

Analyse von *Neisseria meningitidis* mit Protein Microarrays

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde des
Fachbereichs Biologie Chemie Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sigrid Steller
Berlin, 2004

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik Berlin in der Abteilung von Herrn Professor Dr. Lehrach von August 2001 bis Juni 2004 durchgeführt. Der Verfasser versichert, die vorliegende Arbeit eigenständig durchgeführt und alle Hilfsmittel angegeben zu haben.

1. Gutachter: Professor Dr. Hans Lehrach
2. Gutachter: Professor Dr. Volker Erdmann

Ort und Datum der Disputation: Berlin, 18.03.2005

für meinen lieben Andreas

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Meningitis.....	1
1.2. <i>Neisseria meningitidis</i>	1
1.3. Oberflächenstrukturen von <i>Neisseria meningitidis</i>	2
1.4. Pathogenitätsfaktoren.....	4
1.5. Phasenvariation.....	5
1.6. Protein Microarray Technologie.....	7
2. Zielsetzung	11
3. Materialien	12
3.1. Feinchemikalien und Lösungsmittel.....	12
3.2. Enzyme und DNA.....	13
3.3. Antikörper und Seren.....	14
3.4. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	14
3.5. Kits.....	14
3.6. Gebrauchswaren.....	15
3.7. Geräte.....	15
3.8. Computerprogramme und <i>online</i> Datenbanken.....	16
3.9. Medien.....	17
4. Methoden	18
4.1. Molekularbiologische Methoden.....	18
4.1.1. DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	18
4.1.2. DNA Agarose-Gelelektrophorese.....	18
4.1.3. Präparative Gelextraktion.....	19
4.1.4. Vektorpräparation (Plasmidisolierung).....	19
4.1.5. Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA.....	20
4.1.6. QIAquick PCR-Purification	21
4.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten.....	21
4.1.8. Herstellung Hitzeschock-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	21
4.1.9. Transformation durch Hitzeschock.....	22
4.1.10. Minipräparation von Plasmid-DNA.....	22
4.1.11. Bestimmung der DNA-Konzentration	23
4.2. Proteinchemische Methoden.....	23
4.2.1. Proteinexpression in <i>E. coli</i>	23
4.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford.....	24
4.2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	25
4.2.4. Western-Blotting.....	26
4.2.5. Immunchemische Nachweise mit Seren.....	26
4.2.6. Dot-Immunassay.....	26

4.3. Microarrays.....	27
4.3.1. Herstellung der Microarrays.....	27
4.3.2. Spotten.....	28
4.3.3. Serumscreening.....	28
4.3.4. Scannen.....	29
5. Ergebnisse	30
5.1. Auswahl phasenvariabler Gene von <i>Neisseria meningitidis</i>	30
5.1.1. Amplifikation der Genprodukte.....	33
5.1.2. Klonierung.....	34
5.1.3. Proteinexpression und -reinigung.....	34
5.1.4. Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen.....	39
5.2. Screening mit humanen Seren von Impfstoffkandidaten auf Proteinarrays	40
5.2.1. Vorversuche auf Dotblots.....	40
5.2.2. Test von verschiedenen Microarrayoberflächen.....	42
5.2.3. Untersuchung auf Polyacrylamid.....	44
5.2.4. Untersuchung auf Nitrocellulose.....	46
5.3. Kompetitionsversuch zu Omp85.....	52
5.4. Verkürzungen von Omp85 und PorA.....	53
5.4.1. Verkürzungen von Omp85.....	53
5.4.2. Verkürzungen von PorA.....	56
5.5. Screening mit Patientenseren.....	58
5.5.1. Verschiedene Opa-Proteine.....	61
5.5.2. Untersuchung der verkürzten Konstrukte mit Patientenseren.....	62
6. Diskussion	64
7. Literaturverzeichnis	74
Anhang	87