

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. M. Frosch

**Genetische Diversität der
humanen kommensalen Bakterienart
Neisseria lactamica
in epidemiologisch verknüpften Gruppen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Marc Oberkötter
aus Hohenwarth

Würzburg, Dezember 2003.

Referent: Professor Dr. med. U. Vogel

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. H. Girschick

Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2004

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite 1
1.1. Die Gattung <i>Neisseria</i>	Seite 1
1.2. Die Spezies <i>Neisseria lactamica</i>	Seite 3
1.3. Populationsstruktur von Bakterien	Seite 6
1.4. Methoden zur Identifizierung genetischer Variabilität von Bakterien	Seite 9
1.5. Stand der Forschung zur Populationsstruktur von <i>Neisseria lactamica</i>	Seite 10
1.6. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	Seite 11
2. Material und Methoden	Seite 12
2.1. Geräte	Seite 12
2.2. Verbrauchsmaterial	Seite 13
2.3. Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme	Seite 13
2.4. Puffer und Lösungen	Seite 14
2.5. Bakterienkulturen	Seite 15
2.5.1. <i>Neisserien</i> -Stämme	Seite 15
2.5.2. Nährmedium	Seite 15
2.5.3. Kulturbedingungen	Seite 15
2.6. Oligonukleotide	Seite 15
2.7. Isolation und Identifikation von <i>Neisseria lactamica</i> -Stämmen	Seite 17
2.7.1. Die bayerische Meningokokkenträgerstudie	Seite 17
2.7.2. Abstrichentnahme	Seite 18
2.7.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	Seite 19
2.7.3.1. PCR mit der AmpliTaq® DNA-Polymerase	Seite 20
2.7.4. Agarose-Gelelektrophorese	Seite 21
2.7.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen und aus PCR-Ansätzen	Seite 21
2.7.6. Automatisierte DNA-Sequenzierung	Seite 21
2.7.7. Sequenzanalysen	Seite 22

3. Ergebnisse	Seite 23
3.1. Isolation und Identifikation von <i>Neisseria lactamica</i> -Stämmen	Seite 23
3.2. Sequenztypisierung ausgewählter <i>Neisseria lactamica</i> -Stämme	Seite 28
3.3. Sequenzauswertung	Seite 32
4. Diskussion	Seite 34
5. Zusammenfassung	Seite 42
6. Literaturverzeichnis	Seite 43

1. Einleitung

1.1. Die Gattung *Neisseria*

Die Gattung *Neisseria* gehört zur Familie der *Neisseriaceae*, die ihrerseits wiederum der Klasse β -*Proteobacteria* angehört (Holt and Krieg (Eds.): *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol. 1. The Williams Willkins Co., Baltimore, Md., 1984; Stackebrandt et al., 1988). Zur Familie *Neisseriaceae* zählen ausserdem die Gattungen *Acinetobacter*, *Branhamella*, *Eikenella*, *Kingella* und *Moraxella*, wobei eine enge Verwandtschaft zwischen den Gattungen *Neisseria*, *Kingella* und *Eikenella* nachgewiesen wurde (Rossau et al., 1989).

Neisserien sind Gram-negative, aerobe, unbewegliche, sporenlose Kokken, die oft als Diplokokken paarweise zusammen liegen. Die zugewandten Seiten sind oft abgeflacht, so das eine Semmel- oder Kaffeebohnenform zu erkennen ist. *Neisserien* sind ausserhalb ihres Wirtes nicht in der Lage sich zu vermehren und zu überleben. Günstige Kulturbedingungen für diese Bakterien herrschen bei 35-37 °C auf serum-, ascites- oder bluthaltigem Medium. Zufuhr von 5-10 % CO₂ fördert das Wachstum. Gegenüber Austrocknung, Abkühlung und Lichteinwirkung reagieren *Neisserien* sehr empfindlich. Die Oxidase-Reaktion verläuft bei allen *Neisserien* positiv.

Der Genus *Neisseria* umfasst 20 bekannte Spezies (s.a.:<http://www.dsmz.de/bactnom/nam2092.htm>). Einige davon wurden beim Menschen nachgewiesen (*N. cinerea*, *N. elongata*, *N. flavescens*, *N. gonorrhoeae*, *N. lactamica*, *N. meningitidis*, *N. mucosa*, *N. sicca*, *N. subflava*), andere fanden sich nur in Tieren wie Eidechsen (*N. iguanae*), Hunden (*N. weaveri*), Katzen (*N. canis*), Meerschweinchen (*N. animalis*) und Rhesusaffen (*N. macacae*) (s.a.: www.ridom.de). Alle *Neisserien* mit Ausnahme der Gonokokken besiedeln den Nasen-Rachen-Raum ihres Wirtes. Gonokokken dagegen finden sich im Urogenitaltrakt.

Die Besiedlung der menschlichen Mundhöhle mit *Neisserien* erfolgt in den ersten Lebensstagen (Rotimi and Duerden, 1981). Neben der Mundhöhle werden bei Kindern auch selten andere Orte, z.B. das Mittelohr oder das Duodenum von *Neisserien* besiedelt (Gordts et al., 2000; Lloyd-Still and Shwachman, 1975). Die sogenannten apathogenen *Neisserien*, zu denen alle ausser den Meningo- und den Gonokokken gehören, verursachen sehr selten infektiöse Erkrankungen.

So besitzen Berichte über Infektionen, die durch apathogene *Neisserien* hervorgerufen wurden eher anekdotischen Charakter (Denning and Gill, 1991). Unter den apathogenen *Neisserien* zeigt sich v.a. bei *N. cinerea*, *N. polysaccharea* und *N. lactamica* ein hoher Verwandtschaftsgrad zu den pathogenen Gono- und Meningokokken. So teilen diese apathogenen *Neisserien*-Spezies eine hohe Anzahl gemeinsam vorkommender Antigene z.B. Porine und Lipopolysaccharide (Derrick et al., 1999; Kim et al., 1989; Kremastinou et al., 1999; Troncoso et al., 2000) mit den pathogenen *Neisserien*.

Wie bereits erwähnt existieren zwei pathogene *Neisserien*-Arten, die Gonokokken, *Neisseria gonorrhoeae* und die Meningokokken, *Neisseria meningitidis*. *Neisseria gonorrhoeae* ist der Erreger der Gonorrhoe (Tripper), der häufigsten Geschlechtskrankheit mit einer jährlichen Inzidenz von 62 Mio. Krankheitsfällen/Jahr weltweit (s.a.: http://www.who.int/HIV_AIDS/knowledge/facsheet.html). Gonokokken besiedeln die Schleimhäute des Urogenitaltrakts und werden ausschliesslich von Mensch zu Mensch über sexuellen Kontakt übertragen. Der Gonokokkus ist dem Meningokokkus nahe verwandt (Bennett et al., 2002). Diese Annahme lässt sich aus Studien chromosomaler DNA/DNA Hybridisierung schliessen, wobei erstaunliche Übereinstimmungen bei beiden Spezies festgestellt wurden (Hoke and Vedros, 1982; Kingsbury, 1967). So stimmen 98 % der 16S rRNA bei Gono- und Meningokokken überein, was für einen gemeinsamen Vorfahren spricht. *Neisseria meningitidis* ist ein häufiger Erreger von eitriger Meningitis und Sepsis bei Säuglingen und jungen Erwachsenen (Achtman, 1995; Cartwright, 1995; Jones, 1995). Meningokokken werden aerogen übertragen und besiedeln die Schleimhäute des oberen Respirationstrakts, v.a. des Nasopharynx. Kommt es nicht zu einer Elimination der Bakterien führen sie gewöhnlich zu symptomlosem Keimträgertum. Abhängig vom Alter und der epidemiologischen Situation sind bis zu 10 % der Bevölkerung Europas Keimträger, doch nur sporadisch, d.h. in 1-10 Fällen/100000 Einwohner/Jahr kommt es in den Industrieländern zu einem Ausbruch der Erkrankung (Cartwright, 1995; Jones, 1995). Man geht deshalb davon aus, dass es sich bei den Meningokokken um Kommensalen des Nasen-Rachen-Raumes handelt, die nur bei einer Störung des Erreger-Wirt-Gleichgewichts, wie beispielsweise durch reduzierte lokale oder systemische Immunität oder bei

einer gestörten mechanischen Barriere des Nasopharynx durch Rauchen, virale Erkrankungen oder Zahnextraktion zu einer Infektion führen (Cartwright, 1995; Pedersen et al., 1993). Eine weitere Voraussetzung für eine Infektion ist die Virulenz des jeweiligen Meningokokken-Stammes.

Im sogenannten Meningitis-Gürtel Afrikas stellt sich die Situation etwas anders dar, da hier im Gegensatz zu den in Europa und Nordamerika auftretenden, überwiegend sporadischen Meningitis-Fällen auch Meningitis-Epidemien beobachtet wurden: So traten hier seit 1971 insgesamt ca. 30 grosse Meningitis-Epidemien in 5-10jährigen Abständen auf. Es erkrankten jeweils bis zu 1000 Personen/100000 Einwohner/Jahr.

Die meisten Meningokokken-Stämme sind jedoch, wie bereits oben erwähnt apathogene Kommensalen des Nasopharynx, welche nur ganz selten eine Erkrankung auslösen. Andererseits existieren aber wenige hypervirulente Stämme, die 90 % der weltweiten Erkrankungsfälle verursachen (Achtman, 1997; Bygraves et al., 1999; Caugant et al., 1988; Wang et al., 1993).

1.2. Die Spezies *Neisseria lactamica*

Neisseria lactamica ist eine kommensale Spezies, die den menschlichen Nasopharynx als einziges Habitat besiedelt (Hollis, 1973). Es handelt sich ebenfalls um Gram-negative Diplokokken, deren auffälligste biochemische Fähigkeit es ist, Säure aus Glukose, Maltose und Laktose zu bilden. Diese Fähigkeit unterscheidet sie von anderen *Neisserien*, z. B. Meningokokken. So zeigt sich bei *Neisseria lactamica* im Unterschied zu *Neisseria meningitidis* eine positive ONPG-Reaktion (Hollis et al., 1969). Wie bei allen *Neisserien* verläuft die Oxidase-Reaktion auch bei *Neisseria lactamica* streng positiv.

Gram-negative, Laktose-fermentierende Kokken wurden erstmals 1933 von Jessen beschrieben (Jessen, 1933). Es dauerte schliesslich bis 1969, als Hollis et al. *Neisseria lactamica* als neue, eigenständige Spezies innerhalb des Genus *Neisseria* postulierten (Hollis et al., 1969). Mittels chromosomaler DNA-DNA Hybridisierungen (Hoke and Vedros, 1982) und mit Hilfe der Analyse von 16S rRNA Sequenzen und Sequenzen der *argF*-, *recA*- und *rho*-Gene verschiedener *Neisserien*-Spezies konnte eine eindeutige Trennung der Spezies *Neisseria lactamica* von der Spezies *Neisseria meningitidis* bewiesen werden (Smith et al., 1999).

Der wichtigste genomische Unterschied zwischen beiden Spezies ist das Kapseloperon, über welches die meisten *Neisseria meningitidis*-Klone im Gegensatz zu *Neisseria lactamica* verfügen (Claus et al., 2002).

Neisseria lactamica ist im Unterschied zu den fakultativ pathogenen Meningokokken apathogen. Sehr selten wurde über durch *Neisseria lactamica* ausgelöste Erkrankungen berichtet. In drei Fällen sollen Kinder unter sieben Jahren ohne auslösendes Trauma (Greenberg and Kleinerman, 1978; Hansman, 1978; Lauer and Fisher, 1976), in einem Fall eine 46-jährige Frau nach einem vorhergehenden Schädel-Hirn-Trauma an einer durch *Neisseria lactamica* verursachten Meningitis erkrankt sein (Denning and Gill, 1991). Berichte dieser Art haben aber aufgrund des extrem seltenen Vorkommens *Neisseria lactamica*-induzierter Erkrankungen eher anekdotischen Charakter.

Sowohl *Neisseria lactamica* als auch *Neisseria meningitidis* besiedeln den menschlichen Nasen-Rachen-Raum. Grundsätzlich bestehen jedoch zwischen beiden Spezies erhebliche Unterschiede bezogen auf das Alter der besiedelten Personen. So findet sich *Neisseria lactamica* gehäuft bei Säuglingen und Kleinkindern, Kindergarten- und Schulkindern im Alter von 0-14 Jahren (Blakebrough et al., 1982; Cartwright et al., 1987; Gold et al., 1978; Kremastinou et al., 1999; Olsen et al., 1991; Saez Nieto et al., 1985; Simmons et al., 2000). Die höchste *Neisseria lactamica*-Trägerquote findet sich bei Kindern im Alter von sieben Monaten bis drei Jahren (Gold et al., 1978; Olsen et al., 1991; Simmons et al., 2000). So entpuppten sich in Golds Studie in der Altersgruppe der 18-24 Monate alten Kindern in Danbury, Connecticut bis zu 21 % als *Neisseria lactamica*-Träger (Gold et al., 1978). Simmons wiederum beschrieb bei der Gruppe der Zweijährigen in Auckland, Neuseeland eine Trägerquote für *Neisseria lactamica* von 61.5 % (Simmons et al., 2000). In Olsens Arbeit zeigten auf den Faröer Inseln mit 44.6 % die 7-36-Monate alten Kinder das höchste *Neisseria lactamica*-Trägertum (Olsen et al., 1991).

Die *Neisseria lactamica*-Trägerrate nimmt mit zunehmendem Alter kontinuierlich ab (Blakebrough et al., 1982; Gold et al., 1978; Olsen et al., 1991). So fanden sich in Danbury, Connecticut nur noch bei 1.8-2 % aller 14-17-jährigen *Neisseria lactamica* im Nasopharynx (Gold et al., 1978). Auch unter Kleinkindern jünger als sieben Monate finden sich seltener *Neisseria lactamica*-Träger als bei der oben beschriebenen Hauptaltersgruppe. So lag in Danbury die durchschnittliche Trägerquote bei drei Monate alten Kindern bei 3.8 %, bei vier Monate alten bei 3.6 % (Gold et al., 1978).

Die Besiedlung mit Meningokokken unterscheidet sich deutlich von der Besiedlung mit *Neisseria lactamica*: Meningokokken finden sich selten bei Kindern die jünger als zehn Jahre sind. So zeigten sich in Danbury lediglich bei 0.5 % der drei Monate alten Kinder, bzw. bei 1.2 % der 6-8-jährigen Meningokokken im Nasopharynx (Gold et al., 1978). Gehäuft konnte *Neisseria meningitidis* bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen im Alter von 14-20 Jahren isoliert werden (Cartwright et al., 1987; Gold et al., 1978). Die Ergebnisse der im Winter 1999/2000 von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten bayerischen Meningokokkenträgerstudie unterstützen diese Aussagen (Claus et al., Manuskript in Vorbereitung). Hier zeigten sich bei Kindergarten- und Grundschulkindern *Neisseria meningitidis*-Trägerraten von lediglich 2.1 bzw. 2.0 %. Von Kindern und Jugendlichen der 5. bis 10. Klassen waren bereits 7.6 % Meningokokkenträger. Bei 17.9 % der Schüler aus den 11., 12. und 13. Klassen fanden sich Meningokokken. Mit 32.6 % zeigte die von uns ebenfalls untersuchte Gruppe der Bundeswehr-Rekruten die höchste Meningokokken-Trägerrate der Studie.

Aus oben genanntem geht somit hervor, dass mit zunehmenden Lebensalter die Trägerquote für *Neisseria lactamica* immer mehr abnimmt, die für *Neisseria meningitidis* jedoch immer mehr zu. Daraus wird ersichtlich, dass unter Betrachtung verschiedener Altersgruppen ein sich gegenseitig ausschliessendes Besiedlungsmuster der beiden *Neisserien*-Spezies besteht.

Geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Besiedlung mit *Neisseria lactamica* konnten nicht sicher gemacht werden. Nur in Olsens Studie wurden auf den Faröer Inseln mehr männliche als weibliche *Neisseria lactamica*-Träger gefunden. Auch gesicherte „Risikofaktoren“ für einen Befall mit *Neisseria lactamica* konnten nicht nachgewiesen werden. In Danbury, Connecticut wurde aber beobachtet, dass in Grossfamilien eine signifikant höhere Trägerquote vorherrscht als in kleineren Familienverbänden (Gold et al., 1978).

Die durchschnittliche Verweildauer im menschlichen Nasen-Rachen-Raum für *Neisseria lactamica* beträgt bei 3-13 Monate alten Kindern 3-8 Monate, bei 6-8 Jahre alten Kindern 3 Monate. In Danbury lag die *Neisseria lactamica*-Trägerrate v.a. im Zeitraum von April bis Juni besonders hoch (Gold et al., 1978).

Auf Grund des oben genannten, auf das Alter bezogenen unterschiedlichen Besiedlungsmusters bei *Neisseria lactamica* und *meningitidis* wird davon ausgegangen, dass eine Besiedlung mit *Neisseria lactamica* die Altersgruppe der 0-14-Jährigen vor einer Meningokokken-Meningitis zu schützen vermag. Man vermutet zum Einen, dass aufgrund der in dieser Altersgruppe herrschenden hohen *Neisseria lactamica*-Trägerquote eine Besiedlung mit Meningokokken inhibiert wird (Coen et al., 2000). Zum Anderen wird durch die Besiedlung des Nasopharynx mit *Neisseria lactamica* eine schützende humorale Immunität ausgelöst (Coen et al., 2000; Gold et al., 1978). Durch Berechnungen auf Basis eines mathematischen Modells vermochte Coen beide Thesen zu unterstützen. Zudem konnten bei *Neisseria lactamica*-Trägern viermal so hohe Antikörper-Titer gegen *Neisseria meningitidis* A, B und C nachgewiesen werden als bei einer Kontrollgruppe (Gold et al., 1978). Auch zeigt eine hohe Anzahl von *Neisseria lactamica*-Stämmen eine Kreuzreaktivität mit *Neisseria meningitidis*-Stämmen (Gold et al., 1978; Kremastinou et al., 1999; Kim et al., 1989; Saez Nieto et al., 1985; Troncoso et al., 2000; Zorgani et al., 1996). Diese Kreuzreaktivität beruht auf dem gemeinsamen Vorkommen bestimmter Antigene, wie beispielsweise *outer-membrane-Proteine* (OMP) oder Lipooligosaccharide bei beiden Spezies. Vermutungen zielen darauf ab, dass *Neisseria lactamica* aufgrund des Vorkommens kreuzreaktiver Antigene mit *Neisseria meningitidis* eine natürliche Immunität gegenüber den Meningokokken gewährleistet. Diese Hypothese der durch eine kommensale Spezies des menschlichen Nasopharynx hervorgerufenen natürlichen Immunität gegen Meningitis könnte neue Perspektiven zur Entwicklung von Impfstoffen gegen diese Erkrankung eröffnen (Tang et al., 1999).

1.3. Populationsstruktur von Bakterien

Populationsgenetiker begannen in den achtziger Jahren grosse Stammsammlungen verschiedener Bakterienspezies mittels Multilokus-Enzymelektrophorese (MLEE) zu analysieren, um die Variabilität von Bakterienspezies im Rahmen der Populationsbiologie zu definieren (Selander et al., 1987). Mit Hilfe statistischer Tests wurden die dabei gewonnenen Daten ausgewertet, um Beziehungen zwischen Genen an verschiedenen Genorten herzustellen. Dabei fiel auf, dass bei vielen Spezies eine nicht-zufällige Verbindung von Allelen vorliegt, d.h. dass diese Spezies ein ausgeprägtes Kopplungsungleichgewicht aufweisen.

Es wurden drei Typen von Populationsstrukturen bei Bakterien definiert (Maynard-Smith et al., 1993): Klonale (asexuelle), epidemische (bedingt sexuelle) und panmiktische (sexuelle) Populationen. Über einen kurzen Zeitraum weisen alle Bakterien eine klonale Populationsstruktur auf, die sich durch Rekombination auflösen oder durch klonale Expansion verstärken kann. Die Unterscheidung von panmiktischen, epidemischen und klonalen Populationsstrukturen spiegelt somit die verschiedenen Verhältnisse von Rekombination zu Ausbreitung wider (Achtman, 1994).

Bei klonalen Spezies entstehen genetische Veränderungen zwischen verschiedenen Isolaten aus der sequentiellen Akkumulierung von Mutationen in den Nachkommen eines gemeinsamen Vorfahren. Neben Punktmutationen tragen auch andere Mechanismen wie Insertionen und Deletionen zur genetischen Diversität klonaler Populationen bei (Suerbaum and Achtman, 2001; Spratt and Maiden, 1999). Man geht davon aus, dass keine Spezies existiert, die eine absolut klonale Populationsstruktur aufweist. Allerdings existiert von *Yersinia pestis* nur ein Sequenztyp, wobei angenommen wird, dass dieser ein erst kürzlich entstandener Abkömmling von *Yersinia pseudotuberculosis* ist (Achtman et al., 1999). Aufgrund der relativ jungen Evolution von *Yersinia pestis* konnten sich noch keine weiteren Sequenztypen entwickeln. Bei den Prototypen der klonalen Spezies-*Salmonella enteritica* und *Escherichia coli*-konnte durchaus auch horizontaler Gentransfer nachgewiesen werden (Spratt and Maiden, 1999). Jedoch ist bei beiden Spezies horizontaler Gentransfer zu selten, um das genetische Kopplungsungleichgewicht zu zerstören. Bei *Escherichia coli* kommen Punktmutationen etwa fünfmal häufiger vor als lokalisierte Rekombinationsereignisse (Milkman and Bridges, 1990). Es kommt passager zu einer raschen Ausbreitung fitter Klone. Rekombinationsereignisse treten selten auf. Klonale Populationsstrukturen können auch nur dann existieren, wenn es selten zu Rekombinationen oder horizontalem Gentransfer kommt.

Horizontaler Gentransfer geschieht durch Konjugation, Transformation oder Transduktion (Singer and Berg, 1991). Dadurch kann es zur Integration von DNA der selben Spezies (d.h. Rekombination innerhalb einer Spezies), oder von DNA weit oder näher verwandter Spezies (d.h. Rekombination zwischen unterschiedlichen Spezies) kommen.

Rekombinationsereignisse unterbrechen die klonale Struktur, weil die neu eingebrachte DNA nicht Teil der evolutionären Geschichte der anderen Anteile des Genoms ist. Populationen, bei denen Rekombinationen und horizontaler Gentransfer häufig vorkommen nennt man panmiktisch. Panmiktische Spezies sind so variabel, dass gewöhnlich nur Isolate von Trägern mit direkten Kontakten identisch sind. Zu dieser Gruppe zählt v.a. *Helicobacter pylori*. Die extreme genomische Plastizität dieser Spezies steht in Übereinstimmung mit einem Kopplungsgleichgewicht der Gene, welches durch freie Rekombination bedingt ist. Homoplasie-Tests bewiesen, dass bei *Helicobacter pylori* Rekombinationsereignisse sehr viel häufiger vorkommen als Mutationen (Suerbaum et al., 1998). Eine Zwischenstellung der Populationsstrukturen nehmen die epidemischen Spezies ein, die ein mehr oder weniger ausgeprägtes Kopplungsungleichgewicht aufweisen. Zu den epidemischen Spezies gehören *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae* (Spratt and Maiden, 1999). Bei den epidemischen Spezies handelt es sich ursprünglich um panmiktische Spezies, bei denen gelegentlich eine ausgeprägte Expansion einzelner Klone festzustellen ist. Das Auftreten von Klonen ist offensichtlich, obwohl Meningokokken häufig rekombinieren und durch ihre Besiedlung der Mundhöhle freier DNA eigener oder fremder Genera ausgesetzt sind. So ist die Variabilität dieser Trägerisolate ungleich höher als bei klonalen Spezies.

Verschiedene klonale Gruppierungen epidemischer Populationen können in unterschiedlichen geographischen Regionen und in unterschiedlichen Zeiträumen dominieren. So zeigen die meisten Erkrankungsisolate der Serogruppe A-Meningokokken, aber auch andere hypervirulente Stämme über einen Zeitraum von mehreren Jahrzehnten eine klonale Populationsstruktur, wobei die Ausbreitung einer solchen Linie vermutlich in ihrer sehr hohen Fitness begründet liegt. Nichtsdestotrotz ist die Wahrscheinlichkeit eines Nukleotidaustausches innerhalb eines Stoffwechsellagens bei Meningokokken durch Rekombination mindestens 80 mal häufiger als durch Mutation (Feil et al., 1999).

Das gemeinsame Merkmal panmiktischer und epidemischer Spezies ist ihre natürliche Transformationskompetenz, welche eine freie Rekombination von Genen ermöglicht.

1.4. Methoden zur Identifizierung genetischer Variabilität von Bakterien

Die Analyse der Populationsstruktur von Bakterien erfordert spezielle Methoden, um die genetische Verwandtschaft bakterieller Isolate festzustellen. Lange Zeit war die Multi-Lokus-Enzym-Elektrophorese MLEE (Selander et al., 1987) die meistgenutzte und am weitesten verbreitete Methode zur Identifizierung der genetischen Variabilität von Bakterien. Das Prinzip der MLEE besteht darin, diverse zytoplasmatische Alloenzyme bzw. Isoenzymmuster auf elektrophoretische Differenzen hin zu untersuchen. Auf diese Weise können Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der metabolischen Enzyme auf Grund ihrer differierenden elektrophoretischen Mobilität ausgemacht werden. Jeder elektrophoretischen Variante wird eine Ziffer zugeteilt, so dass durch Kombination der verschiedenen Ziffern ein elektrophoretischer Typ (ET) entsteht.

Die Verwendung der MLEE trug massgeblich zur Kenntnis der Populationsstruktur der Meningokokken bei (Caugant et al., 1987). Trotzdem zeigen sich bei dieser Methode zahlreiche Einschränkungen: So ist die Methode auf wenige Speziallaboratorien beschränkt, auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist innerhalb eines Labors oder auch zwischen Labors oftmals eingeschränkt. Stumme Mutationen können mittels MLEE nicht entdeckt werden. Neben der selten, nur bei Verwendung zu weniger Loci inadäquaten Diskriminierung trägt auch das Unvermögen dieser etablierten Methode, genetische Übereinstimmungen zwischen Isolaten zu quantifizieren zur verminderten Anwendbarkeit eben jener Methode bei. Deren wichtigste Nachteil ist jedoch, dass hervorgebrachte Resultate nur schlecht oder überhaupt nicht zwischen verschiedenen Laboratorien miteinander verglichen werden können.

Eine auf dem Konzept der MLEE aufbauende Methode ist die der Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung MLST (Maiden et al., 1998). Bestimmte Allele von Isolaten einer bakteriellen Spezies können jedoch mit dieser Methode direkt durch Sequenzierung interner Fragmente sogenannter *housekeeping*-Gene identifiziert werden, anstatt wie bei der MLEE indirekt durch den Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeit der für sie kodierenden Enzyme. Analog der ET bei der MLEE werden bei der MLST Sequenztypen (ST) definiert. Die Vorteile der MLST gegenüber der MLEE sind überzeugend: Zum Einen ist es nun möglich DNA-Sequenzdaten verschiedener Labors miteinander zu vergleichen, zum Anderen können nun Daten via Internet transferiert und somit einer grossen Anzahl von Personen zugänglich gemacht werden.

Die Entwicklung mehrerer Multilokus-Sequenz-Datenbanken hat für Viele eine Arbeitserleichterung dargestellt (s.a.: www.mlst.net; <http://neisseria.org/nm/typing/mlst>). Ein weiterer, nicht von der Hand zu weisender Vorteil ist, dass die Variationsmöglichkeiten der MLST die der MLEE um ein Vielfaches überbieten. So ist es möglich mit Hilfe des 7-Lokus-MLST-Systems gleiche Ergebnisse wie mit dem herkömmlichen 14-Lokus-MLEE-System vorzuweisen, wobei wie bereits oben erwähnt stumme Mutationen gar nicht mittels MLEE entdeckt werden können.

Aus den genannten Gründen stellt die MLST momentan im Bereich der Erforschung bakterieller Populationsstrukturen den Goldstandard dar, wobei hierbei jedoch angemerkt sei, dass Populationsstrukturen in Zukunft wohl mittels Genomsequenzen dargestellt werden.

1.5. Stand der Forschung zur Populationsstruktur von *Neisseria lactamica*

Für viele kommensale *Neisserien*-Spezies ist horizontaler Gentransfer beschrieben worden. Sowohl innerhalb der selben Spezies, als auch zwischen verschiedenen Spezies konnte ein Gentransfer nachgewiesen werden (Bowler et al., 1994; Derrick et al., 1999; Feil et al., 1996; Feil et al., 2000; Holmes et al., 1999; Linz et al., 2000; Lujan et al., 1991; Saez Nieto et al., 1990; Smith et al., 1999; Zhou et al., 1997; Zhou and Spratt, 1992). Beispielsweise wurde ein horizontale Transfer solcher Gene beschrieben, bei denen Penicillin-Resistenz vermutet wird (Bowler et al., 1994). Meningokokken bauen gehäuft *tbp*-Allele, die von kommensalen *Neisserien*-Stämmen abstammen in ihr Genom ein (Linz et al., 2000). Aus oben genannten Gründen scheint die Definition eines globalen *Neisserien*-Genpools durchaus gerechtfertigt (Maiden et al., 1996).

Die Spezies *Neisseria lactamica* scheint eine Kommensale des menschlichen Nasen-Rachen-Raums mit einer erheblichen epidemiologischen Relevanz darzustellen, da man annimmt, dass eine Besiedlung mit diesen Bakterien vor einer Infektion mit Meningokokken schützt (Coen et al., 2000; Gold et al., 1978). Trotzdem wurde die Populationsstruktur dieser Art vor Beginn der Arbeit weder mittels MLEE noch durch MLST untersucht. So befasste man sich auch in der jüngsten Untersuchung über Rekombinationsereignisse bei *Neisserien* (Smith et al., 1999) lediglich mit sechs *Neisseria lactamica*-Stämmen, die man aus Schweden, England und Kanada (Barrett and Sneath, 1994) rekrutiert hatte.

Insofern konnten bis jetzt keine gesicherten Angaben über die Populationsstruktur der Spezies *Neisseria lactamica* gemacht werden. Ebenso blieb im Unklaren, in wie weit sich epidemiologisch miteinander in Kontakt, bzw. nicht miteinander in Kontakt stehende *Neisseria lactamica*-Isolate genetisch voneinander unterscheiden. In dieser Studie wurde daher die genetische Diversität von 26 *Neisseria lactamica*-Stämmen, die aus epidemiologisch verknüpften Kindergartengruppen und Schulklassen dreier benachbarter bayerischer Städte isoliert wurden, analysiert.

1.6. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der Genotypen von *Neisseria lactamica* bei epidemiologisch verknüpften Trägern. Resultierend aus diesen Ergebnissen sollte die Diversität dieser Spezies bestimmt werden.

Zu diesem Zweck untersuchten wir 26, aus Kindergärten und Grundschulen der drei benachbarten bayerischen Städte Augsburg, Ingolstadt und München entstammenden *Neisseria lactamica*-Stämme durch Sequenzierung der drei Stoffwechsel-Gene *argF*, *rho*, *recA* und des 16S rRNA-Gens.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Brutschränke

- KB 500 (Heraeus, Hanau)
- B5060 E-CO₂ (Heraeus, Hanau)

Elektrophoresekammern

- DNA Subcell™ (BioRad, München)
- Wide Mini-Subcell™ (BioRad, München)

Gel-Dokumentationssystem

- MidiDoc (Herolab, Wiesloch)

Heizblöcke

- BT1 und BT3 (Grant Instruments, Cambridge, UK)

DNA-Sequenzierapparat

- ABI Prism™ Sequencer 377 (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Spannungsgeräte

- Gene Power Supply GPS 200/400 (Pharmacia, Freiburg)
- Power Supply 3000Xi (BioRad, München)

Speed Vac® Plus SC110A (Savant, New York, USA)

Thermocycler

- TRIO (Biometra, Göttingen)
- Personal Cycler (Biometra, Göttingen)

Vortex Reagenzglas mixer (Heidolph, Kelheim)

Wasserbäder verschiedener Hersteller

Zentrifugen

- Biofuge 15 (Heraeus, Hanau)
- Biofuge 15R (Heraeus, Hanau)
- Omnifuge 2.0 RS (Heraeus, Hanau)
- Kühlzentrifuge RC-5B (Sorvall Heraeus, Hanau)
- Ultrazentrifuge L7 (Beckman, München)
- Tisch-Ultrazentrifuge TL-100 (Beckman, München)

2.2. Verbrauchsmaterial

Objektträger 76x26 cm verschiedener Hersteller

0.5 ml-, 1.5 ml-, 2.0 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nürnbergrecht)

15 ml-Röhrchen, steril (Greiner, Nürtingen)

Spritzen und Kanülen (Braun Melsungen AG, Melsungen)

Wattetupfer 15 mm verschiedener Hersteller

2.3. Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme

von AppliChem, Heidelberg

- O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG)

von bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich

- api NH

von Eurogentec, Seraign, Belgien

- *Smart-Ladder*

von Hepha, Bonn

- Oxidase-Reagenz 5 ml

von Merck, Darmstadt

- Ethidiumbromidlösung (2mg/L)

- Standard 1 Nährbouillon

von Perkin Elmer, Weiterstadt

- *AmpliTaq*[®]

von Qiagen, Hilden

- QIAquick PCR Purification Kit

- QIAquick Gel Extraction Kit

von Roth, Karlsruhe

- Agarose NEE0

- dNTPs, lyophilisiert

von Sigma-Aldrich, Schnelldorf

- L-Glutaminsäure- γ -3-Carboxy-4-Nitroanilid-NH₄

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.a. Qualität von Merck, Darmstadt oder Serva, Heidelberg bezogen.

2.4. Puffer und Lösungen

GEBS

- 20 % Glycerin
- 50 mM EDTA
- 0,05 % Bromphenolblau
- 0.5 % N-Lauroylsarkosin
- pH 8.0

Kristallviolett-Lösung

- 96 % Ethanol
- 91 % Phenol
- Kristallviolett (Merck, Darmstadt)

Lugol'sche Lösung

- Aqua demin.
- Kaliumjodid (Merck, Darmstadt)
- Jod (Merck, Darmstadt)

Methylenblau

- Aqua demin.
- 96 % Ethanol
- Methylenblau

PBS

- 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.4
- 140 mM NaCl

oder

- PBS Dulbecco ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Biochrom, Berlin)

Safranin-Lösung

- Aqua demin.
- Safranin O (Merck, Darmstadt)

1xTBE

- 100 mM Tris-HCl
- 100 mM Borsäure
- 2.5 mM EDTA
- PH 8.3

2.5. Bakterienkulturen

2.5.1. *Neisserien*-Stämme

Neisseria lactamica

bezogen von der DSMZ, Braunschweig

DSM 4691 (ATCC 23970, NCTC 10617)

Neisseria meningitidis-Stamm MC58

klinisches Isolat einer Blutkultur aus Stroud, Grossbritannien, 1983, (MRU Manchester Isolat D 641)

B:15:P1.7.16

ST-32 Komplex, ST-74

2.5.2. Nährmedium

Martin-Lewis Agar (Becton Dickinson, Heidelberg):

Selektivnährboden auf Kochblutbasis zur Isolierung pathogener *Neisserien* (enthält unter Anderem Amphotericin B, Colistin, Trimethoprim-Laktat und Vancomycin)

2.5.3. Kulturbedingungen

Alle Inkubationen fanden bei 37 °C statt. Die *Neisserien*-Kulturen wurden in einem CO₂-Brutschrank (5 % CO₂-Atmosphäre) inkubiert.

2.6. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Tabelle 1) wurden von ARK Scientific, Darmstadt bezogen.

Primer für *recA*

DA1 5'-GCCAGAAAAACGGCGGCG-3' Pos. 279-296 (U57905)

DA2 5'-TGACTTTGACGCGGGTTTCG-3' Pos. 670-651 (U57905)

Primer für *argF*

DA3 5'-GACGCGCGTTACAACATGG-3' Pos. 329-347 (X64871)

DA4 5'-GCAGGCAGTGCATGAATTTG-3' Pos. 665-646 (X64871)

Primer für *porB*

DA9 5'-CGGTAGCGGCAACTTCGG-3' Pos. 793-776 (X65533)

DA14 5'-TGAACAGCATCCTGAAAAGCA-3' Pos. 367-347 (X65533)

Primer für *rho*

DA17 5'-TCCGGCACACTCGAAATCC-3' Pos. 37- 55 (AJ223910)

DA18 5'-TGCAGCATCACGGTTTTACC-3' Pos. 449-430 (AJ223910)

Primer für das 16S rRNA Gen

27f 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' Pos. 8- 27 (JO1859)

907r 5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3' Pos. 926-907 (JO1859)

519r 5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3' Pos. 536-519 (JO1859)

Tabelle 1: Oligonukleotide, die für die PCR und Sequenzierung der Stoffwechselfgene *argF*, *recA*, *rho*, *porB* und 16S rRNA der *Neisseria lactamica*-Stämme benutzt wurden.

Oligo-nukleotide	Sequenz (5'-3')	Target	Position (accession number)
DA1	GCCAGAAAAACGGCGGCG	<i>recA</i>	279-269 (U57905)
DA2	TGACTTTGACGCGGGTTTCG	<i>recA</i>	670-651 (U57905)
DA3	GACGCGCGTTACAACATGG	<i>argF</i>	329-347 (X64871)
DA4	GCAGGCAGTGCATGAATTTG	<i>argF</i>	656-646 (X64871)
DA9	CGGTAGCGGCAACTTCGG	<i>por B</i>	793-776 (X65533)
DA14	TGAACAGCATCCTGAAAAGCA	<i>por B</i>	367-347 (X65533)
DA17	TCCGGCACACTCGAAATCC	<i>rho</i>	37-55 (AJ223910)
DA18	TGCAGCATCACGGTTTTACC	<i>rho</i>	449-430 (AJ223910)
27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	16S rRNA Gen	8-27 (JO1859)
907r	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	16S rRNA Gen	926-907 (JO1859)
519r	GWATTACCGCGGCKGCTG	16S rRNA Gen	536-519 (JO1859)

2.7. Isolation und Identifikation von *Neisseria lactamica*-Stämmen

2.7.1. Die bayerische Meningokokkenträgerstudie

Die bayerische Meningokokkenträgerstudie (genehmigt von der Ethikkommission der Universität Würzburg, Studiennummer 137/99) wurde von November 1999 bis März 2000 durchgeführt. Bei 8000 Kindern und Jugendlichen im Alter von drei bis 25 Jahren aus verschiedenen Orten Bayerns wurden Rachenabstriche entnommen. Im Rahmen der Studie wurden *Neisseria meningitidis*- und *Neisseria lactamica*-Stämme gesammelt. In folgenden Ortschaften und Institutionen wurden Rachenabstriche entnommen:

Augsburg

- KG, GS, RS, Gym

Bayreuth

- Bundeswehrekaserne

Coburg

- KG, GS, RS, Gym

Dinkelsbühl

- KG, GS, HS, Gym

Ebern

- Bundeswehrekaserne

Eggenfelden

- KG, GS, HS, RS, Gym

Erlangen

- KG, GS, HS, RS, Gym

Fürstzell

- Gym

Griesbach

- KG, GS, HS

Ingolstadt

- KG, GS, HS, RS, Gym

Kempten

- Bundeswehrekaserne

München

- KG, GS, HS, RS, Gym

Pfarrkirchen

- KG, GS, HS, RS ,Gym

Roth

- Bundeswehrkaserne

Sonthofen

- KG, GS, HS, Gym, Bundeswehrkaserne

Volkach

- Bundeswehrkaserne

Weiden

- KG, GS, HS, Gym

Würzburg

- KG, GS, HS, Gym

Erläuterung der Abkürzungen:

KG: Kindergarten

GS: Grundschule

HS: Hauptschule

RS: Realschule

Gym: Gymnasium

2.7.2. Abstrichentnahme

Mit Hilfe von Wattetupfern wurden bei den Kindern Abstriche der hinteren Rachenwand entnommen, welche dann unverzüglich vor Ort auf Martin-Lewis Agar ausplattiert wurden. Der Transport der bestrichenen Nährmedien zurück in das mikrobiologische Labor nach Würzburg erfolgte auf kürzestem Wege mit der Deutschen Bahn oder dem Lieferwagen. Die Inkubation erfolgte innerhalb von 1-10 h nach Abstrichentnahme. Nach 8-12-stündiger Inkubation der Agarplatten bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre wurden die Kolonien erstmals inspiziert.

Oxidase-Positive Kolonien mit typischem Aussehen wurden nach Subkultur auf Martin-Lewis Agar auf ihre β -Galaktosidase- und γ -Glutamyltransferase (GGT)-Aktivität getestet. Für die β -Galaktosidase-Testung wurde O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) als Substrat verwendet. Die Bakterien wurden in eine ONPG-haltige Lösung (2 mM ONPG, 113 μ M Sodiumdodecylphosphat, 124 mM NaCl, 16 mM K^+ -Phosphat, pH 7) resuspendiert (OD_{600 nm}=1). Bei ONPG-Positiven Stämmen kam es nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C zu einer Gelbfärbung. Die GGT-Testung erfolgte, indem man die Bakterien acht Stunden bei 37 °C in 1 mM L-Glutaminsäure- γ -3-Carboxy-4-Nitroanilid-NH₄ inkubierte. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle dienten jeweils der *Neisseria lactamica*-Referenzstamm DSM 4691 bzw. der *Neisseria meningitidis*-Stamm MC58. Die endgültige Bestätigung der Diagnose *Neisseria lactamica* erfolgte bei Oxidase-positiven, ONPG-positiven und GGT-negativen Bakterienstämmen mittels api NH (Durchführung und Auswertung gemäss Herstellerangabe).

2.7.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion können definierte DNA-Abschnitte mit spezifischen Oligonukleotiden (*Primern*) unter Verwendung der thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* amplifiziert werden. Die *Primer* werden so gewählt, dass sie antiparallel zueinander an den beiden Strängen der DNA hybridisieren und der gewünschte DNA-Abschnitt vervielfältigt werden kann. Die in-vitro-Vervielfältigung der DNA-Abschnitte wird im *Thermocycler* durchgeführt und beinhaltet die Denaturierung der DNA, das Anlagern der *Primer* und die Polymerase-Reaktion.

Reaktionsablauf im *Thermocycler*:

- | | |
|---------------------|---|
| 1. Denaturierung | 300-600 sec bei 94 °C |
| 2. <i>Annealing</i> | 60 sec bei der <i>Annealing</i> -Temperatur |
| 3. <i>Extension</i> | ... sec bei 72 °C |
| 4. Denaturierung | 60 sec bei 94 °C |
| 5. <i>Annealing</i> | 60 sec bei der <i>Annealing</i> -Temperatur |
| 6. <i>Extension</i> | 600 sec bei 72 °C |

Die *Annealing*-Temperatur war für *argF*, *rho* und *porB* 56 °C, für *recA* 62 °C und für 16S rRNA 53 °C. Sie wird 4 °C unterhalb der nach der 2+4-Regel (2 °C pro AT-bp, 4 °C pro GC-bp) berechneten Schmelztemperatur gewählt. So kann eine Anlagerung an unspezifische DNA-Abschnitte verhindert werden, und es erfolgt keine Amplifikation unspezifischer DNA-Fragmente. Die Dauer der Polymerase-Reaktion richtet sich nach der Länge des DNA-Fragments, das amplifiziert werden soll. Innerhalb einer Minute erfolgt ein Einbau von ca. 1000 Nukleotiden. Die Schritte 2-5 werden 36mal durchlaufen.

Die PCR-Produkte wurden vor ihrer weiteren Verwendung als Klonierungsfragment durch eine Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) von den *Primern* getrennt.

2.7.3.1. PCR mit der AmpliTaq® DNA-Polymerase

- 10xPCR-Puffer
- 500 mM KCl
- 100 mM Tris-HCL, pH 8.3
- 25 mM MgCl₂
- 10xNukleotid-Mix
- je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- AmpliTaq® DNA-Polymerase (5 U/μl)
- *Primer* (0.2 mM)

Jeder PCR-Ansatz wird nach folgendem Schema angesetzt:

- 10-20 ng Plasmid-DNA bzw. chromosomale DNA als *Template*
- 10 μl 10xPCR-Puffer
- 6 μl MgCl₂
- 10 μl dNTP
- 1 μl *Primer A*
- 1 μl *Primer B*
- 0.2 μl *Taq*-DNA-Polymerase
- ddH₂O ad 100 μl

Der Reaktionsansatz wird zum Schutz vor Verdunstung mit Mineralöl überschichtet.

2.7.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgt in Agarosegelen, wobei die Agarosekonzentration in Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente gewählt wird z.B.:

0.8 % Agarose für 0.8-12 kb

1 % Agarose für 0.5-10 kb

1.5 % Agarose für 0.2- 3 kb

Die jeweilige Agarosemenge wird in 1xTBE unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C in horizontale Gelträger gegossen. Die zu analysierenden DNA-Lösungen werden vor dem Auftragen mit GEBS verdünnt, wobei das in GEBS enthaltene Bromphenolblau als *Marker* für die Lauffront dient. Als DNA-Größenstandard dienen *Smart-Ladder*. Die Elektrophorese erfolgt bei 100-200 V und Raumtemperatur. Um die DNA-Banden gut sichtbar zu machen, werden die Gele ca. 10 min in eine Ethidiumbromidlösung (2mg/l) gelegt und anschließend unter UV-Licht (302 nm) betrachtet. Aufgrund der konstanten Menge an Größenmarker, die verwendet wird, lässt sich die Menge der zu analysierenden DNA-Fragmente abschätzen.

2.7.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen und aus PCR-Ansätzen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Isolierung amplifizierter DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen erfolgt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden). Beide Verfahren basieren auf der selektiven Bindung der DNA an Silikagel-Membranen in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Bezüglich der Zusammensetzung der Lösungen werden vom Hersteller keine Angaben gemacht.

2.7.6. Automatisierte DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgt mit dem automatischen Sequenziergerät ABI Prism™ Sequenzer 377 (Perkin Elmer, Weiterstadt) nach der Kettenabbruch- oder Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977). Nach der Denaturierung der zu sequenzierenden doppelsträngigen DNA wird zur Initiation der DNA-Synthese durch die *Taq*-DNA-Polymerase ein *Primer* an den zu sequenzierenden Einzelstrang angelagert. Um den Kettenabbruch bei der Synthese zu erzielen, werden dem Reaktionsansatz außer den vier Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) geringe Mengen der 2'.3'-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugefügt, die jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind.

Die ddNTPs werden von der Polymerase als Substrate verwendet, ermöglichen aber aufgrund des Fehlens einer Hydroxylgruppe am 3'-Ende keine Kettenverlängerung. Somit wird die DNA-Synthese nach dem Einbau eines ddNTPs an einer beliebigen Stelle gestoppt, und es entsteht eine Mischung von DNA-Molekülen, die alle das gleiche 5'-Ende besitzen, in der Länge variieren und basenspezifisch terminiert sind.

Sequenzieransatz:

- 0,1 µg PCR-Produkt
- 5-10 pmol *Primer*
- 2 µl Sequenzier-Mix
- ddH₂O ad 10 µl

Die *Taq Cycle*-DNA-Sequenzierung gliedert sich in folgende Schritte:

Denaturierung

- 10 sec bei 96 °C

Primer-Hybridisierung

- 5 sec bei der Temperatur entsprechend der *Primer*-Zusammensetzung (2+4-Regel-5 °C)

DNA-Synthese mit gleichzeitiger Markierung und Termination

- 4 min bei 60 °C

Im Anschluß an die Markierungsreaktion werden die Reaktionsansätze gefällt, in Probenpuffer aufgenommen und für 2 min bei 90 °C hitzedenaturiert. Danach erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzieransätze in Polyacrylamidgel. Das emittierte Fluoreszenzlicht der eingebauten Didesoxynukleotide ermöglicht die Detektion der verschiedenlangen DNA-Moleküle mittels eines Laserscanners, der in das Sequenziergerät integriert ist.

2.7.7. Sequenzanalysen

Die ermittelten DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit der Lasergene-Sequenzanalyse-*Software* (Dnastar, Madison, USA) analysiert. Sequenzvergleiche erfolgten mit dem Clustal V des *MegAlign*-Programms. Sequenzvergleiche mit der GenBank- und der SWISS-PROT-Datenbank erfolgten über den *Server* des *National Center for Biotechnology Information* (Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>).

3. Ergebnisse

3.1. Isolation und Identifikation von *Neisseria lactamica*-Stämmen

Im Rahmen der bayerischen Meningokokkenträgerstudie, die von November 1999 bis März 2000 durchgeführt wurde, wurden in Kindergärten und Schulen der Gemeinden Ansbach, Augsburg, Erlangen, Griesbach, Ingolstadt, München, Pfarrkirchen, Sonthofen und Weiden (Abbildung 1) insgesamt 305 Oxidase-positive, ONPG-positive und GGT-negative *Neisserien*-Stämme gesammelt.

Abbildung 1: Geographische Herkunft der im Rahmen der bayerischen Meningokokkenträgerstudie isolierten *Neisseria lactamica*-Stämme.



Der Altersmedian der teilnehmenden Kinder und Jugendlichen betrug neun Jahre. Mit Hilfe eines biochemischen Testverfahrens (api NH) konnte bei 287 Bakterienstämmen die Diagnose *Neisseria lactamica* sichergestellt werden. Bei den restlichen 18 Stämmen resultierten aus der biochemische Überprüfung folgende Spezies: In vier Fällen ergab die api NH *Neisseria cinerea*, in weiteren drei Fällen *Neisseria meningitidis*, wobei hierbei von Fehlbestimmungen der vorhergehenden GGT- und ONPG-Testung auszugehen ist. In fünf Fällen wurde durch api NH die Diagnose *Haemophilus spp.* gestellt. Dieses Ergebnis wurde nicht weiter verifiziert. In sechs Fällen konnte keine Speziesdiagnose gestellt werden.

Von den 287, biochemisch eindeutig als *Neisseria lactamica* identifizierten Stämmen (Tabelle 2) wurden 40, die von Kindern aus Kindergärten und Schulen der benachbarten Städte Augsburg, Ingolstadt und München isoliert wurden, zur weiteren Untersuchung der genetischen Variabilität von *Neisseria lactamica* ausgewählt. Um die Identifizierung dieser 40 Bakterienstämme als *Neisseria lactamica* mit einem unabhängigen Testverfahren zu bestätigen, analysierten wir deren 16S rRNA-Sequenzen mit Hilfe der RIDOM-Datenbank (Harmsen et al., 2001 und Harmsen et al., 2002). Bei RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms, www.ridom.de) handelt es sich um ein Hypertext-basiertes, intuitives Interface zur Identifikation und molekularen Differenzierung pathogener Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze. Die Ergebnisse von DNA-Sequenzvergleichen werden aus einer relationalen Datenbank ausgegeben, interpretiert und multimedial präsentiert.

Tabelle 2: Herkunft der 287 als *Neisseria lactamica* identifizierten Bakterienstämme.

Abstrich- datum	Gemeinde	Institution (n)	Kinder (n)	Gesamt- zahl (n)	Alters- gruppe (a)	Median (a)
20.01.00	Griesbach	Kindergarten (2)	11		3-6	5
26.01.00	Griesbach	Hauptschule (1)	6		11-14	11.5
	Griesbach			17		
25.01.00	Pfarrkirchen	Kindergarten (1)	6		4-6	5,5
25.01.00	Pfarrkirchen	Grundschule (1)	6		6-10	8.5
25.01.00	Pfarrkirchen	Hauptschule (1)	2		11-12	11.5
25.01.00	Pfarrkirchen	Gymnasium (1)	1		18	18
	Pfarrkirchen			15		
01.02.00	Erlangen	Kindergarten (5)	25		3-6	5
02.02.00	Erlangen	Grundschule (4)	34		6-10	8
07.02.00	Erlangen	Hauptschule (4)	4		11-15	12.5
08.02.00	Erlangen	Realschule (1)	1		12	12
08.02.00	Erlangen	Gymnasium (2)	1		17	17
	Erlangen			65		
15.02.00	Ansbach	Kindergarten (1)	8		3-5	5
15.02.00	Ansbach	Grundschule (1)	8		6-10	6.5
15.02.00	Ansbach	Hauptschule (1)	5		10-12	10
	Ansbach			21		
17.02.00	Weiden	Kindergarten (1)	11		3-6	4
17.02.00	Weiden	Grundschule (1)	1		9	9
	Weiden			12		
24.02.00	Augsburg	Kindergarten (1)	20		3-6	5
21.02.00	Augsburg	Grundschule (1)	20		6-11	8
23.02.00	Augsburg	Realschule (1)	1		13	13
	Augsburg			41		
24.02.00	Ingolstadt	Kindergarten (3)	21		3-6	4
28.02.00	Ingolstadt	Grundschule (1)	12		6-10	7
29.02.00	Ingolstadt	Hauptschule (1)	6		10-13	11.5
01.03.00	Ingolstadt	Realschule (1)	1		13	13
01.03.00	Ingolstadt	Gymnasium (2)	3		19-22	21
	Ingolstadt			43		
08.03.00	Sonthofen	Kindergarten (1)	5		5	5
08.03.00	Sonthofen	Grundschule (1)	2		7-8	7.5
	Sonthofen			7		
23.03.00	München	Kindergarten (7)	42		3-6	5
21.03.00	München	Grundschule (9)	11		8-10	9
20.03.00	München	Hauptschule (9)	13		10-14	12
	München			66		

Gesamt 287

Da 97 % Sequenzidentität des 16S rRNA-Gens häufig als *cut-off* für Speziesgrenzen verwendet wird, wurden in unsere Studie nur solche Stämme aufgenommen, deren Sequenzen mit über 97 % Wahrscheinlichkeit mit denen des in der oben beschriebenen RIDOM-Datenbank aufgeführten *Neisseria lactamica*-Referenzstammes DSM 4691 übereinstimmten. Es handelt sich um ein konservatives Kriterium, da horizontaler Gentransfer für das 16S rRNA-Gen beschrieben ist. Bei vier der 40 ausgewählten Stämme zeigte sich bezüglich des 16S rRNA-Gens zwar die beste Übereinstimmung mit *Neisseria lactamica*, sie betrug aber weniger als 97 %. Die 16S rRNA-Gene von 10 weiteren Stämmen zeigte eine höhere Identität zu *Neisseria cinerea* als zu *Neisseria lactamica* (96.8 bis 99.1 % Übereinstimmung mit *Neisseria cinerea*), was zum Ausschluss dieser Stämme aus der Studie führte, auch wenn nicht auszuschliessen ist, dass es sich um *Neisseria lactamica*-Stämme handelt, die in Folge von horizontalem Gentransfer ein heterologes 16S rRNA-Gen tragen.

Schliesslich verblieben 26 Stämme (Tabelle 3), die im weiteren Verlauf einer Sequenztypisierung unterzogen wurden. Diese 26 Stämme wurden alle innerhalb eines Monats zwischen dem 28.02.2000 und dem 24.03.2000 gesammelt. 17 der näher untersuchten Stämme stammten aus Augsburg, acht davon aus einem Kindergarten, neun aus einer Grundschule. Weitere fünf Stämme kamen aus zwei verschiedenen Ingolstädter Kindergärten. Die restlichen vier analysierten Bakterienstämme entstammten einem Kindergarten der Landeshauptstadt München. Der Alters-Range der *Neisseria lactamica*-Träger betrug drei bis elf Jahre, der Median sieben Jahre. Die Gruppe der Vierjährigen dominierte (Tabelle 3).

Tabelle 3: Sequenztypen der in drei bayerischen Städten gesammelten *Neisseria lactamica*-Stämme.

Isolat-Nr.	Stadt	Institution ¹⁾	Gruppe	Alter	<i>recA</i> *	<i>argF</i> *	<i>rho</i> *	16S rDNA*	<i>porB</i> *	Genotyp
181	Augsburg	KG 1	6	5	1	1	1	1	1	1
175	Augsburg	KG 1	4	4	1	1	1	1	1	1
176	Augsburg	KG 1	4	4	1	1	1	1	1	1
177	Augsburg	KG 1	4	5	1	1	1	1	1	1
149	Augsburg	GS 1	1d	7	1	3	1	1	4	2
163	Augsburg	GS 1	4b	10	1	3	1	1	7	2
147	Augsburg	GS 1	1d	7	1	3	1	1	4	2
205	Ingolstadt	KG 2	T.	3	9	3	1	1	4	3
208	Ingolstadt	KG 3	M.	4	6	3	1	1	11	4
207	Ingolstadt	KG 2	T.	4	5	3	8	1	3	5
206	Ingolstadt	KG 2	T.	4	5	3	8	1	3	5
155	Augsburg	GS 1	3a	9	6	1	5	2	nd°	6
154	Augsburg	GS 1	3a	8	8	2	4	3	nd°	7
162	Augsburg	GS 1	4b	10	8	2	4	3	9	7
185	Augsburg	KG 1	7	3	8	2	4	3	9	7
178	Augsburg	KG 1	5	4	6	1	9	4	10	8
179	Augsburg	KG 1	5	4	1	5	8	5	1	9
265	München	KG 4	1	4	5	1	8	5	1	10
271	München	KG 4	1	5	4	1	8	6	5	11
159	Augsburg	GS 1	4a	11	9	1	2	10	nd°	12
267	München	KG 4	1	5	9	4	7	6	2	13
270	München	KG 4	1	3	2	1	6	7	5	14
156	Augsburg	GS 1	3a	8	1	1	6	8	5	15
210	Ingolstadt	KG 3	M.	3	9	1	2	9	8	16
151	Augsburg	GS 1	1c	6	9	1	2	9	nd°	16
183	Augsburg	KG 1	6	5	7	5	3	9	nd°	17

Anmerkung:

*: Allelnummern

°: not done

¹⁾ KG: Kindergarten; GS: Grundschule

3.2. Sequenztypisierung ausgewählter *Neisseria lactamica*-Stämme

Mit Hilfe einer Sequenztypisierung wurde die genetische Variabilität von *Neisseria lactamica* untersucht. Hierzu untersuchten wir von den 26 ausgewählten Bakterienstämmen neben den 16S rRNA-Sequenzen (Position 52 bis 509 [GenBank accession no. J01859, *Escherichia coli* rDNA]) zusätzlich die Sequenzen von internen Fragmenten der drei *housekeeping*-Gene (Auswahl erfolgte nach Smith et al., 1999) *argF* (Position 358 bis 634 [X64871]), *recA* (Position 308 bis 639 [U57905]) und *rho* (Position 67 bis 417 [AJ223910]). Diese vier Gene wurden 1999 schon von Smith et al. zur Analyse beim Menschen vorkommender *Neisseria*-Spezies verwendet (Smith et al., 1999).

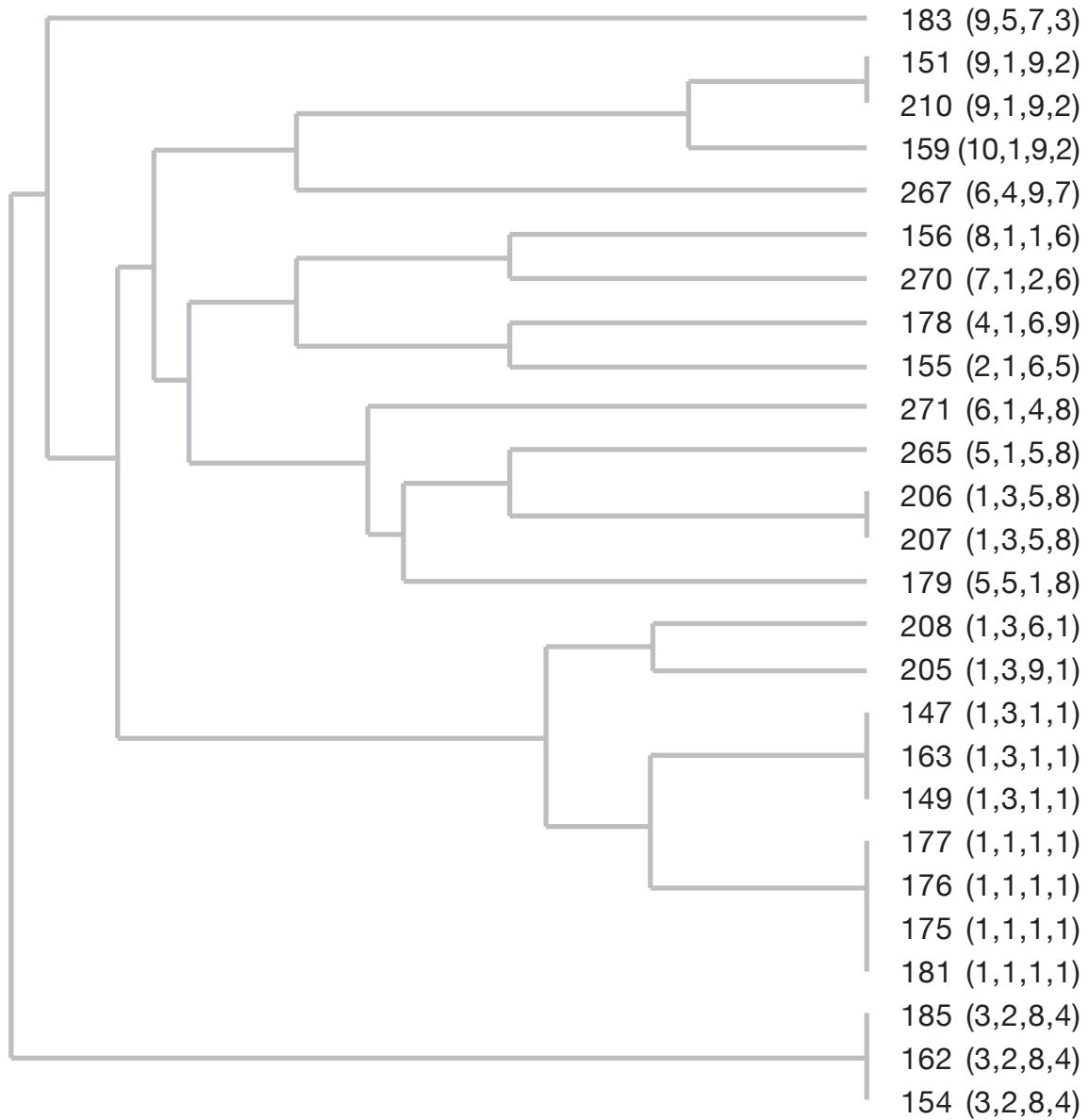
ArgF kodiert für die Ornithin Carbamoyl-Transferase. *RecA* kodiert für das Protein *recA*, welches für erfolgreiche Rekombinationen erforderlich ist. *Rho* kodiert für einen Transkriptions-Terminations-Faktor.

Die Analyse der Sequenzen des 16S rRNA-Gens ergab mit 10 verschiedenen Allelen in 26 Bakterienstämmen eine überraschend hohe Variabilität. 16S-1 kam am häufigsten vor, und wurde sowohl in Ingolstadt als auch in Augsburg gefunden. Auch die von uns definierten Allele 16S-3 (dreimal in Augsburg), 16S-5 (jeweils einmal in Augsburg und München) und 16S-9 (einmal in Ingolstadt, zweimal in Augsburg) kamen mehrmals vor. Die Sequenzierung interner Fragmente der drei Stoffwechselfragmente ergab für *argF* fünf, für *recA* acht und für das *rho*-Gen neun verschiedene Allele. Sechs der elf in München bei vier Isolaten gefundenen Allele waren spezifisch für die Stämme in München (*argF*-4, *recA*-4, *recA*-2, *rho*-7 und 16S-6, 16S-7). 14 Allele der vier untersuchten Gene kamen nur in Augsburg vor (*argF*-2, *argF*-5, *recA*-1, *recA*-7, *recA*-8, *rho*-3, *rho*-4, *rho*-5, *rho*-9 und 16S-2, 16S-3, 16S-4, 16S-8, 16S-10). Es konnte allerdings kein einziges für Ingolstadt spezifisches Allel nachgewiesen werden. Insgesamt nur drei Allele kamen sowohl in Augsburg als auch in Ingolstadt und München vor (*argF*-1, *recA*-9 und *rho*-8). Somit konnte durch die Sequenzierung der drei Stoffwechselfragmente *argF*, *recA*, *rho* sowie des 16S rRNA-Gens ein hohes Mass an genetischer Variabilität in Bezug auf die 26 untersuchten *Neisserien*-Stämme festgestellt werden.

Die Genotypen (=GT) wurden auf der Basis der vier sequenzierten Gene definiert d.h. für die 26 analysierten Bakterienstämme wurden insgesamt 17 verschiedene Genotypen definiert (Tabelle 3). Zwölf der 17 (GT-3, GT-4, GT-6, GT-8, GT-9, GT-10, GT-11, GT-12, GT-13, GT-14, GT-15, GT-17) Genotypen kamen jeweils nur einmal vor. Die *Coverage* betrug 66.7 %, berechnet nach der Formel $c=[1-(n_{singletons} / n_{clones}) \times 100]$ (Giovannoni et al., 1995). Fünf der 17 Genotypen (GT-1, GT-2, GT-5, GT-7, GT-16) tauchten mehr als einmal auf. GT-1 wurde viermal gefunden, und zwar ausschließlich in Augsburg im Kindergarten 1, wobei dieser GT dort dreimal in der Gruppe 4, und einmal in der Gruppe 6 gefunden wurde. Auch GT-2 blieb auf Augsburg beschränkt, hier jedoch auf eine Grundschule, zweimal in der Klasse 1d, einmal in der Klasse 4b vorkommend. GT-5 schliesslich war spezifisch für Ingolstadt, dieser GT wurde bei zwei Kindern der gleichen Kindergartengruppe gefunden. GT-7 und GT-16 traten in verschiedenen Institutionen auf. GT-7 kam zwar auch nur in Augsburg vor, jedoch einmal in einem Kindergarten und zweimal in der selben Grundschule, aber dort in verschiedenen Klassen. GT-16 war der einzige GT, der in verschiedenen Städten (Augsburg und Ingolstadt) gefunden wurde.

Der *linkage distance tree*, der anhand der Allelnummern erstellt wurde (Abbildung 2) verdeutlicht die genetische Diversität der 26 untersuchten *Neisserien*-Stämme, die durch Sequenzierung der vier Gene nachgewiesen wurde. Viele Stämme verschiedener Genotypen besitzen ein oder mehrere identische Allele, was als Zeichen für einen Alleltransfer zwischen den einzelnen Stämmen gelten kann.

Abbildung 2: *Linkage distance tree* der 26 in dieser Studie analysierten *Neisseria lactamica*-Stämme. Die Stammnummern befinden sich auf der rechten Seite, die Allel-Nummer in Klammern dahinter in folgender Reihenfolge: 16S rRNA, *argF*, *recA* und *rho*.



Um zu überprüfen ob Bakterienstämme mit identischem GT durch Sequenzierung eines weiteren genomischen Lokus weiter unterschieden werden können, wurde bei 23 der 26 Stämme ein internes Segment des *porB*-Gens (Position 379 bis 750 [X65533]) sequenziert (Derrick et al., 1999; Ward et al., 1992), wobei dieses Segment für die Aminosäuren 123 bis 246 des *Neisseria lactamica-porB* kodierte. Dieses Fragment beinhaltete zum Einen die Sequenzen, die für die von der Oberfläche exponierten hochvariablen *loops* IV und V des *Neisseria lactamica-porB* kodierten, zum Anderen beinhaltete es teilweise die *loops* III und VI. Oberflächenexponierte Bereiche der Porine stehen unter Immenselektionsdruck und sind hochvariabel. Vom *porB*-Gen wurden insgesamt 11 verschiedene Allele gefunden.

Überraschend war die Tatsache, dass alle Stämme des selben GT identische *porB*-Gen-Sequenzen besaßen. So kam in allen Stämmen mit GT-1 nur das *porB*-Allel 11, in allen GT-5-Stämmen Allel 3, in allen GT-16-Stämmen Allel 8 und in allen GT-7-Stämmen nur Allel 9 vor. Nur einer von drei GT-2-Stämmen konnte mit Hilfe der Porin-Sequenzierung von den anderen Beiden differenziert werden. Hieraus resultierte, dass durch Sequenzierung des *porB*-Gens nur bei Einem der fünf GT, die mehr als einmal auftauchten eine weitere Diskriminierung erreicht werden konnte. Somit ist anzunehmen, dass die Sequenztypisierung der vier Gene *argF*, *recA*, *rho* und 16S rRNA bereits eine ausreichende Diskriminierung von *Neisseria lactamica* erlaubt.

3.3. Sequenzauswertung

Wie bereits in Abschnitt 3.2. angesprochen, ergaben sich durch die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens zehn verschiedene Allele bei den untersuchten 26 *Neisseria lactamica*-Stämmen. Innerhalb dieser zehn Allele wurden 21 polymorphe Stellen beobachtet. Die Sequenzierung des *argF*-Gens ergab fünf unterschiedliche Allele. Bei genauerer Betrachtung erkannten wir neben sieben synonymen Mutationen eine nichtsynonyme Mutation an Position 208, was zu einem Austausch der Aminosäure Valin durch ein Isoleucin führte. Da beide Aminosäuren zu den verzweigtkettigen, apolaren und hydrophoben Aminosäuren gehören ist eine funktionelle Auswirkung dieser Mutation unwahrscheinlich. Bei den neun Allelen des Stoffwechselfgens *rho* zeigten sich insgesamt 13 synonyme Mutationen. Beim *recA* fanden wir acht verschiedene Allele mit insgesamt 24 Mutationen, wobei es ähnlich wie beim *argF* hier jedoch an zwei Stellen (Position 136 und 292) zu einer Veränderung der abgeleiteten Aminosäuresequenz kam. Diese zwei nichtsynonymen Mutationen führten an Position 136 zu einem Austausch des Valins durch ein Isoleucin, an Position 292 wurde ein Isoleucin durch ein Valin ersetzt. Die Darstellung der polymorphen Stellen wurde visuell auf Hinweise für Rekombinationsereignisse inspiziert (Abbildung 3). Punktmutationen sind bei solchen polymorphen Stellen anzunehmen, die als einzelner Nukleinsäureaustausch auffallen (z.B. Pos. 387 bei Allel *recA*-4, Pos. 417 bei Allel *recA*-7, Pos. 427 bei Allel 16S-3). Rekombinationsereignisse sind bei mehreren Mutationen in einem Allel anzunehmen (z.B. Pos. 406 bis 421 bei Allelen 16S-5 bis 16S-10, Pos. 42 bis 267 bei Allelen *rho*-6 und *rho*-9, Pos. 157 bis 160 bei Allelen 16S-3 und 16S-4, bzw. 16S-6 bis 16S-10), da die konsekutive Spontanmutation an mehreren Stellen unwahrscheinlich ist. Insbesondere das Vorliegen von Mosaikstrukturen erleichtert bei der visuellen Inspektion die Interpretation in Richtung Rekombination. Eine solche Mosaikstruktur ist auffällig bei Allel 16S-5, das möglicherweise aus 16S-1 und 16S-6 zusammengesetzt ist (Abbildung 3).

Für alle vier Loci ist anhand der oben aufgezeichneten Kriterien schon bei der visuellen Inspektion horizontaler Gentransfer anzunehmen. Das bei visueller Betrachtung auffällige vermutliche Überwiegen von Rekombinationen im Vergleich zur Punktmutation bestätigt die durch Analyse der Genotypen aufgebrachte Hypothese eines häufigen horizontalen Gentransfers bei *Neisseria lactamica*. Diese durch visuelle Inspektion entstandene Vermutung konnte nach Abschluss dieser Arbeit durch weitere Methoden bestätigt werden (s.a. Diskussion).

Abbildung 3: Polymorphe Stellen innerhalb der *argF*-, *recA*, *rho*- und 16S rRNA-Gene von *Neisseria lactamica*. Die Position der polymorphen Stellen sind oberhalb der Nukleotidsequenzen in vertikaler Form dargestellt. Der aus nichtsynonymen Mutationen resultierende Austausch von Aminosäuren ist unterhalb der Nukleotidsequenzen in Form von Einzelbuchstaben ausgeführt.

<i>argF</i>	<i>recA</i>
11122	1111111222222222333334
35509903	170112223014688999447881
24585884	829473696430458124258177
ACCCAAAG 01	CGTCACTGAGTTGGGTGGCATTCC 01
GTTCAAAG 02	CGTCACTGAGTTGGGTGGC ACCCC 02
ACCC CGGA 03	CGT CGTTGAGCTAGGTGGCATTAC 04
ACCT CGGA 04	AGACGCTGACCTAGGTGGCATTCC 05
ACCC CGGG 05	CGTT GCTGACCCAGGTGGCATTCC 06
I	CGTT GCTGACTCACCCACCATTCT 07
V	ACTTGGCCGCCTAGGTGGCATTCC 08
	ACTTGGCCGCCACCCACTGTTCC 09
	I V
	V I
<i>rho</i>	16S rRNA
111222233	1111122223334444444444
4445159688901	455691238009000111222
2584762758735	379093782349679028017
TTTACAGTCGTCG 01	GATTTGGGCGCGCTTTCTAGG 01
TTTACA ATCCACG 02	GATTT AGGCGCGCTTTCTAGG 02
TTTAC GACCTTCC 03	GTCGGAGGCGCGCTTTCTAGA 03
TTTAT TGGCCGTCC 04	GTCGTAGGCGCGCTTTCTAGG 04
CCCCCAATCGACG 05	GATTTGGGCGCGT CGGTCCCCG 05
CCCCTGACTTCCC 06	GTCGGAAAGCGCGTCCGGTCCCCG 06
TTTACAGTCTTCC 07	GTCGGAGGCGCGTCCGGTCCCCG 07
TTTCT GACCTTTC 08	GTCGGAGGCGCATCCGGTCCCCG 08
CCCCTGACCTTCC 09	GTCGTAGGCGCGTCCGGTCCCCG 09
	TTCGTAGAAAAGTCCGGTCCCCG 10

4. Diskussion

Im Rahmen der bayerischen Meningokokkenträgerstudie, die von November 1999 bis März 2000 durchgeführt wurde, konnten in Kindergärten und Schulen zahlreicher bayerischer Gemeinden insgesamt 287 *Neisseria lactamica*-Stämme isoliert werden. 26 ausgesuchte, aus den benachbarten Gemeinden Augsburg, Ingolstadt und München stammende *Neisseria lactamica*-Stämme wurden zur Untersuchung ihrer genetischen Diversität einer Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung (MLST) unterzogen. Neben den 16S rRNA-Sequenzen wurden dabei Sequenzen von internen Fragmenten der drei *housekeeping*-Gene *argF*, *recA* und *rho* analysiert. Bei 26 Bakterienstämmen ergaben sich für das 16S rRNA-Gen zehn, für *argF* fünf, für *recA* acht und für *rho* neun unterschiedliche Allele.

Daraus resultierend konnten 17 Genotypen (GT) definiert werden, von denen zwölf nur jeweils einmal vorkamen. Versuche, eine weitere Diskriminierung durch Sequenzierung des *porB*-Gens zu erreichen, erbrachte nur wenig zusätzliche Informationen, so dass anzunehmen ist, dass die Sequenzierung der vier verwendeten Gene bereits eine ausreichende Diskriminierung von *Neisseria lactamica* erlaubt.

Durch visuelle Inspektion der Sequenzen konnte bei allen vier Loci das Überwiegen von Rekombinationsereignissen im Vergleich zu Punktmutationen bestätigt werden, so dass für die Spezies *Neisseria lactamica* horizontaler Gentransfer anzunehmen ist. Durch Verwendung zweier weiterer Methoden, der *Split Decomposition*-Analyse (Bandelt and Dress, 1992; Huson, 1998) und der Homoplasie-Testung (Smith and Smith, 1998), wurde nach Abschluss dieser Arbeit zusätzlich zur Bestätigung der rein visuellen Inspektion versucht, bei den vier in dieser Studie sequenzierten Gene 16S rRNA, *argF*, *recA* und *rho* das Vorkommen von Rekombinationsereignisse nachzuweisen (Alber et al., 2001).

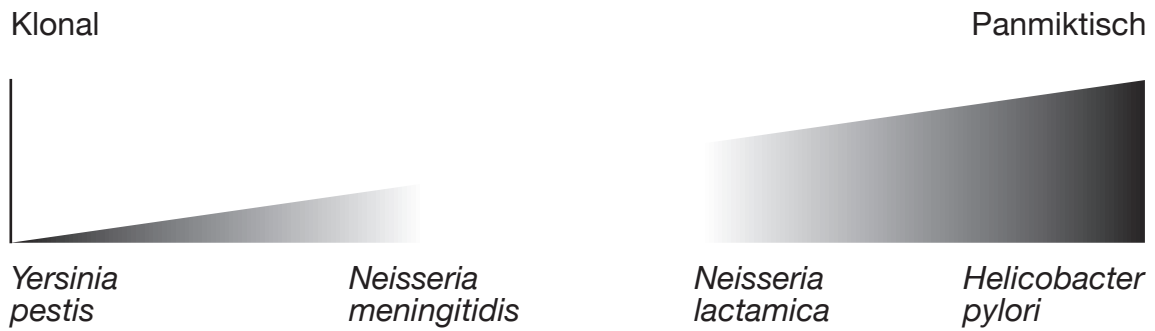
Split Decomposition wurde bisher extensiv zur Analyse der Populationsstruktur von Bakterien und auch Viren angewendet. Bei dieser Methode werden Rekombinationsereignisse durch miteinander verbundene Netzwerke (*split graphs*) visualisiert. Mit Ausnahme des *argF*-Gens zeigten die *split graphs* für alle untersuchten Gene komplexe Netzverbindungen, was auf Rekombinationsereignisse innerhalb dieser Gene schliessen lässt.

Bei der Homoplasie-Testung wiederum handelt es sich um ein rein mathematisches Verfahren, welches ein Mass für die Häufigkeit des Auftretens von Rekombinationsereignissen darstellt. Ein frei rekombinierender Organismus, bei dem die polymorphen Stellen ein Kopplungsgleichgewicht aufweisen zeigt theoretisch ein Homoplasie-Verhältnis von 1.0. Im Gegensatz dazu beträgt das erwartete Homoplasie-Verhältnis für einen nicht rekombinierenden, klonalen Organismus den Wert 0. Da alle Spezies über einen kurzen Zeitraum eine klonale Populationsstruktur aufweisen können, werden jedoch diese theoretischen Maximalwerte niemals erreicht. So findet sich beispielsweise bei *Helicobacter pylori* als Vertreter einer panmiktischen Spezies das höchste bekannte Homoplasie-Verhältnis mit einem für drei Gene berechneten Wert von 0.85, das Homoplasie-Verhältnis für *Neisseria meningitidis* hingegen betrug lediglich 0.34, berechnet für elf Gene (Suerbaum, 2000; Suerbaum et al., 1998) (Tabelle 4). Die für unsere Studie interessierenden Homoplasie-Verhältnisse der Spezies *Neisseria lactamica* ergaben für acht Allele des *recA*-Gens den Wert 0.64 und für neun Allele des *rho*-Gens den Wert 0.54 (Tabelle 4), was die Hypothese eines häufigen Auftretens von Rekombinationsereignissen bei *Neisseria lactamica* unterstützt (Alber et al., 2001). Homoplasie-Tests der zwei weiteren ebenfalls sequenzierten Gene *argF* und 16S rRNA konnten leider nicht durchgeführt werden, da zum Einen mindestens sechs Allele zur Durchführung des Tests benötigt werden (*argF*), zum Anderen das HOMOPLASY-Programm nur mit proteinkodierenden Genen arbeiten kann (16S rRNA).

Tabelle 4 : Mutation und Rekombination bei *Neisseria lactamica*

Organismus	Gen	Basenpaare (n)	Allele (n)	Mean % Ks (Range)	Mean %Ks (Range)	Homoplasie Ratio	Referenz
<i>N.lactamica</i>	<i>recA</i>	432	8	0.3	8.9	0.64+0.04	diese Studie
<i>N.lactamica</i>	<i>rho</i>	351	9	0.0	7.5	0.54+0.05	diese Studie
<i>N.lactamica</i>	<i>argF</i>	276	5	0.29	5.4	n. d.	diese Studie
<i>N.lactamica</i>	16S rRNA	459	10	-	1.84	n. d.	diese Studie
<i>N.meningitidis</i>	16S rRNA	414	10	-	0.68	n. d.	diese Studie
<i>H.pylori</i>	3 Gene	-	-	0.7 (0.3-2.5)	16.8 (14.1-2.4)	0.85	Suerbaum
<i>N.meningitidis</i>	11 Gene	-	-	0.7 (0.3-2.5)	13.4 (5.9-26.8)	0.34	et al., 1998

Aus oben genanntem geht hervor, dass die berechneten Homoplasie-Verhältnisse für *Neisseria lactamica* somit niedriger als die von *Helicobacter pylori*, jedoch deutlich höher als die der Meningokokken liegen. Obwohl der Vergleich von Rekombinationsfrequenzen unterschiedlicher Spezies auf Basis der Homoplasie-Tests mit Vorsicht zu interpretieren ist, würde oben genanntes bedeuten, dass Rekombinationen bei apathogenen *Neisseria lactamica* weitaus häufiger als bei der Spezies *Neisseria meningitidis* mit seinen überwiegend pathogenen Isolaten vorkommen, bzw. effiziente Reinigungsmechanismen (z.B. *bottlenecks*) zur Entfernung von durch Rekombination entstandenen Genotypen aus der Population fehlen. Da Rekombinationsereignisse bei *Neisseria lactamica* häufiger als bei *Neisseria meningitidis* aber seltener als bei *Helicobacter pylori* zu beobachten sind, kann man davon ausgehen, dass die Populationsstruktur von *Neisseria lactamica* zwischen der epidemischen von *Neisseria meningitidis* und der panmiktischen von *Helicobacter pylori* liegt (Abbildung 4).

Abbildung 4: Populationsstrukturen bakterieller Spezies.

Die Bestimmung der K_A - und K_S -Werte, welche die Frequenzen des synonymen und nichtsynonymen Austausches pro synonymen bzw. nichtsynonymen Stellen repräsentieren, zeigte für die, in dieser Studie analysierten Gene im Vergleich zu publizierten Werten von *Helicobacter pylori* und *Neisseria meningitidis* durchweg niedrigere Werte (Tabelle 4). Erklärt werden kann dies durch die geringere Anzahl an in dieser Studie getesteten Allele.

Insgesamt muss jedoch festgehalten werden, dass sowohl durch Berechnung der Homoplasie-Ratios des *recA*- und des *rho*-Gens, als auch durch *Split-Decomposition* Analyse des 16S rRNA-, des *recA* und des *rho*-Gens eine Vielzahl von Rekombinationsereignissen bei *Neisseria lactamica* dargestellt werden konnte.

Unsere Studie zielte darauf ab, die genetische Diversität von *Neisseria lactamica* bei epidemiologisch verknüpften Individuen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein Genotypisierungssystem auf Basis der vier Gene 16S rRNA, *argF*, *recA* und *rho* benutzt (Smith et al., 1999), wobei dieses System eine ausreichende Diskriminierung der verschiedenen *Neisseria lactamica*-Stämme ermöglichte. So konnten für 26 untersuchte Bakterienstämme insgesamt 17 verschiedene Genotypen (GT) definiert werden. Von diesen 17 Genotypen traten 12 jeweils nur einmal auf (GT-3, GT-4, GT-6, GT-8, GT-9, GT-10, GT-11, GT-12, GT-13, GT-14, GT-15, GT-17), die fünf weiteren dagegen kamen mehr als einmal vor (GT-1, GT-2, GT-5, GT-7, GT-16).

GT-1 wurde viermal in einem Augsburger Kindergarten gefunden, davon dreimal in der selben Kindergartengruppe. Ähnlich verhielt es sich mit dem aus einer Augsburger Grundschule isolierten GT-2, der dort insgesamt dreimal vorkam, wobei er zweimal in einer Klasse gefunden wurde. Bei zwei Kindern der gleichen Gruppe eines Ingolstädter Kindergartens schliesslich fand sich jeweils GT-5. Nur GT-7 und GT-16 traten jeweils in verschiedenen Institutionen auf, wobei GT-7 zwar auch nur auf Augsburg beschränkt blieb, hier jedoch einmal in einem Kindergarten und zweimal in einer Grundschule, dort aber aus unterschiedlichen Klassen isoliert wurde. Eine Sonderstellung nahm GT-16 ein, da es sich hierbei um den einzigen GT handelte, der sowohl in Augsburg als auch in Ingolstadt gefunden wurde.

Da nur ein einziger Genotyp in zwei verschiedenen Städten beobachtet wurde, scheint es bei *Neisseria lactamica* nicht üblich zu sein, dass identische Isolate bei epidemiologisch nicht miteinander in Verbindung stehenden Individuen zu finden sind. Vielmehr scheinen unsere Analysen ganz klar eine klonale Ausbreitung der Bakterienstämme in epidemiologisch definierten Einheiten aufzuzeigen. So stützen unsere Untersuchungen die These, dass eine klonale Ausbreitung von *Neisseria lactamica* existiert, falls eine enge epidemiologische Verknüpfung zwischen Trägern, wie er in Kindergärten und Schulen schwer vermeidbar ist, bestehen zu sein scheint. Leider ist bis heute weder genau bekannt, wie lange die durchschnittliche Verweildauer von *Neisseria lactamica* im menschlichen Nasopharynxraum ist, noch wie effektiv diese Spezies von Wirt zu Wirt übertragen wird, so dass Aussagen über die genetische Diversität von *Neisseria lactamica* in Abhängigkeit davon bis dato nicht gemacht werden können.

Auf der von Martin C. Maiden angelegten *Neisserien*-Website (s.a. <http://neisseria.org/nm/typing/mlst>) sind insgesamt 171 *Neisseria lactamica*-Stämme zu finden, die mittels der bei Meningokokken verwendeten Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung (MLST) näher analysiert wurden.

Neben 50 tschechischen und 73 britischen Isolaten wurden auch 48 Stämme deutscher Herkunft einer Untersuchung unterzogen. Diese wurden von unserer Arbeitsgruppe im Rahmen der von November 1999 bis März 2000 durchgeführten bayerischen Meningokokkenträgerstudie gesammelt.

Die untersuchten 171 Stämme wurden zwischen den Jahren 1971 und 2000 gesammelt, wobei allerdings ca. ein Drittel (58 Bakterienstämme) auf das Sammeljahr 2000 zurückgeht. Bezogen auf das Alter der *Neisseria lactamica* Träger betrug der Altersumfang hier drei bis 18 Jahre, der Median 6,5 Jahre. Im Vergleich dazu betrug der Altersumfang der 26 Träger unserer vorliegenden Studie drei bis elf Jahre, der Median sieben Jahre.

Die auf Maidens Website präsentierten 171 *Neisseria lactamica*-Stämme wurden einer Sequenzierung von insgesamt sieben unterschiedlichen Genen unterzogen. Es handelte sich hierbei um die bei der Meningokokken-MLST verwendeten Gene *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* und *pgm*.

Auf der Basis der sieben sequenzierten Gene wurden Sequenztypen (ST) definiert. Erstaunlicherweise ergaben sich für die 171 untersuchten Stämme 169 unterschiedliche Sequenztypen. Für die aus Deutschland stammenden 48 Isolate zeigten sich 47 verschiedene Sequenztypen, d.h. lediglich zwei Isolate wiesen den selben ST auf (ST 1508 für Stamm 16 und Stamm 133). Die Analyse der Gensequenzen der 48 deutschen *Neisseria lactamica*-Stämme ergab für die sieben untersuchten Gene eine relativ hohe Variabilität. So zeigten sich bei der Sequenzierung interner Fragmente der sieben Gene für *abcZ* zehn, für *adk* 15, für *aroE* zwölf, für *fumC* 16, für *gdh* 19, für *pgm* 16 und für *pdhC* sechs verschiedene Allele. Betrachtet man alle 171 aus dem UK, Tschechien und Deutschland stammenden Stämme so zeigt sich ein ähnlicher Trend: Für *abcZ* fanden sich 23 unterschiedliche Allele, für *adk* 31, für *aroE* 26, für *fumC* 33, für *gdh* 46, für *pgm* 38 und für *pdhC* 18. Folglich zeigte sich für das *gdh*-Gen mit 19 bzw. 46 unterschiedlichen Allelen die höchste, für das *pdhC*-Gen mit 6 bzw. 18 Allelen die niedrigste Variabilität.

Betrachtet man die sowohl von Martin Maiden als auch in der vorliegenden Studie analysierten 16 *Neisseria lactamica*-Stämme (Stammnummern 147, 151, 154, 155, 156, 163, 177, 178, 179, 183, 207, 208, 265, 267, 270, 271), so zeigt sich folgendes Ergebnis: Für die 16S rDNA fanden sich 9 unterschiedliche Allele, für *argF* 5, für *recA* 8, für *rho* 9, für *abcZ* 8, für *adk* 9, für *aroE* 11, für *fumC* 10, für *gdh* 11, für *pgm* 11 und für *pdhC* 3. Folglich weist auch hier das *pdhC*-Gen die niedrigste Variabilität auf, die höchste Variabilität zeigen in diesem speziellen Fall neben dem *gdh*-Gen das *pgm*- und das *aroE*-Gen. Die in unserer Studie verwendeten vier Gene liegen bezüglich ihrer Variabilität im Mittelfeld. Verglichen mit den von unserer Arbeitsgruppe untersuchten 26 Stämmen ergibt sich für die von Maiden analysierten 171 Stämme eine höhere Variabilität. Dies ist in der Tatsache begründet, dass die 26 untersuchten bayerischen *Neisseria lactamica*-Stämme von epidemiologisch verknüpften Trägern stammen, was bei den von Maiden untersuchten 171 Stämmen nicht zutraf. Dennoch sind die hier beschriebenen Raten mit den unpublizierten Raten von Maiden et al vergleichbar.

Der Spezies *Neisseria lactamica* wird eine beträchtliche epidemiologische Wichtigkeit zugebilligt, da zahlreiche Studien die These unterstützen, dass *Neisseria lactamica* Kinder im Alter von 0-14 Jahren vor einer Meningokokken-Infektion schützt. So wird vermutet, dass aufgrund der in dieser Altersgruppe herrschenden hohen *Neisseria lactamica*-Trägerquote eine Besiedlung des Nasen-Rachen-Raumes mit *Neisseria meningitidis* inhibiert wird (Coen et al., 2000). Des weiteren wird durch eine Besiedlung des Nasopharynx mit *Neisseria lactamica* eine schützende humorale Immunität ausgelöst (Coen et al., 2000; Gold et al., 1978). So zeigten sich bei *Neisseria lactamica*-Trägern viermal so hohe Antikörper-Titer gegen A-, B-, und C-Meningokokken als bei einer Kontrollgruppe (Gold et al., 1978). Zusätzlich konnte bei einer beträchtlichen Anzahl von *Neisseria lactamica*-Stämmen eine auf gemeinsamen Vorkommen von Antigenen wie *outer-membrane*-Proteinen und Lipooligosacchariden beruhende Kreuzreaktivität mit *Neisseria meningitidis* festgestellt werden (Gold et al., 1978; Kremastinou et al., 1999; Kim et al., 1989; Saez Nieto et al., 1985; Troncoso et al., 2000; Zorgani et al., 1996). Diese Erkenntnisse könnten somit ganz neue Perspektiven in der Entwicklung von Impfstoffen gegen *Neisseria meningitidis* eröffnen.

Gleichzeitig stellt sich die Frage der Relevanz der in dieser Studie gezeigten genetischen Diversität von *Neisseria lactamica* für die Auswahl von *Live-Carrier*-Stämmen zur Vakzinierung.

Sie könnte die Auswahl geeigneter Stämme erschweren. Des weiteren werden zur Entwicklung von Impfstoffen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Daten zur Kolonisationsfähigkeit dieser Bakterienspezies benötigt, welche bislang nicht in ausreichendem Masse vorhanden sind. Zur Impfstoffentwicklung verwendete *Neisseria lactamica*-Isolate müssten eine effektive Besiedlung des menschlichen Nasopharynx und eine gute Transformierbarkeit aufweisen. Zudem ist eine detaillierte Darstellung der immunogenen äusseren Membranproteine von *Neisseria lactamica* im Verhältnis zu den verschiedenen Genotypen unerlässlich.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der von November 1999 bis März 2000 durchgeführten bayerischen Meningokokkenträgerstudie wurden in zahlreichen Kindergärten und Schulen der bayerischen Gemeinden Ansbach, Augsburg, Erlangen, Griesbach, Ingolstadt, München, Pfarrkirchen, Sonthofen und Weiden insgesamt 287 *Neisseria lactamica*-Stämme isoliert.

26 ausgewählte, aus den benachbarten Städten Augsburg, Ingolstadt und München stammende Isolate wurden einer Multi-Lokus-Sequenztypisierung (MLST) zur Untersuchung ihrer genetischen Diversität unterzogen.

Dabei wurden sowohl Sequenzen der 3 Stoffwechselgene *argF*, *recA* und *rho*, als auch Sequenzen des 16S rRNA-Gens analysiert. Für das 16S rRNA-Gen fanden sich zehn, für *argF* fünf, für *recA* acht und für *rho* neun differente Allele. Auf Basis der vier analysierten Gene konnten 17 verschiedene Genotypen definiert werden, von denen zwölf nur einmal, fünf hingegen mehrmals vorkamen.

Es ist anzunehmen, dass durch Sequenzierung der vier in dieser Studie verwendeten Gene bereits eine ausreichende Diskriminierung von *Neisseria lactamica* erfolgte, da Versuche eine weiterführende Diskriminierung durch Sequenzierung des *porB*-Gens zu erreichen, keine wesentlichen zusätzlichen Informationen erbrachten. Durch visuelle Inspektion der Sequenzen konnte bei allen vier Genloci das Überwiegen von Rekombinationsereignissen gegenüber Punktmutationen bestätigt werden, so dass für die Spezies *Neisseria lactamica* horizontaler Gentransfer anzunehmen ist. Da nur ein einziger Genotyp in zwei verschiedenen Städten beobachtet wurde, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass eine klonale Ausbreitung von *Neisseria lactamica* nur dann nachweisbar ist, wenn eine epidemiologische Verknüpfung zwischen Trägern besteht.

6. Literaturverzeichnis

- Achtman, M.** 1994. Clonal spread of serogroup A meningococci: a paradigm for the analysis of microevolution in bacteria. *Mol. Microbiol.* 11:15-22.
- Achtman, M.** 1995. Global epidemiology of meningococcal disease. In: Cartwright K (ed.) *Meningococcal disease*. Wiley, Chichester, England, pp 159-175.
- Achtman, M.** 1997. Microevolution and epidemic spread of serogroup A *Neisseria meningitidis*-a review. *Gene.* 192:135-140.
- Achtman, M., K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule, and E. Carniel.** 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:14043-14048
- Alber, D., M. Oberkötter, S. Suerbaum, H. Claus, M. Frosch, and U. Vogel.** 2001. Genetic diversity of *Neisseria lactamica* Strains from Epidemiologically Defined Carriers. *J. Clin. Microbiol.* 39:1710-1715.
- Bandelt, H. J., and A. W. Dress.** 1992. *Split decomposition*: a new and useful approach to phylogenetic analysis of distance data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1:242-252.
- Barrett, S. J. And P. H. Sneath.** 1994. A numerical phenotypic taxonomic study of the genus *Neisseria*. *Microbiology.* 140:2867-2891.
- Bennett, J. S., K. A. Jolley, and M. C. Maiden.** 2002. Is the gonococcus a clonal complex of the meningococcus? Thirteenth Int. Patogen. *Neisseria* Conf. Oslo, Norway.
- Blakebrough, I. S., B. M. Greenwood, H. C. Whittle, A. K. Bradley, and H. M. Gilles.** 1982. The epidemiology of infections due to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in a northern Nigerian community. *J. Infect. Dis.* 146:626-637.
- Bowler, L. D., Q. Y. Zhang, J. Y. Riou, and B. G. Spratt.** 1994. Interspecies recombination between the *penA* genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species during the emergence of penicillin resistance in *N. meningitidis*: natural events and laboratory simulation. *J. Bacteriol.* 176:333-337.
- Bygraves, J. A., R. Urwin, A. J. Fox, S. J. Gray, J. E. Russel, I. M. Feavers, and M. C. Maiden.** 1999. Population genetic and evolutionary approaches to analysis of *Neisseria meningitidis* isolates belonging to the ET-5 complex. *J. Bacteriol.* 181:5551-5556.

- Cartwright, K. A.** 1995. Meningococcal carriage and disease. In: Cartwright K (ed.) Meningococcal disease. Wiley, Chichester, England, pp 115-146.
- Cartwright, K. A, J. M. Stuart, D. M. Jones, and N. D. Noah.** 1987. The stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. Infect. 99:591-601.
- Caugant, D. A., L. F. Mocca, C. E. Frasch, L. O. Froholm, W. D. Zollinger, and R. K. Selander.** 1987. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. J. Bacteriol. 169:2781-2792.
- Caugant, D. A., B. E. Kristiansen, L. O. Froholm, K. Bovre, and R. K. Selander.** 1988. Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. Infect. Immun. 56:2060-2068.
- Claus, H., A. Friedrich, M. Frosch, and U. Vogel.** 2000. Differential distribution of two novel restriction–modification systems in clonal lineages of *Neisseria meningitidis*. J. Bacteriol. 182:1296-1303.
- Claus, H., M. C. Maiden, R. Maag, M. Frosch, and U. Vogel.** 2002. Many carried meningococci lack the genes required of capsule synthesis and transport. Microbiology. 148:1813-1819.
- Coen, P. G., K. Cartwright, and J. Stuart.** 2000. Mathematical modelling of infection and disease due to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*. Int. J. Epidemiol. 29:180-188.
- Denning, D. W., and S. S. Gill.** 1991. *Neisseria lactamica* meningitis following skull trauma. Rev. Infect. Dis. 13:216-218.
- Derrick, J. P., R. Urwin, J. Suker, I. M. Feavers, and M. C. Maiden.** 1999. Structural and evolutionary inference from molecular variation in *Neisseria* porins. Infect. Immun. 67:2406-2413.
- Feil, E., J. Zhou, J. M. Smith, and B. G. Spratt.** 1996. A comparison of the nucleotide sequences of the *adk* and *recA* genes of pathogenic and commensal *Neisseria* species: evidence for extensive interspecies recombination within *adk*. J. Mol. Evol. 43:631-640.
- Feil, E. J., M. C. Maiden, M. Achtman, and B. G. Spratt.** 1999. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. Mol. Biol. Evol. 16:1496-1502.

- Feil, E. J., M. C. Enright, and B. G. Spratt.** 2000. Estimating the relative contributions of mutation and recombination to clonal diversification: a comparison between *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. Res. Microbiol. 151:465-469.
- Giovannoni, S. J., T. D. Mullins, and K. G. Field.** 1995. Microbial diversity in oceanic systems: rRNA approaches to the study of unculturable microbes. Molecular ecology of aquatic microbes. 217-248.
- Gold, R., I. Goldschneider, M. L. Lepow, T. F. Draper, and M. Randolph.** 1978. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. J. Infect. Dis. 137:112-121.
- Gordts, F., S. Halinyck, D. Pierard, L. Kaufman, and P. A. Clement.** 2000. Microbiology of the middle meatus: a comparison between normal adults and children. J. Laryngo. Otol. 114:184-188.
- Greenberg, L. W., and E. Kleinerman.** 1978. *Neisseria lactamica* meningitis. J. Pediatr. 93: 1061-1062.
- Hansman, D.** 1978. Meningitis caused by *Neisseria lactamica*. N. Engl. J. Med. 299:491.
- Harmsen, D., C. Singer, J. Rothganger, T. Tonjum, G. S. de Hoog, H. Shak, J. Albert, and M. Frosch.** 2001. Diagnostics of *neisseriaceae* and *moraxellaceae* by ribosomal DNA sequencing: ribosomal differentiation of medical microorganisms. J. Clin. Microbiol. 39:936-942.
- Harmsen, D., J. Rothganger, M. Frosch, and J. Albert.** 2002. RIDOM: Ribosomal Differentiation of Medical Micro-organisms Database. Nucleic. Acids. Res. 30:416-417.
- Hoke, C., and N. A. Vedros.** 1982. Taxonomy of the *Neisseriae*: deoxyribonucleic acid base composition, interspecific transformation, and deoxyribonucleic acid hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol. 32:57-66.
- Hollis, D. G.** 1973. Sources of *Neisseria lactamicus*. Lancet. 1:1010.
- Hollis, D. G., G. L. Wiggins, and R. E. Weaver.** 1969. *Neisseria lactamicus* sp.n., a lactose-fermenting species resembling *Neisseria meningitidis*. Appl. Microbiol. 17:71-77.
- Holmes, E. C., R. Urwin, and M. C. Maiden.** 1999. The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. Mol. Biol. Evol. 16:741-749.

- Huson, D. H.** 1998. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics*. 14:68-73.
- Jessen, J.** 1933. Studien ueber gramnegative Kokken. *Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektkrankh.* 133:75-88.
- Jones, D. M.** 1995. Epidemiology of meningococcal disease in Europe and the USA. In: Cartwright K (ed.) *Meningococcal disease*. Wiley, Chichester, England, pp 147-157.
- Kim, J. J., R. E. Mandrell, and J. M. Griffiss.** 1989. *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis* share lipooligosaccharide epitopes but lack common capsular and class 1, 2, and 3 protein epitopes. *Infect. Immun.* 57:602-608.
- Kingsbury, D. T.** 1967. Deoxyribonucleic acid homologies among species of the genus *Neisseria*. *J. Bacteriol.* 94:870-874.
- Kremastinou, J., G. Tzanakaki, A. Pagalis, M. Theodondou, D. M. Weir, and C. C. Blackwell.** 1999. Detection of IgG and IgM to meningococcal outer membrane proteins in relation to carriage of *Neisseria meningitidis* or *Neisseria lactamica*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24:73-78.
- Kremastinou, J., G. Tzanakaki, E. Velonakis, A. Voyiatzi, A. Nickolaou, R. A. Elton, D. Weir, and C. C. Blackwell.** 1999. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* among ethnic Greek school children from Russian immigrant families in Athens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23:13-20.
- Lauer, B. A., and C. E. Fisher.** 1976. *Neisseria lactamica* meningitis. *Am. J. Dis. Child.* 130:198-199.
- Linz, B., M. Schenker, P. Zhu, and M. Achtman.** 2000. Frequent interspecific genetic exchange between commensal *neisseriae* and *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* 36:1049-1058.
- Lloyd-Still, J. D., and H. Shwachman.** 1975. Duodenal microflora: a prospective study in pediatric gastrointestinal disorders. *Am. J. Dig. Dis.* 20:708-715.
- Lujan, R., Q. Y. Zhang, J. A. Saez Nieto, D. M. Jones, and B. G. Spratt.** 1991. Penicillin-resistant isolates of *Neisseria lactamica* produce altered forms of penicillin-binding protein 2 that arose by interspecies horizontal gene transfer. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 35 :300-304.
- Maiden, M. C., B. Malorny, and M. Achtman.** 1996. A global gene pool in the *Neisseriae*. *Mol. Microbiol.* 21:1297-1298.

- Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russel, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic mikroorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3140-3145.
- Maynard-Smith, J., N. H. Smith, M. O'Rourke, and B. G. Spratt.** 1993. How clonal are bacteria? *J. Mol. Biol.* 114:153-168.
- Milkman, R., and M. M. Bridges.** 1990. Molecular evolution of the *Escherichia coli* chromosome. III. Clonal frames. *Genetics.* 126:505-517.
- Olsen, S. F., B. Djurhuus, K. Rasmussen, H. D. Joensen, S. O. Larsen, H. Zoffman, and I. Lind.** 1991. Pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in households with infants within areas with high and low incidences of meningococcal disease. *Epidemiol. Infect.* 106:445-457.
- Pedersen, L. M., O. R. Madsen, and E. Gutschik.** 1993. Septicaemia caused by an unusual *Neisseria meningitidis* species following dental extraction. *Scand. J. Infect. Dis.* 25:137-139.
- Rossau, N., G. Vandenbussche, S. Thielemans, P. Segers, H. Grosch, E. Gothe, W. Mannheim, and J. De Ley.** 1989. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and deoxyribonucleic acid homologies of *Neisseria*, *Kingella*, *Eikenella*, *Simonsiella*, *Alysiella*, and Centers for Disease Control Groups EF-4 and M-5 in the emended family *Neisseriaceae*. *Int. J. Syst. Microbiol.* 39:185-198.
- Rotimi, V. O., and B. J. Duerden.** 1981. Bacteroides species in the normal neonatal faecal flora. *J. Hyg.* 87:299-304.
- Saez Nieto, J. A., J. R. Dominguez, J. L. Monton, P. Cristobal, A. Fenoll, J. Vasquez, J. Casal, and B. Taracena.** 1985. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in a school population during an epidemic period in Spain. *J. Hyg.* 94:279-288.
- Saez Nieto, J. A., R. Lujan, J. V. Martinez Suarez, S. Berron, J. A. Vazquez, M. Vinas, and J. Campos.** 1990. *Neisseria lactamica* and *Neisseria polysaccharea* as possible sources of meningococcal beta-lactam resistance by genetic transformation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:2269-2272.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74:5463-5467.

- Selander, R. K., J. M. Musser, D. A. Caugant, M. N. Gilmour, and T. S. Whittam.** 1987. Population genetics of pathogenetic bacteria. *Microbiob. Pathogen.* 3:1-7.
- Simmons, G., D. Martin, J. Stewart, and D. Bremner.** 2000. Carriage of *N. lactamica* in a population at high risk of meningococcal disease. *Epidemiol. Infect.* 125:99-104.
- Singer, M., and P. Berg.** 1991. *Genes and Genomes.* University Science Books, Mill Valley.
- Smith, J. M., and N. H. Smith.** 1998. Detecting recombination from gene trees. *Mol. Biol. Evol.* 15:590-599.
- Smith, N. H., E. C. Holmes, G. M. Donovan, G. A. Carpenter, and B. G. Spratt.** 1999. Networks and groups within the genus *Neisseria*: analysis of *argF*, *recA*, *rho*, and 16S rRNA sequences from human *Neisseria* species. *Mol. Biol. Evol.* 16:773-783.
- Stackebrandt, E., R. G. E. Murray, and H. G. Trüper.** 1988. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *Int. J. Syst. Microbiol.* 38:321-325.
- Suerbaum, S.** 2000. Genetic variability within *Helicobacter pylori*. *Int. J. Med. Microbiol.* 290:175-181.
- Suerbaum, S., J. M. Smith, K. Bapumia, G. Morelli, N. H. Smith, E. Kunstman, I. Dyrek, and M. Achtman.** 1998. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12619-12624.
- Suerbaum, S., and M. Achtman.** 2001. Population Genetics. In: Mobley H. L. T., G. I. Mendz, and S. L. Hazell (ed.) *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics.* ASM Press, Washington, USA, pp 355-361.
- Spratt, B. G., and M. C. Maiden.** 1999. Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 354:701-710.
- Tang, C., R. Moxon, and M. M. Levine.** 1999. For discussion: live attenuated vaccines for group B meningococcus. *Vaccine.* 17:114-117.
- Troncoso, G., S. Sanchez, M. Moreda, M. T. Criado, and C. M. Ferreira.** 2000. Antigenic cross-reactivity between outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27:103-109.

- Wang, J. F., D. A. Caugant, G. Morelli, B. Koumare, and M. Achtman.** 1993. Antigenic and epidemiologic properties of the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. J. Infect. Dis. 167:1320-1329.
- Ward, M. J., P. R. Lambden, and J. E. Heckels.** 1992. Sequence analysis and relationships between meningococcal class 3 serotype proteins and other porins from pathogenic and non-pathogenic *Neisseria* species. FEMS Microbiol. Lett. 73:283-289.
- Zhou, J., L. D. Bowler, and B. G. Spratt.** 1997. Interspecies recombination and phylogenetic distortions within the glutamine synthetase and shikimate dehydrogenase genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species. Mol. Microbiol. 23:799-812.
- Zhou, J., and B. G. Spratt.** 1992. Sequence diversity within the *argF*, *fbp* and *recA* genes of natural isolates of *Neisseria meningitidis*: interspecies recombination within the *argF* gene. Mol. Microbiol. 6:2135-2146.
- Zorgani, A. A., V. S. James, J. Stewart, C. C. Blackwell, R. A. Elton, and D. M. Weir.** 1996. Serum bactericidal activity in a secondary school population following an outbreak of meningococcal disease: effects of carriage and secretor status. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 14:73-81.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. med. Ulrich Vogel am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg angefertigt.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Vogel für die Überlassung des Themas und seiner fortwährenden Bereitschaft, durch wertvolle Diskussionen und Anregungen diese Arbeit zu fördern.

Herzlichen Dank Herrn Professor Dr. med. Frosch für hilfreiche Diskussionen und die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Professor Dr. med. Suerbaum für die Durchführung der Homoplasie-Tests und der *Split Decomposition*-Analyse.

Mein besonderer Dank gebührt ebenso Herrn Dr. med. Dirk Alber, Frau Dr. rer. nat. Heike Claus und Frau Gabi Heinze für die theoretische und praktische Einweisung in wesentliche Arbeitstechniken und für die zahlreichen konstruktiven Ratschläge.

Schließlich möchte ich an dieser Stelle die Gelegenheit wahrnehmen, all denen meinen Dank auszusprechen, die auf irgendeine Weise – sei es durch sachkundige Diskussionen oder Hilfestellungen jeglicher Art-zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders zu erwähnen sei an dieser Stelle Frau Marianne Kopp, die mit ihren umfangreichen Computerkenntnissen eine wertvolle Stütze darstellte.

Vielen Dank an meine Freundin Daniela Breu für die moralische Unterstützung.

Nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank meinen Eltern, die mir meinen beruflichen Werdegang ermöglicht und mich zu jeder Zeit hilfreich unterstützt haben. Ihnen und meiner Tante Maria Storz-Scheck, die während der Fertigstellung leider verstorben ist sei diese Arbeit gewidmet.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marc Oberkötter
Geburtsdatum: 27.02.1974
Geburtsort: Würzburg
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1980 – 1984 Grundschole, Hohenwarth-Grafenwiesen
1984 – 1993 Benedikt–Stattler–Gymnasium, Kötztling

Zivildienst

1993 – 1995 Rettungsdiensthefeler im
BRK-Kreisverband Cham

Hochschulbildung

1995 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
1995 – 1998 Studium der Humanmedizin an der
Universität Regensburg
März 1998 Ärztliche Vorprüfung
1998 – 2002 Studium der Humanmedizin an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
August 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit November 1999 Anfertigung der vorliegenden Dissertation im
Institut für Hygiene und Mikrobiologie der
Universität Würzburg
August 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2002 Abschluss des Studiums

Berufstätigkeit

seit April 2003 Arzt im Praktikum in der kardiologischen
Abteilung des Kreiskrankenhauses Kelheim

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht: Alber, D., M. Oberkötter, S. Suerbaum, H. Claus, M. Frosch, and U. Vogel. 2001. Genetic diversity of *Neisseria lactamica* Strains from Epidemiologically Defined Carriers. J. Clin. Microbiol. 39: 1710-1715.

Marc Oberkötter
Triftstraße 6
93480 Hohenwarth
Telefon privat 09946/1579
Telefon dienstlich 09441/702350
E-mail: oberkoetter.marc@gmx.de

**Antrag auf Zulassung zur Promotion für die Erlangung des medizinischen
Doktorgrades Dr. med.**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Vorliegende Arbeit ist mit dem Ziel einen akademischen Grad zu erwerben bisher noch keiner anderen Fakultät, weder ganz noch teilweise, vorgelegt worden.

Ich erkläre hiermit, daß ich bisher noch keinen akademischen Grad erworben, oder zu erwerben versucht habe. Mir wurde bisher noch kein akademischer Grad entzogen, ebensowenig wurde bisher ein strafrechtliches Ermittlungs- oder Disziplinarverfahren gegen mich eingeleitet.

Gewünschtes zusätzliches Fachgebiet und Prüfer:
Kinderheilkunde, Priv.-Doz. Dr. med. H. Girschick

Marc Oberkötter