

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut  
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
Direktor: Prof. Dr. Sebastian Suerbaum

**„Entwicklung einer intranasalen Impfung gegen  
gram-negative Bakterien basierend auf  
Außenmembranvesikeln und Evaluation der Immunantwort  
im Mausmodell“**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Najib Ben Khaled  
aus Karlsruhe  
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Andreas Wieser

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Karl-Heinz Herbinger  
Prof. Dr. Rüdiger von Kries

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>A Einleitung</b> .....	<b>4</b>
A 1. Nosokomiale Infektionen mit gram-negativen Bakterien .....	4
A 2. Impfungen .....	8
A 3. Außenmembranvesikel .....	10
3.1 Allgemein .....	10
3.2 Funktionen .....	11
3.3 Interaktionen der OMV mit dem Immunsystem .....	12
3.4 OMV als Impfungen .....	13
A 4. Zielsetzung .....	14
<b>B Material</b> .....	<b>15</b>
B 1. Geräte .....	15
B 2. Chemikalien .....	16
B 3. Puffer und Lösungen .....	17
3.1 Allgemein .....	17
3.2 ELISA .....	17
3.3 Gelelektrophorese .....	18
3.4 Western Blot .....	18
3.5 Fluoreszenzmikroskopie .....	19
3.6 Quantitativer Fluoreszenzassay .....	19
B 4. Antikörper .....	19
4.1 Antikörper für ELISA .....	19
4.2 Antikörper für Western Blot .....	19
4.3 Antikörper für Fluoreszenzversuche .....	20
B 5. Kits .....	20
B 6. Bakterienstämme .....	20
B 7. Seren .....	21
B 8. Nährmedien .....	21
8.1 Flüssige Nährmedien .....	21
8.2 Feste Nährmedien .....	21

B 9. Software .....	21
<b>C Methoden .....</b>	<b>23</b>
C 1. Bakteriologische Methoden .....	23
1.1 Bakterienkultivierung .....	23
1.2 Lagerung .....	24
1.3 Hitzeinaktivierung der Bakterien.....	24
C 2. Produktion der OMV-basierten Vakzine .....	25
2.1 Vesikelgewinnung durch Ultrazentrifugation .....	25
2.2 Quantifikation der OMV .....	26
C 3. Tierexperimentelle Methoden .....	26
3.1 Haltung der Versuchstiere .....	26
3.2 Intranasale Immunisierung .....	26
3.3 Gewinnung der Mausseren .....	27
3.4 Töten der Versuchstiere .....	27
3.5 Finale Blutentnahme.....	27
C 4. Proteinmethoden.....	28
4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	28
4.2 ELISA .....	30
4.3 Western Blot.....	32
C 5. Immunofluoreszenzmikroskopie .....	38
C 6. Quantitativer Fluoreszenzassay .....	40
C 7. Histopathologie der Nasenschleimhaut .....	41
C 8. Statistische Auswertung .....	41
<b>D Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
D 1. Intranasale Impfung der Mäuse .....	43
1.1 Charakterisierung der Proteinprofile der OMV .....	43
1.2 Mausgruppen.....	44
1.3 Impfstoffzusammensetzung.....	45
1.4 Impfung und Probengewinnung.....	45
D 2. Untersuchung der Immunantwort im Mausmodell .....	47
2.1 ELISA .....	47
2.2 Western Blot.....	56

2.3 Immunofluoreszenzmikroskopie .....	62
2.4 Quantitativer Fluoreszenzassay .....	65
D 3. Untersuchung der Immunantwort beim Menschen.....	67
3.1 ELISA .....	67
3.2 Western Blot.....	69
3.3 Immunofluoreszenzmikroskopie .....	71
D 4. Evaluation der Verträglichkeit des Impfstoffs .....	73
<b>E Diskussion .....</b>	<b>75</b>
E 1. Diskussion der Methode .....	77
E 2. Diskussion der Ergebnisse .....	81
<b>F Zusammenfassung .....</b>	<b>95</b>
<b>G Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>H Abkürzungen .....</b>	<b>111</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>115</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>116</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>118</b>

## A Einleitung

### A 1. Nosokomiale Infektionen mit gram-negativen Bakterien

Nosokomiale Infektionen mit gram-negativen Bakterien (GNB) stellen eine große Bedrohung der öffentlichen Gesundheit dar. Laut dem Europäischen Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC) erleiden 3,2 Millionen Patienten jedes Jahr eine Infektion in europäischen Krankenhäusern (1 von 18 Patienten). Die Zahl der Toten beläuft sich auf 175.000 jährlich in Europa (Chopra et al. 2008). Damit gehören nosokomiale Infektionen zu den häufigsten Todesursachen in Europa. In den USA ist eine ähnliche Entwicklung zu beobachten. Von insgesamt 1,7 Millionen Patienten mit nosokomialen Infektionen versterben fast 100.000 (Klevens et al. 2007). Die daraus entstehenden Kosten für das amerikanische Gesundheitssystem belaufen sich auf 5 bis 10 Milliarden US-Dollar pro Jahr (Stone et al. 2005). Unter den 15 am häufigsten isolierten Keimen als Verursacher nosokomialer Infektionen in Europa gehören neun zu den GNB (siehe Abbildung A 1). In den USA werden 30 % aller nosokomialer Infektionen durch GNB verursacht (Hidron et al. 2008). Zu den häufigsten nosokomialen Infektionen in Europa gehören postoperative Wundinfektionen, gefolgt von Harnwegsinfektionen, Pneumonien und Sepsis (Cassini et al. 2016). Hauptverursacher sind GNB, insbesondere *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* und *Enterobacter*-Spezies (spp.) (Peleg und Hooper 2010). Hauptrisikofaktoren für Krankenhausinfektionen sind eine lange stationäre Liegezeit, das Wohnen in einem Pflegeheim, Immunsuppression oder medizinische Fremdkörper. So sind Blasenkatheter wesentlich mit nosokomialen Harnwegsinfekten assoziiert, invasive Beatmungen mit Pneumonie und zentrale Venenkatheter mit Sepsis. Die Behandlung von nosokomialen Infektionen mit GNB wird zunehmend schwieriger, da in den letzten Jahren die Entstehung und

## A Einleitung

Verbreitung multiresistenter Organismen zugenommen hat (Petty et al. 2014, Canton et al. 2012). Insbesondere in Europa konnte ein dramatischer Anstieg von multiresistenten (MDR von englisch (engl.) *multidrug-resistant*) Bakterien beobachtet werden (Souli et al. 2008). MDR bedeutet hierbei die erworbene Resistenz gegenüber mindestens drei der folgenden antimikrobiellen Substanzklassen: Aminoglykoside, Cephalosporine, Chinolone, Cotrimoxazol, Glycylcycline, Monobaktame, Penicilline mit  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren, Phenikole, Fosfomycin, Polymyxine und Tetrazykline. Äußerst besorgniserregend sind Berichte über panresistente GNB, die gegenüber allen verfügbaren Antibiotika unempfindlich sind (Falagas et al. 2005). Vier wichtige Antibiotikagruppen in der Behandlung von Infektionen mit gram-negativen Erregern sind Ureidopenicilline wie Piperacillin, Cephalosporine der dritten (Cefotaxim, Ceftazidim) und vierten Generation (Cefepim), Carbapeneme und Fluorquinolone. In Deutschland hat sich der Begriff 3MRGN bzw. 4MRGN für multiresistente gram-negative Erreger (MRGN) etabliert, die gegen drei bzw. vier dieser Klassen resistent sind (Bundesgesundheitsbl. 2012).

Antimikrobielle Resistenzen bedrohen täglich das Überleben von Patienten in Krankenhäusern weltweit. Die kürzlich publizierte Analyse von Cassini und Kollegen zeigt, dass im Jahr 2015 in Europa etwa 672.000 Patienten an resistenten Bakterien erkrankt und ca. 33.000 verstorben sind (Cassini et al. 2019). Die Entwicklung neuer Antibiotika konnte mit diesem Trend nicht Schritt halten. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurden seit dem Jahr 2000 nur fünf neue Antibiotikaklassen auf den Markt gebracht (Renwick et al. 2016): Oxazolidinone (z.B. Linezolid), Lipopeptide (Daptomycin), Pleuromutilin-Antibiotika (z.B. Lefamulin), Makrozykline (Fidaxomicin) und Diarychinoline (Bedaquilin). Keines dieser fünf neuen Antibiotika eignet sich zur Bekämpfung von GNB. Die Gründe für die fehlende Innovation sind vielseitig. Die aufwendige Grundlagenforschung und die komplexe präklinische und klinische Entwicklung verursachen hohe Kosten (Peleg et al.

## A Einleitung

2010). O'Neill schätzt die Ausgaben für die Entwicklung eines Antibiotikums auf 700 Millionen bis 1,1 Milliarden Euro (O'Neill 2015). Dem stehen gleichzeitig im Vergleich zu anderen Medikamenten niedrige Einnahmen entgegen. Außerdem bestehen Bedenken, dass eine schnelle Resistenzentwicklung gegen ein neues Präparat dieses wertlos machen kann (Peleg et al. 2010). Um der Gefahr durch multiresistente GNB entgegenzutreten, müssen die Anstrengungen in der Antibiotikaforschung verstärkt werden. Darüber hinaus sind neue Ansätze im Management von nosokomialen Infektionen mit gram-negativen Erregern dringend vonnöten. Neben Hygieneprogrammen und leitliniengerechter antibiotischer Behandlung unter mikrobiologischer Führung (*antibiotic stewardship*) könnten Impfungen einen wesentlichen Beitrag leisten.



## A Einleitung

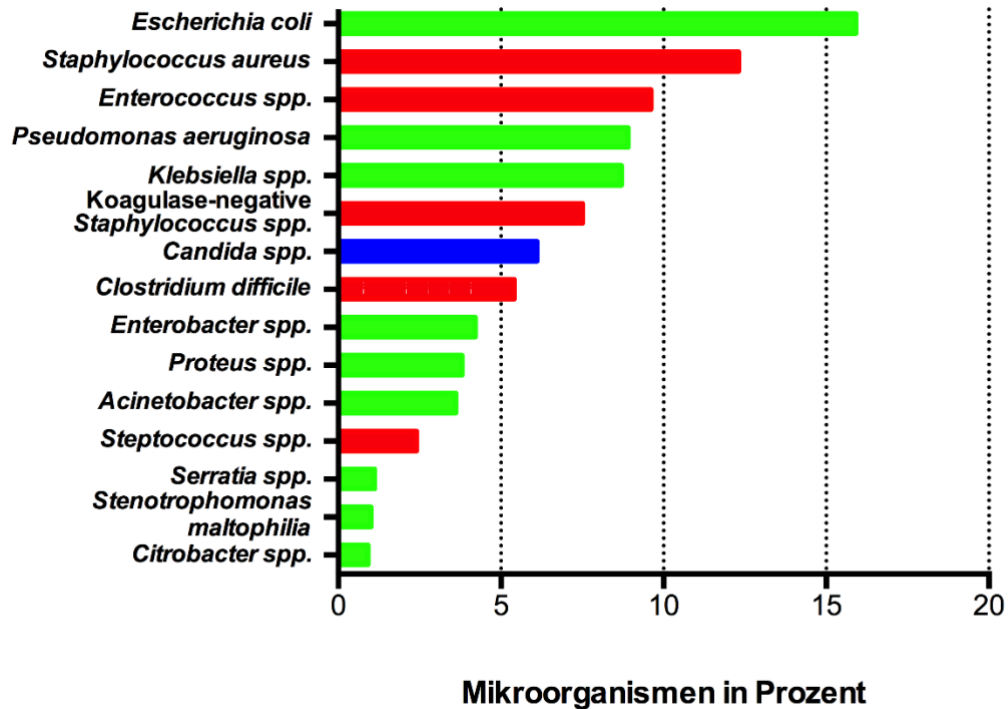


Abb. A 1 Häufigste isolierte Bakterien als Verursacher nosokomialer Infektionen in Europa in Prozent (n = 10.076). In Grün sind die gram-negativen Bakterien gekennzeichnet, in Rot gram-positive Erreger und in Blau Pilze. Eigene Darstellung der Daten aus der ECDC-Punktprävalenzerhebung über nosokomiale Infektionen und den Einsatz antimikrobieller Mittel in Akutkrankenhäusern (ECDC-PPS) im Zeitraum 2011-2012. European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm: ECDC; 2013. Abfrage 22.06.2020. Spp. = Spezies.

## **A 2. Impfungen**

Impfungen sind eine der effektivsten Gesundheitsmaßnahmen zur Reduktion von Morbidität und Mortalität weltweit. Laut der WHO bewahren Impfungen zwei bis drei Millionen Menschen jedes Jahr vor dem Tod und weit mehr vor akuter oder chronischer Erkrankung (Vaccines work 2018). Das Ziel einer Impfung ist effektiver Schutz vor einer Infektion mit einem Pathogen. Gleichzeitig soll die Vakzine selbst keine Erkrankung oder andere schwere Nebenwirkungen verursachen. Den Grundstein moderner Impfstoffentwicklung legte der britische Arzt Edward Jenner vor mehr als 200 Jahren. Er beobachtete, dass Melkerinnen nach einer Infektion mit den harmlosen Kuhpocken vor der tödlichen Pockenerkrankung geschützt waren. In seinen Studien impfte er Probanden erst mit dem Sekret von Ulzera am Euter von Kühen, um sie danach mit dem Pockenerreger zu konfrontieren. Die Probanden erwiesen sich als immun (Jenner 1798). In Anlehnung an Jenners Pionierarbeit bezeichnet man Impfungen heute als Vakzine, von lateinisch *vacca* für „Kuh“. Aus diesen frühen Studien wurde die Schlussfolgerung abgeleitet, dass ein Vakzin einem Erreger ähneln muss, ohne selbst die Erkrankung auszulösen. Zwei Strategien wurden entwickelt. Zum einen wurden Keime durch Labormethoden abgeschwächt und als Vakzine eingesetzt. Wegweisende Entdeckungen von Louis Pasteur führten zu den ersten attenuierten Impfungen gegen die sogenannte „Geflügelcholera“, Tollwut und Anthrax (Pasteur 1880). Zum anderen wurden ganze Erreger abgetötet oder Bestandteile von ihnen extrahiert und inaktiviert. Diese Technik wurde zur Basis der Impfstoffe gegen Diphtherie, Tetanus und Pertussis. Es folgte eine große Erfolgsgeschichte moderner Medizin. Die letzten Pockenerkrankungen traten 1977 in Somalia auf, 1980 erklärte die WHO die Ausrottung der Pocken (Fenner et al. 1988). Mitte des 20. Jahrhunderts verursachte das Poliovirus weltweit pro Tag Lähmungen bei etwa 1.000 Kindern (Vaccines work 2018). Durch die Impfungen im Rahmen des

## A Einleitung

Polioeradikationsprogramms sind jetzt drei Regionen poliofrei: Europa, Amerika und der Westpazifik. Eine Ausrottung des Erregers scheint möglich. Dies sind nur zwei Beispiele außerordentlicher Leistungen durch Vakzine. Trotz dieser großen Erfolge stellen Infektionserkrankungen weiterhin eine Hauptursache weltweiter Mortalität dar. Malaria, Tuberkulose oder AIDS (von engl. *acquired immune deficiency syndrome*, erworbenes Immunschwächesyndrom) sind Beispiele für Erkrankungen ohne effektive Impfung. Wirksame und sichere Vakzine gegen nosokomiale Infektionen mit GNB wären ebenfalls dringend nötig, insbesondere in Anbetracht der zunehmenden Entwicklung und Verbreitung multiresistenter Erreger. Bewährte Strategien der Impfstoffentwicklung sind bei der Suche nach neuen effektiven Vakzinen nur bedingt hilfreich. Problematisch am Einsatz abgeschwächter Erreger als Impfung ist, dass sie bei immunsupprimierten oder schwangeren Patienten zu schweren Infektionen führen können. Von nosokomialen Infektionen bedroht sind jedoch häufig immunsupprimierte Patienten. Die zweite Strategie, das Inaktivieren von Erregern, kann zu einer eingeschränkten Immunantwort führen, da native antigene Strukturen der Pathogene durch die Denaturierung zerstört werden. Außerdem werden die heutigen Impfstoffe meistens parenteral verabreicht. Viele Krankheitserreger, insbesondere gram-negative Erreger nosokomialer Infektionen, dringen jedoch über die Schleimhäute ein. Asymptomatische Kolonisation durch GNB ist ein wesentlicher Risikofaktor für das Entwickeln einer nosokomialen Infektion (Martin et al. 2016, Gorrie et al. 2017). Eine mukosale Impfung könnte zum einen durch eine lokale Immunantwort die Schleimhäute vor Besiedelung und Infektion schützen. Darüber hinaus kann die systemische Immunität den Patienten vor schwerer Erkrankung und Tod bewahren. Besonders wünschenswert für eine Impfung wären nicht lebende bakterielle Komponenten, die native Antigene beinhalten. So könnte eine schützende Immunität induziert werden, ohne Patienten durch eine Infektion zu gefährden.

## A Einleitung

Ein mukosaler Applikationsweg erscheint in diesem Zusammenhang vielversprechend.

### A 3. Außenmembranvesikel

#### 3.1 Allgemein

Die Zellwand von GNB besteht aus einer inneren und einer äußeren Membran. Dazwischen liegt der periplasmatische Raum. Alle GNB produzieren während ihres Wachstums Außenmembranvesikel (OMV von engl. *outer membrane vesicle*). OMV entstehen aus Ausstülpungen der bakteriellen Außenmembran (OM von engl. *outer membrane*) und schnüren sich als Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 50 – 250 nm ab (Beveridge 1999). Die Membran der OMV setzt sich wie die bakterielle Außenmembran aus zwei Schichten zusammen. Sie enthält überwiegend Phospholipide (PL), Lipopolysaccharide (LPS) und Außenmembranproteine (OMP von engl. *outer membrane proteins*) (Kulp und Kuehn 2010). Im Lumen der Vesikel finden sich unterschiedliche bakterielle Produkte. Darunter sind zum einen periplasmatische (PP) und zytoplasmatische Proteine (ZP) (Bonnington und Kuehn 2014). Zum anderen können OMV in geringer Menge auch DNA, RNA und Peptidoglykan beinhalten (Kaparakis et al. 2010, Fulsundar et al. 2014). Abbildung A 3.1 zeigt beispielhaft ein OMV. Die OMV-Produktion von GNB ist ubiquitär. Sie findet einerseits *in vitro* (Hoekstra et al. 1976) in Flüssig- und Festkulturen sowie in Biofilmen statt (Kuehn und Kesty 2005). Andererseits bilden sich OMV auch *in vivo* während der Infektion (Hellman et al. 2000). Das Ausmaß der OMV-Produktion ist von Stamm zu Stamm unterschiedlich und abhängig von der bakteriellen Wachstumsphase und unterschiedlichen Umweltbedingungen (Manning und Kuehn 2013, Peter und Wieser, unveröffentl.).

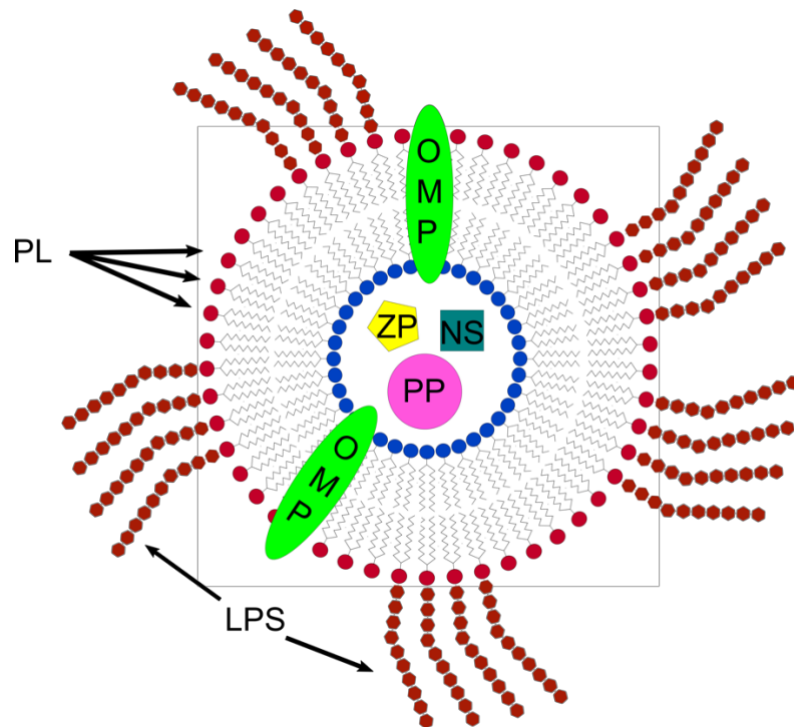


Abb. A 3.1 Schematische Darstellung eines Außenmembranvesikels (OMV von engl. *outer membrane vesicle*). Die Membran des OMV besteht aus zwei Schichten und beinhaltet Phospholipide (PL), Lipopolysaccharide (LPS) und Außenmembranproteine (OMP). Das Lumen enthält periplasmatische und zytoplasmatische Proteine (PP, ZP) sowie die Nucleinsäuren (NS) DNA und RNA. Eigene Darstellung.

### 3.2 Funktionen

Die Produktion von OMV stellt einen Sekretionsmechanismus gram-negativer Erreger zur Interaktion mit der Umwelt dar (Kulp und Kuehn 2010). Gegenüber anderen Systemen bieten OMV einige Vorteile. Zum einen ist ihr Inhalt besser geschützt vor Verdünnung oder Degradation im extrazellulären Raum (Kesty und Kuehn 2004). Zum anderen können Oberflächenbestandteile der OMV spezifische Rezeptoren an anderen Zellen binden und einen zielgerichteten Transport von Substanzen bewirken (Kothary et al. 2017). Nach Erreichen des Ziels kommt es durch eine Fusion des Vesikels mit der Membran pro- oder eukaryotischer Zellen zu einer Freisetzung des Inhalts (Li et al. 1998, Furuta et al. 2009). Dieses einzigartige Sekretionssystem trägt wesentlich zum

bakteriellen Überleben bei. Nach MacDonald und Kuehn übernehmen OMV sowohl defensive als auch offensive Funktionen (MacDonald und Kuehn 2012). OMV schützen das Bakterium durch die Absorption gefährlicher Umweltpartikel wie Antibiotika, Komplementfaktoren oder Bakteriophagen (Tan et al. 2007, Loeb und Kilner 1978, Ciofu et al. 2000). Durch die Induktion von Biofilmbildung schirmen OMV Bakterienkolonien von antimikrobiellen Substanzen ab (Gorby et al. 2008). Außerdem kann ein Bakterium über OMV mit anderen Erregern seiner oder anderer Spezies kommunizieren (Mashburn und Whiteley 2005) und genetische Informationen austauschen (Renelli et al. 2004). Über diesen Mechanismus können sich Antibiotikaresistenzen zwischen unterschiedlichen Erregern verbreiten (Yaron et al. 2000). Darüber hinaus erleichtern OMV die Nahrungsaufnahme (Lin et al. 2017) und geben dem Bakterium eine Möglichkeit nicht benötigte Stoffe zu entfernen (McBroom und Kuehn 2007). Während der Infektion eines Wirts kommen die offensiven Eigenschaften der OMV zur Geltung. Erstens befördern sie Toxine direkt in die Wirtszelle (Bomberger et al. 2009, Kato et al. 2002). Zweitens zerstören OMV konkurrierende Bakterienpopulationen (Li et al. 1998). Drittens erleichtern sie die Kolonisation des Wirtsgewebes mittels verbesserter Adhäsion der Bakterien an Wirtszellen bzw. an anderen Bakterien (Inagaki et al. 2006).

### **3.3 Interaktionen der OMV mit dem Immunsystem**

Die Oberfläche von OMV ist beladen mit Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs von engl. *pathogen-associated molecular patterns*) und bakteriellen Antigenen. Die Erkennung dieser Strukturen durch Immunzellen führt zu einer starken Aktivierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort (Ellis und Kuehn 2010). Einen wichtigen Beitrag zu dieser Immunstimulation leisten LPS und diverse Lipoproteine. Die beiden Letzteren sind Hauptbestandteile der Vesikelmembran. LPS führt durch eine Bindung an Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), Lipoproteine durch Bindung an TLR2 zu einer

Aktivierung des NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor, kappa-light-chain-enhancer*, aus aktivierten B-Lymphozyten) Signalwegs und folglich des angeborenen Immunsystems (van der Pol et al. 2015, Jin et al. 2007, Li et al. 2013). Die Größe der OMV erleichtert ihren Eintritt in Lymphgefäße und die Aufnahme durch antigenpräsentierende Zellen (Bachmann und Jennings 2010). Aktivierte Makrophagen und dendritische Zellen setzen proinflammatorische Botenstoffe frei und präsentieren Antigene der OMV auf ihren Haupthistokompatibilitätskomplex-Oberflächenrezeptoren. Diese Antigene werden von B-Lymphozyten und T-Helferzellen erkannt und führen zur Produktion von Antikörpern im Rahmen der humoralen Immunantwort (Alaniz et al. 2007). Diese immunstimulierenden Eigenschaften machen OMV als Bestandteile von Impfungen attraktiv.

### **3.4 OMV als Impfungen**

OMV präsentieren bakterielle Oberflächenantigene in nativer Konformation gegenüber den Immunzellen. Über ihre PAMPs induzieren bzw. verstärken sie die Immunantwort gegenüber diesen Antigenen und haben daher „selbstadjuvantierende Eigenschaften“. Insgesamt macht dies OMV sehr interessant für die Impfstoffentwicklung. Wie von van der Pol und Kollegen zusammengefasst, wurden einige OMV-basierte Vakzine entwickelt (van der Pol et al. 2015). Die erfolgreichsten OMV-Impfungen richten sich gegen Meningokokken der Gruppe B. Darunter ist die einzige OMV-Impfung, die für Menschen verwendet wird, Bexsero®. Dieses OMV-Produkt ist in über 35 Ländern inklusive USA, Kanada, Australien und den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union zugelassen. Im Zeitraum von 2013 bis 2015 wurden mehr als eine Million Dosen des Vakzins verabreicht (Watson und Turner 2016). Die Effektivität und Sicherheit OMV-basierter Vakzine gegen Meningokokken der Gruppe B wurde in zahlreichen klinischen Studien bestätigt (Holst et al. 2013). Ausgehend von diesem Erfolg wurden in den letzten Jahren einige OMV-

## A Einleitung

Impfungen gegen verschiedene GNB in Tiermodellen untersucht. Die Administration von OMV generierte eine robuste humorale Immunantwort in den Versuchstieren und schützte vor Infektion, beispielsweise gegen die Erkrankungen Keuchhusten (*Bordetella pertussis*, Bottero et al. 2016), Gonorrhoe (*Neisseria gonorrhoeae*, Liu et al. 2017), Bakterienruhr (*Shigella spp.*, Mitra et al. 2013) oder Cholera (*Vibrio cholerae*, Bishop et al. 2010). OMV-Vakzine gegen die nosokomialen Bakterien *Acinetobacter baumannii* (McConnell et al. 2011, Huang et al. 2016), *E. coli* (Fingermann et al. 2018) oder *Staphylococcus aureus* (Stevenson et al. 2018) wurden ebenfalls erfolgreich im Tiermodell entwickelt. Laut unseren Informationen jedoch wurde das Potential von OMV als breit einsetzbare intranasale Vakzine gegen gram-negative Erreger, die von Patienten mit nosokomialen Infektionen entnommen wurden, noch nie untersucht.

### **A 4. Zielsetzung**

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin, die Immunogenität einer Vakzinierung gegen GNB als Verursacher nosokomialer Infektionen basierend auf OMV im Mausmodell zu evaluieren. Im ersten Teil wurden Mäuse mit OMV dreier gram-negativer Bakterienisolate von Patienten und einem *E. coli*-Referenzstamm intranasal vakziniert und die humorale Immunreaktion mittels unterschiedlicher Tests im Mausmodell untersucht. Im zweiten Teil wurde die Immunantwort beim Menschen aus Seren der entsprechenden Patienten charakterisiert und verglichen. Zusätzlich wurde die Verträglichkeit einer OMV-gestützten Vakzinierung durch die histopathologische Untersuchung der Nasenschleimhaut intranasal geimpfter Mäuse evaluiert.



## B Material

### B 1. Geräte

Tabelle B 1. Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
<b>Brutschränke Bakterien</b>	Heraeus function line T6 Heraeus function line T12 BD 115	Heraeus, Hanau* Heraeus, Hanau WTC Binder, Tuttlingen
<b>Bunsenbrenner</b>	Fireboy plus	IntegraBiosciences, Wallisellen, Schweiz
<b>Digitalkamera für Mikroskopie</b>	Kappa K Typ PS 40 - 285 CL (DX)	Kappa optronics Inc., Monrovia, USA
<b>Dokumentationseinheit für Immunoblot</b>	ChemiDoc™ XRS	Biorad, München
<b>Fluoreszenz-Mikroskop</b>	Leitz Aristoplan	Leitz, Wetzlar
<b>Gefrierschrank -20 °C</b>	LGex 3410 MediLine	Liebherr Premium, Bulle, Schweiz
<b>Gefrierschrank -80 °C</b>	PLPE 4186	National Lab, Mölln
<b>Gießeinheit</b>	Mini Protean Casting Stand and Clamps	Biorad, München
<b>Heizplatte</b>	IKA RCT basic	IKA Werke, Staufen
<b>Heizblock</b>	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
<b>Kühlschrank</b>	FKV 4310	Liebherr Premium, Bulle, Schweiz
<b>Laborwaage</b>	Grobwaage: Kern PBC  Feinwaage: Sartorius GHCF15	Kern & Sohn GmbH, Albstadt Sartorius, Göttingen
<b>Laufkammer</b>	Protran II Mini-Vertical unit	Biorad, München
<b>Membranvakuumpumpe</b>	ME 2 NT	Vacuubrand GmbH + Co. KG, Wertheim
<b>Mikroplattenleser</b>	Tristar LB941	Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad
<b>Netzteil Elektrophorese</b>	Power Pac 200	Biorad, München
<b>pH-Meter</b>	pH 3000	Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim
<b>Pipetten</b>	Eppendorf Reference (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl)	Eppendorf, Hamburg
<b>Pipettierhelfer</b>	Accu Jet Pro	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
<b>Schüttelinkubator</b>	Orbital Incubator SI50  Multitron Standart	Stuart Scientific, Staffordshire, UK INFORS HAT, Bottmingen, Schweiz

## B Material

<b>Spektralphotometer</b>	Nanodrop 2000 Ultrospec 3100 pro	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA GE life sciences, Pittsburgh, USA
<b>Sterilwerkbank</b>	UVF 6.18 S	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
<b>Thermodrucker für Ultrospec 3100 pro</b>	Thermal printer DPU 414	Seiko Instruments, Torrance, USA
<b>Ultraschallhomogenisator</b>	Branson Sonifier 250	Emerson Industrials, St. Louis, USA
<b>Ultrazentrifuge</b>	Optima L90K Rotor SW32Ti	Beckman Coulter Biomedical GmbH, München
<b>Vortex</b>	Typ VF2  Vortex Genie-2	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
<b>Zentrifugen</b>	1K15, 12024-H 24 Place Rotor Super T21 Rotor ST-H70  5417 R F 45-30-11 30 Place Rotor	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Thermo Electron Cooperation (ehe. Sorvall), Waltham, USA Eppendorf, Hamburg

\* = Wird kein Land genannt, so liegt der Ort in Deutschland.

## B 2. Chemikalien

Tabelle B 2. Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Aceton</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Acrylamid, Bisacrylamid (AA/BA)</b>	National Diagnostics, Argonne, USA
<b>Ammoniumpersulfat (APS)</b>	Bio-Rad, München
<b>Bovines Serumalbumin (BSA)</b>	Biomol, Hamburg
<b>Bromphenolblau</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>Essigsäure</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Ethanol</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Formaldehyd</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Glycin</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Glycerin</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Harnstoff</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Kaliumchlorid (KCl)</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Methanol</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Mowiol 4-88</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Natriumcarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	Carl Roth, Karlsruhe

## B Material

<b>Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)</b>	E. Merck, Darmstadt
<b>Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Natriumdodecylsulfat (SDS)</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Ponceau S Lösung</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>Trichloressigsäure</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Tris</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Tris-Acetat</b>	Thermo scientific, Wilmington, USA
<b>Tris-HCl</b>	Thermo scientific, Wilmington, USA
<b>Tween 20</b>	Merck KGaA, Darmstadt

## B 3. Puffer und Lösungen

### 3.1 Allgemein

Die Sterilisation des Puffers erfolgte durch Autoklavieren (20 min, 121 °C) oder durch Filtration mittels 0,22 µl Filter (Corning™ 500 ml Einweg-Filtersystem).

Tabelle B 3.1. Allgemein

Name	Zusammensetzung
<b>PBS (von engl. <i>phosphate buffered saline</i>) zehnfach Konzentrat</b>	80 g NaCl 2 g KCl 17,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.000 ml <i>aqua destillata</i> (Aqua dest.) pH 7,4

### 3.2 ELISA

Tabelle B 3.2. ELISA

Name	Zusammensetzung/Hersteller
<b>Beschichtungspuffer</b>	3 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 6 g NaHCO <sub>3</sub> 1.000 ml Aqua dest. pH 9,6
<b>Waschpuffer</b>	PBS 0,05 % Tween 20
<b>Blockierungspuffer</b>	PBS 0,05 % Tween 20 1 % BSA
<b>Substratpuffer</b>	1.000 ml Aqua dest. 10 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 6,7 g C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> pH 5,0
<b>Substrat o-Phenylenediamin</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

### 3.3 Gelelektrophorese

Tabelle B 3.3. Gelelektrophorese

Name	Zusammensetzung/Hersteller
<b>Sammelgel (4 % Acrylamid)</b>	3.000 µl Aqua dest. 400 µl ProtoGel 1.500 µl 0,5 M Tris pH 6,8 50 µl SDS 35 µl APS 7 µl TEMED
<b>Trenngel (10 % Acrylamid)</b>	10.000 µl ProtoGel 8.800 µl Aqua dest. 225 µl APS 300 µl SDS 11.200 µl 1,5 M Tris pH 8,8 18,9 µl TEMED
<b>Laemmli-Laufpuffer zehnfach Konzentrat</b>	30,3 g Tris-HCl, pH 6,8 144 g Glycin 10 g SDS 1.000 ml Aqua dest.
<b>Probenpuffer zweifach Konzentrat</b>	125 mM Tris-HCl, pH 6,8 20 % Glycerin 4 % SDS 2 % β-Mercaptoethanol 0,02 % Bromphenolblau
<b>Ponceau-Färbelösung</b>	0,1 % Ponceau S 5 % Essigsäure Aqua dest.
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	0,125 % Coomassie-Blau (Serva, Heidelberg) 10 % Essigsäure 50 % Methanol Aqua dest.

### 3.4 Western Blot

Tabelle B 3.4. Western Blot

Name	Zusammensetzung/Hersteller
<b>Waschpuffer</b>	PBS 0,05 % Tween 20
<b>Blockierungspuffer</b>	5 % BSA in Waschpuffer
<b>Detektionsreagenz</b>	ECL Western Blotting Detection Reagent, Amersham Biosciences, Freiburg
<b>Transferpuffer zehnfach Konzentrat</b>	30,3 g Tris Base 144 g Glycin 1.000 ml Aqua dest. 20 % Methanol
<b>Größenstandard</b>	PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Rockford, USA)

### 3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Tabelle B 3.5. Fluoreszenzmikroskopie

Name	Zusammensetzung
Waschpuffer	PBS 0,1 % Tween 20
Fixierungsmedium	PBS 3,7 % Formaldehyd
Blockierungspuffer	PBS 0,05 % Tween 20 5 % BSA
Einbettmedium	2,4 g Mowiol 4-88 6 g Glycerin 6 ml Aqua dest. 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5 2,5 % DABCO

### 3.6 Quantitativer Fluoreszenzassay

Tabelle B 3.6. Quantitativer Fluoreszenzassay

Name	Zusammensetzung
Probenpuffer	PBS 0,1 % BSA
Waschpuffer	PBS
Lösungspuffer	PBS 0,1 % Tween 20

## B 4. Antikörper

### 4.1 Antikörper für ELISA

Tabelle B 4.1. Antikörper (AK) für ELISA

Name	Hersteller	Verdünnung
Ziege Anti-Maus IgG AK, Meerrettichperoxidase (von engl. horseradish peroxidase, HRP)-konjugiert	Sigma-Aldrich, Wiesbaden	1:1.000
Ziege Anti-Maus IgM AK HRP-konjugiert	Sigma-Aldrich, Wiesbaden	1:1.000
Ziege Anti-Human IgG AK HRP-konjugiert	Sigma-Aldrich, Wiesbaden	1:1.000

### 4.2 Antikörper für Western Blot

Tabelle B 4.2. Antikörper für Western Blot

Name	Hersteller	Verdünnung
Ziege Anti-Maus IgG AK HRP-konjugiert	Sigma-Aldrich, Wiesbaden	1:1.000

### 4.3 Antikörper für Fluoreszenzversuche

Tabelle B 4.3. Antikörper für Fluoreszenzmikroskopie und *in vivo* Fluoreszenzassay

Name	Hersteller	Verdünnung
Ziege Anti-Maus IgG AK Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiert	Sigma-Aldrich, Wiesbaden	1:100
Ziege Anti-Human IgG AK FITC-markiert	Sigma-Aldrich, Wiesbaden	1:100

### B 5. Kits

Tabelle B 5. Kits

Name	Hersteller
Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA

### B 6. Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterien wurden von Patienten des Klinikums der Universität München im Zuge der bakteriologischen Routinediagnostik isoliert und im eigenen Labor auf Agarplatten angezüchtet. Die Forschungsaktivität hat die klinische Diagnostik und Therapie weder aufgehoben noch beeinflusst. Die personenbezogenen Daten wurden eliminiert und die Bakterienstämme alphabetisch nummeriert. Dementsprechend wurden die Bakterien A, B und C aus den Patienten A, B und C isoliert. Diese alphabetischen Bezeichnungen werden im weiteren Verlauf der Arbeit beibehalten. Das uropathogene *E. coli* Isolat CFT073 (CFT) wurde als Referenzstamm ausgewählt, da es sich in einer der früheren Studien aus der Arbeitsgruppe als sehr immunogen erwiesen hat (Pritsch et al. 2016).

Tabelle B 6. Bakterienstämme

Name	Bakterium	Eigenschaft/Herkunft
Bakterienstamm A	<i>Enterobacter cloacae</i>	Patientenisolat
Bakterienstamm B	<i>E. coli</i>	Patientenisolat
Bakterienstamm C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Patientenisolat
CFT	<i>E. coli</i>	Referenzstamm, aus einem Patienten mit Urosepsis isoliert (Mobley et al. 1990)

## B 7. Seren

Überschüssige Serumproben der Patienten A, B oder C, aus denen die eingesetzten Bakterien isoliert wurden, stammen aus der Routinediagnostik der Infektionsserologie. Es wurden keine zusätzlichen Blutabnahmen oder andere Maßnahmen durchgeführt.

## B 8. Nährmedien

### 8.1 Flüssige Nährmedien

Die Sterilisierung des flüssigen LB (von engl. *lysogeny broth*) Nährmediums erfolgte durch Erhitzen im Autoklaven (20 min bei 121 °C).

Tabelle B 8.1. Flüssige Nährmedien

Name	Zusammensetzung
<b>LB-Medium</b>	10 g Trypton (Becton, Dickinson and Company, Le Point de Claix, Frankreich) 5 g NaCl 5 g Hefeextrakt (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) 1.000 ml Aqua dest. pH 7,4 – 7,6

### 8.2 Feste Nährmedien

Tabelle B 8.2. Feste Nährmedien

Name	Zusammensetzung/Hersteller
<b>LB-Agarplatten</b>	1.000 ml LB Flüssigmedium 15 g Bacto Agar (Becton, Dickinson and Company, Le Point de Claix, Frankreich)
<b>Blutagarplatten</b>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<b>MacConkey Agarplatten</b>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

## B 9. Software

Tabelle B 9. Software

Name	Hersteller	Version
<b>Image Lab Software</b>	Bio Rad Laboratories, München	4.1.16
<b>MikroWin 2000</b>	Mikrotek Laborsysteme, Overath	4.41

B Material

<b>NanoDrop 2000</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA	1.6.198
<b>Kappa Camera Control</b>	Kappa optronics Inc., Monrovia, USA	1.4.0.8053
<b>GraphPad Prism</b>	GraphPad Software, La Jolla, USA	6



## **C Methoden**

### **C 1. Bakteriologische Methoden**

#### **1.1 Bakterienkultivierung**

Die Anzucht von Bakterien gelingt generell in flüssigen oder in durch Agar verfestigten Medien.

Flüssige Nährmedien dienen in erster Linie der Anreicherung von Bakterien. Zur Gewinnung einer Flüssigkultur wurde ein steriler 40 ml Glaskolben mit LB-Medium befüllt und anschließend mit einer Bakterienkolonie beimpft. Durch Abflammen des Gefäßrandes sowie Ausglühen der Impföse vor und nach Beimpfung wurde das Risiko für Kontaminationen minimiert. Nach einer Bebrütung über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C wurde das Wachstum durch Messung der optischen Dichte mit einem Photometer kontrolliert. Vor der weiteren Bearbeitung wurde die Kultur in ein Falcon™ Zentrifugenröhrchen übergeführt, abzentrifugiert (2.500 rpm, 10 min, 4 °C) und in sterilem PBS resuspendiert. Dieser Schritt wurde zur Entfernung restlicher Medienbestandteile zweimal durchgeführt. Die Probe wurde bis zum weiteren Bearbeiten auf Eis gelagert.

Feste Nährmedien hingegen eignen sich zur Differenzierung der Keime und Prüfung auf Reinheit. Durch Ausstrich im Dreiösenprinzip werden Einzelkolonien gewonnen, also Kolonien, die aus einem einzelnen Bakterium entstanden sind. Durch Beurteilung der Koloniemorphologien können Proben auf Kontamination mit anderen Keimen geprüft werden. Blutagar-, MacConkey und LB-Agarplatten wurden im Dreiösenausstrich mit einer kleinen Menge Material unter Verwendung einer abgeflamten Impföse beimpft. Die

Inkubation erfolgte für 48 h im Brutschrank bei 37 °C, das Wachstum wurde nach 24 h und 48 h bewertet.

### **1.2 Lagerung**

Zur Langzeitkonservierung von Bakterien muss der bakterielle Stoffwechsel und die Zellteilung zum Erliegen gebracht werden. Dies wird durch eine Tiefkühlung bei -80 °C unter Zugabe des Frostschutzmittels Glycerin erreicht. Eine Übernachtskultur wurde nach Ausschluss von Kontamination abzentrifugiert (2.500 rpm, 10 min, 4 °C) und in 25 % sterilem Glycerin aliquotiert, kurz geschüttelt und bei -80 °C eingefroren. Bei Bedarf wurden aus diesen Rückstellproben neue Kulturen angezchtet.

### **1.3 Hitzeinaktivierung der Bakterien**

Bakterien wurden hitzeinaktiviert, um im ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (siehe C 4.1) und Immunoblot (siehe C 4.3) als Antigene zur Detektion spezifischer Antikörper gegen bakterielle Strukturen eingesetzt zu werden. Hierzu wurde vom jeweiligen Bakterium eine 50 ml Flüssigkultur im LB-Medium angerichtet und über Nacht unter konstantem Schütteln bei 37 °C bebrütet. Die bewachsenen Kulturen wurden abzentrifugiert (2.500 rpm, 10 min, 4 °C), gewaschen und in 0,5 ml sterilem PBS resuspendiert. Nachdem die Bakterienlösung für 10 min bei 100 °C im Heizblock gekocht wurde, erfolgte ein gründliches Durchmischen mittels Vortexer. Eine kleine Menge der gekochten Lösung wurde zur Kontrolle der vollständigen Inaktivierung auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und bei 37 °C bebrütet. Wuchsen keine Keime auf der Platte, konnte von einer vollständigen Inaktivierung ausgegangen werden. Die Bakterienlysate wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Durch die Tiefkühlung wurde ein Abbau der

bakteriellen Proteine durch eventuell enthaltene nicht inaktivierte Proteasen verhindert.

### **C 2. Produktion der OMV-basierten Vakzine**

#### **2.1 Vesikelgewinnung durch Ultrazentrifugation**

OMV schnüren sich während des bakteriellen Wachstums spontan ab. Um diese Vesikel als Impfstoff einzusetzen, müssen sie zunächst von den Bakterien separiert werden. Bakterienkulturen wurden in flüssigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator bebrütet. Bakterien und andere Bestandteile wurden in zwei Schritten aus dem Medium entfernt. Zunächst wurde die Kultur abzentrifugiert (5.000 g, 20 min, 4 °C), anschließend wurde der Überstand mittels Vakuumpumpe steril filtriert (Porengröße 0,45 µm). Der Zentrifugationsschritt ist nötig, um ein schnelles Zusetzen der Filtermembran zu verhindern. Zur Isolation der Vesikel wurde das nun bakterienfreie Medium bei 150.000 g bei 4 °C für 3 h ultrazentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes waren die Vesikel am Boden des Gefäßes als weißes Pellet sichtbar. Der Rückstand wurde in 0,5 ml steril-filtriertem PBS resuspendiert. Zur Anreicherung von Vesikeln wurden die Rückstände mehrerer Gefäße in derselben Flüssigkeit gelöst. Bakterielle Kontamination wurde durch Ausstrich einer kleinen Menge der gewonnenen Vesikel auf einem Festmedium ausgeschlossen. Kontaminationsfreie Vesikel wurden im Falle einer zügigen Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert. Eine Langzeitkonservierung bei -80 °C erfolgte nur für Analysen, die zur Zerstörung der OMV führen würden, z.B. Proteinbestimmungen.

### **2.2 Quantifikation der OMV**

Eine zuverlässige Quantifikation des Impfprodukts ist ein wichtiger Bestandteil der Qualitätskontrolle im Rahmen der Impfstoffentwicklung. In dieser Arbeit kam eine OMV-basierte Impfung zum Einsatz. Die OMV wurden durch ein in der Arbeitsgruppe entwickeltes Verfahren quantifiziert im Rahmen der Arbeit von Annabell Windisch und Michael Pritsch in der Arbeitsgruppe Wieser (Wieser et al. 2014). Die Vesikelkonzentration wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

## **C 3. Tierexperimentelle Methoden**

### **3.1 Haltung der Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden weibliche BALB/c Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen mit einem Gewicht von etwa 20 g eingesetzt. Zur Abschirmung von Erregern wurden die Labormäuse unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF = specific pathogen free) gehalten und mit sterilem Zuchtfutter sowie Trinkwasser versorgt. Beides war *ad libitum* verfügbar. Die Tiere wurden in Gruppen mit einer maximalen Anzahl von fünf Mäusen tierschutzkonform gehalten.

### **3.2 Intranasale Immunisierung**

Vor der intranasalen Vakzinierung wurden die Labormäuse mit dem gut verträglichen und nicht schleimhautreizenden Inhalationsnarkotikum Isofluran anästhesiert. Die Impflösung wurde unmittelbar vor der Immunisierung in PBS angerichtet und kurz geschüttelt. Anschließend wurden 5 µl der wässrigen Impflösung mit Hilfe von 20 µl Eppendorf GE-Loader Pipettenspitzen in jedes Nasenloch appliziert.

### **3.3 Gewinnung der Mausseren**

Bei der lebenden Maus lassen sich kleine Mengen an Blut durch Punktion der Schwanzvene entnehmen. Zunächst wurde die Maus in einer Kunststoffbox so fixiert, dass der Schwanz aus der Einheit hinausragte. Die Schwanzvene wurde durch eine Wärmelampe dilatiert und mit einer Hohlneedle punktiert. Zur venösen Blutentnahme kamen 23 G Kanülen zum Einsatz, deren Kunststoffansatz abgebrochen wurde, um den Totraum für Mausblut zu verringern. Das Blut wurde in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen und für 30 min aufrechtstehend gelagert. Nach abgelaufener Blutgerinnung wurden die festen Blutbestandteile durch Abzentrifugieren (13.000 rpm, 5 min, 4 °C) entfernt. Zur Langzeitkonservierung wurde das Mausserum bei -80 °C eingefroren.

### **3.4 Töten der Versuchstiere**

Die Versuchstiere wurden nach Ende der Versuche mittels CO<sub>2</sub> fachgerecht und tierschutzkonform getötet. Bei Mäusen tritt nach dem Einatmen des in die Käfige geleiteten CO<sub>2</sub> nach wenigen Sekunden eine schmerzlose Bewusstlosigkeit ein, welche bis zum Eintritt des Todes anhält.

### **3.5 Finale Blutentnahme**

Durch die Punktion der murinen *Vena cava caudalis* konnte eine große Menge an Blut für die weiteren Untersuchungen gewonnen werden. Nach Eintritt des Todes wurde die Bauchhöhle der Maus eröffnet und die *Vena cava caudalis* mit einer 23 G Hohlneedle punktiert. Das Blut wurde durch eine aufgesetzte 1 ml Spritze abgezogen. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie oben beschrieben (siehe C 3.3).

## **C 4. Proteinmethoden**

### **4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

In dieser Arbeit wurde die Effektivität der Impfung durch Evaluation der humoralen Immunantwort untersucht. Durch Quantifikation der eingesetzten Proteine wurden die Ergebnisse der unterschiedlichen Tests vergleichbar. Nach Fällung mittels Trichloressigsäure (TCA) wurde die Proteinkonzentration durch den Bradford-Assay determiniert.

#### **4.1.1 Fällung der Proteine**

Vor Messung der Konzentration der Proteine mittels Bradford-Assay wurden die Proben durch Präzipitation mit TCA von anderen Bestandteilen gereinigt. Zunächst wurde ein Bakterienlysat wie bereits beschrieben hergestellt oder aus aliquotiertem Material auf Eis schonend aufgetaut (siehe C 1.3). 175 µl Probe wurden mit 18 µl 100%iger TCA vermischt und 30 min bei 4 °C inkubiert. In wässriger Lösung befindliche Proteine bilden mit ihren geladenen Seitenketten Wasserstoffbrückenbindungen mit den Wassermolekülen. Das Hinzufügen der TCA entzieht den Proteinen diese Wassermoleküle. Dadurch erniedrigt sich die Löslichkeit der Proteine und sie fallen aus. In einem nächsten Schritt wurden sie durch Abzentrifugation (12.000 rpm, 15 min, 4 °C) von der Lösung getrennt. Nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet in 300 µl Aceton rückgelöst, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt (12.000 rpm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, letzte Acetonreste verdunsteten während einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur unter einer Abzugshaube. Der gefällte Proteinrückstand wurde in 175 µl Harnstofflösung resuspendiert. Das Pellet wurde zur vollständigen Rücklösung unter konstantem Schütteln im Heizblock

inkubiert (900 rpm, 5 min, 45 °C) und bei Bedarf mittels Branson Sonifier 250 homogenisiert.

### **4.1.2 Quantifikation der Proteine mittels Bradford-Test**

Nach Aufreinigung der Proben durch TCA-Fällung wurde die Proteinkonzentration mit dem Bradford-Test bestimmt. Dieser Test macht sich zunutze, dass eine Bindung des Coomassie-Brilliant-Blau Farbstoffs an ein Protein das Absorptionsmaximum von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm (mit Protein) verschiebt. Ungebundener Farbstoff ist bräunlich, proteingebundener Farbstoff hingegen blau. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist photometrisch messbar. Zunächst wird eine Eichgerade durch Messung der Absorptionen einer standardisierten Verdünnungsreihe eines Referenzproteins erstellt. Durch dieses Eichdiagramm kann bei Messung der Absorption einer unbekanntem Proteinprobe auf dessen Konzentration rückgeschlossen werden. Der Bradford-Assay wurde nach Angaben des Herstellers mittels Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit durchgeführt. Zunächst wurde zur Bestimmung der Eichgeraden eine Verdünnungsreihe des Proteins BSA in PBS angerichtet, von einer Ausgangskonzentration von 4 mg/ml bis zur Endkonzentration von 0,25 mg/ml. Diese Verdünnungsreihe wurde ebenfalls mittels TCA ausgefällt (siehe C 4.1.1), um eine Vergleichbarkeit mit der Probe zu erreichen und eventuelle Proteinverluste während der TCA-Präzipitation zu berücksichtigen. Vor der Anwendung wurde das Coomassie Plus Reagenz geschüttelt, da während der Lagerung Aggregate aus Farbstoff entstehen können. 50 µl der Standardreihe oder der unbekanntem Proteinprobe wurden mit 1.500 µl Coomassie Plus Reagenz vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der BSA Standardreihe und der unbekanntem Proteinproben mittels des Spektralphotometers Nanodrop 2000 gemessen. An Hand der Eichgerade wurde die Konzentration der Proteinproben ermittelt. Als Leerwert

diente der Probenpuffer PBS. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Falls nötig wurden die Lösungen so verdünnt, dass die Messung im linearen Bereich der Eichgerade lag. Entsprechend der Verdünnung wurde der Wert in die Ausgangskonzentration rückgerechnet.

### 4.2 ELISA

Der ELISA ist ein quantitativer Immunoassay hoher Sensitivität, der zur Konzentrationsbestimmung von Stoffen eingesetzt wird. In dieser Arbeit wurden hiermit antigenspezifische Antikörper in Maus- und Patientenseren nachgewiesen. Das Grundprinzip des Tests besteht in der Antigen-Antikörper-Reaktion. In Abbildung C 4.2 sind die wichtigsten Schritte dargestellt. Zunächst wird das Antigen in konstanter Konzentration adsorbtiv an eine feste Platte gebunden. Hierzu wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Maxisorp F96 flat bottom plate, Sigma-Aldrich, Wiesbaden) mit 100 µl hitzeinaktivierten Bakterien oder 100 µl OMV des jeweiligen Bakterienstamms beschichtet. Die Proben wurden in Blockierungspuffer gelöst zu einer Proteinendkonzentration von 20 µg/ml. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Das Antigengemisch wurde durch Abklopfen von der Platte entfernt. Nach zweimaligem Waschen wurden unspezifische Bindestellen mittels 200 µl Blockierungspuffer für 1 h bei 37 °C abgesättigt. Dieser Vorgang verhindert die unspezifische Bindung von Antikörpern und verringert somit die Hintergrundaktivität. Anschließend wurden die Serumproben zum Antigen hinzugegeben (siehe Abbildung C 4.2, Schritt 1). Der im Serum enthaltene Antikörper (erster Antikörper) bindet mit seinem Paratop spezifisch das Epitop am Antigen. Dieser erste Antikörper ist die Messgröße des Versuchs. Serumproben wurden seriell in Blockierungspuffer verdünnt beginnend bei 1:100. Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen. 100 µl verdünntes Serum wurde für 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zum Entfernen nicht gebundener Antikörper erfolgten vier Waschschrte mit 300 µl



## C Methoden

Waschpuffer. Zum Nachweis dieses ersten Antikörpers wird in einem weiteren Schritt ein zweiter Antikörper gekoppelt an ein Enzym zum Ansatz hinzugegeben (siehe Abbildung C 4.2, Schritt 2). Antigenspezifische IgG und IgM wurden durch Zugabe von 100 µl Anti-Maus bzw. Anti-Human IgG und IgM (zweiter Antikörper) gekoppelt an das Enzym Meerrettichperoxidase verdünnt 1:1.000 in Blockierungspuffer gebunden. Nach Zugabe der zweiten Antikörper wurden die Platten für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend viermal gewaschen. Darauf wurden 100 µl des o-Phenylendiaminsubstrats gelöst in Substratpuffer für 40 min bei Raumtemperatur unter lichtgeschützten Bedingungen belassen (siehe Abbildung C 4.2, Schritt 3). Nach Zugabe des Substrates kommt es zu einer Enzymreaktion, bei der das farblose Substrat von der Meerrettichperoxidase (HRP von engl. *horseradish peroxidase*) in ein blaues Produkt überführt wird (siehe Abbildung C 4.2, Schritt 4). Dieses Produkt wurde im letzten Schritt durch Messung der Absorption bei 492 nm im Mikroplattenleser photometrisch bestimmt. Die Menge an gebildetem Produkt ist hierbei direkt proportional zur Menge an vorhandenem erstem Antikörper.

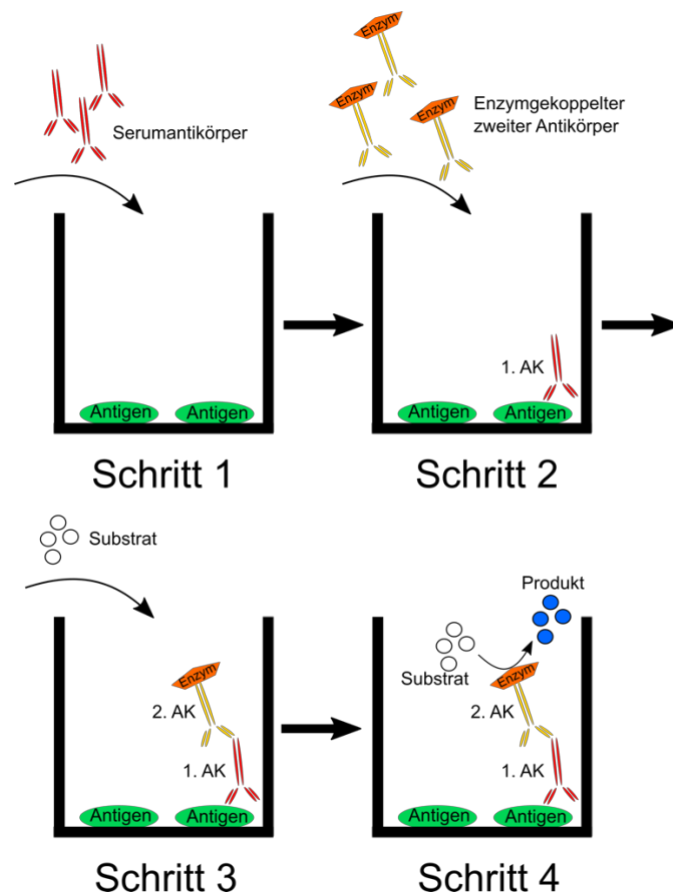


Abb. C 4.2 ELISA zum Nachweis antigenspezifischer Antikörper im Serum von Maus und Patient. AK = Antikörper. Eigene Darstellung.

### 4.3 Western Blot

Der Western Blot erkennt spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen (Towbin et al. 1979, Gershoni und Palade 1982). Er wird daher auch Immunoblot genannt. Zum einen können Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Zum anderen können, wie in vorliegender Arbeit, in Seren enthaltene Antikörper gegen bekannte Proteine nachgewiesen werden. Der Western Blot besteht aus mehreren Schritten (siehe Abbildung D 4.3). Nach Vorbereiten der Proteinproben werden diese mittels SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Geleelektrophorese) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran

übertragen. Dieser Vorgang wird auch als Blot bezeichnet. Schließlich erfolgt der Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion.

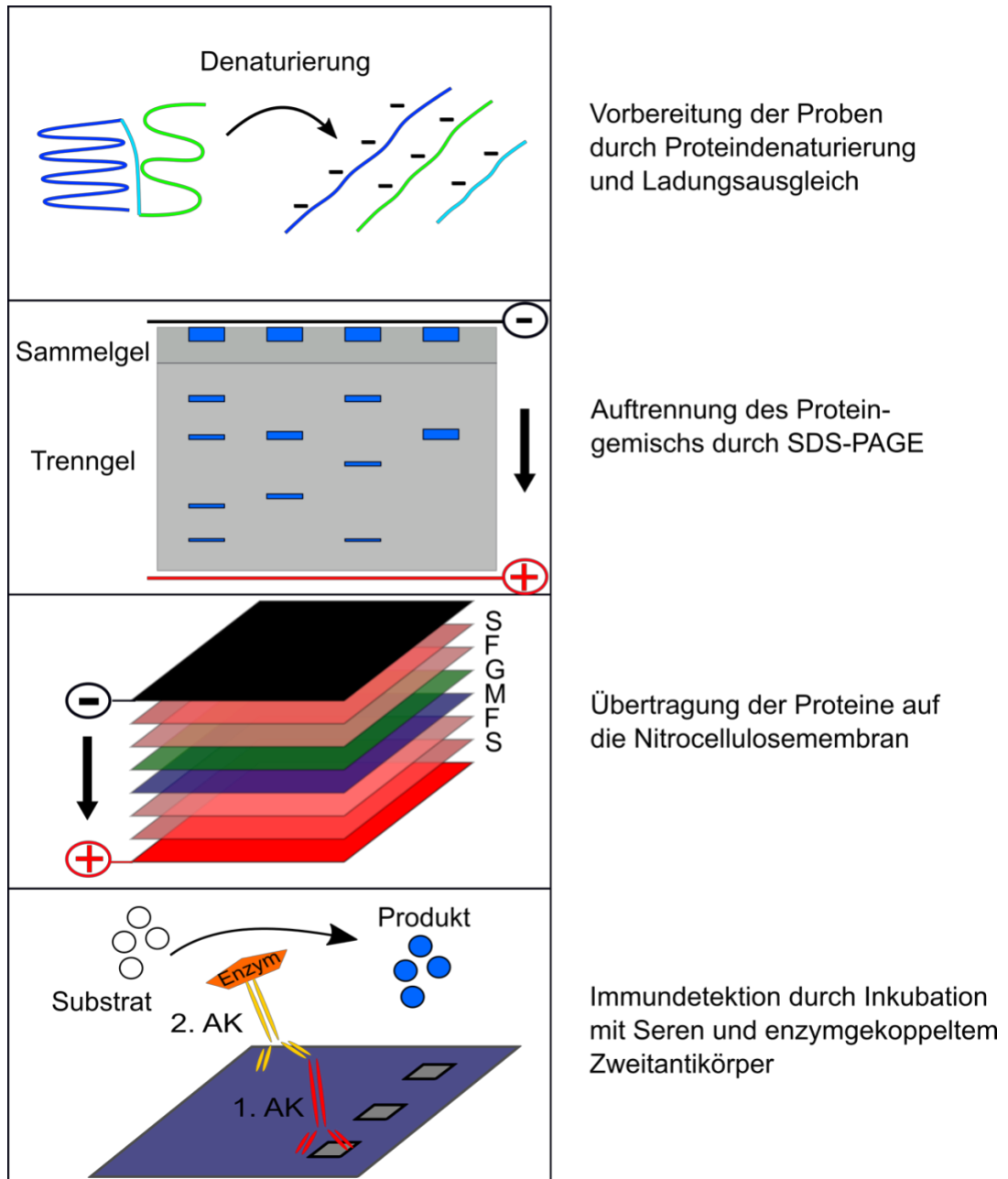


Abb. C 4.3 Western Blot. Nach Vorbereitung der Proben (siehe C 4.3.1) erfolgt eine Auftrennung des Proteingemischs im SDS-PAGE (siehe C 4.3.2). Die Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran (siehe C 4.3.4) erlaubt die Immundetektion der Serumantikörper im letzten Schritt (siehe C 4.3.6). AK = Antikörper, F = Filterpapier, G = Gel, M = Nitrocellulosemembran, S = Schaumstoffschwamm. Eigene Darstellung.

### **4.3.1 Vorbereitung der Proben**

Die Vorbereitung der Proben ist unabdingbar für eine erfolgreiche Separierung des Proteingemischs in der Gelelektrophorese. Der SDS-PAGE trennt die Proteine ausschließlich nach ihrer molekularen Masse. Voraussetzung hierfür ist, dass die Proteinstruktur denaturiert wird. Proteine bilden komplexe dreidimensionale Gebilde, die in mehreren Strukturebenen hierarchisch gegliedert sind. Die unterste Ebene ist hierbei die Primärstruktur. Sie bezeichnet die Aneinanderreihung von Aminosäuren zu Peptidketten. Aneinanderheftungen von Peptidbindungen über Wasserstoffbrücken bilden die Sekundärstruktur - mit der  $\alpha$ -Helix oder dem  $\beta$ -Faltblatt als häufigen Formen. Mehrere Sekundärstrukturelemente ordnen sich im Raum zur Tertiärstruktur an. Letztere kann wiederum als Untereinheit in einer Quartärstruktur organisiert sein. Die Tertiär- und Quartärstruktur eines Proteins sind vor allem über hydrophobe Wechselwirkungen und Disulfidbrücken stabilisiert. Zur Denaturierung wurden die Bakterienlysate oder OMV in Probenpuffer gelöst und 10 min bei 97 °C gekocht. Das  $\beta$ -Mercaptoethanol im Probenpuffer reduziert die Disulfidbrückenbindungen, wohingegen das Detergenz SDS die hydrophoben Wechselwirkungen löst. Darüber hinaus lagert sich das negativ geladene SDS an die Eiweiße und sorgt für eine gleichmäßig negative Ladung aller Proteine proportional zu ihrer Masse. Insgesamt können so im nächsten Schritt die Proteine nur noch auf Grund ihrer unterschiedlichen molekularen Masse, nicht auf Grund unterschiedlicher Ladung oder Proteinkonformation, aufgetrennt werden.

### **4.3.2 Diskontinuierlicher SDS-PAGE**

Der SDS-PAGE trennt Proteine beim Durchlaufen einer Gelmatrix im elektrischen Feld an ihrer molekularen Masse (Laemmli 1970). Bei der diskontinuierlichen Variante erhöht der Einsatz eines Sammel- und eines Trenngels die Auflösung des Verfahrens. Im Sammelgel vereinigen sich die

## C Methoden

Proteine, um dann gleichzeitig ins Trenngel zu laufen (siehe Abbildung D 4.3). Nach Aufbau der Gelgießeinheit wurde diese zunächst durch das Einfüllen von Wasser auf Dichtigkeit überprüft. Das Trenngel wurde angemischt. Die Chemikalien APS und TEMED wurden als letztes zum Gemisch hinzugefügt, da diese die Polymerisation katalysieren. Die Gießeinheit wurde mit Trenngel bis auf 2 cm des oberen Rands befüllt. Während der 30-minütigen Polymerisation wurde das Trenngel mit 20%igem Ethanol überschichtet, um einen geraden Abschluss des Gels zu gewährleisten. Über das ausgehärtete Trenngel wurde das Sammelgel gegossen. Ein Kamm wurde eingesetzt, um Probetaschen zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Gele sofort weiterverarbeitet oder konnten für mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden. Die Gele wurden in eine mit Lauffuffer befüllte Elektrophoresekammer gestellt. Die aufbereiteten Proben (siehe 4.2.1) wurden nach dem Kochen auf Eis gestellt und anschließend in die Probetaschen pipettiert. Der Größenstandard, eine bereits vorgefärbte Proteinleiter (PageRuler Prestained Protein Ladder), wurde ebenfalls aufgetragen. Diese dient zum einen einer Abschätzung der Größe der Proteine. Zum anderen kann die Auftrennung während der Gelelektrophorese und der darauffolgende Transfer kontrolliert werden. Daraufhin wurde die Elektrophorese durch Anlage von 200 V gestartet und bis zum vollständigen Durchlaufen der Proteine (30 min bis 45 min) durchgeführt. Gasblasenbildung bestätigte die korrekte Anlage der Spannung. Die Wanderung der Proteine durch das Gel konnte durch Bromphenolblau im Probenpuffer sichtbar gemacht werden. Die denaturierten, proportional zu ihrer Molekülmasse negativ geladenen Proteine wandern zur Anode. Kleine Proteine wandern schneller durch die engen Poren der dreidimensionalen Gelmatrix als große Proteine. Dadurch kommt es zur Auftrennung dieser und Bildung charakteristischer Banden. Die Gele wurden nun auf zwei unterschiedliche Arten weiterarbeitet. Zur Visualisierung aller aufgetrennten Proteine wurden

die Gele mittels Coomassie-Blau gefärbt (siehe C 4.3.3). Zur Immundetektion von Serumantikörpern wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (siehe C 4.3.4) und mit den Seren inkubiert (siehe C 4.3.6).

### **4.3.3 Coomassie-Färbung**

Coomassie-Brilliant-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der Proteine bindet. Nach Anfärbung mit Coomassie-Blau unterscheiden sich gleiche Mengen verschiedener Proteine nur wenig in ihrer Farbintensität. Diese geringe Variabilität macht das Verfahren besonders valide. Daher ist die Coomassie-Färbung ein Standard-Verfahren der Proteinchemie. Einschränkend ist anzumerken, dass die untere Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung bei ca. 100 ng Protein pro Bande liegt im Vergleich zu sensitiveren, jedoch auch aufwendigeren Silberfärbungen (Winkler et al. 2007).

Die Gele wurden für 30 min unter Schwenken in Coomassie-Blau Färbelösung gefärbt. Proteine oberhalb der Nachweisgrenze wurden als blaue Banden sichtbar.

### **4.3.4 Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran**

Antikörper können keine im Gel liegenden Proteine binden. Um die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen, müssen die aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Es kam das nasse Transferverfahren zum Einsatz. Zunächst wurde das Sammelgel vorsichtig vom Trenngel entfernt. Anschließend wurden Filterpapiere, die Nitrocellulosemembran, Schaumstoffschwämme und das verbleibende Gel in Transferpuffer getränkt. Das Gel und die Membran wurden zwischen Whatman-Filterpapieren und Schaumstoffschwämmen luftblasenfrei übereinandergeschichtet und mit einem Kunststoffgitter fest verriegelt. Für eine fehlerfreie Übertragung durften keine Luftblasen zwischen den Schichten

liegen. Danach wurde das Gitter senkrecht in eine mit gekühltem Transferpuffer gefüllte Kammer eingehängt und die Proteine durch Anlage einer Spannung von 90 V für 1 h vom Gel auf die Membran transferiert. Die negativ geladenen Proteine wandern zur Anode und binden auf der Nitrocellulosemembran.

### **4.3.5 Ponceau Färbung**

Ponceau-S ist ein roter Farbstoff, der reversibel an Eiweiße bindet, schnell wieder zu entfernen ist und die weiteren Reaktionen nicht beeinflusst. Um den vollständigen Proteintransfer nachzuweisen, wurde die Nitrocellulosemembran durch Einlegen in Ponceau-Lösung gefärbt. Vor der weiteren Bearbeitung erfolgte eine Entfärbung durch destilliertes Wasser über mehrere Minuten.

### **4.3.6 Immundetektion**

Im letzten Schritt wurden die Serumantikörper gegen die Proteine der Bakterienlysate oder OMV sichtbar gemacht. Um mehrere Seren zu testen, wurde hierzu die Membran in vertikale Streifen zerschnitten und jeder Streifen in einer Einzelkammer weiterverarbeitet. Die folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurden unspezifische Bindestellen durch eine einstündige Inkubation mit Blockierungspuffer besetzt. Anschließend wurden die Seren 1:1.000 in Blockierungspuffer verdünnt. 150 µl des verdünnten Serums wurde auf die Nitrocellulosestreifen aufgetragen und 2 h belassen. Durch dreimaliges zehnmütiges Waschen (PBS mit 0,1 % Tween Detergenz) mittels eines Wippschüttlers konnten nichtgebundene Antikörper entfernt werden. Als Nächstes wurden die nachzuweisenden Serumantikörper durch einen enzymgekoppelten Sekundärantikörper gebunden. Der 1:1.000 verdünnte HRP-konjugierte Anti-IgG-Antikörper wurde für 2 h inkubiert, gefolgt von drei Waschschritten. Zur

Detektion der gebundenen Antikörper wurde das Chemolumineszenzsubstrat eingesetzt. Gemäß Herstellerangaben wurde das Substrat gemischt und zu den Membranstreifen zugesetzt. Das an den zweiten Antikörper konjugierte Enzym HRP wandelt das Substrat in ein lumineszierendes Produkt um. Das Signal wurde mit der Dokumentationseinheit ChemiDoc™ bei konstanter Belichtungszeit festgehalten.

### **C 5. Immunfluoreszenzmikroskopie**

Die Immunfluoreszenzmikroskopie kam zum Einsatz, um die Lokalisation der von den Serumantikörpern gebundenen bakteriellen Antigene qualitativ zu detektieren. Zunächst wurde vom jeweiligen Bakterium eine 20 ml Flüssigkultur im LB-Medium angesetzt und über Nacht unter konstantem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die bakteriellen Kulturen wurden in 40 ml Falcon™ Röhren übergeführt, abzentrifugiert (2.500 rpm, 10 min, 4 °C) und dreimal in sterilem PBS gewaschen. Um eine standardisierte Bakteriendichte für die Mikroskopie einzusetzen, wurde die optische Dichte bei 600 nm mittels Photometer kontrolliert. Nach Rücklösung in 20 ml sterilem PBS wurde die Bakterienlösung auf Eis gelagert. Die Reaktionsfelder von Objektträgern (Medco, München) wurden mit 3 µl der Bakteriensuspension beschichtet, luftgetrocknet und durch Eintauchen in ein Becken mit 3,7 % Formaldehyd unter dem Abzug für 10 min fixiert. Das Fixationsmittel Formaldehyd erfüllt hierbei mehrere Aufgaben. Zum einen werden die Bakterien durch Quervernetzung ihrer Proteine inaktiviert und können sich so nicht weiter vermehren. Dieser Effekt ist wenig denaturierend, da die Sekundärstruktur der Proteine und somit die Antigeneigenschaften größtenteils erhalten bleiben. Zum anderen haften die Keime fest auf der Glasfläche des Objektträgers und werden bei weiterer Bearbeitung nicht weggespült. Nach einmaligem Waschen wurden durch ein Bad in Blockierungspuffer unspezifische Antigenbindestellen abgesättigt, gefolgt von einem erneuten Waschvorgang.



## C Methoden

Die im Waschpuffer enthaltenen Salze wurden jeweils durch kurzes Eintauchen in destilliertes Wasser entfernt. 3 µl des 1:200 in Blockierungspuffer verdünnten Serums wurde auf die Reaktionsfelder aufgetragen und für 2 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C belassen. Alle Seren und die entsprechenden Kontrollen wurden in Triplikaten bestimmt. Um das Austrocknen des Präparates zu verhindern, fand die Inkubation in einer eigens dafür hergestellten feuchten Kammer statt. Zum Entfernen nicht gebundener Antikörper wurden die Objektträger fünfmal gewaschen. Der gebundene erste Antikörper wurde mittels eines Fluorochrom-gelabelten zweiten Antikörpers sichtbar gemacht. 3 µl FITC-markiertes Anti-Maus IgG bzw. Anti-Human IgG wurde in einer Verdünnung von 1:100 in Blockierungspuffer 1 h bei 37 °C in der Feuchtkammer unter lichtgeschützten Bedingungen inkubiert. Zur Konservierung wurde das Präparat in Mowiol/DABCO Einbettmedium eingedeckt und ein Deckglas aufgesetzt. Das Antibleichmittel DABCO wirkt dem Farbverlust des Fluoreszenzmarkers entgegen. Der Objektträger wurde bei 4 °C für 30 min lichtgeschützt ausgehärtet. Die Visualisierung des an die Antigen-Antikörper-Komplexe gebundenen zweiten Fluorochrom-markierten Antikörpers erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop unter standardisierten Einstellungen. Fluorochrome absorbieren und emittieren Licht bestimmter Wellenlänge. Das eingesetzte FITC-Molekül wird bei 485 nm angeregt, sein Emissionsmaximum liegt bei 520 nm. Der in der gewünschten Position eingespannte Objektträger wurde mit Immersionsöl betropft. Die Beurteilung und Dokumentation der unterschiedlichen Reaktionsfelder erfolgte mittels eines an eine Kamera angeschlossenen Fluoreszenzmikroskops (Belichtungszeit 177 ms). Der Maßstab wurde aus der Mikroskop-Vergrößerung und mit Hilfe eines Messokulars erstellt. Es wurden hellfeld- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt, sowie Überlagerungen von beiden Modalitäten.

## **C 6. Quantitativer Fluoreszenzassay**

Im ELISA, Western Blot und in der Immunofluoreszenzmikroskopie werden Serumantikörper auf unterschiedliche Art nachgewiesen. Im Rahmen dieser Tests kommt es zu verschiedenen Formen der Denaturierung der bakteriellen Antigene. Um zu prüfen, inwiefern vitale Bakterien durch die gebildeten Serumantikörper gebunden werden und das Fluoreszenzsignal zu quantifizieren, wurde der Fluoreszenzassay durchgeführt. Hierbei wurden die lebenden Bakterien zunächst mit den Seren konfrontiert. Anschließend wurden die in den Seren vorhandenen Antikörper mit Fluorochrom-konjugierten zweiten Antikörpern nachgewiesen. Zunächst wurden 20 ml einer LB-Flüssigkultur mit dem jeweiligen Bakterium beimpft und im Schüttelinkubator bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zwei Waschschritte wurden durchgeführt, bestehend jeweils aus einer Zentrifugation (2.500 rpm, 10 min, 4 °C) und Rücklösung des Pellets in 20 ml sterilem PBS. Die Keimzahl wurde mittels spektralphotometrischer Messung bei 600 nm überprüft. 50 µl der Bakterienlösung wurden in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert und bei 5.000 rpm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Letztere Einstellungen wurden für alle weiteren Läufe beibehalten. Das Pellet wurde in 100 µl des jeweiligen 1:100 verdünnten Serums rückgelöst und 2 h bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden nichtgebundene Antikörper durch Waschen mit 500 µl sterilem PBS entfernt, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation. Zum Nachweis der gebundenen antigenspezifischen IgG-Antikörper wurde der zweite Antikörper (Anti-Maus IgG FITC) 1:100 in Probenpuffer verdünnt und für 2 h bei 4 °C unter lichtgeschützten Bedingungen inkubiert. Dreimaliges Waschen eliminierte freie zweite Antikörper und konnte so unspezifische Hintergrundaktivität vermindern. Die Rücklösung des Pellets nach Abschluss der Waschvorgänge erfolgte in 60 µl Lösungspuffer. 50 µl der Probe wurde in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Microplate 96 well black, Berthold Technologies, Bad Wildbad) pipettiert.

Nach einer Anregung bei 485 nm konnte das emittierte Fluoreszenzsignal bei 520 nm mit standardisierten Einstellungen gemessen werden. Die Belichtungszeit betrug 50 ms.

### **C 7. Histopathologie der Nasenschleimhaut**

Ein idealer Impfstoff bietet effektiven Schutz bei geringen Nebenwirkungen. Um eine mögliche lokale Toxizität der Impfung zu evaluieren, wurde das Nasenschleimhautepithel von intranasal geimpften Mäusen histopathologisch untersucht. Die Aufarbeitung des Materials wurde freundlicherweise vom Pathologischen Institut der Ludwigs-Maximilians-Universität durchgeführt. Die entnommenen Mausschädel wurden über Nacht bei Raumtemperatur in 4 % Formaldehyd fixiert, gefolgt von 30-minütigem Spülen. Anschließend wurden die Proben mit einer EDTA-Lösung bei 45 °C für mindestens 24 h entkalkt. Durch diesen Vorgang wird auch der knöcherne Teil der Nase schneidbar. Nach erneutem Spülen wurden die Mausnasen durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. Diese Entwässerung ist Voraussetzung für die darauffolgende Einbettung im hydrophoben Paraffin. Die in Paraffin eingebetteten Organe wurden in 2 µm Scheiben geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit einem Leitz Dialux 20 EB-Mikroskop durch einen verblindeten Pathologen, die Aufnahme der Bilder mit einer Leica DMD108.

### **C 8. Statistische Auswertung**

Alle statistischen Analysen wurden mit Graph Pad Prism 6 durchgeführt. Bei der Durchführung des ELISA wurden alle Seren mindestens in Triplikaten (Anzahl (n. von lateinisch *numerus*)  $\geq 3$ ) gemessen. Um Seren, die auf unterschiedlichen Platten bearbeitet wurden, vergleichbar zu machen, wurde vom arithmetischen Mittelwert (MW) der Triplikate stets der arithmetische

## C Methoden

Mittelwert der Leerwerte, addiert um zehn Standardabweichungen (SD von engl. *standard deviation*), abgezogen. Bei der Signifikanzanalyse kam der Student's t-Test für abhängige Stichproben zum Einsatz. Bei unabhängigen Stichproben wurden die Daten mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Im Fluoreszenzassay wurden die Seren und Kontrollgruppen mindestens dreifach bestimmt. Vom Mittelwert der Seren wurde der Mittelwert der Leerwerte abgezogen. Abhängige Stichproben wurden mittels Student's t-Test untersucht, unabhängige Stichproben mittels Mann-Whitney-U-Test. In der vorliegenden Arbeit wurden gemessene Wahrscheinlichkeiten eines Fehlers der 1. Art mit Irrtumswahrscheinlichkeit Alpha von weniger als 5 % als signifikant definiert ( $p < 0,05$ ).

## **D Ergebnisse**

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin, die Immunogenität der Vakzinierung mit bakteriellen OMV von GNB im Mausmodell zu untersuchen und mit der Immunantwort beim Menschen nach Infektion zu vergleichen. Im ersten Teil wurden Mäuse mit OMV dreier gram-negativer Bakterienisolate von Patienten und einem *E. coli* Referenzstamm intranasal vakziniert und die Immunreaktion im Mausmodell untersucht. Im zweiten Teil wurde die Immunantwort beim Menschen aus Seren der entsprechenden Patienten charakterisiert und verglichen. Zusätzlich wurde die Verträglichkeit einer OMV-gestützten Vakzinierung durch die histopathologische Untersuchung der Nasenschleimhaut intranasal geimpfter Mäuse evaluiert.

### **D 1. Intranasale Impfung der Mäuse**

#### **1.1 Charakterisierung der Proteinprofile der OMV**

Vor Einsatz der OMV als Impfstoff wurde ihr Proteinprofil charakterisiert und mit dem Profil der Bakterien, aus denen die Vesikel isoliert wurden, verglichen. Lysate der Patientenisolate und des Referenzstamms CFT bzw. die jeweiligen OMV wurden mittels SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol denaturiert (siehe C 4.3.1) und in der SDS-PAGE Gelelektrophorese an ihrer Molekularmasse getrennt (siehe C 4.3.2). Die Gele wurden durch Coomassie-Blau Farbstoff gefärbt.

Im direkten Vergleich der Proteinprofile der Bakterienlysate mit denen der OMV zeigt sich, dass deutlich mehr und unterschiedliche Proteine in den Ganzzelllysaten vorhanden sind. Darüber hinaus wird deutlich, dass nur bestimmte Proteine sowohl im Bakterienlysat, als auch in den OMV präsent sind. Bei Isolat A galt dies beispielsweise für Banden mit 35 kDa und 15 kDa. Für B ließen sich Proteine mit einem Molekulargewicht von 35 kDa und 70 kDa

## D Ergebnisse

identifizieren. Die Färbung der Bakterienlysate und OMV von C demonstrierte eine prominente Bande bei 35 kDa. Im Referenzstamm CFT waren deutlich mehr Proteine im Ganzzelllysate auch in den OMV auffindbar mit prominenten Banden bei 15 kDa, 25 kDa, 35 kDa und 40 kDa.

Im Folgenden wurden die OMV der unterschiedlichen Bakterien als Impfstoff im Mausmodell eingesetzt. So konnte überprüft werden, ob die OMV im Mausmodell *in vivo* immunogen sind und eine Immunantwort gegen die Bakterien induzieren.

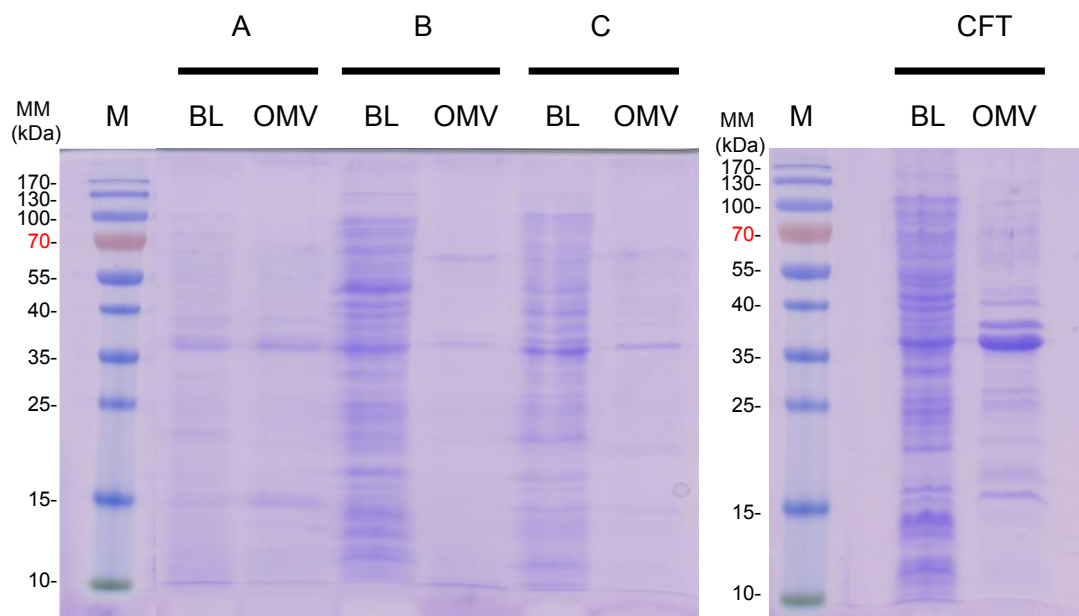


Abb. D 1.1 Coomassie-Färbung der mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine der Bakterien A, B, C und CFT bzw. den jeweiligen OMV. Als Marker zur Bestimmung der molekularen Masse kam eine vorgefärbte Proteinleiter zum Einsatz (PageRuler Prestained Protein Ladder). Die obere Angabe bezieht sich auf das jeweilige Bakterienisolat A, B, C und CFT. Die untere Angabe unterscheidet zwischen dem Bakterienlysate und den OMV des jeweiligen Isolats. BL = Bakterienlysate, M = Marker, MM = Molekülmasse.

### 1.2 Mausgruppen

Die Versuchsgruppe umfasste acht weibliche BALB/c Mäuse. Vier dieser Versuchstiere wurden mit OMV des jeweiligen Bakteriums geimpft, weitere

vier mit OMV adjuvantiert mit Cholera-toxin (CT) (Campos et al. 2003). Dementsprechend war pro Vakzine basierend auf den OMV des jeweiligen Bakteriums (Bakterium A, B, C und CFT) eine ohne Adjuvanz und eine mit Adjuvanz geimpfte Maus vorhanden. Die Kontrollgruppe bestand aus zwei scheinimmunisierten weiblichen Labormäusen der BALB/c Zuchtlinie. Eines dieser Tiere wurde intranasal mit Impfstoffpuffer (steriles PBS) allein vakziniert, ein weiteres mit Impfstoffpuffer und CT.

### **1.3 Impfstoffzusammensetzung**

OMV wurden mittels Ultrazentrifugation aus dem Kulturüberstand des jeweiligen Bakteriums (A, B, C oder CFT) isoliert und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Zur intranasalen Vakzinierung wurden 5 µl OMV-Lösung eingesetzt in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  OMV/µl. Die adjuvantierten Vakzine enthielten zusätzlich CT (0,5 µg/10 µl). Als Kontrollen wurde PBS allein eingesetzt oder PBS mit CT (0,5 µg/10 µl).

### **1.4 Impfung und Probengewinnung**

Zum Start der Versuchsreihe (Tag 0) wurde den Mäusen Blut über die Schwanzvene abgenommen. Dieses Präimmun-Serum diente als Kontrolle bei den weiteren Experimenten. Anschließend erfolgte am selben Tag die erste intranasale Impfung. 5 µl der Vakzinlösung wurden angerichtet und den Versuchstieren in jedes Nasenloch unter Isofluran Anästhesie appliziert. Die tierexperimentellen Methoden sind detailliert im Abschnitt C 3 beschrieben. Nach einer Woche (Tag 7) wurde den Mäusen wiederholt wie beschrieben Blut entnommen, um die Immunantwort sieben Tage nach der ersten Impfung zu untersuchen. Am selben Tag (Tag 7) erfolgte eine Booster-Immunisierung. Die finale Blutentnahme erfolgte nach zwei Wochen (Tag 14) über Punktion der

## D Ergebnisse

murinen *Vena cava caudalis*. Das Impfschema ist in Abbildung D 1.3 dargestellt.

Die Methode der Blutabnahme über die Schwanzvene wurde gewählt, da sie bei den Mäusen verglichen mit anderen Techniken wie der Schwanzamputation oder der retrobulbären Punktion geringen Stress und wenig Nebenwirkungen verursacht. Durch diese Methode konnten nur geringere Mengen Blut (ca. 20  $\mu$ l – 40  $\mu$ l) entnommen werden. Gleichzeitig sollten die Labormäuse nicht unnötig belastet werden durch das Ablassen größerer Blutvolumina, insbesondere in Betracht der kurzen Intervalle zwischen den Abnahmen. Insgesamt wurde aus diesen Gründen bei der Fluoreszenzmikroskopie und dem *in vivo* Lumineszenzassay auf eine Messung der Seren von Tag 7 verzichtet und ausschließlich mit den finalen Seren (Tag 14) gearbeitet. Die Präimmun-Seren (Tag 0) dienen als Kontrollen.

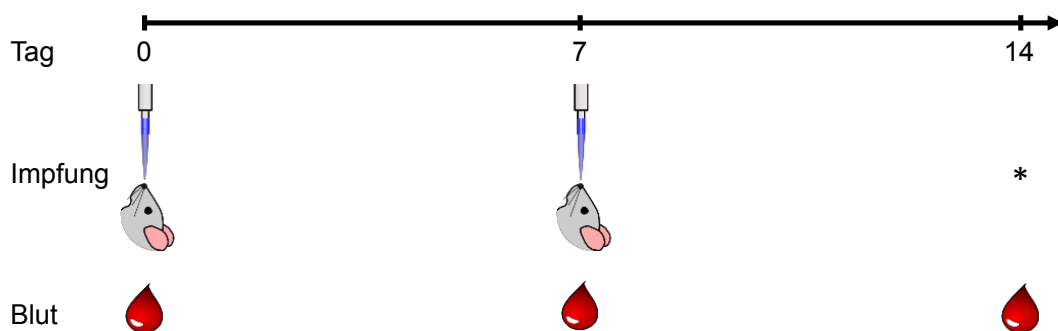


Abb. D 1.4 Impfschema. Blutentnahmen sind durch einen Blutstropfen gekennzeichnet, intranasale Immunisierungen durch einen Mauskopf während der Vakzinierung. Der Stern (\*) markiert die finale Blutentnahme nach Opfertötung des Versuchstiers.



## D 2. Untersuchung der Immunantwort im Mausmodell

### 2.1 ELISA

Die nach der intranasalen Impfung gebildeten bakterienspezifischen Serumantikörper wurden mittels ELISA bestimmt. Zunächst wurde das Testprotokoll validiert. Anschließend wurden die Seren der unterschiedlichen Mausgruppen gemessen.

#### 2.1.1 Optimierung der Inkubationszeit des Substrats

In Folgendem ist ein Kurzprotokoll des ELISA dargestellt. Das Protokoll zur Messung der Antikörper war aus Vorversuchen etabliert.

Tabelle D 2.1.1. ELISA Kurzprotokoll. AK = Antikörper, BP = Blockierungspuffer, HRP = horseradish peroxidase, RT = Raumtemperatur, WP = Waschpuffer.

Beschichtung	100 µl hitzeinaktivierte Bakterien 20 µg/ml in BP über Nacht bei 4 °C
Blockierung	200 µl BP für 1 h bei 37 °C
Serum/1. AK	100 µl Serum seriell in BP verdünnt für 1 h bei 37 °C
Waschen	Vier Waschschritte mit 300 µl WP
2. AK	100 µl Anti-Maus IgG/IgM HRP-konjugiert verdünnt 1:1.000 in BP für 1 h bei 37 °C
Waschen	Vier Waschschritte mit 300 µl WP
Substrat	100 µl o-Phenylendiaminsubstrat für 40 min bei RT
Messung	Mikroplattenleser bei 492 nm

Da bei den Experimenten in dieser Arbeit ein anderes Substrat zum Einsatz kam als bei Etablierung des Assays, wurde die Inkubationszeit des Substrats durch Aufzeichnung der kinetischen Kurve des Substratumsatzes bestimmt. Der ELISA wurde nach Protokoll durchgeführt. Probeweise wurden Seren in Triplikaten 1:1.000, 1:10.000 und 1:50.000 in Blockierungspuffer verdünnt. Nach Hinzugabe des 2. AK und des Substrats wurde der Substratumsatz durch das Enzym HRP in Intervallen von 5 min gemessen. Abbildung D 2.1.1 zeigt die kinetische Kurve des Substrats bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen des 1. AK. Nach Zugabe des Substrates stieg die optische Dichte durch Bildung des blauen Farbstoffs bei Verdünnung 1:1.000 an, bis

## D Ergebnisse

sie nach ca. 30 min ein Plateau erreichte. Bis zur Messung bei 20 min zeigte sich eine signifikante Änderung der Werte zum Vorwert. Bei den Verdünnungen 1:10.000 und 1:50.000 wurde dieses Plateau nach ca. 40 min erreicht. Die Änderungen zum Vorwert waren bis 40min (1:10.000) bzw. 25 min (1:50.000) signifikant. Eine 40-minütige Inkubationszeit wurde für die folgenden ELISA-Versuche gewählt.

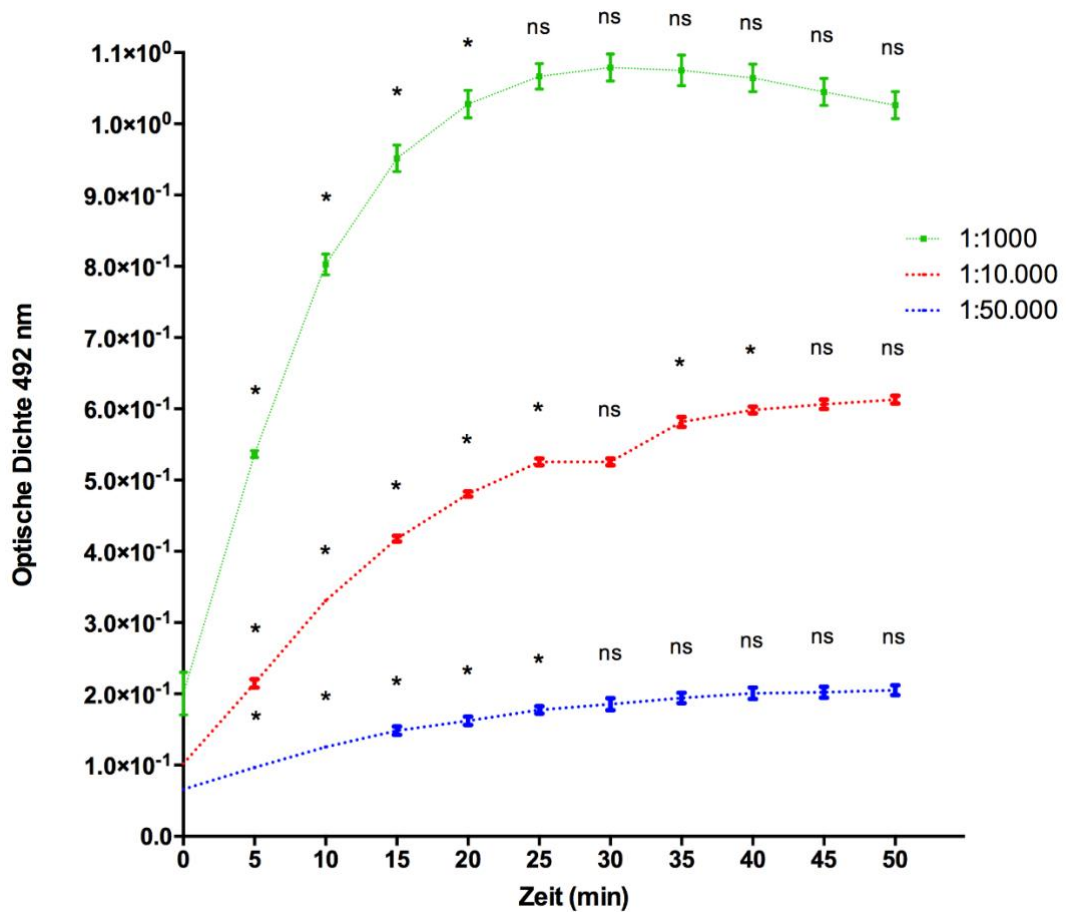


Abb. D 2.1.1 Kinetische Kurve des Substratumsatzes bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen des 1. AK (1:1.000, 1:10.000, 1:50.000) über die Zeit (0 – 40 min) gemessen als optische Dichte bei 492 nm (MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Die Signifikanz der Änderung zum Vorwert ist mit Zeichen über dem jeweiligen Wert angegeben. \* = signifikant,  $p < 0,05$ . ns = nicht signifikant,  $p \geq 0,05$ .

### 2.1.2 Evaluation der humoralen Immunantwort mittels ELISA

Die durch die Impfung induzierten bakterienspezifischen Antikörper wurden durch ELISA bestimmt. Die intranasale Vakzinierung fand an Tag 0 und 7 statt, die Antikörper wurden eine Woche nach der ersten Vakzinierung (Tag 7) bzw. eine Woche nach der zweiten Immunisierung (Tag 14) bestimmt. Die Menge an Antikörpern zu Beginn (Tag 0) diente als Kontrolle. Die Seren wurden seriell verdünnt beginnend bei 1:1.000. Die serielle Verdünnung konnte eine valide Messung sicherstellen, da die Beziehung zwischen Quantität an AK und optischer Dichte nur in bestimmten Bereichen linear verläuft und die Messung idealerweise in diesen Bereichen stattfindet. Exemplarisch verdeutlicht Abbildung D 2.1.2 den linearen Messbereich zwischen optischer Dichte und Verdünnung. Aus diesem linearen Bereich wurde die Verdünnungsstufe 1:1.000 gewählt, um die bakterienspezifischen Antikörper zu bestimmen und zwischen den einzelnen Gruppen zu vergleichen.

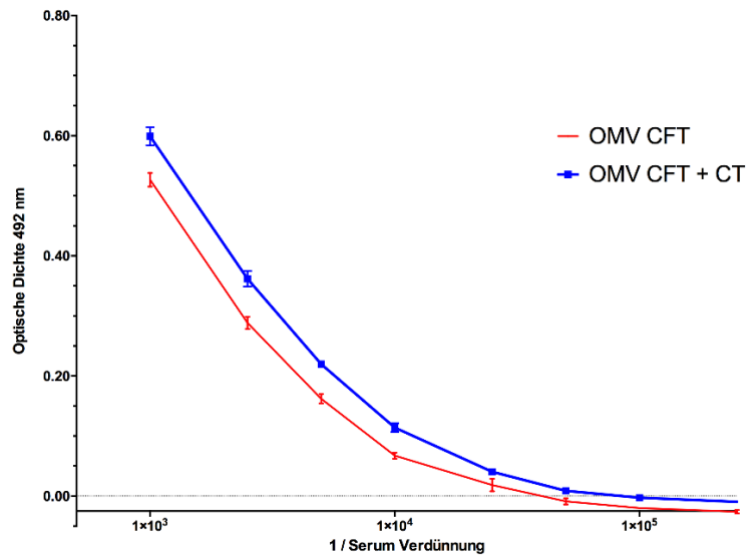


Abb. D 2.1.2 Bestimmung einer geeigneten Verdünnungsstufe der Mausseren für den Nachweis bakterienspezifischer Antikörper mittels ELISA. Reziproker Wert der Serienverdünnung von Seren gemessen als optische Dichte (OD) bei 492 nm (MW +/- SD, n = 3) beginnend bei einer Verdünnung von 1:1.000. Beispielfhaft sind die Seren der Mäuse eingesetzt, die mit OMV des Referenzstamms CFT ohne bzw. mit CT als Adjuvanz immunisiert wurden. Nur in einem bestimmten Bereich ist die Beziehung zwischen Verdünnung und OD linear. Aus diesem Bereich wurde die Verdünnungsstufe 1:1.000 für die weiteren Darstellungen ausgewählt.

**ELISA zum Nachweis von Antikörpern nach Impfung mit OMV A**

Die spezifischen IgG- und IgM-Antikörper von Tag 0, 7 und 14 nach Impfung mit OMV des Bakterienstammes A (OMV A) ohne und mit CT als Adjuvanz wurden gemessen (siehe Abbildung D 2.1.3). Als Kontrolle diente das Serum vor der ersten Vakzinierung (Tag 0) und das Serum einer scheinimmunisierten Maus (Impfung mit PBS bzw. PBS und CT an Tag 14). Signifikante Konzentrationen von IgG- und IgM-Antikörpern im Vergleich zu scheinimmunisierten Kontrollen konnten nach abgeschlossenem Impfzyklus (Tag 14) bei der unadjuvantierten und CT adjuvantierten Gruppe festgestellt werden. Spezifische IgG-Antikörper konnten in beiden Gruppen bereits sieben Tage nach der ersten Immunisierung nachgewiesen werden, nach der zweiten Impfung stiegen die Werte nochmals an. Antikörper der Klasse IgM waren ebenfalls an Tag 7 signifikant zu detektieren, wobei sie bei der adjuvantierten Impfung nochmals an Tag 14 zunahmten. Die mit CT adjuvantierte Impfung war der unadjuvantierten an Tag 14 überlegen.

## D Ergebnisse

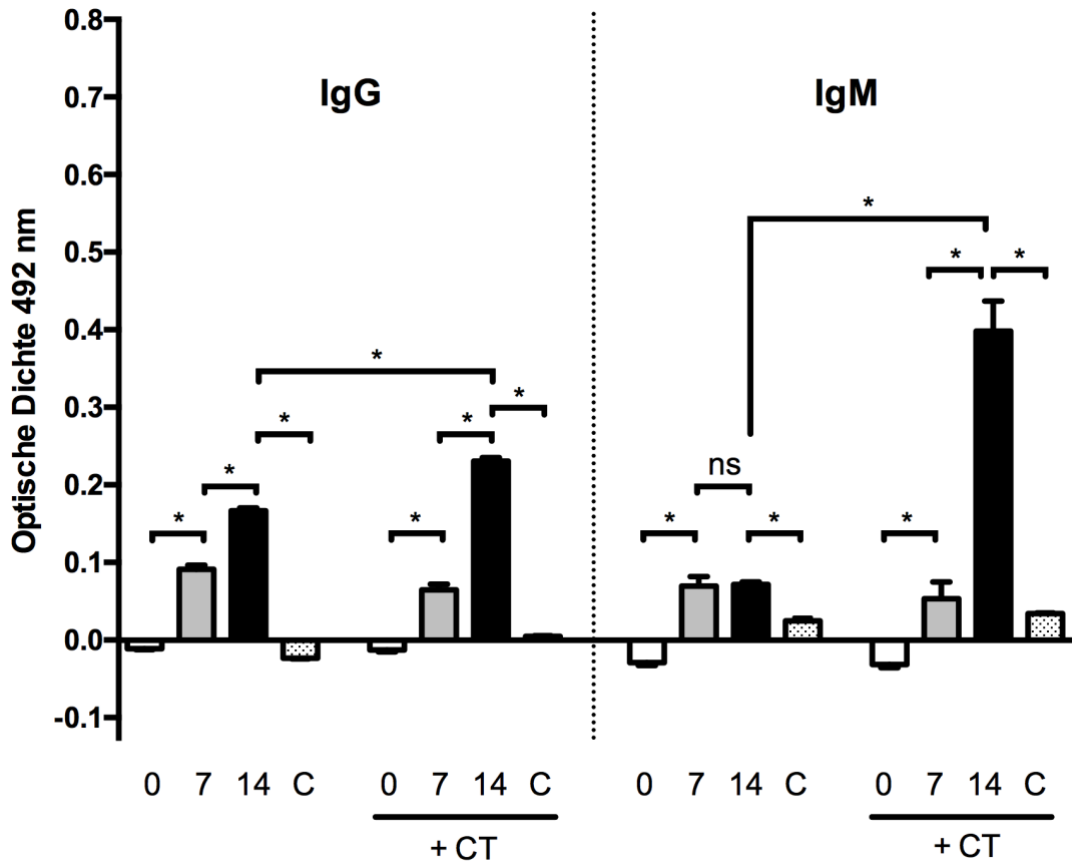


Abb. D 2.1.3 Nachweis bakterienspezifischer IgG- und IgM-Antikörper nach intranasaler Impfung mit OMV A bzw. OMV A mit CT adjuvantiert gemessen im Serum bei Verdünnung von 1:1.000 als optische Dichte (OD) bei 492 nm (MW +/- SD, n ≥ 3). 0, 7, 14 = Serum von Tag 0, 7, 14. C = Kontrollserum der scheinimmunisierten Mäuse an Tag 14. \* = signifikant, p < 0,05. ns = nicht signifikant, p ≥ 0,05.

### **ELISA zum Nachweis von Antikörpern nach Impfung mit OMV B**

Versuchstiere wurden mit OMV von Bakterienstamm B (OMV B) vakziniert, ohne und mit CT als Hilfsstoff. Antigenspezifische IgG- und IgM-Antikörper waren bei mit OMV B bzw. OMV B mit CT geimpften Mäusen nach sieben Tagen signifikant detektierbar, wobei sich nach der zweiten Vakzinierung nochmals eine signifikante Steigerung zeigte. Darüber hinaus war das Signal signifikant erhöht gegenüber den scheinimmunisierten Kontrollen. Das Adjuvanz CT verstärkte die Impfwirkung signifikant.

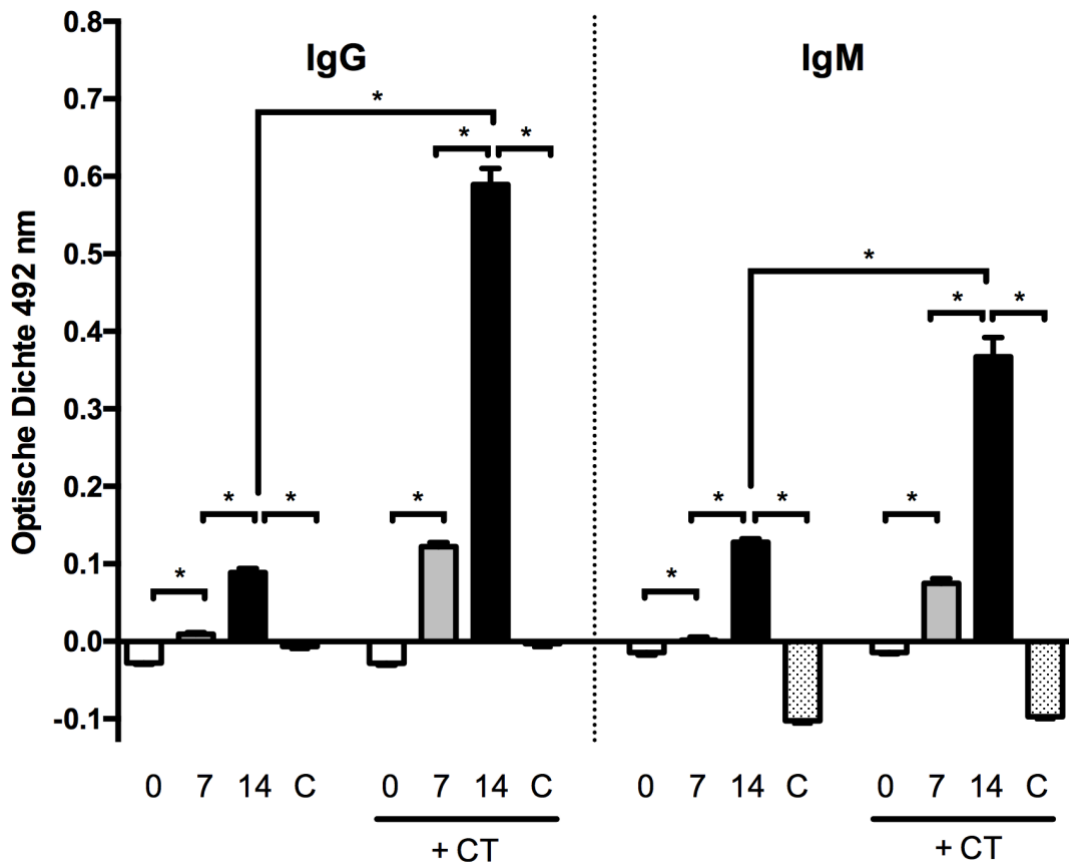


Abb. D 2.1.4 Nachweis bakterienspezifischer IgG- und IgM-Antikörper nach intranasaler Impfung mit OMV B bzw. OMV B mit CT adjuvantiert gemessen im Serum bei Verdünnung von 1:1.000 als optische Dichte (OD) bei 492 nm (MW +/- SD, n ≥ 3). 0, 7, 14 = Serum von Tag 0, 7, 14. C = Kontrollserum der scheinimmunisierten Mäuse an Tag 14. \* = signifikant, p < 0,05. ns = nicht signifikant, p ≥ 0,05.

### **ELISA zum Nachweis von Antikörpern nach Impfung mit OMV C**

Nach Impfung mit OMV von Bakterienstamm C (OMV C) zeigte sich in beiden Gruppen eine signifikante Zunahme von IgG-Antikörpern nach der ersten Impfung (Tag 7) und nochmals nach der Boosterung (Tag 14). IgM wurden nach Abschluss des Impfschemas (Tag 14) in einer signifikant höheren Zahl produziert als zu Beginn (Tag 0). Bei beiden Antikörper Isotypen waren die Level am Ende der Versuche (Tag 14) signifikant höher als bei den scheinimmunisierten Versuchstieren. In der unadjuvantierten Gruppe war ein

## D Ergebnisse

signifikant höheres Signal nachweisbar als in der mit CT adjuvantierten Gruppe.

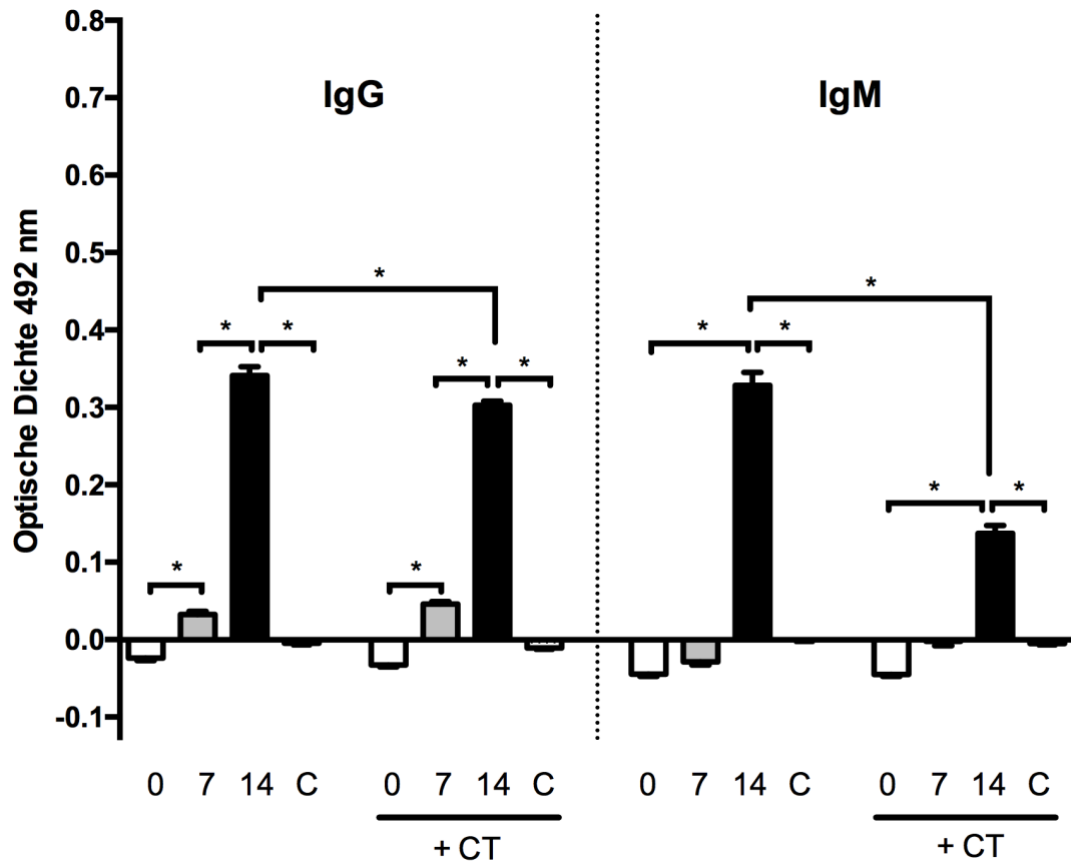


Abb. D 2.1.5 Nachweis bakterienspezifischer IgG- und IgM-Antikörper nach intranasaler Impfung mit OMV C bzw. OMV C mit CT adjuvantiert gemessen im Serum bei Verdünnung von 1:1.000 als optische Dichte (OD) bei 492 nm (MW +/- SD, n ≥ 3). 0, 7, 14 = Serum von Tag 0, 7, 14. C = Kontrollserum der scheinimmunisierten Mäuse an Tag 14. \* = signifikant, p < 0,05. ns = nicht signifikant, p ≥ 0,05.

### ELISA zum Nachweis von Antikörpern nach Impfung mit OMV CFT

Nach der Erstimpfung mit OMV des Referenzstamms CFT (OMV CFT) konnte ein signifikanter Anstieg von IgG- und IgM-Serumantikörpern in beiden Gruppen nachgewiesen werden. Nach der Zweitimpfung zeigte sich ein signifikanter Boosterungseffekt. Das Signal der Versuchsgruppen unterschied sich signifikant von der optischen Dichte (OD) in den Kontrollgruppen. Die IgG-

## D Ergebnisse

und IgM-Antikörperspiegel gegen CFT waren unadjuvantiert etwas höher als CT adjuvantiert, aber nicht signifikant unterschiedlich.

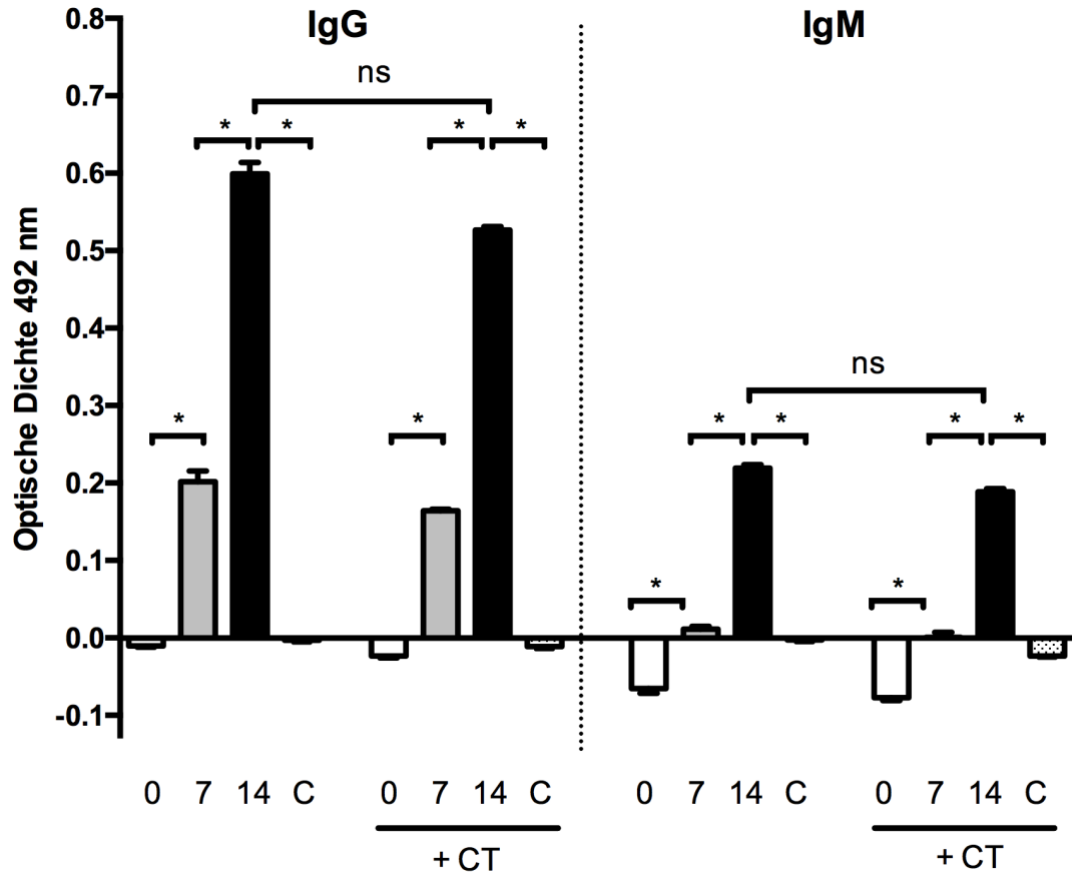


Abb. D 2.1.6 Nachweis bakterienspezifischer IgG- und IgM-Antikörper nach intranasaler Impfung mit OMV CFT bzw. OMV CFT mit CT adjuvantiert gemessen im Serum bei Verdünnung von 1:1.000 als optische Dichte (OD) bei 492 nm (MW +/- SD, n ≥ 3). 0, 7, 14 = Serum von Tag 0, 7, 14. C = Kontrollserum der scheinimmunisierten Mäuse an Tag 14. \* = signifikant, p < 0,05. ns = nicht signifikant, p ≥ 0,05.



### **Zusammenfassung der ELISA-Ergebnisse**

Die Quantifizierung der totalen IgG-Serumantikörper zeigt, dass alle OMV immunisierten Mäuse der unterschiedlichen Gruppen signifikant detektierbare IgG-Antikörper sieben Tage nach der ersten intranasalen Impfung aufwiesen. Darüber hinaus kam es in allen Gruppen zu einer signifikanten Erhöhung der IgG-Antikörper sieben Tage nach der Boosterimmunisierung. Die individuelle Signalstärke war variabel in den unterschiedlichen Gruppen mit der schwächsten IgG-Signalstärke nach Immunisierung mit OMV B.

Die IgM-Antikörperantworten ergaben ein weniger einheitliches Bild. Nach einer Immunisierung mit OMV A, OMV B und OMV CFT konnten 7 Tage nach der ersten Immunisierung IgM signifikant nachgewiesen werden. Bei der Impfung mit OMV C ließ sich 7 Tage nach der ersten Impfung keine signifikante Menge an IgM nachweisen. In allen Gruppen kam es nach der Boosterung zu einer signifikanten Erhöhung der IgM-Antikörper mit Ausnahme der nicht adjuvantierten OMV A Vakzinierung.

Die Wirkung des Adjuvanz CT auf die Antikörperantwort war in den Gruppen unterschiedlich. In den Gruppen OMV A und OMV B verstärkte die Zugabe des Adjuvanz CT zur Impfstofflösung die IgG- und IgM-Immunität signifikant. Bei der Vakzinierung mit OMV C zeigte sich das Gegenteil. Für OMV CFT ergab sich ein ähnlicher, jedoch statistisch nicht signifikanter Trend.

## 2.2 Western Blot

Der Western Blot weist das Vorhandensein antigenspezifischer Antikörper im Serum der immunisierten Mäuse nach. Verglichen mit dem ELISA hat der Western Blot eine höhere Spezifität. Nach der Immunisierung mit OMV interagiert das murine Immunsystem mit den Vesikeln. Es kommt zur Ausbildung von Antikörpern gegen Bestandteile der OMV. Durch den ELISA konnte nachgewiesen werden, dass diese Antikörper in unterschiedlichem Maße in der Lage sind Antigene im Bakterienlysate zu binden. Ein Bakterium exponiert zahlreiche dieser Antigene als Zielstrukturen für die Antikörper. Im Western Blot werden während der Gelelektrophorese diese Zielproteine anhand ihrer molekularen Masse sortiert. Nach Zugabe des Serums binden die Antikörper ihre Zielstrukturen und werden durch Zugabe des zweiten Antikörpers detektiert. Eine detektierte Bande im Western Blot beweist nicht nur die Existenz der Antikörper, sondern bietet auch eine Aussage über die Größe der jeweiligen Zielproteine.

Als Ziele eingesetzt wurden Lysate der unterschiedlichen Bakterien (A, B, C, CFT) und ihre jeweiligen aufgereinigten OMV. So konnte verglichen werden, welche bakteriellen Strukturen die Antikörper binden, bzw. welche OMV-assoziierten Proteine von den Antikörpern erkannt werden. Die Bakterienlysate und die OMV wurden durch Kochen und Zugabe von SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol denaturiert. Nach Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE und Membrantransfer wurden die Antigene mit den jeweiligen Seren und einem HRP-gekoppeltem Anti-IgG Antikörper inkubiert. Nach Zugabe des Substrats stellten sich Antigen-Antikörper-Komplexe als schwarze Banden dar.

Die Mausseren wurden den Versuchstieren vor der ersten Impfung (Tag 0), eine Woche nach der ersten Impfung (Tag 7) sowie nach der zweiten Impfung (Tag 14) abgenommen. Als Kontrollen wurden die Seren scheinimmunisierter Mäuse (PBS und PBS + CT) von Tag 14 eingesetzt.

## D Ergebnisse

### Ergebnisse für OMV A immunisierte Mäuse

Bereits nach der ersten Immunisierung mit OMV A (Tag 7) zeigten sich Antikörper gegen Proteine aus dem Bakterienlysat (siehe Abbildung D 2.2.1). Die Antikörperantwort nahm nach der zweiten Impfung (Tag 14) zu, sichtbar an den stärkeren Banden. Die Antikörper erkannten Proteine mit einer Größe von 35 kDa und 10 kDa. Die Kombinationsimpfung aus OMV A und CT zeigte erst an Tag 14 eine Reaktion bei 35 kDa. Antikörper gegen die OMV demonstrierten ein ähnliches Muster. Nach erster unadjuvantierter Impfung zeigten sich an Tag 7 schwache, an Tag 14 dann starke Banden. Bei CT adjuvantierter Impfung hingegen war der Western Blot erst am Ende der Versuche (Tag 14) positiv. Zusätzlich zu der Bande bei 35 kDa reagierte das Serum beider Gruppen deutlich gegen drei OMV-assoziierte Proteine mit einer Größe von ca. 13 bis 20 kDa. In den Kontrolltieren zeigte sich keine Antikörperantwort, mit Ausnahme einer sehr schwachen Aktivität der mit PBS und CT scheinimmunisierten Mäuse gegen Proteine der OMV.

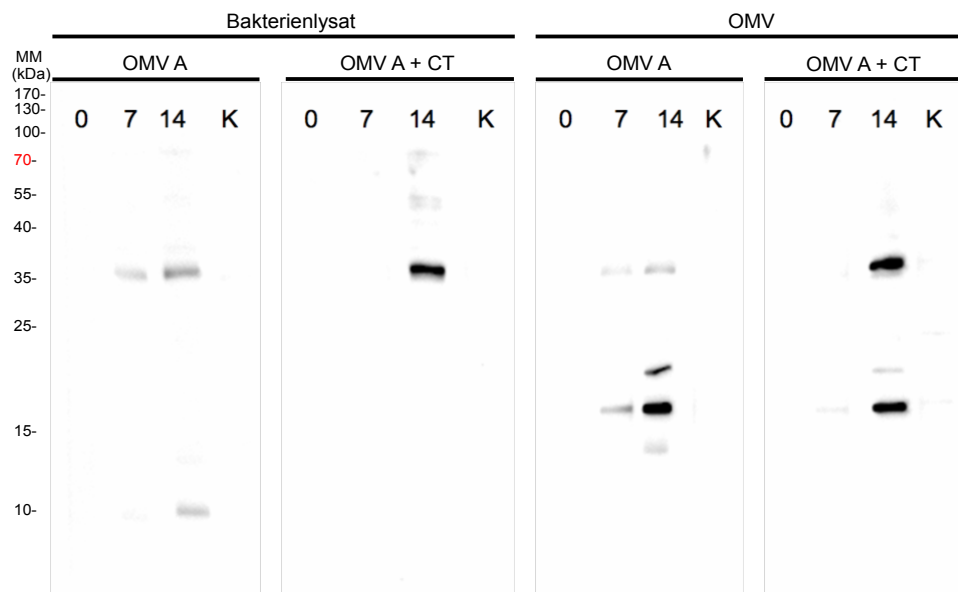


Abb. D 2.2.1 Western Blot zum Nachweis antigenspezifischer Antikörper gegen das Bakterium A (siehe horizontale Beschriftung: Bakterienlysat) oder gegen OMV des Bakteriums A (siehe horizontale Beschriftung: OMV) im Serum der Versuchs- und Kontrolltiere nach Impfung mit OMV A. 0, 7, 14 = Serum von Tag 0, 7, 14. K = Kontrollserum der scheinimmunisierten Mäuse an Tag 14. MM = Molekülmasse.

## D Ergebnisse

### Ergebnisse für OMV B immunisierte Mäuse

Nach der Impfung mit OMV B ohne Adjuvanz zeigte sich im Western Blot eine sehr schwache Immunantwort gegen das Bakterium und keine Immunantwort gegen die OMV (siehe Abbildung D 2.2.2). An Tag 14 wurde ein sehr schwaches Signal im Blot gegen das Bakterienlysate bei 35 kDa nachgewiesen, kongruent zu den Ergebnissen im ELISA. Im Gegensatz dazu reagierte in der Adjuvanzgruppe das Serum sowohl gegen das Bakterienlysate als auch gegen die OMV. An Tag 7 zeigten sich Antikörper gegen ein Zielprotein mit einer Größe von 35 kDa. Nach der zweiten Vakzinierung (Tag 14) war zusätzlich ein weiteres Signal bei 70 kDa sichtbar. Die scheinimmunisierten Mäuse produzierten keine spezifischen Antikörper, mit Ausnahme einer sehr schwachen Antikörperantwort nach Vakzinierung mit PBS und CT.

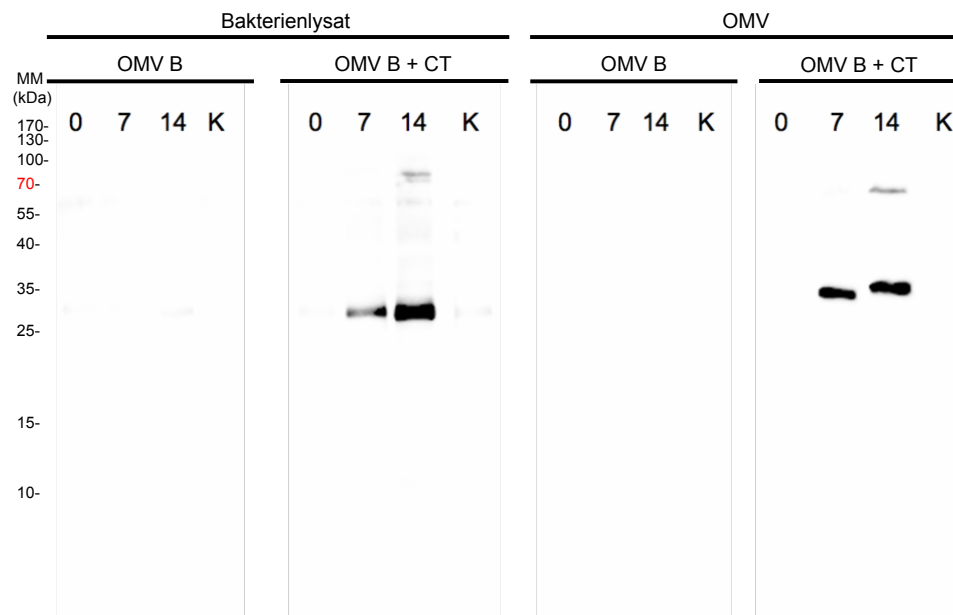


Abb. D 2.2.2 Western Blot zum Nachweis antigenspezifischer Antikörper gegen das Bakterium B (siehe horizontale Beschriftung: Bakterienlysate) oder gegen OMV des Bakteriums B (siehe horizontale Beschriftung: OMV) im Serum der Versuchs- und Kontrolltiere nach Impfung mit OMV B. 0, 7, 14 = Serum von Tag 0, 7, 14. K = Kontrollserum der scheinimmunisierten Mäuse an Tag 14. MM = Molekülmasse.

## D Ergebnisse

### Ergebnisse für OMV C immunisierte Mäuse

Nach der Immunisierung mit OMV C ohne und mit CT konnten Antikörper gegen ein 35 kDa großes Protein des Bakterienlysats in beiden Gruppen zunächst schwach (Tag 7), nach Boostersimpfung stark (Tag 14) nachgewiesen werden. Die Seren reagierten außerdem an Tag 14 gegen ein OMV-assoziiertes Protein gleicher Größe (35 kDa). Nach Inkubation der Bakterienlysate und der OMV mit den Seren scheinimmunisierter Versuchstiere waren keine Banden sichtbar.

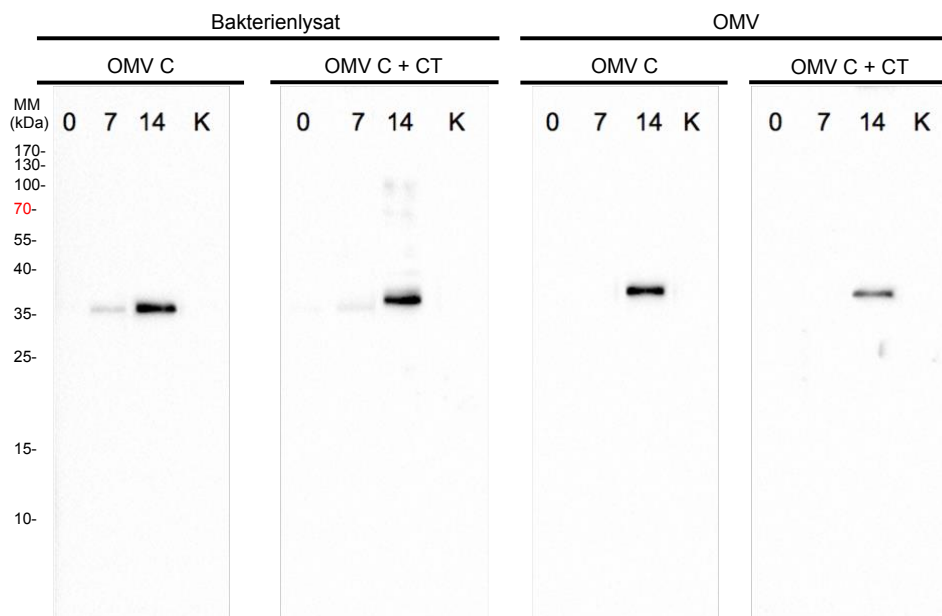


Abb. D 2.2.3 Western Blot zum Nachweis antigenspezifischer Antikörper gegen das Bakterium C (siehe horizontale Beschriftung: Bakterienlysate) oder gegen OMV des Bakteriums C (siehe horizontale Beschriftung: OMV) im Serum der Versuchs- und Kontrolltiere nach Impfung mit OMV C. 0, 7, 14 = Serum von Tag 0, 7, 14. K = Kontrollserum der scheinimmunisierten Mäuse an Tag 14. MM = Molekülmasse.

### Ergebnisse für OMV CFT immunisierte Mäuse

Im Western Blot war nach der ersten Impfung mit OMV CFT eine schwache, nach wiederholter Vakzinierung eine starke Antikörperantwort gegen ein Protein des Bakterienlysats mit einer Größe von ca. 38 kDa nachweisbar. Dies galt sowohl nach Immunisierung mit den OMV allein oder in Kombination der OMV mit dem Hilfsstoff CT. Die Reaktivität derselben Seren gegen die OMV

## D Ergebnisse

des Bakteriums CFT war deutlich ausgeprägter. Nach der ersten Impfung (Tag 7) zeigten sich schwache Banden bei 40, 100, 130 und 170 kDa. Das Signal nahm nach der zweiten Impfung zu. Darüber hinaus war eine starke Bande bei 55 kDa nachweisbar. Die Kontrolltiere waren negativ, mit Ausnahme einer sehr schwachen Aktivität der mit PBS und CT scheinimmunisierten Mäuse gegen Proteine der OMV.

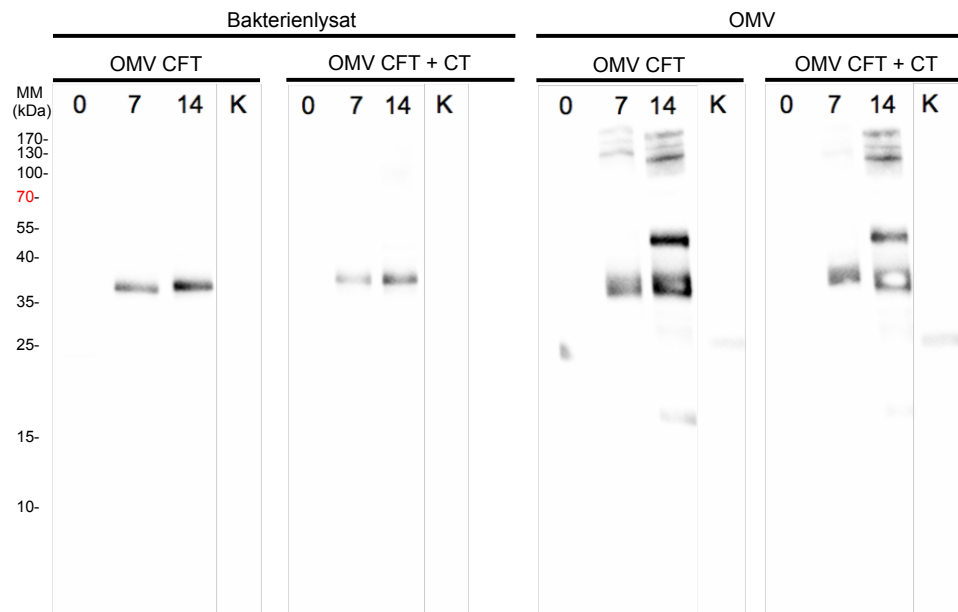


Abb. D 2.2.4 Western Blot zum Nachweis antigenspezifischer Antikörper gegen das Bakterium CFT (siehe horizontale Beschriftung: Bakterienlysat) oder gegen OMV des Bakteriums CFT (siehe horizontale Beschriftung: OMV) im Serum der Versuchs- und Kontrolltiere nach Impfung mit OMV CFT. 0, 7, 14 = Serum von Tag 0, 7, 14. K = Kontrollserum der scheinimmunisierten Mäuse an Tag 14. MM = Molekülmasse.

### Zusammenfassung der Western Blot Ergebnisse

Mittels Western Blot konnte die IgG-Antikörperantwort der Mäuse nach der Immunisierung weiter evaluiert werden. Im Serum der Versuchstiere zu Beginn der Immunisierungen (Tag 0) und im Serum der Kontrollmäuse konnte keine spezifische Antikörperantwort nachgewiesen werden, mit Ausnahme einer höchstens schwachen Aktivität der Seren der zweifach mit PBS und CT scheinimmunisierten Mäuse als Zeichen einer unspezifischen Stimulation des Immunsystems durch CT. Das Serum aller Versuchstiere der

## D Ergebnisse

unterschiedlichen Gruppen nach beiden intranasalen Immunisierungen (Tag 14) reagierte stark mit Proteinen, die sowohl in den OMV als auch in den Ganzzelllysaten vorhanden waren. Eine Ausnahme stellte die Immunisierung mit unadjuvantierten OMV B dar. Im Western Blot zeigte sich, kongruent zur schwachen Signalstärke im ELISA, nur eine schwache Reaktivität des Serums gegen das Bakterienlysate und keine gegen die OMV. Unabhängig von der jeweiligen Signalstärke wird aus dem Vergleich von Coomassie-Färbung (siehe D 1.1) und Western Blot deutlich, dass sich die Immunantwort nur gegen mehrere (A, B und CFT) bzw. hauptsächlich ein Protein (C) richtet. Diese Proteine sind sowohl in den OMV als auch in den Ganzzelllysaten enthalten und offensichtlich immunogen.

### **2.3 Immunofluoreszenzmikroskopie**

Durch Vakzinierung kommt es idealerweise zur Ausbildung spezifischer Antikörper gegen Strukturen des Erregers. Durch die Immunofluoreszenzmikroskopie kann die Lokalisation dieser Antigene qualitativ nachgewiesen werden. Die Reaktionsfelder von Objektträgern wurden mit einer Bakteriensuspension beschichtet und mit Formaldehyd-Lösung (3,7 % v/v) fixiert. Anschließend wurde mit Patienten- und Mausseren inkubiert. Antigenspezifische Antikörper im Serum wurden mittels Fluorochrom-markierten zweiten Antikörpern sichtbar gemacht. Im Fluoreszenz-Mikroskop kann die Intensität und räumliche Verteilung der Anfärbung dargestellt werden. Die Objektträger wurden in drei Modalitäten betrachtet. Hellfeldmikroskopische Aufnahmen zeigten die dem Objektträger anhafteten Bakterien. Die Fluoreszenzmikroskopie diente der Ortsbestimmung der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Überlagerung der beiden Modalitäten enthüllte, ob alle im Hellfeld sichtbaren Bakterien nach Antikörperbindung angefärbt sind. Unspezifische Färbungen konnten durch die eingesetzten Kontrollen (siehe Tabelle D 2.3.) ausgeschlossen werden.

Bezüglich der Kontrollen lässt sich Folgendes zusammenfassen: Es konnte keine Autofluoreszenz der Bakterien (Kontrolle 1) gesehen werden. Ebenso wenig kam es zu unspezifischen Bindungen des zweiten Antikörpers an die Bakterien (Kontrolle 2). Nach Inkubation mit Präimmunsere (Tag 0) und zweitem Antikörper zeigte sich keine Anfärbung (Kontrolle 3). Darüber hinaus konnten keine antigenspezifischen Antikörper im Serum scheinimmunisierter Mäuse (Mockserum Tag 14) detektiert werden. Die Aufnahmen auf Abbildung D 2.3.1 sind repräsentativ für die eingesetzten Kontrollen.

Nach Inkubation mit Seren von Mäusen, die mit unadjuvantierten und CT adjuvantierten OMV A, B, C und CFT immunisiert wurden, war eine grüne Fluoreszenz der bakteriellen Membran zu sehen. Damit konnten



## D Ergebnisse

antigenspezifische IgG-Antikörper im Serum aller immunisierten Mäuse detektiert werden. Die Oberfläche der Bakterien konnte als Hauptlokalisierung der Antikörper bestimmt werden. Die Überlagerung der Fluoreszenzmikroskopie mit dem Hellfeld Bild zeigte, dass alle Bakterien im Präparat von den Antikörpern gebunden wurden.

Tabelle D 2.3. Messreihen Immunofluoreszenzmikroskopie.

Name	Beschichtung	1. AK	2. AK
Kontrolle 1	Bakterium	-	-
Kontrolle 2	Bakterium	-	Anti-Maus IgG FITC
Kontrolle 3	Bakterium	Mausserum Tag 0	Anti-Maus IgG FITC
Kontrolle 4	Bakterium	Mockserum Tag 14	Anti-Maus IgG FITC
Messung/Versuch	Bakterium	Mausserum Tag 14	Anti-Maus IgG FITC

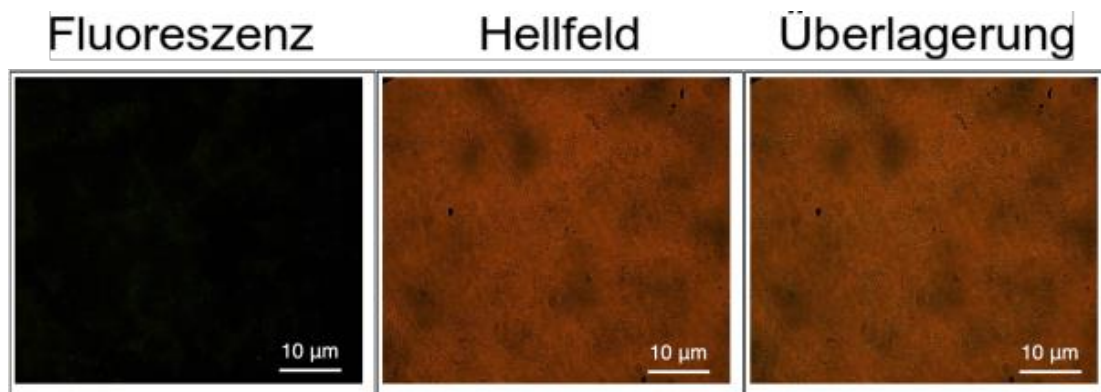


Abb. D 2.3.1 Repräsentative Kontrolle der Immunofluoreszenz zum Ausschluss unspezifischer Färbungen. Von links nach rechts: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, Hellfeldmikroskopie und Überlagerung beider Modalitäten. Es konnte keine unspezifische Färbung in den Kontrollen gesehen werden.

## D Ergebnisse

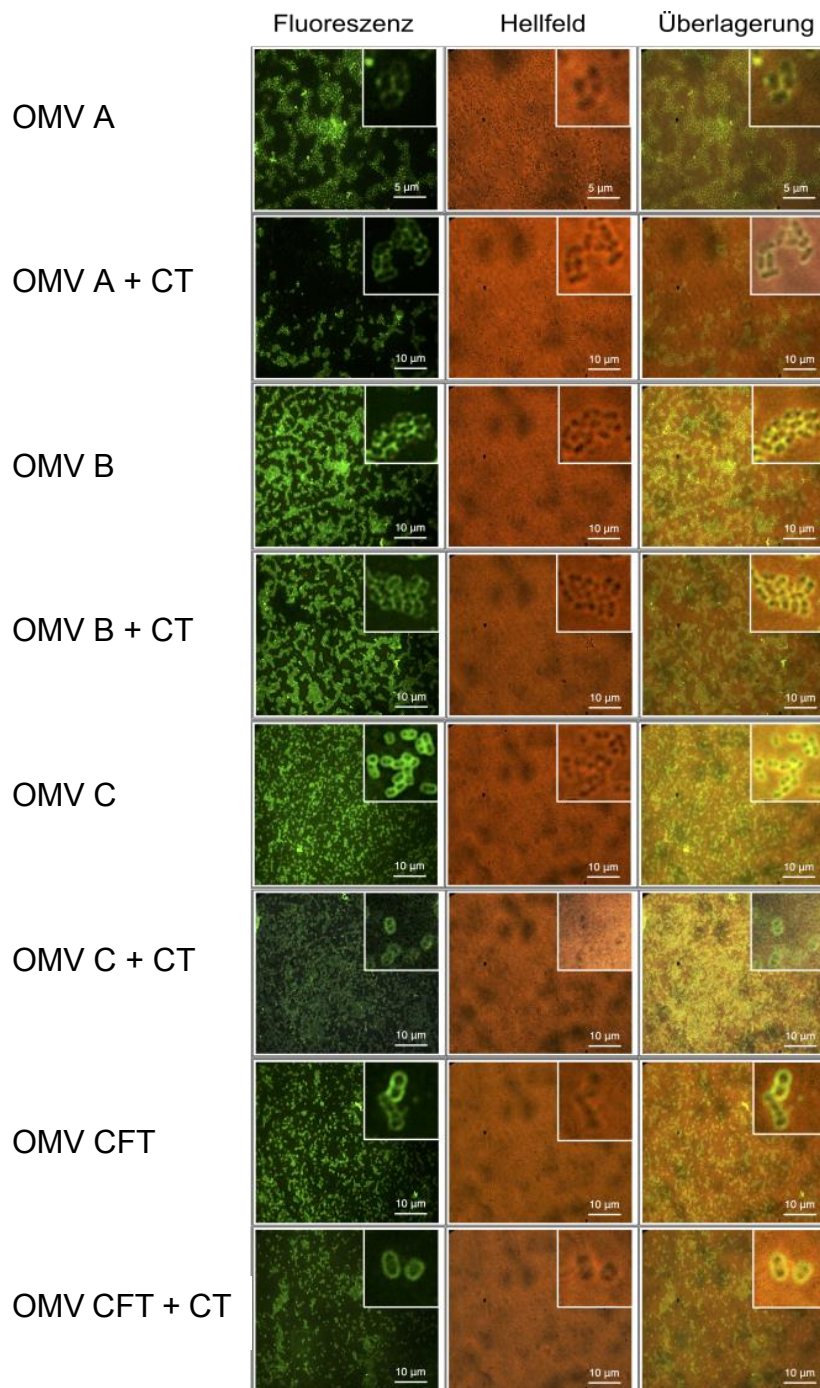


Abb. D 2.3.2 Immunofluoreszenzmikroskopie nach Inkubation der jeweiligen Bakterien (A, B, C, CFT) mit den Seren intranasal immunisierter Mäuse (Tag 14) und zweitem Antikörper (Anti-Maus IgG FITC). Im oberen rechten Bildteil eine Vergrößerung der Übersichtsaufnahmen. Von links nach rechts: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, Hellfeldmikroskopie und Überlagerung beider Modalitäten. Antigen-spezifische IgG-Antikörper im Serum der immunisierten Mäuse banden an der Bakterienoberfläche und wurden durch Fluorochrom-konjugierte Zweitantikörper sichtbar gemacht.

## **2.4 Quantitativer Fluoreszenzassay**

Im ELISA, dem Western Blot und der Immunofluoreszenzmikroskopie wurden antigenspezifische Antikörper im Serum der Versuchstiere nachgewiesen. Dabei wurden Bakterien als Antigene eingesetzt. Im ELISA wurden die Bakterien hitzeinaktiviert. Im Western Blot wurden sie nach Kochen durch Zugabe von SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol denaturiert. In der Immunofluoreszenzmikroskopie wurden die Bakterien durch 3,7 % Formaldehyd abgetötet. Um zu prüfen, inwiefern die Antikörper lebende Bakterien binden können, wurde der quantitative Fluoreszenzassay durchgeführt. Hierzu wurden 50  $\mu$ l einer Bakterienlösung definierter Keimzahl mit Serum inkubiert. Antigenspezifische Antikörper banden an ihre bakteriellen Zielstrukturen. Die Komplexe aus Bakterien und Antikörpern wurden durch den Einsatz von Fluorochrom-konjugierten zweiten Antikörpern (Anti-Maus IgG FITC) nachgewiesen, nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschen entfernt. Das nach Anregung der Fluorochrome emittierte Fluoreszenzsignal wurde im Mikroplattenleser quantifiziert.

Zum Einsatz kam das Serum der Versuchstiere vor und nach den intranasalen Immunisierungen mit den OMV (Tag 0 und Tag 14). Folgende Kontrollen wurden bei diesem Experiment eingesetzt: Zum einen erfolgte eine Inkubation der lebenden Bakterien mit Probenpuffer anstelle von Serum und zweitem Antikörper. So konnte eine bakterielle Autofluoreszenz ausgeschlossen werden. Zum anderen wurden Bakterien nur mit Probenpuffer und anschließend mit zweitem Antikörper inkubiert, um eventuelle unspezifische Bindungen des zweiten Antikörpers an das Bakterium sichtbar zu machen. Die Kontrollen wurden in allen Versuchsschritten analog zu den Proben verarbeitet.

In allen Versuchsgruppen (OMV A, B, C und CFT) erhöhte sich das Fluoreszenzsignal nach der zweifach intranasalen Vakzinierung signifikant (siehe Abbildung D 2.4). Außerdem unterschied sich das Fluoreszenzsignal

## D Ergebnisse

signifikant von dem der Kontrollen. Somit konnten in allen Gruppen Antikörper nachgewiesen werden, die in der Lage waren, native Antigene auf vitalen Bakterien zu binden.

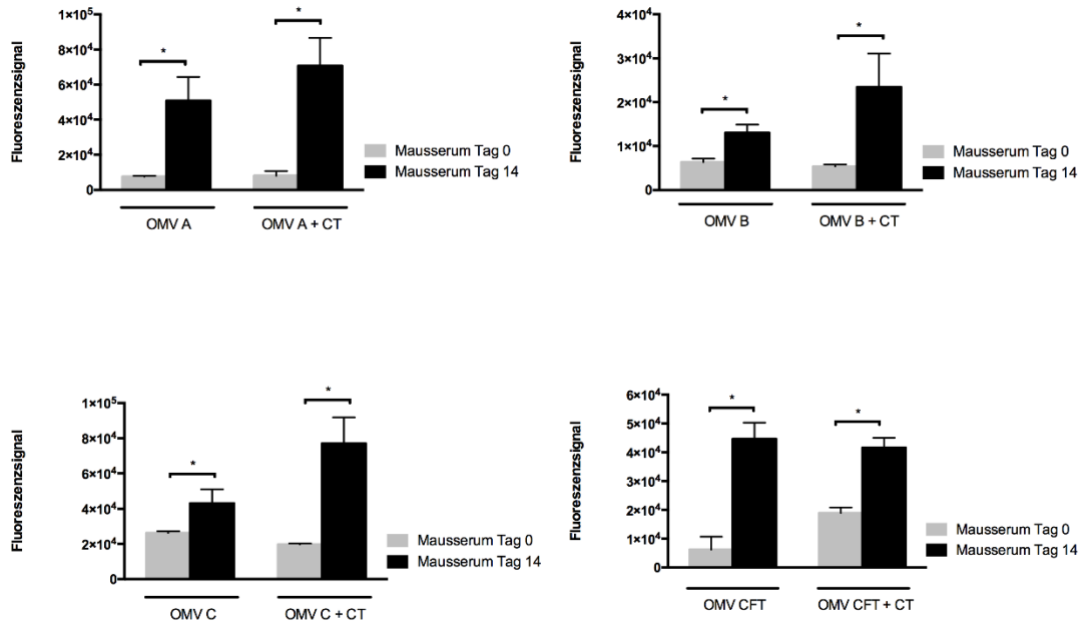


Abb. D 2.4 Quantitativer Fluoreszenzassay. Fluoreszenzsignal (Anregung 485 nm, Emission 520 nm, MW +/- SD, n ≥ 3) nach Inkubation der vitalen Bakterien (A, B, C, CFT) mit den Seren intranasal immunisierter Mäuse der unterschiedlichen Gruppen abgenommen nach abgeschlossenem Impfschema (Tag 14). Zur Kontrolle wurden Seren der Mäuse vor den Impfungen (Tag 0) eingesetzt. \* = signifikant, p < 0,05.

### **D 3. Untersuchung der Immunantwort beim Menschen**

In dieser Arbeit sollte die Immunogenität einer Vakzinierung mit bakteriellen OMV von GNB im Mausmodell charakterisiert werden. Hierzu wurden Mäuse mit OMV dreier Bakterienisolate von Patienten und einem Referenzbakterium immunisiert. Um eine Wirkung der OMV-basierten Impfung im Menschen abzuschätzen, wurde die humane Immunantwort aus Seren der entsprechenden Patienten untersucht. Die Patienten hatten eine Infektion mit dem jeweiligen Bakterium A, B oder C erlitten. Im Rahmen dieser Infektion war es zu einer Konfrontation des menschlichen Immunsystems mit dem jeweiligen Erreger gekommen. In der Folge wurde eine spezifische Immunantwort gegen das Bakterium induziert. In folgenden Experimenten wurde die Reaktivität der Patientenserum gegen die Bakterien untersucht und mit der Reaktivität gegen die zur Impfung eingesetzten OMV verglichen.

#### **3.1 ELISA**

Die Serumantikörper gegen die Bakterien oder gegen ihre OMV wurden mittels ELISA gemessen. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit hitzeinaktivierten Bakterien oder OMV beschichtet. Nach Absättigen unspezifischer Bindestellen wurde das Patientenserum in Verdünnungsreihen beginnend bei 1:100 inkubiert. Der Einsatz verschiedener Verdünnungsstufen machte die Beziehung zwischen Quantität an Antikörpern und optischer Dichte sichtbar. Für den Vergleich der verschiedenen Seren wurden Bereiche eingesetzt, in denen die Beziehung zwischen den beiden Parametern weitgehend linear war (siehe Abbildung D 3.1.1). Dementsprechend kam für A, OMV A, B und OMV B die Verdünnungsstufe 1:1.000 zum Einsatz. Für C und OMV C wurde 1:10.000 gewählt. Nach vier Waschschritten wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe mittels zweitem Antikörper (Anti-Human IgG HRP-konjugiert)

## D Ergebnisse

gebunden. Der Nachweis erfolgte durch Detektion des Substratumsatzes im Mikroplattenleser.

Alle Patientenserum, abgenommen nach der Infektion mit den Bakterien A, B oder C, zeigten eine signifikant höhere Antikörperantwort gegen die Bakterienlysate als gegen ihre OMV (siehe Abbildung D 3.1.2). Gleichzeitig waren alle Patientenserum in der Lage sowohl Bakterium als auch OMV zu binden. Die Reaktivität aller Seren gegenüber den Bakterien war signifikant höher als gegenüber ihren OMV. Ein Serum der Patienten vor der Infektion war jedoch nicht vorhanden. So konnte nicht zwischen durch die Infektion induzierten und eventuell präformierten Antikörpern unterschieden werden.

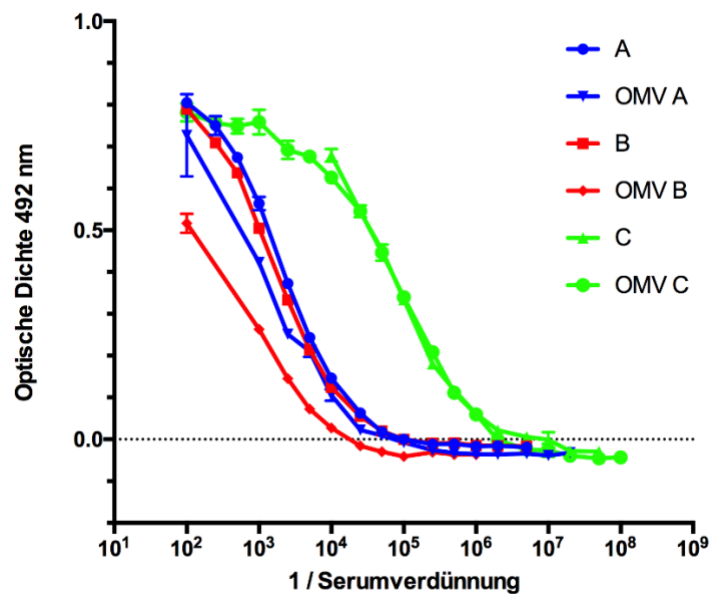


Abb. D 3.1.1 Bestimmung einer geeigneten Verdünnungsstufe zur Messung der Serumantikörper der Patienten nach Infektion mit Bakterium A, B oder C mittels ELISA. Mikrotiterplatten wurden mit Bakterienlysate oder OMV des jeweiligen Bakteriums beschichtet und mit seriell verdünnten Patientenserum inkubiert. Aufgetragen ist der reziproke Wert der Verdünnung von Seren gemessen als optische Dichte (OD) bei 492 nm (MW  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ ) beginnend bei einer Verdünnung von 1:100 ( $10^2$ ) bis 1:10.000.000 ( $10^8$ ). Es wird deutlich, dass die Beziehung zwischen Menge an Antikörper und gemessenem Signal nur in bestimmten Bereichen linear verläuft. Die geeignete Verdünnungsstufe wurde aus den linearen Bereichen ausgewählt.

## D Ergebnisse

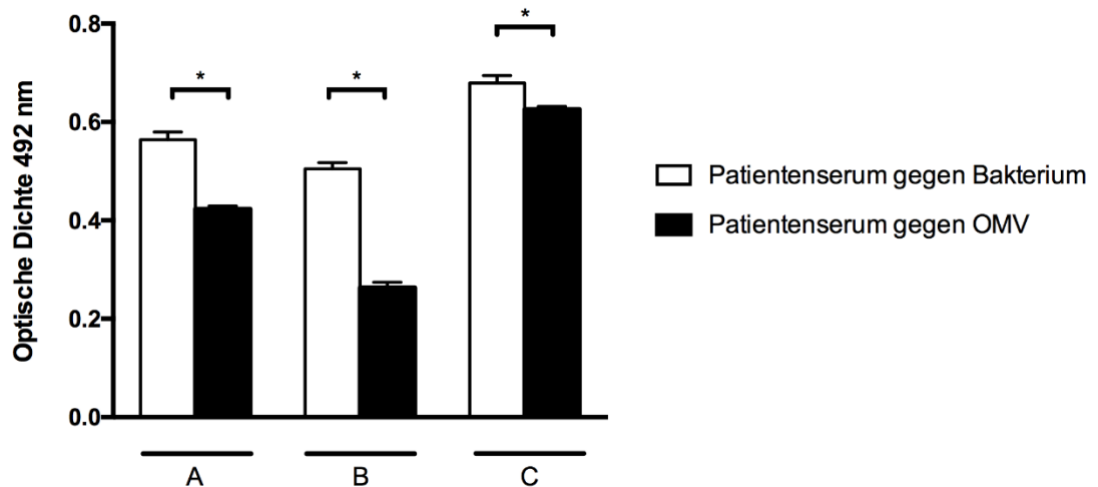


Abb. D 3.1.2 ELISA zur Bestimmung der Serumantikörper der Patienten nach Infektion mit Bakterium A, B oder C gegen Bakterienlysate oder gegen OMV. Gemessen wurde das Serum bei einer Verdünnung von 1:1.000 (für A und B) bzw. 1:10.000 (für C) als optische Dichte (OD) bei 492 nm (MW +/- SD, n ≥ 3). \* = signifikant, p < 0,05.

### 3.2 Western Blot

Mittels Western Blots wurden Serumantikörper der Patienten gegen Proteine aus dem Bakterium oder gegen ihre OMV bestimmt. Als Proteinproben wurden Lysate der Bakterien A, B und C oder ihre OMV eingesetzt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der denaturierten Eiweiße mittels SDS-PAGE wurden sie auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (siehe C 4.3.1 – C 4.3.3). Der korrekte Transfer wurde durch Einsatz eines vorgefärbten Protein Größenstandards und durch Ponceau-Färbung der Membran überprüft (siehe C 4.3.4). Anschließend erfolgte die Immundetektion der Serumantikörper (siehe C 4.3.5) durch Inkubation mit entsprechendem Sekundärantikörper und Substrat.

In den ersten Western Blot Versuchen zeigte sich eine hohe Hintergrundaktivität bei Inkubation der geblotteten Proteine von Bakterienlysate und OMV mit den Patientenseren. Trotz Austestung unterschiedlicher Antigen- und Antikörperkonzentrationen ließ sich dieses Hintergrundsignal nicht wesentlich reduzieren. Dies schränkte die Aussagekraft des Tests ein. Die

## D Ergebnisse

Ergebnisse der Western Blot Experimente sind in Abbildung D 3.2 dargestellt. Im Serum des Patienten A konnte eine starke Antikörperantwort gegen zahlreiche Proteine unterschiedlicher Größe von 100 kDa bis 10 kDa gesehen werden. Die Reaktivität des Patientenserums gegen die OMV war schwächer ausgeprägt. Es kam sowohl zur Bindung gleichgroßer Proteine von Bakterium und OMV (z.B. bei 50 kDa, ca. 22 kDa und 15 kDa), als auch unterschiedlich großer Proteine.

Zahlreiche Banden von 100 kDa bis 15 kDa zeigten sich bei Inkubation des Bakterienlysats B mit Serum des Patienten B. Eine schwächere Aktivität des Serums gegen die OMV konnte gesehen werden.

Auf Grund der hohen Hintergrundaktivität konnten mittels Western Blot keine Aussagen über die Serumantikörper des Patienten C gegen das Bakterium C und seine OMV getroffen werden.

Insgesamt bestätigt der Western Blot die Ergebnisse des ELISA für die Antikörperantwort der Patientenserum gegen Bakterium (bzw. OMV) A und B. In beiden Fällen konnte das Patientenserum sowohl Bakterium als auch OMV binden. Die Reaktivität gegen die Bakterien war stärker ausgeprägt als gegen die OMV. Eine gute Aussage über das Patientenserum C war wegen hoher Hintergrundaktivität nicht möglich, es lassen sich einige Banden erahnen, die spezifische Bindungen anzeigen könnten.



## D Ergebnisse

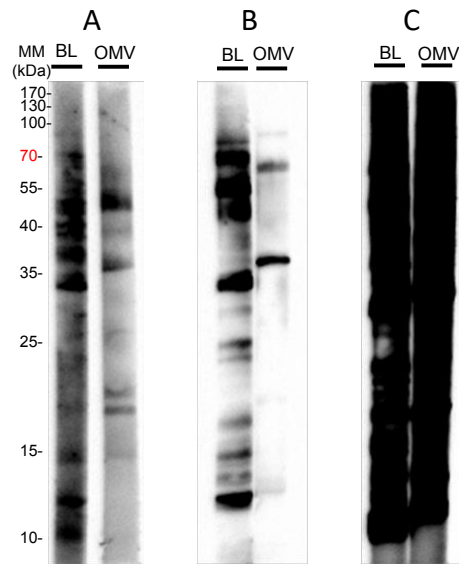


Abb. D 3.2 Western Blot zum Nachweis von Antikörpern im Patientenserum gegen die Bakterienlysate (BL) oder die OMV nach Infektion des jeweiligen Patienten A, B oder C. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Bakterienlysate und der OMV wurden sie auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit Patientenserum inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit einem Zweitantikörper (Anti-Human IgG HRP-konjugiert). BL = Bakterienlysate. MM = Molekülmasse.

### 3.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

In den vorangehenden Experimenten konnten Antikörper im Patientenserum nach Infektion mit den Bakterien A, B und C nachgewiesen werden. Diese Antikörper waren auch dazu in der Lage die OMV der betreffenden Bakterien zu binden. OMV schnüren sich als Vesikel von der bakteriellen Außenmembran ab. Können Antikörper sowohl die Erreger als auch ihre OMV erkennen, sollte eine Deposition an der Bakterienmembran sichtbar werden. Die Lokalisation der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Objektträger wurden mit dem jeweiligen Bakterium beschichtet und mit Formaldehyd fixiert. Nach Inkubation mit dem verdünnten Patientenserum wurden gebundene Serumantikörper durch einen geeigneten zweiten Antikörper (Anti-Human IgG FITC) sichtbar gemacht. Die mikroskopische Dokumentation beinhaltete eine Hellfeld- und

## D Ergebnisse

eine Fluoreszenzmikroskopie, sowie eine Superposition beider Modi. Durch den Einsatz entsprechender Kontrollen konnten unspezifische Färbungen wie eine bakterielle Autofluoreszenz oder eine unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers ausgeschlossen werden. Nach Inkubation der Bakterien A, B oder C mit den jeweiligen Patientenseren konnte eine Anfärbung der Erreger gesehen werden (siehe Abbildung D 3.3). Bakterienspezifische IgG-Antikörper wurden so im Serum aller Patienten detektiert. Wie erwartet, lagerten sich die Immunglobuline hauptsächlich an der Bakterienmembran an. In der Überlagerung von Fluoreszenz- und Hellfeldmikroskopie wurden alle Bakterien grün fluoreszierend und somit von den Antikörpern gebunden dargestellt.

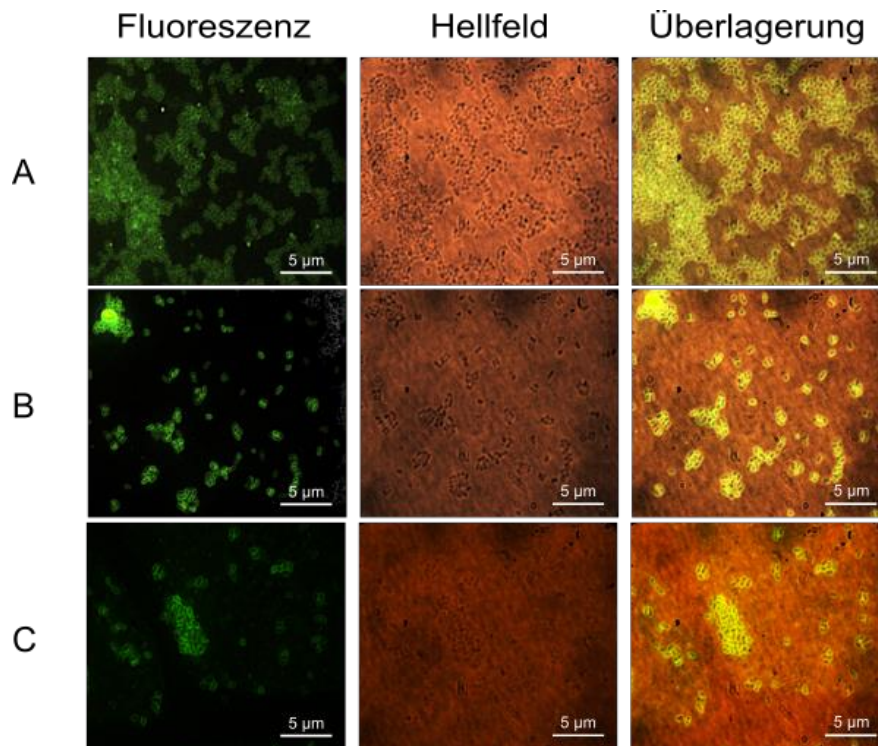


Abb. D 3.3 Immunofluoreszenzmikroskopie zum Nachweis der Lokalisation der Antigen-Antikörper-Bindung. Bakterien (A, B, C) wurden mit den Patientenseren, abgenommen nach Infektion mit dem jeweiligen Erreger, und zweitem Antikörper (Anti-Human IgG FITC) inkubiert. Von links nach rechts: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, Hellfeldmikroskopie und Überlagerung beider Modalitäten. Grüne Fluoreszenz der Bakterienoberfläche demonstriert eine Anlagerung antigenspezifischer IgG-Antikörper an die Bakterienmembran.

#### **D 4. Evaluation der Verträglichkeit des Impfstoffs**

Um die Verträglichkeit eines Impfstoffes basierend auf OMV zu prüfen, wurden verschiedene Parameter erhoben. Zum einen wurden die geimpften Mäuse im Verlauf der Experimente auf Verhaltensauffälligkeiten (z.B. Lethargie, vermehrtes Putzen des Schnäuzchens), Anzeichen emotionaler oder körperlicher Belastung und Zeichen lokaler oder systemischer Toxizität beobachtet. Das Gewicht wurde wöchentlich gemessen. Die Impfungen wurden ohne Anzeichen von Nebenwirkungen gut vertragen, es kam zu keinem Gewichtsverlust und alle Tiere nahmen kontinuierlich an Gewicht zu. Todesfälle unter den Versuchstieren traten ebenfalls nicht auf. Somit erwies sich das Impfschema als exzellent verträglich. Um die Sicherheit einer OMV-gestützten Immunisierung weiter zu charakterisieren, wurde basierend auf der intranasalen OMV-Applikation die Nasenschleimhaut histopathologisch untersucht. Je zwei BALB/c Mäuse wurden entweder mit OMV des Referenzstamms CFT gelöst in Kochsalzlösung oder mit Kochsalzlösung allein als Kontrolle immunisiert. Nach abgeschlossenem Impfzyklus wurden die Mausschädel entnommen und zur mikroskopischen Beurteilung vorbereitet (siehe C 7) . Das Material wurde in Formaldehyd fixiert, mittels EDTA entkalkt und anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. Nach der Einbettung in Paraffin wurden die Organe in 2 µm dünne Scheiben geschnitten, mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und lichtmikroskopisch betrachtet.

In der histologischen Untersuchung des Nasengewebes nach der Immunisierung mit OMV zeigte sich eine physiologische Struktur der Mukosa (siehe Abbildung D 4). Es konnte keine Infiltration von Granulozyten gesehen werden. Es befanden sich keine Gewebnekrosen oder Ulzerationen auf den Präparaten. Ebenso wenig konnte eine Hyperämie der Blutgefäße festgestellt werden. Die Nasenhöhlen waren frei von entzündlichem Exsudat, welches im Rahmen einer Affektion des Nasenepithels von Drüsenzellen produziert

## D Ergebnisse

werden kann. Insgesamt bot sich somit kein Anhalt für eine lokale Toxizität der OMV-Impfung. Die mit Kochsalz geimpften Kontrollmäuse zeigten ebenfalls eine gesunde Nasenschleimhaut (siehe Abbildung D 4).

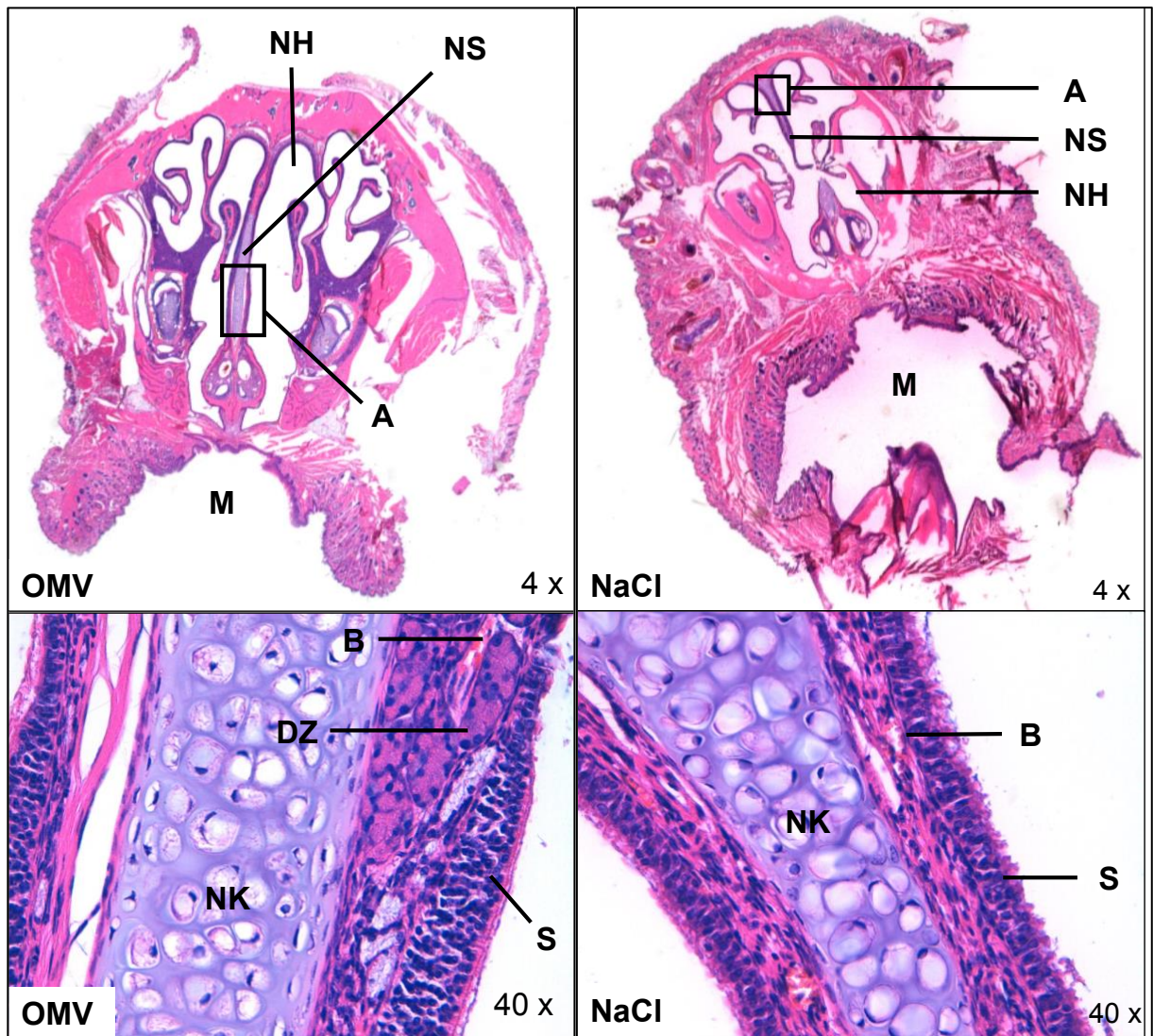


Abb. D 4 Repräsentative Histopathologie des Hämatoxylin- und Eosin-gefärbten Nasengewebes von BALC/c-Mäusen nach intranasaler Immunisierung mit OMV des Referenzstamms CFT (linke Bildhälfte) oder Kochsalz als Kontrolle (rechte Bildhälfte). Das obige Bild als vierfache Vergrößerung, das untere Bild als 40-fache Vergrößerung des umrahmten Ausschnitts (A). In beiden Gruppen zeigte sich eine physiologische Struktur der Nasenschleimhaut ohne Infiltration von Entzündungszellen, Nekrose, Hyperämie oder entzündlichem Exsudat. A = Ausschnitt, B = Blutgefäß, DZ = Drüsenzellen, M = Mundhöhle, NaCl = Kochsalz, NH = Nasenhöhle, NK = Nasenknorpel, NS = Nasenseptum, S = nasale Schleimhaut.

## E Diskussion

Nosokomiale Infektionen mit gram-negativen Erregern bedrohen täglich das Leben von Patienten in Europa und weltweit. Die häufigsten Krankenhausinfektionen durch gram-negative Bakterien (GNB) sind Harnwegsinfekte, Pneumonien und Sepsis (Cassini et al. 2016). Eine schnelle und effektive Antibiotikatherapie führt zu einer deutlichen Reduktion von Mortalität und Morbidität durch diese Infektionen. Gleichzeitig wird die wirksame Behandlung von nosokomialen Infektionen durch GNB zunehmend erschwert durch die Entstehung und Verbreitung von resistenten Bakterien bei gleichzeitig fehlenden neuen antibiotischen Substanzen (Petty et al. 2014, Canton et al. 2012). Neue Strategien im Kampf gegen Krankenhausinfektionen mit GNB sind daher dringend erforderlich. Neben Antibiotika gehören Impfungen zu den erfolgreichsten medizinischen Interventionen gegen Infektionserkrankungen (Vaccines work 2018). Eine wirksame und effektive Vakzinierung könnte einen wichtigen Beitrag gegen die Bedrohung durch nosokomiale Infektionen mit resistenten GNB leisten.

Außenmembranvesikel (OMV von engl. *outer membrane vesicle*) werden konstant von GNB produziert und präsentieren native Antigene auf ihrer Oberfläche (Beveridge 1999, Kulp und Kuehn 2010). Durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs von engl. *pathogen-associated molecular patterns*) in ihrer Membran stimulieren sie das Immunsystem und induzieren eine humorale wie zelluläre Immunantwort (van der Pol et al. 2015). OMV-basierte Vakzine werden klinisch bereits erfolgreich gegen Meningokokken der Gruppe B eingesetzt (Watson und Turner 2016), im Tiermodell wurden einige weitere Impfungen erprobt (Bottero et al. 2016, Liu et al. 2017, Stevenson et al. 2018). In dieser Arbeit sollte die Immunogenität einer Vakzinierung mit bakteriellen OMV von GNB als Verursacher nosokomialer Infektionen im Mausmodell untersucht und mit der

## E Diskussion

Immunantwort von Patienten verglichen werden. Erstens wurden Labormäuse mit OMV dreier gram-negativer Bakterienisolate von Patienten und einem *E. coli*-Referenzstamm intranasal geimpft und die Immunantwort charakterisiert. Zweitens wurde die Immunreaktion in den Seren der entsprechenden Patienten untersucht und verglichen. Drittens wurde die Verträglichkeit der OMV-gestützten Vakzinierung durch die histopathologische Untersuchung der Nasenschleimhaut intranasal immunisierter Versuchstiere evaluiert.

## **E 1. Diskussion der Methode**

Gute Impfstoffe sind in der Lage eine spezifische und schützende Immunität gegen Infektionserkrankungen zu induzieren. Für eine erfolgreiche Entwicklung von Vakzinen spielen präklinische Testungen im Tiermodell eine wichtige Rolle. Innerhalb der kontrollierten Bedingungen von Tiermodellen kann die Immunogenität einer Impfung näher charakterisiert werden. Wichtige Informationen wie Dosis, Impfplan, Verabreichungsweg und Kombination mit Adjuvanzen können untersucht werden. Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit eine intranasale OMV-basierte Impfung gegen GNB im Mausmodell evaluiert werden. Um im Rahmen dieser als Pilotstudie ausgelegten Analyse Daten über die breite Einsetzbarkeit des Verfahrens zu erhalten, wurden nicht eine, sondern acht dezent unterschiedliche Impfstoffformulationen eingesetzt und untersucht: Die OMV dreier Patientenisolat und die des Referenzstamms, jeweils zum einen als reine OMV-Impfstofflösung und zum anderen als Cholera-toxin (CT) adjuvantierte OMV-Lösung.

Trotz der Wichtigkeit der Aussagen aus präklinischen Studien ist durch die Evaluation einer Vakzinierung im Tiermodell allein oft keine sichere Vorhersage von Immunogenität und Wirksamkeit im Menschen möglich (Davis 2008). Diese Einschränkungen in der Übertragbarkeit der Ergebnisse von der Maus auf den Menschen sind in speziesspezifischen Unterschieden der Immunsysteme begründet (Jameson und Masopust 2018, Mestas und Hughes 2004). Um eine Wirkung der OMV-basierten Impfung im Menschen abzuschätzen, wurde die Immunantwort derjenigen Patienten untersucht, die eine Infektion mit den zur Impfstoffproduktion eingesetzten Bakterien überlebt hatten.

Die humorale Immunantwort gilt als der wichtigste Mechanismus in der Abwehr von bakteriellen Pathogenen (Twigg 2005). Sie basiert auf Antikörpern produziert von Plasmazellen. Patienten mit einer eingeschränkten humoralen



Immunantwort und Antikörpermangelsyndromen, insbesondere IgG-Mangel, sind anfällig für wiederkehrende, schwere bakterielle Infektionen (Siber et al. 1980, Barton et al. 2016, Yamazaki et al. 2018). Daher ist der Nachweis der Bildung von spezifischen Antikörpern wichtiger Bestandteil der Impfstoffentwicklung. Zur Untersuchung der humoralen Immunantwort in der Maus nach Impfung und im Menschen nach Infektion kamen in dieser Arbeit verschiedene Immunoassays zum Einsatz (ELISA, Western Blot, Immunofluoreszenzmikroskopie, Fluoreszenzassay). All diese Tests messen auf unterschiedliche Art und Weise das Vorhandensein bakterienspezifischer Serumantikörper. In dieser Arbeit wurde der IgG-Subtyp bestimmt (im ELISA auch IgM). Die unterschiedlichen Tests erlauben unterschiedliche Aussagen und helfen so bei der näheren Charakterisierung der Immunantwort. Der ELISA findet als Test oft Anwendung in der Beurteilung von Immunität nach Impfung. Durch die indirekte Markierung der Antikörper erreicht er eine hohe Sensitivität bei schneller Durchführbarkeit und erlaubt eine Quantifizierung der totalen Antikörper. Der Western Blot verfügt durch den Elektrophoreseschritt über eine hohe Spezifität und erlaubt eine Beurteilung der molekularen Masse der von den Immunoglobulinen gebundenen Proteine. Die Immunofluoreszenzmikroskopie liefert Informationen über die Lokalisation der Antigene auf dem Bakterium. Alle drei Verfahren wurden im Mausmodell angewandt, um die IgG-Antikörper (im ELISA auch IgM) zu untersuchen, die sich im Laufe der Impfung gebildet haben. Im Patientenserum wurden die nach der Infektion formierten Immunoglobuline untersucht. Problematisch ist, dass bei diesen Assays die Antigene teilweise in denaturierter Form vorliegen. Im ELISA bestand das beschichtete Antigen aus hitzeinaktivierten Bakterien, im Western Blot denaturierten die Chemikalien SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol die Proben. Bei der Immunofluoreszenzmikroskopie ist eine Fixierung der Bakterien mit Formalin nötig. Bei dieser Methode kommt es ebenfalls zu einer partiellen Denaturierung der Antigene durch Quervernetzung der Proteine bei



erhaltener Sekundär-/Tertiärstruktur (Mason und O'Leary 1991, Thavarajah et al. 2012). Die Mäuse jedoch wurden mit nativen OMV geimpft. Auch bei der Infektion im Patienten waren die bakteriellen Antigene in nativer Konformation präsent. Komplexe Strukturen wie bakterielle Membranen oder OMV bestehen aus vielen verschiedenen Antigenen mit unterschiedlichen Epitopen. Antikörper richten sich gegen lineare Epitope oder native Konformationsepitope (Sela et al. 1967, Thornton et al. 1986, Rubinstein et al. 2008, Forsström et al. 2015). Durch die Denaturierung in ELISA, Western Blot oder der Immunofluoreszenzmikroskopie besteht die Möglichkeit des Verlusts immunogener Konformationsepitope. Daher wurde zusätzlich der Fluoreszenzassay durchgeführt. Er erlaubte zum einen die Quantifizierung des in der Mikroskopie nur qualitativ vorhandenen Fluoreszenzsignals. Zum anderen werden die nativen Antigene der vitalen Bakterien mit den Antikörpern konfrontiert. Es kommt zu keiner Denaturierung und somit nicht zum Verlust von Konformationsepitopen. Gleichzeitig zeigte der Fluoreszenzassay in dieser Arbeit deutlich höhere Standardabweichungen als der ELISA bei der Quantifikation der Antikörper, obwohl stets mit der gleichen Menge an Material gearbeitet wurde. Dieser Nachteil ergibt sich möglicherweise aus der Arbeit mit vitalen Bakterien. Bei der Durchführung dieses Tests wurden die Proben stets bei 4 °C verarbeitet, um bakterielle oder enzymatische Aktivitäten zu reduzieren, die mit dem Signal oder der Bindung wechselwirken könnten. Gleichzeitig ist der Metabolismus vieler Bakterien auch bei deutlich tieferen Temperaturen noch tätig (Price und Sowers 2004). Bakterielle Enzyme könnten demnach zur Degradation von Antikörpern führen und so die Detektion variabel abschwächen (Ryan et al. 2008). Durch diese Einschränkung kann der Fluoreszenzassay den robusteren ELISA für die Quantifikation der Antikörper nicht ersetzen.

Insgesamt konnte durch den Einsatz dieser vier Methoden die Immunantwort breit charakterisiert werden. Obwohl einige OMV-Vakzin Studien eine

## E Diskussion

Korrelation zwischen totaler Antikörperantwort, gemessen durch unterschiedliche Assays, und einer protektiven Wirkung nachgewiesen haben (Baker et al. 2017, Pajon et al. 2015, Nieves et al. 2011), beweisen die hier durchgeführten Messungen keine Schutzwirkung. Gleichzeitig war Ziel dieser Arbeit die Immunantwort der Maus nach Impfung zu charakterisieren, nicht eine protektive Wirkung der Impfung nachzuweisen. Kommende Studien sollten darauf abzielen die Protektion durch Impfung in murinen Infektionsmodellen zu untersuchen. Dies stellt einen weiteren Schritt in Richtung der Entwicklung einer OMV-basierten intranasalen Impfung gegen GNB dar. Außerdem könnten wertvolle Informationen über die Funktionalität der Immunantwort durch den Nachweis neutralisierender Antikörper oder opsonophagozytischer Aktivität erbracht werden.

## **E 2. Diskussion der Ergebnisse**

In dieser Studie wurde eine OMV-basierte Impfung gegen GNB im Mausmodell getestet. Die Immunogenität der Vakzinierung wurde im Mausmodell untersucht und mit der Immunantwort von Patienten nach Infektion verglichen. Eine wirksame, sichere und kosteneffektive OMV-basierte Impfung gegen GNB wäre auf verschiedene Arten wertvoll.

Erstens könnte sie prophylaktisch gegen nosokomiale Infektionen durch gram-negative Erreger eingesetzt werden. Wichtige Risikofaktoren für das Erwerben einer nosokomialen Infektion sind bekannt, beispielsweise Diabetes mellitus (Erben et al. 2013), invasive Beatmung (Ramirez et al. 2012) oder der Aufenthalt auf einer Intensivstation (Vincent 2003). Risikopatienten könnten somit identifiziert und geimpft werden. Dies könnte die Morbidität und Mortalität durch Krankenhausinfektionen in öffentlichen Gesundheitseinrichtungen senken und die anfallenden Kosten reduzieren.

Zweitens könnte eine OMV-basierte Impfung im besonderen Fall eines Ausbruchs von nosokomialen Infektionen wertvoll sein. Krankenhausinfektionen mit GNB können im Rahmen von Ausbrüchen auftreten. Die Suche in einer Datenbank für in der Literatur publizierte Ausbrüche nosokomialer Infektionen ergab für die in dieser Studie eingesetzten Bakterien 245 gut dokumentierte Ausbruchsgeschehen weltweit (<https://www.outbreak-database.com>, Website des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Datum der Abfrage: 22.06.2020). Die Herstellung einer OMV-basierten Impfung gegen GNB hat Vorteile gegenüber anderen Produktionsverfahren. Durch die Isolation der Vesikel mittels Ultrazentrifugation gelingt die Vakzinentwicklung besonders schnell im Vergleich zur deutlich langsameren Herstellung rekombinanter Impfstoffe oder Multiepitopvakzinen. Gelingt die Isolation des verursachenden Erregers, besteht die Möglichkeit der schnellen Entwicklung einer OMV-basierten Vakzine, wie bereits von McConnell und Kollegen vorgeschlagen

(McConnell et al. 2011). Die schnelle Herstellung einer OMV-basierten Impfung könnte auf diese Weise einen Ausbruch nosokomialer Infektionen mit einem GNB eindämmen oder verhindern.

Drittens könnte eine OMV-basierte Vakzine einen wichtigen Beitrag im Kampf gegen die zunehmende Antibiotikaresistenzentwicklung leisten. Eine Hauptursache der zunehmenden Resistenzentwicklungen liegt im erhöhten Einsatz von Antibiotika. Zahlreiche Studien konnten eine positive Korrelation zwischen einer vermehrten Anwendung von Antibiotika und dem Entstehen von resistenten Erregern nachweisen (Lipsitch 2001, Deeks et al. 1999, Melander et al. 2000, Bronzwaer et al. 2002). Eine OMV-basierte Impfung gegen GNB verhindert prophylaktisch eine Infektion in den geimpften Individuen. Bei hohen Impfraten können auch Ungeimpfte durch den Effekt der Herdenimmunität vor Infektion geschützt werden. Insgesamt sinkt dadurch die Notwendigkeit für den Einsatz antimikrobieller Substanzen. Wie von Jansen und Kollegen vorgeschlagen (Jansen et al. 2018), können Impfungen auf diese Art dem weiteren Entstehen und der Verbreitung multiresistenter Organismen Einhalt gebieten. So kam es beispielsweise nach der Einführung der 13-valenten Vakzine gegen Pneumokokken im Jahr 2010 zu einer deutlichen Reduktion des Auftretens invasiver Infektionen durch Penicillin-resistente Pneumokokken in den USA (Tomczyk et al. 2016).

Die humorale Immunantwort ist essenziell bei der Abwehr systemischer bakterieller Infektionen. Daher wurde die Antikörperantwort im Serum von Mäusen nach Impfung bzw. Patienten nach Infektion über verschiedene Verfahren nachgewiesen.

Alle OMV immunisierten Mäuse bildeten durch die zweifach intranasale Immunisierung eine signifikante Menge bakterienspezifischer IgG- und IgM-Antikörper. Die IgG-Antikörper waren zum einen in der Lage denaturierte Antigene zu binden, wie im ELISA und Western Blot nachweisbar (siehe D 2.1

bzw. D 2.2). Zum anderen konnte eine Erkennung nativer Epitope vitaler Bakterien im Fluoreszenzassay nachgewiesen werden (siehe D 2.4). Wie erwartet nach einer Vakzinierung mit OMV, konnte mittels Immunofluoreszenzmikroskopie die Antigen-Antikörper-Reaktion an der bakteriellen Membran lokalisiert werden (siehe D 2.3). Ausschließlich an der bakteriellen Oberfläche befindliche Antigene können durch zirkulierende Antikörper gebunden werden. Durch eine Impfung gebildete Antikörper bekämpfen die systemische Infektion durch Bakterien über mehrere Mechanismen. Erstens können sie durch Binden bakterieller Virulenzfaktoren wie Fimbrien oder Adhäsine die Interaktion dieser wichtigen Moleküle mit menschlichen Zellen blockieren. Zweitens markieren Antikörper Bakterien für Phagozyten im Rahmen der Opsonierung. Diese „Fresszellen“ können die Antikörper über Fc-Rezeptoren binden und die opsonierten Erreger verdauen. Drittens bewirkt die Bindung von Antikörpern eine Aktivierung des Komplementsystems. Faktoren des Komplementsystems können wiederum die Phagozytose durch Immunzellen erleichtern oder direkt eine Lyse des Bakteriums bewirken.

Die Coomassie-Färbung nach gelelektrophoretischer Auftrennung der verschiedenen Bakterienlysate und OMV ergab ein unterschiedliches Proteinprofil beider (siehe D 1.1). Dies bestätigt zum einen, dass die OMV-Herstellung valide ist und die Impfstofflösungen frei von Bakterien sind. Zum anderen konnten Proteine bestimmter Molekularmasse sowohl in den Vesikeln als auch in den Ganzzelllysaten nachgewiesen werden. Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei diesen Proteinen um Bestandteile der bakteriellen Außenmembran. Wie von Bonnington und Kuehn zusammengefasst (Bonnington und Kuehn 2014), können OMV-Proteine in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Erstens sind bestimmte Proteine in gleichen Mengen in der bakteriellen Außenmembran und OMV vorhanden (Olofsson et al. 2010). Zweitens sind einige Proteine in den OMV angereichert (Yokoyama

et al. 2000). Drittens ist die Existenz von Proteinen beschrieben, die nicht OMV-assoziiert sind (McMahon et al. 2012). Und viertens wurden Proteine aufgefunden, die ausschließlich in den OMV und nicht auf der Bakterienmembran vorhanden sind (Elhenawy et al. 2014). Die Immunantwort nach einer OMV-basierten Impfung sollte sich idealerweise gegen Proteine der ersten oder zweiten Kategorie richten. Die gebildeten Antikörper wären in der Lage bakterielle Strukturen zu binden und so vor einer Infektion zu schützen. Die Proteine dieser Kategorien werden in folgendem als OMV-assoziierte Proteine bezeichnet. Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, wurde der Immunoblot durchgeführt.

Im Western Blot konnte die Immunogenität der Vakzine in der Maus weiter charakterisiert werden. Nach zweifach intranasaler Immunisierung mit OMV konnten in allen Gruppen im Western Blot Antikörper gegen unterschiedliche Proteine detektiert werden (siehe D 2.2). Diese sind sowohl in den OMV vorhanden als auch in den Ganzzelllysaten der Bakterien. Es handelt sich wahrscheinlich um Proteine der bakteriellen Außenmembran, kongruent zu den Ergebnissen in der Immunofluoreszenzmikroskopie. Sichtbar an der unterschiedlichen Anzahl von Banden und der Bandenstärke werden bei den jeweiligen Impfgruppen (OMV A, OMV B etc.) variabel viele Antigene durch Antikörper gebunden. Eine robuste Antikörperantwort gegen mehrere Proteine eines Bakteriums statt gegen ein einziges Protein kann ein wichtiger Bestandteil wirksamer Impfungen sein. Die Abhängigkeit der Expression bestimmter bakterieller Membranproteine von der Wachstumsphase ist schon lange bekannt (Gallot-Lavallee et al. 1995, Schnaitman 1974). Außerdem können Bakterien während der Infektion immunogene Antigene unterexprimieren (Crother et al. 2004, Hennig et al. 1999). Darüber hinaus werden Proteine der bakteriellen Membran herunterreguliert, wenn Bakterien Antibiotikaresistenzen erwerben (Yao et al. 2018, Lin et al. 2010). Eine Immunantwort wäre demnach effektiver, wenn sie sich gegen mehrere

Antigene richtet statt gegen ein einziges. Nach allen intranasalen Impfungen konnten mehrere Banden und somit eine breite Antikörperantwort gegen mehrere Proteine detektiert werden, mit Ausnahme von OMV C. Hier richteten sich die Antikörper prädominant gegen ein Protein. In der Coomassie-Färbung waren jedoch mehrere OMV-assoziierte Proteine bei Bakterium C nachweisbar. Diese weiteren OMV-assoziierten Proteine waren somit in dem Impfschema dieser Arbeit nicht ausreichend immunogen. Unterschiedliche Lösungsansätze für diesen Fall wären denkbar. Zum einen könnte die Impfdosis erhöht oder weitere Nachimpfungen durchgeführt werden. Die intranasale Applikation der Vakzine macht dies unkompliziert möglich. Zum anderen könnten die OMV-assoziierten Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert und durch gentechnische Methoden in den OMV überexprimiert werden, um eine ausreichende Immunantwort zu erzeugen. Koeberling und Kollegen konnten auf diese Art nachweisen, dass es nur nach einer zehnfachen Überexprimierung des Proteins fHbp in den OMV zu einer wirksamen Immunantwort nach OMV-Impfung kommt (Koeberling et al. 2011). In diesem Zusammenhang ist jedoch zu bedenken, dass mit einer höheren Anzahl von antigenen Strukturen und einer weiteren Verstärkung der Immunantwort die Impfung schlechter verträglich sein könnte im Sinne von Impfkomplicationen durch Kreuzreaktionen gegen humane Proteine oder gegen Antigene des physiologischen Mikrobioms (Rojas et al. 2018).

Die intranasale Vakzinierung mittels OMV unter Einsatz verschiedener Bakterien führte im Mausmodell zu einer signifikanten humoralen Immunantwort im Serum. Auffällig war die deutliche Variabilität der Antikörperantwort im quantitativen ELISA. Neben der im Western Blot nachgewiesenen unterschiedlichen Immunogenität der OMV-Proteine könnte die intranasale Applikation der Impfung eine Ursache dieser hohen Variabilität sein. Im Vergleich zum traditionellen parenteralen Verabreichungsweg sind

intranasale Impfungen deutlich schwerer zu standardisieren. Nach der intranasalen Gabe befindet sich der Impfstoff auf der Oberfläche der Nasenschleimhaut. Durch Interaktion mit dem mukosalen Immunsystem kommt es zur Ausbildung der lokalen und systemischen Immunantwort. Gleichzeitig sorgen effektive Strukturen wie beispielsweise die Kinozilien des Nasenepithels für eine frühzeitige Entfernung von Fremdpartikeln wie des Vakzins aus der Nase. Es ist unklar, wie viel Impfstoff letztlich tatsächlich im jeweiligen Individuum an der Nasenschleimhaut verbleibt und wie viel verschluckt, aspiriert oder wieder herausgeniest wird. In anderen Versuchen konnten aus diesen Gründen nach intranasalen OMV-Immunisierungen mit anderen Bakterien nur sehr schwache bis keine Immunantworten detektiert werden. Gleichzeitig bietet ein intranasaler Verabreichungsweg auch zahlreiche Vorteile gegenüber klassischen parenteralen Impfungen. Erstens sind intranasale Immunisierungen in Human- und Tiermedizin sicher durchführbar, da keine Nadeln zum Einsatz kommen. Dies reduziert die Gefahr für Nadelstichverletzungen und folgend für Infektionen mit Hepatitis B, C oder HIV. Zweitens können intranasale Vakzine zur schnellen Impfung und Nachimpfung großer Gruppen eingesetzt werden, da kein geschultes medizinisches Personal nötig ist. Beide Aspekte sind insbesondere von Vorteil für Länder mit schlechterer medizinischer Versorgung. In diesen Regionen ist eine OMV-basierte intranasale Impfung besonders interessant, da für einige OMV-Impfungen Hitzestabilität nachgewiesen wurde (Norheim et al. 2015, Bishop et al. 2010) und somit nicht die Notwendigkeit einer aufwendigen Kühlkette besteht. Drittens sind nicht-invasive Vakzine schmerzlos verabreichbar und daher insbesondere attraktiv für sensible Patientengruppen wie beispielsweise Säuglinge, Kinder oder ältere Menschen. Viertens induziert eine intranasale Impfung neben einer systemischen auch eine mukosale Immunantwort. Dies verstärkt den Effekt der Impfung. Das mukosale Immunsystem enthält die größte Anzahl an Lymphozyten aller Gewebe. Die



Plasmazellen in Schleimhaut und Bindegewebe produzieren den Antikörper IgA, der einen wichtigen Bestandteil der mukosalen Immunabwehr darstellt. Eine effektive intranasale Impfung kann über die Auslösung einer lokalen Immunantwort die Kolonisation mit Pathogenen verhindern und vor einer invasiven Infektion schützen. Nach intranasaler OMV-Impfung mit dem in dieser Arbeit eingesetzten Referenzstamm CFT kam es nicht zur Produktion signifikanter Level des Antikörpers IgA in den Vaginalsekreten und im Serum geimpfter Mäuse. Unterschiedliche Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass eine intranasale Immunisierung mit OMV der Erreger *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis* und *Vibrio cholerae* sowohl eine systemische wie lokale Antikörperantwort produziert und vor mukosaler Kolonisation bzw. Infektion schützt (Roake et al. 2003, Roberts et al. 2008, Schild et al. 2008). Insgesamt stehen dem Nachteil der schlechten Standardisierbarkeit zahlreiche Vorteile gegenüber. Weitere Studien zu Impfstoffformulationen, mukosaler Adhäsion der Antigene und Interaktion mit dem Immunsystem sind nötig, um die Standardisierbarkeit intranasaler OMV-basierter Impfungen zu verbessern.

Adjuvanzien sind potente Bestandteile zahlreicher Impfungen. Sie verstärken den Impferfolg durch eine verbesserte Erkennung und Prozessierung der Antigene durch die Immunzellen. Derzeit werden bei parenteralen Impfstoffen im Menschen die beiden exzellent verträglichen Wirkstoffe Alum (Aluminiumhydroxid) und die Öl/Wasser-Emulsion MF59 eingesetzt. Für mukosale Vakzine hingegen sind nur wenige Adjuvanzien für Menschen zugelassen. CT ist ein hochpotentes intranasales Adjuvanz im Tiermodell und findet Anwendung in vielen Impfstudien. Im Menschen ist CT nicht anwendbar auf Grund seiner hohen Toxizität. Auch in der Maus wurde nach intranasaler Applikation von CT ein Transport in den Hypothalamus und eine konsekutive Entzündungsreaktion im Gehirn festgestellt (Armstrong et al. 2005). Ein weiteres vielversprechendes Adjuvanz war das hitzelabile Enterotoxin (LT)

von *E. coli*. Nach dem Auftreten von Nebenwirkungen wie fazialer Parese nach Einsatz einer LT-unterstützten intranasalen Influenzaimpfung im Menschen wird dieses Adjuvanz nicht mehr eingesetzt (Mutsch et al. 2004). Dementsprechend bestehen gegenüber zahlreichen mukosalen Hilfsstoffen begründete Sicherheitsbedenken. Darüber hinaus können Adjuvanzen in bestimmten Fällen die Immunantwort gegenüber dem eigentlichen Zielantigen verschlechtern oder eine Immuntoleranz induzieren. Dies gilt auch für CT (Sun et al. 2010, Wu und Russel 1994). Eine unadjuvantierte Impfung hätte Vorteile bezüglich der Sicherheitsbedenken und eventuell der Immunogenität. Zu den natürlichen Bestandteilen von OMV gehören zahlreiche PAMPs wie beispielsweise LPS, Lipoproteine und andere Außenmembranproteine. Über die Bindung an verschiedene Toll-like Rezeptoren stimulieren die PAMPs in den OMV eine Immunreaktion des Körpers (Raeven et al. 2016, Lee et al. 2018). OMV können somit als potente Adjuvanzen eingesetzt werden (Pritsch et al. 2016) und besitzen selbstadjuvantierende Eigenschaften (Alaniz et al. 2007). Ist der Einsatz eines zusätzlichen Adjuvanz nötig bei OMV-basierten Impfungen? Um diese Frage zu adressieren, wurden in der vorliegenden Arbeit die jeweiligen Impfungen sowohl als reine OMV-Lösung, als auch als CT adjuvantierte OMV-Lösung eingesetzt. Der Effekt des Adjuvanz variierte in den unterschiedlichen Gruppen (siehe D 2.1). Nach Impfung mit OMV A und OMV B verstärkte die Zugabe von CT die Immunantwort signifikant, wohingegen es bei OMV C zu einer signifikanten Abschwächung kam. Für OMV CFT war kein signifikanter Unterschied feststellbar. Aus den Ergebnissen dieser Studie lässt sich kein eindeutiger Trend für eine Überlegenheit einer adjuvantierten OMV-Impfung feststellen. Darüber hinaus wird klar, dass die Immunantwort auf eine bestimmte OMV/Adjuvanz Kombination nicht ohne Weiteres auf andere OMV/Adjuvanz Kombinationen extrapoliert werden kann. Vor dem Hintergrund der Sicherheitsbedenken gegenüber mukosalen Adjuvanzen und der selbstadjuvantierenden

## E Diskussion

Eigenschaften der OMV sollten bei der Entwicklung OMV-basierter Impfstoffe derweil unadjuvantierte Vakzine bevorzugt werden.

In der vorliegenden Arbeit erzeugte eine intranasale OMV-basierte Vakzine gegen verschiedene GNB eine signifikante IgG- und IgM-Antikörperantwort im Mausmodell. Um Aussagen über eine eventuelle Immunogenität dieser Impfung im Menschen zu treffen, wurde die Immunantwort derjenigen Patienten untersucht, aus denen die Bakterienisolate zur Impfstoffproduktion gewonnen wurden. Betreffende Patienten hatten eine Infektion mit den Bakterien A, B oder C erlitten und überlebt. Neben der antibiotischen Therapie spielten hierbei auch Faktoren des Immunsystems eine Rolle. Bestimmte Antikörper aus der Gesamtmenge aller zirkulierenden Antikörper im Blut der Patienten waren vermutlich in der Lage die Bakterien zu binden und die Infektion zu überwinden. Binden diese Antikörper nicht nur die Bakterien, sondern auch die zur Impfung eingesetzten OMV, könnte eine OMV-basierte Impfung auch im Menschen immunogen sein. Sowohl im ELISA (siehe D 3.1), als auch im Western Blot (siehe D 3.2) konnten IgG-Antikörper nachgewiesen werden, die sowohl Antigene in den Bakterienlysaten als auch in den OMV binden konnten. Mittels der Immunofluoreszenzmikroskopie konnten Antigene, gegen die eine Reaktion bei den infizierten Patienten erfolgte, auf der bakteriellen Membran lokalisiert werden. Gleichzeitig war die Reaktion gegen die Bakterienisolate signifikant stärker als die gegen die OMV, bei sonst vergleichbarer Menge. In den OMV ist dementsprechend nur ein Teil aller immunogenen Antigene präsent. Dieses Ergebnis ist kongruent zur Profilanalyse der Proteine in der Coomassie-Färbung. Ein Schwachpunkt dieses Ansatzes liegt zum einen darin, dass kein Präinfektionsserum der Patienten vorhanden war. Somit konnte nicht zwischen präformierten Antikörpern und spezifisch durch die Infektion induzierten Antikörpern unterschieden werden. Zum anderen stand kein Serum eines mit dem

Referenzstamm CFT infizierten Patienten zur Verfügung. Letztlich bleibt offen, ob eine OMV-basierte Impfung gegen GNB zu einer Immunogenität im Menschen führt. Nach dem Abschluß der präklinischen Impfstoffentwicklung müssen klinische Studien diese Frage klären, bevor eine OMV-basierte Vakzine breit angewendet werden kann.

Die Evaluation von Verträglichkeit ist unerlässlicher Bestandteil präklinischer Impfstoffentwicklung. Sicherheitsbedenken zielen zum einen auf die Möglichkeit einer eigenen Toxizität des Produkts oder zum anderen auf denkbare Nebenwirkungen durch die ausgelöste Immunantwort ab. Insbesondere bei OMV-basierten Vakzinen ist die Untersuchung auf eine Toxizität sehr wichtig. OMV schnüren sich von der bakteriellen Außenmembran ab. Diese enthält hohe Mengen von LPS. Dementsprechend sind LPS auch Hauptbestandteil der OMV (Haurat et al. 2011). LPS gehören zur Familie der PAMPs. Wie andere PAMPs werden LPS von Immunzellen erkannt und erzeugen eine Immunreaktion. Sie werden daher auch als Endotoxine bezeichnet. LPS sind wichtig für die Initiation der Immunantwort bei OMV-basierten Impfungen (van der Ley und van den Dobbelsteen 2011). Gleichzeitig wirken LPS auf diese Weise aber auch als proinflammatorische Endotoxine. Über die Bindung an den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) kommt es zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems und zur Auslösung einer starken Entzündungsreaktion bis hin zum septischen Schock und Tod (Ryu et al. 2017, Raetz und Whitfield 2002). LPS als Bestandteil der OMV könnte daher nach Impfung zu Toxizität führen und die Sicherheit einer OMV-basierten Impfung einschränken. Park und Kollegen haben gezeigt, dass die intraperitoneale Injektion von OMV in der Maus zu einer systemischen Inflammation führt (Park et al. 2010). Eine Lösung aus diesem Dilemma bestand im Einsatz von Detergenzien, um LPS aus den Vesikeln herauszulösen und damit den LPS Gehalt der OMV zu reduzieren (Claassen

et al. 1996, Quakyi et al. 1977). Durch die Extraktion verlieren die OMV jedoch nicht nur LPS, sondern auch immunogene Lipoproteine. Dieser Verlust antigener Eigenschaften wirkt sich wiederum negativ auf die Immunogenität des Impfstoffs aus (van der Ley und van den Dobbelsteen 2011). Gentechnische Veränderungen der zur OMV-Produktion eingesetzten Bakterien sind bereits erfolgreich eingesetzt worden, um den LPS-Gehalt und somit die Toxizität durch OMV zu verringern (Lee et al. 2009, Kim et al. 2009). Darüber hinaus konnten mittels zum einen chemischer, zum anderen gentechnischer Methoden Bakterien so modifiziert verändert werden, dass sie weniger toxische, aber dennoch immunogene Isoformen von LPS exprimieren (Simpson und Trent 2019). Neuere Untersuchungen zum Effekt von LPS auf Säugetiere haben ergeben, dass die giftige Wirkung stark abhängig vom Wirkort zu sein scheint. Im Gegensatz zur systemischen Applikation scheint die mukosale Exposition gegenüber LPS nur eine geringe oder keine Toxizität zu verursachen. In verschiedenen Studien im Tiermodell konnten keine Schäden nach oraler Einnahme hoher LPS-Dosen gesehen werden (Oketani et al. 2001, Illyes et al. 2008, Taniguchi et al. 2009). Auch die Schleimhaut der ableitenden Harnwege zeigte sich als unempfindlich gegenüber LPS (Hedlund et al. 2001). Epitheliale Oberflächen scheinen insgesamt deutlich weniger sensitiv gegenüber LPS zu sein, da sie ohnehin mit zahlreichen GNB als Teil des mukosalen Mikrobioms kolonisiert sind (Marshall 2005). Dies macht den Einsatz einer mukosalen OMV-basierten Vakzine besonders interessant. Bereits in Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe konnten keine toxischen Nebenwirkungen nach intranasaler Immunisierung mit OMV des Referenzstamms CFT beobachtet werden (Pritsch et al. 2016). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Beobachtungen und gehen darüber hinaus. Nach intranasaler Impfung von Mäusen mit OMV aus vier unterschiedlichen GNB konnten weder Anzeichen lokaler noch systemischer Toxizität beobachtet werden. Ebenso wenig traten letale Verläufe oder akute

Schockreaktionen auf. Außerdem wurde die Nasenschleimhaut intranasal OMV-immunisierten Mäuse erstmals histopathologisch untersucht. Es fand sich kein Hinweis auf eine lokale Entzündungsreaktion. Insgesamt geben diese Ergebnisse Anhaltspunkte, dass der Einsatz intranasaler OMV-basierter Impfungen sicher sein könnte. Einschränkend ist hinzuzufügen, dass das Fehlen einer toxischen Nebenwirkung im Mausmodell nicht gleichbedeutend mit einer Sicherheit der Impfung im Menschen ist. Studien zur Verträglichkeit von OMV-Impfungen müssen den weiteren Entwicklungsprozess unabdingbar begleiten.

In dieser Arbeit konnte bewiesen werden, dass eine intranasale OMV-Impfung zu einer systemischen Antikörperantwort gegen die eingesetzten Bakterien führt. Diese Bakterien haben in Patienten schwere Infektionen verursacht. Gleichzeitig sind andere Stämme ihrer Art wichtige Kommensalen und Bestandteile des menschlichen Mikrobioms. Das Mikrobiom ist wichtig für die menschliche Gesundheit. Es übernimmt wichtige Stoffwechselfunktionen und ist unerlässlich für die Entwicklung und die Funktion unseres Immunsystems. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen zahlreiche Verbindungen zwischen Veränderungen in der Mikrobiomzusammensetzung und der Entwicklung zahlreicher Krankheiten von allergischem Asthma (Trompette et al. 2014) über Diabetes (Qin et al. 2012) und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Imhann et al. 2018) bis hin zu Multipler Sklerose (Jangi et al. 2016) und Krebs (Lu et al. 2016), wenngleich viele dieser Studien Assoziationen und keine Kausalität nachgewiesen haben. Die Impfung in dieser Studie richtet sich gegen *E. coli*, *Enterobacter cloacae* und *Klebsiella pneumoniae* Stämme. Der Keim *E. coli* ist ein häufiger Kommensale der menschlichen Flora. Er wird in 61 % aller Stuhlmikrobiota von 242 gescreenten gesunden Probanden aufgefunden (Huttenhower et al. 2012). Gleichzeitig werden erhöhte Mengen von *E. coli* im Mikrobiom mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

(Fang et al. 2018) und Diabetes (Qin et al. 2012) in Verbindung gebracht. Auch *Enterobacter cloacae* lebt im Darm gesunder Menschen (Mezzatesta et al. 2012). Fei und Zhao berichteten einen Zusammenhang zwischen hohen Zahlen dieses Keims und der Entwicklung von Adipositas (Fei und Zhao 2013). Darüber hinaus wurden *Klebsiella pneumoniae* Spezies als Bestandteil der oralen Normalflora identifiziert. Eine Translokation dieser Bakterien von der Mundhöhle in den Dickdarm verursachte eine Inflammation des Colons (Atarashi et al. 2017). Insgesamt wird aus diesen Studien klar, dass eine eindeutige Zuordnung eines Bakteriums zu einem gesundheits- bzw. krankheitsfördernden Mikrobiombestandteil schwierig ist. Es gibt kein spezifisches Set von Bakterien, die ein gesundes Mikrobiom definieren (Huttenhower et al. 2012), da selbst zwischen gesunden Menschen eine große Variabilität der Mikroflora festzustellen ist (Qin et al. 2010). Trotzdem stellt sich die Frage, ob durch die Impfung dieser Arbeit ein toxischer Effekt auf die Kommensalen des Mikrobioms bewirkt werden kann. Während der Tierversuche konnten keine Nebenwirkungen beobachtet werden, die darauf hinweisen könnten wie beispielsweise Durchfall oder eine übermäßige Gewichtszunahme oder -abnahme bei den Versuchstieren. Möglicherweise verhindert die Etablierung einer Toleranz des Immunsystems gegenüber dem Mikrobiom eine unnötige Immunantwort gegen Antigene der kommensalen Bakterien (Geuking et al. 2011, Chassin et al. 2010). Darüber hinaus weisen Studien im Menschen daraufhin, dass es nach intranasaler Vakzinierung zu keiner Produktion von Antikörpern im Darm kommt (Johansson et al. 2004, Rudin et al. 1998). Ein genaueres Verständnis der Interaktionen zwischen dem Mikrobiom und dem Immunsystem ist nötig, um diese Frage beantworten zu können. Weitere Studien zu OMV-basierten Impfungen gegen fakultativ pathogene Bestandteile der menschlichen Flora müssen diesen Aspekt berücksichtigen.

## E Diskussion

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit die Immunogenität OMV-basierter Vakzine gegen GNB im Mausmodell. Nach intranasaler Applikation der OMV kam es zu einer systemischen Antikörperantwort gegen bakterielle Antigene. Eine ähnliche Antikörperantwort ließ sich auch im Serum von Patienten nachweisen, die eine Infektion mit den betreffenden Bakterien erlitten haben. Zusätzlich erwies sich die Impfung im Tiermodell als exzellent verträglich. Diese Ergebnisse unterstützen die Weiterentwicklung von OMV Impfstoffstrategien gegen GNB mit mukosalem Applikationsweg.



## **F Zusammenfassung**

Nosokomiale Infektionen mit gram-negativen Bakterien (GNB) stellen eine große Bedrohung für die öffentliche Gesundheit dar. Die wirksame Behandlung von nosokomialen Infektionen durch GNB wird zunehmend erschwert durch die Entstehung und Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien bei gleichzeitig fehlenden neuen antimikrobiellen Substanzen. Neue Strategien im Kampf gegen Krankenhausinfektionen mit GNB sind dringend erforderlich. Neben Antibiotika gehören Impfungen zu den erfolgreichsten medizinischen Interventionen gegen Infektionskrankheiten. Eine wirksame und effektive Vakzinierung könnte einen wichtigen Beitrag gegen die Bedrohung durch nosokomiale Infektionen mit resistenten GNB leisten. Außenmembranvesikel (OMV von engl. *outer membrane vesicle*) werden konstant von GNB produziert und präsentieren native Antigene auf ihrer Oberfläche. Durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster in ihrer Membran stimulieren sie das Immunsystem und induzieren eine humorale wie zelluläre Immunantwort. OMV-basierte Vakzine werden klinisch bereits gegen Meningokokken der Gruppe B eingesetzt, im Tiermodell wurden einige weitere Impfungen erfolgreich erprobt.

In dieser Arbeit wurde erstmals eine intranasale OMV-basierte Vakzine als breit einsetzbare Strategie gegen nosokomiale Infektionen mit GNB getestet. Die Immunogenität der Impfung wurde im Mausmodell untersucht und mit der Immunantwort von Patienten verglichen. Erstens wurden Labormäuse mit OMV dreier gram-negativer Bakterienisolate von Patienten und einem *E. coli*-Referenzstamm intranasal geimpft und die Immunantwort charakterisiert. Die Impfstoffe kamen sowohl als reine OMV-Lösung, als auch als Cholera-toxin adjuvantierte OMV-Lösung zum Einsatz. Zweitens wurde die Immunreaktion in den Seren der entsprechenden Patienten untersucht und verglichen.

Drittens wurde die Verträglichkeit der OMV-gestützten Vakzinierung durch die histopathologische Untersuchung der Nasenschleimhaut intranasal immunisierter Versuchstiere evaluiert.

Alle OMV immunisierten Mäuse bildeten durch die zweifach intranasale Immunisierung eine signifikante Menge bakterienspezifischer IgG- und IgM-Antikörper. Die Antikörper konnten sowohl denaturierte wie native Antigene binden. Die gebundenen Antigene wurden an der bakteriellen Außenmembran lokalisiert. Eine ähnliche Antikörperantwort ließ sich auch im Serum von Patienten nachweisen, die eine systemische Infektion mit betreffenden Bakterien erlitten haben. Nach intranasaler Impfung von Mäusen mit OMV aus vier unterschiedlichen GNB konnten weder Anzeichen lokaler noch systemischer Toxizität beobachtet werden. Die intranasale OMV-Impfung erwies sich somit als exzellent verträglich.

Diese Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Weiterentwicklung intranasaler OMV-Impfstoffstrategien gegen GNB als Verursacher nosokomialer Infektionen. Kommende Studien sollten darauf abzielen, die Protektion durch die intranasale OMV-Impfung in murinen Infektionsmodellen zu untersuchen, als nächster wichtiger Schritt der präklinischen Impfstoffentwicklung.

## G Literaturverzeichnis

**Alaniz, R. C., B. L. Deatherage, J. C. Lara and B. T. Cookson** (2007). "Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of Salmonella typhimurium that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo." *J Immunol* 179(11): 7692-7701.

**Armstrong, M. E., E. C. Lavelle, C. E. Loscher, M. A. Lynch and K. H. Mills** (2005). "Proinflammatory responses in the murine brain after intranasal delivery of cholera toxin: implications for the use of AB toxins as adjuvants in intranasal vaccines." *J Infect Dis* 192(9): 1628-1633.

**Atarashi, K., W. Suda, C. Luo, T. Kawaguchi, I. Motoo, S. Narushima, Y. Kiguchi, K. Yasuma, E. Watanabe, T. Tanoue, C. A. Thaiss, M. Sato, K. Toyooka, H. S. Said, H. Yamagami, S. A. Rice, D. Gevers, R. C. Johnson, J. A. Segre, K. Chen, J. K. Kolls, E. Elinav, H. Morita, R. J. Xavier, M. Hattori and K. Honda** (2017). "Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation." *Science* 358(6361): 359-365.

**Bachmann, M. F. and G. T. Jennings** (2010). "Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns." *Nat Rev Immunol* 10(11): 787-796.

**Baker, S. M., C. J. H. Davitt, N. Motyka, N. L. Kikendall, K. Russell-Lodrigue, C. J. Roy and L. A. Morici** (2017). "A Burkholderia pseudomallei Outer Membrane Vesicle Vaccine Provides Cross Protection against Inhalational Glanders in Mice and Non-Human Primates." *Vaccines* 5(4): 49-49.

**Barton, J. C., L. F. Bertoli, J. C. Barton and R. T. Acton** (2016). "Selective Subnormal IgG1 in 54 Adult Index Patients with Frequent or Severe Bacterial Respiratory Tract Infections." *J Immunol Res* 2016: 1405950-1405950.

**Beveridge, T. J.** (1999). "Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles." *J Bacteriol* 181(16): 4725-4733.

**Bishop, A. L., S. Schild, B. Patimalla, B. Klein and A. Camilli** (2010). "Mucosal immunization with Vibrio cholerae outer membrane vesicles provides maternal protection mediated by antilipoplysaccharide antibodies that inhibit bacterial motility." *Infect Immun* 78(10): 4402-4420.

**Bomberger, J. M., D. P. Maceachran, B. A. Coutermarsh, S. Ye, G. A. O'Toole and B. A. Stanton** (2009). "Long-distance delivery of bacterial virulence factors by Pseudomonas aeruginosa outer membrane vesicles." *PLoS Pathog* 5(4): e1000382-e1000382.

**Bonnington, K. E. and M. J. Kuehn** (2014). "Protein selection and export via outer membrane vesicles." *Biochimica et biophysica acta* 1843(8): 1612-1619.

**Bottero, D., M. E. Gaillard, E. Zurita, G. Moreno, D. S. Martinez, E. Bartel, S. Bravo, F. Carriquiriborde, A. Errea, C. Castuma, M. Rumbo and D. Hozbor** (2016). "Characterization of the immune response induced by pertussis OMVs-based vaccine." *Vaccine* 34(28): 3303-3309.

**Bronzwaer, S. L., O. Cars, U. Buchholz, S. Molstad, W. Goettsch, I. K. Veldhuijzen, J. L. Kool, M. J. Sprenger and J. E. Degener** (2002). "A European study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance." *Emerg Infect Dis* 8(3): 278-282.

**Bundesgesundheitsblatt** (2012). "Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen." *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 55(10): 1311-1354.

**Campos, E. A., J. Namikoshi, S. Maeba, M. Yamamoto, M. Fukumoto and H. Yamamoto** (2003). "Nasally administered cholera toxin A-subunit acts as a mucosal adjuvant." *J Oral Sci* 45(1): 25-31.

**Canton, R., M. Akova, Y. Carmeli, C. G. Giske, Y. Glupczynski, M. Gniadkowski, D. M. Livermore, V. Miriagou, T. Naas, G. M. Rossolini, O. Samuelsen, H. Seifert, N. Woodford and P. Nordmann** (2012). "Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe." *Clin Microbiol Infect* 18(5): 413-431.

**Cassini, A., L. D. Högberg, D. Plachouras, A. Quattrocchi, A. Hoxha, G. S. Simonsen, M. Colomb-Cotinat, M. E. Kretzschmar, B. Devleeschauwer, M. Cecchini, D. A. Ouakrim, T. C. Oliveira, M. J. Struelens, C. Suetens, D. L. Monnet, R. Strauss, K. Mertens, T. Struyf, B. Catry, K. Latour, I. N. Ivanov, E. G. Dobрева, A. Tambic Andrašević, S. Soprek, A. Budimir, N. Paphitou, H. Žemlicková, S. Schytte Olsen, U. Wolff Sönksen, P. Märtin, M. Ivanova, O. Lyytikäinen, J. Jalava, B. Coignard, T. Eckmanns, M. Abu Sin, S. Haller, G. L. Daikos, A. Gikas, S. Tsiodras, F. Kontopidou, Á. Tóth, Á. Hajdu, Ó. Guólaugsson, K. G. Kristinsson, S. Murchan, K. Burns, P. Pezzotti, C. Gagliotti, U. Dumpis, A. Liuimiene, M. Perrin, M. A. Borg, S. C. de Greeff, J. C. M. Monen, M. B. G. Koek, P. Elstrøm, D. Zabicka, A. Deptula, W. Hryniewicz, M. Caniça, P. J. Nogueira, P. A. Fernandes, V. Manageiro, G. A. Popescu, R. I. Serban, E. Schréterová, S. Litvová, M. Štefkovicová, J. Kolman, I. Klavs, A. Korošec, B. Aracil, A. Asensio, M. Pérez-Vázquez, H. Billström, S. Larsson, J. S. Reilly, A. Johnson and S. Hopkins** (2019). "Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis." *The Lancet Infectious Diseases* 19(1): 56-66.

**Cassini, A., D. Plachouras, T. Eckmanns, M. Abu Sin, H.-P. Blank, T. Ducomble, S. Haller, T. Harder, A. Klingeberg, M. Sixtensson, E. Velasco, B. Weiß, P. Kramarz, D. L. Monnet, M. E. Kretzschmar and C. Suetens** (2016). "Burden of Six Healthcare-Associated Infections on European Population Health: Estimating Incidence-Based Disability-Adjusted Life Years through a Population Prevalence-Based Modelling Study." *PLoS medicine* 13(10): e1002150-e1002150.

**Chassin, C., M. Kocur, J. Pott, C. U. Duerr, D. Gütle, M. Lotz and M. W. Hornef** (2010). "miR-146a Mediates Protective Innate Immune Tolerance in the Neonate Intestine." *Cell Host & Microbe* 8(4): 358-368.

**Chopra, I., C. Schofield, M. Everett, A. O'Neill, K. Miller, M. Wilcox, J.-M. Frère, M. Dawson, L. Czaplowski, U. Urleb and P. Courvalin** (2008). "Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: a consensus statement." *The Lancet Infectious Diseases* 8(2): 133-139.

## G Literaturverzeichnis

**Ciofu, O., T. J. Beveridge, J. Kadurugamuwa, J. Walther-Rasmussen and N. Hoiby** (2000). "Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*." *J Antimicrob Chemother* 45(1): 9-13.

**Claassen, I., J. Meylis, P. van der Ley, C. Peeters, H. Brons, J. Robert, D. Borsboom, A. van der Ark, I. van Straaten, P. Roholl, B. Kuipers and J. Poolman** (1996). "Production, characterization and control of a *Neisseria meningitidis* hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine." *Vaccine* 14(10): 1001-1008.

**Crother, T. R., C. I. Champion, J. P. Whitelegge, R. Aguilera, X.-Y. Wu, D. R. Blanco, J. N. Miller and M. A. Lovett** (2004). "Temporal analysis of the antigenic composition of *Borrelia burgdorferi* during infection in rabbit skin." *Infection and immunity* 72(9): 5063-5072.

**Davis, H. L.** (2008). "Novel vaccines and adjuvant systems: the utility of animal models for predicting immunogenicity in humans." *Hum Vaccin* 4(3): 246-250.

**Deeks, S. L., R. Palacio, R. Ruvinsky, D. A. Kertesz, M. Hortal, A. Rossi, J. S. Spika and J. L. Di Fabio** (1999). "Risk factors and course of illness among children with invasive penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. The *Streptococcus pneumoniae* Working Group." *Pediatrics* 103(2): 409-413.

**Elhenawy, W., M. O. Debelyy and M. F. Feldman** (2014). "Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into *Bacteroides* outer membrane vesicles." *MBio* 5(2): e00909-00914.

**Ellis, T. N. and M. J. Kuehn** (2010). "Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles." *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 74(1): 81-94.

**Erben, N., I. Ozgunes, F. Aksit, E. Doyuk Kartal, E. Colak and G. Usluer** (2013). "Healthcare-associated infections and the distribution of causative pathogens in patients with diabetes mellitus." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32(6): 821-825.

**Falagas, M. E., I. A. Bliziotis, S. K. Kasiakou, G. Samonis, P. Athanassopoulou and A. Michalopoulos** (2005). "Outcome of infections due to pandrug-resistant (PDR) Gram-negative bacteria." *BMC Infectious Diseases* 5(1): 24-24.

**Fang, X., J. M. Monk, S. Nurk, M. Akseshina, Q. Zhu, C. Gemmell, C. Gianetto-Hill, N. Leung, R. Szubin, J. Sanders, P. L. Beck, W. Li, W. J. Sandborn, S. D. Gray-Owen, R. Knight, E. Allen-Vercoe, B. O. Palsson and L. Smarr** (2018). "Metagenomics-Based, Strain-Level Analysis of *Escherichia coli* From a Time-Series of Microbiome Samples From a Crohn's Disease Patient." *Front Microbiol* 9: 2559-2559.

**Fei, N. and L. Zhao** (2013). "An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice." *Isme j* 7(4): 880-884.

**Fenner, F., D. A. Henderson, I. Arita, Z. Jezek and I. D. Ladnyi** (1988). "Smallpox and its eradication." World Health Organization, Geneva.

**Fingermann, M., L. Avila, M. B. De Marco, L. Vazquez, D. N. Di Biase, A. V. Muller, M. Lescano, J. C. Dokmetjian, S. Fernandez Castillo and J. L. Perez Quinoy** (2018). "OMV-

## G Literaturverzeichnis

based vaccine formulations against Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains are both protective in mice and immunogenic in calves." *Hum Vaccin Immunother* 14(9): 2208-2213.

**Forsström, B., B. B. Axnäs, J. Rockberg, H. Danielsson, A. Bohlin and M. Uhlen** (2015). "Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes." *PLoS One* 10(3): e0121673-e0121673.

**Fulsundar, S., K. Harms, G. E. Flaten, P. J. Johnsen, B. A. Chopade and K. M. Nielsen** (2014). "Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation." *Appl Environ Microbiol* 80(11): 3469-3483.

**Furuta, N., H. Takeuchi and A. Amano** (2009). "Entry of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles into epithelial cells causes cellular functional impairment." *Infection and immunity* 77(11): 4761-4770.

**Gallot-Lavallee, T., M. S. Zygmunt, A. Cloeckert, G. Bezaud and G. Dubray** (1995). "Growth phase-dependent variations in the outer membrane protein profile of *Brucella melitensis*." *Res Microbiol* 146(3): 227-236.

**Gershoni, J. M. and G. E. Palade** (1982). "Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter." *Anal Biochem* 124(2): 396-405.

**Geuking, Markus B., J. Cahenzli, Melissa A. E. Lawson, Derek C. K. Ng, E. Slack, S. Hapfelmeier, Kathy D. McCoy and Andrew J. Macpherson** (2011). "Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses." *Immunity* 34(5): 794-806.

**Gorby, Y., J. McLean, A. Korenevsky, K. Rosso, M. Y. El-Naggar and T. J. Beveridge** (2008). "Redox-reactive membrane vesicles produced by *Shewanella*." *Geobiology* 6(3): 232-241.

**Gorrie, C. L., M. Mirceta, R. R. Wick, D. J. Edwards, N. R. Thomson, R. A. Strugnell, N. F. Pratt, J. S. Garlick, K. M. Watson, D. V. Pilcher, S. A. McGloughlin, D. W. Spelman, A. W. J. Jenney and K. E. Holt** (2017). "Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients." *Clin Infect Dis* 65(2): 208-215.

**Haurat, M. F., J. Aduse-Opoku, M. Rangarajan, L. Dorobantu, M. R. Gray, M. A. Curtis and M. F. Feldman** (2011). "Selective Sorting of Cargo Proteins into Bacterial Membrane Vesicles." *Journal of Biological Chemistry* 286(2): 1269-1276.

**Hedlund, M., B. Frendéus, C. Wachtler, L. Hang, H. Fischer and C. Svanborg** (2001). "Type 1 fimbriae deliver an LPS- and TLR4-dependent activation signal to CD14-negative cells." *Molecular Microbiology* 39(3): 542-552.

**Hellman, J., P. M. Loisel, E. M. Zanzot, J. E. Allaire, M. M. Tehan, L. A. Boyle, J. T. Kurnick and H. S. Warren** (2000). "Release of gram-negative outer-membrane proteins into human serum and septic rat blood and their interactions with immunoglobulin in antiserum to *Escherichia coli* J5." *J Infect Dis* 181(3): 1034-1043.

**Hennig, I., B. Teutenberg-Riedel and G.-F. Gerlach** (1999). "Downregulation of a protective *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigen during the course of infection." *Microbial Pathogenesis* 26(2): 53-63.

**Hidron, A. I., J. R. Edwards, J. Patel, T. C. Horan, D. M. Sievert, D. A. Pollock and S. K. Fridkin** (2008). "NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007." *Infect Control Hosp Epidemiol* 29(11): 996-1011.

**Hoekstra, D., J. W. van der Laan, L. de Leij and B. Witholt** (1976). "Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*." *Biochim Biophys Acta* 455(3): 889-899.

**Holst, J., P. Oster, R. Arnold, M. V. Tatley, L. M. Naess, I. S. Aaberge, Y. Galloway, A. McNicholas, J. O'Hallahan, E. Rosenqvist and S. Black** (2013). "Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV): lessons from past programs and implications for the future." *Hum Vaccin Immunother* 9(6): 1241-1253.

**Huang, W., S. Wang, Y. Yao, Y. Xia, X. Yang, K. Li, P. Sun, C. Liu, W. Sun, H. Bai, X. Chu, Y. Li and Y. Ma** (2016). "Employing *Escherichia coli*-derived outer membrane vesicles as an antigen delivery platform elicits protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infection." *Sci Rep* 6: 37242-37242.

**Huttenhower, C., D. Gevers, R. Knight, S. Abubucker, J. H. Badger, A. T. Chinwalla, H. H. Creasy, A. M. Earl, M. G. FitzGerald, R. S. Fulton, M. G. Giglio, K. Hallsworth-Pepin, E. A. Lobos, R. Madupu, V. Magrini, J. C. Martin, M. Mitreva, D. M. Muzny, E. J. Sodergren, J. Versalovic, A. M. Wollam, K. C. Worley, J. R. Wortman, S. K. Young, Q. Zeng, K. M. Aagaard, O. O. Abolude, E. Allen-Vercoe, E. J. Alm, L. Alvarado, G. L. Andersen, S. Anderson, E. Appelbaum, H. M. Arachchi, G. Armitage, C. A. Arze, T. Ayvaz, C. C. Baker, L. Begg, T. Belachew, V. Bhonagiri, M. Bihan, M. J. Blaser, T. Bloom, V. Bonazzi, J. Paul Brooks, G. A. Buck, C. J. Buhay, D. A. Busam, J. L. Campbell, S. R. Canon, B. L. Cantarel, P. S. G. Chain, I. M. A. Chen, L. Chen, S. Chhibba, K. Chu, D. M. Ciulla, J. C. Clemente, S. W. Clifton, S. Conlan, J. Crabtree, M. A. Cutting, N. J. Davidovics, C. C. Davis, T. Z. DeSantis, C. Deal, K. D. Delehaunty, F. E. Dewhirst, E. Deych, Y. Ding, D. J. Dooling, S. P. Dugan, W. Michael Dunne, A. Scott Durkin, R. C. Edgar, R. L. Erlich, C. N. Farmer, R. M. Farrell, K. Faust, M. Feldgarden, V. M. Felix, S. Fisher, A. A. Fodor, L. J. Forney, L. Foster, V. Di Francesco, J. Friedman, D. C. Friedrich, C. C. Fronick, L. L. Fulton, H. Gao, N. Garcia, G. Giannoukos, C. Giblin, M. Y. Giovanni, J. M. Goldberg, J. Goll, A. Gonzalez, A. Griggs, S. Gujja, S. Kinder Haake, B. J. Haas, H. A. Hamilton, E. L. Harris, T. A. Hepburn, B. Herter, D. E. Hoffmann, M. E. Holder, C. Howarth, K. H. Huang, S. M. Huse, J. IZard, J. K. Jansson, H. Jiang, C. Jordan, V. Joshi, J. A. Katancik, W. A. Keitel, S. T. Kelley, C. Kells, N. B. King, D. Knights, H. H. Kong, O. Koren, S. Koren, K. C. Kota, C. L. Kovar, N. C. Kyrpides, P. S. La Rosa, S. L. Lee, K. P. Lemon, N. Lennon, C. M. Lewis, L. Lewis, R. E. Ley, K. Li, K. Liolios, B. Liu, Y. Liu, C.-C. Lo, C. A. Lozupone, R. Dwayne Lunsford, T. Madden, A. A. Mahurkar, P. J. Mannon, E. R. Mardis, V. M. Markowitz, K. Mavromatis, J. M. McCorrison, D. McDonald, J. McEwen, A. L. McGuire, P. McInnes, T. Mehta, K. A. Mihindukulasuriya, J. R. Miller, P. J. Minx, I. Newsham, C. Nusbaum, M. O'Laughlin, J. Orvis, I. Pagani, K. Palaniappan, S. M. Patel, M. Pearson, J. Peterson, M. Podar, C. Pohl, K. S. Pollard, M. Pop, M. E. Priest, L. M. Proctor, X. Qin, J. Raes, J. Ravel, J. G. Reid, M. Rho, R. Rhodes, K. P. Riehle, M. C. Rivera, B. Rodriguez-Mueller, Y.-H. Rogers, M. C. Ross, C. Russ, R. K. Sanka, P. Sankar, J. Fah Sathirapongsasuti, J. A. Schloss, P. D. Schloss, T. M. Schmidt, M. Scholz, L. Schriml, A. M. Schubert, N. Segata, J. A. Segre, W. D. Shannon, R. R. Sharp, T. J. Sharpton, N. Shenoy, N. U. Sheth, G. A. Simone, I. Singh, C. S. Smillie, J. D. Sobel, D. D.**

**Sommer, P. Spicer, G. G. Sutton, S. M. Sykes, D. G. Tabbaa, M. Thiagarajan, C. M. Tomlinson, M. Torralba, T. J. Treangen, R. M. Truty, T. A. Vishnivetskaya, J. Walker, L. Wang, Z. Wang, D. V. Ward, W. Warren, M. A. Watson, C. Wellington, K. A. Wetterstrand, J. R. White, K. Wilczek-Boney, Y. Wu, K. M. Wylie, T. Wylie, C. Yandava, L. Ye, Y. Ye, S. Yooseph, B. P. Youmans, L. Zhang, Y. Zhou, Y. Zhu, L. Zoloth, J. D. Zucker, B. W. Birren, R. A. Gibbs, S. K. Highlander, B. A. Methé, K. E. Nelson, J. F. Petrosino, G. M. Weinstock, R. K. Wilson, O. White and C. The Human Microbiome Project (2012).** "Structure, function and diversity of the healthy human microbiome." *Nature* 486(7402): 207-214.

**Illyes, G., K. Kovacs, B. Kocsis and K. Baintner (2008).** "Failure of oral *E. coli* O83 lipopolysaccharide to influence intestinal morphology and cell proliferation in rats: short communication." *Acta Vet Hung* 56(1): 1-3.

**Imhann, F., A. Vich Vila, M. J. Bonder, J. Fu, D. Gevers, M. C. Visschedijk, L. M. Spekhorst, R. Alberts, L. Franke, H. M. van Dullemen, R. W. F. Ter Steege, C. Huttenhower, G. Dijkstra, R. J. Xavier, E. A. M. Festen, C. Wijmenga, A. Zhernakova and R. K. Weersma (2018).** "Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease." *Gut* 67(1): 108-119.

**Inagaki, S., S. Onishi, H. K. Kuramitsu and A. Sharma (2006).** "Porphyromonas gingivalis vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by "Tannerella forsythia"." *Infect Immun* 74(9): 5023-5028.

**Jameson, S. C. and D. Masopust (2018).** "What Is the Predictive Value of Animal Models for Vaccine Efficacy in Humans? Reevaluating the Potential of Mouse Models for the Human Immune System." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10(4): a029132-a029132.

**Jangi, S., R. Gandhi, L. M. Cox, N. Li, F. von Glehn, R. Yan, B. Patel, M. A. Mazzola, S. Liu, B. L. Glanz, S. Cook, S. Tankou, F. Stuart, K. Melo, P. Nejad, K. Smith, B. D. Topcuolu, J. Holden, P. Kivisakk, T. Chitnis, P. L. De Jager, F. J. Quintana, G. K. Gerber, L. Bry and H. L. Weiner (2016).** "Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis." *Nat Commun* 7: 12015-12015.

**Jansen, K. U., C. Knirsch and A. S. Anderson (2018).** "The role of vaccines in preventing bacterial antimicrobial resistance." *Nature Medicine* 24: 10-19.

**Jenner, E. (1798).** "An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae: A disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox." Sampson Low, London.

**Jin, M. S., S. E. Kim, J. Y. Heo, M. E. Lee, H. M. Kim, S. G. Paik, H. Lee and J. O. Lee (2007).** "Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide." *Cell* 130(6): 1071-1082.

**Johansson, E. L., C. Bergquist, A. Edebo, C. Johansson and A. M. Svennerholm (2004).** "Comparison of different routes of vaccination for eliciting antibody responses in the human stomach." *Vaccine* 22(8): 984-990.

**Kaparakis, M., L. Turnbull, L. Carneiro, S. Firth, H. A. Coleman, H. C. Parkington, L. Le Bourhis, A. Karrar, J. Viala, J. Mak, M. L. Hutton, J. K. Davies, P. J. Crack, P. J. Hertzog, D. J. Philpott, S. E. Girardin, C. B. Whitchurch and R. L. Ferrero (2010).** "Bacterial



## G Literaturverzeichnis

membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells." *Cell Microbiol* 12(3): 372-385.

**Kato, S., Y. Kowashi and D. R. Demuth** (2002). "Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin." *Microb Pathog* 32(1): 1-13.

**Kesty, N. C. and M. J. Kuehn** (2004). "Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles." *J Biol Chem* 279(3): 2069-2076.

**Kim, S. H., K. S. Kim, S. R. Lee, E. Kim, M. S. Kim, E. Y. Lee, Y. S. Gho, J. W. Kim, R. E. Bishop and K. T. Chang** (2009). "Structural modifications of outer membrane vesicles to refine them as vaccine delivery vehicles." *Biochim Biophys Acta* 1788(10): 2150-2159.

**Klevens, R. M., J. R. Edwards, C. L. Richards, Jr., T. C. Horan, R. P. Gaynes, D. A. Pollock and D. M. Cardo** (2007). "Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002." *Public Health Rep* 122(2): 160-166.

**Koerberling, O., I. Delany and D. M. Granoff** (2011). "A critical threshold of meningococcal factor H binding protein expression is required for increased breadth of protective antibodies elicited by native outer membrane vesicle vaccines." *Clinical and vaccine immunology: CVI* 18(5): 736-742.

**Kothary, M. H., G. R. Gopinath, J. Gangiredla, P. V. Rallabhandi, L. M. Harrison, Q. Q. Yan, H. R. Chase, B. Lee, E. Park, Y. Yoo, T. Chung, S. B. Finkelstein, F. J. Negrete, I. R. Patel, L. Carter, V. Sathyamoorthy, S. Fanning and B. D. Tall** (2017). "Analysis and Characterization of Proteins Associated with Outer Membrane Vesicles Secreted by *Cronobacter* spp." *Frontiers in Microbiology* 8: 134-134.

**Kuehn, M. J. and N. C. Kesty** (2005). "Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction." *Genes Dev* 19(22): 2645-2655.

**Kulp, A. and M. J. Kuehn** (2010). "Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles." *Annual review of microbiology* 64: 163-184.

**Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.

**Lee, J., Y. J. Yoon, J. H. Kim, N. T. H. Dinh, G. Go, S. Tae, K.-S. Park, H. T. Park, C. Lee, T.-Y. Roh, D. Di Vizio and Y. S. Gho** (2018). "Outer Membrane Vesicles Derived From *Escherichia coli* Regulate Neutrophil Migration by Induction of Endothelial IL-8." *Frontiers in Microbiology* 9: 2268-2268.

**Lee, S. R., S. H. Kim, K. J. Jeong, K. S. Kim, Y. H. Kim, S. J. Kim, E. Kim, J. W. Kim and K. T. Chang** (2009). "Multi-immunogenic outer membrane vesicles derived from an MsbB-deficient *Salmonella enterica* serovar typhimurium mutant." *J Microbiol Biotechnol* 19(10): 1271-1279.

**Li, J., D. S. Lee and J. Madrenas** (2013). "Evolving Bacterial Envelopes and Plasticity of TLR2-Dependent Responses: Basic Research and Translational Opportunities." *Front Immunol* 4: 347-347.

## G Literaturverzeichnis

**Li, Z., A. J. Clarke and T. J. Beveridge** (1998). "Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria." *J Bacteriol* 180(20): 5478-5483.

**Lin, J., W. Zhang, J. Cheng, X. Yang, K. Zhu, Y. Wang, G. Wei, P.-Y. Qian, Z.-Q. Luo and X. Shen** (2017). "A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition." *Nature Communications* 8: 14888-14888.

**Lin, X. M., J. N. Yang, X. X. Peng and H. Li** (2010). "A novel negative regulation mechanism of bacterial outer membrane proteins in response to antibiotic resistance." *J Proteome Res* 9(11): 5952-5959.

**Lipsitch, M.** (2001). "Measuring and interpreting associations between antibiotic use and penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*." *Clin Infect Dis* 32(7): 1044-1054.

**Liu, Y., L. A. Hammer, W. Liu, M. M. Hobbs, R. A. Zielke, A. E. Sikora, A. E. Jerse, N. K. Egilmez and M. W. Russell** (2017). "Experimental vaccine induces Th1-driven immune responses and resistance to *Neisseria gonorrhoeae* infection in a murine model." *Mucosal Immunol* 10(6): 1594-1608.

**Loeb, M. R. and J. Kilner** (1978). "Release of a special fraction of the outer membrane from both growing and phage T4-infected *Escherichia coli* B." *Biochim Biophys Acta* 514(1): 117-127.

**Lu, Y., J. Chen, J. Zheng, G. Hu, J. Wang, C. Huang, L. Lou, X. Wang and Y. Zeng** (2016). "Mucosal adherent bacterial dysbiosis in patients with colorectal adenomas." *Sci Rep* 6: 26337-26337.

**MacDonald, I. A. and M. J. Kuehn** (2012). "Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways." *Research in microbiology* 163(9-10): 607-618.

**Manning, A. J. and M. J. Kuehn** (2013). "Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles." *J Mol Microbiol Biotechnol* 23(1-2): 131-141.

**Marshall, J. C.** (2005). "Lipopolysaccharide: An Endotoxin or an Exogenous Hormone?" *Clinical Infectious Diseases* 41(Supplement\_7): S470-S480.

**Martin, R. M., J. Cao, S. Brisse, V. Passet, W. Wu, L. Zhao, P. N. Malani, K. Rao and M. A. Bachman** (2016). "Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*." *mSphere* 1(5): e00261-16.

**Mashburn, L. M. and M. Whiteley** (2005). "Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote." *Nature* 437(7057): 422-425.

**Mason, J. T. and T. J. O'Leary** (1991). "Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation." *J Histochem Cytochem* 39(2): 225-229.

**McBroom, A. J. and M. J. Kuehn** (2007). "Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response." *Mol Microbiol* 63(2): 545-558.

## G Literaturverzeichnis

**McConnell, M. J., C. Rumbo, G. Bou and J. Pachon** (2011). "Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Acinetobacter baumannii*." *Vaccine* 29(34): 5705-5710.

**McMahon, K. J., M. E. Castelli, E. García Vescovi and M. F. Feldman** (2012). "Biogenesis of outer membrane vesicles in *Serratia marcescens* is thermoregulated and can be induced by activation of the Rcs phosphorelay system." *Journal of bacteriology* 194(12): 3241-3249.

**Melander, E., K. Ekdahl, G. Jonsson and S. Molstad** (2000). "Frequency of penicillin-resistant pneumococci in children is correlated to community utilization of antibiotics." *Pediatr Infect Dis J* 19(12): 1172-1177.

**Mestas, J. and C. C. Hughes** (2004). "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." *J Immunol* 172(5): 2731-2738.

**Mezzatesta, M. L., F. Gona and S. Stefani** (2012). "Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance." *Future Microbiol* 7(7): 887-902.

**Mitra, S., M. K. Chakrabarti and H. Koley** (2013). "Multi-serotype outer membrane vesicles of *Shigellae* confer passive protection to the neonatal mice against shigellosis." *Vaccine* 31(31): 3163-3173.

**Mobley, H. L., D. M. Green, A. L. Trifillis, D. E. Johnson, G. R. Chippendale, C. V. Lockett, B. D. Jones and J. W. Warren** (1990). "Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains." *Infection and immunity* 58(5): 1281-1289.

**Mutsch, M., W. Zhou, P. Rhodes, M. Bopp, R. T. Chen, T. Linder, C. Spyr and R. Steffen** (2004). "Use of the Inactivated Intranasal Influenza Vaccine and the Risk of Bell's Palsy in Switzerland." *New England Journal of Medicine* 350(9): 896-903.

**Nieves, W., S. Asakrah, O. Qazi, K. A. Brown, J. Kurtz, D. P. Aucoin, J. B. McLachlan, C. J. Roy and L. A. Morici** (2011). "A naturally derived outer-membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary *Burkholderia pseudomallei* infection." *Vaccine* 29(46): 8381-8389.

**Norheim, G., H. Sanders, J. W. Mellesdal, I. Sundfør, H. Chan, C. Brehony, C. Vipond, C. Dold, R. Care, M. Saleem, M. C. J. Maiden, J. P. Derrick, I. Feavers and A. J. Pollard** (2015). "An OMV Vaccine Derived from a Capsular Group B Meningococcus with Constitutive FetA Expression: Preclinical Evaluation of Immunogenicity and Toxicity." *PLoS One* 10(9): e0134353- e0134353.

**O'Neill, J.** (2015). "Securing New Drugs for Future Generations: The Pipeline of Antibiotics." London Wellcome Trust: 1-41.

**Oketani, K., T. Inoue and M. Murakami** (2001). "Effect of E3040, an inhibitor of 5-lipoxygenase and thromboxane synthase, on rat bowel damage induced by lipopolysaccharide." *Eur J Pharmacol* 427(2): 159-166.

**Olofsson, A., A. Vallstrom, K. Petzold, N. Tegtmeyer, J. Schleucher, S. Carlsson, R. Haas, S. Backert, S. N. Wai, G. Grobner and A. Arnqvist** (2010). "Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles." *Mol Microbiol* 77(6): 1539-1555.

## G Literaturverzeichnis

**Pajon, R., C. M. Buckwalter, K. O. Johswich, S. D. Gray-Owen and D. M. Granoff** (2015). "A native outer membrane vesicle vaccine confers protection against meningococcal colonization in human CEACAM1 transgenic mice." *Vaccine* 33(11): 1317-1323.

**Park, K. S., K. H. Choi, Y. S. Kim, B. S. Hong, O. Y. Kim, J. H. Kim, C. M. Yoon, G. Y. Koh, Y. K. Kim and Y. S. Gho** (2010). "Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* induce systemic inflammatory response syndrome." *PLoS One* 5(6): e11334-e11334.

**Pasteur, L.** (1880). "De l'atténuation du virus du choléra des poules." *C. R. Acad. Sci.* 91: 673–680.

**Peleg, A. Y. and D. C. Hooper** (2010). "Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria." *New England Journal of Medicine* 362(19): 1804-1813.

**Petty, N. K., N. L. Ben Zakour, M. Stanton-Cook, E. Skippington, M. Totsika, B. M. Forde, M. D. Phan, D. Gomes Moriel, K. M. Peters, M. Davies, B. A. Rogers, G. Dougan, J. Rodriguez-Bano, A. Pascual, J. D. Pitout, M. Upton, D. L. Paterson, T. R. Walsh, M. A. Schembri and S. A. Beatson** (2014). "Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(15): 5694-5699.

**Price, P. B. and T. Sowers** (2004). "Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(13): 4631-4636.

**Pritsch, M., N. Ben-Khaled, M. Chaloupka, S. Kobold, N. Berens-Riha, A. Peter, G. Liegl, S. Schubert, M. Hoelscher, T. Löscher and A. Wieser** (2016). "Comparison of Intranasal Outer Membrane Vesicles with Cholera Toxin and Injected MF59C.1 as Adjuvants for Malaria Transmission Blocking Antigens AnAPN1 and Pfs48/45." *Journal of immunology research* 2016: 3576028-3576028.

**Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, T. Yamada, D. R. Mende, J. Li, J. Xu, S. Li, D. Li, J. Cao, B. Wang, H. Liang, H. Zheng, Y. Xie, J. Tap, P. Lepage, M. Bertalan, J. M. Batto, T. Hansen, D. Le Paslier, A. Linneberg, H. B. Nielsen, E. Pelletier, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, K. Turner, H. Zhu, C. Yu, S. Li, M. Jian, Y. Zhou, Y. Li, X. Zhang, S. Li, N. Qin, H. Yang, J. Wang, S. Brunak, J. Dore, F. Guarner, K. Kristiansen, O. Pedersen, J. Parkhill, J. Weissenbach, P. Bork, S. D. Ehrlich and J. Wang** (2010). "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing." *Nature* 464(7285): 59-65.

**Qin, J., Y. Li, Z. Cai, S. Li, J. Zhu, F. Zhang, S. Liang, W. Zhang, Y. Guan, D. Shen, Y. Peng, D. Zhang, Z. Jie, W. Wu, Y. Qin, W. Xue, J. Li, L. Han, D. Lu, P. Wu, Y. Dai, X. Sun, Z. Li, A. Tang, S. Zhong, X. Li, W. Chen, R. Xu, M. Wang, Q. Feng, M. Gong, J. Yu, Y. Zhang, M. Zhang, T. Hansen, G. Sanchez, J. Raes, G. Falony, S. Okuda, M. Almeida, E. LeChatelier, P. Renault, N. Pons, J. M. Batto, Z. Zhang, H. Chen, R. Yang, W. Zheng, S. Li, H. Yang, J. Wang, S. D. Ehrlich, R. Nielsen, O. Pedersen, K. Kristiansen and J. Wang** (2012). "A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes." *Nature* 490(7418): 55-60.

**Quakyi, E. K., P. H. Carter, C. M. Tsai and G. E. Marti** (1997). "Immunization with meningococcal membrane-bound lipooligosaccharide accelerates granulocyte recovery and enhances lymphocyte proliferation in myelosuppressed mice." *Pathobiology* 65(1): 26-38.

## G Literaturverzeichnis

**Raetz, C. R. and C. Whitfield** (2002). "Lipopolysaccharide endotoxins." *Annu Rev Biochem* 71: 635-700.

**Raeven, R. H. M., J. Brummelman, J. L. A. Pennings, L. van der Maas, W. Tilstra, K. Helm, E. van Riet, W. Jiskoot, C. A. C. M. van Els, W. G. H. Han, G. F. A. Kersten and B. Metz** (2016). "Bordetella pertussis outer membrane vesicle vaccine confers equal efficacy in mice with milder inflammatory responses compared to a whole-cell vaccine." *Sci Rep* 6: 38240-38240.

**Ramirez, P., G. L. Bassi and A. Torres** (2012). "Measures to prevent nosocomial infections during mechanical ventilation." *Curr Opin Crit Care* 18(1): 86-92.

**Renelli, M., V. Matias, R. Y. Lo and T. J. Beveridge** (2004). "DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential." *Microbiology* 150(Pt 7): 2161-2169.

**Renwick, M. J., V. Simpkin and E. Mossialos** (2016). "Targeting innovation in antibiotic drug discovery and development: the need for a one-health, one-Europe, one-world framework." *European Observatory on Health Systems and Policies Health Policy Series No. 45*: 1–133.

**Roake, J. A., J. I. Keenan, S. G. Rijpkema and Z. Durrani** (2003). "Differences in immunogenicity and protection in mice and guinea pigs following intranasal immunization with *Helicobacter pylori* outer membrane antigens." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 36(3): 199-205.

**Roberts, R., G. Moreno, D. Bottero, M. E. Gaillard, M. Fingerhann, A. Graieb, M. Rumbo and D. Hozbor** (2008). "Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis." *Vaccine* 26(36): 4639-4646.

**Rojas, M., P. Restrepo-Jiménez, D. M. Monsalve, Y. Pacheco, Y. Acosta-Ampudia, C. Ramirez-Santana, P. S. C. Leung, A. A. Ansari, M. E. Gershwin and J.-M. Anaya** (2018). "Molecular mimicry and autoimmunity." *Journal of Autoimmunity* 95: 100-123.

**Rubinstein, N. D., I. Mayrose, D. Halperin, D. Yekutieli, J. M. Gershoni and T. Pupko** (2008). "Computational characterization of B-cell epitopes." *Mol Immunol* 45(12): 3477-3489.

**Rudin, A., E. L. Johansson, C. Bergquist and J. Holmgren** (1998). "Differential kinetics and distribution of antibodies in serum and nasal and vaginal secretions after nasal and oral vaccination of humans." *Infection and immunity* 66(7): 3390-3396.

**Ryan, M. H., D. Petrone, J. F. Nemeth, E. Barnathan, L. Bjorck and R. E. Jordan** (2008). "Proteolysis of purified IgGs by human and bacterial enzymes in vitro and the detection of specific proteolytic fragments of endogenous IgG in rheumatoid synovial fluid." *Mol Immunol* 45(7): 1837-1846.

**Ryu, J. K., S. J. Kim, S. H. Rah, J. I. Kang, H. E. Jung, D. Lee, H. K. Lee, J. O. Lee, B. S. Park, T. Y. Yoon and H. M. Kim** (2017). "Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer." *Immunity* 46(1): 38-50.

## G Literaturverzeichnis

**Schild, S., E. J. Nelson and A. Camilli** (2008). "Immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles induces protective immunity in mice." *Infection and immunity* 76(10): 4554-4563.

**Schnaitman, C. A.** (1974). "Outer membrane proteins of *Escherichia coli*. IV. Differences in outer membrane proteins due to strain and cultural differences." *Journal of bacteriology* 118(2): 454-464.

**Sela, M., B. Schechter, I. Schechter and F. Borek** (1967). "Antibodies to Sequential and Conformational Determinants." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 32: 537-545.

**Siber, G. R., P. H. Schur, A. C. Aisenberg, S. A. Weitzman and G. Schiffman** (1980). "Correlation between serum IgG-2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens." *New England Journal of Medicine* 303(4): 178-182.

**Simpson, B. W. and M. S. Trent** (2019). "Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences." *Nature Reviews Microbiology* 17(7): 403-416.

**Souli, M., I. Galani and H. Giamarellou** (2008). "Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe." *Euro Surveill* 13(47): 5437-5453.

**Stevenson, T. C., C. Cywes-Bentley, T. D. Moeller, K. B. Weyant, D. Putnam, Y. F. Chang, B. D. Jones, G. B. Pier and M. P. DeLisa** (2018). "Immunization with outer membrane vesicles displaying conserved surface polysaccharide antigen elicits broadly antimicrobial antibodies." *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(14): E3106-e3115.

**Stone, P. W., E. C. Hedblom, D. M. Murphy and S. B. Miller** (2005). "The economic impact of infection control: making the business case for increased infection control resources." *Am J Infect Control* 33(9): 542-547.

**Sun, J. B., C. Czerkinsky and J. Holmgren** (2010). "Mucosally induced immunological tolerance, regulatory T cells and the adjuvant effect by cholera toxin B subunit." *Scand J Immunol* 71(1): 1-11.

**Tan, T. T., M. Morgelin, A. Forsgren and K. Riesbeck** (2007). "*Haemophilus influenzae* survival during complement-mediated attacks is promoted by *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles." *J Infect Dis* 195(11): 1661-1670.

**Taniguchi, Y., N. Yoshioka, T. Nishizawa, H. Inagawa, C. Kohchi and G.-I. Soma** (2009). "Utility and Safety of LPS-based Fermented Flour Extract as a Macrophage Activator." *Anticancer Research* 29(3): 859-864.

**Thavarajah, R., V. K. Mudimbaimannar, J. Elizabeth, U. K. Rao and K. Ranganathan** (2012). "Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation." *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP* 16(3): 400-405.

**Thornton, J. M., M. S. Edwards, W. R. Taylor and D. J. Barlow** (1986). "Location of 'continuous' antigenic determinants in the protruding regions of proteins." *Embo j* 5(2): 409-413.

## G Literaturverzeichnis

**Tomczyk, S., R. Lynfield, W. Schaffner, A. Reingold, L. Miller, S. Petit, C. Holtzman, S. M. Zansky, A. Thomas, J. Baumbach, L. H. Harrison, M. M. Farley, B. Beall, L. McGee, R. Gierke, T. Pondo and L. Kim** (2016). "Prevention of Antibiotic-Nonsusceptible Invasive Pneumococcal Disease With the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine." *Clin Infect Dis* 62(9): 1119-1125.

**Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon** (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.

**Trompette, A., E. S. Gollwitzer, K. Yadava, A. K. Sichelstiel, N. Sprenger, C. Ngom-Bru, C. Blanchard, T. Junt, L. P. Nicod, N. L. Harris and B. J. Marsland** (2014). "Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis." *Nat Med* 20(2): 159-166.

**Twigg, H. L.** (2005). "Humoral Immune Defense (Antibodies)." *Proceedings of the American Thoracic Society* 2(5): 417-421.

**Vaccines work** (Editorial) (2018). *Nature Communications* 9(1): 1666-1666.

**van der Ley, P. and G. van den Dobbelsteen** (2011). "Next-generation outer membrane vesicle vaccines against *Neisseria meningitidis* based on nontoxic LPS mutants." *Hum Vaccin* 7(8): 886-890.

**van der Pol, L., M. Stork and P. van der Ley** (2015). "Outer membrane vesicles as platform vaccine technology." *Biotechnol J* 10(11): 1689-1706.

**Vincent, J.-L.** (2003). "Nosocomial infections in adult intensive-care units." *The Lancet* 361(9374): 2068-2077.

**Watson, P. S. and D. P. Turner** (2016). "Clinical experience with the meningococcal B vaccine, Bexsero((R)): Prospects for reducing the burden of meningococcal serogroup B disease." *Vaccine* 34(7): 875-880.

**Wieser, A., E. Storz, G. Liegl, A. Peter, M. Pritsch, J. Shock, S. N. Wai and S. Schubert** (2014). "Efficient quantification and characterization of bacterial outer membrane derived nano-particles with flow cytometric analysis." *Int J Med Microbiol* 304(8): 1032-1037.

**Winkler, C., K. Denker, S. Wortelkamp and A. Sickmann** (2007). "Silver- and Coomassie-staining protocols: detection limits and compatibility with ESI MS." *Electrophoresis* 28(12): 2095-2099.

**Wu, H. Y. and M. W. Russell** (1994). "Comparison of systemic and mucosal priming for mucosal immune responses to a bacterial protein antigen given with or coupled to cholera toxin (CT) B subunit, and effects of pre-existing anti-CT immunity." *Vaccine* 12(3): 215-222.

**Yamazaki, R., T. Kikuchi, J. Kato, M. Sakurai, Y. Koda, R. Hashida, Y. Yamane, R. Abe, N. Hasegawa, S. Okamoto and T. Mori** (2018). "Recurrent bacterial pneumonia due to immunoglobulin G2 subclass deficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Efficacy of immunoglobulin replacement." *Transpl Infect Dis* 20(3): e12863-e12863.

## G Literaturverzeichnis

**Yao, Z., L. Sun, Y. Wang, L. Lin, Z. Guo, D. Li, W. Lin and X. Lin** (2018). "Quantitative Proteomics Reveals Antibiotics Resistance Function of Outer Membrane Proteins in *Aeromonas hydrophila*." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 8: 390-390.

**Yaron, S., G. L. Kolling, L. Simon and K. R. Matthews** (2000). "Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria." *Appl Environ Microbiol* 66(10): 4414-4420.

**Yokoyama, K., T. Horii, T. Yamashino, S. Hashikawa, S. Barua, T. Hasegawa, H. Watanabe and M. Ohta** (2000). "Production of shiga toxin by *Escherichia coli* measured with reference to the membrane vesicle-associated toxins." *FEMS Microbiol Lett* 192(1): 139-144.



## H Abkürzungen

A	Ausschnitt
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AIDS	engl. <i>acquired immune deficiency syndrome</i> , erworbenes Immunschwächesyndrom
AK	Antikörper
Alum	Aluminiumhydroxid
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	lat. <i>aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
B	Blutgefäß (für Abbildung D 4)
BA	Bisacrylamid
BALB/c	Albino-Laborstamm der Hausmaus
BL	Bakterienlysat
BP	Blockierungspuffer
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CFT	CFT073, Isolat eines uropathogenen <i>E. coli</i>
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Choleratoxin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DZ	Drüsenzellen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	engl. <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> , Europäisches Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten
ECL	engl. <i>enhanced chemiluminescence</i> , verbesserte Chemilumineszenz
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

## H Abkürzungen

g	Gramm
g	bei Zentrifugen: Erdbeschleunigung
G	Gauge, Maßeinheit für Kanüldurchmesser
GNB	gram-negative Bakterien
h	engl. <i>hour</i> , Stunde
HCl	Chlorwasserstoffsäure, Salzsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
lat.	lateinisch
LB	engl. <i>lysogeny broth</i> , Nährmedium zur Kultur von Bakterien
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Hitzelabiles Enterotoxin von <i>E. coli</i>
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
M	Mundhöhle (für Abbildung D 4)
M	Molare Masse
MDR	engl. <i>multidrug-resistant</i> , multiresistent
min	Minute
ml	Milliliter
MM	Molekülmasse
mol	Basiseinheit der Stoffmenge
MRGN	multiresistente gram-negative Erreger
MW	arithmetischer Mittelwert
n	lat. <i>numerus</i> , Anzahl
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat

## H Abkürzungen

NF-κB	engl. <i>nuclear factor, kappa-light-chain-enhancer</i> , aus aktivierten B-Lymphozyten
NH	Nasenhöhle (für Abbildung D 4)
NK	Nasenknorpel (für Abbildung D 4)
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
NS	Nasenseptum (für Abbildung D 4)
NS	Nukleinsäuren (für Abbildung A 3.1)
OD	optische Dichte
OM	engl. <i>outer membrane</i> , Außenmembran
OMP	engl. <i>outer membrane proteins</i> , Außenmembranproteine
OMV	engl. <i>outer membrane vesicles</i> , Außenmembranvesikel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphat gepufferte Salzlösung mit Tween 20
pH	lat. <i>potentia Hydrogenii</i> , Maß für Säuregehalt einer Lösung
PL	Phospholipide
PP	periplasmatische Proteine
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	nasale Schleimhaut (für Abbildung D 4)
SD	engl. <i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SPF	engl. <i>specific pathogen free</i> , spezifisch pathogenfrei
spp.	Spezies
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
USA	engl. <i>United States of America</i> , Vereinigte Staaten von Amerika

## H Abkürzungen

V	Volt
v/v	Volumenprozent
WHO	engl. <i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
WP	Waschpuffer
XDR	engl. <i>extensively drug-resistant</i> , extensiv resistent
z.B.	zum Beispiel
ZP	zytoplasmatische Proteine
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )

## **Danksagung**

Allen voran geht mein besonderer Dank an Herrn PD Dr. Wieser für die exzellente Betreuung meiner Dissertation. Er hat sowohl durch seine fachliche Kompetenz und sein enormes Wissen als auch durch seine moralische Unterstützung wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Trotz seines mehr als vollen Zeitplans war er stets für mich da und für konstruktive Gespräche verfügbar.

Ein großes Dankeschön möchte ich an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Wieser richten: An Frau Gabriele Liegl und Herrn PD Dr. Michael Pritsch für das Einlernen in die Arbeitstechniken im Labor und die große Geduld bei meinen zahlreichen Fragen; an Frau Dr. Anna Neumann für die guten Anregungen; an Frau Annabell Windisch und Herrn Thomas Steinkirchner für die Unterstützung beim Schreiben der Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei allen Mitgliedern des Max-von-Pettenkofer Instituts für das freundliche Arbeitsklima und die großartige Hilfsbereitschaft bedanken, insbesondere bei Herrn Professor Soeren Schubert und bei Frau Birgit Groß.

Des Weiteren bin ich Frau Dr. Christine Woischke als Vertreterin des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität zu großem Dank verpflichtet für die Durchführung der histopathologischen Experimente und die Hilfestellung bei Beschreibung der korrespondierenden Ergebnisse.

Bedanken möchte ich mich auch sehr bei der Studienstiftung des deutschen Volkes für die ideelle und finanzielle Unterstützung.

Meinen Eltern Petra und Adel, meinen Geschwistern Jasmin und Sami und meiner Freundin Arianna bin ich tiefverbunden und dankbar für Ihre unglaubliche Unterstützung und ihr großes Vertrauen.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich, Najib Ben Khaled, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Entwicklung einer intranasalen Impfung gegen gram-negative Bakterien basierend auf Außenmembranvesikeln und Evaluation der Immunantwort im Mausmodell“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**Najib Ben Khaled**

München, den 05.10.2021

Najib Ben Khaled