

1. Einleitung

1.1. Meningitis

Infektionskrankheiten werden durch pathogene Mikroorganismen verursacht. Zwar sind im 20. Jahrhundert die bakteriellen Infektionskrankheiten durch die Behandlung mit Antibiotika unterschiedlichster Wirkungsweise weitgehend beherrschbar geworden, doch bleibt der Kampf gegen tödliche, durch Bakterien verursachte Infektionskrankheiten eine dauernde Herausforderung. Dabei gehört bakterielle Meningitis (Hirnhautentzündung) zu einer der gefährlichsten Infektionskrankheiten. Erkrankungen sind weltweit verbreitet, allein in Deutschland erkrankt jährlich einer von 100.000 Einwohnern. Die am stärksten betroffene Bevölkerungsschicht sind Kinder unter vier Jahren (Berger *et al.*, 1988; Epidemiologisches Bulletin, 2002). Trotz Antibiotikatherapien ist die Sterblichkeit mit 10 % hoch, weitere 20 % der Patienten können Folgeschäden, wie Hörminderung oder neurologische Defekte, davontragen (Edwards und Baker, 1981; Naess *et al.*, 1994). Große Ausbrüche von Meningokokkenkrankungen werden regelmäßig vor allem aus dem „Meningitisgürtel“ in Afrika, der von Gambia bis nach Äthiopien reicht, berichtet, aber auch aus China und Südamerika. Diese Epidemien treten in Abständen von 5 – 10 Jahren auf, dabei erkranken bis zu 500 von 100.000 Einwohnern (Yang *et al.*, 1996; Tikhomirov *et al.*, 1997; Cooksen *et al.*, 1998; Greenwood, 1999; weekly epidemiological record, 1999, 2003).

1.2. *Neisseria meningitidis*

Bakterien der Gattung *Neisseria* sind gram-negative, unbewegliche und sporenlose Diplokokken der Familie *Neisseriaceae*. Zwölf verschiedene Spezies konnten beim Menschen isoliert werden, doch nur zwei Arten sind pathogen: *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae*. Während die Meningokokken (*Neisseria meningitidis*) Gehirnhautentzündung auszulösen vermögen, stellen die Gonokokken (*Neisseria gonorrhoeae*) den Erreger der Gonorrhoe (“Tripper”) dar. Der einzige natürliche Wirt der Meningokokken und Gonokokken ist der Mensch (Morse und Knapp, 1991). Sie sind auf die Besiedlung der Schleimhäute spezialisiert und können außerhalb des Wirtes nicht

überleben. Erstmals nachgewiesen und isoliert wurden die Meningokokken 1887 von Weiselbaum (Weiselbaum, 1887), nachdem bereits 1805 die durch sie verursachte Meningitis epidemica als eigenes Krankheitsbild beschrieben worden war (Vieusseux, 1806). Meningokokken werden durch Tröpfcheninfektion übertragen. 10 % der Bevölkerung tragen den Erreger in sich ohne zu erkranken (Greenfield *et al.*, 1971). Sie werden daher als Kommensalen des Nasen-Rachen-Raumes angesehen, die nur bei einer Störung des Erreger-Wirts-Gleichgewichts zu einer Infektion führen (Virji, 1996). Die Verwandlung der symptomlos persistierenden Meningokokken in ein äußerst aggressives Agens, das die Blut-Hirn-Schranke in kürzester Zeit überwindet und eine eitrige Infektion der Hirnhäute verursacht, ist bisher nur wenig aufgeklärt (Meyer, 1989). Sicher spielen dabei Variationen der Oberflächenstrukturen eine wichtige Rolle, die zu schlagartigen Änderungen des Phänotyps führen können. Es werden aber auch septische Verlaufsformen ohne meningitische Beteiligung beobachtet, bei denen große Mengen an bakteriellen Zellwandbestandteilen, vor allem des Endotoxins (Lipopolysaccharid), in die Blutbahn freigesetzt werden. Diese sind für das Krankheitsbild des septischen Schocks mit schweren Störungen des Gerinnungssystems verantwortlich (Brandtzaeg *et al.*, 1992). Meningokokken gehören zu den natürlich kompetenten Bakterienarten, d.h. sie sind in der Lage, freie DNA aus der Umwelt aufzunehmen und diese neue Erbinformation in ihr Genom zu integrieren. Hierdurch entstehen beständig neue Varianten, die sich in einer menschlichen Population schnell ausbreiten und weiter verändern können (Catlin, 1960).

1.3. Oberflächenstrukturen von *Neisseria meningitidis*

Eine Meningokokken-Infektion beginnt im Nasen-Rachen-Raum (Nasopharynx). Nach der Anhaftung der Meningokokken durch die Pili an die nasopharygealen Schleimhaut durchqueren diese die Epithelzellen des Nasopharynx. Neben diesen Pili, die für die primäre Rezeptorerkennung auf Epithelzellen verantwortlich sind (Stephens, 1989), folgen Interaktionen von verschiedenen Membranproteinen (Opa, Opc) mit humanen Zellen. Somit kann das Bakterium über diese Opa-Proteine einen engen Kontakt zur Wirtszelle herstellen (Dehio *et al.*, 1998). Abbildung 1 zeigt den Zellwandaufbau bei *Neisseria meningitidis*.

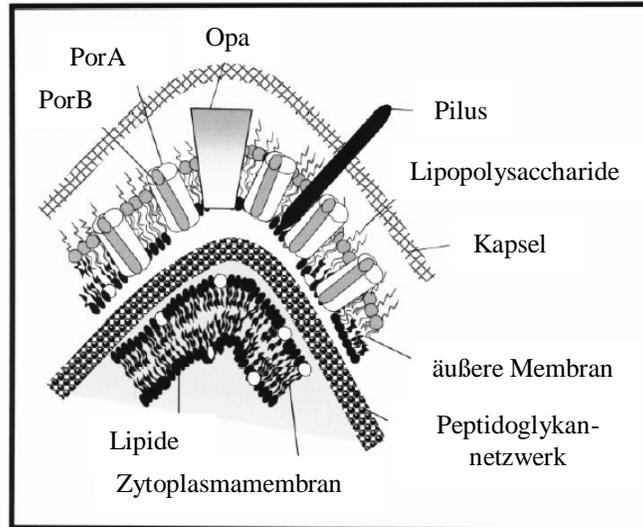


Abb. 1: Oberflächenstrukturen von *Neisseria meningitidis* (aus Pollard und Frasch, 2001).

Wie alle gram-negativen Bakterien besitzen Neisserien zwei Zellmembranen, eine äußere und eine innere, die durch das Peptidoglykannetzwerk (Murinsacculus) getrennt werden (Gram, 1884). Lipopolysaccharide (LPS) bilden den Hauptbestandteil der äußeren Membran. Das LPS, das aufgrund seiner pathophysiologischen Wirkung auch als Endotoxin bezeichnet wird (Rietschel *et al.*, 1994), besteht aus drei Regionen: dem Lipid A, Kernoligosacchariden und O-Seitenketten. Bei Neisserien fehlt diese O-spezifische Seitenkette. Das Lipopolysaccharid wird deshalb als Lipooligosaccharid (LOS) bezeichnet (Kahler und Stephens, 1998). Einige dieser Oligosaccharide ähneln den humanen Glykosphingolipiden (Mandrell *et al.*, 1992) und spielen damit eine wichtige Rolle bei der Virulenz. Ferner ist der Lipid A-Teil für den septischen Schock verantwortlich (Rietschel *et al.*, 1996). Die äußeren Membranproteine werden nach ihrer Größe in fünf Gruppen eingeteilt (Tsai *et al.*, 1981), siehe untenstehende Tabelle 1.

Tab. 1: Äußere Membranproteine von *Neisseria meningitidis*.

Klasse	Hauptantigene
Klasse 1	PorA
Klasse 2/3	PorB
Klasse 4	RmpM
Klasse 5	Opa, Opc

Porine bilden die zentralen Proteinkomponenten in der äußeren Membran und dienen als Transportkanäle für Ionen und Nährstoffe (Benz *et al.*, 1988). *Neisseria meningitidis* besitzt zwei große äußere Membranporine, PorA und PorB (Lynch *et al.*, 1984; Song *et al.*, 1998). Das PorB Protein bildet anionenselektive Poren, während das PorA Porin kationenselektiv ist (Tomassen *et al.*, 1990). Die Opa und Opc Proteine der Klasse 5 spielen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion an die menschliche Zelle sowie der Invasion in die Epithelzellen. Diese Proteine sind extrem heterogen und zeigen sowohl Antigen- als auch Phasenvariation (De Vries *et al.*, 1996; Hauck und Meyer, 2003).

1.4. Pathogenitätsfaktoren

Zu den wichtigsten Pathogenitätsfaktoren, die für die Virulenz von *Neisseria meningitidis* verantwortlich sind, gehört ein vom Erreger exprimiertes Kapselpolysaccharid. Dieses Kapselpolysaccharid umgibt die gesamte Bakterienzelle wie einen Schutzwall und ermöglicht dem Bakterium damit das Überleben im Blut. Die unterschiedliche Zusammensetzung dieser Kapselpolysaccharide bildet die Grundlage für die Einteilung der Meningokokken in zwölf Serogruppen (A, B, C, 29-E, H, I, K, L, W-135, X, Y, Z) (Vedros, 1987). Klinische Relevanz besitzen nur fünf dieser Serogruppen, A, B, C, W-135 und Y, die in 95 % aller Meningokokkenerkrankungen auftreten. In Mitteleuropa und Nordamerika treten hauptsächlich Erkrankungen der Serogruppe B mit 50 bis 70 % der Krankheitsfälle auf, gefolgt von der Serogruppe C mit etwa 30 % (Schlech *et al.*, 1985; Connolly und Noah, 1999), während die Serogruppe A der häufigste Erreger der Meningokokkenepidemien in Afrika und China ist (Wang *et al.*, 1992; Achtman, 1997).

Eine Möglichkeit zur aktiven Immunisierung gegen die verschiedenen Serogruppen ist die Verwendung von Impfstoffen, die aus den entsprechenden Kapselpolysacchariden hergestellt werden. Den ersten erfolgreich eingesetzten Kapselpolysaccharidimpfstoff gegen die Serogruppe A und C bei *Neisseria meningitidis* generierten Gotschlich und Mitarbeiter (Gotschlich *et al.*, 1969). Im Gegensatz zu den Kapselpolysacchariden der Serogruppe A und C ist das Kapselpolysaccharid der Serogruppe B nur schwach immunogen (Wyle *et al.*, 1972), denn es ist chemisch und immunologisch identisch mit der terminalen Kohlenhydratstruktur eines Glykoproteins des menschlichen Gehirns. Dieses

Glykoprotein, das neuronale Zelladhäsionsmolekül (N-CAM), ist für Zell- Zellinteraktionen verantwortlich (Finne *et al.*, 1983; Bitter-Suermann und Roth, 1987) und kommt vor allem auf Zelloberflächen der Neuronen und der muskelbildenden Zellen vor. Daher wird beim Menschen durch Meningokokken der Serogruppe B keine Antikörperreaktion hervorgerufen, da dieses Zelladhäsionsmolekül vom menschlichen Immunsystem nicht als fremd erkannt wird (Hayrinen *et al.*, 1995), was die Herstellung eines Impfstoffes gegen die Serogruppe B erschwert. Alternativ wurden Versuche mit Impfstoffen unternommen, die nicht an die Kapsel gebunden sind. Dabei handelt es sich einerseits um äußere Membranvesikel (OMVs) (Zollinger *et al.*, 1987; Bjune *et al.*, 1991; Boslego *et al.*, 1995; Perkins *et al.*, 1998), und andererseits um einzelne spezifische äußere Membranproteine wie z.B. PorA (Peeters *et al.*, 1996; van der Voort *et al.*, 1997) oder Opc-Proteine (Musacchio *et al.*, 1997). Jedoch induzierten auch diese Impfstoffe keine langanhaltende Immunität und keinen aktiven Schutz im Kindesalter (Wildes und Tunkel, 2002). Damit ist es bis heute nicht gelungen, einen effektiven Impfstoff gegen die Serogruppe B zu entwickeln (Poolman, 1995; Jódar *et al.*, 2002).

1.5. Phasenvariation

Bei der Pathogenität spielt Phasenvariation eine große Rolle, es ist eine Strategie, die von vielen Bakterienarten benutzt wird. Dabei findet eine Regulation der Genexpression durch die Variation der Anzahl repetitiver Elemente in der Gensequenz statt, was die Anpassung der Bakterienpopulation an wechselnde Umwelteinflüsse erleichtert (Moxon *et al.*, 1994). Es ist bemerkenswert, daß bei *Neisseria* die im Zusammenhang mit Adhäsion und Invasion stehenden Oberflächenstrukturen wie Pilus (Jennings *et al.*, 1998), Kapsel (Hammerschmidt *et al.*, 1996), äußere Membranproteine (Sarkari *et al.*, 1994; van der Ende *et al.*, 1995), Hämoglobin Rezeptoren (Lewis *et al.*, 1999) und Lipopolysaccharide (Jennings *et al.*, 1995; Jennings *et al.*, 1999; Berrington *et al.*, 2002) in ihrer Struktur variabel sind und von Zelle zu Zelle variieren können. Durch spontanes An- und Abschalten der Gene können innerhalb weniger Generationen strukturell und serologisch variante Formen der Proteine hervorgebracht werden. Dies läßt sich in Kultur nachvollziehen, indem man einen Stamm wiederholt auf Agarplatten passagiert, es bilden sich variante Kolonietypen. Dieses

Phänomen dient primär der Umgehung des Immunsystems, denn eine Immunantwort, die sich gegen zwischenzeitlich veränderte Oberflächenantigene richtet, ist unwirksam. Tatsächlich spielt die immunologische Täuschung bei pathogenen Neisserien eine wichtige Rolle und stellt zugleich ein Hindernis bei der Entwicklung wirksamer Impfstoffe dar (Meyer, 1989).

Phasenvariation wurde erstmals bei *Haemophilus influenza* nachgewiesen. Hier konnten 9 Gene mit einem tetramerischen Sequenzmotiv bestimmt werden (Hood *et al.*, 1996). Im Genom von *Helicobacter pylori* wurden 27 mögliche phasenvariable Gene gefunden (Saunders *et al.*, 1998), von denen einige bereits experimentell bestätigt wurden (Peck *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Appelmelk *et al.*, 1999, 2000; Josenhans *et al.*, 2000; Yamaoka *et al.*, 2000). Im Genom von *Neisseria meningitidis* MC58 (Tettelin *et al.*, 2000) wurden 65 putative phasenvariable Gene durch Sequenzanalyse identifiziert (Saunders *et al.*, 2000). Eine erweiterte Analyse und der Vergleich der sequenzierten Genome von *Neisseria meningitidis* Stamm Z2491 (Serogruppe A), *Neisseria gonorrhoeae* Stamm FA1090 sowie *Neisseria meningitidis* Stamm MC58 (Serogruppe B) (Snyder *et al.*, 2001) führte zur Identifikation von 102 phasenvariablen Genen bei *Neisseria meningitidis* Stamm MC58. Davon kamen 11 Gene nur bei *Neisseria meningitidis* Stamm MC58 vor und zeigten keine Homologien in den anderen Stämmen. Damit zeigt *Neisseria meningitidis* MC58 die bisher größte Anzahl an putativen phasenvariablen Genen in allen bekannten Genomen. Zur Phasenvariation kommt es durch reversible Änderungen innerhalb einfacher DNA Repeats. Diese repetitiven Sequenzen können entweder innerhalb des Gens, dem Promotor oder in der Nähe der Promotoregion lokalisiert sein. Die Instabilität dieser Repeats und die Änderung ihrer Länge während der Replikation führen zu Verschiebungen des Leserahmens und beeinflussen damit die Translation. Änderungen im Promotor beeinflussen ebenfalls die Genexpression (Stern *et al.*, 1986). Die Expression wird durch einen Mechanismus kontrolliert, der als „slipped strand mispairing“ bekannt ist und hier am Beispiel eines Opa-Proteins dargestellt werden soll (Abbildung 2). Die Opa-Proteine gehören zur Klasse 5 der äußeren Membranproteine und geben den Kolonien ein opaques Erscheinungsbild (Stern *et al.*, 1984). Sie stehen in direktem Kontakt mit dem Wirt und weisen eine hohe Phasenvarianz auf. Die antigene Variabilität wird durch die gleichzeitige Expression mehrerer Opa-Proteine erreicht. Die Anzahl der opa-Gene, die für jeweils ein

Opa-Protein kodieren, beträgt bei den verschiedenen Stämmen der Meningokokken drei bis vier, die alle gleichzeitig exprimiert werden können (Achtman *et al.*, 1991).

Start: ATG AAT CCA GCC CCC AAA AAA
M N P A P K K

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
CCT	TCT	CTT	CTC	TTC	TCT	TCT	CTT	CTC	TTC	TCT	CTT	
P	S	L	L	F	S	S	L	L	F	S	S	L

CCG CAG CGC AGG CGG CAA GTG AAG ACG GCA GCC GCA GCC CGT in Frame
P Q R R R Q V K T A A A A R.....

↓
Phasenvariation

Start: ATG AAT CCA GCC CCC AAA AAA
M N P A P K K

1	2	3	4	5	6	7	8	9		
CCT	TCT	CTT	CTC	TTC	TCT	TCT	CTT	CTC	TTC	TCT
P	S	L	L	F	S	S	L	L	F	S

TTC CGC AGC GCA GGC GGC AAG TGA out of Frame
F R S A G G K Stop

Abb. 2: Phasenvariation am Beispiel eines Opa-Proteins durch „slipped strand mispairing“.

Das Beispiel in Abbildung 2 zeigt den 5´-Bereich der DNA Sequenz kodierend für ein Opa-Protein. Zwischen dem Startcondon (ATG) und dem Hauptteil des Leserahmens in der Signalpeptidregion ist eine Anzahl von pentamerischen Repeats mit der Sequenz CTTCT vorhanden. Während der Replikation kann es zur Addition oder Deletion von Pentameren kommen. Bereits der Verlust eines Pentameres führt zur Verschiebung des Leserahmens und damit zu einer veränderten Translation. Das Protein ist nicht mehr in Frame und wird vorzeitig abgebrochen, sobald ein Stopcodon auftritt, es kommt zur Bildung eines nicht funktionellen Opa-Proteins.

1.6. Protein Microarray Technologie

Nach der Genomsequenzierung im “High throughput” Maßstab, die die Möglichkeit geschaffen hatte, Tausende von neuen Genen zu identifizieren (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001), folgte im nächsten Schritt die Aufdeckung der funktionellen Bedeutung. Dies

gelang mit Hilfe der Microarray Technologie, die ihren Durchbruch in den neunziger Jahren erhielt, als die dafür konzipierten Geräte wie Arrayer (Spottingroboter) und Scanner die Herstellung und Auswertung von Microarrays mit Tausenden von Messpunkten ermöglichten. Die ersten kommerziellen DNA Microarrays kamen wenig später auf den Markt. Ein DNA Microarray ist ein Träger, auf dem punktgenau eine definierte Anzahl an DNA Proben aufgebracht wird. Mittlerweile gelingt es *high density DNA microarrays* mit bis zu 30.000 cDNAs auf einem Objektträger herzustellen. Solche DNA Arrays ermöglichen es, z.B. das komplette Transkriptionsmuster von Tumoren oder Geweben in einem Experiment zu erfassen (Unger *et al.*, 2001). Da jedoch von einer DNA-Sequenz nicht direkt auf das Proteinmuster einer Zelle geschlossen werden kann, wurde versucht, in Anlehnung an die DNA Microarray Technologie, Protein Microarrays zu entwickeln. Proteinarrays bieten eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten. So können Protein-Protein-Interaktionen, Enzym-Substrat, Antikörper-Antigen- und Protein-DNA-Wechselwirkungen untersucht werden. Doch steckt die Entwicklung von Protein Microarrays noch in den Anfängen. DNA und Proteine sind zwei völlig verschiedene Molekülarten, die sich stark in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften unterscheiden. Während DNA definierte helikale Strukturen mit negativ geladenen Phosphatgruppen aufweist, zeigen Proteine individuell gefaltete Strukturen. Außerdem hängen die Proteineigenschaften oft von posttranslationalen Modifikationen ab wie z.B. Glykosylierungen oder Phosphorylierungen. Deshalb können zwar die Techniken der Aufbringung und Auswertung größtenteils von DNA Arrays auf Proteinarrays übertragen werden, nicht jedoch die der Bindung der Proteine auf eine geeignete Oberfläche. Proteinarrays benötigen eine definierte und funktionalisierte Oberfläche für die Proteinimmobilisierung. In unserer Abteilung wurden grundlegende Entwicklungen von Protein Microarrays durchgeführt (Büssow *et al.*, 1998; Lueking *et al.*, 1999). Ein erster wichtiger Punkt bei der Herstellung von Protein Microarrays ist die Gewinnung der Proteine. Diese können z.B. als rekombinante Proteine aus cDNA Expressionsbibliotheken (Büssow *et al.*, 1998, 2000; Clark *et al.*, 1999) oder durch das Subklonieren von offenen Leserahmen mit entsprechenden spezifischen Primern (Walhout *et al.*, 2000) gewonnen werden. Die Proteine werden anschließend auf einem Träger immobilisiert, dabei erlauben Roboter eine Anordnung der Proben in hoher Dichte. Ausschlaggebend ist die

Beschaffenheit der Oberfläche. Erste Microarrays wurden in unserer Gruppe mit PVDF-Membranen hergestellt. Bakterienlysate von 92 humanen cDNA Klonen wurden in einer Dichte von 600 Spots/cm² gespottet und mit spezifischen Antikörpern gescreent (Lueking *et al.*, 1999). Als eine weitere Möglichkeit der Proteinimmobilisierung wurde die Einlagerung von Proteinen in modifizierte Polyacrylamid Gelpads untersucht. Doch benötigte diese Art von Microarrays angefertigte Masken, um die Diffusion der Moleküle zu beschleunigen (Arenkov *et al.*, 2000). Weiterhin war die direkte Bindung der Proteine an eine feste, zuvor (z.B. mit Aldehyd) behandelte Glasoberfläche, untersucht worden (MacBeath und Schreiber, 2000). Damit gelang der erste große Proteom Microarray. 5.800 aufgereinigte Hefeproteine waren auf eine Glasoberfläche gespottet und auf Protein-Protein-Interaktionen untersucht worden (Zhu *et al.*, 2001).

Ein wichtiger Einsatz von Proteinarrays ist die Identifizierung von spezifischen Antikörpern für die Diagnose. Mit Hilfe von Proteinarrays kann das Vorhandensein bzw. das Fehlen spezifischer Antikörper im Serum von Patienten nachgewiesen werden, wobei alters- und geschlechtsgleiche Kontrollen herangezogen werden (Cahill, 2001; Haab *et al.*, 2001). Der erste Microarray, bei dem Serenstudien durchgeführt wurden, untersuchte 18 bekannte Autoantigene von Patienten mit einer Autoimmunerkrankung (Joos *et al.*, 2000). In einer weiteren Studie mit Autoantigenen wurden auf einem Array 196 verschiedene Moleküle aufgebracht und mit Seren-Gemischen von unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen inkubiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Detektion um das sechsfache sensitiver war, als beim herkömmlichen ELISA (Robinson *et al.*, 2002).

Neben diesen Protein Microarrays wurden ebenfalls Antikörperarrays entwickelt, wie z.B. der erste Hochdichte Antikörper Microarray mit 18342 scFv-Fragmenten aus einer *phage-display* Bibliothek. Bei diesem Microarray wurden mit spezifischen Antigenen Antikörper-Antigen Wechselwirkungen untersucht (de Wildt *et al.*, 2000). Die Protein Microarrays können daher generell in zwei Gruppen eingeteilt werden: analytische Arrays und funktionale Arrays. Analytische Microarrays beinhalten eine hohe Dichte von Antikörpern oder Antigenen, die entsprechend nach spezifischen Protein- bzw. Antikörperbindungen suchen. Funktionale Arrays werden dagegen genutzt, um Protein-Protein, Protein-DNA, Protein-Lipid oder Enzym-Substrat Interaktionen zu bestimmen. Weiterhin wurden Peptidarrays hergestellt (Fodor *et al.*, 1991; Houseman *et al.*, 2002) und Gewebe auf Arrays

gebracht (Kononen *et al.*, 1998). Allerdings wurde bisher noch kein Microarray mit bakteriellen Proteinen entwickelt. Bei *Neisseria meningitidis* konnten DNA Microarrays eingesetzt werden, um die Genregulation während der Interaktion mit humanen Epithelzellen zu verfolgen (Wells *et al.*, 2001; Grifantini *et al.*, 2002), doch wurden bisher noch keine Proteine von *Neisseria meningitidis* auf einem Array untersucht. Neisserien sind ausschließlich humanpathogene Bakterien, und ein geeignetes Tiermodell, mit dem die Bakterien-Wirtszellinteraktionen genau untersucht werden könnte, fehlt. Die meisten Modelle wurden nach intraperitonealer Infektion der Tiere für Untersuchungen zu Serumresistenz verwendet (Wang und Frasch, 1984; Saukkonen *et al.*, 1989) und sind nicht geeignet, um die Beteiligung bestimmter Proteine an der Infektion zu zeigen. Das Screenen von Proteinarrays mit Antikörpern aus Serum könnte daher bei der Suche nach krankheitsspezifischen Proteinen hilfreich sein. Weiterhin bieten Proteinarrays gegenüber herkömmlichen Techniken wie ELISA, der Western-Blot-Analyse oder dem Radioimmunassay den Vorteil, daß nur geringe Probenvolumina benötigt werden und Antigene parallel auf einem Array detektiert werden können.

2. Zielsetzung

Immer noch sterben weltweit Menschen an Meningitis, in Deutschland erkrankt jährlich einer von 100.000 Einwohnern. Jedoch ist ein Impfschutz gegen die Serogruppe B, die am häufigsten in Europa und Nordamerika auftretende Meningokokken-Infektion, nicht möglich. Die Identifizierung von krankheitsspezifischen Proteinen ist dabei ein wichtiger Schwerpunkt in der biomedizinischen Forschung, und die Herstellung von Proteinarrays würde diese Suche nach diagnostischen Markern erleichtern. Das Genom von *Neisseria meningitidis* Stamm MC58 beinhaltet 2.158 vorhergesagte offene Leserahmen. Eine besondere Gruppe stellen die phasenvariablen Gene dar, die biologisch interessant sind, da sie eine wichtige Rolle bei der Pathogenität spielen könnten. Da hierzu noch wenig bekannt war, sollte in dieser Arbeit zum besseren Verständnis von phasenvariablen Genen während der Infektion ein Protein Microarray mit deren Expressionsprodukten hergestellt und mit humanen Seren gescreent werden. 102 verschiedene putative phasenvariable Gene wurden bei *Neisseria meningitidis* Serogruppe B vorhergesagt (Synder *et al.*, 2001). Ausgehend von dieser Information sollten zuerst die Gene mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert, in Expressionsvektoren kloniert und die Proteine exprimiert werden. Die so erhaltenen, gereinigten Proteine sollten auf einem Proteinarray gespottet werden. Die Bindung der Proteine an die Oberfläche stellt dabei eines der Hauptprobleme der Protein Microarrays dar. Daher sollten zunächst die technischen Bedingungen getestet und unter Berücksichtigung der Reproduzierbarkeit und des Signal-Hintergrund-Verhältnisses optimiert werden. Darüber hinaus wurde die Entwicklung von Kontrollen und Standards zur Quantifizierung angestrebt. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollten die Grundlage zur Optimierung der Musterung von *Neisseria meningitidis* Proteinarrays benutzt werden. Diese entwickelten Arrays sollten mit Impfstoffkandidaten und Patientenserum gescreent und bewertet werden.