

## 6. Diskussion

Neisserien stellen mit ihrer Fähigkeit, die Schleimhäute des Nasenrachenraums zu kolonisieren, in die Epithelzellen einzudringen und auch die Phagozytose durch Granulozyten zu überleben, fakultativ intrazelluläre Erreger dar (Meyer, 1989). Der Übergang von der extrazellulären Umgebung in das Zellinnere bis in den Blutstrom und die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke verlangen von *Neisseria meningitidis* spezielle Regulationsmechanismen zur optimalen Anpassung an die neue Wirtszellumgebung. Die Fähigkeit von Neisserien, ihre Oberflächenstrukturen zu variieren, trägt zu dieser Adaption bei (Meyer *et al.*, 1990). Welche Bedeutung dabei die phasenvariablen Gene haben, ist bisher wenig aufgeklärt. Oft wurden bei virulenten Genen repetitive Elemente gefunden. Innerhalb solcher Repeats können Rekombinationen stattfinden, wodurch die Expression an- und abgeschaltet wird ("phase variation"), was zu einem schwächer oder stärker virulenteren Phänotyp führt (Grandi, 2001). Von den bekannten 102 phasenvariablen Genen bei *Neisseria meningitidis* MC58, die von Saunders und Snyder (Saunders *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 2001) durch computergestützte Genomanalyse bestimmt wurden, konnten im ersten Teil dieser Arbeit nach Amplifikation der Genprodukte und Klonierung 87 Proteine erfolgreich überexprimiert werden. Einige dieser Gene waren in der Datenbank ("TIGR") mit einem authentischen Frameshift ausgewiesen, die Proteine konnten aber rekombinant exprimiert werden. Die Aufreinigungseffizienz betrug 85 %, was in guter Übereinstimmung mit veröffentlichten Ergebnissen liegt. So konnten bei *Helicobacter pylori* für 60 % der klonierten Gene Protein aus *E. coli* aufgereinigt werden (Grandi, 2001). Bei der Aufreinigung unter nativen Bedingungen ergab sich in dieser Arbeit eine Effizienz von 26 %. Damit lag diese deutlich niedriger als unter denaturierenden Bedingungen, was zu erwarten war, denn nur lösliche Proteine wurden bei diesem Aufreinigerungsverfahren erfasst. Überexprimierte Proteine sind häufig im Bakterium nicht löslich, sie akkumulieren in Einschlußkörperchen (*inclusion bodies*). Bei der Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen werden solche Proteine, die in den *inclusion bodies* angehäuft sind, mit aufgereinigt. Viele Proteine bilden *inclusion bodies*, wenn sie in größerem Maßstab vom Bakterium exprimiert werden. Einige Proteine werden allerdings von der Zelle toleriert und liegen gelöst in ihrer nativen Konfiguration im Cytoplasma vor (Schein, 1989).

Die aufgereinigten *Neisseria* Proteine (sowohl denaturiert als auch nativ) waren Ausgangspunkt für die Herstellung der in dieser Arbeit generierten Proteinarrays.

Während die DNA Microarray Technologie bereits vielseitig eingesetzt wird, sind Protein Microarrays im Laborbetrieb noch nicht etabliert. Zu Beginn dieser Arbeit war erst wenig zu Proteinarrays publiziert worden. Grund hierfür ist, daß DNA und Protein zwei völlig unterschiedliche Makromoleküle darstellen, deren physikochemische und biochemische Eigenschaften sehr unterschiedlich sind. Somit lassen sich die Bedingungen von DNA Arrays nicht direkt auf Proteinarrays übertragen. In dieser Arbeit sollte ein *Neisseria meningitidis* Microarray entwickelt und mit dessen Anwendung humane Seren untersucht werden. Bei einem Microarray spielt die Oberfläche eine bedeutende Rolle. Ausschlaggebend dabei sind die Haftung der Moleküle an die Oberfläche, eine effiziente Antikörperreaktion, präzise Detektionsschritte, sowie die Qualität der erhaltenen Daten bedingt durch das Verhältnis von Signal- zu Hintergrundintensität und das Verhältnis von Signalintensitäten bei Patienten und Kontrollpersonen. Proteine können durch nicht kovalente Oberflächeninteraktionen mit hydrophoben (Nitrocellulose, Polystyren) oder positiv geladenen (Poly-Lysin, Aminosilan) Oberflächen immobilisiert werden. Einige Forschergruppen haben bereits verschiedene Strategien entwickelt, um die strukturelle und funktionelle Intaktheit der Proteine auf Microarrays zu bewahren, um Funktionsstudien wie Protein-Protein-Interaktionen durchführen zu können. Zwei Gruppen von Oberflächen sind dabei untersucht worden, die erste umfasste einfach modifizierte Glas- oder Plastikoberflächen, wie z.B. Aldehyd Slides (MacBeath und Schreiber, 2000) oder Poly-L-Lysin Slides (Haab *et al.*, 2001). In anderen Studien wurden Gel-beschichtete Oberflächen, wie Polyacrylamid (Arenkov *et al.*, 2000) oder Agarose (Afanassiev *et al.*, 2000) verwendet. Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß je nach Aufgabenstellung und Reinheit des Ausgangsmaterials nicht jede Oberfläche für jede Anwendung geeignet war. In dieser Arbeit wurden daher zuerst verschiedene käufliche (Aldehyd und Nitrocellulose) und selbst hergestellte Oberflächen (Poly-L-Lysin und Polyacrylamid) für das Serumscreening getestet. Poly-L-Lysin, ein primäres Amin, bindet negativ geladene Aminosäuren wie Asparaginsäure und Glutaminsäure des Proteins durch ionische Wechselwirkungen, während beim Aldehyd die Aminosäuren Arginin und Lysin durch die Bildung einer

Schiff'-schen Base kovalent gebunden werden. Diese beiden Oberflächen wiesen jedoch keine gute Haftung bzw. eine niedrige Bindungskapazität für Proteine auf. Die Proteine verschmierten auf der Oberfläche, was ein Zeichen möglicher Überladung war. Die Oberflächen Polyacrylamid und Nitrocellulose zeigten dagegen definierte Proteinspots. Das Polyacrylamid besitzt eine vernetzte Struktur, in deren Poren sich die Proteine einlagern können und durch Wasserstoffbrückenbindungen gebunden werden. Bei der Nitrocellulosemembran sind monomere Einheiten zu einem Polymer verknüpft, an diese werden die Proteine nicht kovalent gebunden. Diese beiden Oberflächen wurden im Hinblick auf Reproduzierbarkeit, Standardabweichung sowie das Verhältnis von Signal- zu Hintergrund untersucht. Die Signalintensitäten bei der mit Polyacrylamid beschichteten Oberfläche wies eine Abweichung von bis zu  $\pm 40\%$  auf, während diese bei den Nitrocellulose beschichteten FAST Slides bei nur  $\pm 10\%$  lag. Obwohl beide Oberflächen eine dreidimensionale Struktur besitzen und damit bessere Bindungskapazitäten als Oberflächen mit einer zweidimensionalen Struktur aufweisen (Stillman und Tonkinson, 2000), schien die Oberfläche von Nitrocellulose definierter zu sein als die von Polyacrylamid. Dies konnte bei systematischen Oberflächenstudien für Microarrays in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls bestätigt werden (Angenendt *et al.*, 2003). Relative Signalstärken von bis zu 50.000 konnten in der vorliegenden Arbeit auf Nitrocellulose für Proben bei einem Hintergrund von etwa 100 gemessen werden. Die Detektionsgrenze für einige *Neisseria* Proteine lag bei ca. 100 amol und war damit vergleichbar mit veröffentlichten Werten (Kim *et al.*, 2002; Angenendt *et al.*, 2003; Kersten *et al.*, 2003). Da die mit FAST Slides gewonnenen Ergebnisse gut reproduzierbar waren, wurden diese Slides für alle weiteren Serumuntersuchungen verwendet. Die Proteine wurden indirekt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, was eine sensitive und quantitative Auswertung mit Laserscanner und der entsprechenden Software ermöglichte. Es wurde damit in dieser Arbeit der erste Microarray mit bakteriellen Proteinen hergestellt.

Die ersten Screeningversuche wurden mit Seren von sogenannten Impfstoffkandidaten durchgeführt. Das Serum stammte von gesunden Jugendlichen aus Norwegen, die mit äußeren Membranvesikeln (OMVs) von *Neisseria meningitidis* geimpft worden waren. Diese OMVs wurden durch Zellextraktion von Meningitis Bakterien präpariert und

enthalten hauptsächlich Porine sowie kleine Mengen an anderen Proteinen und Lipopolysaccharide (Frasch *et al.*, 2001). Dieser Test-Impfstoff wurde in Norwegen entwickelt („MenB-Folkehelsa“), seine genaue Zusammensetzung ist jedoch nicht bekannt, da es sich um keinen synthetischen Impfstoff handelt. Insgesamt waren von den 102 vorhergesagten phasenvariablen Genen bei *Neisseria meningitidis* 16 Gene in der Datenbank („TIGR“) als oberflächenassoziiert angegeben. Zwei äußere Membranproteine von den insgesamt 87 getesteten Proteinen hatten hauptsächlich nach der Impfung mit diesen OMVs bei den Versuchspersonen zu einer erhöhten Antikörperbildung geführt. Zum einen war es das Protein Omp85 (NMB0182), das mit 9 von 10 Seren, zum anderen das Protein PorA (NMB1429), welches mit 6 von 10 Seren nachgewiesen werden konnte. Die Antikörperbindung an diese beiden Proteine konnte in Western-Blot-Experimenten mit den Seren der Impfstoffkandidaten bestätigt werden. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit war dieser OMV-Impfstoff bei Jugendlichen in Island eingesetzt worden, wobei ebenfalls hauptsächlich Antikörper gegen das Protein PorA sowie gegen äußere Membranproteine der Klasse 5 gebildet worden waren (Wedegge *et al.*, 2003). Damit zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit eine gute Übereinstimmung mit der Veröffentlichung. Durch einen Wettbewerbsversuch in Anlehnung an die Experimente der Gruppe um Robinson (Robinson *et al.*, 2002) konnte außerdem gezeigt werden, daß die gebildeten Antikörper im Serum gegen Omp85 spezifisch an dieses Protein gebunden hatten. Dabei waren die Antikörper aus dem Serum an das Protein adsorbiert worden und ein Rückgang der Signalstärke um 80 % konnte festgestellt werden. Um die Bindung von Antikörpern an Omp85 und PorA bestimmten Bindungsbereichen im Protein zuzuordnen, wurden von diesen Proteinen verschiedene Konstrukte mit unterschiedlicher Länge hergestellt. Die Signalstärke nahm mit der Verkürzung ab, aber bei allen exprimierten und gespotteten Konstrukten hatte eine Antikörperbindung stattgefunden. Damit gab es für diese Proteine über die gesamte Länge des Moleküls verteilt verschiedene Bindungsstellen bzw. mehrere prominente Bereiche, die immunogen waren. Zwei Konstrukte Omp85-60 und PorA-33 zeigten jedoch trotz geringer Verkürzung (etwa 25 %) eine drastische Abnahme der Signalstärke um fast 80 %, was einen ersten Hinweis auf eine gehäufte Lage von Bindungsstellen in diesem Bereich des Proteins gab. Bei diesem Serumscreening war die Detektion der Antikörper vornehmlich gegen denaturierte Proteine mit linearen Epitopen

erfolgt. Über lineare Epitope von *Neisseria meningitidis* ist nicht viel bekannt, daher müßten an dieser Stelle weitere Untersuchungen zur Charakterisierung möglicher Bindungsstellen folgen. Dagegen hatte eine frühere Veröffentlichung bereits darauf hingewiesen, daß bei einem Epitopmapping des *Lip* Antigens von *Neisseria meningitidis* eine polyklonale Immunantwort gegen konformative Epitope stattgefunden hatte (Tinsley *et al.*, 1992).

Omp85 ist ein hochkonserviertes äußeres Membranprotein, das breitgefächert bei gram-negativen Krankheitserregern auftritt, wie z.B. *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenza* und *Treponema pallidum* (Stephens und Lammel, 2001). Die Funktion von Omp85 ist nicht vollständig geklärt, es zeigt Homologien zum Oberflächenantigen D-15-Ag von *Haemophilus influenzae* und dem Oma87 von *Pasteurella multocida* (Manning *et al.*, 1998). Kürzlich veröffentlichte Arbeiten beschreiben, daß das Omp85 Protein bei *Neisseria meningitidis* eine wesentliche Rolle in der Biogenese der äußeren Membran spielt. Bisher ist bei Bakterien wenig über die Integration von Proteinen in die äußere Membran bekannt (Kleinschmidt, 2003). Das Gen von Omp85 ist im Operon der Lipopolysaccharid-Biosynthese lokalisiert (Genevrois *et al.*, 2003; Voulhoux *et al.*, 2003), wobei Omp85 für die effektive Insertion von Lipiden (Genevrois *et al.*, 2003) sowie integralen Proteinen in die äußere Membran notwendig ist (Voulhoux *et al.*, 2003). Weiterhin wurde die Omp85 Familie in der äußeren Membran von Mitochondrien, bei Eukaryoten, in Pflanzen sowie beim Menschen gefunden (Gentle *et al.*, 2004). Bei Untersuchungen mit *Chlamydia* konnte gezeigt werden, daß Antikörper gegen Omp85 *in vitro* eine Infektion durch dieses Bakterium verhinderten (Stephens und Lammel, 2001). Gegen Omp85 waren in 9 von 10 Seren der Impfstoffkandidaten Antikörper gebildet worden, damit kann dieses Protein als stark immunogen angesehen werden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie waren Gene von *Neisseria meningitidis* MC58 auf Phasenvarianz untersucht worden, wobei Omp85 entgegen früherer Erkenntnisse als nicht phasenvariables Gen ausgewiesen wurde (Martin *et al.*, 2003). Darauf weisen auch die Ergebnisse in dieser Arbeit hin, da in fast allen Seren (9 von 10) Antikörper gegen Omp85 nachgewiesen wurden. Bei Phasenvariation ist ein unterschiedliches An- und Abschalten des Gens zu erwarten. In diesem Fall hätte auch nur ein Teil der untersuchten Personen eine

Antikörperbindung aufweisen sollen, wie das z.B. bei dem Protein PorA zu beobachten war, das nur mit 6 von 10 Seren detektiert wurde.

PorA ist ein bekannter Hauptbestandteil von OMV-Impfstoffen, dessen Immunität bereits gezeigt werden konnte (Wedegé und Froholm, 1986). Monoklonale Antikörper gegen dieses Protein zeigten bakterizide Wirkung und einen Immunschutz im Tiermodell (Saukkonen *et al.*, 1989). In einer Impfstoffkampagne, bei der eine Immunisierung mit diesem OMV-Impfstoff erfolgte, zeigte in erster Linie PorA eine Immunantwort (Rosenqvist *et al.*, 1995). Daher wurde dieses Protein bei Impfstoffuntersuchungen häufig eingesetzt (z.B. Claassen *et al.*, 1996; Cartwright *et al.*, 1999; de Kleijn *et al.*, 2000). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Screeningversuchen wurden bei 6 der 10 Impfstoffkandidaten Antikörper gegen PorA nachgewiesen, damit kann dieses Protein ebenfalls als stark immunogen angesehen werden. PorA ist stark phasenvariabel (Newcombe *et al.*, 1998; van der Ende *et al.*, 1999) und der Einsatz von PorA als Impfstoff daher nur begrenzt möglich (Bethell und Pollard, 2002). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigt, daß PorA als Liposom eingekapselt werden kann und die Immunogenität des Antigens dadurch erhalten bleibt. Damit bietet dieses Verfahren eine Alternative zu den herkömmlichen OMV-Impfstoffen (Arigita *et al.*, 2004).

Für eine weitere Screeningreihe standen 20 Seren von Patienten zur Verfügung, die an Meningitis erkrankt waren. Als Kontrollen dienten Seren von gesunden Personen gleichen Alters und Geschlechts. Zum Vergleich der Signalintensitäten der Proteinarrays untereinander wurden zur Normalisierung nicht markierte IgG- und IgM- Antikörper in Standardreihen mitgespottet. Da in dieser Versuchsreihe Prä- und Postimmenserum nicht von derselben Person stammten, wurde für die statistische Bewertung der Einstichproben-Gauss-Test herangezogen (Sachs, 1992). Das Ergebnis war eine Testgröße. War diese größer als 3, wurde dies als echte Zunahme der Antikörperkonzentration, bedingt durch die Krankheit, bewertet. Wie beim Screening zuvor mit den Seren der Impfstoffkandidaten, zeigte jede Person individuelle Reaktionen gegenüber dem gesamten Proteinspektrum. Dies weist daraufhin, daß entweder die gleichen Proteine nicht in jeder Person die gleiche Antikörperproduktion initiierten bzw. nicht jedes phasenvariable Protein bei jedem

Patienten exprimiert wurde. Weiterhin können Antikörper möglicherweise auch bei gesunden Personen auftreten, 10 % der Bevölkerung trägt *Neisseria meningitidis* Bakterien in sich ohne zu erkranken. Auffällig war das Protein NMB0442, gegen das bei 11 von 20 Patienten Antikörper gebildet worden waren, bei einer Steigerung der Signalstärke im Serum um das 10fache gegenüber den Kontrollen. Die Funktion dieses Proteins ist noch nicht geklärt. In der TIGR-Annotierung wurde es mit einem authentischen Frameshift ausgewiesen. Das Protein konnte jedoch rekombinant exprimiert werden und weist Homologien zu Opa-Proteinen auf. Opa-Proteine sind integrale äußere Membranproteine, deren hydrophober Bereich der Signalpeptidsequenz von einer Anzahl von CTCTT-Pentamereinheiten kodiert wird. Ein Opa-Protein wird nur dann korrekt translatiert und exprimiert, wenn die Anzahl der CTTCT-Pentamereinheiten zum richtigen Leserahmen führt (Stern *et al.*, 1986; Stern und Meyer, 1987; Aho *et al.*, 1991). Das Expressionsmuster der Opa-Proteine variiert bei Isolaten, die aus verschiedenen Körperflüssigkeiten eines Erkrankten wie Blut, Rückenmark usw. entnommen wurden (Tinsley und Heckels, 1986; Woods und Cannon, 1990). Bei *Neisseria gonorrhoeae* konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, daß Opa-Proteine eine wichtige Rolle bei der Durchdringung von *Neisseria* in Wirtszellen spielen (van Putten *et al.*, 1995; Freissler *et al.*, 2000). Das Protein NMB0442 weist auf der Proteinebene starke Homologien (70 %) zu dem veröffentlichten Protein OpaJ in *Neisseria meningitidis* auf. Für dieses Protein konnte gezeigt werden, daß die Interaktion zwischen Protein und Rezeptor auf humanen Zellen von der Konformation des Proteins abhängt (de Jonge *et al.*, 2002). Weiterhin wurde bei einem homologen Protein von *Streptococcus pyogenes* kürzlich ein sogenannter „serum opacity factor“ nachgewiesen, der stark virulent wirkt und zu Infektionen im Nasenrachenraum führt (Courtney *et al.*, 2003). Dies weist auf die Bedeutung der Opa-Proteine während einer Infektion hin und konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit belegt werden. In 11 von 20 Seren bei Meningitis Patienten konnten Antikörper gegen das Opa-Protein NMB0442 nachgewiesen werden. Alle diese Fakten zeigen, daß Opa-Proteine wichtige Virulenzfaktoren mit hochvariablen Sequenzen sind.

In Meningokokken wurden bei den verschiedenen Stämmen von *Neisseria* drei bis vier opa-Loci identifiziert (Aho *et al.*, 1991; Hobbs *et al.*, 1994). Drei Opa-Proteine aus *Neisseria*

*meningitidis* MC58 konnten in dieser Arbeit rekombinant exprimiert werden, NMB0926, NMB0442 und NMB1636. Diese wurden mit Hilfe von Patientenseren untersucht. Dabei sind NMB0926 und NMB0442 zu 94 % identisch auf Proteinebene, während das Protein von NMB1636 nur 78 % Übereinstimmungen mit NMB0442 sowie mit NMB0926 aufwies. Obwohl die Proteine denaturiert mit linearisierten Epitopen vorlagen, zeigten sie ein unterschiedliches Verhalten gegenüber den Antikörpern der Seren. Ein Hauptunterschied bestand in der Repeatanzahl, während der Repeat bei NMB0442 viermal hintereinander auftrat, lag der gleiche Repeat bei NMB0926 sechsmal vor. Ob dies ausschlaggebend für die unterschiedliche Immunantwort ist, müßte in einem Epitopmapping geklärt werden.

Vergleicht man die Screeningergebnisse der Impfstoffkandidaten mit denen der Patientenseren, so wurden nach der Impfung mit den äußeren Membranvesikeln hauptsächlich Antikörper gegen die Proteine Omp85 und PorA gebildet. Bei den Patienten nach einer Meningitis-Infektion lagen hingegen hauptsächlich Antikörper gegen das Opa-Protein NMB0442 vor. Nur bei einem von 20 Patienten waren in dieser Studie Antikörper gegen PorA gebildet worden. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür bieten, daß bei einer Untersuchung mit demselben OMV-Impfstoff in Norwegen bei nur 57 % der untersuchten Personen ein Immunschutz erreicht werden konnte (Perkins *et al.*, 1998). Das Omp85 Protein hatte beim Screenen mit den Seren der Impfstoffkandidaten eine starke immunogene Wirkung gezeigt. Bei den Patientenseren dagegen konnten nur bei 5 von 20 Patienten Antikörper gegen Omp85 detektiert werden. Damit ist dieses Protein sicherlich als potentieller Impfstoff nur bedingt einsatzfähig. Interessant wäre weiterhin, das Opa-Protein (NMB0442) in einem geeigneten Tiermodell auf sein Immunisierungspotential zu untersuchen. Für eine Impfstoffentwicklung sind diese Proteine allerdings wenig geeignet (Maskell *et al.*, 1993), denn innerhalb eines Stammes von *Neisseria meningitidis* können eine Vielzahl von verschiedenen Opa-Proteinen exprimiert werden. In einer Studie von 228 Stämmen wurden 26 verschiedene Varianten von Opa-Proteinen gefunden (Wang *et al.*, 1993). Andererseits zeigen diese Ergebnisse auch wie wenig eigentlich über den Hergang der Erkrankung und die Bildung eines effektiven Immunschutz bekannt ist. Sicher müßten deutlich mehr Seren von Patienten getestet und das Proteinspektrum erweitert werden, um ein besseres Verständnis der Abläufe während einer Infektion zu erhalten.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß das Protein NMB0442 während der Infektion exprimiert wird, was ein Hinweis darauf ist, daß dieses Protein eine wichtige Rolle während der Meningitis-Infektion spielt. Dies ist von besonderem Interesse, da ein Anstieg an Meningokokkenerkrankungen weltweit zu verzeichnen ist, besonders verursacht durch die Serogruppe B, die häufig in Europa und Nordamerika auftritt und gegen die es noch immer keinen effektiven Impfstoff gibt. Andere Techniken wurden bereits eingesetzt, um potentielle Impfstoffkandidaten zu identifizieren, wie z.B. durch das Screenen einer *Neisseria meningitidis* Mutanten Bibliothek im Rattenmodell (Sun *et al.*, 2000) oder durch die Immunisierung von Mäusen mit *Neisseria* Antigenen, die in *E. coli* exprimiert worden waren (Pizza *et al.*, 2000). Daher ist die Microarray Technologie ein zusätzliches Werkzeug, um neue mögliche Impfstoffkandidaten zu identifizieren. In einer vergleichbaren Arbeit wurde die DNA Microarray Technologie bei *Neisseria meningitidis* erfolgreich eingesetzt. Änderungen in der Genregulation während der Wirtszellinteraktion hatten neue potentielle Impfstoffkandidaten aufgezeigt (Grifantini *et al.*, 2002). Von den 347 untersuchten Genen waren bei 5 die entsprechenden Antigene in der Lage eine bakterizide Antikörperbildung in Mäusen hervorzurufen. Doch handelte es sich bei diesen Kandidaten um keine phasenvariablen Gene, daher war ein Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit konnte die Protein-Microarray Technologie erstmals bei *Neisseria meningitidis* erfolgreich angewandt werden. Durch das Screenen mit Seren war es möglich, potentielle Impfstoffkandidaten zu identifizieren. So ist das Opa85 als Zusatz für einen synthetischen Impfstoff durchaus geeignet. Die Protein-Microarray Technologie ist weiterhin eine gute Methode, um diagnostische Marker zu finden. Das Opa-Protein (NMB0442) wurde bei mehr als 50 % der Patientenserum nachgewiesen. Weitere Studien mit verschiedenen *Neisseria* Stämmen müßten an dieser Stelle durchgeführt werden, um die Anwendung zu validieren. Die Untersuchungen dieser Arbeit sind damit ein erster Schritt in der Entwicklung diagnostischer Marker. Eine Meningokokkenerkrankung wird zur Zeit immer noch durch Kultivierung des Organismus aus Blut oder Rückenmarksflüssigkeit diagnostiziert, was sehr zeitaufwendig ist. Durch einen Schnelltest, z.B. auf einem Proteinarray, könnte diese Diagnosedauer wesentlich verkürzt werden.

Für die Zukunft ist zu erwarten, daß die Microarrays in ihrer Weiterentwicklung eine breite Anwendung in der medizinischen Forschung und Praxis finden werden, da sie die Möglichkeit bieten, mit kleinsten Probenvolumina im hohen Durchsatz zu arbeiten und ein Serumscreening mit hoher Sensitivität und Spezifität ermöglichen. Rasche Erkennung der Erkrankung mittels diagnostischer Marker, Therapie- und Infektionsverlaufsstudien und die Serotypisierung sind u.a. potentielle Anwendungsgebiete. Desweiteren sind die hergestellten Expressionsklone eine wertvolle Quelle rekombinanter Proteine für verschiedenste Anwendungen, z.B. für Studien von Protein-Protein-Interaktionen, dem Wirkstoff-Screening oder zur Gewinnung monoklonaler Antikörper für die Grundlagenforschung.