

5. Ergebnisse

5.1. Auswahl phasenvariabler Gene von *Neisseria meningitidis*

Die Genomsequenzen von *Neisseria meningitidis* MC58 (Serogruppe B) und *Neisseria meningitidis* Z2491 (Serogruppe A) wurden im Jahr 2000 veröffentlicht (Tettlin *et al.*, 2000, Parkhill *et al.*, 2000). Die Genomgröße beträgt 2,2 Millionen Basenpaare und ist damit klein im Vergleich zu *E. coli* (4 Millionen Basenpaare). Es besitzt zahlreiche repetitive Elemente und polymorphe Regionen. Im Genom sind etliche Rekombinationen vorhanden, die Folge der Fähigkeit zur natürlichen Transformation. Ferner spielt Phasenvariation bei *Neisseria* eine bedeutende Rolle. *Neisseria meningitidis* zeigt die größte Anzahl an putativen phasenvariablen Genen aller sequenzierten Genome. Die Veröffentlichungen von Saunders und Mitarbeitern (Saunders *et al.*, 2000) sowie Snyder und Mitarbeitern (Snyder *et al.*, 2001) wiesen 102 phasenvariable Gene bei *Neisseria meningitidis* Stamm MC58 nach (Tabelle 2). Bei einem Vergleich der drei sequenzierten Genome von *Neisseria meningitidis* MC58, *Neisseria meningitidis* Z2491, *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 (Snyder *et al.*, 2001) traten 11 Gene ausschließlich bei *Neisseria meningitidis* MC58 auf (in der Tabelle 2 mit einem * markiert). Bei der angegebenen möglichen Funktion handelt es sich um Homologievergleiche aus der Datenbank ("TIGR") mit dem annotierten Genom des Stammes MC58.

Tab. 2: 102 putative phasenvariable Gene von *Neisseria meningitidis* MC58.

NMB Nummer	Genhomologie (mögliche Funktion nach "TIGR")
0032	hypothetisches Protein
0039	hypothetisches Protein
0040	Hydrolase (putativ)
0049	PilC2 Protein (Pilus-Protein), auth. Frameshift
0053	konserviertes hypothetisches Protein
0065 *	hypothetisches Protein
0067 *	Sialinsäure Kapselbiosyntheseprotein SiaD
0098 *	ABC Transporter, ATP-Bindungsprotein, auth. Frameshift
0127	50S ribosomales Protein L11
0182	äußeres Membranprotein, Omp85
0193	Glucoseinhibitor
0218	Glycosyltransferase
0270	bioH Protein (putativ)

0297	hypothetisches Protein
0300	hypothetisches Protein
0312	Virulenz assoziiertes Protein VapA, auth. Frameshift
0341	TspA Protein
0368	hypothetisches Protein
0377	konserviertes hypothetisches Protein
0385	Thiamin-Monophosphat-Kinase
0415	konserviertes hypothetisches Protein, auth. Frameshift
0432	konserviertes hypothetisches Protein
0442	Opa-Protein, auth. Frameshift
0456	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase
0471	konserviertes hypothetisches Protein
0486	konserviertes hypothetisches Protein
0488	hypothetisches Protein
0593	konserviertes hypothetisches Protein
0623	Spermidin Putrescin ABC Transporter
0624	Galactosyltransferase verwandtes Protein, auth. Frameshift
0726	Typ II Restriktionsenzym HgaI
0741	konserviertes hypothetisches Protein
0785	Exodeoxyribonuclease V 135 kDa Polypeptid
0831	Typ I Restriktionsenzym S Protein
0846	Verwandtes Protein der LPS-Biosynthese
0872	konserviertes hypothetisches Protein
0884	Superoxiddismutase
0892	AziC verwandtes Protein
0926	Opa Protein, auth. Frameshift
0955	2-Oxoglutarat Dehydrogenase, E1 Komponente
0961 *	FunZ Protein
0970	konserviertes hypothetisches Protein
0983	Phosphoribosylaminoimidazocarboxamideformyltransferase
1001	Integrase Protein
1030	konserviertes hypothetisches Protein
1032	Typ II Restriktionsenzym Nla IV
1053	Opc-Protein
1080	Ner Protein, auth. Frameshift
1094	hypothetisches Protein
1140	MesJ Protein, Zellzyklen Protein, auth. Frameshift
1200	Ribonuclease II Protein
1202	hypothetisches Protein
1223	ortspezifische DNA Methylase, degeneriert
1255	Glycosyltransferase, degeneriert
1261	Typ III Restriktionsmodifikationsenzym, auth. Frameshift
1265 *	konserviertes hypothetisches Protein
1275	hypothetisches Protein mit Frameshift
1277	Transporter, BCCT-Familie
1350	hypothetisches Protein

1375	Putative Modifikationsmethylase, auth. Frameshift
1377	L-Lactat Dehydrogenase
1379	NifS Protein
1407 *	FrpA verwandtes Protein, degeneriert
1429	äußeres Membranprotein PorA
1443	DNA Polymerase III, Frameshift
1465	Opa-Protein, auth. Frameshift
1467	Exopolyphosphatase
1489 *	hypothetisches Protein
1507	hypothetisches Protein
1525	VirG verwandtes Protein, auth. Frameshift
1540	Lactoferrin Bindungsprotein A
1543	konserviertes hypothetisches Protein
1626	konserviertes hypothetisches Protein
1634	konserviertes hypothetisches Protein
1636	Opa-Protein, auth. Frameshift
1668	Hämoglobin Rezeptor
1723	Cytochrom C Oxidase, Untereinheit III
1734	Glutaredoxin
1741 *	konserviertes hypothetisches Protein, auth. Frameshift
1760	konserviertes hypothetisches Protein
1783	Sekretionsprotein, putativ, auth. Frameshift
1786	hypothetisches Protein
1824	konserviertes hypothetisches Protein
1836	Lipopolysaccharid Biosynthese Protein WbpC, putativ
1846	zur Familie der Mrp/NBP35 Proteine gehörend
1847	PilC1 Protein (Pilus Protein), auth. Frameshift
1877	zur Familie der Prolyl-Oligopeptidasen gehörendes Protein
1893	konserviertes hypothetisches Protein, auth. Frameshift
1900	Polyphosphat Kinase
1913	Fettsäure / Phospholipid-Synthese-Protein
1929	Lacto-N-Neotetraose Biosynthese, Glycosyl Transferase
1931	hypothetisches Protein
1969	Serotyp-1-spezifisches Antigen, putativ
1985	homolog zu Adhäsion / Penetrations Proteinen
1988	Eisen reguliertes äußeres Membranprotein FrpB
1994 *	Adhäsion / Invasion Protein, putativ
1998 *	Serin-Typ-I -Peptidase
2008 *	verwandt zu ABC Transporter, ATP-Bindungsproteinen
2032	Lipopolysaccharid Glycosyltransferase, auth. Frameshift
2093	Methionin Aminopeptidase
2104	MafA Protein, auth. Frameshift
2145	hypothetisches Protein

Die phasenvariablen Gene wurden nach den Veröffentlichungen von Saunders *et al.*, 2000 und Snyder *et al.*, 2001 zusammengestellt. NMB steht für *Neisseria meningitidis* Serogruppe B. Ein authentischer Frameshift ist eine echte, z.B. durch das Fehlen einer Base, entstandene Verschiebung des Leserahmens.

5.1.1. Amplifikation der Genprodukte

Die Primer für die Amplifikation der 102 phasenvariablen Gene wurden so gewählt, daß diese in Frame zum Startcodon des Expressionsvektors lagen. Das Gen NMB0297 wurde jedoch von der Liste der zu amplifizierenden Gene ausgeschlossen, da die Basenfolge nur 97 Nucleotide besaß und das entsprechende Protein rekombinant schwer zu exprimieren wäre. Im Falle von Genen mit authentischem Frameshift wurden die längstmöglichen offenen Leserahmen (ORFs) gewählt. Bei einigen Genen konnte jedoch kein durchgehender ORF gefunden werden, es traten interne Stopcodons auf. Für diese Gene wurde der Leserahmen verkürzt oder, wie für die Gene NMB0831, NMB1261, NMB1275, NMB1783 und NMB2032, zwei Genabschnitte (A und B) gewählt, in denen ein offener Leserahmen gewährleistet war. Dies war möglich, da in dieser Arbeit nur nach möglichen Epitopen auf Proteinebene gesucht werden sollte. NMB1407 zeigte keinen offenen Leserahmen, selbst bei einer Aufteilung in mehrere Teilbereiche, und wurde nicht in die Liste aufgenommen. Damit ergaben sich für 100 verschiedene Gene 105 zu amplifizierende Genfragmente. Die PCR wurde wie unter 4.1.1. beschrieben durchgeführt. Alle Gene bis auf NMB1202 ließen sich erfolgreich amplifizieren und die Fragmente entsprachen der erwarteten Größe. Abbildung 3 zeigt eine Auswahl aufgereinigter PCR-Produkte.

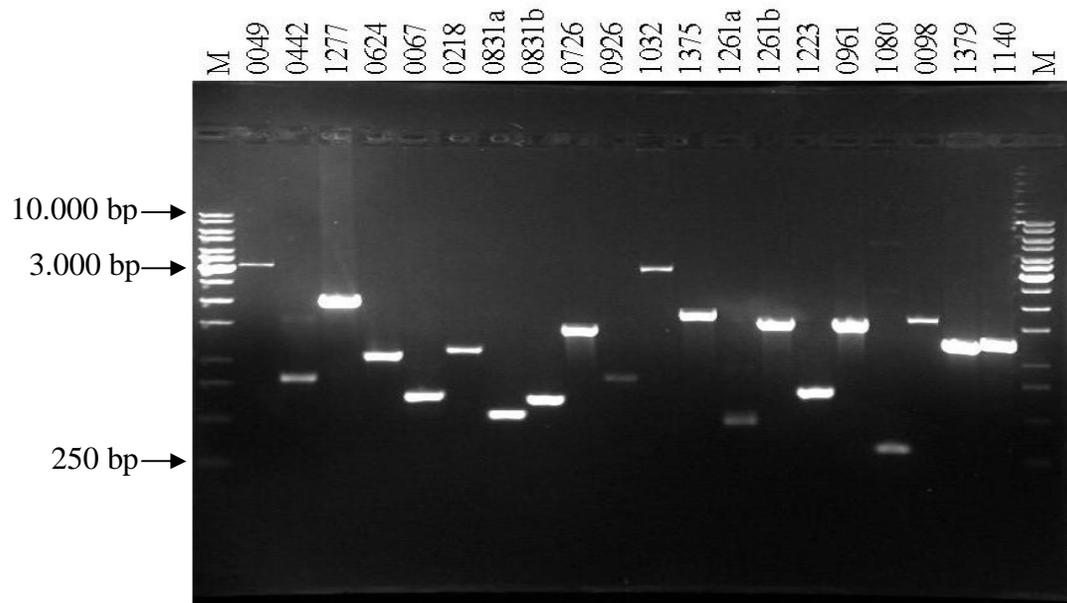


Abb. 3: Auswahl aufgereinigter PCR-Produkte. Die Gene sind mit ihrer NMB-Nummer angegeben (siehe auch Tabelle 2). M = Molekulargewichtsmarker (1 kb DNA Leiter).

5.1.2. Klonierung

Alle 104 PCR-Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, aufgereinigt und im Anschluß direkt in den Expressionsvektor pQE32-NST-BTattB kloniert. Dieser Vektor besaß eine Sequenz, die das zu exprimierende Protein N-terminal mit einem RGS-His₆-tag modifizierte, über den sich die Proteine leicht aufreinigen ließen (Lueking *et al.*, 2000). Die Transformation erfolgte in den Klonierungsstamm SCS1, der sich durch eine hohe Transformationseffizienz auszeichnete. Dabei war eine Klonierung der Gene NMB0065 (924 bp) und NMB1032 (729 bp) nicht möglich. Es konnten nur Transformanden mit leerem Vektor nachgewiesen werden. NMB0065 kodiert ein hypothetisches Protein, während das Gen NMB1032 am DNA-Metabolismus beteiligt ist. Von allen Klonen wurde die Plasmid-DNA präpariert, im Agarosegel analysiert und die positiven Klone vom 5' Ende ansequenziert. Einige Klone zeigten dabei Stopcodons im Leserahmen. Diese sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Bei diesen Klonen ließ sich kein Protein exprimieren, einige von ihnen besaßen einen authentischen Frameshift. Damit verblieben 92 Klone für die Proteinexpression.

Tab. 3: Zusammenstellung von Genen, die kein Protein exprimierten.

NMB	Genlänge in bp	Proteinmasse in kDa
0624	(1219) 1108	(44,7) 40,6
0892	420	15,3
1277	2025	76,3
1375	(2107) 1748	(77,3) 64,1
1465	827	36,3
1525	2030	74,4
1723	1095	40,0
1783a	714	26,2
1847	3088	113,2
2008	1641	63,1

Die in Klammern gesetzte Zahl gibt die ursprüngliche Genlänge mit entsprechender Proteinmasse an, während es sich bei der nachstehenden Zahl um die durch Primer gewählte, verkürzte Genlänge / Proteinmasse handelt.

5.1.3. Proteinexpression und -reinigung

Die Überexpression der Proteine erfolgte als Fusionsproteine mit einem RGS-His₆-tag. Damit konnten diese spezifisch durch Affinitätschromatographie an einer Nickelchelate-

Matrix gereinigt werden. Nach Proteinexpression erfolgte die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen mit 6 M Harnstoff am Biorobot 8000. Die Proteine wurden auf einem SDS-Gel analysiert, die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt und die molare Masse berechnet. Bei 91 von 102 Klonen konnte erfolgreich Protein gewonnen werden. Nur NMB0098 exprimiert trotz korrekter Basenfolge kein Protein (die Gesamtlänge von 2084 bp war aufgrund interner Stopcodons auf 1646 bp verkürzt worden). Nach Überprüfung der Wachstumskurve zeigte sich, daß dieses Gen vermutlich ein stark toxisches Protein produzierte, da das Wachstum nach der Induktion mit IPTG stagnierte. Bei vergleichsweise gut exprimierenden Proteinen, wie z.B. NMB0471, war ein stetiges Wachstum zu beobachten (Abbildung 4).

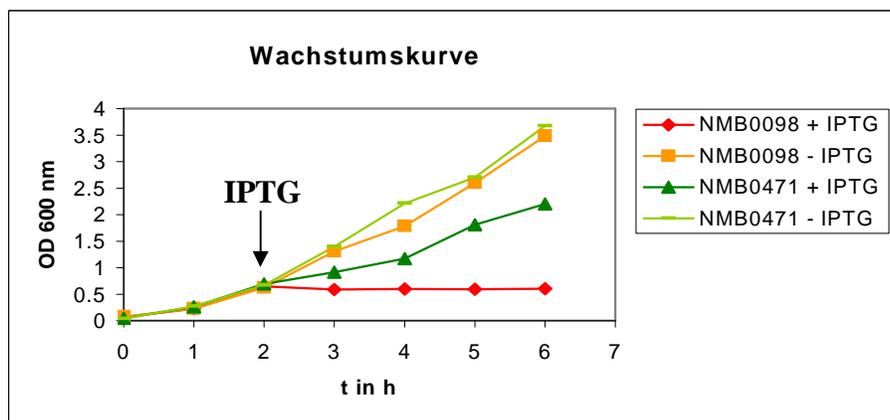


Abb. 4: Wachstumskurven von Transformanten mit den Genen von NMB0098 und NMB0471 im Vergleich.

Alle aufgereinigten Proteine mit entsprechender NMB-Nummer sowie Genlänge, Proteinmasse und –konzentration sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tab. 4: 91 exprimierte und aufgereinigte Proteine von *Neisseria meningitidis*.

NMB Nummer	Genlänge bp	Proteinmasse kDa	Proteinkonzentration	
			µg/ml	µM
0032	525	19,6	600	30,6
0039	270	10,5	130	12,4
0040	711	26,8	220	8,2
0049	3164	116,0	110	0,9
0053	684	24,7	600	24,3
0067	675	26,4	80	3,0
0127	432	15,0	110	7,3

0182	2391	88,4	50	0,6
0193	1893	69,8	110	1,6
0218	1128	42,1	130	3,1
0270	747	27,0	300	11,1
0300	(302) 198	(11,1) 7,3	550	75,3
0312	2089	76,6	130	1,7
0341	2625	92,5	50	0,5
0368	456	17,8	310	17,4
0377	1128	40,9	140	3,4
0385	954	34,6	480	13,9
0415	(1645) 1244	(60,3) 45,6	50	1,1
0432	786	27,2	120	4,4
0442	794	29,1	110	3,8
0456	1248	45,2	150	3,3
0471	1074	38,6	70	1,8
0486	(1340) 1232	(49,1) 45,2	590	13,1
0488	492	18,8	700	37,2
0593	2424	89,1	70	0,8
0623	1137	41,2	130	3,2
0726	1467	56,8	30	0,5
0741	1437	52,8	560	10,6
0785	3612	134,6	140	1,0
0831a	491	18,0	120	6,7
0831b	581	21,0	100	4,8
0846	1032	39,0	150	3,8
0872	1842	68,7	120	1,7
0884	585	21,9	550	25,1
0926	824	30,2	160	5,3
0955	2826	105,1	100	0,95
0961	1593	62,7	50	0,8
0970	(1422) 1232	(52,1) 45,2	140	3,1
0983	1578	56,8	120	2,1
1001	570	21,6	120	5,6
1030	561	20,5	70	3,4
1053	816	30,0	40	1,3
1080	260	9,5	100	10,5
1094	1548	58,6	180	3,1
1140	1282	47,0	170	3,6
1200	2373	89,0	140	1,6
1223	(2509) 660	(92,0) 24,2	520	21,5
1255	(1008) 756	(37,0) 27,7	280	10,1
1261a	492	18,0	130	7,2
1261b	1585	58,0	150	2,6
1265	291	10,6	200	18,9
1275a	370	13,6	140	10,3
1275b	1060	38,8	30	0,8
1350	339	13,1	330	25,2
1377	1170	43,5	330	7,6
1379	1212	44,6	335	7,8
1429	1176	42,1	20	0,5
1443	2112	76,3	180	2,4
1467	1506	55,9	100	1,8
1489	492	18,6	760	40,9
1507	357	13,1	140	10,7
1540	2829	105,7	70	0,7
1543	1212	47,1	140	3,0

1626	1101	41,1	60	1,5
1634	1206	46,8	270	5,8
1636	817	30,3	70	2,3
1668	2373	87,0	50	0,6
1734	639	23,9	170	7,1
1741	(1340) 1233	(49,1) 45,2	90	2,0
1760	504	19,5	610	31,3
1783b	495	18,2	240	13,2
1786	1152	44,5	130	2,9
1824	834	30,2	90	3,0
1836	1869	70,4	160	2,3
1846	1077	38,6	520	13,5
1877	2013	74,7	160	2,1
1893	845	31,0	100	3,2
1900	2148	80,6	80	1,0
1913	1053	37,0	70	1,9
1929	1047	40,6	140	3,4
1931	345	13,5	140	10,4
1969	3246	113,6	60	0,5
1985	4371	160,0	500	3,1
1988	2142	79,1	70	0,9
1994	1092	38,0	90	2,4
1998	4293	157,6	60	0,4
2032a	571	21,0	140	6,7
2032b	621	23,0	100	4,3
2093	777	28,2	700	24,8
2104	(961) 720	(35,2) 26,4	340	12,9
2145	177	7,0	240	34,3

Die in Klammer gesetzte Zahl ist die ursprüngliche Genlänge mit entsprechender Proteinmasse, während es sich bei der nachstehenden Zahl um die durch Primer gewählte, verkürzte Genlänge / Proteinmasse handelt.

Alle aufgereinigten Proteine, die in Tabelle 4 aufgelistet sind, besaßen die erwartete theoretisch berechnete Größe, bis auf das Protein NMB1836. Es konnte nur ein verkürztes Fragment exprimiert werden. Statt den zu erwartenden 70 kDa war das Proteinfragment nur etwa 20 kDa groß. Da die Sequenzanalyse in diesem Teil korrekt war, wurde es trotzdem auf dem Array untersucht. Alle überexprimierten Proteine konnten in hoher Reinheit gewonnen werden und lagen in einem Massenbereich von 7 kDa (NMB2145) bis 160 kDa (NMB1985). Die Proteinausbeute betrug durchschnittlich 400 µg aus 2 ml Kulturmedium. Zusammenfassend konnten damit von den 105 zu amplifizierenden Genen, darunter fielen auch die aufgeteilten Genabschnitte, 104 amplifiziert werden. Von diesen ließen sich 102 klonieren, wovon 91 Protein exprimierten, was einer Expressionsrate von 87 % entspricht. Abbildung 5 zeigt alle 91 aufgereinigten *Neisseria meningitidis* Proteine. Werden jedoch die aufgeteilten Genabschnitte unberücksichtigt gelassen, so wurde bei 87 von 102 aufgelisteten phasenvariablen Genen Protein exprimiert, was 85 % entspricht.

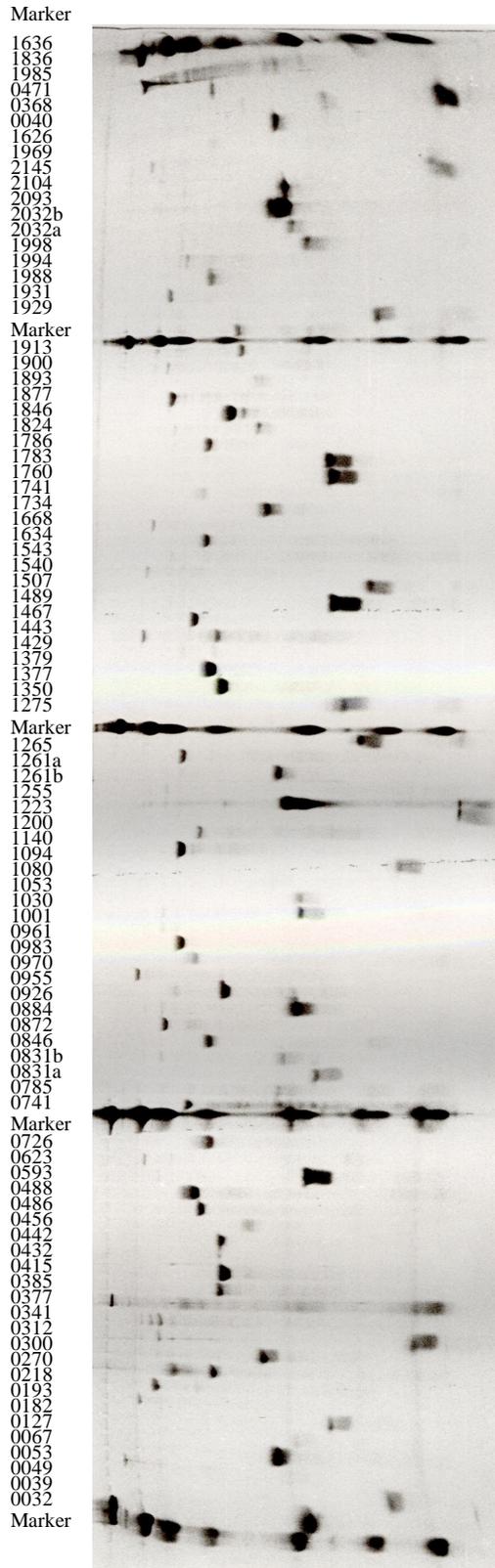


Abb. 5: SDS-PAGE Gel mit 91 aufgereinigten *Neisseria meningitidis* MC58 Proteinen angegeben mit ihrer NMB-Nummer (Commassie gefärbt). Marker: 14,3 – 220 kDa.

5.1.4. Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen

Alle Klone (102) wurden erneut angezogen und die Proteine unter nativen Bedingungen in Abwesenheit von Harnstoff aufgereinigt. Später sollten diese Proteine auf dem Proteinarray untersucht werden. Die Elution erfolgte in diesem Fall mit Hilfe von Imidazol. Dabei ließen sich 24 von 91 Proteinen aufreinigen, was einer Ausbeute von 26 % entspricht. Die durchschnittliche Proteinmenge lag bei 120 µg aus 2 ml Kulturmedium. In Tabelle 5 sind die Proteine zusammengestellt, die sich nativ aufreinigen ließen. Abbildung 6 zeigt eine Auswahl dieser aufgereinigten Proteine. Die Proteine NMB1467, NMB1734 und NMB1824 zeigten dabei unter nativen Aufreinigungsbedingungen eine stärkere Anreicherung als unter denaturierenden, teilweise bis zur fünffachen Menge. Dabei wurde deutlich, daß es sich hauptsächlich um Enzyme handelt und weniger um oberflächenassoziierte Proteine.

Tab. 5: Zusammenstellung nativ aufgereinigter Proteine.

NMB-Nummer									
0193	0218	0377	0488	0726	0884	0955	0961	0970	0983
1094	1140	1261b	1377	1379	1467	1540	1734	1741	1783b
1786	1824	1846	1900						

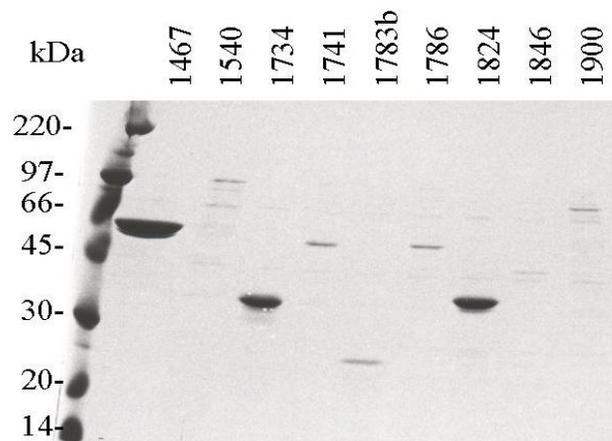


Abb. 6: SDS-PAGE Gel einer Auswahl nativ aufgereinigter Proteine.

5.2. Screening mit humanen Seren von Impfstoffkandidaten auf Proteinarrays

5.2.1. Vorversuche auf Dotblots

In diesem Teil der Arbeit sollten die zuvor exprimierten *Neisseria meningitidis* Proteine mit Hilfe der Microarray Technologie untersucht werden. Dazu sollten die hergestellten Proteinarrays mit humanen Seren gemustert werden. Für die ersten Untersuchungen der überexprimierten *Neisseria meningitidis* Proteine standen 10 verschiedene humane Seren zur Verfügung. Diese stammten von gesunden Jugendlichen aus Norwegen. Sie waren dreimal mit äußeren Membranvesikeln (OMVs) des Impfstoff-Stammes B:15:P1.7,16 in einer Dosis von je 25 µg geimpft worden. Serum war vor der Impfung, hier als Präimmunserum bezeichnet, und 6 Wochen nach der letzten Impfung entnommen worden, hier als Postimmunserum bezeichnet. Die Seren hatten die Nummern 3019, 3020, 3021, 3082, 3116, 3165, 3175, 3239, 3259 und 3294. In einem Vorversuch wurden die ersten 28 denaturiert aufgereinigten Proteine auf eine PVDF-Membran pipettiert, mit Prä- und Postimmunserum (3239) über Nacht inkubiert und die gebundenen Antikörper detektiert. Abbildung 7 zeigt diesen Vergleich.

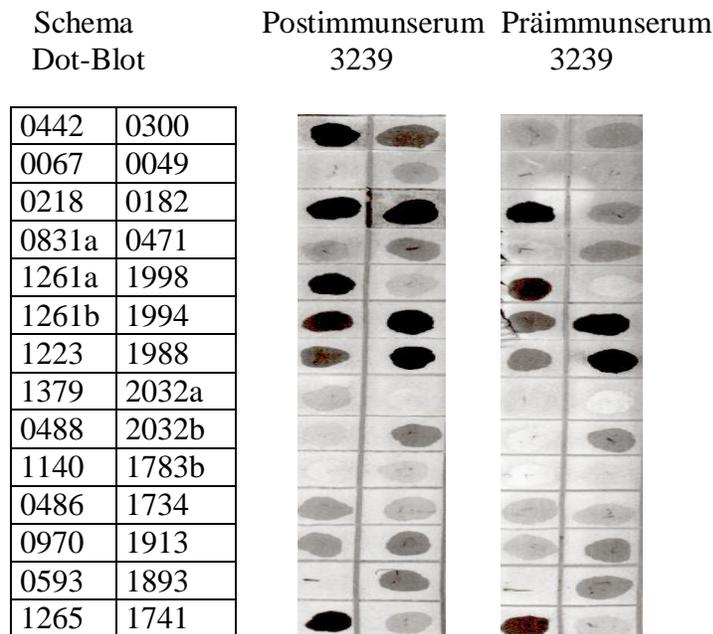


Abb. 7: Dot-Blot mit 28 *Neisseria meningitidis* Proteinen, gescreent mit Post- und Präimmunserum Nummer 3239, detektiert über ein alkalisches Phosphatase Konjugat.

Bei diesem Vergleich wird deutlich, daß nur im Postimmunserum 3239 Antikörper gegen die Proteine NMB0442, NMB0182 und geringfügig gegen NMB0300 gebildet worden waren. Die Proteine NMB0218, NMB0831a, NMB1261a, NMB1261b, NMB1265, NMB1994 und NMB1988 zeigten dagegen mit beiden Seren (Prä- und Postimmunserum) eine Reaktion. Fünf weitere Seren wurden getestet und solche Proteine als positiv bewertet, an die nur Antikörper aus dem Postimmunserum und nicht aus dem Präimmunserum gebunden hatten (Tabelle 6).

Tab. 6: Serumscreening auf Dot-Blots.

Protein	Nummer des Serums (Prä- und Postimmunserum)					
	3019	3020	3116	3239	3259	3294
0182	+	+	+	+	+	+
0442	+		+	+		
0300				+		
0049	(+)					
1893					(+)	

+ starkes Signal, (+) schwaches Signal (detektiert im Vergleich Post- / Präimmunserum).

Auffällig war das Protein NMB0182, es zeigte für alle getesteten Seren eine positive Reaktion mit den Antikörpern aus dem Postimmunserum. Andere Proteine hatten nur vereinzelt eine Reaktion gegeben, oder das Signal war sehr schwach, diese stehen in Tabelle 6 in Klammern.

Im nächsten Versuch wurden die Proteine mit einem Q-Array System auf eine PVDF-Membran gespottet. Diese Methode ermöglichte es, geringe Volumina eines Proteins auf einer sehr kleinen Fläche anzuordnen. In diesem Fall waren es je 5 nl von denselben 28 Proteinen, die zuvor im Dot-Blot untersucht worden waren und nun auf eine Fläche von 36 mm² gespottet wurden. Dabei wurde die Membran vor dem Spotten auf einem Objektträger (2,5 x 7,5 cm) fixiert. Abbildung 8 zeigt das Ergebnis des Screenings mit dem Prä- und Postimmunserum 3239.

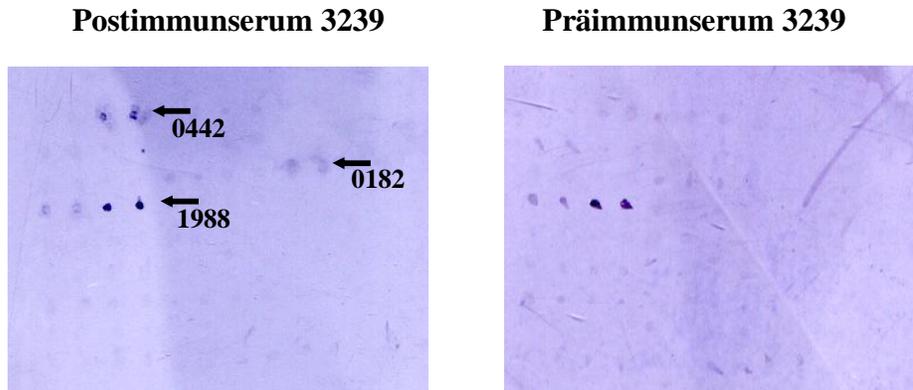


Abb. 8: Dot-Blots mit 28 *Neisseria meningitidis* Proteinen, gescreent mit dem Post- und Präimmunserum Nummer 3239 und detektiert über ein alkalisches Phosphatase Konjugat.

Wie beim Dotblot zuvor zeigten die Proteine NMB0442 und NMB0182 eine positive Antikörperreaktion, ebenso gab es für das Protein NMB1988 in beiden Seren eine Reaktion. Damit zeigte das Ergebnis keinen Unterschied, ob die Proteine auf eine PVDF-Membran pipettiert oder gespottet wurden. Doch wie in Abbildung 8 besonders bei den Spots von NMB0182 deutlich wird, waren die Proteinspots oft verwischt. Die PVDF-Membran mußte beim Spotten feucht auf dem Objektträger liegen, wodurch es unweigerlich zu Verschiebungen der Membran kam. Auch trocknete die Membran beim längeren Spotten schnell aus, und es konnte dann nicht mehr genügend Proteinlösung aufgenommen werden. Ein weiterer Nachteil der Blots war, daß zum Inkubieren größere Volumina an Seren benötigt wurden sowie eine unzureichende quantitative Bewertung. Daher wurde nach anderen, geeigneteren Oberflächen gesucht.

5.2.2. Test von verschiedenen Microarrayoberflächen

Im folgendem Versuch wurden verschiedene Oberflächen getestet. Glas diente dabei als Träger des Microarrays und wurde unterschiedlichst beschichtet. Vier verschiedene Oberflächen wurden untersucht, wovon die Polyacrylamid- und die Poly-L-Lysinbeschichtung selbst hergestellt wurden. Arrays mit einer Aldehydbeschichtung und die FAST Slides mit einer Nitrocelluloseoberfläche waren käuflich erworben. Auf diese Oberflächen wurde ein Teil der Proteine gespottet, mit einem Anti-RGS-His Antikörper

gescreent und mit einem Anti-Maus-IgG Cy5 markiertem sekundären Antikörper detektiert. Dieser Vergleich ist in Abbildung 9 dargestellt.

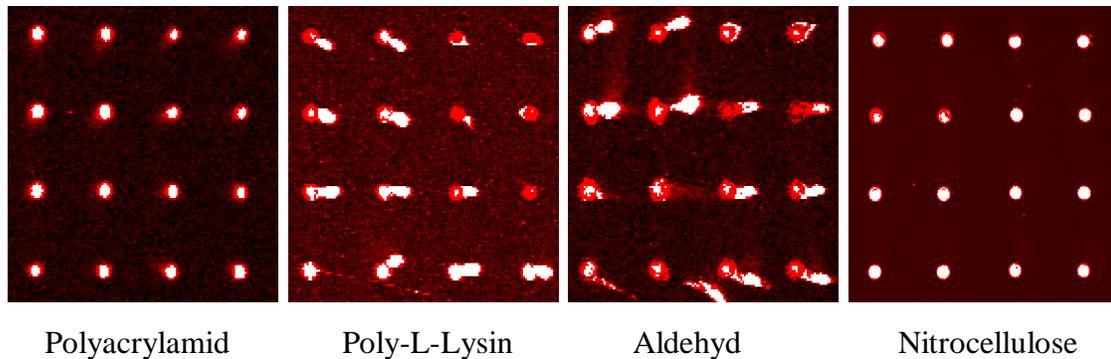


Abb. 9: *Neisseria meningitidis* Proteine gespottet auf verschiedenen Oberflächen, gescreent mit Anti-RGS-His und detektiert mit Anti-Maus-IgG-Cy5.

Die Oberflächen Poly-L-Lysin und Aldehyd wiesen beide keine gute Bindung für Proteine auf. Diese verschmierten stark, wie in Abbildung 9 zu sehen ist. Die Oberflächen Polyacrylamid und Nitrocellulose dagegen zeigten definierte Proteinspots. Daher wurde zunächst das kostengünstigere Polyacrylamid als Oberfläche eingesetzt, und der Einfluß verschiedener Schichtdicken des Gels auf die Spotqualität untersucht. Die Dicken betragen dabei entweder 30 μm , 60 μm oder 80 μm . Die Proteine wurden auf die Oberfläche gespottet und mit Serum gescreent. Es zeigte sich, daß das Protein NMB0182, welches besonders starke Antikörperreaktionen aufwies, gut auswertbare Signalintensitäten bei einer Schichtdicke von 80 μm aufwies (Ergebnisse nicht gezeigt). Als Blockingreagenz wurde Magermilch verwendet. Sowohl die Variation der Magermilchkonzentration (2 %, 5 %, und 10 %) als auch der Einsatz anderer Blocksubstrate, wie BSA (Rinderserumalbumin) oder Fischgelantine hatten nur einen geringfügigen Einfluß auf die Hintergrundintensität bei der Antikörperdetektion (Ergebnisse nicht gezeigt). Für alle weiteren Untersuchungen wurde daher die Oberfläche Polyacrylamid mit einer Schichtdicke von 80 μm verwendet und mit Magermilch in einer Konzentration von 5 % geblockt.

5.2.3. Untersuchung auf Polyacrylamid

Ein Teil der Proteine, und zwar die 28, die bereits zuvor im Dot-Blot Experiment untersucht worden waren, wurden erneut auf Polyacrylamid gespottet. Das Spotschema ist in Abbildung 10A dargestellt. Die Micorarrays wurden mit 5 % Magermilch geblockt und über Nacht mit je einem der 10 verschiedenen humanen Seren inkubiert. Als Kontrolle diente jeweils das Serum vor der Impfung des entsprechenden Probanden. Der sekundäre Antikörper war ein Cy5 gelabelter Anti-Human-IgG. Eine weitere Kontrolle war ein mit RGS-His Antikörper gescreenter Microarray zur Überprüfung der His-getaggtten Proteine, gezeigt in Abbildung 10B. Dieses Screeningexperiment wurde dreimal für jedes Serum durchgeführt. Die Signalstärken wurden mit dem Programm Genepix ausgewertet und miteinander verglichen. In Abbildung 10C sind an einem Beispiel des Serums 3239 die gemessenen Intensitätswerte dargestellt.

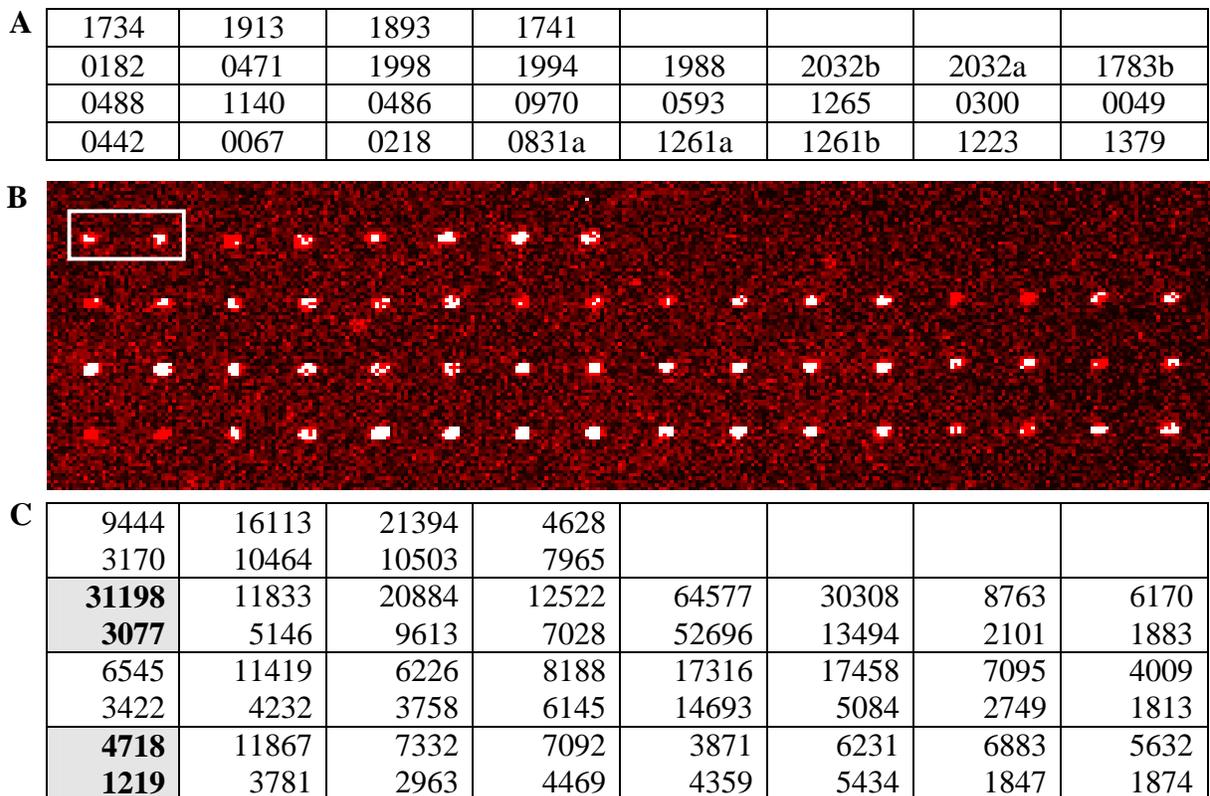


Abb. 10: A Spotschema der ausgewählten *Neisseria meningitidis* Proteine, B Proteinarray mit 28 *Neisseria meningitidis* Proteinen gespottet, in Duplikaten auf Polyacrylamid, gescreent mit RGS-His Antikörpern als Kontrolle, detektiert mit Anti-Maus-Cy5 und C Signalintensitäten eines Experiments von Post- (oberer Wert) bzw. Präimmunserum (unterer Wert) 3239. Hervorgehoben wurden die Proteine NMB0182 und NMB0442.

Die angegebene Signalstärke in Abbildung 10C ist der Mittelwert von zwei Datenpunkten in diesem Experiment. Der untere Wert gibt die gemessene Signalstärke des Serums vor der Impfung und der obere Wert nach der Impfung an. Wird die Differenz von beiden berechnet, so zeigt sich die echte Zunahme des gebildeten Antikörpers nach der Impfung ausgedrückt durch die Signalstärke. Besonders hervorgehoben wurden die Werte für NMB0182, bei dem der Quotient Post- / Präimmunserum bei 10 lag sowie das Protein NMB0442 mit einem Quotienten von 4. Das Protein NMB1988 dagegen zeigte mit beiden Seren (Prä- und Postimmunserum) eine auffällig starke Antikörperreaktion, was durch die intensive Signalstärke in Abbildung 11 deutlich wird. Die Abbildungen von zwei übereinander gelegten Micorarrays wurden mit dem Programm Genepix erstellt.



Abb. 11: Übereinanderlagerung der Abbildungen von zwei Proteinarrays mit Hilfe des Programms Genepix, gescreent mit Prä- und Postimmunserum (3239), detektiert mit Anti-Human-IgG-Cy5, hervorgehoben ist im Rahmen das Protein NMB1988.

Damit bestätigte dieses Screeningergebnis die positiven Kandidaten aus dem vorangegangenen Dot-Blot Experiment. Zusätzlich ermöglichte die Auswertung der Proteinarrays mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung und die damit verbundene computergestützte Auswertung genauere quantitative Aussagen über die Antikörperaktivität und dessen Titer im Serum. Das Screeningexperiment wurde für jedes Serum auf dieser Polyacrylamidoberfläche dreimal durchgeführt, doch waren die Werte schlecht reproduzierbar. Bei der Spotanalyse und der anschließenden statistischen Bewertung zeigten sich Standardabweichungen von bis zu $\pm 40\%$. Daher wurden in Tabelle 7 keine absoluten Signalstärken, sondern durch die Kennzeichnung mit einem + eine Tendenz der positiven Kandidaten angegeben, deren Signal um das Doppelte im Serum im Vergleich zum Präimmunserum erhöht war.

Tab. 7: Auswertung der Proteinarrays auf der Polyacrylamidoberfläche

Protein	Nummer des Serums									
	3019	3020	3021	3082	3116	3165	3175	3239	3259	3294
0182	+	+			+	+	+	+		+
0442	+				+			+	+	

Nur zwei Proteine zeigten eine auffällige Immunantwort, erneut das Protein NMB0182, gegen das in 7 von 10 Seren Antikörper gebildet wurden, sowie das Protein NMB0442 gegen das ebenfalls Antikörper in vier Seren vorlagen.

5.2.4. Untersuchung auf Nitrocellulose

Die Polyacrylamidarrays wiesen allerdings nach dem Screenen mit Serum oft Schlieren auf, die sich nicht erklären ließen. Da diese Arrays einen hohen Fehler gezeigt hatten, wurden die FAST Slides mit der Nitrocelluloseoberfläche in einer Vorversuchsreihe getestet. Ein Teil der Proteine wurde auf diese Oberfläche gespottet und mit einer Auswahl an Seren gescreent und statistisch bewertet. Dabei zeigte sich eine durchschnittliche Standardabweichung identischer Proteine von $\pm 10\%$. Die 10 humanen Seren wurden daher erneut mit dieser Oberfläche untersucht. Alle 91 überexprimierten *Neisseria meningitidis* Proteine wurden auf FAST Slides gespottet. Diese Oberfläche beruhte auf einem Nitrocellulosepolymer, das eine Dicke von 14 μm besaß. Die Slides wurden mit 3 %-igem fötalem Kälberserum (FKS) in PBS geblockt und mit den 10 verschiedenen humanen Seren inkubiert. Untersuchungen hatten gezeigt, daß für diese Nitrocelluloseoberfläche FKS als Blockreagenz ein besseres Signal- zu Rauschverhältnis ergab als die zuvor eingesetzte Magermilch (Ergebnisse nicht gezeigt). In Abbildung 12 ist ein Proteinarray mit allen 91 *Neisseria* Proteinen dargestellt, in A gescreent mit dem RGS-His Antikörper und in B gescreent mit Prä- und Postimmunserum (3239). Die gemessenen Signalstärken lagen durchschnittlich um 100 für den Hintergrund und erreichten Werte von bis 50.000 relative Signalintensität für die Proben beim Screenen mit Postimmunserum. Zur Normalisierung der Proteinarrays wurden Standardreihen von IgG und IgM mitgespottet, diese ermöglichten einen Vergleich der Proteinarrays untereinander. Die Detektionsgrenze betrug

etwa 100 amol pro Protein, dies zeigt die ausgesprochene Sensitivität der Methode. Jedes Protein wurde in zwei Feldern doppelt gespottet. Die Intensitäten von allen vier Messpunkten auf einem Array wurden gemittelt und der Quotient der Intensitäten Post- / Präimmunserum ermittelt. In Tabelle 8 sind die Proteine angegeben, deren Quotient größer oder gleich zwei war. Die komplette Auswertung befindet sich im Anhang.

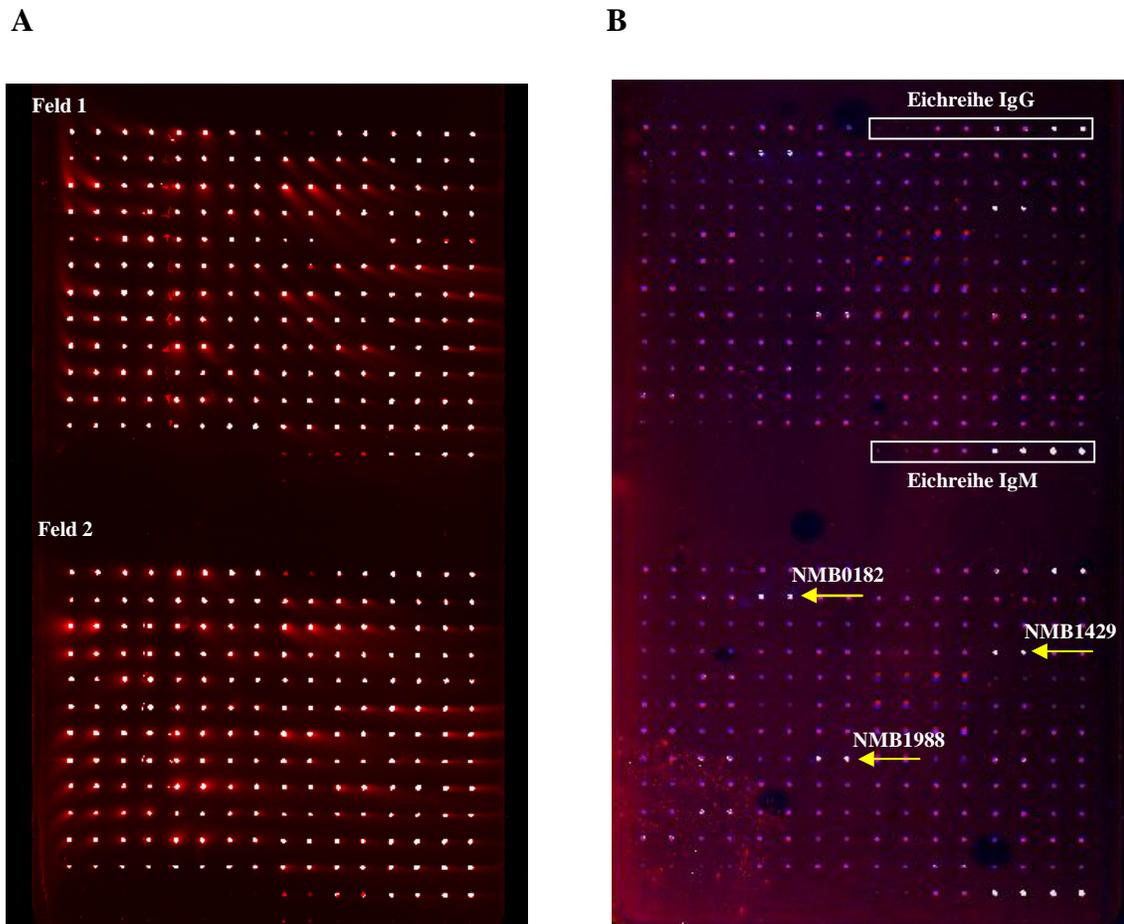


Abb. 12: A Proteinarray mit 91 überexprimierten *Neisseria meningitidis* Proteinen in zwei Feldern doppelt gespottet, gescreent mit RGS-His Antikörpern. B Abbildungen zweier Proteinarrays übereinandergelegt mit Hilfe des Programms Genepix, gescreent mit Prä- und Postimmunserum (3239). Eichreihe IgG und IgM lagen in Verdünnungsstufen von 1×10^{-1} bis 1×10^{-4} vor.

Tab. 8: Auswertung des Serumscreenings mit 10 Seren von Impfstoffkandidaten.

Protein NMB	Nummer des Serums									
	3019	3020	3021	3082	3116	3165	3175	3239	3259	3294
0049								2,1		
0053								2,1		
0182	8,8	9,6		2,5	11,7	5,1	16,4	10,5	6,6	13,7
0193					2,2					
0300	2,0	3,4			4,4		2,6	2,0	2,2	2,7
0377						2,8				
0385			2,5							
0432	2,1									
0442	2,7				3,3	2,2		2,0		
0486					2,2		2,2			
0623					2,4					
0726					2,1					
0785		3,7								
0831b								2,4		
0884	2,3									
1080	2,0									
1094					2,6					
1223								2,2		
1261b	2,0				2,3				2,9	3,2
1265								2,1		
1275b	2,1									
1379					2,1			2,2		
1429		4,6			6,5	4,9		8,3	5,7	7,2
1489			2,5					2,1		
1507	2,4									
1634								2,0		
1741					2,2					
1760	2,2				2,1					
1786								2,0		
1846								2,2		
1847					2,3					
1877							2,1			
1893									2,6	
1929	2,1									
1969					2,1					
1985	2,5				2,1					
1994	2,1				2,0			2,5		

Angegeben ist der Quotient der Signalstärke Post- / Präimmunserum ≥ 2 .

Insgesamt zeigten 37 von 91 Proteinen eine Reaktion mit den getesteten Seren, bei denen der Quotient (Post- / Präimmunserum) größer als 2 war, 28 davon traten nur einmal auf und sind damit vermutlich personenspezifisch. Einige Seren wie 3019, 3116 und 3239 zeigten eine starke Antikörperreaktion mit den *Neisseria meningitidis* Proteinen, während andere Seren wie 3021 und 3082 kaum eine Reaktion ergaben. Bei diesem Screening wurden insgesamt 5 oberflächenassoziierte und 15 hypothetische Proteine gefunden, gegen die nach der Immunisierung Antikörper auftraten. In einem Kontrollversuch wurde der Proteinarray nur mit dem Antikörper Anti-Human-IgG-Cy5 gescreent. Die Proteine NMB0300 und NMB1261b reagierten dabei besonders stark, was zu einer erhöhten Hintergrundreaktion für diese Proteine führte.

Gegen drei Proteine wurde auf der Nitrocelluloseoberfläche verstärkt Antikörper in den Seren der Impfstoffkandidaten nach der Impfung gebildet. Das war zum einen das Protein NMB0182 in 9 von 10 Seren mit einem Quotienten Post- / Präimmunserum von bis zu 16. Und zum anderen die Proteine NMB0300 und NMB1429, die in 7 bzw. 6 Seren auftraten. Der Quotient lag für NMB1429 bei durchschnittlich 6 und für NMB0300 bei 3. Das Screeningergebnis dieser Proteine ist in einem Diagramm in Abbildung 13 zusammengefaßt. Die Proteine NMB0182 (Omp85) und NMB1429 (PorA) gehören zur Klasse der membranassoziierten Proteine. Gegen die Proteine NMB1985 und NMB1994, ebenfalls oberflächenassoziierte Proteine, waren in 2 bzw. 3 Seren Antikörper gebildet worden. Diese Ergebnisse zeigten, daß diese Proteine stark immunogen wirkten.

Die beiden Proteine Omp85 und PorA konnten eindeutig durch die Reaktion mit den Antikörpern der Seren in einem Western-Blot-Experiment bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Das Protein NMB0300 hatte mit 7 von 10 Seren eine Reaktion gezeigt, die allerdings mit einem durchschnittlichen Quotienten von fast 3 schwach, aber deutlich war. Die Interpretation dieser Daten wurde erschwert, da das Protein einen starken Hintergrund mit dem sekundären Antikörper IgG gezeigt hatte. In diesem Experiment wurde jedoch das Serum vor der Impfung mit dem Serum nach der Impfung verglichen. Hierbei wurde eine echte Zunahme der Antikörperkonzentration beobachtet. NMB0300 ist ein hypothetisches Protein, das Homologien zu äußeren Membranproteinen aufweist.

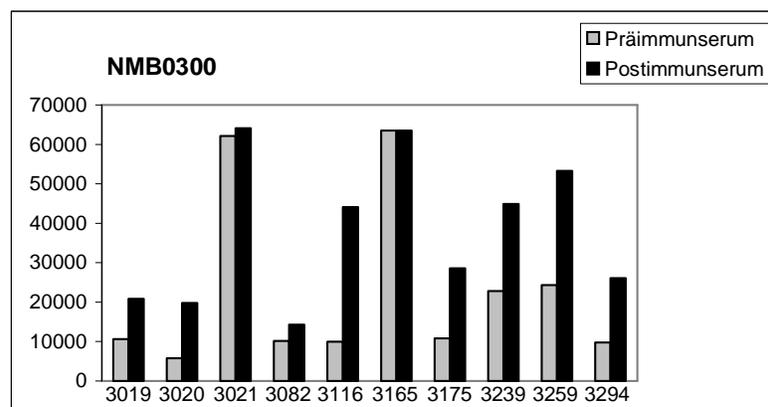
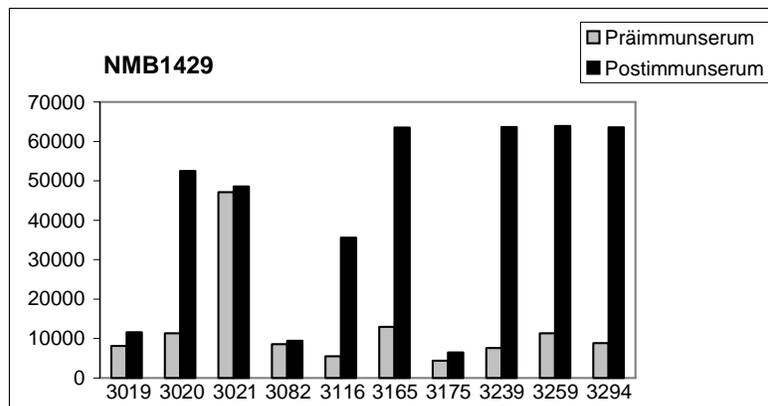
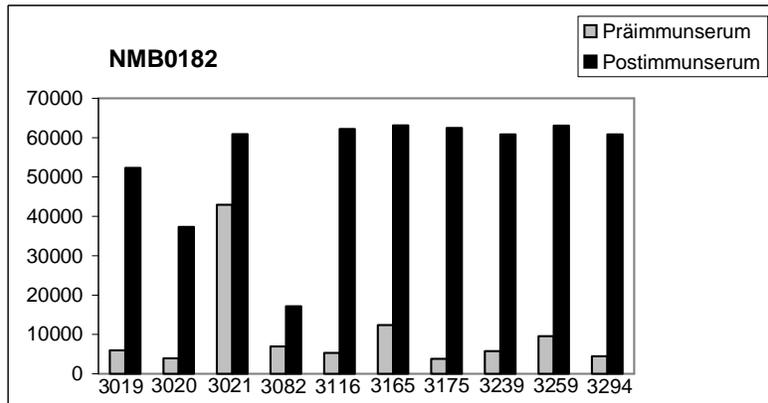


Abb. 13: Diagramm der Signalintensitäten von NMB0182, NMB1429 und NMB0300 gescreent mit 10 humanen Seren von Impfstoffkandidaten.

Im Vergleich zu den vorherigen Ergebnissen auf der Polyacrylamidoberfläche zeigte das Protein NMB0182 auf der Nitrocelluloseoberfläche mit den Antikörpern der Seren gute Übereinstimmungen. Nur in zwei Seren (3082 und 3259) wurde zuvor auf der Polyacrylamidoberfläche das Protein nicht detektiert. Beim Protein NMB0442 dagegen war eine Übereinstimmung mit den Seren 3019, 3116 und 3239 zu verzeichnen, jedoch nicht mit den Seren 3165 und 3259.

Die unter nativen Bedingungen aufgereinigten Proteine wurden ebenfalls auf Nitrocellulose gespottet und mit den Seren der Impfstoffkandidaten gescreent (Daten nicht gezeigt). Doch zeigten diese Proteine keine zusätzliche Reaktion mit den Antikörpern der Seren.

5.3. Wettbewerbsversuch zu Omp85

In einem Wettbewerbsversuch sollte getestet werden, ob die Antikörper gegen das Protein Omp85 spezifisch gebunden hatten. Dazu wurde das rekombinante Protein im Überschuss an eine Ni-NTA beschichtete Platte gebunden und mit Serum inkubiert. Als Kontrolle diente eine Pufferprobe. Nach der Inkubation wurde das Serum entnommen und auf einem Proteinarray mit Omp85 erneut inkubiert. Das Protein hatte die Antikörper aus dem Serum gebunden, und es zeigte sich eine deutliche Abnahme der Serumintensität auf dem Array gegenüber der Kontrolle. Tabelle 9 und Abbildung 14 verdeutlichen dieses Ergebnis. Die Intensität war um etwa 80 % zurückgegangen, damit hatten die Antikörper aus dem Serum spezifisch an das Protein Omp85 gebunden.

Tab. 9: Wettbewerbsversuch mit Omp85

	Signalintensität ohne Wettbewerb	Signalintensität mit Wettbewerb	
Serum 3175	22020 ± 3670	6166 ± 282	(28 %)
Serum 3294	16394 ± 2542	3357 ± 436	(20 %)

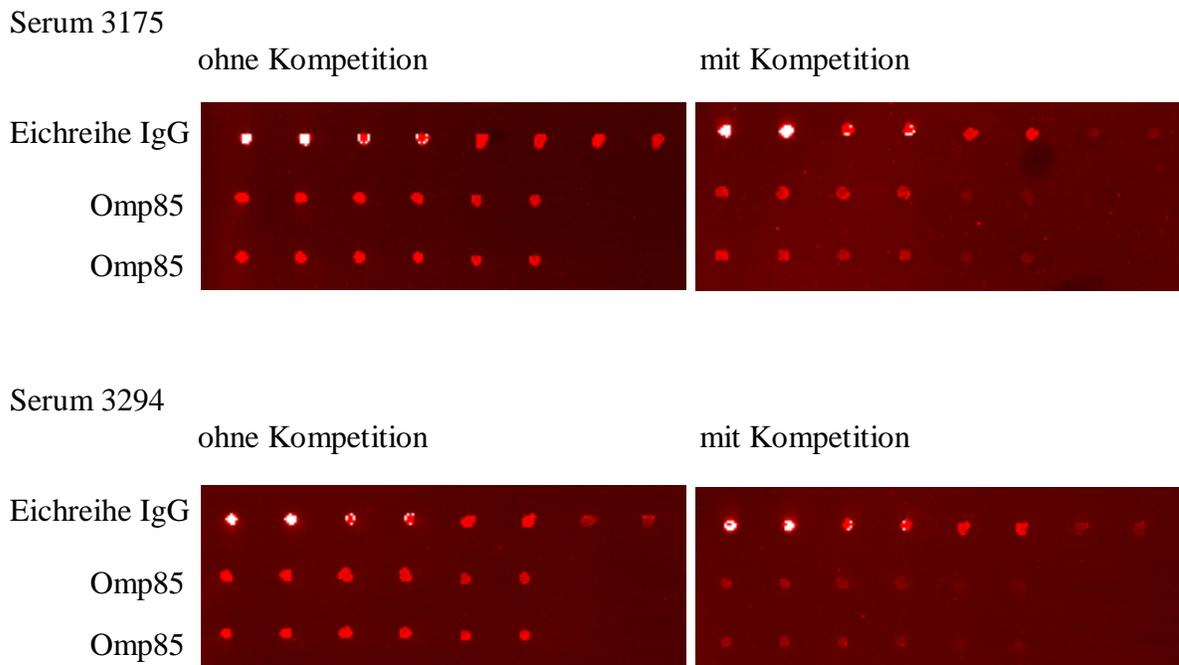


Abb. 14: Die Proteine (Omp85) wurden doppelt in Verdünnungsreihen gespottet (original, 1:2, 1:10), die Antikörper lagen in Verdünnungsstufen von 1×10^{-1} bis 1×10^{-4} vor, gescreent mit Serum 3175 sowie 3294 und detektiert mit Anti-Human-IgG-Cy5.

5.4. Verkürzung von Omp85 und PorA

Die Proteine Omp85 (NMB0182) und PorA (NMB1429) zeigten deutliche Reaktionen mit den Antikörpern der Seren der Impfstoffkandidaten nach der Immunisierung (siehe Kapitel 5.2.4.). Um festzustellen, ob diese Antikörperreaktionen auf einen bestimmten Bereich im Protein beschränkt waren, oder ob verschiedene Bindungsstellen verteilt über das Protein vorlagen, wurden Konstrukte unterschiedlicher Länge von Omp85 und PorA hergestellt.

5.4.1. Verkürzungen von Omp85

In einem ersten Versuch wurde die DNA des *omp85* Gens durch einen enzymatischen Restriktionsverdau mit *Bss*HII verkürzt.



Abb. 15: Verkürzung von *omp85* mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bss*HII.

Das Gen *omp85* besitzt zwei Schnittstellen für das Enzym *Bss*HII (Abbildung 15). Der Vektor mit dem Insert *omp85* wurde mit *Bss*HII verdaut, die DNA religiert und neu transformiert. Dabei wurde ein Teilstück von 733 bp herausgeschnitten. Danach waren der vordere und hintere DNA-Abschnitt nicht mehr in Frame. Das neue Teilstück besaß nur noch eine Länge von 1658 bp und kodierte für ein Protein von 50 kDa. Von diesem neuen Klon wurde das Protein exprimiert und isoliert. Abbildung 16 zeigt das aufgereinigte verkürzte Protein Omp85-50 sowie das Protein in Originallänge. Beide Proteine wurden in äquimolarem Verhältnis auf Nitrocellulose gespottet und mit den Seren der Impfstoffkandidaten gescreent, siehe Tabelle 10.

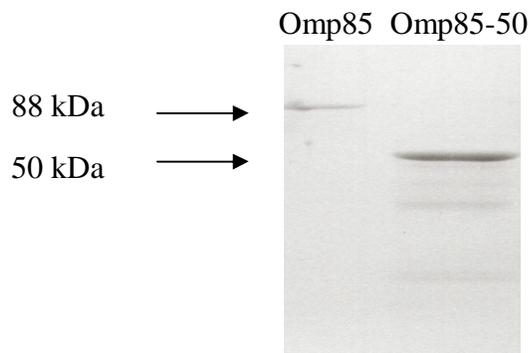


Abb. 16: SDS-PAGE Gel mit dem Protein Omp85 und dem verkürzten Konstrukt Omp85-50, gefärbt mit Coomassie Blue.

Im nächsten Versuch wurden weitere Konstrukte hergestellt, die sowohl am 5' Ende als auch am 3' Ende verkürzt waren. Durch gezielte Primerwahl wurde die entsprechende Länge des Fragments festgelegt (Abbildung 17).

Omp85 Konstrukte:

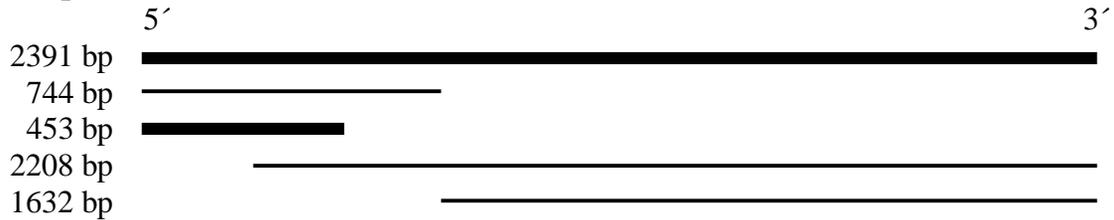


Abb. 17: Verschiedene Konstrukte mit entsprechender Basenpaarlänge von Omp85.

Mit den entsprechenden Primern wurde zuerst eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die gereinigten PCR-Produkte sind in Abbildung 18A dargestellt. Nach der Ligation und Transformation folgte die Proteinexpression und Aufreinigung (Abbildung 18B).

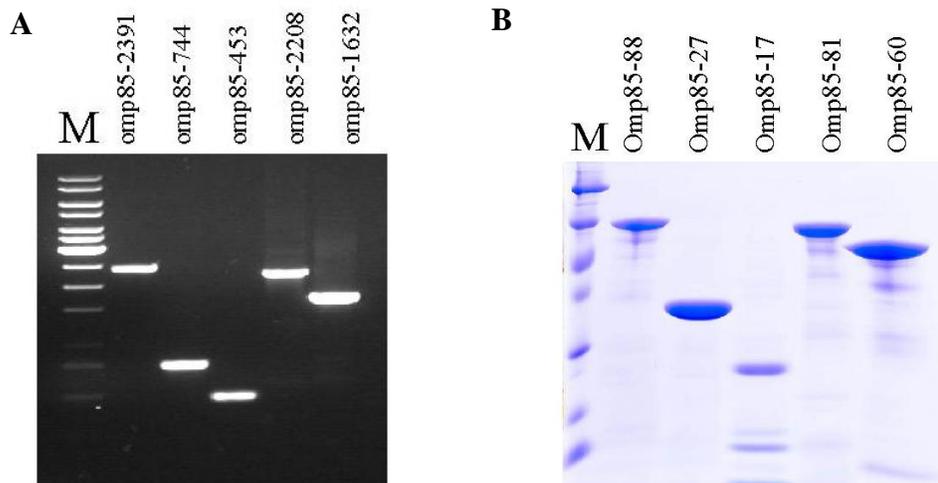


Abb. 18: A Aufgereinigte PCR-Produkte der einzelnen Konstrukte, B die entsprechenden exprimierten und gereinigten Proteine.

Diese Proteine wurden ebenfalls auf Nitrocellulose gespottet, mit den Seren der Impfstoffkandidaten (3020, 3165, 3294, 3259, 3175 und 3116) inkubiert und mit dem Antikörper Anti-Human-IgG-Cy5 detektiert. Die gemessenen Signalstärken der verschiedenen Konstrukte nach dem Screening sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Bei den angegebenen Werten handelt es sich jeweils um den Mittelwert von vier Messpunkten

auf einem Proteinarray, wobei der Wert des Präimmunserums von dem des Postimmunserums abgezogen wurde. Beim Vergleich der Intensitäten wurde ein etwa gleiches äquimolares Verhältnis berücksichtigt.

Tab. 10: Konstrukte von Omp85 und deren Signalstärke nach dem Screenen mit Postimmunserum der Impfstoffkandidaten.



Nummer des Serums	Konstrukte Omp85					
	Omp85	Omp85-50	Omp85-27	Omp85-17	Omp85-81	Omp85-60
3020	33126	21975	11018	10361	12107	2639
	100 %	66 %	33 %	31 %	37 %	8 %
3116	30956	32859	23079	16434	12969	35774
	100 %	106 %	75 %	53 %	42 %	116 %
3165	56125	62292	38429	42919	30805	7516
	100%	111 %	68 %	76 %	55 %	13 %
3175	21876	20779	6570	5696	1721	2171
	100 %	95 %	30 %	26 %	8 %	10 %
3259	47427	28453	12924	11101	59441	6069
	100 %	60 %	27 %	23 %	125 %	13 %
3294	17535	12129	6570	5696	38181	6559
	100 %	69 %	37 %	32 %	218 %	37 %

Angegeben ist die relative Signalstärke. Die Prozentangabe bezieht sich auf Omp85 des jeweiligen Serums. Die Konstruktamen entsprechen den molaren Massen.

Der Vergleich der Signalintensitäten zeigte, daß die gebildeten Antikörper gegen Omp85 das Protein über die gesamte Länge erkannten. Für alle Konstrukte konnten relative Signalstärken gemessen werden, die oberhalb des Wertes für den Hintergrund (~100) lagen. In Tabelle 10 wird die Abnahme der Signalstärke in Bezug auf die Länge des Konstruktes durch Prozent ausgedrückt. Dabei wird deutlich, daß mit einer Verkürzung der Proteinelänge die Signalstärke etwa vergleichbar abnahm, was auf verschiedene Bindungsstellen im Protein hinweist. Die Proteinsequenz zeigte ebenfalls, daß Motive mit derselben Sequenz über das gesamte Molekül verteilt auftraten. Besonders auffällig jedoch war das Konstrukt Omp85-60. Vier Kandidaten wiesen bei dieser Verkürzung nur noch eine Signalstärke von

durchschnittlich 10 % zur Gesamtlänge auf. Dies läßt bei einer Proteinmasse von 60 kDa mögliche Bindungsstellen im davor liegenden Sequenzbereich vermuten.

Abbildung 19 zeigt ein Beispiel der verschiedenen Konstrukte gespottet als Doppelspots in Verdünnungsreihen, die mit Prä- und Postimmunserum (3165) gescreent und mit dem Antikörper Anti-Human-IgG-Cy5 detektiert wurden. Deutlich sind die Signale für alle Konstrukte bis zu einer Verdünnung von 1:100 zu erkennen, die von den Antikörpern der Seren erkannt wurden. Dies verdeutlicht noch mal, daß im Serum polyklonale Antikörper vorlagen, die verschiedene Bereiche im Molekül erkannten.

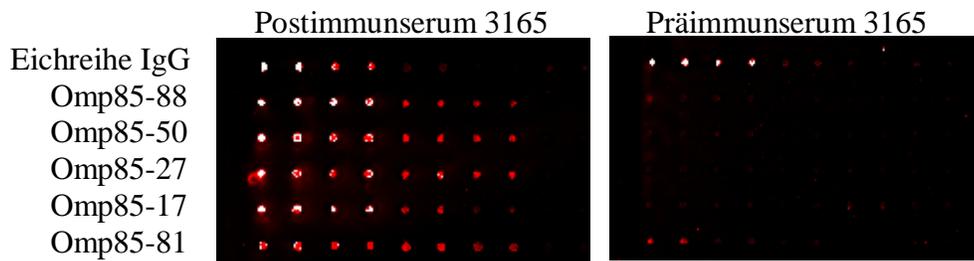


Abb. 19: Verdünnungsreihen von Omp85 Proteinfragmenten. Gescreent mit Prä- und Postimmunserum (3165). Jedes Protein lag als Doppelspot in Verdünnungsreihen vor (1×10^{-1} bis 1×10^{-4} für den IgG-Antikörper und 1:2, 1:5, 1:10 und 1:100 für die Proteine).

5.4.2. Verkürzungen von PorA

Für PorA wurden ebenfalls durch gezielte Primerwahl verschiedene Konstrukte hergestellt, die sowohl am 5' Ende als auch am 3' Ende verkürzt waren (Abbildung 20).

PorA Konstrukte:

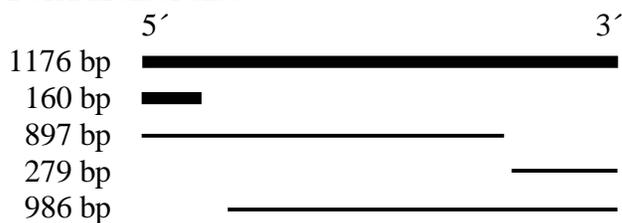


Abb. 20: Verschiedene Konstrukte mit entsprechender Basenpaarlänge von PorA.

Wie zuvor wurde zuerst eine PCR-Reaktion mit den entsprechenden Primern durchgeführt. Nach der Ligation und Transformation wurden die Proteine exprimiert und aufgereinigt.

Die Proteine wurden in zwei Feldern doppelt gespottet. Jedes Protein lag dabei in den Verdünnungsstufen 1:2, 1:5, 1:10 und 1:100 vor. Die Microarrays wurden im Anschluß mit folgenden Seren inkubiert: 3020, 3165, 3294, 3259 und 3116. Zur Detektion diente der Antikörper Anti-Human-IgG-Cy5. Die entsprechenden Signalstärken der verschiedenen Konstrukte nach dem Screening sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tab. 11: Konstrukte von PorA und deren Signalstärke nach dem Screenen mit Postimmunserum der Impfstoffkandidaten.



Nummer Serum	Konstrukte PorA				
	PorA	PorA-33	PorA-6	PorA-27	PorA-8
3020	43314 (100 %)	20917 (48 %)	7860 (18 %)	41347 (95 %)	1119 (3 %)
3116	49632 (100 %)	5515 (11 %)	1725 (4 %)	23482 (47 %)	11505 (23 %)
3165	61855 (100 %)	11597 (19 %)	6503 (11 %)	59954 (97 %)	3130 (5 %)
3259	61974 (100 %)	10715 (17 %)	3917 (6 %)	57054 (92 %)	9386 (15 %)
3294	62246 (100 %)	11597 (19 %)	6503 (10 %)	59954 (96 %)	3130 (5 %)

Angegeben ist die relative Signalstärke, die Prozentangabe bezieht sich auf PorA des jeweiligen Serums. Die Konstruktnamen entsprechen den molaren Massen.

Die angegebenen Werte in Tabelle 11 sind jeweils der Mittelwert von vier Messungen, wobei der Wert für das Präimmunserum von dem entsprechendem Wert des Postimmunserum abgezogen wurde. Auf beiden Microarrays lagen die Proteine im selben molaren Verhältnis vor. Es wurde die prozentuale Abnahme der Signalstärke des Konstruktes zur Signalstärke des unverkürzten Proteins berechnet.

Der Vergleich der Signalintensitäten zeigte, daß die gebildeten Antikörper gegen PorA wie zuvor bei Omp85 das Protein unabhängig von der Länge erkannten. Wobei das Konstrukt PorA-27 deutlich höhere Signalintensitäten aufwies, als das etwa gleich lange Konstrukt PorA-33. Das läßt gehäufte Bindungsstellen eher am C-terminalen Ende des Moleküls vermuten. Während die beiden anderen kleineren Konstrukte von etwa gleicher Länge auch vergleichbare Signalstärken aufwiesen.

5.5. Screening mit Patientenseren

Vom Referenzzentrum für Meningokokken-Infektionen in Graz standen Seren von Patienten zur Verfügung, die an Meningitis erkrankt waren. Es wurden keine Todesfälle von diesen Patienten gemeldet. Das Alter der Patienten reichte von 8 Monaten bis 33 Jahre, sie waren sowohl männlich (m) als auch weiblich (w). Die bestimmte Serogruppe war in 13 Fällen Serogruppe B, in 6 Fällen Serogruppe C und einmal war sie unbekannt (Tabelle 12).

Tab. 12: Alter, Geschlecht und Serogruppe der 20 Meningitisseren.

#	Alter	Geschlecht	Serogruppe	#	Alter	Geschlecht	Serogruppe
1	17 Jahre	m	B	11	14 Jahre	m	C
2	11 Jahre	m	B	12	6 Jahre	m	C
3	20 Jahre	m	B	13	15 Jahre	w	B
4	16 Jahre	m	?	14	6 Jahre	w	B
5	33 Jahre	w	C	15	17 Jahre	w	B
6	9 Jahre	m	C	16	5 Jahre	m	B
7	2 Jahre	m	B	17	19 Jahre	m	B
8	6 Jahre	w	C	18	33 Jahre	m	B
9	9 Jahre	w	B	19	8 Monate	w	B
10	8 Jahre	w	B	20	15 Jahre	m	C

Die 91 überexprimierten *Neisseria meningitidis* Proteine wurden erneut auf Nitrocellulose gespottet und mit den ersten zehn Patientenseren gescreent. Dabei wurde als sekundärer Antikörper sowohl Anti-Human-IgG als auch Anti-Human-IgM Cy5 markiert eingesetzt und die Immunantwort miteinander verglichen, da nicht sicher war, in welchem Stadium der Krankheit die Seren von den Patienten genommen wurden. Der Körper bildet bei einer Infektionserkrankung in den ersten Tagen zuerst hauptsächlich IgM Antikörper und dann nach etwa 7 bis 10 Tagen IgG Antikörper. Bei diesem Screening zeigte sich, daß die IgG Immunantwort deutlich stärker war, als die von IgM. Daher wurde für weitere Versuche nur der IgG Antikörper eingesetzt. Die Protein Microarrays wurden mit allen Seren gescreent. Da in diesem Fall nicht von jedem Patienten ein sogenanntes Kontrollserum zur Verfügung stand, wie zuvor bei den Impfstoffkandidaten, war ein echter Vergleich nicht möglich. Als Kontrollen wurden daher Seren von Probanden gleichen Alters und Geschlechts gesammelt. Für den Vergleich gesund / krank wurde eine statistische Berechnung nach dem Einstichproben-Gauss-Test (Sachs, 1992) durchgeführt. Dabei wurde von der Signalstärke des Patienten die Signalstärke des Mittelwerts der Kontrollen abgezogen und durch die

Standardabweichung der Kontrollen geteilt. Das Ergebnis diente als Testkriterium. War der Wert größer als 3, so wurde das Ergebnis als signifikant bewertet. Es steht für die erhöhte Antikörperreaktion dieser erkrankten Person. Das Screeningergebnis der 20 Patientenseren ist in Tabelle 13 zusammen gefaßt.

Tab. 13: *Neisseria meningitidis* Proteine, die eine Immunantwort bei Seren von Meningitis Patienten zeigten.

Patient Protein	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0032												6		8	3					
0053					3									8	3		3			
0182	3				3									3			22	4		
0300																	6	3		
0312																	3			
0341	3					4											6			
0368					4															
0377														8				3	3	
0415													4	3	3		3		5	
0432																	6			
0442	25	7	9		19	4	3		3	9		8					25	14		
0471	3													22						
0486		7										5					3			
0488																	8	3		
0593	3											5					20	13		
0623																	6			
0726		10										5		3	3		5			
0741	3																5			
0785												3					16	13		
0846															3					
0872													3							
0926	4																5			
1001																			5	
1030																			3	
1053	4																			
1094						3														
1223												3		6	7			7	3	4
1350					3															
1379		3																		
1429				8																
1443				3									9						3	
1540								3												
1636				4	6					3										
1734																	6	3		
1741														4						
1836	3				3															
1877																3	5			
1893																	7	5		
1931												3		4			13	12		
1985															3					
1988														3						5
1994					8									7					3	
1998	3																	3		
2104	5																			
A1275					3															
B0831	3																4			
B1261																	8			

Nach statistischen Berechnungen unter Berücksichtigung der Kontrolle steht der angegebene Wert bzw. die Testgröße für die erhöhte Antikörperreaktion einer erkrankten Person.

Die gemessenen Signalintensitäten der Antikörperreaktionen bei Patientenseren und Kontrollen sind im Anhang beigefügt. Wie aus Tabelle 13 ersichtlich, zeigte jedes Serum ein individuelles Antikörpermuster, es konnte aber kein Zusammenhang bezüglich Alter, Geschlecht oder Serogruppe festgestellt werden. Vereinzelt zeigte ein Serum starke Antikörperreaktionen zu vielen Proteinen. Einige Proteine hatten jeweils nur bei einem Patienten eine verstärkte Reaktion im Vergleich zur Kontrolle hervorgerufen.

In Abbildung 21 wurde als Beispiel das Screeningergebnis vom Serum 17 mit der entsprechenden Kontrolle gegenübergestellt. Alle 91 *Neisseria meningitidis* Proteine liegen in diesem Feld als Doppelspots vor. Zum Vergleich zwischen den beiden Arrays gescreent mit Serum bzw. Kontrolle wurde eine Eichreihe von IgG in den Verdünnungsstufen 1×10^{-1} bis 1×10^{-4} mit gespottet. Einige signifikante Proteine, die nur im Serum des Patienten auftraten, wurden dabei exemplarisch herausgestellt, wie z.B. die Proteine NMB0593 und NMB0182, die um das etwa 10fache gegenüber der Kontrolle erhöht waren. Andere Proteine, wie z.B. das Protein NMB1985, traten sowohl im Serum als auch in der Kontrolle mit deutlichen Signalstärken auf.

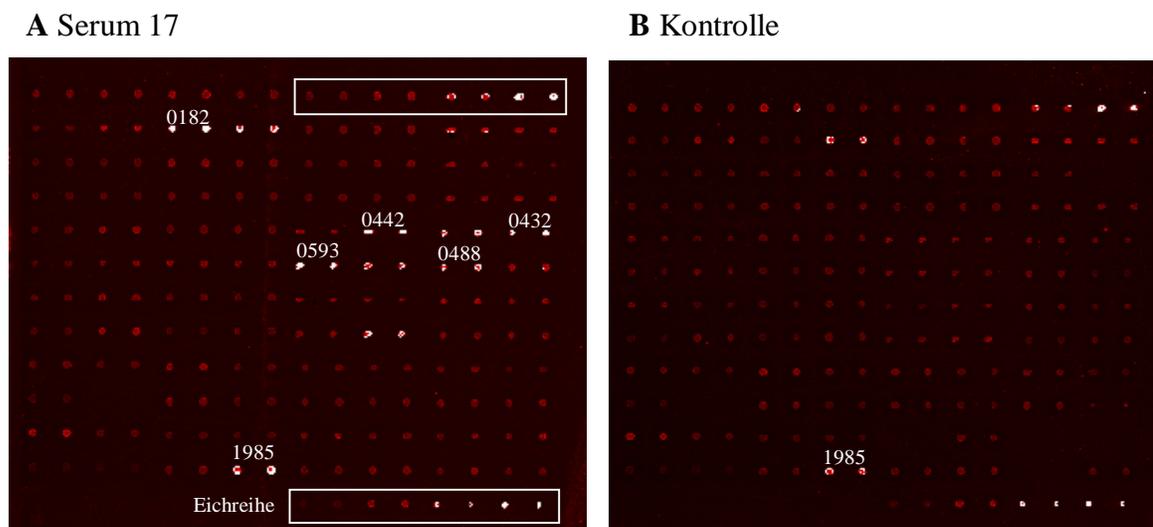


Abb. 21: Proteinarray mit 91 überexprimierten *Neisseria meningitidis* Proteinen vorliegend in Doppelspots, gescreent mit Patientenserum 17 (A) und Kontrolle (B), detektiert mit dem Antikörper Anti-Human-IgG-Cy5. Im Rahmen unterlegt ist die mitgespottete Verdünnungsreihe von IgG. Hervorgehoben wurden exemplarisch einige Proteine, die nur im Serum auftraten.

Beim Screening aller Patientenserum war das Protein NMB0442 sehr auffällig. Eine Antikörperreaktion konnte mit 11 der 20 untersuchten Seren zum Teil mit einer relativen Signalintensität von bis zu 58.000 nachgewiesen werden. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurden Western-Blot-Experimente durchgeführt. Dabei konnte deutlich eine Reaktion des Antikörpers mit dem Protein auf dem Blot bestätigt werden (Abbildung 22). Markiert wurde das Protein NMB0442, bei der darunter liegenden Bande handelt es sich um Abbauprodukte des Proteins, was durch MS-Analyse bestätigt werden konnte.

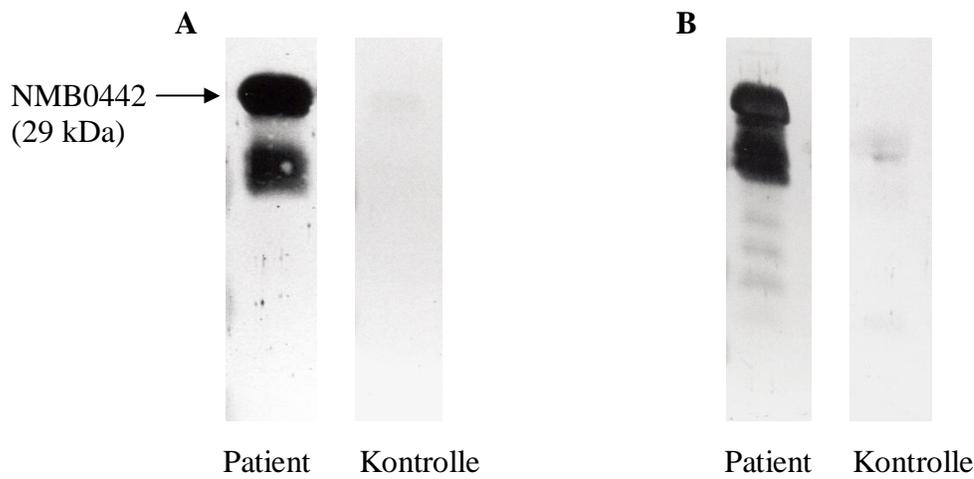


Abb. 22: Western-Blot des Proteins NMB0442. Gescreent im Fall A mit Serum 5 und der entsprechenden Kontrolle, im Fall B mit Serum 17 und der entsprechenden Kontrolle. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit alkalischer Phosphatase und BCIP/NBT als Substrat.

5.5.1. Verschiedene Opa-Proteine

Das Protein NMB0442 gehört zur Gruppe der äußeren Membranproteine, doch die Funktion dieses Proteins ist noch nicht geklärt. Bei einer Datenbankrecherche wurde das Protein als putatives Opa-Protein identifiziert. *Neisseria meningitidis* besitzt drei verschiedene Opa-Proteine: NMB0442, NMB0926 und NMB1636. Alle besitzen einen authentischen Frameshift. Dabei ist die Sequenz von NMB0442 auf Proteinebene zu 94 % identisch mit NMB0926, während NMB1636 nur zu 78 % identisch mit NMB0926 und NMB0442 ist. Aus Tabelle 13 ist ersichtlich, daß NMB0926 mit zwei Seren eine Antikörperreaktion aufwies, während NMB0442 mit 11 Seren eine Reaktion gezeigt hatte. Weiterhin war die gemessene absolute Signalstärke (siehe Anhang) von NMB0926 deutlich

geringer als bei NMB0442, um etwa das 15fache bei den Seren 1 und 17, wobei die gemessene Proteinkonzentration vergleichbar war. In Abbildung 23 sind diese drei Opa-Proteine auf einem Western-Blot gegenübergestellt. Die Proteine wurden mit dem Serum von den Patienten 1 und 17 sowie der entsprechenden Kontrolle gescreent. Damit bestätigte dieses Ergebnis das Screening auf den Proteinarrays. Die Detektion auf dem Blot erfolgte mit einer enzymatischen Farbreaktion. Eine Quantifizierung war mit den vorhandenen Mitteln nicht möglich und damit kein direkter Vergleich zwischen der Signalstärke vom Array zum Blot.

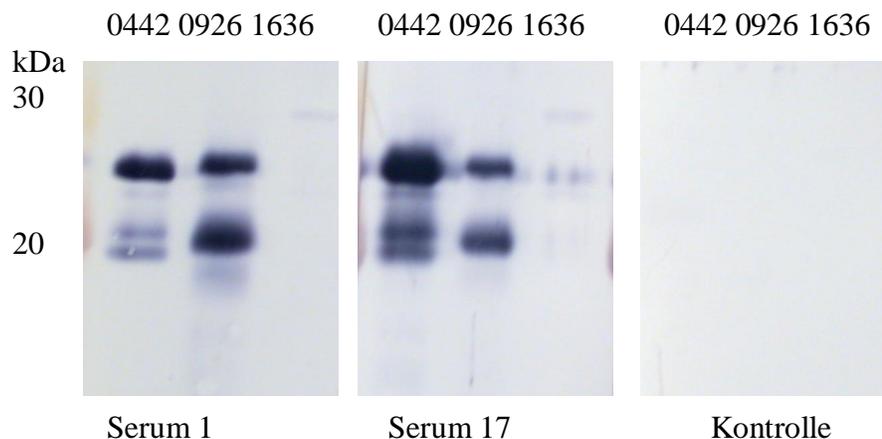


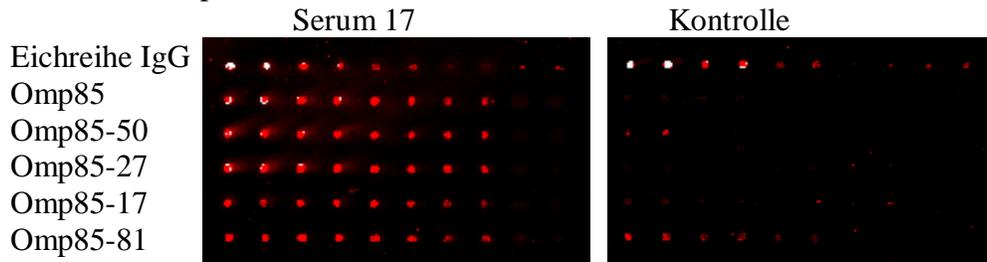
Abb. 23: Western-Blot-Analyse der Opa-Proteine von *Neisseria meningitidis* gescreent mit zwei Seren und einer Kontrolle. Detektion der Proteine mit alkalischer Phosphatase und BCIP/NBT als Substrat.

5.5.2. Untersuchung der verkürzten Konstrukte mit Patientenseren

Die verkürzten Konstrukte von Omp85 und PorA wurden ebenfalls mit den Patientenseren gescreent. Gegen diese Proteine wurden nur bei zwei Seren verstärkt Antikörper gebildet, gegen Omp85 im Serum 17 und gegen PorA im Serum 4. Die Proteine wurden wie zuvor gespottet und lagen in Verdünnungsstufen vor. Nach dem Blocken wurden diese mit den entsprechenden Seren inkubiert und mit dem Antikörper Anti-Human-IgG-Cy5 detektiert. Erneut konnte bestätigt werden, daß jedes Konstrukt unabhängig von der Proteinlänge mit den Antikörpern der Seren reagiert hatte (Abbildung 24). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Proteinfragmente sowohl von den Seren der Impfstoffkandidaten als auch von den an Meningitis erkrankten Patienten erkannt wurden. Die Signalstärken waren für alle

Konstrukte vergleichbar mit den Werten die zuvor bei den Impfstoffkandidaten gemessen wurden. So wies z.B. das Konstrukt Omp85-81 für die Seren der Patienten ebenfalls niedrige Intensitätswerte bei einer Proteinmasse von 81 kDa auf (Daten nicht gezeigt).

A Konstrukte von Omp85:



B Konstrukte von PorA:

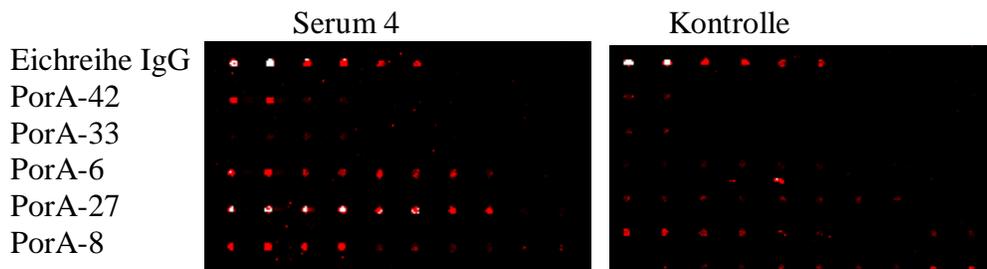


Abb. 24: Konstrukte der Proteine Omp85 und PorA gescreent mit Patientenserum und der entsprechenden Kontrolle, detektiert mit Anti-Human-IgG-Cy5. Jedes Protein lag als Doppelpot in Verdünnungsreihen vor (1×10^{-1} bis 1×10^{-4} für den IgG Antikörper und 1:2, 1:5, 1:10 und 1:100 für die Proteine).