Spectinomycin 40 µg/ml für *E. coli* und 75 µg/ml für Neisserien

Biochrom, Berlin

Gentamicin 10 mg/ml (1 ml in 50 ml RPMI = 0,2 mg/ml)

Für die Bestimmung der minimalen Hemstoffkonzentration wurden Etest-Streifen mit einem Konzentrationsgradienten verwendet.

Viva Diagnostik GmbH, Köln

Etest[®] Streifen zur Antibiotika Empfindlichkeitstestung

2.9 Zelllinien

Die Tabelle 2.9. gibt einen kurzen Überblick über die im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Zelllinien und deren Charakteristika.

Zelllinie	Organismus	Gewebe	Marker	Referenz
HEp-2*	<i>Homo sapiens</i>	ursprünglich Derivat eines epidermoid Kehlkopfkarzinum ABER: HeLa kontaminiert (ATCC Katalog; ATCC, Manassas, Va)	<ul style="list-style-type: none"> • HeLa Chromosomen: 1 Kopie von M2 2-5 Kopien von M3 1 Kopie von M4 • positiv für Keratin 	Moore <i>et al.</i> , 1955
HeLa*	<i>Homo sapiens</i>	Cervix; epithelial; Adenocarcinom	<ul style="list-style-type: none"> • HeLa Chromosomen: 1 Kopie von M1 1 Kopie von M2 4-5 Kopien von M3 2 Kopien von M4 • positiv für Keratin 	Macville <i>et al.</i> , 1999
HBMEC	<i>Homo sapiens</i>	Human brain microvascular endothelial cells	positiv für: <ul style="list-style-type: none"> • Faktor VIII-Rag • Carboanhydrase IV • Ulex Europeus Agglutinin I • Aufnahme von fluoreszenz-markierten acetylierten LDH (Low Density Lipoprotein) • Expression von γGT (Gamma Glutamyl Transpeptidase I) 	Stins <i>et al.</i> , 1997

Tab. 2.9.: Zelllinien

*Anmerkung: Obwohl die Epithelzelllinie HEp-2 identisch mit der HeLa-Zelllinie ist, wird aus Gründen der Klarheit die Bezeichnung HEp-2 in der gesamten Arbeit beibehalten.

2.10 Zellkultur

HEp-2 Zellen wurden in RPMI 1640 unter Zugabe von 10% fetalen bovines Serum (FCS) (beides von Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und 2 mM L-Glutamine (Biochrom, Berlin, Deutschland) in T75-Zellkulturflaschen (Noras, Würzburg, Deutschland) kultiviert.

Die Kultivierung der HBMEC Zellen erfolgte ebenfalls in RPMI Medium unter Zugabe von 10% FCS, sowie von 10% Nu-Serum IV (Becton Dickinson, Bedford, Mass.), 1% Vitaminen, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, Heparin (5 U/ml) (alle Reagenzien sind von Biochrom) und 30 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ *Endothel cell growth supplement* (Cell Systems Clonetics, St. Katharinen, Deutschland) in mit 0,2%iger Gelatine beschichteten T75 - Zellkulturflaschen.

Beide Zelllinien wurden in einer Atmosphäre von 37°C und 5% CO₂ Gehalt kultiviert.

Es wurden außerdem von allen Zelllinien Gefrierkulturen angefertigt und diese erst bei -70°C für 1 Tag gelagert, dann in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196°C aufbewahrt.

Gefrierkultur	abtrysinierte Zellen aus einer T75-Zellkulturflasche (vollständiger Monolayer) 900 μl RPMI 1640 Medium 100 μl DMSO
---------------	---

3 Methoden

3.1 Infektionsversuche

3.1.1 Adhäsion- und Invasionsversuche an HEp-2 und HBMEC Zellen

Reagenzien

1x PBS

Saponin

Gentamicin

RPMI1640

RPMI1640 + 10% FCS

Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen ausgesät und bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens (1×10^7) kultiviert. Die Infektion der Zellen erfolgte mit 1×10^8 Bakterien (*multiplicity of infection* = MOI 10) des jeweiligen Meningokokkenisolats in RPMI Medium (HEp-2) bzw. in RPMI Medium und 10% hitzeinaktivierten FCS (HBMEC) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Die Infektionszeit betrug 6 h. Nach dieser Inkubationszeit wurde jeweils der Überstand abgenommen und die nicht adhärenen Bakterien mit PBS von den Zellen gewaschen. Dieser Arbeitsschritt wurde insgesamt dreimal wiederholt. Um die Anzahl der nicht adhärenen Meningokokken zu bestimmen, wurden die bakterienhaltigen Überstände zuvor in geeigneten Verdünnungsstufen auf GC-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Alle Verdünnungen wurden in PBS durchgeführt. Parallel dazu erfolgte die Bestimmung der adhärenen Bakterien nach 10 min Lysierung der Zellen mit 1 ml 1% Saponin. Für die Bestimmung der intrazellulären Bakterien wurden die Zellen für 1,5 h in RPMI Medium, versetzt mit 100 µg/ml Gentamicin, inkubiert. Dadurch kommt es zu einer Eliminierung der extrazellulären Bakterien. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und dann ebenfalls mit Saponin lysiert. Aus beiden Saponinlösungen und den darin enthaltenen Zellen wurden Verdünnungsreihen in PBS hergestellt, diese dann ebenfalls auf GC-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag erfolgte für die Auswertung der Adhärenz und Invasion die Auszählung der koloniebildenden Einheiten.

Die Infektionsversuche für die im Rahmen der Doktorarbeit konstruierten Mutanten erfolgten in 24-well Platten mit 1×10^6 Zellen pro Vertiefung. HEp-2 Zellen wurden mit bakterienhaltigen RPMI Medium bzw. RPMI Medium + 10% FCS infiziert. Die Infektion der HBMEC Zellen erfolgte ebenfalls in RPMI + 10% FCS, sowie in RPMI + 10% HS. Danach wurde der Infektionsversuch wie beschrieben durchgeführt.

3.2 RNA-Isolierung

Der Umgang mit RNA erfordert besondere Maßnahmen, um RNase-freies Arbeiten zu garantieren. RNasen sind sehr stabile Enzyme und benötigen keinerlei Kofaktoren für ihre Funktion. Um Kontaminationsprobleme zu vermeiden, wurden deshalb alle Lösungen mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt. Diese Chemikalie bindet an primäre und sekundäre Amine, z.B. Histidin, und führt zu kovalenten Bindungen, wodurch die Aktivität der RNasen zerstört wird. DEPC gilt als Karzinogen und muss deshalb mit Vorsicht gehandhabt werden. Da Hände die Hauptquelle für RNasen darstellen, müssen generell Handschuhe getragen werden.

3.2.1 Isolierung der RNA von zell-adhärenenten Bakterien

Reagenzien

Qiagen RNeasy Minikit mit den Puffern RLT, RW1 und RPE

2-Mercaptoethanol

FastRNA Blue Röhrchen

FastPrep FP120 Schüttler

Die Infektion der Zellen erfolgte wie unter 3.1.1. beschrieben. Nach 6 h wurden die zelladhärenenten Bakterien isoliert. Nach der Entfernung der eukaryotischen Zellen erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4000 x g und 4°C um die Bakterien zu gewinnen. Das bakterielle Pellet wurde dann in 1 ml RLT Puffer (Qiagen), einem Lysepuffer, versetzt mit 0,1% 2-Mercaptoethanol, resuspendiert. Das in dem Puffer enthaltene chaotrope Salz Guanidinisothiocyanat wirkt denaturierend auf Proteine und inaktiviert dadurch auch RNasen. Die Zellsuspension wurde dann in FastRNA Blue Röhrchen überführt. Die mechanische Aufschließung der Zellen erfolgte durch die Silica/Ceramid – Matrix der Röhrchen für 45 s bei einer Geschwindigkeit von 6,5 in einem FastPrep FP120 Schüttler. Die Röhrchen wurden anschließend für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die folgende RNA-Reinigung aus den Überständen erfolgte über Säulchen mit Silicia-haltigen Membranen. Dafür wurde ein *RNeasy Minikit* mit den dazugehörigen Pufferlösungen verwendet. Ein speziell entwickeltes Puffersystem, basierend auf hohen Salzkonzentrationen, gewährleistet die Bindung der RNA an die Membran. Durch die Zugabe von Ethanol wird dieser Effekt noch verstärkt. Dafür wurden die Überstände jeweils mit 250 µl 96% Ethanol versetzt, dann auf eine *RNeasy Mini Spin* Säule pipettiert und 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Um mögliche Kontaminationen zu entfernen, wurde die Membran der Säulen mit jeweils 700 µl des Waschpuffers RW1 versetzt und erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen. Danach erfolgte die Zugabe von 500 µl des Waschpuffers RPE. Die Säule wurde dann erneut für 15 s bei 8,000 x g zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurden die Säulen bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert um die Membran zu trocknen. Dann wurden die Säulen in ein neues RNase-freies 1,5 ml Gefäß überführt und jeweils 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Ein weiterer Zentrifugationsschritt von 1 min bei 8000 x g diente zur Gewinnung des Eluats. Um die RNA Ausbeute noch weiter zu erhöhen wurde eine zweite Elution, ebenfalls mit 50 µl RNase-freies Wasser, durchgeführt. Die RNA musste anschließend noch näher qualifiziert werden. Dies geschah unter anderen durch DNase -Behandlung und cDNA Synthese mit anschließender PCR (3.2.3).

3.2.2 Isolierung der Kontroll-RNA für den Mikroarray

Jeweils 10 ml RPMI Medium mit bzw. ohne 10% FCS wurden mit 1×10^8 Bakterien beimpft und jeweils für 6 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Danach wurden die Kulturen abzentrifugiert (10 min, 4000 x g, 4°C) und das bakterienhaltige Sediment anschließend in 1x PBS resuspendiert. Die Resuspension wurde dann erneut zentrifugiert (2 min, 4000 x g, 4°C) und wiederholt mit PBS gewaschen. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt erfolgte die Zugabe von 10 ml Trypsin/EDTA. Die Inkubationszeit betrug 10 min unter leichten Schütteln. Nach dieser Zeitperiode wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert (10 min, 4000 x g, 4°C). Nach dem Aufschluss der bakteriellen Zellen mittels *FastPrep*, erfolgte dann die Isolierung der RNA wie unter 3.2.1. beschrieben.

3.2.3 RNA-Isolierung aus Flüssigkulturen

10 ml supplementiertes PPM-Medium wurden mit einer Übernachtskultur von Meningokokken infiziert und bis zu einem OD_{600nm}=1 ($\cong 1 \times 10^9$ Bakterien) geschüttelt. Diese Kultur wurde dann auf 1×10^8 Bakterien verdünnt und bis zum Erreichen der mittleren logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600nm}=0,5) unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Kulturen abzentrifugiert (10 min, 4000 x g, 4°C) und das Sediment in 1 ml RLT-Puffer (Qiagen), versetzt mit 0,1% 2-Mercaptoethanol, resuspendiert. Der mechanische Aufschluss erfolgte wie bereits beschrieben (3.2.1.). Die RNA wurde anschließend mit dem *Qiagen RNeasy Midikit* isoliert. Es wurde nach dem Protokoll „*Isolation of Total RNA from Bacteria*“ des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Pufferlösungen (RLT, RW1 und RPE) gearbeitet. Anschließend wurde die RNA näher qualifiziert (siehe unter 3.2.4).

3.2.4 Qualifizierung und Quantifizierung der isolierten RNA

3.2.4.1 DNase – Behandlung

Reagenzien

0,05 M MgSO₄ (DEPC-behandelt)

1 M Na-Acetat (DEPC-behandelt)

RNase freie DNase I

Um eine qualitativ hochwertige RNA zu erhalten, wurden potentielle Spuren von DNA durch eine DNase - Behandlung entfernt. Dies geschah durch die Zugabe folgender Reagenzien:

5 mM MgSO₄ (5 µl auf 50 µl)

0,1 M Na-Acetat (5 µl auf 50 µl)

10 U/µl DNase (1 µl auf 50 µl)

Der Ansatz musste für 1 h bei 37°C inkubiert werden. Danach erfolgte die Reinigung der RNA von der enzymatischen Reaktion mittels *Qiagen RNeasy Minikit* (nur bei der RNA-Isolierung der zelladhärenten Bakterien und der Kontroll RNA) bzw. durch den *Qiagen RNeasy Midikit*. Es wurde nach dem „*RNA Clean-up*“ Protokoll (siehe 3.2.1. bzw. 3.2.3. allerdings ohne die Zugabe von Puffer RW1), des Herstellers unter Verwendung der

mitgelieferten Pufferlösungen gearbeitet. Der vollständige Abbau der DNA wurde anschließend mittels PCR (Primer 829F/829R bzw. Primer 1972F/1972R) überprüft. Die Quantifizierung und Qualifizierung der RNA erfolgte photometrisch bzw. mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese.

3.2.4.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Im Anschluss daran wurde die Anwesenheit von humanen Nukleinsäuren bei der isolierten RNA ausgeschlossen. Dieser Schritt ist nur notwendig bei der RNA-Isolierung von zell-adhärenenten Bakterien. Die Überprüfung erfolgte mittels *reverse Transkriptions-PCR* (RT-PCR). Dafür wurden jeweils 5 µl der isolierten RNA mit dem Enzym *Reverse Transkriptase* in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Zuerst wurde die RNA mit 3 µl *reverse* Primer (AktinR) versetzt und anschließend mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 16 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 5 min auf 70°C erhitzt um mögliche Sekundärstrukturen der Primer aufzuschmelzen. Das darauffolgende langsame Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur (~ 10 min) diente der Hybridisierung des Primers. Die weitere Reaktion wurde dann durch die Zugabe folgender Reagenzien gestartet:

4 µl 5 mM dNTP (0,5 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
0,1 µl (= 1 mM) Dithiothreitol
8 µl *first strand* Puffer
9,6 µl DEPC-H₂O
1 µl RNaseOUT Recombinant Ribonuklease Inhibitor
1 µl (=200 U) Superscript II RNase H Reverse Transkriptase

Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 42°C inkubiert und anschließend mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen gereinigt. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Pufferlösungen gearbeitet. Die DNA wurde mit 50 µl H₂O von der Säule eluiert. Jeweils 1 µl des Eluats diente als *Template* für eine sich anschließende PCR Reaktion (hier: Primer AktinF/AktinR).

Variation

- *Light Cycler* - Es wurden jeweils 2 µg RNA mit 10 µl Gesamt-Primer Mix umgeschrieben. Die so synthetisierte DNA diente als *Template* für die PCR mittels *Light Cycler*.
- Analyse der konstruierten Mutanten - Ebenfalls 2 µg RNA wurden für die *reverse Transkription* eingesetzt. Hier erfolgte der Umschrieb allerdings mit 3 µl (= 6 ng) *Random Hexamer Primern*. Für die sich anschließende PCR wurden jeweils die genspezifischen Primer verwendet.

Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.4.3 Quantifizierung der RNA

Die Konzentration und Reinheit der RNA kann durch Messung der Absorption bei 260 nm (OD_{260}) und 280 nm (OD_{280}) im Spektrophotometer bestimmt werden. Eine $OD_{260nm} = 1$ entspricht einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad der Präparation bezüglich der Kontamination mit Proteinen und sollte 1,8-2,0 betragen. Sind größere Proteinmengen in der Lösung vorhanden, steigt die OD_{280} und das Verhältnis wird kleiner. Für die Messung wurde die RNA in H_2O (1:50 bzw. 1:20) verdünnt und anschließend in einer 1 ml Quarzküvette gemessen.

3.2.4.4 Qualifizierung der RNA mittels denaturierender Gelelektrophorese

<u>5x RNA-Gelladungspuffer:</u>	5 ml	50% Formamid
	1,65 ml	2,2 M Formaldehyd
	500 μl	1x MOPS
	1 ml	1/10 Volumen Ficoll 1-10%
	2 ml	0,02% Bromphenolblau

Einzelsträngige RNA kann durch intramolekulare Basenpaarung Sekundärstrukturen bilden und muss daher unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt werden. Die Zugabe von Guanidinisothiocyanat (GTC) in das Gel garantiert die Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen und ermöglicht so einheitliche Laufbedingungen. Für ein 1% Gel wurde 1 g Agarose in 72 ml DEPC- H_2O und 5 ml 10x MOPS bis zum vollständigen Lösen der Agarose in der Mikrowelle erhitzt. Nachdem die Mischung abgekühlt war, erfolgte die Zugabe von:

40 μl	1M Guanidinthiocyanat
8,7 ml	DEPC- H_2O
7,5 μl	Ethidiumbromid

Jeweils 1 Volumen 5x RNA Gelladungspuffer wurde mit 4 Volumen RNA Probe versetzt und 15 min bei 65°C erhitzt, um innere Auffaltungen der RNA aufzulösen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS Puffer. Die Qualität der RNA wurde durch Abschätzen der ribosomalen RNA-Banden (16S und 23S) bemessen. Sie sollten scharf und abtrennbar sein. Ist dies nicht der Fall, läuft z.B. die RNA auf dem Gel als Schmier, kann von einer Kontamination der Präparation mit RNasen ausgegangen werden.

3.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ist eine *in vitro*-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die zwischen zwei Regionen bekannter Sequenz liegen, vervielfältigen kann. Das Reaktionsprinzip der PCR entspricht prinzipiell der Replikation der DNA in der Zelle. Eine DNA-Polymerase synthetisiert neue DNA an einer vorhandenen einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize (*Template*). Für die PCR wurde folgender Ansatz gewählt:

1 μl *Template*
 0,5 μl *forward* Primer (100 pmol/ μl)
 0,5 μl *reverse* Primer (100 pmol/ μl)
 2,5 μl (= 200 μM) 4 mM dNTP
 5 μl 10x Reaktionspuffer
 3,25 μl 25 mM MgCl_2
 37,2 μl Aqua dest.
 0,5 μl Taq-Polymerase (5 U/ μl)

Die gesamte Reaktion basiert auf drei Teilschritten mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen, die sich zyklisch wiederholen.

Parameter	Zeit	Temperatur	Zyklen
1. Denaturierung	5 min	94°C	1x
	1 min	94°C	30x
2. Anlagerung	1 min	x	30x
3. Verlängerung	30 s - 1 min	72°C	30x
	5 min	72°C	1x
	Pause	4°C	

In dem zweiten Schritt (Anlagerung), hybridisieren die Primer mit der Matrizen-DNA. Die Anlagerungstemperatur richtet sich nach dem GC-Gehalt der Primer und wird so gewählt, dass sie sich 5-6°C unter deren Schmelzpunkt befindet. Die Berechnung des Schmelzpunktes erfolgt nach der 2+4-Regel (2°C pro AT-bp, 4°C pro GC-bp). Im dritten Schritt, der Verlängerung, dienen die Primer der Polymerase als Startmoleküle für die Kopierung der beiden Matrizenstränge. Die Dauer des Verlängerungszyklus richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Durch mehrfache Wiederholung der Polymerase-Reaktion wird das nachzuweisende DNA – Fragment nahezu exponentiell vermehrt. Nach dem letzten Zyklus erfolgt die Abkühlung des Reaktionsgefäßes auf 4°C. 10 μl des PCR Produktes wurden anschließend zur Kontrolle auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

3.4 Auftrennung der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA wurde durch elektrophoretische Auftrennung dargestellt. DNA-Moleküle stellen sich im Gel als charakteristische Bande dar, die an ihrer typischen Laufweite erkannt wird. Die Auftrennung erfolgte in Agarosegelen. Agarose wirkt als Molekularsieb. Moleküle, die klein sind im Verhältnis zum Durchmesser der Gelporen, wandern rasch vorwärts, solche die größer sind als die Poren, sind nahezu unbeweglich. Die Agarosekonzentration wurde in Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente gewählt:

0,8% Agarose für 0,8-12 kb
 1% Agarose für 0,5-10 kb
 1,5% Agarose für 0,2- 3 kb.

Die jeweilige Agarosemenge wurde in 1x TAE Puffer unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C in horizontale Gelträger gegossen. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Gelladungspuffer verdünnt. Als DNA-Größenstandard diente die Smart-Leiter. Die Elektrophorese erfolgte bei 100-200V. Für die Visualisierung der DNA-Banden wurden die Gele für 10 min in eine Ethidiumbromidlösung (2 mg/l) gelegt, anschließend unter UV-Licht (302 nm) betrachtet und fotografiert.

3.5 Methoden zur Untersuchung der bakteriellen Transkription

3.5.1 Mikroarrays

Die Technologie der DNA-Mikroarrays ermöglicht die simultane Analyse einer großen Anzahl von Gensequenzen zum Zweck der Gen- und Sequenzidentifizierung, zu Expressionsstudien und zur Detektierung von Polymorphismen. Hauptsächlich finden Mikroarrays Anwendung im Sektor der RNA-Expressionsanalyse. Der Mikroarray kann als eine geordnete Ansammlung von Mikrosots, mit je klar definierter DNA Menge einer Spezies, definiert werden. Die DNA Probe ist auf einem festen Trägersubstrat fixiert. Diese Technologie basiert auf der Hybridisierung zwischen zwei einzelsträngigen komplementären Nukleinsäuren, eine davon ist auf der Trägermatrix fixiert. Man unterscheidet zwei Formen der DNA Arrays: Oligonukleotid-Arrays und cDNA-Mikroarrays (Gabig und Wgryzn, 2001), die sich unter anderem jeweils in der Größe der gespotteten Nukleinsäuren unterscheiden. Für cDNA-Mikroarrays werden PCR Produkte mit einer Länge von 300-500 bp auf geeignete Trägermaterialien gespottet. Dagegen ist die Länge der Nukleinsäuren bei den Oligonukleotidarrays kürzer. Im Durchschnitt beträgt sie zwischen 20-70 bp. Beide Mikroarraytechniken unterscheiden sich in ihrem Anwendungsspektrum. Mikroarrays, auf der Basis von PCR Amplifikaten, werden für großflächige Screening und Expressionsstudien eingesetzt, dagegen eignen sich Oligonukleotid-Arrays besonders für Expressionsüberwachung, Detektierung von Mutationen und Genidentifizierung.

Die Herstellung der Ziel-DNA für den Array erfolgt im Allgemeinen, indem man vom Untersuchungsobjekt (z.B. kultivierte Zellen oder Bakterien) RNA gewinnt und davon cDNA synthetisiert. Die Markierung erfolgt dann durch die Zugabe von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden bei der *Reversen Transkription*. Der Mikroarray wird dann mit der Ziel-DNA hybridisiert und anschließend für jeden Punkt des Arrays die Signalstärke bestimmt. Verwendet man für die Herstellung einer zweiten Ziel-DNA ein anderes Fluorochrom, kann man mit beiden Ziel-DNAs gleichzeitig hybridisieren und braucht nur die Differenz zwischen den Signalen beider Fluorochrome zu bestimmen, um eine Aussage über die Unterschiede im Genexpressionsmuster zwischen den beiden untersuchten Versuchsbedingungen zu erhalten (Mühlhardt C., 2002).

3.5.1.1 Konstruktion der Gesamt-Genom-DNA Mikroarrays

1x Spottingpuffer: 20% DMSO
0,05% Tween 20

Reduktionslösung: 660 mg NaBH₄ (Natriumborhydrid)
200 ml 1x PBS
66 ml absoluter Ethanol

NaBH₄ wurde langsam unter ständigen Rühren dem PBS zugeführt. Nachdem sich die Chemikalie gelöst hatte, erfolgte die langsame Zugabe von Ethanol (ebenfalls unter Rühren). Da NaBH₄ ein starkes, leichtentzündliches Gift darstellt, mussten die Arbeitsschritte unter dem Abzug durchgeführt werden.

Für einen großen Teil der Expressionsstudien kamen Arrays, basierend auf Oligonukleotiden, zur Anwendung. Eine Ausnahme stellten die Eurogentec-Slides dar. Hier wurden jeweils PCR-Amplifikate mit einer Länge zwischen 300-800 bp in Duplikaten auf Superaldehyd-Slides gespottet. Die Slides wurden von der Firma Eurogentec (Eurogentec, Seraing, Belgien) fertig konstruiert bezogen.

Für die Oligoslides wurden jeweils 3 Oligonukleotide (40-mer) pro Gen, die den 5'- und den 3'- Bereich, sowie einen Teil der Genmitte abdecken, auf der Grundlage der veröffentlichten Sequenz der Meningokokkenisolate MC58 (Serogruppe B) und Z2491 (Serogruppe A) konstruiert (Tettelin *et al.*, 2000; Parkhill *et al.*, 2000). Als interne Kontrolle dienten Oligos von vier ausgewählten Genen von *Saccharomyces cerevisiae* (Guckenberger *et al.*, 2002). Alle Oligonukleotide weisen eine Modifikation am 5'- Ende in Form eines C₆-Aminolinker auf, die für die kovalente Bindung der Oligos an die Slideoberfläche notwendig ist (nur bei Superaldehyd-Slides) und wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden in 1x Spottingpuffer vorgelegt und dann mit Hilfe des Affymetrix 417 Arrayer (MWG Biotech AG) jeweils 5 mal auf Superaldehyd- (TeleChem International, Sunnyvale, California) oder Epoxy-Slides (Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Deutschland) gespottet. Das gespottete Volumen pro Array betrug 3,75-4,0 nl. Die Slides wurden dann über Nacht im Array belassen (nur bei Superaldehyd-Slides) bzw. für 30 min in einer Feuchtkammer (relative Luftfeuchte > 95%) inkubiert (Epoxy-Slides). Die Nachbehandlung der Slides erfolgte dann wie unten beschrieben.

Superaldehyd-Slides

Superaldehyd-Slides sind besonders für die kovalente Immobilisierung von Molekülen mit freien Aminogruppen geeignet. Darunter fallen PCR-Produkte und Oligonukleotide. Für die Immobilisierung von Oligonukleotiden ist eine Amino-Modifizierung empfehlenswert. Die Aldehyd-Gruppen der Slideoberfläche reagieren unter Bildung einer Schiff'schen-Base zunächst reversibel mit den NH₂-Gruppen der Biomoleküle. Bei der Nachbehandlung der Slides entsteht dann durch Reduktion der Doppelbindung mittels einer NaBH₄-haltigen Lösung (Reduktionslösung) eine dauerhafte Anheftung der Oligonukleotide an die Slideoberfläche.

Nachbehandlung

1. 1 x 2 min in 0,2% SDS
2. 2 x 1 min in H₂O
3. 1 x 5 min in NaBH₄-Reduktionslösung (*giftig, unterm Abzug)
4. 1 x 1 min in H₂O (0°C)
5. 1 x 1 min in 0,2% SDS
6. 2 x 1 min in H₂O
7. trocken zentrifugieren der Slides für 3 min bei 1600 x g

Alle Waschschrte wurden unter Rühren durchgeführt.

Epoxy-Slides

Epoxy-Slides sind besonders für die kovalente Immobilisierung von Oligonukleotiden (10-20 bp) geeignet. Eine Amino-Modifizierung ist nicht erforderlich, da alle polaren Gruppen unmittelbar und irreversibel mit der Epoxy-Gruppe reagieren. Durch die sehr hydrophobe Oberfläche können kleinste Spotgrößen (von 100 bis 130 µm Ø) erzielt werden, weshalb sich diese Slides sehr gut für hochdichte Arrays eignen.

Bei den Epoxy-Slides war keine Nachbehandlung notwendig.

3.5.1.2 Reverse Transkription unter gleichzeitigem Einbau der Farbstoffe Cy3 und Cy5 (Labelling)

Identische RNA-Mengen, die miteinander verglichen werden sollten, wurden während einer Erststrangsynthese mit einem Farbstoff markiert. Die Extraktion der RNA richtete sich nach den späteren Status der betreffenden Probe: Experiment bzw. Kontrolle (siehe 3.2.). Der Einbau der Farbstoffe erfolgte durch *nick translation* von Cy3- bzw. Cy5-dCTPs. Aufgrund der Vorzüge dieser beiden wasserlöslichen Farbstoffe (klar definiertes Emissionsspektrum, hohe Fluoreszenz) eignen sie sich speziell für eine multiple Farbdetektion, wie sie z.B. in Mikroarrays Anwendung findet. Nach der Aufreinigung und anschließender Vereinigung der beiden markierten Proben erfolgte dann die Hybridisierung.

Für die Reverse Transkription wurden durchschnittlich 27 µg RNA auf ein Volumen von 6 µl eingestellt und mit jeweils 10 µl aufgereinigtem Gesamt-Genom-Primer-Mix (Konzentration 0,5152 pmol/µl) versetzt. Des weiteren erfolgte die Zugabe von 2 µl Standard -RNA (jeweils unterschiedlich für Cy3 bzw. Cy5). Als interne Standards fungierten 4 verschiedene *Saccharomyces* spezifische *in vitro* hergestellte Transkripte: CHS1, CHS2, GAS1 und FKS1 (CHS1 = Chitin-Synthase I, CHS2 = Chitin-Synthase II, GAS1 = *cell surface glycoprotein* 115-120 kDa und FSK1 = 1,3 β-D-Glucan-Synthase) (Guckenberger *et al.*, 2002). Der Ansatz wurde für 5 min bei 70°C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen und dann sofort auf Eis gestellt. Danach erfolgte die Zugabe folgender Reagenzien:

0,8 µl 10 mM dCTP
1 µl 20 mM dATP
1 µl 20 mM dGTP
1 µl 20 mM dTTP
0,1 µl 0,1 M DTT
8 µl 5x *first strand buffer*
5,8 µl DEPC-H₂O
1 µl RNase Out
1 µl Superscript II RNase H⁻ Reverse Transkriptase
2 µl Cy3- bzw. Cy5-dCTP

Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte für 2 h bei 42°C. Da die Farbstoffe stark lichtempfindlich sind, wurde dieser und alle darauffolgenden Arbeitsschritte im dunklen durchgeführt. Das Enzym wurde anschließend für 15 min bei 70°C deaktiviert. Nachdem die

Probe abgekühlt war, wurden mögliche Spuren von RNA durch Zugabe von 2 µl DNase freie RNase entfernt. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei 37°C erfolgte die Aufreinigung der cDNA über G50-Säulchen von der Firma Amersham Pharmacia. Die Probenvorbereitung für die sich dann anschließende Hybridisierung waren damit abgeschlossen.

Eurogentec-Slides

Diese Arrays erforderten ein anderes Protokoll, da sie auf gespotteten PCR-Produkten basieren. 25 µg RNA wurden auf ein Volumen von 10 µl eingestellt. Als interner Standard dienten 0,5 µl Luciferase-RNA (10 ng/µl). Danach erfolgte die Zugabe folgender Reagenzien:

- 1 µl 1 mM dCTP
- 3 µl 20 mM dNTP-dCTP (Konzentration jedes dNTP 6,67 mM)
- 4 µl 0,1 M DTT
- 8 µl 5x *first strand buffer*
- 8 µl DEPC-H₂O
- 1 µl 0,1 pmol/µl spezifischer Primermix von Eurogentec
- 1 µl RNase Out
- 1 µl Cy3 bzw. Cy5

Der Ansatz wurde jeweils für 5 min bei 65°C und anschließend bei 42°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 µl *Reverser Transkriptase* (200 U/µl). Der Ansatz wurde für weitere 2 h bei 42°C inkubiert. Jeweils nach 1 h wurde nochmals 1 µl *Reverse Transkriptase* zu dem Ansatz gegeben. Die weitere Vorgehensweise war dann analog, wie für die Oligoslides beschrieben.

3.5.1.3 Hybridisierung der Slides

Um ungebundene DNA-Moleküle und Kopplungspufferreste, die sich störend auf die Hybridisierung auswirken können, zu entfernen bzw. abzusättigen, mussten die Slides vorbehandelt werden. Einzige Ausnahme stellten die Eurogentec-Slides dar, die keiner Vorbehandlung bedurften. Die Vorbehandlung richtete sich nach der Art der verwendeten Slides.

Superaldehyd-Slides

1. 45 min in Vorhybridisierungslösung (2 g BSA, 40 ml 20x SSC, 10 ml 10% SDS und 150 ml H₂O) bei 42°C
2. 7 x 1 min in bidestilliertem Wasser
3. 1 x 30 s in absoluten Ethanol

Die abschließende Trocknung der Slides erfolgte durch kurze Zentrifugation (3 min, 1600 x g). Um ein gründliches und intensives Waschen zu gewährleisten, wurden alle Schritte (Ausnahme Waschschrift 3) auf einem magnetischen Rührgerät und unter ständigen Rühren durchgeführt.

Epoxy-Slides

1. 1 x 5 min in Waschlösung 1 (0,1 % Triton-X 100)
2. 2 x 2 min in Waschlösung 2 (HCl-Lösung pH4)

3. 1 x 10 min in Waschlösung 3 (100 mM KCl)
4. 1 x 1 min in bidestillierten Wasser
5. 1 x 15 min in QMT Blocking Solution bei 50°C
6. 1 x 1 min in bidestillierten Wasser

Um ein gründliches und intensives Waschen zu gewährleisten, wurden erneut alle Schritte (Ausnahme Waschschrift 4) auf einem magnetischen Rührgerät und unter ständigen Rühren durchgeführt. Die abschließende Trocknung der Slides erfolgte durch kurze Zentrifugation (3 min, 1600 x g). Die beiden Proben wurden vereinigt, auf 45 µl eingedampft und dann jeweils mit 0,1% SDS und 3x SSC versetzt.

Ansatz: 45 µl Probe
 9 µl 20x SSC
 6 µl 1% SDS

Für die Eurogentec-Slides wurde die vereinigte Probe auf 10 µl eingedampft und dann mit 35 µl EGT-Hybridisierungspuffer versetzt. Die Zugabe von 5 µl 10 mg/ml hitzedenaturierten Lachssperma (5 min bei 95°C, auf Eis) garantierte die Absättigung freier Bindungsstellen.

Der Ansatz wurde dann für 1 min bei 95°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Jeweils 30 µl der Probe wurden auf den vorbehandelten Slide (Eurogentec-Slide: 50 µl) gegeben und mit einem Deckgläschen luftblasenfrei abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte in einer CORNING-Hybridisierungskammer bei 50°C bzw. 42°C (Eurogentec-Slide) über Nacht im Wasserbad.

3.5.1.4 Waschen der Slides

Die Slides mussten nach der Hybridisierung gewaschen werden. Die typischen Waschpuffer enthalten idealerweise SSC und SDS. Nach dem Entfernen der Hybridisierungskammer erfolgte die Waschung der Slides mit:

1. 1 x 10 min Waschpuffer 1 (2x SSC + 0,2% SDS)
2. 1 x 10 min Waschpuffer 2 (2x SSC) und
3. 1 x 10 min Waschpuffer 3 (0,2 xSSC)

gründlich bei Raumtemperatur unter Rühren. Anschließend wurden die Slides durch Zentrifugation getrocknet (3 min, 1600 x g). Für die Eurogentec-Slide existierte ein dazu unabhängiges Wasch-Protokoll:

1. 1 x 5 min 0,2 x SSC; 0,1 % SDS
2. 1 x 5 min 0,2 x SSC.

Danach wurde der Slide ebenfalls durch Zentrifugation getrocknet.

3.5.1.5 Scannen und Auswertung

Das Scannen der hybridisierten Slides erfolgte mit einem geeigneten Fluoreszenzscanner (Affymetrix 418 Scanner, MWG-Biotech AG). Die durchschnittliche Signalintensität und die Messung des lokalen Hintergrunds wurden durch die ImaGene, Version 4.0 Software (Biodiscovery Inc., Los Angeles, Kalifornien) für jeden Spot ermittelt. Die beiden Farbkanäle (grün für Cy3 und rot für Cy5) wurden dann normalisiert, wobei die Meanwerte von allen *N. meningitidis* DNA Spots berücksichtigt wurden. Anschließend wurden von den normalisierten Werten die Cy3/Cy5 Fluoreszenzverhältnisse berechnet und die durchschnittlichen Signalverhältnisse von allen Oligos ermittelt. Letztere dienten dann zur Berechnung der einzelnen Transkript-Verhältnisse jedes einzelnen ORFs. Die weitere Auswertung erfolgte dann mittels Microsoft Excel 2000 Version von Windows.

3.5.2 Real-time quantitative PCR mit dem Light-Cycler

Die Technologie der *quantitativen real time* PCR ermöglicht unter anderen die Expressionsanalyse und stellt eine hochempfindliche und akkurate Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren dar. Diese sensitive Quantifizierung beruht auf der Detektierung eines Fluoreszenzsignals, das sich proportional zur Produktmenge verhält. Als Fluoreszenzfarbstoff verwendet man unter anderem *SYBR green I*, der nur an doppelsträngige DNA bindet.

Die Menge an PCR-Produkt kann dann direkt in Echtzeit (*real time*) mittels eines Fluorimeters gemessen werden. Die Quantifizierung basiert auf dem sogenannten *threshold-cycle* (C_T -Wert), dieser Wert entspricht dem ersten PCR-Zyklus mit detektierbarer Fluoreszenz. Zu diesem Zeitpunkt ist die Vermehrung noch exponentiell, später verlangsamt sich dieser Prozess aufgrund der Akkumulation von störenden Einflüssen (z.B. Anhäufung von Pyrophosphat) linear bis er schließlich ganz zum Stillstand kommt. Aus dem C_T -Wert lässt sich dann mittels einer Standardkurve bekannter DNA Konzentrationen auf die Templatmenge der unbekannt Probe schließen, deren Quantifizierung auf der Amplifikation von cDNA (3.2.3.2.) basiert.

Für die PCR wurde der *Light Cycler-DNA Master SYBR Green I Kit* der Firma Roche Diagnostics verwendet:

Mastermix:	132 μ l H ₂ O
	28,8 μ l 25mM MgCl ₂
	15,6 μ l <i>forward</i> Primer (8 pmol/ μ l)
	15,6 μ l <i>reverse</i> Primer (8 pmol/ μ l)
	24 μ l Enzymmix (enthält <i>Taq</i> DNA Polymerase, dNTP-Mix, SYBR Green I und 10 mM MgCl ₂)

Jeweils 18 μ l Mastermix wurden entnommen und mit 2 μ l DNA (Standard oder unbekannt Probe) versetzt und in eine Glaskapillare überführt. Die Amplifikation mit dem *Light Cycler* erfolgte dann nach folgendem Programm:

Parameter	Zeit	Temperatur	Zyklen
1. Denaturierung	8 min	95°C	1x
	0 s	95°C	40x
2. Anlagerung	5 s	Primer abhängig	40x
3. Verlängerung	18 s		72°C
4. Schmelzkurve	30 s	95°C	1x
	30 s	65°C	1x
	0 s	95°C	1x
5. Kühlen		40°C	

Während der Verlängerung binden mehr und mehr SYBR *green* Moleküle an die neusynthetisierte DNA. Es kommt zu einer deutlichen Erhöhung der Fluoreszenz, die dann am Ende jedes Verlängerungszyklus gemessen wird.

Des Weiteren kann mit dem *Light Cycler* eine detaillierte Schmelzkurven-Analyse von PCR Produkten durchgeführt werden. Dies erfolgt im Anschluss an die PCR und kann Aussagen über die Anwesenheit von unspezifischen Produkten liefern (z.B. Verunreinigungen, Primerdimer-Bildung).

Der PCR liegt eine Standardreihe mit bekannten DNA-Konzentrationen zu Grunde.

ST1 100 pg/μl
 ST2 10 pg/μl
 ST3 1 pg/μl
 ST4 100 fg/μl
 ST5 10 fg/μl
 ST6 1 fg/μl

Die zu untersuchenden cDNA-Proben (Experiment und Kontrolle) wurden 1:5 und 1:10 verdünnt.

3.6 DNA-Präparation

3.6.1 Midipräparation von Plasmid-DNA

Die Plasmidisolierung erfolgte chromatographisch über Anionenaustauschsäulen der Firma Qiagen (*Qiagen Plasmid Midi Kit*) unter der Verwendung der mitgelieferten Pufferlösungen P1, P2, P3, QBT, QC und QF. Diese Methode basiert auf einer modifizierten Anwendung der alkalischen SDS-Lyse nach Birnboim und Doly (1983). Niedrige Salzkonzentrationen in der Probe binden die DNA an das makroporöse Material der Säule. Durch die schrittweise Erhöhung der Salzkonzentrationen in den folgenden Wasch- und Elutionsschritten wird die DNA schließlich von der Säule gelöst.

50 ml Übernachtskultur des Plasmid-tragenden Bakterienstammes wurden bei 4000 x g 10 min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden zunächst in 4 ml Puffer P1 resuspendiert, anschließend mit der gleichen Menge Puffer P2 versetzt und nach vorsichtigen Mischen für 5 min bei RT inkubiert. Der stark alkalische Puffer P2 (enthält NaOH und SDS) führt zur

bakteriellen Lyse und zur Denaturierung der DNA. Die Zugabe von 4 ml Puffer P3, führt zur Bildung eines Präzipitats aus chromosomaler DNA und anderen zellulären Bestandteilen. Die Plasmid-DNA bleibt dagegen in Lösung und die Einzelstränge verdrillen sich zu einem *Supercoiling*. Nach einer 15 min Inkubation auf Eis, erfolgte die Abtrennung der ausgefallenen Zellbestandteile durch Filtration. Das Lysat wurde in einen angefeuchteten Faltenfilter überführt und der Durchfluss gesammelt. Das so erhaltene klare Lysat wurde dann auf eine mit Puffer QBT äquilibrierte QIAGEN-tip100 Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit zweimal 10 ml Puffer QC wurde die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Zum Fällern der DNA wurde dann das Eluat mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, 30 min bei 15.000 x g zentrifugiert und das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das DNA Sediment für ca. 1 min in der *Speed Vac* getrocknet und dann in 100 µl dest. Wasser aufgenommen. Jeweils 1 µl des Plasmids diente zur Kontrolle auf einem 1% igen Agarosegel.

3.6.2 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation kleinerer Mengen DNA wurde der *QIAprep Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen verwendet. Der Kit beruht ebenfalls auf der Silicagel-Anionenaustauschertechnik, wie unter 3.6.1. beschrieben.

Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Pufferlösungen gearbeitet. Die dadurch gewonnene Plasmid-DNA wurde in 60 µl dest. Wasser aufgenommen. Jeweils 5 µl diente zur Kontrolle auf einem 1% igen Agarosegel.

3.6.3 Präparation genomischer DNA

Reagenzien

Puffer B1	1,86 g EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat 0,61 g Tris 80 ml H ₂ O 5 ml 10% Tween 20 5 ml 10% Triton X-100 pH Wert einstellen auf 8,0 und mit Wasser auf 1 l auffüllen
Puffer B2	28,7 g Guanidin-HCl 70 ml H ₂ O 20 ml 100% Tween 20 mit Wasser auf 1 l auffüllen

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mit dem *Genomic-tip 100 Kit* der Firma Qiagen. Die DNA wird unter geeigneten Bedingungen (niedrige Salzkonzentrationen, geeigneter pH-Wert) an die Matrix einer Anionenaustausch-Säule gebunden. RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen werden durch Waschen mit salzhaltigen Puffern entfernt. Die DNA wird dann durch einen Hochsalzpuffer von der Säule eluiert und mittels einer Isopropanol Fällung aufkonzentriert und entsalzt.

Für die Isolierung wurde die gewünschte Meningokokken - Kultur auf GC-Agar über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ angezogen. Am nächsten Tag wurden jeweils $1,5 \times 10^{10}$ Bakterien in 5 ml 1x PBS eingerieben (Kontrolle erfolgte über OD-Messung bei 600 nm). Die Bakteriensuspension wurde dann für 10 min bei 4000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte

die Resuspension des Sediments in 7 ml Puffer B1 + 14 µl RNase-Lösung (100 mg/ml). Dazu wurden dann 160 µl Lysozymlösung (100 mg/ml) addiert, für 30 min bei 37°C inkubiert und im Anschluss daran weggefroren (1 h, -70°C). Nach dem langsamen Auftauen bei 50°C erfolgte die Zugabe von 200 µl Proteinase K-Lösung und 2,4 ml Puffer B2. Um eine optimale Denaturierung der Proteine (Nukleasen, DNA bindene Proteine) zu erhalten, musste die Lösung für 1 h bei 50°C inkubiert werden. Anschließend wurde der Ansatz mit 10 ml Äquilationspuffer QBT (Kit) aufgefüllt und auf die zuvor äquilibrierte Säule gegeben. Nach dem Waschen der Säule erfolgte dann die Eluierung der DNA. Anschließend wurde diese nochmals mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und für 30 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde nochmals mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (15 min, 10.000 x g) und nach dem kurzen Trocknen in der *Speed-vac* in jeweils 100 µl 1x TE Puffer gelöst.

3.6.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen und aus PCR-Ansätzen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraktion Kit* (Qiagen) durchgeführt. Die Isolierung amplifizierter DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen erfolgte mittels *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). Beide Verfahren basieren auf der selektiven Bindung der DNA an Silikagel-Membranen in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, während Kontaminationen die Säule passieren. Verunreinigungen werden durch einen Waschschrift (Puffer PE) entfernt und die saubere DNA von der Säule eluiert. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Pufferlösungen (PB, PE und QC) gearbeitet.

3.6.4.1 PCR Purification

5 Volumen Puffer PB wurden zu dem PCR-Ansatz pipettiert, durchmischt und auf eine *QIAquick* Säule gegeben. Die Säule wurde dann für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 750 µl Puffer PE. Die Säule wurde erneut für 1 min zentrifugiert. Da sich der Puffer PE störend auf enzymatische Reaktionen auswirkt, wurden mögliche Reste durch einen sich anschließenden 2 min Zentrifugationsschritt entfernt. Danach wurde die DNA mit 50 µl H₂O von der Säule eluiert.

3.6.4.2 Gel Extraktion

Zu dem ausgeschnittenen Fragment wurden jeweils 3 Volumen Puffer QG addiert und der Ansatz bis zum Lösen der Agarose bei 50°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 Volumen Isopropanol. Die Probe wurde dann auf eine *QIAquick* Säule gegeben und für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die weitere Vorgehensweise war dann analog, wie für die *PCR Purification* beschrieben.

3.6.5 Quantifizierung der DNA mittels Absorptionsspektrometrie

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dazu wurde die DNA 1:50 verdünnt. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm, der Verdünnung und einem für DNA spezifischen Multiplikationsfaktor. Aus dem Verhältnis der OD_{260 nm} und der

OD_{280nm} erhält man außerdem eine Aussage über die Proteinkontamination in der Lösung (3.2.4.3.).

3.7 Klonierungsmethoden

3.7.1 Spalten von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern eingesetzt. Jeweils 1-2 Units Enzym pro µg DNA wurden verwendet, um 1µg DNA in einer Stunde zu schneiden. Alle Enzyme generieren Fragmente mit einem 5' - Phosphat – und einem 3'-Hydroxyl-Ende. Die Enden sind entweder glatt (*blunt ends*), das bedeutet in beiden Strängen wird an der gleichen Stelle geschnitten, oder sie stehen über (*sticky ends*). Wenn das 5'- Ende länger ist, bezeichnet man dies als einen 5'- Überhang, sonst als 3'-Überhang.

Reaktionsansatz: 1 µg DNA
 2 µl Enzym
 3 µl Puffer

Dieser Ansatz wurde mit Wasser auf ein Volumen von 30 µl aufgefüllt und für einen Zeitraum von 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Spaltung chromosomaler DNA wurden 2-3 µg mit 30-40 *Units* Enzym pro µg DNA über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Abstopfung der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 3 µl 10x Gelladungspuffer.

3.7.2 Dephosphorylierung der Vektor-DNA

Schneidet man den Vektor nur mit einem Restriktionsenzym entstehen zwei kompatible Enden, die wieder miteinander ligieren können. Eine Hydrolyse der 5'- Phosphatreste mittels einer alkalischen Phosphatase (CIP = *calf intestine alkaline phosphatase*) vermindert die Religierung des Vektors. Das Enzym ist mit den meisten Puffern, die für die Restriktionsverdau verwendet wurden, kompatibel. Daher fand die Dephosphorylierung im Anschluss an den Restriktionsverdau statt. Zu der gespalteten DNA wurde 1 µl CIP gegeben und dann für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte mittels Aufreinigung über *PCR-Purifikationkit* (siehe 3.6.4).

3.7.3 Auffüllen überhängender 5'-DNA-Enden und Abbau überhängender 3'-DNA-Enden

Da für einen Großteil der Klonierungen keine kompatiblen Schnittstellen zur Verfügung standen, wurden überhängende Fragmentenden geglättet und das Fragment dann in einen Vektor mit glatten, dephosphorylierten Enden ligiert. Fragmente mit 5'- Überhang konnten mittels einer Polymerasereaktion problemlos aufgefüllt werden.

Ansatz: x μ l DNA
 5 μ l NTP (100 μ M Endkonzentration je dNTP)
 2 μ l T4-Polymerase
 7 μ l Puffer
 Auffüllen mit Wasser auf 70 μ l

Der Ansatz wurde für 5-7 min bei 37°C inkubiert und anschließend das Enzym durch 10 min Erhitzen auf 75°C deaktiviert.

Die Glättung der 3'- Enden beruhte auf der 3',5'- Exonukleaseaktivität der Polymerase. Der Ansatz entspricht dem der Auffüllreaktion.

3.7.4 Phosphorylierung von PCR-Produkten

Die T4-Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert den Transfer einer terminalen Phosphatgruppe des ATP's auf die Hydroxylgruppe des 5'- Endes. Diese Methode ist sehr effektiv und daher ideal für die Phosphorylierung von PCR-Produkten, die für eine Klonierung vorgesehen sind. Die Reaktion wurde meistens mit der unter 3.6.3. beschriebenen Methode gekoppelt. Jeweils 1 μ l PNK und 1 μ l 10 mM ATP wurden dem Ansatz beigefügt. Die Inkubation erfolgte dann allerdings für 30 min bei 37°C. Das Enzym wurde dann mittels *PCR-Purifikationskit* (siehe 3.6.4.) oder durch Erhitzen (10 min 75°C) inaktiviert.

3.7.5 Ligation von DNA mit glatten Enden

Fragmente mit glatten Enden lassen sich beliebig, wenn auch unter größeren Schwierigkeiten, klonieren. Um effiziente Ausbeuten zu erhalten, wurden dem Reaktionsgemisch Substanzen hinzugefügt, die eine makromolekulare Kondensierung der DNA in Aggregate bewirken, wie z.B. Polyethylenglykol (PEG) und Hexamincobaltchlorid. Diese beschleunigen die Ligation und erlauben, dass niedrigere DNA- und Enzymkonzentrationen eingesetzt werden können.

Außerdem unterdrücken sie die intramolekulare Ligation und begünstigen dafür die intermolekulare Ligation, was zu einer veränderten Verteilung der Ligationsprodukte führt. Erhöhte Konzentrationen von MgCl₂ (5 mM) führen ebenfalls zu einer Stimulierung der Reaktion. Jeweils 1,5 μ M Hexamincobaltchloride, 15% PEG 2000, bzw. 5 mM MgCl₂ wurden zu dem Ligationsansatz addiert. Die Ligation erfolgte durch die T4-DNA Ligase unter Zusatz von ATP. Das Enzym katalysiert die Verknüpfung zwischen einer 3'- Hydroxyl- und einer 5'- Phosphatgruppe zu einer Phosphodiesterbindung. Die Ligation wurde in 1x Ligase-Puffer für 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C in einem Reaktionsvolumen von 20-30 μ l mit 1 μ l T4-Ligase (400 U/ μ l) durchgeführt. Jeweils 200 ng Vektor wurden für eine Ligation eingesetzt. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert sollte dabei 1:3 bzw. 1:5 betragen.

Der Ansatz musste dann aufgrund der mitgeführten Salze (MgCl₂, Hexamincobaltchlorid) nach der Inkubationszeit für die sich anschließende Transformation aufgereinigt werden. Die Aufreinigung erfolgte mittels *PCR-Purifikationskit* (siehe 3.6.4.).

3.7.6 Transformation

Als Transformationskompetenz wird die Fähigkeit von Bakterien bezeichnet, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Neben Bakterien mit natürlicher Transformationskompetenz (z.B. Neisserien, Pneumokokken, Bacillus) gibt es auch als inkompetent geltende Bakterien, wie z.B. *Escherichia coli*, die jedoch durch Modifikation der Zelloberfläche kompetent gemacht werden können.

3.7.6.1 Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation

Aus einer Übernachtskultur von *E. coli* (Stamm DH5 α) wurden 0,5 ml in 100 ml flüssiges LB-Medium pipettiert und bei 37°C bis zu einer OD_{550nm} = 0,5-0,8 geschüttelt. Nach Abkühlung der Kultur im Eisbad (30 min) wurde diese dann für 20 min (4800 x g, 4°C) zentrifugiert. Das Sediment wurde 2 mal in 50 ml eiskalten sterilen Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Durch die anschließende Aufnahme der kompetenten Zellen in ca. 2 ml eiskaltes 10% Glycerin konnten diese dann in Aliquotes von 100 μ l bei -70°C aufbewahrt werden.

3.7.6.2 Elektroporation von *E. coli*

Bei dieser Methode werden durch einen hohen elektrischen Puls Poren in der Zellmembran geöffnet, die sich zur Aufnahme der fremden DNA-Moleküle eignen. Entscheidend für ein gutes Gelingen der Transformation ist eine geringe Ionenkonzentration in dem Ansatz, da es sonst zum Kurzschluss kommen kann. Um dies zu vermeiden, wurden die Ligats mittels *PCR-Purifikationskit* aufgereinigt, in 50 μ l dest. Wasser aufgenommen und in der *Speed Vac* auf 20 μ l eingedampft. Jeweils 2 μ l wurden zu 50 μ l kompetenter Zellen pipettiert und dann luftblasenfrei in eine gekühlte Elektroporationsküvette mit dem Elektrodenabstand 0,2 cm überführt. Die Transformation erfolgte mittels eines Elektroporationsgeräts bei folgenden Einstellungen: 2,5 kV, 25 μ F und 400 Ω . Für eine erfolgreiche Transformation sollte die Zeitkonstante (Geschwindigkeit der Entladung) zwischen 8 und 9 liegen. Zu dem Ansatz wurde 1 ml SOC Medium addiert und dann für 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Ausplattierung der Zellen erfolgte in Aliquots von 100 μ l auf Antibiotika-haltigem LB-Agar. Abschließend wurden diese dann über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.7.6.3 Transformation von Meningokokken

Meningokokken weisen eine natürliche Transformationskompetenz auf, die sie befähigt Fremd-DNA in jeder Wachstumsphase aus dem extrazellulären Medium aufzunehmen (Frosch und Meyer, 1992). Der Einbau der Fremd-DNA in die genomische DNA erfolgt durch homologe Rekombination. Zur Transformation wurden Meningokokken einer frischen Übernachtskultur vom Agar abgeerntet, in 3 ml supplementiertem PPM-Medium resuspendiert und für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte die Einstellung der OD_{600nm} auf 0,1. Jeweils 1 ml der Bakteriensuspension wurden mit 1 μ g Plasmid-DNA versetzt, für 6 h bei 37°C schüttelnd inkubiert und danach in geeigneten Aliquots auf GC-Platten, versetzt mit einem geeigneten Antibiotika, ausplattiert. Die Bebrütung der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C und 5% CO₂.

3.8 DNA-Nachweis und-Analyse

3.8.1 Herstellung und Markierung der Sonden

Die spezifischen Sonden wurden durch eine PCR amplifiziert und das Produkt mittels *PCR-Purification Kit* aufgereinigt. Jeweils 3 µg der aufgereinigten DNA wurden dann für die Markierung eingesetzt. Die Markierung erfolgte mittels *DIG DNA Labeling*. Die DIG (DIG = Digoxigenin) markierten DNA-Sonden wurden nach der *random primed* Methode hergestellt. Diese Methode basiert auf der Hybridisierung von Oligonukleotiden aller möglichen Sequenzkombinationen an die denaturierte, zu markierende DNA. Die komplementäre DNA wird mittels Klenow Enzym synthetisiert. Als Primer verwendet das Enzym die 3'-OH Enden der *random* Oligonukleotide. Die Elongation erfolgt unter Verwendung von Desoxyribonukleotiden, unter anderen auch von DIG-11-dUTP. Das dUTP ist über einen Spacer mit dem Stereoid-Hapten Digoxigenin verbunden. DIG-UTP wird dann alle 20-25 Nukleotide in die neusynthetisierte DNA eingebaut.

Die DNA wurde auf ein Gesamtvolumen von 15 µl mit dest. Wasser aufgefüllt und für 10 min bei 95°C denaturiert. Auf Eis wurden dann zu der frisch denaturierten Probe folgende Reagenzien gegeben:

- 2 µl Hexanukleotide Mix, 10x konz.
- 2 µl DIG DNA labeling mix, 10x konz.
- 1 µl Klenow Enzym

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Abstopfung der Reaktion erfolgte dann durch Zugabe von 2 µl EDTA, pH 8,0. Anschließend wurde der Ansatz mit 2,5 µl 3 M NaAc (pH 4,8) und 75 µl abs. Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Der Ansatz wurde dann zentrifugiert (30 min, 16000 x g, 4°C), das Sediment mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 16000 x g, 4°C). Das trockene Sediment wurde dann in 50 µl 1x TE-Puffer resuspendiert. Die Ausbeute der Markierungsreaktion wurde mittels Dot Blot, im Vergleich zu einer mitgelieferten DIG-markierten Kontroll-DNA, ermittelt. Die Kontroll-DNA lag in verschiedenen Verdünnungsstufen bekannter Konzentration vor (1 ng – 100 fg). Von der zu untersuchenden DNA wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe hergestellt (1:1 – 1: 100000). Jeweils 1 µl der DNA wurde auf eine Nylonmembran getropft. Nach dem Trocknen der DNA erfolgte die irreversible Bindung der Probe an die Membran durch *UV-cross linking*. Die weitere Quantifizierung erfolgte dann mittels *enzyme-linked Immunoassay* (= ELISA) (3.7.4.). Durchschnittlich 100 ng markierter DNA wurden für die sich anschließende Hybridisierung eingesetzt.

3.8.2 Southern Blot

Die durch Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA wurde elektrophoretisch in einem 0,8% igen Agarosegel aufgetrennt. Das Gel musste vor dem Bloten vorbehandelt werden. Um Fragmente über 5 kb Länge effizient auf die positiv geladene Nylonmembran zu transferieren, wurde das Gel für 30 min in 0,25 M HCl gelegt. Durch die HCl-Behandlung wurde die DNA teilweise depurinisiert und zerbrach dabei in kleinere Fragmente. Danach wurde die DNA durch eine 30 min Inkubation in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH/ 1,5 M NaCl) denaturiert und durch eine 30 min Inkubation in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris HCl pH 7,0/ 1,5 M NaCl) wieder neutralisiert. Der Kapillar-Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran erfolgte unter Verwendung eines Hochsalzpuffers (10x SSC)

innerhalb von 2,5 h bei RT. Danach wurde die Membran zweimal für 10 min in 2x SSC gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die Fixierung der DNA auf die Membran erfolgte mittels UV-Vernetzung bei 100 mJ.

3.8.3 DNA Hybridisierung

<u>High SDS Puffer</u>	10,5 g SDS
	75 ml Formamid
	37,5 ml 20x SDS
	7,5 ml 1 M PO ₄ ($\frac{3}{4}$ NaH ₂ PO ₄ und $\frac{1}{4}$ Na ₂ HPO ₄ , pH 7,5)
	1,5 ml 10% Sarkosin
	30 ml 10% Blockingreagenz

Alle Reagenzien wurden mittels Rühren auf einem Heizblock bei 100°C gelöst. Es musste darauf geachtet werden, dass die Mischung nicht kocht.

Hybridisierungsreaktionen erfolgen aufgrund der Basenpaarungswechselwirkungen zwischen zwei einzelsträngigen Nukleinsäureketten, wenn sie komplementäre Nukleotidsequenzen aufweisen. Durch die hohe Sensitivität und Selektivität der Hybridisierung ist es möglich, mit DNA Sonden komplementäre Sequenzen nachzuweisen, deren Konzentrationen nur 1 Molekül pro Zelle betragen.

Um alle freien verbliebenden Bindungsstellen der Membran abzusättigen, fand zuvor eine Vorhybridisierung in 10 ml *high SDS Puffer* statt (1 h, 42°C). Anschließend wurden 10 ml Hybridisierungslösung mit 100 ng markierter DNA versetzt und die Lösung für 10 min bei 95°C inkubiert, um die Sonde zu denaturieren. Nach dem Abkühlen auf Eis erfolgte die Zugabe der Lösung zu der in einer Hybridisierungsröhre befindlichen Membran. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C im Hybridisierungssofen. Der Hybridisierungspuffer war mit dem Vorhybridisierungspuffer identisch.

3.8.4 Nachweis der markierten DNA

Nach der Hybridisierung an die Ziel-DNA wurden die Hybride im ELISA unter Verwendung eines Antikörper-Konjugats (Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat, <Dig>-AP) und einer nachfolgenden Enzym-katalysierten Chemilumineszenz Reaktion mit Hilfe des *DIG Luminescent Detection Kits* von Roche nachgewiesen. Als Chemilumineszenz-Substrat für die Phosphatase diente CSPD. Die Dephosphorylierung von CSPD führt zur Bildung eines meta-stabilen Dioxetan Phenolat-Anions, welches zerfällt und in gepufferter Lösung Licht bei 477 nm emittiert. Die Lumineszenz wird auf Röntgenfilmen detektiert.

Der Filter wurde zweimal für 5 min in 2x SSC und 0,1% SDS bei RT gewaschen. Um eine erhöhte Spezifität zu erzielen wurde nochmals 2x für 15 min in 0,1% SSC und 0,1% SDS bei 68°C gewaschen. Danach begann die eigentliche Nachweisreaktion:

1. 1-5 min in Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure; 0,1 M NaCl, pH 7,5; 0,3% Tween)
2. 30 min in Puffer 2 (1% Blockierungsreagenz; 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt)
3. 30 min anti-DIG-AP in Puffer 2 (1:10000)
4. 2 x 15 min in Waschpuffer
5. 5 min in Puffer 3 (0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl, pH 9,5)

6. 5 min CSPD in Puffer 3 (1:100)

Abschließend wurde der Blot in Frischhaltefolie gewickelt und für ca. 15 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Auflegung eines Röntgenfilms. Der Zeitraum ist abhängig von der Signalstärke der Sonde. Je stärker die Markierung, um so kürzer ist die Expositionszeit. Sie kann zwischen 5 min bis mehren Stunden variieren.

3.8.5 Automatisierte Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem ABJ Prism 377 DNA Sequenzer nach der Kettenabbruch- oder Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Nach der Denaturierung der zu sequenzierenden doppelsträngigen DNA wurde durch Anlagerung eines Primers die Synthese mittels *Taq*-DNA-Polymerase initiiert. Um den Kettenabbruch bei der Synthese zu erzielen, wurden dem Reaktionsansatz außer den vier Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) geringe Mengen der 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugefügt. Diese waren mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die dNTPs werden von der Polymerase als Substrat verwendet, ermöglichen aber aufgrund des Fehlens einer Hydroxylgruppe am 3'-Ende keine Kettenverlängerung. Somit wird die DNA-Synthese nach dem Einbau eines ddNTPs an einer beliebigen Stelle gestoppt, und es entsteht eine Mischung partiell doppelsträngiger DNA-Moleküle, die alle das gleiche 5'-Ende besitzen, aber am 3'-Ende in der Länge variieren und basenspezifisch terminiert sind. Die eingebauten Fluoreszenzfarbstoffe werden von dem Sequenzer während der Elektrophorese mittels Laser angeregt und gemessen.

Ansatz: 0,4 µg Plasmid oder 0,1 µg PCR-Produkt
10 pmol Primer
2 µl Sequenziermix
Aufgefüllt mit H₂O auf 10 µl

3.9 Quantifizierung von Proteinen und Polysacchariden

3.9.1 Kapselpolysaccharid-ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay)

Antikörper lassen sich als außerordentlich empfindliche analytische Reagenzien zur quantitativen Bestimmung von Proteinen oder anderer Antigene einsetzen. Der für das betreffende Protein spezifische Antikörper wird an eine polymere Matrix (hier eine Mikrotiter-Platte beschichtet mit PDL=Poly-D-Lysin) gebunden. Dann erfolgt die Zugabe des Bakterienextraktes. Nach der Bildung der Antikörper-Antigenkomplexe wird die Matrix gewaschen. Anschließend fügt man einen 2. Antikörper hinzu, der mit einem Enzym (z.B. einer alkalischen Phosphatase), verknüpft ist. Dieses Enzym kann mit großer Geschwindigkeit ein zugegebenes farbloses Substrat zu einem farbigen Produkt umwandeln. Die an die Platte gebundene Menge an Antikörper ist der des Antigens in der Probe proportional.

Jeweils 50 µl PDL wurden pro Vertiefung in eine Mikrotiter-Platte pipetiert. Nach 30 min wurde die Platte dann dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die Antigenanlagerung erfolgte dann für 1 h. Dafür wurden Meningokokken einer Übernachtskultur in 1x PBS aufgenommen und auf 2×10^8 Bakterien/ml eingestellt. 20 µl des Antigens dienten zur Beimpfung der Platte. Anschließend wurden die Bakterien durch Zugabe von 100 µl 0,05% Glutaraldehyd fixiert.

Nach 10 min wurde die Platte erneut 3 mal mit 1x PBS gewaschen. Dann erfolgte die Absättigung freier Bindungsstellen mittels Zugabe von 1% BSA/PBS (150 µl pro Vertiefung) für 30 min. Die Platte wurde erneut gewaschen. Danach erfolgte die Anlagerung des ersten spezifischen Antikörpers (20 µl je Vertiefung). Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde erneut mit 1x PBS gewaschen und der 2. Antikörper (20 µl/Vertiefung) für 45 min angelagert. Anschließend wurde das Substrat (20 µl/Vertiefung) zugegeben. Als Substrat diente ABTS. Jeweils 10 min und 20 min nach der Substratzugabe erfolgte dann die photometrische Messung bei 410 nm mittels eines ELISA Readers.

3.9.2 Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Reagenzien

Sample Solution	5% 2-Mercaptoethanol
	2% SDS
	12,5% Glycerin 50% in H ₂ O
	0,5 M TrisHCl pH 6,8
	1 Messerspitze Bromphenolblau

Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich Proteine hauptsächlich aufgrund ihrer Masse in Polyacrylamidgelen trennen. Das Acrylamid bildet zusammen mit dem Bisacrylamid ein quervernetztes Netzwerk, wobei die Porengröße durch die Konzentration von Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt wird. Das Proteingemisch wird zunächst unter Zusatz von SDS gelöst, einem Detergenz, das fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört. Die SDS-Anionen binden an die Proteine, so dass ein negativer Komplex entsteht, dessen Ladung der Masse des Proteins ungefähr proportional ist. Um eine optimale Auftrennung der Proteine zu erhalten, verwendet man zweischichtige Gele, die sich jeweils in pH-Wert und Acrylamidkonzentration unterscheiden. Diese gewährleisten, trotz möglicher Modifikationen der Polypeptidkette (Glykolisierung), gleiche Laufbedingungen für alle Proteine. Die untere Schicht wird als Trenngel und die obere Schicht als Sammelgel bezeichnet.

Sammelgel: 0,375 ml 30% Polyacrylamid
0,625 ml Upper Tris
1,625 ml H₂O
10 µl TEMED
17,5 µl 10% APS

Trenngel: 2,5 ml 30% Polyacrylamid
(12,5%) 1,5 ml Lower Tris
2 ml H₂O
10 µl TEMED
30 µl 10% APS

Das Trenngel wird dann luftblasenfrei mit Butanol überschichtet und nach dem Festwerden mit Wasser gewaschen.

Meningokokken einer Übernachtskultur wurden auf 2×10^8 Bakterien/ml in 1x PBS eingestellt und für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (13000 x g). Das Sediment wurde dann in 25

μ l Sample Solution resuspendiert. Die Proben wurden dann für 10 min bei 100°C gekocht und anschließend sofort auf Eis gestellt. Jeweils 5 μ l pro Tasche dienen zum Auftrag auf ein 12,5% Gel (Laufbedingungen 1h – 1,5 h bei 40 mA).

3.9.3 Western Blot

Reagenzien

1x Laufpuffer	700 ml H ₂ O
	200 ml Methanol
	100 ml 10x Lämmli

Geringe Mengen eines bestimmten Proteins in einer Zelle kann man mittels einer immunologischen Technik – dem Western Blot nachweisen. Dazu wird die Probe mittels einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt.

Die aufgetrennten Proteingemische werden dann aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes Feld eluiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Nach dem elektrophoretischen Transfer von Protein auf Nitrocellulose müssen zunächst die freien Bindungsstellen der Membran blockiert werden. Nach der Absättigung bleibt den Antikörpern nur mehr die Möglichkeit an das Epitop ihres Antigens zu binden. Dieser Antikörper-Antigenkomplex lässt sich dann sichtbar machen, indem man einen zweiten Antikörper zugibt, der für den ersten spezifisch ist. Um diese spezifische Bindung nachzuweisen, muss der Antikörper mit einem Enzym gekoppelt sein, das eine Farbreaktion auslösen kann.

Nach der Elektrophorese erfolgte der Aufbau des Blotes wie folgt:

1. Fiberpad
2. Filterpapier
3. Gel
4. Protan BA 85 Nitrocellulosemembran
5. Filterpapier
6. Fiberpad

Alle Filterpapiere und Fiberpads mussten zuvor mit Blot-Puffer getränkt werden. Die Gelhalter wurden dann zusammengeklappt und mit der durchsichtigen Seite (Membranseite) zur Anode der Blotkammer eingesetzt. Die Apparatur wurde dann mit Blotpuffer aufgefüllt, das Kühlelement eingesetzt und für 1 h bei 300 mA geblottet. Nach dem Transfer wurde dann die Membran mittels Ponceau S Gebrauchslösung für 30-60 s angefärbt und die sichtbaren Banden des Markers eingezeichnet. Danach begann die eigentliche Blotentwicklung:

1. Absättigung mit 1x PBS/0,1% Tween 20/5% Magermilch für 1 h bei RT
2. Zugabe des 1. Antikörpers in 1x PBS/0,1% Tween20/1% Magermilch für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C
3. 2 x 5 min mit 1x PBS/0,1% Tween 20 waschen
4. Zugabe des 2. Antikörpers in 1x PBS/0,1% Tween 20 für 1h bei RT
5. 3 x 5 min mit 1x PBS/0,1% Tween 20 waschen
6. 1 x 10 min mit 0,1 M TrisHCl pH 9,6
7. Zugabe von 1 ml Substrat (100 μ l NBT, 10 μ l Indolyl, 2 μ l 2M MgCl₂, 888 μ l TrisHCl pH 9,6)

Durch die Zugabe des Substrates bildete sich ein sichtbares Präzipitat um den Antigen-Antikörperkomplex. Nach dessen Visualisierung wurde die Reaktion mit Wasser abgestoppt.

3.9.4 Färbung der Proteine mittels Coomassie

Coomassie Färber 200 mg Coomassie Brilliant Blue[®]-250
 200 ml abs. Ethanol
 40 ml Eisessig
 160 ml Aqua dest.

Entfärber 100 ml Eisessig
 200 ml Methanol (reinst)
 Auffüllen mit Aqua dest. auf 1 l

Bei Proteinmengen, die größer als 200 ng sind empfiehlt sich die Coomassie-Färbung. Mit dem Färben werden die Proteine im Gel fixiert. Die Fixierung erfolgt meistens mit Ethanol/Essigsäure/Wassermischungen, die ein Färbemittel enthalten. Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

1. Gel für 10 min in Coomassie-Färbelösung
2. Gel für 2x 20 min in Entfärber (bis Banden klar erkennbar sind).

Anschließend wurde das Gel in Ampuwa, versetzt mit 5% Glycerin-87%, geschrumpft, in Einmachfolie eingeschlagen und zum Trocknen in einem Trockenrahmen aufgezogen.

3.10 Proteinexpression

Die Konstruktion eines rekombinanten DNA – Moleküls stellt den ersten Schritt für die Proteinexpression dar. Durch die Wahl geeigneter Restriktionsenzyme, die an strategisch günstigen Positionen im Plasmid schneiden, kann man Fremd-DNA direkt hinter den Promotor oder andere Signalsequenzen der Wirtszelle setzen. Der Wirt erkennt dann das rekombinante Gen als „legitimes“ Gen und transkribiert und translatiert es. Dies erlaubt die Expression von Proteinen. Die Fusion mit einem Histidin-tag (einer Polyhistidin-Sequenz von 6-8 Aminosäuren-Länge) garantiert die einfache Aufreinigung über *immobilized metal affinity chromatography*. Die Expression des gewünschten Proteins erfolgte unter Verwendung des *pBAD Topo-TA Expression[®] Kit*. Die DNA des zu exprimierenden Proteins wurde in den pBAD/Thio Vektor kloniert. Der Vektor enthält den araBAD Promotor der durch araC reguliert wird. In der Abwesenheit von Arabinose blockiert araC durch seine Bindung an den Promotor die Transkription und fungiert als Repressor. Der Induktor Arabinose inaktiviert araC und erlaubt die Transkription des zu exprimierenden Proteins.

2 ml LB Medium + 100 µg Ampicilin wurden mit den zu testenden Rekombinaten beimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀=1-2 über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden pro zu testenden Stamm 2 frische Kulturen (10 ml LB + 100 µg Ampicilin) mit 0,1 ml der Übernackkultur beimpft. Die Kulturen wurden mit 1 und 2 beschriftet und bis zum Erreichen der mittleren logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀=0,5) unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Es wurde dann eine Probe von 1 ml entnommen, mit t₀ beschriftet und 30 s bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen und

das Sediment bei -20°C eingefroren. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 ml 0,2% bzw. 0,02% Arabinose induziert. Nach 4 h Wachstum wurde erneut 1 ml Kultur abgenommen, entsprechend beschriftet und wie oben beschrieben abzentrifugiert. Das Sediment wurde weggefroren. Die Kontrolle der Induktion erfolgte durch Auftragen der gesammelten Proben auf ein SDS-Gel. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mittels Coomassie-Färbung visualisiert. Anhand der Intensität der Proteinbande, die dem rekombinanten Protein entspricht, kann die Expression abgeschätzt werden.

3.11 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen mit einem 6xHis-Motiv

Rekombinante Proteine, die ein 6xHis-Motiv tragen, können durch Affinitätsreinigung an Nickel-Nitrilo-tri-Essigsäure (NTA) isoliert werden (Janknecht *et al.*, 1991). NTA chelatiert 4 der 6 möglichen Bindungsstellen an einem Ni^{2+} Ion. An die freien Bindungsstellen der Ni^{2+} Ionen bindet das 6xHis-Motiv. Diese Bindung kann durch Absenken des pH-Wertes, oder Zugabe von Imidazol aufgehoben werden, wodurch das Protein von der NTA-Matrix eluiert. Das zu diesem Zweck verwendete Nickelgranulat liegt gebrauchsfertig in einem Puffer/Ethanol-Gemisch vor, das zuvor durch die Zugabe von 1-2 ml 1x PBS/ 1% Triton X-100 entfernt wird. Das Nickelgranulat wurde dann 1 min bei 1600 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt und diente außerdem zur Äquilibrierung des Granulats, das anschließend in 1x PBS/ 1% Triton X-100 vorlag. 1 Liter Bakterienkultur wurde mittels 0,02% Arabinose induziert und über Nacht bei 20°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur zentrifugiert (4000 x g, 4°C , 10 min) und das Sediment in 10 ml eiskalten 1x PBS/ 1% Triton X resuspendiert. Durch die Zugabe von einer Spatelspitze Lysozym wurden die Bakterien aufgebrochen, für 5-10 min auf Eis inkubiert und anschließend mittels Ultraschall für 30 s beschallt. Dieser letzte Schritt wurde insgesamt 3mal wiederholt. Die Probe wurde anschließend für 5 min zentrifugiert (4000 x g, 4°C). Der proteinhaltige Überstand wurde dann mit 2 ml Nickelgranulat gemischt und über Nacht bei 4°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe auf die mit einem Faltenfilter ausgelegte Säule gegeben und der Durchfluss mit 10% Glycerin auf Trockeneis bei -20°C weggefroren. Die Säulen wurden dann mit 10 ml 1x PBS/ 1% Triton X-100 und 5 mM Imidazol gewaschen um potentielle Verunreinigungen zu entfernen. Der Durchfluss wurde erneut weggefroren. Dann wurde das untere Ende der Säule mittels einer Kappe verschlossen und das Protein durch Zugabe von 1 ml 1x PBS/ 1% Triton X-100 und 20 mM Imidazol von der Nickelmatrix eluiert. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 min wurde die Kappe entfernt und der Durchfluss wiederum weggefroren. Dieser Schritt wurde mehrmals mit steigender Imidazolkonzentration wiederholt (40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM und 500 mM) und das Eluat jeweils bei -20°C aufbewahrt. Abschließend wurde auf die Säule 1x PBS/1% Triton X-100 gegeben und diese bei 4°C gelagert.

3.12 Quantifizierung von LPS (Lipooligosaccharide)

3.12.1 Präparation von LPS

Lysis Puffer 2% SDS
 4% 2-Mercaptoetanol
 10% Glycerin
 1 Messerspitze Bromphenolblau
 Auffüllen mit 1 M Tris-HCl pH 6,8 auf 10 ml
 Lagerung bei 4°C

Meningokokken einer Übernachtskultur wurden auf 6×10^8 Bakterien pro ml in 1x PBS eingestellt und für 2 min bei 13000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 50 µl Lysepuffer resuspendiert, für 10 min bei 110°C inkubiert und danach abgekühlt (10 min/60°C). Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl Proteinase K (2,5 mg/ml Lysispuffer). Der Ansatz wurde dann für 1 h bei 60°C inkubiert. Die Lagerung der hergestellten LPS-Präparationen erfolgte bei -20°C.

3.12.2 Tricin-Gelsystem zur Auftrennung von LPS

Ladungspuffer: 4% SDS
 12% Glycerin
 50 mM Tris-HCl pH 6,8
 2% 2-Mercaptoetanol
 0,01% 5 Serva Blue G

Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-Elektrophorese (3.8.2.). Das sehr geringe Molekulargewicht der Lipooligosaccharide favorisiert hochkonzentrierte Gele und ein spezielles Puffersystem, bestehend aus einem Anodenpuffer (0,2 M Tris-HCl pH 8,9) und einem Kathodenpuffer (0,1 M Tris HCl / 0,1 M Tricin / 0,1% SDS / pH 8,25).

Trenngel: 2,5 ml Acrylamid (46,5%)-Bisacrylamid (3%)-Mix
 1,5 ml H₂O
 6,25 ml Gelpuffer (3M Tris-HCl pH 8,45 / 0,3% SDS)
 1 ml 87% Glycerin
 7,5 µl TEMED
 75 µl 10% APS

Sammelgel: 0,25 ml Acrylamid (48%)-Bisacrylamid (1,5%)-Mix
 2,1 ml H₂O
 0,78 ml Gelpuffer (3M Tris-HCl pH 8,45 / 0,3% SDS)
 3 µl TEMED
 30 µl 10% APS

Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels (30 min–2 h) wurden 1,5 µl der LPS-Präparation mit jeweils 1,5 µl Ladungspuffer versetzt, für 5 min bei 100°C inkubiert und dann

sofort auf Eis gestellt. Die Gelapparatur wurde mit Puffer aufgefüllt (Anodenpuffer außen, Kathodenpuffer zwischen den Glasplatten) und 3 µl Probe aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 30 V (nur bis zum Erreichen des Trenngels) und 110 V (Durchlauf des Trenngels) bis die als Marker dienende grüne Farbfront des Ladungspuffer 30 min aus dem Gel gelaufen war.

3.12.3 Silberfärbung und Entwicklung der LPS-Gele

Die Silberfärbung ist eine extrem empfindliche Methode zum Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen. Dabei komplexieren Silber-Ionen mit dem Protein. Durch die anschließende Reduzierung mit alkalischen Formaldehyd fällt dieses aus und die dabei auftretenden Banden erscheinen braun bis schwarz.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese wie folgt behandelt:

1. Fixierung (40% abs. Ethanol / 5% 96%ige Essigsäure) über Nacht bei RT
2. Oxidation* (40% abs. Ethanol / 5% 96%ige Essigsäure / 0,7% Periodsäure) für 5 min unter leichten Schütteln, danach kurz mit H₂O spülen
3. Waschen mit Wasser für 3 x 15 min unter leichten Schütteln
4. Färbung* (467 µl 2 N NaOH / 666 µl 25% Ammoniaknitratlösung / 1667 µl 20% AgNO₃) für 10 min unter leichten Schütteln, danach kurz mit H₂O spülen
5. Waschen mit Wasser für 3 x 10 min unter leichten Schütteln
6. Entwickeln* mit Formaldehydfixierer (50 mg Zitronensäure / 0,5 ml 37% Formaldehyd) bis alle Banden sichtbar sind
7. Stoppen mit 5% Essigsäure

*erst kurz vor Gebrauch ansetzen

Anschließend wurde das Gel in Ampuwa, versetzt mit 65% Methanol und 5% Glycerin-87%, geschrumpft, dann in Einmachfolie eingeschlagen und zum Trocknen in einem Trockenrahmen aufgezogen.

3.13 Bakterizidie-Test

VBS/BSA: 5 mM Barbital
145 mM NaCl
0,5 mM MgCl₂
0,15 mM CaCl₂
0,5% BSA

Die Testung der Sensibilität von Meningokokken gegenüber humanem Serum erfolgte mittels Bakterizidie-Tests. Dazu wurden von einer auf GC-Agar gewachsenen Übernachtskultur die Bakterien abgenommen und auf eine OD_{600nm} 0,1 (= 1 x 10⁸ Bakterien/ml) in 1 ml VBS/BSA eingestellt. Die Bakterienzahl wurde zunächst auf 1 x 10⁶ CFU verdünnt. Dann wurde das VBS/BSA vorgelegt, darauf das Serum pipettiert und zum Schluss die Bakterien (25 µl) zugegeben. Die Pipettierung der Reaktion erfolgte auf Eis. Die Menge an VBS/BSA richtete sich nach der zu testenden Serumkonzentration. Das Endvolumen der Reaktion betrug jeweils

250 μ l. Danach wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C im Thermomixer auf Schüttelstufe 7 inkubiert. Anschließend wurden für die Bestimmung der Lebendkeimzahl entsprechende Aliquots in PBS verdünnt, auf GC-Platten ausplattiert und bei 37°C/ 5% CO₂ über Nacht bebrütet.

3.14 Testung der Antibiotikaresistenz

Die Testung der Antibiotika-Sensibilität erfolgte durch die Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK). Als minimale Hemmkonzentration gilt die Konzentration, bei der nach 20 h kein sichtbares Wachstum nachweisbar ist.

Meningokokken einer Übernachtskultur wurden auf eine OD_{600nm}=0,5 in 5 ml 0,9% NaCl Lösung eingestellt. Das aus dieser Kultur mittels eines Wattetupfers entnommene bakterienhaltige Material diente dann zur gleichmäßigen Beimpfung einer Müller-Hinton Blutagar Platte (5% Schafserythrozyten). Pro Antibiotikum wurde eine Platte verwendet. Als Sensibilitätstestverfahren zur Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration wurde der Epsilon-Test (E-Test) verwendet. Bei diesem Verfahren diffundiert das Antibiotikum von einem präparierten Streifen mit vorgegebenen Konzentrationsgradienten in den Agar. Auf der einen Seite des Streifens ist ein definierter Antibiotikagradient aufgebracht, die andere Seite des Streifens zeigt die Skala der entsprechenden MHK-Werte. Mittels Pinzette wurden auf den einzelnen Platten die jeweiligen Teststreifen luftblasenfrei aufgelegt. Die Platten wurden dann anschließend über Nacht bei 37°C/ 5% CO₂ bebrütet. Am nächsten Tag wurde die MHK am Schnittpunkt der Hemmhofellipse mit der Skala des E-Teststreifens abgelesen.

4 Ergebnisse

4.1 Transkriptomanalyse

In dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird die Veränderung des Transkriptionsprofils von Meningokokken während der Infektion von Epithel- und Endothelzellen mit Hilfe der DNA-Mikroarraytechnologie analysiert. Mikroarrays stellen eine ideale Technologie zur genomweiten Studie der Genexpression auf Ebene der Transkription dar (Winzeler *et al.*, 1999; Rappuoli, 2000). Bei dieser Technik können auf einen beschichteten Glasobjektträger DNA-Fragmente im „*high density*“ – Format aufgebracht werden, so dass ein komplettes bakterielles Genom repräsentiert ist. Durch Hybridisierung der Gesamtgenom-Arrays mit amplifizierter bakterieller cDNA aus experimentellen Systemen kann das Expressionsmuster aller Gene unter definierten Bedingungen aufgezeigt werden. Für die Analyse und den damit verbundenen Infektionsversuchen wurde das Meningokokkenisolat MC58 (Serogruppe B), ein klinisches Isolat des ST-32 (vormals ET-5) Komplex verwendet. Von diesem Isolat lag die vollständige Sequenzinformation vor (Tettelin *et al.*, 2000). Dies ermöglichte die Konstruktion von DNA-Mikroarrays. Das Genom von MC58 hat eine Größe von ca. 2,2 MB mit einem GC-Gehalt von ca. 52% und verfügt über eine Vielzahl repetitiver DNA – Elemente. Die repetitiven Sequenzen in Transkriptionsterminatoren werden als wichtige Elemente für den horizontalen Transfer von DNA innerhalb der Gattung *Neisseria* angesehen. Des Weiteren wurde mit der vollständigen Genomsequenz eine Vielzahl von Genen identifiziert, die einer Phasenvariation unterliegen, d.h. deren Expression an- oder abgeschaltet werden kann. Neuere Untersuchungen beziffern die Anzahl der phasenvariablen Gene für den Stamm MC58 mit 82 (Snyder *et al.*, 2001).

4.1.1 Ermittlung der veränderten Anzahl der zell-adhärenenten Bakterien

Als Probe für den Mikroarray diente in cDNA umgeschriebene RNA zelladhärenenten Bakterien. Die Markierung der RNA-Probe mittels eines fluoreszierenden Farbstoffs erfolgte während der cDNA Synthese. Für diese „direkte Markierung“ sind RNA Mengen von > 20 µg notwendig. Wichtig für die RNA Ausbeute ist eine hohe Adhärenzrate. Daher wurde in einem ersten Schritt das Adhärenzpotential des Stamms MC58 sowie einer isogenen kapselnegativen *siaD*-Mutante nach Kontakt mit HEp-2 und HBMEC Zellen bestimmt. Die beiden Zelllinien wurden nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens von 1×10^6 Zellen/ml mit einer MOI von 10 (entspricht 10 Bakterien/Zelle) des jeweiligen Stammes in RPMI Medium allein (HEp-2) oder RPMI Medium + 10% FCS (HBMEC) beimpft. Nach 6 h wurde die Anzahl der zelladhärenenten Bakterien bestimmt.

Zelltyp	MC58		MC58 <i>siaD</i>	
	Adhärenz	Invasion	Adhärenz	Invasion
HEp-2	$2,8 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^6$ * 1,4%	$9,3 \times 10^1 \pm 5,2 \times 10^1$ * 0,003%	$4,2 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^7$ * 75%	$3,3 \times 10^4 \pm 1,7 \times 10^4$ * 0,08%
HBMEC	$2,0 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$ * 0,9%	$5,0 \times 10^3 \pm 2,5 \times 10^3$ * 0,25%	$3,3 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^7$ * 49,6%	$3,4 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^5$ * 2,3%

Tab. 4.1.1: Adhärenz- und Invasionswerte von MC58 und MC58 *siaD* an HEp-2 und HBMEC. Die prozentualen Werte sind mit angegeben (*).

Anhand der Daten ist ersichtbar, dass die Adhärenz der kapsellosen Mutante bedeutend größer ist als die des bekapselten Wildtyps. So betrug die durchschnittliche prozentuale Adhärenz an Epithelzellen 75% und an Endothelzellen 49,6%. Im Vergleich dazu wies der bekapselte MC58 nur eine Adhärenzquote von 1,4% an HEp-2 und 0,9% an HBMEC Zellen auf. Nur ein geringer Prozentsatz der Bakterien war jeweils intrazellulär lokalisiert. Aufgrund des erhöhten Adhärenzpotentials wurde die kapsellose *siaD*-Mutante für alle weiteren Versuche verwendet.

4.1.2 Isolierung der zell-adhärenenten Bakterien

4.1.2.1 Isolierung der an HEp-2 adhärenenten Bakterien

Ein konfluenter Monolayer von $7,5 \times 10^6$ Zellen wurde mit $7,5 \times 10^7$ Bakterien (MOI=10) in 75 cm² Zellkulturflaschen beimpft. Nach 6 h Infektionszeit wurden die nicht adhärenenten Bakterien im Überstand durch drei PBS Waschschriffe entfernt und die adhärenenten Bakterien mittels Trypsin von den Wirtszellen getrennt. Zu diesem Zeitpunkt waren durchschnittlich 1×10^8 Bakterien zellassoziiert. Dies entspricht einer Adhärenz von 24%. Durch Gentamicinassays wurde die Anzahl der intrazellulär lokalisierten Bakterien mit $2,4 \times 10^5$ Bakterien bestimmt. Dieser Wert entspricht einer prozentualen Internalisierung von 0,2%. Nach der Anwendung des Waschprotokolls konnten mehr als 97% der Bakterien abgewaschen werden. Nur 0,2% der Bakterien waren nach der Trypsinbehandlung noch zellassoziiert. Davon waren wiederum 25% intrazellulär lokalisiert.

MC58 <i>siaD</i> HEp-2	Überstand	Adhärenz	Invasion
– Trypsin	$3,1 \times 10^8 \pm 7,6 \times 10^7$ * 75,6%	$1,0 \times 10^8 \pm 2,5 \times 10^7$ * 24,4%	$2,4 \times 10^5 \pm 9,9 \times 10^4$ * 0,24%
+ Trypsin	$1,7 \times 10^9 \pm 6,4 \times 10^8$ * 99,8%	$2,7 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$ * 0,2%	$6,8 \times 10^5 \pm 6,2 \times 10^5$ * 25%

Tab. 4.1.2.1.: Vergleich von Überstand-, Adhärenz- und Invasionswerten von MC58 *siaD* an HEp-2 in RPMI 1640 Medium ohne Trypsin- bzw. mit Trypsinbehandlung. Die prozentualen Werte sind mit angegeben (*).

4.1.2.2 Isolierung der an HBMEC adhärennten Bakterien

HBMEC-Zellen wurden mit dem unbekapselten Stamm MC58 *siaD* in RPMI + 10% FCS infiziert. Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog, wie für die Epithelzelllinie HEp-2 beschrieben.

Nach einem Zeitraum von 6 h waren $2,2 \times 10^8$ Bakterien zellassoziiert. Der Anteil der intrazellulären Bakterien betrug dabei $4,7 \times 10^4$ Bakterien.

Durch die sich anschließende Separation der Bakterien von den Wirtszellen mittels Trypsin konnten mehr als 96% der Meningokokken von den Zellen abgewaschen werden. Jeweils 0,2% der Bakterien waren nach der Trypsinbehandlung noch zellassoziiert. Dabei entspricht der Anteil der intrazellulär lokalisierten Bakterien ($3,2 \times 10^4$ Bakterien) annähernd dem Wert ohne Trypsinbehandlung ($4,7 \times 10^4$ Bakterien).

MC58 <i>siaD</i> HBMEC	Überstand	Adhärenz	Invasion
– Trypsin	$8,3 \times 10^9 \pm 5,1 \times 10^9$ * 97,4%	$2,2 \times 10^8 \pm 8,0 \times 10^7$ * 2,6%	$4,7 \times 10^4 \pm 2,9 \times 10^4$ * 0,02%
+ Trypsin	$4,2 \times 10^9 \pm 3,1 \times 10^9$ * 99,8%	$7,5 \times 10^6 \pm 5,4 \times 10^6$ * 0,2%	$3,2 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$ * 0,42 %

Tab. 4.1.2.2.: Vergleich von Überstand-, Adhärenz- und Invasionswerten von MC58 *siaD* an HBMEC Zellen in RPMI 1640 Medium + 10% FCS ohne Trypsin- bzw. mit Trypsinbehandlung. Die prozentualen Werte sind mit angegeben (*).

4.1.3 Transkriptomanalyse von Meningokokken während der Infektion mit HEp-2 Zellen

HEp-2 Zellen wurden mit dem *N. meningitidis* Stamm MC58 *siaD* beimpft. Nach 6 h Infektionszeit wurden die zelladhärenten Bakterien mittels eines Trypsinwaschschrittes von den Zellen abgetrennt und sofort im Anschluss die RNA isoliert. Diese RNA wurde als Experiment bezeichnet. Als Kontrolle dienten Bakterien vom Stamm MC58 *siaD*, die unter den gleichen Bedingungen und nach dem selben Protokoll, jedoch ohne die Anwesenheit von Zellen, inkubiert und auch isoliert wurden. Die RNA des Experimentes, sowie die RNA der Kontrolle wurden jeweils verschieden markiert (Experiment Cy3, Kontrolle Cy5) und dann mit Gesamt-Genom-DNA Mikroarrays hybridisiert. Basierend auf den Daten von Guckenberger und Kollegen (Guckenberger *et al.*, 2002) weisen die verwendeten Oligonukleotid-Mikroarrays eine hohe Sensivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit auf. Vorversuche zur Untersuchung des Hitzeschocks bei *N. meningitidis* mit den gleichen Arrays zeigten, dass mit 99,9% Wahrscheinlichkeit bei einem Faktor von 1,8 und mit 99,7% Wahrscheinlichkeit bei einem Faktor von 1,6 von einer Hochregulierung ausgegangen werden kann. Eine Herunterregulierung ließ sich ab einem Faktor von $\leq 0,5$ detektieren (Guckenberger *et al.*, 2002). Insgesamt wurden 5 verschiedene RNA-Isolierungs- und Hybridisierungsexperimente mit jeweils einem Austausch der Farbstoffe während der Markierungsreaktion (Experiment Cy5, Kontrolle Cy3) durchgeführt. Es wurden alle jene ORF's als differentiell reguliert betrachtet, die in mindestens 3 Experimenten einen Faktor von $\geq 1,6$ oder $\leq 0,5$ aufwiesen.

Nach Kontakt mit Epithelzellen wiesen 72 Gene eine differentielle Regulierung auf. Das entspricht 3,3% des Gesamtgenoms von *N. meningitidis* Stamm MC58. Davon waren 67 Gene induziert und 5 Gene reprimiert. Der Grad der differentiellen Regulierung umfasste eine

Hochregulierung bis 3,7 und eine Herunterregulierung bis -1,8. Tabelle 4.1.3. gibt einen Überblick über die Anzahl der differentiell regulierten Gene nach Kontakt mit Epithelzellen.

Diese wurden anhand ihrer Funktion in folgende Gruppen eingeteilt:

- Membranproteine und Transporter
- Genregulatoren
- allgemeiner Metabolismus
- Proteinbiosynthese.

Des weiteren konnte eine große Vielzahl an hypothetischen ORF's bzw. ORF's mit unbekannter Funktion detektiert werden. Ein großer Teil der hochregulierten Gene, insgesamt 15, kodieren Proteine mit Virulenzeigenschaften. So z.B. Proteine für die Kapselbiosynthese und deren Transport (*siaB*, *siaA*, *ctrD*, *ctrC*), eine Immunoglobulin A1 Protease (*iga*), Enzyme der Lipooligosaccharidbiosynthese (*rfaF*), einige Aufnahmesysteme für Eisen (*tonB*, *exbD*, *lbpB*, *fbpB*), Proteine, die bei der Zusammensetzung der Pili vom Typ IV eine Rolle spielen (*pilN*, *pilO*), Invasine (*opa*, *porA*) und potentielle Toxine (*frpC*). Von 20 Genen, die für Membranproteine und Transporter kodieren, waren 18 hoch- und 2 herunterreguliert. Ein weiteres Set an differentiell regulierten Genen, insgesamt 24, kodierten für Proteine der Genexpression (Transkription und Translation) und des Metabolismus. Des weiteren konnten 20 differentiell regulierte Gene (17 davon hoch- und 3 herunterreguliert) detektiert werden, denen bisher keine bekannte Funktion zugewiesen werden konnte. Alle diese Gene wurden nach Kontakt mit Epithelzellen induziert.

Tab. 4.1.3.: Differenziell regulierte ORF's von *Neisseria meningitidis* Stamm MC58 *siaD* nach Kontakt mit Epithelzellen (HEp-2)

Funktionale Kategorie	ORF – Nummer Serogruppe B	differenzielle Regulierung	STaBWN	diff. Regulierung in HBMEC	Protein	Virulenzgen	ORF-Nummer Serogruppe A	Phasenvariabel	
Kapsel	NMB0069	1.8	0.2	Nein	Kapsel Biosynthese Protein, SiaB	+	keine	-	
	NMB0070	2.2	0.3	Nein	Kapsel Biosynthese Protein, SiaA	+	keine	-	
	NMB0073	2.2	0.2	Nein	Kapsel Polysaccharid Export Membran Protein, CtrC	+	NMA0196	-	
	NMB0074	2.4	0.2	Nein	Kapsel Polysaccharid Export ATP bindenes Protein, CtrD	+	NMA0195	-	
Protein fate Membran	NMB0700	2.0	0.2	Nein	IgA spezifische Serine Endopeptidase	+	NMA0905	-	
	NMB0364/NMB0584/ NMB1412/NMB1414	2.4	0.4	Nein	FrpC Operon	+	NMA2124	-	
	NMB0442/NMB0926 /NMB1465/NMB1636	1.9	0.2	Nein	Opacity Proteine, OpaA-D	+	NMA1676/NMA1890 NMA2043	+ -	
	NMB0886	1.7	0.2	Nein	fimbriales Protein FimT	-	NMA1106	-	
	NMB0889	2.1	0.1	Nein	putatives Membranprotein	-	NMA1109	-	
	NMB1415/NMB0585	2.3	0.3	Nein	Eisen-regulierendes Protein FrpC	+	NMA1626/NMA0788	-	
	NMB1429	1.6	0.2	Nein	Außenmembranprotein PorA	+	NMA1642	+	
	NMB1651	2.6	0.4	Nein	Alanin Racemase, Alr	-	NMA1906	-	
	NMB1730	1.8	0.7	1.7	TonB	+	NMA1985	-	
	NMB1809	1.7	0.1	Nein	PilN	+	NMA0653	-	
	NMB1810	2.1	0.5	Nein	PilO	+	NMA0652	-	
	Transport	NMB0177	-1.6	0.1	Nein	putativer As(=Aminosäure) Transporter	-	NMA0091	-
		NMB0633	2.0	0.6	Nein	Eisen (III) ABC Transporter, FbpB	+	NMA0843	-
		NMB0787	2.1	0.4	Nein	As ABC Transporter, periplasmatisches As bindendes Protein	-	NMA0997	-
NMB0788		1.8	0.3	Nein	As ABC Transporter, Permease Protein	-	NMA0999	-	
NMB0880		1.9	0.2	Nein	Sulfate ABC Transporter, Cys W	-	NMA1098	-	
NMB0881		1.6	0.1	Nein	Sulfate ABC Transporter, CysT	-	NMA1100	-	
NMB1017		2.1	0.2	Nein	Sulfate ABC Transporter, periplasmatisches Sulfate bindenes Protein	-	NMA1243	-	
NMB1728		1.8	0.4	Nein	Biopolymer Transporter Protein, ExbD	+	NMA1983	-	
Transkription	NMB1888	2.3	0.3	Nein	Protein Export Membran Protein, SecG	-	NMA0569	-	
	NMB1998	-1.8	0.3	Nein	Außenmembran Protein FetA	-	NMA0453	+	
	NMB0126	2.1	0.1	Nein	Transkription Antitermination Protein NusG	-	NMA0147	-	
	NMB0132	1.8	0.2	Nein	DNA abhängige RNA Polymerase, β - Untereinheit RpoB	+	NMA0142	-	
Metabolismus	NMB0617	1.6	0.3	Nein	Rho Transkription Terminationsfaktor	-	NMA0825	-	
	NMB0678	2.1	0.7	Nein	putative Tryptophan Synthase α - Kette TrpA	-	NMA0879	-	
	NMB0994 NMB1377	2.0 2.1	0.3 0.2	Nein Nein	Acyl-Coenzym A Dehydrogenase Protein L-Lactat Dehydrogenase, LldA	- -	NMA1202 NMA1592	- -	

	NMB1527	2.1	0.9	1.6	ADP-Heptose: Lipopolysaccharid Heptosyltransferase II, RfaF	+	NMA1727	-
	NMB1541	1.9	0.1	Nein	Lactoferrin bindenes Protein, LbpB	+	NMA1740	-
	NMB1574	2.2	0.3	1.7	Ketolsäure Reduktoisomerase, IlvC	+	NMA1763	-
	NMB1576	2.3	0.9	1.7	Acetolactat Synthase Isoenzym III kleine Untereinheit, IlvH	+	NMA1765	-
	NMB1577	2.7	0.7	1.6	Acetolactat Synthase Isoenzym III große Untereinheit, IlvI	+	NMA1766	-
	NMB1581	2.1	0.4	Nein	Histodinol Dehydrogenase, HisD	-	NMA1770	-
	NMB1845	2.7	0.6	2.0	putatives periplasmatisches Thioredoxin	-	NMA0612	-
	NMB1857/NMB0977	2.2	0.2	2.4	<i>Modulator of drug activity B</i> , putatives MdaB	-	NMA0600/NMA1174	-
	NMB1861	1.9	0.3	Nein	Putative Acetyl-Coenzym A Carboxylase, Biotin Carboxylase Komponente AccC	-	NMA0596	-
	NMB1887	2.1	0.5	Nein	Putative Triosephosphat Isomerase, TpiA	-	NMA0570	-
	NMB1940	2.2	0.3	Nein	ATP Synthase A Kette ,AtpB	-	NMA0513	-
	NMB2154	1.8	0.2	Nein	Elektronen Transfer Flavoprotein α – Untereinheit, EtfA	-	NMA0241	-
	NMB2155	1.9	0.4	Nein	Elektronen Transfer Flavoprotein β – Untereinheit, EtfB	-	NMA0242	-
Translation	NMB0124	2.2	0.2	Nein	Elongationsfaktor TU TufA1	+	NMA0134	-
	NMB0145	1.8	0.4	Nein	50S ribosomales Protein L2, RplB	-	NMA0126	-
	NMB0159	1.7	0.3	1.6	30S ribosomales Protein S5, RpsE	-	NMA0112	-
	NMB0167	1.7	0.3	2.0	30S ribosomales Protein S4, RpsD	-	NMA0104	-
	NMB0591	1.7	0.2	Nein	16S rRNA processing protein, RimM	-	NMA0794	-
DNA	NMB0210	2.9	0.5	Nein	Pseudogen (modifizierende Methylase)	-	NMA0059	-
Phagen verwandt	NMB0101	1.6	0.3	Nein	Putative Transpoase für IS1016	-	NMA0175	-
	NMB0240	1.9	0.2	Nein	Putative IS1016 Transpoase	-	NMA0022	-
Hypothetisch	NMB0065	1.8	0.2	Nein	Hypothetisches Protein	-	keine	+
	NMB0129	1.8	0.3	Nein	Hypothetisches Protein	-	intergeniert zwischen NMA0144+NMA0145	-
	NMB0200	2.1	0.3	2.1	Hypothetisches Protein	-	keine	-
	NMB0239	2.1	0.4	Nein	Hypothetisches Protein	-	NMA0021	-
	NMB0328	1.7	0.2	Nein	Hypothetisches Protein	-	keine	-
	NMB0429	-1.8	0.4	Nein	Hypothetisches Protein	-	NMA2055	-
	NMB0451	2.3	0.4	Nein	Hypothetisches Protein Tou2	-	NMA2035	-
	NMB0475	1.6	0.2	Nein	Hypothetisches Protein	-	NMA2010	-
	NMB0476	2.0	0.3	Nein	Hypothetisches Protein	-	NMA2009	-
	NMB0517	2.1	0.3	Nein	Hypothetisches Protein	-	keine	-
	NMB0744	3.7	0.9	1.6	Hypothetisches Protein	-	NMA0957	-
	NMB0995	2.1	0.2	Nein	Hypothetisches Protein Mip	+	NMA1203	-
	NMB1016	1.8	0.3	Nein	Hypothetisches Protein	-	NMA1237	-
	NMB1452	2.6	1.4	Nein	konserviertes hypothetisches Protein	-	NMA1666	-
	NMB1575	2.1	0.5	1.6	konserviertes hypothetisches Protein	-	NMA1764	-
	NMB1578	1.7	0.2	Nein	konserviertes hypothetisches Protein	-	NMA1767	-
	NMB1632	-1.6	0.1	Nein	Hypothetisches Protein	-	NMA0780	-
	NMB1889	1.6	0.2	1.6	Hypothetisches Protein	-	keine	-
	NMB2000	1.6	0.3	Nein	Hypothetisches HslO	-	NMA0441	-
	NMB2140	2.1	0.3	Nein	konserviertes hypothetisches Protein	-	NMA0226	-

4.1.4 Analyse des Transkriptom von Meningokokken während der Infektion mit HBMEC Zellen

HBMEC Zellen wurden ebenfalls mit dem Meningokokkenstamm MC58 *siaD* beimpft und nach 6 h Infektion die RNA der adhärenen Bakterien isoliert. Die Daten aus fünf unabhängigen Isolierungs- und Hybridisierungsexperimenten (davon 1 Austausch der Farbstoffe) wurden jeweils zusammengefasst, und als differentiell reguliert all jene Gene betrachtet, die in mindestens drei Experimenten eine transkriptionelle Unterscheidung um den Faktor 1,6 aufwiesen. Der Vergleich auf der Transkriptionsebene zwischen adhärenen Bakterien und Bakterien ohne Wirtszellen zeigte eine signifikante Veränderung des Transkriptionsprofils für 48 ORF's. Dies entspricht 2,2% des Gesamtgenoms von *Neisseria meningitidis*. Davon waren 41 Gene induziert und 7 Gene reprimiert. Der Grad der differentiellen Regulierung reichte von einer Hochregulierung um den Faktor 4,5 bis zu einer Herunterregulierung um den Faktor -1,9. Der Großteil der Gene war in der Virulenz, dem Transport, der Proteinbiosynthese und dem Metabolismus involviert oder kodierte für hypothetische Proteine. Die Virulenz- assoziierten Gene spielen eine Rolle in der Lipooligosaccharidbiosynthese (*rfaF*) und der Eisenaufnahme (*tonB*). Es wurden des weiteren ein putatives Hämolyisin (NMB1646) und eine NADP-spezifische Glutamate-Dehydrogenase (NMB1710), sowie einige Gene, die für essentielle metabolische Funktionen kodieren (*ilvC*, *ilvH*, *ilvI*) detektiert. Alle Virulenzgene wurden wiederum erst durch die Interaktion mit HBMEC induziert. Ebenso konnte für alle 5 differentiell regulierten Membranproteine und Transporter eine Induktion verzeichnet werden. Von weiteren 26 Genen, die im Metabolismus, in der Transkription und der Translation involviert sind, waren 23 Gene hochreguliert und 3 Gene reprimiert. Die differentiell regulierten Gene umfassen außerdem ein Set von 15 hypothetischen ORF's, von denen 12 Gene hoch- und 2 Gene herunterreguliert waren. Tabelle 4.1.4. gibt einen Überblick über die Anzahl der differentiell regulierten Gene nach Kontakt mit Endothelzellen.

4.1.5 Globale Analyse der differentiell regulierten Gene während der Interaktion mit Epithel- und Endothelzellen

Die Lokalisierung der detektierten Gene demonstrierte eine zufällige Verteilung innerhalb des Genoms (Abb. 4.1.5.). Insgesamt wiesen 13 Gene, sowohl nach Kontakt mit Epithel- als auch mit Endothelzellen, eine differentielle Regulierung auf. Der Großteil der regulierten Gene war auch im Genom des Serogruppe A Stamms Z2491 vorhanden, allerdings mit der Ausnahme von 14 Genen, die hier nicht detektiert werden konnten (Tab.4.1.5.).

Ein geringer Teil (5 ORF's) der differentiell regulierten Gene sind phasenvariabel. Die Gene *opa*, *porA*, *fetA* sowie der ORF NMB0065 waren nur nach Kontakt mit Epithelzellen induziert. Dagegen war *funZ* spezifisch nach Interaktion mit HBMEC hochreguliert. Keines dieser phasenvariablen Gene konnte in beiden Zellsystemen detektiert werden. Der Mechanismus der Phasenvariabilität lässt sich auf Längenvariationen von einfachen Sequenzwiederholungen zurückführen. Befindet sich die Wiederholung innerhalb eines Gens, wie dies für *opa*, *fetA*, NMB0062 und *funZ* der Fall ist, kommt es zu translationalen Veränderungen des Leserahmens. Die Wiederholung kann allerdings auch im Promotorbereich liegen und damit Einfluss auf die Transkription des Gens haben. Ein Beispiel dafür ist das *porA*-Gen. Diese Gene sind mit der Ausnahme von *funZ* auch im Stamm der Serogruppe A Z2491 präsent.

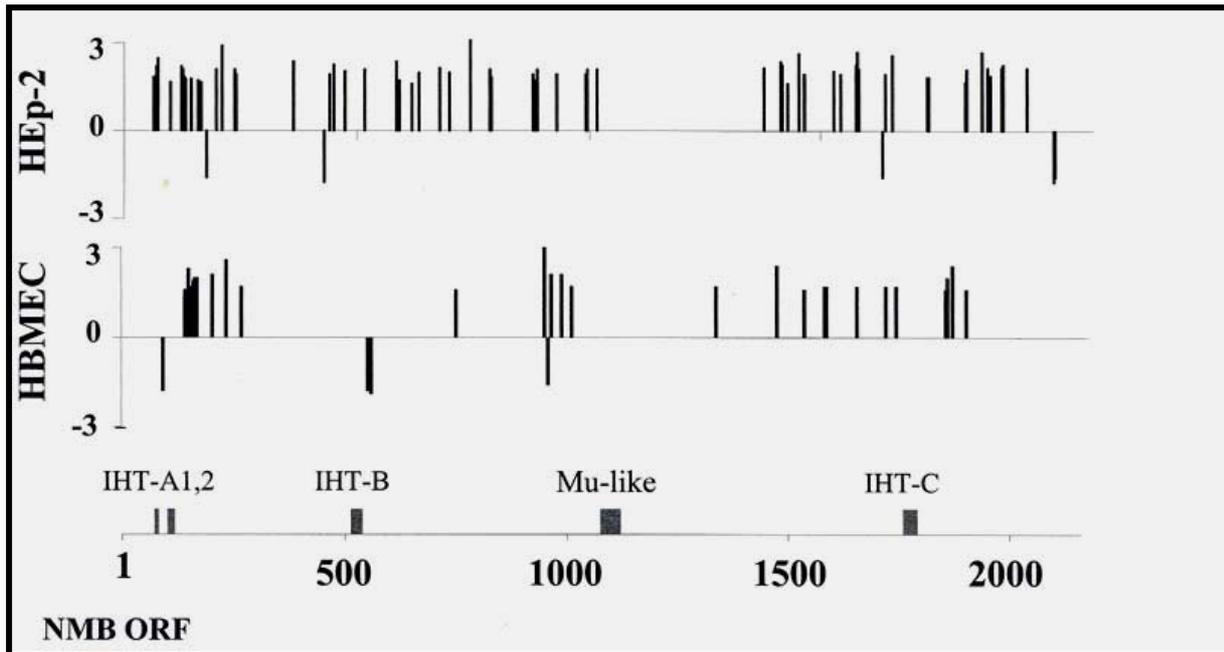


Abb. 4.1.5.: Genomische Verteilung der differentiell regulierten Gene innerhalb des MC58 Genoms, nach Adhärenz an HEP-2 bzw. HBMEC Zellen. Die Positionen der differentiell transkribierten ORF's innerhalb des Genoms sind auf der x-Achse dargestellt, der Grad der differentiellen Regulierung ist auf der Y-Achse verzeichnet.

NMB, *Neisseria meningitidis* Serogruppe B; IHT, Inseln horizontalen DNA Transfers

Tab. 4.1.4.: Differenziell regulierte ORF's von *Neisseria meningitidis* Stamm MC58 *siaD* nach Kontakt mit Endothelzellen (HBMEC)

Funktionale Kategorie	ORF – Nummer Serogruppe B	differenzielle Regulierung	STaBWN	diff. Regulierung in HEp-2	Protein	Virulenzgen	ORF-Nummer Serogruppe A	Phasenvariabel
Membran	NMB1468	2.4	0.4	Nein	putatives Membranprotein	-	NMA1680	-
	NMB1646	1.7	0.2	Nein	putatives Hämolysin	+	NMA1900	-
	NMB1730	1.7	0.2	1.8	TonB	+	NMA1985	-
Transport	NMB0162	1.9	0.2	Nein	Präprotein Translokase SecY Untereinheit	-	NMA0109	-
	NMB1843	1.6	0.2	Nein	Transkriptionsregulator MarR -Familie	-	NMA0613	-
Metabolismus	NMB0546	-1.8	0.2	Nein	Alkohol Dehydrogenase (Propanol), AdhA	-	NMA0725	-
	NMB0950	-1.8	0.3	Nein	putative Succinate Dehydrogenase Flavoprotein Untereinheit	-	NMA1145	-
	NMB0951	-1.6	0.3	Nein	putative Succinate Dehydrogenase Eisen-Schwefel Protein	-	NMA1146	-
	NMB1527	1.6	0.2	2.1	ADP-Heptose: Lipopolysaccharide Heptosyltransferase II, RfaF	+	NMA1727	-
	NMB1574	1.7	0.1	2.2	Ketolsäure Reduktoisomerase, IlvC	+	NMA1763	-
	NMB1576	1.7	0.1	2.3	Acetolactat Synthase Isoenzym III, kleine Untereinheit IlvH	+	NMA1765	-
	NMB1577	1.6	0.2	2.7	Acetolactat Synthase Isoenzyme III, große Untereinheit IlvI	+	NMA1766	-
	NMB1710	1.7	0.2	Nein	NADP spezifische Glutamate Dehydrogenase, GdhA	+	NMA1964	-
	NMB1845	2.0	0.4	2.7	putatives periplamatisches Thioredoxin	-	NMA0612	-
	NMB1857/NMB0977	2.4	0.2	2.2	<i>Modulator of drug activity</i> , MdaB	-	NMA0600	-
Translation	NMB0143	1.6	0.1	Nein	50S ribosomales Protein L4, RplD	-	NMA0128	-
	NMB0144	1.7	0.2	Nein	50S ribosomales Protein L23, RplW	-	NMA0127	-
	NMB0148	1.6	0.3	Nein	30S ribosomales Protein S3, RpsC	-	NMA0123	-
	NMB0149	2.3	0.9	Nein	50S ribosomales Protein L16, RplP	-	NMA0122	-
	NMB0150	1.7	0.5	Nein	50S ribosomales Protein L29, RpmC	-	NMA0121	-
	NMB0151	1.7	0.1	Nein	30S ribosomales Protein S17, RpsQ	-	NMA0120	-
	NMB0159	1.6	0.2	1.7	30S ribosomales Protein S5, RpsE	-	NMA0112	-
	NMB0160	1.6	0.3	Nein	50S ribosomales Protein L30, RpmD	-	NMA0111	-
	NMB0161	1.6	0.3	Nein	50S ribosomales Protein L15, RplO	-	NMA0110	-
	NMB0163	2.0	0.2	Nein	Translation Initiationsfaktor IF-1, InfA	-	NMA0108	-
	NMB0164	1.7	0.1	Nein	50S ribosomales Protein L36, RpmJ	-	NMA0107	-
	NMB0167	2.0	0.1	1.7	30S ribosomales Protein S4, RpsD	-	NMA0104	-
	NMB0169	1.6	0.1	Nein	50S ribosomales Protein L17, RplQ	-	NMA0102	-
	NMB0941	2.4	0.2	Nein	Putatives 50S ribosomales Protein L36, RpmJ2	-	NMA1137	-

	NMB0942	4.5	0.2	Nein	50S ribosomales Protein L31, putatives RpmE2	-	NMA1138	-
DNA	NMB0232	2.6	1.9	Nein	DNA -Helikase II, UvrD	-	NMA0027	-
Phagen verwandt	NMB0987	1.8	0.9	Nein	putative <i>N</i> -Acetylmuramoyl-L-alanin Amidase	-	NMA1303	-
	NMB0961	2.1	0.7	Nein	FunZ	-	NMA1188	-
Hypothetisch	NMB0091	-1.7	0.3	Nein	hypothetisches Protein	-	keine	+
	NMB0092	-1.8	0.2	Nein	hypothetisches Protein	-	keine	-
	NMB0093	-1.8	0.3	Nein	hypothetisches Protein	-	keine	-
	NMB0200	2.1	0.4	2.1	hypothetisches Protein	-	keine	-
	NMB0267	1.8	0.3	Nein	putatives periplasmatisches Protein	-	NMA2219	-
	NMB0555	1.7	0.4	Nein	hypothetisches Protein NMA0737	-	NMA0737	-
	NMB0744	1.6	0.2	3.7	hypothetisches Protein	-	NMA0957	-
	NMB0985	1.7	0.6	Nein	E16 verwandtes Protein	-	NMA1301	-
	NMB0986	1.6	0.9	Nein	hypothetisches Protein	-	NMA1186	-
	NMB1009	1.6	0.2	Nein	konserviertes hypothetisches Protein	-	NMA1187	-
	NMB1010	1.6	0.2	Nein	hypothetisches Protein	-	NMA1302	-
	NMB1330	1.7	0.3	Nein	hypothetisches Protein	-	NMA1197	-
	NMB1575	1.6	0.1	2.1	konserviertes hypothetisches Protein	-	keine	-
	NMB1844	1.6	0.2	Nein	hypothetisches Protein	-	NMA1764	-
	NMB1889	1.6	0.2	1.6	hypothetisches Protein	-	keine	-

Tab. 4.1.5.: Differentiell regulierte ORF's von *N. meningitidis* nach Kontakt mit beiden Zellsystemen (sowohl HEp-2, als auch HBMEC)

Funktionale Kategorie	ORF – Nummer Serogruppe B	differentielle Regulierung		Protein	Virulenzgen	ORF-Nummer Serogruppe A
		HEp-2	HBMEC			
Membran	NMB1730	1.8	1.7	TonB Protein	+	NMA1985
Metabolismus	NMB1527	2.1	1.6	ADP-Heptose: LPS-Heptosyltransferse II, RfaF	+	NMA1727
	NMB1574	2.2	1.7	Ketolsäure Reduktoisomerase	+	NMA1763
	NMB1576	2.3	1.7	Acetolactate Synthase Isoenzym III, kleine Untereinheit, IlvH	+	NMA1765
	NMB1577	2.7	1.6	Acetolactate Synthase Isoenzym III, große Untereinheit, IlvI	+	NMA1766
	NMB1845	2.7	2.0	putatives periplasmatisches Thioredoxin	-	NMA0612
	NMB1857/	2.2	2.4	<i>Modulator of drug activity B</i> , MdaB	-	NMA0600/
	NMB0977					NMA1174
Translation	NMB0159	1.7	1.6	30S ribosomales Protein S5, RpsE	-	NMA0112
	NMB0167	1.7	2.0	30S ribosomales Protein S4, RpsD	-	NMA0104
Hypothetisch	NMB0200	2.1	2.1	hypothetisches Protein	-	keine
	NMB0744	3.7	1.6	hypothetisches Protein	-	NMA0957
	NMB1575	2.1	1.6	konserviertes hypothetisches Protein	-	NMA1764
	NMB1889	1.6	1.6	hypothetisches Protein	-	keine

4.1.6 Validierung spezifischer Veränderungen durch RT-PCR

Eine quantitative RT-PCR mit dem *Light Cycler* diene als unabhängiges System zur Überprüfung der Mikroarraydaten. Für den *Light Cycler* wurde RNA aus der gleichen Isolierung verwendet mit der auch die Arrayexperimente durchgeführt wurden. RNA von zwei unabhängigen Isolierungen und somit auch von 2 Arrayexperimenten bildeten die Ausgangsbasis für die cDNA Synthese. Zur Überprüfung wurden solche Gene herangezogen, die entweder nur während der Interaktion mit HEp-2 Zellen (*siaA*, *ctrC*) bzw. mit HBMEC Zellen (*secY*, NMB0985) oder in beiden Systemen (NMB0200, *mdaB*) differentiell reguliert waren. Dafür wurde jeweils ein ungefähr 200 bp langes Genfragment mit spezifischen Primern amplifiziert und das aufgereinigte PCR-Produkt anschließend in den pCR[®]2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert. Verdünnungen der daraus resultierenden Plasmide dienten als externe Standards für den *Light Cycler*. Als Referenzgen für die Normalisierung der erhöhten Transkriptionswerte diene der ORF NMB2052. Dieses Gen wies in allen Experimenten eine stabile Transkription auf. Die Quantifizierung des zu untersuchenden Gens im Vergleich zum Referenzgen erfolgte nach einem mathematischen Modell von Pfaffl (Pfaffl, 2001). Die so gewonnenen RT-PCR Daten konnten die im Mikroarray beobachteten Regulierungen für alle ausgewählten Gene bestätigen.

Weiterhin musste ausgeschlossen werden, dass die nach Kontakt mit Epithelzellen erhöhte transkriptionale Aktivität im Kapsellokus auf eine im *siaD*-Gen lokalisierte Insertion zurückzuführen ist. Dieses Gen kodiert für eine Polysialyltransferase und ist eines von 4 Genen, die den *sia*-Operon bilden. Das bei der *siaD*-Mutante induzierte Gen *siaA*, wurde zur Überprüfung der Daten herangezogen. Zu diesem Zweck wurden HEp-2 Zellen mit dem bekapselten Wildtyp MC58 infiziert. Nach einer Infektionszeit von 6 h erfolgte die RNA Isolierung unter den gleichen experimentellen Bedingungen, wie für die kapsellose Mutante beschrieben. Als *Template* zur Amplifizierung des *siaA*-Gens diene die in cDNA umgeschriebene isolierte RNA. Für dieses Gen konnte auch nach der Infektion mit dem bekapselten Stamm eine Hochregulierung um den Faktor 1,6 verzeichnet werden.

ORF	HEp-2		HBMEC	
	RT-PCR	Array	RT-PCR	Array
NMB0070, <i>siaA</i>	2,0	2,2	1,2	1,4
NMB0073, <i>ctrC</i>	3,0	2,2	0,9	1,2
NMB0162, <i>secY</i>	1,2	1,0	2,0	1,9
NMB0200, hyp. Protein	1,9	2,1	1,7	2,1
NMB0985, E16-related Protein	1,4	1,4	1,8	2,1
NMB1857, <i>mdaB</i>	2,6	2,2	2,4	2,4
NMB2052, <i>petB</i>	1,0	1,1	1,0	1,0

Tab. 4.1.6.: Bestätigung einzelner differentiell regulierter Gene während der Interaktion des *N. meningitidis* Stamm MC58 *siaD* mit Epithel- und Endothelzellen durch RT-PCR. Die entsprechenden Arraywerte sind mit angegeben.

4.2 Untersuchung einzelner differentiell regulierter Gene

Die durchgeführten Mikroarraystudien führten zur Identifizierung einer Vielzahl von Genen, die möglicherweise in die bakterielle Interaktion mit der Wirtszelle involviert sind. Abschließende Aussagen über die Rolle der entsprechenden ORF's im Infektionsprozess lassen sich allerdings nur durch eine Deletion des jeweiligen Gens und Untersuchungen von Wildstamm und Defektmutanten u.a. im Zellkulturmodell treffen. Daher wurden drei ORF's anhand verschiedener Kategorien wie Funktion und Virulenz für die Mutantenkonstruktion ausgewählt und mittels unterschiedlicher Untersuchungstechniken charakterisiert. Das Infektionspotential der ORF's NMB1527 und NMB1646 wurde mittels Adhärenz- und Invasionsassays bestimmt. Für die funktionelle Charakterisierung des ORF's NMB1843 wurden Mikroarrays verwendet. Die generelle Charakterisierung umfasste:

- Sequenzierung
- Southernblot
- RT-PCR
- *real time* PCR (Validierung der Arraydaten)
- Analyse der Oberflächenstrukturen (Opa, Opc und Pili).

Unabhängig davon kamen für die Genanalyse weitere Methoden zur Anwendung (u.a. Bakterizidie-, Zytotoxizitätsassays, Antibiogramme). Dies war von der vermuteten Funktion abhängig.

4.2.1 Charakterisierung des induzierten ORF's NMB1527 (*rfaF*)

Der ORF NMB1527 kodiert für eine LPS-Heptosyltransferase (*rfaF*) und ist in der LPS-Biosynthese involviert (Institute for genomic research: <http://www.tigr.org>; Jennings *et al.*, 1995a). Dieses Gen wurde sowohl durch Kontakt mit Epithelzellen, als auch durch Kontakt mit Endothelzellen induziert. Des Weiteren ist dieses Gen eng mit der Virulenz einer Meningokokken-Infektion assoziiert, da es essentiell für die septische Phase der Infektion ist (Sun *et al.*, 2000).

4.2.1.1 Klonierung des ORF's NMB1527

Das *rfaF*-Gen wurde mittels PCR amplifiziert und überhängende 3'-Enden entfernt. Als *Template* diente chromosomale DNA des Stammes MC58. Das geglättete PCR-Produkt wurde dann in den mit *SmaI/Asp718* gespaltenen Vektor pTL1 kloniert. Dies führte zur Entstehung des Plasmids prfaFBK. Die anschließende Sequenzierung des Plasmids bestätigte den Einbau eines 1011 bp großen Fragmentes. Danach erfolgte der Einbau einer Kanamycin - Resistenzkassette aus dem Plasmid pUC4K in die im Gen lokalisierte *EcoRI*-Schnittstelle. Da das ausgewählte Enzym *EcoRI* im *rfaF*-Lokus zweimal spaltet (Pos. 174 und Pos. 559), entfiel bei der Spaltung ein Fragment von 385 bp.

Das daraus resultierende Plasmid prfaFKanBK wurde dann sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte eine Insertion der Kassette in Leserichtung zum vorhandenen ORF NMB1527. Des Weiteren zeigte sich, dass das Gen aufgrund der *EcoRI*-Spaltung nur noch eine Größe von 626

bp aufweist. Bakteriensuspensionen des *N. meningitidis* Stammes MC58, sowie dessen kapsellose Mutante MC58 *siaD* wurden mit dem Plasmid prfaFKanBK transformiert und die erhaltenen Klone auf mit Kanamycin angereicherten GC-Agar Platten ausplattiert. Durch eine PCR mit der Primerkombination PUCK4F/rfaFpQER konnten Transformanten detektiert werden, bei denen der Leserahmen des Gens durch die Insertion der Kanamycinkassette unterbrochen war. Die korrekte Insertion des Selektionsmarkers wurde durch Southern-Blot, Sequenzierung und RT-PCR bestimmt.

4.2.1.2 Überprüfung der chromosomalen Insertion der Kanamycinkassette in den ORF NMB1527

Zur Verifizierung der korrekten Insertion der Antibiotikumkassette wurde eine Southern-Blot Analyse durchgeführt. Die chromosomale DNA der Mutanten, sowie deren Ausgangsstämme wurde mit *SfuI* verdaut und mit einer für den ORF NMB1527 spezifischen Sonde, die durch eine PCR mit den Primern NMB rfaFpTLF und rfaFpQER generiert worden war, hybridisiert. Das hybridisierte *SfuI*-Fragment umfasste bei den Ausgangsstämmen MC58 und MC58 *siaD* 4453 bp. Aufgrund der chromosomalen Insertion der Kassette wurde ein Fragment von 5350 bp bei den Mutanten detektiert. Dies konnte im Southern Blot für alle Klone bestätigt werden (Abb. 4.2.1.2.).

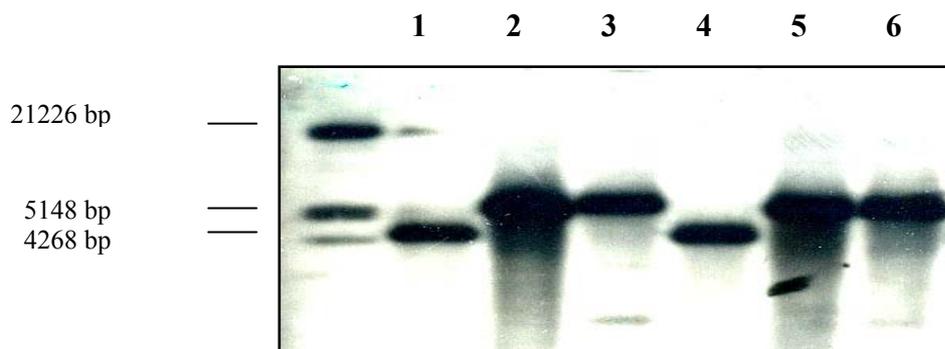


Abb. 4.2.1.2.: Southern Blot chromosomaler DNA nach *SfuI*-Restriktion von MC58 WT (1), Klon 6 (2), Klon 8 (3), MC58 *siaD* (4), Klon 1 (5), Klon 2 (6).

Zusätzlich wurden Amplifikate chromosomaler DNA mit den Primern rfaFpTLF und rfaFpQER generiert und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte die korrekte Insertion der Kanamycinkassette in den ORF NMB1527.

4.2.1.3 Bestätigung der Deletion mittels RT-PCR

Die RNA der Mutanten sowie der Ausgangsstämme wurden isoliert und jeweils 2 µg mit *random* Primern in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente als *Template* für eine PCR mit den für die Genamplifikation eingesetzten spezifischen *Primern* rfaFpTLF und rfaFpQER. Das Plasmid prfaFBK und die genomische DNA des Stammes MC58 dienen als positiv Kontrolle. Bei erfolgreicher Deletion des Gens wird kein spezifisches Produkt bei den Mutanten detektiert (Abb. 4.2.1.3.).

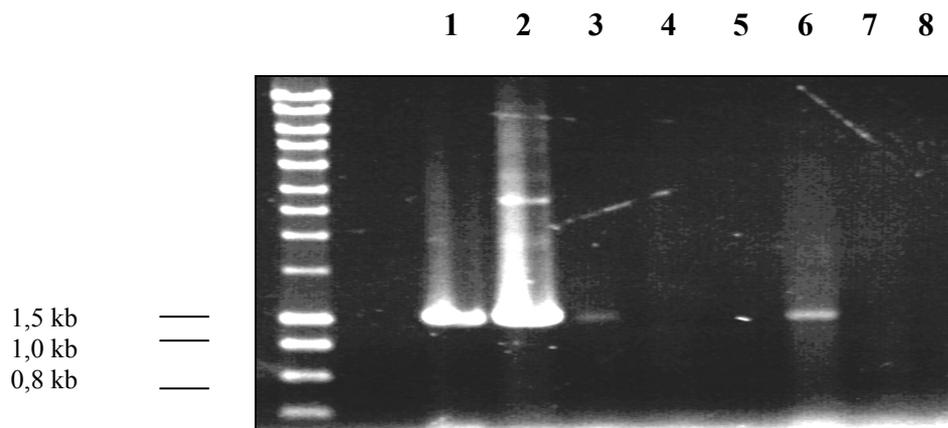


Abb. 4.2.1.3.: RT-PCR von MC58 WT gen. DNA (1), prfaFBK (2), MC58 WT (3), Klon 6 (4), Klon 8 (5), MC58 *siaD* (6), Klon 1 (7), Klon 2 (8)

Die konstruierten Mutanten wurden als MC58 *rfaF* bzw. MC58 *siaD*, *rfaF* bezeichnet.

4.2.1.4 Überprüfung der nach Zellkontakt detektierten Induktion von *rfaF* mittels RT-PCR

Das konstruierte Plasmid prfaFBK fungierte als interner Standard für die Überprüfung der Mikroarraydaten. RNA zweier unterschiedlicher Arrayexperimente wurde in cDNA umgeschrieben und mittels *Light Cycler* PCR amplifiziert. Unabhängig dazu wurde RNA des bekapselten Wildtyps nach Interaktion mit dem betreffenden Zelltyp isoliert und ebenfalls umgeschrieben. Die so gewonnenen RT-PCR Daten konnten die im Mikroarray beobachtete differentielle Regulierung von *rfaF* für den Stamm MC58 *siaD* in beiden Zellkultursystemen bestätigen. Bei dem bekapselten Stamm konnte eine Induktion nur nach Zellkontakt mit HBMEC Zellen detektiert werden. Zur Normalisierung der erhöhten Transkriptionswerte diente wiederum der ORF NMB2052.

Zelllinie	MC58 <i>siaD</i>		MC58 WT	
	Array	RT-PCR	Array	RT-PCR
HEp-2	2,1	2,0	n.b.	1,05
HBMEC	1,6	3,0	n.b.	1,6

Tab. 4.2.1.4. Vergleich der im Array detektierten Induktion von NMB1527 mit RT-PCR.
n.b.: nicht bestimmt

4.2.1.5 Analyse der Oberflächenstrukturen der Stämme MC58 *rfaF* und MC58 *siaD*, *rfaF*

Alle Stämme wurden phänotypisch auf die Expression der Oberflächenproteine Pili, Opa und Opc mittels Western Blot Analyse untersucht. Alle Mutanten ließen sich Opa, Opc und Pili positiv darstellen. Mittels des Opa Antikörpers konnten zwei verschiedene Banden (25 kDa und zwischen 20 und 15 kDa) nachwiesen werden.

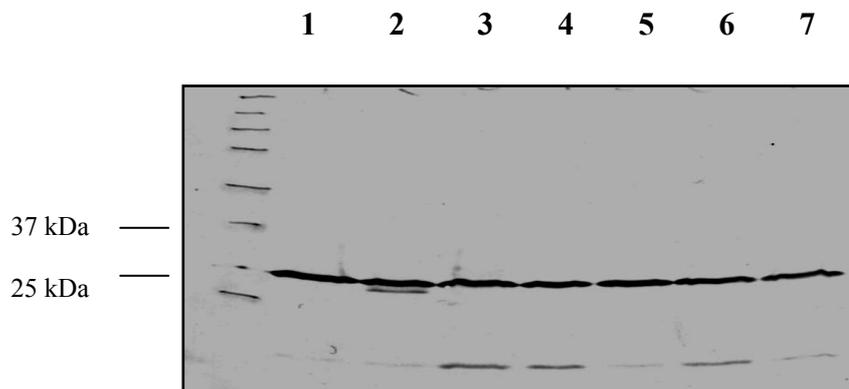


Abb. 4.2.1.5.1.: Opa Expression von MC58 *opc* (1), MC58 WT (2), MC58 *rfaF* (Klon 6) (3), MC58 *rfaF* (Klon 8) (4), MC58 *siaD* (5), MC58 *siaD*, *rfaF* (Klon 1) (6), MC58 *siaD*, *rfaF* (Klon 2) (7)

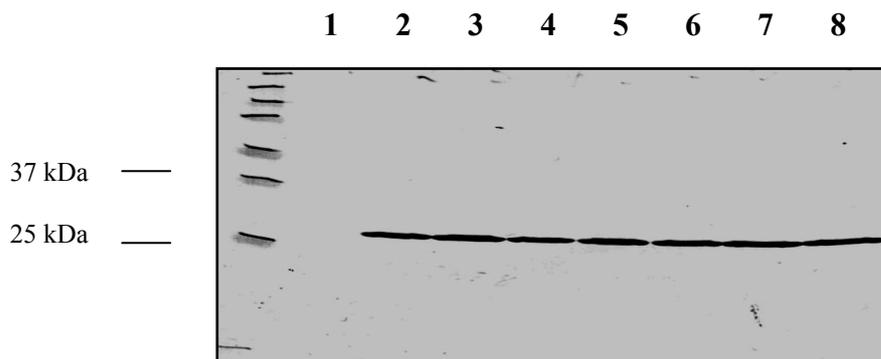


Abb. 4.2.1.5.2.: Darstellung der Expression des Oberflächenproteins Opc mittels Western Blot. MC58 *opc* (1), MC58 WT (2), MC58 *rfaF* (Klon 6) (3), MC58 *rfaF* (Klon 8) (4), MC58 *siaD* (5), MC58 *siaD, rfaF* (Klon 1) (6), MC58 *siaD, rfaF* (Klon 2) (7), MC58 *siaD* (8).

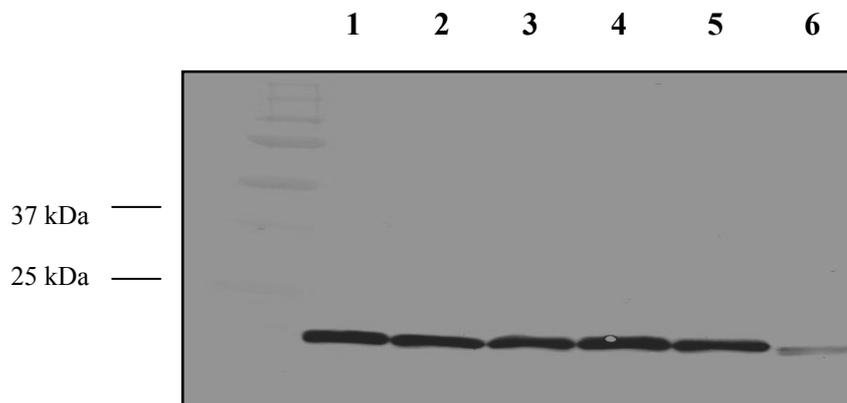


Abb. 4.2.1.5.3.: Nachweis der Pili Expression von MC58 WT (1), MC58 *rfaF* (Klon 6) (2), MC58 *rfaF* (Klon 8) (3), MC58 *siaD, rfaF* (Klon 1) (4), MC58 *siaD, rfaF* (Klon 2) (5) und MC58 *siaD* (6)

4.2.1.6 Funktionelle Analyse der LPS-Struktur von MC58 *rfaF* und MC58 *siaD, rfaF*

Das LPS der Stämme MC58 *rfaF* und MC58 *siaD, rfaF* sowie deren Ausgangsstämme wurde mittels Proteinase K-Verdau präpariert. Vergleiche der LPS-Profile der *rfaF*-Mutanten mit einer genetisch definierten *pgm*-Mutante zeigten eine einzelne Bande, die beträchtlich schneller wandert als die des Referenzstammes. Das Gen *pgm* kodiert für eine Phosphoglucomutase und ist für die Umwandlung von Glucose-6-phosphat in Glucose-1-phosphat, einem essentiellen Kohlenhydrat der UDP-Glukose- und UDP-Galaktose-Synthese, verantwortlich. Die Deletion dieses Gens resultiert in einem stark verkürzten Oligosaccharid folgender Struktur: HEp-2(GlcNAc)PEA→KDO₂→Lipid A (Zhou *et al.*, 1994). Vergleicht man die *rfaF*-Mutanten mit diesem Kontrollstamm, kann von einer weiteren Verkürzung des LPS ausgegangen werden.

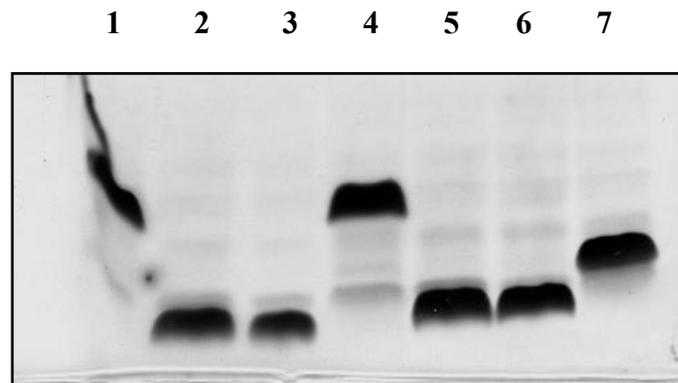


Abb. 4.2.1.6.: LPS Strukturen von *N. meningitidis* MC58 (1), MC58 *siaD* (4) und den genetisch definierten LOS-Mutanten MC58 *rfaF* (Klon 6) (2), MC58 *rfaF* (Klon 8) (3), MC58 *siaD*, *rfaF* (Klon 1) (5), MC58 *siaD*, *rfaF* (Klon 2) (6), MC58 *pgm* (7). Das isolierte LPS wurde mittels Tricin SDS-PAGE Analyse getrennt und durch Silberfärbung visualisiert.

4.2.1.7 Kapselpolysaccharid-ELISA der Stämme MC58 *rfaF* und MC58 *siaD*, *rfaF*

Die Mutanten wurden im Kapselpolysaccharid-ELISA mit dem gegen das Kapselpolysaccharid der Serogruppe B gerichteten Antikörper mAB735 auf ihre Fähigkeit zur Kapselexpression untersucht. Es zeigte sich, dass die Deletion des *rfaF*-Gens die Kapselexpression der bekapselten Mutanten nicht beeinflusst. Weiterhin konnte der kapsellose Phänotyp für die *siaD*, *rfaF*-Mutanten bestätigt werden.

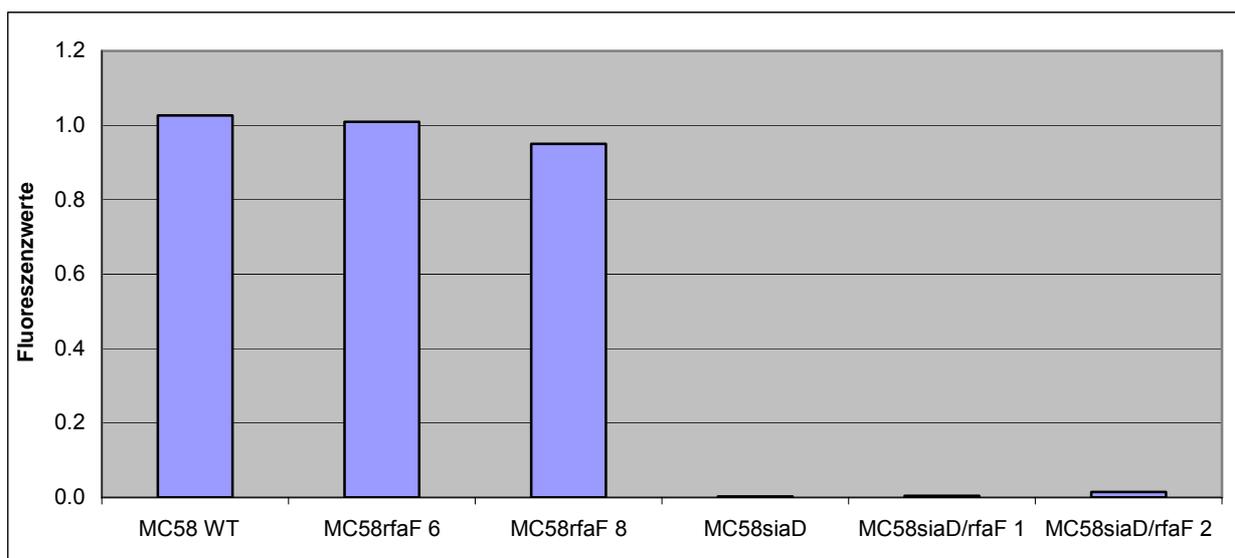


Abb. 4.2.1.7.: Kapselpolysaccharid-ELISA der Stämme MC58, MC58 *rfaF* (Klon 6), MC58 *rfaF* (Klon 8), sowie MC58 *siaD*, MC58 *siaD*, *rfaF* (Klon 1) und MC58 *siaD*, *rfaF* (Klon 2) mit dem Antikörper mAB 735. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei 410 nm.

4.2.1.8 Die Bedeutung von *rfaF* für die Vermittlung der Serumresistenz

Das Komplementsystem stellt einen der wichtigsten Mechanismen zur Verteidigung gegen Meningokokken in der Blutbahn dar. Es setzt sich aus vielen verschiedenen Plasmaproteinen zusammen. Man unterscheidet drei Wege der Komplementaktivierung. Beim klassischen Weg geschieht dies durch eine Antikörperbindung an Antigene. Der Lektin-Weg wird durch die Bindung von einem mannanbindenden Serumlektin an mannosehaltige Proteine oder Kohlenhydrate auf Bakterien oder Viren ausgelöst. Der alternative Weg schließlich kann ausgelöst werden, wenn eine spontan aktivierte Komplementkomponente an die Oberfläche eines Pathogens bindet. Die frühen Vorgänge der Komplementaktivierung bestehen aus einer Reihe von proteolytischen Spaltungen, bei denen ein inaktives Vorläuferprotein gespalten wird. Dabei bildet sich ein großes aktives Fragment, das an der Oberfläche des Pathogens bindet und an der nächsten Spaltung beteiligt ist, und ein kleines Peptidfragment, das von der Zelle freigesetzt wird und oft die Entzündungsreaktion bewirkt. Die frühen Vorgänge enden mit einer Protease (C3-Konvertase), die kovalent an die Pathogenoberfläche gebunden ist. Diese spaltet spezifisch die Komplementkomponente C3 in C3a und C3b. Dieses Ereignis stellt einen Angelpunkt der Komplementaktivierung dar bei denen die Haupteffektoraktivitäten des Komplements entstehen. Eine entscheidende Rolle spielt dabei das an die Bakterienoberfläche gebundene C3b-Molekül. C3b sowie die davon abstammenden Fragmente sind die wichtigsten Opsonine des Komplementsystems. Sie binden an Komplementrezeptoren auf den Phagozyten und erleichtern die Aufnahme des Pathogens. C3b bildet darüber hinaus noch eine C5-Konvertase. Diese initiiert die späten Ereignisse der Komplementaktivierung an deren Ende die Bildung eines membranangreifenden Komplexes aus sich zusammenlagernden terminalen Komplementkomponenten steht. Dieser Komplex bildet eine Pore in die Membran des Erregers, was zu dessen Tod führen kann. C3a und C5a lösen lokale Entzündungsreaktionen aus, indem sie Flüssigkeit, Zellen und Proteine an die Stelle der Infektion locken. Schließlich initiiert die Bindung von C3b den alternativen Weg und verstärkt so die Komplementaktivierung.

Meningokokken haben im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, um sich gegen diese bakterizide Aktivität des humanem Serums zu schützen. So sind Meningokokkenisolate aus der Blutbahn bekapselt und ihr LOS-Immunotyp ist terminal sialysiert. Die Kapsel verhindert unter anderen die korrekte Insertion des terminalen membranangreifenden Komplex in die Meningokokken-Membran. Neben der Kapsel stellt das Lipooligosaccharid die zweite wichtige Komponente bei der Ausprägung der Serumresistenz von Meningokokken dar. Mutationen in der LOS Struktur führen zu einer veränderten Toleranz gegenüber humanem Serum. So sind bereits eine Vielzahl von LPS-Mutanten beschrieben, die einen serumsensiblen Phänotyp aufweisen (Kahler *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1997, 1999).

Basierend auf je drei unabhängig durchgeführten Bakterizidie-Tests zeigten die beiden *rfaF*-Mutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm eine signifikant erhöhte Serumsensibilität in 40% NHS ($p < 0.02$ für Klon 8 vs. WT und $p < 0.01$ für Klon 6 vs. WT). So wurde der Klon 6 in 2 von 3 Experimenten komplett abgetötet. Die Ermittlung der Signifikanz für die einzelnen Datenreihen erfolgte mittels dem Student'schen t-Test. Die Versuche wurden mit einem Serumpool, bestehend aus 10 Spendern, durchgeführt. In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich die durch die Deletion des *rfaF*-Gens bedingte Verkürzung der Lipooligosaccharidstruktur negativ auf die Überlebensfähigkeit der Bakterien in humanem Serum auswirkt. Die Expression eines verkürzten Lipooligosaccharids als Resultat der *rfaF*-

Deletion führt somit zu einer gesteigerten Sensibilität gegenüber der Komplement vermittelten Zelllyse.

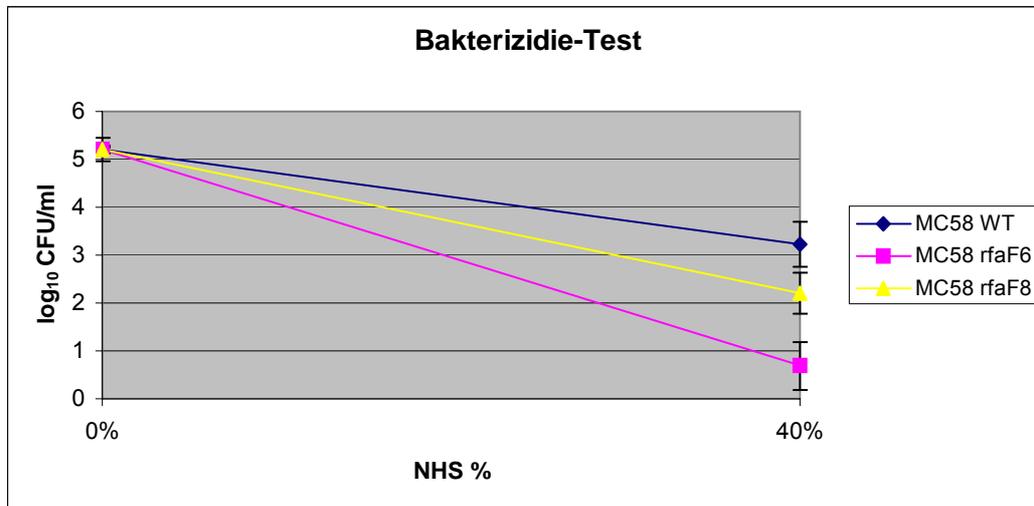


Abb. 4.2.1.8.: Bakterizidie-Tests. Bakterien (10^5 /ml) des bekapselten Ausgangsstammes MC58 und der beiden *rfaF*-Mutanten wurden in 40% humanem Serum für 1 h bei 37°C inkubiert. Das Diagramm zeigt die Daten aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

4.2.1.9 Testung der Stämme MC58 *rfaF* und MC58 *siaD*, *rfaF* im Zellkulturmodell

Die konstruierten Mutanten wurden im Zellkulturmodellsystem auf ihr Adhärenz- und Invasionsvermögen untersucht. Für die Infektionsversuche wurde der kapsel exprimierenden Stamm MC58 *rfaF* (Klon 6) und die kapsellose Mutante MC58 *siaD*, *rfaF* (Klon 1) verwendet. Ein konfluenter Zellrasen von 1×10^6 Zellen/ml wurde mit 1×10^7 Bakterien/ml beimpft. HEp-2 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium allein bzw. versetzt mit 10% FCS infiziert. Die Infektion der HBMEC Zellen dagegen wurde in RPMI Medium + 10% FCS bzw. 10% HS durchgeführt.

Nach 6 h Infektionszeit waren $2,8 \times 10^6 (\pm 1,7 \times 10^6)$ Bakterien des bekapselten Referenzstammes MC58 an HEp-2 Zellen assoziiert. Nur ein geringer Prozentsatz davon (0,003%) war intrazellulär lokalisiert. Dies entspricht einem Wert von $8,7 \times 10^1 (\pm 4,3 \times 10^1)$ Bakterien. Der Verlust eines funktionsfähigen *rfaF*-Gens bewirkte einen Anstieg der Adhärenz um das 4-fache auf $1 \times 10^7 (\pm 6,7 \times 10^6)$ Bakterien ($p = <0,05$). Die durchschnittliche invasive Kapazität erhöhte sich um den Faktor 40 auf $3,8 \times 10^3 (\pm 1,9 \times 10^3)$ Bakterien ($p = <0,01$). Die Zugabe von FCS induziert einen weiteren Anstieg der bakteriellen Aufnahme. Im Gegensatz zu den bekapselten Stämmen zeigte die kapseldefiziente *rfaF*-Mutante nur eine geringfügige Steigerung der Invasion, die Adhärenz blieb davon unbeeinflusst. So konnte lediglich ein Anstieg der Invasionswerte von $4,5 \times 10^4 (\pm 4,1 \times 10^4)$ (MC58 *siaD*) Bakterien auf $1,3 \times 10^5 (\pm 4,3 \times 10^4)$ Bakterien (MC58 *siaD*, *rfaF*) in reinen RPMI Medium beobachtet werden. Dies entspricht einer Steigerung um den Faktor 2,9.

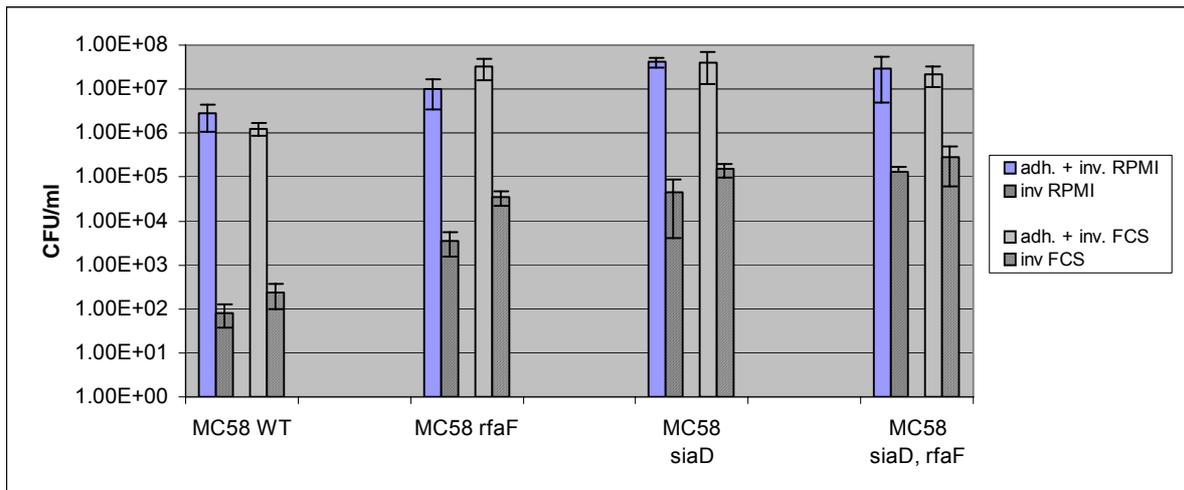


Abb. 4.2.1.9.1.: Darstellung der Adhärenz und Invasion der Stämme MC58, MC58 *rfaF*, MC58 *siaD* und MC58 *siaD, rfaF* nach Kontakt mit HEP-2 Zellen. Die Infektionszeit betrug 6 h.

Bei der Interaktion der bekapselten Stämme mit der Endothelzelllinie HBMEC adhärten in RPMI Medium + 10% FCS durchschnittlich $3,8 \times 10^6 (\pm 9,9 \times 10^5)$ Bakterien des Ausgangsstamms MC58 und $9,34 \times 10^6 (\pm 3 \times 10^6)$ Erreger der bekapselten *rfaF*-Mutante. Die Adhärenz betrug 1,2% bei den Wildtyp und erhöhte sich bei der Mutante auf 7,2%. Bei der kapsellosen *rfaF*-Mutante konnte dagegen eine leichte Verringerung der Adhärenz beobachtet werden. Gleiches galt für die Invasion.

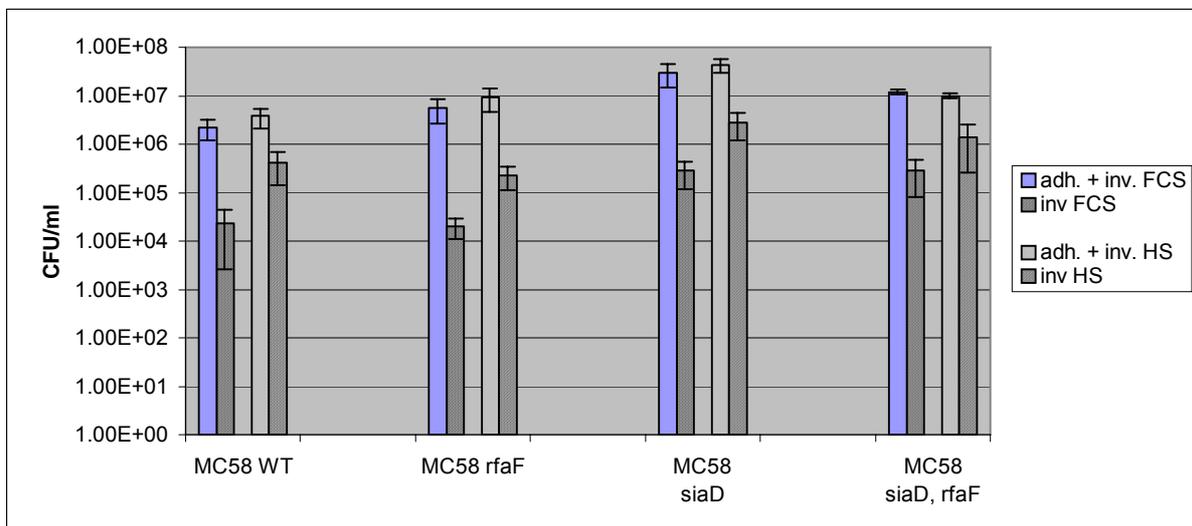


Abb. 4.2.1.9.2.: Darstellung der Adhärenz und Invasion der Stämme MC58, MC58 *rfaF*, MC58 *siaD* und MC58 *siaD, rfaF* nach Kontakt mit HBMEC Zellen. Die Infektionszeit betrug 6 h.

4.2.1.10 Replikation der *rfaF* negativen Stämme in der Gegenwart von humanen Zellen

Bei den Infektionsversuchen mit HEp-2 und HBMEC Zellen zeigte sich, dass sowohl die Kapsel exprimierende *rfaF*-Mutante, als der kapsellose Stamm MC58 *siaD*, *rfaF* über eine geringere Replikationsrate verfügen als die Ausgangsstämme MC58 und MC58 *siaD*.

Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert. Nach einer Infektionszeit von 6 h wurde der Überstand abgenommen und in geeigneten Verdünnungen ausplattiert.

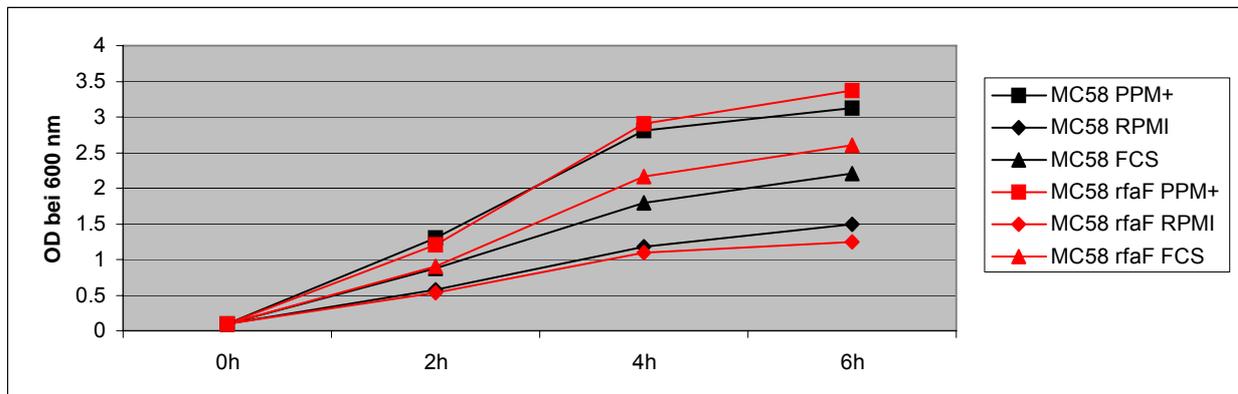
Tabelle 4.2.1.10. gibt einen Überblick über die Anzahl der detektierten Bakterien im zellulären Überstand nach 6 h Infektionszeit.

Stamm	HEp-2		HBMEC	
	RPMI	FCS	FCS	HS
MC58 WT	$1,9 \times 10^8 \pm 3,3 \times 10^7$	$2,5 \times 10^8 \pm 7,7 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8 \pm 3,6 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8 \pm 4,3 \times 10^7$
MC58 <i>rfaF</i>	$1,4 \times 10^7 \pm 3,6 \times 10^6$	$8,5 \times 10^7 \pm 4,4 \times 10^7$	$7,3 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7 \pm 1,2 \times 10^7$
MC58 <i>siaD</i>	$1,4 \times 10^7 \pm 5,8 \times 10^6$	$3,1 \times 10^7 \pm 1,9 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^7$
MC58 <i>siaD</i> , <i>rfaF</i>	$2,3 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6 \pm 2,9 \times 10^6$	$8,9 \times 10^6 \pm 6,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7 \pm 6,0 \times 10^6$

Tab. 4.2.1.10.: Replikation der Stämme MC58, MC58 *rfaF*, MC58 *siaD* und MC58 *siaD*, *rfaF* in der Anwesenheit von HEp-2 und HBMEC Zellen. Die Infektionsdauer betrug 6 h.

So verminderte sich die Anzahl der Bakterien im reinen RPMI Überstand bei der Interaktion des Stamms MC58 *rfaF* mit HEp-2 um den Faktor 13 und bei der kapseldefizienten *rfaF*-Mutante um den Faktor 6. Die Zugabe von FCS wirkte sich positiv auf die Replikation aus. Bei der Interaktion mit HBMEC Zellen konnte ebenfalls eine verminderte Anzahl von Erregern der bekapselten, sowie der kapsellosen *rfaF*-Mutante gegenüber den Ausgangsstämmen beobachtet werden. Der Unterschied war allerdings nicht so ausgeprägt wie in der Gegenwart der Epithelzelllinie HEp-2. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass eine verminderte Teilungsrate der *rfaF*-Mutanten für die beobachtete Abnahme der Bakterien im Überstand verantwortlich ist, wurde die Wachstumskapazität der Bakterien in unterschiedlichen Medien in der Abwesenheit von Zellen überprüft. Dazu wurden die Stämme in supplementierten PPM, sowie in reinen RPMI Medium und RPMI Medium versetzt mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, eingerieben und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Stämme auf eine OD = 0,1 (1×10^8 Bakterien/ml) eingestellt. Jeweils nach 2, 4 und 6 h wurde die OD gemessen und eine Wachstumskinetik erstellt. Alle 4 Stämme wiesen ihre höchste Wachstumskapazität in supplementierten PPM Medium auf. Die Mutation des *rfaF*-Gens beeinflusste die Vermehrungsrate der Bakterien in keinsten Weise. Einen im Gegensatz zu PPM⁺ Medium schwach wachstumsfördernden Effekt wies reines RPMI Medium auf. Erst die Zugabe von von FCS führte zu einer Steigerung der Wachstumsrate.

A



B

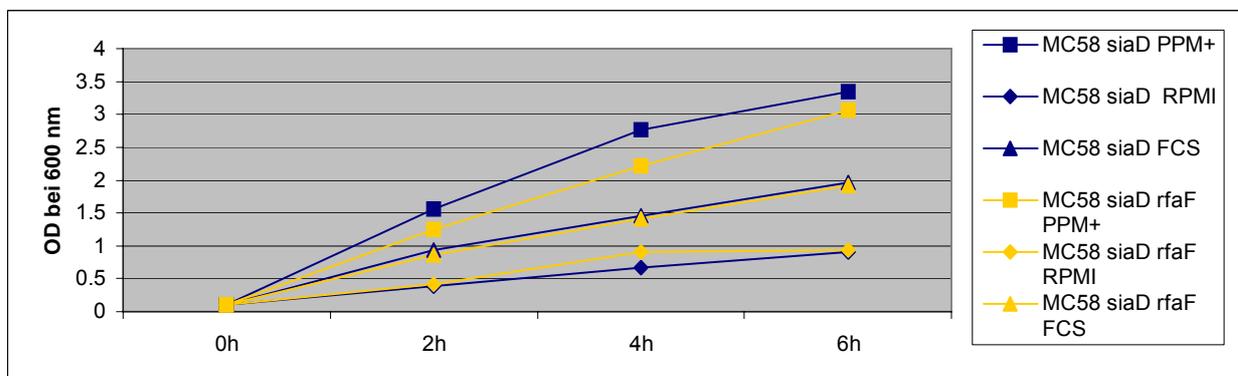


Abb. 4.2.1.10.: Wachstumskinetik der *rfaF*-Mutanten im Vergleich zu ihren Ausgangstämmen in verschiedenen Medien. Die Messung der OD erfolgte jeweils nach 2 h, 4 h und 6 h.

A Wachstumskinetik der Stämme MC58 WT und MC58 *rfaF*

B Wachstumskinetik der Stämme MC58 *siaD* und MC58 *siaD, rfaF*.

4.2.1.11 Konstruktion von *opc*, *rfaF* defizienten Mutanten des Serogruppe B Stammes MC58

Die vorangehenden Resultate zeigten, dass sich die Verkürzung der Lipooligosaccharidkette nicht negativ auf die zelluläre Interaktion mit der Wirtszelle auswirkt. In einem zweiten Schritt wurden *opc* negative *rfaF*-Mutanten konstruiert, um den potentiellen Einfluss zu minimieren, den andere Oberflächenstrukturen, wie Pili und Außenmembranproteine, auf das Infektionspotential der *rfaF*-Mutanten haben. So zeichnen sich *opa* negative LPS-Mutanten (Δ lgtA; Δ lgtD; Δ lgtA, Δ lgtE) bei Gonokokken durch eine Abnahme der Invasion aus (Song *et al.*, 2000). Um die Rolle des *rfaF*-Gens bei der zellulären Interaktion in der Abwesenheit von Opc zu untersuchen, wurde daher in einer *opc* defizienten Mutante zusätzlich das *rfaF*-Gen deletiert.

Als Ausgangskonstrukt für die Klonierung diente das Plasmid prfaFBK. Darin erfolgte der Einbau einer Spectinomycin – Resistenzkassette aus dem Plasmid pHP45 Ω in die im Gen

lokalisierte *EcoRI*-Schnittstelle. Mehrere Klone des daraus resultierenden Plasmids *prfaFSpecBK* wurden sequenziert.

Die Sequenzierung bestätigte die Insertion der Kasette in Leserichtung zum vorhandenen ORF NMB1527. Mit diesem Vektor wurden Meningokokken des *opc* negativen Stamms MC58 *opc* transformiert (Unkmeir *et al.*, 2002) und die erhaltenen Klone auf mit Spectinomycin angereicherten GC-Agar Platten ausplattiert. Parallel dazu wurde auch der kapseldefiziente *opc* negative Stamm MC58 *siaD*, *opc* transformiert. Durch eine PCR mit der Primerkombination *smr-fwd/rfaFpQER* bzw. *smr-rev/rfaFpQER* konnten Transformanden detektiert werden, bei denen der Leserahmen des Gens durch die Insertion der Spectinomycinkasette unterbrochen war. Die korrekte Insertion des Selektionmarkers wurde durch Southern-Blot und Sequenzierung bestimmt. Amplifikate chromosomaler DNA wurden mit den Primern *rfaFpTLF* und *rfaFpQER* generiert und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte die korrekte Insertion der Spectinomycinkasette in den ORF NMB1527.

4.2.1.12 Genomische Analyse der *opc* negativen *rfaF*-Mutanten mittels Southern-Blot

Die chromosomale DNA der Mutanten, sowie deren Ausgangsstämme wurde, wie bereits bei den anderen *rfaF*-Mutanten beschrieben (siehe 4.2.2.1.), mit *SfiI* verdaut und mit einer für den ORF NMB1527 spezifischen Sonde hybridisiert. Die detektierte Verschiebung im Bandenmuster lässt auf eine korrekte Insertion der Spectinomycinkasette schließen.

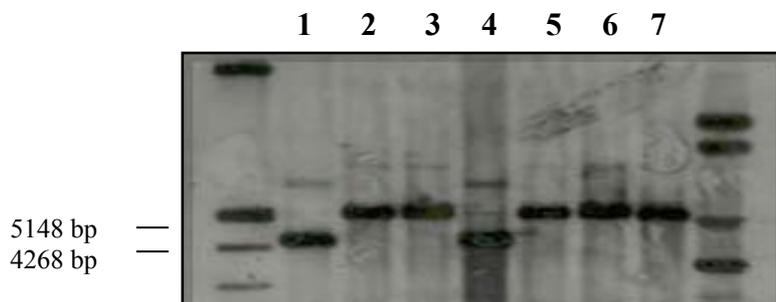


Abb. 4.2.2.12.: Southern Blot chromosomaler DNA nach *SfiI*-Restriktionsverdau von MC58 *opc* (1), Klon 5 (2), Klon 6 (3), MC58 *siaD*, *opc* (4), Klon 3 (5), Klon 7 (6), Klon 9 (7).

Die konstruierten Mutanten wurden mit MC58 *opc*, *rfaF* bzw. MC58 *siaD*, *opc*, *rfaF* bezeichnet.

4.2.1.13 Analyse der Oberflächenstrukturen der *opc* negativen Stämme

Die in der vorliegenden Studie analysierten *rfaF*-Mutanten wurden vor ihrer Verwendung im Infektionsversuch mittels verschiedener gegen bestimmte bakterielle Oberflächenepitope gerichtete Antikörper (Opa, Opc und Pili) auf deren Expression im Western Blot untersucht. Alle getesteten Stämme ließen sich im Western Blot positiv auf die Expression von Pili und Opa darstellen. Dagegen konnte das Opc-Protein nicht nachgewiesen werden.

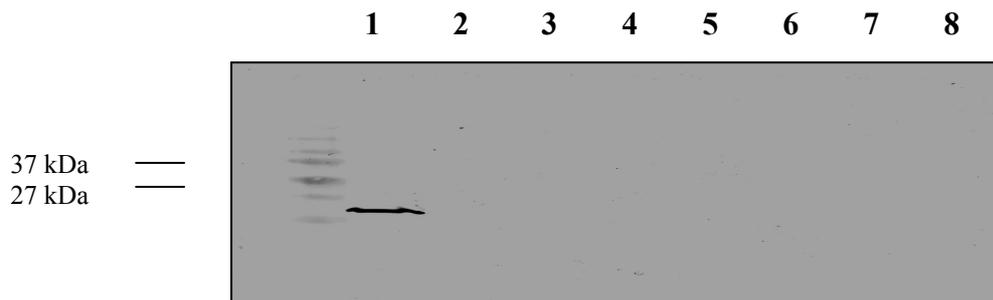


Abb. 4.2.1.13.: Darstellung der Expression des Oberflächenproteins Opc mittels Western Blot MC58 WT (1), MC58 *opc* (2), MC58 *opc*, *rfaF* (Klon 5) (3), MC58 *opc*, *rfaF* (Klon 6) (4), MC58 *siaD*, *opc* (5), MC58 *siaD*, *opc*, *rfaF* (Klon 3) (6), MC58 *siaD*, *opc*, *rfaF* (Klon 7) (7), MC58 *siaD*, *opc*, *rfaF* (Klon 9) (8)

4.2.1.14 Funktionelle Analyse der LOS-Struktur der *opc* negativen Stämme

Die konstruierten Defektmutanten wurden auf ihre Eigenschaft zur Expression eines verkürzten Lipooligosaccharids untersucht. Die Vorgehensweise erfolgte analog, wie für die bereits beschriebenen *rfaF*-Mutanten. Aufgrund der Vergleiche der LPS-Profile der *rfaF*-Mutanten mit geeigneten Referenzstämmen zeigte sich, dass der Phänotyp der Mutanten ein stark verkürztes LOS exprimiert.

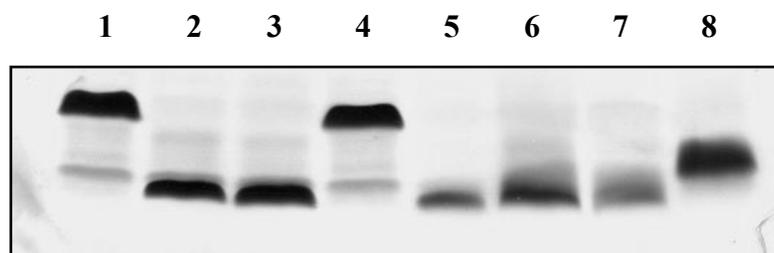


Abb. 4.2.1.14.: LPS Profil von MC58 *opc* (1), MC58 *opc*, *rfaF* (Klon 5) (2) MC58 *opc*, *rfaF* (Klon 6) (3), MC58 *siaD*, *opc* (4), MC58 *siaD*, *opc*, *rfaF* (Klon 3) (5), MC58 *siaD*, *opc*, *rfaF* (Klon 7) (6), MC58 *siaD*, *opc*, *rfaF* (Klon 9) (7) und MC58 *pgm* (8).

Das isolierte LPS wurde mittels Tricin SDS-PAGE Analyse getrennt und durch Silberfärbung visualisiert.

4.2.1.15 Testung der *opc*, *rfaF* negativen Stämme im Zellkulturmodell

Die *opc*, *rfaF* defekten Mutanten sowie die dazugehörigen Referenzstämme wurden auf ihre Fähigkeit zur Adhärenz und Invasion im HBMEC Zellkulturmodell untersucht.

Der Verlust eines funktionsfähigen *rfaF*-Gens wirkte sich bei der kapsellosen Mutante negativ auf die Adhärenz aus. Desweiteren war die Internalisierungsrate aller *opc* negativen *rfaF*-Mutanten geringer als die der Ausgangsstämme. So wies die bekapselte Mutante *opc*, *rfaF* im Vergleich zu dem Ausgangstamm MC58 *opc* eine signifikante oder nahezu signifikante Abnahme der Invasion in allen drei Medien auf ($p < 0,05$ in RPMI; $p < 0,05$ in 10% FCS und $p = 0,056$ in 10% HS). Gleiches konnte für die kapsellose *opc*, *rfaF*-Mutante beobachtet werden. Die Infektionsversuche belegen somit, dass der Lipooligosaccharidanteil in der *Opc* – unabhängigen Invasion in HBMEC Zellen involviert ist.

MC58	MC58 <i>opc</i>	MC58 <i>opc</i> , <i>rfaF</i>	MC58 <i>siaD</i> , <i>opc</i>	MC58 <i>siaD</i> , <i>opc</i> , <i>rfaF</i>
RPMI				
Adhärenz	$5,8 \times 10^6 \pm 3,9 \times 10^6$	$9,0 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7 \pm 7,5 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6 \pm 2,2 \times 10^6^*$
Invasion	$2,0 \times 10^3 \pm 1,1 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2 \pm 2,0 \times 10^2^*$	$3,2 \times 10^4 \pm 1,7 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3 \pm 4,0 \times 10^2^*$
FCS				
Adhärenz	$5,3 \times 10^6 \pm 3,9 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6 \pm 2,9 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7 \pm 4,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^6^*$
Invasion	$7,8 \times 10^3 \pm 4,8 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2 \pm 3,0 \times 10^2^*$	$4,8 \times 10^4 \pm 2,7 \times 10^4$	$5,7 \times 10^3 \pm 2,6 \times 10^3^*$
HS				
Adhärenz	$6,9 \times 10^6 \pm 4,2 \times 10^6$	$7,3 \times 10^6 \pm 5,8 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7 \pm 2,3 \times 10^7$	$2,1 \times 10^6 \pm 6,0 \times 10^5^*$
Invasion	$1,3 \times 10^4 \pm 3,5 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3 \pm 1,6 \times 10^3$	$7,6 \times 10^4 \pm 5,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4 \pm 9,4 \times 10^3$

Tab. 4.2.1.15.1.: Adhärenz und Invasionswerte der *opc*, *rfaF* negativen Stämme nach Kontakt mit HBMEC Zellen, *p-Wert = $< 0,05$. Die Infektionszeit betrug 6 h.

Parallel dazu wurden die Stämme auch im HEP-2 Zellkulturmodell auf ihre Fähigkeit zur Adhärenz und Invasion untersucht. Im Gegensatz zu der Interaktion mit HBMEC Zellen wirkte sich die *rfaF*-Mutation nicht negativ auf die zelluläre Interaktion aus. Durch die Zugabe von FCS konnte ein positiver Effekt auf die Internalisierung beobachtet werden. Die Invasion erhöhte sich bei den bekapselten Stämmen um den Faktor 11 (MC58 *opc*) bzw. um den Faktor 28 (MC58 *opc*, *rfaF*). Auch bei den kapsellosen Stämmen zeigte sich eine Steigerung der bakteriellen Aufnahme in Gegenwart von FCS (MC58 *siaD*, *opc* um den Faktor 7 und MC58 *siaD*, *opc*, *rfaF* um den Faktor 5). Die Adhärenz blieb jedoch unbeeinflusst.

MC58	MC58 <i>opc</i>	MC58 <i>opc, rfaF</i>	MC58 <i>siaD, opc</i>	MC58 <i>siaD, opc, rfaF</i>
RPMI Adhärenz Invasion	$3,8 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^6$ $1,4 \times 10^2 \pm 5,9 \times 10^1$	$1,5 \times 10^6 \pm 2,3 \times 10^5$ $2,6 \times 10^2 \pm 1,6 \times 10^2$	$2,4 \times 10^7 \pm 6,1 \times 10^6$ $5,0 \times 10^3 \pm 3,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^7 \pm 4,7 \times 10^6$ $4,4 \times 10^3 \pm 2,7 \times 10^3$
FCS Adhärenz Invasion	$3,9 \times 10^6 \pm 2,8 \times 10^6$ $1,4 \times 10^3 \pm 8,6 \times 10^2$	$5,9 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^6$ $5,1 \times 10^3 \pm 2,9 \times 10^3$	$3,6 \times 10^7 \pm 6,0 \times 10^6$ $3,6 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^4$	$2,3 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^7$ $2,1 \times 10^4 \pm 5,5 \times 10^3$

Tab. 4.2.1.15.2.: Adhärenz und Invasionswerte der *opc, rfaF* negativen Stämme nach Kontakt mit HEP-2 Zellen. Die Infektionszeit betrug 6 h.

4.2.2 Charakterisierung des induzierten ORF's NMB1843

Der ORF NMB1843 kodiert für einen putativen Transkriptionsregulator aus der MarR-Familie. (Institute for genomic research: <http://www.tigr.org>). Diese Familie ist durch ein helix-turn-helix (HTH) Motiv charakterisiert über das die Bindung an die DNA erfolgt. Mitglieder der MarR-Familie sind in Systemen involviert, die zur Ausprägung eines Antibiotikaresistenten Phänotyps führen. Der ORF NMB1843 wurde durch Kontakt mit Endothelzellen induziert.

4.2.2.1 Klonierung des ORF's NMB1843

Das Gen wurde mittels PCR amplifiziert und überhängende 3'-Enden entfernt. Als *Template* diente chromosomale DNA des Stammes MC58. Das geglättete PCR-Produkt wurde dann in den mit *SmaI/Asp718* gespaltenen Vektor pTL1 kloniert. Dies führte zur Entstehung des Plasmids p1843BK. Die sich anschließende Sequenzierung des Plasmids bestätigte den Einbau eines 441 bp großen Fragmentes. Danach erfolgte der Einbau einer Kanamycin-Resistenzkassette aus dem Plasmid pUC4K in die im Gen lokalisierte *PinAI*-Schnittstelle (Pos. 202). Da keine dazu homologe Schnittstelle in dem Vektor pUC4K existierte, wurde die Kanamycinkassette mit *PstI* heraus gespalten, die überhängenden Enden geglättet und in die ebenfalls geglättete *PinAI*-Schnittstelle ligiert. Das daraus resultierende Plasmid p1843KanBK wurde dann sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte eine Insertion der Kassette in Leserichtung zum vorhandenen ORF NMB1843. Bakteriensuspensionen des *N. meningitidis* Stammes MC58, sowie dessen kapselloser Mutante MC58 *siaD* wurden dann mit dem Plasmid p1843KanBK transformiert und die erhaltenen Klone auf mit Kanamycin angereicherten GC-Agar Platten ausplattiert. Durch eine PCR mit der Primerkombination PUCK4F/NMB1843rev wurden Transformanden detektiert, bei denen der Leserahmen des Gens durch die Insertion der Kanamycinkassette unterbrochen war. Im Anschluss an die Mutagenese wurden die Mutanten phänotypisch auf die Expression der Oberflächenproteine

Pili, Opa und Opc untersucht. Alle getesteten Stämme ließen sich im Western Blot Pili, Opa und Opc positiv darstellen. Es konnte keine veränderte Expression festgestellt werden.

4.2.2.2 Überprüfung der chromosomalen Insertion der Kanamycinkassette in den ORF NMB1843

Die Bestätigung der korrekten Insertion der Anitbiotikumkassette erfolgte mittels Southern-Blot Analyse. Dazu wurde die chromosomale DNA der Mutanten, sowie deren Ausgangsstämme mit *DraI* verdaut und anschließend mit einer für den ORF NMB1843 spezifischen Sonde hybridisiert. Das hybridisierte *DraI*-Fragment umfasste 4052 bp. Die Insertion der Kassette konnte für alle Klone aufgrund der detektierten Verschiebung im Bandenmuster um 1220 bp bestätigt werden.

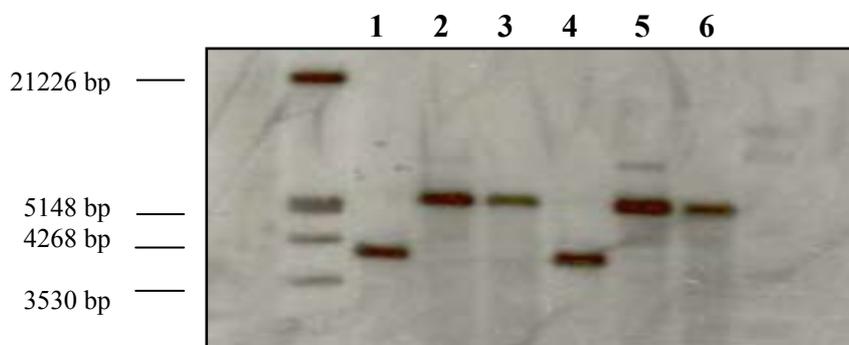


Abb. 4.2.2.2.: Southern Blot chromosomaler DNA von MC58 WT (1), Klon 3 (2), Klon 7 (3), MC58 *siaD* (4), Klon 2 (5), Klon 4 (6) nach *DraI*-Restriktionsverdau.

Zusätzlich wurden Amplifikate chromosomaler DNA mit den Primern NMB1843proFV und NMB1843rev generiert und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte nochmals die korrekte Insertion der Kanamycinkassette in den ORF NMB1843. Des Weiteren wurde mittels RT-PCR die Deletion des ORF's NMB1843 auch auf Transkriptionsebene bestätigt. Die konstruierten Mutanten wurden als Δ NMB1843 bzw. *siaD* Δ NMB1843 bezeichnet.

4.2.2.3 Überprüfung der nach Zellkontakt detektierten Induktion von NMB1843 mittels RT-PCR

Die im Array für den ORF NMB1843 ermittelten Daten wurden mittels *Light Cycler real time PCR* überprüft. Als interner Standard diente das Plasmid p1843BK. Die Vorgehensweise war analog, wie bereits für die *rfaF*-Mutanten beschrieben. Die gewonnenen RT-PCR Daten bestätigten die im Mikroarray beobachteten Regulierungen für den ORF NMB1843. Gleichzeitig konnte eine erhöhte transkriptionelle Aktivität dieses ORF's auch nach Kontakt mit Epithelzellen detektiert werden. Zur Normalisierung der erhöhten Transkriptionswerte diente wiederum der ORF NMB2052.

Zelllinie	MC58 <i>siaD</i>	
	Array	RT-PCR
HBMEC	1,6	2,9
HEp-2	1,5	1,6

Tab. 4.2.2.3.: Bestätigung der im Array detektierten Induktion von NMB1843 durch *real time* PCR.

4.2.2.4 Transkriptionale Aktivität von MC58 Δ NMB1843 vs. MC58WT

Mittels DNA-Chip Analyse können mögliche Gene, die unter der Kontrolle eines transkriptionellen Regulators stehen, identifiziert werden, da die Deletion des Regulatorproteins oftmals zu einem veränderten transkriptionellen Profil gegenüber dem Wildtypstamm führt (Barbosa und Levy, 2000). In einem nächsten Schritt wurde daher das transkriptionelle Profil von MC58 Δ NMB1843 im Vergleich zu dem Ausgangsstamm durch Mikroarrayhybridisierungen analysiert.

Kulturen von der *N. meningitidis* Mutante Δ NMB1843 Klon 3 wurden bis zum Erreichen der mittleren logarithmischen Wachstumsphase in supplementierten PPM Medium kultiviert und im Anschluss die RNA isoliert. Als Kontrolle dienten Bakterien des bekapselten Wildtyps. Fünf verschiedene Hybridisierungsexperimente mit jeweils einem Austausch der Farbstoffe (Experiment Cy5, Kontrolle Cy3) wurden durchgeführt. Zur besseren Verifizierung erfolgte zusätzlich noch eine Hybridisierung mit einem cDNA Slide

Insgesamt 39 detektierte Gene wiesen eine Regulierung auf, die möglicherweise auf die transkriptionelle Kontrolle des ORF's NMB1843 zurückzuführen ist. Davon waren 37 Gene induziert und 2 Gene reprimiert. Die hohe Anzahl der induzierten Gene ist ein eindeutiger Hinweis für eine Repressorfunktion von NMB1843. Tabelle 4.2.2.4. gibt einen Überblick über die Anzahl der differentiell regulierten Gene.

Eines der beiden herunterregulierten Gene ist der ORF NMB1843. Dieser Grad der Regulierung ist eine weitere Bestätigung für die Deletion dieses putativen Regulators. Des Weiteren wurden sieben virulenzassoziierte Gene detektiert, die unter anderen in der Detoxifizierung (*sodC*), sowie in der Toxinproduktion und Resistenz (NMB1779/NMB0497 und NMB1780/NMB0496) involviert sind. Ein weiteres hochreguliertes Virulenzgen stellt die IgaA1 Protease dar. Weiterhin wurde mit *nadA* ein putatives Adhäsion/Invasin als induziert detektiert. Ein Großteil der differentiell regulierten Gene, insgesamt 24, kodierten für hypothetische Proteine. Die restlichen differentiell regulierten Gene konnten anhand ihrer Funktion in folgende Gruppen einteilt werden: Gene für Transporter (*gluP*) und mögliche Membranproteine (NMB0863), Gene des allgemeinen Metabolismus (*metK*, *pgm*) und der Biosynthese (*bioF*), sowie Gene, die im Proteinabbau eine Rolle spielen (*clpB*).

Auffällig war die Detektion von Genen, die im Genom sehr eng beieinander lokalisiert sind (z.B: NMB0367, NMB0369 - NMB0372 bzw. NMB0861, NMB0863-NMB0865). Bei Genklustern, die in ihrer Anordnung und Orientierung in 2 oder mehr Genomen konserviert sind, ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass es sich um einen Operon handelt. Unter Verwendung einer Datenbank (<http://www.tigr.org/tigrscripts/operons/operons.cgi>) die auf einem von Ermolaeva und Kollegen entwickelten statischen Computerprogramm basiert, ließen sich Vorhersagen diesbezüglich treffen (Ermolaeva *et al.*, 2001). So beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass die beiden ORF's NMB1779/NMB1780 eine transkriptionelle Einheit bilden 68,85%. In den Genomen von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pasteurella multocida* PM70, *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933), *Escherichia coli* O157:H7 (VT2-Sakai), *Yersinia pestis* und *Ralstonia solanacearum* waren diese beiden Gene ebenfalls in der gleichen Richtung lokalisiert. Bei den anderen detektierten Genklustern handelt es sich nur mit geringer Wahrscheinlichkeit (16,13% für NMB0119/0120; NMB0520/0521; NMB1397/NMB1398 und 39,03% für NMB0863/0865) um einen Operon. Dazu homologe Genpaare existieren nur in dem Genom von *Neisseria meningitidis* Z2491.

Tab. 4.2.2.4.: Mögliche durch den ORF NMB1843 transkriptionell regulierte Gene

Die Gene, die für die Bestätigung der Arraydaten verwendet wurden sind unterstrichen und fett markiert. Der Regulator und nadA (NMB1994) sind farblich hervorgehoben.

Funktionale Kategorie	ORF – Nummer Serogruppe B	diff. Regulierung	STaBWN	Protein	Virulenzgen	ORF-Nummer Serogruppe A	Phasenvariabel
Regulator	NMB1843	0.4	0.1	Transkriptionsregulator MarR Familie	-	NMA0613	-
Biosynthese	NMB0472	1.6	0.5	8-amino-7-oxononate Synthase, bioF	-	NMA2013	-
Oberflächenstruktur	NMB1994	9.7	2.1	putatives Adhäsion/Invasin, nadA	+	keine	+
Metabolismus							
Zentraler Energie	NMB1799	1.9	1.0	S-adenosylmethionine Synthase, metK	-	NMA0663	-
	NMB0620/NMB1830	1.6	0.5	Phosphoglycolate Phosphatase, pgm	-	NMA1688	-
Transport	NMB0535	1.8	0.3	Glukose/Galaktose Transporter, gluP	-	NMA0714	-
	NMB1794	1.8	0.9	Citrate Transporter	-	NMA0668	-
Protein fate	NMB0700	1.7	0.5	IgA-spezifische Serin Endopeptidase	+	NMA0905	-
	NMB1472	1.6	0.8	ClpB protein, clpB	-	NMA1683	-
Zelluläre Prozesse							
Detoxification	NMB1398	1.8	0.5	Cu-Zn-Superoxide Dismutase, sodC	+	NMA1617	-
Toxin Produktion/	NMB1779/NMB0497	2.5	1.4	Hemolysin/Hemagglutinin related Protein	+	NMA0688	-
Toxin Resistenz	NMB1780/NMB0496	1.6	0.3	Hemolysin activation protein HecB, putative	+	NMA0687	-
Hypothetisch	NMB0119	1.7	1.0	hypothetisches Protein	-	NMA0155	-
	NMB0120	1.7	0.7	hypothetisches Protein	-	NMA0154	-
	NMB0369/NMB0372/ NMB0655	1.7	0.8	hypothetisches Protein	-	NMA2115	-
	NMB0367/NMB0370/ NMB0371	1.6	0.3	hypothetisches Protein	-	NMA2118	-
	NMB0520	2.1	1.5	hypothetisches Protein	-	NMA0697	-
	NMB0521	1.8	0.9	hypothetisches Protein, putativ periplasmatic	-	NMA0698	-
	NMB0529	0.2	1.0	hypothetisches Protein, konserviert	-	NMA0707	-
	NMB0861/NMB0865	1.6	0.5	hypothetisches Protein	-	NMA1073/NMA1078	-
	NMB0863	1.8	1.0	hypothetisches Protein, putatives Membranprotein	-	NMA1074	-
	NMB0864	2.0	1.0	hypothetisches Protein	-	NMA1075/NMA1076	-
	NMB1202	2.0	1.1	hypothetisches Protein	-	NMA1373	-
	NMB1397	2.2	1.4	hypothetisches Protein	-	NMA1616	-
	NMB1417	2.2	2.0	hypothetisches Protein, konserviert	-	NMA1628	-
	NMB1611	1.9	1.2	hypothetisches Protein	-	NMA1810	-
	NMB1629	2.9	2.1	hypothetisches Protein	-	NMA0777	-
	NMB1632/NMB1545	1.6	1.0	hypothetisches Protein	-	NMA0780	-
	NMB1782	1.6	0.5	hypothetisches Protein	-	NMA0684	-
	NMB1786	1.6	0.5	hypothetisches Protein	-	NMA0678	+

4.2.2.5 Analyse der Genregulation der Mutante MC58ΔNMB1843 durch RT-PCR

Die Arraydaten wurden für eine Anzahl ausgewählter Gene (u.a. *sodC*, *iga*, *nadA*) mittels RT-PCR überprüft. RNA von zwei unabhängigen Isolierungen und somit auch von 2 Arrayexperimenten bildeten die Ausgangsbasis für die cDNA Synthese. Speziell dafür konstruierte Plasmide (200 bp Fragmente des jeweiligen Gens kloniert in den pCR[®]2.1.-TOPO Vektor) dienten als interne Standards für den *Light Cycler*. Eine Ausnahme bildeten die Gene *nadA*, NMB0497, NMB1779. Hier wurden direkt die Verdünnungen der aufgereinigten PCR-Produkte als Standards verwendet. Bei dem Regulatorgen NMB1843 diente das Plasmid p1843BK als interner Standard.

Die so gewonnenen RT-PCR Daten bestätigten die im Mikroarray beobachteten Regulierungen für alle ausgewählten Gene. Einzig der ORF NMB0497 konnte nicht als induziert detektiert werden. Dieses Ergebnis beinhaltet die Möglichkeit, dass die im Mikroarray detektierte Induktion sich nur auf den ORF NMB1779 bezieht. Beide Gene weisen eine hohe Übereinstimmung in ihrer Sequenz auf (96,9% Identität und 97,5% Ähnlichkeit) und unterscheiden sich nur in den letzten 200 bp. Dieser Bereich wurde für die Primerkonstruktion herangezogen. Zur Normalisierung der Transkriptionswerte wurde der ORF NMB1034 (*leuD*) verwendet, der in allen sechs Experimenten eine stabile Transkription aufwies.

	RT-PCR	Array
NMB0497	1,2	2,5
NMB0535 (<i>gluP</i>)	4,8	1,8
NMB0700 (<i>iga</i>)	2,7	1,7
NMB1398 (<i>sodC</i>)	2,1	1,8
NMB1779	3,3	2,5
NMB1843	0,04	0,4
NMB1994 (<i>nadA</i>)	10,3	9,7
NMB1034 (<i>leuD</i>)	0,99	1,1

Tab. 4.2.2.5.: Vergleich der transkriptionellen Aktivität ausgewählter Gene in Bezug auf die Deletion des ORF's NMB1843 durch RT-PCR. Die entsprechenden Arraywerte sind mit angegeben.

4.2.2.6 Darstellung des Expressionsprofils der Mutante MC58 Δ NMB1843

Die Deletion eines Transkriptionsregulators beeinflusst in der Regel auch die Translationsebene, so dass bestimmte Proteine in veränderten Mengen synthetisiert werden. Die SDS-PAGE Analyse kann einen Einblick in das veränderte Expressionsprofil liefern. Zellysate von Meningokokken einer Übernachtskultur wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und dieses durch Coomassie gefärbt. Durch Anwendung dieser Technik konnte bei den NMB1843-Mutanten eine Proteinbande bei 210 kDa identifiziert werden, die bei den Ausgangsstämmen nicht nachweisbar war.

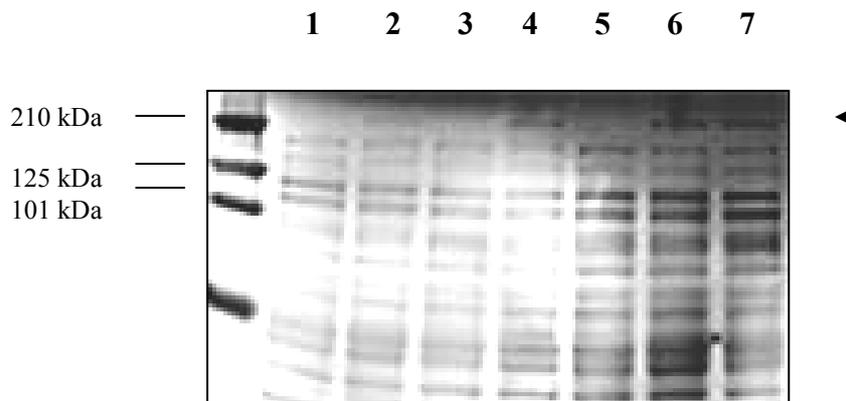


Abb. 4.2.2.6.: SDS-PAGE Analyse von MC58 WT (1, 3); Δ NMB1843 Klon (2); Δ NMB1843 Klon 7 (4), MC58 *siaD* (5); *siaD*, Δ NMB1843 Klon 2 (6) und *siaD*, Δ NMB1843 Klon 4 (7)

4.2.2.7 Identifizierung des für die Mutante MC58 Δ NMB1843 spezifischen Protein von 210 kDa

Das im SDS-Gel detektierte Protein bei 210 kDa wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Armin Bosserhoff, Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH), Abteilung Biomolekulare Chemie mittels Massenspektroskopie charakterisiert. Die Analyse beruht auf dem Computerprogramm MASCOT, welches drei Arten von Proteinidentifizierung umfasst (Perkins *et al.*, 1999):

1. Peptide Mass Fingerprint: Proteaseverdau mit Trypsin zur Bestimmung des Molekulargewichtes der so entstandenen Peptide
2. Tandem mass spectrometry (MS/MS) liefert Aussagen über die Struktur durch Analyse des Ionenspektrums einzelner Peptidfragmente
3. Kombination der einzelnen Daten (MG der Peptide) mit den entsprechenden Sequenzdaten (Aminosäuren).

Unter Verwendung von MASCOT konnten 9 einzelne Peptidfragmente identifiziert werden:

1. **KVVTNLTK**
2. **DATAADVEADDFK**
3. **LGENITFAEETK**

4. **AGETIYDIGEDGTITQK**
5. **AEAAAGTANTAADKAEVA****AAK**
6. **TNIVK**
7. **AATVAIVAAYNNGQEING**
8. **LADTDAALADTDAALDETTNALNK**
9. **AAETAAGK**

Aufgrund dieser Peptidfragmente wurde das in der Mutante induzierte Protein bei 210 kDa mit einer Trefferquote von 143 ($p < 0.05$) als *nadA* identifiziert. *NadA* ist ein 35 kDa Protein der bakteriellen Außenmembran, das aufgrund seiner Struktur (Coiled-coil Struktur und Leucin zipper Sequenzen) in der Lage ist hochmolekulare oligomere Strukturen zu bilden (Comanducci *et al.*, 2002). Die Abbildung 4.2.2.7. zeigt die Proteinsequenz von *nadA* mit den 9 identifizierten Peptidfragmenten.

```
MSMKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATSDDDVKKAATVAIVAAYNNGQEINGFKAG
ETIYDIGEDGTITQKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKTVNENKQNVDAKV
KAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDETTNALNKLGENTTFAEETKTNIVKI
DEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDA
KVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVA
```

Abb. 4.2.2.7. Proteinsequenz von *nadA* (NMB1994). Die einzelnen Peptidfragmente sind farblich hervorgehoben.

4.2.2.8 Expression des Regulatorproteins NMB1843 als terminales His-Tag Fusionsprotein

Das Gen NMB1843 wurde mittels PCR amplifiziert (Primer 1843for und 1843Rneu) und das gereinigte PCR-Produkt in den pBAD/Thio-TOPO[®] Vektor kloniert. Dies führte zur Entstehung des Plasmids p1843BAD/Thio-TOPO[®] (Abb. 4.2.2.8.1.). Die Expression erfolgte als COOH-terminales Histidin (HisTag) Fusionsprotein. Drei positive Klone wurden ausgewählt und die Proteinexpression durch Zugabe von 0,02% und 0,2% Arabinose induziert. Die Inkubationszeit betrug 3 h bei 30°C bzw über Nacht bei 20°C.

Das rekombinante Protein hatte eine Größe von 33 kDa. Bei erfolgreicher Induktion lässt sich bei dieser Größe eine verstärkte Proteinexpression detektieren. Jeweils Aliquots des Überstands und des bakterienhaltigen Sediments wurden auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen und die Proteinexpression mittels Western-Blot analysiert. Unter Verwendung des Antikörpers Anti-Thio (bindet an die HP-Thioredoxin Box) zeigte nur der Klon 36 eine verstärkte Proteinexpression (Abb. 4.2.2.8.2.).

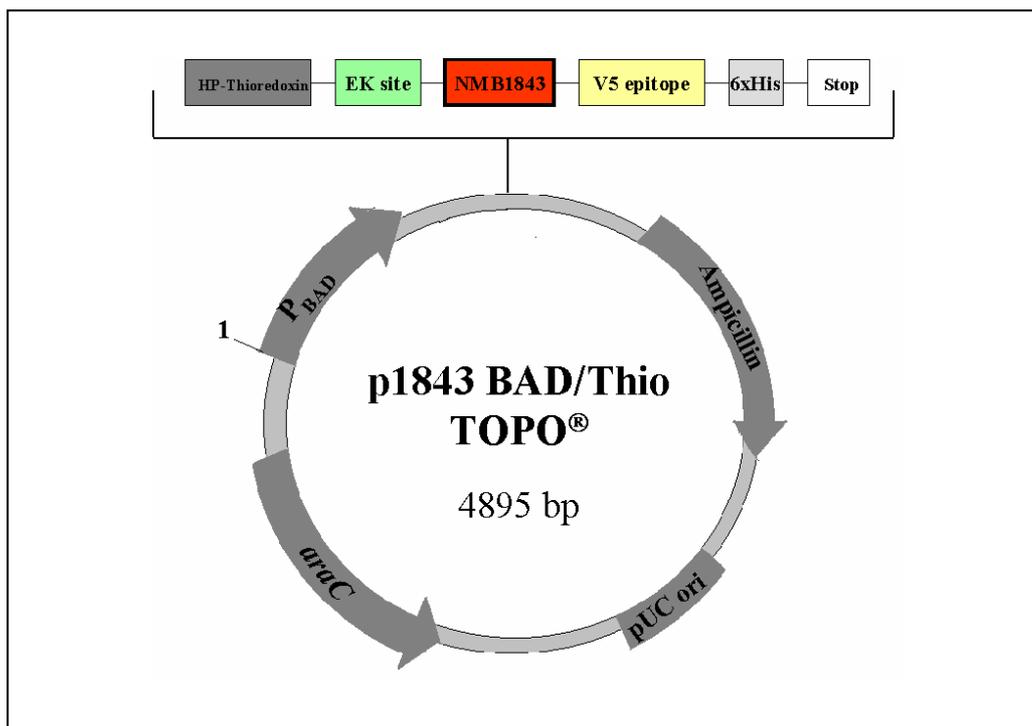


Abb. 4.2.2.8.1.: Vektorkarte des Plasmids pBAD/Thio-TOPO[®] (4454 bp) mit dem eingebauten Gen NMB1843. Der Einbau erfolgte in die *Cloning Site* des Vektors (Basen 714-715). Dies führte zur Entstehung des Plasmids p1843 BAD/Thio TOPO[®] (4895bp).

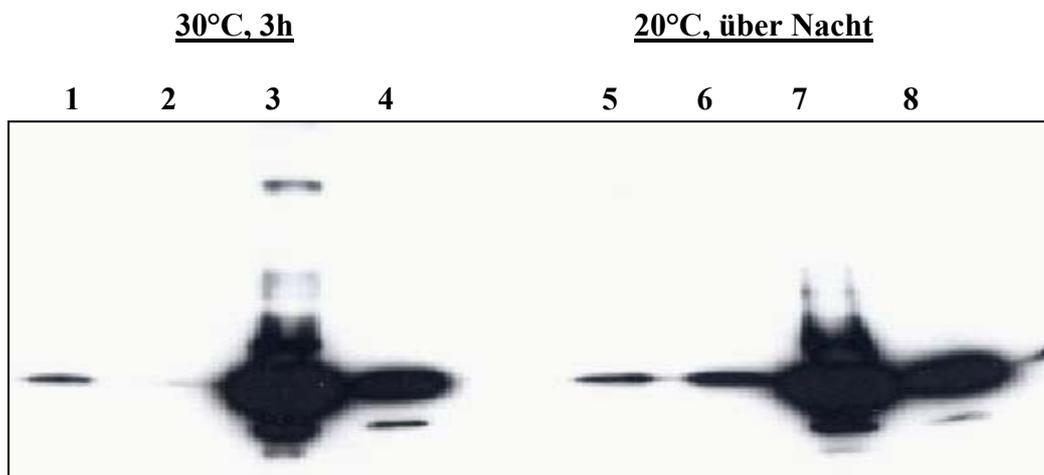


Abb. 4.2.2.8.2.: Darstellung des rekombinanten Fusionsproteins 1843_{His6} (Klon 36) mittels Western Blot.

(1) Überstand 0,2% Arabinose; (2) Überstand 0,02% Arabinose; (3) Sediment 0,2% Arabinose; (4) Sediment 0,02% Arabinose (1-4 = Inkubationszeit 3 h bei 30°C) und (5) Überstand 0,2% Arabinose; (6) Überstand 0,02% Arabinose; (7) Sediment 0,2% Arabinose; (8) Sediment 0,02% Arabinose (5-8 = Inkubationszeit über Nacht bei 20°C).

Der Klon 36 wurde mit den Primern Trxfwd und pBadrev sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte die fehlerfreie Insertion des Gens, so dass der translationale Leserahmen unverändert blieb.

4.2.2.9 Das rekombinante Regulatorprotein lässt sich mittels Ni – Granulat aufreinigen

Die Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins 1843_{His6} erfolgte über Affinitätschromatographie mittels Nickelgranulats. Durch den Poly-Histidin-Tag bindet das rekombinante Protein an die Ni - Matrix, da der Imidazolrest des Histidins mit dem Nickel einen Komplex bildet. Folglich wird es auf der Matrix zurückgehalten, während die anderen Proteine nicht binden. Imidazol selbst kann Komplexe mit dem Nickel bilden, so dass durch Zugabe des Imidazols das Protein von den Nickelgranulat verdrängt und so aufgereinigt wird. Durch schrittweise Erhöhung der Imidazolkonzentration wird das Protein schließlich von der Nickelmatrix eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und in einem SDS Polyacrylamid Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinexpression wurde mittels Western-Blot Analyse unter Verwendung des Anti-Thio Antikörpers kontrolliert.

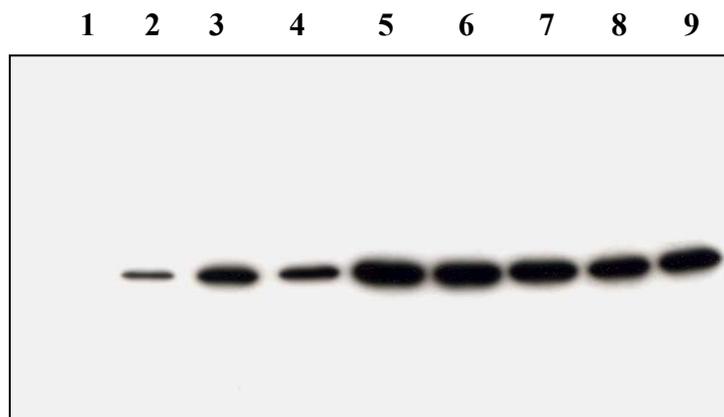


Abb. 4.2.2.9.: Darstellung des aufgereinigten Proteins 1843_{His6}

Die Elution des Proteins von der Nickelmatrix erfolgte durch schrittweise Erhöhung der Imidazolkonzentration: **(1)** 40 mM Imidazol, **(2)** 60 mM Imidazol, **(3)** 80 mM Imidazol, **(4)** 100 mM Imidazol, **(5)** 150 mM Imidazol, **(6)** 200 mM Imidazol, **(7)** 250 mM Imidazol, **(8)** 500 mM Imidazol und **(10)** Nickelgranulat.

Das gereinigte Protein kann für Studien zur DNA – Protein Bindung eingesetzt werden, um die Frage zu klären, ob der Regulator 1843 direkt die Expression von NadA reguliert. Zu diesem Zweck sollen in naher Zukunft Gelretardierungsexperimente (*gel mobility-shift assays*) mit Fragmenten des *nadA*-Promotors unter Verwendung des gereinigten Protein 1843_{His6} durchgeführt werden.

4.2.2.10 Analyse der Antibiotikaresistenz in *Neisseria meningitidis*

In Bakterien wird ein Großteil von MDR (*multidrug resistance*) Transportern von transkriptionalen Aktivatoren und Repressoren kontrolliert. Bekannte Repressorgene gehören unter anderem der MarR-Familie an, wie z.B. *marR*, der Repressor des *marRAB* Operon in *E. coli* (Schuhmacher und Brennan, 2002). Deletionen des *marR*-Gens führen zu einer erhöhten Antibiotikaresistenz gegenüber Tetracyclin und Chloramphenicol (White *et al.*, 1997). Um zu testen, ob die Deletion des ORF's NMB1843 in *Neisseria* ähnliche Auswirkungen auf die Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Antibiotika hat, wurden die Stämme MC58 und MC58 *siaD*, sowie die dazugehörigen Δ NMB1843-Mutanten mittels MHK-Bestimmung auf ihre Antibiotikaresistenz untersucht. Es wurden unter anderen solche Antibiotika getestet, die in der Klinik als Therapeutikum bei einer Meningokokkeninfektion eingesetzt werden. Wie in der Tabelle 4.2.10. dargestellt, hat die Deletion des ORF's 1843 jedoch keinen Effekt auf die Empfindlichkeit gegenüber den getesteten antimikrobiellen Agenzien. So bewirkt der Verlust des Regulators NMB1843 keinen Antibiotika resistenten Phänotyp.

Stämme	Minimale Hemmstoffkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) von:			
	Rifampicin	Tetracyclin	Penicillin	Cefotaxim
MC58 WT	0,094	0,19	0,047	< 0,016
MC58 Δ NMB1843 Klon3	0,064	0,19	0,047	< 0,016
MC58 Δ NMB1843 Klon7	0,094	0,19	0,047	< 0,016
MC58 <i>siaD</i>	0,004	0,094	0,032	< 0,016
MC58 <i>siaD</i> Δ NMB1843 Klon2	0,012	0,094	0,032	< 0,016
MC58 <i>siaD</i> Δ NMB1843 Klon4	0,023	0,094	0,032	< 0,016

Tab 4.2.2.10.: Einfluss der Mutation des ORF's NMB1843 auf die Empfänglichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen. Die Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration erfolgte mittels E-Test. Für die Antibiotika Penicillin und Rifampicin gelten derzeit folgende Grenzwerte:

- Penicillin sensibel bis 0,064 $\mu\text{g/ml}$ und resistent ab 2 $\mu\text{g/ml}$
- Rifampicin sensibel bis 1 $\mu\text{g/ml}$ und resistent ab 2 $\mu\text{g/ml}$
(Nationales Referenzentrum für Meningokokken, Würzburg).

4.2.3 Charakterisierung des induzierten ORF's NMB1646

Der ORF NMB1646 kodiert für ein putatives Hämolyysin (Institute for genomic research: <http://www.tigr.org>) und weist u.a. eine Homologie zu einem Hämolyysin III (42,3% Identität/57,2% Ähnlichkeit) von *Pseudomonas syringae* DC3000, sowie zu einem putativen Hämolyysin III (48,8% Identität/60,4% Ähnlichkeit) von *Chromobacterium violaceum* ATCC12472 auf. Des Weiteren gehört der ORF zu der Familie der Hämolyysin III verwandten Proteine. Diese Familie besteht aus integralen Membranproteinen. Der ORF NMB1646 wurde durch Kontakt mit Endothelzellen induziert.

4.2.3.1 Klonierung des ORFs NMB1646

Das Gen wurde mittels PCR amplifiziert und überhängende 3'-Enden entfernt. Als *Template* diente chromosomale DNA des Stammes MC58. Das geglättete PCR-Produkt wurde dann in den mit *SmaI/Asp718* gespaltenen Vektor pTL1 kloniert. Dies führte zur Entstehung des Plasmids pHemBK. Die anschließende Sequenzierung des Plasmids bestätigte den Einbau eines 627 bp großen Fragmentes. Danach erfolgte der Einbau einer Kanamycin-Resistenzkassette aus dem Plasmid pUC4K in die im Gen lokalisierte *PstI*-Schnittstelle (Pos. 335). Das daraus resultierende Plasmid pHemKanBK wurde sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte eine Insertion der Kassette in Leserichtung zum vorhandenen ORF NMB1646. Bakteriensuspensionen des *N. meningitidis* Stammes MC58, sowie dessen kapselloser Mutante MC58 *siaD* wurden dann mit dem Plasmid pHemKanBK transformiert und die erhaltenen Klone auf mit Kanamycin angereicherten GC-Agar Platten ausplattiert. Durch eine PCR mit der Primerkombination PUCK4F/PQEIII1646R konnten Transformanten detektiert werden, bei denen der Leserahmen des Gens durch die Insertion der Kanamycinkassette unterbrochen war. Im Anschluss an die Mutagenese wurden die Mutanten phänotypisch auf die Expression der Oberflächenproteine Pili, Opa und Opc untersucht. Alle getesteten Stämme ließen sich im Western Blot Pili, Opa und Opc positiv darstellen. Es konnte keine veränderte Expression festgestellt werden.

4.2.3.2 Überprüfung der chromosomalen Insertion der Kanamycinkassette in den ORF NMB1646

Die korrekte Insertion der Resistenzkassette wurde durch Southern-Blot Analyse überprüft. Dazu wurde die chromosomale DNA der Mutanten, sowie deren Ausgangsstämme mit *EcoRI* verdaut und mit einer für den ORF NMB1646 spezifischen Sonde hybridisiert. Das hybridisierte *EcoRI*-Fragment umfasste 11.212 bp. Die chromosomale Insertion der Kassette konnte aufgrund einer Verschiebung im Bandenmuster um 1220 bp für alle Klone bestätigt werden.

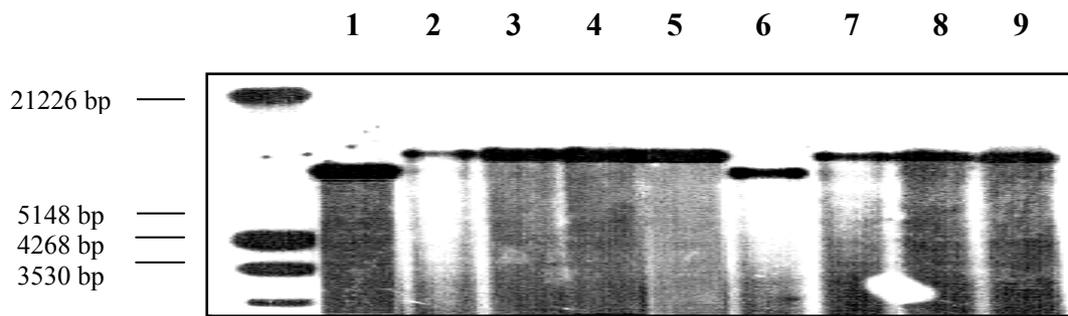


Abb.4.2.3.2.: Southern Blot chromosomaler DNA von MC58 WT (1), Klon 1 (2), Klon 7 (3), Klon 14 (4), Klon 16 (5), MC58 *siaD* (6), Klon 10 (7), Klon 13 (8), Klon 16 (9) nach *EcoRI*-Restriktionsverdau.

Zusätzlich wurden Amplifikate chromosomaler DNA mit den Primern NMB1646fpro und PQEHIII1646R generiert und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte die korrekte Insertion der Kanamycinkassette in den ORF NMB1646. Des Weiteren wurde mittels RT-PCR die Deletion des ORF's NMB1646 auch auf Transkriptionsebene bestätigt. Die konstruierten Mutanten wurden als MC58 *hem* bzw. MC58 *siaD*, *hem* bezeichnet.

4.2.3.3 Überprüfung der nach Zellkontakt detektierten Induktion von NMB1646 mittels RT-PCR

Die im Array für den ORF NMB1646 ermittelten Daten wurden mittels *Light Cycler* RT-PCR überprüft. Als interner Standard diente das konstruierte Plasmid pHemBK. RNA's zweier unterschiedlicher Arrayexperimente wurden in cDNA umgeschrieben und mittels *Light Cycler* PCR amplifiziert. Parallel dazu wurde ebenfalls RNA des bekapselten Wildtyps nach Interaktion mit Epithel- bzw. Endothelzellen isoliert und davon cDNA synthetisiert.

Die so gewonnenen RT-PCR Daten konnten die im Mikroarray beobachtete Hochregulierung des ORF NMB1646 nach Kontakt mit HBMEC Zellen für den Stamm MC58 *siaD* bestätigen. Auch für den bekapselten Stamm konnte eine erhöhte transkriptionelle Aktivität des ORF's NMB1646 nur nach Interaktion mit Endothelzellen nachgewiesen werden.

Zur Normalisierung der erhöhten Transkriptionswerte diente wiederum der ORF NMB2052.

Zelllinie	MC58 <i>siaD</i>		MC58 WT	
	Array	RT-PCR	Array	RT-PCR
HEp-2	1,38	1,4	n.b.	0,93
HBMEC	1,7	4,24	n.b.	1,68

Tab. 4.2.3.3.: Bestätigung der im Array detektierten Induktion von NMB1646 während der Infektion mit HBMEC Zellen durch RT-PCR.
n.b.; nicht bestimmt

4.2.3.4 Testung der Stämme MC58 *hem* und MC58 *siaD*, *hem* im Zellkulturmodell

Die konstruierten Mutanten wurden im Zellkulturmodellsystem auf ihre Fähigkeit zur Adhärenz und Invasion untersucht. Für die Infektionsversuche wurde der kapsel exprimierende Stamm MC58 *hem* (Klon 1) und die kapsellose Mutante MC58 *siaD*, *hem* (Klon 10) verwendet.

Die Deletion des ORF NMB1646 hatte keinen signifikanten Effekt auf die Adhärenz- und Invasion. Nur für die kapsellose *hem*-Mutante konnte eine leichte Abnahme der intrazellulären Erreger verzeichnet werden von $3,4 \times 10^4 (\pm 1,7 \times 10^4)$ (MC58 *siaD*) auf $2,1 \times 10^4 (\pm 1,5 \times 10^4)$ (MC58 *siaD*, *hem*) in RPMI Medium bzw. von $1,5 \times 10^5 (\pm 5,1 \times 10^4)$ (MC58 *siaD*) auf $6,0 \times 10^4 (\pm 2,6 \times 10^4)$ (MC58 *siaD*, *hem*) in RPMI Medium + 10% FCS.

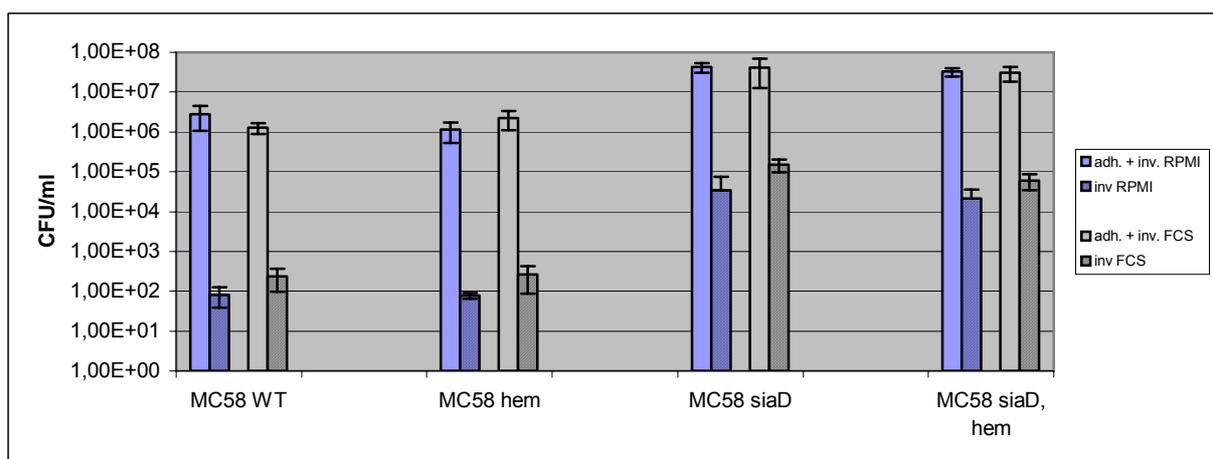


Abb. 4.2.3.4.1.: Adhärenz und Invasion der Stämme MC58, MC58 *hem*, MC58 *siaD* und MC58 *siaD*, *hem* nach Kontakt mit HEp-2 Zellen. Die Infektionszeit betrug 6 h.

Bei der Interaktion der bekapselten Stämme mit der Endothelzelllinie HBMEC konnten keine signifikanten Unterschiede in der Adhärenz und Invasion zwischen den jeweiligen *hem*-Mutanten und ihren Ausgangsstämmen festgestellt werden.

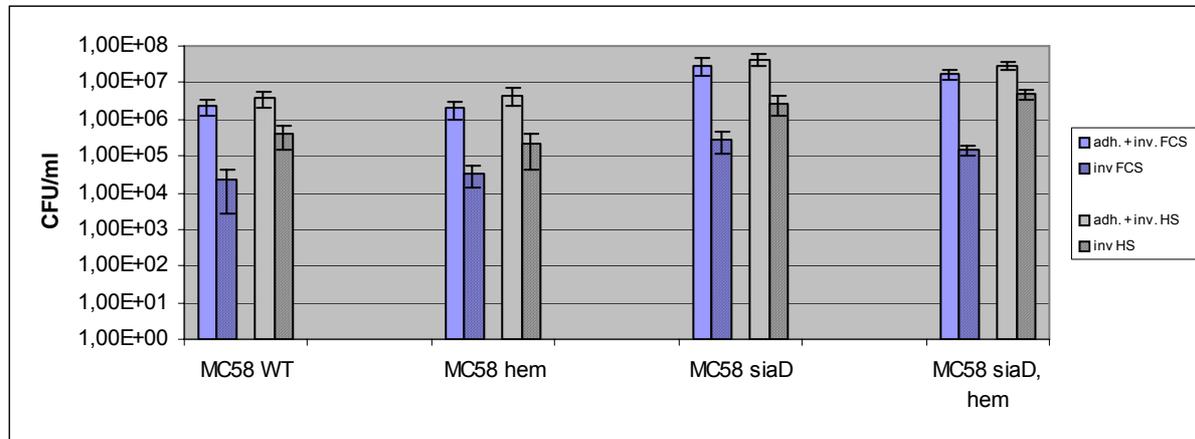


Abb. 4.2.3.4.2.: Adhärenz und Invasion der Stämme MC58, MC58 *hem*, MC58 *siaD* und MC58 *siaD, hem* nach Kontakt mit HBMEC Zellen. Die Infektionszeit betrug 6 h.

4.2.3.5 Bestimmung der Hämolysin assoziierten Zytotoxizität

Als nächstes wurde mittels Lactat-Dehydrogenase (LDH) Messungen das zytotoxische Potential der Mutanten im Zellkulturmodell HBMEC bestimmt. Anhand dieser Messung konnte für *Streptococcus suis* gezeigt werden, dass das hohe zytotoxische Potential bestimmter Isolate auf die Produktion von Suilysin (*S. suis* Hämolysin) zurückzuführen ist (Charland *et al.*, 2000).

Jeweils ein Klon für den kapselexpmierenden MC58 (MC58 *hem* Klon 1) sowie für die kapsellose *siaD*-Mutante (MC58 *siaD, hem* Klon 10) wurden für die Versuche verwendet. Wie aus der Abbildung 4.2.3.5. ersichtlich, führt der Verlust des *hem*-Gens bei dem bekapselten Stamm nur zu einer geringfügigen Verringerung der zellulären Lyse. Dieser Effekt ist nicht mehr nachweisbar, wenn die Anzahl der Bakterien auf 10^8 /Well erhöht wird. Bei der unbekapselten *hem*-Mutante konnte keine Verminderung der Zytotoxizität festgestellt werden. Es wurde im Gegenteil eine leichte Erhöhung der zellulären Lyse beobachtet. Weiterhin zeigte sich, dass die Zytoxizität nicht proportional zur Bakterienanzahl ist. Es zeichnete sich sogar eine leichte Verringerung des zytotoxischen Effektes bei einem Anstieg der Bakterienkonzentration ab.

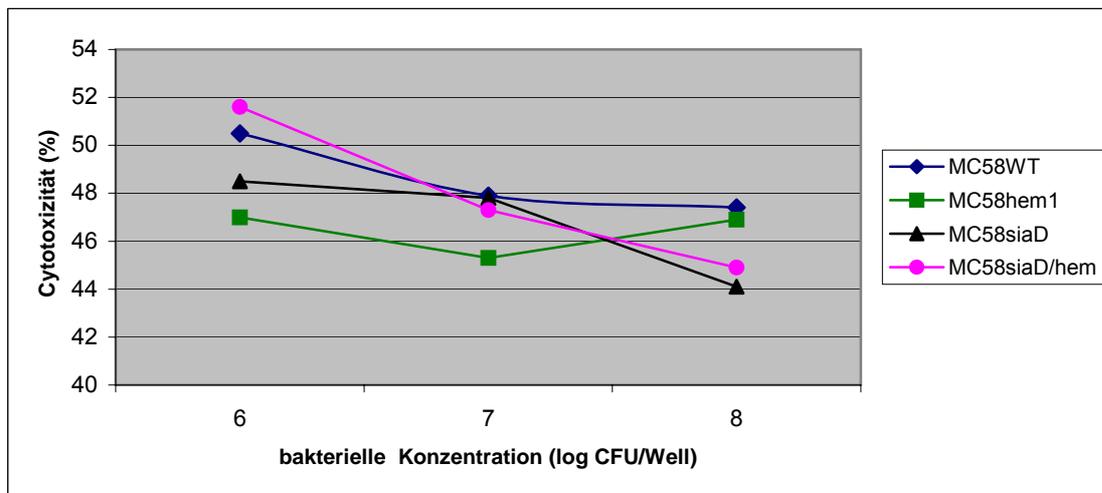


Abb. 4.2.3.5.: Effekt der *hem*-Mutation auf die Zytotoxizität im Zellkulturmodell (HBMEC). Die Zytotoxizität wurde durch die Messung des freigesetzten LDH in Gegenwart verschiedener Bakterienkonzentration nach einer Inkubation von 6 h bestimmt.

5 Diskussion

5.1 Transkriptomanalyse von *N. meningitidis* während der Interaktion mit humanen Zellen

In der vorliegenden Arbeit steht die Charakterisierung des Transkriptionsprofils von *N. meningitidis* während der Interaktion mit Epithel- und Endothelzellen im Vordergrund. Das Wissen um die bakteriellen Komponenten, die für eine Kolonisierung erforderlich sind, führt zu einem besseren Verständnis der Pathogenitätsmechanismen einer Meningokokken-Infektion. Die Mikroarraytechnologie erlaubt die Analyse von Veränderungen im transkriptionellen Expressionsprofil unter bestimmten Milieubedingungen. Der Einsatz dieser Technologie zum Studium der komplexen Interaktion Erreger – Wirt kann daher zur Identifizierung neuer Impfstoffkandidaten bzw. potentieller Angriffsziele von Antiinfektiva führen. Die Versuche wurden mit dem kapselnegativen Stamm MC58 *siaD* durchgeführt, da sich die Kapselexpression negativ auf die bakterielle Interaktion auswirkt (Virji *et al.*, 1995) und dadurch nicht mehr ausreichende Mengen an RNA für eine Mikroarrayhybridisierung isoliert werden konnten. Vorversuche an HBMEC und HEp-2 Zellen bestätigten diesen Effekt. So wies der kapseldefiziente Stamm MC58 *siaD* eine 20-fache Steigerung der bakteriellen Zellassoziation an Epithelzellen im Vergleich zu dem bekapselten Wildtyp auf. Nur 1% davon war intrazellulär lokalisiert. Ähnliche Daten zeigten auch Infektionsversuche an HBMEC Zellen.

Nach Adhärenz von MC58 *siaD* an Epithelzellen wurden 72 Gene, und nach Kontakt mit Endothelzellen 48 Gene als differentiell reguliert detektiert. Die differentiell regulierten Gene ließen sich in folgende Kategorien einteilen:

- Membranproteine und Transporter
- Expressionsregulatoren
- Proteinbiosynthese
- genereller Metabolismus
- hypothetische Proteine.

Einige dieser differentiell regulierten Gene tragen zur Virulenz von Meningokokken bei und ihre korrespondierenden Genprodukte sind in der Interaktion von pathogenen *Neisserien* mit Epithel- und Endothelzellen involviert (Hopper *et al.*, 2000; Virji *et al.*, 1991; Virji *et al.*, 1995). Neben den für die zelluläre Interaktion wichtigen Genen, wie den Opa Proteinen, wurden auch Gene identifiziert, deren Rolle in der bakteriellen Infektion noch ungeklärt sind. So weist der ORF NMB1857 eine hohe Homologie zu einem Gen auf, das für das *drug modulator protein* MdaB kodiert. MdaB ist in einer Vielzahl pathogener Bakterien präsent. Die Überproduktion dieses Proteins in *E. coli* bewirkt eine Resistenz gegenüber den beiden Topoisomerase Inhibitoren Adriamycin und Etoposide (Chatterjee und Sternberg, 1995). Weiterhin zeigte der ORF NMB0995 (kodiert für eine putative FK506-inhibierbare Rotamase), eine Homologie zu *mip*, das für einen *macrophage infectivity potentiator* von *Legionella* und *Streptococcus* exprimiert (Sampson *et al.*, 1992). Von den während der Interaktion mit HEp-2 und HBMEC Zellen differentiell regulierten Genen, wurden fünf (*rfaF*, *ilvl*, *tonB*, *exbD* und *gdhA*) als essentiell für die Pathogenese im neugeborenen Rattenmodell

identifiziert (Sun *et al.*, 2000). Während die Transkription von *exbD* nur nach Kontakt mit HEp-2 Zellen und *gdhA* nur nach Adhärenz an HBMEC Zellen induziert war, konnten die drei ORF's *rfaF*, *ilvl* und *tonB* in beiden Zellkultursystemen als hochreguliert detektiert werden. Bei der Pathogenese von Meningokokken-Erkrankungen spielen besonders jene Gene eine Rolle, die in der Synthese und im Export der Polysaccharidkapsel involviert sind (Frosch *et al.*, 1989). Bisherige Daten zeigen, dass die Expression der Kapsel die bakterielle Aufnahme an Epithel- und Endothelzellen inhibiert (Virji *et al.*, 1993 und Virji *et al.*, 1995). Bei bekapselten Meningokokkenisolaten sind Pili die einzig effektiven Adhäsine (Virji *et al.*, 1991). In kapseldefizienten Bakterien tragen neben Pili andere Oberflächenstrukturen, wie die Außenmembranproteine Opa und Opc, zur Modulierung der bakteriellen Interaktion mit Wirtszellen bei (Virji *et al.*, 1991, 1993 und 1995; de Vries *et al.*, 1998; Unkmeir *et al.*, 2002). So wurden in der vorliegenden Arbeit die Außenmembranproteine opaA-D nach Kontakt mit Epithelzellen, als induziert detektiert. Auch eine leichte transkriptionelle Erhöhung jener Gene, die in der Kapselbiosynthese involviert sind, konnte nach der Infektion von HEp-2 Zellen beobachtet werden. Diese Daten sprechen gegen einen negativ transkriptionellen Kontrollmechanismus der Kapselexpression, wie er bei einem Meningokokkenstamm der Serogruppe C beschrieben wurde (Deghmane *et al.*, 2000).

Die detektierte Induktion des *iga* Gens steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Kolonisierung (Nassif *et al.*, 1999) der Mukosa und dem intrazellulären Überleben der internalisierten Bakterien. IgA ist der häufigste Antikörper in Sekreten, vor allem in denen der Schleimhautepithelien im Darm und im respiratorischen Trakt. Die Sekretion von IgA-Antikörpern kann die Anheftung von Bakterien an die Wirtszelle verhindern und dadurch den Eintritt der Erreger durch das intestinale Epithel blockieren. Die von *Neisseria meningitidis* sezernierte IgA1 Protease schneidet IgA1 und trägt zur Neutralisierung der mukosalen Immunantwort bei. Des Weiteren wird die für die Aufnahme der Bakterien wichtige zelluläre Interaktion mit der Wirtszelle gewährleistet. Ein weiterer Effektormechanismus ist die Spaltung des phagosomalen Lamp-1 Proteins, einem glykolisiertes Protein der Phagosomen-Membran, durch die IgA1-Protease (Lin *et al.*, 1997; Hauck und Meyer, 1997). Durch die Spaltung von Lamp-1 wird die phagolysomale Fusion verhindert. Dadurch verbessern sich die Möglichkeiten für Meningokokken, bei der nasopharyngealen Überwindung der Mukosa-Barriere intrazellulär in Epithelzellen zu überleben (Lin *et al.*, 1997).

Ein wichtiger limitierender Faktor an der Oberfläche der Wirtszellen ist Eisen. So wurden die beiden Gene *tonB* und *exbD*, die in der Eisenaufnahme involviert sind, im Mikroarray induziert. TonB ist ein konserviertes Makromolekül der inneren Membran, das zusammen mit ExbB und ExbD Konformationsänderungen in TonB-abhängigen Außenmembranrezeptoren bewirkt, z.B. auch bei Rezeptoren, die in der Eisenaufnahme involviert sind. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die TonB-abhängige Eisenaufnahme essentiell für die intrazelluläre Replizierung der Meningokokken ist (Larson *et al.*, 2002). TonB und ExbD sind weiterhin zwei Gene, die essentiell für die septische Phase der Meningokokken-Infektion sind (Sun *et al.*, 2000). Die signifikante Induzierung der Gene für den TonB-Komplex und die erhöhte Expression des *igaA*-Gens spiegeln die erfolgreiche Adaption des Bakteriums an die Milieubedingungen des Wirtes wieder, z.B. ausreichende Versorgung an Eisen und dem Schutz vor der intrazellulären Verdauung durch Lysosomen. Weiterhin wurden 21 Stoffwechselfgene induziert. So ist die Adaption des bakteriellen Metabolismus an die spezifische Umgebung des Wirtes essentiell für eine erfolgreiche *in vivo* Replikation (Goetz *et al.*, 2001). Zusätzlich wurden u.a. 27 Stoffwechsel - spezifische Gene im neugeborenen Rattenmodell als essentiell für die Pathogenese identifiziert (Sun *et al.*, 2000). Einunddreißig der differentiell regulierten Gene konnte noch keine Funktion im Meningokokkengenom

zugeordnet werden. Möglicherweise tragen sie zur bakteriellen Zellinteraktion mit dem Wirt bei. Parallel zu der von uns durchgeführten Analyse, wurden von der Arbeitsgruppe um R. Rappuoli Transkriptionsstudien an einer bronchialen Zelllinie ebenfalls mit dem Stamm MC58 durchgeführt (Grifantini *et al.*, 2002). Von der Gesamtheit der dort detektierten Gene sind u.a. auch 15 in dieser Arbeit nach Kontakt mit HEp-2 induziert (Tab. 5.1.). Es handelt sich um 6 Gene, die für Proteine mit Transporterfunktion kodieren, 2 Gene, die im Energiemetabolismus involviert sind, einem Transkriptionsfaktor, 2 Resistenzgenen gegen Toxine (*mdaB*) und 3 hypothetische ORF's. Diese Ergebnisse belegen nochmals die Relevanz der nach Kontakt mit HEp-2 generierten Daten. Dennoch gibt es immer noch eine Reihe von ORF's, die in dem gewählten Zellkulturmodell nicht bestätigt werden konnten. Dies könnte neben den beiden unterschiedlichen Zelllinien auch auf die verschiedenen Infektionszeiten, sowie die andersartige Präparation der RNA zurückzuführen sein.

Genlokus	Protein	HEp-2	16HBE14				
		360 min	30 min	60 min	120 min	180 min	
NMB0177	putativer Aminosäure Transporter	1,6	2,36	1,54	1,05	1,12	
NMB0328	Hypothetisches Protein	1,7	2,72	1,77	1,70	1,49	
NMB0517	Hypothetisches Protein	2,1	6,45	1,48	0,94	1,01	
NMB0617	Rho Transkription Terminations Faktor	1,6	2,33	2,84	1,25	1,6	
NMB0787	Periplasmatisches Aminosäure bindendes Protein	2,1	0,48	1,32	8,42	2,42	
NMB0788	Aminosäures ABC Transporter, Permease Protein	1,8	0,39	0,83	3,56	1,88	
NMB0880	Sulfate ABC Transporter, CysW	1,9	0,90	1,11	3,14	2,57	
NMB0881	Sulfate ABC Transporter, CysT	1,6	0,99	0,91	4,97	3,15	
NMB0977	<i>Modulator of drug activity</i> , MdaB	2,2	1,54	3,48	1,33	1,68	
NMB0994	Acyl-Coenzym A Dehydrogenase Protein	2,0	1,01	2,36	8,99	3,50	
NMB0995	Hypothetisches Protein Mip	2,1	1,01	2,47	9,37	3,21	
NMB1017	Sulfate ABC Transporter Periplasmatisches Sulfate bindendes Protein	2,1	1,48	3,24	8,10	3,00	
NMB1377	L-Lactate Dehydrogenase	2,1	1,24	1,45	2,08	1,69	
NMB1845	Thioredoxin	2,7	2,06	1,18	1,03	0,93	
NMB1857	<i>Modulator of drug activity</i> , MdaB	2,2	1,3	3,91	1,51	1,75	

Tab. 5.1.: Vergleich der Gene, die in beiden Zellkultursystemen einer Aktivierung unterlagen. Das Zeitfenster der Induktion ist grau hinterlegt (Grifantini *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit zeigen 13 ORF's (27%) der differentiell regulierten Gene eine hohe Übereinstimmung sowohl bei HBMEC als auch bei HEp-2 adhärenen Neisserien. Ein Großteil der nach Kontakt mit HBMEC Zellen als differentiell reguliert identifizierten Virulenzgene, konnten auch bei HEp-2 adhärenen Bakterien als induziert detektiert werden (z.B. *tonB*, NMB1574, NMB1576, NMB1577). Dies legt den Schluss nahe, das diese Gene eine generelle Funktion bei der bakteriellen Wirtszellinteraktion haben könnten. Die dagegen

für die jeweilige Zelllinie als spezifisch reguliert identifizierten Gene können für die verschiedenen Anforderungen des Bakteriums für eine Infektion an Epithel- bzw. Endothelzellen sprechen. So wurden z.B. ein Großteil der Eisen regulierenden Gene, sowie jene Gene, welche die Biosynthese der Kapsel und Pili betreffen und auch die IgA1-Protease nur nach Kontakt mit HEp-2 Zellen induziert. Die unterschiedlichen Transkriptionsmuster bei HEp-2 und HBMEC adhärenenten Meningokokken können auf die Bindung verschiedener Oberflächenrezeptoren der Wirtszellen zurückzuführen sein. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass FCS einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität im Zellkulturmodell hat und das einige der detektierten Gene durch Serum induziert werden. Dies spiegelt allerdings die tatsächliche biologische Situation wieder. So erfordert die Opc-vermittelte Internalisierung in HBMEC Zellen die Präsenz von Fibronektin, einem Serumbestandteil, das als Brückenmolekül fungiert und die Verbindung zwischen Opc und dem $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-Rezeptor vermittelt (Unkmeir *et al.*, 2002). Ein Großteil der differentiell regulierten Gene ist auch im Genom des *N. meningitidis* Serogruppe A Stammes Z2491 anwesend. Aber 14 der hier identifizierten Gene sind nur für die Serogruppe B spezifisch und daher im Stamm Z2491 nicht vorhanden. Neben den beiden Serogruppe B spezifischen Kapselgenen *siaA* und *siaB*, trifft dies vor allem auf hypothetische ORF's zu.

5.2 Charakterisierung einzelner im Mikroarray induzierter Gene

5.2.1 *RfaF* - eine LPS-Heptosyl-II-transferase

RfaF kodiert für eine LPS-Heptosyl-II-transferase und ist in der LPS-Biosynthese involviert. Dieses Enzym katalysiert den Transfer der zweiten Heptose an die erste Heptose und ist somit für die Verlängerung der α -Kette verantwortlich. Eine Deletion des *rfaF*-Gens führt zur Expression eines stark verkürzten LOS-Moleküls, dessen Struktur aus einer einzigen an ein Molekül KDO (2-Keto-3-Deoxyoctansäuren) addierten Heptose besteht (Jenning *et al.*, 1995). Der Hauptteil der Oligosaccharidkette ist somit ab der ersten Heptose nicht mehr existent (Abb. 5.2.1.).

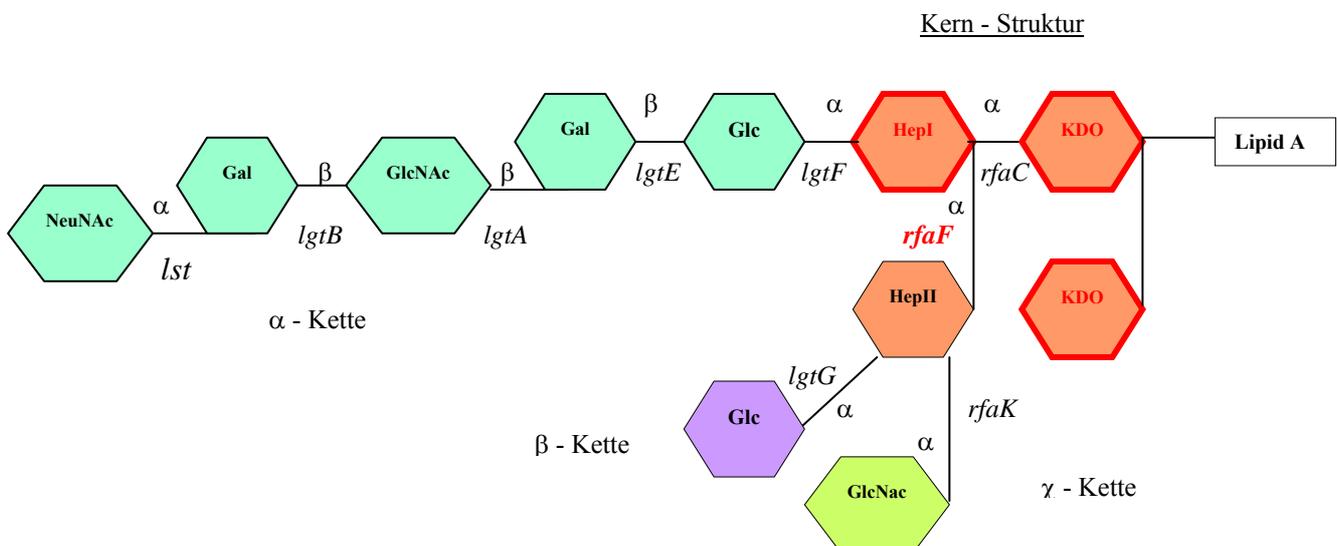


Abb. 5.2.1.: Genetische LOS-Struktur von *Neisseria meningitidis*. Die von den *rfaF*-Mutanten exprimierte LOS-Struktur ist rot umrandet.

Bei der Analyse des Transkriptionsprofils während der Infektion von Epithel- und Endothelzellen mit Hilfe der Mikroarraytechnologie wurde *rfaF* in beiden Zellkultursystemen als induziert identifiziert. Mittels eines unabhängigen Systems, einer *real time PCR* mit dem *Light Cycler*, konnten diese Daten, sowohl bei Kontakt mit Epithel- als auch bei Kontakt mit Endothelzellen bestätigt werden. Weiterhin wurde mit dieser Methode auch eine Induktion des Gens für den bekapselten Stamm nach der Infektion von HBMEC Zellen detektiert. Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche Rolle des LOS bei der Etablierung einer erfolgreichen Infektion des Wirtes hin. So wurde bei *Haemophilus influenzae* eine erhöhte Expression von *rfaF* nach der Infektion von primären bronchialen Epithelzellen festgestellt (Swords *et al.*, 2002). Auch handelt es sich bei *rfaF* um einen wichtigen Virulenzfaktor, der als essentiell für die Pathogenese im neugeborenen Rattenmodell gilt (Sun *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Daten ist die Charakterisierung des *rfaF*-Gens speziell auf der Ebene der bakteriellen Zellinteraktion Meningokokkus - Wirt von großen Interesse.

Zu diesem Zweck wurden durch Insertion einer Antibiotikakassette in das zu untersuchende *rfaF*-Gen Mutanten vom bekapselten Stamm MC58, sowie von der isogenen Kapseldefizienten Mutante MC58 *siaD*, konstruiert. Der korrekte Einbau der Kassette wurde dann durch Southern-Blot Analyse und Sequenzierung der *rfaF*-Konstrukte bestätigt. Weiterhin zeigten durchgeführte RT-PCR Studien, dass auf transkriptioneller Ebene bei den konstruierten Mutanten kein *rfaF*-Transkript mehr nachgewiesen werden konnte.

Vergleiche der LPS Profile der Mutante mit den einer genetisch definierten *pgm*-Mutante demonstrierten, dass das LPS der *rfaF*-Konstrukte schneller im SDS-PAGE Gel wandert, als das des isogenen Kontrollstammes MC58 *pgm*. Das Gen *pgm* kodiert für eine Phosphoglucomutase und ist für die Umwandlung von Glukose-6-phosphat in Glukose-1-phosphat, einem essentiellen Kohlenhydrat der UDP-Glukose- und UDP-Galaktose- Synthese, verantwortlich (Zhou *et al.*, 1994). Die Mutation des *pgm*-Gens führt zu einem verkürzten Oligosaccharid bestehend aus HEP-2(GlcNAc)→KDO₂→LipidA (Kahler *et al.*, 1998). Das veränderte Laufverhalten der *rfaF*-Mutanten gegenüber der genetisch definierten *pgm*-Mutante spricht für eine noch stärkere Verkürzung der LOS-Kette zu der für *rfaF* beschriebenen charakteristischen Struktur: Hep→KDO₂→LipidA (Jenning *et al.*, 1995).

Da der Lipooligosaccharidanteil neben der Kapsel eine der Hauptstrukturen für die bakterielle Resistenz gegenüber humanen Serum darstellt, wurden Bakterizidieassays mit den bekapselten *rfaF*-Mutanten durchgeführt, um die Rolle von *rfaF* bei der Serumresistenz aufzuzeigen. So wies der Stamm MC68 *rfaF* Klon 6 in 40% gepoolten normalem humanem Serum (NHS) gegenüber dem Wildtyp eine Reduzierung der Serumresistenz um 96,5% auf. Die vollständige Deletion der α -Kette resultiert somit in einer erhöhten Serumsensibilität. Diese Serumdefizienz wurde auch für eine *rfaK*-Mutante beschrieben (Kahler *et al.*, 1998), die eine LOS-Struktur ähnlich der von *rfaF* exprimiert, nur das hier die zweite Heptose noch existiert (HEP-2→KDO₂→LipidA).

In Zellkulturexperimenten wurde dann die zelluläre Interaktion der *rfaF*-Mutanten mit HEp-2 und HBMEC Zellen untersucht. So hat die Deletion des *rfaF*-Gens bei *Neisseria gonorrhoea* einen negativen Einfluss auf die Adhärenz an Chang Zellen (conjunctiva epithelial cells). Aufgrund der starken Verkürzung des LPS ist die Adhärenz vermindert und die bakterielle Aufnahme stark eingeschränkt. Die Mutanten sind nicht mehr invasiv (Schwan *et al.*, 1995). Diese Beobachtung konnte für Meningokokken nicht bestätigt werden. So zeigte die bekapselte *rfaF*-Mutante nach Kontakt mit HEp-2 Zellen eine Steigerung der Adhärenz um das 5-fache in RPMI bzw. um das 25-fache in RPMI + 10% FCS. Die Internalisierung erhöhte sich im Vergleich zum Ausgangsstamm signifikant um den Faktor 40 (RPMI-Medium allein). Durch eine verbesserte Fähigkeit zur Adhärenz gegenüber dem Wildtyp zeichnete sich auch eine *rfaF*-Mutante vom Stamm H44/76 aus (Gorter *et al.*, 2003). Bei der Kapsel-defizienten *rfaF*-Mutante konnte keine signifikante Steigerung der Adhärenz beobachtet werden.

Die zelluläre Interaktion mit der Wirtszelle wurde durch den Verlust eines funktionsfähigen *rfaF*-Gens nicht beeinträchtigt. So konnte eine erhöhte Anzahl intrazellulärer Erreger bei der Infektion in reinen RPMI-Medium auch für die unbekapselte *rfaF*-Mutante nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen sind konträr zu den beschriebenen Phänotyp für Gonokokken *rfaF*-Mutanten, der durch eine Abnahme der Adhärenz und einer stark eingeschränkten Invasion charakterisiert ist.

Eine Erklärung dafür könnte in den spezifischen Eigenschaften der für die Untersuchung verwendeten Stämme liegen. So wurden für die von Schwan *et al.* publizierten Daten ein Stamm verwendet, der keine Pili mehr exprimiert. Pili allerdings erhöhen die Adhärenz pathogener *Neisserien* an Epithelzellen (Nassif *et al.*, 1994; Dehio *et al.*, 1998; Nassif *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2000; Merz und So, 2000) sowie an vaskulären Endothelzellen (Virji *et al.*, 1991) und stellen die einzigen effektiven Adhäsine bei kapsel exprimierenden Meningokokken dar. Die Pilus-vermittelte Interaktion bewirkt innerhalb der Wirtszelle eine Reorganisation des Aktinzytoskelettes, an deren Ende die Aufnahme des Bakteriums in die eukaryotische Zelle steht (Merz und So, 1997; Merz *et al.*, 1999; Pujol *et al.*, 1999; Merz und So, 2000). Weiterhin zeigte eine Studie von Virji *et al.* (1995), dass Pili essentiell für die Interaktion von bekapselten Bakterien mit sialysierten L3 LPS Immunotyp sind. So ist bekannt, dass sialysiertes LOS einen inhibitorischen Effekt auf die Adhärenz und Invasion hat (Virji *et al.*, 1993).

Eine Vielzahl von Arbeiten belegen einen positiven Effekt der LOS-Verkürzung auf die zelluläre Interaktion mit der Wirtszelle. Meningokokken des Immunotyps L8, welche die *Lacto-N-neotetraose*-Struktur nicht mehr exprimieren, zeigten im HUVEC Zellkulturmodell eine höhere Invasivität als der L3 Immunotyp mit voll exprimierten LOS (Virji *et al.*, 1995). Auch der *N. gonorrhoeae* Stamm WS-1, der außer dem LipidA nur noch die beiden KDO-Substitutionen exprimiert (KDO₂→LipidA), wies an ektocervicalen Zellen eine höhere Adhärenz auf als der Vergleichsstamm mit voll exprimierten LOS (Edwards und Apicella, 2002).

Interessanterweise zeigten beide *rfaF*-Mutanten in der Gegenwart von HEp-2 Zellen eine verminderte Replikation im Überstand. Dieser Effekt lässt sich allerdings nicht auf eine geringere Replikationsrate zurückführen. Wachstumskurven der *rfaF*-Mutanten sowie ihrer Ausgangsstämme in verschiedenen Medien belegten eine annähernd gleiche Teilungsrate. Möglicherweise beruht dieser im Zellkulturmodell beobachtete Effekt auf einer schnelleren bakteriellen Adhärenz. Diese könnte auf die Demaskierung bestimmter Epitope basieren, die eine wichtige Rolle bei der Zellassoziiierung spielen. So resultiert, die im Vergleich zu den Kapsel exprimierenden Stämmen, verbesserte Adhärenz und Invasion von kapselnegativen Isolaten aus dem freien Zugang zu den Außenmembranproteinen Opa und Opc (Virji *et al.*, 1995). Bekapselte Stämme demonstrieren die funktionellen Eigenschaften dieser Antigene nicht mehr (Virji *et al.*, 1992; 1993). Auch wirkt sich der Verlust der Kapsel negativ auf die Replikation in zellulären Überständen aus (eigene Beobachtungen; Unkmeir *et al.*, 2002).

Bei der zellulären Interaktion mit der Endothelzelllinie HBMEC konnte nur für die bekapselte *rfaF*-Mutante eine leicht erhöhte Anzahl zellassoziierter Bakterien nachgewiesen werden. Untersuchen der Invasivität zeigten keine signifikanten Veränderungen der bakteriellen Aufnahme. Auch die kapselnegative *rfaF*-Mutante demonstrierte weder eine erhöhte Adhärenz, noch eine vermehrte Invasion. Auffällig war auch hier wiederum die verminderte Replikation, speziell der bekapselten *rfaF*-Mutante, im zellulären Überstand.

Interessanterweise wurden mehr Bakterien des bekapselten Ausgangsstamms MC58 von Endothelzellen internalisiert als von Epithelzellen (MC58 WT: $2,2 \times 10^2$ in RPMI+10% FCS an HEp-2 vs $2,3 \times 10^4$ in RPMI+10% FCS an HBMEC). Eine ähnliche Beobachtung machte bereits die Arbeitsgruppe M. Virji, die zeigte, dass die endothelialen Zelllinien HUVEC

(human umbilical vein endothelial cells) und BAOEC (bovine aortic endothelial cells) signifikant mehr Meningokokken phagozytierten als die epithelialen Zelllinien CHANG und HEp-2 (Virji *et al.*, 1992). Bei der Interaktion mit Endothelzellen zeigten die *rfaF* negativen Stämme in der Präsenz von 10% FCS keine veränderte bakterielle Aufnahme im Vergleich zu Epithelzellen (MC58 *rfaF* $3,8 \times 10^4$ invasive Bakterien an HEp-2 vs $2,0 \times 10^4$ invasive Bakterien an HBMEC). Die verkürzte LPS-Struktur bewirkt möglicherweise einen besseren Zugang zu bestimmten adhäsiven Strukturen der bakteriellen Oberfläche, die mit einem Rezeptor interagieren, der nur für HEp-2 Zellen spezifisch ist und auf HBMEC Zellen nicht vorkommt. Dies könnte eine Erklärung für die im Vergleich zu Endothelzellen verbesserte Aufnahme der *rfaF* defizienten Bakterien gegenüber den Ausgangsstämmen in Epithelzellen sein.

Die Daten aus den Zellkulturexperimenten werfen die Frage auf, warum *rfaF* bei Zellkontakt hochreguliert wird, da der Verlust des Gens sich offenbar nicht negativ auf die zelluläre Interaktion ausübt. Da *rfaF* jedoch für die sich anschließende septische Phase der Infektion essentiell ist (Sun *et al.*, 2000), kann davon ausgegangen werden, dass die Induktion dieses Gens in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Überleben des Pathogens in der Blutbahn steht. So ist neben der Kapsel, das Lipopolysaccharid für das Überleben im Blut von zentraler Bedeutung. Die Verkürzung dieser Struktur, bedingt durch die Deletion des *rfaF*-Gens, führte zu einer erhöhten Serumsensibilität der *rfaF* defizienten Meningokokken.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob sich durch die Deletion einer für die zelluläre Interaktion verantwortlichen Oberflächenstruktur die adhärenenten bzw. invasiven Eigenschaften der *rfaF*-Mutanten so verändern, dass möglicherweise der von Schwan *et al.*, beschriebene Phänotyp auftritt. So sind vor allem Pili bei bekapselten Stämmen und die Außenmembranproteine Opa und Opc bei kapsellosen Erregern in die zelluläre Interaktion mit dem Wirt involviert (Nassif *et al.*, 1999; Unkmeir *et al.*, 2002). Daher wurden durch Insertion einer Spectinomycinkassette bekapselte und unbekapselte *rfaF*-Mutanten von einem *opc* defizienten MC58 Stamm konstruiert. Mittels Southern Blot und Sequenzierung wurde dann der korrekte Einbau der Kassette in den *rfaF*-Lokus bestätigt. Die Analyse des LPS-Profiles im Tricin-Gel zeigte weiterhin das für *rfaF*-Mutanten charakteristische Laufverhalten. Anschließende Untersuchungen zur Opc-Expression bestätigten den *opc* negativen Phänotyp. Auf der zellulären Ebene zeigten die drei bekapselten Stämme MC58 WT, MC58 *opc* und MC58 *opc, rfaF* nach der Interaktion mit HEp-2 Zellen keine veränderte Adhärenz und Invasion. Die Deletion des *opc*-Gens wirkte sich erst bei den beiden kapsellosen Stämmen MC58 *siaD, opc* und MC58 *siaD, opc, rfaF* negativ auf die bakterielle Aufnahme aus. Hier konnte eine um den Faktor 8 verringerte Internalisierung in reinen RPMI Medium beobachtet werden. Diese Daten korrelieren mit denen von Virji *et al.*, 1993 publizierten. Allerdings zeigte auch hier die kapsellose *rfaF*-Mutante gegenüber dem Ausgangsstamm MC58 *siaD, opc* keine veränderte Adhärenz und Invasion.

Eine Verringerung der Invasion, die sich auf die Deletion des *rfaF*-Gens zurückführen lässt, zeigte sich erst nach Kontakt mit HBMEC Zellen. Hier konnte bereits eine verminderte bakterielle Aufnahme für den bekapselten *opc* negativen Stamm gegenüber den Wildtyp beobachtet werden (Unkmeir *et al.*, 2002). Die Deletion des *rfaF*-Gen führt dann nochmals zu einer Abnahme der Invasion um den Faktor 16 (RPMI + 10% FCS). Gleiches galt auch für die beiden kapsellosen Stämme. So wies der Stamm MC58 *siaD, opc* eine um den Faktor 7 geringere Internalisierungsrate gegenüber der *opc* positiven *siaD*-Mutante in RPMI + 10% FCS auf. In der Präsenz von humanem Serum konnte eine weitere Abnahme der Invasion um den Faktor 47 verzeichnet werden. Verglichen mit dem Ausgangsstamm MC58 *siaD, opc*, führte die Deletion des *rfaF*-Gens auch vor kapselfreien Hintergrund zu einer signifikanten Abnahme der intrazellulär lokalisierten Erreger. Interessanterweise konnte auch eine

Abnahme der Adhärenz um den Faktor 4 in RPMI Medium beobachtet werden. Dieses Ergebnis blieb auch unter der Zugabe von FCS bzw. HS bestehen. Dies deutet darauf hin, dass die LPS-Struktur durchaus eine Rolle in der bakteriellen Zellinteraktion spielt, speziell wenn eine wichtige adhäsive Struktur fehlt. So erlaubt die Interaktion zwischen der Lacto-N-neotetraose Struktur und dem humanen Asialoglycoproteinrezeptor (ASGP-R) bei *N. gonorrhoeae* die Aufnahme der Bakterien in PHUEC Zellen, einer Epithelzelllinie (Harvey *et al.*, 2001).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten deuten, speziell im Epithelzellmodell, auf einen Anstieg der bakteriellen Adhärenz und Invasion in Folge einer LOS-Verkürzung hin. Möglicherweise kommt es dadurch zu einem verbesserten Zugang zu bestimmten adhäsiven Strukturen. Wenn eine für die Adhärenz bzw. Invasion wichtige Determinante fehlt, konnte ein negativer Effekt der *rfaF* Deletion auf der zellulären Ebene beobachtet werden. Ein vergleichbares Resultat wurde für einen *opa* negativen Gonokokkenstamm beschrieben (Song *et al.*, 2000). Dort wiesen diejenigen bakteriellen Stämme mit voll exprimierten LOS eine höhere Invasion auf, als die mit einer verkürzten LOS-Struktur.

5.2.2 Der ORF NMB1843 - ein Transkriptionsregulator aus der marR-Familie

MarR ähnliche Proteine wurden in einer Vielzahl von Bakterien identifiziert, u.a. in *Escherichia coli*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella typhimurium*. Diese Proteine sind für pathogene Bakterien von Bedeutung, da sie unter anderen Gene kontrollieren, die eine implizierte Rolle bei der Antibiotikaresistenz und in der Hämolyse haben (Sulavik *et al.*, 1995 und Oscarsson *et al.*, 1996).

Einige Mitglieder dieser Familie sind in spezifischen Reaktionen, verursacht durch aromatische Verbindungen, involviert: z.B. MarR (Sulavik *et al.*, 1995 und Cohen *et al.*, 1993), CinR (Dalrymple und Swadling, 1997), HpcR (Roper *et al.*, 1993), HpaR (Galan *et al.*, 2003), BadR (Egland und Harwood 1999) und EmR (del Castillo *et al.*, 1991). Die meisten der zur MarR-Familie gehörenden Regulatoren stellen transkriptionelle Repressoren dar. Es gibt jedoch einige Ausnahmen. So fungieren BadR (*Rhodopseudomonas palustris*) und SlyA (*Escherichia coli*) als Aktivatoren (Egland und Harwood 1999; Oscarsson *et al.*, 1996) und MexR (*Pseudomonas aeruginosa*) kann sowohl auf reprimierender als auch auf aktivierender Ebene arbeiten (Poole *et al.*, 1996).

Bei der Analyse des Transkriptionsprofils während der Infektion von Epithel- und Endothelzellen mit Hilfe der Mikroarraytechnologie wurde der ORF NMB1843 im Zellkulturmodell HBMEC als induziert identifiziert. Mittels eines unabhängigen Systems, einer *real time PCR* mit dem *Light Cycler*, konnten diese Daten bestätigt werden. Des Weiteren zeigte sich, dass das Gen mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,7% auch bei Kontakt mit HEp-2 Zellen induziert ist, da im *Light Cycler* eine differentielle Regulierung um den Faktor 1,6 detektiert wurde.

Der ORF NMB1843 weist eine Homologie zu *hpcR* von *Shigella flexneri* (53,3% Identität und 75,2% Ähnlichkeit) und *hpaR* von *Salmonella typhimurium* sowie *Salmonella enterica* (56,9% bzw. 57,7% Identität und 76,9% Ähnlichkeit) auf. Beide Proteine kodieren für einen *homoprotocatechuate degradative operon repressor* – einem Regulator des *hpa*-Stoffwechselweges. Dieser katabolische Stoffwechselweg führt zum Abbau von 4-Hydroxyphenyllessigsäure (4HPA), einer aromatischen Verbindung, zu Pyruvat und Bernsteinsäure-Semialdehyd (Prieto *et al.*, 1996). Weiterhin wies der ORF die HTH-MARR Domäne auf, die charakteristisch für Mitglieder der marR-Familie ist (Abb.5.1.) Mittels dieses helix-turn-helix Motivs binden die Regulatorproteine an die DNA.

PILNQANI TDQ WRIIRLLAENGLDFQDLANQACILRPS LTGILTRLEKAGLVVRL KPSN	NMB1843
PIVKSHNL TDQ WRIVRILADSPSMDFHELAFRTCILRPS LTGILTRMERDGLVLR KPVN	hpaR
--LSPLDI TAAQ FKVLCSIRCAACITPVEL LKKVLSVDL GAL TRMLDRLVCKGWVERL PNPN	marR
DQR RVFL KL TAEGEKLYEEI GEEV DERYDA-IEEVLGREKM	NMB1843
DQR KLYVMLTEQGQTLYARARSEVEEAYRK-IEADFTPEKT	hpaR
DKR GVLV KL TTSGAAICEQ CHQLVG QDLHQELTKNLTADDEV	marR

Abb. 5.2.2.1.: Alignment der HTH-MARR Domäne von NMB1843, hpaR (*Salmonella enterica*) und marR (*Escherichia coli*). Die putative HpaR DNA-Erkennungsbox ist grau hinterlegt (Galan *et al.*, 2003). Die beiden putativen helix-turn-helix Motive von MarR sind unterstrichen (Aleksun *et al.*, 2000). Konservierte Reste sind rot markiert.

In einem nächsten Schritt wurden Mutanten der Stämme MC58 und MC58 *siaD* konstruiert, in denen der ORF NMB1843 nicht mehr exprimiert wird. Dies geschah mittels Insertion einer Kanamycinkassette in das zu untersuchende Gen. Die Mutanten wurden dann auf phänotypischer Ebene weiter charakterisiert. Die dazu durchgeführten Versuche beinhalteten unter anderen die Testung verschiedener Antibiotika, in Bezug auf eine veränderte Antibiotikatoleranz der NMB1843-Mutanten. So bewirkt bei *E. coli* die Deletion des *marR*-Gens einen Antibiotika resistenten Phänotyp (Aleksun und Levy, 1997). Diese *marR*-Mutanten weisen unter anderen eine erhöhte Toleranz gegenüber Tetracyclin, Chloramphenicol, Penicillin und Rifampicin auf. Dieser für *marR*-Mutanten charakteristische Phänotyp ließ sich für *Neisseria meningitidis* nicht bestätigen. Hier bewirkte die Deletion des ORF's NMB1843 keine veränderte Antibiotikatoleranz gegenüber den getesteten antimikrobiellen Substanzen. So liegt die Bedeutung dieses ORF's wahrscheinlich nicht in der Aktivierung von *multidrug resistance* Genen, die einen Antibiotika resistenten Phänotyp erst bedingen. Möglicherweise existieren für den ORF NMB1843 andere stimulierende Signale.

Um potenzielle Gene zu identifizieren, die unter der Kontrolle dieses Regulators stehen, wurden in einem nächsten Schritt Mikroarray-Experimente durchgeführt. RNA der bekapselten Mutante und des Ausgangsstammes MC58 wurden nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase in supplementierten PPM Medium isoliert und in cDNA umgeschrieben. Bei der sich anschließenden Transkriptomanalyse wurden 39 Gene als differentiell reguliert identifiziert. Davon waren 37 Gene induziert und 2 reprimiert. Die differentiell regulierten ORF's ließen sich in folgende Kategorien einteilen:

- Transporter
- Biosynthese
- genereller Metabolismus
- hypothetische Proteine.

Interessanterweise konnten mehrere Virulenz assoziierte Gene als induziert detektiert werden. Dazu gehört zum einen das Gen *sodC*, das für eine Superoxide-Dismutase kodiert und in der Detoxifizierung eine Rolle spielt. Für den dazu benachbarten ORF NMB1398 konnte ebenfalls eine Hochregulierung verzeichnet werden. Ebenfalls eine Superoxide-Dismutase wurde in *marR* negativen Mutanten bei *E. coli* als induziert detektiert (Barbosa und Levy, 2000; Greenberg *et al.*, 1991). Zwei weitere wichtige Virulenzfaktoren, die möglicherweise unter der Kontrolle des ORF's NMB1843 stehen, sind ein Hemolysin/Hemagglutinin verwandtes Protein sowie dessen Aktivator HecB. Beide Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese und stellen mit 68,85% Wahrscheinlichkeit eine transkriptionelle Einheit dar. Des weiteren wurde ein dazu benachbartes Gen (NMB1782) im Mikroarray ebenfalls

hochreguliert. So bewirkt ein chromosomales Fragment aus *Salmonella typhimurium*, das unter anderem für SlyA kodiert, nach der Klonierung in *E. coli* einen hämolytischen Phänotyp. Die Expression von SlyA, einem Transkriptionsregulator aus der MarR-Familie, genügte für die Ausbildung der Hämolyse (Ludwig *et al.*, 1995). Auch die IgaA1 Protease konnte wiederum als hochreguliert identifiziert werden. Für einen möglichen Kontrollmechanismus durch den Transkriptionsregulator NMB1843 spricht die Tatsache, dass die IgaA1 Protease bei der Interaktion mit Epithel- bzw. Endothelzellen, nur bei Kontakt mit HEp-2 Zellen induziert war, das Zellkulturmodell in dem der ORF NMB1843 bezüglich den Arrayergebnissen keine differentielle Regulierung zeigte. Dagegen konnte bei Kontakt mit HBMEC für die IgaA1 Protease keine differentielle Regulierung mehr nachgewiesen werden, hier zeigte jedoch der ORF NMB1843 eine Erhöhung in seiner transkriptionellen Aktivität (RT-PCR 2,9). Für das Gen *gluP*, einem Glukose- und Galaktose-Transporter, zeigte ein funktionelles Homolog in *E. coli* eine Induktion in *marA* positiven Stämmen (Barbosa und Levy, 2000). *MarA* kodiert für einen globalen Transkriptionsaktivator, dessen transkriptionelle Aktivität durch *marR* reguliert wird (Aleksun und Levy, 1997). Bei dem durch *marA* induzierten Gen handelt es sich um *mglB*, einem Transporter, der Galaktose bindet (Hogg *et al.*, 1991). Weiterhin konnte *gluP* spezifisch nur bei *N. meningitidis* identifiziert werden, nicht allerdings bei der apathogenen Spezies *N. lactamica*, die ebenfalls den Nasopharynxbereich kolonisiert (Perrin *et al.*, 1999). Eine mögliche Rolle von *gluP* in der Pathogenese ist daher nicht auszuschließen. Des Weiteren wurde *nadA*, ein putatives Adhäsion/Invasion hochreguliert. Der Grad der Regulierung (Faktor 9,7) spricht insbesondere für eine mögliche transkriptionelle Kontrolle durch den ORF NMB1843. *NadA* induziert in Mäusen bakterizide Antikörper und ist damit ein interessanter Kandidat für einen Komponenten Impfstoff gegen Meningokokken. Des Weiteren wurde dieses Gen in 52 hypervirulenten Stämmen gefunden. Es ist nicht präsent in den apathogenen Spezies *N. lactamica* und *N. cinerea*, sowie in dem Serogruppe A Stamm Z2491 und in *N. gonorrhoeae* (Comanducci *et al.*, 2002). In einem nächsten Schritt wurden die Mikroarraydaten für einige ausgewählte Gene mittels eines unabhängigen Systems, einer *real time* PCR, überprüft. Die Virulenz assoziierten Gene *igaA1*, *sodC* und *nadA*, sowie der Transporter *gluP* wiesen auch in diesem System eine erhöhte transkriptionelle Aktivität auf. Für die beiden Hemagglutinin/Hemolysin verwandten Gene NMB0497 und NMB1779, konnte nur für das letztere Gen die Induktion bestätigt werden. Die große Homologie (96,9% Identität) zu dem ORF NMB0497 kann zur Detektierung falsch positiver Signale im Mikroarray führen. Für die Primerkonstruktion wurden die letzten 200 bp des C-terminalen Bereiches herangezogen, da sich die beiden Gene in diesem Bereich unterscheiden. Weiterhin ist die starke Reprimierung des ORF's NMB1843 in der RT-PCR ein weiterer Beweis für eine erfolgreiche Deletion des Gens, da anhand dieser Daten eine transkriptionelle Aktivität nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

Untersuchungen des Translationsprofils zeigten ein ≈ 210 kDa großes Protein, das repräsentativ für die Mutanten Δ NMB1843 ist. Die Analyse mittels Massenspektroskopie identifizierte dieses Protein als *nadA*, einem 35,3 kDa großen Protein der bakteriellen Außenmembran. Die Topologie von *NadA* (coiled coil Struktur, Leucin-Zipper Sequenzen) bedingt die Ausbildung hoch oligomerer Strukturen (Comanducci *et al.*, 2002). So vermitteln coiled coil Strukturen und Leucin-Zipper Motive intermolekulare Interaktionen zwischen Monomeren. (Lupas, 1996; O'Shea *et al.*, 1991). Dies kann eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen dem detektierten Molekulargewicht (≈ 210 kDa) und dem tatsächlichen Molekulargewicht (35,3 kDa) von *nadA* sein.

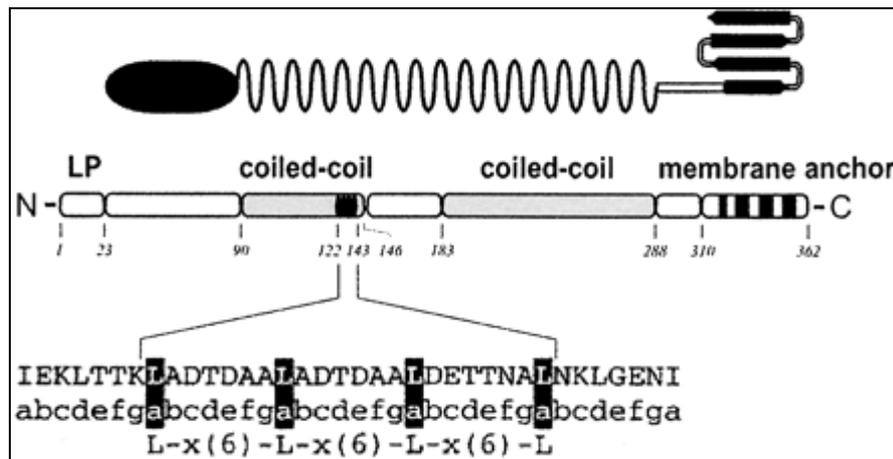


Abb. 5.2.2.2.: Schematische Illustration der möglichen Topologie von NadA. Die Leucin-Zipper Domäne mit den einzelnen Aminosäuren ist vergrößert dargestellt. Die Leucinreste sind schwarz hinterlegt (aus Comanducci *et al.*, 2002).
N, N-Terminus; C, C-Terminus; LP, Leader Peptide.

Der Promotorbereich von *nadA* enthält 9 Wiederholungen des Tetranukleotids TAAA, über das sich die Expression des Gens phasenvariabel regulieren lässt (Comanducci *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2003). Es wird diskutiert, dass dieser Bereich eine mögliche Bindestelle für einen putativen Regulator darstellt. Veränderungen in der Anzahl der Nukleotide könnten die Bindung zwischen Regulator und DNA verändern oder seine Interaktion mit der RNA Polymerase beeinflussen. Beide Vorgänge würden zu einer modifizierten NadA Expression führen (Martin *et al.*, 2003). Aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten Daten, kann von einer *nadA* Regulierung durch den ORF NMB1843 ausgegangen werden. Dies geschieht entweder direkt oder über die Reprimierung eines für *nadA* spezifischen Aktivators. Gelretardierungsexperimente (*gel mobility-shift assays*) mit Fragmenten des *nadA*-Promotors unter Verwendung des gereinigten Regulators (NMB1843) könnten aufzeigen ob der Regulator NMB1843 direkt an die Promotorregion von *nadA* bindet. Das Protein (NMB1843) ist aufgrund des in den *E. coli* Stamm TOP10F' eingebrachten Plasmid p1843BAD/Thio recht einfach zu reinigen. Zum einen, weil es durch die Induktion durch Arabinose in großen Mengen vorkommt und zum anderen kann durch die Fusion mit dem Poly – His – Tag das Regulatorprotein mit recht geringem Aufwand gereinigt werden.

Die dargestellten Daten, lassen somit die Vermutung zu, dass es sich bei dem ORF NMB1843 um einen Repressor handelt unter dessen Kontrolle möglicherweise einige virulenzassoziierte Gene stehen (u.a. *sodA*, *igaA1*, *nadA*). Insbesondere für *nadA* konnten eindeutige Hinweise erbracht werden, das dieses Gen durch den ORF NMB1843 reguliert wird. Da NadA als putativer Impfstoffkandidat gilt, ist die detaillierte Aufklärung jener Faktoren von Interesse die zu einer Aktivierung bzw. Reprimierung dieses Gens führen.

Wir haben des weiteren Hinweise darauf, dass es sich bei dem für die Abschaltung des Transkriptionsregulators NMB1843 wichtigen Agens nicht um ein Antibiotika handelt. Möglicherweise könnte es sich um eine aromatische Verbindung wie 3-Hydrophenylelessigsäure, 4-Hydrophenylelessigsäure oder 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure handeln, die als potentielle Liganden für *hpaR* von *E. coli* beschrieben wurden (Galan *et al.*, 2003).

5.2.3 Der ORF NMB1646 - ein putatives Hämolysin

Die Synthese einer Kapsel sowie zytolytischer Exotoxine wie Hämolysine, sind charakteristisch für eine Reihe von Bakterien, die unter anderen schwere Meningitiden verursachen, wie *Streptokokkos pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli K1* und *Listeria monocytogenes* (Leib und Tauber, 1999). So aktiviert das β -Hämolysin/Zytolysin, ein Poren bildendes Membran assoziiertes Toxin der Gruppe B Streptokokken, eine Vielzahl von Genen (IL-8, Groalpha, Grobeta, IL-6 und GM-CSF), die Neutrophile rekrutieren und damit zur Entwicklung einer Meningitis beitragen. Diese Induktion führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten. Mikroarraystudien an HBMEC Zellen mit einer Hämolysin defekten Mutante von *Streptococcus agalactiae* (Gruppe B Streptokokken) zeigten, verglichen mit dem Toxin produzierenden Wildtyp, eine starke Abnahme der durch Zellkontakt induzierten Gene. Dies betraf insbesondere die Gene für proinflammatorische Cytokine (Doran *et al.*, 2003).

Bei der Analyse des Transkriptionsprofils von *N. meningitidis* während der Infektion von Epithel- und Endothelzellen mit Hilfe der Mikroarraytechnologie wurde der ORF NMB1646, der für ein putatives Hämolysin kodiert, im Zellkulturmodell HBMEC als induziert identifiziert. Diese detektierte differentielle Regulierung konnte unabhängig davon auch mittels *real time* PCR bestätigt werden. Weiterhin wurde mit dieser Methode auch eine Induktion des Gens für den bekapselten Stamm nach der Infektion von HBMEC Zellen detektiert.

Die Suche nach konservierten Domänen deutete zum einen auf eine Familie möglicher Membranproteine hin, die alle eine Homologie zu Hämolysin III von *Bacillus cereus* aufweisen und zum anderen auf eine Gruppe von kanalbildenden Zytolysinen bzw. Makrophagen assoziierter Reifungsproteine, die eine Rolle bei der immunologischen Abwehr spielen. Es wurden 6 mögliche Transmembrandomänen identifiziert, was auf ein integrales Membranprotein schließen lässt (Abb. 5.2.3.).

Um die Rolle von Hämolysin im Infektionsprozess bei Meningokokken näher zu untersuchen, wurden Mutanten der Stämme MC58 und MC58 *siad* konstruiert, in denen der ORF NMB1646 nicht mehr exprimiert wird. Untersuchungen des zytotoxisches Potential der Mutanten zeigten, dass die Deletion dieses Hämolysingens keinen Einfluss auf die Zytotoxizität hat. Es existieren im Genom von *N. meningitidis* neben dem ORF NMB1646 jedoch noch 6 weitere Gene, die ebenfalls alle als mögliche Hämolysine beschrieben sind (NMB0493, NMB0497, NMB1214, NMB1768, NMB1779 und NMB2091). Möglicherweise bewirkt erst die Deletion von mehreren Hämolysingenen eine Abnahme der Zytotoxizität. Des weiteren besteht die Möglichkeit, dass Hämolysin nicht mit der zellulären Membran interagieren kann und dadurch die gewählte Zelllinie HBMEC nicht sensitiv für dieses Toxin ist. Ein funktionsfähiges Aufnahmesystem ist allerdings die Voraussetzung für eine Entfaltung der toxischen Wirkung. Die Funktion als Porenbildner wird auch beeinträchtigt, wenn das Hämolysin nicht in den Lipid-Bilayer inseriert, auch wenn eine Interaktion zwischen Toxin und Membran stattfindet. Verfügt ein Zellsystem über einen Reparaturmechanismus zur Verschließung der durch das Toxin gebildeten Läsionen, kann das Toxin trotz erfolgreicher Permeabilisierung wirkungslos sein (Stanley *et al.*, 1998). Des weiteren kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem ORF NMB1646 nicht um ein Hämolysin handelt. So kodiert der ORF YOL002c, der ebenfalls zu der Familie der Hämolysin III verwandten Proteine gehört, in *Saccharomyces cerevisiae* für ein Protein, das eine Rolle im Lipid- und Phosphat-Metabolismus spielt (Karpichev *et al.*, 2002).

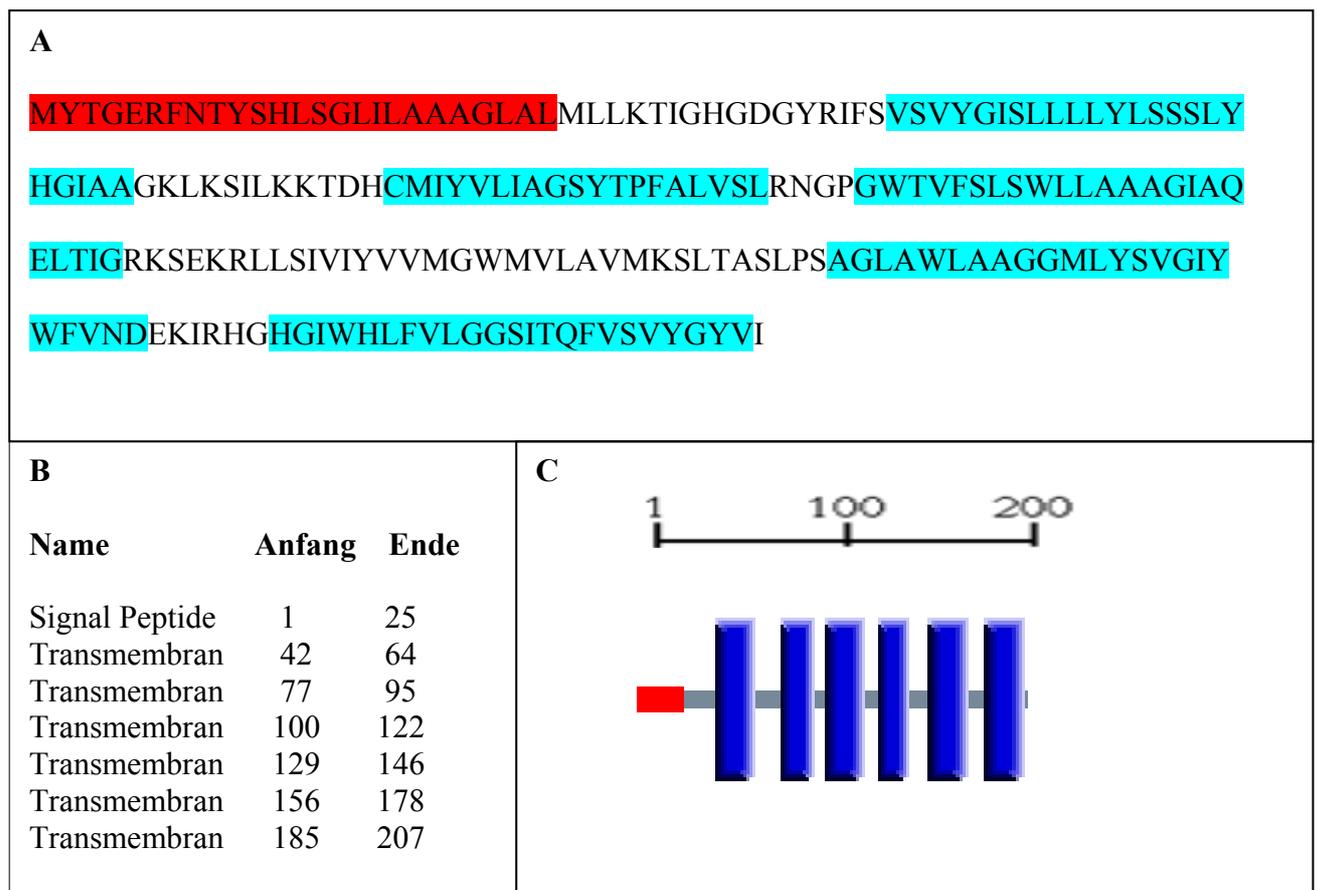


Abb. 5.2.3.: Schematische Illustration der möglichen Topologie des ORF's NMB1646.

A: Aminosäuresequenz des putativen Hämolytins. Die Transmembrandomänen sind blau, die Sequenz des Signalpeptids rot hinterlegt.

B: Positionen der einzelnen Domänen

C: Illustration der möglichen Topologie von NMB1646. Der Bereich des Signalpeptids ist rot dargestellt. Blaue Balken verkörpern die einzelnen Transmembrandomänen.

Auf der Basis durchgeführter Infektionsstudien zeigten die *hem*-Mutanten keine veränderte Adhärenz und Invasion gegenüber den Ausgangsstämmen. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Anwesenheit der anderen 6 Meningokokken Hämolytine Effekte, welche durch die Deletion des ORF's NMB1646 bedingt sind, überdecken. Möglicherweise führt die Deletion des zu untersuchenden Hämolytins zu einer Überexpression der anderen Hämolytine um dadurch negative Effekte zu kompensieren.

Die ermittelten Daten deuten darauf hin, dass der ORF NMB1646 für die zelluläre Interaktion jedoch keine unmittelbare Rolle spielt. Eine hämolytische Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden und daher stellt sich die Frage, ob dieser ORF wirklich als Hämolytin fungiert. Die im Mikroarray detektierte Induktion bei der Interaktion mit Endothelzellen lässt sich möglicherweise auch auf FCS zurück führen. Des Weiteren kann die gesteigerte transkriptionelle Aktivität des ORF's NMB1646 bereits eine Adaption an die im Liquor vorherrschenden Milieubedingungen darstellen. Möglicherweise liegt somit die Bedeutung des ORF's NMB1646 in biologischen Vorgängen, die erst noch einer Aufklärung bedürfen.

6 Zusammenfassung

Neisseria meningitidis, ein pathogenes Bakterium, das schwere Fälle von Sepsis und Meningitis verursacht, interagiert während der Infektion mit verschiedenen Oberflächen des Wirtes. Die schnellstmögliche Anpassung an die spezifischen Milieubedingungen im Wirtsorganismus ist daher ein essentieller Schritt in der Pathogenese.

Durch Verwendung von DNA-Mikroarrays, die auf gespotteten Oligonukleotiden basieren, wurde das Transkriptionsprofil von *N. meningitidis* während der Infektion von Epithel- und Endothelzellen analysiert. Zur Analyse wurde die isogene kapseldefiziente *siaD*-Mutante des *N. meningitidis* Stammes MC58 verwendet. 72 Gene konnten nach Kontakt mit Epithelzellen und 48 Gene nach Kontakt mit Endothelzellen als differential reguliert identifiziert werden. Darunter auch eine große Anzahl von Virulenzgenen. Während ein Teil der detektierten Gene in beiden Systemen als differentiell reguliert galt, gab es doch eine Anzahl von ORF's, die nur für ein Zellkulturmodell spezifisch reguliert waren (59 spezifische Gene für HEp-2 und 35 spezifische Gene für HBMEC). Für einige ausgewählte Gene wurde die im Mikroarray detektierte Regulierung durch Quantitative RT-PCR nochmals bestätigt. Die Funktion von den als induziert identifizierten Genen *rfaF*, *hem* und NMB1843 wurde im Anschluß durch die Konstruktion von Mutanten näher untersucht.

Das *rfaF*-Gen, eine in der LPS Biosynthese involvierte Heptosyl-II-transferase, wurde in beiden Zellkultursystemen als differentiell reguliert identifiziert. Die Deletion des Gens führte speziell für den bekapselten Stamm MC58 zu einer signifikanten Erhöhung der Adhärenz und Invasion nach Infektion von Epithelzellen. Untersuchungen des Infektionspotential für HBMEC Zellen ergaben keine signifikant veränderte Adhärenz und Invasion. Bei zusätzlicher Deletion von *rfaF* in einem *opc* negativen Stamm konnte eine Abnahme der bakteriellen Aufnahme im Zellkulturmodell HBMEC beobachtet werden. Dagegen zeigten die *opc*, *rfaF* negativen Mutanten nach Kontakt mit HEp-2 Zellen keine verminderte Invasion. Weiterhin führte die Deletion des *rfaF*-Gens zu einer verstärkten Sensibilität gegenüber humanen Serum. Diese Daten deuten daraufhin, dass die LPS-Struktur eine Rolle in der bakteriellen Zellinteraktion spielt, speziell wenn eine für die Adhäsion wichtige Komponente nicht mehr exprimiert wird.

Der ORF NMB1843, der für einen Transkriptionsregulator aus der MarR-Familie kodiert, ebenso wie das Hämolyisin Gen konnten nur nach Kontakt mit HBMEC Zellen als differentiell reguliert identifiziert werden. In Infektionsstudien zeigten die *hem*-Mutanten keine veränderte Adhärenz und Invasion. Weiterhin war die Zytotoxizität der Mutanten nicht eingeschränkt. Ob der ORF NMB1646 daher als Hämolyisin fungiert bleibt zu klären.

Durchgeführte Mikroarraystudien mit den NMB1843-Mutanten, führten zur Identifizierung einiger ORF's, die möglicherweise unter der Kontrolle dieses Regulators stehen. Dazu gehören die Virulenz assoziierten Gene *sodC*, *iga* und *nadA* sowie das für ein Hämolyisin kodierende Gen NMB1779. Die Untersuchung des Expressionsprofils mittels SDS-PAGE Analyse führte zur Identifizierung einer Proteinbande bei 210 kDa, die spezifisch für die NMB1843 negativen Stämme ist. Dieses Protein wurde als *nadA* identifiziert. *NadA* induziert im Tiermodell bakterizide Antikörper und gilt daher als möglicher Impfstoffkandidat.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten liefern neue Einblicke in die Pathogenitätsmechanismen von *N. meningitidis* und belegen die Bedeutung der transkriptionellen Genregulation in den einzelnen Stadien der Meningokokkeninfektion.

7 Summary

Neisseria meningitidis is a major cause of septicemia and meningitis. During the course of infection, *N. meningitidis* encounters multiple environments within its host, which makes rapid adaptation to environmental changes a crucial factor for neisserial pathogenicity.

As technology platform oligonucleotide-based DNA microarrays were employed to analyse the transcriptome profile of *N. meningitidis* during two key steps of meningococcal infection: the interaction with epithelial and endothelial cells. The isogenic capsule deficient *siaD* mutant of the *N. meningitidis* strain MC58 was used for this study. Seventy-two genes were differentially regulated after contact with epithelial cells, and 48 genes were differentially regulated after contact with endothelial cells, including a considerable proportion of well-known virulence genes. While several genes were in concordance between bacteria adherent to both cell types, there were a considerable number of open reading frames that were differentially regulated in only one system (59 genes specific for HEp-2 and 35 genes specific for HBMEC). Quantitative RT-PCR analyses confirmed the microarray observed regulation for several selected ORF's. Subsequently, the function of the upregulated genes *rfaF*, *hem* and NMB1843 was investigated by construction of mutants.

The *rfaF* gene, encoding a heptosyl-2-transferase involved in LPS biosynthesis, were detected as being differentially regulated in both cell systems. Disruption of the *rfaF* gene in meningococcal strain MC58 resulted in a significantly increased adhesion and invasion to epithelial cells in particular for the capsulated mutant. Investigations of the infection potential for HBMEC cells did not result in a significant change in adherence and invasion pattern.

The additional deletion of the *rfaF* gene in an *opc* negative strain leads to a significantly decrease in the bacterial uptake for HBMEC cells. Compared to HBMEC, *opc*, *rfaF* mutants showed no differences in internalisation after contact with HEp-2 cells. Moreover *rfaF* deficient meningococci demonstrated enhanced sensitivity to normal human serum (NHS). These data provide evidence that the LPS structure plays a role in the bacterial cell interaction, particularly if an important adhesive structure is absent.

The ORF NMB1843, which encodes a transcriptional regulator of the MarR family, as well the hemolysin gene, were detected as being upregulated only after contact with endothelial cells. Using infection assays, no changes were detected in the adherence and invasion pattern for *hem* mutants. Furthermore the cytotoxic potential of the mutants was not different from the parental strains. Therefore it remains to be clarified whether the ORF NMB1646 actually act as a hemolysin.

Microarray studies for the NMB1843 mutants showed some ORF's, which possibly are under control of this regulator, for example the virulence genes *sodC*, *iga* and *nadA* as well as the hemolysin coding gene NMB1779. The analysis of the expression profile by SDS-PAGE led to the identification of a 210 kDa protein, which is specific for the NMB1843 negative strains. This unknown protein was identified as *nadA*. *NadA* evokes a strong antibactericidal antibody response in laboratory animals. For this reason *NadA* is regarded as a good vaccine candidate. The data represented in this study provide new insight into the pathogenicity mechanisms of *N. meningitidis* and could demonstrate the importance of gene regulation on the transcriptional level during different stages of meningococcal infection.

8 Literaturverzeichnis

Achtman M., Neibert M., Crowe B.A., Strittmatter W., Kusecek B., Weyse E., Walsh M.J., Slawig B., Morelli G., and Moll A. (1988): Purification and characterization of eight class 5 outer membrane proteins variants from a clone of *Neisseria meningitidis* serogroup A. *J Exp Med.* **168**, 507-525.

Alekshun M.N., Kim Y.S., and Levy S.B. (2000): Mutational analysis of MarR, the negative regulator of *marRAB* expression in *Escherichia coli*, suggests the presence of two regions required for DNA binding. *Mol. Microbiol.* **35**, 1394-1404.

Alekshun M.N. and Levy S.B. (1997): Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 2067-2075.

Apicella M.A., Shero M., Jarvis G.A., Griffiss J.M., Mandrell R.E., and Schneider H. (1987): Phenotypic variation in epitope expression of the *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide. *Infect Immun* **55**, 1755-1761.

Apicella M.A., Ketterer M., Lee F.K., Zhou D., Rice P.A., and Blake M.S. (1996): The pathogenic of gonococcal urethritis in men: confocal and immunoelectron microscopic analysis of urethral exudates from men infected with *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis.* **173**, 636-646.

Bhattacharjee A.K., Jennings J.H., Kenny C.P., Martin A., and Smith I.C., (1976): Structural determination of the polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups Y, W-135, and BO1. *Can J Biochem* **54**, 1-8.

Barbosa T.M. and Levy S.B. (2000): Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of *marA*. *J. Bacteriol.* **182**, 3467-3474.

Barlow A.K., Heckels J.E., and Clarke I.N. (1989): The class1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*: gene sequence and structural and immunological similarities to gonococcal porins. *Mol. Microbiol.* **3**, 131-139.

Bauer F.J., Rudel T., Stein M., and Meyer T.F. (1999): Mutagenesis of the *Neisseria gonorrhoeae* porin reduces invasion in epithelial cells and enhances phagocyte responsiveness. *Mol. Microbiol.* **186**, 903-913.

Berrington A.W., Tan Y.C., Srikhanta Y., Kuipers B., van der Ley P., Peak I.R.A., and Jennings M.P. (2002): Phase variation in meningococcal lipooligosaccharide biosynthesis genes. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **34**, 267-275.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1983): A rapid alkaline extraction procedure for the isolation of plasmid DNA. *MethEnzymol* **100**, 243-255.

- Cartwright K.A.V., Stuart J.M., Jones D.M., and Noah N.D. (1987):** The Stonehouse Survey-nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect.* **99**, 591-601.
- Cartwright, K. (1995):** Meningococcal carriage and disease. In Cartwright, K. (Ed), Meningococcal disease. *John Wiley and Sons, Chichester*, 115-146.
- Charland N., Nizet V., Rubens C.E., Kim K.S., Lacouture S., Gottschalk M. (2000):** *Streptococcus suis* serotype 2 interaction with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun.* **68**, 637-643.
- Chatterjee P.K., and Sternberg N.L. (1995):** A general genetic approach in *Escherichia coli* for determining the mechanisms of action of tumoricidal agents: applications to DMP 840, a tumoricidal agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8950-8954.
- Claus H., Borrow R., Achtmann M., Morelli G., Kantelberg C., Longworth E., Frosch M., and Vogel U. (2004):** Genetics of capsule O-acetylation in serogroup C, W-135 and Y meningococci. *Mol Microbiol* **51**, 227-239.
- Cohen S.P., Hächler H., and Levy S.B. (1993):** Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 1484-1492.
- Comanducci M., Bambini S., Brunelli B., Adu-Bobie J., Arico B., Capecchi B., Giuliani M.G., Masignani V., Santini I., Savino S., Granoff D.M., Caugant D.A., Piazza M., Rappuoli R., and Mora M. (2002):** NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J. Exp. Med.* **195**, 1445-1454.
- Connolly M., and Noah N. (1999):** Is group C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993-6. *Epidemiol. Infect.* **122**, 41-49.
- Dalrymple B.P., and Swadling Y. (1997):** Expression of *Butyrivibrio fibrisolvens* E 14 gene (*cinB*) encoding an enzyme with cinnamoyl ester hydrolase activity is negatively regulated by the product of an adjacent gene (*cinR*). *Microbiology* **143**, 1203-1210.
- Deghmane A.E., Petit S., Topilko A., Pereira D., Giorgini D., Larribe M., and Taha M.K. (2000):** Intimate adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells is under the control of the *crgA* gene, a novel LysR-type transcriptional regulator. *EMBO J.* **19**, 1068-1069.
- Dehio C., Gray-Owen S.D., and Meyer T.F. (1998):** The role of neisserial opa proteins in interactions with host cells. *Trends in Microbiology* **6**, 489-495.
- del Castillo I., Gonzalez-Pastor J.E., San Millan J. L., and Moreno F. (1991):** Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* regulatory gene *mprA* and construction of *mprA*-deficient mutants. *J. Bacteriol.* **173**, 3924-3929.
- Detweiler C.S., Cunanan D.B., and Falkow S. (2001):** Host microarray analysis reveals a role for the *Salmonella* response regulator phoP in human macrophage cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **98**, 5850-5855.

- Devoe I.V., and Gilchrist J.E. (1975):** Pili on meningococci from primary cultures of nasopharyngeal carriers and cerebrospinal fluid of patients with acute disease. *J Exp Med.* **141**, 297-305.
- De Vries F.P., Cole R., Dankert J., Frosch M., and van Putten J.P.M. (1998):** *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycanreceptors. *Mol Microbiol* **27**,1203-1212.
- Dietrich G., Kurz S., Hübner C., Aepinus C., Theiss S., Guckenberger M., Panzner U., Weber J., and Frosch M. (2003).** Transkriptome analysis of *Neisseria meningitidis* during infection. *J. Bacteriol.* **185**, 155-164.
- Dhiman N., Bonilla R., Kane D., and Poland G.A. (2002):** Gene expression microarrays: a 21st century tool for directed vaccine design. *Vaccine* **20**, 22-30.
- Doran K.S., Liu G.Y., and Nizet V. (2003):** Group B streptococcal β -hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitidis. *J. Clin. Invest.* **112**, 736-744.
- Edwards U., Müller A., Hammerschmidt S., Gerady-Schahn R., and Frosch M. (1994):** Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the alpha-2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Mol Microbiol.* **14**, 141-149.
- Edwards J.L., and Apicella M.A. (2002):** The role of Lipooligosaccharide in *Neisseria gonorrhoeae* pathogenesis of cervical epithelia: lipid A serves as a C3 acceptor molecule. *Cellular Microbiology* **4**, 585-598.
- Egland P.G., Harwood C.S. (1999):** BadR, a new MarR family member, regulates anerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris* in concert with AadR, an FNR family member. *J. Bacteriol.* **181**, 2102-2109.
- Ermolaeva M.D., White O, and Salzberg S.L. (2001):** Prediction of operons in microbial genomes. *Nucleic Acids Research* **29**, 1216-1221.
- Finne J., Bitter-Suermann D., Goridis C., and Finne U. (1987):** An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J. Immunol.* **138**, 4402-4407.
- Fodor S.P., Read J.L., Pirrung M.C., Stryer L., Lu A.T., and Solas D. (1991):** Light directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **251**, 767-773.
- Frasch C.E., Zollinger W.D., and Poolman J.T. (1985):** Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infec Dis* **7**, 504-510.
- Frasch C.E. (1989):** Vaccines for prevention of meningococcal disease. *Clin Microbiol Rev.* **2**, 134-138.
- Frosch M., Weisgerber C., and Meyer T.F. (1989):** Molecular characterisation and expression in *Escherichia coli* of the gene complex encoding the polysaccharide capsule of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1669-1673.

- Frosch M., and Meyer T.F. (1992):** Transformation-mediated exchange of virulence determinants by co-cultivation of pathogenic *Neisseriae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **79**, 345-349.
- Frosch M., Müller D., Bousset K., and Müller A. (1992):** Conserved outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in capsule expression. *Infect. Immun.* **60**, 798-803.
- Frosch M. and Müller A. (1993):** Phospholipid substitution of capsular polysaccharides and mechanism of capsule formation in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **8**, 483-493.
- Frosch M. (1999):** Meningokokkenimpfstoffe. *Dt. Ärztebl.* **96**, A-3306-3308.
- Fussenegger M., Rudel T., Barten R., Ryll R., and Meyer T.F. (1997):** Transformation competence and type-4 pilus biogenesis in *Neisseria gonorrhoeae* – a review. *Gene* **192**, 125-134.
- Gabig M., and Wegrzyn G. (2001):** An introduction to DNA chips: principles, technology, applications and analysis. *Acta Biochimica Polonica* **48**, 615-622.
- Galan B., Kolb A., Sanz J.M., Garcia J.L., and Prieto M. (2003):** Molecular determinants of the *hpa* regulatory system of *Escherichia coli*: the HpaR repressor. *Nucleic Acids Research* **31**, 6598-6609.
- Gamian A., Beurret M., Michon F., Brisson J.R., and Jennings J.H. (1992):** Structure of the L2 lipooligosaccharide core oligosaccharides of *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem.* **267**, 992-995.
- Goetz M., Bubert A., Wang G., Chico-Calero I., Vazquez-Boland M., Beck J., Slaghuis J., Szalay A.A., and Goebel W. (2001):** Microinjection and growth of bacteria in the cytosol of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **98**, 12221-12226.
- Gold R., Goldschneider I., Lepow M.L., Draper T.F., Randolph M. (1978):** Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. *J Infect Dis* **137**, 112-121.
- Gorter A.D., Oostrik J., van der Ley P., Hiemstra P.S., Dankert J., and van Alphen I. (2003):** Involvement of lipooligosaccharides of *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis* in defensin-enhanced bacterial adherence to epithelial cells. *Microbial Pathogenesis* **34**, 121-130.
- Gotschlich E.C., Seiff M.E., Blake M.S., and Koomey M. (1987):** Porin protein of *Neisseria gonorrhoeae*: cloning and gene structure. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **84**, 8135-8139.
- Greenberg J.T., Chou J.H., Monach P.A., and Demple B. (1991):** Activation of oxidative stress genes by mutations at the *soxQ/cfbX/marA* locus of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 4433-4439.

- Grifantini R., Bartolini E., Muzzi A., Draghi M., Frigimelicia E., Berger J., Ratti G., Petracca R., Galli G., Agnusdei M., Guiliani M.M., Santini L., Brunelli B., Tettelin H., Rappuoli R., Randazzo F., and Gandhi G. (2002):** Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays. *Nat. Biotechnol.* **20**, 914-921.
- Grifantini P., Bartolini E., Muzzi A., Draghi M., Frigimelicia E., Berger J., Randazzo F., and Grande D. (2002):** Gene expression profile in *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* upon Host-cell contact. *Ann. N.Y.Acad.Sci.* **975**, 202-216.
- Griffis J.M., Yamasaki R., Estabrook M., and Kim J.J. (1991):** Meningococcal mimicry and the search for an ideal vaccine. *Transaction of the Royal society of Tropical Medicine and Hygiene* **85**, Supplement **1**, 32-36.
- Guckenberger M., Kurz S., Aepinus C., Theiss S., Haller S., Leimbach T., Panzner U., Weber J., Paul H., Unkmeir A., Frosch M., and Dietrich G. (2002):** Analysis of the heat shock response of *Neisseria meningitidis* with cDNA- and oligonucleotide-based DNA microarrays. *J. Bacteriol.* **184**, 2546-2551.
- Haas R., Veit S., and Meyer T.F. (1992):** Silent pilin genes of *Neisseria gonorrhoeae* MS11 and the occurrence of related hypervariant sequences among other gonococcal isolates. *Mol Microbiol.* **6**, 197-208.
- Hammerschmidt S., Birkholz C., Zahringer U., Robertson B.D., van Putten J., Ebeling O., and Frosch M. (1996a):** Contribution of genes from the capsule gene complex (cps) to lipooligosaccharide biosynthesis and serum resistance in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* **11**, 885-896.
- Hammerschmidt S., Muller A., Sillmann H., Muhlenhoff M., Borrow R., Fox A., van Putten J.P.M., Zollinger W.D., Gerardy-Schahn R., and Frosch M. (1996b):** Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol.* **20**, 1211-1220.
- Hammerschmidt S., Hilse R., van Putten J.P.M., Gerardy-Schahn R., Unkmeir A., and Frosch M. (1996c):** Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO J.* **15**, 192-198.
- Hanahan D. (1983):** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**, 557-580.
- Harvey H.A., Jennings M.P., Campell C.A., Williams R., and Apicella M.A. (2001):** Receptor-mediated endocytosis of *Neisseria gonorrhoeae* into primary human urethral epithelial cells: the role of the asialoglycoprotein receptor. *Mol Microbiol.* **42**, 659-672.
- Hauck C.R., and Meyer T.F. (1997):** The lysosomal/phagosomal membrane protein h-lamp-1 is a target of the IgA1 protease in *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS Lett.* **405**, 86-90.
- Hitchcock P.J., (1989):** Unified nomenclature for pathogenic *Neisseria* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **45**, 64-65.

- Hobbs M.M., Malomy B., Prasad P., Morelli G., Kusecek B., Heckels J.F., Cannon J.G., and Achtmann M. (1998):** Recombinational reassortments among opa genes from Et-37 complex *Neisseria meningitidis* isolates of diverse geographical origins. *Microbiology* **144**, 157-166.
- Hogg R.W., Voelker C., and von Carlowitz I. (1991):** Nucleotide sequence and analysis of the *mgl* operon of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **229**, 453-459.
- Jacobson S., Issa M., Unemo M., Bäckman A., Mölling P., Sulaiman N., and Olcen P. (2003):** Molecular characterisation of group A *Neisseria meningitidis* isolated in Sudan 1985-2001. *APMIS* **111**, 1060-1066.
- Janknecht R., de Matrynof G., Lou J., Hipskind R.A., Nordheim A., and Stunnenberg H.G. (1991):** Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **88**, 8972-8976.
- Jennings M.P., Biseric M., Dune K.L.R., Virji M., Martin A., Wilks K.E., Richards J. C., and Moxon E.R. (1995a):** Cloning and molecular analysis of the *Isi* (*rfaF*) gene of *Neisseria meningitidis* which encodes a heptosyl-2-transferase involved in LPS biosynthesis: evaluation of surface exposed carbohydrates in LPS mediated toxicity for human endothelial cells. *Microbial pathogenesis* **19**, 391-407.
- Jennings M.P., Hood D.W., Peak I.R.A., Virji M., and Moxon E.R. (1995b):** Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase variable expression of the lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **18**, 729-740.
- Jennings M.P., Srikhanta Y.N., Moxon E.R., Kramer M., Poolman J.T., Kuipers B., and van der Ley P. (1999):** The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* **145**, 3013-3021.
- Jennings H.J., Bhattacharjee A.K., Bundle D.R., Kenny C.P., Martin A., and Smith I.C. (1977):** Structures of the capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* as determined by ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Infect Dis.* **136**, 48-83.
- Jennings H.J., Johnson K.G., and Keene L. (1983):** The structure of a R-type lipooligosaccharide core obtained from some lipopolysaccharides of *Neisseria meningitidis*. *Carbohydr Res.* **121**, 233-241.
- Jones D.M. (1995):** Epidemiology of meningococcal disease in Europe and the USA. In Cartwright, K. (Ed), Meningococcal disease. *John Wiley and Sons, Chichester*, 147-155.
- Jonsson A.B., Nyberg G., and Normark S. (1991):** Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in *pilC*, a novel gene for pilus assembly. *EMBO J* **10**, 477-488.
- Kallstrom H., and Jonsson A.B. (1998):** Characterisation of the region downstream of the pilus biogenesis gene *pilC1* in *Neisseria gonorrhoea*. *Biochem Biophys Acta* **1397**, 137-140.
- Kallstrom H., Islam M.S., Berggren P.O., and Jonsson A.B. (1998):** Cell signaling by the type IV pili of pathogenic *Neisseria*. *J Biol Chem.* **273**, 21777-21782.

- Kahler C.M., Martin L.E., Shih G.C., Rahman M.M., Carlson R.W., and Stephens D.S. (1998):** The ($\alpha\rightarrow 8$)-linked polysialic acid capsule and lipooligosaccharide structure both contribute to the ability of serogroup B *Neisseria meningitidis* to resist the bactericidal activity of normal human serum. *Infect. Immun.* **66**, 5939-5947.
- Karpichev I.V., Cornivelli L., and Small G.M. (2002):** Multiple regulatory roles of a novel *Saccharomyces cerevisiae* protein, encoded by YOL002c, in lipid and phosphate metabolism. *J Biol Chem* **277**, 19609-19617.
- Kellogg D.S.J., Cohen I.R., Norins L.C., Schroeter A.L., Reising G. (1968):** *Neisseria gonorrhoeae* II. Colonial variation and pathogenicity during 35 months *in vitro*. *J Bacteriol.* **96**, 596-605.
- Kim J.J., Phillips N., Gibson B.W., Griffis J.M., and Yamasaki R. (1994):** Meningococcal group A lipooligosaccharide (LOS): preliminary structural studies and characterization of serotype-associated and conserved LOS-epitopes. *Infect. Immun.* **60**, 1566-1575.
- Kurian K.M., Watson C.J., and Wyllie A.H. (1999):** DNA chip technology. *J Pathol.* **187**, 267-271.
- Larson J.A., Higashi D.L., Stojiljkovic I., and So M. (2002):** Replication of *Neisseria meningitidis* within epithelial cells requires TonB-dependent acquisition of host cell iron. *Infect. Immun.* **70**, 1461-1467.
- Leib S.L., and Tauber M.G. (1999):** Pathogenesis of bacterial meningitidis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **13**, 527-548.
- Lin L., Ayala P., Larson J., Mulks M., Fukuda M., Carlsson S.R., Enns C., and So M. (1997):** The *Neisseria* type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **24**, 1083-1094.
- Liszewski M.K., Post T.W., and Atkinson J.P. (1991):** Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* **9**, 431-455.
- Lucchini S., Thompson A., and Hinton J.C.D. (2001):** Microarrays for microbiologists. *Microbiology* **147**, 1403-1414.
- Ludwig A., Tengel C., Bauer S., Bubert A., Benz R., Mollenkopf H.J., and Goebel W. (1995):** SlyA, a regulatory protein from *Salmonella typhimurium*, induces a haemolytic and pore-forming protein in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **249**, 474-486.
- Lupas A. (1996):** Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 375-382.
- Lynch E.C., Blake M.S., Gotschlich E.C., and Mauro A. (1984):** Studies of porins: Spontaneously transferred from whole cells and reconstituted from purified proteins of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Biophys J.* **267**, 104-107.

- Macville M., Schrock E., Padilla-Nash H., Keck C., Ghadimi B.M., Zimonjic D, Popescu N., and Ried T. (1999):** Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res.* **59**, 141-150.
- Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., and Spratt B.G. (1998):** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**, 3140-3145.
- Mandrell R.E., Griffis J.M., and Macher B.A. (1988):** Lipooligosaccharides (LOS) of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* have components that are immunochemically similar to precursors of human blood group antigens. Carbohydrate sequence specificity of the mouse monoclonal antibodies that recognize crossreacting antigens on LOS and human erythrocytes. *J. Exp. Med.* **168**, 107-126.
- Mandrell R.E., Leese A.J., Sugai J.V., Shero M., Griffis J.M., Cole J.A., Parsons N.J., Smith H., Morse S.A., and Apicella M.A. (1990):** In vitro and in vivo modifications of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide epitope structure by sialylation. *J. Exp. Med.* **171**, 1649-1664.
- Mandrell R.E., Kim J.J., Griffis J.M., and Yamasaki R. (1991):** Endogeneous sialylation of the lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* **173**, 2823-2832.
- Mandrell R.E., and Apicella M.A. (1993):** Lipooligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modification of LOS. *Immunobiology* **187**, 382-402.
- Massari P., Ho Y., and Wetzler L.M. (2000):** *Neisseria meningitidis* porin PorB interacts with mitochondria and protects cells from apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 9070-9075.
- Massari P., Ram S., Macleod H., and Wetzler L.M. (2003):** The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. *Trends in Microbiology* **11**, 87-93.
- Mattick J.S., Whitchurch C.B., Alm R.A. (1996):** The molecular genetics of type - 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa* – a review. *Gene* **179**, 147-155.
- Merker P., Tommassen J., Kusecek B., Virji M., Sesardic D., and Achtmann M. (1997):** Two-dimensional structure of the Opc invasin from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* **23**, 281-293.
- Merz A.J., Rifken D.B., Arvidson C.G., and So M. (1996):** Traversal of a polarized epithelium by pathogenic *Neisseriae*: facilitation by type IV pili and maintenance of epithelial barrier function. *Mol Med.* **2**, 745-754.
- Merz A.J., Enns C.A., and So M. (1999):** Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **32**, 1316-1332.
- Merz A.J., and So M. (1997):** Attachment of pilated, Opa- and Opc- gonococci and meningococci to epithelial cells elicits cortical actin rearrangements and clustering of tyrosine-phosphorylated. *Infect. Immun.* **65**, 4341-4349.

- Merz A.J., and So M. (2000):** Interaction of pathogenic *Neisseriae* with epithelial cell membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 423-457.
- Merz A.J., So M., and Sheetz M.P. (2000):** Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407**, 98-101.
- Meyer T.F., Billyard E., Haas R., Storzbach S., and So M. (1984):** Pilus genes of *Neisseria gonorrhoeae*: chromosomal organisation and DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6110-6114.
- Moore A.E., Sabachewsky L., and Toolan H.W. (1955):** Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.* **15**, 598-602.
- Mosleh I.M., Boxberger H.J., Sessler M.J., and Meyer T.F. (1997):** Experimental infection of native ureteral tissue with *Neisseria gonorrhoeae*: adhesion, invasion, intracellular fate, exocytosis, and passage through a stratified epithelium. *Infect. Immun.* **65**, 3391-3398.
- Morelli G., Malorny B., Muller K., Seifer A., Wang J.F., del Valle J., and Achtmann M. (1997):** Clonal descent and microevolution of *Neisseria meningitidis* during 30 years of epidemic spread. *Mol Microbiol* **25**, 1047-1064.
- Morley S.L., and Pollard A.J. (2002):** Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? *Vaccine* **20**, 666-687.
- Moxon E.R., Rainley P.B., Nowak M.A., and Lenski R.E. (1994):** Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr Biol* **4**, 24-33.
- Mühlhardt Cornel (2002):** Der Experimentator – Molekularbiologie/Genomics. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*, **3. Auflage**.
- Muller A., Gunther D., Dux F., Naumann M., Meyer T.F., and Rudel T. (1999):** Neisserial Porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by activation of cysteine proteases. *EMBO J.* **18**, 339-352.
- Nassif X., Beretti J.L., Lowy J., Stenberg P., O'Garora P., Pfeifer J., (1994):** Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 3769-3773.
- Nassif X., Pujol C., Morand P., and Eugene E. (1999):** Interactions of pathogenic *Neisseria* with host cells. Is it possible to assemble the puzzle. *Mol. Microbiol.* **32**, 1124-1132.
- Olyhoek A.J., Sarkari J., Bopp M., Morelli G., and Achtmann M. (1991):** Cloning and expression in *Escherichia coli* of *opc*, the gene unusual class 5 outer membran protein from *Neisseria meningitidis* (meningococcus/surface antigen). *Microb Pathog.* **11**, 249-257.
- Oscarsson J., Mizunoe Y., Uhlin B. E., and Haydon D.J. (1996):** Induction of haemolytic activity in *Escherichia coli* by the *slyA* gene product. *Mol. Microbiol.* **20**, 191-199.
- O'Shea E.K., Klemm J.D., Kim P.S., and Albert T. (1991):** X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* **254**, 539-544.

- Parkhill J., Achtmann M., James K.D., Bentley S.D., Churcher C., Klee S.R., Morelli G., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Davies R.M., Davis P., Devlin K., Feltwell T., Hamlin N., Holroyd S., Jagels K., Leather S., Moule S., Mungall K., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., Simmonds M., Skelton J., Whitehead S., Spratt B. G., and Barrell B.G. (2000):** Complete DNA sequence of serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. *Nature* **404**, 502-506.
- Petersen M., Fessner W.D., Frosch M. and Lüneberg E. (2000):** The *siaA* gene involved in capsule polysaccharide biosynthesis of *Neisseria meningitidis* B codes for *N*-acylglucosamine-6-phosphate 2-epimerase activity. *FEMS Microbiology Letters* **184**, 161-164.
- Perkins D.N., Pappin D.J., Creasy D.M., and Cottrell J.S. (1999):** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567.
- Perrin A., Nassif X., and Tinsley C. (1999):** Identification of regions of the chromosome of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* which are specific to the pathogenic *Neisseria* species. *Infect. Immun.* **67**, 6119-6129.
- Pfaffl M. (2001):** A new mathematical model for relative quantification in real-time-RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, 2003-2007.
- Pron B., Taha M.K., Rambaud C., Fournet J.C., Pattey N., and Monnet J.P. (1997):** Interaction of *Neisseria meningitidis* with the components of the Blood-Brain-Barrier correlates with an increased expression of PilC. *JID* **176**, 1285-1213.
- Pujol C., Eugene E., Morand P., and Nassif X. (2000):** Do pathogenic *Neisseriae* need several ways to modify the host cell cytoskeleton? *Microbes and Infection* **2**, 821-827.
- Pujol C., Eugene E., Marceau M., and Nassif X. (1999):** The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4017-4022.
- Poole K., Tetro K., Zhao Q., Neshat S., Heinrichs D. E., and Bianco N. (1996):** Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2021-2028.
- Porat N., Apicella M.A., and Blake M.S. (1995):** A lipooligosaccharide-binding site of HepG2 cells similar to the gonococcal opacity-associated surface protein Opa. *Infect. Immun.* **63**, 2164-2172.
- Porat N., Apicella M.A., and Blake M.S. (1995):** *Neisseria gonorrhoeae* utilizes and enhances the biosynthesis of the asialoglycoprotein receptor expressed on the surface of the hepatic HepG2 cell line. *Infect. Immun.* **63**, 1498-1506.
- Prentki P., and Krisch H.M. (1984):** In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**, 303-313.

- Prieto M.A., Diaz E., and Garcia J.L. (1996):** Molecular characterization of the 4-Hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster. *J. Bacteriol.* **168**, 111-120.
- Raghunathan P.L., Bernhardt S.A., and Rosenstein N.E. (2004):** Opportunities for control of meningococcal disease in the United States. *Annu. Rev. Med.* **55**, 333-353.
- Rappuoli R. (2000):** Pushing the limits of cellular microbiology: microarrays to study bacteria-host cell intimate contacts. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 13467-13469.
- Robertson B.D., and Meyer T.F. (1992):** Genetic variation in pathogenic bacteria. *Trends in Genetic* **8**, 422-427.
- Roper D.I., Fawcett T., and Cooper R.A. (1993):** The *Escherichia coli* C homoprotocatechuate degradative operon: *hpc* gene order, direction of transcription and control of expression. *Mol. Gen. Genet.* **237**, 241-250.
- Rudel T., Scheuerpflug I., and Meyer T.F. (1995):** *Neisseria* PilC protein identified as type-4-pilus tip-located adhesin. *Nature* **373**, 357-362.
- Ryll R.R., Rudel T., Scheuerpflug I., Barten R., and Meyer T. (1997):** PilC of *Neisseria meningitidis* is involved in class II pilus formation and restores pilus assembly, natural transformation competence and adherence to epithelial cells in PilC-deficient gonococci. *Mol. Microbiol.* **23**, 879-892.
- Sampson, B.A., and Gottschlich E.C. (1992):** *Neisseria meningitidis* encodes a FK506-inhibitable rotamase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1164-1168.
- Sanger F., Nicklen S., and Coulson A.R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sarkari J., Pandit N., Moxon E.R., and Achtman M. (1994):** Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cystidine. *Mol. Microbiol.* **13**, 207-217.
- Saunders N.J., Jeffries A.C., Peden J.F., Hood D.W., Tettelin H., Rappuoli R., and E.R. Moxon (2000):** Repeat-associated phase variable genes in the complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* strain MC58. *Mol. Microbiol.* **37**, 207-215.
- Shaw J.H., and Falkow S. (1988):** Model for invasion of human tissue culture cells by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **56**, 1625-1632.
- Schuhmacher M. and Brennan R. (2002):** Structural mechanisms of multidrug recognition and regulation by bacterial multidrug transcription factors. *Mol. Microbiol.* **45**, 885-893.
- Schwan E.T., Robertson B.D., Brade H., and van Putten J.P.M. (1995):** Gonococcal *rfaF* mutants express Rd₂ chemotype LPS and do not enter epithelial host cells. *Mol. Microbiol.* **15**, 267-275.

- Seifert H.S., Wright C.J., Jerse A.E., Cohen M.S., and Cannon J.G. (1994):** Multiple gonococcal pilin antigenetic variants are produced during experimental human infections. *J Clin Invest.* **93**, 2744-2749.
- Seya T., Hara T., Iwata K., Kuriyama S., Hasegawa T., Nagase Y., Miyagawa S., Matsumoto M., Hatanaka M., and Atinkson J.P. (1995):** Purification and functional properties of soluble forms of membrane cofactor proteins (CD46) of complement: identification of forms increased in cancer patients' sera. *Internat Immunol* **7**, 727-736.
- Snyder L.A.S., Butcher S.A., and Saunders N.J. (2001):** Comparative whole-genome analyses reveal over 100 putative phase-variable genes in the pathogenic *Neisseria* spp. *Microbiology* **147**, 2321-2332.
- Song W., Lang M., Chen R., Stein D.C. (2000):** Role of the lipooligosaccharide in Opa-independent invasion of *Neisseria gonorrhoeae* into human epithelial cells. *J. Exp. Med* **191**, 949-959.
- Southern E.M. (1975):** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* **98**, 503-517.
- Stanley P., Koronakis V., and Hughes C. (1998):** Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: A unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 309-333.
- Stephens D.S., and McGee Z.A. (1981):** Attachment of *Neisseria meningitidis* to human mucosal surfaces: influence of pili and type of receptor cell. *J Infect Dis.* **143**, 525-532.
- Stephens D.S., Hoffmann L.H., and McGee Z.A. (1983):** Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis* **148**, 369-376.
- Stephens D.S. (1989):** Gonococcal and meningococcal pathogenesis as defined by human cell, cell culture, and organ culture assays. *Clin Microbiol Rev.* **2**, 104-111.
- Stephens D.S., Spellman P.A., and Swartley J.S. (1993):** Effect of the (α 2 \rightarrow 8)-linked polysialic acid capsule on adherence of *Neisseria meningitidis* to human mucosal cells. *J Infect Dis.* **167**, 475-479.
- Stern A., Nickel P., Meyer T.F., and So M. (1984):** Opacity determinants of *Neisseria gonorrhoeae*: gene expression and chromosomal linkage to the gonococcal pilus gene. *Cell* **37**, 447-456.
- Stern A., Brown M., Nickel P., and Meyer T.F. (1986):** Opacity genes in *Neisseria gonorrhoeae*: control of phase and antigenetic variation. *Cell* **47**, 61-71.
- Stins M.F., Gilles F, and Kim K.S. (1997):** Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J. Neuroimmunol.* **76**, 81-90.

- Suker J., Feavers I.M., Achtmann M., Morelli G., Wang J.F., and Maiden M.C. (1994):** The porA gene in serogroup A meningococci: evolutionary stability and mechanism of genetic variation. *Mol Microbiol.* **12**, 253-265.
- Sulavik M.C., Gambino L.F., and Miller P.F. (1995):** The MarR repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*; prototypic member of bacterial regulatory proteins involved in sensing phenolic compounds. *Mol. Med.* **1**, 436-446.
- Sun Y.H., Bakshi S., Chalmers R., and Tang C.M. (2000):** Functional genomics of *Neisseria meningitidis* pathogenesis. *Nat. Med.* **6**, 1269-1273.
- Swanson J. (1973):** Studies on gonococcus infection. IV. Pili: their role in attachment of gonococcus to tissue culture cells. *J Exp Med.* **137**, 571-589.
- Swanson J. (1978):** Studies on gonococcus infection. XIV. Cell wall protein differences among color/opacity colony variants of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun.* **21**, 292-302.
- Swords E.W., Chance D.L., Cohn L.A., Shao J., Apicella M.A., and Smith A.L. (2002):** Acylation of the Lipooligosaccharide of *Haemophilus influenzae* and Colonization: an *htrB* mutation diminishes the colonization of human airway epithelial cells. *Infect. Immun.* **70**, 4661-4668.
- Tettelin H., Saunders N.J., Heidelberg J., Jeffries A.C., Nelson K.E., Eisen J.A., Ketchum K.A., Hood D.W., Peden J.F., Dodson R.J., Nelson W.C., Gwinn M.L., DeBoy R., Peterson J.D., Hickey E.K., Haft D.H., Salzberg S.L., White O., Fleischmann R.D., Dougherty B.A., Mason T., Ciecko A., Parksey D.S., Blair E., Cittone H., Clark E.B., Cotton M.D., Utterback T.R., Khouri H., Qin H., Vamathevan J., Gill J., Scarlato V., Massignani V., Pizza M., Grandi G., Sun L., Smith H.O., Fraser C.M., Moxon E.R., Rappuoli R., and Venter J.C. (2000):** Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* **28**, 1809-1815.
- Tsai C.M., and Civin C.I. (1991):** Eight lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis* react with an monoclonal antibody which binds lacto-N-neotetraose (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc). *Infec. Immun.* **59**, 3604-3609.
- Ulmer J.B., Burke C.J., Shi C., Friedmann A., Donnelly J.J., and Liu M.A. (1992):** Pore formation and mitogenicity in blood cells by the class 2 protein of *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **31**, 19266-19271.
- Unkmeir A., Kämmerer U., Stade A., Hübner C., Haller S., Kolb-Mäurer A., Frosch M. and Dietrich G. (2002):** Lipooligosaccharide and Polysaccharide Capsule: Virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human dendritic cells. *Infec. Immun.* **70**, 2454-2462.
- Unkmeir A., Latsch K., Dietrich G., Wintermeyer E., Schinke B., Schwender S., Kim S. K., Eigenthaler M., and Frosch M. (2002):** Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol. Microbiol.* **46**, 933-946.

- Van der Ende A., Hopman C., Zaat S., Oude Essink B., Berkhout B., and Dankert J. (1995):** Variable expression of class1 outer membran protein in *Neisseria meningitidis* is caused by variation in the spacing between -10 and -35 region of the promotor. *J. Bacteriol.* **177**, 2475-2480.
- Van der Ley P., Heckels J.E., Virji M., Hoogerhout P., and Poolman J.T. (1991):** Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria spp.* *Infec. Immun.* **59**, 2963-2971.
- Van Putten J.P.M. (1993):** Phase variation of lipopolysaccharides directs interconversion of invasive and immuno-resistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae*. *EMBO J.* **12**, 4043-4051.
- Van Putten J.P.M., Grassme H.U., Robertson B.D. and Schwan E.T. (1995):** Function of lipopolysaccharides in the invasion of *Neisseria gonorrhoeae* into human mucosal cells. *Prog Clin Biol Res.* **392**, 49-58.
- Van Putten J.P.M., Duensing T.D., and Cole R.L. (1998):** Entry of OpaA⁺ gonococci into HEp-2 cells requires concerted action of glycoaminoglycans, fibronectin and integrin receptors. *Mol. Microbiol.* **424**, 369-379.
- Vedros N.A. (1984):** Genus I : Neisseriae. In Krieg, N.R. and Holt J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Sytematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore*, 290-296.
- Vieusseux M. (1806):** Memoire sur la maladie qui a regne a Geneve au printemps de 1805. *J Med Chir Pharmcol* **11**, 163-182.
- Virji M., Kayhty H., Ferguson D.J.P., Heckels J.E., and Moxon E.R. (1991):** The role of pili in the interaction of pathogenic *Neisseria* with cultured human endothelial cells. *Mol. Microbiol.* **5**, 1831-1841.
- Virji M., Makepeace K., Peak I., Ferguson D.J.P., Achtmann M., Sarkari J. and Moxon E.R (1992):** Expression of the *opc* protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **6**, 2785-2795.
- Virji M., Makepeace K., Peak I., Ferguson D.J.P., Achtmann M., and Moxon E.R (1993):** Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol. Microbiol.* **18**, 751-754.
- Virji M., Makepeace K., Peak I., Ferguson D., Jennings M., and Moxon E.R. (1995):** Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol. Microbiol.* **18**, 751-754.
- Virji M. (1996):** Meningococcal disease: epidemiology and pathogenesis. *Trends Microbiol.* **4**, 466-469.
- Virji M., Makepeace K., Ferguson D.J.P., and Watt S.M. (1996):** Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic *Neisseriae*. *Mol Microbiol* **22**, 941-950.

Vogel U., and Frosch M. (1999): Mechanism of neisserial serum resistance. *Mol. Microbiol.* **32**, 1133-1139.

Wang J.F., Caugant D.A., Li X., Hu X., Poolman J.T., Crowe B.A., and Achtmann M. (1992): Clonal and antigenic analysis of serogroup A *Neisseria meningitidis* with particular reference to epidemiological features of epidemic meningitis in the People's Republic of China. *Infect. Immun.* **60**, 5267-5282.

Weichselbaum A. (1887): Über die Ätiologie der akuten Meningitis cerebro-spinalis. *Fortschr.Med.* **5**, 573-583.

White D., Maneewannakul K., Hofe E., Zillman M., Eisenberg W., Field A., and Levy S.B. (1997): Inhibition of the multiple antibiotic resistance (*mar*) Operon in *Escherichia coli* by antisense DNA analogs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **41**, 2699-2704.

Wilder-Smith A., and Memih Z. (2003): Meningococcal disease and travel. *International Journal of Antimicrobial Agents* **21**, 102-106.

Winzeler E.A., Lee B., McCusker J.H., and Davis R.W. (1999): Whole genome genetic-typing in yeast using high-density oligonucleotide arrays. *Parasitology* **118**, 73-80.

Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Peng T.I., Jones D.P., and Wang X. (1997): Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondrial blocked. *Science* **275**, 1129-1132.

Zhou D., Stephens D.S., Gibson B.W., Engstrom J., McAllister C.F., Lee F.K.N., and Apicella M.A. (1994). Lipooligosaccharide biosynthesis in pathogenic *Neisseria*: cloning, identification and characterisation of the phosphoglucomutase gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 11162-11169.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
abs	absolut
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
As	Aminosäure
bp	Basenpaar
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
CFU	<i>colony forming units</i>
CIP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
CSPD	Dinatrium3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'- -(5'-chloro)tricyclodecan}-4-yl)phenylphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DIG	Digoxigen
DMF	Dimethylformamid
DTT	Diothiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbant assay</i>
FCS	fetales Kälberserum
GC-Agar	Gonokokken-Agar
IHT	Inseln horizontalen DNA Transfers
IPTG	Isopropylthio- β -D-galaktosidase
HS	Humanes Serum
Ka	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KDO	2-Keto-3-Deoxyoctansäure
LB	Luria-Broth
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
MG	Molekulargewicht
MDR	<i>multidrug resistance transporter</i>
MHK	minimale Hemmkonzentration
MLST	Multi-Locus-Sequence-Typing-Ansatz
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NHS	normales humanes Serum
NMA	<i>Neisseria meningitidis</i> Serogruppe A
NMB	<i>Neisseria meningitidis</i> Serogruppe B
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate –buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol

Pos	Position
Rnase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spec	Spectinomycin
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA Puffer; ein Elektrophoresepuffer
TEMED	N, N, N', N', - Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
VDAC	<i>voltage-dependent anionic channel</i>
VT	Volumenanteil
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactosid

LEBENS LAUF

Name:	Claudia Hübner
Familienstand:	ledig
Geboren:	17.04.1976 in Köthen/Anhalt
Schul Ausbildung:	
1982-1991	Friedrich Engels Oberschule Dessau
1991-1994	Europagymnasium Dessau
Schulabschluss:	allgemeine Hochschulreife
Hochschulausbildung:	
1994 – 2000	Studium der Biologie an der Friedrich Schiller Universität Jena
1996	Vordiplom
1998	Diplomprüfung
1998	Diplomarbeit am Hans Knöll Institut für Naturstoff-Forschung in Jena Thema der Diplomarbeit: Molekulare Klonierung und Charakterisierung von Proteinen des intrazellulären Transportes der humanpathogenen Hefe <i>Candida albicans</i>
2000	Abschluss: Diplom-Biologin
seit 2000:	Beginn der vorliegenden Dissertation im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg mit freundlicher Genehmigung durch Herrn Prof. Dr. M. Frosch angefertigt.

Herrn Prof. J. Kreft möchte ich für die Übernahme der Betreuung innerhalb der biologischen Fakultät danken, wodurch diese Arbeit erst ermöglicht wurde.

Besonderen Dank gilt Dr. rer. nat. G. Dietrich und Dr. med. A. Unkmeir-Schuberts für die Konzeption und Förderung der Arbeit, sowie die Betreuung aller wissenschaftlichen Fragen.

Ganz besonderen Dank verdienen A. Schramm-Glück und U. Panzner ohne deren unermüdliche Mithilfe viele der in dieser Arbeit präsentierten Daten niemals zustande gekommen wären.

Danken möchte ich auch der gesamten Arbeitsgruppe Vogel, insbesondere Frau G. Heinze und C. Meinhardt, sowie R. Jägerhuber und S. Theiss für ihre stete Hilfsbereitschaft, die viele Schritte dieser Arbeit erleichtert hat.

Mein Dank gilt außerdem meinen Eltern und meinem Freund Christoph Knapp, ohne deren unermüdliche Unterstützung ich jetzt nicht da wäre, wo ich jetzt bin.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Diese Arbeit hat bisher in gleicher oder ähnlicher Form keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

