

Identifikation und Charakterisierung neuer immunogener Proteine und anschließende Generierung rekombinanter Antikörper mittels Phage Display

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Molekularbiologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

vorgelegt von Daniel Connor
geboren in Freiburg im Breisgau

Potsdam, den 06.09.2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Frank F. Bier
2. Gutachter: Prof. Dr. Katja Arndt
3. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Dübel

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-104120
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-104120>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	VI
Abstract	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Bakterien	1
1.1.1 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1
1.1.2 <i>Neisseria meningitidis</i>	2
1.1.3 <i>Borrelia burgdorferi</i>	3
1.1.4 <i>Clostridium difficile</i>	4
1.2 Das Immunsystem	5
1.2.1 Die Immunantwort	5
1.2.2 Antigenerkennung und -präsentation durch Immunzellen.....	7
1.2.3 Antikörper und Antikörperfragmente	9
1.3 Phage Display	10
1.4 Stand der Technik.....	11
1.4.1 Methoden zur Detektion von pathogenen Bakterien	11
1.4.2 Screeningmethoden für die Identifikation immunogener Proteine.....	13
1.5 Motivation und Arbeitshypothese	14
2 Material und Methoden	17
2.1 Chemikalien, Puffer und Medien.....	17
2.2 Antikörper	17
2.3 Oligonukleotide und Vektoren	18
2.4 Bakterienstämme	18
2.5 Herstellen von <i>E. coli</i> Zelllysaten.....	18
2.6 Konstruktion genomischer DNA Bibliotheken.....	19
2.6.1 Bakterienkulturen.....	19
2.6.2 Zellyse und Extraktion genomischer DNA	19
2.6.3 Fragmentierung genomischer DNA.....	20
2.6.4 Vorbereitung des Plasmidvektors	21
2.6.5 Klonierung der DNA Fragmente	22

2.6.6	Transformation mittels Elektroporation	22
2.6.7	Titerbestimmung der genomischen DNA Bibliothek.....	23
2.6.8	Bibliotheksvalidierung mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung	23
2.7	Erstellen der Phage Display Bibliothek.....	24
2.7.1	Verpacken der Bibliothek mit Hyperphage	24
2.7.2	Titerbestimmung der verpackten Bibliothek	25
2.7.3	Bibliotheksvalidierung mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung	25
2.8	Selektion immunogener Polypeptidphagen.....	25
2.8.1	Anreicherung bindender Polypeptidphagen durch Panning.....	25
2.8.2	Titerbestimmung nach der Elution und Fällung während des Pannings.....	26
2.8.3	Produktion von Einzelklonen für das Polypeptid Screening.....	26
2.8.4	Screening der Einzelklone mittels ELISA.....	27
2.9	Validierung des immunogenen Charakters der Volllängenproteine.....	28
2.9.1	Amplifikation und Klonierung der Volllängengene	28
2.9.2	Expression und Aufreinigung der Volllängenproteine	28
2.9.3	Kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Assay	29
2.9.4	SDS-PAGE zur Kontrolle der Volllängenproteine.....	29
2.9.5	Validierungs-ELISA.....	30
2.10	Charakterisierung der Antigenregionen.....	30
2.10.1	Epitopmapping mittels Microarray	30
2.10.2	Microarray Analyse.....	31
2.10.3	Alaninscan mittels Microarray.....	31
2.10.4	Epitopmapping und Alaninscan mittels Cellulose Membran	32
2.11	Überprüfung der Transkription der hypothetischen Proteine	32
2.11.1	Isolierung der Gesamt-RNA.....	32
2.11.2	Analyse der RNA Integrität	33
2.11.3	Reverse Transkription in Erststrang-cDNA	33
2.11.4	Quantitative Echtzeit-PCR	33
2.12	Selektion rekombinanter scFv-Antikörper mittels Phage Display	33
2.12.1	Auswahl der Proteine und Peptidsequenzen als Antigene	33
2.12.2	Produktion und Aufreinigung der Proteine.....	34

2.12.3	Panning mit HAL9/10 Bibliotheken	34
2.12.4	Produktion löslicher, monoklonaler scFv-Antikörper für das Screening.....	35
2.12.5	Screening löslicher scFv-Antikörper mittels ELISA	35
2.12.6	Titrations-ELISA	36
2.13	Expression der Antikörper als scFv-Fc-Fusionsproteine.....	37
2.13.1	Umklonierung der scFv-Antikörper Gene und Produktion in HEK293-6E Zellen	37
2.13.2	SDS-PAGE und Western Blot	37
2.14	Charakterisierung der Antikörper	38
2.14.1	Titrations-ELISA der scFv-Fc (human)-Fusionsantikörper.....	38
2.14.2	Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten mittels SPR.....	39
2.14.3	ELISA mit Zelllysat und Zellen	40
2.15	Bioinformatische Analyse.....	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Konstruktion genomischer DNA Bibliotheken.....	41
3.2	Verpacken der Bibliotheken mit Hyperphage	44
3.3	Selektion immunogener Polypeptidphagen.....	45
3.3.1	Selektion immunogener Polypeptidphagen von <i>N. gonorrhoeae</i>	45
3.3.2	Selektion immunogener Polypeptidphagen von <i>N. meningitidis</i>	49
3.3.3	Selektion immunogener Polypeptidphagen von <i>B. burgdorferi</i>	51
3.3.4	Selektion immunogener Polypeptidphagen von <i>C. difficile</i>	51
3.4	Klonierung und Produktion der Volllängenproteine	51
3.5	Validierung des immunogenen Charakters der Volllängenproteine.....	53
3.6	Charakterisierung der Antigenregionen.....	54
3.6.1	Bestimmung der Epitopregionen durch Epitopmapping.....	54
3.6.2	Bestimmung kritischer Aminosäurereste mittels Alaninscan	65
3.7	Erstellen der Proteinmodelle	75
3.8	Überprüfung der Transkription mittels quantitativer Echtzeit-PCR.....	83
3.9	Auswahl der Proteine für die Antikörperproduktion	84
3.9.1	Nachbarschaftsproteine und funktionelle Partnerproteine von NGO1634.....	84
3.9.2	BLAST und Multiple Alignments	86
3.9.3	Vorhersage der Lokalisation und 3D-Struktur	86

3.9.4	Hydrophobizitätsplots	87
3.9.5	Transmembrantopologie und Vorhersage von Signalpeptiden	88
3.10	Produktion und Charakterisierung rekombinanter scFv-Antikörper	89
3.10.1	Panning und Screening mit der HAL9/10 Bibliothek	89
3.10.2	Titrations-ELISA der scFv-Antikörper.....	89
3.11	Produktion und Charakterisierung rekombinanter scFv-Fc (human)-Fusionsantikörper	92
3.11.1	Western Blot zur Kontrolle der Bindung an die Produktionszelllinie.....	92
3.11.2	Titrations-ELISA der scFv-Fc (human)-Fusionsantikörper.....	93
3.11.3	Affinitätsmessung mittels SPR.....	94
3.11.4	ELISA auf Zellen und Zelllysate von <i>N. gonorrhoeae</i>	96
4	Diskussion	98
4.1	Konstruktion genomischer DNA Bibliotheken.....	98
4.2	Selektion von Polypeptidphagen und Identifikation neuer immunogener Proteine	99
4.3	Identifikation und Charakterisierung linearer Epitope.....	100
4.4	Proteinmodellierung und Kartierung der identifizierten Epitope	100
4.5	Auswahl spezifischer Proteine für die Antikörperscreenings.....	108
4.6	Charakterisierung rekombinanter scFv-Fc-Fusionsantikörper	108
5	Schlussfolgerung und Ausblick	111
	Literaturverzeichnis.....	i
	Abbildungsverzeichnis.....	xviii
	Tabellenverzeichnis	xxiii
	Abkürzungsverzeichnis	xxiv
I	Verwendete Chemikalien und Puffer	xxvi
II	Oligonukleotide	xxx
III	Vektorkarten.....	xxxii
IV	Schematische Übersicht der isolierten Polypeptide.....	xxxv
V	Epitopmappings und Spezifitätsassays.....	xxxvi
VI	qPCR der Transkripte der ausgewählten Proteine für die Antikörperisolation.....	xlii
VII	String Datenbank Datenausgabe	xliii
VIII	Alignments der Proteine für die Antikörperselektion	xliv
IX	CDR Vergleich der isolierten, rekombinanten scFv-Antikörperfragmente.....	xlvi

X	Western Blot Analyse der exprimierten scFv-Fc-Antikörper	xlvii
XI	SPR Messungen.....	xlviii
	Wissenschaftliche Leistungen	lii
	Danksagung	liii
	Eidesstattliche Erklärung	lv

Zusammenfassung

Seit der Einführung von Antibiotika in die medizinische Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten existiert ein Wettlauf zwischen der Evolution von Bakterienresistenzen und der Entwicklung wirksamer Antibiotika. Während bis in die 80er Jahre verstärkt an neuen Antibiotika geforscht wurde, gewinnen multiresistente Keime heute zunehmend die Oberhand. Um einzelne Pathogene erfolgreich nachzuweisen und zu bekämpfen, ist ein grundlegendes Wissen über den Erreger unumgänglich. Bakterielle Proteine, die bei einer Infektion vorrangig vom Immunsystem prozessiert und präsentiert werden, könnten für die Entwicklung von Impfstoffen oder gezielten Therapeutika nützlich sein. Auch für die Diagnostik wären diese immundominanten Proteine interessant. Allerdings herrscht ein Mangel an Wissen über spezifische Antigene vieler pathogener Bakterien, die eine eindeutige Diagnostik eines einzelnen Erregers erlauben würden.

Daher wurden in dieser Arbeit vier verschiedene Humanpathogene mittels Phage Display untersucht: *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Borrelia burgdorferi* und *Clostridium difficile*. Hierfür wurden aus der genomischen DNA der vier Erreger Bibliotheken konstruiert und durch wiederholte Selektion und Amplifikation, dem sogenannten Panning, immunogene Proteine isoliert. Für alle Erreger bis auf *C. difficile* wurden immunogene Proteine aus den jeweiligen Bibliotheken isoliert. Die identifizierten Proteine von *N. meningitidis* und *B. burgdorferi* waren größtenteils bekannt, konnten aber in dieser Arbeit durch Phage Display verifiziert werden. Für *N. gonorrhoeae* wurden 21 potentiell immunogene Oligopeptide isoliert, von denen sechs Proteine als neue zuvor unbeschriebene Proteine mit immunogenem Charakter identifiziert wurden. Von den Phagen-präsentierten Oligopeptide der 21 immunogenen Proteine wurden Epitopmappings mit verschiedenen polyklonalen Antikörpern durchgeführt, um immunogene Bereiche näher zu identifizieren und zu charakterisieren. Bei zehn Proteinen wurden lineare Epitope eindeutig mit drei polyklonalen Antikörpern identifiziert, von fünf weiteren Proteinen waren Epitope mit mindestens einem Antikörper detektierbar. Für eine weitere Charakterisierung der ermittelten Epitope wurden Alaninscans durchgeführt, die eine detaillierte Auskunft über kritische Aminosäuren für die Bindung des Antikörpers an das Epitop geben.

Ausgehend von dem neu identifizierten Protein mit immunogenem Charakter NGO1634 wurden 26 weitere Proteine aufgrund ihrer funktionellen Ähnlichkeit ausgewählt und mithilfe bioinformatischer Analysen auf ihre Eignung zur Entwicklung einer diagnostischen Anwendung analysiert. Durch Ausschluss der meisten Proteine aufgrund ihrer Lokalisation, Membrantopologie oder unspezifischen Proteinsequenz wurden scFv-Antikörper gegen acht Proteine mittels Phage Display generiert und anschließend als scFv-Fc-Fusionsantikörper produziert und charakterisiert.

Die hier identifizierten Proteine und linearen Epitope könnten einen Ansatzpunkt für die Entwicklung einer diagnostischen oder therapeutischen Anwendung bieten. Lineare Epitopsequenzen werden häufig für die Impfstoffentwicklung eingesetzt, sodass vor allem die in dieser Arbeit bestimmten Epitope von Membranproteinen interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen in diese Richtung sind. Durch weitere Untersuchungen könnten möglicherweise unbekannte Virulenzfaktoren entdeckt werden, deren Inhibierung einen entscheidenden Einfluss auf Infektionen haben könnten.

Abstract

Since the advent of antibiotics into the field of medical therapy of bacterial infections, there has been a battle of effective antibiotics and the everlasting evolution of bacterial resistances. Until the 1980s many antibiotics were developed after invention of the first applied antibiotic penicillin in 1946. Since then, antibiotic research has been largely neglected resulting in the evolution of numerous strains from different bacteria with multiple resistances to available antibiotics. Therefore, extensive knowledge of a pathogen is crucial to detect and fight a particular disease. Hence, proteins that are processed and presented preferentially by the immune system during an infection could be beneficial for the development of vaccines and targeted therapeutic agents. Furthermore, immunodominant proteins could be interesting for the development of a diagnostic tool. However, many potential antigen targets of most pathogenic bacteria are still unknown.

On this account, four human pathogens were examined in this work utilising phage display: *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Borrelia burgdorferi* and *Clostridium difficile*. Phage libraries were constructed from genomic DNA of the four pathogens. These libraries were used to isolate immunogenic proteins by panning through repetitive rounds of selection and amplification. Immunogenic proteins were successfully isolated for all pathogens except *C. difficile*. The identified proteins from *N. meningitidis* and *B. burgdorferi* had mostly been described before. However, they were verified by phage display in this work. Twenty-one potentially immunogenic oligopeptides were isolated from the *N. gonorrhoeae* library. Six of those were identified as novel proteins with an immunogenic character and validated also as full length proteins. Epitope mappings were conducted for all of the 21 phage presented oligopeptides with different polyclonal antibodies to identify and characterise the immunogenic regions. Linear epitopes were found unambiguously for ten proteins with the three applied antibodies. In addition, epitopes for five proteins were identified with at least one antibody. The determined epitopes were then further characterized by alanine scans to investigate the impact of each individual amino acid on the binding of the antibody to the antigen's epitope.

Based on the novel identified immunogenic protein NGO1634, 26 additional proteins were selected due to their functional resemblance. These proteins were analysed with bioinformatic tools and amongst others checked for their localisation, membrane topology and conservation of their protein sequence. Finally, scFv antibody fragments were isolated from a phage display library (HAL9/10) against eight proteins. The best antibodies were then produced as scFv-Fc fusion antibodies and their binding behaviour was further characterised.

The identified proteins and linear epitopes could serve as a starting point for the development of diagnostic or therapeutic tools. Further studies could unveil unknown virulence factors. Inhibition of those virulence factors could possibly have a vital impact on countering infections. Furthermore, linear epitopes are commonly used for vaccine development. Novel epitopes of membrane proteins could be interesting candidates for further immunization studies.

1 Einleitung

1.1 Bakterien

Bakterien sind mikroskopisch kleine, einzellige Mikroorganismen, die sich durch ihre Überlebensfähigkeit an alle noch so lebensunwirtlichen Habitate angepasst haben. Dabei kolonisieren extremophile Bakterien Milieus mit extremen pH-Werten und Temperaturen, hoher Feuchtigkeit oder Trockenheit [1]. So besiedeln unterschiedlich spezialisierte Bakterien in großer Anzahl den menschlichen und tierischen Körper [2,3], leben im Boden [4] und im Wasser [5], lassen sich in der Nähe von Geysiren [6] und heißen Unterwasserquellen [7] nieder oder trotzen eisigen Temperaturen [8]. Einige Bakterien sind zudem in der Lage temporäre Umweltveränderungen durch Sporenbildung zu überdauern [9]. Die kommensalen Bakterien des Menschen leben in großer Anzahl auf der Haut, den Schleimhäuten und dem Darm. Während eine Vielzahl von Bakterien ihrem Wirt als Symbiosepartner unter anderem beim Verdauen und Aufschluss der Nahrung oder als Schutz dient, existieren auch etliche pathogene Bakterien, die Pflanzen, Menschen und Tiere infizieren und unterschiedlich schwere Erkrankungen hervorrufen können. Dabei sind die Pathogene aufgrund ihrer Toxizität und Aggressivität unterschiedlich virulent und werden nach ihrem Gefahrenpotential in vier Risikogruppen eingeteilt. Die bakteriell verursachten Krankheiten mit den schwerwiegendsten Folgen sind Tuberkulose, Milzbrand, Cholera, Lepra und die Pest, wobei Tuberkulose mit 9,6 Millionen neuen Fällen und 1,5 Millionen Todesfällen im Jahr 2014 die zur Zeit tödlichste bakterielle Infektionskrankheit darstellt [10]. Neben Atemwegsinfektionen und der Infektion über Lebensmittel sind sexuell übertragbare Krankheiten der Hauptübertragungsweg von bakteriellen Infektionen. Des Weiteren sind trotz immer strenger werdender Hygienevorschriften nosokomiale Infektionen auch in Industrienationen weiterhin ein ernst zu nehmendes Problem [11]. Die potentielle Gefahr, die von bakteriellen Infektionen ausgeht, wird aufgrund der Versäumnis in der Entwicklung neuer Antibiotika und des exzessiven Antibiotikagebrauchs sogar noch potenziert. So wurden in den letzten Jahrzehnten zunehmend multiresistente Bakterienspezies isoliert, die nur noch schwer zu behandeln sind [12]. Erst kürzlich wurden Fälle von superresistenten *Klebsiella pneumoniae* Stämmen bekannt, die gegen Carbapeneme resistent sind und auch Resistenzen gegen die bisher verwendete Alternative Colistin entwickelt haben [13]. Das Resistenzgen für die Polymyxinresistenz, eine Gruppe von Antibiotika zu denen auch Colistin gehört, wurde auch in *E. coli* gefunden. Liu *et al.* zeigten, dass das entsprechende Gen durch Plasmid-assoziierten, horizontalen Gentransfer ausgetauscht werden kann [14].

1.1.1 *Neisseria gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae ist ein gramnegatives, pathogenes β -Proteobakterium, das üblicherweise als Diplokokkus vorkommt und ausschließlich den Menschen als Wirt befällt. Es gehört zum Genus *Neisseria*, der sowohl das Pathogen *Neisseria meningitidis* und weitere nicht-pathogene Spezies wie *Neisseria lactamica* oder *Neisseria cinerea* einschließt. Das Pathogen ist der Erreger der sexuell übertragbaren Krankheit Gonorrhoe und wird häufig als Gonokokkus abgekürzt. Gonorrhoe ist eine

1 Einleitung

der am längsten bekannten Krankheiten und die Symptome wurden bereits während der Zeit des griechischen und römischen Weltreichs und in der Bibel erwähnt [15]. Im Jahr 2008 wurde von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) die Anzahl von 499 Millionen Neuinfektionen mit einer sexuell übertragbaren Krankheit geschätzt. Hierbei wurden nur die vier sexuell übertragbaren Infektionen (STI) Gonorrhoe, Chlamydien, Syphilis und Trichomoniasis für die Schätzung berücksichtigt [16]. Allein 106 Millionen Neuinfektionen davon fielen auf Gonorrhoe [17]. *N. gonorrhoeae* besiedelt die urogenitalen Epithelzellen und kann bis in den oberen Genitaltrakt wandern, was eine Entzündung im Beckenbereich (PID) der Frau zur Folge haben kann [18,19]. Zudem wurde gezeigt, dass *N. gonorrhoeae* bei der Infektion des Gebärmutterhalses Biofilme ausbildet [20]. In seltenen Fällen führt eine unbehandelte Infektion von *N. gonorrhoeae* zu Sterilität bei Männern oder Unfruchtbarkeit bei Frauen als Folge der PID [21]. Des Weiteren berichten einige Studien von einer erhöhten HIV Übertragung im Zuge einer *N. gonorrhoeae* Infektion [22,23]. Aufgrund der Tatsache, dass 80 % der Infektionen bei Frauen asymptomatisch verlaufen [21], bleibt eine Diagnose häufig aus, sodass keine Behandlung erfolgt und die Infektion weiter übertragen wird. Auch bei Männern sind asymptomatische Krankheitsverläufe bekannt, jedoch in einem geringen Maß [24–27]. Seit der Einführung von Antibiotika gegen *N. gonorrhoeae* entwickelten sich Antibiotika-resistente Stämme, die meist eine Alternative in Form eines anderen Antibiotikums forderten. Durch horizontalen Gentransfer ist es *N. gonorrhoeae* gelungen, Resistenzen gegen alle eingesetzten Antibiotikaklassen zu entwickeln, wie zum Beispiel Sulfanilamide, Penicilline, Tetracycline und neuerdings auch Fluorochinolone [23,28,29]. Des Weiteren wurden erst kürzlich auch resistente Stämme gegen die letzte momentan einzeln wirksame Antibiotikaklasse, die Cephalosporine, in verschiedenen Teilen der Erde isoliert [30–32]. Erst im letzten Quartal des Jahres 2015 gingen Meldungen eines neuen superresistenten *N. gonorrhoeae* Stamms in England durch die Presse. Durch ein außergewöhnlich umfangreiches Repertoire an Schutzmechanismen gelingt es *N. gonorrhoeae* dem Immunsystem auszuweichen und sich etlichen Abwehrmechanismen zu widersetzen. So produziert das Pathogen zum Beispiel IgA₁ Proteasen, die die Immunglobulin A (IgA) Antikörper abbauen, die hauptsächlich in den urogenitalen Schleimhäuten vorkommen [33,34]. Des Weiteren verfügt *N. gonorrhoeae* über die Möglichkeit Antigenstrukturen wie Pili oder die sogenannten Opacity Proteine an der Zelloberfläche über Genrekombination zu variieren [35,36]. Ein weiterer Virulenzfaktor ist ein Porin auf der äußeren Membran (P.I), durch den die Gonokokken möglicherweise dem Verdau durch Phagozyten entgehen [37]. Die Immunantwort findet hauptsächlich auf der Schleimhautebene statt und bleibt nicht als Immungedächtnis längerfristig erhalten. Dies führt zu einer hohen Reinfektionsrate der Patienten, teilweise auch mit dem selben *N. gonorrhoeae* Stamm [32]. Daher ist die Entwicklung eines Impfstoffs erschwert und nicht absehbar [27,29].

1.1.2 *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis gehört wie *N. gonorrhoeae* zum Genus *Neisseria* und ist ein gramnegatives Bakterium. Es ist ein obligat humanes Pathogen, das jedoch im Nasopharynx von 3–25 % der gesunden Population angesiedelt ist [38,39]. Obwohl die Träger oft eine natürliche Resistenz entwickeln, gibt es jährlich 1,2 Millionen invasive Fälle der Meningitis weltweit, vor allem unter Kindern und Heranwachsenden, mit einer hohen Mortalität und Morbidität [40]. Trotz rechtzeitiger

Behandlung liegt die Sterberate bei 10–15 % [41]. Gelangt *N. meningitidis* in die Blutbahn kann die Sepsis durch eine hohe Bakterienanzahl und Endotoxinkonzentration innerhalb von 24–48 Stunden zum Tod führen [42]. Aber auch bei einer überstandenen Meningitis leiden bis zu 50 % der Patienten an neurologischen oder psychologischen Einschränkungen [43,44]. Vor allem im afrikanischen Meningitis-Gürtel südlich der Sahara werden nach wie vor Epidemien mit hohen Infektionsraten gemeldet [45]. Viele *N. meningitidis* Stämme besitzen eine Polysaccharidkapsel, die je nach Serogruppe eine andere Zusammensetzung hat und als Virulenzfaktor fungiert. So werden 13 verschiedene Serogruppen unterschieden, wovon jedoch nur sechs krankheitserregend sind [46] und 90 % der Infektionen auf die vier Serogruppen A, B, C und Y zurückzuführen sind [39]. Während mittlerweile einige Vakzine gegen die Kapselpolysaccharide von *N. meningitidis* effektiv wirken, ist das Pathogen fähig, seine Kapselpolysaccharidstruktur zu verändern [47], sodass eine großflächige Impfung eventuell zu einer Mutation der Zelloberfläche führt. Des Weiteren sind in Europa mittlerweile drei Konjugat-Impfstoffe zugelassen, die unter anderem gegen den Serotyp B bzw. gegen die Serotypen A, C, W135 und Y wirksam sind [48]. Neben der Polysaccharidkapsel wirken auch Membranproteine und Lipooligosaccharide (Endotoxin) als Virulenzfaktoren [49]. Der gesamte Infektionsmechanismus ist bisher noch nicht aufgeklärt, aber durch die Produktion von Vesikeln der äußeren Membran (OMV) und der Ausbildung der Polysaccharidkapsel untergräbt das Pathogen die Immunantwort des Wirts [50]. Um an die Epithelzellen der Nasenschleimhaut zu binden, besitzt *N. meningitidis* Pili [51–53], die vermutlich an die CD46 Rezeptoren der Wirtszellen binden. Zudem spielen die Proteine Opa und Opc neben anderen Adhäsinen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion an die Epithelzellen [51,54,55]. Bei der Invasion ins Endothelgewebe und letztendlich für das Überleben im Blutkreislauf spielen wiederum die Polysaccharidkapsel und die Lipopolysaccharide eine wichtige Rolle, um die zelluläre Immunantwort und das Komplementsystem zu umgehen [56,57].

1.1.3 *Borrelia burgdorferi*

Borrelia burgdorferi ist ein von Zecken übertragbares, obligat parasitäres Bakterium, das erst im Jahr 1982 entdeckt wurde [58] und sich normalerweise in einem Kreislauf zwischen Zecken und kleinen Säugetieren ohne Krankheitsbild vermehrt und verbreitet [59]. Die Infektion des Menschen führt jedoch zu einem pathogenen Krankheitsverlauf in Form der Lyme-Borreliose, der auch bei Hunden [60] oder Affen [61] nachgewiesen wurde. Unter dem Überbegriff *B. burgdorferi* sensu lato werden die drei Lyme Borreliose verursachenden Spezies zusammengefasst: *B. burgdorferi* sensu strictu, *B. gerinii* und *B. afzelii* [62]. Sie gehören zur Klasse der Spirochäten, die sich äußerlich durch ihre langgestreckte, helix-artige Zellmorphologie auszeichnen. Zudem befinden sich die Flagellen nicht außen wie bei anderen Bakterien, sondern im Inneren des Periplasmas, wodurch eine außergewöhnliche Fortbewegungsweise durch Rotation des gesamten Zellkörpers zustande kommt [63]. Diese Bewegung ermöglicht es den Spirochäten in hoch viskose Flüssigkeiten wie Schleime und Zellgewebe einzudringen und in tiefere Gewebsschichten bis in die Gelenke vorzustoßen, um dort über lange Zeit, unentdeckt vom Immunsystem, zu überdauern [64,65]. Der erste vollständig sequenzierte Stamm war *B. burgdorferi* B31 [66] und gilt seitdem als Referenzstamm. Interessanterweise besteht das Genom zu mehr als einem Drittel aus linearen und zirkulären Plasmiden [67,68]. Während die Gene auf dem Chromosom größtenteils auch von anderen Bakterien

1 Einleitung

bekannt sind, scheinen viele der auf den Plasmiden kodierten Gene nur im Genus *Borrelia* konserviert [69] und für die Pathogenität des Bakteriums verantwortlich zu sein [70,71]. Insgesamt weist *B. burgdorferi* ein relativ kleines Genom auf, sodass Gene für die Nukleotid-, Aminosäure- und Fettsäureproduktion fehlen [66]. Dies unterstreicht die parasitäre Ausrichtung, da für die Beschaffung dieser Moleküle der Wirtsorganismus ausgebeutet wird. Die Erkrankung äußert sich zunächst in vielen Fällen durch einen charakteristischen, lokalen Hautausschlag, dem sogenannten *Erythema migrans* und wird häufig von unspezifischen Symptomen ähnlich einem grippalen Infekt wie Fieber, Kopfschmerzen und Gliederschmerzen begleitet [72]. Falls der Patient in dieser Phase nicht mit Antibiotika behandelt wird, kommt es zur Verbreitung des Erregers im ganzen Körper. Diese Infektion führt häufig zu Arthritis verschiedener Gelenke [59] und seltener zu einer Neuroborreliose, die zu Erkrankungen des peripheren und zentralen Nervensystems führen kann [73]. Bei nicht behandelten Patienten können nach monate- bis jahrelangen symptomfreien Latenzzeiten schwere und chronische Symptome auftreten. Dazu gehören unter anderem die chronische Lyme-Arthritis [74], aber auch die Borrelien-Meningitis oder eine Enzephalitis [75].

1.1.4 *Clostridium difficile*

Clostridium difficile ist ein ubiquitär vorkommendes Bakterium, das auch bei einer geringen Anzahl an gesunden Menschen im Darm angesiedelt ist [76–78]. Es ist ein grampositives Stäbchen und wächst obligat anaerob. Aufgrund seiner Fähigkeit aerotolerante Sporen zu bilden, ist es sehr widerstandsfähig gegen Temperaturschwankungen, Trockenheit oder auch chemische Substanzen wie Desinfektionsmittel [79]. Während es unter normalen Bedingungen von der natürlichen Darmflora inhibiert wird, kann eine Antibiotikabehandlung vor allem mit Breitbandantibiotika und dem daraus resultierenden Rückgang der Darm-assoziierten Bakterien zu einem rasanten Wachstum von *C. difficile* führen. Die große Anzahl der Erregerzellen geht einher mit der Produktion von Toxinen, die starke Durchfälle, Entzündungen und Fieber zur Folge hat [80]. Die beiden Toxine – Enterotoxin A und Zytotoxin B – sind hierbei für die zytotoxische Schädigung der Intestinalzellen und eine Störung der Salzaufnahme verantwortlich, die zu starken Verlusten von Flüssigkeiten und Salzen führt [81]. Entgegen der relativ niedrigen Anzahl an gesunden *C. difficile* Trägern, steigt die Anzahl der Infizierten in Krankenhäusern auf 5–40 % [82–85], wodurch das Pathogen mittlerweile zu den häufigsten nosokomialen Erregern zählt. Vor allem Patienten hohen Alters oder mit einer Immunsuffizienz sind einem großen Risiko ausgesetzt [86]. Allein in den USA sterben jährlich 14.000 Patienten an *C. difficile* Infektionen [87]. Die Pathogenese beruht zunächst auf der Anhaftung der *C. difficile* Zellen an die Epithelzellen. Als wichtige Virulenzfaktoren für die Adhärenz gelten Adhäsine wie GroEL oder das Zellwandprotein Cwp66, aber auch Flagellenkomponenten wie FliC oder FliD [88–90]. Wie bereits erwähnt, werden daraufhin die beiden Toxine ausgeschüttet, wodurch die Epithelzellen direkt angegriffen werden und die Epithelbarriere durchbrochen wird [91]. Beim normalen Krankheitsverlauf folgt dann eine milde bis schwere Diarrhö und Exsikkose. Der schwere Krankheitsverlauf geht mit einer starken Entzündungsreaktion einher, die eine Kolitis hervorrufen kann und zum Aufbau einer Pseudomembran aus Neutrophilen, Fibrin und Zelltrümmern führt [85]. Letztendlich kann dies in einem sogenannten toxischen Megakolon enden, der eine hohe Mortalität in 24–38 % der Fälle aufweist [92].

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem verfügt über zwei verschiedene Mechanismen zur Abwehr körperfremder Stoffe. Zum einen besitzt der Körper eine angeborene oder unspezifische Immunabwehr, die sich aus Epithelzellen, Phagozyten und dem Komplementsystem zusammensetzt und die erste Barriere für eindringende Moleküle und pathogene Erreger darstellt. Zum anderen verfügt das Immunsystem über die Möglichkeit eine spezifische Immunabwehr gegen Eindringlinge hervorzurufen, wenn die angeborene Immunabwehr nicht ausreicht. Da das Immunsystem und die Immunantwort sehr komplexe und umfangreiche Themengebiete darstellen, wird in diesem Abschnitt nur ein Überblick über die angeborene und adaptive Immunantwort gegeben. Für detaillierte Auskünfte stehen eine Vielzahl ausführlicher Bücher wie zum Beispiel *Janeway's Immunobiology* von Murphy *et al.* [93] zur Verfügung.

1.2.1 Die Immunantwort

Zu den Abwehrmechanismen der angeborenen Immunantwort gehören mechanische Barrieren wie die Haut und Schleimhäute, zelluläre Bestandteile wie Makrophagen oder natürliche Killerzellen und humorale Bestandteile wie das Komplementsystem oder Interleukine. Durch gegenseitige Aktivierung kooperieren die angeborene und adaptive Immunantwort miteinander. So aktivieren zum Beispiel Makrophagen die adaptive Immunantwort, wenn die Anzahl der Erreger überhandnimmt. Entsprechend werden Zellen, die von der adaptiven Immunantwort markiert wurden, von den Makrophagen zerstört. Die erste Reaktion der Immunantwort auf eine Infektion ist die Erkennung von charakteristischen Merkmalen wie Rezeptoren auf der Oberfläche des Eindringlings, die das angeborene Immunsystem als körperfremd erfasst. Die körperfremden Partikel werden von den Makrophagen mittels Phagozytose umschlossen und durch Lysosome enzymatisch aufgelöst. Teile der phagozytierten Mikroorganismen werden danach auf der Oberfläche der Makrophagen präsentiert. Parallel werden durch Botenstoffe (Chemokine und Cytokine) weitere Zellen rekrutiert und eine lokale Entzündungsreaktion hervorgerufen. Ein weiteres Erregerunspezifisches System ist das Komplementsystem, das aus mehr als 30 Proteinen zusammengesetzt ist und dessen Hauptaufgabe darin besteht, die Oberfläche von Krankheitserregern zu bedecken. Dieser Vorgang wird Opsonierung genannt und signalisiert den Phagozyten, dass dieses Pathogen körperfremd ist und zerstört werden muss. Des Weiteren sorgen auch Teile des Komplementsystems für eine Entzündungsreaktion, um den Kampf gegen die Infektion zu verstärken. Das Komplementsystem wird über drei verschiedene Wege aktiviert: Der klassische Weg, bei dem die Aktivierung meist über einen an ein Antigen gebundenen Antikörper erfolgt, der Lektin-Weg und der alternative Weg, der durch einen spontanen Zerfall eines Komplementfaktors ausgelöst wird. Neben der Opsonierung werden die Bakterienmembranen auch durch Einfügen von Poren in deren Zellmembran vom Komplementsystem zerstört. Weitere Bestandteile der angeborenen Immunantwort sind Granulozyten und Interleukine. Während die zellulären Granulozyten über die Blutbahn zu entfernten Geweben transportiert werden und dort mit proteolytischen Enzymen die Krankheitserreger vernichten, dienen die Interleukine als Botenstoffe, die verschiedene Abwehrzellen zum Ort der Infektion leiten und deren Vervielfältigung anregen.

1 Einleitung

Die adaptive Immunantwort wird durch die Phagozytose von Bakterien durch dendritische Zellen ausgelöst, indem Teile der Eindringlinge auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Sie fungieren somit als Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort. Die Erkennung der Mikroorganismen erfolgt über spezifische Struktur-erkennende Rezeptoren oder über die Aufnahme von extrazellulärem Material durch Rezeptor-unabhängige Makropinozytose. Dendritische Zellen befinden sich in großer Anzahl in Oberflächengewebe des Körpers aber auch in den inneren Schleimhäuten, also an allen potentiellen Eintrittsschwellen für Mikroorganismen. Nach der Phagozytose der körperfremden Partikel, wandern die dendritischen Zellen zu den sekundären lymphatischen Organen und präsentieren dort den naiven T-Lymphozyten die verdauten Antigenepitope und schütten stimulierende Faktoren aus, die eine spezifische Immunantwort auslösen. Jeder T-Lymphozyt ist somit gegen ein spezifisches Antigen gerichtet und trägt im Gegensatz zu den Makrophagen nur Rezeptoren für dieses Antigen. Diese Rezeptoren werden durch einen komplexen klonalen Mechanismus im Knochenmark oder Thymus bereitgestellt, der eine riesige Auswahl an Antigenrezeptoren generiert. Um eine Erkennung von körpereigenen Zellen zu verhindern, werden alle zu diesen Zellen komplementären T-Lymphozyten aussortiert. Der zweite wichtige Zelltyp der adaptiven Immunantwort sind die B-Lymphozyten. Während die T-Lymphozyten zellbasiert für die Steuerung der Immunantwort verantwortlich sind, produzieren aktivierte B-Lymphozyten Antikörper, die sie sezernieren. Des Weiteren produzieren B-Lymphozyten einen B-Zell Antigen Rezeptor, der dem später sezernierten Antikörper entspricht und auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Jeder Antikörper und Antigenrezeptor besteht aus einem variablen und einem konstanten Teil. Der variable Teil ist für die Erkennung des Antigens zuständig, der konstante Teil eines Antikörpers entscheidet über seine Antikörperklasse. Je nach Antikörperklasse wirken die Antikörper auf unterschiedliche Weise und werden zu verschiedenen Bereichen des Körpers transportiert. Die Generierung der Antigenrezeptoren und der Antikörper beruht auf dem gleichen Prinzip. Trotz einer relativ geringen Anzahl an Genen können durch DNA Rekombination Millionen verschiedene Genabschnitte generiert werden. Die variable Region wird aus zufällig gewählten DNA Modulen zusammengesetzt. Hierfür stehen auf verschiedenen Chromosomen drei verschiedene Module zur Verfügung: *variable* (V), *diversity* (D) und *joining* (J). Des Weiteren bestehen Antikörper aus jeweils zwei Segmenten einer leichten und einer schweren Kette, T-Zellrezeptoren aus einer α - und einer β -Kette. Die leichte Kette und die α -Kette werden nur aus einem V- und J-Segment zusammengesetzt, während die schwere Kette und β -Kette aus V-, D- und J-Segment besteht. So können zum Beispiel bei der schweren Kette über 6000 Kombinationen miteinander variiert werden. Die beiden leichten Ketten ergeben weitere 320 Kombinationen. Zusammen ergibt alleine die kombinatorische Zusammensetzung aus schwerer und leichter Kette $1,9 \times 10^6$ mögliche Antikörper. Bei der Antikörperreifung existieren zusätzliche Modifikationssysteme, die zu einer noch wesentlich höheren Diversität führen. Nach Schätzungen sind mindestens 10^{11} verschiedene B-Zellrezeptoren bzw. Antikörper nur durch die junktionale Vielfalt möglich. Hinzu kommen Punktmutationen durch somatische Hypermutation, die die Affinität zu einem Antigen noch erhöhen kann. Die gereiften Lymphozyten suchen dann in den Blutbahnen und sekundären lymphatischen Organen ihr entsprechendes Antigen. Beim Aufeinandertreffen mit einer antigenpräsentierenden Zelle (APC)

vermehren sich die Lymphozyten und sorgen so für eine Vielzahl an identischen Klonen, die ein Antigen spezifisch erkennen. Dieser Vorgang ist wiederum sehr komplex und unterscheidet sich je nachdem ob es sich um einen B-Lymphozyten oder T-Lymphozyten handelt und hängt auch von der Art des Antigens ab. So werden T-Lymphozyten durch dendritische Zellen aktiviert, während B-Lymphozyten normalerweise durch T-Helferzellen aktiviert werden. Aber auch eine T-Zell-unabhängige Aktivierung kann zum Beispiel bei sich wiederholenden Polysacchariden, wie sie auf der Oberfläche von Bakterien vorkommen, stattfinden. Die Proliferation nimmt einige Tage in Anspruch und die Zelle verbleibt währenddessen an der lokalen Entzündungsstelle. Im Anschluss differenziert sich die Zelle zu einer Effektorzelle, die entweder im Falle einer B-Zelle Antikörper produziert oder im Falle einer T-Zelle infizierte Zellen oder Tumorzellen zerstören kann und andere Zellen des Immunsystems aktiviert. Einige der T- und B-Lymphozyten differenzieren zu sogenannten Gedächtniszellen, die nach der Aktivierung und auch nach erfolgreicher Vernichtung des Eindringlings im Blut verbleiben. Bei einer erneuten Infektion desselben Erregers wird so die Vermehrung von antigenspezifischen Zellen beschleunigt und vermehrt. Die restlichen Lymphozyten werden durch Apoptose abgebaut.

1.2.2 Antigenerkennung und -präsentation durch Immunzellen

Bei der Erkennung von Antigenen sind sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem involviert. Allerdings unterscheiden sich die beiden stark in ihren Erkennungsmustern. Das angeborene Immunsystem erkennt Antigene, die auf der Oberfläche vieler Bakterienstämme vorkommen wie Lipopolysaccharide (LPS), bakterielle Kohlenhydrate und Flagelline aber auch doppelsträngige RNA aus RNA-Viren. Hierfür besitzt der Körper Rezeptoren auf und in verschiedenen Zellen, die diese konservierten Strukturen erkennen. Zu diesen Zellen gehören die dendritischen Zellen, Makrophagen und Monozyten. Während manche Rezeptoren auf der Zellmembran exprimiert werden, werden andere aus Endosomen freigesetzt oder befinden sich im Zytoplasma. Die Bindung der Rezeptoren an bakterielle Erkennungsstrukturen löst unter anderem die Freisetzung inflammatorischer Zytokine aus und setzt somit die Immunantwort in Gang.

Die B- und T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems erkennen Antigene auf unterschiedliche Weise. Die Antikörper der B-Lymphozyten erkennen die Antigene in ihrer nativen dreidimensionalen Form, während die Antigene für die Erkennung durch T-Lymphozyten zuvor aufbereitet werden müssen. Dies erfolgt durch APCs wie den dendritischen Zellen oder Makrophagen, die Teile der Antigene gebunden an Oberflächenmoleküle an der Zelloberfläche präsentieren. Der Locus dieser Moleküle wird als Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) bezeichnet. Die Oberflächenmoleküle werden daher MHC-Moleküle genannt und aufgrund verschiedener Struktur- und Funktionsunterschiede in zwei Klassen (MHC-I und MHC-II) unterteilt. Beide Klassen bestehen aus drei Molekültypen.

Die MHC-I-Moleküle bestehen aus einer α -Kette mit drei Domänen und einem assoziierten β 2-Mikroglobulin. Sie werden von allen kernhaltigen Zellen des Organismus exprimiert und präsentieren Antigene von zytoplasmatischen Antigenen für $CD8^+$ -T-Zellen. Diese zytoplasmatischen Antigene sind typischerweise körpereigene oder virale Proteine, die zu kurzen Peptiden mit einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren aufbereitet werden. Das Peptid wird dann jeweils an ein MHC-I-Molekül

1 Einleitung

gebunden und via Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert. CD8⁺-T-Zellen leiten nach der Identifizierung einer markierten Zelle die Apoptose ein.

MHC-II-Moleküle werden nur auf dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten exprimiert. Die Bindungsfurche für die Peptidbindung wird durch eine α - und eine β -Kette geformt, die aus jeweils zwei Untereinheiten bestehen. Aufgrund der Beschaffenheit der Bindungsfurche können längere Peptide als von MHC-I-Molekülen gebunden werden. So werden extrazelluläre Antigene wie bakterielle Proteine oder Toxine in Peptide mit einer Länge von 13–17 Aminosäuren aufbereitet und auf der Zelloberfläche über ein MHC-II-Molekül für CD4⁺-T-Zellen präsentiert. Die Markierung der CD4⁺-T-Zellen oder auch T-Helferzellen löst eine Reihe von Reaktionen im Immunsystem aus, unter anderem die Aktivierung von B-Zellen und somit die Produktion von Antikörpern.

Für die Aktivierung von naiven T-Zellen werden jedoch mindestens zwei aktivierende Vorgänge benötigt, um die Proliferation und Sekretion von Interleukin-2 (IL2) zu initiieren. Die alleinige Bindung an die auf APCs präsentierten MHC/Peptid-Komplexe reicht hierfür nicht aus. Ein weiteres wichtiges Signal ist die Bindung von Kostimuli wie CD80, das von professionellen APCs exprimiert wird, die vorher durch pathogen-assoziierte Erkennungsmuster wie LPS aktiviert wurden. CD80 wird dabei von CD28 gebunden, das bei den meisten T-Zellen auf der Oberfläche präsentiert wird. Die Aktivierung der T-Zellen führt neben der Proliferation zur Produktion und Sekretion von IL2 und des CD40-Liganden, der wiederum dendritische Zellen (DCs) stimuliert. Je nachdem welche Art der Infektion vorliegt, produzieren die DCs unterschiedliche Zytokine, die wiederum verschiedene CD4⁺-T-Zellantworten auslösen. So erfolgt nach Erstaktivierung der DCs, beispielsweise durch bakterielles LPS, die Ausschüttung von IL12 und IFN- γ , wodurch die Ausbildung von T_H1-Zellen angeregt wird. Diese kommen hauptsächlich bei intrazellulären Infektionen durch Bakterien oder Viren vor. Als Resultat entsteht eine zellvermittelte Immunität, die mit einer Entzündungsreaktion und der Produktion von IgG einhergeht. T_H2-Zellen differenzieren sich hingegen nach einer parasitären Infektion durch Aktivierung mit IL4 aus. Daraus resultierend wird eine starke humorale Immunantwort mit einem Klassenwechsel zu IgE hervorgerufen, wodurch Eosinophile und Mastzellen zur lokalen Infektionsstelle wandern und weitere Signalmoleküle ausschütten. Eine dritte wichtige Klasse der CD4⁺-T-Zellen sind die T_H17-Zellen, die vor allem in die frühe Immunantwort involviert sind. Ihre Hauptaufgabe ist die Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze, indem neutrophile Granulozyten aktiviert werden, die bei der Beseitigung der Pathogene helfen. Für die Aktivierung von B-Lymphozyten sorgt vor allem eine relativ neu entdeckte Klasse der T-Helferzellen, die als folliculäre T-Helferzellen (T_{FH}) bezeichnet werden. Diese kommen vor allem in den Lymphfollikeln vor und können Zytokine ausschütten, die sowohl von T_H1- und T_H2-Zellen exprimiert werden. Die Aktivierung der B-Lymphozyten durch T_{FH}-Zellen führt zur humoralen Immunantwort durch die Produktion und Affinitätsreifung von IgGs. Des Weiteren existieren neben den stimulierenden T-Helferzellen auch regulatorische T-Zellen (T_{reg}), die unreife dendritische Zellen inhibieren. Die Suppression des Immunsystems durch T_{reg} verhindert somit Autoimmunantworten gegen körpereigene Stoffe.

1.2.3 Antikörper und Antikörperfragmente

Antikörper dienen dem Immunsystem als Hilfsmittel zur Bekämpfung einer riesigen Anzahl an Eindringlingen, die durch die angeborene Immunabwehr nicht erkannt oder vernichtet werden. Ihre Aufgabe ist es, Krankheitserreger oder deren Toxine als Antigene zu binden und für die weiteren Komponenten des Immunsystems zu markieren. Die Produktion erfolgt durch B-Lymphozyten und es existieren fünf Antikörperklassen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. IgM Antikörper sorgen für die primäre adaptive Immunantwort und liegen als Pentamere im Plasma vor. Nach der Bindung eines Antigens an den IgM B-Zellrezeptor der unreifen B-Zelle und einer T-Zell-abhängigen Aktivierung, kommt es neben Punktmutationen zur Verbesserung der Affinität auch zu Klassenwechseln durch Austausch der konstanten Region der schweren Ketten. Je nach Antikörperklasse erledigen die Antikörper unterschiedliche Aufgaben wie Neutralisation, Opsonierung, Komplementaktivierung oder die Aktivierung weiterer Komponenten des Immunsystems. Auch Gedächtnis-B-Zellen werden hierbei ausgebildet, die eine wiederholte Infektion schnell erkennen und die Immunantwort beschleunigen und verstärken können. Der größte Anteil an Antikörpern im humanen Serum machen die IgG Antikörper aus. Sie bestehen aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten. Ein IgG Antikörper hat ein Molekulargewicht von etwa 150 kDa, das sich aus je 50 kDa der beiden schweren Ketten und je 25 kDa der beiden leichten Ketten zusammensetzt. In Abbildung 1.1 ist der schematische Aufbau eines IgG Moleküls abgebildet. Die beiden schweren Ketten sind dabei durch Disulfidbrücken in der sogenannten *hinge*-Region kovalent verbunden. Die schweren Ketten bestehen aus drei konstanten Regionen (CH), wobei CH2 und CH3 als Fc-Teil bezeichnet wird und für die Makrophagenbindung und Komplementaktivierung verantwortlich ist. Die variablen Bereiche mit den hypervariablen CDRs (*complementarity determining region*) befinden sich auf den variablen Teilen der schweren Kette (VH) und der leichten Kette (VL). Jeder variable Bereich trägt drei CDR Regionen, die mit den umliegenden Bereichen die Antigenbindungsstelle bilden. Diese Antigenbindungsstelle wird als Paratop bezeichnet, das das Antigen über das Epitop bindet. Die beiden variablen Teile der schweren und leichten Kette werden zusammen als Fv-Fragment bezeichnet. Der konstante Teil der leichten Kette (CL) ist über eine Disulfidbrücke mit dem CH1-Bereich der schweren Kette kovalent verbunden. Der gesamte Bereich, der nicht zum Fc-Teil gehört wird als Fab-Fragment bezeichnet.

1 Einleitung

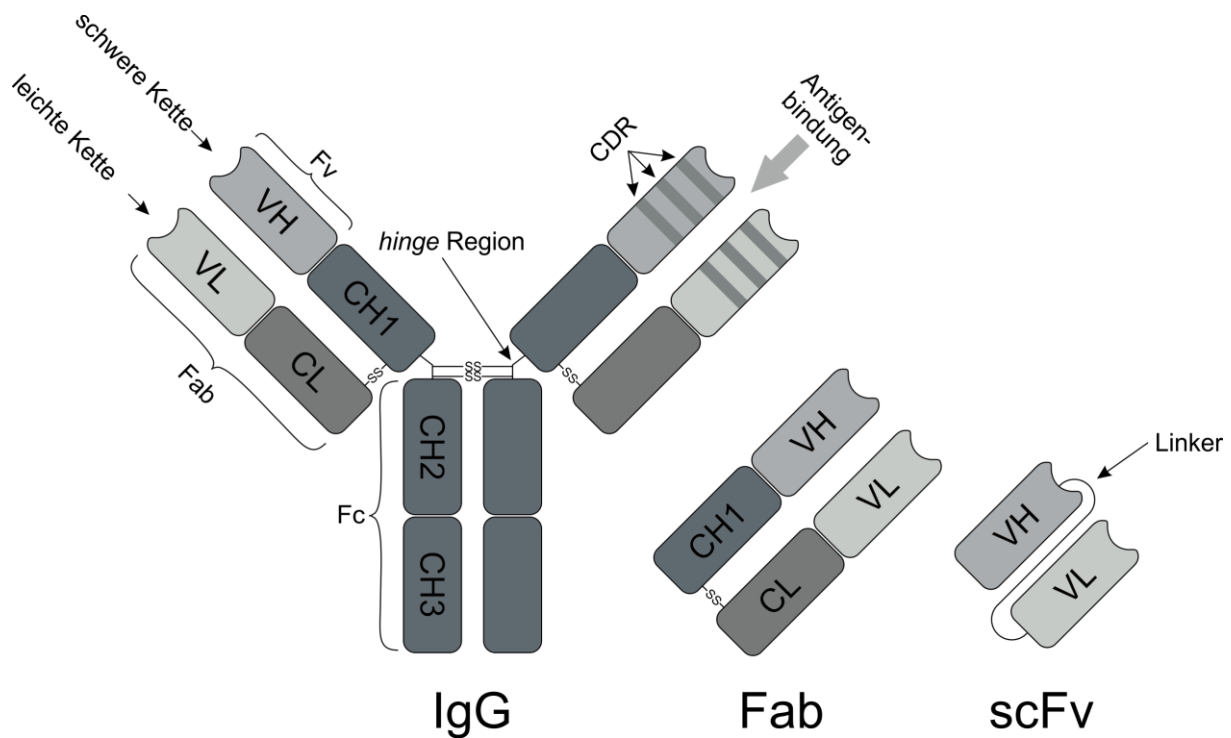


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers und zweier Antikörperfragmente.

Das IgG-Molekül besteht jeweils aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Die schweren Ketten sind aus vier Untereinheiten zusammengesetzt, während die leichten Ketten aus zwei Untereinheiten aufgebaut sind. Die unterschiedlichen Bereiche des Moleküls erfüllen diverse Aufgaben. Die Antigenbindungsstelle oder auch Paratop wird durch je eine variable Region auf der schweren und der leichten Kette gebildet. Das Paratop wird hauptsächlich durch drei hypervariable Bereiche, den sogenannten CDRs, charakterisiert. Das sogenannte Fab-Fragment kann durch Spaltung des Antikörpers mit Papain erhalten werden. Auch eine rekombinante Produktion in CHO-Zellen ist möglich. Aufgrund der geringeren Größe bei gleichem Bindungsverhalten werden jedoch bevorzugt scFv-Fragmente rekombinant exprimiert. Die Konstruktion von ScFv-Antikörperbibliotheken und die Amplifikation in *E. coli* Zellen sind wesentlich einfacher als die Produktion von Fab-Fragmenten.

1.3 Phage Display

Das Phage Display ist eine biotechnologische Selektionsmethode, mit der Bindepartner gegen nahezu alle Liganden aus einer rekombinanten Peptid-, Protein- oder Antikörperfragment-Bibliothek isoliert werden können. Entwickelt wurde die Methode von Smith *et al.* als erste molekulare Display-Technik [94]. Ein großer Vorteil des Phage Displays ist die Kopplung von Genotyp und Phänotyp. Während die Proteine auf der Oberfläche des Phagen präsentiert werden, trägt der Phage die entsprechende codierende DNA im Inneren auf einem Plasmid. Somit können isolierte Bindepartner durch Sequenzierung leicht identifiziert und charakterisiert werden. Phage Display wird für verschiedene Ansätze verwendet, um geeignete Bindepaare zu identifizieren: Durch Fusion kurzer Peptiden an das Hüllprotein pVIII können Bindepaare mit einer hohen Avidität identifiziert werden [95]; für die Präsentation größerer Moleküle, also Proteinfragmente, Proteine oder Antikörperfragmente, werden diese an das Hüllprotein pIII fusioniert. So wurden beispielsweise Peptidbibliotheken verwendet, um eine spezifische Sonde für das Prostata-spezifische Antigen zu isolieren [96]. Proteinbibliotheken wurden unter anderem für die Identifikation immunogener Proteine von *Salmonella typhimurium* [97], aus Speichel von Zecken [98] und auch von zwei *Mycoplasma*-Arten [99,100] eingesetzt. Die häufigste Anwendung finden Phage Display Bibliotheken bei der Selektion von spezifischen Antikörpern gegen eine Vielzahl von Antigenen [101]. Dabei wurden unter anderem Antikörper

gegen Tumorzellen [102], Bakterien [103], Proteine [104] und Peptide [105] isoliert. Da das Einbringen von Fremd-DNA einen Selektionsnachteil für die Phagen mit sich bringt, wird die genetische Information auf einem Phagemidvektor bereitgestellt [106]. Dieser trägt die genetische Information für das Insert-pIII-Fusionsprodukt, eine Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker und Replikationsursprünge für *E. coli* und den M13 Phagen. Die Koinfektion mit Hyperphage [107], einem speziellen Helferphagen, bei dem das Gen für das Hüllprotein pIII deletiert ist, liefert die genetische Information für die Replikation und Verpackung der neuen Phagen. Aufgrund der Deletion des Gens für das Hüllprotein pIII in den Helferphagen, ist das Fusionsprodukt aus Insert und pIII auf dem Phagemid die einzige Quelle für ein funktionales Hüllprotein pIII. Daher präsentiert jeder Phage mehrere Kopien des Fusionsprodukts auf seiner Oberfläche [108]. Die Koinfektion mit Hyperphage sorgt im Gegensatz zu normalen Helferphagen zusätzlich für eine Anreicherung von offenen Leserahmen (ORFs). Nur DNA-Fragmente, die im korrekten Leseraster eingebaut wurden, werden als Fusionsproteine translatiert und eingebaut [109]. DNA-Fragmente, die nicht dem offenen Leserahmen entsprechen oder invers eingebaut sind, haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für den Einbau eines Stopcodons, sodass kein vollständiges Insert-pIII-Fusionsprodukt generiert wird. Die ORF-selektierte Bibliothek wird dann für das Panning mit Seren von immunisierten Tieren oder Humansen verwendet. Wie bereits erwähnt, wird das Phage Display größtenteils für die Isolation von spezifischen Antikörpern eingesetzt. Neben dem scFv-Format werden häufig auch *fragment antigen binding* Antikörper (Fab) auf Phagen präsentiert [110,111]. Antikörperbibliotheken werden mittels PCR durch Amplifikation der genetischen Information von B-Lymphozyten und Klonierung in Phagemide konstruiert [112]. Die B-Lymphozyten können von einem oder mehreren humanen Spendern stammen oder tierischen Ursprungs sein. Des Weiteren wird zwischen naiven Bibliotheken und Immunbibliotheken unterschieden. Naive Bibliotheken von nicht immunisierten Spendern werden für die Selektion von Antikörpern gegen eine Vielzahl von Antigenen verwendet, während Bibliotheken von immunisierten Spendern meist für die Selektion von Antikörpern gegen das für die Immunisierung verwendete Antigen eingesetzt werden [113]. Des Weiteren unterscheiden sich die Antikörperklassen der beiden Bibliotheken: Naive Bibliotheken enthalten die genetische Information von IgM-Antikörpern gegen eine riesige Anzahl an Antigenen [114]. Immunbibliotheken hingegen präsentieren IgG-basierte Antikörperfragmente, die bereits *in vivo* eine Affinitätsreifung durchlaufen haben [115].

1.4 Stand der Technik

1.4.1 Methoden zur Detektion von pathogenen Bakterien

Die Detektion von pathogenen Bakterien ist ausschlaggebend für die Vorsorge von Krankheiten und die Gesundheit der heutigen Gesellschaft. In vielen Bereichen des täglichen Lebens ist eine Kontrolle der Bakterienkontamination – vor allem durch pathogene Bakterien – unumgänglich. Die drei größten Bereiche sind die Lebensmittelindustrie, Krankenhäuser und klinische Diagnostik und der Wasser- und Umweltschutz [116]. Eine optimale Detektionsmethode verbindet eine hohe Zuverlässigkeit des Ergebnisses mit einer möglichst kurzen Bearbeitungs- und Wartezeit. Die erste und heute noch gängige Methode zur Detektion von Bakterien ist die Kultivierung und das

1 Einleitung

anschließende Auszählen der Kolonien [117]. Diese Methode weist eine hohe Selektivität und Zuverlässigkeit mit eindeutigen Ergebnissen auf. Sie hat jedoch den großen Nachteil, dass die Kultivierung je nach Pathogen mehrere Tage in Anspruch nehmen kann. Des Weiteren sind viele Bakterien, die sich auf bestimmte Nischen spezialisiert haben, schwer unter Laborbedingungen zu kultivieren [118]. Die gängigste Alternative ist die Polymerasekettenreaktion (PCR) und daraus weiterentwickelte Methoden, die den Einsatz außerhalb des Labors ermöglichen oder den Arbeitsaufwand und die Dauer des Tests verringern. Durch Multiplex-PCRs können verschiedene Krankheitserreger parallel detektiert werden, wie beispielsweise die Erreger verschiedener Geschlechtskrankheiten [119]. Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) ermöglicht eindeutige Ergebnisse aus verschiedenen Proben innerhalb weniger Stunden [120,121]. Die isothermale Amplifikation erlaubt es dem Benutzer, DNA außerhalb des Labors ohne Veränderung der Inkubationstemperatur zu amplifizieren und so Bakterien zu detektieren [122,123]. Der Nachteil dieser Methode beruht auf dem Nachweis eines DNA-Abschnitts, der zwar Auskunft über das richtige Bakterium gibt, aber meist nicht über einen bestimmten Stamm, der beispielsweise eine besondere Antibiotikaresistenz trägt. Weitere, häufig verwendete Detektionsmethoden sind immunologische Nachweisverfahren wie der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder Immunosorbent-Agglutination-Assay. Diese beruhen auf der Bindung eines spezifischen Antikörpers an ein Antigen. Viele medizinische Labore nutzen immunologische Assays für die Detektion von Bakterien wie *C. difficile* [124], *N. meningitidis* [125] oder *B. burgdorferi* [126]. Eine sehr schnelle Detektionsmethode beruht auf der Identifikation durch Massenspektrometrie. Hierbei können Bakterienkolonien innerhalb von wenigen Minuten identifiziert werden [127]. Verschiedene Massenspektrometrieverfahren wurden bereits erfolgreich eingesetzt. So wurden mittels Elektrosprayionisation intakte grampositive und gramnegative Bakterien identifiziert [128]. Häufiger wird jedoch die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) eingesetzt [129]. Das MALDI-Verfahren verbindet eine sehr schnelle Analysezeit, eine hohe Sensitivität, das Messen intakter Zellen und die Möglichkeit der Automatisierung. In den vergangenen Jahren sind auch zunehmend andere Massenspektrometrieverfahren entwickelt und für die Bakteriendetektion verwendet worden, die genauere Informationen über die Lipidzusammensetzung oder Metabolite liefern.

All diese Methoden eignen sich sehr gut für die Detektion von Bakterien und haben alle ihre Vorteile. Sie haben jedoch auch gemein, dass sie kostenintensiv sind und geschultes Personal voraussetzen. Die Detektion erfolgt daher meist im Labor und kann nicht direkt vor Ort durchgeführt werden. Ein optimales Detektionssystem verbindet daher einen schnellen Detektionsablauf, eine benutzerfreundliche Bedienung und ein einfaches Ausleseverfahren. Der gängigste Ansatz sind Lateral Flow Streifen, die vor allem durch den Schwangerschaftstest bekannt sind. Der immunchromatographische Schnelltest beruht ebenfalls auf einer Antikörper-/Antigenbindung, die durch die Markierung des Detektionsantikörpers nachgewiesen wird. Auch für die Detektion von Bakterien werden Lateral Flow Streifen eingesetzt. Für *C. difficile* beruhen diese häufig auf dem Nachweis der exprimierten Toxine A und B und kommerzielle Immunoassays sind von verschiedenen Herstellern erhältlich [130]. Auch für den Nachweis einiger Geschlechtskrankheiten gibt es Lateral Flow Assays von einer Vielzahl an Herstellern [131].

1.4.2 Screeningmethoden für die Identifikation immunogener Proteine

Die Identifikation immunogener Proteine ist die Grundlage für die Entwicklung neuer Diagnostika und Therapeutika. In den letzten Jahrzehnten wurde auf dem Gebiet der Immunproteomik eine Vielzahl von Methoden etabliert, die bei der Identifikation immunogener Proteine helfen. Ursprünglich wurden die Proteine aus einem Zelllysate mittels SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert [132]. Um eine bessere Auftrennung der vielen Proteine im Lysat zu erhalten, wurde zunehmend die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt [133]. Allerdings mangelte es nach der Auftrennung der Proteine an der Identifikation der einzelnen Spots. Durch den Fortschritt im Bereich der Massenspektrometrie entwickelte sich in Kombination mit der 2D-Gelelektrophorese ein nützliches Werkzeug zur Identifikation neuer immunogener Proteine [134,135]. Ein großer Nachteil der 2D-Gelelektrophorese ist die schlechte Auflösung. Sehr große, aber auch kleine, sowie hydrophobe und basische Proteine sind schlecht detektierbar. Auch die Überlagerung von Proteinspots mit ähnlichen Eigenschaften bezüglich der Größe und dem isoelektrischen Punkt sorgt für nicht eindeutig identifizierbare Spots. Trotz vieler Vorteile kommen heutzutage vermehrt alternative Ansätze ohne Gelelektrophorese zum Einsatz. Hierbei werden Genbibliotheken aus der genomischen DNA erstellt und rekombinant in *E. coli* exprimiert. Die produzierten Proteine werden dann in Form eines Microarrays auf einen Glasträger aufgebracht und ähnlich wie beim Western Blot mit Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert [136,137]. Auf diese Weise können theoretisch alle kodierten Proteine eines Genoms analysiert werden. Ein weiterer Vorteil gegenüber der 2D-Gelelektrophorese ist die benötigte Menge an Probenvolumen. Während für große 2D-Gele 50–100 µL benötigt werden, sind für die Microarray Screenings nur 2–5 µL notwendig. Ein großer Nachteil der rekombinanten Proteinexpression für Genbibliotheken besteht darin, dass unter anderem Membranproteine schwer zu produzieren sind. Des Weiteren ist die Amplifizierung und Klonierung von einer großen Menge an Genen sehr zeit- und arbeitsintensiv. Eine Alternative bieten randomisierte cDNA Bibliotheken [138–140]. Hierbei wird nicht jedes Gen einzeln amplifiziert, sondern die gesamte cDNA zunächst normalisiert und dann randomisiert in einen linearisierten Vektor kloniert. Während der Arbeitsaufwand für die Konstruktion der Bibliothek dadurch verringert wird, exprimieren die Klone letztendlich zufällige Proteine oder Proteinfragmente. Dadurch müssten wesentlich mehr Klone isoliert und analysiert werden, um alle Proteine der Bibliothek abzudecken. Eine relativ neue Methode, bei der die Proteinexpression direkt auf dem Microarray stattfindet, nennt sich *Nucleic Acid-Programmable Protein Array* (NAPPA). Hierbei werden die Gene für die entsprechenden Proteine direkt auf der Microarrayoberfläche immobilisiert. Die Proteine werden daraufhin zellfrei synthetisiert und über einen Protein-Tag an die Oberfläche gekoppelt [141]. Ähnlich funktioniert auch die DNA Array zu Protein Array Technik (DAPA) [142]. DNA Template werden auf einen Glasträger immobilisiert, während auf einem zweiten Glasträger Fängermoleküle für einen Protein-Tag gekoppelt sind. Durch Inkubation mit einer Zellextrakt-getränkten Membran werden die Proteine produziert und auf dem zweiten Glasträger immobilisiert.

Der direkteste Ansatz ist die Amplifikation jedes einzelnen ORFs und der anschließenden Produktion der einzelnen Proteine. Barbour *et al.* haben auf diese Weise 80 % des Proteoms von *B. burgdorferi* abgedeckt und auf Immunogenizität überprüft [143]. Allerdings ist die Amplifikation, Klonierung und

1 Einleitung

Produktion von ungefähr 1300 Genen bzw. Proteinen ein sehr zeitintensives und arbeitsaufwendiges Vorhaben. Eine Screeningmethode, die einige der zuvor genannten Nachteile überwindet, ist das Phage Display. So werden nicht bindende Proteine und Proteinfragmente durch konsequente Panningrunden nach und nach aussortiert, während bindende Proteine amplifiziert werden. Gleichzeitig sind die Konstruktion der Phagenbibliothek und die Pannings innerhalb weniger Tage durchführbar (vgl. Abschnitt 1.3).

1.5 Motivation und Arbeitshypothese

Seit der Entdeckung des ersten Antibiotikums vor rund einhundert Jahren und der großtechnischen Produktion von Penicillin vor 70 Jahren verbesserten sich der Gesundheitsstandard und die durchschnittliche Lebenserwartung kontinuierlich. Viele bakterielle Infektionen schienen kontrollierbar, sodass die Forschung sich auf andere Themen fokussierte. Spätestens seit Ende der 1980er Jahre wurde daher nur noch sehr wenig an neuen Antibiotika geforscht, in der Annahme, die bekannten Antibiotika würden ausreichen. Seit geraumer Zeit ist diese Vorstellung jedoch von vielen Stämmen verschiedener Bakterienarten widerlegt worden. Neben Resistenzen gegen einzelne, altbewährte Antibiotika werden vermehrt Stämme mit multiplen Resistenzen von Erkrankten isoliert. Dies gilt für Humanpathogene in Krankenhäusern genauso wie für Tierpathogene in Mastbetrieben. In den Medien als Superbugs bezeichnet, sind unter anderem Methicillin-resistente Stämme von *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder multiresistente *Clostridium difficile* Stämme weltweit bekannte Vertreter. Aber auch ein Stamm von *Neisseria gonorrhoeae* wurde kürzlich in England isoliert, der mit den herkömmlichen Antibiotika nur noch durch kombinierte Dosierung zu behandeln ist. Dieser akuten Gefahr unaufhaltsamer Bakterieninfektionen kann nur durch Erforschung neuer Antibiotika und alternativer Behandlungsmethoden entgegen gewirkt werden. Hierfür sind grundlegende Kenntnisse über die Infektionsmechanismen der jeweiligen Bakterien und die Interaktion mit dem Immunsystem unumgänglich. Proteine, die vom Immunsystem häufig als immundominante Antigene erkannt und prozessiert werden, könnten sich für die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten und Impfstoffe wie auch für die Diagnostik eignen. Zwar existieren für viele Bakterien bereits Diagnostiktools, aber sie sind meist nur von Fachkräften durchführbar oder teuer. Eine schnellere, günstigere, einfachere und zugleich zuverlässigere Alternative wäre dabei wünschenswert. Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit verschiedene humanpathogene Bakterienstämme mittels Phage Display auf neue Antigene hin untersucht. Anschließend wurde durch Epitopmappings der immunogene Charakter der identifizierten Proteine näher charakterisiert. Neben immundominanten Proteinen könnten die exakten Epitopregionen für die Generierung monoklonaler Antikörper oder als Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Impfstoffs nützlich sein. Des Weiteren könnten die immundominanten Proteine Einfluss auf die Pathogenität und Virulenz des Bakteriums haben. Daher könnte möglicherweise eine Deletion des Gens oder die Inhibierung des Proteins die Infektion verhindern.

Im Vergleich zu anderen Screeningmethoden bietet das Phage Display genomischer Bibliotheken einige Vorteile. Die großen Nachteile von herkömmlichen Expressionsbibliotheken werden durch das Phage Display umgangen. Erstens werden die vielen Klone mit Inserts außerhalb des Leserasters oder

inversen Inserts durch die Koinfektion mit Hyperphage und die damit verbundene Anreicherung der offenen Leserahmen aussortiert. Dadurch werden größtenteils nur korrekt translatierte Oligopeptide präsentiert. Zweitens müssen wesentlich weniger Klone aufgrund der vorangegangenen Panningrunden und der damit einhergehenden Amplifikation der bindenden Proteine überprüft werden.

Abbildung 1.2 zeigt den kompletten Ablauf von der Konstruktion und dem Panning einer Phagenbibliothek für die Detektion von immunogenen Proteinen, über die Selektion immunogener Proteine bis zur anschließenden Selektion von Antikörperfragmenten aus einer scFv-Antikörper-Phagenbibliothek. Die Methode kann für jeden Erreger durchgeführt werden, solange die genomische DNA zugänglich ist. Des Weiteren wird die Analyse der erhaltenen DNA Sequenzen vereinfacht, wenn das Genom des verwendeten Stamms bereits vollständig sequenziert ist. In dieser Arbeit wurden vier Humanpathogene untersucht, die aufgrund ihrer Inzidenz, zunehmender Antibiotikaresistenzen oder mangelnder Therapiemöglichkeiten akut klinisch relevant sind. Nach der Kultivierung wird die genomische DNA isoliert und mittels Ultraschall oder enzymatischem Verdau fragmentiert. Diese Fragmente werden daraufhin mithilfe eines Phagemidvektor kloniert. Anschließend wird die Bibliothek mit einem speziellen Helferphagen, dem sogenannten Hyperphagen, verpackt. Dieser Schritt ist der wichtigste und entscheidende Unterschied zu herkömmlichen Expressionsbibliotheken, da hier ORFs angereichert werden. Inserts, die nicht im Leserahmen liegen oder invers in den Vektor eingebaut wurden, erhöhen die Wahrscheinlichkeit auf ein Stopcodon innerhalb des abgelesenen Fusionsprodukts aus Insert und Hüllprotein pIII. Dadurch wird das Hüllprotein nicht auf der Oberfläche des Phagen präsentiert, wodurch dieser Phage nicht in der Lage ist, die Bakterienzelle zu infizieren. Durch zwei bis drei Panningrunden und anschließendem Screening werden immunogene Oligopeptide identifiziert. Durch Sequenzierung der entsprechenden genetischen Information der jeweiligen Phagen und anschließender Überprüfung durch BLAST können vermeintlich immunogene Proteine identifiziert werden. Um den immunogenen Charakter zu verifizieren, werden die identifizierten Proteine als Vollängenproteine produziert und mittels ELISA überprüft. Gegen die neuen immunogenen Proteine und funktionelle Partner davon werden daraufhin Antikörperfragmente aus einer naiven humanen scFv-Antikörperbibliothek isoliert und charakterisiert. Somit können die Identifikation neuer immunogener Proteine und die Produktion spezifischer Antikörper gegen diese Proteine innerhalb von drei bis vier Wochen für jeden bakteriellen Erreger erfolgen.

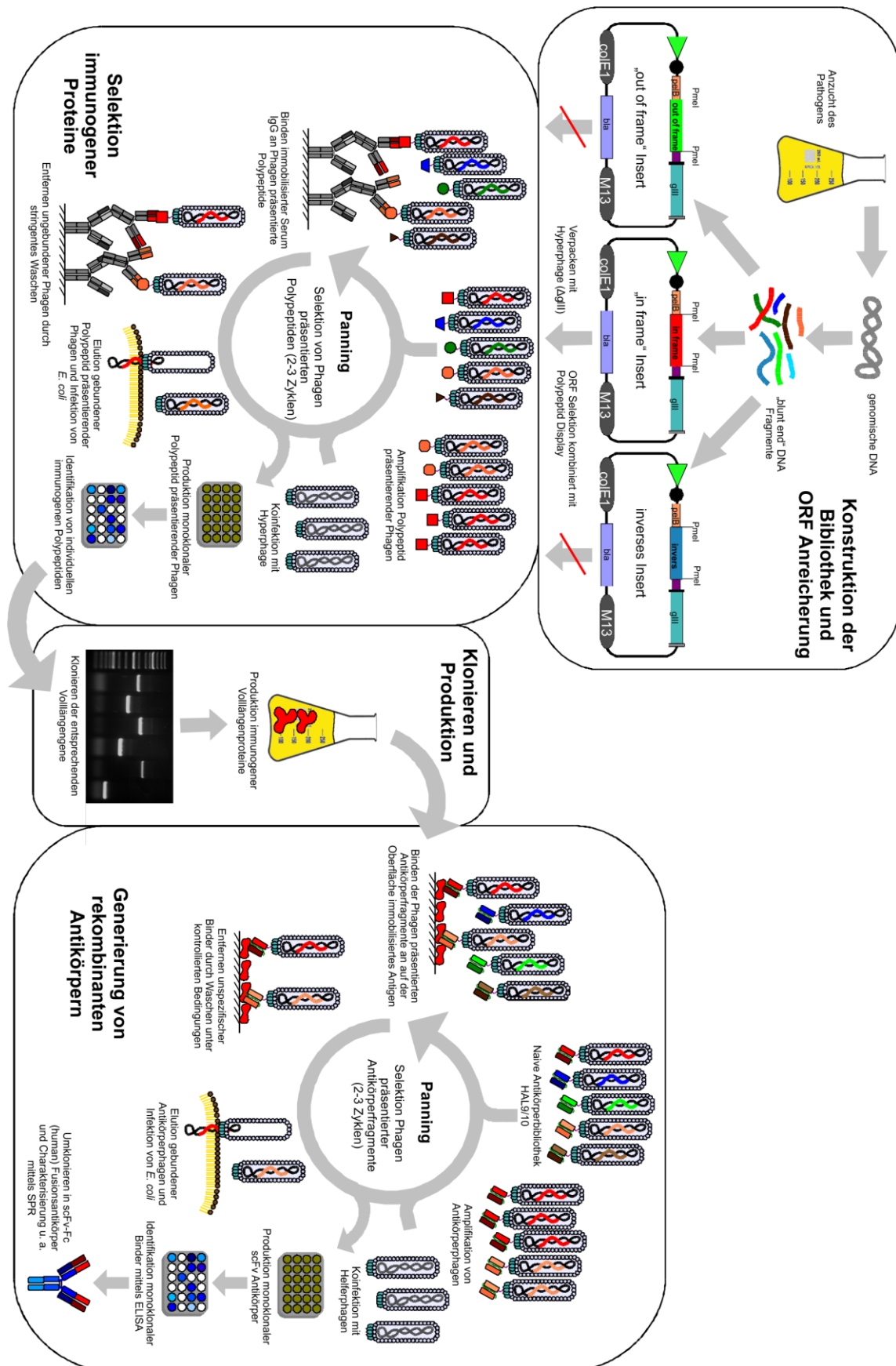


Abbildung 1.2: Schematischer Überblick des kompletten Ablaufs der Konstruktion einer Phagenbibliothek und der Identifikation neuer immunogener Proteine bis hin zur Selektion spezifischer, rekombinanter Antikörperfragmente aus einer scFv-Antikörper-Phagenbibliothek (Modifiziert nach Meyer et al. [97]).

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Puffer und Medien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle I.1, die verwendeten Puffer und Medien in Tabelle I.2 in Anhang I aufgelistet.

2.2 Antikörper

Die Pannings und Screenings der Phagenbibliothek wurden mit folgenden polyklonalen Kaninchenantikörpern durchgeführt: *B. burgdorferi* (1439-9406, Lot# 240912, AbD Serotec GmbH), *N. gonorrhoeae* (BP1050, Lot# 2B04511, Acris Antibodies GmbH), *N. meningitidis* (6600-5906, Lot# 281111, AbD Serotec GmbH). Die Antikörper wurden durch Immunisierung der Kaninchen mit einem Präparat aus den gesamten Erregerzellen produziert und die IgG Fraktion aufgereinigt. Für *C. difficile* wurden humane Seren verwendet, die freundlicherweise von Marlene Wullt, Universität Lund, Abteilung für Infektionskrankheit bereitgestellt wurden. Ein polyklonaler Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG (Fc-spezifisch, 611-1103, Lot# 29341, Biomol GmbH) wurde als Fängerantikörper während des Pannings verwendet. Polypeptid-präsentierende Phagen wurden für die Screenings über ihr Hüllprotein pVIII mit einem immobilisierten monoklonalen Mausantikörper (anti-M13/fd/F1/pVIII, 61097, Lot# 8032501, PROGEN Biotechnik GmbH) gebunden. Ein polyklonaler Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG, gekoppelt an Meerrettichperoxidase HRP (ab6721, Lot# GR3175-3, Abcam), wurde als Sekundärantikörper für die kolorimetrische Ausgabe des Signals in den Screening ELISAs und dem ELISA zur Validierung des immunogenen Charakters der Vollängenproteine mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat eingesetzt. Des Weiteren wurde der gleiche Antikörper für das Epitopmapping und den Alaninscan auf Zellulose Membran mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Substrat verwendet. Für die Validierung des immunogenen Charakters der Vollängenproteine, die Epitopmappings und die Alaninscans wurden drei polyklonale Kaninchenantikörper (BP1050, Lot# 2B04511 und Lot# 7A03112, Acris Antibodies GmbH; ab19962, Lot# GR204640-1, Abcam) von drei verschiedenen Immunisierungen genutzt. Die Spezifitätskontrollen erfolgten mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen *E. coli* (ab137967, Lot# GR129883-2, Abcam) und *N. meningitidis* (6600-5906, Lot# 281111, AbD Serotec GmbH). Als Sekundärantikörper für alle Microarray-basierten Versuche wurde ein polyklonaler Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG gekoppelt mit Chromeo546 (ab60317, Lot# GR35519-8, Abcam) eingesetzt, der eine fluorimetrische Signalausgabe bei einer Wellenlänge von 532 nm ermöglicht. Das Epitopmapping von NGO0170 erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen *N. gonorrhoeae* (BP1050, Lot# 2B04511, Acris Antibodies GmbH) und einem polyklonalen Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG gekoppelt mit HRP (ab6721, Lot# GR3175-3, Abcam) als Sekundärantikörper. Für Screening- und Titrations-ELISAs der scFv-Antikörper wurde ein monoklonaler Mausantikörper gegen den am scFv fusionierten myc-Tag (Klonnummer 9E10, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Michael Hust, TU Braunschweig) als Detektionsantikörper verwendet. Um die Antikörper-Antigen-Bindung farblich zu detektieren, wurde

2 Material und Methoden

ein polyklonaler Kaninchenantikörper gegen Maus IgG (Fc-spezifisch) gekoppelt an HRP (A0168, Sigma) eingesetzt. Für die Titration und zur Ermittlung der EC₅₀ Werte der Fusionsantikörper (scFv-Fc) wurde ein polyklonaler Ziegenantikörper gegen humanes IgG (Fc-spezifisch) gekoppelt an HRP (A0170, Sigma) als Detektionsantikörper verwendet. Für den Western Blot zur Überprüfung der produzierten scFv-Fc-Fusionsantikörper auf Zelllysate der Produktionszellen wurde ein polyklonaler Ziegenantikörper gegen humanes IgG (Fc-spezifisch) gekoppelt an AP (109-055-098, Jackson ImmunoResearch Inc.) verwendet. Als Fängerantikörper für den Zell-ELISA wurde ein monoklonaler Mausantikörper gegen UV-inaktivierte *N. gonorrhoeae* Zellen (BM3068, Lot# 1H24311, Acris Antibodies GmbH) verwendet, dessen exaktes Antigen nicht bekannt ist.

2.3 Oligonukleotide und Vektoren

Alle Oligonukleotide wurden von der biomers.net GmbH synthetisiert und je nach Verwendungszweck über Kartusche (z. B. PCR zur Amplifikation von Genen) oder HPLC (quantitative Echtzeit-PCR) aufgereinigt. Alle Oligonukleotide wurden auf 10 µM verdünnt und als Stammlösungen bei -20 °C gelagert. Eine Übersicht der verwendeten Oligonukleotide und deren Verwendung sind in Anhang II angefügt. Die Vektorkarten der verwendeten Plasmidvektoren sind in Anhang III aufgeführt.

2.4 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden folgende Erreger und deren entsprechende Stämme untersucht: *B. burgdorferi* B31 (ATCC-35210, ATCC), *C. difficile* 630 (BAA-1382, ATCC), *N. gonorrhoeae* FA1090 (ATCC-700825, ATCC), *N. meningitidis* MC58 (ATCC-BAA-335, ATCC). Es wurde darauf geachtet, dass das Genom der jeweiligen Stämme vollständig sequenziert war. Das Erstellen und die Titerbestimmung der Antigenbibliotheken erfolgte mit *Escherichia coli* TOP10F' (C665-11, Life Technologies GmbH). *E. coli* TG1 (200123, Stratagene) wurden für die scFv-Antikörper Pannings verwendet. *E. coli* XL1 Blue MRF' wurden für die Titerbestimmung der dritten scFv-Antikörper Panningrunde eingesetzt. *E. coli* BLR-DE3 Zellen (69053-4, Merck KGaA) wurden für die Expression der Vollängenproteine verwendet.

2.5 Herstellen von *E. coli* Zelllysaten

Während dieser Arbeit wurden Zelllysate von unterschiedlichen *E. coli* Stämmen verwendet. So wurden die Primärantikörper bei den Screening-ELISAs und bei der Validierung des immunogenen Charakters der Vollängenproteine mit *E. coli* Zelllysate des jeweiligen Produktionsstammes (TOP10 F' bzw. BLR-DE3) vorinkubiert, um mögliche unspezifische Kreuzreaktionen auszuschließen. Des Weiteren wurde *E. coli* Zelllysate als Negativkontrolle bei den Western Blots zur Überprüfung der produzierten scFv-Fc-Fusionsantikörper eingesetzt. Alle *E. coli* Zelllysate wurden wie folgt hergestellt: 50 mL 2x YT-Medium wurden mit einer Impföse aus einer kryokonservierten Probe beimpft und 7 h bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6–0,7 inkubiert. Für *E. coli* TOP10F' wurden 50 µg mL⁻¹ Tetracyclin als Endkonzentration hinzugegeben. *E. coli* BLR-DE3 Zellen wurden ohne Antibiotikazugabe kultiviert. 40 mL der Kultur wurden 10 min bei 3000x g pelletiert und das Pellet in

flüssigem Stickstoff eingefroren. Danach wurde das Pellet in 20 mL PBS resuspendiert und die Zelllösung mit folgenden Einstellungen am Ultraschallhomogenisator (Sonotrode MS72 und SONOPULS Homogenisator HD 2070, Bandelin) lysiert: 4 x 2 min, Amplitudeneinstellung 50 %, Zykleneinstellung cycle 5. Zwischen den vier Wiederholungen wurde der Ansatz jeweils 2 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Zelltrümmer 15 min bei 3000x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt und bei -20 °C eingefroren.

2.6 Konstruktion genomischer DNA Bibliotheken

2.6.1 Bakterienkulturen

C. difficile, *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* wurden zunächst auf Columbia-Blut-Agarplatten unter den jeweiligen Atmosphärenbedingungen vereinzelt. Einzelkolonien wurden daraufhin in jeweils 10 mL Flüssigkultur wie folgt überimpft und bei 160 rpm auf einem beheizbaren Schüttelinkubator kultiviert: *C. difficile* 48 h in Brain-Heart-Infusion Medium (BHI), anaerob (GasPak™ EZ Anaerobe Container System Sachets w/Indicator, 260001, BD) bei 37 °C; *N. gonorrhoeae* 48 h in BHI + 5 % Fetales Kälberserum (FKS), microaerophil (CampyGen™ 2,5 L, CN0025, Oxoid Limited) bei 37 °C; *N. meningitidis* über Nacht in Casein-Soja-Pepton-Bouillon (CASO), microaerophil bei 37 °C. Kryokonservierte Proben wurden mit einer Endkonzentration zwischen 16–20 % Glycerin angefertigt und bei -80 °C gelagert. Die Handhabung von *B. burgdorferi* unterschied sich wie folgt: Die Anzucht erfolgte in modifiziertem Barbour-Stoener-Kelly Medium (BSK-H) unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37 °C. Die mikroaerophilen Bedingungen wurden durch das Beifügen eines CampyGen Päckchens (CN0025, Thermo Fisher Scientific Inc.) erreicht. Alle zwei Tage wurde die Kultur visuell mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft und bei ausreichender Spirochätenanzahl 1:5 mit neuem BSK-H Medium verdünnt, da eine zu starke Verdünnung das Wachstum der Spirochäten beeinträchtigt. Für die Isolierung der genomischen DNA von *B. burgdorferi* wurden 4 mL Medium mit 1 mL einer kryokonservierten Probe inokuliert und bis zu einem Kulturvolumen von 500 mL kultiviert. Für die anderen Bakterien wurden 10 mL Medium mit einer Impföse aus einer kryokonservierten Probe inokuliert. 2 mL der Bakterienkulturen wurden in einen Erlenmeyerkolben mit 200 mL frischem Medium überführt. Die Zellgewinnung erfolgte in 40 mL Aliquots für 10 min bei 3000x g. Das Wachstum der Bakterien wurde durch die Messung der OD₆₀₀ bzw. mittels Fluoreszenzmikroskopie für *B. burgdorferi* unter Anfärben mit SYBR Green überprüft.

2.6.2 Zellyse und Extraktion genomischer DNA

Die DNA Extraktion wurde für *N. meningitidis* mithilfe des QIAamp DNA Mini Kits (51304, Qiagen) und für die weiteren Bakterien mittels Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die gewählte Extraktionsmethode richtete sich nach der Löslichkeit der Pellets nach der Zellernte, dem Lyseverhalten und dem Kulturvolumen. Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde wie folgt durchgeführt: Die Bakterienpellets wurden zunächst in 1 mL 1x phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) resuspendiert und nochmals 10 min bei 3000x g zentrifugiert. Die Lyse von grampositiven Bakterien und gramnegativen Bakterien unterschied sich in der Pufferzusammensetzung. Für das grampositive Bakterium *C. difficile* wurde folgender Puffer

2 Material und Methoden

hergestellt: 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA, 1,2 % Triton X, 20 mg mL⁻¹ Lysozym (GeneJET Genomic DNA Preparation Kit; K0721, Fermentas). Lysozym wurde immer frisch zu der Stammlösung des Puffers hinzugegeben. Das Pellet wurde in 500 µL Lysepuffer gelöst und 30 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden 25 mg mL⁻¹ Proteinase K hinzugegeben und weitere 1,5 h bei 56 °C inkubiert. Danach wurde die RNA mit 10 µL DNase-freier RNase für 10 min bei Raumtemperatur (RT) verdaut. Für die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde zunächst 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zum Ansatz hinzugegeben, kurz auf einem Schüttler durchmischt und mit einer Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehung (16100x g) 1 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt und der erste Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) Schritt wiederholt. Die obere Phase wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) vermischt, erneut zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde anschließend mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 1 Volumen 100 % Isopropanol durch Schütteln gefällt und durch Zentrifugieren für 30 min bei 16100x g bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 mL 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 100 µL TE Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert und die Konzentration am NanoDrop gemessen.

Die restlichen Bakterien waren gramnegativ oder im Falle von *B. burgdorferi* nicht nach Gramfärbung klassifizierbar [144] und wurden mit einem Lysepuffer für gramnegative Bakterien lysiert: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 25 mM EDTA, 75 mM NaCl, 0,1 % SDS, 0,5 mg mL⁻¹ Proteinase K. Proteinase K wurde immer frisch zu der Stammlösung des Puffers hinzugegeben. Die Pellets wurden in 500 µL Lysepuffer aufgenommen und 1,5 h bei 56 °C inkubiert. Der RNA-Verdau und die restliche Schritte der Phenol-Chloroform-Extraktion wurden wie für grampositive Bakterien beschrieben durchgeführt.

2.6.3 Fragmentierung genomischer DNA

Die DNA wurde mittels zwei Vorgehensweisen fragmentiert: Durch einen Restriktionsverdau mit drei Enzymen oder Ultraschallbehandlung. Zunächst wurde ein Ansatz mit jeweils drei *blunt end* Restriktionsenzymen gewählt. Die DNA von *B. burgdorferi*, *C. difficile*, *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* wurde jeweils nach folgendem Protokoll fragmentiert. Zunächst wurde ein Reaktionsansatz wie folgt pipettiert und bei 37 °C inkubiert: 12 µg genomische DNA, 10 µL 10x NEB Buffer 4, 0,5 µL *AfeI*, 0,5 µL *AluI*, 0,25 µL *DpnI* bzw. 0,5 µL *RsaI*. Der Reaktionsansatz wurde auf 100 µL Gesamtreaktionsvolumen mit ddH₂O aufgefüllt. Nach Vermischen der Reaktionsbestandteile durch Schütteln wurde der Ansatz für 25 min ohne Schütteln inkubiert. Um die optimale Inkubationszeit zu bestimmen, wurden nach 10 min, 15 min, 20 min und 25 min jeweils 25 µL in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Restriktionsenzyme für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Die kompletten Ansätze wurden daraufhin auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und die Fragmentierung überprüft. Die Proben, bei denen keine Bande der genomischen DNA zu erkennen war und die Fragmentgrößen zwischen 100 bp und 1200 bp lagen, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mittels NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (740609.250, Macherey-Nagel) nach Anleitung des Herstellers in einem 2 mL Reaktionsgefäß aufgereinigt. Hierfür wurden alle Proben eines Erregers vereint und über eine Säule aufgereinigt. Je nachdem, ob ein Bakterium seine

DNA methyliert oder nicht, stehen für den Verdau der genomischen DNA unterschiedliche Restriktionsenzyme zur Verfügung. Das Restriktionsenzym *DpnI* schneidet die DNA an der Erkennungssequenz GATC, allerdings nur, wenn diese am Adeninrest über die sogenannte Dam-Methylierung methyliert ist. *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* [145] und *B. burgdorferi* [146] weisen keine Dam-Methylierung auf und wurden daher mit *RsaI* als drittem Enzym neben *AfeI* und *AluI* verdaut. Bei *C. difficile* ist wenig über Methylierungsmuster bekannt, sodass sowohl *DpnI* als auch *RsaI* für den Restriktionsverdau in verschiedenen Ansätzen überprüft wurden.

Als zweite Fragmentierungsmethode wurde die Ultraschallbehandlung gewählt. Insgesamt wurden 60 µg genomische DNA pro Erreger mittels Ultraschall fragmentiert. Hierfür wurde die DNA auf 2 mL mit PBS aufgefüllt und folgendes Protokoll sechs Mal auf Eis wiederholt: 2 min Ultraschallbehandlung mit einer Amplitude von $126 \mu\text{m s}^{-2}$ (entspricht 50 %), Zykleneinstellung cycle 5, gefolgt von 2 min auf Eis. Alle Angaben beziehen sich auf die Einstellungen des Bandelin Sonopuls HD2070 Ultraschallhomogenisators, verwendet mit der Sonotrode MS72. Nach der Fragmentierung wurden die DNA-Ansätze mit einem Amicon Ultra Filtersystem mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa wieder aufkonzentriert. Anschließend wurde die fragmentierte DNA wie beim Restriktionsverdau beschrieben weiterbehandelt (1 % Agarosegel, Aufreinigung über NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit). Da bei der Ultraschallbehandlung willkürliche Fragmente und Bruchstellen entstehen, wurden die DNA-Stücke mit dem Fast DNA End Repair Kit (K0771, Fermentas) nach Anleitung des Herstellers behandelt und erneut mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up aufgereinigt.

2.6.4 Vorbereitung des Plasmidvektors

Der Vektor pHORF3 wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Michael Hust an der TU Braunschweig zur Verfügung gestellt. Der Vektor wurde mit *PmeI* verdaut, um eine Ligation der *blunt end* Restriktionsschnittstellen und der reparierten DNA-Enden der Ultraschallbehandlung zu ermöglichen. Hierfür wurden 100 µg Vektor pHORF3, 60 µL 10x NEB4 Puffer, 6 µL 100x BSA, 50 µL *PmeI* in ein Reaktionsgefäß pipettiert und der Reaktionsansatz auf 600 µL Gesamtvolumen mit ddH₂O aufgefüllt. Der Restriktionsansatz wurde auf drei Aliquots á 200 µL aufgeteilt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Der verdaute Vektor wurde mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit aufgereinigt, indem die gesamten 600 µL auf 8 Säulen aufgeteilt wurden und die Vektor-DNA jeweils mit 50 µL NE Puffer eluiert wurde. Daraufhin wurde der Vektor wie folgt dephosphoryliert: 70 µg Vektor pHORF3, 120 µL 10x NEB3, 10 µL Alkaline Phosphatase (CIP), aufgefüllt auf 1200 µL mit ddH₂O. Acht Aliquots mit jeweils 150 µL wurden 1 h bei 50 °C inkubiert. Um die Dephosphorylierung der *blunt ends* zu gewährleisten, wurden die von NEB angegebenen Ratschläge zur Effizienzsteigerung (+ 20–25 %) befolgt. Daher wurde etwas mehr als 1 U CIP pro µg DNA eingesetzt und die Temperatur auf 50 °C erhöht. Die dephosphorylierten Ansätze wurde wiederum mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit aufgereinigt und die Elutionen vereinigt. Der verdaute und dephosphorylierte Vektor wurde anschließend mit einem 1%igen Agarosegel überprüft.

2.6.5 Klonierung der DNA Fragmente

Die Ligation erfolgte bei 16 °C für 16 h. Folgender Ligationsansatz wurde pipettiert: 500 ng bzw. 1000 ng verdauter und dephosphorylierter Vektor pHORF3, 700 ng fragmentierte genomische DNA, 5 µL 10x Ligasepuffer, 1,67 µL T4 DNA Ligase, aufgefüllt auf 50 µL Gesamtreaktionsvolumen mit ddH₂O. Anschließend wurde die Ligase für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Für die Ligation der DNA Fragmente des Restriktionsverdaus wurden 500 ng des Vektors eingesetzt, da von einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 600 bp ausgegangen wurde. Die durchschnittliche Fragmentgröße nach der Ultraschallbehandlung war mit ca. 300 bp kleiner, sodass mehr Vektor eingesetzt wurde (1000 ng). Die Berechnung der Mengen an Insert zu Vektor für die Ligation erfolgte mit Formel 1.

$$\text{Insertmenge} = \frac{\text{Vektormenge} \times \text{Insertgröße}}{\text{Vektorgröße}} \cdot x \quad 1$$

wobei

Insertmenge	benötigte Menge der Inserts in ng
Vektormenge	eingesetzte Menge des Vektors in ng
Insertgröße	durchschn. Größe des Inserts in Kilobasenpaaren
Vektorgröße	Größe des Vektors in Kilobasenpaaren (pHORF3 4,144 kb)
x	Überschuss an Insert zu Vektor

Nach der Ligation wurden die Ligationsansätze mit Amicon Ultra Filtern mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa in ddH₂O umgepuffert, um störende Salze und andere Verunreinigungen für die Elektroporation zu entfernen.

2.6.6 Transformation mittels Elektroporation

Ein umgepufferter Ligationsansatz (ca. 30–35 µL) wurde für zwei Transformationsansätze verwendet. Zu jedem Ansatz wurden 25 µL elektrokompetente *E. coli* TOP10F' Zellen hinzugegeben und auf Eis für 1 min inkubiert. Daraufhin wurde das Gemisch in eine auf Eis gekühlte 0,1 cm Küvette gefüllt, sodass die Flüssigkeit ohne Luftblasen den Küvettenboden bedeckte. Die Elektroporation erfolgte im Elektroporator mit einem Puls von 1,8 kV für 5 ms. Direkt im Anschluss wurde 1 mL 37 °C warmes SOC-Medium hinzugegeben, gemischt und die Bakterien für 1 h bei 600 rpm in einem Thermomixer inkubiert. 10 µL wurden dann für die Titerbestimmung entnommen und die restlichen 990 µL auf Agarplatten (Seitenlänge 24,5 cm, 431111, Corning Incorporated) mit 2x YT-GA (1,6 % Trypton, 1 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl + 100 mM Glukose + 100 µg ml⁻¹ Ampicillin) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Bakterienrasen in frischem Medium aufgenommen. Dafür wurden 25 mL 2x YT-Medium auf den Agar gegeben und 30 min auf einer Wippe inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit einem Drigalskispatel vorsichtig vom Agar abgelöst und in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde dann für das Verpacken der Bibliothek mit Hyperphage verwendet und der Rest mit Glycerin mit einer Endkonzentration von 17 % versetzt und bei –80 °C kryokonserviert.

2.6.7 Titerbestimmung der genomischen DNA Bibliothek

10 µL des Transformationsansatzes wurden mit 990 µL 2xYT gemischt (10^{-2}) und daraus eine Verdünnungsreihe (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) erstellt. Durch Ausplattieren von jeweils 100 µL auf 2xYT-GA Agarplatten wurden Verdünnungsfaktoren von 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} erreicht. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Durch Auszählen der Kolonien und unter Einbeziehen der Verdünnungsfaktoren wurde der Titer in cfu (*colony forming unit* = Koloniebildende Einheit) pro mL berechnet. Die Anzahl benötigter Kolonien zur Abdeckung des gesamten Genoms wurde mit Formel 2 berechnet [147]:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln\left(1 - \frac{a}{b}\right)} \quad 2$$

wobei

- N Anzahl benötigter Klone
- P Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmtes Fragment vertreten ist ($0,999 \cong 99,9\%$)
- a Durchschnittsgröße eines DNA Fragments in bp
- b Gesamtgröße des Bakteriengenoms in bp

2.6.8 Bibliotheksvalidierung mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung

Um die Ligation und Transformation zu überprüfen, wurden Einzelkolonien von der Titeragarplatte isoliert. Daraufhin folgte entweder eine Kolonie-Polymerasekettenreaktion (CPCR) oder 5 mL 2xYT-GA wurden mit einer Einzelkolonie inokuliert, über Nacht inkubiert und anschließend für die Sequenzierung verwendet. Die CPCR erfolgte nach dem Pipettierschema in Tabelle 2.1 mit den Primern MHLacZPro_f und MHgIII_r (siehe Anhang II). Die Kolonie wurde mit einem Zahnstocher direkt in den CPCR-Ansatz überführt.

Tabelle 2.1: Pipettierschema für die CPCR zur Überprüfung der Bibliothek.

Komponente	Volumen /µL	Menge bzw. Konzentration
DNA	-	1 Kolonie
5x GoTaq Flexi Puffer/5x HF Puffer	4	1x
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 bzw. 0 bei Phusion Polymerase	2 mM
dNTPs (10 mM)	0,4	0,2 mM
Forward Primer (10 µM)	1	0,5 µM
Reverse Primer (10 µM)	1	0,5 µM
GoTaq Polymerase/Phusion Polymerase	0,1/0,2	0,5 U/0,4 U
ddH ₂ O	ad 20	-

Die CPCR wurde mit dem Programm in Tabelle 2.2 durchgeführt.

Tabelle 2.2: Programmeinstellungen für die CPCR.

Bei Nennung von zwei Zahlen stellt die erste Zahl die Einstellung für die GoTaq Polymerase, die zweite die Einstellung für die Phusion Polymerase dar.

Schritt	Temperatur /°C	Zeit /s	Zyklen
Initial Denaturation	95/98	120/30	-
Denaturation	95/98	15/10	
Annealing	56	20/20	35
Extension	72	90/60	
Final Extension	72	600	-

2 Material und Methoden

Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel oder mittels QIAxcel Advanced System (Qiagen) elektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert. Als Größenstandard wurden die Hyperladder™ IV (BIO-33029, Bionline GmbH) bzw. der QX Size Marker 100 bp–2,5 kb (929559, Qiagen) eingesetzt.

Die 5 mL Kulturen wurden am folgenden Morgen mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit nach Anleitung des Herstellers lysiert und die Plasmid-DNA isoliert. Die Konzentration wurde auf $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ eingestellt und an LGC Genomics GmbH zur Sequenzierung übergeben.

2.7 Erstellen der Phage Display Bibliothek

2.7.1 Verpacken der Bibliothek mit Hyperphage

Die Bibliotheken wurden mittels Hyperphage verpackt [148], um eine Präsentation von Polypeptiden auf der Oberfläche der Phagenmoleküle zu erhalten. Des Weiteren wird durch das Verpacken mit Hyperphage die Anzahl an open reading frames (ORFs) signifikant erhöht und dadurch die Menge an nicht kodierender DNA und somit die Anzahl überflüssiger Klone verringert. Hierfür wurden 400 mL 2x YT-GA mit einer kryokonservierten Probe der Bakterienbibliothek auf eine OD_{600} von $\leq 0,1$ angeimpft und bei 250 rpm und 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,5 wachsen gelassen. 25 mL der Bakterienkultur (ca. $1,25 \times 10^{10}$ Bakterienzellen, Annahme $\text{OD}_{600} 1 = 1 \times 10^9$ Zellen [149]) wurden daraufhin in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und mit Hyperphage im Verhältnis 1:20 ($2,5 \times 10^{11}$ Phagenpartikel) infiziert. Die Kultur wurde 30 min bei 37°C ohne Schütteln und weitere 30 min bei 250 rpm in einem Erlenmeyerkolben inkubiert. Parallel wurde die restliche Bakterienkultur durch Pelletieren von jeweils 40 mL Kultur für 10 min bei $3250 \times g$ und Aufnehmen der Pellets in 800 μL 2x TY-GA und 200 μL 86 % Glycerin kryokonserviert. Nach der Inkubation wurde das Bakterien-Phagen-Gemisch 10 min bei $3250 \times g$ zentrifugiert, um die Glukose, die den Lac-Promotor blockiert, aus dem Ansatz zu entfernen. Daraufhin wurde das Pellet in 400 mL 2x YT-AK (2x YT mit $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin + $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin) resuspendiert und über Nacht bei 250 rpm und 30°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Bakterienzellen für 20 min bei $10000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in zwei 500 mL Zentrifugenbecher überführt und die Phagenpartikel durch Zugabe von 1/5 Volumen PEG/NaCl (20 % (w/v) PEG 6000, 2,5 M NaCl) auf Eis unter Schütteln auf einer Wippe über Nacht gefällt. Daraufhin wurden die Phagenpartikel für 1 h bei $10000 \times g$ und 4°C pelletiert und die Pellets in 10 mL Phage Dilution Puffer (10 mM TrisHCl pH 7,5, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA) resuspendiert. Anschließend wurden die restlichen Bakterien 10 min bei $20000 \times g$ und 4°C pelletiert und der Überstand in ein neues 50 mL Zentrifugenröhrchen durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von $0,45 \mu\text{m}$ filtriert. Dann wurden die Phagen erneut mit 1/5 Volumen PEG/NaCl durch Mischen und Inkubation auf Eis auf einer Wippe für 1 h gefällt. Die Phagenpartikel wurden daraufhin für 30 min bei $20000 \times g$ und 4°C pelletiert, der Überstand vollständig verworfen und das Pellet in 1 mL Phage Dilution Puffer resuspendiert. Durch erneutes Zentrifugieren bei $16100 \times g$ wurden die restlichen Bakterien entfernt und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. 10 μL des Überstands wurden für die Titerbestimmung verwendet.

2.7.2 Titerbestimmung der verpackten Bibliothek

5 mL 2x YT-T (2x YT mit $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Tetracyclin) wurden mit *E. coli* TOP10F' inokuliert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 50 mL 2x YT-T Medium mit $500 \mu\text{L}$ Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 kultiviert. Parallel wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) der Phagenlösung ($10 \mu\text{L}$ von 1 mL für die erste Verdünnung) mit sterilem PBS Puffer ($990 \mu\text{L}$ für die erste Verdünnung) erstellt. $10 \mu\text{L}$ (Verdünnungsfaktor 10^{-2}) der letzten vier Verdünnungsstufen wurden dann mit jeweils $50 \mu\text{L}$ der *E. coli* TOP10F' Kultur für 30 min bei 37°C inkubiert und danach pro Verdünnungsstufe drei $10 \mu\text{L}$ Tropfen auf eine 2x YT-GA Agarplatte pipettiert. Der Titer (cfu mL^{-1}) ergab sich durch die doppelte Anzahl der ausgezählten Kolonien und der jeweiligen Verdünnungsstufe.

2.7.3 Bibliotheksvalidierung mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung

Die Validierung der verpackten Bibliothek erfolgte wie bereits bei der *E. coli* Bibliothek durch CPCR und Sequenzierung (siehe Abschnitt 2.6.8).

2.8 Selektion immunogener Polypeptidphagen

2.8.1 Anreicherung bindender Polypeptidphagen durch Panning

Für das Panning wurden in zwei Vertiefungen einer Maxisorp W 96 well Mikrotiterplatte (MTP) $150 \mu\text{L}$ eines polyklonalen anti-Kaninchen IgG (Fc-spezifisch) Ziegenantikörpers ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) verdünnt in PBS Puffer über Nacht bei 4°C immobilisiert. Für das Panning der Bibliothek von *C. difficile* wurde ein monoklonaler anti-Human IgG (Fc-spezifisch) Mausantikörper verwendet. Anschließend wurden die Vertiefungen drei Mal mit PBS-T (PBS Puffer mit 0,1 % Tween20) gewaschen und für 1 h mit 2 % MPBS-T (PBS-T mit 2 % (w/v) Milchpulver) geblockt. Um bindende Antikörper gegen Phagenpartikel auszuschließen, wurden die polyklonalen Antikörper und das Humanserum zunächst vorinkubiert. Hierfür wurden für jede Vertiefung des Pannings zwei Vertiefungen einer weiteren Mikrotiterplatte mit $200 \mu\text{L}$ Hyperphage (5×10^{10} Phagenpartikel) in PBS bei 4°C über Nacht beschichtet und am nächsten Tag mit 2 % MPBS-T für 1 h geblockt. Die polyklonalen Antikörper und die vereinigten Humanseren wurden 1:10 bzw. 1:200 verdünnt und für 1 h in der ersten Vertiefung inkubiert, in die zweite Vertiefung überführt und erneut 1 h inkubiert. Nach der Vorinkubation wurden die Antikörper in die Vertiefungen für das Panning überführt, für 1,5 h bei RT oder optional bei 4°C über Nacht inkubiert und drei Mal mit PBS-T gewaschen. Daraufhin wurden $150 \mu\text{L}$ der verpackten Phagenbibliothek mit $50 \mu\text{L}$ 2 % MPBS-T zu den Vertiefungen gegeben und für 2 h inkubiert. Für die zweite und dritte Panningrunde wurden jeweils $150 \mu\text{L}$ der gefällten Phagen (ca. 1×10^{10} Phagenpartikel) der jeweils vorigen Panningrunde verwendet. Nicht oder nur schwach gebundene Phagen wurden durch stringente Waschschriffe entfernt, deren Anzahl sich nach der Panningrunde richtete. So wurden die Vertiefungen zehn Mal je Panningrunde gewaschen. Gebundene Phagenpartikel wurden danach mit $200 \mu\text{L}$ $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Trypsin in PBS für 30 min bei 37°C eluiert. Die eluierten Phagen der zwei Panningvertiefungen wurden vereint und $10 \mu\text{L}$ für die Titration verwendet. Die restlichen $390 \mu\text{L}$ wurden für die Infektion von 20 mL einer *E. coli* TOP10F' Kultur (Wachstum bei 37°C bis OD_{600} 0,5) verwendet. Die Bakterien wurden 30 min bei 37°C mit den

2 Material und Methoden

Phagen inkubiert und dann für 10 min bei 3250x g pelletiert. Das Pellet wurde in 250 µL 2x YT-GA Medium resuspendiert, auf eine 2x YT-GA Agarplatte (Durchmesser 15 cm) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien mit einem Drigalskispatel in 5 mL 2x YT-GA aufgenommen und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. 50 mL 2x YT-GA Medium wurden mit den abgeschwemmten Bakterien auf eine $OD_{600} \leq 0,1$ angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurden 5 mL (ca. $2,5 \times 10^9$ Bakterien) der Bakterienkultur mit Hyperphage im Verhältnis 1:20 (5×10^{10} Phagenpartikel) infiziert und für 30 min bei 37 °C ohne Schütteln und weiteren 30 min bei 200 rpm inkubiert. Die restlichen Bakterien wurden für 5 min bei 3250x g pelletiert und in 4 mL 2x YT-GA resuspendiert und daraus Kryostocks mit ca. 17 % Glycerin hergestellt. Um die Glukose zu entfernen, wurden die Bakterien für 10 min bei 3250x g pelletiert und das Pellet anschließend in 30 mL 2x YT-AK resuspendiert und bei 30 °C und 250 rpm über Nacht in einem Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien für 20 min bei 3250x g und 4 °C in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen zentrifugiert und der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Dieser Schritt wurde wiederholt, falls der Überstand noch trüb war. Die Phagen im Überstand wurden dann mittels Zugabe von 1/5 Volumen PEG/NaCl für 1 h auf Eis auf einem Wippschüttler gefällt. Daraufhin wurden die Phagen 1 h bei 6000x g und 4 °C pelletiert und das Pellet in 500 µL Phage Dilution Puffer aufgenommen. Um restliche Bakterien abzutrennen, wurde die Phagenlösung nochmals in einer Tischzentrifuge bei 16100x g zentrifugiert und der Überstand in ein Schraubgefäß überführt und bei 4 °C gelagert oder für die nächste Panningrunde verwendet. 10 µL der gefällten Phagen wurden für die Titerbestimmung eingesetzt. Während dieser Arbeit wurden Pannings mit zwei oder drei Panningrunden durchgeführt. Nach zwei Panningrunden ist die Wahrscheinlichkeit höher, auch schwächer bindende Antigene zu isolieren, die jedoch trotzdem von Antikörpern detektiert werden. Gleichzeitig sind nach zwei Panningrunden auch mehr nicht bindende Polypeptide vorhanden, die mit einer steigenden Zahl an Panningrunden größtenteils entfernt werden können.

2.8.2 Titerbestimmung nach der Elution und Fällung während des Pannings

Beide Titerbestimmungen, sowohl nach der Elution als auch nach dem Fällung, wurden mit der gleichen Vorgehensweise wie unter 2.7.2 durchgeführt. Allerdings unterschied sich die Verdünnungsreihe für die Titerbestimmung der Elution. Je nach Panningrunde wurden die Konzentrationen nach der Elution niedriger angesetzt als bei der Titerbestimmung der Bibliothek und nach der Fällung der Phagen. Ausgehend von Verdünnungen 10^{-3} und 10^{-4} für die erste Panningrunde, wurde die Verdünnung für die weiteren Panningrunden jeweils um eine Logarithmusstufe verringert, also auf 10^{-5} nach der zweiten bzw. 10^{-6} nach der dritten Panningrunde.

2.8.3 Produktion von Einzelklonen für das Polypeptid Screening

Die Vertiefungen einer Polypropylen-MTP mit abgerundetem Boden (PP-MTP) wurden mit jeweils 175 µL 2x TY-GA gefüllt. Daraufhin wurden 94 pHORF Klone von der Agarplatte zur Titerbestimmung nach der letzten Panningrunde mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und für jeden Klon eine Vertiefung angeimpft. H9 und H12 wurden als Negativkontrollen zur Überprüfung der sterilen Bedingungen nicht angeimpft. Die Platte wurde mit einer luftdurchlässigen Folie bedeckt und die

Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 800 rpm in einem MTP-Schüttler. Die Vertiefungen einer PP-MTP wurden mit 165 µL 2x YT-GA gefüllt, 10 µL der Übernachtskultur aus jeder Vertiefung der Masterplatte hinzugefügt und diese für 2 h bei 37 °C und 800 rpm inkubiert. Die Masterplatte wurde mit einer Endkonzentration von 17 % Glycerin bei -80 °C gelagert. Pro Vertiefung wurden 5×10^9 Phagenpartikel (Hyperphage) hinzugefügt, die Platte 30 min bei 37 °C ohne Schütteln und weitere 30 min bei 800 rpm inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien für 10 min bei 3250x g pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und 175 µL vorgewärmtes 2xYT-AK Medium zu jeder Vertiefung hinzugefügt und die Platte mit luftdurchlässiger Folie bedeckt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30 °C und 800 rpm. Am folgenden Tag wurden die Bakterien 20 min bei 3250x g abzentrifugiert. Jeweils 150 µL Überstand wurden in eine neue Mikrotiterplatte überführt und die Phagen durch Zugabe von 40 µL PEG/NaCl und einer Inkubation von 1,5 h bei 4 °C gefällt. Die Phagen wurden bei 3250x g und 4 °C für 1 h pelletiert, der Überstand vollständig entfernt und die Phagen in 150 µL PBS resuspendiert. Potentielle Bakterienreste wurden 5 min bei 3250x g pelletiert, die Überstände in eine neue MTP überführt und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.8.4 Screening der Einzelklone mittels ELISA

Der Fängerantikörper (1:400 verdünnt mit PBS, Maus monoclonal anti-pVIII von M13/fd/f1 Phagen) wurde in einer Maxisorp W 96 well MTP über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Für das Screening der *B. burgdorferi* Bibliotheken wurde kein Fängerantikörper eingesetzt, sondern die Phagen direkt auf der Oberfläche der MTP immobilisiert, da der polyklonale Antikörper gegen *B. burgdorferi* unspezifisch mit dem Fängerantikörper interagiert. Am nächsten Tag wurden die Überstände entfernt und die Vertiefungen mit 350 µL 2 % MPBS-T für 1,5 h geblockt. Daraufhin wurde die MTP drei Mal mit PBS-T gewaschen und jeweils 50 µL der amplifizierten Phagen (ca. 1×10^9 – 1×10^{10}) mit 100 µL 2 % MPBS-T in die Vertiefungen überführt und für 2 h bei RT inkubiert. Als Negativkontrolle wurden 3×10^8 Phagen einer unspezifischen Bibliothek (in Vertiefungen H9 und H12) verwendet. Gleichzeitig wurden die Antikörper/Humanseren für die Kompetition 1:200 in 2 % MPBS-T + 10 % *E. coli* Zellysat + 1×10^{10} Hyperphage pro mL Serum verdünnt und für 2 h bei RT inkubiert. Die nicht gebundenen Phagen wurden dann durch dreimaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Daraufhin wurden 100 µL des vorinkubierten Antikörpers/Serums zu jeder Vertiefung hinzugefügt, gefolgt von einer Inkubation von 2 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T wurde der jeweilige Sekundärantikörper (Ziegen-AK anti-Human IgG HRP 1:70000, Sigma 10170; Ziegen-AK anti-Kaninchen IgG HRP 1:20000, Sigma 0545; für die Positivkontrollen in H3 und H6 Maus-AK anti-m13 HRP 1:5000, GE 27942101) hinzugegeben und für 1,5 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T wurden 100 µL Substratlösung zu jeder Vertiefung hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte zwischen 5–20 min bis eine ausreichende Blaufärbung eintrat. Daraufhin wurde die Reaktion mit 100 µL 1 N H₂SO₄ je Vertiefung abgestoppt und die Absorption bei 450 nm im Plattenreader gemessen.

2.9 Validierung des immunogenen Charakters der Vollängenproteine

2.9.1 Amplifikation und Klonierung der Vollängengene

Identifizierte Polypeptide von *N. gonorrhoeae* wurden als Vollängenproteine produziert, um den immunogenen Charakter auch im vollständigen Protein zu validieren. Die kodierenden Gene wurden mit den entsprechenden Primern (Anhang II) aus genomischer DNA amplifiziert. Alle Primer wurden mit einem Überhang synthetisiert, der so gewählt wurde, dass möglichst keine internen Schleifenprodukte oder eine Hybridisierung der Primerpaare möglich waren. Der Überhang bestand jeweils aus einer Schnittstelle für ein Restriktionsenzym direkt vor dem Gen und einem unspezifischen kurzen Überhang, damit die Restriktionsschnittstelle für das Enzym zugänglich ist. Für die Amplifikation wurde die Phusion Polymerase mit einem leicht abgeänderten Protokoll (vgl. CPCR, Tabelle 2.2) verwendet. Die Annealingtemperatur war abhängig vom Primerpaar und wurde mit dem NEB Tm Calculator (<http://tmcalculator.neb.com/#!/>) berechnet, die Zeit für den Extension Schritt wurde auf 20 s verkürzt und es wurden nur 30 Zyklen gewählt. Alle Gene wurden mit jeweils zwei Restriktionsenzymen geschnitten, um eine gerichtete Ligation zu ermöglichen, sodass die Inserts nur in korrekter Ausrichtung vorlagen. Als Vektor diente das Plasmid pET21a(+), welches mit *NdeI* und *NotI* geschnitten wurde. Dementsprechend wurden die amplifizierten Genabschnitte ebenfalls mit diesen beiden Enzymen verdaut. Falls innerhalb des Gens Schnittstellen für *NdeI* und *NotI* existierten, wurde anstelle von *NdeI* *NheI* verwendet. Besaß das Protein ein Signalpeptid wurde das Gen ohne Signalpeptid amplifiziert und mit *NheI* und *NotI* geschnitten und in das entsprechend geschnittene Plasmid pET21a(+) mit pelB Signalsequenz ligiert. Nach dem Verdau wurden die geschnittenen PCR-Produkte mittels 1%igem Agarosegel getrennt und mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit aufgereinigt. Die Ligation wurde mit einem 3-fachen Überschuss an Insert durchgeführt und die benötigte Menge an Insert mit Formel 1 in Abschnitt 2.6.5 berechnet. Für den Vektor wurden 50 ng bei einer Größe von ca. 5360 bp eingesetzt und der Ligationsansatz betrug 10 µL. Ansonsten erfolgte die Ligation wie unter Punkt 2.6.5 beschrieben. Die ligierten Konstrukte wurden wiederum über Amicon Ultra Filtern mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa in ddH₂O umgepuffert, um störende Salze und andere Verunreinigungen für die Elektroporation zu entfernen. Elektrokompente *E. coli* BLR-DE3 Zellen wurden dann mit den ligierten Konstrukten transformiert und der Transformationsansatz auf 2x YT-GA Agarplatten ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die positiven Klone mittels CPCR mit den Primern pet21a_CPCR3_for und pet21a_CPCR3_rev (Sequenzen siehe Anhang II) und einem 1 % Agarosegel der PCR-Produkte identifiziert. Positive Klone wurden daraufhin in 5 mL 2x YT-GA Medium über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und am nächsten Tag eine Plasmidpräparation durchgeführt, um die Plasmide anschließend sequenzieren zu lassen. Hierfür wurden zunächst dieselben Primer genutzt wie für die CPCR. Bei Genen mit einer Länge von mehr als 1600 bp wurde ein Primer Walking durchgeführt und die sequenzierten Genfragmente anschließend zusammengesetzt.

2.9.2 Expression und Aufreinigung der Vollängenproteine

200 mL 2x YT-GA Medium wurden mit 10 mL einer Vorkultur angeimpft und in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C und 120 rpm kultiviert. Die

Expression wurde durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert und für 5 h bei 30 °C und 100 rpm inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen für 20 min bei 3000x g pelletiert und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Hierbei wurde das Zellpellet in Polyhistidin-Tag (His-Tag) Binding Puffer (50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0, 8 M Harnstoff) aufgenommen und für 1 h durch Überkopfrotation inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension durch Ultraschallbehandlung (6 Zyklen, 10 s, 50 %, Zykleneinstellung cycle 5, 10 s Inkubation auf Eis; Einstellungen beziehen sich auf Sonotrode MS72 und SONOPULS Homogenisator HD 2070, Bandelin) lysiert und die Zellbestandteile 20 min bei 10000x g abzentrifugiert. Parallel wurden 0,5 mL Ni-NTA Agarose Suspension (Qiagen, 30210) für 2 min bei 6800x g zentrifugiert, mit 1 mL His-Tag Binding Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand der lysierten Zellen zu der Ni-NTA Matrix gegeben und für 2 h über Kopf geschüttelt. Daraufhin wurde die Lösung auf eine Polypropylensäule geladen und das chromatographische Bett durch Gravitationsfluss ausgebildet. Durch Waschstschritte mit 10 mM, 30 mM und 50 mM Imidazol im Waschpuffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 8 M Harnstoff, pH 8,0) wurden die überschüssigen Zellproteine herausgewaschen. Die exprimierten Volllängenproteine, fusioniert an einen His-Tag, wurden drei Mal mit 1,25 mL Elutionspuffer (PBS Puffer, pH 7,4 mit 100 mM EDTA, 8 M Harnstoff) eluiert.

2.9.3 Kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Assay

Der BCA Assay wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet. Um das Probenvolumen so gering wie möglich zu halten, wurde die Vorgehensweise im Mikrotiterformat nach Anleitung des Herstellers mit 10 µL Probenvolumen gewählt. Die Farbintensität wurde nach 30 min am Fluostar Omega Plattenreader (BMG Labtech) kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert.

2.9.4 SDS-PAGE zur Kontrolle der Volllängenproteine

Die korrekte Expression der Volllängenproteine wurde mittels 12–15%igen SDS-PAGE Gelen mithilfe des theoretisch berechneten Molekulargewichts des jeweiligen Proteins identifiziert. 12%ige Gele wurden für Proteine mit einem Molekulargewicht ab 20 kDa verwendet, während 15%ige Gele für alle Proteine unter 20 kDa eingesetzt wurden. Die Gele wurden nach dem Protokoll von Sambrook und Russell [150] gegossen. Als Laufpuffer wurde TGS Puffer verwendet. 0,5 µg Protein wurden mit 5x Lane Marker Reducing Sample Buffer (Thermo Scientific, 39000) und einer entsprechenden Menge ddH₂O für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Als Größenstandards wurden für 12%ige Gele die PageRuler Plus Prestained Ladder (Thermo Scientific, 26619) und für 15%ige Gele die Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder (Thermo Scientific, 26628) verwendet. Die Proteinproben wurden dann in die Geltaschen aufgetragen und zunächst durch Anlegen von 60 V für 10 min in einem Sammelgel gebündelt und danach bei 110 V für 60 min im Trenngel nach ihren Größen separiert. Die Banden wurden mit PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Scientific, 24620) mit einem beschleunigten Mikrowellenprotokoll wie folgt angefärbt: Zunächst wurde das Gel mit 100 mL ddH₂O bedeckt und in der Mikrowelle 1 min bei 600 W erhitzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für weitere 4 min auf einem Horizontalschüttler mit 35 rpm. Dieser Waschstschritt wurde insgesamt drei Mal wiederholt, woraufhin 20 mL PageBlue Protein Staining Solution hinzugegeben wurden, um das Gel vollständig zu

2 Material und Methoden

bedecken. Danach wurde die Lösung bei 600 W 30 s bis knapp unter den Siedepunkt erhitzt und das Gel anschließend für 20 min auf einem Horizontalschüttler in der Färbelösung inkubiert. Um die Färbelösung zu entfernen, wurde das Gel drei Mal mit ddH₂O gewaschen. Durch Inkubation mit ddH₂O über Nacht bei 8 °C und Zugabe eines gefalteten Papiertuchs, welches die überschüssige Farbe aus dem Wasser aufnimmt, wurde der Hintergrund des Gels entfärbt. Abschließend erfolgte die Aufnahme des Gels mit einem Geldokumentationsgerät.

2.9.5 Validierungs-ELISA

Für die Validierung des immunogenen Charakters der Volllängenproteine wurde ein ELISA durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 1 µg jedes Proteins als Triplikat in 1x PBS Puffer oder NaHCO₃ Puffer an die Oberfläche einer Maxisorp MTP bei 4 °C über Nacht gebunden. Als Prozesskontrollen wurden PBS, BSA, der Primärantikörper und der Sekundärantikörper eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden ein in *E. coli* überexprimiertes Protein (BB0069) von *B. burgdorferi* verwendet, mit dem auch die Ausschlussgrenze berechnet wurde, und ein Protein (NGO1500) eines negativen Klon, der nach den Panningrunden im Screening nur der dreifachen Signalintensität der Negativkontrollen entsprach. Als Positivkontrolle wurde ein Protein (NGO0564) gewählt, dessen Homolog in *N. meningitidis* als Immunogen beschrieben war und im Phagenscreening identifiziert wurde. Nach der Immobilisierung der Proteine wurden die Vertiefungen drei Mal mit 200 µL PBS-T gewaschen und daraufhin die Oberflächen der Vertiefungen mit 2 % MPBS-T für 2 h geblockt. Parallel wurden die Primärantikörper (drei Kaninchen anti-*N. gonorrhoeae* Antikörper von verschiedenen Immunisierungen) 1:1000 in 2 % MPBS-T + 10 % *E. coli* BLR-DE3 Zelllysat verdünnt und für 2 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Vertiefungen mit 200 µL PBS-T wurden jeweils 100 µL der vorinkubierten Antikörper in die Vertiefungen pipettiert und die MTP für 2 h inkubiert. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers (je 100 µL 1:20000 verdünnt in 2 % MPBS-T) wurden die Vertiefungen drei Mal mit 200 µL PBS-T gewaschen. Die Inkubation mit Sekundärantikörper erfolgte für 1,5 h. Der Nachweis der Bindung erfolgte durch die an den Sekundärantikörper gebundene HRP und dem entsprechenden Substrat TMB. Durch Zugabe von 100 µL TMB-Lösung und einer Inkubation von 10–15 min erfolgte eine zunehmende Blaufärbung der TMB-Lösung. Um die Reaktion zu beenden, wurde diese nach 15 min mit 1 N H₂SO₄ gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen.

2.10 Charakterisierung der Antigenregionen

2.10.1 Epitopmapping mittels Microarray

Alle Proteine (mit Ausnahme von NGO0170, siehe 2.10.4), deren Polypeptide während des Screenings mindestens die vierfache Signalintensität der Negativkontrollen zeigten, wurden für das Epitopmapping mittels Microarray verwendet. Dabei wurden nur die Bereiche der Proteine untersucht, die zuvor beim Screening als Polypeptide auf den Phagen präsentiert wurden. Von einigen Proteinen wurden verschiedene potentielle Epitopbereiche präsentiert, sodass jede dieser Regionen des Proteins auf lineare Epitope untersucht wurde. Wenn mehrere Polypeptide eines Proteins isoliert wurden, wurden die Polypeptide, die einen überlappenden Bereich abdeckten, wie ein zusammengesetztes Polypeptid behandelt. Die Proteinregionen wurden *in silico* in überlappende

15-mere mit einem Versatz von vier AS unterteilt. Die Peptidsynthese und das Immobilisieren der Peptide an die Microarray Glasoberfläche wurden von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH durchgeführt. Jede Peptidsequenz wurde drei Mal pro Subarray aufgebracht. Jeder Microarray Glasträger war unterteilt in drei identische Subarrays, sodass ein Proplate 3-well Kammersystem (Grace) verwendet wurde, um eine gleichzeitige Inkubation mit verschiedenen Antikörpern auf einem Glasträger zu ermöglichen. Als Positivkontrolle wurde ein Kaninchen Antikörper immobilisiert, der von dem im Assay verwendeten Sekundärantikörper detektiert wurde. Des Weiteren wurden humanes IgG und Maus IgG immobilisiert, um Kreuzreaktionen des Sekundärantikörpers auszuschließen. Als Negativkontrolle wurde MBP (Basisches Myelinprotein) eingesetzt. Das Epitopmapping wurde mit den gleichen drei polyklonalen Antikörpern gegen *N. gonorrhoeae* durchgeführt wie der ELISA in Abschnitt 2.9.5. Alle identifizierten Polypeptide wurden auf ihre Epitopregionen untersucht. Die Arrays wurden zunächst mit 1,5 mL 2 % MPBS-T für 3 h geblockt, daraufhin fünf Mal mit 1 mL PBS-T gewaschen und mit den entsprechenden Antikörpern (je 1 mL 1:1000 in 2 % MPBS-T verdünnt) über Nacht bei 4 °C bei 35 rpm inkubiert. Danach wurden die Arrays erneut fünf Mal mit PBS-T gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (1 mL 1:1000 in 2 % MPBS-T verdünnt) 2 h im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurden die Arrays erneut fünf Mal mit PBS-T gewaschen, das Kammersystem entfernt, die Glasträger unter fließendem dH₂O gewaschen, mit Stickstoff getrocknet und an einem Axon GenePix 4300A Laser Scanner (Molecular Devices) analysiert. Die Scaneinstellungen in der Software waren wie folgt: 532 nm laser, PMT gain 400, 40 % laser power, lines to average 1, 10 µm resolution und standard green emission filter bei 532 nm. Jeweils ein Subarray wurde als Negativkontrolle nur mit PBS und Sekundärantikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers auszuschließen. Zusätzlich wurden weitere Arrays mit anti-*N. meningitidis* und anti-*E. coli* Antikörpern inkubiert, um die Spezifität der Peptid-Antikörperbindung mit einem nah verwandten Pathogen und dem Modellorganismus für Bakterien zu vergleichen.

2.10.2 Microarray Analyse

Für die Microarray Analyse wurde der Median der Fluoreszenzintensität jedes einzelnen Spots verwendet. Von jedem Spot wurde der jeweilige lokale Hintergrund subtrahiert (median F532 – B532) und dieser Wert für die weitere Auswertung verwendet. Die Hintergrund-bereinigten Signale der Kontrollkammer (nur PBS anstelle eines Primärantikörpers) wurden von den entsprechenden Signalen der mit Antikörper inkubierten Spots abgezogen, wodurch die relative Fluoreszenzintensität (RFI) für jeden einzelnen Spot erhalten wurde. Von jedem Peptid wurden die RFI-Werte der drei Antikörper gegen *N. gonorrhoeae* verwendet und ein Box-Whisker-Plot (n = 9) aller Peptide eines Proteins erstellt.

2.10.3 Alaninscan mittels Microarray

Peptide, bei denen eine Epitopregion identifiziert wurde, wurden mittels Alaninscan weiter charakterisiert. Jede Aminosäure wurde schrittweise gegen Alanin ausgetauscht. Falls ein Alaninrest in der Ursprungssequenz vorlag, wurde er durch Glycin ersetzt. Die modifizierten Peptide wurden von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH synthetisiert und auf Glasträgern immobilisiert. Das

2 Material und Methoden

Array Design wurde so gewählt, dass eine parallele Inkubation mit verschiedenen Antikörpern mit dem Proplate 3-well Kammersystem möglich war (vgl. 2.10.1). Die Inkubationen, das Scannen und die Analyse erfolgte wie beim Epitopmapping in Abschnitt 2.10.1.

2.10.4 Epitopmapping und Alaninscan mittels Cellulose Membran

Für NGO0170 wurde das Epitopmapping mit einer Cellulose Membran anstelle eines Microarrays durchgeführt. Dieses Protein wurde bei einem späteren Panning isoliert, als die anderen Peptide bereits mittels Microarray untersucht wurden. Identisch zur Microarraymethode wurde das Phagen-präsentierte Polypeptid in 15-mere mit einem Versatz von vier AS synthetisiert. Die Peptidsynthese wurde von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH direkt auf der Membran durchgeführt. Die Membran wurde zunächst 5 min in Methanol inkubiert, um die Präzipitation von hydrophoben Peptiden während des anschließenden Waschschriffs (3 x 3 min) mit TBS-T (50 mM Tris, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 8,0 eingestellt mit HCl, 0,05 % Tween 20) zu verhindern. Die gewaschene Membran wurde dann über Nacht bei 4 °C oder 2 h bei RT mit 2 % Milchpulver in TBS-T (2 % MTBS-T) bei RT und 40 rpm auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Daraufhin wurde die Membran mit 4 µg mL⁻¹ polyklonalem Kaninchenantikörper (1:1000, Ausgangskonzentration 4 mg mL⁻¹ verdünnt) für 3 h unter Schütteln inkubiert und wiederum mit TBS-T (3 x 5 min) gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 1 µg mL⁻¹ polyklonalen Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG konjugiert an HRP (1:2000 verdünnt, vgl. Abschnitt 2.8.4) für 2 h auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Der gebundene Antikörper wurde durch Inkubation mit Substratlösung (0,1 % 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in TBS pH 7,3, 100 mM Imidazol, 0,01 % H₂O₂) detektiert. Die Membran wurde mit Regenerationspuffer I bzw. Regenerationspuffer IIA und IIB nach Anleitung des Herstellers regeneriert.

Die ermittelte Epitopregion wurde mittels Alaninscan weiter charakterisiert. Auch der Alaninscan für das Epitop von NGO0170 wurde mittels Cellulose Membran durchgeführt. Das weitere Vorgehen entsprach dem Epitopmapping mittels Cellulose Membran.

2.11 Überprüfung der Transkription der hypothetischen Proteine

2.11.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte als biologisches Triplikat aus jeweils einer 10 mL *N. gonorrhoeae* Kultur. Die RNA wurde mit dem RNAProtect Bacteria Reagent und dem RNeasy Mini Kit nach Anleitung des Herstellers isoliert. Zusätzlich zum DNA Verdau auf der Säule wurde ein zweiter DNA Verdau nach der Aufreinigung durchgeführt. Hierfür wurden 10 µg RNA mit 10x Reaction Buffer, 10 U DNaseI und Nuklease-freies Wasser in einem Reaktionsvolumen von 100 µL für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die DNase wurde daraufhin nach Zugabe von 10 µL 50 mM EDTA durch Inkubation für 10 min bei 65 °C inaktiviert und die RNA mit dem RNeasy Mini Kit nach dem RNA Clean-Up Protokoll aufgereinigt.

2.11.2 Analyse der RNA Integrität

Die RNA Integrität wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer und dem RNA 6000 Pico Kit nach Anleitung des Herstellers überprüft. Die RNA integrity number (RIN) wird in einem Bereich von 0–10 angegeben, wobei hohe Werte auf eine intakte RNA hinweisen und niedrige Werte für einen zunehmenden Abbau der RNA sprechen [151].

2.11.3 Reverse Transkription in Erststrang-cDNA

Die Erststrang-cDNA wurde mittels RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit nach Anleitung des Herstellers mit *random hexamer* Primern erzeugt. Gleichzeitig wurden Negativkontrollen ohne Reverse Transkriptase (RT-) und ohne Templat (*no template control*, NTC) mitgeführt.

2.11.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Die Expression bzw. die Transkription von NGO1634 und den davon abgeleiteten Proteinen für die Antikörperselektion (siehe 2.12.1) wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) überprüft. Hierfür wurden die Primer in Anhang II verwendet. Für NGO1634 wurden drei verschiedene cDNA Ansätze als biologisches Triplikat verwendet. Die Transkription der anderen Gene wurde nur mittels einer cDNA kontrolliert. Als Negativkontrollen wurde eine Kontrolle ohne cDNA Templat und die beiden Negativkontrollen der Reversen Transkription (RT- und NTC) eingesetzt. Ein Abschnitt des Haushaltsgens NGO0715 (Glukose-6-Phosphat 1-Dehydrogenase) wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Reaktion wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x), with separate ROX vial (K0251, Thermo Fisher Scientific Inc.) und der Erststrang-cDNA angesetzt. Die qPCR wurde mit folgendem Programm am Roche LightCycler 2.0 durchgeführt: 95 °C 10 min, 40 Zyklen: 95 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s mit einer einzelnen Datenerfassung nach dem Elongationsschritt. Zusätzlich wurde eine Schmelzkurve mit konstanter Fluoreszenzerfassung aufgenommen, die bei 95 °C begann und mit 0,05 °C s⁻¹ bis auf 45 °C abnahm.

2.12 Selektion rekombinanter scFv-Antikörper mittels Phage Display

2.12.1 Auswahl der Proteine und Peptidsequenzen als Antigene

Ausgehend von NGO1634 wurden funktionelle Partner und verwandte Proteine ausgewählt und zunächst bioinformatisch untersucht. Hierbei wurden die Lokalisation der Proteine, 3-dimensionale Strukturen, Hydrophobizitätsplots und Membrantopologien vorhergesagt und multiple Alignments durchgeführt und analysiert (siehe 2.15), um geeignete Kandidaten für die Selektion rekombinanter scFv-Antikörper auszuwählen. Je nach BLAST Ergebnis wurden anhand von multiplen Alignments entweder Vollängenproteine (NGO1430 und NGO1847) oder spezifische Oligopeptide als Antigene ausgewählt. Von jedem Peptid wurden zwei Varianten mit unterschiedlichen Linkern (N-terminal Biotin-PEG mit einem (β-Alanin)₅- bzw. GGSGGS-Peptid) von der Firma PEPS4LS, Heidelberg, produziert. Die verwendeten Oligopeptide sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.3: Verwendete Peptide für die Antikörperisolierung.

Jedes Peptid wurde in zweifacher Ausführung mit unterschiedlichem Linker synthetisiert. Die Linker unterschieden sich in ihrer Zwischensequenz. Das erste Peptid hatte einen GGSGGS-Linker mit N-terminaler Biotinylierung über einen PEG-Linker, während der zweite Linker aus fünf β -Alaninen bestand und ebenfalls über einen PEG Linker biotinyliert war.

Locus Tag	Peptidbezeichnung	Peptidsequenz
NGO0553	Pep0553	eBio-GGSGGS-PNNTQQKELNTIVV eBio-(bA) 5 -PNNTQQKELNTIVV
NGO0555	Pep0555	eBio-GGSGGS-SRTLSPHWRINSHAG eBio-(bA) 5 -SRTLSPHWRINSHAG
NGO1092	Pep1092	eBio-GGSGGS-RAADKAAYALEKAQEKH eBio-(bA) 5 -RAADKAAYALEKAQEKH
NGO1094	Pep1094	eBio-GGSGGS-ARKGAEERERAAAQAH eBio-(bA) 5 -ARKGAEERERAAAQAH
NGO1626	Pep1626	eBio-GGSGGS-GGHESVPNGWATWVS eBio-(bA) 5 -GGHESVPNGWATWVS
NGO1634	Pep1634	eBio-GGSGGS-KAARQAKMWEEPLDY eBio-(bA) 5 -KAARQAKMWEEPLDY

2.12.2 Produktion und Aufreinigung der Proteine

Zunächst wurden die kodierenden Gene der ausgewählten Proteine mit entsprechenden Primern (siehe Anhang II) amplifiziert. Das weitere Vorgehen entsprach der Amplifikation und Klonierung wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben. Die Expression und Aufreinigung der Proteine und die Validierung der Proteinexpression anhand des Molekulargewichts mittels SDS-PAGE sind in den Abschnitten 2.9.2 und 2.9.4 beschrieben.

2.12.3 Panning mit HAL9/10 Bibliotheken

Das Panning für die Selektion von scFv-Antikörperfragmenten unterschied sich je nachdem ob das Antigen als Protein oder Peptid vorlag. Für Proteinantigene wurden pro Antigen zwei Vertiefungen mit je 2 μ g der Antigene (NGO1430 und NGO1847) in 150 μ L 1x PBS direkt an die Oberfläche einer Maxisorp MTP durch Inkubation über Nacht bei 4 °C gebunden. Parallel wurde je eine Vertiefung pro Panning mit 350 μ L Panningblock (1 % (w/v) BSA, 1 % (w/v) Milchpulver in PBS-T) geblockt. Am nächsten Tag wurden die Vertiefungen mit Antigen drei Mal mit PBS-T gewaschen und danach mit 2 % MPBS-T für 1 h geblockt. Gleichzeitig wurden 100 μ L der human scFv antibody library 10 (HAL10) und 10 μ L der HAL9 scFv-Bibliothek mit 90 μ L Panningblock für 1 h in der über Nacht mit Panningblock inkubierten Vertiefung vorinkubiert [152]. Die Vertiefungen mit Antigen wurden drei Mal mit PBS-T gewaschen und die vorinkubierten Phagenbibliotheken in die Vertiefungen mit Antigen überführt und für 2 h bei RT inkubiert. Schwach oder nicht gebundene Phagen wurden durch stringentes Waschen mit PBS-T (10 x Anzahl der Panningrunde, vgl. Abschnitt 2.8.1) entfernt. Bindende Phagen wurden daraufhin durch Trypsinierung mit 150 μ L Trypsin (10 μ g mL⁻¹) für 30 min bei 37 °C eluiert. 150 μ L der eluierten scFv-Phagen wurden daraufhin zu 150 μ L *E. coli* TG1 (Wachstum einer Vorkultur 50 mL 2x YT bis OD₆₀₀ 0,5) in eine Polypropylen Deepwell MTP überführt und 30 min bei 37 °C ohne Schütteln und weitere 30 min bei 650 rpm inkubiert. Nach der Infektion wurden 1000 μ L 2x YT und 150 μ L 10x GA hinzugegeben und die Bakterien 1 h bei 37 °C und 550 rpm inkubiert. Danach erfolgte die Infektion mit dem Helferphagen M13K07 (1x10¹⁰ Phagen) und eine Inkubation von 30 min bei 37 °C ohne Schütteln und weitere 30 min bei 37 °C und 650 rpm. Um die

inhibierend wirkende Glukose aus dem Ansatz zu entfernen, wurden die infizierten Bakterien für 10 min bei 3250x g pelletiert und der komplette Überstand verworfen. Daraufhin wurden 950 µL 2x YT-AK hinzugefügt und über Nacht bei 30 °C und 650 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien 10 min bei 3250x g abzentrifugiert und der Überstand mit den produzierten Phagen in eine neue MTP überführt und 75 µL für die nächste Panningrunde eingesetzt. Die dritte Panningrunde wurde nur bis zur Trypsinierung durchgeführt. 10 µL der eluierten Phagen wurden für die Titerbestimmung verwendet. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) mit PBS angelegt und daraufhin jeweils 10 µL jeder Verdünnung mit 50 µL *E. coli* XL1 Blue MRF' (Wachstum bis OD₆₀₀ 0,5–0,6) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die gesamten 60 µL wurden dann auf 2x YT-GA Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Das Panning für Peptidantigene wurde bis auf ein paar Änderungen wie das Panning für Proteinantigene durchgeführt. Alle Peptide waren biotinyliert und jedes Peptid wurde mit zwei verschiedenen Linkern synthetisiert: Mit einem beta-Alanin₅ (bA)₅ und einem GGSGGS-Linker. Die Peptide wurden nicht direkt auf der MTP Oberfläche immobilisiert. Zuvor wurden 200 ng Streptavidin in 150 µL PBS pro Vertiefung für 1 h inkubiert und immobilisiert. Daraufhin wurden die Vertiefungen für 1 h mit 2 % (w/v) BSA in PBS geblockt und anschließend 2 µg der biotinylierten Antigene mit dem (bA)₅-Linker in 150 µL PBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Bei der Vorbereitung der scFv-Bibliotheken wurde zusätzlich noch mit 5 µL Streptavidin (1 mg mL⁻¹) vorinkubiert, entsprechend wurden nur 85 µL Panning Block eingesetzt. Des Weiteren wurden die Peptide mit verschiedenen Linkern alternierend in den Panningrunden eingesetzt, d. h. in der ersten Runde der (bA)₅-Linker, in der zweiten Runde der GGSGGS-Linker usw.

2.12.4 Produktion löslicher, monoklonaler scFv-Antikörper für das Screening

Die Vertiefungen einer PP-MTP wurden mit 150 µL 2x YT-GA gefüllt und 92 Antikörperklone von der Titerplatte nach der letzten Panningrunde gepickt. Zwei Vertiefungen (H9 und H12) wurden mit einem Klon, der scFv-Antikörper gegen Streptavidin exprimiert, als Positivkontrolle angeimpft (Klon SH1173_D8, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Saskia Helmsing, TU Braunschweig). Weitere zwei Vertiefungen (H3 und H6) wurden als Negativkontrollen nicht angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 800 rpm. Am nächsten Tag wurde die Platte als Masterplatte mit 20 % Glycerin versetzt und bei –80 °C gelagert. Zuvor wurde eine neue PP-MTP mit 180 µL 2x YT-GA befüllt und jede Vertiefung mit 10 µL der entsprechenden Vertiefung aus der Masterplatte angeimpft. Daraufhin erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 37 °C und 800 rpm. Die Bakterien wurden für 10 min bei 3250x g pelletiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurden die Pellets in 190 µL gepuffertem 2x YT-SA mit 50 µM IPTG aufgenommen und über Nacht bei 30 °C und 800 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien 10 min bei 3250x g pelletiert und der Überstand in eine neue MTP überführt.

2.12.5 Screening löslicher scFv-Antikörper mittels ELISA

Der Screening-ELISA unterschied sich je nach Antigen in der Art der Immobilisierung und der Blockinglösung. Die Vertiefungen H9 und H12 wurden immer mit Streptavidin beschichtet. Für Peptide wurden zunächst 200 ng Streptavidin in PBS über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Als

2 Material und Methoden

Negativkontrolle wurde jeweils eine weitere Platte mit Streptavidin beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten drei Mal mit H₂O_T (dH₂O mit 0,05 % Tween20) im ELISA-Washer gewaschen. Anschließend wurden die Vertiefungen der Kontrollplatte mit 2 % BSA in PBS-T (0,1 % Tween20) über Nacht bei 4 °C geblockt. Die Peptidplatten wurden in der gleichen Blockinglösung für 5 h bei RT geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit H₂O_T wurden 200 ng Peptid in 100 µL PBS zu den Vertiefungen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Für Proteine wurde ähnlich verfahren. Die Beschichtung unterschied sich in folgenden Punkten: 200 ng der Proteine in PBS wurden direkt über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Als Kontrolle wurde eine Platte mit 200 ng BSA pro Vertiefung beschichtet. Die Proteinplatten und deren Kontrollplatten wurden mit 2 % MPBS-T über Nacht bei 4 °C geblockt; nur H9 und H12 wurden anstelle von 2 % MPBS-T mit 2 % BSA in PBS-T geblockt, um eine mögliche Anlagerung von Milchpulvermolekülen an die Streptavidinmoleküle zu verhindern.

Alle Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper wurden in den entsprechenden Blockinglösungen durchgeführt. Am nächsten Tag wurden alle Platten drei Mal mit 0,05 % H₂O_T gewaschen und danach jeweils mit 40 µL der produzierten scFv mit 60 µL Blockinglösung für 1,5 h bei RT inkubiert. Die Vertiefungen H9 und H12 jeder Platte wurden mit 40 µL eines Streptavidinbindenden scFv (siehe 2.12.4) mit 60 µL Blockinglösung inkubiert. Die Vertiefungen H3 und H6 wurden während des scFv-Inkubationsschritts weiter mit Blockinglösung inkubiert. Daraufhin wurden der Überstand entfernt, die Vertiefungen drei Mal gewaschen und jede Vertiefung mit 100 µL anti-myc-Tag Antikörper (1:50 verdünnt) für 1,5 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde jede Vertiefung mit 100 µL anti-Maus IgG (Fc-spezifisch) HRP (1:20000 verdünnt) inkubiert. Danach wurden die Vertiefungen drei Mal gewaschen und 100 µL Substratlösung (TMB) zu jeder Vertiefung gegeben und bis zu einer ausreichenden Blaufärbung (ca. 10–15 min) unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µL 1 N H₂SO₄ abgestoppt und die Absorption bei 450 nm am Mikrotiterplattenphotometer gemessen. Die scFv-Fragmente, die eine zehnfach höhere Intensität als die Negativkontrollen zeigten, wurden erneut in einem multiplen Mikrotiteransatz produziert und für den Titrations-ELISA eingesetzt.

2.12.6 Titrations-ELISA

Für den Titrations-ELISA wurden zunächst die Antigene in einer Corning® certified high binding Mikrotiterplatte immobilisiert. Zur Veranschaulichung ist das im folgenden Abschnitt beschriebene Vorgehen in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt. Je nach Antigen wurden entweder 12 Vertiefungen mit 200 ng des Proteins in 100 µL 100 mM NaHCO₃ pH 9,6 direkt oder für Peptide 24 Vertiefungen zunächst mit 200 ng Streptavidin in 100 µL PBS immobilisiert. Des Weiteren wurden für jedes Proteinantigen 12 Vertiefungen mit BSA als Kontrolle und für Peptidantigene 12 Vertiefungen nur mit Streptavidin beschichtet. Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert und am nächsten Tag drei Mal mit 0,05 % PBS-T gewaschen. Die mit Proteinantigen beschichteten Platten wurden mit 2 % MPBS-T über Nacht bei 4 °C geblockt. Mit Streptavidin beschichtete Platten wurden mit 2 % BSA in 0,1 % PBS-T für 2 h bei RT geblockt und daraufhin 200 ng der einzelnen Peptide in 100 µL PBS in den jeweiligen Vertiefungen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Je Peptidantigen wurden 12 Vertiefungen mit dem (bA)₅-Linker und 12 Vertiefungen mit dem GGSGGS-Linker beschichtet. Die

Kontrollvertiefungen wurden nicht mit Peptiden inkubiert und weiter über Nacht bei 4 °C geblockt. Am nächsten Tag wurden die Platten drei Mal mit 0,05 % PBS-T gewaschen und 200 µL der löslichen scFv im Überstand in die erste Vertiefung der Titrations-ELISA Platte überführt. In die weiteren Vertiefungen wurden zuvor 100 µL 2 % BSA in 0,1 % PBS-T (für Peptidantigene) bzw. 2 % MPBS-T (für Proteinantigene) vorgelegt. Die scFv wurden nun bis zu einer Verdünnung von 1:2048 jeweils 1:2 verdünnt. Ausgehend von den 200 µL in der ersten Vertiefung wurden immer 100 µL aus der vorherigen Vertiefung in die nächste Vertiefung überführt. Aus der letzten Vertiefung wurden 100 µL entnommen und verworfen. Die scFv-Verdünnungsreihe wurde für 1,5 h bei RT inkubiert. Daraufhin wurden alle Vertiefungen mit 100 µL anti-myc-Tag Antikörper (9E10, 1:50 verdünnt) in der entsprechenden Blockinglösung für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Platten drei Mal mit 0,05 % PBS-T gewaschen und mit 100 µL anti-Maus IgG HRP Konjugat (1:1000 verdünnt) in entsprechender Blockinglösung für 45 min bei RT inkubiert und erneut gewaschen. Die Messung der Antikörper-Antigen-Bindung wurde durch Inkubation mit TMB bis zu einer ausreichenden Blaufärbung für ungefähr 10–15 min und anschließendem Abstoppen der Reaktion mit 1 N H₂SO₄ ermöglicht. Die Absorption der abgestoppten Reaktion wurde am Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gemessen. Die scFv-Antikörper, die eine sigmoidale Titrationskurve und bei den Kontrollen kein Signal aufwiesen, wurden für die Expression in eukaryotischen Zellen als scFv-Fc-Fusionsantikörper umklontiert.

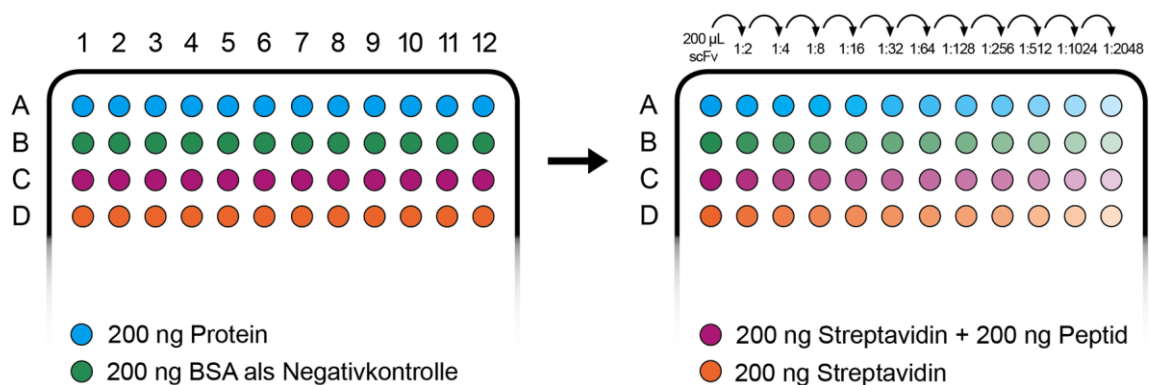


Abbildung 2.1: Pipettierschema des Titrations-ELISAs.

Links) 12 Vertiefungen wurden mit 200 ng Protein bzw. 200 ng Streptavidin + 200 ng Peptid beschichtet. Als Kontrollen wurden BSA für Proteinantigene und Streptavidin für Peptidantigene immobilisiert. **Rechts)** Nach Wasch- und Blockschritten wurden 200 µL scFv-Überstand in die Vertiefungen der ersten Spalte hinzugegeben und jeweils 1:2 in der nächsten Vertiefung mit Blockinglösung verdünnt. In der letzten Vertiefung wurde dadurch ausgehend von der ersten Vertiefung eine Verdünnung von 1:2048 erreicht.

2.13 Expression der Antikörper als scFv-Fc-Fusionsproteine

2.13.1 Umklonierung der scFv-Antikörper Gene und Produktion in HEK293-6E Zellen

Die Umklonierung der scFv-Antikörper Gene in den pHAL30 Vektor und die Produktion der scFv-Fc-Antikörper in HEK293-6E wurde von Saskia Helmsing an der TU Braunschweig durchgeführt.

2.13.2 SDS-PAGE und Western Blot

Mittels SDS-PAGE und Western Blot wurde überprüft, ob die exprimierten und aufgereinigten scFv-Fc-Antikörper unspezifisch an das Zelllysat der Expressionszelllinie und spezifisch an die jeweiligen

2 Material und Methoden

Antigene binden. Hierfür wurden zunächst 12%ige Polyacrylamidgele hergestellt (vgl. 2.9.4) und die Proteine bei 200 V ca. 55 min nach ihrer Größe aufgetrennt. Jedes Protein und die Zellysate wurden bei 56 °C und 95 °C pro getestetem Antikörper vorinkubiert. Zur Größenbestimmung wurde der Proteinmarker Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards (Bio-Rad, 1610373) aufgetragen. Der Western Blot wurde mit PVDF Membranen mit einer Porengröße von 0,2 µm durchgeführt. Die Membran wurde zunächst mit 96 % Ethanol aktiviert und die Proteine mittels Bio-Rad Trans-Blot Turbo auf die Membran übertragen. Da zwei Gele parallel geblottet wurden, kamen folgende Einstellungen zum Einsatz: 0,8 A, 20 V, 30 min. Nach dem Blotten wurden die Membranen in 2 % MPBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Primärantikörper wurden 10 µg der produzierten und aufgereinigten scFv-Fc-Fusionsproteine in 10 mL 2 % MPBS verwendet und die Membranen für 2 h bei RT auf einem Wippschüttler inkubiert. Daraufhin wurde der Überstand dekantiert und die Membranen zwei Mal mit 10 mL 1x PBS für 5 min gewaschen. Als Sekundärantikörper wurden 10 mL eines Ziegenantikörpers gegen humanes IgG (Fc-spezifisch) gekoppelt an AP (1:20000) verwendet und die Membranen 1,5 h bei RT auf einem Wippschüttler inkubiert. Danach wurden die Membranen zwei Mal gewaschen und 5 min mit 10 mL Substratpuffer präinkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit den Substraten NBT und BCIP in Substratpuffer für 20 min ohne Schwenken. Abschließend wurden die Membranen fünf Mal mit H₂O gewaschen und in Papiertüchern über Nacht im Dunkeln getrocknet.

2.14 Charakterisierung der Antikörper

2.14.1 Titrations-ELISA der scFv-Fc (human)-Fusionsantikörper

Die Titrations-ELISAs mit den Fusionsantikörpern (scFv-Fc) wurden, wie in Absatz 2.12.6 beschrieben, mit folgenden Änderungen durchgeführt. Es wurden die gleichen Verdünnungsreagenzien, Blocking- und Waschlösungen wie in Absatz 2.12.6 verwendet. Zwischen jedem Inkubationsschritt wurden die Platten drei Mal gewaschen. Jeweils 12 Vertiefungen wurden zunächst mit Protein bzw. Streptavidin für die Peptidantigene (200 ng in 100 µL PBS) beschichtet und über Nacht bei 4 °C bzw. für 1 h bei RT inkubiert. Die Streptavidin beschichteten Vertiefungen wurden nach der 1-stündigen Inkubation drei Mal gewaschen und über Nacht bei 4 °C geblockt. Am nächsten Tag wurden die Platten gewaschen und mit den Peptidantigenen (200 ng in 100 µL) mit den (bA)₅-Linkern 1 h bei RT inkubiert. Parallel wurden die Proteinplatten 1 h geblockt. 1000 ng (\cong 47,17 µM) der exprimierten scFv-Fc-Antikörper wurden in die Vertiefungen der ersten Spalte pipettiert. In die weiteren Vertiefungen wurden zuvor 100 µL 2 % BSA in 0,1 % PBS-T (für Peptidantigene) bzw. 2 % MPBS-T (für Proteinantigene) vorgelegt. Ausgehend von den Vertiefungen der ersten Spalte wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe der scFv-Fc-Fusionsantikörper erstellt, gefolgt von einer Inkubation von 1,5 h bei RT. Die gebundenen scFv-Fc-Antikörper wurden mit einem Ziegenantikörper gegen humanes IgG (Fc-spezifisch) gekoppelt an HRP (1:70000) für 1 h bei RT inkubiert. Die weitere Vorgehensweise ist in Absatz 2.12.6 beschrieben. EC50 Werte wurden berechnet, indem eine lineare Regressionsgerade an den annähernd linearen Abschnitt der sigmoidalen Kurve angelegt wurde. Der halbe Wert aus der Differenz von Maximum zu Minimum wurde daraufhin in die nach x umgestellte Regressionsgleichung gesetzt. Dadurch wurde die Konzentration erhalten, bei der der halbmaximale Effekt beobachtet werden kann.

2.14.2 Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten mittels SPR

Für die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten bzw. der Affinität der rekombinanten Antikörper wurde die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) verwendet. SPR ist eine in der Bioanalytik gängige Methode, um die Bindung eines Analyten an einen oberflächengebundenen Liganden in Echtzeit und markierungsfrei nachzuweisen. Die Signalausgabe der SPR erfolgt in Resonanzeinheiten (RU), die über die Detektion von oberflächennahen Änderungen des Brechungsindex gemessen werden. Alle SPR Messungen wurden an einem Biacore T200 bei RT durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurde HBSP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,4) als Laufpuffer verwendet und ein Fluss von $10 \mu\text{L min}^{-1}$ angelegt. Die Immobilisierung der gewünschten Liganden erfolgte an kommerziell erhältliche, funktionelle Chips (G-COOH-sp, 1-03-04-004, Ssens und NiHC 1000M, SC NiHC1000M, Xantec).

Für die Kopplung der biotinylierten Peptide wurden G-COOH-sp Chips verwendet. Diese wurden zuerst mit 50 mM NaOH und zwei Mal mit 50 mM HCl für jeweils 30 s konditioniert und diese Schritte ein weiteres Mal wiederholt. Dann wurde die Oberfläche mit EDC/NHS (400 mM und 100 mM in H_2O) für 80 s aktiviert und anschließend mit $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Neutravidin in 10 mM Acetatpuffer pH 5,5 oder 20 mM Acetatpuffer pH 5,2 für 60 s–120 s inkubiert. Daraufhin wurde der Chip mittels 1 M Ethanolamin pH 8,5 für 420 s inaktiviert. Zunächst wurde der Chip dann mit Regenerierungspuffer I (10 mM Glycin-HCl pH 2,5) für 2 x 30 s gewaschen. Die biotinylierten Peptide wurden auf $1 \mu\text{M}$ in Laufpuffer verdünnt und 120 s injiziert. Um Verschleppungen zu vermeiden, wurde nach 120 s Inkubationsphase für 120 s mit HBSP gewaschen. Um Neutravidin-Antikörper-Bindungen zu verhindern, wurden die freien Neutravidinmoleküle mit $9,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Biotin in Laufpuffer für 120 s gesättigt. Die rekombinanten Antikörper wurden dann ansteigend in Konzentrationen von 0,93 nM–1000 nM für 120 s injiziert. Die Regenerierung erfolgte mit Regenerierungspuffer I bis die RU ihren Ausgangswert erreicht hatten.

Für die Kopplung von Vollängenproteinen mit fusioniertem His-Tag wurde ein NiHC 1000M Chip verwendet, dessen Oberfläche mit einem Polycarboxalhydrogelmultilayer mit Poly-NTA überzogen ist. Zunächst wurde der Chip mit HBSPE (HBSP Puffer 350 mM EDTA, pH 8,3) für 300 s und mit HBSPB (HBSP Puffer mit 300 mM NaCl und 50 μM EDTA) für 60 s gewaschen. Daraufhin folgte die Kopplung des Nickels (1 mM NiSO_4 in HBSPB) an NTA durch Injektion für 120 s. Die Proteine lagen denaturiert in 8 M Harnstoff vor, sodass die Harnstoffkonzentration so reduziert werden musste, dass einerseits das jeweilige Protein noch löslich und andererseits die Messung nicht beeinträchtigt wurde. Dafür wurden die Proteinlösungen auf 3 M Harnstoff eingestellt und der Verdünnungspuffer zur Injektion mit Harnstoff versetzt (HBSPU: HBSP mit 3 M Harnstoff, 50 mM EDTA). Die Proteinkonzentration wurde auf 100 nM eingestellt und die Proteine 120 s lang injiziert. Daraufhin folgten drei Waschschrte mit HBSPB je 60 s. Die rekombinanten Antikörper wurden in ansteigenden Konzentrationen von 0,8 nM–500 nM für jeweils 120 s injiziert. Die Regenerierung erfolgte durch Injektion von Regenerierungspuffer II (PBS Puffer, 100 mM EDTA, 8 M Harnstoff, pH 7,4) für 2 x 120 s und anschließendem Waschschrte mit HBSPB. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Biacore T200 Evaluation Software.

2.14.3 ELISA mit Zelllysate und Zellen

Eine *N. gonorrhoeae* Zellkultur (50 mL) wurde wie in Abschnitt 2.6.1 kultiviert. Parallel wurde *E. coli* TOP10F' Zelllysate hergestellt. Die Lysate wurden entsprechend Abschnitt 2.5 mit 40 mL der jeweiligen Kultur hergestellt. Das Bindungsverhalten der rekombinanten Antikörper wurde nach den Bindungsstudien mit ihren Antigenen auch mit den jeweiligen Volllängenproteinen (soweit vorhanden), Zelllysate und kompletten Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zelllysate mit einer Konzentration von 50 µg/mL eingesetzt. Die Zellen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,2 mit PBS Puffer verdünnt. Diese wurden dann direkt immobilisiert und in einem zweiten Ansatz durch einen immobilisierten, monoklonalen Antikörper gekoppelt. Von den Proteinen wurde 1 µg Protein in 100 µL NaHCO₃ Puffer direkt immobilisiert. Je 200 ng der Peptide in Blockingpuffer wurden an zuvor immobilisierte 200 ng Streptavidin (in PBS) gekoppelt. Nach dem jeweils ersten Immobilisierungsschritt an die Oberfläche der Mikrotiterplatte wurden die Bindungsstellen geblockt. Weitere Inkubationsschritte wurden in Blockingpuffer durchgeführt. Die Detektion der relativen Bindungsstärke erfolgte mit TMB als Substrat und 1 N H₂SO₄ zum Abstoppen der Farbreaktion. Die Absorption wurde bei 450 nm am FluoStar Omega Plattenreader gemessen.

2.15 Bioinformatische Analyse

Alle Primer wurden manuell erstellt und danach mit dem Onlineprogramm PCR Primer Stats der Sequence Manipulation Suite überprüft [153]. Primer für die qPCR wurden mit dem Onlineprogramm GeneScript Real-Time PCR (TaqMan) Primer Design erstellt. Sequenzierte Inserts wurden mit BLAST identifiziert [154]. Die erhaltenen Sequenzierungsdaten wurden in Geneious R6 (Version 6.1.8) importiert und dort durch Alignments und Annotation analysiert und graphisch dargestellt. Die Lokalisation der Proteine wurde mittels PSORTb v3.0.2 [155] bzw. PSORT [156] und mögliche Signalpeptide mit SignalP 4.1 [157] vorhergesagt. Wenn eine Vorhersage mit PSORTb nicht möglich war, wurde die erste Version von PSORT zur Vorhersage der Lokalisation verwendet. Hydrophobizitätsplots wurden für die Vorhersage der Peptidzugänglichkeit im Protein für die rekombinanten Antikörper mit dem Onlineprogramm ProtScale [158] des ExpASY Bioinformatics Resource Portals verwendet. Bei Membranproteinen wurde die Membrantopologie mittels TMPred [159] und TMHMM Server v. 2.0 ermittelt [160]. 3-dimensionale Strukturen wurden mit I-TASSER [161–163] berechnet und die Modelle mit Chimera 1.10.2 [164] visualisiert und wichtige Regionen (Epitope, kritische Aminosäurereste) annotiert. Die Qualität aller 3-D Modelle wurde zusätzlich mit QMEAN überprüft [165]. Die Immune Epitope Database (www.iedb.org) wurde verwendet, um gefundene Epitope mit bekannten Epitopen von *Neisseria* zu vergleichen. Die String Datenbank (string-db.org) wurde verwendet um die funktionellen Partner und verwandten Proteine von NGO1634 auszuwählen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel und OriginPro 2015G. Die CDR Regionen der isolierten scFv-Antikörperfragmente wurden mit dem Fab Analysis Tool VBASE2 bestimmt [166].

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion genomischer DNA Bibliotheken

Die genomische DNA von *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* und *B. burgdorferi* wurde zunächst mittels Restriktionsverdau und von allen vier Erregern mittels Ultraschall fragmentiert und jeweils mindestens als Doppelansatz in den pHORF3 Vektor kloniert. Die Fragmente der beiden Ansätze unterschieden sich stark in ihrer durchschnittlichen Größe. Während die Fragmente nach dem Restriktionsverdau Größen in einem Bereich zwischen 100 bp und 1500 bp hatten, lagen die Fragmente nach der Ultraschallbehandlung zwischen 200 bp und 500 bp. Übersichtshalber sind in Abbildung 3.1 zwei Agarosegelbilder dargestellt: Das linke Bild zeigt die vier Fragmentenspuren des Restriktionsverdaus genomischer DNA von *N. gonorrhoeae* nach 10 min, 15 min, 20 min und 25 min, das rechte Bild die genomische DNA von *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* und *B. burgdorferi* nach der Ultraschallfragmentierung. Letztendlich wurden nur die Bibliotheken der Ultraschallfragmentierung für die weiteren Versuche verwendet, da bei diesen eine zufällige Fragmentierung der DNA erfolgt, während beim Restriktionsverdau weitestgehend ein vorgegebenes Fragmentierungsmuster zu erwarten ist.

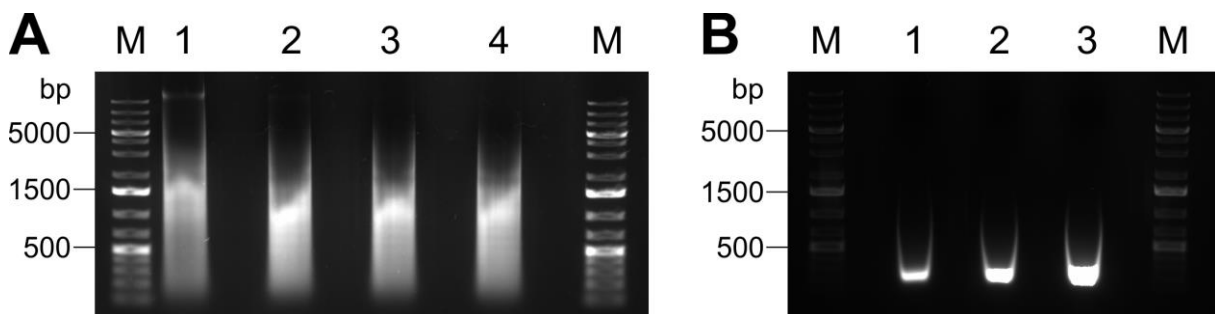


Abbildung 3.1: Vergleich der Größenverteilung und Restriktionsmuster nach dem Verdau von genomischer DNA (gDNA) mit Restriktionsenzymen und nach der Ultraschallfragmentierung.

A) Verdau der genomischen DNA von *N. gonorrhoeae* mit vier verschiedenen Inkubationszeiten. M GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 1 Verdau nach 10 min, 2 Verdau nach 15 min, 3 Verdau nach 20 min, 4 Verdau nach 25 min. **B)** Ultraschallfragmentierte genomische DNA verschiedener Erreger. M GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 1 gDNA von *N. gonorrhoeae*, 2 gDNA von *N. meningitidis*, 3 gDNA von *B. burgdorferi*.

Einzelkolonien der Bibliotheken wurden nach der Transformation mittels Sequenzierung und PCR überprüft. Exemplarisch ist in Abbildung 3.2 die elektrophoretische Auftrennung von Einzelklonen der erstellten *N. gonorrhoeae* Bibliotheken mit dem QIAxcel Advanced System abgebildet. Einzelklone wurden von drei Bibliotheken gepickt und mit dem Leervektor in der jeweils drittletzten Spur verglichen. Zum Vergleich sind im oberen Teil der Abbildung die Ergebnisse der restriktionsverdauten Bibliothek (A) und im unteren Teil die Ergebnisse der Ultraschall-fragmentierten Bibliothek von *N. gonorrhoeae* (B) abgebildet. Die Klone des Restriktionsverdaus enthielten fast alle ein Insert zwischen 130–1350 bp. Die PCR auf die DNA von Klon 9 zeigte keine Bande. Die Klone der Ultraschall-fragmentierten Bibliothek enthielten bis auf Klon 23 alle ein Insert. Die Inserts waren mit einer Größe von 100–550 bp kleiner als die des Restriktionsverdaus. Klon 23 enthielt nur den leeren Vektor. Zusätzlich zur PCR wurden die Plasmide weiterer Klone sequenziert. Eine Übersicht der

3 Ergebnisse

konstruierten DNA-Bibliotheken mit Angabe der durchschnittlichen Fragmentgrößen und der Anzahl der individuellen Klone ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Ebenfalls angegeben ist die theoretisch benötigte Anzahl an Klonen, um das gesamte Genom mit 99,9%iger Wahrscheinlichkeit abzudecken. Bibliotheken mit einer Größe von $> 10^6$ cfu mL⁻¹ und einer Insertrate von über 80 % wurden für das eigentliche Phage Display weiter verwendet. Der Großteil der Bibliotheken erfüllte beide Voraussetzungen. Vereinzelt wurden Insertraten von unter 80 % erreicht. Diese Bibliotheken wurden nicht weiter verwendet. Allerdings waren auch bei Bibliotheken mit hohen Insertraten, wie erwartet, nur wenige Inserts im Leserahmen; beispielsweise für *N. gonorrhoeae* ein Klon von 21 sequenzierten Klonen, was 4,7 % entsprach.

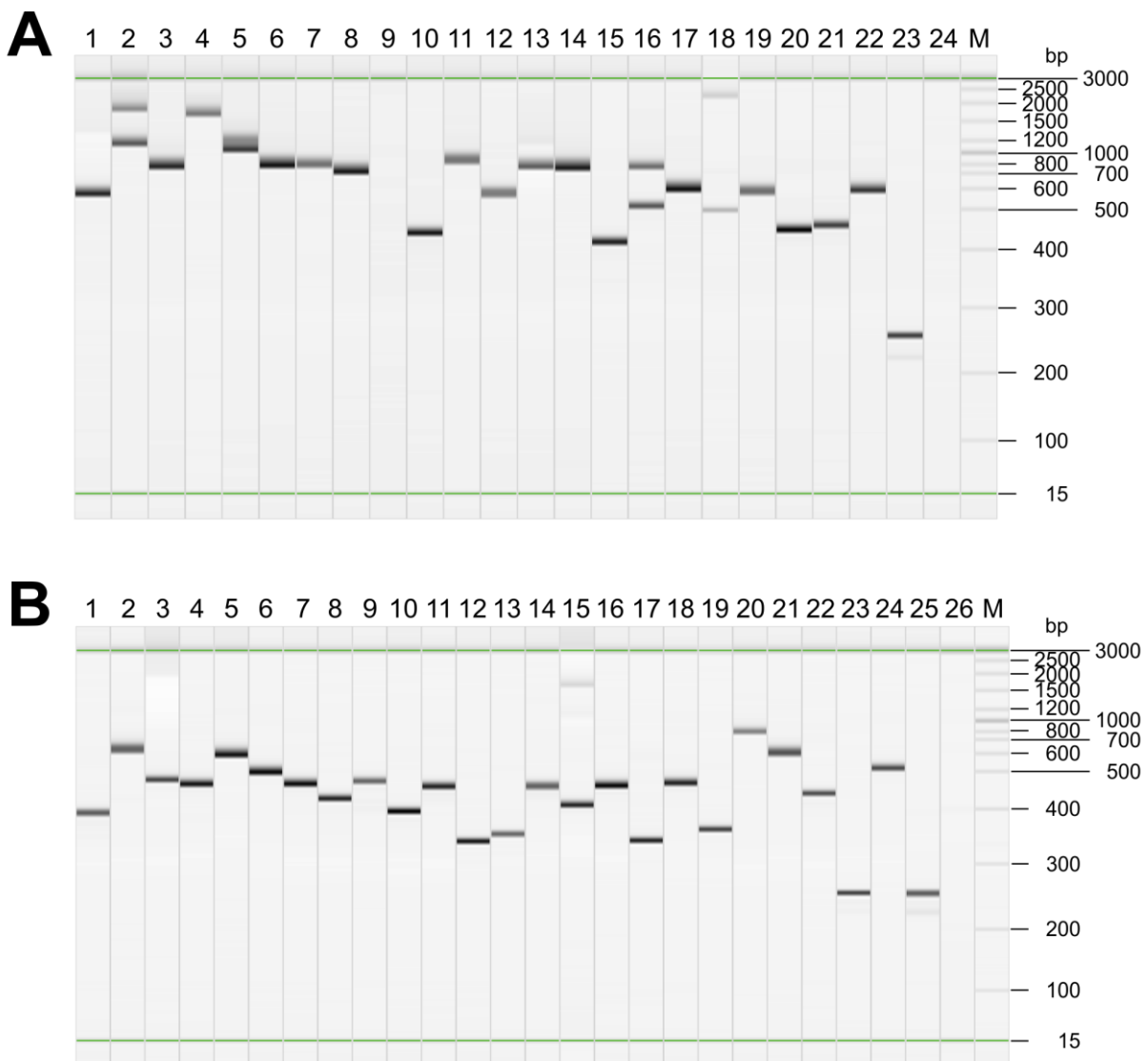


Abbildung 3.2: Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Fragmente von Einzelklonen der *N. gonorrhoeae* Bibliotheken.

A) PCR der Bibliothek der restriktionsverdauten genomischen DNA. Inserts von 22 Einzelklonen wurden amplifiziert (Spur 1–22) und mit dem Leervektor (Spur 23) verglichen. Spur 24 ist eine PCR-Kontrolle ohne Templat und M ist der Qiagen QX Size Marker 100 bp–2,5 kb. **B)** PCR der mit Ultraschall fragmentierten Bibliothek. Die Inserts von 24 Einzelklonen wurden amplifiziert und mit dem Leervektor in Spur 25 verglichen. Spur 26 ist eine PCR-Kontrolle ohne Templat und M der Qiagen QX Size Marker 100 bp–2,5 kb.

Tabelle 3.1: Übersicht der während dieser Arbeit konstruierten Bibliotheken mittels Restriktionsverdau und Ultraschallfragmentierung.

Mehrere Bibliotheken wurden für jedes Pathogen erstellt. Bibliotheken mit einer Größe von $> 10^6$ cfu mL⁻¹ und einer Insertrate von über 80 % wurden weiter verwendet. Der Großteil der Bibliotheken erfüllte beide Voraussetzungen. Teilweise wurden nur Insertraten von ca. 50 % erreicht. Für den Restriktionsverdau und die Ultraschallfragmentierung wurden über die jeweilige Genomgröße und die durchschnittliche Fragmentgröße die Anzahl der theoretisch benötigten Klone berechnet, sodass jedes Fragment mit einer 99,9%igen Wahrscheinlichkeit in der Bibliothek vorlag. Zusätzlich wurde für die restriktionsverdauten Bibliotheken ein theoretischer Verdau mit Geneious durchgeführt, der eine Berechnung der Anzahl und durchschnittlichen Länge der Fragmente ermöglichte. Allerdings wird dieses Fragmentmuster nur in einem idealen System auftreten. Da jedoch manche Schnittstellen nicht erkannt werden oder die DNA aufgrund der Aufreinigung möglicherweise bereits in Teilstücke fragmentiert ist, dienen diese beiden Werte nur als Schätzungen.

Erreger	Genomgröße inkl. Plasmide /bp	Anzahl Plasmide	Größe aller Plasmide /bp	durchschn. Fragmentgröße /bp	theor. benötigte Klone	durchschn. Bibliothekgröße /cfu mL ⁻¹	Anzahl der Fragmente nach theor. Verdau mit Geneious	berechnete theor. Fragmentlänge /bp
Restriktionsverdau								
<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090	2153922		629	23651	$5,4 \times 10^7$		6635	325
<i>N. meningitidis</i> MC58	2272360		482	32562	$4,7 \times 10^7$		7334	310
<i>B. burgdorferi</i> B31	1521208	21	610484	578	18176	$2,6 \times 10^7$	8244	185
<i>C. difficile</i> 630	4298133	1	7881	347	85559	$4,8 \times 10^7$	27381	157
Ultraschallfragmentierung								
<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090	2153922		218	68247	$1,1 \times 10^7$			
<i>N. meningitidis</i> MC58	2272360		277	56664	$2,2 \times 10^7$			
<i>B. burgdorferi</i> B31	1521208	21	610484	221	47544	$2,4 \times 10^6$		
<i>C. difficile</i> 630	4298133	1	7881	235	126338	$2,3 \times 10^7$		

3.2 Verpacken der Bibliotheken mit Hyperphage

Die Bibliotheken wurden mit Hyperphage verpackt, sodass sowohl das exprimierte Protein als auch seine genetische Information in einem Phagen präsentiert werden. Zudem hatte das Verpacken einen Anstieg der offenen Leserahmen (ORF) zur Folge. Während die ursprüngliche *E. coli* Bibliothek nur wenige Inserts mit richtigem ORF aufwies, wurde dieser Wert auf über 70 % bei den Phagen-verpackten Bibliotheken gesteigert. Für die Pannings wurden nur Phagen-verpackte Bibliotheken verwendet, die eine ORF Insertrate von $\geq 70\%$ aufwiesen, keine Stopcodons innerhalb des Inserts trugen und die ursprüngliche Bibliothek um mindestens ein hundertfaches abdeckten. Die verpackten Bibliotheken wurden wiederum mittels Sequenzierung und PCR überprüft. Tabelle 3.2 fasst die Ergebnisse dieser Bibliotheken in Bezug auf die durchschnittliche Fragmentgröße, Anzahl der individuellen Klone und Rate der ORF-Inserts zusammen.

Tabelle 3.2: Übersicht der Phagen-verpackten Bibliotheken.

Die durchschnittliche Bibliotheksgröße nach der Transformation ist in Tabelle 3.1 aufgeführt. Die durchschnittlichen Phagentiter deckten die Bibliotheksgrößen mindestens 100-fach ab. Die ORF Insertraten lagen im Bereich von 70 % oder höher.

Erreger	durchschn. Bibliotheksgröße nach Transformation /cfu mL ⁻¹	durchschn. Phagentiter /cfu mL ⁻¹	durchschn. Anzahl der ORF Inserts /%
Restriktionsverdau			
<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090	5,4x10 ⁷	7,8x10 ¹⁰	80
<i>N. meningitidis</i> MC58	4,7x10 ⁷	5,5x10 ¹⁰	70
<i>B. burgdorferi</i> B31	2,6x10 ⁷	3,8x10 ¹⁰	77
<i>C. difficile</i> 630	4,8x10 ⁷	1,5x10 ¹⁰	79
Ultraschallfragmentierung			
<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090	1,1x10 ⁷	3,2x10 ¹⁰	69
<i>N. meningitidis</i> MC58	2,2x10 ⁷	8,9x10 ⁹	67
<i>B. burgdorferi</i> B31	2,4x10 ⁶	8,5x10 ⁹	83
<i>C. difficile</i> 630	2,3x10 ⁷	1,1x10 ¹⁰	90

Exemplarisch ist in Abbildung 3.3 die elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte einer Phagen-verpackten Bibliothek von *N. gonorrhoeae* mit dem QIAxcel Advanced System gezeigt. Alle untersuchten Klone enthielten Inserts mit Größen zwischen 70 bp und 750 bp. Zusätzlich wurden weitere Klone sequenziert, um die Anzahl der ORF Inserts zu bestimmen.

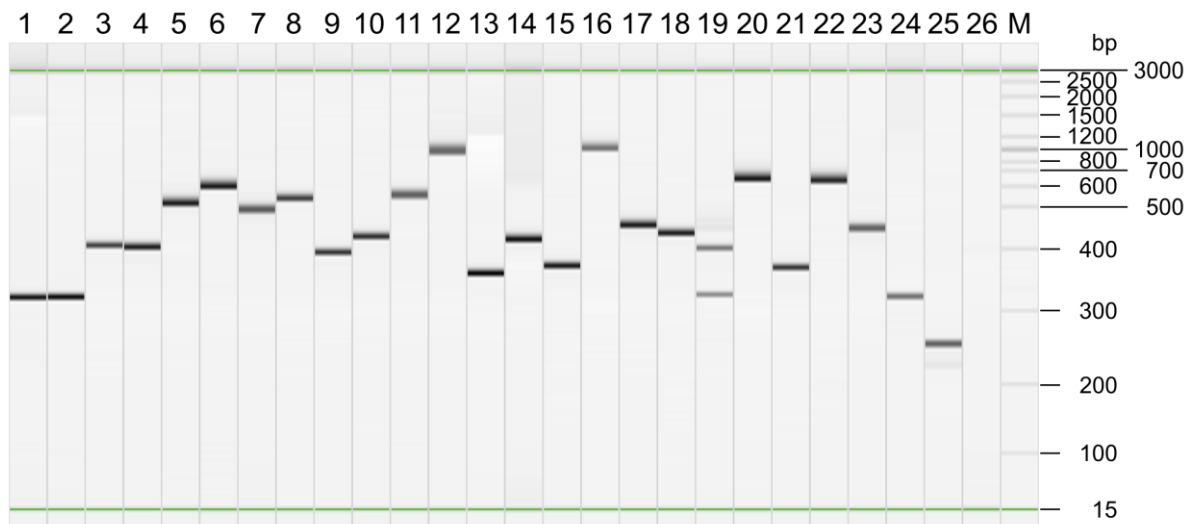


Abbildung 3.3: Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung der CPCR-Fragmente von Einzelklonen der mit Hyperphage verpackten *N. gonorrhoeae* Bibliotheken.

Die Inserts von 24 Einzelklonen (Spuren 1–24) wurden amplifiziert und mit dem Leervektor in Spur 25 verglichen. Spur 26 ist eine PCR-Kontrolle ohne Templat und M der Qiagen QX Size Marker 100 bp–2,5 kb.

3.3 Selektion immunogener Polypeptidphagen

3.3.1 Selektion immunogener Polypeptidphagen von *N. gonorrhoeae*

Insgesamt wurden 552 Polypeptid präsentierende Phagen nach unterschiedlicher Anzahl an Panningrunden (zwei bzw. drei) produziert und mittels ELISA analysiert. Der Durchschnittswert der Negativkontrollen wurde von allen Messwerten abgezogen und Klone mit einer Signalintensität über 0,3 wurden sequenziert. Exemplarisch für alle Screening-ELISAs ist in Abbildung 3.4 das Ergebnis eines solchen ELISAs für 92 Klone einer Bibliothek von *N. gonorrhoeae* dargestellt.

Durch BLAST Analyse der sequenzierten Klone wurden Polypeptide von 21 Proteinen identifiziert (Tabelle 3.3), die einen immunogenen Charakter hatten. Des Weiteren wurden bei vielen der identifizierten Proteine mehrere Polypeptide identifiziert, die unterschiedliche Größen besaßen und teilweise auch verschiedene Bereiche des Proteins abdeckten (siehe Anhang IV). Dies ist besonders für die Bestimmung von Epitopregionen interessant (siehe 3.6.1), da in diesen Bereichen des Proteins die Bindung eines Antikörpers stattfand. Von den identifizierten Proteinen waren 13 in der Literatur im Zusammenhang mit Immunogenizität oder Vakzinen beschrieben (die entsprechenden Publikationen sind in Tabelle 3.3 mit aufgeführt). Acht Polypeptide zeigten keine Homologie zu bekannten Immunogenen. Einer dieser Klone beinhaltete zwei Gene in seinem Insert, wobei die letzten 92 bp von NGO1657 und die ersten 131 bp von NGO1656 durch einen nicht kodierenden Abschnitt von 48 bp getrennt war. Die acht potentiellen immunogenen Proteine und diverse Kontrollproteine wurden als Vollängenproteine produziert (markiert mit einem Stern in Tabelle 3.3). Ebenfalls wurde NGO1500, eine Glutamatrancemase, bei einem der Pannings isoliert. Allerdings zeigte sie Signalintensitäten unterhalb der Ausschlussgrenze und wurde daher als Negativkontrolle für die Validierung der Immunogenizität der Vollängenproteine verwendet.

3 Ergebnisse

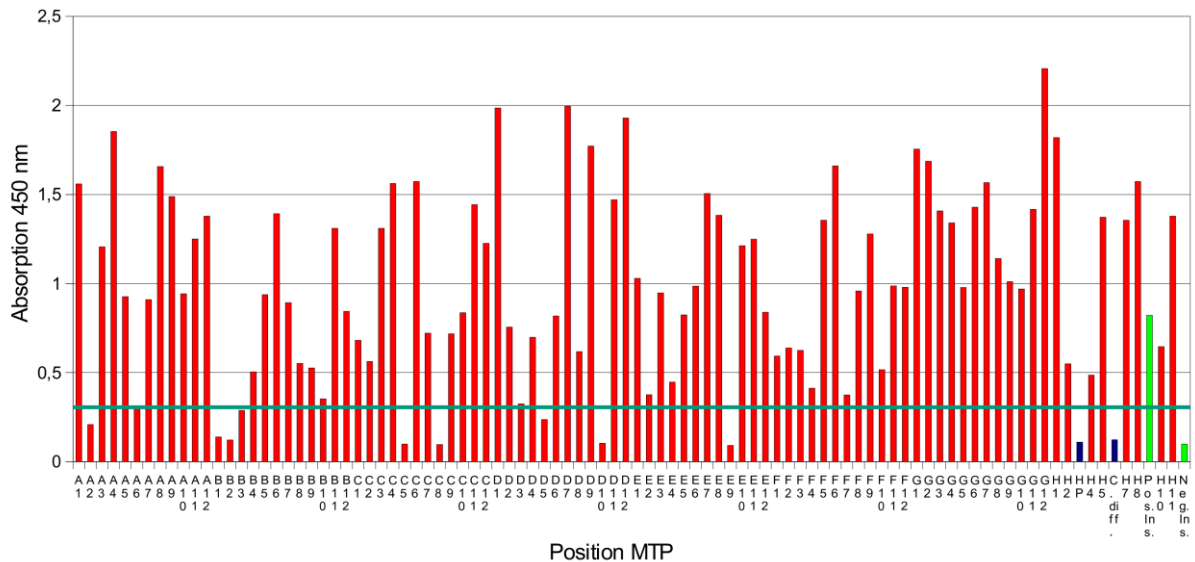


Abbildung 3.4: Auswertung eines Screening-ELISA mit 92 Einzelklonen einer *N. gonorrhoeae* Bibliothek.

92 monoklonale, Polypeptid präsentierende Phagen wurden produziert und die Polypeptide mittels Sandwich ELISA auf ihren immunogenen Charakter untersucht. Als Negativkontrollen kamen Hyperphage (H3), ein Polypeptid präsentierender Phage einer *C. difficile* Bibliothek (H6) und ein Insert aus einer vorherigen Screeningrunde (H12), das ein Signal unterhalb der Ausschlussgrenze zeigte, zum Einsatz. In H9 wurde ein Insert aus einer vorherigen Screeningrunde, das ein Signal über der Ausschlussgrenze aufwies. Die Ausschlussgrenze (grüne Linie bei 0,33 AU) für den Screening-ELISA wurde auf den dreifachen Wert des Durchschnitts der drei Negativkontrollen festgelegt. Alle Klone oberhalb der Ausschlussgrenze wurden sequenziert und bioinformatisch analysiert.

Tabelle 3.3: Überblick der durch Phage Display isolierten immunogenen Polypeptide von *N. gonorrhoeae* und deren entsprechenden, durch BLAST identifizierten Proteine.

Für einige Proteine wurden mehrere Polypeptidinserts gefunden, die teilweise auch unterschiedliche Bereiche des Proteins abdeckten. Die Anzahl der individuellen Inserts und der Insertgrößen sind aufgelistet. Die Proteine, deren Locus Tag mit einem Sternchen versehen sind, wurden als Volllängenproteine produziert, um ihre immunogene Eigenschaft als Volllängenprotein zu verifizieren.

<i>N. gonorrhoeae</i> Locus Tag Nummer	Proteinbezeichnung	Anzahl der isolierten Inserts	Insertgröße /bp	Molekulargewicht des Volllängenproteins /kDa	Homolog in <i>N. meningitidis</i>	vorhergesagte Lokalisation mittels PSORTb	Zuvor als Immunogen im <i>Neisseria</i> Genus oder in Vakzinen gefunden	Referenz
NGO0170*	ABC Transporter, ATP- bindendes Protein	1	121	28.12	NMB0588	Zytoplasmatische Membran	Nein	-
NGO0326*	RNA-bindendes Protein Hfq	1	109	10.78	NMB0748	Zytoplasma	Nein	-
NGO0451*	replikative DNA Helikase	1	76	52.18	NMB0885	Zytoplasma	Nein	-
NGO0564*	Dihydrolipoamid Acetyltransferase	1	310	54.69	NMB1342	Zytoplasma	Ja	[167]
NGO0584	50S ribosomales Protein L9	2	130/148	15.07	NMB1320	Zytoplasma	Ja	[168]
NGO0592	Trigger Faktor	3	115-208	48.37	NMB1313	Zytoplasma	Ja	[169]
NGO0642*	tRNA Pseudouridin Synthase B	1	262	33.39	NMB1374	Zytoplasma	Nein	-
NGO0777*	DNA-bindendes Protein Hu	1	100	9.38	NMB1230	Zytoplasma	Nein	-
NGO0916*	Dihydrolipoamid Succinyltransferase	1	272	41.69	NMB0956	Zytoplasma	Ja	[170]
NGO0983	Äußeres Membran Protein H.8	1	174	8.02	NMB1523	Äußere Membran	Ja	[171]
NGO1043*	Hypothetisches Protein	2	160/217	11.41	NMB1468	Periplasma	Ja	[172]
NGO1429	Molekulares Chaperon DnaK	10	67-325	68.86	NMB0554	Zytoplasma	Ja	[169,173]
NGO1577	Äußeres Membran Protein PIII	6	115-274	25.54	NMB0382	Äußere Membran	Ja	[169,174]
NGO1634*	Hypothetisches Protein, putatives Phagen-assoziiertes Protein	2	97/133	21.11	-	Zytoplasma	Nein	-
NGO1656*	Konserviertes hypothetisches Protein	1	271	31.53	NMB0345	Nicht eindeutig, nicht Zytoplasma	Ja	[169,175]

3 Ergebnisse

<i>N. gonorrhoeae</i> Locus Tag Nummer	Proteinbezeichnung	Anzahl der isolierten Inserts	Insertgröße /bp	Molekulargewicht des Volllängenproteins /kDa	Homolog in <i>N. meningitidis</i>	vorhergesagte Lokalisation mittels PSORTb	Zuvor als Immunogen im <i>Neisseria</i> Genus oder in Vakzinen gefunden	Referenz
NGO1657*	Stress-induziertes Morphogen Bola		Insert NGO1656		NIMB0344	Nicht eindeutig, nicht Zytoplasma	Nein	-
NGO1796*	Ribosom recycling Faktor	1	295	20.64	NIMB0187	Zytoplasma	Nein	-
NGO1852*	50S ribosomales Protein L7/L12	3	136-289	12.56	NIMB0131	Zytoplasmatische Membran/Periplasma	Ja	[173]
NGO2094	Chaperonin 10 kDa Untereinheit	5	103-196	10.29	NIMB1973	Zytoplasma	Nein, aber in anderen Bakterien	[176,177]
NGO2095	Chaperonin 60 kDa Untereinheit	11	67-301	57.35	NIMB1972	Zytoplasma	Ja	[169,173]
NGO2139	Methionin ABC Transporter Substrat-bindendes Protein	1	327	31.34	NIMB1946	Zytoplasmatische Membran	Ja	[178,179]

3.3.2 Selektion immunogener Polypeptidphagen von *N. meningitidis*

Für das Panning der *N. meningitidis* Bibliotheken wurden Pannings mit zwei und drei Panningrunden durchgeführt. Insgesamt wurden 276 Polypeptid präsentierende Phagen produziert und mittels ELISA analysiert. Mittels BLAST wurden 13 Polypeptide mit einem vermeintlich immunogenen Charakter identifiziert. Diese Immunogene sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Wie bereits unter Punkt 3.3.1 beschrieben, wurden auch bei der Selektion mit *N. meningitidis* Bibliotheken mehrere unterschiedliche Abschnitte eines Proteins als Inserts gefunden. Die Proteine waren größtenteils in der Literatur beschrieben. Die entsprechenden Literaturreferenzen sind in der Tabelle angegeben. Da die Immunogenität der gefundenen Proteine größtenteils beschrieben war, wurden diese nicht weiter als Vollängenproteine produziert. Die Ergebnisse zeigten aber die Möglichkeiten der Methode immunogene Proteine zu identifizieren. Die gefundenen Proteine konnten in *N. meningitidis* verifiziert werden.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.4: Überblick der durch Phage Display isolierten immunogenen Polypeptide von *N. meningitidis* und deren entsprechenden, durch BLAST identifizierten Proteine.
Die Anzahl der individuellen Inserts und der Insertgrößen sind aufgelistet:

<i>N. meningitidis</i> Locus Tag Nummer	Protein Bezeichnung	Anzahl der isolierten Inserts	Insertgröße /bp	Molekulargewicht des Vollängenproteins /kDa	Vorhergesagte Lokalisation mittels PSORTb	Zuvor als immunogen beschrieben	Referenz
NIMB0131	50S ribosomales Protein L7/L12	1	151	12,62	Zytoplasmatische Membran/ Periplasma	Ja	[173]
NIMB0294	Thiol:dissulfide Austausch Protein	4	196-343	25,42	Periplasma	Ja	[179]
NIMB0382	Äußeres Membranprotein Klasse 4	1	184	26,19	Äußere Membran	Ja	[173]
NIMB0460	Transferrin-bindendes Protein 2	1	94	77,42	Extrazellulär/Äußere Membran	Ja	[180]
NIMB0554	Chaperon Protein Dnak	1	358	68,79	Zytoplasma	Ja	[173]
NIMB0561	Protein GrpE	2	115/148	21,32	Zytoplasma	Nein	
NIMB1313	Trigger Faktor	5	127-344	48,33	Zytoplasma	Ja	[181]
NIMB1342	Dihydrolipoamid Acetyltransferase	1	266	55,22	Zytoplasma	Ja	[167]
NIMB1468	Uncharakterisiertes Protein	1	184	10,86	Periplasma	Ja	[172,179]
NIMB1483	Putatives Lipoprotein NlpD	2	211/238	42,88	Nicht eindeutig	Ja*	*
NIMB1523	Hypothetisches Protein	1	211	8,96	Nicht eindeutig, nicht Zytoplasma	Nein	
NIMB1533	Äußeres Membranprotein H.8	1	163	18,54	Äußere Membran	Ja	[179]
NIMB1946	Äußeres Membranlipoprotein	1	502	31,22	Zytoplasmatische Membran	Ja	[179]

* Homologe Proteine von *Yersinia pestis* als Virulenzfaktor [182] und *Bartonella bacilliformis* als immunogenes Lipoprotein [183]

3.3.3 Selektion immunogener Polypeptidphagen von *B. burgdorferi*

Für *B. burgdorferi* wurden 184 Polypeptid präsentierende Einzelphagen produziert und mittels ELISA analysiert. Sieben Polypeptide mit vermeintlich immunogenen Charakter wurden durch BLAST identifiziert (Tabelle 3.5). Größtenteils handelte es sich um Proteine auf der äußeren Membran oder Chaperone, deren immunogener Charakter jedoch bereits zuvor beschrieben worden war. Wie bei *N. meningitidis* konnten die immunogenen Proteine auch in *B. burgdorferi* verifiziert werden, wurden jedoch nicht als Vollängenproteine produziert und nicht weiter untersucht.

Tabelle 3.5: Überblick der durch Phage Display isolierten immunogenen Polypeptide von *B. burgdorferi* und deren entsprechenden, durch BLAST identifizierten Proteine.

Die Anzahl der individuellen Inserts und der Insertgrößen sind aufgelistet (vgl. Tabelle 3.3).

B. burgdorferi Locus Tag Nummer	Protein Bezeichnung	Anzahl der isolierten Inserts	Insert- größe /bp	Molekular- gewicht des Vollängen- proteins /kDa	Vorher- gesagte Lokalisation mittels PSORTb	Zuvor als Immunogen beschrieben	Referenz
BB_0147	Flagellares Filament p41	7	121–298	35,77	Periplasma	Ja	[143]
BB_0390	50S ribosomales Protein L7/L12	1	181	12,90	Zytoplasma	Nein	-
BB_0518	Chaperon Protein Dnak	1	283	69,23	Zytoplasma	Ja	[143]
BB_0649	60 kDa Chaperonin	1	91	58,95	Zytoplasma	Ja	[143]
BB_A15	Äußeres Oberflächen- protein A	2	286/490	29,37	Äußere Membran	Ja	[143]
BB_A16	Äußeres Oberflächen- protein B	1	325	31,73	Äußere Membran	Ja	[143]
BB_B19	Äußeres Oberflächen- protein C	1	199	22,34	Äußere Membran	Ja	[143]

3.3.4 Selektion immunogener Polypeptidphagen von *C. difficile*

Die Pannings der *C. difficile* Bibliotheken wurden mit humanen Seren durchgeführt, da aufgrund der hohen Toxinproduktion keine polyklonalen Antikörper in Tieren produziert werden können. Bereits die Titer der einzelnen Panningrunden stiegen nicht von Runde zu Runde an, sodass die Screenings in sehr schwachen Signalen resultierten. Es war daher nicht möglich Klone mit einem signifikanten Signal zu detektieren. Daher wurden keine immunogenen Proteine von *C. difficile* identifiziert.

3.4 Klonierung und Produktion der Vollängenproteine

Da nur für *N. gonorrhoeae* neue immunogene Proteine identifiziert wurden, werden im weiteren Verlauf nur noch die Ergebnisse für *N. gonorrhoeae* beschrieben. 15 Proteine wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert: Die acht potentiell immunogenen Proteine (vgl. Tabelle 3.3), NGO1500 und BB0069 aus *B. burgdorferi* als Negativkontrollen, NGO0564 und NGO0916 als Positivkontrollen und drei Proteine (NGO1043, NGO1656 und NGO1852), die in *N. meningitidis* als immunogen beschrieben sind und nach Vorhersage nicht im Cytoplasma lokalisiert sind. Proteine, die in vielen anderen

3 Ergebnisse

Bakterien als immunogen beschrieben waren und solche, die bereits in *N. meningitidis* ausgiebig untersucht waren, wurden nicht als Vollängenproteine produziert. Alle Gene wurden vollständig amplifiziert und erfolgreiche Klonierungen wurden mittels PCR und Sequenzierung nach der Transformation überprüft (Abbildung 3.5 A). Alle Proteine mit Ausnahme von NGO0916 konnten exprimiert werden und wurden mittels Affinitätschromatographie über einen fusionierten His-Tag aufgereinigt. Die Expression und Aufreinigung der Proteine wurden mittels denaturierender SDS-PAGE überprüft (Abbildung 3.5 B und C). NGO1043 wurde mit einer pelB Signalsequenz exprimiert, da die Proteinausbeute mit der ursprünglichen Signalsequenz sehr gering war. Aufgrund der Signalsequenz sind in der entsprechenden Spur zwei Banden – eine auf Höhe von 11 kDa, die andere bei 13 kDa – zu sehen. Die pelB Signalsequenz besteht aus 21 Aminosäuren und hat somit eine berechnete Größe von 2 kDa, sodass das Protein mit abgespaltener Signalsequenz auf Höhe der niedrigeren Bande, das Protein mit Signalsequenz auf Höhe der oberen Bande verläuft. Die Produktion von NGO1656 resultierte ebenfalls in einer Doppelbande auf Höhe von ca. 30 kDa. Die Lokalisation von NGO1656 wurde als „unknown, non-cytoplasmic“ vorhergesagt und die Analyse der Sequenz ergab eine Signalsequenz von 20 Aminosäuren am N-Terminus, die wie bei NGO1043 dazu führt, dass zwei Banden mit nahezu gleichem Molekulargewicht auf dem Gel sichtbar sind.

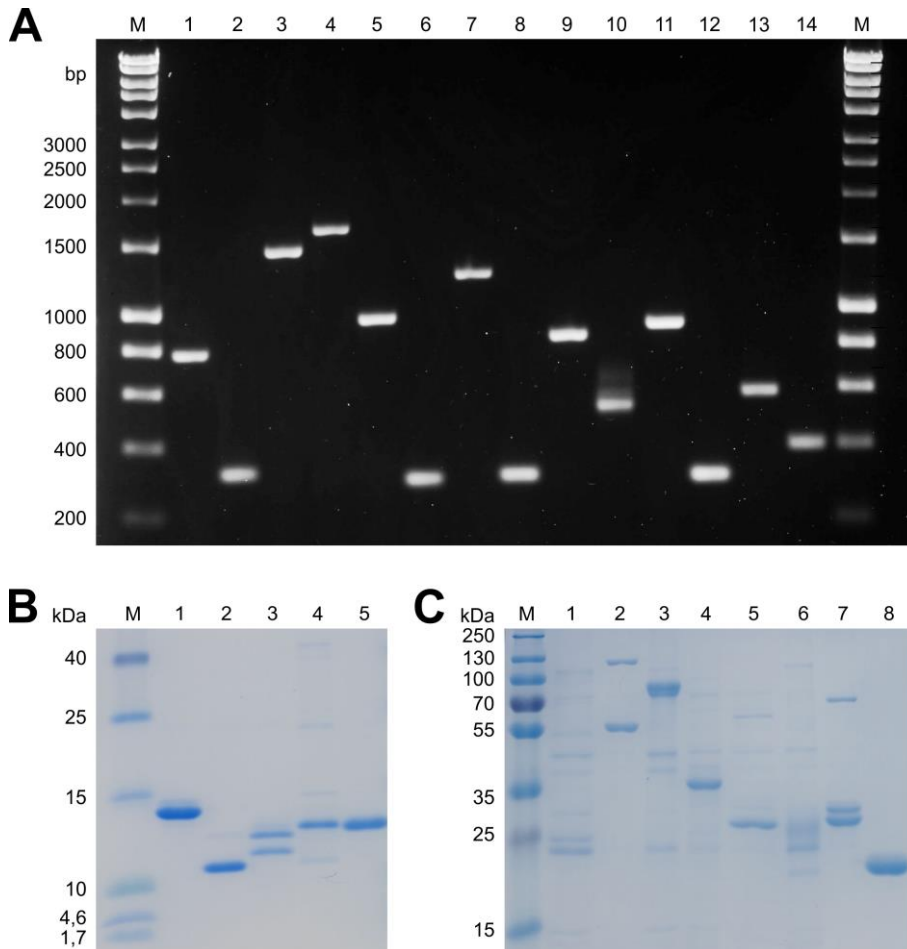


Abbildung 3.5: Amplifikation der Volllängengene und Expression und Aufreinigung der Volllängenproteine.

A) 1,5%iges Agarosegel: M Hyperladder I (Bio-33025-26, bioline), 1 NGO0170, 2 NGO0326, 3 NGO0451, 4 NGO0564 (Positivkontrolle), 5 NGO0642, 6 NGO0777, 7 NGO0916, 8 NGO1043, 9 NGO1500 (Negativkontrolle), 10 NGO1634, 11 NGO1656, 12 NGO1657, 13 NGO1796, 14 NGO1852. **B)** 15%igen SDS-PAGE Gel: 0,5 µg des jeweiligen Proteins wurden aufgetragen. M Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder (26628, Thermo Scientific), 1 NGO0326, 2 NGO0777, 3 NGO1043, 4 NGO1657, 5 NGO1852. **C)** 10%iges SDS-PAGE Gel: M PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (26619, Thermo Scientific), 1 NGO0170, 2 NGO0451, 3 NGO0564 (Positivkontrolle), 4 NGO0642, 5 NGO1500 (Negativkontrolle), 6 NGO1634, 7 NGO1656, 8 NGO1796.

3.5 Validierung des immunogenen Charakters der Volllängenproteine

Der immunogene Charakter der exprimierten Volllängenproteine wurde mittels ELISA (Abbildung 3.6) mit drei kommerziell erhältlichen polyklonalen Antikörpern aus verschiedenen Immunisierungen validiert. NGO00326, NGO0777, NGO1043, NGO1656 und NGO1852 wiesen Signalintensitäten von 2,5 AU auf Höhe der Positivkontrolle auf, die der zehnfachen Signalintensität der Negativkontrolle entsprach. Die Proteine NGO0170, NGO0642, NGO1634 und NGO1796 zeigten Signalintensitäten oberhalb der Ausschlussgrenze zwischen 0,75 und 1,0 AU. Zwei der neu identifizierten, potentiell immunogenen Proteine lagen unterhalb der Ausschlussgrenze. Zum einen NGO1657, dessen Signal bei 0,38 AU ungefähr auf Höhe der Negativkontrolle NGO1500 verlief und NGO0451, das die niedrigste Signalintensität im gesamten Assay mit 0,07 AU aufwies. NGO1500 und BB0069 wurden als Negativkontrollen mitgeführt. NGO1500 wurde nach drei Panningrunden bei der Selektion immunogener Polypeptidphagen (vgl. 3.3.1) isoliert, zeigte dort aber Signalintensitäten unterhalb der Ausschlussgrenze und wurde daher als Volllängenprotein exprimiert und als Negativkontrolle mitgeführt. Die Ausschlussgrenze wurde jedoch mit einer zweiten Negativkontrolle berechnet.

3 Ergebnisse

Hierfür wurde ein Protein (BB0069) von *B. burgdorferi* unter gleichen Bedingungen in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt. Die Ausschlussgrenze wurde als vierfache Signalintensität von BB0069 (0,13 AU) festgelegt, da das Signal von BB0069 nur den Hintergrund durch *E. coli* Proteine und die Bindung unspezifischer Antikörper darstellt, während Antikörper gegen NGO1500 in dem polyklonalen Antikörpergemisch detektierbar sein könnten. Von allen Signalen wurde ein Nullwert in Form einer Pufferkontrolle abgezogen.

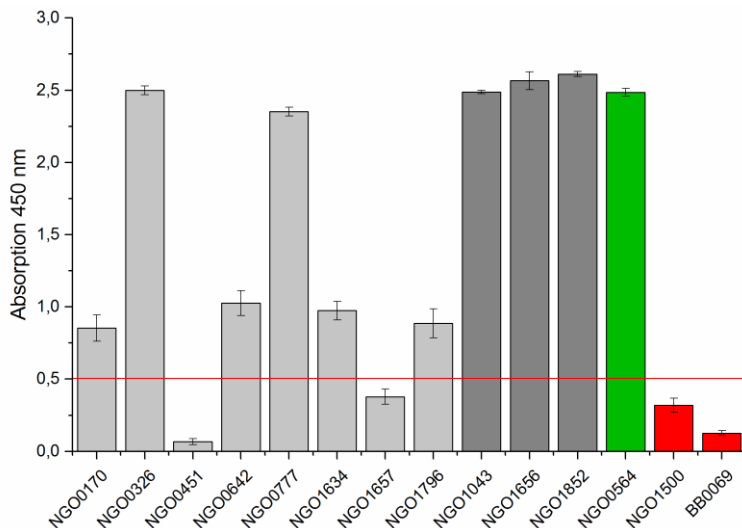


Abbildung 3.6: ELISA Ergebnis der exprimierten und aufgereinigten Volllängenproteine zur Verifizierung ihres immunogenen Charakters (n = 3).

Drei polyklonale Kaninchen Antikörper gegen *N. gonorrhoeae* von verschiedenen Immunisierungen wurden verwendet. Zwei Proteine wurden als Negativkontrollen eingesetzt (rot markierte Säulen): Protein BB0069 von *B. burgdorferi*, das unter gleichen Bedingungen exprimiert und aufgereinigt wurde, wie die zu untersuchenden potentiellen Immunogene; und NGO1500, eine Glutamyltrypsinase, die bei den Pannings als schwach bindendes Polypeptid isoliert wurde. Die Ausschlussgrenze (rote Linie) wurde auf den Wert des vierfachen Signals der Negativkontrolle BB0069 gesetzt. Die Signalintensität einer Pufferkontrolle wurde von jeder Probe abgezogen. NGO0564 wurde als Positivkontrolle verwendet (grüne Säule). Untersuchte Proteine, deren immunogener Charakter zuvor nicht in *N. gonorrhoeae* oder verwandten Bakterien beschrieben war, sind hellgrau eingefärbt. Proteine, deren immunogener Charakter in dem nah verwandten Pathogen *N. meningitidis* beschrieben waren, sind als dunkelgraue Säulen dargestellt. Diese Proteine zeigten alle Signalintensitäten um 2,5 AU, die auf Höhe der Positivkontrolle verliefen. Des Weiteren wiesen NGO0326 und NGO0777 als neue immunogene Proteine ebenfalls Signalintensitäten in diesem Bereich auf. NGO0170, NGO0642, NGO1634 und NGO1796 lagen mit Signalintensitäten zwischen 0,85 und 1,03 AU deutlich über der Ausschlussgrenze von 0,52 AU.

3.6 Charakterisierung der Antigenregionen

3.6.1 Bestimmung der Epitopregionen durch Epitopmapping

Die Phagen-präsentierten Bereiche der Volllängenproteine wurden *in silico* in überlappende 15-mere zerlegt. Für zehn der 21 untersuchten Proteine wurden lineare Epitope eindeutig identifiziert. Bei weiteren fünf Proteinen wurden zunächst lineare Epitope mit einem (BP1050, Lot# 2B04511, Acris Antibodies GmbH) der drei polyklonalen Antikörper nachgewiesen. Für NGO0983 zeigten fast alle Peptide deutliche Signale, da das Protein aus einer repetitiven Sequenz aufgebaut ist (AAEAP). Ein Alaninscan wurde daher nicht durchgeführt. Die Fluoreszenzintensitäten der vier anderen Proteine (NGO0916, NGO1043, NGO1634 und NGO1796) bei der Inkubation mit drei polyklonalen Antikörpern lagen auf dem Niveau der Negativkontrolle. Trotzdem wurden auch mit den vermeintlichen Epitopen

dieser vier Proteine Alaninscans durchgeführt. Bei fünf Proteinen wurden keine linearen Epitope identifiziert. Dies galt für NGO0451, NGO0584, NGO0642, NGO1657 und NGO2139.

Zu jedem Epitopmapping mit den drei polyklonalen Antikörpern gegen *N. gonorrhoeae* wurden jeweils Kontrollen mit Antikörpern gegen *N. meningitidis* und *E. coli* mitgeführt. Jedes identifizierte Epitop wurde daher auf seine Spezifität mit diesen beiden polyklonalen Antikörpern untersucht. Die Box-Whisker-Plots, die nicht in diesem Abschnitt dargestellt sind, sind in Anhang V aufgeführt.

Beim Epitopmapping des Polypeptides von NGO0326 wurden zwei aufeinanderfolgende Peptide mit einer erhöhten Signalintensität ermittelt. Peptide 5 (QHENKPQAAPASTLV) und 6 (KPQAAPASTLVQVET) wiesen hierbei eine mittlere Signalintensität von ungefähr 3500 AU und 1500 AU auf. Der linke Bereich von Abbildung 3.7 zeigt die Ergebnisse des Epitopmappings von NGO0326 dargestellt als Box-Whisker-Plot. Die Peptidsequenz von Peptid 5 wurde als Epitopregion identifiziert und mittels Alaninscan weiter untersucht. Bei den Spezifitätskontrollen mit Antikörpern gegen *E. coli* und *N. meningitidis* wurde nur für die Negativkontrolle mit dem Antikörper gegen *E. coli* ein minimaler Signalanstieg detektiert.

Der untersuchte Bereich von NGO0564 umfasste 24 überlappende Peptide, in dem zwei individuelle lineare Epitope identifiziert wurden (Abbildung 3.7 rechts). Die Peptide 1 (IVEIKVPDIGGHENV) und 2 (KVPDIGGHENVDIIA) und Peptide 23 (AEAQPAPAAAGGATV) und 24 (EAQPAPAAAGGATVQ) zeigten Signalanstiege. Peptid 1 und Peptid 23 wurden als Epitope identifiziert und weiter mittels Alaninscan charakterisiert. Die Kontrollen mit unspezifischen Antikörpern zeigten kein Signal für die vier untersuchten Epitopeptide.

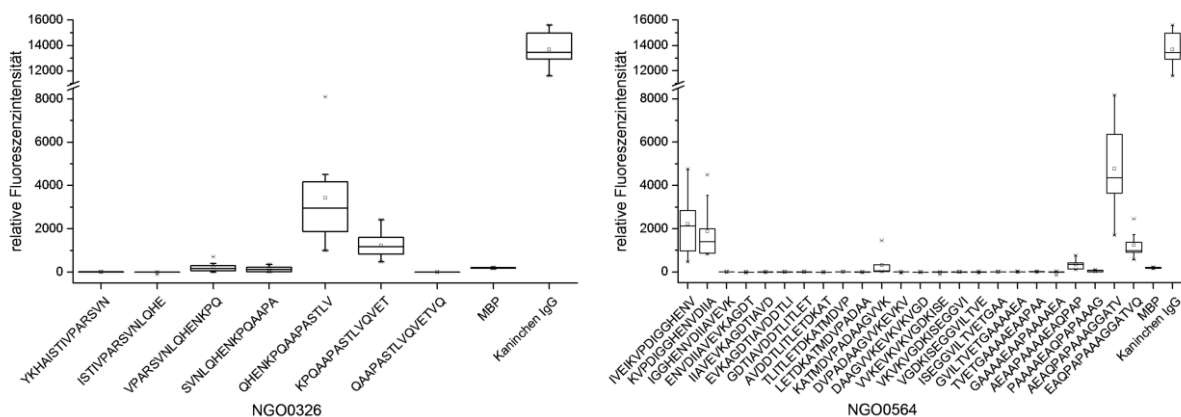


Abbildung 3.7: Epitopmappings der durch Phage Display isolierten Polypeptide von NGO0326 und NGO0564 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der sieben bzw. 24 überlappenden Peptide, die die Phagen-präsentierten Bereiche der Proteine NGO0326 (links) und NGO0564 (rechts) umfassen. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG, als Negativkontrolle MBP immobilisiert. Die einzelnen Boxen repräsentieren 50 % der erhaltenen Werte. Der Median der Werte ist als durchgehende Linie, der Mittelwert als kleines Quadrat dargestellt. Die Whisker schließen 98 % der Daten ein. Ausreißer sind mit einem kleinen Kreuz einzeln markiert. **Links**) Peptide 5 (QHENKPQAAPASTLV) und 6 (KPQAAPASTLVQVET) zeigen eine deutlich höhere Signalintensität als der Rest der Peptide und die Negativkontrolle. **Rechts**) Peptide 1 (IVEIKVPDIGGHENV) und 2 (KVPDIGGHENVDIIA) und Peptide 23 (AEAQPAPAAAGGATV) und 24 (EAQPAPAAAGGATVQ) zeigen eine deutlich höhere Signalintensität als der Rest der Peptide und die Negativkontrolle.

Für NGO0592 wurden zwei Polypeptide während der Phagenscreenings identifiziert und diese getrennt voneinander auf ihre Epitope untersucht (Abbildung 3.8). Das erste Polypeptid, unterteilt in sieben überlappende Peptide, wies kein lineares Epitop auf. Bei dem zweiten Polypeptid, das in zehn überlappende Peptide unterteilt war, waren deutliche Signalunterschiede bei drei

3 Ergebnisse

aufeinanderfolgenden Peptiden (2–4 SEPTLPEVDADFAKA, LPEVDADFAKALGIA, DADFAKALGIADGDV) im Vergleich zu den restlichen Peptiden und der Negativkontrolle feststellbar.

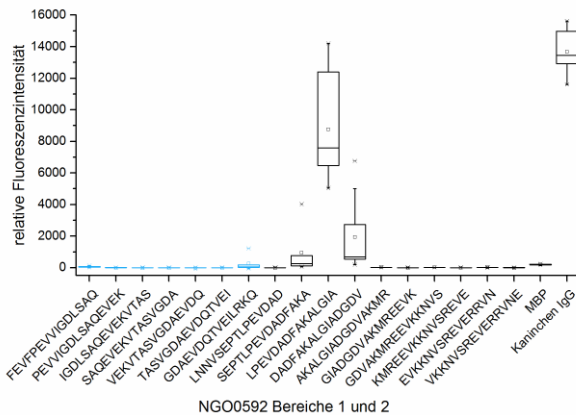


Abbildung 3.8: Epitopkartierung der durch Phage Display isolierten Polypeptide von NGO0592 (n = 9).

Der Box-Whisker-Plot zeigt die relativen Fluoreszenzintensitäten der überlappenden Peptide der zwei Phagen-präsentierten Bereiche. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG, als Negativkontrolle MBP immobilisiert. Die einzelnen Boxen repräsentieren 50 % der erhaltenen Werte. Der Median der Werte ist als durchgehende Linie, der Mittelwert als kleines Quadrat dargestellt. Die Whisker schließen 98 % der Daten ein. Ausreißer sind mit einem kleinen Kreuz einzeln markiert. Die sieben überlappenden Peptide des ersten Bereichs (blau) zeigten keinen Signalanstieg. Der zweite Phagen-präsentierte Bereich wies deutlich höhere Signalintensitäten für die Peptide 2–4 mit einem Maximum bei Peptid 3 (LPEVDADFAKALGIA) auf.

Die Spezifitätskontrollen der drei Epitopeptide wiesen keine Signalintensitäten für den *E. coli* Antikörper auf, allerdings zeigten die Peptide 0592_2_2 (SEPTLPEVDADFAKA) und 0592_2_3 (LPEVDADFAKALGIA) bei der Inkubation mit *N. meningitidis* Antikörper ungefähr ein Viertel des Signals der Inkubation mit *N. gonorrhoeae* Antikörper. Als Beispiel ist in Abbildung 3.9 das Ergebnis der Spezifitätskontrolle für die drei identifizierten Peptide von NGO0592 dargestellt. Die weiteren Spezifitätskontrollen sind Anhang V aufgeführt. Das Epitopeptid LPEVDADFAKALGIA wurde weiter mittels Alanin-Scan untersucht.

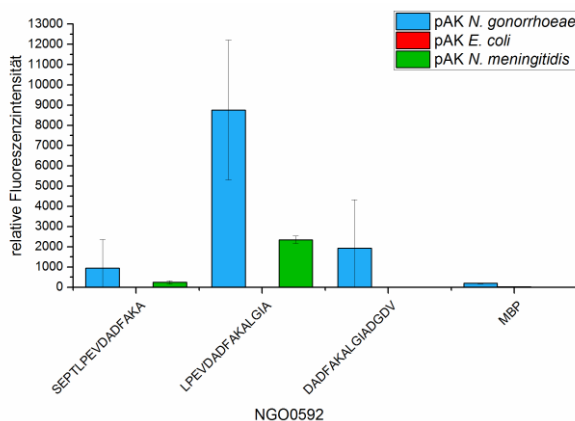


Abbildung 3.9: Spezifitätskontrolle der drei Epitopeptide von NGO0592.

Die Signalintensitäten des *N. gonorrhoeae* Antikörpers entsprechen den Werten des Epitopmappings. Für die Kontrollantikörper gegen *E. coli* und *N. meningitidis* unterschiedliche Signalintensitäten gemessen. Für den *E. coli* Antikörper lagen alle Werte zwischen 0 und 50 AU. Die Inkubation mit dem *N. meningitidis* Antikörper zeigte bei dem Peptid mit der höchsten Signalintensität (LPEVDADFAKALGIA) eine mittlere Signalintensität von 2250 AU.

In Abbildung 3.10 sind die Ergebnisse des Epitopmappings von NGO0777 als Box-Whisker-Plot abgebildet. Das Epitopmapping von NGO0777 resultierte in drei aufeinanderfolgende Peptide mit ansteigender Signalintensität bis zu einem Mittelwert von ungefähr 4500 AU für Peptid 6

(KALDATTNAVTNALK). Für NGO0777 zeigten die Kontrollen mit den unspezifischen Antikörpern kein Signal.

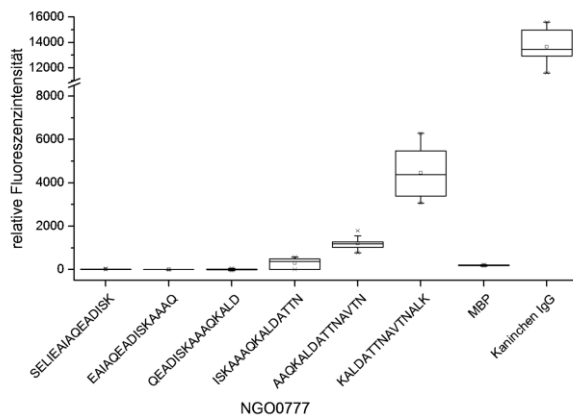


Abbildung 3.10: Epitopmapping des durch Phage Display isolierten Polypeptids von NGO0777 (n = 9).

Der Box-Whisker-Plot zeigt die relativen Fluoreszenzintensitäten der sechs überlappenden Peptide, die den Phagen-präsentierten Bereich des Proteins NGO0777 umfassen. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG, als Negativkontrolle MBP immobilisiert. Die einzelnen Boxen repräsentieren 50 % der erhaltenen Werte. Der Median der Werte ist als durchgehende Linie, der Mittelwert als kleines Quadrat dargestellt. Die Whisker schließen 98 % der Daten ein. Ausreißer sind mit einem kleinen Kreuz einzeln markiert. Peptide 5 (AAQKALDATTNAV7TN) und 6 (KALDATTNAV7TNALK) zeigen eine deutlich höhere Signalintensität als der Rest der Peptide und die Negativkontrolle.

Für NGO1429 wurden zunächst zehn Polypeptide in den Pannings isoliert, die aufgrund von Überlappungen zu vier Peptiden zusammengefasst wurden (vgl. Anhang IV). Die Ergebnisse der Epitopmappings sind in Abbildung 3.11 anhand von Box-Whisker-Plots dargestellt. Bei zwei Polypeptiden (1429_1, 1429_3) waren eindeutige Signalzunahmen zu erkennen. Das dritte Peptid von 1429_1 (QATKDAGRIAGLDVK) wies eine mittlere Signalintensität von 7500 AU auf. Die elf überlappenden Peptide von 1429_3 hatten in zwei Bereichen höhere Signalintensitäten als die Negativkontrolle und die restlichen Peptide. Vor allem das dritte (DDVILVGGQSRMPKV) und siebte Peptid (EAVKDFFGKEPRKDV) zeigten erhöhte Signale bei 3000 AU und über 5000 AU. Ein vergleichsweise niedriger Anstieg der Signalintensität wurde ebenfalls für die überlappenden Peptide des zweiten isolierten Polypeptids (1429_2 Peptide 8–10 und 12) festgestellt, während die Signale der überlappenden Peptide des vierten Polypeptids alle auf Höhe der Negativkontrolle verliefen. Die Spezifitätskontrollen zeigten für die meisten Peptide keinen Anstieg der Signalintensität. Nur für die Peptide 1–3 von 1429_3 (AGLSTGDIDDVILVG, TGDIDDVILVGGQSR, DDVILVGGQSRMPKV) war ein minimaler Signalanstieg detektierbar. Das dritte Peptid von 1429_1 und das dritte und siebte Peptid von 1429_3 wurden als Epitope identifiziert und weiter mittels Alaninscan charakterisiert.

3 Ergebnisse

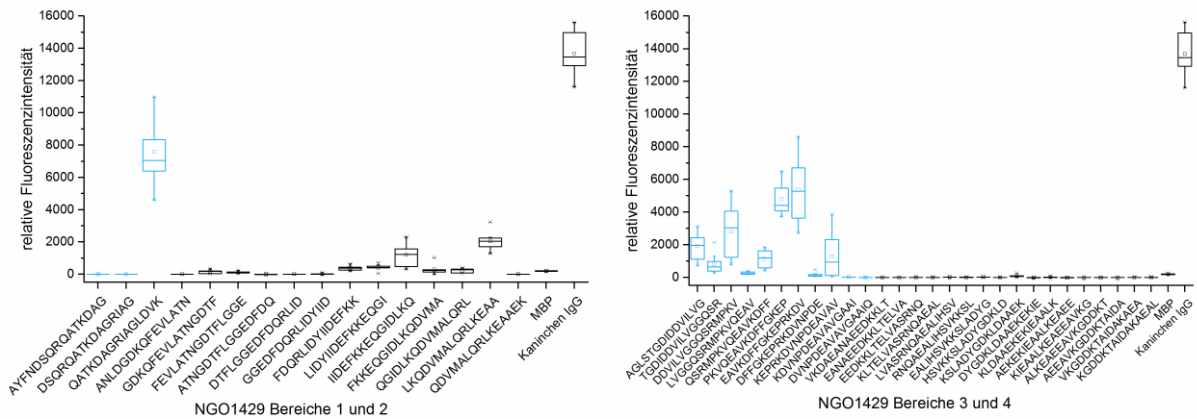


Abbildung 3.11: Epitommappings der durch Phage Display isolierten Polypeptide von NGO1429 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der überlappenden Peptide der vier Phagen-präsentierten Bereiche von NGO1429. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG, als Negativkontrolle MBP immobilisiert. Die einzelnen Boxen repräsentieren 50 % der erhaltenen Werte. Der Median der Werte ist als durchgehende Linie, der Mittelwert als kleines Quadrat dargestellt. Die Whisker schließen 98 % der Daten ein. Ausreißer sind mit einem kleinen Kreuz einzeln markiert. **Links**) Bereich 1 besteht aus den ersten drei Peptiden (blau). Peptid 3 (QATKDAGRIAGLDVK) zeigte eine deutlich höhere mittlere Signalintensität als die restlichen Peptide und die Negativkontrolle. Die Peptide des zweiten Bereichs zeigen vergleichsweise niedrige Signalintensitäten. Nur die mittlere Signalintensität von Peptid 12 (LKQDVMALQRLKEAA) lag bei 2000 AU und somit eindeutig über den Signalintensitäten der anderen Peptide. **Rechts**) Der dritte Phagen-präsentierte Bereich bestand aus elf überlappenden Peptiden (blau). Peptide 3 und 7 wurden als Epitope identifiziert. Die Peptide des vierten Bereichs zeigten alle Signalintensitäten auf Höhe der Negativkontrolle.

Von Protein NGO1577 wurden mehrere immunogene Polypeptide mittels Panning isoliert. Die sechs Polypeptide wurden zu zwei Bereichen zusammengefügt und in 14 bzw. sieben überlappende Peptide *in silico* aufgeteilt (Abbildung 3.12 links). Im ersten Bereich wurden zwei Epitopregionen gefunden. Für die Peptide 1_1 (PVAVVEQAPQYVDET) und 1_2 (VEQAPQYVDETISLS) wurden Signalintensitäten von knapp 1000 AU gemessen, während sich vor allem Peptid 1_9 (AEAQDNLKVLAQRLS) mit einem Mittelwert bei 8000 AU eindeutig von den restlichen Peptiden abhob. Peptid 1_10 zeigte dabei noch ein niedriges Signal bei 800 AU. Die Signalintensitäten der Peptide des zweiten untersuchten Bereichs lagen unterhalb der Negativkontrolle. Bei den Spezifitätskontrollen waren ausschließlich Signalanstiege nach der Inkubation mit dem *N. gonorrhoeae* Antikörper detektierbar, die Kontrollantikörper zeigten keine Bindung.

Das Epitopmapping des mittels Phage Display identifizierten Bereichs von NGO1656 offenbarte eine Epitopregion für Peptid 9 (KIDSSVIDAQVAEFR), das keinen Signalanstieg für die Spezifitätskontrollen zeigte. Das identifizierte Epitopeptid war das letzte Peptid der neun überlappenden Peptide von NGO1656. Das rechte Diagramm in Abbildung 3.12 zeigt die Ergebnisse des Epitopmappings von NGO1656 in Form eines Box-Whisker-Plots.

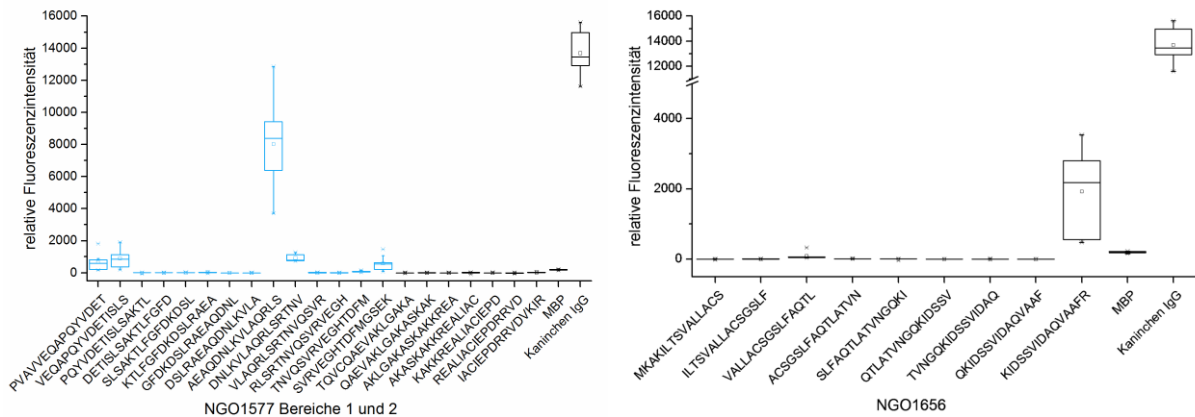


Abbildung 3.12: Epitopmappings der durch Phage Display isolierten Polypeptide von NGO1577 und NGO1656 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der zwei Phagen-präsentierten Bereiche von NGO1577 (links) und der neun überlappenden Peptide, die den Phagen-präsentierten Bereich des Proteins NGO1656 umfassen (rechts). Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG, als Negativkontrolle MBP immobilisiert. Die einzelnen Boxen repräsentieren 50 % der erhaltenen Werte. Der Median der Werte ist als durchgehende Linie, der Mittelwert als kleines Quadrat dargestellt. Die Whisker schließen 98 % der Daten ein. Ausreißer sind mit einem kleinen Kreuz einzeln markiert. **Links)** Bei den 14 überlappenden Peptiden des ersten Bereichs (blau) zeigte Peptid 9 (AEAQDNLKVLQRLS) eine deutlich höhere Signalintensität als die anderen Peptide. Die Signalintensitäten der überlappenden Peptide des zweiten Phagen-präsentierten Bereichs (schwarz) lagen alle auf Höhe der Negativkontrolle MBP. **Rechts)** Das letzte Peptid (KIDSSVIDAQVAEFR) zeigte eine deutlich höhere Signalintensität als der Rest der Peptide und die Negativkontrolle.

Peptid 4 (VAVAGPAGAGAADA) des untersuchten Bereichs von Protein NGO1852 zeigte im Vergleich zu den restlichen Peptiden einen starken Anstieg der Signalintensität auf über 20000 AU (Abbildung 3.13 links). Die Spezifitätskontrolle des identifizierten Epitops und der zwei nachfolgenden Peptide ergab eine spezifische Bindung der *N. gonorrhoeae* Antikörper an das Epitop, während die beiden anderen polyklonalen Antikörper keine Bindung aufwiesen.

Das Epitopmapping des Phagen-präsentierten Polypeptids von NGO2094 resultierte in zwei Epitopregionen in den 14 untersuchten, überlappenden Peptiden (Abbildung 3.13 rechts). Das erste Epitop wurde in Peptid 3 (RLEAEEKTASGIVLP) detektiert, das zweite in Peptid 11 (GKIGKDGARRPLDVK). Peptid 3 wies eine durchschnittliche Signalintensität von 7000 AU auf, während das nächste Peptid noch eine Intensität von 3000 AU hatte. Peptide 9, 10 und 11 zeigten Signalintensitäten von 5000 AU, 20000 AU und 22000 AU. Alle Kontrollen mit *E. coli* und *N. meningitidis* Antikörpern waren negativ, sodass durch die Bindung des polyklonalen Antikörpers gegen *N. gonorrhoeae* zwei spezifische, lineare Epitope identifiziert wurden.

3 Ergebnisse

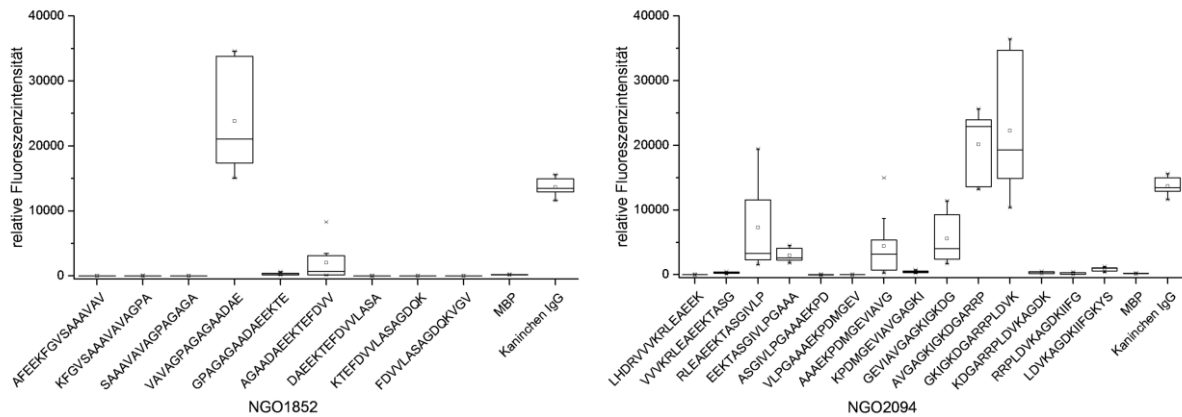


Abbildung 3.13: Epitommappings der durch Phage Display isolierten Polypeptide von NGO1852 und NGO2094 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der neun bzw. 14 überlappenden Peptide von NGO1852 (links) und NGO2094 (rechts). Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG, als Negativkontrolle MBP immobilisiert. Die einzelnen Boxen repräsentieren 50 % der erhaltenen Werte. Der Median der Werte ist als durchgehende Linie, der Mittelwert als kleines Quadrat dargestellt. Die Whisker schließen 98 % der Daten ein. Ausreißer sind mit einem kleinen Kreuz einzeln markiert. **Links** Peptid 4 (VAVAGPAGAGAADA) zeigte eine höhere mittlere Signalintensität als der Rest der Peptide und die Negativkontrolle. **Rechts** Peptide 3 (RLEAEETASGIVLP) und 11 (GKIGKDGARRPLDVK) zeigten die höchsten mittleren Signalintensitäten der umliegenden Peptide und wurden daher als Epitopregionen identifiziert.

Für Protein NGO2095 wurden zunächst vier immunogene Regionen mittels Phage Display identifiziert und durch Epitopmapping näher charakterisiert (Abbildung 3.14). Die erste Region bestand aus drei überlappenden Peptiden und wies die höchsten Signalintensitäten im gesamten Epitopmapping von über 45000 AU für Peptid 1_1 (PKGRNVVVDRAFGGP) auf. Die zwei weiteren Peptide 1_2 und 1_3 zeigten ebenfalls erhöhte Signalintensitäten von 29000 AU und 5000 AU. Auch die Peptide 2_3 (NSDEQVGAIIEAME) und 2_4 (QVGAIIEAMEKVGK) und 2_12–2_14 (VVEGMQFDRGYLSPY, MQFDRGYLSPYFIND, RGYLSPYFINDAEKQ) hatten mittlere Signalintensitäten über 6000 AU. Die überlappenden Peptide des dritten untersuchten Polypeptids zeigten niedrige Signalintensitäten mit einem Maximum von 700 AU, sodass dieser Bereich nicht weiter charakterisiert wurde (Anhang V). In der vierten Region hingegen wurden zwei Epitobereiche identifiziert. Jeweils vier aufeinander folgende Peptide (4_8–4_11 und 4_13–4_16) zeigten höhere Signalintensitäten als die restlichen Peptide und die Negativkontrolle MBP. Während das erste Epitop auf Peptid 4_9 (GKGNYGYNAGSGEYGG) und 4_10 (YGYNAGSGEYGDMMIG) mit den höchsten Signalintensitäten von 23000 AU und 15000 AU fällt, liegt das zweite Epitop im Bereich von Peptid 4_14 (GVLDPAKVTRRSALQH) mit der höchsten Signalintensität (16000 AU) der vier aufeinander folgenden Peptide. Für die Alaninscans wurden das Peptid 1_1, eine Konsensussequenz aus den Peptiden 2_3 und 2_4, eine Konsensussequenz aus den Peptiden 2_12–2_14 und die Peptide 4_10 und 4_14 weiter charakterisiert. Für die Regionen um die Peptide 4_10 und 4_14 wurden keine Konsensussequenzen gewählt, da vier aufeinanderfolgende Peptide erhöhte Signalintensitäten zeigten. Es wurde daher jeweils das mittlere der drei Peptide mit den höchsten Signalintensitäten weiter charakterisiert. Die Spezifitätskontrollen zeigten für alle gefundenen Epitope von NGO2095 Signale auf Höhe der Negativkontrolle.

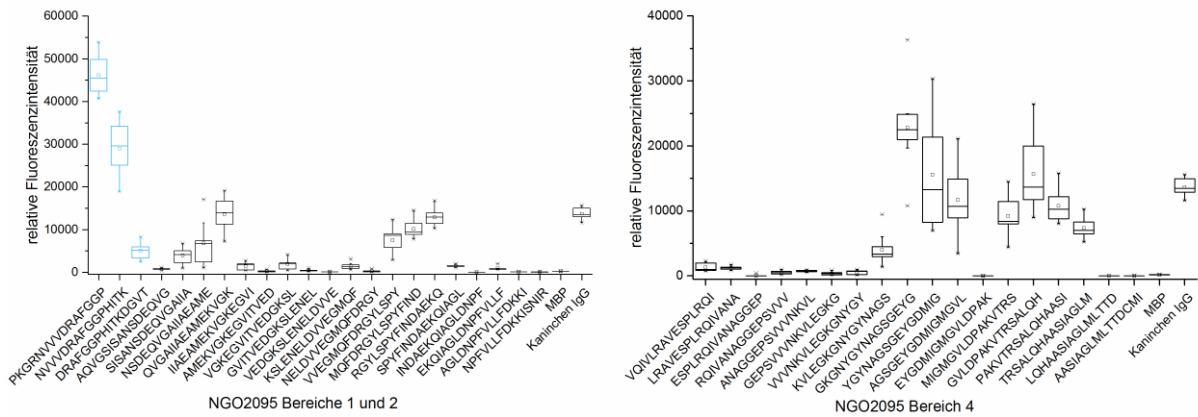


Abbildung 3.14: Epitommappings der durch Phage Display isolierten Polypeptide von NGO2095 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der überlappenden Peptide von drei der vier Phagen-präsentierten Bereiche des Proteins NGO2095. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG, als Negativkontrolle MBP immobilisiert. Die einzelnen Boxen repräsentieren 50 % der erhaltenen Werte. Der Median der Werte ist als durchgehende Linie, der Mittelwert als kleines Quadrat dargestellt. Die Whisker schließen 98 % der Daten ein. Ausreißer sind mit einem kleinen Kreuz einzeln markiert. **Links)** Der erste untersuchte Bereich umfasst drei Peptide (blau), die alle mittlere Signalintensitäten über der Negativkontrolle hatten. Der zweite Bereich (schwarz) besteht aus 20 überlappenden Peptiden, bei denen zwei Regionen um die Peptide 3 (NSDEQVGAIIEAME) und 4 (QVGAIIEAMEKVGK) und die Peptide 12 (VVEGMQFDRGYLSPY) bis 14 (RGYLSPYFINDAEKQ) deutlich höhere Signalintensitäten aufweisen. **Rechts)** Zwei Epitopbereiche wurden bei den Peptiden 9 (GKGNYGYNAGSGEYGY) und 10 (YGYNAGSGEYGDIMG) und bei Peptid 14 (GVLDPKAVTRTSALQH) identifiziert.

NGO0584, NGO0916, NGO1043, NGO1634 und NGO1796 wiesen bei den Versuchen mit drei polyklonalen Antikörpern aus verschiedenen Immunisierungen Signale auf Höhe der Negativkontrolle oder sehr streuende Signalintensitäten für die verschiedenen Antikörper auf. Hierbei wurde jeweils ein Array mit einem der drei Antikörper inkubiert. Vorab wurden bei Versuchen mit nur einem der drei polyklonalen Antikörper, der auch für die ersten Screenings und die Panningrunden verwendet wurde, eindeutige Epitope für die Bindung dieses Antikörpers identifiziert (n = 3). Allerdings waren die Signale bei der Inkubation mit drei Antikörpern generell geringer (vgl. Positivkontrollen in Abbildung 3.15: Mittelwert mit einem polyklonalen AK bei 30000 AU, mit drei polyklonalen Antikörpern bei 14000 AU). So reichen die Signalintensitäten des Peptids 1043_6 (KGQVKDAAADAKASA) bei der Inkubation mit drei Antikörpern von ca. 0 AU bis zu einem Ausreißer von 800 AU (Abbildung 3.15 links). Bei der Inkubation mit nur einem Antikörper zeigte sich hier aber ein Mittelwert von knapp 7000 AU mit einem Minimum von ca. 3000 AU (Abbildung 3.15 rechts).

3 Ergebnisse

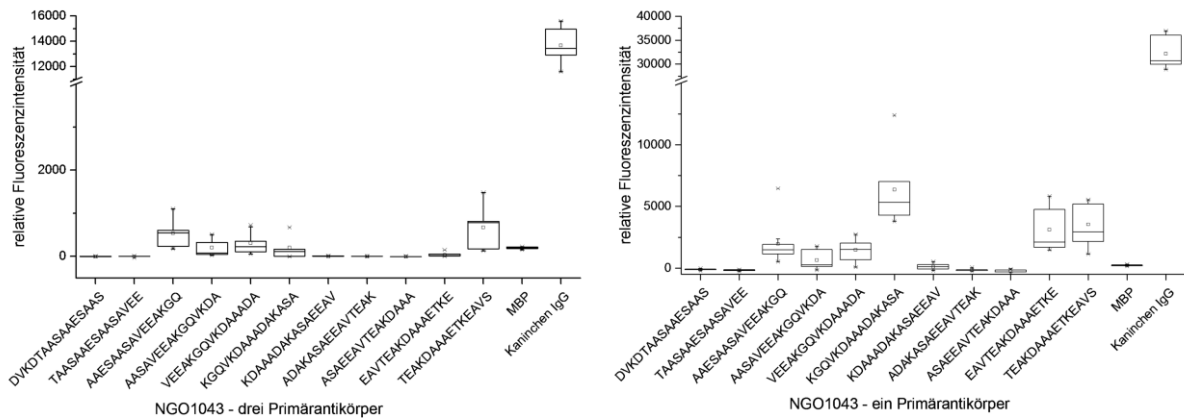


Abbildung 3.15: Vergleich der Epitommappings des Phagen-präsentierten Peptids von NGO1043 mit drei (links) und einem (rechts) Primärantikörper.

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der überlappenden Peptide des untersuchten Bereichs von NGO1043. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG, als Negativkontrolle MBP immobilisiert. Die einzelnen Boxen repräsentieren 50 % der erhaltenen Werte. Der Median der Werte ist als durchgehende Linie, der Mittelwert als kleines Quadrat dargestellt. Die Whisker schließen 98 % der Daten ein. Ausreißer sind mit einem kleinen Kreuz einzeln markiert. Die y-Achsen sind unterschiedlich skaliert. Das Epitopmapping mit drei Antikörpern zeigte generell niedrigere Signalintensitäten mit einer Positivkontrolle bei 14000 AU, während die Positivkontrolle beim Epitopmapping mit einem Antikörper über 30000 AU lag. Das Epitopmapping mit drei Antikörpern deutet auf mögliche Epitope im Bereich der Peptide 3–6 und bei Peptid 11 hin. Allerdings waren die mittleren Signalintensitäten mit einem Maximum bei 800 AU sehr niedrig und aufgrund der großen Boxen nicht eindeutig. Das Epitopmapping mit einem Primärantikörper zeigte zwei Bereiche (Peptide 3–6 und Peptide 10 und 11), die deutlich höhere Signalintensitäten aufwiesen als die restlichen Peptide.

Noch überlappend ist die Differenz bei NGO0916. Während die Inkubation mit drei Antikörpern zu einer Signalerhöhung des Peptids 0916_19 (LARIDTAATVAAEAP) mit einem Ausreißer auf maximal 1500 AU ausreichte, wurde bei der Inkubation mit nur einem Antikörper ein Mittelwert von über 10000 AU für Peptid 0916_20 (DTAATVAAEAPAAAP) erreicht. Der Vergleich der Ergebnisse der beiden Inkubationen ist in Abbildung 3.16 .

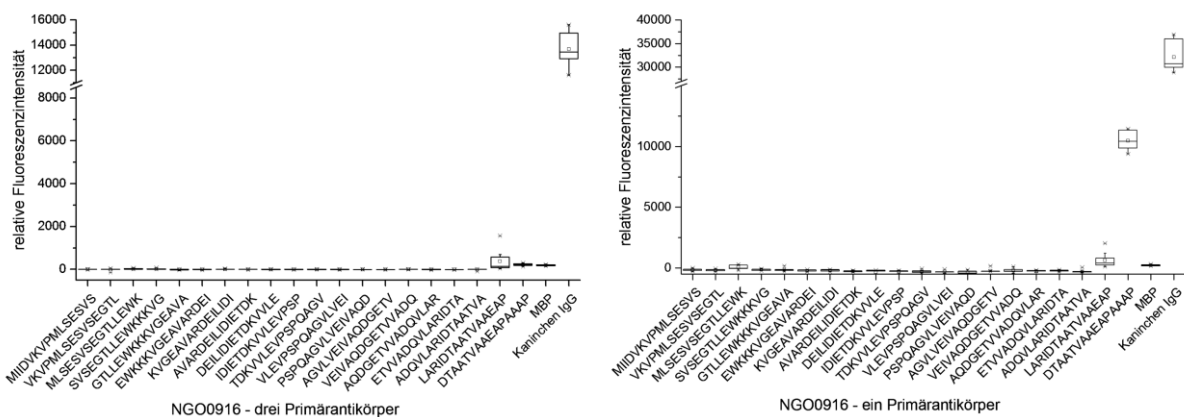


Abbildung 3.16: Vergleich der Epitommappings des Phagen-präsentierten Peptids von NGO0916 mit drei (links) und einem (rechts) Primärantikörper.

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der 20 überlappenden Peptide des untersuchten Bereichs von NGO1043. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG, als Negativkontrolle MBP immobilisiert. Die einzelnen Boxen repräsentieren 50 % der erhaltenen Werte. Der Median der Werte ist als durchgehende Linie, der Mittelwert als kleines Quadrat dargestellt. Die Whisker schließen 98 % der Daten ein. Ausreißer sind mit einem kleinen Kreuz einzeln markiert. Die y-Achsen sind unterschiedlich skaliert. Während links bei der Inkubation mit drei Primärantikörpern nur Peptid 19 leicht erhöhte Signalintensitäten zeigt, ist bei der Inkubation mit einem Primärantikörper ein Anstieg der mittleren Signalintensität auf über 10000 AU für Peptid 20 im Vergleich zu den anderen Peptiden feststellbar.

Die Signalintensitäten des Epitopmappings von NGO1796 waren insgesamt sehr niedrig mit maximalen Signalintensitäten von 700 AU. Die Ergebnisse der Epitopmappings sind in Abbildung 3.17 als Box-Whisker-Plots dargestellt. Während bei der Inkubation der überlappenden Peptide von NGO1796 mit drei Antikörpern alle Signale sehr schwach waren, zeigten sich bei der Inkubation mit einem polyklonalen Antikörper die Signale einiger Peptide deutlich erhöht. Neben Peptid 12 (AKVEKAIRDSNLGLN), das auch bei der Inkubation mit drei Antikörpern das höchste mittlere Signal hatte, waren bei der Inkubation mit einem Antikörper auch die Signalintensitäten von Peptid 16 (AAVGDLIRVPMPMLT) und Peptid 19 (MLTEERRKDLIKVVR) deutlich erhöht. Die mittleren Signalintensitäten lagen bei 2000 AU für Peptid 12, 2200 AU für Peptid 16 und 7700 AU für Peptid 19. Die umliegenden Peptide (Peptid 13, Peptide 15 und 17) zeigten hierbei ebenfalls höhere Signalintensitäten als die restlichen Peptide (1200 AU, 1600 AU und 640 AU). Für die umliegenden Peptide von Peptid 19 (18 und 20) lagen die Signale auf Höhe der Negativkontrolle, sodass Peptid 19 nicht weiter untersucht wurde. Die angrenzenden Peptide von Peptid 16 hingegen wiesen ebenfalls erhöhte Signalintensitäten auf, sodass Peptid 12 und Peptid 16 als Epitopregionen identifiziert wurden. Peptide mit den höchsten Signalintensitäten wurden als Epitopsequenz definiert und mittels Alaninscan weiter untersucht.

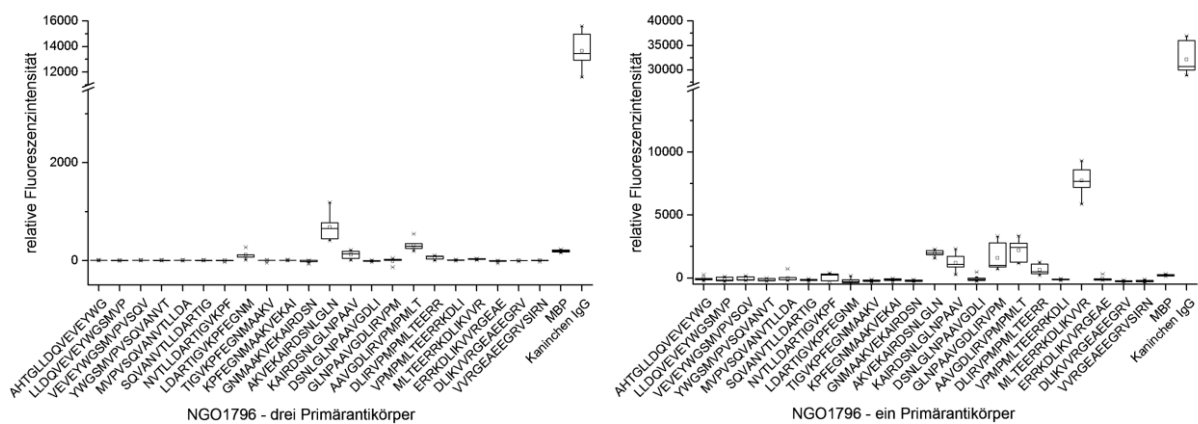


Abbildung 3.17: Vergleich der Epitopmappings des durch Phage Display isolierten Polypeptids von NGO1796 (n = 9) mit drei (links) und einem (rechts) Primärantikörper.

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der 22 überlappenden Peptide, die den Phagen-präsentierten Bereich des Proteins NGO1796 umfassen. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG, als Negativkontrolle MBP immobilisiert. Die einzelnen Boxen repräsentieren 50 % der erhaltenen Werte. Der Median der Werte ist als durchgehende Linie, der Mittelwert als kleines Quadrat dargestellt. Die Whisker schließen 98 % der Daten ein. Ausreißer sind mit einem kleinen Kreuz einzeln markiert. Die Peptide 12 (AKVEKAIRDSNLGLN) und 16 (AAVGDLIRVPMPMLT) zeigten höhere Signalintensitäten als der Rest der Peptide und die Negativkontrolle.

Die Ergebnisse der weiteren Epitopmappings und Spezifitätskontrollen sind in Anhang V angefügt. Für das Protein NGO1634 waren zwar mittlere Signalintensitäten bis zu 2500 AU für Peptid 5 (SDYEPSDFDAKNHQI) detektierbar, allerdings waren bei den Inkubationen mit drei Antikörpern die Mediane sehr niedrig (Abbildung V.9). Bei der Inkubation mit einem Antikörper hingegen wurden im Vergleich zu den anderen Peptiden Signalanstiege für Peptide 5 und 6 (YEPSDFDAKNHQILS) auf 3500 AU und 4000 AU im Vergleich zu den anderen Peptiden gemessen. Peptid 6 wurde aufgrund des höheren Medians weiter mittels Alaninscan charakterisiert. Die Inkubation mit dem polyklonalen *E. coli* Antikörper führte ebenfalls zu Signalintensitäten von 3000 AU und 4000 AU für die beiden

3 Ergebnisse

Peptide 5 und 6, während die Inkubation mit dem polyklonalen *N. meningitidis* Antikörper Signale auf Höhe der Negativkontrolle generierte.

Da NGO0170 bei späteren Pannings als neues immunogenes Protein identifiziert wurde, wurde das Epitopmapping nicht mit den anderen Proteinen mittels Microarray untersucht, sondern mithilfe von immobilisierten Peptiden auf einer Cellulose Membran (Abbildung 3.18). Hierbei wurde die Membran nach dem Blocken zunächst nur mit Puffer und anschließend mit Sekundärantikörper inkubiert, um unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an die Peptide auszuschließen. Danach erfolgte die Überprüfung der Bindung durch Zugabe von DAB (Abbildung 3.18 A). Bei der Inkubation mit einem polyklonalen Antikörper gegen *N. gonorrhoeae* (Acris Antibodies GmbH, BP1050, Lot# 2B04511) wiesen die Spots 5–8 nur eine leichte Hintergrundverfärbung, die Verfärbung der Spots 2–4 war hingegen deutlich intensiver. Der dritte Spot weist einen Kreis um den eigentlichen Spot auf. Dies spricht für eine Bindung des Antikörpers an die immobilisierten Peptide, die jedoch in einer zu hohen Konzentration immobilisiert sind. Als Epitopregion wurde aufgrund der Bindung an die Peptide 2–4 das dritte Peptid (LLAREKIAAGATETI) definiert und mittels Alaninscan weiter untersucht. Da sowohl Peptid 2 als auch Peptid 4 vergleichbare Intensitäten aufwiesen, wurde keine Konsensussequenz gewählt, sondern das mittlere Peptid 3 als Epitopsequenz weiter untersucht.

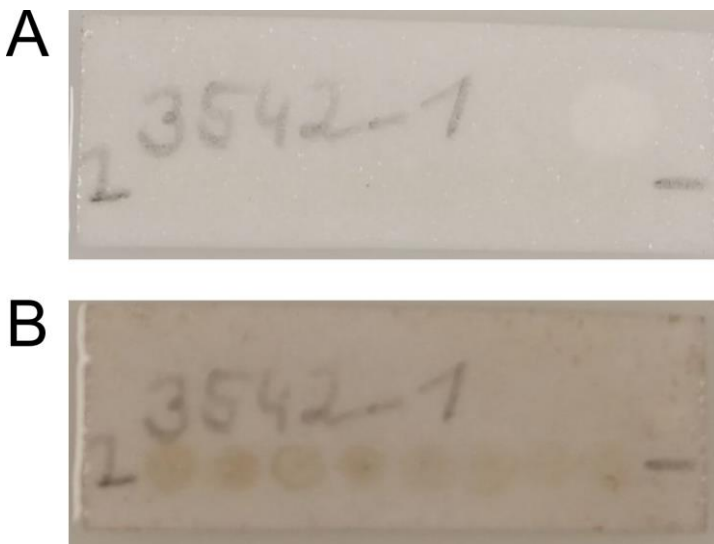


Abbildung 3.18: Epitopmapping von NGO0170 mittels immobilisierter Peptide auf einer Cellulose Membran (Lot# 3542_1).

Das erste und letzte Peptid sind mit einem Minus markiert. Das erste Peptid ist zusätzlich mit einer 1 versehen. Die Sequenzabfolge von links nach rechts ist wie folgt: 1 RAYFPNTLLAREKI, 2 PNTLLAREKIAAGA, 3 LLAREKIAAGATETI, 4 EKIAAGATETILTES, 5 AGATETILTESYLAQ, 6 ETILTESYLAQASAK, 7 TESYLAQASAKMQQQ, 8 SYLAQASAKMQQQES. **A)** Die Inkubation erfolgte nur mit Puffer und dem Sekundärantikörper. Die anschließende Zugabe des Substrats zeigte eine minimale Verfärbung der gesamten Membran. **B)** Die Inkubation erfolgte mit einem polyklonalen *N. gonorrhoeae* Antikörper und dem Sekundärantikörper. Die anschließende Zugabe des Substrats führte zu einer Farbreaktion der Spots 1–4. Die hinteren Spots 5–8 weisen eine schwächere Hintergrundfärbung auf.

Wie bereits erwähnt, wurden für vier der 21 untersuchten Proteine keine Epitope identifiziert. Für die Polypeptide von NGO0451 und NGO1657 wurde der vermeintlich immunogene Charakter nicht für die Vollängenproteine bestätigt. Dennoch wurden Epitopmappings durchgeführt, die jedoch in allen Peptiden nur Signalintensitäten auf Höhe der Negativkontrollen generierten. Ebenfalls kein lineares Epitop wurde für die Proteine NGO0642 (20 überlappende Peptide) und NGO2139 (25 überlappende Peptide) gefunden. Das homologe Protein von *N. meningitidis* zu NGO0584 ist zwar als

3 Ergebnisse

davon eine Signalintensität von 2000 AU und niedriger hatten. Der Austausch von Prolin an Stelle 7 des Peptids (2000 AU), und noch mehr der Austausch von Glycin an Stelle 11 (1500 AU) und Threonin an Stelle 14 (900 AU), zeigten eine Abnahme der Signalintensität um 50–77 %.

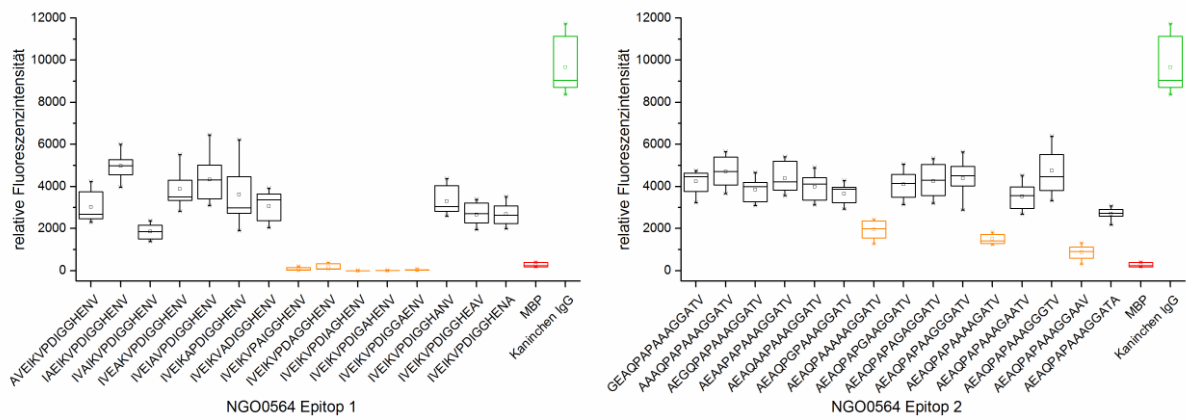


Abbildung 3.20: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der beiden identifizierten Epitope von NGO0564 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der Peptide mit jeweils einer ausgetauschten Aminosäure von Epitop 1 (links) und Epitop 2 (rechts). Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG (grün), als Negativkontrolle MBP (rot) immobilisiert. Peptide, deren mittlere Signalintensitäten mehr als 50 % von der durchschnittlichen Signalintensität der restlichen Peptide abweichen, sind orange markiert.

Der Alaninscan des Epitops von NGO0584 zeigte viele Schwankungen in den Signalintensitäten (Abbildung 3.21 links). Die Hälfte der Peptide wiesen Signalintensitäten bis 3000 AU auf, die anderen Peptide zeigten nahezu kein Signal. Allerdings wechselten sich die Peptide mit hohen und niedrigen Signalintensitäten ab, sodass keine distinkten Bereiche identifizierbar waren, in denen ein Signalverlust zu erkennen war. Im rechten Bereich von Abbildung 3.21 sind die Ergebnisse des Alaninscans von NGO0592 gezeigt. Die Signale von 14 der 15 Peptide des Epitops von NGO0592 (LPEVDADFALGIA) lagen oberhalb von 4000 AU bis zu einem Maximum von 9500 AU auf Höhe der Positivkontrolle (Kaninchen IgG). Nur ein Peptid, bei dem die Asparaginsäure an Position 5 gegen Alanin ausgetauscht wurde, wies ein deutlich niedrigeres Signal von 2000 AU auf, was einem Signalverlust von 70 % gegenüber dem Durchschnitt der mittleren Signalintensitäten der anderen Peptide entsprach.

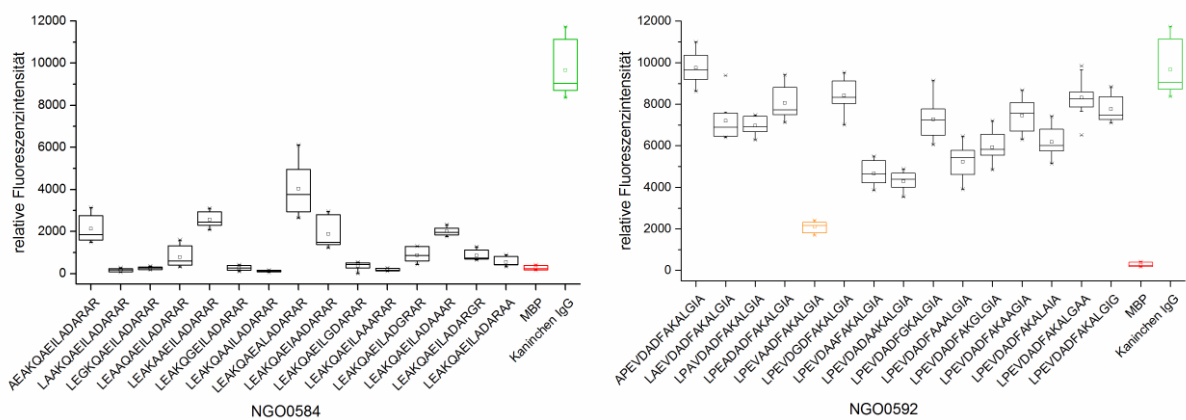


Abbildung 3.21: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der identifizierten Epitope von NGO00584 und NGO00592 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der Peptide mit jeweils einer ausgetauschten Aminosäure der Epitope von NGO00584 (links) und NGO00592 (rechts). Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG (grün), als Negativkontrolle MBP (rot) immobilisiert. **Links)** Aufgrund von starken Schwankungen der Signalintensitäten wurden keine distinkten Bereiche identifiziert. **Rechts)** Das orange markierte Peptid wies einen Signalverlust von 70 % im Vergleich zum durchschnittlichen mittleren Signal der restlichen Peptide auf.

Die Signale des Großteils der Peptide des Alaninscans von NGO0777 lag über 2000 AU. Der linke Teil von Abbildung 3.22 zeigt die Ergebnisse des Alaninscans dargestellt als Box-Whisker-Plot. Die Signalintensitäten der Peptide 4 und 6 fielen komplett auf Werte unterhalb der Negativkontrolle. Die beiden ausgetauschten Aminosäuren waren Asparaginsäure und Threonin. Bei zwei weiteren Aminosäuren (7. und 8. AS) lagen die Mittelwerte der Signale bei 1200 AU und knapp unter 1000 AU. Dies entsprach einem Signalabfall von 37 % bzw. 68 % verglichen mit dem Mittelwert der restlichen Peptide, deren mittlere Signalintensitäten über 2000 AU lagen.

Die identifizierte Epitopregion von NGO0916 umfasste 13 Aminosäuren, da die Epitopregion auf den hinteren Bereich des letzten Peptids festgelegt wurde (AATVAAEAPAAAP). Die Ergebnisse des Alaninscans sind in Abbildung 3.22 rechts dargestellt. Der Mittelwert der Signalintensität des Großteils der Peptide lag über 15000 AU, die meisten sogar über 25000 AU. Drei aufeinanderfolgende Peptide (Aminosäuren 7–9: Glutaminsäure, Alanin, Prolin) wiesen einen Abfall der Signalintensitäten auf 14000 AU, 4000 AU und 2000 AU auf, was Signalverlusten von 95–99 % (unterhalb der Negativkontrolle) entsprach. Des Weiteren hatte der Austausch der fünften Aminosäure (Alanin) mit einer mittleren Signalintensität von 7000 AU einen Signalverlust von 75 % zur Folge.

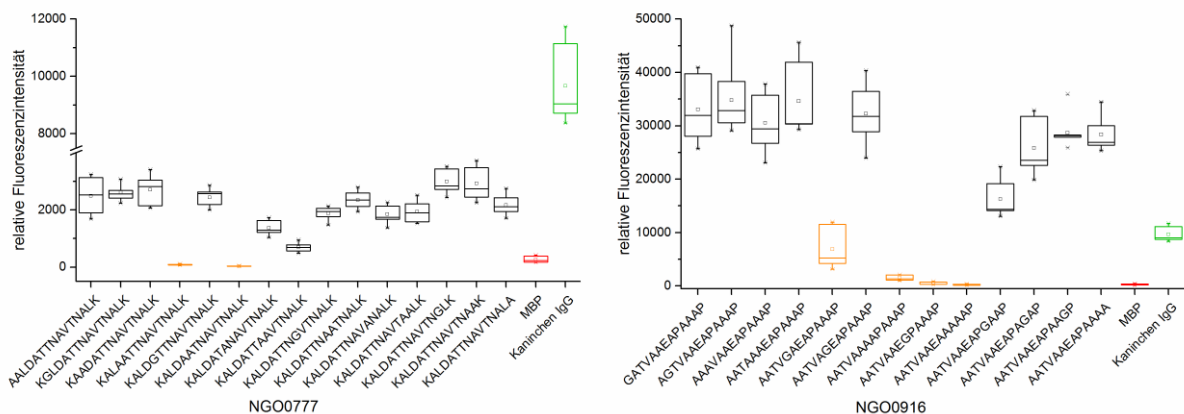


Abbildung 3.22: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der identifizierten Epitope von NGO0777 und NGO0916 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der Peptide mit jeweils einer ausgetauschten Aminosäure der Epitope von NGO0777 (links) und NO0916 (rechts). Jede Aminosäure der Epitopregion wurde gegen Alanin ausgetauscht. Im Falle von Alanin wurde dieses durch Glycin ersetzt. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG (grün), als Negativkontrolle MBP (rot) immobilisiert. **Links)** Die Peptide mit einem Aminosäureaustausch an den Stellen 4 (Asparaginsäure) und 6 (Threonin) sorgen für einen kompletten Signalverlust im Vergleich zu den Signalintensitäten der anderen Peptide (orange markiert). **Rechts)** Der Austausch der Aminosäure an Position 5 sorgte für einen Signalverlust von 75 %. Der Austausch der Aminosäuren an Position 7, 8 und 9 hatte einen kompletten Verlust des Signals zur Folge. Die Boxen dieser vier Peptide sind in der Abbildung orange markiert.

Die Alaninscans für die beiden Epitopregionen von NGO1043 waren nicht eindeutig. Die Ergebnisse sind in Form von Box-Whisker-Plots in Abbildung 3.23 dargestellt. Die erste Epitopsequenz (KGQVKDAAADAKASA) hatte eine Länge von 15 AS, während die zweite Epitopregion (TEAKDAAAETKE) nur 12 Aminosäuren lang war. Für Epitop 1 führte der Austausch von drei aufeinanderfolgenden Aminosäuren (Aminosäuren 5–7: Lysin, Asparaginsäure, Alanin) zu einer Signalabnahme auf Höhe der Negativkontrolle von 270 AU und niedriger. Die meisten anderen Peptide lagen in einem Bereich zwischen 1000 AU und 7000 AU. Die Signalintensität der Peptide 10 und 12, bei denen die Aminosäuren Asparaginsäure bzw. Lysin gegen Alanin ausgetauscht wurden, lagen ebenfalls unterhalb der 1000 AU. Bei Epitop 2 schwankten die mittleren Signalintensitäten der

3 Ergebnisse

einzelnen Peptide zwischen 1400 AU und 14000 AU. Während die Signalintensitäten von fünf Peptiden über 10000 AU lagen, wiesen weitere fünf Peptide ein Signal zwischen 1400 und 5000 AU auf. Peptide 5 und 11 zeigten einen Signalverlust auf 30 AU bzw. 300 AU, was einer prozentualen Abnahme von 99 % bzw. 96 % im Vergleich zur durchschnittlichen mittleren Signalintensität der restlichen Peptide entsprach.

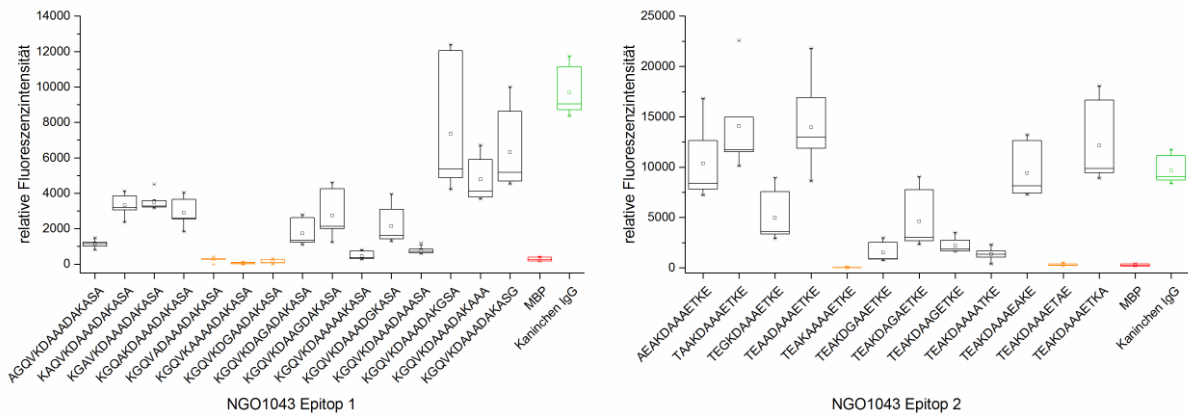


Abbildung 3.23: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der beiden identifizierten Epitope von NGO1043 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der Peptide mit jeweils einer ausgetauschten Aminosäure von Epitop 1 (links) und Epitop 2 (rechts). Jede Aminosäure der Epitopregion wurde gegen Alanin ausgetauscht. Im Falle von Alanin wurde dieses durch Glycin ersetzt. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG (grün), als Negativkontrolle MBP (rot) immobilisiert. Peptide, deren mittlere Signalintensitäten auf Höhe der Negativkontrolle liegen, sind orange markiert.

Das erste Epitop von NGO1429 bestand aus elf Aminosäuren (DAGRIAGLDVK) und zeigte eine deutliche Abhängigkeit der Bindung zum Antikörper im C-terminalen Peptidbereich (Abbildung 3.24 links). Während der Austausch der ersten sechs Aminosäuren (DAGRIA) zu keinem Abfall der Signalintensität führte (Mittelwerte zwischen 4000 AU und 7000 AU), sorgte der Austausch der hinteren fünf Aminosäuren (GLDVK) bei fast allen Peptiden zu einem kompletten Signalverlust. Der Austausch von Valin an der vorletzten Stelle des Epitopeptids wies eine mittlere Signalintensität von ungefähr 1000 AU auf. Dennoch entsprach die Abnahme des Signals für Valin 84 % und nahezu 100 % für die anderen vier Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Peptids. Der Alaninscan des zweiten Epitops (EAVKDFFGKEPRKDV) zeigte ebenfalls einen Bereich auf, der für die Antikörperbindung entscheidend war (Abbildung 3.24 rechts). Während die ersten vier und hinteren sechs Aminosäuren Signalintensitäten von über 3500 AU besaßen, war eine Signalabnahme im mittleren Bereich des Peptids erkennbar. Für vier aufeinanderfolgende Aminosäuren (Aminosäuren 5–8: Asparaginsäure, zwei Mal Phenylalanin, Glycin) wurden mittlere Signalintensitäten unter 500 AU detektiert, was einer Abnahme von 86–99 % entsprach. Der Austausch der nächsten Aminosäure (Glycin) in der Peptidsequenz wies ebenfalls eine geringere Signalintensität als der Austausch der Aminosäuren im vorderen und hinteren Bereich des Peptids auf. Allerdings war die Abnahme des Signals auf 1800 AU nicht so deutlich wie bei den mittleren vier Aminosäuren.

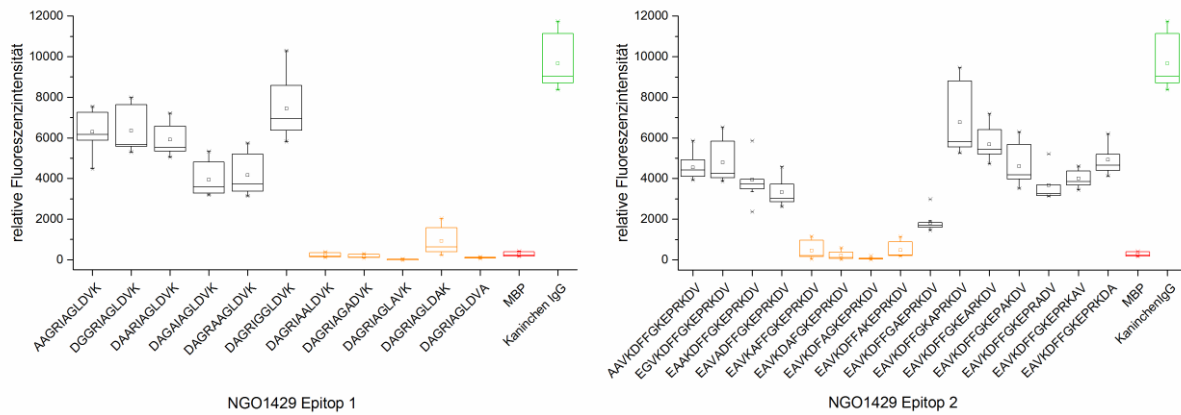


Abbildung 3.24: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der beiden identifizierten Epitope von NGO1429 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der Peptide mit jeweils einer ausgetauschten Aminosäure von Epitop 1 (links) und Epitop 2 (rechts). Jede Aminosäure der Epitopregion wurde gegen Alanin ausgetauscht. Im Falle von Alanin wurde dieses durch Glycin ersetzt. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG (grün), als Negativkontrolle MBP (rot) immobilisiert. Peptide, bei denen der Austausch der entsprechenden Aminosäure kritisch für die Antikörperbindung war, sind orange markiert.

Die beiden identifizierten Epitope von NGO1577 wurden per Alaninscan weiter charakterisiert (Abbildung 3.25). Das erste Epitop (VEQAPQYVDETISLS) zeigte hohe Signale für alle Peptide. Die mittleren Signale der meisten Peptide lagen oberhalb von 9000 AU. Nur zwei Peptide (3 und 4), bei denen ein Glutamin bzw. Alanin ausgetauscht wurde, zeigten eine Signalabnahme auf 4000 AU und 4500 AU, was einem Signalverlust von 68 % bzw. 63 % entsprach. Durch den Alaninscan des zweiten Epitops (AEAQDNLKVLAAQRLS) wurden drei Aminosäuren identifiziert, die die Antikörper-Epitop-Bindung kritisch beeinflussen. Der Austausch der Glutaminsäure an Position 2, von Asparagin an Position 6 und Arginin an Position 13 hatten Signalverluste von 92–98 % zur Folge. Die mittleren Signalintensitäten lagen bei 1000 AU, 800 AU bzw. 290 AU. Des Weiteren zeigten der Austausch der Asparaginsäure an Position 5 und der Austausch des Leucins an Position 10 schwächere Signalintensitäten (61 % bzw. 63 %) als die restlichen Peptide.

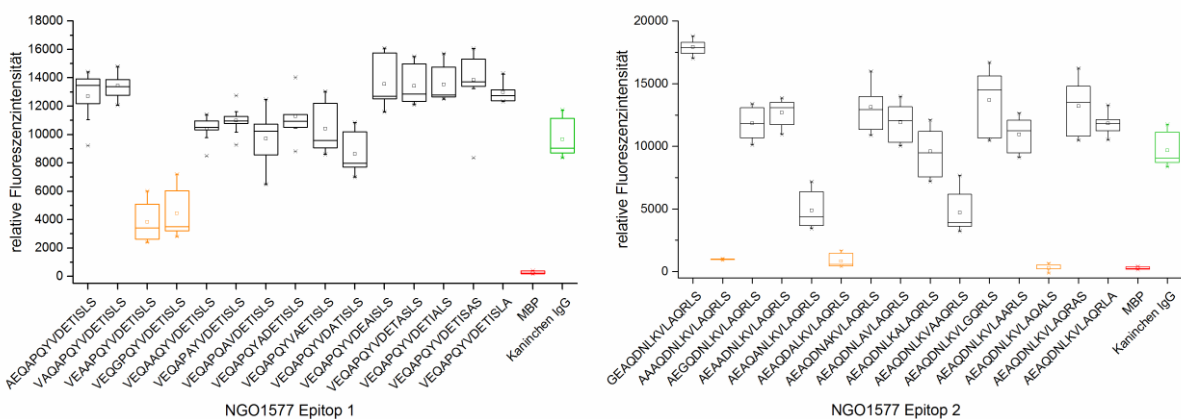


Abbildung 3.25: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der beiden identifizierten Epitope von NGO1577 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der Peptide mit jeweils einer ausgetauschten Aminosäure von Epitop 1 (links) und Epitop 2 (rechts). Jede Aminosäure der Epitopregion wurde gegen Alanin ausgetauscht. Im Falle von Alanin wurde dieses durch Glycin ersetzt. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG (grün), als Negativkontrolle MBP (rot) immobilisiert. Peptide, bei denen der Austausch der entsprechenden Aminosäure kritisch für die Antikörperbindung war, sind orange markiert.

Im Gegensatz zu dem nicht einheitlichen Bindungsmuster der drei Antikörper gegen *N. gonorrhoeae* beim Epitopmapping von NGO1634, zeigte der Alaninscan des Epitops deutliche Unterschiede in den

3 Ergebnisse

einzelnen Peptiden (Abbildung 3.26 links). Das Epitop (YEPSDFDAKNHQI) mit einer Länge von 13 Aminosäuren zeigte beim Austausch von sieben Aminosäuren mittlere Signale von über 4000 AU. An den Positionen 4–7, 9 und 11 lagen sechs Aminosäuren, deren Austausch einen kritischen Einfluss auf die Bindung des Antikörpers hatte. So hatte der Austausch der vier aufeinanderfolgenden Aminosäuren SDFD (Peptid 4–7) einen nahezu vollständigen Signalverlust zur Folge. Der Austausch der Aminosäuren 9 (Lysin) und 11 (Histidin) hatte den gleichen Effekt.

Der Alaninscan des Epitopeptids von NGO1656 zeigte generell niedrige Signalintensitäten mit einem Mittelwert von 1300 AU (Abbildung 3.26 rechts). Der Austausch der Asparaginsäure an Position 4 sorgte für den größten Signalverlust auf 70 AU und somit unter die Intensität der Negativkontrolle. Ein Austausch der Aminosäuren an Positionen 6, 7 und 10 sorgte für eine Signalabnahme um 73 %, 63 % und 79 % verglichen mit dem mittleren Signal der anderen Peptide. Aufgrund der niedrigen mittleren Signalintensitäten unter 1000 AU von sieben Peptiden war eine eindeutige Aussage über kritische Aminosäuren für die Antikörperbindung schwierig.

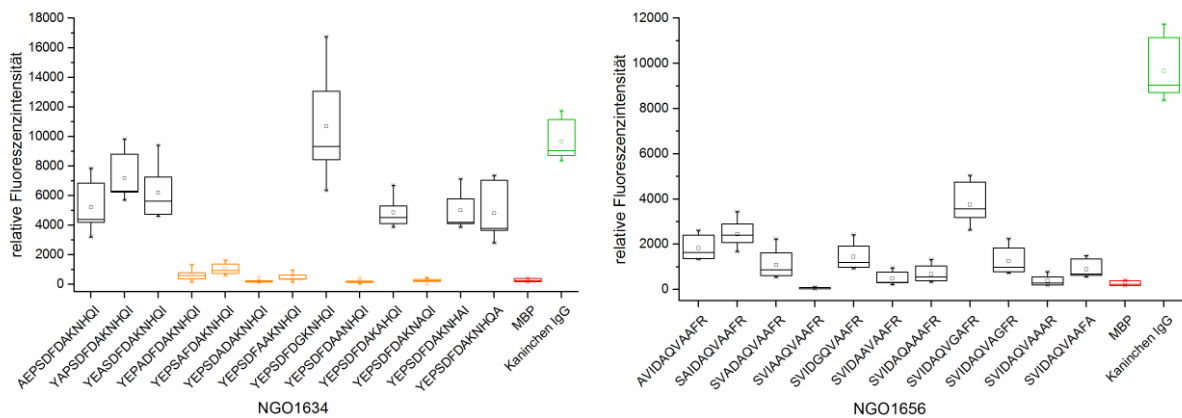


Abbildung 3.26: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der identifizierten Epitope von NGO1634 und NGO1656 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der Peptide mit jeweils einer ausgetauschten Aminosäure der Epitope von NGO1634 (links) und NGO1656 (rechts). Jede Aminosäure der Epitopregion wurde gegen Alanin ausgetauscht. Im Falle von Alanin wurde dieses durch Glycin ersetzt. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG (grün), als Negativkontrolle MBP (rot) immobilisiert. Peptide, bei denen der Austausch der entsprechenden Aminosäure kritisch für die Antikörperbindung war, sind orange markiert.

Die Alaninscans der Epitope von NGO1796 zeigten ebenfalls schwache Signale mit einer mittleren Signalintensität von 1000 AU (Abbildung 3.27). Für Epitop 1 hatte der Austausch von drei Aminosäuren einen vollständigen Signalverlust als Ergebnis. Die drei Aminosäuren waren Isoleucin an Position 4, Asparaginsäure an Position 6 und Leucin an Position 9. Der Austausch der Aminosäuren Asparaginsäure und Isoleucin an Position 5 und 7 des zweiten Epitops hatte ebenfalls einen vollständigen Signalverlust zur Folge.

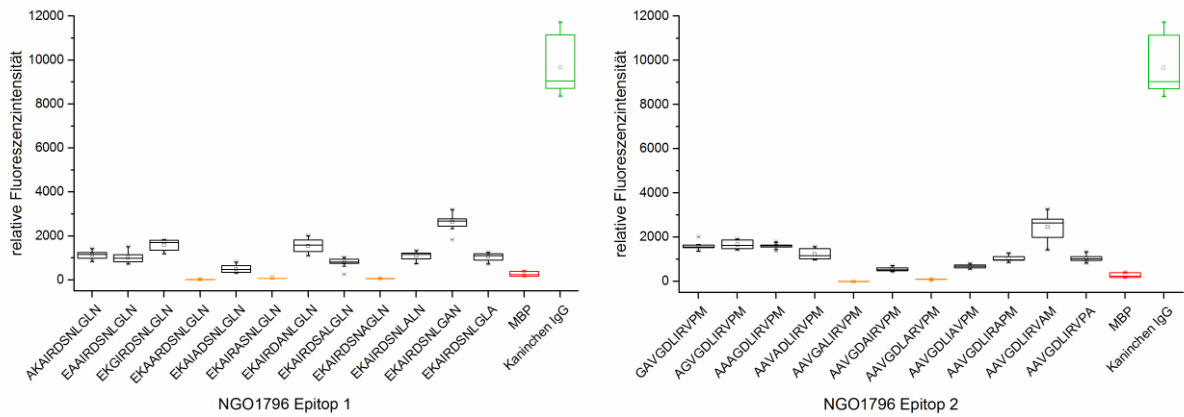


Abbildung 3.27: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der beiden identifizierten Epitope von NGO1796 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der Peptide mit jeweils einer ausgetauschten Aminosäure von Epitop 1 (links) und Epitop 2 (rechts). Jede Aminosäure der Epitopregion wurde gegen Alanin ausgetauscht. Im Falle von Alanin wurde dieses durch Glycin ersetzt. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG (grün), als Negativkontrolle MBP (rot) immobilisiert. Peptide, bei denen der Austausch der entsprechenden Aminosäure kritisch für die Antikörperbindung war, sind orange markiert.

Für das Epitop von NGO1852 hatten elf der 15 Peptide Signalintensitäten über 15000 AU (Abbildung 3.28). Ein Austausch von Prolin an der sechsten Position des Peptids (3000 AU) führte ebenso zu einem Signalverlust wie ein Austausch von Glycin an achter (4000 AU) und zehnter (2000 AU) Position oder der Asparaginsäure an Position 13 (5000 AU). Die Signalabnahme lag bei den vier Peptiden zwischen 67 % und 87 %.

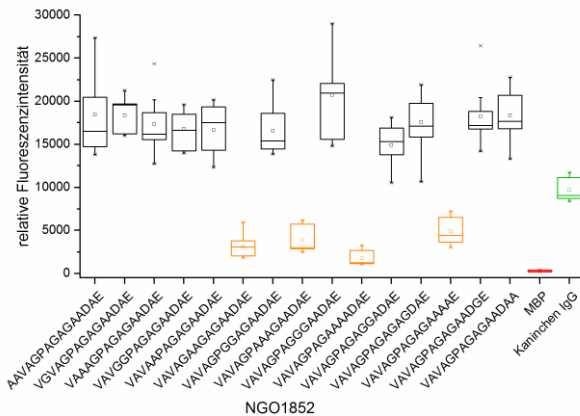


Abbildung 3.28: Box-Whisker-Plot des Alaninscans des identifizierten Epitops von NGO1852 (n = 9).

Der Box-Whisker-Plot zeigt die relativen Fluoreszenzintensitäten der Peptide mit jeweils einer ausgetauschten Aminosäure des Epitops von NGO1852. Jede Aminosäure der Epitopregion wurde gegen Alanin ausgetauscht. Im Falle von Alanin wurde dieses durch Glycin ersetzt. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG (grün), als Negativkontrolle MBP (rot) immobilisiert. Peptide, bei denen der Austausch der entsprechenden Aminosäure kritisch für die Antikörperbindung war, sind orange markiert.

Beide Alaninscans von NGO2094 wiesen Signalintensitäten mit starken Schwankungen zwischen den einzelnen Peptiden auf (Abbildung 3.29). So lagen acht der elf Peptide des ersten Epitops zwischen von 5000 AU und 21000 AU. Drei Peptide fielen unter den Wert von 5000 AU. Der Austausch der Aminosäuren Threonin, Serin und Glycin an den Positionen 4, 6 und 7 führte zu Signalverlusten von 89 %, 72 % und 97 % verglichen mit dem Mittelwert aller anderen Peptide. Für Epitop 2 lagen die Signalintensitäten der meisten Peptide über 8000 AU. Der Austausch der Aminosäuren an Position 6 (Asparaginsäure) und 7 (Glycin) hatte Signalabnahmen auf 5000 AU und 2500 AU zur Folge.

3 Ergebnisse

Komplette Signalverluste wurden durch den Austausch der Aminosäuren an Positionen 3 (Isoleucin) und 9 (Arginin) erhalten.

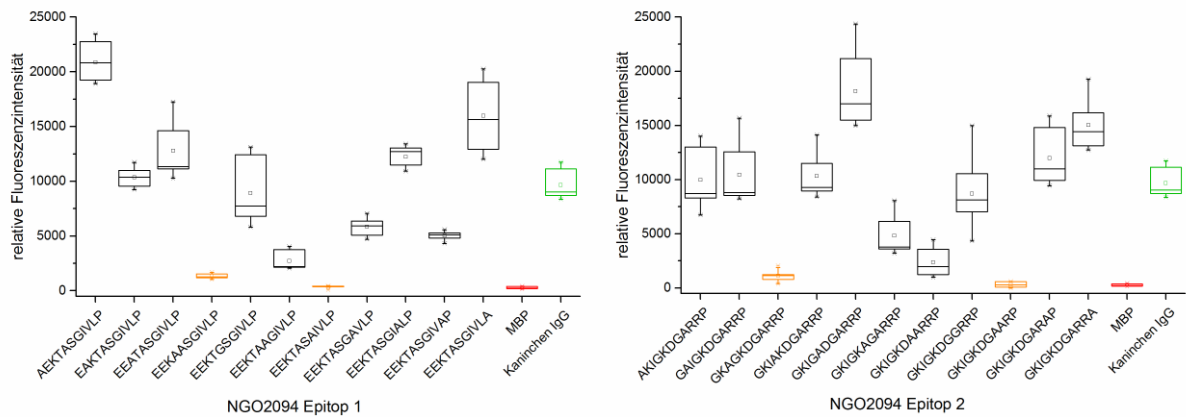


Abbildung 3.29: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der beiden identifizierten Epitope von NGO2094 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der Peptide mit jeweils einer ausgetauschten Aminosäure von Epitop 1 (links) und Epitop 2 (rechts). Jede Aminosäure der Epitopregion wurde gegen Alanin ausgetauscht. Im Falle von Alanin wurde dieses durch Glycin ersetzt. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG (grün), als Negativkontrolle MBP (rot) immobilisiert. Peptide, bei denen der Austausch der entsprechenden Aminosäure kritisch für die Antikörperbindung war, sind orange markiert.

Für NGO2095 wurden sechs Epitopregionen mittels Alaninscan überprüft. Fünf der sechs identifizierten Epitope wiesen einzelne Aminosäuren oder Bereiche innerhalb des Epitops auf, die einen Einfluss auf die Bindung des Antikörpers hatten. Abbildung 3.30 zeigt die Ergebnisse des Alaninscans für Epitope 1 und 2 anhand von Box-Whisker-Plots. Bei Epitop 1 (PKGRNVVVDRAFG) lagen die mittleren Signale bei zehn Peptiden oberhalb von 25000 AU, während ein Peptid knapp unterhalb dieses Werts lag. Nur zwei aufeinanderfolgende Peptide zeigten Signalintensitäten unterhalb von 15000 AU. Die Signalabnahme um 53 % bzw. 71 % trat bei einem Austausch der Asparaginsäure an Position 9 bzw. Arginin an Position 10 auf. Für Epitop 2 (DEQVGAIIEA) lagen die mittleren Signalintensitäten von acht Peptiden über 19000 AU, das mittlere Signal des Peptids an Position 3 bei 12600 AU. Der Austausch von Glycin an Position 5 und Isoleucin an Position 7 zeigte deutliche Signalabnahmen um 76 % bzw. 88 % auf 6000 AU und 3000 AU.

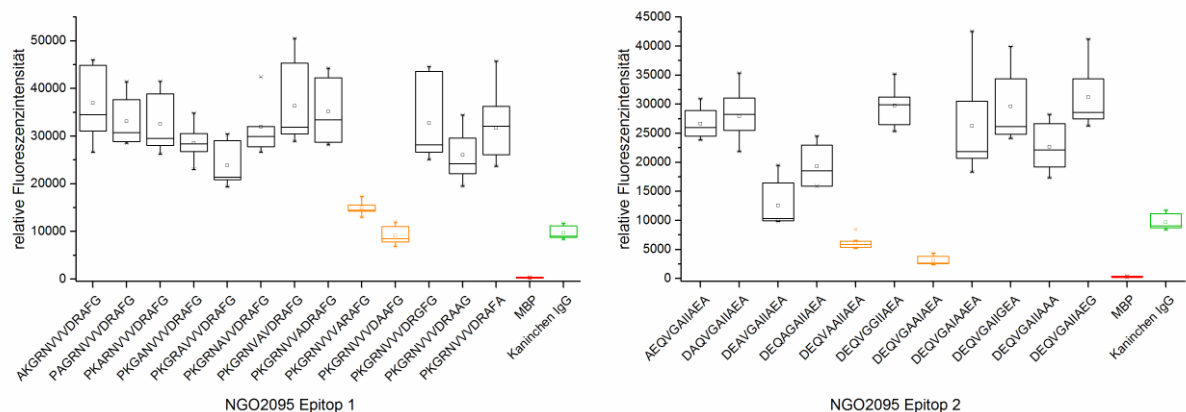


Abbildung 3.30: Box-Whisker-Plots der Alaninscans des ersten und zweiten identifizierten Epitops von NGO2095 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der Peptide mit jeweils einer ausgetauschten Aminosäure von Epitop 1 (links) und Epitop 2 (rechts). Jede Aminosäure der Epitopregion wurde gegen Alanin ausgetauscht. Im Falle von Alanin wurde dieses durch Glycin ersetzt. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG (grün), als Negativkontrolle MBP (rot) immobilisiert. Peptide, bei denen der Austausch der entsprechenden Aminosäure kritisch für die Antikörperbindung war, sind orange markiert.

Die Box-Whisker-Plots der Alaninscans für die Epitope 3 und 4 sind in Abbildung 3.31 dargestellt. Epitop 3 (FDRGYLSPYFI) zeigte nur bei fünf Peptiden Signalintensitäten über 2000 AU, jedoch beim Austausch der Aminosäuren an den Position 2 und Positionen 4–8 mittlere Signale zwischen 20 AU und 600 AU. Der Austausch der Asparaginsäure an Position 2 sorgte für einen Signalverlust um 97 % und eine Signalintensität unterhalb der Negativkontrolle. Die fünf aufeinanderfolgenden Aminosäuren GYLSP an den Positionen 4–8 führten, mit Ausnahme des Lysins, zu Signalverlusten von 94–98 %. Der Austausch des Lysins hatte einen Verlust des Signals von 84 % zur Folge. Die Signalintensitäten des Alaninscans von Epitop 4 (EKKDRVEDALH) konnten in drei Gruppen unterteilt werden. Sechs Peptide zeigten Signalintensitäten über 15000 AU. Peptide 8 und 10 lagen knapp unterhalb der Positivkontrolle bei 8500 AU. Die drei aufeinanderfolgenden Peptide mit einem Aminosäureaustausch an den Positionen 5–7 Arginin, Valin und Glutaminsäure wiesen Signalintensitäten von 1900 AU, 3900 AU und 1400 AU auf, was einer Signalabnahme von 90 %, 79 % bzw. 92 % entsprach.

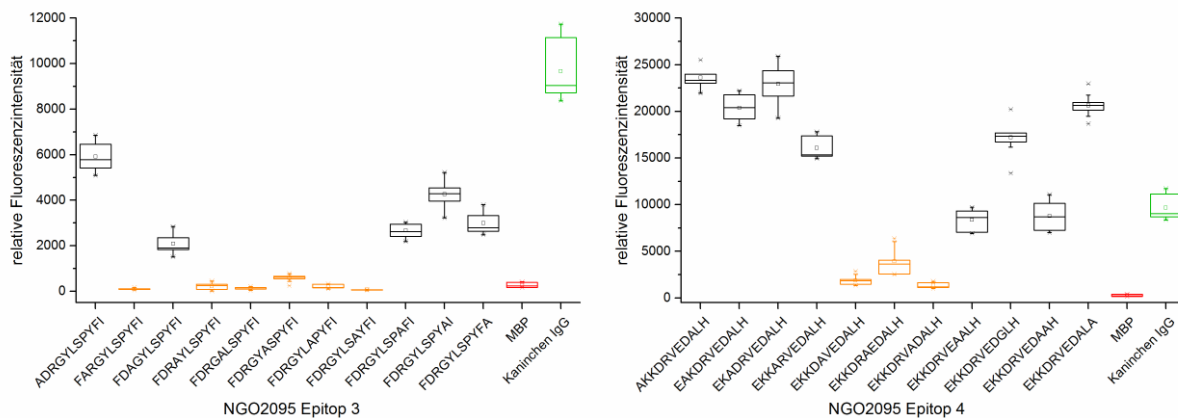


Abbildung 3.31: Box-Whisker-Plots der Alaninscans des dritten und vierten identifizierten Epitops von NGO2095 (n = 9).

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der Peptide mit jeweils einer ausgetauschten Aminosäure von Epitop 3 (links) und Epitop 4 (rechts). Jede Aminosäure der Epitopregion wurde gegen Alanin ausgetauscht. Im Falle von Alanin wurde dieses durch Glycin ersetzt. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG (grün), als Negativkontrolle MBP (rot) immobilisiert. Peptide, bei denen der Austausch der entsprechenden Aminosäure kritisch für die Antikörperbindung war, sind orange markiert.

Abbildung 3.32 zeigt die Ergebnisse des Alaninscans für Epitope 1 und 2 anhand von Box-Whisker-Plots. Die Peptide von Epitop 5 (YGYNAGSGEYGDMIG) zeigten ebenfalls Signalintensitäten in drei verschiedenen Bereichen. Elf Peptide zeigten mittlere Signalintensitäten über 17500 AU. Der Austausch der drei aufeinanderfolgenden Aminosäuren Glycin, Serin und Glycin an den Positionen 6–8 hatte Signalintensitäten zwischen 7300 AU und 10900 AU zur Folge. Der Austausch der Glutaminsäure an Position 9 führte zu einem Signalverlust von 96 % auf 800 AU. Für das sechste Epitop (GVLDPAKVTRSALQH) wurden mittels Alaninscan keine kritischen Aminosäuren für die Antikörperbindung detektiert. Alle Peptide lagen mit ihren mittleren Signalen über 6000 AU. Zwar variieren die Werte unter den verschiedenen Peptiden zwischen 6000 AU und 17500 AU, aber eine eindeutige Abgrenzung war aufgrund der überlappenden Boxen und Whisker nicht möglich.

3 Ergebnisse

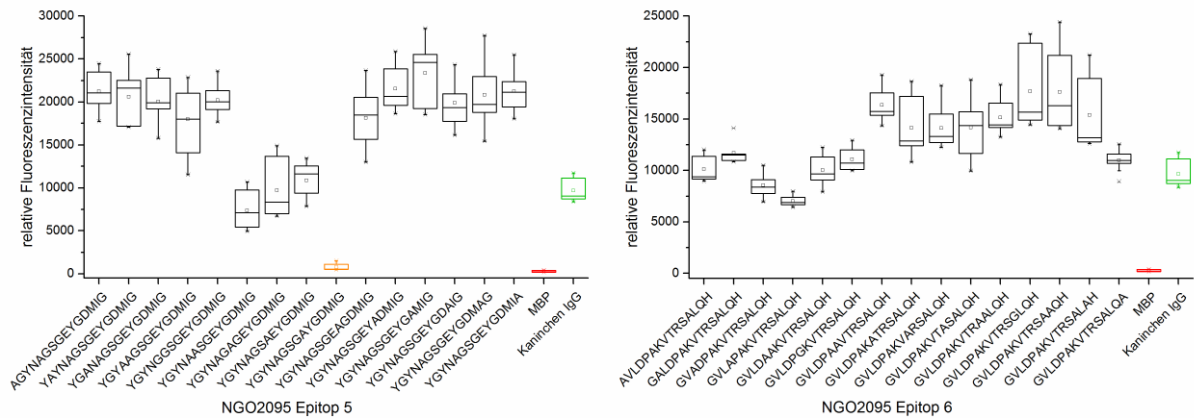


Abbildung 3.32: Box-Whisker-Plots der Alaninscans des fünften und sechsten identifizierten Epitops von NGO2095 (n = 9). Die Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der Peptide mit jeweils einer ausgetauschten Aminosäure von Epitop 5 (links) und Epitop 6 (rechts). Jede Aminosäure der Epitopregion wurde gegen Alanin ausgetauscht. Im Falle von Alanin wurde dieses durch Glycin ersetzt. Als Positivkontrolle wurde Kaninchen IgG (grün), als Negativkontrolle MBP (rot) immobilisiert. Peptide, bei denen der Austausch der entsprechenden Aminosäure kritisch für die Antikörperbindung war, sind orange markiert.

Der Alaninscan des identifizierten Epitops von NGO170 (LLAREKIAAGATETI) wurde mittels immobilisierter Peptide auf einer Cellulose Membran durchgeführt. Zunächst wurde die Membran nur mit Puffer und anschließend mit Sekundärantikörper inkubiert, um die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an die immobilisierten Peptide auszuschließen. Nach der Regeneration wurde die Membran mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert und die Bindung der Antikörper durch die Zugabe des Substrats DAB nachgewiesen. Die Sekundärantikörperkontrolle und die Ergebnisse des Alaninscans mit Primär- und Sekundärantikörper sind in Abbildung 3.33 dargestellt. Die Negativkontrolle an Position 17 zeigte hierbei die schwächste Verfärbung. Der Austausch der vier Aminosäuren Isoleucin, Alanin, Alanin und Glycin an den Positionen 7–10 zeigte eine schwächere Verfärbung als die restlichen Peptide und das Epitopeptid an Position 16. Auch der Austausch der ersten drei Aminosäuren Leucin, Leucin und Alanin hatte eine leichte Signalabnahme zur Folge.

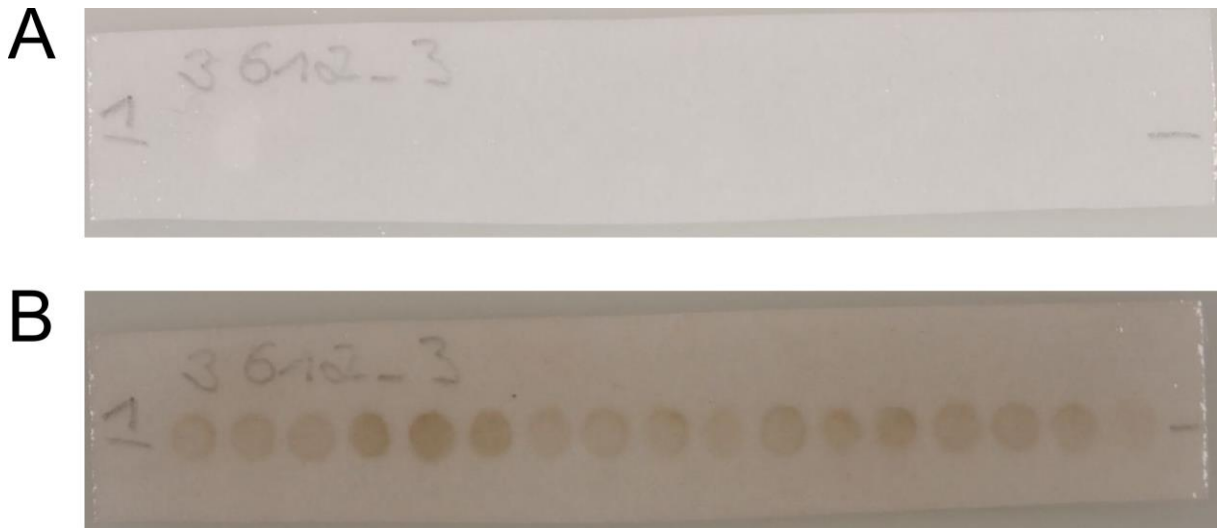


Abbildung 3.33: Alaninscan des Epitops von NGO0170 mittels immobilisierter Peptide auf einer Cellulose Membran (Lot# 3612_3).

Das erste und letzte Peptid sind mit einem Minus markiert. Das erste Peptid ist zusätzlich mit einer 1 versehen. Die Sequenzabfolge von links nach rechts ist wie folgt: 1 ALAREKIAAGATETI, 2 LAAREKIAAGATETI, 3 LLAREKIAAGATETI, 4 LLAAEKIAAGATETI, 5 LLARAKIAAGATETI, 6 LLAREKIAAGATETI, 7 LLAREKIAAGATETI, 8 LLAREKIAAGATETI, 9 LLAREKIAAGATETI, 10 LLAREKIAAGATETI, 11 LLAREKIAAGATETI, 12 LLAREKIAAGAAETI, 13 LLAREKIAAGATATI, 14 LLAREKIAAGATEAI, 15 LLAREKIAAGATETA, 16 LLAREKIAAGATETI, 17 TESYLAQASAKMQQQ. **A)** Die Inkubation erfolgte nur mit Puffer und dem Sekundärantikörper. Die anschließende Zugabe des Substrats zeigte eine minimale Verfärbung der gesamten Membran. **B)** Die Inkubation erfolgte mit einem polyklonalen *N. gonorrhoeae* Antikörper und dem Sekundärantikörper. Die anschließende Zugabe des Substrats führte zu einer Farbreaktion der Spots. Der letzte Spot (17) wurde als Kontrollpeptid mitgeführt und weist die niedrigste Farbreaktion auf. Peptid 16 ist das ursprüngliche Epitopeptid ohne Punktmutation.

Für die im Epitopmapping negativen Proteine NGO0451, NGO0642, NGO1657 und NGO2139 wurden keine Alaninscans durchgeführt. NGO0983 wies während des Epitopmappings Signalintensitäten für sieben aufeinanderfolgende Peptide auf, allerdings hauptsächlich für einen Antikörper. Da kein Epitopeptid definierbar war, wurde für NGO0983 auch kein Alaninscan durchgeführt.

3.7 Erstellen der Proteinmodelle

Für alle immunogenen Proteine wurden Proteinmodelle mit I-TASSER erstellt. Die Qualität jedes einzelnen Modells wurde mit QMEAN bewertet. Der QMEAN Wert bewegt sich in einem Bereich zwischen 0 und 1, wobei höhere Werte ein zuverlässigeres Proteinmodell wiedergeben. Proteinmodelle mit Werten unter 0,4 sind daher nicht zuverlässig und entsprechen einer zufälligen Struktur. Die durch Panning isolierten Polypeptide wurden daraufhin in den monomeren Modellen markiert. Des Weiteren wurden die identifizierten Epitopregionen und die für die Antikörperbindung kritischen Aminosäuren farblich hervorgehoben. Lag das homologe Protein als Multimer vor, wurden der Übersicht halber nur die Epitope markiert.

Bei NGO0170, mit einer vorhergesagten Lokalisation in der zytoplasmatischen Membran, liegt das identifizierte Polypeptid am C-terminalen Ende des Proteins – drei α -Helices und zwei β -Faltblätter umfassend. In der Mitte des Polypeptids wurde eine Epitopregion identifiziert und im Strukturmodell hellblau hervorgehoben. Die Bewertung der Qualität des Modells mittels QMEAN lieferte einen Wert von 0,652. Das strukturelle Homolog mit der höchsten Übereinstimmung ist ein Heterotetramer, das in *Haemophilus influenza* vorkommt [184] (PDB ID: 2NQ2). Es besteht aus zwei gleichen Ketten, die die Membran durchziehen und zwei gleichen Ketten, die sich in das Zytoplasma erstrecken, wobei

3 Ergebnisse

NGO0170 den Bereich abdeckt, der in das Zytoplasma hineinreicht. Das Epitop ist am unteren Ende der in das Zytoplasma reichenden Ketten präsentiert. Das Modell des Mono- und Multimers von NGO0170 ist in Abbildung 3.34 A und B dargestellt.

Das durch Phage Display identifizierte Polypeptid von NGO0326 ist ebenfalls am C-terminalen Ende des Proteins lokalisiert und umfasst ein β -Faltblatt und eine Random Coil Struktur. Das identifizierte Epitop liegt mittig leicht zum C-terminalen Ende des Polypeptids versetzt. Die Analyse mittels QMEAN bestätigte das Modell mit einem Wert von 0,630. Das strukturelle Homolog mit der höchsten Übereinstimmung ist ein Homohexamer von *Lysteria monocytogenes* [185], das zyklisch angeordnet ist (PDB ID: 4NL2). Der Abgleich der Sequenzen aller verfügbaren PDB Homologe endete jedoch direkt vor dem identifizierten Epitop, sodass die Epitopregion nicht in dem Modell vorhanden war. Daher ist nur das Monomer in Abbildung 3.34 C dargestellt, das Multimer ist nicht abgebildet.

Das 102 Aminosäuren umspannende Polypeptid von NGO0564 liegt am N-Terminus des Proteins. Die in der PDB Datenbank verfügbaren Modellsequenzen begannen jedoch erst ab Aminosäure 287, sodass der komplette Bereich davor nicht über bekannte Strukturen modelliert wurde. Daher liegt der Großteil des Polypeptids als Random Coil Struktur vor. Die zwei identifizierten Epitopregionen (hellblau) wurden mit den für die Bindung wesentlichen Aminosäuren (grün) im Proteinmodell hervorgehoben. Das erste Epitop liegt direkt am Anfang des Polypeptids und Proteins, das zweite am Ende des Polypeptids, aber immer noch in dem Bereich, der bei den Alignments nicht abgedeckt wurde. Die Bewertung des Modells ergab bei QMEAN einen Wert von 0,487. Das strukturelle Homolog liegt als Homotetramer (PDB ID: 4N72) in *E. coli* [186] vor. Allerdings war auch hier keine Modellierung des Epitops möglich, da der entsprechende Bereich nicht im homologen Modell vorhanden war. Das Strukturmodell und die identifizierten Epitope sind in Abbildung 3.34 D dargestellt.

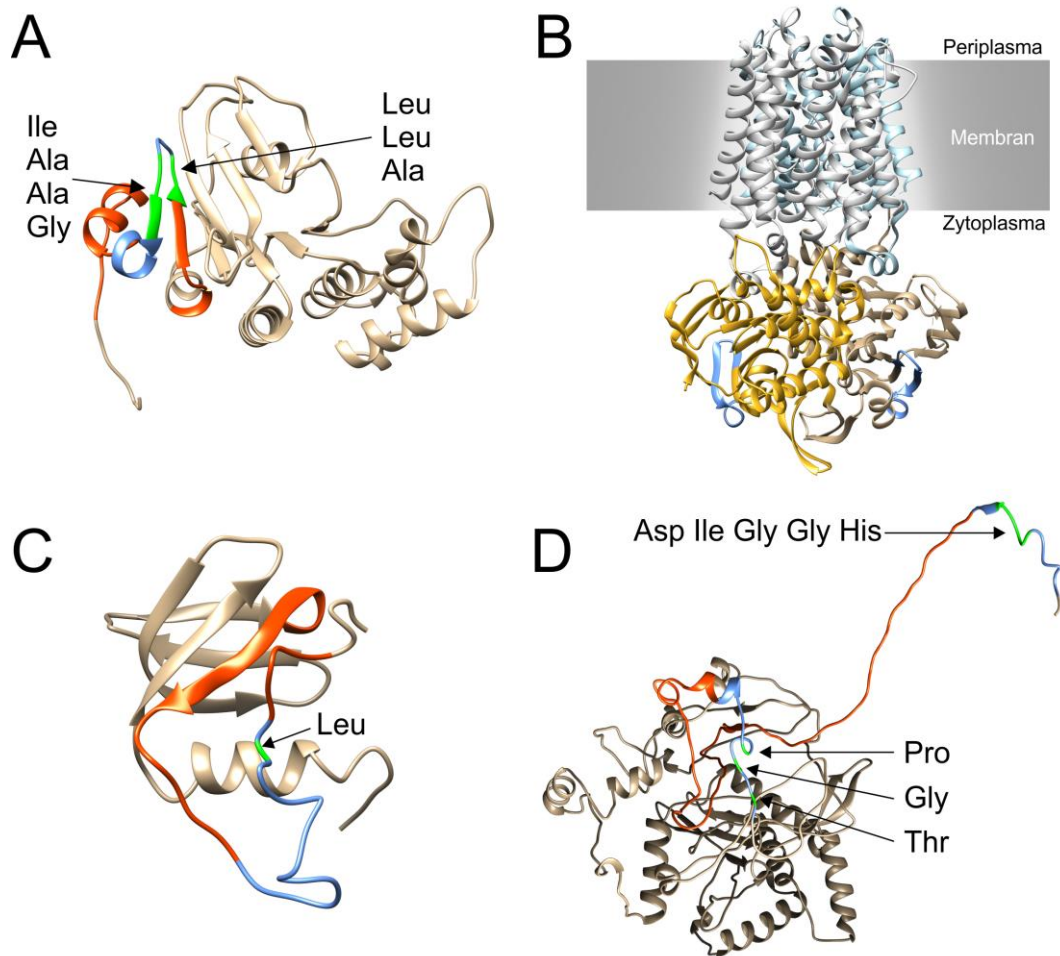


Abbildung 3.34: Strukturmodelle der immunogenen Proteine NGO0170 (A und B), NGO0326 (C) und NGO0564 (D).

Die isolierten Polypeptide sind orange-rot markiert, identifizierte Epitopregionen sind in hellblau eingefärbt und einzelne Aminosäuren oder Bereiche, die für die Bindung der Antikörper ausschlaggebend sind, sind hellgrün hervorgehoben und mit einem Pfeil und der entsprechenden Abkürzung der Aminosäure versehen. B) Heterotetramer eines Strukturhomologs von NGO0170 eingebettet in die zytoplasmatische Membran (PDB ID: 2NQ2).

Die beiden Phagen-präsentierten Polypeptide von NGO0592 waren beide in der Mitte der Aminosäuresequenz des Proteins lokalisiert. Abbildung 3.35 A zeigt das generierte Modell mit den beiden Phagen-präsentierten Polypeptiden, dem identifizierten Epitop und der für die Antikörperbindung kritischen Aminosäure. Das identifizierte Epitop umfasste eine α -Helix und einige Aminosäuren, die in Random Coils strukturiert sind. Die QMEAN Qualitätsbeurteilung des Modells ergab einen Wert von 0,618 und die Sequenzalignments deckten die gesamte Proteinsequenz ab. Das homologe Protein mit der höchsten strukturellen Übereinstimmung lag als Monomer (PDB ID: 1W26) vor und wurde aus *E. coli* isoliert [187]. Da es sich bei dem homologen Proteine um ein Monomer handelt, ist nur das berechnete Modell dargestellt.

Das isolierte Polypeptid von NGO0777 befand sich am N-terminalen Ende des Proteins. Das Modell ist in Abbildung 3.35 B als Monomer und in C als Homodimer eines strukturellen Homologs dargestellt. Die Sekundärstruktur des Polypeptidbereichs bestand größtenteils aus zwei α -Helices. Die Sequenz mit der höchsten Strukturähnlichkeit aus der PDB Datenbank deckte die komplette Sequenz ab. Der als Qualitätsindikator von QMEAN bestimmte Wert lag bei 0,586. Das Epitop liegt im hinteren Bereich des Polypeptids und bestand ausschließlich aus einer α -helikalen Struktur. Die in der

3 Ergebnisse

PDB Datenbank strukturell nächsten Homologe waren zwei DNA-bindende Proteine (PDB IDs: 1P71, 1P51) aus *Anabaena* sp., einem Cyanobakterium, die als Homodimere an die DNA binden [188].

Das Modell des im Zytoplasma lokalisierten Proteins NGO0916 wurde durch fehlende Sequenzalignments erst ab Aminosäure 161 angelehnt an die homologe Struktur modelliert (Abbildung 3.35 D). Der QMEAN Wert des Modells betrug 0,420 und lag somit knapp oberhalb der Ausschlussgrenze. Der Bereich vor der homologen Sequenz ist daher größtenteils als Random Coil dargestellt. Sowohl das durch Phage Display isolierte Polypeptid als auch das identifizierte Epitop befinden sich in diesem Bereich. Ein als Epitop in der IEDB Datenbank hinterlegter Bereich (DEILIDIETDKVVL) [189], das auch auf dem isolierten Polypeptid lag, ist dunkelgrün markiert. Dieses Epitop wurde jedoch bei den Epitopmappings nicht identifiziert. Das strukturell nächstgelegene Homolog ist die katalytische Domäne der Dihydrolipoamid Succinyltransferase aus *E. coli* (nicht publiziert, PDB ID 1SCZ), die in ihrer Quartärstruktur als Homo-24-mer vorkommt. Wie bei dem Monomer von NGO0916 waren auch beim Multimer die Bereiche des Polypeptids und Epitops nicht Teil des Modells.

Das generierte Modell von NGO0983 hatte einen QMEAN Wert von 0,571, bestand jedoch hauptsächlich aus Random Coil Strukturen (Abbildung 3.35 E). Das durch Phage Display isolierte Polypeptid nahm mehr als die Hälfte der Proteinsequenz ein. Aufgrund des großen Epitopbereichs, der sich über sieben überlappende Peptide erstreckte, wurde kein Alaninscan durchgeführt. Das Protein mit der höchsten strukturellen Ähnlichkeit war eine humane KIF9 Motor Domäne (nicht publiziert, PDB ID: 3NWN), die als Homotetramer vorkommt. Ebenfalls unter den zehn ähnlichsten strukturellen Homologen war Colicin IA [190], das von einigen *E. coli* Stämmen produziert, aus den Zellen ausgeschleust wird und dort toxisch auf kompetitive *E. coli* Stämme wirkt.

Das identifizierte Polypeptid von NGO1043 ist mittig im größtenteils aus α -Helices bestehenden Proteinmodell lokalisiert (Abbildung 3.35 F). Das Protein besteht aus zwei parallelen α -helikalen Strängen, wobei der C-Terminus an der kürzeren Seite endet. Zwei Epitope wurden identifiziert, die sich direkt kurz vor und nach der Beugung des Proteins befinden. Ähnliche strukturelle Eigenschaften hatten ein synthetisches Monomer, das in *E. coli* exprimiert wurde [191], aber auch ein Frostschutzprotein der Flunder *Pseudopleuronectes americanus* [192].

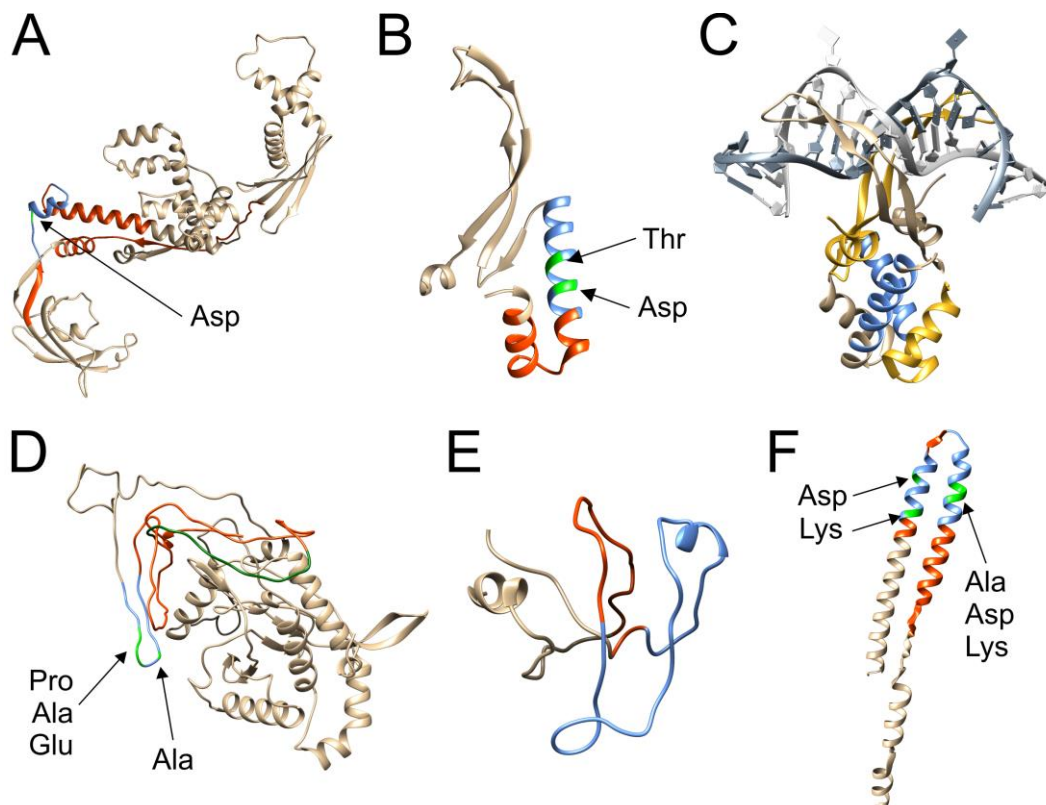


Abbildung 3.35: Strukturmodelle der immunogenen Proteine NGO0592 (A), NGO0777 (B und C), NGO0916 (D), NGO0983 (E) und NGO1043 (F).

Die isolierten Polypeptide sind orange-rot markiert, identifizierte Epitopregionen sind in hellblau eingefärbt und einzelne Aminosäuren oder Bereiche, die für die Bindung der Antikörper ausschlaggebend sind, sind hellgrün hervorgehoben und mit einem Pfeil und der entsprechenden Abkürzung der Aminosäure versehen. C) Homodimer eines Strukturhomologs von NGO0777 gebunden an einen DNA-Strang (PDB ID: 1P51).

Für NGO1429 wurden vier verschiedene immunogene Bereiche identifiziert, die sich über das gesamte Protein verteilen. Das berechnete Modell ist als Monomer in Abbildung 3.36 A und B aus verschiedenen Richtungen betrachtet dargestellt. Vier Epitopregionen wurden in drei der vier Polypeptidbereiche identifiziert und mittels Alaninscan wurden für zwei Epitope kritische Aminosäuren für die Antikörper-Epitop-Bindung detektiert. Die Epitope befinden sich sowohl in α -Helices als auch auf β -Faltblättern. Die QMEAN Qualitätsbeurteilung des Modells ergab einen Wert von 0,675. Das strukturell nächste Protein war das Chaperon HSP70 (PDB ID: 4JNE) aus *E. coli*, das als Homodimer vorkommt [193]. Die Epitopregionen und kritischen Aminosäuren sind im Homodimer auf der Oberfläche des Proteins präsentiert (Abbildung 3.36 C).

Die Phagen-präsentierten Polypeptidsequenzen von NGO1577 umfassten mehr als die Hälfte der gesamten Proteinsequenz. Es wurden zwei Epitope identifiziert und für die Antikörperbindung entscheidende Aminosäuren gefunden. Des Weiteren ist in Abbildung 3.36 D ein in *N. gonorrhoeae* beschriebenes Epitop [194] eingezeichnet (dunkelgrün im Hintergrund). Der QMEAN Wert lag bei 0,308 und somit unterhalb der Ausschlussgrenze für ein zuverlässiges Modell. Eine Metallopeptidase von *Mesorhizobium* sp. BNC1 (nicht publiziert, PDB ID: 3IUU) und eine Glukokinase von *Trypanosoma cruzi* (PDB ID: 2Q2R) [195] wurden von I-TASSER als Proteine mit den höchsten strukturellen Ähnlichkeiten ausgegeben.

3 Ergebnisse

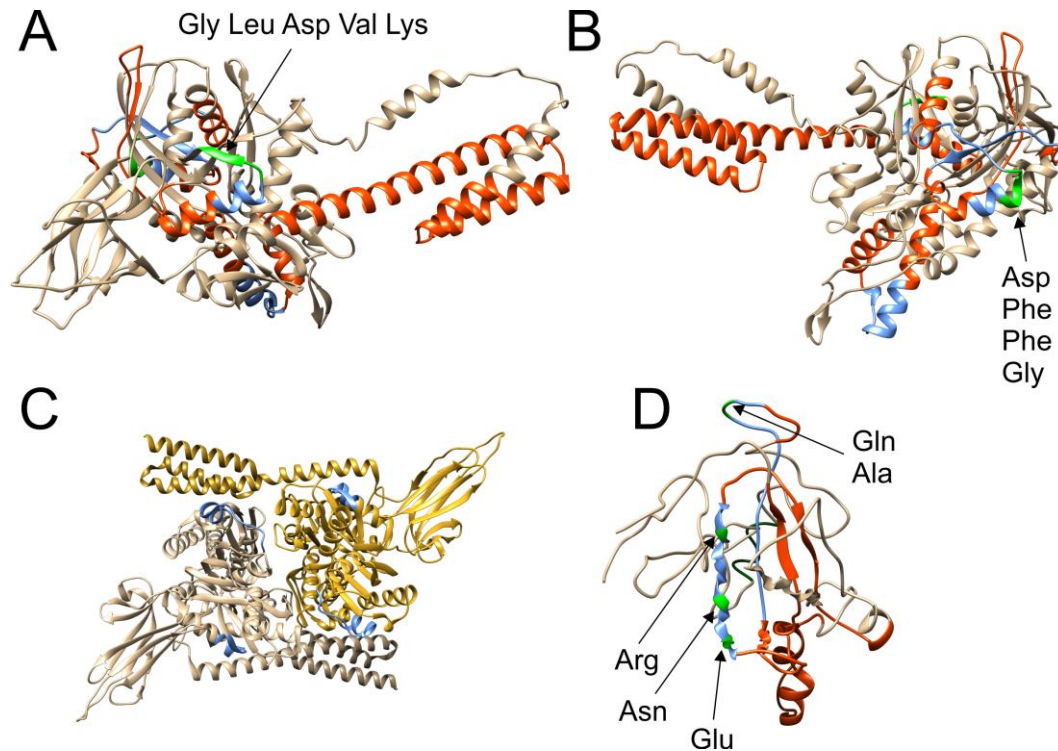


Abbildung 3.36: Strukturmodelle der immunogenen Proteine NGO1429 (A, B und C) und NGO1577 (D).

Die isolierten Polypeptide sind orange-rot markiert, identifizierte Epitopregionen sind in hellblau eingefärbt und einzelne Aminosäuren oder Bereiche, die für die Bindung der Antikörper ausschlaggebend sind, sind hellgrün hervorgehoben und mit einem Pfeil und der entsprechenden Abkürzung der Aminosäure versehen. B) NGO1429 180° um die y-Achse und 45° um die x-Achse gedreht. C) Homodimer eines Strukturhomologs von NGO1429 (PDB ID: 4JNE). D) Ein in der Literatur beschriebenes Epitop ist in dem dargestellten Modell mittig im Hintergrund dunkelgrün markiert.

Das erste von I-TASSER vorgeschlagene Modell für NGO1634 fiel aufgrund eines zu niedrigen QMEAN Werts durch (0,340). Nach einem QMEAN Vergleich der fünf erstellten Modelle wurde das zweite Modell mit dem höchsten QMEAN Wert (0,458) gewählt (Abbildung 3.37). Das isolierte Polypeptid und das identifizierte Epitop mit den für die Antikörperbindung wichtigen Aminosäuren wurden in dem Modell farblich hervorgehoben. Das Polypeptid befand sich im letzten Drittel vor dem C-Terminus, während das identifizierte Epitop ungefähr in der Mitte des Polypeptids lokalisiert war. Das strukturelle Analog mit der höchsten Übereinstimmung, bezogen auf das erste Modell, war ein Protein von *Kribella flavida* (nicht publiziert, PDB ID: 4G6Q), dessen Funktion nicht bekannt ist. Das Multimer ist nicht abgebildet, da es vom ersten Modell abgeleitet wurde, das bei QMEAN eine schlechte Qualität aufwies.

Das mittels Phage Display isolierte Polypeptid von NGO1656 ist direkt am Beginn des Proteins am N-Terminus lokalisiert und umfasst eine α -Helix und eine Random Coil Struktur. Das identifizierte Epitop liegt am C-terminalen Ende des Polypeptids. Der Wert für die Qualitätsbestimmung des Modells mittels QMEAN lag mit 0,414 knapp oberhalb der Ausschlussgrenze. Das von I-TASSER identifizierte Protein mit der höchsten strukturellen Ähnlichkeit war ein Homodimer von *Campylobacter jejuni* (nicht publiziert, PDB ID: 3RFW). Das Epitop lag im unteren Bereich des in Abbildung 3.37 dargestellten Modells, leicht verdeckt von der zweiten Proteintertiärstruktur.

Das Proteinmodell von NGO1796 ist hauptsächlich aus drei α -Helices aufgebaut (Abbildung 3.37 D). Zwischen der ersten und der zweiten α -Helix ist ein Bereich mit vielen Drehungen und Biegungen lokalisiert, aufgebaut durch kurze α -Helices, β -Faltblätter und Random Coils. Das isolierte Polypeptid

erstreckt sich über diesen gesamten Bereich und nimmt auch die Hälfte der zweiten α -Helix ein. Die zwei identifizierten Epitope liegen direkt hintereinander am äußersten Teil des variablen Strukturbereichs. Das erste Epitop ist Teil einer kurzen α -Helix und des darauffolgenden Random Coil Bereichs. Das zweite Epitop besteht hauptsächlich aus zwei β -Faltblättern. Die Qualitätsbewertung durch QMEAN ergab einen Wert von 0,675 für das generierte Modell. Die Proteine mit der höchsten strukturellen Ähnlichkeit waren Ribosom recycling Faktoren von *Vibrio parahaemolyticus* [196] und *E. coli* (nicht publiziert, PDB ID: 1ISE).

Das isolierte Polypeptid von NGO1852 erstreckt sich über drei α -Helices und ein β -Faltblatt in der Mitte des Proteins, leicht versetzt Richtung N-Terminus. Das Epitop ist mittig auf dem Phagen-präsentierten Polypeptid lokalisiert. Die Qualitätsanalyse mittels QMEAN ergab einen Wert von 0,560. Das strukturell ähnlichste Protein war ein ribosomales Protein L12 (PDB ID: 1DD3) von *Thermogota maritima* [197], dessen Quartärstruktur sich zu einem Heterotrimer ausbildet (Abbildung 3.37 F). Das Epitop ist in der homologen Quartärstruktur mittig, leicht nach innen versetzt, lokalisiert.

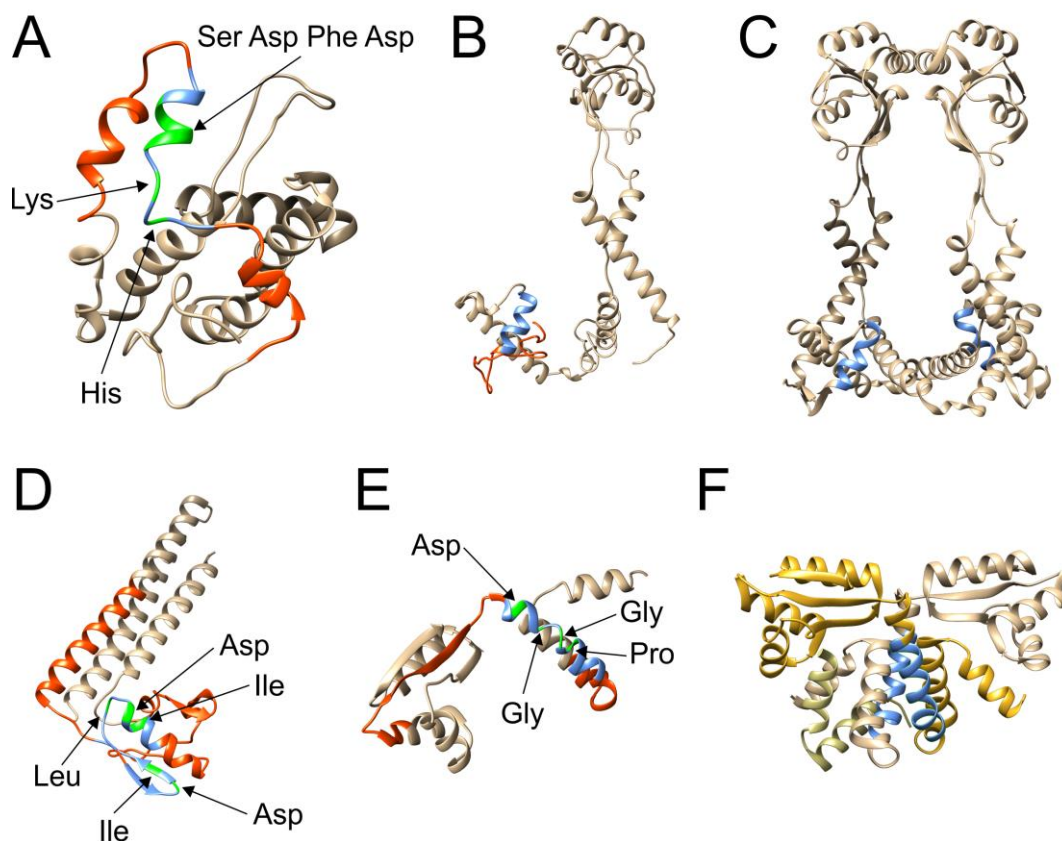


Abbildung 3.37: Strukturmodelle der immunogenen Proteine NGO1634 (A), NGO1656 (B und C), NGO1796 (D) und NGO1852 (E und F).

Die isolierten Polypeptide sind orange-rot markiert, identifizierte Epitopregionen sind in hellblau eingefärbt und einzelne Aminosäuren oder Bereiche, die für die Bindung der Antikörper ausschlaggebend sind, sind hellgrün hervorgehoben und mit einem Pfeil und der entsprechenden Abkürzung der Aminosäure versehen. C) Homodimer eines Strukturhomologs von NGO1656 (PDB ID: 3RFW). F) Heterotrimer eines Strukturhomologs von NGO1852 (PDB ID: 1DD3).

Das konstruierte Modell von NGO2094 wurde aufgrund der hohen Anzahl an Phagen-isolierten Polypeptiden zu einem großen Teil mittels Epitopmapping untersucht. Die zwei identifizierten

3 Ergebnisse

Epitope befinden sich an den äußeren Enden zweier nach außen präsentierter Bereiche des Proteins. Die für die Bindung des Antikörpers entscheidenden Aminosäuren befinden sich bei beiden Epitopen jeweils leicht versetzt vor und hinter einer Schleife. Die fünf von I-TASSER konstruierten Modelle hatten alle relativ niedrige QMEAN Werte. Das zweite Modell mit einem Wert von 0,434 ist in Abbildung 3.38 A abgebildet. Die Proteine mit der höchsten strukturellen Ähnlichkeit waren ein humanes mitochondriales Chaperon (PDB ID: 4PJ1, Abbildung 3.38 B) [198], das sich zu einem Hetero-28-mer zusammenlagert und der GroEL-GroES Komplex (PDB ID: 1PCQ) von *E. coli* [199], der aus einem Hetero-21-mer besteht. Die Strukturen unterschieden sich hauptsächlich darin, dass bei dem humanen Chaperonin an beiden Enden des GroEL Komplexes mehrere GroES-Ketten lokalisiert sind, während diese bei dem Chaperonin aus *E. coli* nur im unteren Bereich vorhanden waren. Die sechs identifizierten Epitopregionen von NGO2095 sind in Abbildung 3.38 C hellblau markiert. Der QMEAN Wert des Modells betrug 0,734. Das Protein mit der höchsten strukturellen Ähnlichkeit war das GroEL Protein (PDB ID: 1KP8) von *E. coli* [200], das sich aus 14 gleichen Proteinketten zusammensetzt. Die Epitope sind im Multimer farblich verschieden gekennzeichnet. Zwei Epitope (blau, rosa) werden auf der äußeren Oberfläche präsentiert, während die restlichen Epitope weiter im Inneren des Proteins eingeschlossen sind.

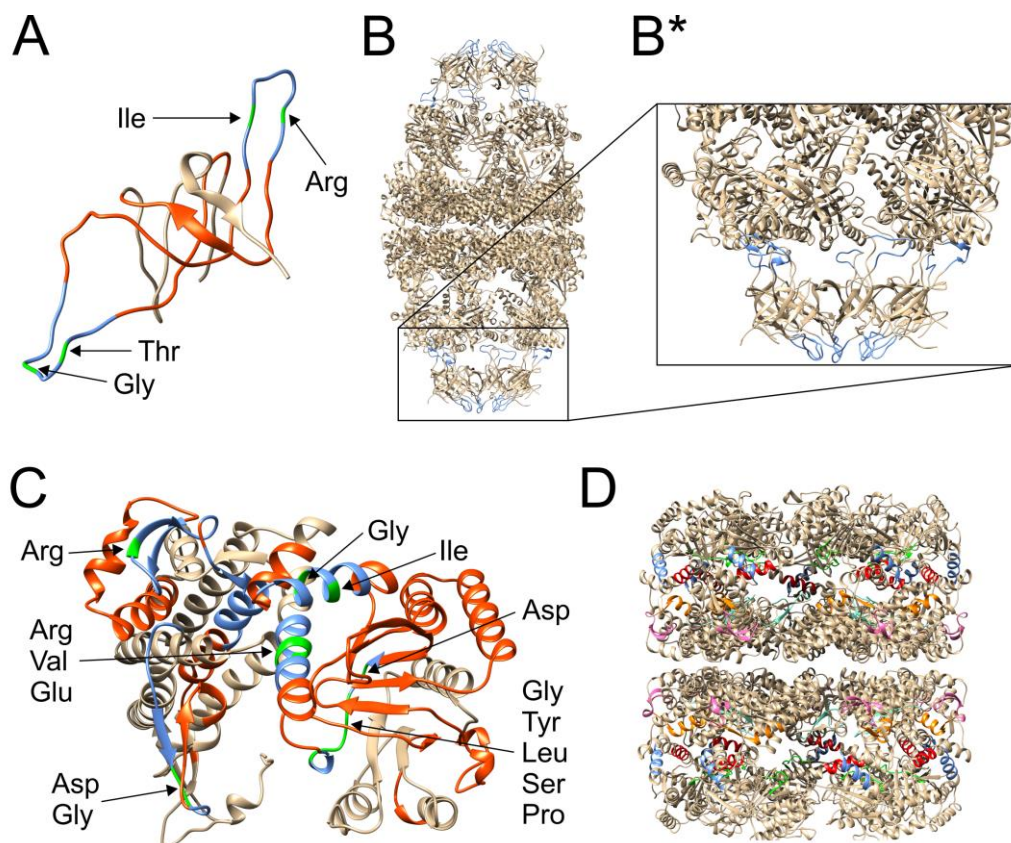


Abbildung 3.38: Strukturmodelle der immunogenen Proteine NGO2094 (A, B und B*) und NGO2095 (C und D).

Die isolierten Polypeptide sind orange-rot markiert, identifizierte Epitopregionen sind in hellblau eingefärbt und einzelne Aminosäuren oder Bereiche, die für die Bindung der Antikörper ausschlaggebend sind, sind hellgrün hervorgehoben und mit einem Pfeil und der entsprechenden Abkürzung der Aminosäure versehen. B) Hetero-28-mer eines Strukturhomologs von NGO2094. B*) Ausschnitt des Modells in B. D) Homo-21-mer eines Strukturhomologs von NGO2095.

Von NGO0584 und NGO2139 wurden die im Phage Display Screening identifizierten Polypeptide an die Proteinmodelle angepasst (Abbildung 3.39). Von NGO0642, das als Volllängenprotein validiert wurde, wurde ebenfalls ein Proteinmodell erstellt und die durch Phage Display isolierten Polypeptide farblich hervorgehoben (Abbildung 3.39). Allerdings wurden für alle drei Proteine keine linearen Epitope identifiziert, sodass nur die Polypeptide markiert sind. Für NGO0451 und NGO1657 wurden keine Proteinmodelle erstellt, da diese Proteine entweder keinen immunogenen Charakter als Volllängenproteine aufwiesen und daher auch keine linearen Epitope identifiziert wurden.

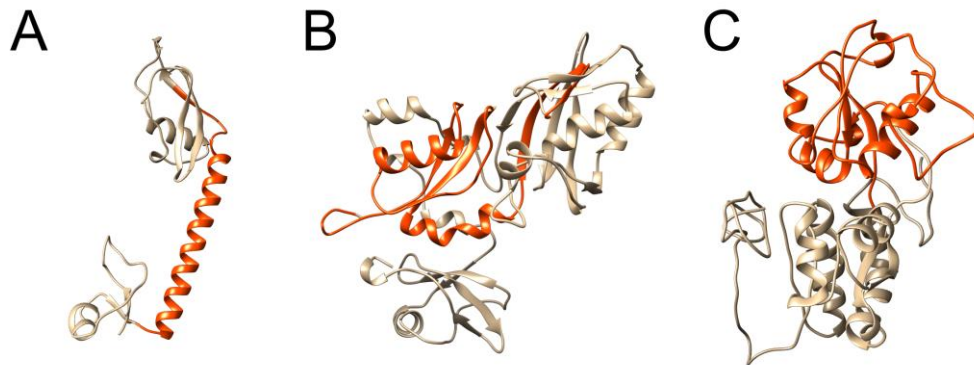


Abbildung 3.39: Strukturmodelle der immunogenen Proteine NGO0584 (A), NGO0642 (B) und NGO2139 (C).

Für die drei Proteine wurden keine Epitope identifiziert, sodass nur die isolierten Polypeptide in den Modellen orange-rot markiert sind.

3.8 Überprüfung der Transkription mittels quantitativer Echtzeit-PCR

Da das neu identifizierte immunogene Protein NGO1634 als „hypothetisches Protein, putativ Phagen-assoziiert“ annotiert ist, wurde die Transkription des entsprechenden Gens mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) überprüft. Die RNA wurde hierfür als biologisches Triplikat ausgehend von drei *N. gonorrhoeae* Kulturen isoliert. Um eine Degradation der RNA auszuschließen, wurde die RNA Integritäts Nummer (RIN) der einzelnen isolierten RNA Proben ermittelt. Der niedrigste RIN Wert lag bei 8,9. Je höher der RIN Wert (max. 10) desto weniger ist die RNA degradiert. Aus den drei RNA Ansätzen wurden cDNAs revers transkribiert. Die anschließende qPCR der drei cDNAs (Abbildung 3.40) und der entsprechenden Negativkontrollen (qPCR-NTC, RT-, RT-NTC) resultierte in folgenden Cp-Werten: $20,94 \pm 1,70$ für NGO0715 (Glukose-6-Phosphat 1-dehydrogenase, Positivkontrolle), $27,52 \pm 0,82$ für NGO1634 und > 35 für alle Negativkontrollen.

3 Ergebnisse

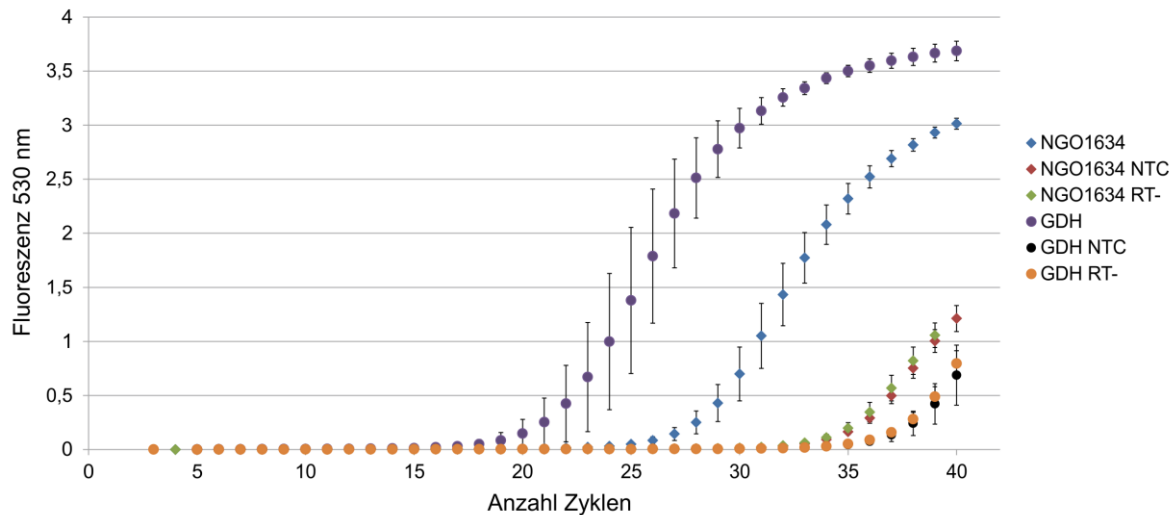


Abbildung 3.40: Ergebnisse der Transkriptionsanalyse von NGO1634 mittels qPCR.

Als Positivkontrolle wurde das Haushaltsgen GDH mitgeführt. Die Cp-Werte lagen für GDH bei $20,94 \pm 1,7$, für NGO1634 bei $27,52 \pm 0,82$ und über 35 für alle Negativkontrollen.

Des Weiteren wurde die Transkription der selektierten Proteine für die Antikörperisolierung (siehe Abschnitt 3.9) überprüft. Hierfür wurde die cDNA von nur einer RNA Extraktion verwendet. Die Diagramme der qPCR sind in Anhang VI beigefügt. Aufgrund der Übersichtlichkeit sind neben den cDNA Proben nur die RT- Kontrollen im Diagramm abgebildet. Folgende Cp-Werte wurden erhalten: NGO0715 (Glukose-6-Phosphat 1-Dehydrogenase, Positivkontrolle) 19,52, NGO1634 26,55, NGO0553 23,12, NGO0555 31,35, NGO1092 26,59, NGO1430 25,89, NGO1626 18,12, NGO1847 26,04. Die Cp-Werte der Negativkontrollen lagen größtenteils über 35 Zyklen. Folgende Kontrollen hatten Cp-Werte unterhalb von 35 Zyklen. Die Kontrollen von NGO0555 lagen oberhalb von 33 Zyklen. Die Kontrollen von NGO1626 zeigten Cp-Werte zwischen 33 und 34 Zyklen. Die Kontrollen von NGO1847 hatten relativ niedrige Cp-Werte von 31 Zyklen.

3.9 Auswahl der Proteine für die Antikörperproduktion

Für die rekombinante Expression von Antikörperfragmenten wurden durch bioinformatische Analyse, ausgehend von dem neu identifizierten, immunogenen Protein NGO1634, Nachbarschaftsproteine und funktionelle Partner mittels Datenbankrecherche in der String Datenbank gesucht. Zunächst wurden 26 Proteine zusätzlich zu NGO1634 ausgewählt und weiter mithilfe von BLASTs und Sequenzalignments, 3D-Struktur- und Lokalisationsvorhersagen, Hydrophobizitätsplots und im Falle von Membranproteinen auch die Membrantopologie analysiert. Aufgrund der bioinformatischen Analyse wurde die Anzahl der potentiellen Antigene von 27 auf 8 Proteine eingegrenzt.

3.9.1 Nachbarschaftsproteine und funktionelle Partnerproteine von NGO1634

Zuerst wurden entsprechende Proteine aus der String Datenbank ausgewählt, die möglichst nur in *N. gonorrhoeae* konserviert waren. Eine Übersicht der ausgewählten Proteine ist in Tabelle 3.6 aufgeführt. Die acht durch bioinformatische Analysen ausgewählten Proteine sind in der Tabelle mit einem Stern markiert. In Anhang VII ist zudem ein Beispiel für die visuelle Darstellung der funktionellen Partner in der String Datenbank abgebildet. Durch die Darstellung wird eine erste

Differenzierung zwischen konservierten und nicht konservierten Proteinen in verschiedenen Spezies ermöglicht.

Tabelle 3.6: Übersicht der ausgewählten Proteine für die Antikörperisolation.

Ausgehend von NGO1634 in der ersten Zeile der Tabelle wurden Nachbarschaftsproteine und funktionelle Partner durch Abgleich mit der String Datenbank ausgewählt. Die für die Antikörperisolation ausgewählten Proteine sind mit einem Stern versehen.

	Locus Tag	Protein	Vorhersage der Lokalisation mit PSORTb (bzw. PSORT)
	NGO1634*	Hypothetisches Protein, putatives Phagen-assoziiertes Protein	Zytoplasma
1	NGO0553*	TonB-abhängiger Rezeptor	Äußere Membran
2	NGO0554	Hypothetisches Protein	Äußere Membran (PSORT)
3	NGO0555*	Hypothetisches Protein	Äußere Membran
4	NGO0640	Putatives Restriktionsmodifikationssystem-R Protein	Zytoplasma
5	NGO0641	Typ III Restriktions/Modifikations System Methylase	Zytoplasma oder äußere Membran
6	NGO0953	Hypothetisches Protein	Zytoplasma (PSORT)
7	NGO1088	Hypothetisches Protein, putatives Phagen-assoziiertes Protein	Zytoplasma
8	NGO1089	Hypothetisches Protein, putatives Phagen-assoziiertes Protein	Zytoplasma (PSORT)
9	NGO1090	Hypothetisches Protein, putatives Phagen-assoziiertes Protein	Zytoplasma (PSORT)
10	NGO1091	Hypothetisches Protein, putatives Phagen-assoziiertes Protein	Zytoplasma (PSORT)
11	NGO1092*	Phagen-assoziiertes Protein	Äußere Membran
12	NGO1093	Phagen-assoziiertes Protein	Innere Membran (PSORT)
13	NGO1094*	Hypothetisches Protein, putatives Phagen-assoziiertes Protein	Zytoplasma
14	NGO1097	Hypothetisches Protein, putatives Phagen-assoziiertes Protein	Zytoplasma (PSORT)
15	NGO1098	Hypothetisches Protein, putatives Phagen-assoziiertes Protein	Zytoplasma
16	NGO1430*	Hypothetisches Protein	Äußere Membran (PSORT)
17	NGO1431	Hypothetisches Protein	Äußere Membran
18	NGO1432	Hypothetisches Protein	Periplasma (PSORT)
19	NGO1626*	Hypothetisches Protein, putatives Phagen-assoziiertes Protein	Zytoplasma (PSORT)
20	NGO1632	Hypothetisches Protein, putatives Phagen-assoziiertes Protein	keine Vorhersage
21	NGO1633	Hypothetisches Protein, putatives Phagen-assoziiertes Protein	Zytoplasma (PSORT)
22	NGO1636	DNA Replikationsprotein, Phagen-assoziiert	Zytoplasma
23	NGO1664	Hypothetisches Protein	Zytoplasma (PSORT)
24	NGO1847*	Hypothetisches Protein	Microbody (PSORT)
25	NGO2071	Konserviertes hypothetisches Protein	Zytoplasmatische Membran
26	NGO2113	Konserviertes hypothetisches Protein	Zytoplasma

3.9.2 BLAST und Multiple Alignments

Alle Proteine wurden daraufhin mittels BLAST Algorithmus und multipler Alignments in Geneious auf konservierte Bereiche in *N. gonorrhoeae* überprüft. Anhang VIII zeigt zwei Beispiele für die Auswahl eines möglichen konservierten Peptids und die Auswahl eines Proteins für die Antikörperisolation mittels Phage Display. Bereiche, die in *N. gonorrhoeae* konserviert waren und in anderen Bakterien einschließlich anderer *Neisseria* Arten Mutationen aufwiesen, wurden parallel mit Vorhersagen zur 3D-Struktur, der Lokalisation und Hydrophobizitätsplots auf ihre Eignung in Bezug auf Zugänglichkeit für Antikörper analysiert.

3.9.3 Vorhersage der Lokalisation und 3D-Struktur

Von den acht ausgewählten Proteinen sind laut Vorhersage vier Proteine in der äußeren Membran verankert, NGO1634 und zwei weitere Proteine zytoplasmatisch und NGO1847 liegt in Microbodies vor (vgl. Tabelle 3.6). Die 3D-Strukturmodelle sind in Abbildung 3.41 aufgeführt. Wenn ein Peptid als Antigen für die Antikörperisolation ausgewählt wurde, ist dieses in der 3D-Struktur farblich hervorgehoben. Für NGO1092 war aufgrund der Größe des Proteins keine Vorhersage der 3D-Struktur durchführbar. Die QMEAN Werte der einzelnen Strukturmodelle waren wie folgt: NGO0553 0,249 (Modell 3); NGO0555 0,169 (Modell 2); NGO1094 0,227 (Modell 3); NGO1430 0,248 (Modell 3); NGO1626 0,357 (Modell 1); NGO1634 0,458 (Modell 2) und NGO1847 0,325 (Modell 5). Die QMEAN Werte sind allesamt sehr niedrig, da die meisten ausgewählten Proteine hypothetische Proteine waren. Daher wurden zumeist weit entfernte Proteine für die Konstruktion der homologen Strukturmodelle von I-TASSER herangezogen.

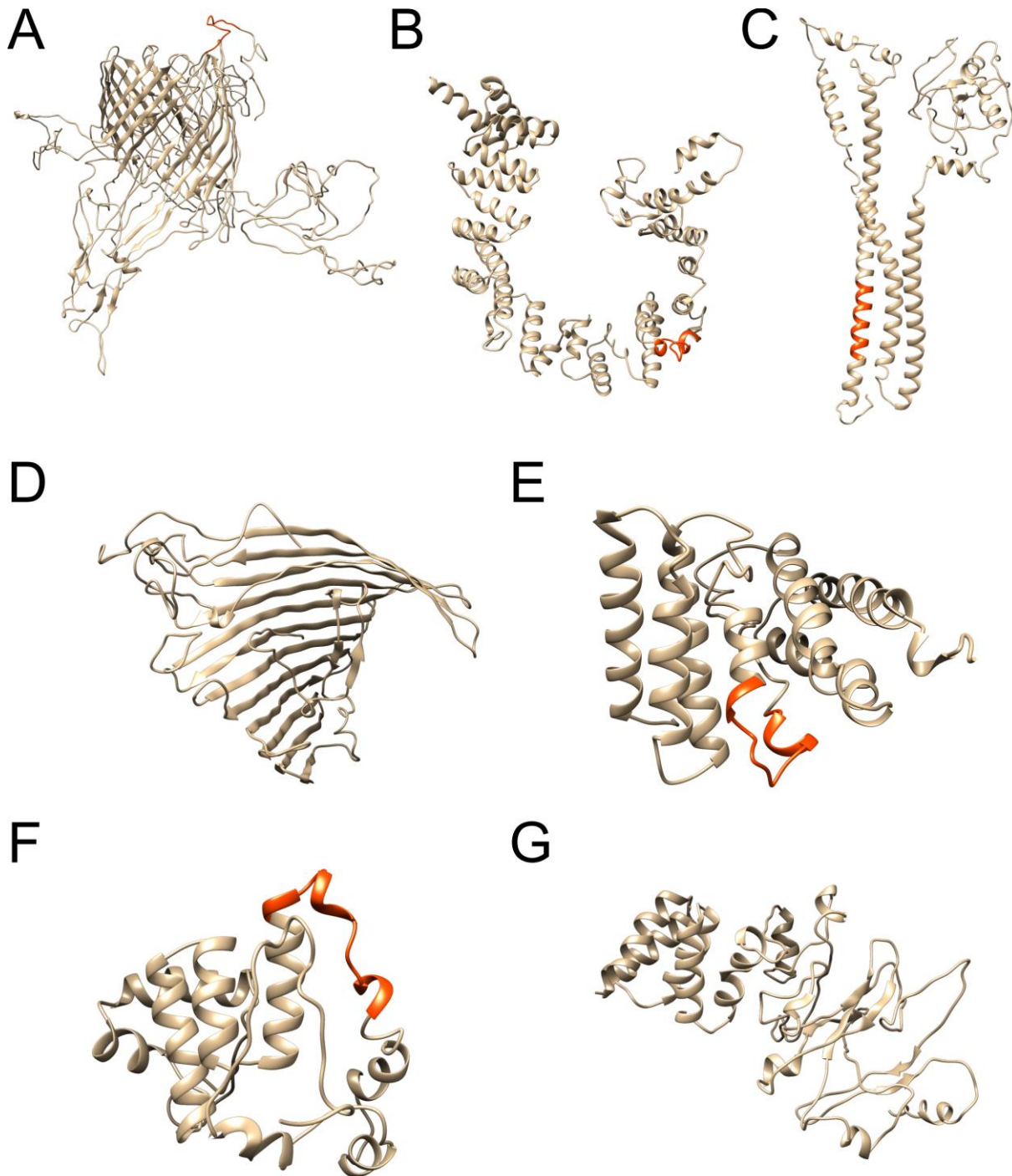


Abbildung 3.41: Vorhergesagte 3D-Strukturmodelle der acht ausgewählten Proteine für die Antikörperisolation.

Die 3D-Strukturmodelle wurden mittels I-TASSER berechnet. Die Überprüfung durch QMEAN ergab bei den meisten Modellen keine ausreichende Qualitätsbeurteilung. Bei Peptidantigenen ist der verwendete Peptidbereich farblich hervorgehoben. A) NGO0553 B) NGO0555 C) NGO1094 D) NGO1430 E) NGO1626 F) NGO1634 G) NGO1847.

3.9.4 Hydrophobizitätsplots

Als Beispiel für die durchgeführten Hydrophobizitätsplots ist in Abbildung 3.42 der Hydrophobizitätsplot des ausgewählten Peptids von NGO1634 dargestellt. Die Peptidbereiche sind in der Sequenz rot hervorgehoben. Die Aminosäuren des Peptids lagen zwischen -1 und -2 auf der y-Achse. Die Aminosäuren der Peptidsequenzen der sechs Peptidantigene befanden sich alle im nicht hydrophoben Bereich. Nur wenige Aminosäuren in dem gewählten Bereich vor und nach der Peptidsequenz hatten einen hydrophoben Charakter. Üblicherweise wird von einem hydrophoben

3 Ergebnisse

Bereich gesprochen, sobald 15–20 aufeinanderfolgende Aminosäuren eine positive Hydrophobizität aufweisen. Dies war bei keiner der Peptidsequenzen der Fall.

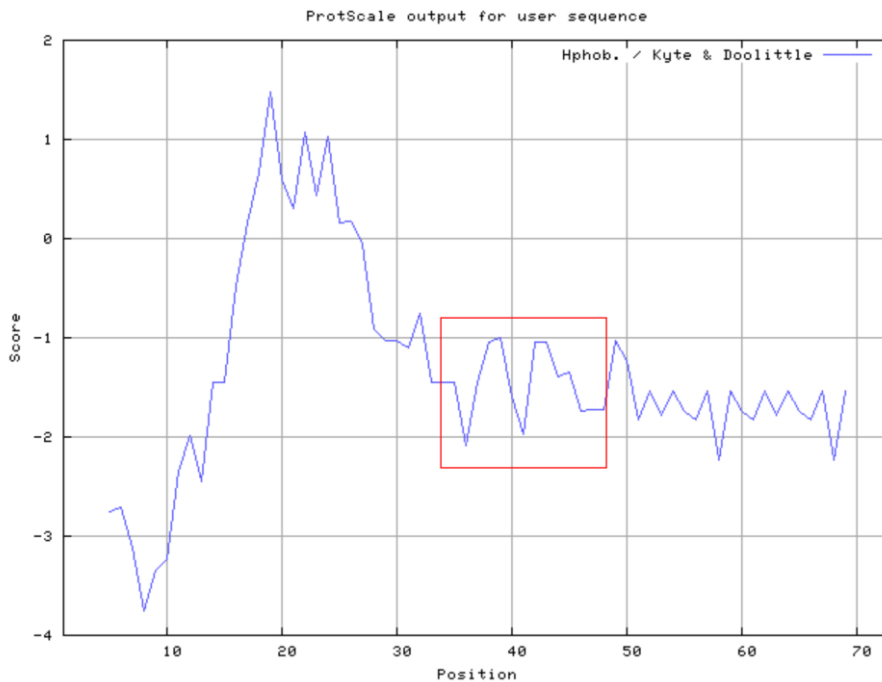


Abbildung 3.42: Hydrophobizitätsplot des Peptids von NGO1634.

Das Peptid ist durch ein rotes Rechteck umrahmt. Ca. 25 Aminosäuren vor und hinter dem Peptid wurden mitberechnet, um eine zuverlässige Aussage zu erhalten. Zwischen Position 17 und 27 befindet sich ein kurzer hydrophober Bereich, der sich ungefähr über 10 Aminosäuren erstreckt.

3.9.5 Transmembrantopologie und Vorhersage von Signalpeptiden

Bei den Membranproteinen, von denen nur Peptide als Antigene verwendet wurden, wurde zusätzlich noch die Transmembrantopologie analysiert. In Verbindung mit der Berechnung möglicher Signalpeptide kann so die Lokalisation von Membranproteinen vorhergesagt werden. Ein Beispiel für die Vorhersage ist in Abbildung 3.43 anhand von NGO1092 dargestellt. Die Vorhersagen der zwei verwendeten bioinformatischen Tools unterscheiden sich bezüglich der Bereiche, die außerhalb und innerhalb der Membran liegen. Das ausgewählte Peptid für die Antikörpergenerierung lag in der Sequenz zwischen 1279 bp und 1295 bp. Während TMPred diesen Bereich innerhalb der Membran vorhersagt, liegt der Bereich laut TMHMM außerhalb der Membran. Für NGO0553 und NGO0555 wurden jeweils Transmembrandomänen am N-Terminus identifiziert. Durch SignalP wurden diese Bereiche als Signalpeptide vorhergesagt, die im Zuge des Einbaus in die Membran abgespalten werden. NGO1092 und NGO1430 wiesen keine Signalpeptide auf.

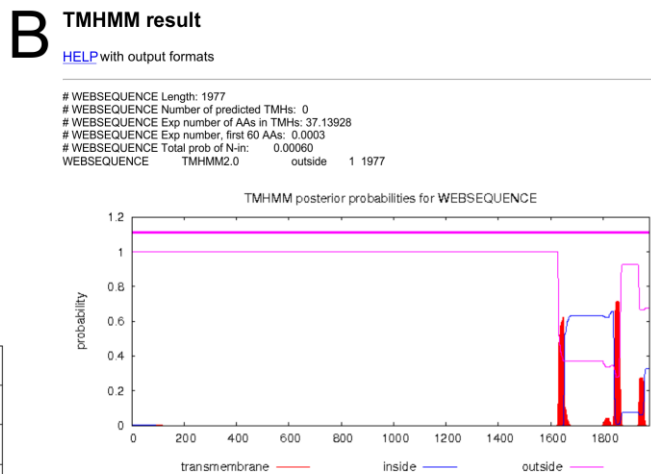
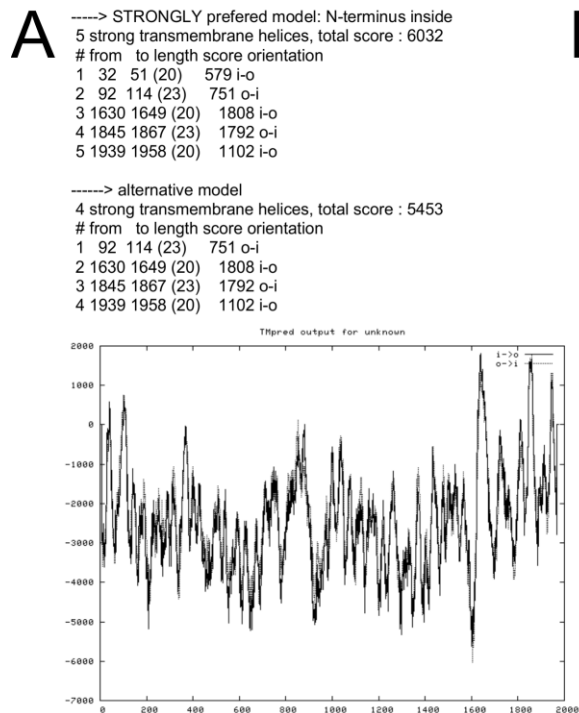


Abbildung 3.43: Beispiel der Datenoutputs von TMPred (A) und TMHMM (B) mit vorgeschlagenem Modell bzw. grafischer Übersicht für NGO1092.

Das präferierte Modell von TMPred geht von einem N-Terminus im Inneren mit fünf Transmembranhelices aus. Das ausgewählte Peptid für die Antikörpergenerierung läge somit auf der Innenseite der Membran. Die Vorhersage von TMHMM lokalisiert die ersten 1600 Aminosäuren außerhalb der Membran, womit das Peptid zugänglich für Antikörper wäre.

3.10 Produktion und Charakterisierung rekombinanter scFv-Antikörper

3.10.1 Panning und Screening mit der HAL9/10 Bibliothek

Die Pannings und Screenings erfolgten mit immobilisiertem Antigen und der humanen HAL9/10 scFv Phage Display Bibliothek. Für die acht Antigene wurden zunächst insgesamt 29 scFv-Antikörperfragmente isoliert. Eine Übersicht der CDR Regionen der isolierten Antikörper ist in Anhang IX aufgeführt.

3.10.2 Titrations-ELISA der scFv-Antikörper

Alle Antikörper wurden mittels Titrations-ELISA überprüft, wodurch ein Vergleich der Antikörper zu einem Antigen möglich war. Die y-Skalen der einzelnen Diagramme unterscheiden sich in ihren maximalen Werten von 1,5–3 AU. Die sechs isolierten Antikörper gegen das Antigen NGO1430 wiesen unterschiedliche Bindungsmuster auf (Abbildung 3.44 links). Klone B6 und D3 zeigten bei 100 µL des Überstands mindestens vierfach schwächere Signale im Vergleich zu den weiteren vier Antikörpern. Alle Antikörper zeigten bei der BSA Kontrolle keine Bindung. Die Antikörperbindung der Klone B6 und D3 könnte auch durch eine geringe Anzahl immobilisierter Proteine auf der Oberfläche limitiert sein. Um dies zu überprüfen, wurden alle Klone gegen dieses Antigen für die Umklonierung zur Produktion von scFv-Fc-Fusionsantikörpern mit humanem Fc-Teil ausgewählt.

Für die Peptide von NGO1094 und NGO1626 sowie für das Volllängenprotein NGO1847 wurde jeweils nur ein Antikörper isoliert (Abbildung 3.44 rechts). Alle drei zeigten vergleichsweise

3 Ergebnisse

schwaches Bindungsverhalten. Allerdings ist der Vergleich zwischen verschiedenen Peptiden oder verschiedenen Proteinen schwierig, da sie unterschiedlich gut an der Oberfläche immobilisiert sein können. Die drei Antikörper wurden für die Umklonierung als Fusionsantikörper ausgewählt.

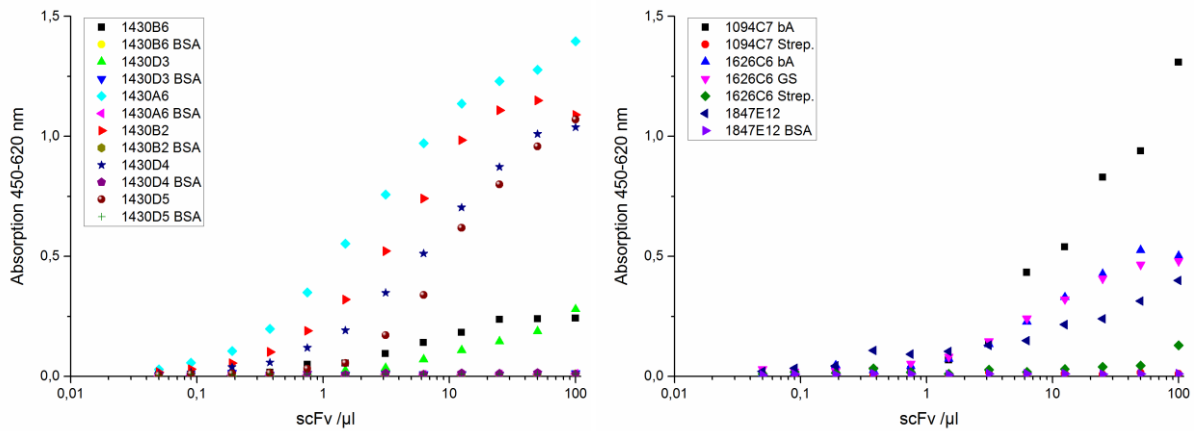


Abbildung 3.44: Ergebnisse der Titrations-ELISAs der isolierten Antikörper gegen die Volllängenproteine NGO1430 und NGO1847 und die Peptide von NGO1094 und NGO1626.

Die x-Achsen sind logarithmisch skaliert. **Links)** Sechs Antikörper wurden gegen das Antigen NGO1430 isoliert. Als Kontrolle wurde BSA immobilisiert und die unspezifische Bindung der Antikörper gemessen. Keiner der isolierten Antikörper zeigte eine unspezifische Bindung. Klone B6 und D3 zeigten eine wesentlich schwächere Bindung an das Antigen als die anderen Klone. **Rechts)** Titrations-ELISAs der isolierten scFv-Antikörper gegen die Peptide von NGO1094 und NGO1626 und das Vollständigprotein NGO1847. Für NGO1094 und NGO1626 wurden die Kontrollvertiefungen mit Streptavidin, für NGO1847 mit BSA beschichtet.

Die Antikörper gegen die Peptidantigene von NGO0553 und NGO0555 zeigten einen sigmoidalen Verlauf für beide Peptide während die Streptavidin Negativkontrollen keinen Signalanstieg aufwiesen (Abbildung 3.45). Bei NGO0555 hatte der Klon F3 jedoch einen wesentlich niedrigeren Kurvenverlauf als die anderen drei Antikörper gegen dasselbe Peptid. Daher wurden diese drei Klone und der Klon gegen NGO0553 für die Umklonierung ausgewählt.

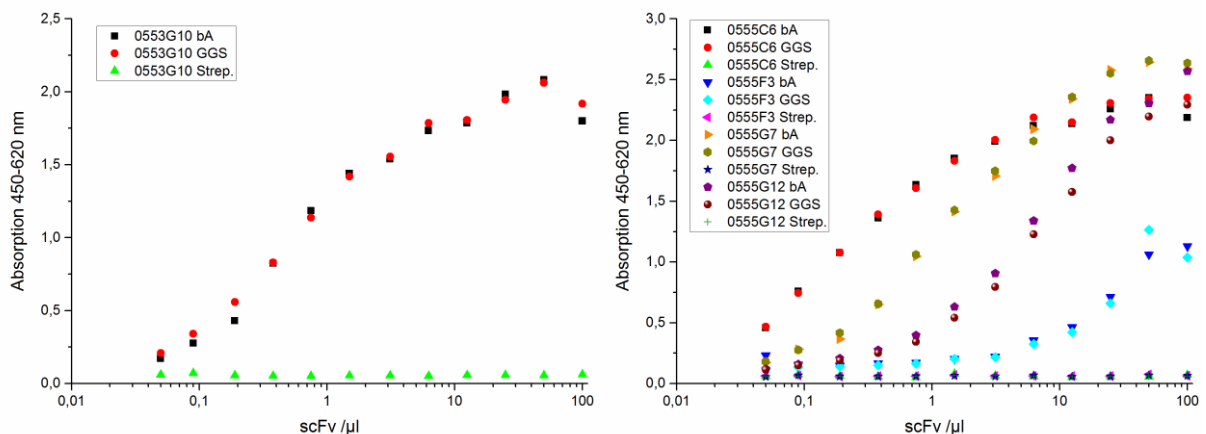


Abbildung 3.45: Ergebnisse der Titrations-ELISAs der isolierten Antikörper gegen die Peptidantigene von NGO0553 und NGO0555.

Die x-Achsen sind logarithmisch skaliert. Die y-Achsen der beiden Diagramme haben unterschiedliche Maxima. Als Kontrolle wurde Streptavidin immobilisiert. **Links)** Titrations-ELISA des Antikörperklons G10 gegen NGO0553. **Rechts)** Titrations-ELISAs der isolierten scFv-Antikörper gegen das Peptid von NGO0555. Alle Klone bis auf F3 wurden umkloniert.

Gegen das Peptid von NGO1092 wurden neun scFv-Antikörper isoliert. Die Ergebnisse der Titrations-ELISAs sind in Abbildung 3.46 dargestellt. Die Antikörper der Klone A2, C1, D2 und F4 zeigten auch bei den Streptavidin Negativkontrollen einen Anstieg des Signals bei höheren Konzentrationen. Für die

Klone A2 und C1 wurde ab einem eingesetzten Volumen von 6,25 μL , für Klon F4 ab 25 μL ein Anstieg der Signale bei der Streptavidin Kontrolle festgestellt. Für den scFv-Antikörper von Klon D2 war die Bindung an das Peptid und Streptavidin identisch. Für die Umklonierung wurden nur die Klone A2, D9, E10 und F10 ausgewählt. Klon A2 wurde trotz des Anstiegs der Streptavidin Kontrolle gewählt, da er die stärkste Bindungskurve der scFv-Antikörper gegen NGO1092 hatte.

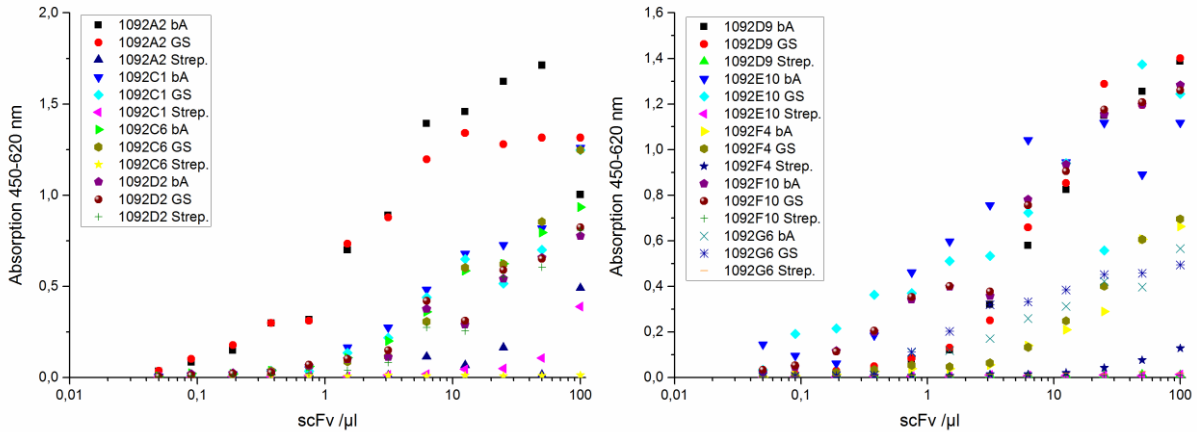


Abbildung 3.46: Ergebnisse der Titrations-ELISAs der isolierten Antikörper gegen das Peptidantigen von NGO1092.

Die x-Achsen sind logarithmisch skaliert. Die y-Achsen der beiden Diagramme haben unterschiedliche Maxima. Als Kontrolle wurde Streptavidin immobilisiert. Insgesamt wurden neun scFv-Antikörper gegen das Peptidantigen isoliert. **(Links)** Titrations-ELISA der Antikörperklone A2, C1, C6 und D2. **(Rechts)** Titrations-ELISAs der Antikörperklone D9, E10, F4, F10 und G6.

Gegen das ausgewählte Peptid von NGO1634 wurden sechs Antikörper isoliert. Die Ergebnisse der Titrations-ELISAs sind in Abbildung 3.47 dargestellt. Grundsätzlich zeigten alle Antikörper gute Bindungskurven. Allerdings wurden für die Umklonierung nur die besten Binder ausgewählt. Dies waren die Klone A9, C8, E9 und G2.

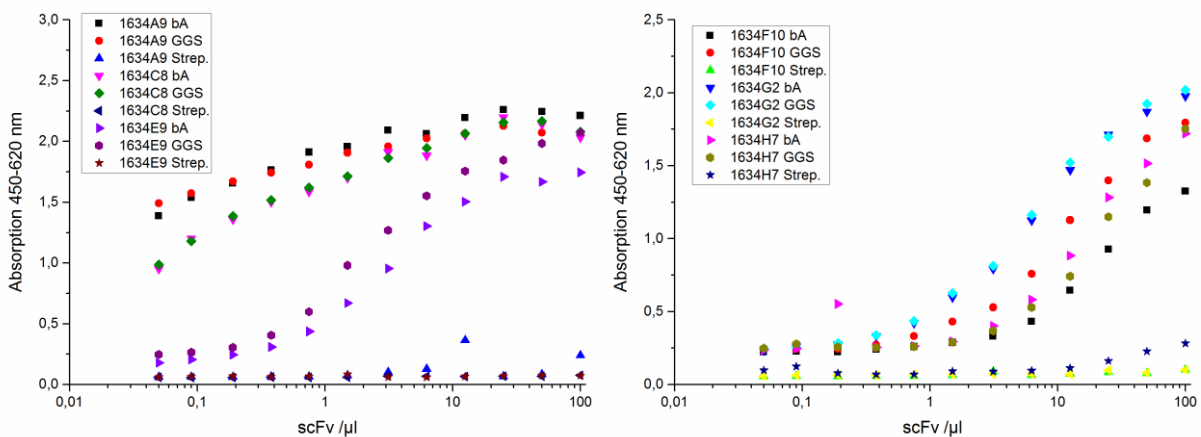


Abbildung 3.47: Ergebnisse der Titrations-ELISAs der isolierten Antikörper gegen das Peptidantigen von NGO1634.

Die x-Achsen sind logarithmisch skaliert. Die y-Achsen der beiden Diagramme haben unterschiedliche Maxima. Als Kontrolle wurde Streptavidin immobilisiert. Insgesamt wurden sechs scFv-Antikörper gegen das Peptidantigen isoliert. **(Links)** Titrations-ELISA der Antikörperklone A9, C8 und E9. **(Rechts)** Titrations-ELISAs der Antikörperklone F10, G2 und H7.

Insgesamt wurden 20 scFv-Antikörper für die Umklonierung ausgewählt. Eine Übersicht dieser Antikörper ist in Tabelle 3.7 aufgeführt.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.7: Übersicht der umklonierten Antikörper.

Antigen	Antikörperbezeichnung
Peptid	
0553	0553G10
0555	0555C6
	0555G7
1092	1092A2
	1092D9
	1092E10
	1092F10
1094	1094C7
1626	1626C6
1634	1634A9
	1634C8
	1634E9
	1634G2
Protein	
1430	1430A6
	1430B2
	1430B6
	1430D3
	1430D4
	1430D5
1847	1847E12

3.11 Produktion und Charakterisierung rekombinanter scFv-Fc (human)-Fusionsantikörper

3.11.1 Western Blot zur Kontrolle der Bindung an die Produktionszelllinie

Die ausgewählten 20 Klone wurden daraufhin freundlicherweise von Saskia Helmsing (TU Braunschweig) umkloniert und die Fusionsantikörper exprimiert und aufgereinigt. Zur Kontrolle auf unspezifische Bindung der Antikörper an die Produktionszelllinie wurden Western Blots von Marlies Becker (TU Braunschweig) durchgeführt (Anhang X). Die Expression der Klone 1094C7 und 1092D9 war nicht erfolgreich, sodass nur die produzierten 18 Antikörper mittels Western Blot analysiert wurden. Die Klone 0553G10 und 0555G7 zeigten bei der Western Blot Analyse unspezifische Bindungen. Während bei 0553G10 der gesamte Blot auch nach Wiederholung angefärbt war, wurden bei 0555G7 unspezifische Bindungen an große Zelllysateproteine festgestellt. Bei den weiteren peptid-assoziierten Antikörpern wurden keine unspezifischen Bindungen an das Zelllysate festgestellt. Antigene mit einem Molekulargewicht < 5 kDa wurden nicht im Western Blot analysiert. Bei den Proteinantigenen wurde diese Kontrolle mitgeführt. Alle Proteine und Zelllysate wurden einmal bei 56 °C und einmal bei 95 °C inkubiert, bevor sie mittels SDS-PAGE nach ihren Größen aufgetrennt wurden. So war bei den Klonen 1430 A6, B2, D4 und D5 eine distinkte Bande auf der Höhe zwischen 37 kDa und 50 kDa (berechnetes Molekulargewicht 45,86 kDa) zu erkennen, sowohl nach einer

Inkubation bei 56 °C als auch bei 95 °C. Unspezifische Wechselwirkungen mit dem Zelllysate waren bei keinem der protein-assoziierten Antikörper detektierbar. Der Western Blot von Klon 1430B6 zeigte bei 56 °C eine schwache Bande auf Höhe von ungefähr 46 kDa, während bei Klon 1430D3 keine Bande identifiziert wurde. Für NGO1847 wurden anstatt 210 ng 420 ng des Proteins aufgetragen, da bei 210 ng des Antigens keine Bande identifiziert wurde. Bei 420 ng war eine sehr schwache Bande auf Höhe von 25 kDa nach einer Inkubation von 95 °C detektierbar.

3.11.2 Titrations-ELISA der scFv-Fc (human)-Fusionsantikörper

Mit allen Antikörpern wurden Titrations-ELISAs durchgeführt. Die Antikörper gegen NGO0553, NGO0555, NGO1626 und NGO1634 zeigten einen sigmoidalen Kurvenverlauf mit EC_{50} Werten um 1 μ M oder niedriger (Abbildung 3.48).

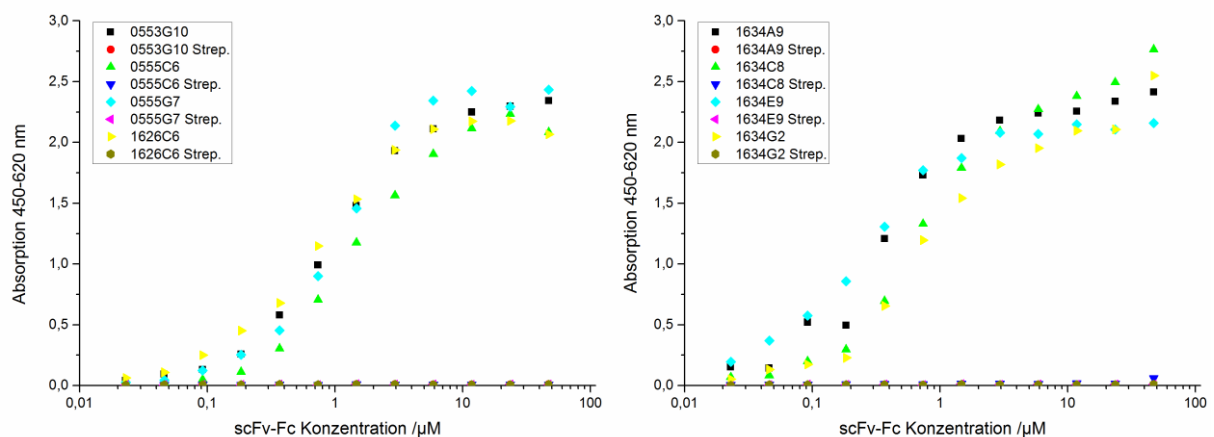


Abbildung 3.48: Ergebnisse der Titrations-ELISAs der scFv-Fc-Fusionsantikörper gegen die Antigene NGO0553, NGO0555, NGO1626 und NGO1634.

Als Kontrolle wurden Streptavidin-beschichtete Vertiefungen mit der jeweiligen Antikörperkonzentration inkubiert. Die x-Achsen sind logarithmisch skaliert. **Links)** Sigmoidale Kurvenverläufe der Antikörperklone 0553G10, 0555C6, 0555G7 und 1626C6. **Rechts)** Sigmoidale Kurvenverläufe der Antikörperklone gegen das Peptid von NGO1634.

Das gleiche galt für die Antikörperklone A6, B2, D4 und D5 gegen NGO1430. Die Maximalwerte lagen bei allen zuvor genannten Antikörpern zwischen 2,0 AU und 2,8 AU. Klon 1430B6 erreichte einen maximalen Wert von 2,0 AU. Allerdings erfolgte der Anstieg des Signals erst ab einer Konzentration von 0,18 μ M im Vergleich zu den zuvor genannten Antikörpern, die bereits bei der niedrigsten Konzentration von 0,023 μ M ein Signal aufwiesen. Klon 1430D3 hingegen hatte nur ein Maximum von 0,24 AU, sodass eine Auswertung nicht erfolgte. Die Ergebnisse der Titrations-ELISAs der Klone gegen Protein NGO1430 sind in Abbildung 3.49 dargestellt

3 Ergebnisse

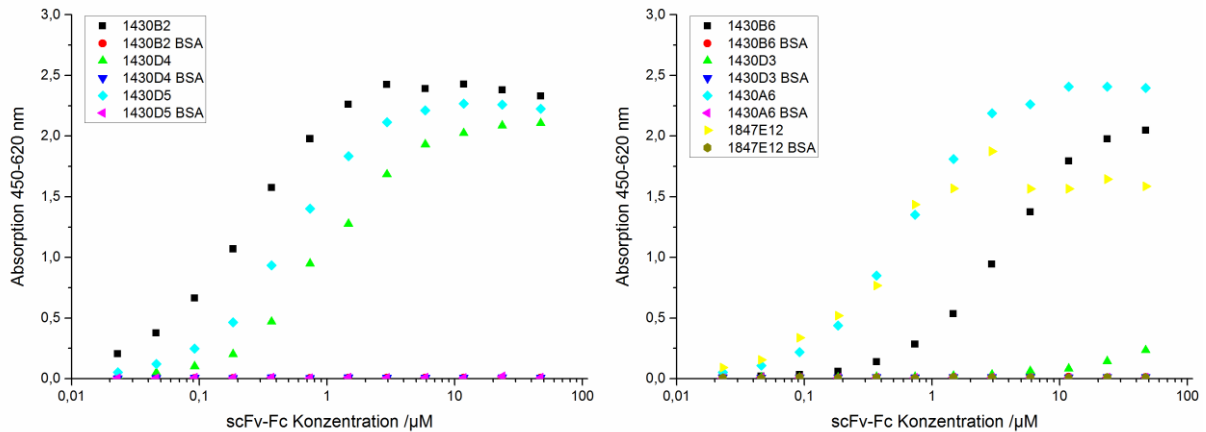


Abbildung 3.49: Ergebnisse der Titrations-ELISAs der scFv-Fc-Fusionsantikörper gegen die Antigene NGO1430 und NGO1847.

Als Kontrolle wurden BSA-beschichtete Vertiefungen mit der jeweiligen Antikörperkonzentration inkubiert. Die x-Achsen sind logarithmisch skaliert. Links) Sigmoidale Kurvenverläufe der Antikörperklone B2, D4 und D5 gegen das Antigen NGO1430. Rechts) Sigmoidale Kurvenverläufe der Antikörperklone B6, D3 und A6 gegen das Antigen NGO1430 und von Klon 1847E12.

Die Titrations-ELISAs der Antikörper gegen NGO1092 (Abbildung 3.50) und NGO1847 (Abbildung 3.49) wiesen einige Ausreißer auf. Auch die Maximalwerte bei einer Konzentration von 47,17 µM lagen bei drei der vier Antikörper unterhalb von 2 AU. Zusätzlich war bei den Klonen 1092E10 und 1092F10 kein Grenzwert erkennbar, an den sich die Funktion annähert. Dadurch sind die berechneten EC50 Werte dieser Antikörper nicht vergleichbar mit denen der restlichen Antikörper. Eine Übersicht aller EC50 Werte ist in Tabelle 3.8 angegeben.

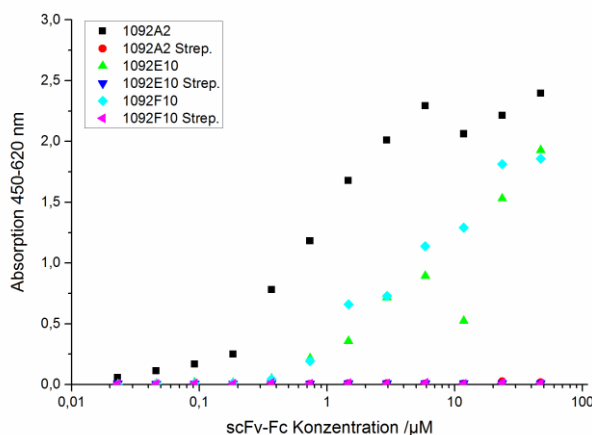


Abbildung 3.50: Ergebnisse der Titrations-ELISAs der scFv-Fc-Fusionsantikörper gegen das Antigen NGO1092.

Als Kontrolle wurden Streptavidin-beschichtete Vertiefungen mit der jeweiligen Antikörperkonzentration inkubiert. Die x-Achsen sind logarithmisch skaliert. Die Vertiefungen der Antikörperklone E10 und F10 zeigten insgesamt niedrigere Absorptionswerte als Klon A2.

3.11.3 Affinitätsmessung mittels SPR

Die Affinitätsbestimmung der rekombinanten Antikörper mittels SPR ist in Tabelle 3.8 zusammengefasst. Die ermittelten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) der Bindungen sind als Kenngröße für die Affinität angegeben. Die meisten der K_D -Werte wurden über Steady State Affinity berechnet, wenn nicht anders in der Tabelle angegeben.

Tabelle 3.8: Affinitätsbestimmung der rekombinanten Antikörper mittels SPR und berechnete EC50 Werte mittels Titrations-ELISA.

Angegeben sind die berechneten K_D -Werte, die entsprechende maximale Response (R_{max}) und der χ^2 -Wert, der eine Aussage über die Qualität des Fits gibt. Je niedriger der χ^2 -Wert, desto besser passt der Fit und desto genauer ist der berechnete K_D -Wert. Alle K_D -Werte wurden über Steady State Affinity berechnet, wenn nicht anders unter Anmerkung angegeben. Die mit einem Stern markierten Antikörper wiesen viele Ausreißer auf, sodass eine genaue Berechnung des EC50 Werts nicht möglich war.

Antikörper- bezeichnung	K_D /nM	R_{max} /RU	χ^2 /RU²	Anmerkung	berechnete EC50 Werte /μM
0553G10	189,0	223,4	3,59	schwache Bindung an 0555	1,05
0555C6	155,0	171,0	19,20		1,25
0555G7	n. b.	n. b.			1,16
1092A2	174,0	118,5	7,85		0,84*
1092E10	231,5	26,8	0,21	schwache Bindung an 0553	3,63*
1092F10	720,3	148,8	0,05		2,05*
1430A6	-	-	-	Kinetikbestimmung nicht möglich	1,13
1430B2	287,3	1000	0,08		0,22
1430B6	20,5	772,6	38,00	1:1 Kinetik	3,78
1430D3	-	-	-	Ausfall Titrations-ELISA	n. a.*
1430D4	19,7	709,9	24,80	1:1 Kinetik	1,08
1430D5	-	-	-	Kinetikbestimmung nicht möglich	0,64
1626C6	-	-	-	keine Bindung	0,61
1634A9	45,0	137,1	28,30		0,42
1634C8	148,1	114,2	5,85		0,74
1634E9	39,9	32,8	1,48		0,24
1634G2	148,0	64,6	4,41		0,76
1847E12	88,69	590,6	18,40		0,34*

Als Beispiel für die Auswertung der SPR-Ergebnisse ist in Abbildung 3.51 ein Sensorgramm mit steigenden Konzentrationen des Antikörpers und der Fit der Steady State Affinitätsberechnung dargestellt. Die weiteren Sensorgramme sind in Anhang XI beigefügt.

3 Ergebnisse

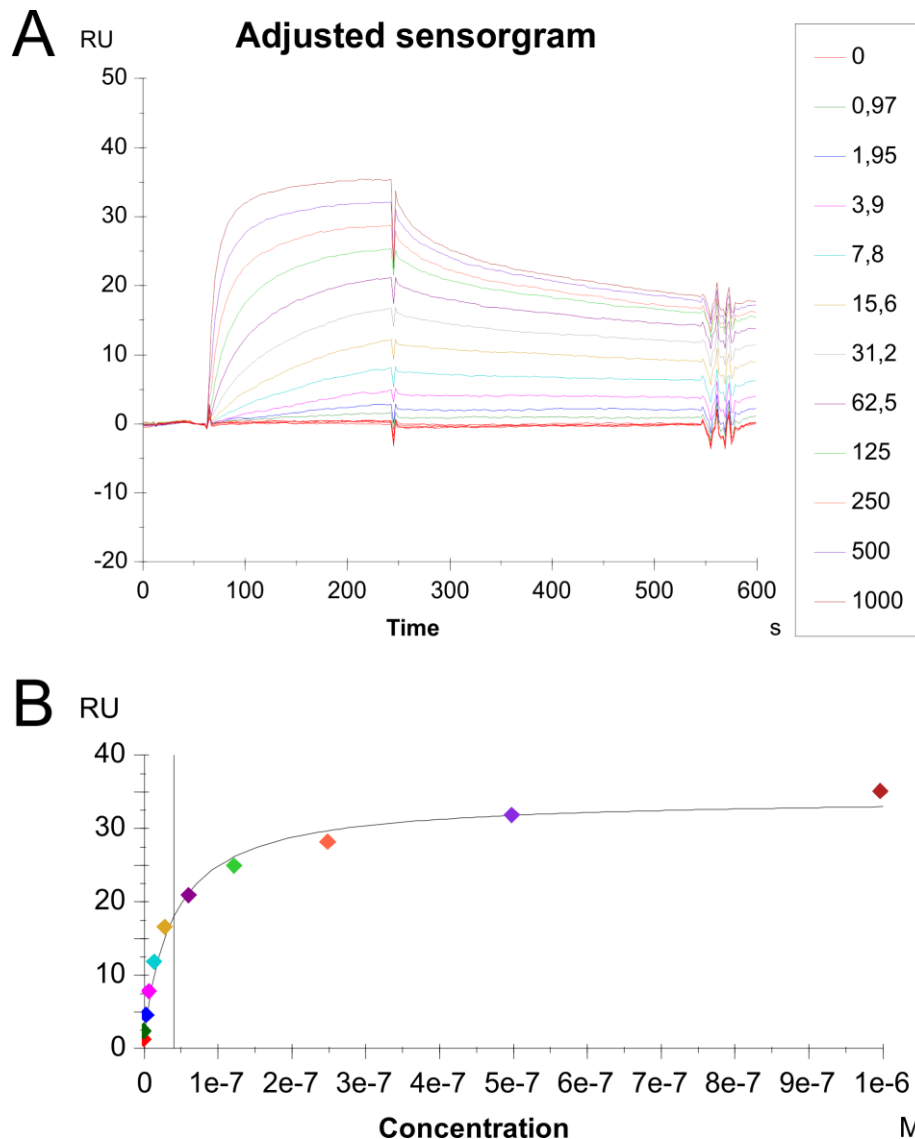


Abbildung 3.51: Ergebnisse der SPR Messungen für den Antikörper 1634E9.

A) Sensorgramm mit aufsteigender Antikörperkonzentration von 0 nM–1000 nM. **B)** Fit mittels Steady State Affinity durch auftragen der Response Units gegen die molare Konzentration. Berechneter K_D -Wert: 39,9 nM bei einem R_{max} von 32,8 RU und einem χ^2 von 1,48 RU^2 .

3.11.4 ELISA auf Zellen und Zelllysate von *N. gonorrhoeae*

Die rekombinanten scFv-Fc-Antikörper zeigten im ELISA keine Bindung an *N. gonorrhoeae* Zellen oder Lysate. Eine Bindung an die jeweiligen Antigene war jedoch detektierbar. Antikörper, die gegen Peptidantigene generiert wurden, zeigten keine Bindung an die zugehörigen Vollängenproteine. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.52 dargestellt.

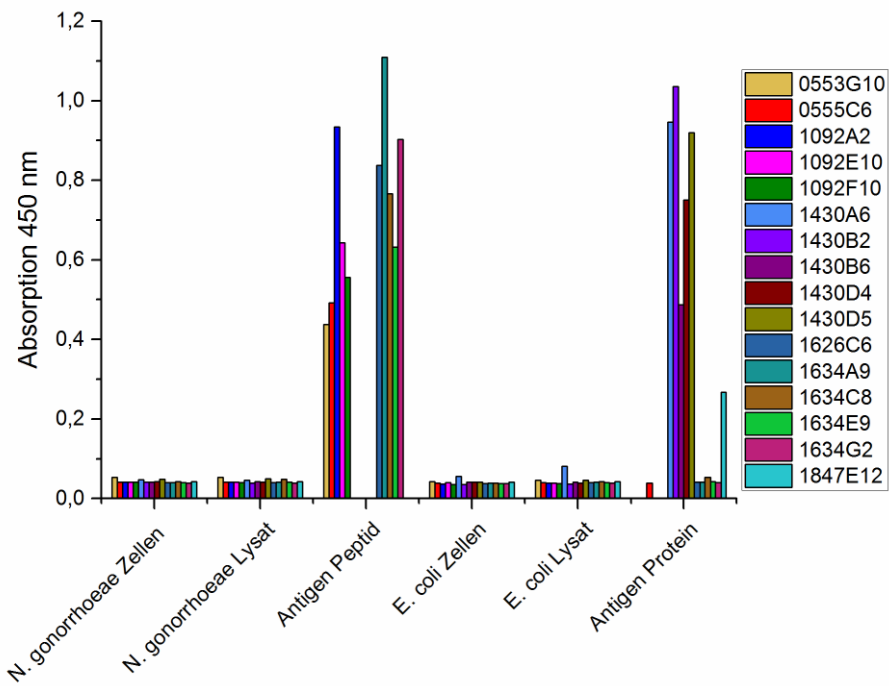


Abbildung 3.52: ELISA-Ergebnisse der Bindung der scFv-Fc-Antikörper an *N. gonorrhoeae* Zellen und Lysate.

Als Kontrollen wurden *E. coli* Zellen und Lysat und die entsprechenden Antigene immobilisiert. Falls vorhanden, wurde auch die Bindung an die Volllängenproteine überprüft.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden vier bakterielle Humanpathogene ausgewählt, um mittels Phage Display immunogene Proteine zu identifizieren. Während vergleichbare Untersuchungen, allerdings meist über 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie, für *B. burgdorferi* [143], *C. difficile* [201] und *N. meningitidis* [169,173,179,202] schon in der Literatur beschrieben waren, war dies die erste Arbeit zur Aufklärung des Immunoproteoms von *N. gonorrhoeae*. Die identifizierten Immunogene von *B. burgdorferi* und *N. meningitidis* waren größtenteils bekannt (vgl. Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5). Des Weiteren waren einige der identifizierten Proteine von *N. meningitidis* bereits als Antigene durch reverse Vakzinologie in der Literatur beschrieben [168,170]. Die identifizierten Proteine von *B. burgdorferi* und *N. meningitidis* wurden daher nicht weiter charakterisiert. Nichtsdestotrotz zeigten die Ergebnisse der Screenings mit den Pathogenen *B. burgdorferi* und *N. meningitidis*, dass die Detektion von immunogenen Proteinen mittels Phage Display möglich ist. Dass größtenteils bereits bekannte Immunogene isoliert wurden, hängt auch mit der extensiven Forschung im Bereich der Meningitis und Borreliose in den letzten Jahrzehnten zusammen. Für *C. difficile* wurden, womöglich aufgrund der verwendeten Humanseren, keine Polypeptidphagen mit signifikanten Signalen isoliert. Die Generierung von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen ist für *C. difficile* nicht möglich, da eine hohe Toxinproduktion das Verenden der Versuchstiere zur Folge hätte. Für *N. gonorrhoeae* hingegen wurden 21 potentielle, immunogene Polypeptide durch Phage Display mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper isoliert und sechs neue Immunogene als Vollängenproteine verifiziert. Die Identifikation neuer immunogener Proteine könnte für die Aufklärung ihrer Rolle bezüglich Pathogenität und Virulenz interessant sein. Des Weiteren könnten diese Proteine als potentielle Kandidaten für therapeutische Maßnahmen dienen.

4.1 Konstruktion genomischer DNA Bibliotheken

Die Konstruktion genomischer DNA Bibliotheken erfordert eine relativ große Menge an genomischer DNA (üblicherweise min. 60 µg) [99,147]. Nach der DNA Extraktion wurde die DNA durch Restriktionsenzyme oder Ultraschallbehandlung fragmentiert. Aufgrund der vorgegebenen Restriktionsschnittstellen bei der Fragmentierung mit Restriktionsenzymen ist jedoch kein zufälliges Schnittmuster zu erwarten, sodass immer die gleiche theoretische Anzahl an identischen Fragmenten eintritt. Die Ultraschallfragmentierung hingegen zerkleinert die DNA in einem zufälligen Muster, wodurch die DNA in zufällige Abschnitte unterteilt wird. Da die Fragmentierung der genomischen DNA durch Ultraschall bei manchen Bakterien nicht anwendbar ist [97], wurde die DNA zunächst durch Restriktionsverdau fragmentiert. Letztendlich wurden aber nur die Ultraschallfragmentierten Bibliotheken für die Pannings und Screenings verwendet. Fast alle erstellten Bibliotheken deckten die theoretisch benötigte Anzahl an Klonen mehrere 100-fach ab. Die Ultraschall-fragmentierte Bibliothek von *B. burgdorferi* hatte mit ungefähr 50-facher Anzahl an Klonen die niedrigste Abdeckung der theoretisch benötigten Klone. Durch die Vielzahl an Klonen kann davon ausgegangen werden, dass jeweils das gesamte Genom in der Bibliothek präsentiert wurde, da die theoretisch benötigte Anzahl an Klonen mit 99,9 % Wahrscheinlichkeit berechnet wurde. Die verpackten Phage

Display Bibliotheken deckten die Anzahl der *E. coli* Bibliotheken mindestens 300-fach ab. Generell sollte der Phagentiter mindestens 10–100-fach größer als die Bibliothek sein, um die Diversität der ursprünglichen Bibliothek abzudecken (persönliche Kommunikation Michael Hust, TU Braunschweig). Die durchschnittliche ORF Insert Rate von mindestens 67 % übertraf die von Hust *et al.* beschriebene Insertrate von 60 % für Hyperphage verpackte Bibliotheken [109].

4.2 Selektion von Polypeptidphagen und Identifikation neuer immunogener Proteine

Insgesamt wurden 21 potentiell immunogene Polypeptide von *N. gonorrhoeae* mittels Phage Display Screening mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper identifiziert. Bei einigen der entsprechenden Proteine wurden des Weiteren Polypeptide von verschiedenen Bereichen des Proteins gefunden. Dies war der Fall bei folgenden Proteinen: NGO0592, NGO1429, NGO1577, NGO2094 und NGO2095 (vgl. Anhang IV). Diese Bereiche wiesen auf mehrere potentielle Epitopregionen innerhalb eines Proteins hin. Alle identifizierten Polypeptidregionen wurden mittels Epitopmapping auf Epitope überprüft.

Von den 21 Proteinen wurden 13 Proteine ausgewählt und als Volllängenproteine exprimiert, um den immunogenen Charakter auch in Volllänge zu verifizieren. Zwei der 13 ausgewählten Proteine dienten hierbei als Positiv- (NGO0451) bzw. Negativkontrolle (NGO1500). Des Weiteren wurden neben acht vermeintlich neuen Immunogenen die drei Proteine NGO1043, NGO1656 und NGO1852 exprimiert, die zuvor nur in *N. meningitidis* als immunogen beschrieben waren und als interessante Kandidaten für die Entwicklung eines Impfstoffs gelten (vgl. Ergebnisse Tabelle 3.3). Für sechs der vermeintlich neuen Immunogene wurde der immunogene Charakter auch als Volllängenprotein validiert. Ebenfalls bestätigt wurde der immunogene Charakter für die drei in *N. meningitidis* beschriebenen Immunogene und die Positivkontrolle. Zwei Proteine (NGO0451 und NGO1657) zeigten Signale unterhalb des Grenzwerts im ELISA. Für NGO1657 kann dies mit dem Doppelinsert mit NGO1656 erklärt werden. Das Insert setzte sich in 5'-3' Richtung aus dem hinteren Teil des Gens von NGO1657, einem nicht kodierenden Intronbereich und dem vorderen Teil des Gens von NGO1656 zusammen. Das identifizierte Polypeptid bestand daher nur aus dem hinteren Bereich des Inserts und dem fusionierten Phagenhüllprotein III, sodass für dieses Polypeptid wahrscheinlich das erste Startcodon übersprungen wurde und die Transkription erst ab dem Startcodon von NGO1656 begann. Für NGO0451 hingegen ist das fehlende Signal im ELISA mit Volllängenproteinen widersprüchlich zu den Ergebnissen im ELISA mit den Phagen-präsentierten Polypeptiden. Während das Polypeptid auch bei mehrfach wiederholter Produktion und erneutem ELISA immer positiv war, zeigte das Protein bei mehrfacher Produktion und wiederholtem ELISA immer nur Signale auf Höhe der Negativkontrolle BB0069. Eine mögliche Erklärung wäre, dass das Epitop im Volllängenprotein für den Antikörper nicht erreichbar ist, während die Epitopregion im deutlich kürzeren Polypeptid präsentiert wird. Des Weiteren könnte auch aufgrund der Denaturierung des Proteins bei der Aufreinigung eine im Protein und Polypeptid ausgebildete Sekundär- oder Tertiärstruktur beeinträchtigt sein, die für die strukturelle Bindung des Antikörpers wichtig ist. Allerdings zeigten auch die Epitopmappings der Polypeptidregionen sowohl für NGO0451 als auch NGO1657 keine

signifikanten Signalanstiege, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass beide Proteine keinen immunogenen Charakter aufweisen. Die identifizierten immunogenen Proteine werden in Abschnitt 4.3 und 4.4 diskutiert.

4.3 Identifikation und Charakterisierung linearer Epitope

Die Identifikation linearer Epitope mittels Microarray ist eine etablierte Technik, die bereits zuvor erfolgreich Anwendung bei der Bestimmung von Epitoperegionen anderer Proteine humanpathogener Bakterien gefunden hat [203,204]. Daher wurde diese Methode gewählt, um alle in dieser Arbeit identifizierten Polypeptidbereiche der 21 Proteine auf ihre Epitope zu untersuchen. Da diese Bereiche des Proteins im Phagenscreening als immunogen erkannt wurden, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass dort lineare Epitope für eine Antikörperbindung verantwortlich sind. Für zehn Proteine wurden 19 eindeutige Epitope mit den drei verfügbaren polyklonalen Kaninchenantikörpern identifiziert. Diese Epitope wurden also während der Immunantwort in verschiedenen Versuchstieren und unterschiedlichen Immunisierungen erkannt und zeigten somit einen immundominanten Charakter. Bei weiteren fünf Proteinen wurden widersprüchliche Ergebnisse mit drei Antikörpern erhalten, während die Inkubation mit nur einem Antikörper zuvor eindeutige Signale zeigte. Diese Epitope wurden zwar als Epitope für einen Antikörper bestimmt, scheinen aber nicht immundominant zu sein. Für vier Proteine wurden keine Epitope identifiziert. Darunter waren die Proteine NGO0451 und NGO1657, die bereits beim ELISA mit den Volllängenproteinen unterhalb der Ausschlussgrenze lagen, sodass aufgrund des fehlenden immunogenen Charakters keine Epitope zu erwarten waren. Für die Proteine NGO0642 und NGO2139 wurden ebenfalls keine linearen Epitope identifiziert. Während NGO0642 ein neu identifiziertes immunogenes Protein darstellt, ist für NGO2139 ein Homolog in *N. meningitidis* als Genom-abgeleitetes Neisseria Antigen 1946 annotiert. Pizza *et al.* und Tsolakos *et al.* haben den immunogenen Charakter für das homologe Protein von *N. meningitidis* bereits zuvor mit Mausantikörpern beschrieben [178,179]. Die Polypeptide beider Proteine wurden bei den Screenings in dieser Arbeit identifiziert und der immunogene Charakter von NGO0642 auch im ELISA als Volllängenprotein verifiziert. Im Vergleich zu anderen Screeningmethoden wie 2D-Gelelektrophorese oder Microarray-Screening von cDNA Bibliotheken, werden beim Phage Display nicht die Volllängenproteine auf der Phagenoberfläche präsentiert, sondern nur Polypeptidbereiche der einzelnen Proteine. Je kürzer die präsentierten Polypeptide, desto weniger werden die ursprünglichen Struktur motive ausgebildet. Dies würde erklären, warum viele der identifizierten Epitope als lineare Epitope vorliegen, obwohl bis zu 90 % der B-Zell Epitope Konformationsepitope sind [205]. Im Gegensatz dazu lagen für die Proteine NGO0642 und NGO2139 womöglich Konformationsepitope vor, die mittels Microarray mit kurzen, überlappenden Peptiden nicht identifiziert werden können.

4.4 Proteinmodellierung und Kartierung der identifizierten Epitope

Von den 19 immunogenen Proteinen wurden 3D-Strukturmodelle mit I-TASSER erstellt und die durch Phage Display isolierten Polypeptide und identifizierten Epitope kartiert. Für die beiden Proteine

NGO0451 und NGO1657, deren immunogener Charakter nicht als Volllängenprotein bestätigt wurde, wurden keine 3D-Strukturmodelle erstellt. Bei multimeren Modellen wurden bekannte Homologe in ihrer Quartärstruktur dargestellt und die Epitope hervorgehoben, um die Zugänglichkeit für spezifische Antikörper abzuwägen. Zunächst werden die in dieser Arbeit erstmals als immunogen beschriebenen Proteine abgehandelt, danach folgen die restlichen mittels Epitopmapping und Strukturvorhersage charakterisierten Proteine.

NGO0170 ist als ein ABC Transporter ATP-bindendes Protein annotiert, das in den Transport von Zink/Mangan involviert ist. Das Phagen-präsentierte Polypeptid lag im C-terminalen Bereich des Proteins. Das von I-TASSER identifizierte Homolog mit der größten Strukturübereinstimmung war ein putativer Metall-Chelat ABC Transporter von *Haemophilus influenza* [206], das als Heterotetramer mit jeweils zwei identischen Strängen vorkommt. Die zwei homologen Stränge von NGO0170 befinden sich hierbei im Zytoplasma, während die beiden anderen Stränge in der Membran lokalisiert sind. Durch den Vergleich der Ausgangs- und Homologsequenz ist das identifizierte Polypeptid und Epitop im unteren, frei zugänglichen Bereich des Proteins lokalisiert und nicht in der Membran oder im Inneren des Proteins verborgen. Dadurch wäre eine Antikörperbindung zunächst möglich. Die Vorhersage der Lokalisation ergab jedoch, dass der Komplex inklusive NGO0170 in der zytoplasmatischen Membran eingebettet ist, wodurch eine Bindung – zum Beispiel für ein Diagnostiktool – von Antikörper an das Protein nicht direkt möglich wäre. Zudem zeigt der aus der Membran reichende Teil des Proteins nach Innen in das Zytoplasma. Allerdings sind bioinformatische Vorhersagen grundsätzlich nur Vermutungen, die aufgrund einer gewissen Anzahl bekannter Proteine mit ähnlichen strukturellen Eigenschaften oder Sequenzähnlichkeiten aufgestellt werden. So wurden mehrere ABC Transporter von *N. meningitidis*, deren Lokalisation im Periplasma vorhergesagt war, auch auf der Zelloberfläche gefunden [207,208]. Um eine genaue Aussage über die exakte Lokalisation und Zugänglichkeit für Antikörper zu treffen, sind daher weitere Versuche notwendig. Interessanterweise zeigt das homologe Protein von *N. meningitidis* (NMB0588) Sequenzhomologien auf Aminosäureebene mit einer potentiellen Pathogenitätsinsel in *E. coli* [209], wodurch der mögliche Einfluss von NGO0170 auf die Pathogenität von *N. gonorrhoeae* unterstrichen wird. Des Weiteren fanden Pawlik et al. [210] heraus, dass das homologe Protein NMB0588 unter Bedingungen mit niedrigem Zinkpegel hochreguliert wird. Dieses Phänomen tritt häufig während der Infektion humaner Wirtszellen auf [211]. Eine Deletionsmutante, bei der das Gen von NGO0170 deletiert wird, könnte weitere Hinweise auf den Einfluss dieses Proteins auf die Lebensfähigkeit und Virulenz von *N. gonorrhoeae* liefern. Je nach Bedeutung der dadurch erhaltenen Informationen, könnte NGO0170 ein attraktives Zielprotein für eine neue therapeutische Behandlungsstrategie oder für die Entwicklung eines diagnostischen Nachweisverfahrens sein. Das Epitopmapping und der Alaninscan für NGO0170 wurden im Gegensatz zu den anderen Proteinen mit einer Cellulose Membran durchgeführt. Hierbei ist eine quantitative Auswertung nicht wie bei der Microarrayauswertung möglich. Auch die Signalintensitäten auf der Membran waren relativ schwach und die nicht gebundenen Peptide zeigten ebenfalls eine schwache Hintergrundverfärbung. Trotzdem zeigten drei aufeinanderfolgende Spots eine dunklere Farbabstufung, wodurch das mittlere dieser drei Peptide als Epitopregion (LLAREKAAGATETI) identifiziert wurde. Alternativ könnten die

4 Diskussion

Konsensussequenz der drei Peptide (LLAREKI) oder ein weiteres Epitopmapping mit kürzeren Bereichen und mit nur einer Aminosäureverlagerung untersucht werden, um das Epitop weiter einzugrenzen. Das Epitopeptid wurde durch Alaninscans mittels Cellulose Membran weiter charakterisiert. Vier aufeinanderfolgende Aminosäuren in der Mitte des Epitopeptids sorgten für eine Signalabnahme im Vergleich zu den anderen Peptiden. Diese für die Antikörperbindung kritischen Aminosäuren lagen hinter einem Loop, gut zugänglich im Modell des Monomers und des homologen Multimers.

NGO0326 ist als RNA-bindendes Protein Hfq annotiert, das in vielen Bakterien hoch konserviert ist. Seine Funktion als RNA Chaperon ist die Anpassung der posttranskriptionalen Regulation bei Stress. Bei verschiedenen Bakterien wurde ein wesentlicher Einfluss durch Hfq auf die Virulenz festgestellt [212–214], darunter auch in *N. meningitidis* [215]. Des Weiteren wurde durch eine Deletionsmutante in *N. gonorrhoeae* gezeigt, dass der Verlust von NGO0326 zu einer differenzierten Expression von 369 ORFs führt [216] und somit Einfluss auf einen großen Teil der Proteinexpression hat. Die Folgen der Deletion waren eine veränderte Wachstumsgeschwindigkeit und eine verminderte Anhaftung an Epithelzellen. NGO0326 zeigte beim ELISA mit Vollängenproteinen sehr hohe Signalintensitäten auf Höhe der Positivkontrolle. Das Homolog mit der höchsten strukturellen Übereinstimmung war das Protein Hfq von *Listeria monocytogenes* [185] mit einer Sequenzabdeckung von 75 %. Allerdings waren die letzten 24 Aminosäuren am C-Terminus der Sequenz von NGO0326 nicht durch die Homologsequenz abgedeckt. Das identifizierte Polypeptid lag jedoch auf 35 der letzten 39 Aminosäuren, sodass der größere Teil des Polypeptids nicht im vorhergesagten Modell und der multimeren Struktur einbezogen ist. Da das Protein NGO0326 im Cytoplasma lokalisiert ist, sollten das identifizierte Polypeptid und das darauf liegende Epitop für Antikörper zugänglich sein, wenn die Membran zuvor permeabilisiert wurde. Das Epitopmapping des Polypeptids von NGO0326 resultierte in einer linearen Epitopsequenz. Zwei aufeinanderfolgende Peptide zeigten signifikante Signalanstiege im Vergleich zu den restlichen Peptiden. Allerdings war das Signal von QHENKPQAAPASTLV wesentlich höher als das des zweiten Peptids. Daher wurde nicht die Konsensussequenz von elf Aminosäuren (KPQAAPASTLV) als Epitopregion gewählt, sondern das gesamte erste Peptid als Epitop bestimmt und mittels Alaninscan charakterisiert. Beim Alaninscan führte der Austausch von Leucin zu einem Abfall des Signals und einer schwächeren Bindung des Antikörpers an die Epitopregion.

Das dritte neue immunogene Protein NGO0642 ist als tRNA Pseudouridin Synthase B annotiert. Es ist für die Synthese von Pseudouridin verantwortlich, das in der tRNA verbaut wird und ist mit 80–96%iger Sequenzübereinstimmung in der Gattung *Neisseria* hoch konserviert. Das von I-TASSER berechnete Protein mit der höchsten strukturellen Übereinstimmung war die als Monomer vorkommende tRNA Pseudouridin Synthase B aus *E. coli* [217]. Untersuchungen mit Deletionsmutanten von *E. coli* und *Shigella flexneri* ergaben, dass das Fehlen der Homologe von NGO0642 in *E. coli* den Translationsprozess beeinflusst und in *S. flexneri* die Expression von Virulenzfaktoren beeinträchtigt [218]. Für das Polypeptid von NGO0642 wurde kein Epitop identifiziert. Alle Signale der überlappenden Peptide lagen auf Höhe der Negativkontrolle MBP. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass das identifizierte Polypeptid 28 % des gesamten Proteins

abgedeckt hatte. Möglicherweise wurde daher die ursprüngliche Tertiärstruktur auch durch das Polypeptid eingenommen und der Antikörper erkannte das Konformationsepitop auf dem Phagen-präsentierten Polypeptid. Die Microarray basierte Überprüfung durch überlappende Peptide ist jedoch auf lineare Epitope limitiert, wodurch das vermeintlich strukturelle Epitop nicht erkannt wird. NGO0777, annotiert als DNA-bindendes Protein Hu, ist an der Regulierung der Genexpression und anderer DNA spezifischer Vorgänge wie der Replikation beteiligt [219]. Durch das Entfernen eines Dam-ersetzenden Proteins, das an der DNA Synthese beteiligt ist, wurde in der Deletionsmutante gezeigt, dass NGO0777 hochreguliert war [145]. Des Weiteren wird die Expression des homologen Proteins in *E. coli* induziert, wenn die Zellen mit UV-Licht oder Mitomycin C behandelt und so ein Stresssituation ausgesetzt werden [220]. NGO0777 scheint daher ein wichtiger Bestandteil der Regulation der DNA Reparatur in Stresssituationen zu sein, was ebenfalls bei der Zelladhäsion und Infektion der Fall sein könnte. Obwohl das Proteins laut Vorhersage im Zytoplasma lokalisiert sein soll, wurde das homologe Protein von *N. meningitidis* (NMB1230) in zwei verschiedenen Arbeiten in Vakzinen bestehend aus Vesikeln der äußeren Membran gefunden [168,170]. Falls weitere Untersuchungen zeigen, dass die von den homologen Proteinen bekannten Eigenschaften auch auf NGO0777 zutreffen, könnte das neu identifizierte immunogene Protein ein interessantes Zielprotein entweder für eine neue therapeutische oder eine diagnostische Anwendung sein. Bei der Bestimmung des Epitops zeigten die letzten beiden Peptide signifikant höhere Signalintensitäten als die restlichen Peptide. Die Spezifitätskontrollen zeigten hingegen keine Signale für die Kontrollantikörper, sodass von einer spezifischen Bindung der drei Antikörper aus verschiedenen Immunisierungen ausgegangen werden kann. Als Epitopregion wurde das Peptid KALDTTNAVTLNALK ausgewählt. Der Alaninscan zeigte beim Austausch der Asparaginsäure an Position 4 und Threonin an Position 6 einen Signalverlust von nahezu 100 %. Das Epitop und die für die Antikörperbindung kritischen Aminosäuren liegen in dem theoretischen Homodimer frei zugänglich an der Oberfläche des Proteins.

Das fünfte neu identifizierte Immunogen war NGO1634. Es ist als hypothetisches Protein oder putatives Phagen-assoziiertes Protein annotiert. Der Kenntnisstand über dieses vermeintliche Protein ist sehr gering, sodass Funktion und Informationen über die Expression nicht bekannt sind. Daher wurde mittels qPCR die Präsenz der mRNA von NGO1634 im Transkriptom untersucht. Dadurch wurde gezeigt, dass der erste Schritt der Proteinexpression in Form der Transkription unter Laborbedingungen stattfindet. Weitere Untersuchungen mittels 2D-Gelelektrophorese oder FACS mit einem markierten monoklonalen Antikörper könnten weitere Auskunft über die Expression bzw. Lokalisation von NGO1634 geben. Eine Phagen-assoziierte Expression und die Konstruktion funktioneller Bakteriophagen ist bisher nicht bekannt [21], obwohl einige Regionen im Genom von *N. gonorrhoeae* ihren Ursprung in lysogenen Phagen haben [221]. Es spricht daher einiges dafür, dass das kodierende Gen von NGO1634 ursprünglich aus einem Bakteriophagen stammt und möglicherweise im Zuge der Evolution eine neue, noch unbekannt Funktion in *N. gonorrhoeae* ausübt. BLAST Ergebnisse auf Proteinebene zeigten eine hohe Übereinstimmung von Treffern in *N. gonorrhoeae* Stämmen, während nur einige andere *Neisseria* Spezies ein ähnliches Gen tragen. Das nächste entfernt verwandte Protein mit der höchsten Übereinstimmung ist ein zur PaaX Familie

4 Diskussion

gehörender transkriptioneller Regulator von *E. coli* mit einer Sequenzabdeckung (*query cover*) von 86 % und einer niedrigen Identität (*identity*) von 31 %, sodass NGO1634 und seine homologen Proteine in *Neisseria* stark konserviert sind. Eine Deletionsmutante könnte eine funktionelle Analyse ermöglichen, mit der der Einfluss des Proteins auf die Infektion, Lebensfähigkeit und Virulenz von *N. gonorrhoeae* genauer untersucht werden könnte. Das Epitopmapping des im Phage Display identifizierten Polypeptids zeigte mit drei Antikörpern widersprüchliche Ergebnisse mit niedrigen Medianen. Im ELISA mit den Vollängenproteinen zeigten jedoch alle Antikörper nahezu die gleiche Signalintensität. Bei der Inkubation mit nur einem Antikörper, der auch für die Screenings verwendet wurde, wiesen zwei Peptide (SDYEPSDFDAKNHQI und YEPSDFDAKNHQILS) signifikante Signalunterschiede auf. Allerdings zeigten dieselben Peptide bei der Spezifitätskontrolle mit dem Antikörper gegen *E. coli* ebenfalls Signale auf gleicher Höhe wie mit dem Antikörper gegen *N. gonorrhoeae*. Die zweite Spezifitätskontrolle mit einem Antikörper gegen *N. meningitidis* zeigte hingegen keinen Signalanstieg. Das vermeintliche Epitop ist also weder immundominant noch spezifisch. Durch einen Protein BLAST der ersten Peptidsequenz wurde spezifisch nach Übereinstimmungen in *E. coli* und *N. meningitidis* gesucht. Für *E. coli* waren die besten Übereinstimmungen eine N-6 DNA Methylase mit insgesamt acht gleichen Aminosäuren (YESPD_DA_N_), die jedoch durch einige Aminosäuren unterbrochen waren, und eine Transketolase mit sieben aufeinanderfolgenden Aminosäuren (PSDFDAK). Eventuell erkennt der polyklonale Antikörper gegen *E. coli* daher das gefundene Epitop. Für *N. meningitidis* wurde ein Peptid mit 100 %iger Übereinstimmung gefunden, dessen vollständiges Protein ebenfalls als putatives Phagen-assoziiertes Protein annotiert ist. Durch Protein BLAST der gesamten Proteinsequenz wurden insgesamt nur neun Proteine in verschiedenen *N. meningitidis* Stämmen gefunden, die eine gewisse Ähnlichkeit zu NGO1634 haben. Die ersten vier Treffer hatten zwar ähnliche Sequenzen, aber das gesuchte Peptid war jeweils nur teilweise abgedeckt. Erst in der Sequenz des fünften Treffers war die Sequenz des identifizierten Peptids 100 % identisch. Das dazugehörige Protein ist als hypothetisches Protein annotiert und wurde erst kürzlich (Jahr 2016) in die Datenbank aufgenommen. Der Treffer hatte eine Sequenzabdeckung von 84 % und eine Identität von 90 %. Entgegen der im Epitopmapping widersprüchlichen Signale der verschiedenen Antikörper zeigte die Inkubation mit den verschiedenen Antikörpern im Alaninscan übereinstimmende Signale für die jeweiligen Peptide. Sieben Peptide hatten Signalintensitäten oberhalb von mindestens 3000 AU, während sechs Peptide kein oder ein deutlich schwächeres Signal zeigten. Da jedoch das Epitopmapping und die Spezifitätskontrollen nicht aussagekräftig waren, sind das identifizierte Epitop und die während des Alaninscans identifizierten Aminosäuren mit Vorsicht zu betrachten. Aufgrund des geringen Kenntnisstands war auch das Erstellen eines 3D-Stukturmodells nicht so eindeutig wie bei den meisten anderen Proteinen. Die meisten von I-TASSER erstellten Modelle für NGO1634 fielen durch den Qualitätstest mittels QMEAN. Nur ein Modell erreichte einen Wert, der von QMEAN als ausreichend anerkannt wurde. Das von I-TASSER identifizierte multimere Analog wurde daher nicht in die Auswertung mit aufgenommen.

Das letzte der sechs neu identifizierten Proteine war NGO1796, das als Ribosom recycling Faktor (*rrf*) annotiert und am Recycling der Ribosomen nach der Translation beteiligt ist. Untersuchungen des

Homologs in *E. coli* ergaben, dass *rrf* unentbehrlich für das bakterielle Wachstum ist [222]. Des Weiteren wurde für das *rrf* von *Brucella melitensis* festgestellt, dass es bei Hitzestress hochreguliert wurde und somit als Hitzeschockprotein fungiert [223]. Weitere Untersuchungen z. B. mit einer Deletionsmutante könnten zeigen, ob diese Tatsachen auch für *N. gonorrhoeae* zutreffen. Dies macht das Protein auch als potentielles Target für eine neuartige antibakterielle Behandlung interessant. Das Epitopmapping und die beiden Alaninscans von NGO1796 zeigten sehr schwache Signale. Allerdings waren die Spezifitätskontrollen im Vergleich auf Höhe der Negativkontrolle MBP, während die drei Antikörper gegen *N. gonorrhoeae* alle übereinstimmende Signale für die jeweiligen Peptide zeigten. Das Peptid AKVEKAIRDSNLGLN wies eine Signalintensität von 600 AU auf, auch ein weiteres Peptid (AAVGDLIRVPMPMLT) zeigte ein sehr schwaches Signal bei 300 AU. Allerdings zeigten die Spezifitätskontrollen keine Signale, sodass trotz der niedrigen Signale Alaninscans für die beiden Peptide durchgeführt wurden. Bei den Alaninscans hatte der Austausch von zwei bzw. drei Aminosäuren den kompletten Signalverlust zur Folge. Aufgrund der niedrigen Signalintensitäten sind die beiden definierten Epitope jedoch kritisch zu betrachten. Die vermeintlichen Epitopregionen von NGO1796 waren im 3D-Strukturmodell nach außen präsentiert. Das strukturelle Analog mit der höchsten Übereinstimmung war das Protein *rrf* von *Vibrio parahaemolyticus*, das als Monomer vorliegt [196].

Zwei der identifizierten Polypeptide zeigten als Vollängenprotein nur ein schwaches oder kein Signal. NGO0451, eine replikative DNA Helikase, wies als Vollängenprotein Signalintensitäten auf Höhe der Negativkontrolle BB0069 auf, obwohl die Signalintensitäten beim Screening mit den Phagen-präsentierten Polypeptiden auch nach mehrmaligen Wiederholungen immer deutlich positiv waren. Möglicherweise erkannte der polyklonale Antikörper ein Epitop auf dem kurzen Polypeptid, das im Vollängenprotein im Inneren des Proteins verborgen ist. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die Polypeptide neben linearen Epitopen auch strukturelle Epitope auf den Phagen präsentieren. Die kurzen, auf den Phagen-präsentierten Polypeptide könnten so ihre eigene Sekundärstruktur ausbilden. Daher könnte die Sekundärstruktur des Polypeptids vom Antikörper erkannt worden sein, während die Sekundär- und Tertiärstruktur des Vollängenproteins nicht dieselbe Konformation einnimmt und das Protein somit nicht von dem Antikörpergemisch erkannt wird. Daher ist es bei neuen Immunogenen unumgänglich, den immunogenen Charakter auch als Vollängenprotein nachzuweisen. Das zweite Vollängenprotein, das beim ELISA nur ein schwaches Signal zeigte, war NGO1657. Während des Screenings wurde für NGO1656 und NGO1657 nur ein gemeinsames Polypeptid isoliert, das die letzten 92 bp von NGO1657 und die ersten 131 bp von NGO1656 trug. Daher wurden beide Proteine als Vollängenproteine exprimiert. Allerdings zeigte nur NGO1656 Signale über der Ausschlussgrenze, während NGO1657 Signalintensitäten in Höhe der zweiten Negativkontrolle NGO1500 hatte. Eine plausible Erklärung ist, dass sich zwischen den beiden kodierenden Bereichen ein 48 bp langer, nicht kodierender Bereich befand. Dieser Bereich schloss drei Stopcodons ein, sodass wahrscheinlich nur der hintere Teil des Inserts abgelesen wurde. In diesem Fall wäre die Transkription am Startcodon von NGO1656 gestartet und hätte letztendlich ein Fusionsprodukt aus dem Polypeptid von NGO1656 und dem verkürzten pIII Hüllprotein zur Folge. Die Verpackung von Bibliotheken mit Hyperphage führt zu einer Anreicherung von ORFs [109]. Dadurch

4 Diskussion

werden Inserts mit Stopcodons oder out-of-frame Inserts größtenteils entfernt, weil die neu gebildeten Phagen nur infektiös sind, wenn die kodierte Sequenz des Inserts und gIII als Vollängenfusionsprotein exprimiert wird. Daher wurde das Polypeptid von NGO1657 wahrscheinlich nicht auf dem Phagen präsentiert, sodass die Selektion während des Pannings nur aufgrund des Polypeptids von NGO1656 stattfand.

Die weiteren Proteine waren entweder in *Neisseria* als Immunogen beschrieben oder wurden in Vesikelvakzinen der äußeren Membran von *N. meningitidis* gefunden. Daher wurden nur einige von ihnen ausgewählt, um ihren immunogenen Charakter auch als Vollängenproteine zu verifizieren. NGO1043 [172], NGO1656 [169,170,175], NGO1852 [167] wurden aus unterschiedlichen Gründen ausgewählt. Generell wurden Proteine, die bereits in mehreren verschiedenen Bakterien als immunogen beschrieben waren, nicht als Vollängenproteine produziert. Das 50S ribosomale Protein L7/L12 (NGO1852) ist zwar in vielen Bakterien als immunogenes Protein beschrieben [173,224,225]. Es wurde jedoch aufgrund als Vollängenprotein ausgewählt, da es zum Beispiel bei *Brucella abortus* in Mäusen eine starke Immunantwort auslöst, wenn es Escheriosome-vermittelt als Antigen verabreicht wird [226]. Die Proteine NGO1043 und NGO1656 wurden ausgewählt, weil die Homologe in *N. meningitidis* auf der äußeren Membran präsentiert werden (NMB1468 [172], NMB0345 [175]) und somit auch in *N. gonorrhoeae* als potentielle Zielproteine für eine diagnostische Anwendung oder für die Entwicklung eines Vakzins von Bedeutung sein könnten. NGO1043 ist als hypothetisches Protein oder Lipoprotein annotiert. Das homologe Protein NMB1468 ist in *N. meningitidis* als immunogenes Protein beschrieben und wurde als aussichtsreicher Kandidat für die Entwicklung eines Vakzins bewertet [172]. Das Homolog von NGO1656 in *N. meningitidis* (NMB0345) wurde als Immunogen identifiziert [169] und in Vesikelvakzinen der äußeren Membran gefunden [170,175]. Der immunogene Charakter der drei Vollängenproteine (NGO1043, NGO1656 und NGO1852) wurde in dieser Arbeit für *N. gonorrhoeae* verifiziert.

Einige Proteine wurden als Kontrollen exprimiert. So wurde die Dihydrolipoamid Acetyltransferase (NGO0564), die beim Screening der Phagenbibliothek identifiziert wurde, als Positivkontrolle verwendet. In *N. meningitidis* wurde das Homolog (NMB1342) als potentieller Kandidat für die Entwicklung eines Vakzins getestet [167]. Im ELISA mit den Vollängenproteinen zeigte es ein 10-fach höheres Signal als die Negativkontrolle BB0069, wodurch der immunogene Charakter in *N. gonorrhoeae* validiert wurde und dieses Protein in weiteren ELISAs als Positivkontrolle verwendet wurde. BB0069, das als Aminopeptidase II aus *B. burgdorferi* annotiert ist, und NGO1500, ein während des Screenings identifiziertes Protein, das jedoch Signale unterhalb der Ausschlussgrenze zeigte, wurden als Negativkontrollen eingesetzt. BB0069 wurde gewählt, um die rekombinante Expression zu kontrollieren. Da es keine Ähnlichkeit zu Proteinen von *N. gonorrhoeae* hat, sind die Signalintensitäten dieser Negativkontrolle nur dem Hintergrundsignal zuzuordnen, das durch die Bindung an *E. coli* Proteine und an das unspezifische Protein aus *B. burgdorferi* zustande kommt. Die Ausschlussgrenze wurde daher auf den Wert des vierfachen Signals von BB0069 festgesetzt.

Die Proteine, die bereits in verschiedenen Bakterien als immunogene Proteine beschrieben waren, wurden nicht als Vollängenproteine exprimiert. Durch den immunogenen Charakter der Phagen-präsentierten Polypeptide wurde dieser in *N. gonorrhoeae* für die identifizierten Proteine bestätigt.

Diese Proteine waren NGO0592 [169], NGO0983 [227], NGO1429 [169,173], NGO2094 [228] und NGO2139 [229]. Des Weiteren wurden zwei Proteine identifiziert, die bereits in *N. gonorrhoeae* als immunogen beschrieben waren: NGO1577, ein in der äußeren Membran lokalisiertes Protein PIII [230] und NGO2095, die 60 kDa große Untereinheit eines Chaperonins [231].

Die Lokalisation der meisten neu identifizierten immunogenen Proteine wurde als zytoplasmatisch vorhergesagt. Eine Ausnahme bildete NGO0170, das laut Vorhersage in der zytoplasmatischen Membran lokalisiert ist. Trotzdem beruht die Aussage über die Lokalisation nur auf bioinformatischen Vorhersagen, die durch ähnliche Sequenz- oder Strukturbereiche getroffen werden. Daher sind definitive Angaben zu der Lokalisation eines Proteins nur durch direkte Lokalisationsuntersuchungen möglich wie zum Beispiel durch FACS mit einem monoklonalen Antikörper. So werden zwei der identifizierten Proteine (NGO1429 und NGO1852), die laut Vorhersage im Zytoplasma lokalisiert sind, an der Oberfläche von *N. meningitidis* [232] bzw. *N. gonorrhoeae* [233,234] präsentiert. Des Weiteren wurden homologe Proteine von NGO0326, NGO0564, NGO0592, NGO0777, NGO0916, NGO0983, NGO1043, NGO2095 und NGO2139 in isolierten Fraktionen der äußeren Membran gefunden [170,208,235]. Allerdings wurde nicht genauer untersucht, ob die Proteine oder welches der genannten Proteine wirklich auf der Oberfläche präsentiert wird oder ob sie Überbleibsel der Vesikelproduktion waren. Die homologen Proteine von NGO0592, NGO1429 und NGO2095 wurden in *N. meningitidis* auf der Zelloberfläche nachgewiesen [235]. Des Weiteren wurden ebenfalls Proteine identifiziert, die in anderen Bakterien Virulenz-assoziiert sind, wie NGO0326 [213] und NGO1577 [236], wodurch unter den identifizierten Proteinen eventuell noch weitere Virulenzfaktoren zu finden sind.

Neben den neu identifizierten Immunogenen wurden auch Epitopmappings für die anderen Proteine durchgeführt. NGO0916, NGO1043, NGO1634 und NGO1796 zeigten nur eindeutige Signalintensitäten, wenn der im Panning verwendete Antikörper verwendet wurde. Die anderen beiden Antikörper zeigten nahezu kein Signal. Da im ELISA mit den Vollängenproteinen drei dieser vier Proteine einheitliche Signale mit allen drei Antikörpern zeigten, wurden offensichtlich unterschiedliche Epitope von den Antikörpern erkannt, die eventuell in anderen Bereichen des Proteins lagen. Die Signale von NGO0451 und NGO1657 lagen bereits im ELISA unterhalb der Ausschlussgrenze und zeigten somit beim Epitopmapping auch keine Signale. Bei den Proteinen NGO0584 und NGO2139 wurden ebenfalls keine Epitope identifiziert, obwohl zumindest das Homolog von NGO2139 in *N. meningitidis* (NMB1946) als Immunogen beschrieben ist [178]. In *N. meningitidis* wird dieses Protein als potentieller Kandidat für die Entwicklung eines neuen Vakzins gehandelt, sodass z. B. auch die Kristallstruktur aufgeklärt ist [237]. Diese 3D-Struktur wurde auch von I-TASSER als Analog mit der größten strukturellen Übereinstimmung für NGO2139 ausgewählt.

Die Epitopmappings von NGO0983 und NGO1796 sind kritisch zu betrachten. Bei NGO0983 zeigten sieben aufeinanderfolgende Peptide einen Signalanstieg. Allerdings muss dazu gesagt werden, dass der Peptidbereich aus einer wiederholenden APAAE Sequenz bestand, die offensichtlich stark immunogen wirkt. Gleiches gilt für das homologe Protein von *N. meningitidis* (NMB1523), für das bereits eine Vielzahl an Epitopen beschrieben wurde [238]. Das Epitopmapping von NGO1796

hingegen zeigte allgemein sehr niedrige Signale im Bereich von maximal 950 AU. Daher sind definitive Aussagen über ein Epitop schwierig.

4.5 Auswahl spezifischer Proteine für die Antikörperscreenings

Für die Antikörperisolation mittels Phage Display wurden sieben zusätzliche Proteine ausgehend von dem neu identifizierten Immunogen NGO1634 ausgewählt, die aufgrund einer bioinformatischen Analyse Kandidaten für ein spezifisches, antikörperbasiertes Diagnostiktool wären. In der ersten Auswahl waren 26 Proteine, die mittels String Datenbank als funktionelle Partner und Nachbarschaftsproteine von NGO1634 ermittelt wurden und größtenteils als hypothetische Proteine annotiert sind. Für die Auswahl wurde darauf geachtet, dass die Proteine möglichst an der Zelloberfläche präsentiert werden und sie spezifisch für *N. gonorrhoeae* sind. Letztendlich wurden vier Proteine ausgewählt, deren Lokalisation in der äußeren Membran vorhergesagt wurde und eines, das laut Vorhersage in Microbodies lokalisiert ist. Die drei weiteren Proteine waren neben NGO1634 zwei weitere zytoplasmatische, hypothetische Proteine, die auch als putative Phagen-assoziierte Proteine annotiert sind. Durch Alignments, Hydrophobizitätsplots, 3D-Strukturmodelle und Transmembrantopologie wurden spezifische Bereiche ausgewählt, die auf der Proteinoberfläche und, falls möglich, außerhalb der Membran präsentiert werden. Aus diesen Bereichen wurden die Peptide für die Antikörperselektion ausgewählt. Für NGO1430 und NGO1847 wurden die Vollängenproteine für die Antikörperselektion verwendet, um zu überprüfen, ob die Antikörperselektion gegen Vollängenproteine erfolgreicher als mit einem Peptidantigen ist. Zusätzlich wurde die Transkription der ausgewählten Gene durch qPCR überprüft. Die Cp-Werte der Proben lagen alle unterhalb von 27 Zyklen bis auf NGO0555 mit 31,35 Zyklen. Die Negativkontrollen lagen hingegen alle über 31 Zyklen, sodass immer mindestens 5 Zyklen zwischen Probe und Negativkontrollen lagen. Somit wurde die Transkription der ausgewählten Proteine bis auf NGO0555 nachgewiesen. Die Expression und Funktion der Proteine ist dadurch jedoch nicht bewiesen. Die Expression und Lokalisation könnten mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen und bestimmt werden, während die Funktion durch Knockoutmutanten untersucht werden könnte.

4.6 Charakterisierung rekombinanter scFv-Fc-Fusionsantikörper

Gegen die ausgewählten Antigene wurden 29 scFv-Antikörper mittels Phage Display isoliert. Nach dem Vergleich der scFv-Antikörper durch Titrations-ELISAs, der Produktion der scFv-Fc-Fusionsantikörper in CHO-Zellen und der Überprüfung der Fusionsantikörper durch Western Blots und Titrations-ELISAs wurden insgesamt 16 scFv-Fc-Fusionsantikörper weiter charakterisiert. Durch Affinitätsmessungen mittels SPR wurden die K_D -Werte der einzelnen Klone bestimmt. Die meisten K_D -Werte lagen im zwei- bis dreistelligen nanomolaren Bereich und sind mit monoklonalen Mausantikörpern mit einer niedrigen Affinität vergleichbar (vgl. Abbildung 4.1). Die meisten Mausantikörper liegen im einstelligen nanomolaren Bereich (knapp 40 %), wohingegen monoklonale Kaninchenantikörper im zwei- bis dreistelligen picomolaren Bereich (ca. 87 %) liegen.

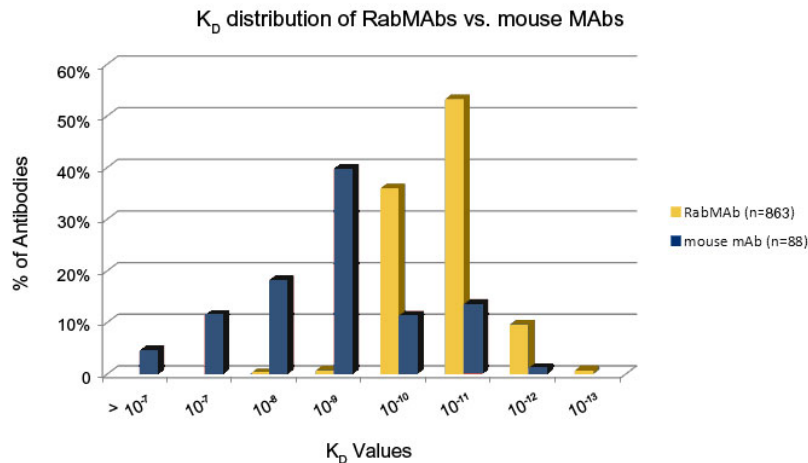


Abbildung 4.1: Vergleich der K_D -Werte von monoklonalen Maus- und Kaninchenantikörpern.

Die isolierten rekombinanten Antikörper lagen im Bereich von 10^{-8} – 10^{-7} und somit auf Höhe von Mausantikörpern mit relativ niedriger Affinität (www.abcam.com/ps/CMS/Images/kd-figure12.jpg, abgerufen am 08.04.2016).

Die berechneten Affinitäten lagen im üblichen Bereich bei der Isolation von rekombinanten Antikörpern aus Phage Display Bibliotheken [239,240]. Der direkte Nachweis der Proteine auf Zellen oder im Zelllysate war mit den isolierten Antikörpern nicht möglich. Dies könnte mehrere Ursachen haben. Während bei einem direkten Nachweis der Antigene in einer MTP-Platte etliche Moleküle in genau der Form vorliegen, gegen die auch die Antikörper isoliert wurden, liegt im Lysat oder beim ELISA mit ganzen Zellen ein Gemisch von hunderten bis tausenden Proteinen und anderen Molekülen vor. Je nachdem wie sich die Expression des gesuchten Antigens verhält, ist möglicherweise nur eine geringe Anzahl an Kopien dieses Moleküls auf der Zelle präsentiert oder im Lysat vorhanden. Die Detektion von einigen Molekülen in einem Gemisch aus vielen anderen Molekülen ist ohne Signalamplifikation schwierig, sodass eventuell selbst gebundene Moleküle in einem ELISA mit HRP-Sekundärantikörper nicht ausreichend detektiert werden. Des Weiteren wurden Antikörper auch gegen Proteine isoliert, die laut Vorhersage nicht auf der Oberfläche präsentiert werden. Diese Proteine könnten höchstens im Lysat nachgewiesen werden. Allerdings wurde auch bei Untersuchungen mit dem Lysat kein Signal erhalten. Eine Erklärung, die wiederum mit der Anzahl der exprimierten Moleküle zu tun hat, wäre die niedrige Affinität der Antikörper. Eventuell hätten wesentlich längere Inkubationszeiten zu einer Signalzunahme geführt. Allerdings steigt bei einer zu langen Inkubationszeit auch die Hintergrundfärbung in den Negativkontrollen an. Mögliche Abhilfe könnte eine Affinitätsreifung der Antikörper sein. Hierbei wird eine Phagenbibliothek erstellt, bei der zufällige Mutationen durch mehrere Runden einer *error-prone* PCR eingefügt werden [240]. So kann die Affinität von rekombinanten Antikörpern bis zu 100-fach erhöht werden [241]. Allerdings fiel bei den Peptidantigenen auf, dass die isolierten Antikörper bereits auf Proteinebene keine Bindung mehr zeigten. Während die Peptidantigene detektiert wurden, konnte bei den vorhandenen Vollängenproteinen, mit Zellen und im Lysat keine Bindung festgestellt werden. Dies traf bei den Vollängenproteinen von NGO0555, NGO1626 und NGO1634 zu. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür wäre, dass die gewählten Peptidbereiche trotz der Vorhersagen über Lokalisation, Struktur und Zugänglichkeit im Vollängenprotein nicht zugänglich für die Antikörper waren. Des Weiteren besteht auch die Möglichkeit, dass die gewählten Proteine unter Laborbedingungen nicht translatiert

4 Diskussion

werden. Obwohl die Anwesenheit transkribierter mRNA für alle Gene bis auf NGO0553 mittels qPCR bestätigt wurde, wäre es möglich, dass die Translation an anderer Stelle terminiert wird, wie z. B. bei der Initiation der Translation oder durch kurzlebige RNA Moleküle. Die vermeintlich äußeren Membranproteine NGO0553 und NGO1092 konnten nicht in *E. coli* exprimiert werden. Neben der schwierigen Expression von Membranproteinen spielte auch die Größe der beiden Proteine eine entscheidende Rolle (1206 AS und 1977 AS), sodass alternativ eine Expression von nach außen präsentierten Domänen oder eines Teilabschnitts des Proteins möglich gewesen wäre. Allerdings werden dabei auch nicht alle Strukturen so ausgebildet wie im nativen Protein. Da die rekombinanten Antikörper lineare Epitope erkennen, muss daher die gesamte Epitopsequenz oder ein essentieller Teil davon für den Antikörper nicht zugänglich sein.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die wachsende Anzahl an Antibiotika-resistenten Erregern birgt die Gefahr, dass scheinbar harmlose, bakteriellen Infektionen Patienten in Lebensgefahr bringen, da herkömmliche Therapiemethoden versagen. Es verlangt nach neuen diagnostischen Anwendungen und Therapieansätzen wie die Entwicklung von Impfstoffen. Bei einer Vielzahl von Pathogenen sind bisher jedoch keine oder nur wenige potentielle Antigene bekannt. Die Suche nach neuen spezifischen Antigenen ist daher notwendig. Zusätzlich sind auch Proteine interessant, die während der Infektion eine wichtige Rolle spielen und damit die Virulenz des Pathogens beeinflussen, um den Weg der Infektion vollständig zu verstehen.

In dieser Arbeit wurden immunogene Proteine von verschiedenen humanpathogenen Bakterien identifiziert und rekombinante scFv-Antikörperfragmente mittels Phage Display erfolgreich selektiert. Für *N. gonorrhoeae* wurden 21 immunogene Proteine isoliert und lineare Epitope für viele dieser immunogenen Proteine bestimmt. Für *N. meningitidis* und *B. burgdorferi* wurden ebenfalls zahlreiche immunogene Proteine identifiziert, von denen die Mehrheit bereits in der Literatur beschrieben waren. Für *C. difficile* wurden keine immunogenen Proteine identifiziert, da während der Pannings Humanseren verwendet wurden, die zu einem sehr niedrigen Phagentiter geführt haben.

Sechs der 21 immunogenen Proteine von *N. gonorrhoeae* waren zuvor nicht in der Literatur beschrieben und könnten zur Aufklärung der Virulenz von *N. gonorrhoeae* beitragen. Mithilfe von Knockoutmutanten könnte die Funktion des Proteins aufgeklärt werden. Eine veränderte Invasivität in einem Infektionsmodell würde für ein Virulenz-assoziiertes Protein sprechen. Je nach Bedeutung des Proteins für die Infektion könnten die Proteine auch als Ausgangspunkt für einen therapeutischen Ansatz fungieren, beispielsweise durch Blockieren von Bindestellen oder Inaktivierung der Funktion mit konkurrierenden Liganden. Für eine Anwendung in der Diagnostik könnten vor allem Membranproteine aber auch Proteine mit einer anderen Lokalisation verwendet werden. Hierfür wäre ein Assay denkbar, bei dem zunächst ein Zellaufschluss durchgeführt wird. Auf diese Weise könnten auch Proteine, die im Zellinneren lokalisiert sind, diagnostisch relevant werden. Beispielsweise könnte NGO1634 aus *N. gonorrhoeae* ein interessantes Target sein, das weiter untersucht werden sollte. Es ist als nicht charakterisiertes Protein oder putatives Phagen-assoziiertes Protein annotiert, könnte aber aufgrund der hier nachgewiesenen Transkription auch im Organismus von *N. gonorrhoeae* eine Funktion übernommen haben. Um die Funktion und die Translation zu überprüfen, wäre eine Knockoutmutante der erste Schritt zur weiteren Charakterisierung.

Zusätzlich wurden die immunogenen Proteine von *N. gonorrhoeae* auf lineare Epitope untersucht. Bemerkenswert war die hohe Anzahl an gefundenen linearen Epitopen, da in globulären Proteinen größtenteils diskontinuierliche bzw. strukturelle Epitope von B-Lymphozyten prozessiert werden. Lineare Epitope eignen sich für die Generierung von Antikörpern und werden auch bei der Impfstoffentwicklung eingesetzt. Die in dieser Arbeit identifizierten linearen Epitope lagen in den 3D-Strukturmodellen alle auf der Oberfläche der Proteine und müssten auf diese Weise zugänglich für Antikörper sein, die gegen diese Antigene gerichtet sind. Durch Immunisierung mit den Epitopeptiden könnte in-vivo überprüft werden, ob die Infektionsrate von *N. gonorrhoeae*

5 Schlussfolgerung und Ausblick

abnimmt. Des Weiteren könnten die generierten Antikörper möglicherweise verwendet werden, um *N. gonorrhoeae* spezifisch nachzuweisen.

Des Weiteren wurden scFv-Antikörperfragmente gegen funktionelle Partner des Proteins NGO1634 isoliert. Diese zeigten K_D -Werte im zwei- bis dreistelligen nanomolaren Bereich und sind somit vergleichbar mit monoklonalen Mausantikörpern mit niedrigen Affinitäten. Gegen alle Antigene wurden erfolgreich scFv-Antikörperfragmenten aus der HAL9/10 Bibliothek isoliert, die alle ihre Antigene erkannten. Allerdings wurden die entsprechenden Antigen auf Zellen und in Zelllysaten von *N. gonorrhoeae* nicht erkannt. Da es sich bei den ausgewählten Proteinen größtenteils um putative Proteine handelte und nur die Transkription der Gene nachgewiesen wurde, kann nicht eindeutig gesagt werden, ob die Proteine vom Organismus exprimiert wurden. Obendrein wurde keine Bindung zwischen Antikörpern gegen Peptide und deren Volllängenproteinen festgestellt. Offenbar waren die Übereinstimmung der gewählten Antigenpeptide und deren Volllängenproteine bezogen auf ihre Struktur nicht ausreichend, sodass die Volllängenantigene nicht von den Antikörpern gebunden wurden. Der Einsatz linearer Epitope für die Selektion rekombinanter Antikörper sollte diese Hürde überwinden, sodass die Antikörper, die gegen Peptide gerichtet sind, auch die Volllängenproteine erkennen. Durch die Generierung rekombinanter Antikörper gegen die Epitope der anderen identifizierten, immunogenen Proteine könnten deren Lokalisation und die Verfügbarkeit für die Entwicklung einer diagnostischen Anwendung genauer untersucht werden.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit immunogene Proteine von drei verschiedenen humanpathogenen Bakterien mittels Phage Display identifiziert und lineare Epitope der immunogenen Proteine von *N. gonorrhoeae* erfolgreich bestimmt. Die anschließende Selektion von scFv-Antikörperfragmenten generierte eine Vielzahl von Antikörpern gegen die ausgewählten Antigene. Für weitere Untersuchungen ist die Generierung von Antikörpern gegen die Volllängenproteine notwendig.

Literaturverzeichnis

1. Rothschild LJ, Mancinelli RL. Life in extreme environments. *Nature*. 2001;409: 1092–1101. doi:10.1038/35059215
2. Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ. Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2001;6: 170–174. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.00043.x
3. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *Lancet Lond Engl*. 2003;361: 512–519. doi:10.1016/S0140-6736(03)12489-0
4. Laubach CA, Rice JL. Spore-Bearing Bacteria in Soil. *J Bacteriol*. 1916;1: 513–518.
5. Jordan EO. The Kinds of Bacteria found in River Water. *J Hyg (Lond)*. 1903;3: 1–27.
6. Reysenbach AL, Wickham GS, Pace NR. Phylogenetic analysis of the hyperthermophilic pink filament community in Octopus Spring, Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60: 2113–2119.
7. Yurkov V, Beatty JT. Isolation of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria from black smoker plume waters of the Juan de Fuca ridge in the Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64: 337–341.
8. Junge K, Eicken H, Deming JW. Bacterial Activity at –2 to –20°C in Arctic Wintertime Sea Ice. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70: 550–557. doi:10.1128/AEM.70.1.550-557.2004
9. Abel-Santos E. *Bacterial Spores: Current Research and Applications*. Horizon Scientific Press; 2012.
10. WHO. WHO | Global tuberculosis report 2015 [Internet]. 2015 [cited 12 Apr 2016]. Available: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
11. WHO. WHO | Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide [Internet]. 2011 [cited 12 Apr 2016]. Available: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80135/1/9789241501507_eng.pdf?ua=1
12. Nikaido H. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu Rev Biochem*. 2009;78: 119–146. doi:10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923
13. Marchaim D, Chopra T, Pogue JM, Perez F, Hujer AM, Rudin S, et al. Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Metropolitan Detroit, Michigan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55: 593–599. doi:10.1128/AAC.01020-10
14. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16: 161–168. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7
15. Shmaefsky BR. *Gonorrhoea*. Chelsea House Publishing; 2005.
16. WHO. WHO | Sexually transmitted Infections (STIs) [Internet]. 2013 [cited 12 Apr 2016]. Available: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/82207/1/WHO_RHR_13.02_eng.pdf

Literaturverzeichnis

17. WHO. WHO | Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* [Internet]. 2012 [cited 9 Apr 2015]. Available: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241503501/en/>
18. Svensson L, Weström L, Ripa KT, Mårdh PA. Differences in some clinical and laboratory parameters in acute salpingitis related to culture and serologic findings. *Am J Obstet Gynecol*. 1980;138: 1017–1021.
19. Rotman E, Seifert HS. The genetics of *Neisseria* species. *Annu Rev Genet*. 2014;48: 405–431. doi:10.1146/annurev-genet-120213-092007
20. Falsetta ML, Steichen CT, McEwan AG, Cho C, Ketterer M, Shao J, et al. The Composition and Metabolic Phenotype of *Neisseria gonorrhoeae* Biofilms. *Front Microbiol*. 2011;2. doi:10.3389/fmicb.2011.00075
21. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Elsevier Health Sciences; 2014.
22. Update to CDC's Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010: Oral Cephalosporins No Longer a Recommended Treatment for Gonococcal Infections [Internet]. 9 Apr 2015 [cited 9 Apr 2015]. Available: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6131a3.htm>
23. Tapsall JW, Ndowa F, Lewis DA, Unemo M. Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009;7: 821–834. doi:10.1586/eri.09.63
24. Wallin J. Gonorrhoea in 1972. A 1-year study of patients attending the VD Unit in Uppsala. *Br J Vener Dis*. 1975;51: 41–47.
25. Handsfield HH, Lipman TO, Harnisch JP, Tronca E, Holmes KK. Asymptomatic Gonorrhea in Men. *N Engl J Med*. 1974;290: 117–123. doi:10.1056/NEJM197401172900301
26. John J, Donald WH. Asymptomatic urethral gonorrhoea in men. *Br J Vener Dis*. 1978;54: 322–323.
27. Holmes K. *Sexually Transmitted Diseases, Fourth Edition*. McGraw-Hill Education; 2008.
28. Workowski KA, Berman SM, Douglas J, John M. Emerging Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Urgent Need to Strengthen Prevention Strategies. *Ann Intern Med*. 2008;148: 606–613. doi:10.7326/0003-4819-148-8-200804150-00005
29. Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhea. *Future Microbiol*. 2012;7: 1401–1422. doi:10.2217/fmb.12.117
30. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, et al. Is *Neisseria gonorrhoeae* Initiating a Future Era of Untreatable Gonorrhea?: Detailed Characterization of the First Strain with High-Level Resistance to Ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55: 3538–3545. doi:10.1128/AAC.00325-11
31. Cole MJ, Spiteri G, Chisholm SA, Hoffmann S, Ison CA, Unemo M, et al. Emerging cephalosporin and multidrug-resistant gonorrhoea in Europe. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2014;19: 20955.

32. Barbee LA, Dombrowski JC. Control of *Neisseria Gonorrhoeae* in the Era of Evolving Antimicrobial Resistance. *Infect Dis Clin North Am*. 2013;27. doi:10.1016/j.idc.2013.08.001
33. Mulks MH, Plaut AG. IgA protease production as a characteristic distinguishing pathogenic from harmless *neisseriaceae*. *N Engl J Med*. 1978;299: 973–976. doi:10.1056/NEJM197811022991802
34. Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature*. 1987;325: 458–462. doi:10.1038/325458a0
35. Hagblom P, Segal E, Billyard E, So M. Intragenic recombination leads to pilus antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature*. 1985;315: 156–158.
36. Stern A, Brown M, Nickel P, Meyer TF. Opacity genes in *Neisseria gonorrhoeae*: control of phase and antigenic variation. *Cell*. 1986;47: 61–71.
37. Bauer FJ, Rudel T, Stein M, Meyer TF. Mutagenesis of the *Neisseria gonorrhoeae* porin reduces invasion in epithelial cells and enhances phagocyte responsiveness. *Mol Microbiol*. 1999;31: 903–913.
38. Christensen H, May M, Bowen L, Hickman M, Trotter CL. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2010;10: 853–861. doi:10.1016/S1473-3099(10)70251-6
39. Yazdankhah SP, Caugant DA. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol*. 2004;53: 821–832. doi:10.1099/jmm.0.45529-0
40. Jafri RZ, Ali A, Messonnier NE, Tevi-Benissan C, Durrheim D, Eskola J, et al. Global epidemiology of invasive meningococcal disease. *Popul Health Metr*. 2013;11: 17. doi:10.1186/1478-7954-11-17
41. Sharip A, Sorvillo F, Redelings MD, Mascola L, Wise M, Nguyen DM. Population-based analysis of meningococcal disease mortality in the United States: 1990-2002. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25: 191–194. doi:10.1097/01.inf.0000202065.03366.0c
42. WHO. WHO | Meningococcal meningitis [Internet]. 2015 [cited 14 Apr 2016]. Available: <http://www.who.int/immunization/topics/meningitis/en/>
43. Merkelbach S, Sittinger H, Schweizer I, Müller M. Cognitive outcome after bacterial meningitis. *Acta Neurol Scand*. 2000;102: 118–123.
44. van de Beek D, Schmand B, de Gans J, Weisfelt M, Vaessen H, Dankert J, et al. Cognitive impairment in adults with good recovery after bacterial meningitis. *J Infect Dis*. 2002;186: 1047–1052. doi:10.1086/344229
45. Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME. Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*. 2009;27, Supplement 2: B51–B63. doi:10.1016/j.vaccine.2009.04.063
46. Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet Lond Engl*. 2007;369: 2196–2210. doi:10.1016/S0140-6736(07)61016-2
47. Swartley JS, Marfin AA, Edupuganti S, Liu LJ, Cieslak P, Perkins B, et al. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94: 271–276.

Literaturverzeichnis

48. Robert-Koch-Institut. Ständige Impfkommision (STIKO) am RKI: Stellungnahme zum neuen Meningokokken-B-Impfstoff. *Epidemiologisches Bulletin* 49/2013. 2013. pp. 495–498. Available: http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2013/Ausgaben/49_13.pdf?__blob=publicationFile
49. Tzeng Y-L, Stephens DS. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microbes Infect.* 2000;2: 687–700. doi:10.1016/S1286-4579(00)00356-7
50. Gasparini R, Amicizia D, Lai PL, Panatto D. *Neisseria meningitidis*, pathogenetic mechanisms to overcome the human immune defences. *J Prev Med Hyg.* 2012;53: 50–55.
51. Hill DJ, Griffiths NJ, Borodina E, Virji M. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. *Clin Sci.* 2010;118: 547–564. doi:10.1042/CS20090513
52. Craig L, Volkmann N, Arvai AS, Pique ME, Yeager M, Egelman EH, et al. Type IV Pilus Structure by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography: Implications for Pilus Assembly and Functions. *Mol Cell.* 2006;23: 651–662. doi:10.1016/j.molcel.2006.07.004
53. Kirchner M, Meyer TF. The PilC adhesin of the *Neisseria* type IV pilus-binding specificities and new insights into the nature of the host cell receptor. *Mol Microbiol.* 2005;56: 945–957. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04600.x
54. Virji M, Watt SM, Barker S, Makepeace K, Doyonnas R. The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol.* 1996;22: 929–939.
55. Hung M-C, Christodoulides M. The Biology of *Neisseria* Adhesins. *Biology.* 2013;2: 1054–1109. doi:10.3390/biology2031054
56. Geoffroy M-C, Floquet S, Métais A, Nassif X, Pelicic V. Large-Scale Analysis of the *Meningococcus* Genome by Gene Disruption: Resistance to Complement-Mediated Lysis. *Genome Res.* 2003;13: 391–398. doi:10.1101/gr.664303
57. Schneider MC, Exley RM, Ram S, Sim RB, Tang CM. Interactions between *Neisseria meningitidis* and the complement system. *Trends Microbiol.* 2007;15: 233–240. doi:10.1016/j.tim.2007.03.005
58. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science.* 1982;216: 1317–1319.
59. Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. *J Clin Invest.* 2004;113: 1093–1101. doi:10.1172/JCI200421681
60. Appel MJ, Allan S, Jacobson RH, Lauderdale TL, Chang YF, Shin SJ, et al. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *J Infect Dis.* 1993;167: 651–664.
61. Philipp MT, Aydinug MK, Bohm RP, Cogswell FB, Dennis VA, Lanners HN, et al. Early and early disseminated phases of Lyme disease in the rhesus monkey: a model for infection in humans. *Infect Immun.* 1993;61: 3047–3059.
62. Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, et al. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol.* 1992;42: 378–383. doi:10.1099/00207713-42-3-378

63. Motaleb MA, Corum L, Bono JL, Elias AF, Rosa P, Samuels DS, et al. *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97: 10899–10904. doi:10.1073/pnas.200221797
64. Charon NW, Cockburn A, Li C, Liu J, Miller KA, Miller MR, et al. The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annu Rev Microbiol*. 2012;66: 349–370. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150145
65. Tilly K, Rosa PA, Stewart PE. Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin North Am*. 2008;22: 217–234, v. doi:10.1016/j.idc.2007.12.013
66. Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, et al. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*. 1997;390: 580–586. doi:10.1038/37551
67. Barbour AG, Garon CF. Linear plasmids of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have covalently closed ends. *Science*. 1987;237: 409–411. doi:10.1126/science.3603026
68. Hyde FW, Johnson RC. Characterization of a circular plasmid from *Borrelia burgdorferi*, etiologic agent of Lyme disease. *J Clin Microbiol*. 1988;26: 2203–2205.
69. Casjens S, Palmer N, van Vugt R, Huang WM, Stevenson B, Rosa P, et al. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol*. 2000;35: 490–516.
70. Schwan TG, Burgdorfer W, Garon CF. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of in vitro cultivation. *Infect Immun*. 1988;56: 1831–1836.
71. Xu Y, Kodner C, Coleman L, Johnson RC. Correlation of plasmids with infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto type strain B31. *Infect Immun*. 1996;64: 3870–3876.
72. Nadelman RB, Wormser GP. Erythema migrans and early Lyme disease. *Am J Med*. 1995;98: 15S–24S. doi:10.1016/S0002-9343(99)80040-0
73. Halperin JJ, Luft BJ, Anand AK, Roque CT, Alvarez O, Volkman DJ, et al. Lyme neuroborreliosis Central nervous system manifestations. *Neurology*. 1989;39: 753–753. doi:10.1212/WNL.39.6.753
74. Steere AC, Schoen RT, Taylor E. The Clinical Evolution of Lyme Arthritis. *Ann Intern Med*. 1987;107: 725–731. doi:10.7326/0003-4819-107-5-725
75. Hildenbrand P, Craven DE, Jones R, Nemeskal P. Lyme Neuroborreliosis: Manifestations of a Rapidly Emerging Zoonosis. *Am J Neuroradiol*. 2009;30: 1079–1087. doi:10.3174/ajnr.A1579
76. Tullus K, Aronsson B, Marcus S, Möllby R. Intestinal colonization with *Clostridium difficile* in infants up to 18 months of age. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 1989;8: 390–393.
77. Taylor RH, Borriello SP, Taylor AJ. Isolation of *Clostridium difficile* from the small bowel. *Br Med J Clin Res Ed*. 1981;283: 412.

Literaturverzeichnis

78. Nakamura S, Mikawa M, Nakashio S, Takabatake M, Okado I, Yamakawa K, et al. Isolation of *Clostridium difficile* from the Feces and the Antibody in Sera of Young and Elderly Adults. *Microbiol Immunol.* 1981;25: 345–351. doi:10.1111/j.1348-0421.1981.tb00036.x
79. Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends Microbiol.* 2014;22: 406–416. doi:10.1016/j.tim.2014.04.003
80. Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin Microbiol Rev.* 1988;1: 1–18. doi:10.1128/CMR.1.1.1
81. Keel MK, Songer JG. The Comparative Pathology of *Clostridium difficile*-associated Disease. *Vet Pathol Online.* 2006;43: 225–240. doi:10.1354/vp.43-3-225
82. McFarland LV. Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment. *Future Microbiol.* 2008;3: 563–578. doi:10.2217/17460913.3.5.563
83. Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH. Clindamycin-associated colitis. A prospective study. *Ann Intern Med.* 1974;81: 429–433.
84. Zimmerman MJ, Bak A, Sutherland LR. Review article: treatment of *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 1997;11: 1003–1012.
85. Poutanen SM, Simor AE. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *Can Med Assoc J.* 2004;171: 51–58. doi:10.1503/cmaj.1031189
86. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerg Infect Dis.* 2006;12: 409–415. doi:10.3201/eid1205.051064
87. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States [Internet]. 2013 [cited 19 Apr 2016]. Available: <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
88. Hennequin C, Porcheray F, Waligora-Dupriet A, Collignon A, Barc M, Bourlioux P, et al. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiol Read Engl.* 2001;147: 87–96. doi:10.1099/00221287-147-1-87
89. Tasteyre A, Barc MC, Collignon A, Boureau H, Karjalainen T. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect Immun.* 2001;69: 7937–7940. doi:10.1128/IAI.69.12.7937-7940.2001
90. Waligora AJ, Hennequin C, Mullany P, Bourlioux P, Collignon A, Karjalainen T. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect Immun.* 2001;69: 2144–2153. doi:10.1128/IAI.69.4.2144-2153.2001
91. Hecht G, Koutsouris A, Pothoulakis C, LaMont JT, Madara JL. *Clostridium difficile* toxin B disrupts the barrier function of T84 monolayers. *Gastroenterology.* 1992;102: 416–423.
92. Giles Dobson CH. *Clostridium difficile* colitis causing toxic megacolon, severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* 2003;29: 1030. doi:10.1007/s00134-003-1754-7

93. Murphy, Kenneth M., Mowat, Allan, Weaver, Casey T. *Janeway's immunobiology*. 8th edition. New York: Garland Science; 2012.
94. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985;228: 1315–1317.
95. Cesareni G, Castagnoli L, Cestra G. Phage displayed peptide libraries. *Comb Chem High Throughput Screen*. 1999;2: 1–17.
96. Lang Q, Wang F, Yin L, Liu M, Petrenko VA, Liu A. Specific probe selection from landscape phage display library and its application in enzyme-linked immunosorbent assay of free prostate-specific antigen. *Anal Chem*. 2014;86: 2767–2774. doi:10.1021/ac404189k
97. Meyer T, Schirrmann T, Frenzel A, Miethe S, Stratmann-Selke J, Gerlach GF, et al. Identification of immunogenic proteins and generation of antibodies against *Salmonella Typhimurium* using phage display. *BMC Biotechnol*. 2012;12: 29. doi:10.1186/1472-6750-12-29
98. Becker M, Felsberger A, Frenzel A, Shattuck WMC, Dyer M, Kügler J, et al. Application of M13 phage display for identifying immunogenic proteins from tick (*Ixodes scapularis*) saliva. *BMC Biotechnol*. 2015;15: 43. doi:10.1186/s12896-015-0167-3
99. Kügler J, Nieswandt S, Gerlach GF, Meens J, Schirrmann T, Hust M. Identification of immunogenic polypeptides from a *Mycoplasma hyopneumoniae* genome library by phage display. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;80: 447–458. doi:10.1007/s00253-008-1576-1
100. Naseem S, Meens J, Jores J, Heller M, Dübel S, Hust M, et al. Phage display-based identification and potential diagnostic application of novel antigens from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Vet Microbiol*. 2010;142: 285–292. doi:10.1016/j.vetmic.2009.09.071
101. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making Antibodies by Phage Display Technology. *Annu Rev Immunol*. 1994;12: 433–455. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.002245
102. Popkov M, Rader C, Barbas CF. Isolation of human prostate cancer cell reactive antibodies using phage display technology. *J Immunol Methods*. 2004;291: 137–151. doi:10.1016/j.jim.2004.05.004
103. Nian S, Wu T, Ye Y, Wang X, Xu W, Yuan Q. Development and identification of fully human scFv-Fcs against *Staphylococcus aureus*. *BMC Immunol*. 2016;17: 8. doi:10.1186/s12865-016-0146-z
104. Shirvan AN, Aitken R. Isolation of recombinant antibodies directed against surface proteins of *Clostridium difficile*. *Braz J Microbiol Publ Braz Soc Microbiol*. 2016;47: 394–402. doi:10.1016/j.bjm.2016.01.017
105. Stocker G, Dumoulin D, Vandevyver C, Hilbrig F, Freitag R. Screening of a human antibody phage display library against a peptide antigen using stimuli-responsive bioconjugates. *Biotechnol Prog*. 2008;24: 1314–1324. doi:10.1002/btpr.60
106. Barbas CF, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88: 7978–7982.
107. Rondot S, Koch J, Breitling F, Dübel S. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat Biotechnol*. 2001;19: 75–78. doi:10.1038/83567

Literaturverzeichnis

108. Soltes G, Hust M, Ng KKY, Bansal A, Field J, Stewart DIH, et al. On the influence of vector design on antibody phage display. *J Biotechnol.* 2007;127: 626–637. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.08.015
109. Hust M, Meysing M, Schirrmann T, Selke M, Meens J, Gerlach G-F, et al. Enrichment of open reading frames presented on bacteriophage M13 using hyperphage. *BioTechniques.* 2006;41: 335–342.
110. Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, et al. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol.* 1996;14: 309–314. doi:10.1038/nbt0396-309
111. de Haard HJ, van Neer N, Reurs A, Hufton SE, Roovers RC, Henderikx P, et al. A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem.* 1999;274: 18218–18230.
112. Hust M, Meyer T, Voedisch B, Rülker T, Thie H, El-Ghezal A, et al. A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *J Biotechnol.* 2011;152: 159–170. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.945
113. Pelat T, Hust M, Laffly E, Condemine F, Bottex C, Vidal D, et al. High-Affinity, Human Antibody-Like Antibody Fragment (Single-Chain Variable Fragment) Neutralizing the Lethal Factor (LF) of *Bacillus anthracis* by Inhibiting Protective Antigen-LF Complex Formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51: 2758–2764. doi:10.1128/AAC.01528-06
114. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol.* 1991;222: 581–597.
115. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature.* 1991;352: 624–628. doi:10.1038/352624a0
116. Lazcka O, Del Campo FJ, Muñoz FX. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2007;22: 1205–1217. doi:10.1016/j.bios.2006.06.036
117. Leoni E, Legnani PP. Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of *Legionella* species from hot water systems. *J Appl Microbiol.* 2001;90: 27–33.
118. Relman DA. Detection and identification of previously unrecognized microbial pathogens. *Emerg Infect Dis.* 1998;4: 382–389. doi:10.3201/eid0403.980310
119. Mahony JB, Jang D, Chong S, Luinstra K, Sellors J, Tyndall M, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Mycoplasma genitalium* in first-void urine specimens by multiplex polymerase chain reaction. *Mol Diagn.* 1997;2: 161–168. doi:10.1016/S1084-8592(97)80024-0
120. Gaydos CA, Cartwright CP, Colaninno P, Welsch J, Holden J, Ho SY, et al. Performance of the Abbott RealTime CT/NG for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 2010;48: 3236–3243. doi:10.1128/JCM.01019-10
121. Bélanger SD, Boissinot M, Clairoux N, Picard FJ, Bergeron MG. Rapid Detection of *Clostridium difficile* in Feces by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 2003;41: 730–734. doi:10.1128/JCM.41.2.730-734.2003

122. Edwards T, Burke PA, Smalley HB, Gillies L, Hobbs G. Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for Detection of *Neisseria gonorrhoeae* in Urine Samples and Tolerance of the Assay to the Presence of Urea. *J Clin Microbiol.* 2014;52: 2163–2165. doi:10.1128/JCM.00314-14
123. Zhang LL, Hou XX, Geng Z, Lou YL, Wan KL, Hao Q. Combination of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay and Nested PCR for Detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Human Serum Samples. *Biomed Environ Sci BES.* 2015;28: 312–315. doi:10.3967/bes2015.044
124. McElgunn CJ, Pereira CR, Parham NJ, Smythe JE, Wigglesworth MJ, Smielewska A, et al. A Low Complexity Rapid Molecular Method for Detection of *Clostridium difficile* in Stool. *PLOS ONE.* 2014;9: e83808. doi:10.1371/journal.pone.0083808
125. Silber E, Sonnenberg P, Ho KC, Koornhof HJ, Eintracht S, Morris L, et al. Meningitis in a community with a high prevalence of tuberculosis and HIV infection. *J Neurol Sci.* 1999;162: 20–26. doi:10.1016/S0022-510X(98)00259-7
126. Smismans A, Goossens VJ, Nulens E, Bruggeman CA. Comparison of five different immunoassays for the detection of *Borrelia burgdorferi* IgM and IgG antibodies. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12: 648–655. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01448.x
127. Krásný L, Hynek R, Hochel I. Identification of bacteria using mass spectrometry techniques. *Int J Mass Spectrom.* 2013;353: 67–79. doi:10.1016/j.ijms.2013.04.016
128. Goodacre R, Heald JK, Kell DB. Characterisation of intact microorganisms using electrospray ionisation mass spectrometry. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;176: 17–24. doi:10.1016/S0378-1097(99)00212-8
129. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 1996;14: 1584–1586. doi:10.1038/nbt1196-1584
130. Alcalá L, Sánchez-Cambronero L, Catalán MP, Sánchez-Somolinos M, Peláez MT, Marín M, et al. Comparison of Three Commercial Methods for Rapid Detection of *Clostridium difficile* Toxins A and B from Fecal Specimens. *J Clin Microbiol.* 2008;46: 3833–3835. doi:10.1128/JCM.01060-08
131. Herring AJ, Ballard RC, Pope V, Adegbola RA, Chungalucha J, Fitzgerald DW, et al. A multi-centre evaluation of nine rapid, point-of-care syphilis tests using archived sera. *Sex Transm Infect.* 2006;82: v7–v12. doi:10.1136/sti.2006.022707
132. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 1979;76: 4350–4354.
133. Pitarch A, Pardo M, Jiménez A, Pla J, Gil C, Sánchez M, et al. Two-dimensional gel electrophoresis as analytical tool for identifying *Candida albicans* immunogenic proteins. *ELECTROPHORESIS.* 1999;20: 1001–1010. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19990101)20:4/5<1001::AID-ELPS1001>3.0.CO;2-L
134. Pardo M, Ward M, Pitarch A, Sánchez M, Nombela C, Blackstock W, et al. Cross-species identification of novel *Candida albicans* immunogenic proteins by combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *ELECTROPHORESIS.* 2000;21: 2651–2659. doi:10.1002/1522-2683(20000701)21:13<2651::AID-ELPS2651>3.0.CO;2-3

135. Connolly JP, Comerici D, Alefantis TG, Walz A, Quan M, Chafin R, et al. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *PROTEOMICS*. 2006;6: 3767–3780. doi:10.1002/pmic.200500730
136. Eyles JE, Unal B, Hartley MG, Newstead SL, Flick-Smith H, Prior JL, et al. Immunodominant *Francisella tularensis* antigens identified using proteome microarray. ©Crown Copyright 2007 Dstl. *PROTEOMICS*. 2007;7: 2172–2183. doi:10.1002/pmic.200600985
137. Lee S-J, Liang L, Juarez S, Nanton MR, Gondwe EN, Msefula CL, et al. Identification of a common immune signature in murine and human systemic Salmonellosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109: 4998–5003. doi:10.1073/pnas.1111413109
138. Hoppe S, Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M. Microarray-based method for screening of immunogenic proteins from bacteria. *J Nanobiotechnology*. 2012;10: 12. doi:10.1186/1477-3155-10-12
139. Hoppe S, Bier FF, Nickisch-Rosenegk M v. Rapid Identification of Novel Immunodominant Proteins and Characterization of a Specific Linear Epitope of *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE*. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0065837
140. Danckert L, Hoppe S, Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M. Rapid identification of novel antigens of *Salmonella Enteritidis* by microarray-based immunoscreening. *Mikrochim Acta*. 2014;181: 1707–1714. doi:10.1007/s00604-014-1197-6
141. Ramachandran N, Hainsworth E, Bhullar B, Eisenstein S, Rosen B, Lau AY, et al. Self-assembling protein microarrays. *Science*. 2004;305: 86–90. doi:10.1126/science.1097639
142. He M, Stoevesandt O, Palmer EA, Khan F, Ericsson O, Taussig MJ. Printing protein arrays from DNA arrays. *Nat Methods*. 2008;5: 175–177. doi:10.1038/nmeth.1178
143. Barbour AG, Jasinskas A, Kayala MA, Davies DH, Steere AC, Baldi P, et al. A Genome-Wide Proteome Array Reveals a Limited Set of Immunogens in Natural Infections of Humans and White-Footed Mice with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*. 2008;76: 3374–3389. doi:10.1128/IAI.00048-08
144. Samuels DS. *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis*. Horizon Scientific Press; 2010.
145. Kwiatek A, Bacal P, Wasiluk A, Trybunko A, Adamczyk-Poplawska M. The dam replacing gene product enhances *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 viability and biofilm formation. *Front Microbiol*. 2014;5. doi:10.3389/fmicb.2014.00712
146. Hughes CA, Johnson RC. Methylated DNA in *Borrelia* species. *J Bacteriol*. 1990;172: 6602–6604.
147. Jacobsson K, Rosander A, Bjerketorp J, Frykberg L. Shotgun phage display - Selection for bacterial receptors or other exported proteins. *Biol Proced Online*. 2003;5: 123–135. doi:10.1251/bpo54
148. Rondot S, Koch J, Breitling F, Dubel S. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat Biotechnol*. 2001;19: 75–78. doi:10.1038/83567
149. Myers JA, Curtis BS, Curtis WR. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophys*. 2013;6: 4. doi:10.1186/2046-1682-6-4

150. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press; 2001.
151. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006;7: 3. doi:10.1186/1471-2199-7-3
152. Kügler J, Wilke S, Meier D, Tomszak F, Frenzel A, Schirrmann T, et al. Generation and analysis of the improved human HAL9/10 antibody phage display libraries. *BMC Biotechnol*. 2015;15: 10. doi:10.1186/s12896-015-0125-0
153. Stothard P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques*. 2000;28: 1102, 1104.
154. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215: 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
155. Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinforma Oxf Engl*. 2010;26: 1608–1615. doi:10.1093/bioinformatics/btq249
156. Nakai K, Horton P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci*. 1999;24: 34–36.
157. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 2011;8: 785–786. doi:10.1038/nmeth.1701
158. Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools in the ExpASY server. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 1999;112: 531–552.
159. Hofmann K, Stoffel W. TMBASE-A database of membrane spanning protein segments. *Biol Chem*. 1993;374: 166. doi:10.1515/bchm3.1993.374.1-6.143
160. Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol ISMB Int Conf Intell Syst Mol Biol*. 1998;6: 175–182.
161. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods*. 2015;12: 7–8. doi:10.1038/nmeth.3213
162. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. 2008;9: 40. doi:10.1186/1471-2105-9-40
163. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*. 2010;5: 725–738. doi:10.1038/nprot.2010.5
164. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25: 1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084
165. Benkert P, Künzli M, Schwede T. QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Res*. 2009;37: W510-514. doi:10.1093/nar/gkp322

166. Retter I, Althaus HH, Münch R, Müller W. VBASE2, an integrative V gene database. *Nucleic Acids Res.* 2005;33: D671–D674. doi:10.1093/nar/gki088
167. Ala'Aldeen D a. A, Westphal AH, Kok AD, Weston V, Atta MS, Baldwin TJ, et al. Cloning, sequencing, characterisation and implications for vaccine design of the novel dihydrolipoyl acetyltransferase of *Neisseria meningitidis*. *J Med Microbiol.* 1996;45: 419–432. doi:10.1099/00222615-45-6-419
168. Gil J, Betancourt LZH, Sardiñas G, Yero D, Niebla O, Delgado M, et al. Proteomic study via a non-gel based approach of meningococcal outer membrane vesicle vaccine obtained from strain CU385: a road map for discovering new antigens. *Hum Vaccin.* 2009;5: 347–356.
169. Williams JN, Skipp PJ, O'Connor CD, Christodoulides M, Heckels JE. Immunoproteomic Analysis of the Development of Natural Immunity in Subjects Colonized by *Neisseria meningitidis* Reveals Potential Vaccine Candidates. *Infect Immun.* 2009;77: 5080–5089. doi:10.1128/IAI.00701-09
170. Vaughan TE, Skipp PJ, O'Connor CD, Hudson MJ, Vipond R, Elmore MJ, et al. Proteomic analysis of *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccine antigens. *Vaccine.* 2006;24: 5277–5293. doi:10.1016/j.vaccine.2006.03.013
171. Black JR, Black WJ, Cannon JG. Neisserial antigen H.8 is immunogenic in patients with disseminated gonococcal and meningococcal infections. *J Infect Dis.* 1985;151: 650–657.
172. Hsu C-A, Lin W-R, Li J-C, Liu Y-L, Tseng Y-T, Chang C-M, et al. Immunoproteomic identification of the hypothetical protein NMB1468 as a novel lipoprotein ubiquitous in *Neisseria meningitidis* with vaccine potential. *PROTEOMICS.* 2008;8: 2115–2125. doi:10.1002/pmic.200700574
173. Mendum TA, Newcombe J, McNeilly CL, McFadden J. Towards the Immunoproteome of *Neisseria meningitidis*. *PLoS ONE.* 2009;4. doi:10.1371/journal.pone.0005940
174. Kurz S, Hübner C, Aepinus C, Theiss S, Guckenberger M, Panzner U, et al. Transcriptome-based antigen identification for *Neisseria meningitidis*. *Vaccine.* 2003;21: 768–775. doi:10.1016/S0264-410X(02)00596-0
175. Williams JN, Weynants V, Poolman JT, Heckels JE, Christodoulides M. Immuno-proteomic analysis of human immune responses to experimental *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccines identifies potential cross-reactive antigens. *Vaccine.* 2014;32: 1280–1286. doi:10.1016/j.vaccine.2013.12.070
176. Hubálek M, Hernychová L, Havlasová J, Kasalová I, Neubauerová V, Stulík J, et al. Towards proteome database of *Francisella tularensis*. *J Chromatogr B.* 2003;787: 149–177. doi:10.1016/S1570-0232(02)00730-4
177. Qamra R, Mande SC, Coates ARM, Henderson B. The unusual chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 2005;85: 385–394. doi:10.1016/j.tube.2005.08.014
178. Pizza M, Scarlato V, Maignani V, Giuliani MM, Aricò B, Comanducci M, et al. Identification of Vaccine Candidates Against Serogroup B Meningococcus by Whole-Genome Sequencing. *Science.* 2000;287: 1816–1820. doi:10.1126/science.287.5459.1816
179. Tsolakos N, Brookes C, Taylor S, Gorringer A, Tang CM, Feavers IM, et al. Identification of vaccine antigens using integrated proteomic analyses of surface immunogens from serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J Proteomics.* 2014;101: 63–76. doi:10.1016/j.jprot.2014.02.013

180. Griffiths E, Stevenson P, Ray A. Antigenic and molecular heterogeneity of the transferrin-binding protein of *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Lett.* 1990;57: 31–36.
181. Grandi G. Bioinformatics, DNA Microarrays and Proteomics in Vaccine Discovery: Competing or Complementary Technologies? In: Grandi G, editor. *Genomics, Proteomics and Vaccines*. John Wiley & Sons, Ltd; 2003. pp. 23–41. Available: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0470012536.ch2/summary>
182. Tidhar A, Flashner Y, Cohen S, Levi Y, Zauberman A, Gur D, et al. The NlpD Lipoprotein Is a Novel *Yersinia pestis* Virulence Factor Essential for the Development of Plague. *PLOS ONE.* 2009;4: e7023. doi:10.1371/journal.pone.0007023
183. Padmalayam I, Kelly T, Baumstark B, Massung R. Molecular Cloning, Sequencing, Expression, and Characterization of an Immunogenic 43-Kilodalton Lipoprotein of *Bartonella bacilliformis* That Has Homology to NlpD/LppB. *Infect Immun.* 2000;68: 4972–4979. doi:10.1128/IAI.68.9.4972-4979.2000
184. Pinkett HW, Lee AT, Lum P, Locher KP, Rees DC. An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science.* 2007;315: 373–377. doi:10.1126/science.1133488
185. Kovach AR, Hoff KE, Canty JT, Orans J, Brennan RG. Recognition of U-rich RNA by Hfq from the Gram-positive pathogen *Listeria monocytogenes*. *RNA N Y N.* 2014;20: 1548–1559. doi:10.1261/rna.044032.113
186. Wang J, Nemeria NS, Chandrasekhar K, Kumaran S, Arjunan P, Reynolds S, et al. Structure and Function of the Catalytic Domain of the Dihydrolipoyl Acetyltransferase Component in *Escherichia coli* Pyruvate Dehydrogenase Complex. *J Biol Chem.* 2014;289: 15215–15230. doi:10.1074/jbc.M113.544080
187. Ferbitz L, Maier T, Patzelt H, Bukau B, Deuerling E, Ban N. Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature.* 2004;431: 590–596. doi:10.1038/nature02899
188. Swinger KK, Lemberg KM, Zhang Y, Rice PA. Flexible DNA bending in HU-DNA cocrystal structures. *EMBO J.* 2003;22: 3749–3760. doi:10.1093/emboj/cdg351
189. Shigematsu H, Shimoda S, Nakamura M, Matsushita S, Nishimura Y, Sakamoto N, et al. Fine specificity of T cells reactive to human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant autoantigen in primary biliary cirrhosis: implications for molecular mimicry and cross-recognition among mitochondrial autoantigens. *Hepatology Baltim Md.* 2000;32: 901–909. doi:10.1053/jhep.2000.18714
190. Wiener M, Freymann D, Ghosh P, Stroud RM. Crystal structure of colicin Ia. *Nature.* 1997;385: 461–464. doi:10.1038/385461a0
191. Huang P-S, Oberdorfer G, Xu C, Pei XY, Nannenga BL, Rogers JM, et al. High thermodynamic stability of parametrically designed helical bundles. *Science.* 2014;346: 481–485. doi:10.1126/science.1257481
192. Sun T, Lin F-H, Campbell RL, Allingham JS, Davies PL. An Antifreeze Protein Folds with an Interior Network of More Than 400 Semi-Clathrate Waters. *Science.* 2014;343: 795–798. doi:10.1126/science.1247407

193. Qi R, Sarbeng EB, Liu Q, Le KQ, Xu X, Xu H, et al. Allosteric opening of the polypeptide-binding site when an Hsp70 binds ATP. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20: 900–907. doi:10.1038/nsmb.2583
194. Virji M, Heckels JE. Location of a blocking epitope on outer-membrane protein III of *Neisseria gonorrhoeae* by synthetic peptide analysis. *J Gen Microbiol.* 1989;135: 1895–1899. doi:10.1099/00221287-135-7-1895
195. Cordeiro AT, Cáceres AJ, Vertommen D, Concepción JL, Michels PAM, Versées W. The Crystal Structure of *Trypanosoma cruzi* Glucokinase Reveals Features Determining Oligomerization and Anomer Specificity of Hexose-phosphorylating Enzymes. *J Mol Biol.* 2007;372: 1215–1226. doi:10.1016/j.jmb.2007.07.021
196. Nakano H, Yoshida T, Uchiyama S, Kawachi M, Matsuo H, Kato T, et al. Structure and Binding Mode of a Ribosome Recycling Factor (RRF) from Mesophilic Bacterium. *J Biol Chem.* 2003;278: 3427–3436. doi:10.1074/jbc.M208098200
197. Wahl MC, Bourenkov GP, Bartunik HD, Huber R. Flexibility, conformational diversity and two dimerization modes in complexes of ribosomal protein L12. *EMBO J.* 2000;19: 174–186. doi:10.1093/emboj/19.2.174
198. Nisemblat S, Yaniv O, Parnas A, Frolow F, Azem A. Crystal structure of the human mitochondrial chaperonin symmetrical football complex. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112: 6044–6049. doi:10.1073/pnas.1411718112
199. Chaudhry C, Farr GW, Todd MJ, Rye HS, Brunger AT, Adams PD, et al. Role of the γ -phosphate of ATP in triggering protein folding by GroEL–GroES: function, structure and energetics. *EMBO J.* 2003;22: 4877–4887. doi:10.1093/emboj/cdg477
200. Wang J, Boisvert DC. Structural basis for GroEL-assisted protein folding from the crystal structure of (GroEL-KMgATP)₁₄ at 2.0Å resolution. *J Mol Biol.* 2003;327: 843–855.
201. Wright A, Drudy D, Kyne L, Brown K, Fairweather NF. Immunoreactive cell wall proteins of *Clostridium difficile* identified by human sera. *J Med Microbiol.* 2008;57: 750–756. doi:10.1099/jmm.0.47532-0
202. Christodoulides M. *Neisseria* proteomics for antigen discovery and vaccine development. *Expert Rev Proteomics.* 2014;11: 573–591. doi:10.1586/14789450.2014.938640
203. Gaseitsiwe S, Valentini D, Mahdavi S, Reilly M, Ehrnst A, Maeurer M. Peptide Microarray-Based Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Epitope Binding to HLA-DRB1*0101, DRB1*1501, and DRB1*0401. *Clin Vaccine Immunol CVI.* 2010;17: 168–175. doi:10.1128/CVI.00208-09
204. Hoppe S, Bier FF, von Nickisch-Roseneck M, Nickisch-Roseneck MV. Rapid identification of novel immunodominant proteins and characterization of a specific linear epitope of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One.* 2013;8: e65837. doi:10.1371/journal.pone.0065837
205. Horsfall AC, Hay FC, Soltys AJ, Jones MG. Epitope mapping. *Immunol Today.* 1991;12: 211–213. doi:10.1016/0167-5699(91)90029-S
206. Weng J, Ma J, Fan K, Wang W. Asymmetric conformational flexibility in the ATP-binding cassette transporter HI1470/1. *Biophys J.* 2009;96: 1918–1930. doi:10.1016/j.bpj.2008.11.035

207. Grifantini R, Bartolini E, Muzzi A, Draghi M, Frigimelica E, Berger J, et al. Gene expression profile in *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* upon host-cell contact: from basic research to vaccine development. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;975: 202–216.
208. Williams JN, Skipp PJ, Humphries HE, Christodoulides M, O'Connor CD, Heckels JE. Proteomic Analysis of Outer Membranes and Vesicles from Wild-Type Serogroup B *Neisseria meningitidis* and a Lipopolysaccharide-Deficient Mutant. *Infect Immun.* 2007;75: 1364–1372. doi:10.1128/IAI.01424-06
209. Dobrindt U, Blum-Oehler G, Nagy G, Schneider G, Johann A, Gottschalk G, et al. Genetic Structure and Distribution of Four Pathogenicity Islands (PAI I536 to PAI IV536) of Uropathogenic *Escherichia coli* Strain 536. *Infect Immun.* 2002;70: 6365–6372. doi:10.1128/IAI.70.11.6365-6372.2002
210. Pawlik M-C, Hubert K, Joseph B, Claus H, Schoen C, Vogel U. The Zinc-Responsive Regulon of *Neisseria meningitidis* Comprises 17 Genes under Control of a Zur Element. *J Bacteriol.* 2012;194: 6594–6603. doi:10.1128/JB.01091-12
211. Kehl-Fie TE, Skaar EP. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr Opin Chem Biol.* 2010;14: 218–224. doi:10.1016/j.cbpa.2009.11.008
212. Sonnleitner E, Hagens S, Rosenau F, Wilhelm S, Habel A, Jäger K-E, et al. Reduced virulence of a hfq mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb Pathog.* 2003;35: 217–228.
213. Sittka A, Pfeiffer V, Tedin K, Vogel J. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* 2007;63: 193–217. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05489.x
214. Ding Y, Davis BM, Waldor MK. Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates sigma expression. *Mol Microbiol.* 2004;53: 345–354. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04142.x
215. Fantappiè L, Metruccio MME, Seib KL, Oriente F, Cartocci E, Ferlicca F, et al. The RNA Chaperone Hfq Is Involved in Stress Response and Virulence in *Neisseria meningitidis* and Is a Pleiotropic Regulator of Protein Expression. *Infect Immun.* 2009;77: 1842–1853. doi:10.1128/IAI.01216-08
216. Dietrich M, Munke R, Gottschald M, Ziska E, Boettcher JP, Mollenkopf H, et al. The effect of hfq on global gene expression and virulence in *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS J.* 2009;276: 5507–5520. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07234.x
217. Hoang C, Ferré-D'Amaré AR. Cocystal Structure of a tRNA Ψ 55 Pseudouridine Synthase: Nucleotide Flipping by an RNA-Modifying Enzyme. *Cell.* 2001;107: 929–939. doi:10.1016/S0092-8674(01)00618-3
218. Poljak A, Comstedt P, Hanner M, Schüler W, Meinke A, Wizel B, et al. Identification and characterization of *Borrelia* antigens as potential vaccine candidates against Lyme borreliosis. *Vaccine.* 2012;30: 4398–4406. doi:10.1016/j.vaccine.2011.10.073
219. Dorman CJ, Deighan P. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13: 179–184.
220. Miller HI, Kirk M, Echols H. SOS induction and autoregulation of the *himA* gene for site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78: 6754–6758.

221. Piekarowicz A, Kłyż A, Majchrzak M, Adamczyk-Popławska M, Mangel TK, Stein DC. Characterization of the dsDNA prophage sequences in the genome of *Neisseria gonorrhoeae* and visualization of productive bacteriophage. *BMC Microbiol.* 2007;7: 66. doi:10.1186/1471-2180-7-66
222. Janosi L, Shimizu I, Kaji A. Ribosome recycling factor (ribosome releasing factor) is essential for bacterial growth. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91: 4249–4253.
223. Teixeira-Gomes AP, Cloeckert A, Zygmunt MS. Characterization of Heat, Oxidative, and Acid Stress Responses in *Brucella melitensis*. *Infect Immun.* 2000;68: 2954–2961. doi:10.1128/IAI.68.5.2954-2961.2000
224. Sanchez-Campillo M, Bini L, Comanducci M, Raggiaschi R, Marzocchi B, Pallini V, et al. Identification of immunoreactive proteins of *Chlamydia trachomatis* by Western blot analysis of a two-dimensional electrophoresis map with patient sera. *ELECTROPHORESIS.* 1999;20: 2269–2279. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19990801)20:11<2269::AID-ELPS2269>3.0.CO;2-D
225. Haas G, Karaali G, Ebermayer K, Metzger WG, Lamer S, Zimny-Arndt U, et al. Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. *Proteomics.* 2002;2: 313–324.
226. Mallick AI, Singha H, Khan S, Anwar T, Ansari MA, Khalid R, et al. Escheriosome-mediated delivery of recombinant ribosomal L7/L12 protein confers protection against murine brucellosis. *Vaccine.* 2007;25: 7873–7884. doi:10.1016/j.vaccine.2007.09.008
227. Cannon JG. Conserved lipoproteins of pathogenic *Neisseria* species bearing the H.8 epitope: lipid-modified azurin and H.8 outer membrane protein. *Clin Microbiol Rev.* 1989;2: S1–S4.
228. Bae JE, Schurig GG, Toth TE. Mice immune responses to *Brucella abortus* heat shock proteins: Use of baculovirus recombinant-expressing whole insect cells, purified *Brucella abortus* recombinant proteins, and a vaccinia virus recombinant as immunogens. *Vet Microbiol.* 2002;88: 189–202. doi:10.1016/S0378-1135(02)00101-3
229. Kelly DF, Rappuoli R. Reverse Vaccinology and Vaccines for Serogroup B *Neisseria meningitidis*. In: Pollard AJ, Finn A, editors. *Hot Topics in Infection and Immunity in Children II.* Springer US; 2005. pp. 217–223. Available: http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-25342-4_15
230. Swanson J, Mayer LW, Tam MR. Antigenicity of *Neisseria gonorrhoeae* outer membrane protein(s) III detected by immunoprecipitation and Western blot transfer with a monoclonal antibody. *Infect Immun.* 1982;38: 668–672.
231. Pannekoek Y, Dankert J, van Putten JP. Construction of recombinant neisserial Hsp60 proteins and mapping of antigenic domains. *Mol Microbiol.* 1995;15: 277–285.
232. Knaust A, Weber MVR, Hammerschmidt S, Bergmann S, Frosch M, Kurzai O. Cytosolic Proteins Contribute to Surface Plasminogen Recruitment of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* 2007;189: 3246–3255. doi:10.1128/JB.01966-06
233. Spence JM, Clark VL. Role of Ribosomal Protein L12 in Gonococcal Invasion of Hec1B Cells. *Infect Immun.* 2000;68: 5002–5010. doi:10.1128/IAI.68.9.5002-5010.2000
234. Spence JM, Tyler RE, Domaaal RA, Clark VL. L12 enhances gonococcal transcytosis of polarized Hec1B cells via the lutropin receptor. *Microb Pathog.* 2002;32: 117–125. doi:10.1006/mpat.2001.0484

235. Ferrari G, Garaguso I, Adu-Bobie J, Doro F, Taddei AR, Biolchi A, et al. Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis* Δgna33 mutant: Proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles. *PROTEOMICS*. 2006;6: 1856–1866. doi:10.1002/pmic.200500164
236. Wolff K, Stern A. Identification and characterization of specific sequences encoding pathogenicity associated proteins in the genome of commensal *Neisseria* species. *FEMS Microbiol Lett*. 1995;125: 255–263. doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07366.x
237. Xue Yang ZW. Crystal structure of lipoprotein GNA1946 from *Neisseria meningitidis*. *J Struct Biol*. 2009;168: 437–43. doi:10.1016/j.jsb.2009.09.001
238. Tinsley CR, Virji M, Heckels JE. Antibodies recognizing a variety of different structural motifs on meningococcal Lip antigen fail to demonstrate bactericidal activity. *J Gen Microbiol*. 1992;138: 2321–2328. doi:10.1099/00221287-138-11-2321
239. Coia G, Hudson PJ, Irving RA. Protein affinity maturation in vivo using *E. coli* mutator cells. *J Immunol Methods*. 2001;251: 187–193. doi:10.1016/S0022-1759(01)00300-3
240. Thie H, Voedisch B, Dübel S, Hust M, Schirrmann T. Affinity Maturation by Phage Display. In: Dimitrov AS, editor. *Therapeutic Antibodies*. Humana Press; 2009. pp. 309–322. Available: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-554-1_16
241. Low NM, Holliger P, Winter G. Mimicking Somatic Hypermutation: Affinity Maturation of Antibodies Displayed on Bacteriophage Using a Bacterial Mutator Strain. *J Mol Biol*. 1996;260: 359–368. doi:10.1006/jmbi.1996.0406

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers und zweier Antikörperfragmente.....	10
Abbildung 1.2: Schematischer Überblick des kompletten Ablaufs der Konstruktion einer Phagenbibliothek und der Identifikation neuer immunogener Proteine bis hin zur Selektion spezifischer, rekombinanter Antikörperfragmente aus einer scFv-Antikörper-Phagenbibliothek (Modifiziert nach Meyer et al. [97]).	16
Abbildung 2.1: Pipettierschema des Titrations-ELISAs.....	37
Abbildung 3.1: Vergleich der Größenverteilung und Restriktionsmuster nach dem Verdau von genomischer DNA (gDNA) mit Restriktionsenzymen und nach der Ultraschallfragmentierung.....	41
Abbildung 3.2: Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung der CPCR-Fragmente von Einzelklonen der <i>N. gonorrhoeae</i> Bibliotheken.....	42
Abbildung 3.3: Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung der CPCR-Fragmente von Einzelklonen der mit Hyperphage verpackten <i>N. gonorrhoeae</i> Bibliotheken.....	45
Abbildung 3.4: Auswertung eines Screening-ELISA mit 92 Einzelklonen einer <i>N. gonorrhoeae</i> Bibliothek.....	46
Abbildung 3.5: Amplifikation der Volllängengene und Expression und Aufreinigung der Volllängenproteine.	53
Abbildung 3.6: ELISA Ergebnis der exprimierten und aufgereinigten Volllängenproteine zur Verifizierung ihres immunogenen Charakters (n = 3).....	54
Abbildung 3.7: Epitopmappings der durch Phage Display isolierten Polypeptide von NGO0326 und NGO0564 (n = 9).....	55
Abbildung 3.8: Epitopmapping der durch Phage Display isolierten Polypeptide von NGO00592 (n = 9).....	56
Abbildung 3.9: Spezifitätskontrolle der drei Epitoppeptide von NGO0592.	56
Abbildung 3.10: Epitopmapping des durch Phage Display isolierten Polypeptids von NGO0777 (n = 9).....	57
Abbildung 3.11: Epitopmappings der durch Phage Display isolierten Polypeptide von NGO1429 (n = 9).....	58
Abbildung 3.12: Epitopmappings der durch Phage Display isolierten Polypeptide von NGO1577 und NGO1656 (n = 9).....	59
Abbildung 3.13: Epitopmappings der durch Phage Display isolierten Polypeptide von NGO1852 und NGO2094 (n = 9).....	60
Abbildung 3.14: Epitopmappings der durch Phage Display isolierten Polypeptide von NGO2095 (n = 9).....	61
Abbildung 3.15: Vergleich der Epitopmappings des Phagen-präsentierten Peptids von NGO1043 mit drei (links) und einem (rechts) Primärantikörper.....	62
Abbildung 3.16: Vergleich der Epitopmappings des Phagen-präsentierten Peptids von NGO0916 mit drei (links) und einem (rechts) Primärantikörper.....	62

Abbildung 3.17: Vergleich der Epitopmappings des durch Phage Display isolierten Polypeptids von NGO1796 (n = 9) mit drei (links) und einem (rechts) Primärantikörper.	63
Abbildung 3.18: Epitopmapping von NGO0170 mittels immobilisierter Peptide auf einer Cellulose Membran (Lot# 3542_1).....	64
Abbildung 3.19: Box-Whisker-Plot des Alaninscans des identifizierten Epitops von NGO0326 (n =9).....	65
Abbildung 3.20: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der beiden identifizierten Epitope von NGO0564 (n = 9).....	66
Abbildung 3.21: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der identifizierten Epitope von NGO00584 und NGO00592 (n = 9).....	66
Abbildung 3.22: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der identifizierten Epitope von NGO0777 und NGO00916 (n = 9).....	67
Abbildung 3.23: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der beiden identifizierten Epitope von NGO1043 (n = 9).....	68
Abbildung 3.24: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der beiden identifizierten Epitope von NGO1429 (n = 9).....	69
Abbildung 3.25: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der beiden identifizierten Epitope von NGO1577 (n = 9).....	69
Abbildung 3.26: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der identifizierten Epitope von NGO1634 und NGO1656 (n = 9).....	70
Abbildung 3.27: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der beiden identifizierten Epitope von NGO1796 (n = 9).....	71
Abbildung 3.28: Box-Whisker-Plot des Alaninscans des identifizierten Epitops von NGO1852 (n = 9).....	71
Abbildung 3.29: Box-Whisker-Plots der Alaninscans der beiden identifizierten Epitope von NGO2094 (n = 9).....	72
Abbildung 3.30: Box-Whisker-Plots der Alaninscans des ersten und zweiten identifizierten Epitops von NGO2095 (n = 9).....	72
Abbildung 3.31: Box-Whisker-Plots der Alaninscans des dritten und vierten identifizierten Epitops von NGO2095 (n = 9).....	73
Abbildung 3.32: Box-Whisker-Plots der Alaninscans des fünften und sechsten identifizierten Epitops von NGO2095 (n = 9).....	74
Abbildung 3.33: Alaninscan des Epitops von NGO0170 mittels immobilisierter Peptide auf einer Cellulose Membran (Lot# 3612_3).....	75
Abbildung 3.34: Strukturmodelle der immunogenen Proteine NGO0170 (A und B), NGO0326 (C) und NGO0564 (D).....	77
Abbildung 3.35: Strukturmodelle der immunogenen Proteine NGO0592 (A), NGO0777 (B und C), NGO0916 (D), NGO0983 (E) und NGO1043 (F).	79
Abbildung 3.36: Strukturmodelle der immunogenen Proteine NGO1429 (A, B und C) und NGO1577 (D).	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.37: Strukturmodelle der immunogenen Proteine NGO1634 (A), NGO1656 (B und C), NGO1796 (D) und NGO1852 (E und F).	81
Abbildung 3.38: Strukturmodelle der immunogenen Proteine NGO2094 (A, B und B*) und NGO2095 (C und D).	82
Abbildung 3.39: Strukturmodelle der immunogenen Proteine NGO0584 (A), NGO0642 (B) und NGO2139 (C).	83
Abbildung 3.40: Ergebnisse der Transkriptionsanalyse von NGO1634 mittels qCPR.	84
Abbildung 3.41: Vorhergesagte 3D-Strukturmodelle der acht ausgewählten Proteine für die Antikörperisolation.	87
Abbildung 3.42: Hydrophobizitätsplot des Peptids von NGO1634.	88
Abbildung 3.43: Beispiel der Datenoutputs von TMPred (A) und TMHMM (B) mit vorgeschlagenem Modell bzw. grafischer Übersicht für NGO1092.	89
Abbildung 3.44: Ergebnisse der Titrations-ELISAs der isolierten Antikörper gegen die Volllängenproteine NGO1430 und NGO1847 und die Peptide von NGO1094 und NGO1626.	90
Abbildung 3.45: Ergebnisse der Titrations-ELISAs der isolierten Antikörper gegen die Peptidantigene von NGO0553 und NGO0555.	90
Abbildung 3.46: Ergebnisse der Titrations-ELISAs der isolierten Antikörper gegen das Peptidantigen von NGO1092.	91
Abbildung 3.47: Ergebnisse der Titrations-ELISAs der isolierten Antikörper gegen das Peptidantigen von NGO1634.	91
Abbildung 3.48: Ergebnisse der Titrations-ELISAs der scFv-Fc-Fusionsantikörper gegen die Antigene NGO0553, NGO0555, NGO1626 und NGO1634.	93
Abbildung 3.49: Ergebnisse der Titrations-ELISAs der scFv-Fc-Fusionsantikörper gegen die Antigene NGO1430 und NGO1847.	94
Abbildung 3.50: Ergebnisse der Titrations-ELISAs der scfv-Fc-Fusionsantikörper gegen das Antigen NGO1092.	94
Abbildung 3.51: Ergebnisse der SPR Messungen für den Antikörper 1634E9.	96
Abbildung 3.52: ELISA-Ergebnisse der Bindung der scFv-Fc-Antikörper an <i>N. gonorrhoeae</i> Zellen und Lysate.	97
Abbildung 4.1: Vergleich der K_D -Werte von monoklonalen Maus- und Kaninchenantikörpern.	109
Abbildung III.1: Karte des Phage Display Vektors pHORF3.	xxxii
Abbildung III.2: Karte des Klonierungsvektors pET21a(+).	xxxii
Abbildung III.3: Karte des Klonierungsvektors pet21a(+)+pelB.	xxxiii
Abbildung III.4: Karte des Phage Display Vektors pHAL30 für die scFv-Bibliotheken HAL9/10.	xxxiii
Abbildung III.5: Karte des Klonierungsvektors pCMX2.5-hlgG1-Fc für die Produktion von scFv-Fc-Fusionsantikörpern.	xxxiv
Abbildung IV.1: Schematische Übersicht der mittels Phage Display identifizierten Polypeptide.	xxxv
Abbildung V.1: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO0326, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.	xxxvi

Abbildung V.2: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO0564, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.	xxxvi
Abbildung V.3: Vergleich der Epitopmappings von NGO0584 mit drei Primärantikörpern (links) und einem Primärantikörper (rechts).	xxxvi
Abbildung V.4: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO0916, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.	xxxvii
Abbildung V.5: Ergebnisse des Epitopmappings des Phagen-präsentierten Polypeptids von NGO0983.	xxxvii
Abbildung V.6: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO1043, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.	xxxvii
Abbildung V.7: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO1429, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.	xxxviii
Abbildung V.8: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO1577, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.	xxxviii
Abbildung V.9: Vergleich der Epitopmappings von NGO1634 mit drei Primärantikörpern (links) und einem Primärantikörper (rechts).	xxxviii
Abbildung V.10: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO1634, die im Epitopmapping mit einem Antikörper deutliche Signale generierten.	xxxix
Abbildung V.11: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO1656, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.	xxxix
Abbildung V.12: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO1796, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.	xxxix
Abbildung V.13: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO1852, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.	xl
Abbildung V.14: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO2094, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.	xl
Abbildung V.15: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO2095, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.	xl
Abbildung V.16: Ergebnisse des Epitopmappings des Phagen-präsentierten dritten Polypeptids von NGO2095.	xli
Abbildung V.17: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO2095, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.	xli
Abbildung V.18: Ergebnisse des Epitopmappings des Phagen-präsentierten Polypeptids von NGO2139.	xli
Abbildung VI.1: Ergebnisse der qPCR zur Überprüfung der Transkription der ausgewählten Proteine für die Antikörperselektion.	xlii
Abbildung VII.1: Datenausgabe einer Suche in der String Datenbank.	xliii
Abbildung VIII.1: Alignment der nächsten Sequenzhomologe von NGO0555 von <i>N. gonorrhoeae</i> FA1090 (gelb hinterlegt).	xliv

Abbildungsverzeichnis

Abbildung VIII.2: Alignment der nächsten Sequenzhomologe von NGO1847 von <i>N. gonorrhoeae</i> FA1090 (gelb hinterlegt).....	xlv
Abbildung IX.1: Vergleich der CDRs der isolierten, rekombinanten scFv-Antikörperfragmente.	xlvi
Abbildung X.1: Western Blot Analyse der exprimierten scFv-Fc-Antikörper.....	xlvii
Abbildung XI.1: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 0553G10 mittels Steady State Affinity.	xlviii
Abbildung XI.2: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 0555C6 mittels Steady State Affinity.	xlviii
Abbildung XI.3: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1092A2 mittels Steady State Affinity.	xlviii
Abbildung XI.4: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1092E10 mittels Steady State Affinity.	xlix
Abbildung XI.5: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1092F10 mittels Steady State Affinity.	xlix
Abbildung XI.6: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1430B2 mittels Steady State Affinity.	xlix
Abbildung XI.7: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1430B6 mittels 1:1 Kinetik.	l
Abbildung XI.8: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1430D4 mittels 1:1 Kinetik.	l
Abbildung XI.9: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1634A9 mittels Steady State Affinity.	l
Abbildung XI.10: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1634C8 mittels Steady State Affinity.	li
Abbildung XI.11: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1634G2 mittels Steady State Affinity.	li
Abbildung XI.12: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1847E12 mittels 1:1 Kinetik.	li

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Pipettierschema für die CPCR zur Überprüfung der Bibliothek.....	23
Tabelle 2.2: Programmeinstellungen für die CPCR.	23
Tabelle 2.3: Verwendete Peptide für die Antikörperisolierung.	34
Tabelle 3.1: Übersicht der während dieser Arbeit konstruierten Bibliotheken mittels Restriktionsverdau und Ultraschallfragmentierung.....	43
Tabelle 3.2: Übersicht der Phagen-verpackten Bibliotheken.....	44
Tabelle 3.3: Überblick der durch Phage Display isolierten immunogenen Polypeptide von <i>N. gonorrhoeae</i> und deren entsprechenden, durch BLAST identifizierten Proteine.	47
Tabelle 3.4: Überblick der durch Phage Display isolierten immunogenen Polypeptide von <i>N. meningitidis</i> und deren entsprechenden, durch BLAST identifizierten Proteine.	50
Tabelle 3.5: Überblick der durch Phage Display isolierten immunogenen Polypeptide von <i>B. burgdorferi</i> und deren entsprechenden, durch BLAST identifizierten Proteine.	51
Tabelle 3.6: Übersicht der ausgewählten Proteine für die Antikörperisolation.	85
Tabelle 3.7: Übersicht der umklonierten Antikörper.	92
Tabelle 3.8: Affinitätsbestimmung der rekombinanten Antikörper mittels SPR und berechnete EC50 Werte mittels Titrations-ELISA.	95
Tabelle I.1: Verwendete Chemikalien.	xxvi
Tabelle I.2: Eingesetzte Puffer und Medien.	xxviii
Tabelle II.1: Verwendete Oligonukleotide.....	xxx

Abkürzungsverzeichnis

2x YT	2-fach Hefe-Trypton Medium, engl. <i>yeast-tryptone broth</i>
AP	Alkalische Phosphatase, engl. <i>alkaline phosphatase</i>
APC	Antigen präsentierende Zelle, engl. <i>antigen presenting cell</i>
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AU	Einheit der Absolutmessung, engl. <i>arbitrary units</i>
BHI	Hirn-Herz-Glukose Bouillon, engl. <i>brain-heart infusion</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	Basenpaar
BSK-H	Standardisiertes Barbour-Stonner-Kelly Medium
CASO	Casein-Soja-Pepton Medium
cDNA	komplementäre DNS , engl. <i>complementary DNA</i>
CDR	Antigenbindungsstelle eines Antikörpers, engl. <i>complementarity determining region</i>
cfu	Koloniebildende Einheit, engl. <i>colony forming unit</i>
Cp	<i>crossing point</i>
CPCR	Kolonie-Polymerasekettenreaktion, engl. <i>colony polymerase chain reaction</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle, engl. <i>dendritic cell</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat, engl. <i>deoxyribonucleosid triphosphate</i>
EC50	Halbmaximale effektive Konzentration, engl. <i>half maximal effective concentration</i>
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EtOH	Ethanol
Fc	kristallisierbares Fragment, engl. <i>crystallisable fragment</i>
FKS	Fetales Kälberserum
g	Normalfallbeschleunigung $\approx 9,81 \text{ m s}^{-2}$, engl. <i>standard gravity</i>
gDNA	genomische DNA
HRP	Meerrettichperoxidase, engl. <i>horseradish peroxidase</i>
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
MBP	Basisches Myelinprotein, engl. <i>myelin basic protein</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. <i>major histocompatibility complex</i>

MTP	Mikrotiterplatte, engl. <i>microtiter plate</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimide
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure, engl. <i>Nickel-Nitrilotriacetic acid</i>
NTC	Negativkontrolle ohne Templat, engl. <i>no template control</i>
OD bzw. OD ₆₀₀	Optische Dichte (bei 600 nm)
OMV	Vesikel der äußeren Membran, engl. <i>outer membrane vesicle</i>
ORF	Offener Leserahmen, engl. <i>open reading frame</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PDB	Protein Data Bank
PEG6000	Polyethylenglykol 6000
PID	Entzündung im Beckenbereich, engl. <i>pelvic inflammatory disease</i>
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR, engl. <i>real-time quantitative PCR</i>
RIN	RNA Integritätsnummer, engl. <i>RNA integrity number</i>
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
RT-	Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase
RU	Resonanzeinheit, engl. <i>resonance unit</i>
scFv	single chain Antikörper, engl. <i>single chain variable fragment</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, engl. <i>surface plasmon resonance spectroscopy</i>
STI	Sexuell übertragbare Infektion, engl. <i>sexually transmitted infection</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung, engl. <i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGS	SDS-Tris-Glycin Puffer
T _H	T-Helferzellen
T _{FH}	follikuläre T-Helferzellen
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TSA	Casein-Soja-Pepton-Agar, entspricht CASO mit Agar, engl. <i>Tryptic soy agar</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. <i>world health organization</i>

I Verwendete Chemikalien und Puffer

Tabelle I.1: Verwendete Chemikalien.

Neben der Chemikalienbezeichnung sind die Summenformel, Bestellnummer und Hersteller angegeben.

Bezeichnung	Summenformel	Bestellnummer	Hersteller
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	$C_{16}H_{20}N_2$	860336-1G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride	$C_{12}H_{14}N_4 \cdot 4 HCl$	CN75.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Acrylamide/Bis-acrylamide, 30%ige Lösung	$C_3H_5NO/C_7H_{10}N_2O_2$	A3574	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Agar für die Molekularbiologie		A3477,0500	AppliChem GmbH
Agarose Basic		A8963,1000	AppliChem GmbH
Albumin Fraktion V (pH 7,0)		A1391,0100	AppliChem GmbH
Ammoniumpersulfat	$(NH_4)_2S_2O_8$	A3678-25G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ampicillin - Natriumsalz	$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$	A0839,0025	AppliChem GmbH
Brain Heart Infusion Broth		53286-500G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
BSK-H Medium, Komplett		B8291-1L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
CASO-Buillon		X938.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Chloroform:Isoamylalkohol 24:1		A1935,0500	AppliChem GmbH
D(+)-Biotin		A0969,0001	AppliChem GmbH
D(+)-Glucose GPR RECTAPUR	$C_6H_{12}O_6$	24.379.294	VWR International
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Na_2HPO_4	4984.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
DNase I		A3778,0100	AppliChem GmbH
EDTA	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	A4892,1000	AppliChem GmbH
Essigsäure	$C_2H_4O_2$	3739.4	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethanol	C_2H_6O	1.117.272.500	Merck KGaA
Ethanolamin	C_2H_7NO	E9508-100ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
FBS Superior		S0615-500ML	Biochrom GmbH
Glycerin	$C_3H_8O_3$	3783.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Glycin	$C_2H_5NO_2$	A3707,1000	AppliChem GmbH
Harnstoff	CH_4N_2O	2317.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Hefeextrakt für die Molekularbiologie		A3732,0500	AppliChem GmbH
HEPES für die Molekularbiologie	$C_8H_{18}N_2O_4S$	A3724,0100	AppliChem GmbH
Imidazol	$C_3H_4N_2$	1.047.160.250	Merck KGaA
IPTG für die Molekularbiologie	$C_9H_{18}O_5S$	A4773,0025	AppliChem GmbH
Isopropanol	C_3H_8O	T902.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumchlorid	KCl	6781.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	3904.1	Carl Roth GmbH + Co. KG

Bezeichnung	Summenformel	Bestellnummer	Hersteller
Kanamycin Sulfate	$C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4$	A1493,0010	AppliChem GmbH
Lysozym		8529.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Magermilchpulver		A0830,0500	AppliChem GmbH
Magnesiumchlorid-Hexahydrat für die Molekularbiologie	$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	A4425,0250	AppliChem GmbH
β -Mercaptoethanol	C_2H_6OS	A1108,0025	AppliChem GmbH
Methanol	CH_3OH	7342.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride	$C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$	03450-1G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	$C_6H_{16}N_2$	T9281	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid reinst, rieselfähig	$NaCl$	A4857,5000	AppliChem GmbH
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	6885.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumhydroxid	$NaOH$	A0991,1000	AppliChem GmbH
NeutrAvidin Protein		31000	Thermo Fisher Scientific Inc.
N-Hydroxysuccinimide	$C_4H_5NO_3$	56480	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat	$NiSO_4$	106727	Merck KGaA
Ni-NTA Agarose		30310	Qiagen N.V.
Nukleasefreies Wasser	H_2O	T143.4	Carl Roth GmbH + Co. KG
PageBlue Protein Staining Solution		24620	Thermo Fisher Scientific Inc.
Pepton aus Casein (säurehydrolysiert)		A2142,0500	AppliChem GmbH
Pepton aus Soja		2365.3	Carl Roth GmbH + Co. KG
Phenol equilibriert, stabilisiert:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1		A0889,0500	AppliChem GmbH
Polyethylenglykol 6000		0158.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Proteinase K von <i>Tritirachium album</i>		SAE0009-25MG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	1.076.511.000	Merck KGaA
Schwefelsäure	H_2SO_4	4623.4	Carl Roth GmbH + Co. KG
SDS-Lösung, 10%ig für die Molekularbiologie		A0676,1000	AppliChem GmbH
Streptavidin		35490.01	SERVA Electrophoresis GmbH
SYBR Green		S9430-.5ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tetracyclin	$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$	A2228.0025	AppliChem GmbH
Tetramethylethylenediamin	$C_6H_{16}N_2$	T9281-25ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris	$C_4H_{11}NO_3$	AE15.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Triton X-100		93420	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypsin		T0303-1G	Sigma-Aldrich

Bezeichnung	Summenformel	Bestellnummer	Hersteller
Trypton		A1553,1000	Chemie GmbH AppliChem GmbH
Tween20	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	9127.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Wasserstoffperoxid, 30%ige Lösung	H ₂ O ₂	8070.2	Carl Roth GmbH + Co. KG

Tabelle I.2: Eingesetzte Puffer und Medien.

Die Puffer sind sortiert nach ihrem Verwendungszweck. Gängige Puffer wurden auch für verschiedene Methoden verwendet.

Bezeichnung	Zusammensetzung
ELISA und Mikroarray	
NaHCO ₃	100 mM NaHCO ₃ , pH 9,6
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PBS-T	PBS Puffer mit 0,1 % Tween20
MPBS-T	PBS-T mit 2 % (w/v) Milchpulver
Panningblock	PBS-T mit 1 % (w/v) BSA, 1 % (w/v) Milchpulver
TMB Lösung A (19 Teile)	10 g Zitronensäure vorgelöst in 100 mL Wasser, 9,73 g Kaliumcitrat auf 1 L Wasser, pH 4,1
TMB Lösung B (1 Teil)	240 mg Tetramethylbenzidin, 10 mL Aceton, 90 mL Ethanol, 907 µL 30 % H ₂ O ₂
Epitopmapping Cellulose Membran	
TBS	50 mM Tris, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 8,0
TBS-T	TBS Puffer mit 0,05 % Tween 20
MTBS-T	TBS-T mit 2 % (w/v) Milchpulver
Regenerationspuffer I	62,5 mM Tris, 2 % SDS, pH 6,7; 70 µL β-Mercaptoethanol pro 10 ml SDS Puffer
Regenerationspuffer IIA	8 M Urea, 1 % SDS, 0.1 % β-Mercaptoethanol
Regenerationspuffer IIB	400 mL H ₂ O, 500 mL Ethanol, 100 mL Essigsäure
Panning	
PEG/NaCl	20 % (w/v) PEG 6000, 2,5 M NaCl
Phage Dilution Puffer	10 mM TrisHCl pH7,5, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA
TE Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA
Kaliumphosphatpuffer	0,17 M KH ₂ PO ₄ , 0,72 M K ₂ HPO ₄
Proteinaufreinigung	
Elutionspuffer	PBS Puffer, pH 7,4 mit 100 mM EDTA, 8 M Harnstoff
His-Tag Binding Puffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 100 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0, 8 M Harnstoff
Waschpuffer I	entspricht His-Tag Binding Puffer
Waschpuffer II	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 300 mM NaCl, 30 mM Imidazol, pH 8,0, 8 M Harnstoff
Waschpuffer III	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH 8,0, 8 M Harnstoff
SDS PAGE	
10x TGS	250 mM Tris, 1,92 M Glycine, 1 % SDS, pH 8,5

Bezeichnung	Zusammensetzung
SPR	
HBSP	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,4
HBSPB	HBSP + 300 mM NaCl + 50 μ M EDTA, pH 7,4
HBSP E	HBSP + 350 mM EDTA, pH 8,3
HBSP U	HBSP + 3 M Harnstoff + 50 μ M EDTA, pH 7,4
HBSP Ni	HBSP + 1 mM NiCl ₂
Acetatpuffer	10 mM Essigsäure pH 5,5 oder 20 mM Essigsäure pH 5,2, titriert mit 1 M NaOH
Regenerierungspuffer I SPR	10 mM Glycin-HCl pH 2,5
Regenerierungspuffer II SPR \triangleq Elutionspuffer	PBS Puffer, 100 mM EDTA, 8 M Harnstoff, pH 7,4
Zellyse	
Lysepuffer für gramnegative Bakterien	10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 25 mM EDTA, 75 mM NaCl, 0,1 % SDS, 0,5 mg mL ⁻¹ Proteinase K
Lysepuffer für grampositive Bakterien (Gram-positive bacteria lysis buffer)	20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA, 1,2 % Triton X, 20 mg mL ⁻¹ Lysozym
Medien	
2x YT	16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7,0
2x YT (gepuffert)	2x YT + 10 % (v/v) Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0
2x YT-AK	2x YT + 100 μ g mL ⁻¹ Ampicillin + 50 μ g mL ⁻¹ Kanamycin
2x YT-GA	2x YT + 100 mM Glukose + 100 μ g mL ⁻¹ Ampicillin
2x YT-SA	gepuffertes 2x YT + 50 mM Saccharose + 100 μ g mL ⁻¹ Ampicillin
BHI	37 g Brain Heart Infusion Broth
BSK-H	Flüssigmedium von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (B8291-1L)
CASO	30 g CASO-Bouillon
SOC	mitgeliefert bei kompetenten Zellen
Columbia-Blut-Agarplatten	gebrauchsfertige Platten von VWR International (100253ZF)

II Oligonukleotide

Tabelle II.1: Verwendete Oligonukleotide.

Angegeben sind die Primerbezeichnung, die Sequenz in 5'-3' Richtung und die Schmelztemperatur. Die Oligonukleotide sind nach ihrem Verwendungszweck sortiert. Unterstrichene Nukleotide stellen die Restriktionsschnittstellen dar. Ausgetauschte Nukleotide, um ein Stopcodon zu verhindern, sind fett markiert.

Primerbezeichnung	Sequenz 5'-3'	Schmelztemperatur /°C
Sequenzierung und Kolonie PCR		
MHLacZ_Pro_f	GGCTCGTATGTTGTGTGG	60
MHgIII_r	CTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC	57
pet21a_CPCR3_for	ATGCCGGCCACGATGCGTCC	78
pet21a_CPCR3_rev	GGCGCGTCCCATTTCGCCAA	78
Volllängenproteine Immunogene		
N_gon_0170_for	AGATATACATATGGGGTGTTTACCTTTG	57
N_gon_0170_rev	AGAGCGTGCGGCCGCATATGAGGCGCACCAGT	59
Ngon_0326_for	AGATATACATATGACAGCTAAAGGACAAATGTTGCA	68
Ngon_0326_rev	CTCGAGTGCGGCCGCATATTCGGCAGGCTGCTGGACG	73
Ngon_0451_for	AAGGAGATATACATATGAACGATTACGCAGCTATGCCG	71
Ngon_0451_rev	CTCGAGTGCGGCCGCATAATCTTCTATCTTTGCTCCTCGG	66
Ngon_0546_for	AAGGAGATATACATATGAGTATCGTAGAAATCAAAGTCCC	63
Ngon_0546_rev	GACGTGTGCGGCCGCATATAAGGTAATGCGGCGGAAGT	65
Ngon_0642_for	AAGGAGATATAGCTAGCATGACCAATAAACCCGCCAAACGCC	76
Ngon_0642_rev	GTCGAGTGCGGCCGCCAGGCGGAGGATGCCGCCG	79
Ngon_0777_for	AAGGAGATATACATATGAACAAGTCTGAATTGATCG	61
Ngon_0777_rev	CTCGAGTGCGGCCGCATACAGTGCCTTTCAATG	57
Ngon_0916_for	AAGGAGATATACATATGATTATTGATGTAAGTACCTATGCTG	63
Ngon_0916_rev	CTCGAGTGCGGCCGCATACAGATCCAACAACAGGC	59
Ngon_1043_for	AAGGAGATATAGCTAGCAACAGGAGGTTAAAGAAGCGGC	67
Ngon_1043_rev	CTCGAGTGCGGCCGCATATTTGGCGGCGTCTTTCAT	66
Ngon_1500_for	AGATATACATATGGAAAATATCGGCAGGCAGC	70
Ngon_1500_rev	TCGAGTGCGGCCGCATAACCCAAAGACACCATTTCATCTG	67
Ngon_1634_for	AAGGAGATATACATATGAGTGCAGGCTGATGGG	70
Ngon_1634_rev	CACGAGTGCGGCCGCACAAAATCTGATGGTTCTTAGCGCAA	69
Ngon_1656_for	AAGGAGATATACATATGAAAGCAAAAATCCTGACTTCCG	69
Ngon_1656_rev	CTCGAGTGCGGCCGCATATTTTGAGGTTTGATGTTTGCC	67
Ngon_1657_for	AAGGAGATATACATATGCCGGCTGTCGATTTGATC	70
Ngon_1657_rev	CTCGAGTGCGGCCGCACAGTCCGCCGTATGGAAATACT	66
Ngon_1796_for	AAGGAGATATACATATGATCAACGATTTCAAAAACAGC	65
Ngon_1796_rev	CTCGAGTGCGGCCGCATAAACCCGCATCAGGTCTTC	64
Ngon_1852_for	AAGGAGATATACATATGGCTATTACTAAAGAAGACATT	56
Ngon_1852_rev	CTCGAGTGCGGCCGCATATTTGATTTGACTTTAGCG	59
B_burg_0069_for	AAGGAGATATACATATGGAGAAAGATTTAATAAAATA	53
B_burg_0069_rev	ATCGAGTGCGGCCGCATATATTGCGAATTTACCAG	53

Primerbezeichnung	Sequenz 5'-3'	Schmelztemperatur /°C
Volllängenproteine Antikörperselektion		
N_gon_1094_for	AGATATACATATGGGTTTGTGGAGCCGTCTG	69
N_gon_1094_rev	ATCGAGTGCGGCCGCCATTGCTCAACCCTCTTCTCAC	68
N_gon_1430_for	AGATATACATATGAAACTAAATACTCTCACATGGGC	64
N_gon_1430_rev	ATCGAGTGCGGCCGCCAGTTTTTCAGCAGGGGGAT	64
N_gon_1626_for	GCTTACATATGTACGAAATGTGCCGGA	66
N_gon_1626_rev	ATGAGTCTCGAGATACCCGAAAGCGCGATTGAT	68
N_gon_1847_for	TGCTATACATATGTTTCGAGGCGGCCGAT	70
N_gon_1847_rev	ATCGAGTGCGGCCGCATAATCATCACGCCGAGTAAATTGTAAA	67
N_gon_0555_for	TGTATAGCTAGCGCTCCGTCCAACGATGC	66
N_gon_0555_rev	CACGAGTGCGGCCGCACAAAACCGATATTTAAAACCCAAC	63
N_gon_0553_for	TGTATAGCTAGCGACACCCCGAACAATACCGA	67
N_gon_0553_rev	ATGAGTCTCGAGATAAAAACCTGCCCTTGATGC	63
Quantitative Echtzeit-PCR		
N_gon_0553_real_fw	CAAGGGTATCGCCTTCAAAT	54
N_gon_0553_real_rev	ATATTTCCGGCTGCAAGGACT	55
N_gon_0555_real_fw	CAATGTAAACCAAGGCAACG	53
N_gon_0555_real_rev	GATGAGAAGGTCTGAATCCGT	56
N_gon_1092_real_fw	GGACAAGGTTGTCAGGGAAT	56
N_gon_1092_real_rev	AACGCTTCTGAGCATCCTTT	56
N_gon_1430_real_fw	TCATCAAACCTCAAACGCCAT	53
N_gon_1430_real_rev	TCGTGTTTGTAGCGAGAAATC	54
N_gon_1626_real_fw	CCGGTACTCTCCATGACCTT	58
N_gon_1626_real_rev	ATACTTGGATCGCGTAAGGC	56
N_gon_1634_real_fw	CGTACGGCAGCATATCAAGT	56
N_gon_1634_real_rv	ACGTTGATGCGGTAGATGTC	56
N_gon_1847_real_fw	GTGAGGCATTGGTTCAGTTG	56
N_gon_1847_real_rev	ATATTGAACGAAGGATGCCA	53
N_gon_gdh_real_fw	GCATGAACGGCTATCTTGAA	54
N_gon_gdh_real_rv	GGTACGCAGGTAGAAGGGAA	58

III Vektorkarten

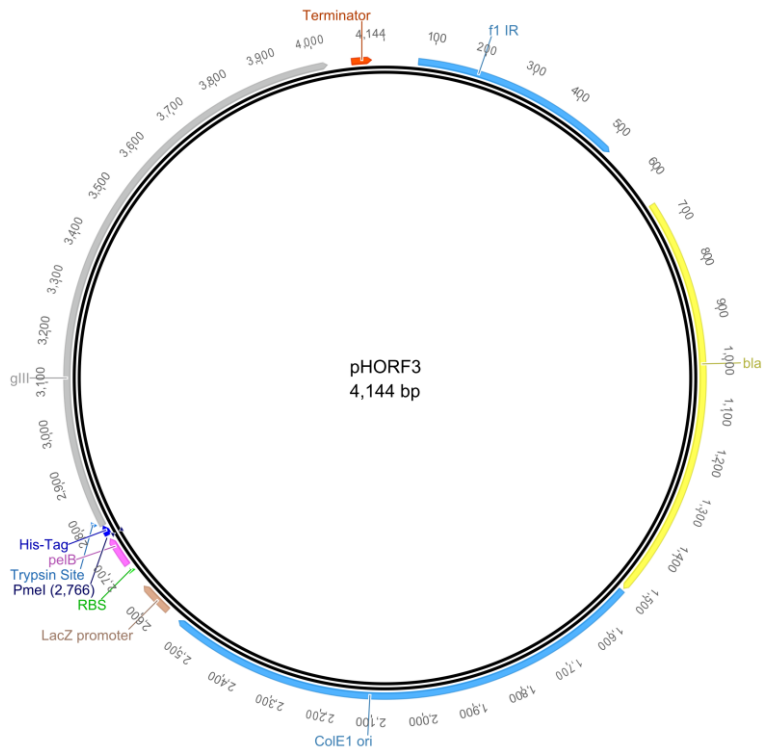


Abbildung III.1: Karte des Phage Display Vektors pHORF3.

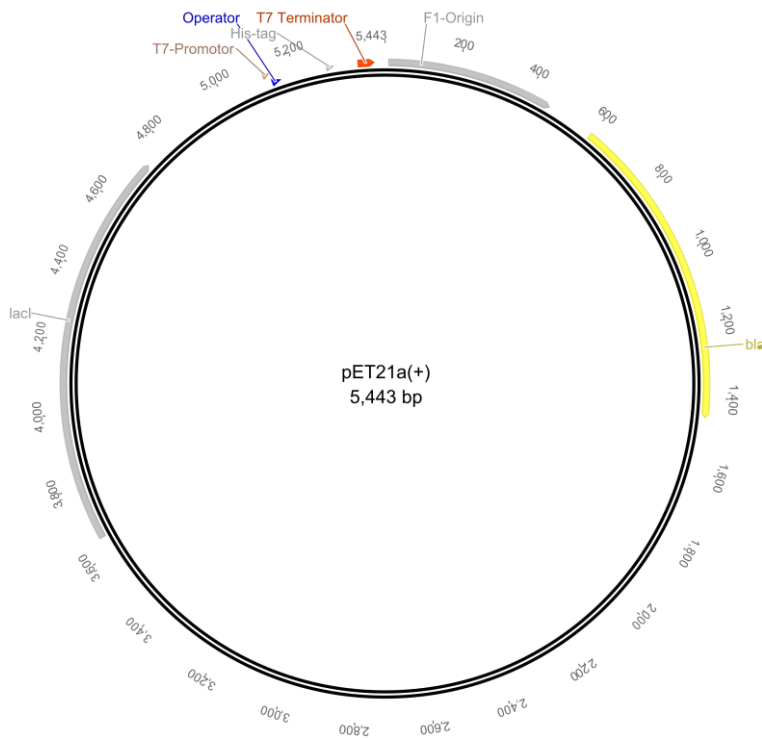


Abbildung III.2: Karte des Klonierungsvektors pET21a(+).

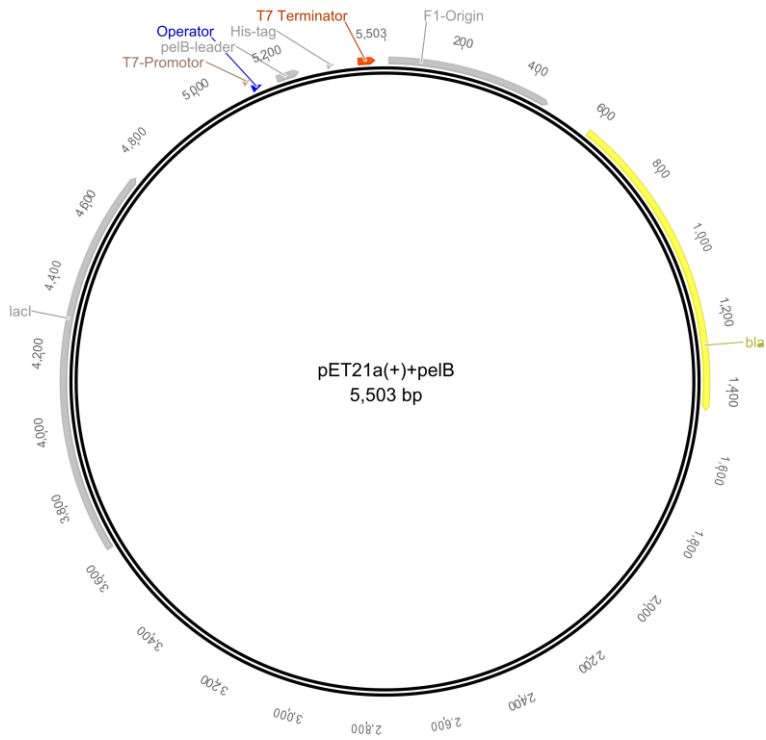


Abbildung III.3: Karte des Klonierungsvektors pet21a(+)+pelB.

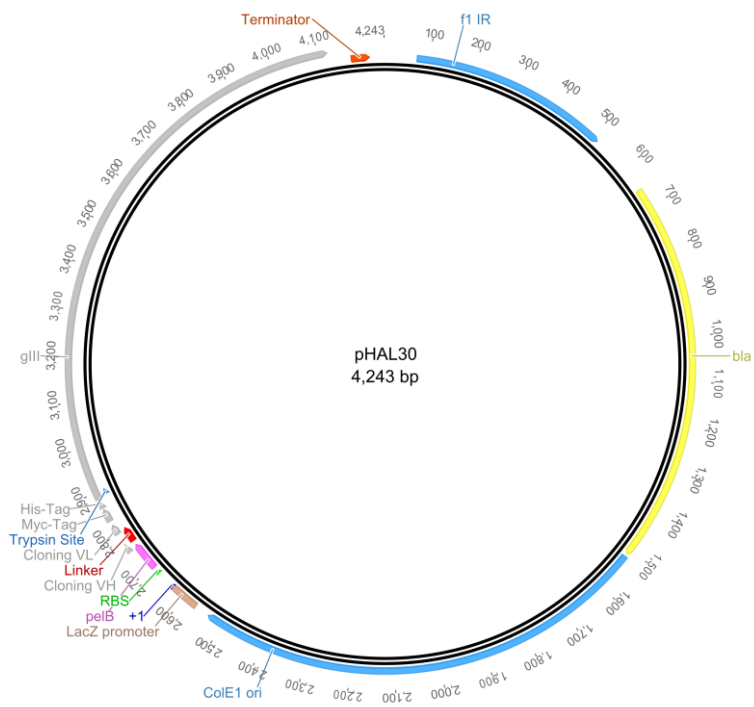


Abbildung III.4: Karte des Phage Display Vektors pHAL30 für die scFv-Bibliotheken HAL9/10.

Anhang

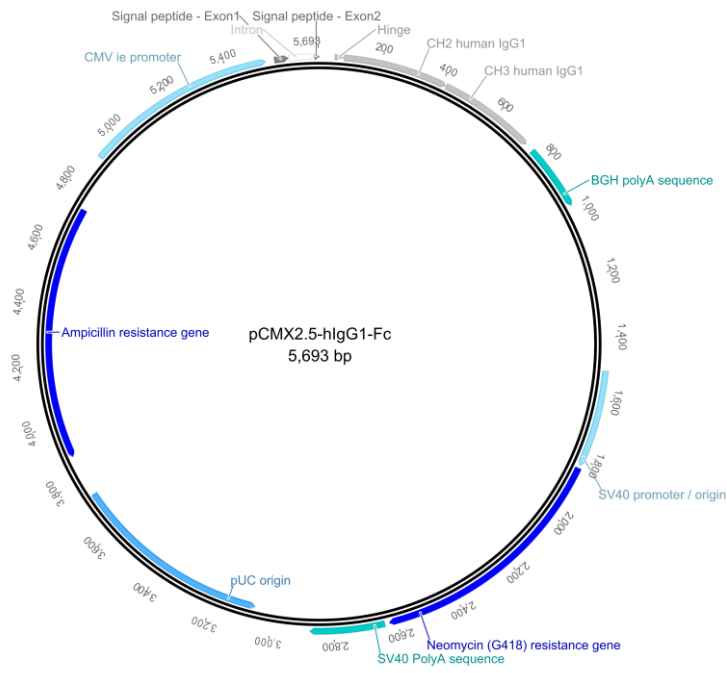


Abbildung III.5: Karte des Klonierungsvektors pCMX2.5-hIgG1-Fc für die Produktion von scFv-Fc-Fusionsantikörpern.

IV Schematische Übersicht der isolierten Polypeptide



Abbildung IV.1: Schematische Übersicht der mittels Phage Display identifizierten Polypeptide.

Die hellgrauen Balken stellen die Länge des gesamten Proteins dar, die dunkelgrauen Balken die Bereiche, die von Phagen präsentiert wurden. Überlappende Polypeptide wurden zu einem Polypeptid vereint und mittels Epitopmapping untersucht.

V Epitopmappings und Spezifitätsassays

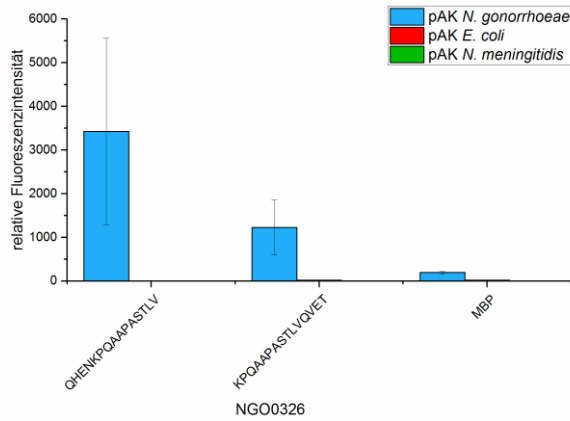


Abbildung V.1: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO0326, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.

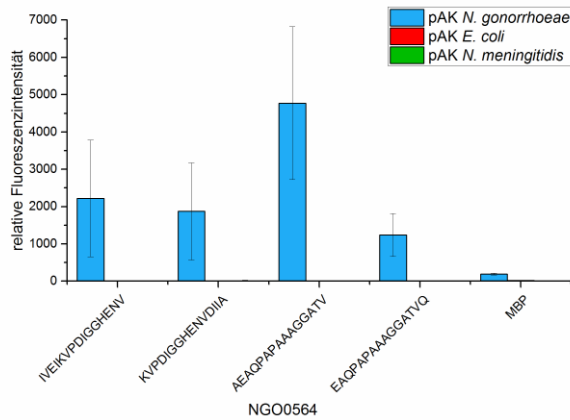


Abbildung V.2: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO0564, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.

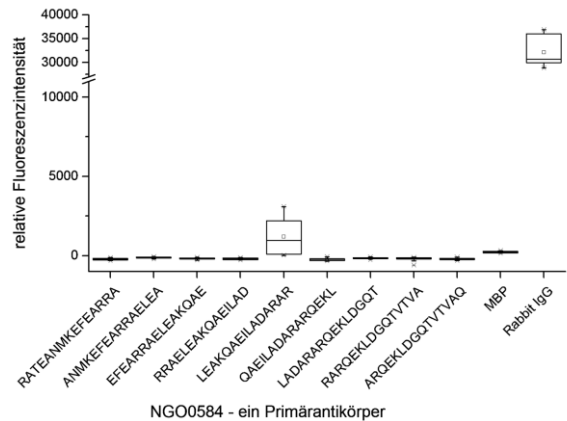
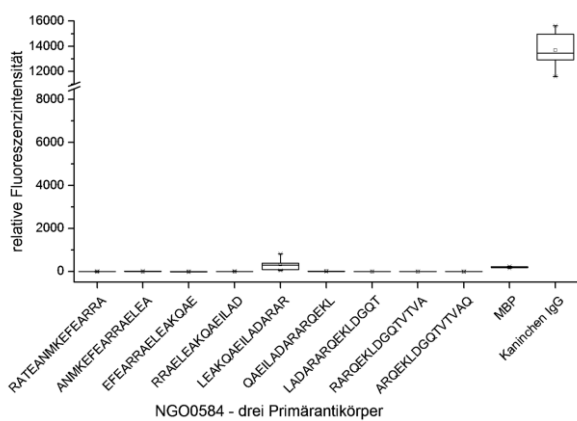


Abbildung V.3: Vergleich der Epitopmappings von NGO0584 mit drei Primärantikörpern (links) und einem Primärantikörper (rechts).

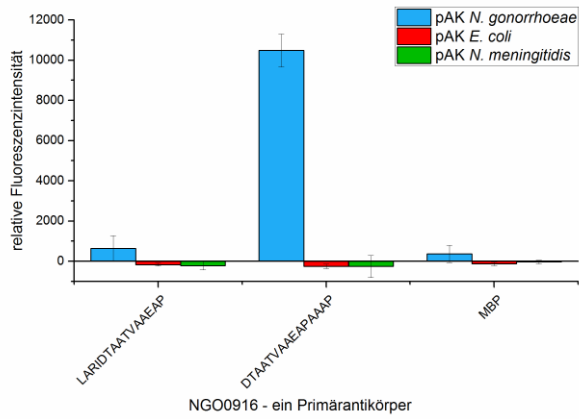


Abbildung V.4: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO0916, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.

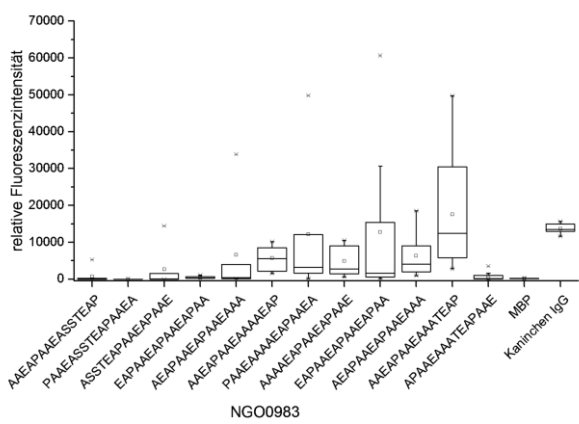


Abbildung V.5: Ergebnisse des Epitopmappings des Phagen-präsentierten Polypeptids von NGO0983.

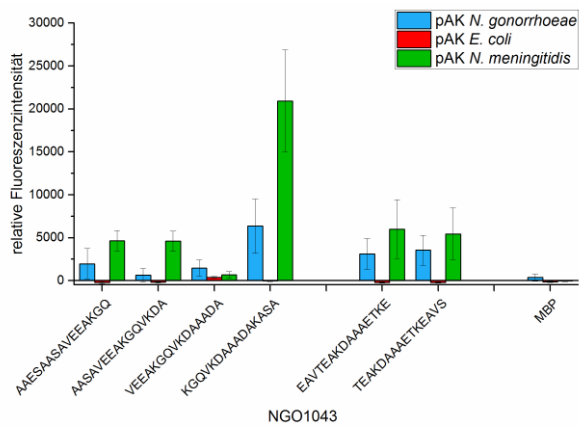


Abbildung V.6: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO1043, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.

Anhang

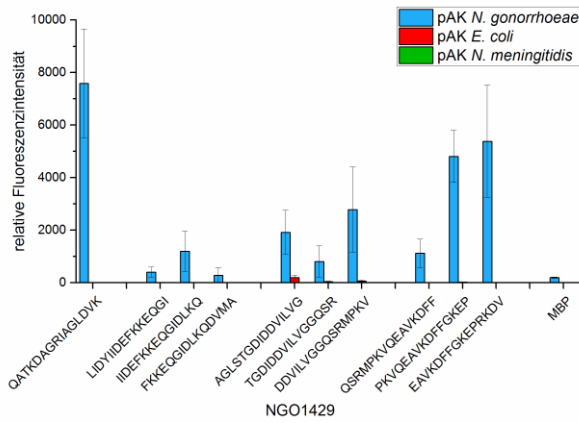


Abbildung V.7: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO1429, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.

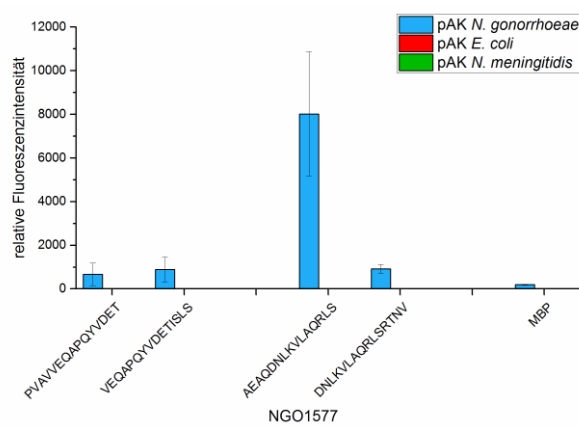


Abbildung V.8: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO1577, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.

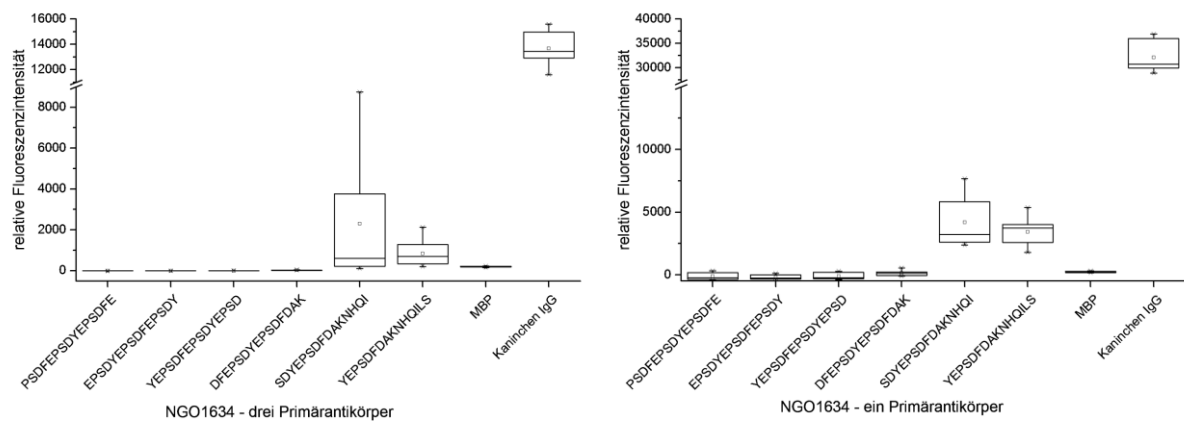


Abbildung V.9: Vergleich der Epitopmappings von NGO1634 mit drei Primärantikörpern (links) und einem Primärantikörper (rechts).

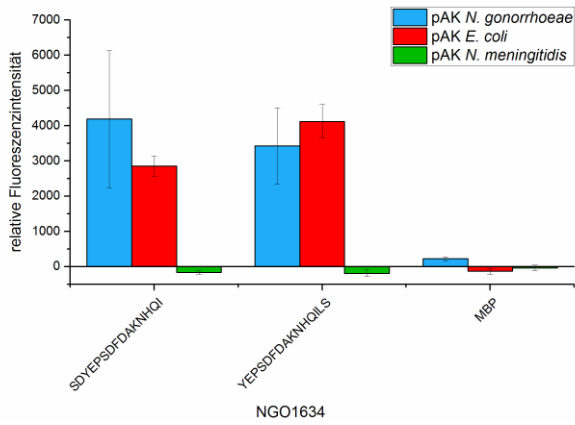


Abbildung V.10: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO1634, die im Epitopmapping mit einem Antikörper deutliche Signale generierten.

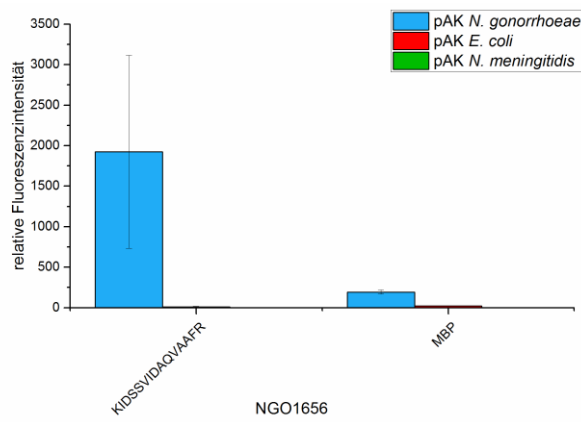


Abbildung V.11: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO1656, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.

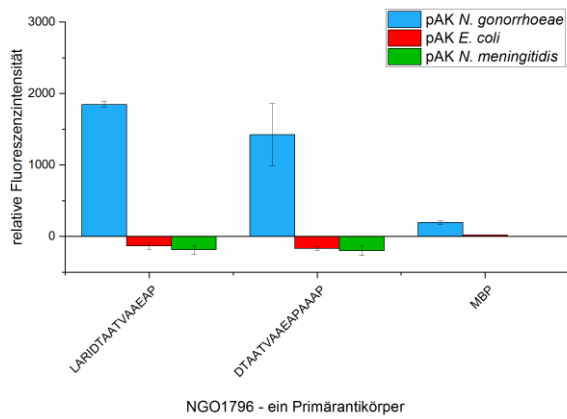


Abbildung V.12: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO1796, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.

Anhang

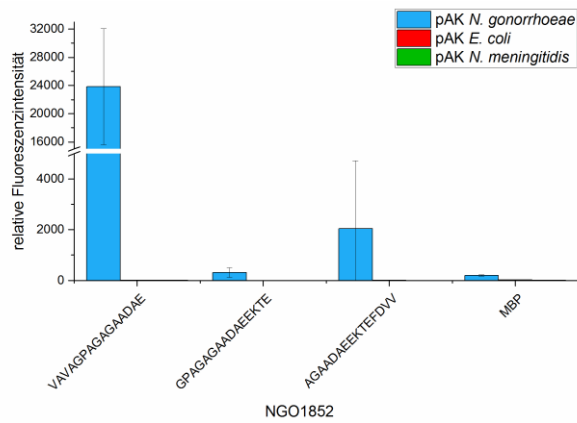


Abbildung V.13: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO1852, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.

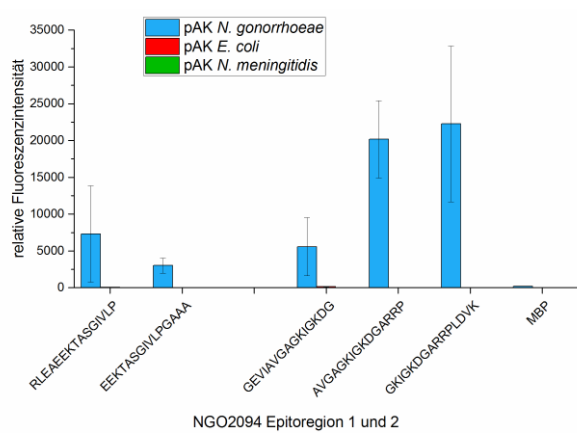


Abbildung V.14: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO2094, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.

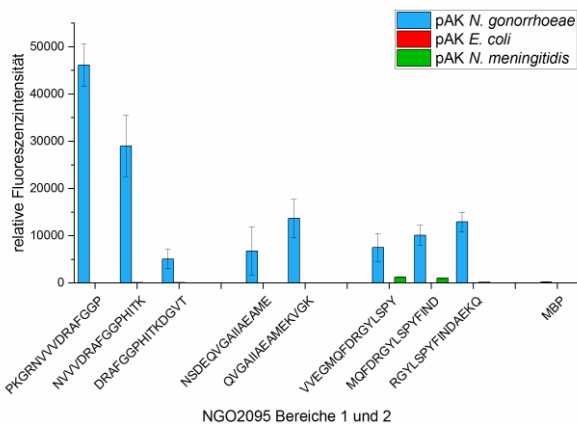


Abbildung V.15: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO2095, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.

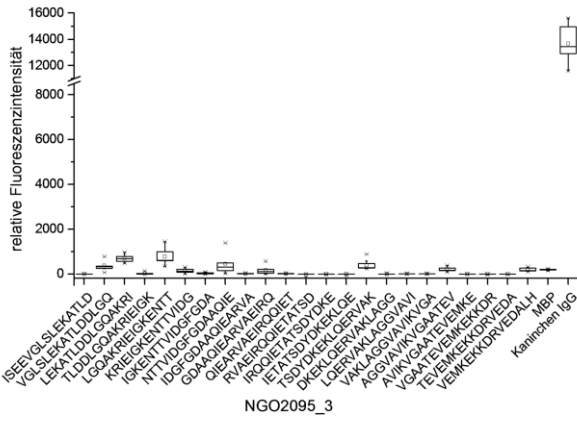


Abbildung V.16: Ergebnisse des Epitopmappings des Phagen-präsentierten dritten Polypeptids von NGO2095.

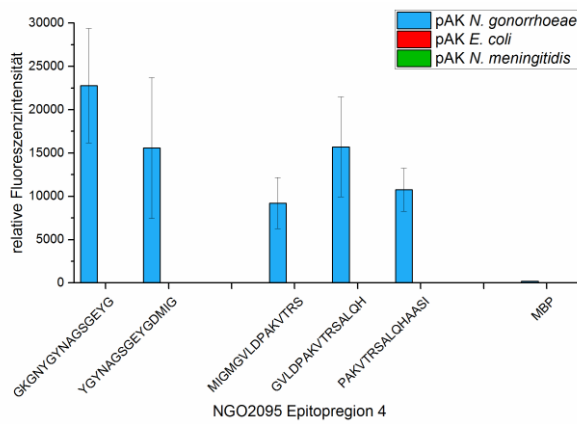


Abbildung V.17: Spezifitätskontrolle der Peptide von NGO2095, die im Epitopmapping deutliche Signale generierten.

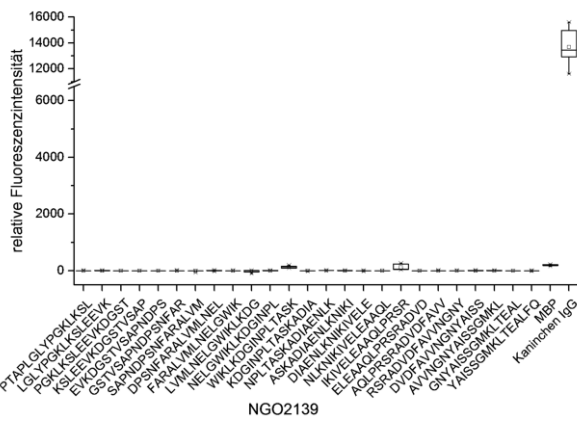


Abbildung V.18: Ergebnisse des Epitopmappings des Phagen-präsentierten Polypeptids von NGO2139.

VI qPCR der Transkripte der ausgewählten Proteine für die Antikörperisolation

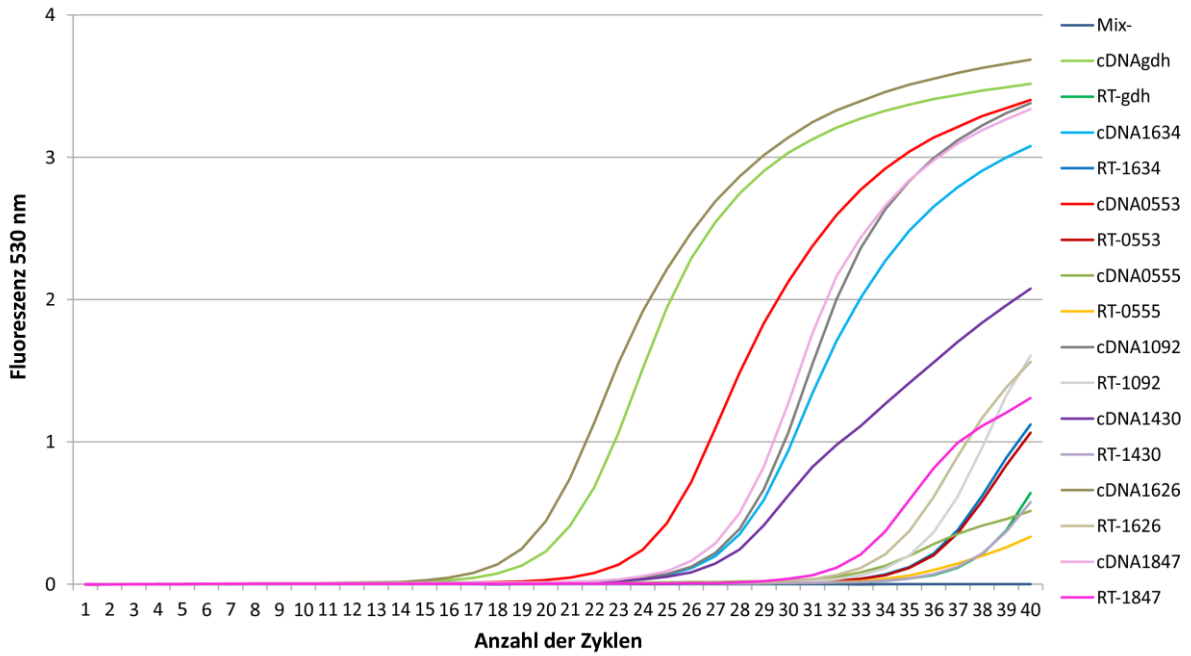


Abbildung VI.1: Ergebnisse der qPCR zur Überprüfung der Transkription der ausgewählten Proteine für die Antikörperselektion.

VII String Datenbank Datenausgabe

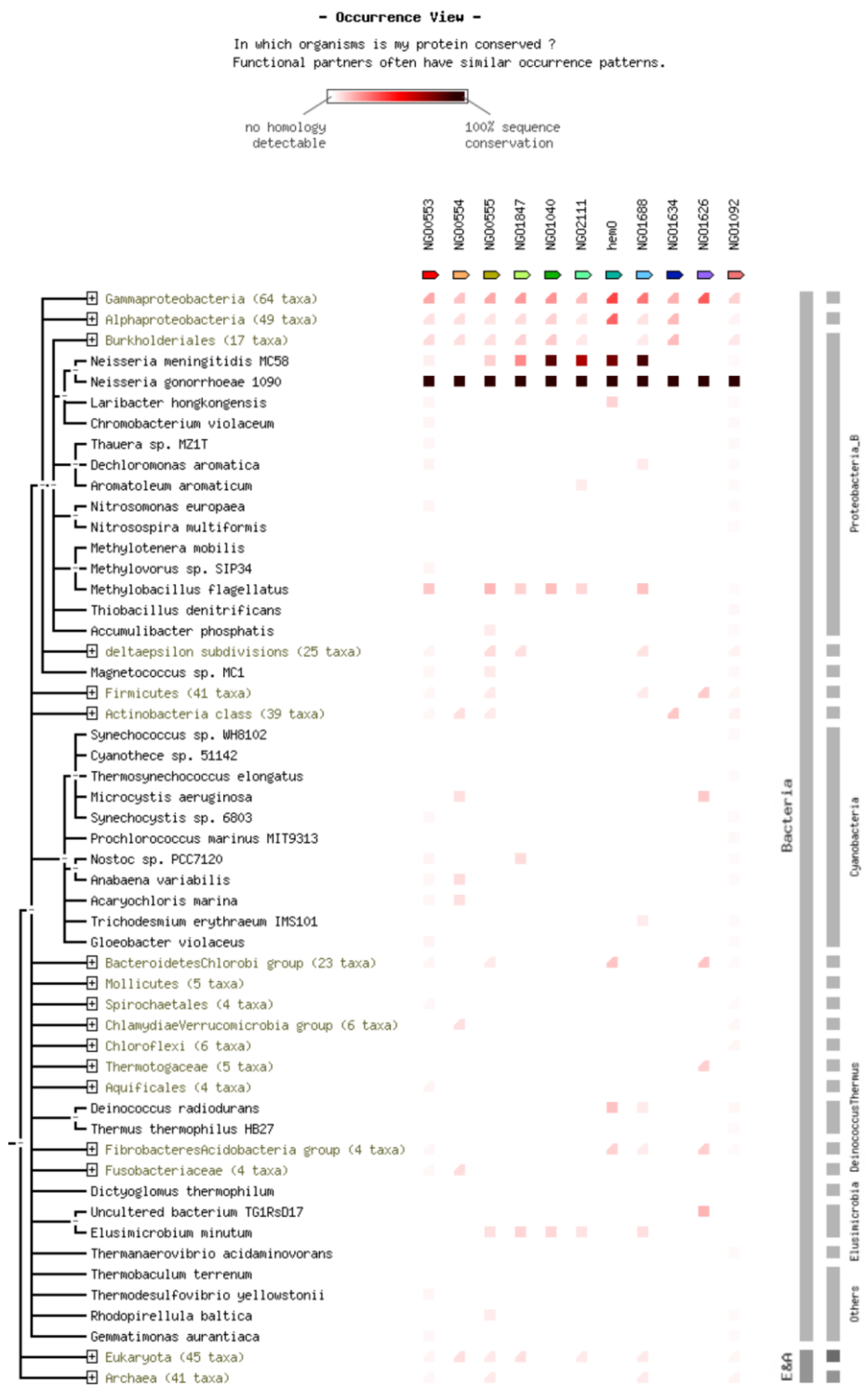


Abbildung VII.1: Datenausgabe einer Suche in der String Datenbank.

VIII Alignments der Proteine für die Antikörperselektion

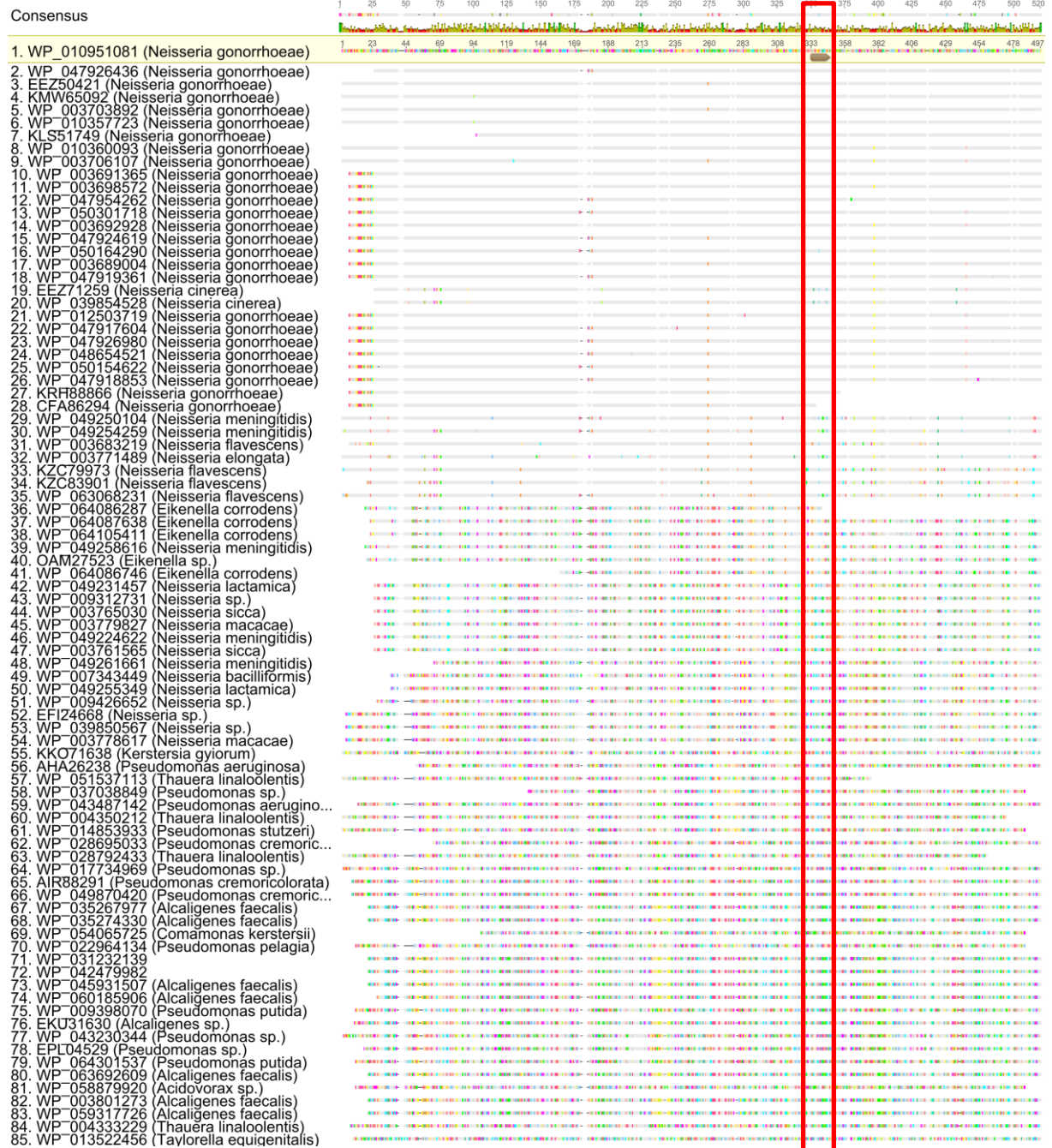


Abbildung VIII.1: Alignment der nächsten Sequenzhomologe von NGO055 von *N. gonorrhoeae* FA1090 (gelb hinterlegt). Farblich markierte Aminosäuren stellen Unterschiede in der Sequenz dar. Rot umrahmt sind die Sequenzbereiche des ausgewählten Peptids (schematisch dargestellt als brauner Pfeil).

Consensus

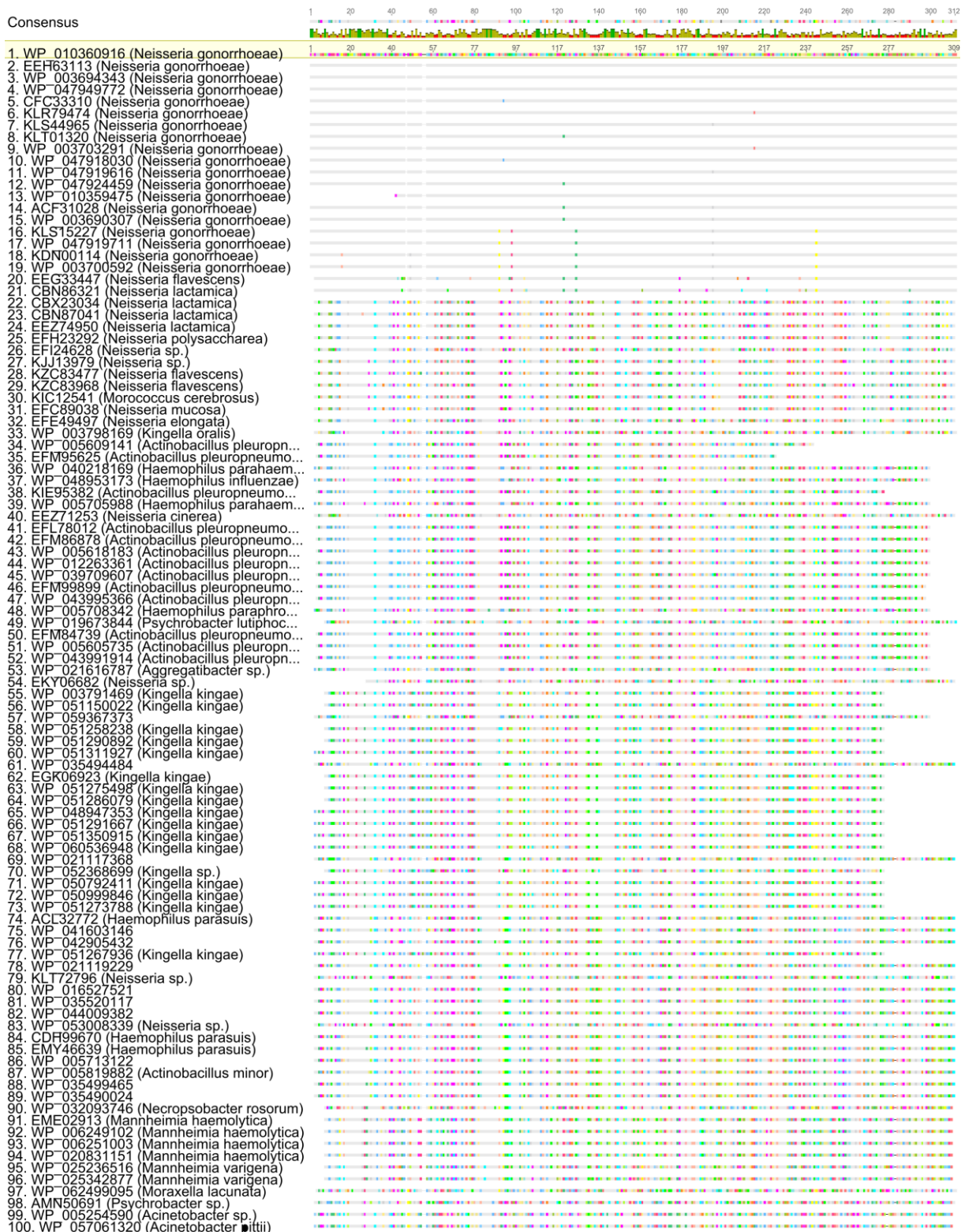


Abbildung VIII.2: Alignment der nächsten Sequenzhomologe von NGO1847 von *N. gonorrhoeae* FA1090 (gelb hinterlegt).

Farblich markierte Aminosäuren stellen Unterschiede in der Sequenz dar. NGO1847 wurde als Volllängenprotein zur Selektion von scFv-Antikörpern verwendet.

IX CDR Vergleich der isolierten, rekombinanten scFv-Antikörperfragmente

	HEAVY CHAIN	LIGHT CHAIN
SH1255_G10 (0553)	VSSNSAAMN... YRSKMYN... ATGDSLDY.....	RSNIGSNY... RNN..... AAWDDSLGGGFRRSDDQVDRPR
SH1256_C06 (0555)	GFTFSSYG... ISYDGSNK... AKDSSDAFDI.....	SDVGGYNY... EVS..... SSYTSSSTVV.....
SH1256_F03 (0555)	GFTFSSYA... IYPIFGTA... ARAPSYDSSGYAASFDY.....	QDIRKY... DAL... QQYDNLPLT.....
SH1256_G07 (0555)	GFTFSSYA... ISGGGGS... AKQWMDKSGAFDI.....	QVSSSTY... GAS... HQYDSDSPET.....
SH1256_G12 (0555)	GFTFSSYG... ISYDGSNK... AKDGGYCSGGSCYEGMFDP.....	QDD... QSYDSSSNWV.....
SH1259b_C06 (1626)	GFTFSSYG... IQYDGSIE... ARDDGYEDLRHP.....	SDVGGYNY... DVS... SSYTSSSTLV.....
SH1260_A09 (1634)	GFASSNYW... IKODGSEK... ARRAVASDY.....	NTGSKS... DDS... QVWDSRRDHVV.....
SH1260_C08 (1634)	GYTFTSYY... INPSGGST... ARNLGD.....	SSNIGSNT... SNN... AAWDDSLNGVW.....
SH1260_E09 (1634)	GFTFSSYA... ISYDGSNK... ARGQYSSDLTTPSY.....	SSNIGSNH... RNN... AAWDHSLKSMV.....
SH1260_F10 (1634)	GFSLSNYW... IKODGSEK... ARRAVASDY.....	NTGSKS... YDS... QVWDSSSDHRV.....
SH1260_G02 (1634)	GFASSNYW... IKODGSEK... ARRAVASDY.....	ELGDKY... BDK... QAWDNTKAI.....
SH1260_H07 (1634)	GFTFSSYA... ISYDGSNK... ARDGGVAAAGTVHXL.....	SSNIERNN... GNN... AAWDDGLNGVA.....
SH1261b_B06 (1430)	GYTFTSYG... ISAYNGNT... ACSGGYSKXASxGY.....	SKNIXSNA... SKN... AAWDDXXNGRV.....
SH1261b_D03 (1430)	VSSNIAAMN... YRSKMYN... ARAQSIROWLGSBDY.....	SSNIGINT... GND... AAWDDSLNIVA.....
SH1267_A2 (1092)	GFTFDDYG... INWNGGST... ARGRGSYRYYFDY.....	NTGKMT... HDS... QVWDSNDHVV.....
SH1267_C1 (1092)	GFTFSSYA... ISGGGGS... AKGMLGYSNYLLRFDY.....	ASNIGDNS... DNN... EAWDDRILYGAV.....
SH1267_C6 (1092)	GFTFDDYG... INWNGGST... ARGRGSYRYYFDY.....	SANIGRHA... ANN... AAWDASLNGVL.....
SH1267_D2 (1092)	GFTFSSSA... ISSDGSND... AKDGNMWMGGIDY.....	SDVGGYNY... DVS... SSYTSSSTLV.....
SH1267_D9 (1092)	GFTFSSYA... IKODGSEK... ARDRPLHTAPYYGGMDV.....	QITRND... GVS... LQYDYPLT.....
SH1267_E10 (1092)	GYTFTSYG... INPNSGGT... ARGFYGM DY.....	SSNIGSNT... SNN... EAWDDSLNGVHVFGGGTKLTFLL
SH1267_F4 (1092)	GFAFNXYW... IKODGSEK... ARAVAGRFDY.....	SSNIGSNT... SNN... AAWDDSLNGFV.....
SH1267_F10 (1092)	GFTFDDYG... INWNGGST... ARGRGSYRYYFDY.....	NSNIGGNY... SHN... AAWDDSLNAVV.....
SH1267_G6 (1092)	GFTFDDYG... INWNGGST... ARGRGSYRYYFDY.....	SSNIGSNY... SNN... AAWDDSLNGVW.....
SH1268_C7 (1094)	GYTFTSYY... INPSGGTT... ASFAAGTY.....	SGNIAASNY... DDN... QSYDSTNFMV.....
SH1269_A6 (1430)	GFTFSSYA... IPIIFGTT... ARDRYCSGGSCGYGM DV.....	QVSSSSY... GAS... QOYGSST.....
SH1269_B2 (1430)	GYTFTSYY... INPSGGST... ASGALFGGGTLVTVSS.....	QITGTY... AAS... QKYDSAPPT.....
SH1269_D4 (1430)	GFTFSSYS... ISSSSSYT... ARDIGADI.....	SSNIGINS... SDN... AAWDDSLSGV.....
SH1269_D5 (1430)	VSSSSASMN... YRSRWYT... ARDFYRRGDHRRTFDY.....	QVSSSN... GAS... QQYNMPPGGDVRERDQGGNQT
SH1270_E12 (1847)	GYTFTSYG... ISAYNGNT... ARGTRRRHVV.....	SSNIGNNY... DNN... AGWDYSLTGGV.....

Abbildung IX.1: Vergleich der CDRs der isolierten, rekombinanten scFv-Antikörperfragmente.

Aminosäuren, die durch ein x dargestellt sind, weisen Sequenzunterschiede zu den jeweiligen humanen Segmentgenen auf.

X Western Blot Analyse der exprimierten scFv-Fc-Antikörper

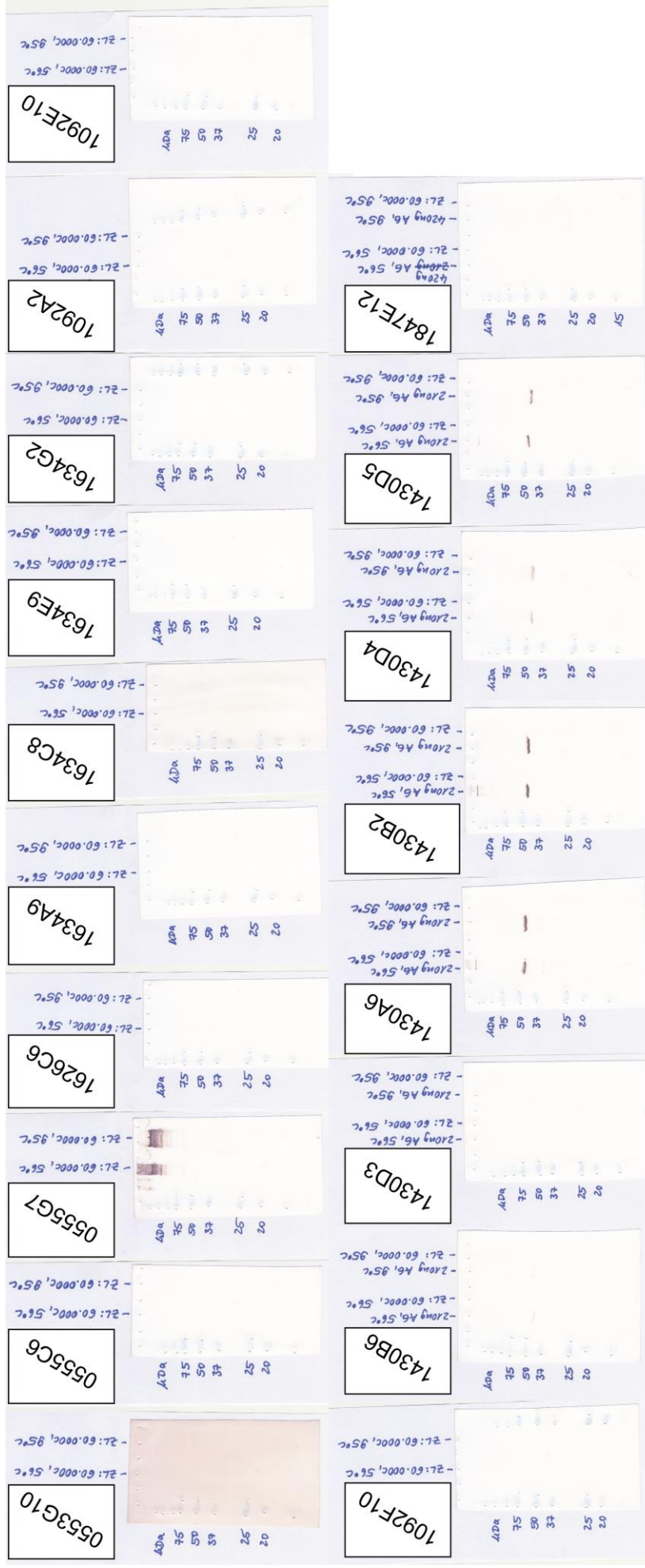


Abbildung X.1: Western Blot Analyse der exprimierten scFv-Fc-Antikörper.

Die Antikörper wurden auf ihr Antigen, falls als Vollängenprotein verfügbar, und Zellysate der Expressionszelllinie getestet. Hierfür wurden die Antigene und Zellysate bei 56 °C und bei 95 °C inkubiert und aufgetragen.

XI SPR Messungen

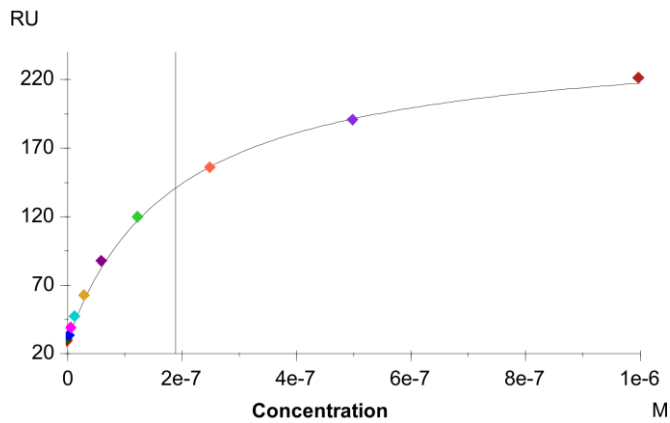


Abbildung XI.1: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 0553G10 mittels Steady State Affinity.

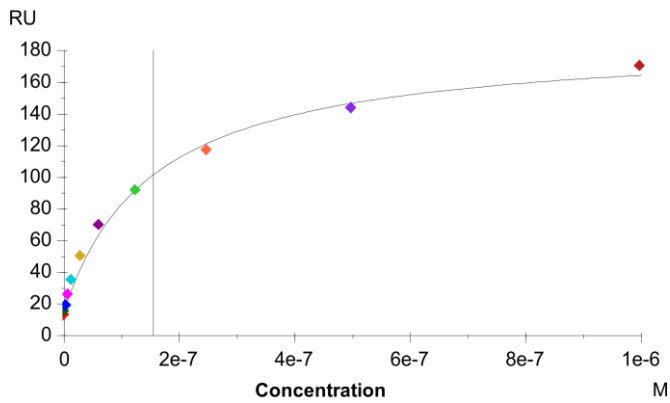


Abbildung XI.2: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 0555C6 mittels Steady State Affinity.

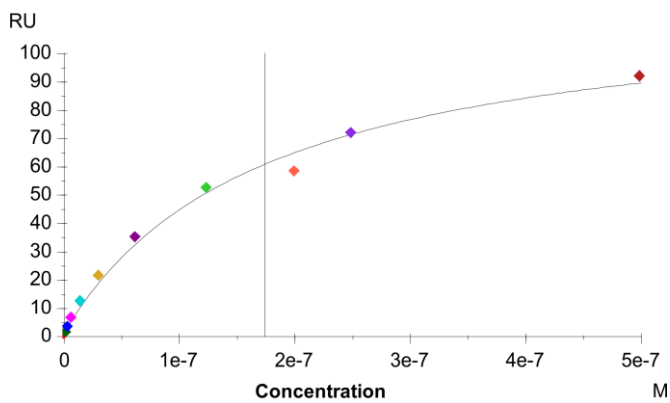


Abbildung XI.3: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1092A2 mittels Steady State Affinity.

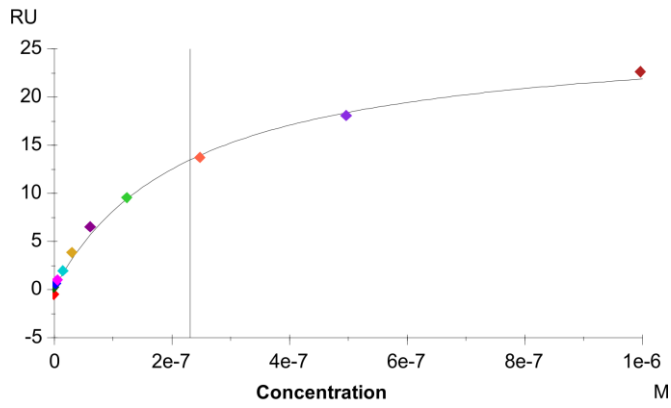


Abbildung XI.4: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1092E10 mittels Steady State Affinity.

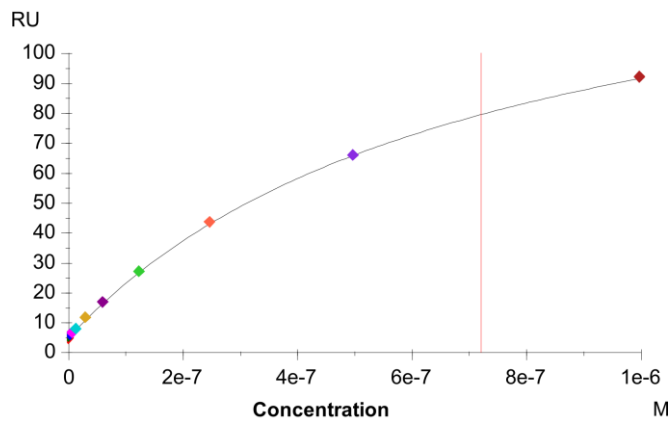


Abbildung XI.5: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1092F10 mittels Steady State Affinity.

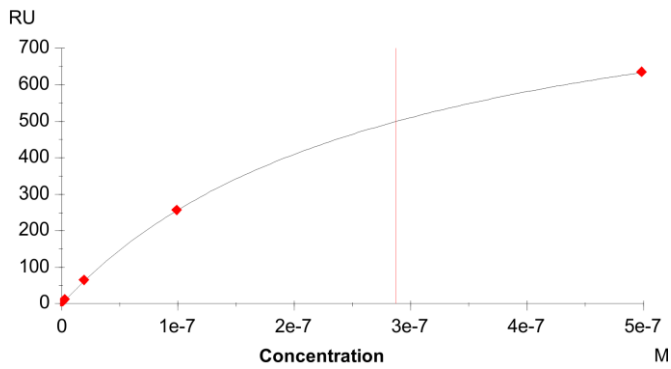


Abbildung XI.6: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1430B2 mittels Steady State Affinity.

Anhang

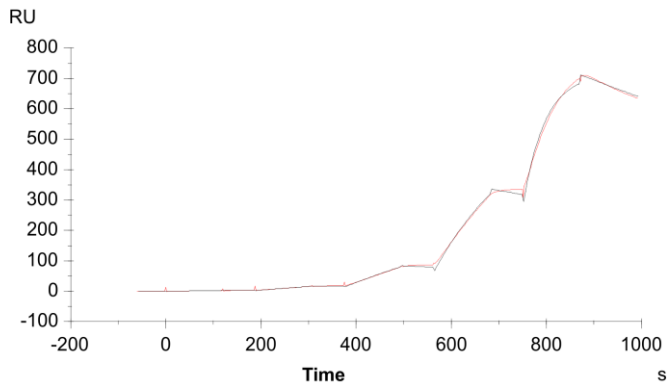


Abbildung XI.7: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1430B6 mittels 1:1 Kinetik.

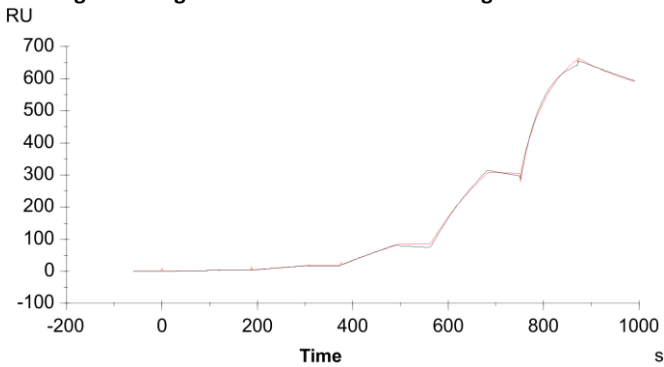


Abbildung XI.8: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1430D4 mittels 1:1 Kinetik.

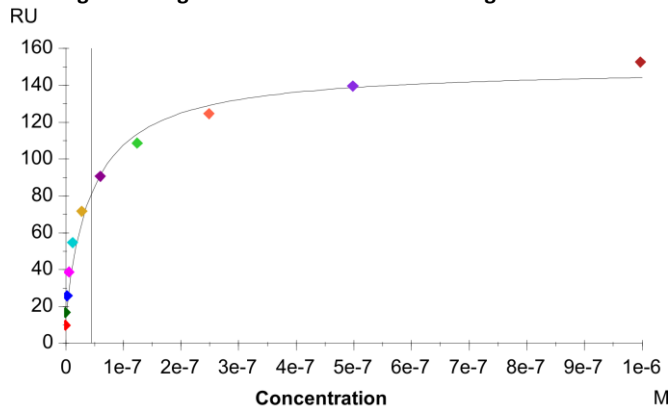


Abbildung XI.9: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1634A9 mittels Steady State Affinity.

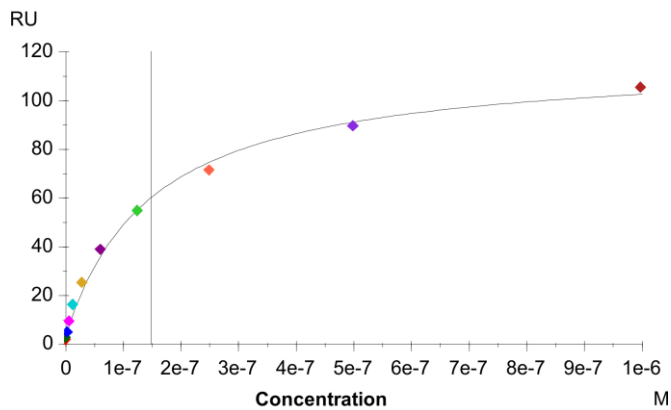


Abbildung XI.10: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1634C8 mittels Steady State Affinity.

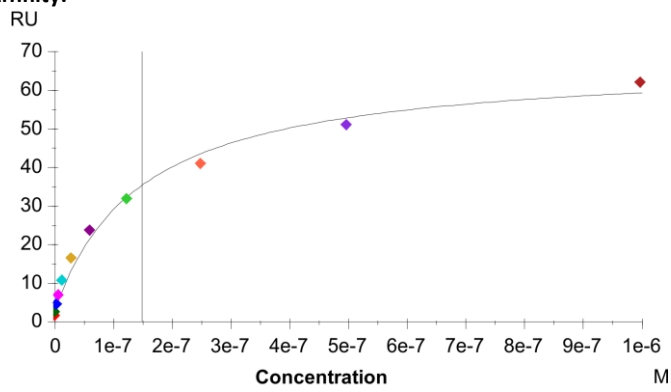


Abbildung XI.11: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1634G2 mittels Steady State Affinity.

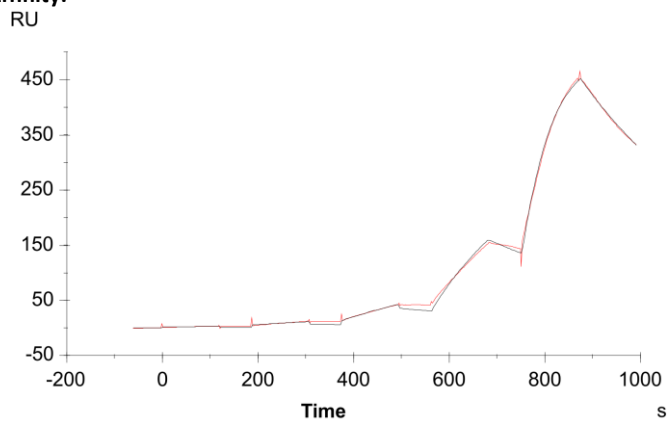


Abbildung XI.12: Diagramm des Fits zur Bestimmung der Affinität des Antikörperklons 1847E12 mittels 1:1 Kinetik.

Wissenschaftliche Leistungen

Publizierte Manuskripte (peer reviewed):

Connor DO, Zantow J, Hust M, Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M. Identification of Novel Immunogenic Proteins of *Neisseria gonorrhoeae* by Phage Display. PLOS ONE. 2016;11. doi:10.1371/journal.pone.0148986.

Manuskripte in Vorbereitung:

Connor DO, Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M. Epitope Determination of Immunogenic Proteins of *Neisseria gonorrhoeae*. PLOS ONE.

Internationale Vorträge:

Connor DO, Zantow J, Hust M, Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M. Identification of immunogenic proteins and linear epitopes of *Neisseria gonorrhoeae*. 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Kopenhagen, Dänemark. 2015.

Posterbeiträge:

Connor DO, Helmsing S, Bier FF, Hust M, von Nickisch-Rosenegk M. Generierung von spezifischen, rekombinanten Antikörpern gegen *Neisseria gonorrhoeae* und Charakterisierung für mögliche Applikationen. 9. Deutschen BioSensor Symposium, München, Deutschland, 2015.

Connor DO, Ehrentreich-Förster E, Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M. Utilising phage display to identify immunogenic domains of *Neisseria gonorrhoeae* proteins. Potsdam Days on Bioanalysis 2015, Potsdam, Deutschland, 2015.

Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht ohne die Hilfe und Unterstützung einer Vielzahl an Personen möglich gewesen. Daher gilt mein Dank folgenden Kollegen, Freunden und Familienmitgliedern.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frank Bier für die Betreuung dieser Doktorarbeit und für die Möglichkeit bedanken, die Arbeit am Fraunhofer IBMT/IZI-BB durchzuführen.

Dr. Markus von Nickisch-Rosenegk danke ich für die direkte Unterstützung während dieser Arbeit und seine Einsatzbereitschaft bei administrativen Angelegenheiten. Du hattest immer ein offenes Ohr und einen Ratschlag parat, wenn es Rückschläge zu verkraften galt.

Großer Dank gilt meinen Kooperationspartner an der TU Braunschweig: Prof. Dr. Michael Hust, Jonas Zantow, Dr. Jonas Kügler und Saskia Helmsing, um nur einige beim Namen zu nennen. Durch diese Kooperation wurde ich in die Methodik des Phage Display eingeführt. Des Weiteren bin ich sehr dankbar, dass ich die scFv-Antikörperbibliothek HAL9/10 der TU Braunschweig für die Isolation von scFv-Fragmenten gegen die identifizierten Proteine verwenden durfte.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Katja Arndt und Prof. Dr. Stefan Dübel, die als wissenschaftliche Gutachter dieser Arbeit fungieren.

Dr. Sebastian Hoppe möchte ich für die vielen Diskussionen und Ratschläge danken. Zudem waren deine Hinweise und Korrekturen bezüglich der Manuskripte und dieser Arbeit sehr hilfreich und haben einige Unklarheiten beseitigt. Auch danke ich dir für die vielen Gespräche und Diskussionen über weniger fachliche Themen, die die abendliche Fahrt nach Berlin verkürzt haben.

Besonderer Dank gilt auch Simone Aubele und Martina Obry, die mir bei vielen Experimenten unterstützend unter die Arme gegriffen haben. Auch bei Bestellungen und den alltäglichen Laborarbeiten seid ihr eine große Hilfe gewesen.

Selbstverständlich gilt mein Dank auch meinen Bürokollegen. Allen voran Lena Danckert, die mich bis zum Schluss ertragen musste und neben fachlichen Diskussionen auch stets für einen Spaß zu haben war; aber auch Andisheh Motealleh, Thomas Paulraj und Vladimir Prokopovic.

Bei Dr. Walter Stöcklein möchte ich mich für die Unterstützung bei den SPR-Messungen und deren Auswertung bedanken.

Ebenfalls danken möchte ich Hauke Reimann, der während seiner Bachelorarbeit die Gene der Vollängenproteine kloniert und einen Teil der Proteine produziert und aufgereinigt hat.

Danksagung

Natürlich gilt mein Dank auch allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Technische Molekularbiologie. Sowohl für hilfreiche Vorschläge bei Seminaren als auch für den Zeitvertreib im Labor bin ich euch allen dankbar und möchte die Zeit nicht missen.

Eine große Unterstützung waren auch die erfolgreichen Instituts-Fußballteams der vergangenen Jahre und die Beachvolleyballer, die vor allem im Sommer dabei halfen, den Kopf nach der Arbeit frei zu kriegen. Hervorzuheben ist hier das Fußballteam 2016, mit dem endlich der Turniersieg in Golm gelang.

Des Weiteren möchte ich all meinen Freunden am und außerhalb des Instituts für ihre Unterstützung danken und dass sie immer da sind, wenn man sie braucht.

Ganz besonders danken möchte ich selbstverständlich meinen Eltern und meiner Omi, die mich stets ihre Unterstützung spüren ließen und mich zu der Person erzogen haben, die ich heute bin. Ebenfalls bin ich euch sehr dankbar, dass ihr mich so lange finanziell unterstützt habt. Ich habe es immer zu schätzen gewusst und bin mir darüber im Klaren, dass es nicht selbstverständlich ist.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Verlobten Nadine Rasche. Du hast mir in allen guten und schlechten Lebenslagen den Rücken gestärkt und mich über die letzten 10 Jahre in allem unterstützt. Danke für die wunderbare, gemeinsame Zeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne Hilfe Dritter verfasst habe. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht verwendet. Die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Abschnitte sind als solche kenntlich gemacht. Diese wissenschaftliche Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen und wurde auch nicht veröffentlicht.

Potsdam, den 06. September 2016

Daniel Connor