

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

**Herstellung eines
monoklonalen Antikörpers gegen
die Endonuklease *NmeDI* zur Typisierung von
*Neisseria meningitidis***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Hanne Weinand
aus Düren

Würzburg, Januar 2005

Referent: Professor Dr. med. U. Vogel
Koreferent: Professor Dr. med. A. Rethwilm
Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.05

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 <i>Neisseria meningitidis</i>	1
1.1.1 Allgemeines.....	1
1.1.2 Klinische Aspekte der Meningokokken- Infektion	3
1.1.3 Epidemiologie.....	6
1.1.4 Genetische Variabilität von <i>Neisseria meningitidis</i>	8
1.1.5 Populationsstruktur von <i>Neisseria meningitidis</i>	9
1.1.6 Vergleich der Populationsstruktur zu anderen bakteriellen Arten.....	12
1.1.7 Typisierung von <i>Neisseria meningitidis</i>	13
1.1.7.1 Serologische Typisierung	14
1.1.7.2 DNA-Sequenz-basierte Typisierung von hypervariablen Genen ...	14
1.1.7.3 Restriktions-Modifikations-Systeme als Klon-spezifische DNA-Marker bei <i>Neisseria meningitidis</i>	16
1.8. ST-11 und ST- 8 Komplex Meningokokken.....	17
1.9 Fragestellung	21
2.Material und Methoden.....	22
2.1 Geräte	22
2.2 Verbrauchsmaterial	23
2.3 Versuchstiere	24
2.4 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme	24
2.5 Puffer und Lösungen:.....	25
2.6 Bakterienstämme	30
2.6.1 <i>E.coli</i>	30
2.6.2 Neisserienstämme.....	30
2.7 Nährmedien.....	30
2.7.1 Zellkulturmedien-, und -zusätze	31
2.8 Kulturbedingungen	31
2.9 Plasmide	31
2.11 DNA-Methoden	32
2.11.1 Midi-Präparation von Plasmid-DNA.....	32
2.11.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	33
2.11.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen und aus PCR-Ansätzen ...	33
2.11.5 Automatisierte DNA-Sequenzierung.....	33
2.12 Klonierungsmethoden	34
2.12.1 Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
2.12.2 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren	34
2.12.3 DNA-Ligation	34
2.13 Elektroporation von <i>E. coli</i>	34
2.14 Proteinchemische Methoden.....	35
2.14.1 Proteinexpression in <i>E. coli</i>	35
2.14.2 Aufreinigung induzierter Proteine über Ni-NTA Agarose beads	36
2.14.3 Aufreinigung des Proteins über Elektroelution aus präparativen SDS-Polyacrylamidgelen.....	36
2.14.4 Western-blot.....	37
2.14.5 Dot-blot.....	38

Inhaltsverzeichnis

2.15 Immunisierung der Mäuse und Fusion der Zellen	39
2.15.1 Immunisierung der Mäuse	39
2.15.2 Fusion der Zellen.....	40
2.16 ELISA	42
2.17 Zellkultur.....	43
2.17.1 Expansion	43
2.17.2 Klonierung und erneute Expansion	43
2.17.3 Aufreinigung der monoklonalen Antikörper über Gradifrac.....	44
3. Ergebnisse	45
3.1 Klonierung und Expression des Endonukleasegens von <i>NmeDI</i>	45
3.2 Herstellung monoklonaler Antikörper	47
3.3 Screening der Hybridomzellen	48
3.4 Expansion und Klonierung der Hybridomzellen.....	48
3.4.1 ELISA- Ergebnisse	50
3.5 Aufreinigung und Proteinbestimmung der Antikörper.....	51
3.6 Testung des aufgereinigten Antikörpers 3/9-2 in ELISA, Western-blot und Dot-blot.....	52
3.7 Testung diverser Meningokokkenstämme im Dot-blot mit dem mAK 3/9- 2	55
4. Diskussion	58
4.1 Sensitivität und Spezifität des monoklonalen Antikörpers 3/9-2	58
4.2 Anwendungsgebiete des <i>NmeDI</i> spezifischen mAK 3/9-2	61
4.3 Methodenvergleich	63
4.4 Methodenkritik	65
5. Zusammenfassung	67
6. Literaturverzeichnis	69
6.1 Bücher	69
6.2 Originalarbeiten	69
7. Anhang	83
7.1 Abkürzungsverzeichnis	83

1. Einleitung

1.1 *Neisseria meningitidis*

1.1.1 Allgemeines

Die Gattung *Neisseria* gehört zur Familie der *Neisseriaceae*, die der β -Subklasse der Klasse *Proteobacteria* zugeordnet wird (Stackebrandt *et al.*, 1988). *Neisserien* sind gramnegative, aerobe, unbewegliche Diplokokken, die nur innerhalb eines Wirtes in der Lage sind, sich zu vermehren und zu überleben. Die Bakterien sind gegenüber Austrocknung sehr empfindlich (Berger und Döring 1969). Innerhalb der Gattung *Neisseria* gibt es zwei humanpathogene Spezies, *N. meningitidis* (Meningokokken) und *N. gonorrhoeae* (Gonokokken), und eine Vielzahl apathogener Arten, z.B. *N. lactamica*, *N. mucosa* und *N. sicca*. Meningokokken und Gonokokken kommen ausschließlich beim Menschen vor. Sie weisen auf DNA-Ebene eine mehr als 80%ige Genhomologie und eine bis zu 98%ige Homologie der Stoffwechselfgene auf (Guibourdenche *et al.*, 1986). Sie unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrem Organotropismus und besitzen eine unterschiedliche Ausstattung an Virulenzfaktoren. Meningokokken verfügen über ein variables Lipopolysaccharid (LPS) und prägen für die Adhärenz an menschliche Zellen variable Pili und Oberflächenadhäsine (Opa, Opc) aus. Sie bilden eine Polysaccharidkapsel aus, die die Serogruppe des Erregers bestimmt und einen wesentlichen Virulenzfaktor der Meningokokken darstellt (Jennings *et al.*, 1977). Die Polysaccharidkapsel ist ein vom Erreger exprimiertes saures Exopolysaccharid. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Kapselpolysaccharide teilt man Meningokokken in dreizehn Serogruppen ein (Vedros 1987). Klinisch relevant sind davon die Serogruppen A, B, C, W-135 und Y. Die Kapsel stellt sowohl einen Phagozytoseschutz als auch einen Schutz vor Komplementreaktionen dar (Kahler und Stephens, 1998; Masson und Hohlbein, 1985; Vogel und Frosch, 1999; Vogel *et al.*, 1997).

Neisseria meningitidis ist der häufigste Erreger einer Meningitis und Sepsis im Kindesalter (Jones und Kaczmarek, 1995; Cartwright, 1995). Meningokokken werden durch Tröpfchen- Aerosole oder direkt übertragen und besiedeln die

Einleitung

Schleimhäute der oberen Atemwege, vor allem den Nasopharynx. Meningokokken adhären mit Hilfe der Pili (Pilin, PilC) und anderer Oberflächenproteine (Opa, Opc) an die Epithelzellen der Nasopharyngealschleimhaut des Wirtes. Dort können sie monatelang verweilen, ohne klinische Symptome zu verursachen, d.h., es kommt zu einem symptomlosen Keimträgertum (Caugant *et al.*, 1986). Daher werden Meningokokken als Kommensalen des Nasen-Rachen-Raumes angesehen, die nur bei Störung des Erreger-Wirt-Gleichgewichtes zu einer Infektion führen (Virji, 1996).

In den Industrieländern sind je nach Altersstufe und epidemiologischer Situation bis zu 30% Keimträger anzutreffen, die Erkrankung tritt jedoch nur mit einer Inzidenz von 1-10/100000/Jahr auf (Jones und Kaczmarek, 1995; Cartwright, 1995), die Keimträgerquote bei Säuglingen und Kleinkindern ist niedrig. Sie zeigt einen Gipfel im Jugend- und frühen Erwachsenenalter.

Von Musher wurde gezeigt, dass die Rate der Kolonisation des Nasopharynx mit *Neisseria meningitidis* bei jungen Erwachsenen, die in Schulen bzw. Militärkompanien auf engem Raum miteinander leben, über 50% betragen kann (Übersicht in Musher *et al.*, 2003). In Familien, die zuvor nicht mit Meningokokken-Erkrankungen konfrontiert waren, zeigte sich nach wiederholten Nasopharynxabstrichen in zwei bis drei aufeinanderfolgenden Jahren, dass in manchen Fällen bis zu 18% der Familienmitglieder mit *Neisseria meningitidis* besiedelt waren (Greenfield *et al.*, 1971). Die Wahrscheinlichkeit, ein Geschwisterkind bei bestehender Meningokokken-Erkrankung anzustecken, liegt bei 2-3% (Olcén *et al.*, 1979). Die Infektionsrate unter Studenten bei einem an Meningokokken Erkrankten liegt bei 0,04 bis 2,5% (Ronne *et al.*, 1993; Jackson *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1999). Mehr als 95% der Meningokokken-Erkrankungen in den USA und anderen westlichen Ländern sind sporadisch (Rosenstein *et al.*, 1999; Übersicht in Musher *et al.*, 2003).

1.1.2 Klinische Aspekte der Meningokokken- Infektion

Als Risikofaktoren für eine manifeste Meningokokkenerkrankung gelten unter anderem niedriger sozialer Status und das Zusammenleben mit vielen Personen auf engem Raum (Stuart *et al.*, 1988), passives Rauchen (Stanwell-Smith *et al.*, 1994, Stuart *et al.*, 1988) und männliches Geschlecht (Cartwright, 1995). Gefährdet für eine manifeste Meningokokken- Erkrankung sind vor allem splenektomierte Patienten, Patienten mit einer Influenza-A-Virus-Infektion und dadurch bedingter Immunsuppression (Cartwright, 1995) und Patienten mit Defekten im Komplementsystem (Übersichten in Ross und Densen, 1984 und in Figueroa und Densen, 1991). Von Hermans *et al.* wurde ein Zusammenhang manifester Meningokokkenerkrankungen mit genetischen Varianten im Mannose-bindenden Lektin (MBL) beschrieben, das einen gesonderten Weg der Komplementaktivierung initiiert (Übersicht Hibberd *et al.*, 1999). Von Bredius *et al.* wurde gezeigt, dass Fc- γ -Rezeptor-Polymorphismen eine entscheidende Rolle bei fulminanter Meningokokkenerkrankung spielt (Übersicht Bredius *et al.*, 1994). Hermans *et al.* hat den Zusammenhang der für eine Meningokokkensepsis typischen intravasalen Koagulopathie bei Kindern mit einer erhöhten Konzentration von Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAL-1) im Plasma beschrieben. Kinder mit einem bestimmten Polymorphismus im PAL-1 Gen produzieren höhere Konzentrationen an PAL-1 und haben daher ein erhöhtes Risiko, eine Koagulopathie zu entwickeln und somit eine höhere Mortalitätsrate (Übersicht in Hermans *et al.*, 1999). Nadel *et al.* beschrieben den Zusammenhang der Schwere der Meningokokkenerkrankung und der TNF α -1- bzw. TNF α -2-Sekretion, da diese eine wesentliche Rolle bei der Pathophysiologie der Meningokokkensepsis spielt. Ein Polymorphismus in der Promoterregion des TNF α -Gens entscheidet über die Produktion von TNF α -1 bzw. TNF α -2, wobei TNF α -2 zu einer erhöhten Sekretion und einer erhöhten Mortalität führt (Übersicht in Nadel *et al.*, 1996).

Die Meningokokkenmeningitis beginnt meist mit sehr starken Kopfschmerzen, Erbrechen und hohem Fieber. In ungefähr der Hälfte der Fälle gehen Prodromi voraus, die dem Bild eines grippalen Infektes ähneln (Olcén *et al.*, 1979). Die

Einleitung

neurologischen Meningitiszeichen nach Kernig und Brudzinski sind häufig positiv (Kernig 1882, Brudzinski 1809). Bei Kindern unter einem Jahr können diese Meningitiszeichen häufig nicht zuverlässig nachgewiesen werden, auch andere Symptome sind in diesem Alter oft unspezifisch. Eine vorgewölbte und gespannte Fontanelle kann bei Säuglingen ein Hinweis auf eine Meningitis sein. Labordiagnostisch erscheint der Liquor trüb und reich an Leukozyten. In 72% der Fälle sind die Meningokokken mikroskopisch direkt nachweisbar (Olcén *et al.*, 1979).

Die Entstehung der Meningitis erklärt sich durch die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und Blut-Liquor-Schranke in den Subarachnoidalraum seitens der Meningokokken, wobei die genaue Eintrittspforte in den Liquorraum nicht endgültig geklärt ist. Es lassen sich jedoch aus experimentellen Modellsystemen und histologischen Beobachtungen Rückschlüsse auf die Eintrittspforte ziehen. Eine histopathologische Untersuchung von Hirngewebe eines an einer Meningokokkeninfektion verstorbenen Säuglings zeigte die Adhäsion von Meningokokken an Endothelzellen des Plexus choroideus. Diese Beobachtung spricht dafür, dass Meningokokken auf diesem Weg den Subarachnoidalraum erreichen (Übersicht in Kubes und Ward, 2000). Durch die Endotoxinwirkung der Meningokokken werden von Astrozyten, Makrophagen und Endothelzellen TNF- α und Interleukin-1 freigesetzt, die eine meningeale Entzündungsreaktion induzieren. Proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 β , stimulieren die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, die beide die Migration von Leukozyten aus der Blutbahn in den Subarachnoidalraum steuern (Übersicht in van Furth, 1996).

Eine Meningokokkensepsis kann auch ohne meningitische Symptome ablaufen. Die Meningokokkensepsis kann mit Schüttelfrost, Hypotonie, Übelkeit, Petechien und einer Leukozytose einhergehen. Der septische Schock mit Gerinnungsstörungen, Kreislauf- und Multiorganversagen dominiert das klinische Bild. Schwere septische Verlaufsformen sind mit hohen Plasmaspiegeln von Lipopolysacchariden (LPS) assoziiert (Brandtzaeg *et al.*, 1995). Sobald LPS-haltiges Material in den menschlichen Blutkreislauf gelangt, werden Entzündungsreaktionen induziert, die die Organfunktionen des Wirtes

Einleitung

beeinträchtigen (Morrison und Ryan, 1987). Außerdem kommt es zu hämorrhagischer Diathese bei disseminierter intravasaler Gerinnung und zur Gefäßschädigung (Brandtzaeg, 1995). Daraus resultieren die für eine Meningokokken-Infektion klassischen Petechien. In schwersten Fällen entwickeln sich eine Verbrauchskoagulopathie und ein septischer Schock.

Disseminierte Meningokokkenerkrankungen können von einem breiten Spektrum an Symptomen begleitet sein. Diese können den systemischen Krankheitszeichen vorausgehen oder einzige Manifestation der Infektion sein. Als alleinige Manifestation der Meningokokkenerkrankung sind Arthritis, Perikarditis, Endokarditis, Konjunktivitis, gastrointestinale Störungen und Hirnnervenausfälle beschrieben (Steven and Wood, 1995). Die Meningokokkenerkrankung bedingt durch Serogruppe Y manifestiert sich häufig als Pneumonie (Hoppes *et al.*, 1977; Rosenstein *et al.*, 1999). Die Letalität der invasiven Meningokokkeninfektion liegt in Deutschland durchschnittlich bei 10%. Wird die durch Meningokokken verursachte Meningitis oder Sepsis überlebt, kann man in 6-7 % der Fälle bleibende Schäden beobachten (Grimwood *et al.*, 2000; Pfister *et al.*, 1993; Durand *et al.*, 1993; Übersicht in Frosch, Uni-Med 2003). Diese bleibenden Schäden können durch tiefe Nekrosen verursacht werden, die zu Amputationen führen können, aber auch bleibende Gehör- und Nierenschäden sind möglich.

Nach §6 des Infektionsschutzgesetzes vom 1. Januar 2001 ist die durch Meningokokken ausgelöste Meningitis und/oder Sepsis bei Krankheitsverdacht, Erkrankung und Tod namentlich meldepflichtig. Nach §7 des Infektionsschutzgesetzes ist der direkte Erregernachweis aus Liquor, Blut und hämorrhagischen Hautinfiltrationen meldepflichtig. Die Meldung muß umgehend per Telefon an das Gesundheitsamt erfolgen.

Als Schutzimpfung steht eine Vakzine, bestehend aus den Kapselpolysacchariden A, C, W135 und Y zur Verfügung. Gegen den in Deutschland vorherrschenden Kapseltyp B gibt es keine Schutzimpfung. Die hochmolekularen Impfstoffe aus gereinigten Kapsel-Polysacchariden wurden Ende der 60er Jahren von Gotschlich *et al.* entwickelt (Gotschlich *et al.*, 1969). Die vorhandenen Impfstoffe sind jedoch nicht geeignet, eine Population langfristig

zu schützen (Vogel und Frosch, 1999), da die Kapselantigene der Meningokokken zu einer T-Zell-unabhängigen Immunantwort führen. Da diese nur von kurzer Dauer ist, lässt eine Sekundärimmunisierung keinen Booster-Effekt erkennen. Bei Kleinkindern unter achtzehn Monaten bleibt eine Immunantwort gegen das Serogruppe C Polysaccharid vollständig aus (Frasch, 1995). Die schwache Immungenität gilt vor allem dem Serogruppe B Polysaccharid, welches bisher auch in den Impfstoffen nicht enthalten ist. Konjugat-Impfstoffe, die zu einer T-Zell-abhängigen Immunantwort führen sollen, wurden durch Kopplung der Polysaccharide an Trägerproteine entwickelt und klinisch getestet (Constatino *et al.*, 1992; Richmond *et al.*, 1999). Das Meningokokken-Serogruppe-C Konjugat (MCC) wird seit 1999 in Großbritannien zur systemischen Impfung von Kindern und Jugendlichen unter 18 Jahren eingesetzt. Eine Studie zur Wirksamkeit dieses Konjugatimpfstoffes bei Teenagern und Kleinkindern wurde 2001 von Ramsay veröffentlicht (Ramsay *et al.*, 2001). Die Studie zeigte, dass die Wirksamkeit des MCC für Teenager bei 97% und für Kleinkinder bei 92% lag. Damit bestätigte sich die Überlegenheit des MCC gegenüber dem normalen C-Polysaccharid-Impfstoff, der bei Kleinkindern ineffektiv ist (Ramsay *et al.*, 2001). Für 11 bis 55jährige Individuen wurde kürzlich der erste polyvalente Konjugatimpfstoff gegen die Serogruppen A, C, W135 und Y in den USA zur Zulassung empfohlen.

1.1.3 Epidemiologie

Erkrankungen an *Neisseria meningitidis* sind in jedem Alter möglich, betreffen in Europa aber vor allem Säuglinge und Kleinkinder. Der erste Erkrankungsgipfel tritt im Alter von sechs Monaten auf. In diesem Alter nimmt die plazentar vermittelte passive Immunität ab. Nachdem das Erkrankungsrisiko nach dem Kleinkindalter zunächst wieder sinkt, ist ein zweiter Altersgipfel bei 14 bis 19-Jährigen zu beobachten, der vor allem den erweiterten sozialen Aktivitäten und somit Übertragungsmöglichkeiten unter Jugendlichen zugeschrieben wird (Jones und Kaczmarek, 1995).

Einleitung

In direktem Zusammenhang mit dem Erkrankungsalter scheint die Besiedlung des Nasopharynx mit der apathogenen, unbekapselten Neisserien-Spezies *Neisseria lactamica* zu stehen. Die Prävalenz von bakteriziden Antikörpern im Kindesalter steigt deutlich an, obwohl kleine Kinder selten Träger von Meningokokken sind. Durch den Kontakt mit *Neisseria lactamica* werden bakterizide Antikörper gegen die Oberflächenstrukturen von Meningokokken verschiedener Serogruppen gebildet (Cartwright, 1995, Coen *et al.*, 2000, Gold *et al.*, 1978). Im Jugendalter, dem 2. Erkrankungsgipfel, kommt es deutlich häufiger zu Besiedlung mit Meningokokken bei gleichzeitigem Rückgang der Prävalenz von *Neisseria lactamica* (Cartwright *et al.*, 1987; Cartwright, 1995).

Weltweit werden mehr als 90% der Meningokokken-Infektionen durch die Serogruppen A, B, C, W-135 und Y hervorgerufen, wobei in Mitteleuropa die Meningokokken der Gruppe B der häufigste Verursacher von Meningokokken-Sepsis und Meningitis (66%) ist, gefolgt von den Gruppen C (28%), A (kleiner 2%), W-135 und Y (beide ca. 2 %) (Connolly und Noah, 1999). Die Erkrankungen durch B und C-Meningokokken haben einen saisonalen Peak im ersten Quartal eines Jahres. Die Gründe dafür sind nicht gesichert, man hat aber einen Zusammenhang mit dem gehäuften Auftreten von viralen Erkältungskrankheiten (z.B. Influenza A) und engerem Personenkontakt in dieser Zeit beobachtet (Cartwright *et al.*, 1991). In einer Militäreinheit wurde kurz nach einem Rötelausbruch ein Meningokokkenausbruch beobachtet, das gleiche kann für Mykoplasmeninfektionen angenommen werden (Moore *et al.*, 1990).

Einige Länder, vor allem in tropischen und subtropischen Regionen, werden in Abständen von 5-10 Jahren von Meningokokken-Epidemien heimgesucht. Als Beispiele dafür sind der Meningitisgürtel in Afrika (Zentralafrika: von Obervolta über Nigeria, Tschad bis nach Äthiopien) und China zu nennen. Hier erkrankten bei Epidemien bis zu 1000 Personen/100.000 Einwohner/Jahr (Weekly Epidemiological Record, 1999). Bei solchen Epidemien in Afrika und China ist die Serogruppe A, gefolgt von der Serogruppe C, am häufigsten vertreten (Wang *et al.*, 1992; Achtman *et al.*, 1997).

1.1.4 Genetische Variabilität von *Neisseria meningitidis*

Bei Bakterien sind drei Formen der DNA-Übertragung bekannt: Konjugation, Transduktion und Transformation (Singer und Berg, 1991). Bei Neisserien findet der horizontale Genaustausch überwiegend durch Transformation statt. Als natürliche Kompetenz bezeichnet man die Fähigkeit, unter physiologischen Bedingungen mittels Transformation freie, lösliche DNA aus der Umgebung aufzunehmen.

Bei Meningokokken findet eine ständige Mikroevolution statt, die durch Punktmutationen, Deletionen, Insertionen, Translokationen von Genen innerhalb des Genoms und horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Stämmen oder Spezies verursacht wird. Der horizontale Genaustausch wird durch die natürliche Transformierbarkeit der Neisserien erleichtert. Das gemeinsame Vorkommen apathogener Neisserien und Meningokokken im Nasen-Rachen-Raum des Menschen ermöglicht interspezifischen horizontalen Gentransfer (Lujan *et al.*, 1991; Zhou und Spratt, 1992; Hazelzet *et al.*, 1998, Linz *et al.*, 2000). Durch den horizontalen Genaustausch entstehen heterogene Populationen, die auf einen gemeinsamen Genpool zurückgreifen können (Maiden *et al.*, 1996). Neben der Bildung von Mosaikgenen, die sowohl aus DNA-Abschnitten des Empfängerbakteriums als auch aus Abschnitten der Fremd-DNA bestehen, kann auch ein allelischer Austausch von kompletten Genen oder größeren Gen-Clustern erfolgen (Lujan *et al.*, 1991; Bowler *et al.*, 1994). Einige Genabschnitte scheinen allerdings vom horizontalen Genaustausch über Speziesgrenzen hinweg ausgeschlossen zu sein. Als Beispiel ist hier der *cps*-Lokus (Kapselgenkomplex) zu nennen, der bisher nur in Meningokokken gefunden wurde (Frosch *et al.*, 1991). Allerdings sind Gene des *cps*-Lokus Gegenstand eines Austausches genetischen Materials zwischen verschiedenen Meningokokkenstämmen (Swartley *et al.*, 1997; Cardenosa *et al.*, 2003; Vogel *et al.*, 2000).

Die Mikroevolution bei Meningokokken wurde am Beispiel von Serogruppe A-Meningokokken untersucht und als Modell sequentieller Flaschenhälse (bottlenecks) beschrieben (Achtman, 1994). Die Ausbreitung einzelner

Meningokokkenvarianten mit hoher Fitness in einer Wirtspopulation erfolgt als klonale Expansion. Durch Mikroevolution entstehen neue genetische Varianten. Der Übertritt auf eine neue Wirtspopulation führt dann wieder zu einer klonalen Reduktion, da dieser Übertritt nur einem Derivat des Ursprungsklons gelingt (Achtman, 1994).

1.1.5 Populationsstruktur von *Neisseria meningitidis*

Die Analyse der Allele verschiedener Stoffwechselfgene bzw. deren kodierter Enzyme ermöglicht eine phylogenetisch relevante Typisierung von Bakterien. Mittels Multilokus-Enzym-Elektrophorese (MLEE) wurden Enzymvarianten von 10 bis 15 Stoffwechselfenzymen anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität analysiert (Selander *et al.*, 1986; Caugant *et al.*, 1987). Die Varianten entstehen durch Mikroevolution der kodierenden Gene. Ein identisches Isoenzymmuster von Stämmen erlaubt einen Rückschluss auf einen hohen Grad genetischer Verwandtschaft. Sie gehören demselben Klon an und werden als elektrophoretischer Typ (ET) zusammengefaßt. Gruppen verwandter ETs, die sich in der MLEE nur in wenigen Allelen unterscheiden, werden klonalen Linien (Komplexe, Cluster oder Subgruppen) zugeordnet (Achtman, 1995). Von Maiden *et al.* wurde 1998 eine besser reproduzierbare Methode, die Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST), etabliert. Die MLST basiert auf der Sequenzierung von 400-500 bp langen internen DNA-Fragmenten von sieben Stoffwechselfgenen (Maiden *et al.*, 1998). Die Klone mit einem identischen Sequenzprofil der sieben untersuchten Gene gehören einem gemeinsamen Sequenztyp (ST) an. Die Zusammenfassung mehrerer STs, die vier gemeinsame Loci miteinander teilen, werden zum klonalen Komplex zusammengefasst, und nach ihrem Founder benannt. Als Founder wird der Sequenztyp bezeichnet, der nach sogenannter BURST-Analyse (based upon related sequence-type) als ursprünglicher Genotyp einer klonalen Linie ermittelt wurde. Vorteile der MLST gegenüber der MLEE bestehen in der feineren Trennung von Klonen, da auch Sequenzunterschiede erkannt werden, die sich auf das elektrophoretische Laufverhalten der Genprodukte nicht auswirken. Die

Einleitung

MLST- Methode ist zudem weniger zeitaufwendig und erlaubt einen objektiven Vergleich der Ergebnisse (Maiden *et al.*, 1998). Der wichtigste Vorteil der MLST ist die sogenannte Portabilität. Das Datenformat ist mit Hilfe von Computern zu bearbeiten. Mittels MLST wurden bisher bereits 3746 verschiedene Sequenztypen von Neisserien in mehr als 50 Ländern identifiziert (<http://pubmlst.org/neisseria/>). Die MLST wird auch für andere Bakterienspezies, wie *Bacillus cereus*, *Burkholderia pseudomallei*, *Campylobacter spp.*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus et epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae et agalactiae* und *Vibrio vulnificus* angewendet (<http://www.mlst.net>).

Die Population der Meningokokken besteht aus einer heterogenen Mischung von Isolaten, die selten Erkrankungen hervorrufen, und aus Gruppen eng verwandter Stämme (klonale Linien), die zum Ausbruch der Erkrankung führen. Diese klonalen Linien besitzen eine erhöhte Fähigkeit zur Verursachung der Erkrankung und werden daher als hypervirulente Linien bezeichnet (Maiden *et al.*, 1998). Es gibt auch klonale Linien bei apathogenen Trägerisolaten. Allerdings sind nur wenige klonale Linien für die meisten Erkrankungen verantwortlich. Derzeit sind 25 klonale Linien allgemein akzeptiert (<http://pubmlst.org>), der Anteil hypervirulenter Linien bei Trägern liegt bei 10% (Jolley *et al.*, 2000; Claus *et al.*, 2005).

Im Meningitis-Gürtel in Afrika treten Epidemien und Pandemien der Meningokokkenerkrankung auf, die vor allem durch die Serogruppe A verursacht werden. Nur wenige der über 500 bekannten Meningokokken der Serogruppe A wurden als hypervirulente Linien identifiziert und zunächst durch die MLEE in neun Subgruppen eingeteilt (Wang *et al.*, 1992). Mittlerweile wird auch hier die MLST-Nomenklatur verwendet, derzeit sind 7 ST bei Meningokokken der Serogruppe A bekannt. Von Zhu *et al.* wurde die genetische Variabilität von sechs polymorphen Loci an 502 A-Meningokokken-isolaten der Subgruppe III (ST-5-Komplex) untersucht. Dabei wurden neun genoclouds identifiziert, die von Mitte der 60iger Jahre bis Mitte der 90iger Jahre drei Pandemien ausgelöst hatten, ausgehend von Ost-Asien über Europa

bis Afrika. Als genocloud bezeichnet man einen häufig vorkommenden Genotyp zusammen mit seinen epidemiologisch assoziierten Nachkommen. Das Genocloud-Konzept dient der Beschreibung von Sequenzvariabilität unter klonal verwandten Isolaten vieler Bakterienspezies (Zhu *et al.*, 2001). Die hypervirulenten Linien sollen wie andere Linien die Folge erfolgreicher Anpassung sein. Ihre Founder-Genotypen stellen einen Fitness-Peak dar. Die relative Konsistenz genotypischer und phänotypischer Merkmale bedingt allerdings die Entstehung einer Herdimmunität, die eine weitere Ausbreitung eines Klons inhibieren kann (Zhu *et al.*, 2001).

Die Meningokokkenerkrankungen in den Industrieländern werden durch eine kleine Anzahl hypervirulenter Linien der Serogruppen B und C verursacht, die vor allem während endemischer Erkrankungen und Ausbrüchen isoliert werden (Cartwright, 1995). So treten in Europa Serogruppe B Meningokokken aus dem ST-32 Komplex und der ST-41/44 Komplex sowie Serogruppe C Stämme aus dem ST-11 Komplex und dem nahe verwandten ST-8 Komplex auf. Der ST-8 Komplex umfasst sowohl Meningokokken der Serogruppe B und C.

Vertreter einer klonalen Linie weisen meist ähnliche Serogruppen, Serotypen und –subtypen auf. Es ist aber möglich, dass einzelne Stämme im horizontalen Gentransfer neue antigenetische Eigenschaften erwerben. So können Meningokokken ihren Kapseltyp wechseln (Übersicht in Swartley *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 2000b). Innerhalb klonaler Gruppierungen können immer wieder neue Varianten entstehen. Der ET-15 Klon ist dem ST-11 Komplex zuzuordnen. ET-15 Meningokokken wurden erstmals in den Jahren 1988/89 bei Ausbrüchen in Kanada isoliert (Ashton *et al.*, 1991). Seither haben sie weltweite Verbreitung gefunden.

Im Jahre 1993 führten sie in der Tschechischen Republik zu Ausbrüchen mit einer deutlichen Steigerung der Inzidenz von Meningokokken-Erkrankungen (Krizova und Musilek, 1995; Krizova *et al.*, 1997). In Deutschland ist der ET-15-Klon für die meisten regional begrenzten Ausbrüche der Erkrankung bei Jugendlichen verantwortlich (Angabe des Nationalen Referenzzentrums für Meningokokken Würzburg, siehe www.meningococcus.de).

1.1.6 Vergleich der Populationsstruktur zu anderen bakteriellen Arten

Mittels Multilocus-Enzymelektrophorese (MLEE) begannen Populationsgenetiker in den achtziger Jahren mit der Analyse verschiedener Bakterienstamm-sammlungen, um die Variabilität von Bakterienspezies im Rahmen der Populationsbiologie zu definieren (Selander *et al.*, 1987). Diese Daten wurden ausgewertet, um Beziehungen zwischen Genen an verschiedenen Loci herzustellen. Viele Bakterienspezies zeigten ein ausgeprägtes Kopplungsungleichgewicht, was bedeutet, daß eine nicht-zufällige Verbindung von Allelen vorliegt. Durch die Bestimmung des index of association können panmiktische (sexuelle) Populationen von epidemischen (bedingt sexuellen) und klonalen (asexuellen) Populationen abgegrenzt werden (Maynard-Smith *et al.*, 1993; Suerbaum und Achtman, 2001). Über einen kurzen Zeitraum weisen alle Bakterien eine klonale Populationsstruktur auf, die sich aber durch Rekombination wieder auflösen oder durch Ausbreitung verstärken kann. Die Unterscheidung in panmiktische, epidemische und klonale Populationsstruktur spiegelt somit das Verhältnis von Rekombination zu Ausbreitung wieder (Maynard-Smith *et al.*, 1993; Suerbaum und Achtman, 2001).

Zu den klonalen Spezies gehören z.B. *Escherichia coli* und *Yersinia pestis*. Ihre genetischen Veränderungen resultieren überwiegend aus der sequentiellen Akkumulierung von Mutationen in den Nachkommen eines gemeinsamen Vorfahren. Aber auch diese klonalen Spezies sind nicht absolut klonal, denn auch hier findet horizontaler Genaustausch statt. Allerdings ist die Frequenz des Gentransfers zu gering, um das Kopplungsungleichgewicht zu zerstören. Bei *E. coli* sind Punktmutationen fünfmal häufiger als lokalisierte Rekombinationereignisse (Milkman and Bridges; 1990). *Yersinia pestis* verfügt sogar über nur einen Sequenztyp. Die Spezies entwickelte sich als phylogenetisch junge Abspaltung vor 1.500 bis 20.000 Jahren aus *Yersinia pseudotuberculosis* (Achtman *et al.*, 1999).

Zu den panmiktischen Spezies zählen beispielsweise *Helicobacter pylori* (Suerbaum und Achtman, 2001) und vermutlich *Neisseria lactamica*. *Neisseria lactamica* ist so variabel, daß nur die Isolate von Trägern mit direktem Kontakt

identisch sind (Alber *et al.*,2001). Es existieren derzeit 173 MLST-Einträge bezüglich *Neisseria lactamica* mit 171 Sequenztypen (<http://pubmlst.org/neisseria/>).

Sequenzdaten von Virulenzgenen bei *H. pylori* wurden mit Hilfe des Homoplasietestes hinsichtlich Rekombination untersucht. Im Gegensatz zu den klonalen Spezies finden hier Rekombinationen viel häufiger statt als Punktmutationen (Suerbaum und Achtman, 2001). Es handelt sich um eine panmiktische Art, bei der sich die Allele verschiedener Loci im Kopplungsgleichgewicht (linkage equilibrium) befinden.

Neisseria meningitidis nimmt eine Zwischenstellung zwischen den klonalen und panmiktischen Spezies ein. Hier liegt eine ausgeprägte Rekombination und genetische Diversität mit Tendenz zur klonalen Ausbreitung fitter Genotypen und Bereinigung der Population und Varianten durch das sogenannte „Bottlenecking“ vor (Achtman, 1994). Solche epidemischen Spezies sind ursprünglich panmiktische Spezies, bei denen gelegentlich eine Expansion einzelner Klone zu beobachten ist. So können verschiedene klonale Gruppierungen in unterschiedlichen Regionen und in unterschiedlichen Zeitabschnitten dominieren. Die Wahrscheinlichkeit eines Nukleotidaustausches innerhalb eines Stoffwechselgens durch Rekombination ist dennoch 80mal größer als durch Mutation (Feil *et al.*, 1999).

Sowohl epidemische als auch panmiktische Spezies verfügen über Transformationskompetenz, die die freie Rekombination von Genen ermöglichen.

1.1.7 Typisierung von *Neisseria meningitidis*

Die Typisierung von *Neisseria meningitidis* erfolgt anhand verschiedener Typisierungsmethoden. Dabei unterscheidet man die serologische Typisierung (Polysaccharidkapsel, PorA, PorB) von der DNA-Sequenz-basierten Typisierung hypervariabler Gene (porA, fetA) und die phylogenetisch relevanten Typisierungsmethoden (MLEE und MLST). Andere Typisierungsverfahren wie die Pulsfeldgelelektrophorese oder andere Fingerprint-Methoden spielen eine untergeordnete Rolle.

1.1.7.1 Serologische Typisierung

Bei der serologischen Typisierung von *Neisseria meningitidis* wird die antigenetische Zusammensetzung der Polysaccharidkapseln untersucht. So lassen sich die Meningokokken in dreizehn verschiedene Serogruppen einteilen. Die Typisierung kann serologisch mit Hilfe spezifischer Antikörper oder durch molekulare Analysen auf der Basis serogruppenspezifischer Gene bestimmt werden. Die Serogruppenbestimmung ist essentiell, um die Impfpräventabilität eines Falles zu determinieren.

Die äußere Membran der Meningokokken enthält äußere Membranproteine (OMP= outer membrane protein), die nach ihrem elektrophoretischen Wanderungsverhalten in fünf Klassen eingeteilt werden. Anhand der OMP der Klasse 1 (Porin A) und der Klassen 2 und 3 (Porin B) werden Meningokokken unter Einsatz monoklonaler Antikörper serotypisiert bzw. serosubtypisiert. Da das Klasse 1-OMP über zwei besonders variable Regionen (VR1 und VR2) verfügt, können bei der Serosubtypisierung zwei separate Epitope angegeben werden (Poolman *et al.*, 1995). Die serologischen Eigenschaften von Meningokokken-Stämmen dienen ihrer Klassifikation und werden in einer antigenetischen Formel zusammengefasst, die zunächst die Serogruppe (z.B. C) dann Serotyp (z.B. 2a) und -subtyp (z.B. P1.5,2) angibt (Frasch *et al.*, 1985). Für dieses Beispiel ergibt sich dann die Formel C:2a:P1.5,2. Durch die serologische Klassifizierung der Lipopolysaccharide in der äußeren Membran erhält man den Meningokokken-Immunityp (Jones *et al.*, 1992). Die serologische Feintypisierung wird zunehmend verlassen, da aufgrund der hohen Geschwindigkeit der Entwicklung neuer PorA und PorB-Varianten Reagenzien nicht ausreichend zur Verfügung stehen. Zudem ist die serologische Typisierung schwieriger zu standardisieren als die Sequenztypisierung.

1.1.7.2 DNA-Sequenz-basierte Typisierung von hypervariablen Genen

Die Genfragmente der variablen Regionen VR1 und VR2 des äußeren Membranproteins PorA können mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert werden. Die Aminosäuresequenz kann aus den DNA-

Einleitung

Sequenzanalysen abgeleitet werden und die Serosubtypisierung ersetzen (Maiden *et al.*, 1998). Die Sequenzunterschiede können zur Unterscheidung von Stämmen z.B. innerhalb eines Ausbruches herangezogen werden.

Ein weiteres OMP, das FetA (vorher bekannt als FrpB, Ala Aldeen *et al.*, 1994; Beucher und Sparling, 1995; Gotschlich *et al.*, 1991), wurde 2003 von Thompson *et al.* als valides Target für ein Typisierungsverfahren beschrieben (Thompson *et al.*, 2003).

Immunologisch interessant wurde FetA durch die Beobachtung, daß Patienten mit durchgemachter Meningokokkenerkrankung FetA-Antikörper im Blut aufweisen (Black *et al.*, 1986) und dass monoklonale Mausantikörper (mAK), die gegen FetA gerichtet waren, sowohl bakterizid waren und spezifisch das Isolat erkannten, gegen dass sie gerichtet waren (Pettersen *et al.* 1990). Ein Topologiemodell für FetA besagt, dass es 26 β -Faltblätter besitzt, die die Transmembrandomänen darstellen. Von den 13 Oberflächen-„Loops“ ist besonders Loop 7 immunologisch interessant, da er bezüglich der Aminosäuresequenz sehr variabel ist und auch die Epitope zahlreicher mAKs enthält.

Dieses Protein wird abhängig von der Eisenkonzentration exprimiert und ist ein Bestandteil von Meningokokkenvakzinen. Es zeigt eine hohe Diversität. Aus 107 Meningokokkenisolaten wurden insgesamt 60 fetA-Allele identifiziert, die für 56 Proteinsequenzen kodieren. Phylogenetische Analysen ergaben, daß diese Allele sowohl durch Punktmutationen als auch durch horizontalen Gentransfer entstanden sind. Die Nukleotidaustausche sind aber ungleichmäßig innerhalb des Gens verteilt, so dass konservierte und variable Sequenzbereiche innerhalb des Gens vorhanden sind. Ein konservierter Bereich in der aminoterminalen Domäne kann von der variablen Region (VR) unterschieden werden. Basierend auf den Peptiden der VR wurde eine Klassifizierung eingeführt. Von allen Varianten wurden bis heute 24 in 5 so genannte FetA Varianten-Familien zusammengefasst (Thompson *et al.*, 2003) (<http://neisseria.org/nm/typing/fetA>). Im Nationalen Referenzzentrum für Meningokokken (NRZM) wurde die FetA-Typisierung als Alternative für die PorB-Typisierung erkannt, da das Por-B Gen einer Sequenztypisierung nicht zugänglich ist.

1.1.7.3 Restriktions-Modifikations-Systeme als Klon-spezifische DNA-Marker bei *Neisseria meningitidis*

Das Phänomen der Restriktion und Modifikation wurde erstmals zu Beginn der fünfziger Jahre beschrieben (Luria und Human, 1952). R-M-Systeme kommen nur in Prokaryonten vor. Ihre Funktion besteht im Schutz vor fremder DNA. Die meisten Bakterien mit R-M-Systemen verfügen über mehrere Systeme (Wilson und Murray, 1991). Restriktions-Modifikations-Systeme (R-M-Systeme) bestehen aus Paaren intrazellulärer Enzyme: eine Endodesoxyribonuklease (ENase) und einer DNA-Methyltransferase (MTase). Die für R-M-Systeme kodierenden Gene können chromosomal oder auf Plasmiden lokalisiert sein. Man unterscheidet zwei Gruppen von R-M-Systemen. Zum einen die klassischen R-M-Systeme, bei denen die Modifikation der zellulären DNA diese vor der Restriktion schützt, und zum anderen Systeme, bei denen die Restriktion nur erfolgt, wenn die DNA methyliert ist. Die enzymatische Reaktion der ENasen umfaßt das spezifische Erkennen von vier bis acht Basen im DNA-Doppelstrang und das darauffolgende Schneiden beider Stränge der Duplex- im Unterschied zu anderen Nukleasen, die nur einen Strang schneiden. Als Co-Faktoren der Reaktionen werden Magnesium oder ähnliche divalente Kationen benötigt (Wilson und Murray, 1991). ENasen sind sehr heterogen und weisen nur eine geringgradige Verwandtschaft untereinander auf (Jeltsch *et al.*, 1995). Für Meningokokken wurden von unserer Arbeitsgruppe R-M-Systeme beschrieben, die als genetische Marker identifiziert wurden und spezifisch für verschiedene klonale Linien der Meningokokken sind (Claus *et al.*, 2000 und 2001). R-M-Systeme wurden bisher in 13 Neisserien-Spezies isoliert, u.a. von *N.gonorrhoeae* und *N.meningitidis* (<http://rebase.neb.com/>). Das erste Meningokokken-R-M-System *NmeI* wurde 1984 isoliert (Sparling und Bhatti, 1984). Durch Repräsentative Differenzanalyse (RDA) wurden von Claus *et al.* die R-M-Systeme *NmeAI*, *NmeBI* und *NmeDI* identifiziert, die innerhalb hypervirulenter Meningokokkenlinien differentiell verteilt sind (Claus *et al.*, 2000 und 2001). Die Gene, die *NmeBI* und *NmeDI* kodieren, sind zwischen den Genen *pheS* und *pheT* inseriert, die die α - und β -Kette der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase kodieren. Der Locus in der Nähe der tRNA-Synthetase-Gene

scheint ein bevorzugter Integrationsort für heterologe DNA-Fragmente der Meningokokken zu sein. Zur Bestimmung der Verteilung der R-M-Systeme innerhalb der klonalen Linien der Meningokokken wurden DNAs genetisch unterschiedlicher Meningokokkenstämme, die mittels MLST charakterisiert worden waren, mit Sonden der drei R-M-Systeme hybridisiert (Claus *et al.*, 2000). Die klonalen Linien, die epidemische und hyperendemische Meningokokkenerkrankungen hervorrufen, konnten anhand der drei R-M-Systeme eingeteilt werden.

-*NmeBI*-positiv: ST-32 Komplex und ST-44 Komplex, die vor allem Serogruppe-B-Erkrankungen hervorrufen.

-*NmeAI*-positiv, *NmeDI*- negativ: Serogruppe-A-Meningokokken

-*NmeAI*- und *NmeDI*-positiv: ST-11 Komplex und ST-8 Komplex, die vor allem Serogruppe-C-Erkrankungen hervorrufen.

Sowohl *NmeAI* als auch *NmeDI* kommen bei Meningokokken der klonalen Linien ST-8 und ST-11 Komplex vor.

1.8. ST-11 und ST- 8 Komplex Meningokokken

Die beiden wichtigen hypervirulenten Meningokokkenlinien ST-8 und ST-11 Komplex sind von besonderer Bedeutung für weltweite Serogruppe C-Erkrankungen. Der ST8-Komplex ist sowohl mit den Serogruppen B als auch C assoziiert. Der ST-11 Komplex ist zu 90% mit der Serogruppe C assoziiert. Nur selten kommen die Serogruppen B und W135 vor.

Die Neisserien MLST- Datenbank zeigte, dass 275 der 367 invasiven Serogruppe-C-Stämme den ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken angehörten (<http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>).

Die ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken stehen in Beziehung zueinander. Ihre Founder-Genotypen sind auf 3 Allelen kodiert, die in 7 Loci lokalisiert sind und durch MLST typisiert wurden (Claus *et al.*, 2003). Sie exprimieren beide ähnliche PorA und PorB Proteine der Klasse 2 und verfügen über charakteristische R-M-Systeme. Durch DNA-DNA Hybridisierung wurde gezeigt,

Einleitung

dass das putative R-M-System *NmeDI* spezifisch für diese beiden Linien ist (Claus *et al.*, 2000 a und b). *NmeDI* weist für die ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken eine Spezifität von 95% auf.

Innerhalb klonaler Gruppierungen können neue Varianten mit hoher Fitness und gegebenenfalls Virulenz entstehen. So ist der ET-15 Klon dem ET-37 Komplex (ST-11 Komplex) zuzuordnen. ET-15 Meningokokken wurden 1988/89 in Kanada isoliert (Ashton *et al.*, 1991(b)) und fanden seither weltweite Verbreitung. Von Ashton *et al.* wurden 1991 378 Isolate von *Neisseria meningitidis* der Serogruppe C mit Hilfe der MLEE charakterisiert, nachdem gehäuft Fälle von Meningokokkeninfektionen in Kanada auftraten. Es wurden 34 verschiedene ETs gefunden, die in 96% der Fälle dem Serotyp 2a angehörten. Der ET-15 Klon war verantwortlich für einen Ausbruch in der Region Ontario (Ashton *et al.*, 1991(b)).

In der Provinz Quebec wurden in den Jahren 1991 und 1992 234 Isolate von *Neisseria meningitidis* charakterisiert, wobei in 69,7% der Fälle die Serogruppe C und in 27,4% der Fälle Serogruppe B gefunden wurde. Der Serotyp 2a machte 80,3% der Serogruppe C Meningokokken aus, P1.2 war der häufigste damit assoziierte Subtyp. Der ET-15 Klon wurde in 76,5% der Serogruppe C Isolate gefunden, wobei 90% davon dem Serotyp 2a angehörten. Obwohl die Erkrankung vor allem Kinder unter 4 Jahren betraf, war die höchste Mortalität im Alter zwischen 12 und 19 zu finden (Ringuette *et al.*, 1994).

In der Tschechischen Republik führten 1993 ET-15 Meningokokken des Typs C:2a:P1.2(1.5), zu Ausbrüchen und einer gesteigerten Inzidenz der Erkrankung (Krizova und Musilek 1995). Sie zeichneten sich vor allem aus durch eine erhöhte Inzidenz unter Jugendlichen, durch besondere Virulenz mit einer fünffach erhöhten Rate an Defektheilung und einer Verdopplung der Letalität im Vergleich zu anderen elektrophoretischen Typen (Krizova und Musilek, 1995; Erickson und De Wals, 1998). Mit Hilfe der MLST wurde bald der ET-15 Klon gefunden, der dem ET-37 Komplex angehört. Sowohl beim Militär als auch in der Zivilbevölkerung kam es zu einem Ausbruch der Erkrankung. Die betroffene Altersklasse lag zwischen 15 und 19 Jahren.

Einleitung

Sowohl in Kanada als auch in der Tschechischen Republik wurden daraufhin Massenvakzinierungskampagnen mit Serogruppe C Polysacchariden durchgeführt (De Wals *et al.*, 1996; Kriz *et al.*, 1995), da die gefundenen ET-15 Stämme der Serogruppe C angehörten. Anschließend wurden zunehmend ET-15 Meningokokken der Serogruppe B isoliert, die durch hohe Virulenz und eine 20%ige Letalität gekennzeichnet waren (Krizova *et al.*, 1997). Man nimmt an, daß aufgrund des hohen Selektionsdruckes die Serogruppe durch Kapsel-switching verändert wurde (Übersicht in Swartley *et al.*, 1997).

Die ET-15 Stämme zeichnen sich in der MLEE durch ein seltene Variante des *fumC*-Allels aus, die im ET-37 Komplex sonst nicht vorkommt. Der in der MLST sequenzierte Abschnitt des *fumC*-Gens (Position 776-1230) zeigt keinen Unterschied zwischen ET-15 und ET-37. Von Vogel *et al.* wurde jedoch eine nicht-synonyme Punktmutation an Position 640 des *fumC*-Gens im ET-15 Klon gesehen (Vogel *et al.*, 2000(a)). Da die MLST die Positionen 776-1230 erfasst, nicht aber die Position 640, wurde der Unterschied zwischen ET-15 und ET-37 in der MLST nicht erfasst.

In Rottal-Inn kam es 1998 während der Karnevalszeit zu einem Meningokokkenausbruch. Die Typen C:2a:P1.5,2:FetA3-6 und C:2a:P1.5,2:FetA4-1 wurden dort isoliert. Betroffen waren 7 Personen, wovon ein 16jähriger Junge im Rahmen der Erkrankung verstorben ist. Die betroffenen Jugendlichen pendelten zwischen mehreren vollbesetzten Discotheken hin und her, wo enger Personenkontakt stattgefunden hat. In der Umgebung der Betroffenen wurde eine antimikrobielle Chemoprophylaxe veranlasst. Alle Schulen wurden geschlossen, Großveranstaltungen wurden abgesagt (Hauri *et al.*, 2000). In Rottal/Inn wurden ca. 2000 Personen, im Landkreis Passau ca. 3000 Personen mit einem Serogruppe A/C- Polysaccharidimpfstoff geimpft.

In Karlsruhe kam es 1999/2000 zu 9 Meningokokken-Erkrankungen bei Jugendlichen. Verantwortlich dafür war der ET-15 Klon C:2a:P1.5,2:FetA4-1. Im Landkreis Karlsruhe wurden 15400 Jugendliche (36%) der 14-19jährigen geimpft (Epid. Bull 21, 2002). Im Jahre 2003 kam es in Schwerte zu einer Meningokokken-Erkrankung von 6 Personen, verursacht durch den ET-15 Klon C:2a:P1.5-1,10-8:FetA3-6. In Altusried/Börwang erkrankten 2004 4 Personen

Einleitung

am ET-15 Klon C:2a:P1.5,2:FetA3-6, woraufhin 5000 mit einem Serogruppe C-Konjugat Polysaccharidimpfstoff geimpft wurden.

Diese Ausbrüche belegen die Bedeutung von Meningokokken der ST-11 Komplexe in Deutschland. Für andere Länder lässt sich dieses auch in Bezug auf den ST-8 Komplex sagen. So wurde die hyperendemische Situation in Spanien in den 1990er Jahren durch diese beiden Komplexe verursacht. Eine rasche und einfache Identifikation der beiden Linien ist daher für Referenzzentren eine wichtige methodische Erleichterung (Berron *et al.*, 1998).

1.9 Fragestellung

Die beiden hypervirulenten Meningokokkenlinien ST-8 und ST-11 Komplex sind weltweit von besonderer Bedeutung für Serogruppe-C- Erkrankungen. Die Neisseria MLST-Datenbank zeigt, dass ca. 75% der invasiven Serogruppe-C-Stämme den ST-8 und St-11 Komplexen angehören (<http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>). Durch DNA-DNA Hybridisierung wurde gezeigt, dass das putative R-M-System *NmeDI* spezifisch für diese beiden Linien ist (Claus *et al.*, 2000 a und b). Die untersuchte MLST- Stammsammlung mit 103 pathogenen Isolaten wies eine Spezifität von *NmeDI* für die ST8- und ST11-Komplexe von 95% auf.

Diese Spezifität wurde durch Reevaluation an einer in Bayern von Vogel *et al.* durchgeführten Meningokokkenstudie bestätigt. Von 822 Meningokokkenisolaten gehörten 10 Isolate zu den ST-8 und ST-11 Komplexen, die in der DNA-DNA Hybridisierung alle *NmeDI* positiv waren. Von den übrigen 812 Isolaten waren 5 (< 1%) *NmeDI* positiv ohne zu den ST-8 und ST-11 Komplexen zu gehören (Claus *et al.*, 2003; Claus *et al.*, 2005). Diese Beobachtung zeigt, daß *NmeDI* nach horizontalem Gentransfer genetisch nicht außerhalb der ST-8 und ST-11 Komplexe fixiert wird.

NmeDI stellt also einen exzellenten epidemiologischen Marker dar, mit dem Meningokokken der ST-8 und ST-11 Komplexe identifiziert werden können.

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, einen monoklonalen Antikörper (MAk) gegen die Endonuklease des R-M-Systems *NmeDI* zu erzeugen.

Der mAk sollte zur raschen Identifizierung von ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken bei Patienten und gesunden Trägern dienen.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Brutschrank

KB 500 (Heraeus, Hanau)

Elektrophoresekammern

DNA Subcell™ (BioRad, München)

Wide Mini-Subcell™ (BioRad, München)

FPLC

Gradifrac zur Antikörper-Aufreinigung (Pharmacia, Freiburg)

Gel-Dokumentationssystem

MidiDoc (Herolab, Wiesloch)

Gerät zur Elektroelution

S&S Biotrap Elektroseparationssystem zur Elution von Makromolekülen
(Schleicher und Schuell, Dassel)

Geräte zur Elektroporation

Gene Pulser™ (BioRad, München)

Pulse Controller™ (BioRad, München)

Heizblöcke

BT1 und BT3 (Grant Instruments, Cambridge, UK)

Mikroskop für die Zellkultur

Leitz Dialux, Wilovert, inverses Mikroskop (Hund, Wetzlar)

Schüttelinkubatoren

G25 (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA)

KS 10 (Bühler, Tübingen)

Sequenziergerät

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)

Material und Methoden

Spektrophotometer

U-2000 (Hitachi, San Jose, CA, USA)

Sterile Werkbank

Gelaire BSB6A (Flow Laboratories, Meckenheim)

Thermocycler

TRIO (Biometra, Göttingen)

Personal Cycler (Biometra, Göttingen)

Ultraschallgerät

Sonifier®II Ultraschall Desintegrator Modell 250 mit Standard-Mikrospitze, konisch, 3mm (Branson, Danburg)

Wasserbäder verschiedener Hersteller

Zentrifugen

Biofuge 15 (Heraeus, Hanau)

Biofuge 15R (Heraeus, Hanau)

Omnifuge2.0 RS (Heraeus, Hanau)

Kühlzentrifuge RC-5B (Sorvall Heraeus, Hanau)

2.2 Verbrauchsmaterial

- Dialyseschläuche, Porengröße 0,0025 µm (Pharmacia, Freiburg)
- Elektroporationsküvetten, 0,2 cm (Eurogentec, Seraing, Belgien)
- HiTrap Protein G affinity columns (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Mikrotiterplatten, 96 well (Nunc, Brand Products, Wiesbaden)
- Multiwell- Zellkulturplatten (Becton-Dickinson, Heidelberg)
- Plastikflaschen, 50ml und 260 ml (Nunc, Brand products, Wiesbaden)
- Plastikpipetten, 5ml und 10 ml (Costar, Bodenheim)
- 0,5-ml-, 1,5-ml- und 2,0ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht)
- 15ml-Röhrchen und 50 ml-Röhrchen, steril (Greiner, Nürtingen)
- Röntgenfilm Hyperfilm™-MP (Amersham, Braunschweig)
- Spritzen und Kanülen (Braun Melsungen AG, Melsungen)
- 15ml und 50ml Zentrifugengefäße (Falcon, Heidelberg)

2.3 Versuchstiere

Balb/c –Mäuse, weiblich, 6-8 Wochen alt (Charles River, Sulzfeld)

2.4 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme

von AppliChem, Heidelberg

Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)

X-Gal

von Bayer, Leverkusen

Ampicillin (Binotal®)

von Becton Dickinson, Heidelberg

Bacto-Trypton

Hefeextrakt

von Biochrom

Rekombinantes Humanes Interleukin-6

von Eurogentec, Seraing, Belgien

Smart-Ladder

von Life Technologies, Karlsruhe

LB Agar (Lennox L Agar)

LB Broth Base (Lennox L Broth Base)

DNA-Längenstandard (one-kb-ladder)

von Linaris, Bettingen

Antibody-Multiplier-Adjuvans-System

von NEB, Schwalbach

Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme

von Perkin Elmer, Weiterstadt

AmpliTaQ®

BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready-Reaction Kit

von Qiagen, Hilden

Qiagen Plasmid Midi/Maxi Kit

QIAprep Spin Miniprep Kit

QIAquick PCR Purification Kit

Nickel-NTA Agarose Beads

von Roche, Mannheim

ABTS (2,2Azino-di-3ethylbenzthiazolinsulfonat)

Lysozym

von Roth, Karlsruhe

Agarose NEE0

dNTPs, lyophilisiert

30%ige Acrylamid-Stammlösung

von Seromed

HAT und HT

RPMI-Medium 1640

Trypanblau

von Sigma, Deisenhofen

Antibiotika

Dimethylformamid (DMF)

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Paraffin-Mineralöl

Triton X

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

2.5 Puffer und Lösungen:

Dot-blot -Puffer

-Block-Puffer:

1xPBS

0,1% Tween-20

5% Magermilchpulver

-Wasch-Puffer:

1xPBS

0,1% Tween-20

ELISA-Puffer

-Coating-Puffer

0,2M Na₂CO₃

0,2M NaHCO₃, pH 9,6

-Lyse-Puffer

1,55M NH₄Cl

0,27M EDTA

0,1M KHCO₃

FPLC- Puffer

- Start-Puffer (FPLC)

20mM NaH₂PO₄, pH 7,4

- Neutralisations-Puffer (FPLC)

1M Tris-HCl, pH 9,0

- Elutions-Puffer (FPLC)

0,1M Glycin-HCL, pH 2,7

GEBS

20% Glycerin

50mM EDTA

0,05% Bromphenolblau

0,5% N-Lauroylsarkosin

Gradifrac-Lösungen:

-Starting-Puffer

20mM NaH₂PO₄, pH 7,4

-Elutionspuffer

0,1M Glycin-HCl, pH 2,7

Material und Methoden

-Neutralisation-Puffer

1M Tris-HCl, pH 9,0

Puffer für die Nickel-NTA –Säulen

-Lyse-Puffer (NiNTA Magnetic Agarose Beads)

50mM NaH₂PO₄

300mM NaCl

10mM Imidazol, pH 8,0

-Waschpuffer (NiNTA Magnetic Agarose Beads)

50mM NaH₂PO₄

300mM Natriumchlorid

20mM Imidazol, pH 8,0

-Elutions-Puffer (NiNTA Agarose Beads)

50mM NaH₂PO₄

300mM NaCl

250mM Imidazol, pH 8,0

PBS

10mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4

140 mM NaCl

oder

PBS Dulbecco ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (Biochrom, Berlin)

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Page), Puffer und Lösungen :

- 20% SDS (Sodiumdodecylsulfat)

- 30% Acrylamid-Stammlösung

- TEMED (Tetramethylethylendiamine)

- 10% APS (Ammoniumpersulfat)

Material und Methoden

-Lower Tris-Puffer:

90,85g Tris in 400ml Ampuwa (dH₂O) gelöst, pH mit konz. HCl auf 8,8 eingestellt, anschließend 10 ml 20% SDS dazugegeben, ad 500ml mit dH₂O aufgefüllt.

-Upper Tris-Puffer

30,3g Tris in 400 ml dH₂O gelöst, pH mit konz. HCl auf 6,8 eingestellt, anschließend 10ml 20% SDS dazugegeben und ad 500 ml mit dH₂O aufgefüllt.

-10x Elektrophorese-Puffer:

30,3g Tris

143,7g Glycin

5g SDS

in 1l dH₂O gelöst, 1:10 für den Gellauf verdünnt (1x Elektrophoresepuffer)

-1x Sample Solution

5% β-Mercaptoethanol

2% SDS

25% Glycerin 50% in Ampuwa

0,5M Tris-HCl, pH 6,8

Bromphenolblau (Spatelspitze)

-Coomassie Brilliant Blue

500ml Methanol

100ml 100%ige Essigsäure

2,75g Brillant Blue

ad 1l dH₂O

-Entfärbelösung

750ml 100%ige Essigsäure

1000ml Methanol

1000ml 100% Ethanol

ad 10l dH₂O

Material und Methoden

1x TAE

40mM Tris
20mM Essigsäure
1mM EDTA

1x TBE

100mM Tris-HCl
100mM Borsäure
2,5mM EDTA
pH 8.3

TE (10/1)

10mM Tris-HCl, pH 8,0
1mM EDTA, pH 8,0

Tris- Glycin- SDS (Elektroelution)

25mM Tris
192mM Glycin
0,025% SDS

Western-blot -Puffer

-Blot-Puffer (10x)

30g Tris
144g Glycin
ad 1l Aqua dest

-Blot-Puffer(1x)

100ml 10x Puffer
200ml Methanol
700ml Aqua dest

-Block-Puffer

1x PBS
0,1% Tween20
5% Magermilchpulver

-Waschpuffer

1xPBS

0,1% Tween20

-Ponceau S Lösung

20g Ponceau in 100ml Trichloressigsäure gelöst (Stammlösung), vor Gebrauch 1:50 in Aqua dest gelöst.

2.6 Bakterienstämme

2.6.1 *E.coli*

E.coli M15[pREP4] der Firma Qiagen

Nal^S, Str^S, Rif^S, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺

2.6.2 Neisserienstämme

N. meningitidis MC58

klinisches Isolat aus Großbritannien, 1985, von E. R. Moxon, Oxford

B:15:P1.7,16; ST-74 (ST-32-Komplex)

N. meningitidis 2120

eigenes klinisches Isolat aus Bayern, 1997 (Vogel et al., 1998)

C:NT:P1.5,2 ; ST-11

Isolate von gesunden Meningokokkenträgern wurden der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie entnommen (Claus *et al.*, 2002; Claus *et al.*, 2005).

2.7 Nährmedien

Luria-Broth-Medium (LB-Medium)

1% Bacto-Trypton

0,5 % Hefeextrakt

1% NaCl

pH 7,5

LB-Agar

LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar

SOB-Medium

2% Bacto-Trypton

0,5% Hefeextrakt

10mM NaCl

2,5mM KCl

SOC-Medium

SOB-Medium + 20mM Glucose

+10mM MgCl₂

+10mM MgSO₄

2.7.1 Zellkulturmedien-, und -zusätze

RPMI 1640-Medium (Seromed)

FCS (Biochrom)

Fetales Kälberserum

HAT-Medium (Seromed)

100µM Hypoxanthin

0,4µM Aminopterin

16µM Thymidin

HT-Medium (Seromed)

100µM Hypoxanthin

16µM Thymidin

2.8 Kulturbedingungen

Alle Inkubationen fanden bei 37 °C statt. Bei rekombinanten Bakterienstämmen wurden dem Medium die zur Selektion notwendigen Antibiotika zugesetzt.

2.8.1 Antibiotikazusätze

Bei Zusatz von Antibiotika wurden folgende Konzentrationen verwendet:

Ampicillin:100µg/ml für *E.coli*, Kanamycin:30µg/ml für *E.coli*.

2.9 Plasmide

pQE32 (Vektor zur Expression von mit HIS-Tag versehenen Fusionsproteinen der Firma Qiagen)

2.9.1 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide werden von Sigma-ARK Scientific, Darmstadt bezogen.

Primer für die Amplifizierung des 5' und 3'-Bereiches des ENase-Gens von *NmeDI* (AJ238948) in der PCR:

Primerpaar HW1 und HW2: AT 55, Extensionszeit 45 Sekunden

Primerpaar HW3 und HW4: AT 54, Extensionszeit 45 Sekunden

HW1 5'-GCGCGC**GGATCC**TGAGCGGACAAAACTGACG-3'

Position 1908-1927

HW2 5'-GCGCGC**GGATCC**CTCATATTCCTTCATTACGCC-3'

Position 2315-2335

HW3 5'-GCGCGC**GGATCC**ATGTCGTTATTTTCGGAAATCCC-3'

Position 2340-2361

HW4 5'-GCGCGC**GGATCC**CACATTTTTCCATAAAGCAGTC-3'

Position 2933-2954

GGATCC: BamHI- Schnittstelle

Diese Oligonukleotide führen am 3' Ende und am 5' Ende eine BamHI-Schnittstelle ein, über die die PCR-Fragmente in die BamHI-Schnittstelle des Expressionsvektors pQE-32 ligiert werden.

2.10 DNA-Methoden

2.10.1 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Für präparative Arbeiten und Sequenzierungen wurde eine Präparationsmethode verwendet, bei der die DNA über spezielle Silicagel-Anionenaustauschersäulen aufgereinigt wurde. Die Plasmidpräparation wurde nach Protokoll mit dem Qiagen Plasmid-Midi Kit durchgeführt.

2.10.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation kleinerer Mengen reiner DNA wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit verwendet. Das Prinzip beruht auf der Silicagel-Membran-Austauschertechnik.

2.10.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen und aus PCR-Ansätzen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Die Isolierung amplifizierter DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben.

2.10.3.1 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentrationen sowie der Reinheit von DNA-Lösungen wurden photometrische Messungen geeigneter Verdünnungen der Lösungen bei 260 und 280nm in 1-ml-Quarzküvetten durchgeführt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA 50 µg/ml, bei einzelsträngiger DNA 40 µg/ml und bei Oligonukleotiden 30 µg/ml.

2.10.4 Automatisierte DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch den Bereich Molekularbiologie des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie mit dem automatischen Sequenzierungsgerät "ABI Prism™ Sequencer 377" (Perkin Elmer) nach der Kettenabbruch- oder Didesoxy-Methode.

Sequenzieransatz

0,4µg Plasmid-DNA oder 0,1µg PCR-Produkt

5-10pmol Primer

2µl Sequenzier-Mix

ddH₂O ad 10 µl

Die Sequenzen wurden mit der Lasergene-Sequenzanalyse-Software (Dnastar, Madison, USA) analysiert. Sequenzvergleiche erfolgten mit der Clustal V-Methode des MegAlign-Programms.

2.11 Klonierungsmethoden

2.11.1 Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden in den vom Hersteller (NEB) beigefügten Puffern eingesetzt. Es wurden 1-2 Units Enzym pro μg DNA eingesetzt, um die DNA in einer Stunde zu schneiden.

2.11.2 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren

Zum Schutz vor inter- oder intramolekularen Reaktionen von linearisierten Vektoren in Ligationsansätzen wurden die 5'-Phosphatgruppen der Vektor-DNA mit Hilfe der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestine phosphatase = CIP) abgespalten, so daß nur noch Verknüpfungen zwischen dem Vektor mit einer Hydroxylgruppe am 3'-Ende und der zu klonierenden DNA mit einer Phosphatgruppe am 5'-Ende erfolgen können.

2.11.3 DNA-Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren erfolgte mit Hilfe der T4-DNA Ligase und unter Zusatz von ATP. Das Enzym katalysiert die Verknüpfung zwischen einer 3'-Hydroxyl- und einer 5'-Phosphatgruppe zu einer Phosphodiesterbindung.

2.12 Elektroporation von *E. coli*

Eine Methode zum Erzielen einer Transformation der unterschiedlichsten Zelltypen ist die Elektroporation (Böttger *et al.*, 1988). Die Transformations-effizienz bei der Elektroporation ist sehr hoch (bis $10 \text{ cfu}/\mu\text{g}$ DNA), weshalb sich diese Methode gut zur Transformation mit großen Plasmiden ($>10 \text{ kb}$) eignet.

2.13 Proteinchemische Methoden

2.13.1 Proteinexpression in E. coli

Die Expression des Proteins erfolgte mit dem QIAexpressionist™ –System der Firma Qiagen. Als Wirt diente der E. coli - Stamm M15, der das low copy Plasmid pREP4 enthält, auf dem der lac-Repressor kodiert ist. Die kodierte Sequenz des lac-Repressors steht unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promoters und wird dadurch permanent durch die Zelle exprimiert. Als Selektionsmarker kodiert dieses Plasmid eine Kanamycin-Resistenz. Der eigentliche Expressionsvektor ist pQE32, der den lac-Operator und als Selektionsmarker eine Ampicillin-Resistenz enthält. Die Induktion erfolgte mit IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid), das an den lac-Repressor bindet und diesen allosterisch hemmt. Der so gehemmte Repressor bindet nicht mehr an den Operator, sodaß das Protein transkribiert werden kann.

Procedere:

Zunächst wurde eine o/n -Kultur (10ml) des E.coli-Stammes M15[pREP4] in LB-Medium mit Ampicillin (100µg/ml) und Kanamycin (30µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Am darauffolgenden Tag wurde die optische Dichte (OD) bei 600 nm gemessen und eine 50 ml Kultur mit einer OD von 0,2 angeimpft. Diese Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt, bis die OD 0,5 betrug. Zur Kontrolle des IPTG-Induktionserfolges wurde vor der Zugabe von IPTG 1ml der Kultur (Probe1) entnommen, bei 11000g abzentrifugiert und das Pellet in 50µl 1x sample solution aufgenommen.

Nun wurde der Kultur IPTG mit einer Endkonzentration von 1mM zugefügt. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 4 Stunden. Nach erneuter OD-Bestimmung wurde der Kultur wieder 1ml entnommen (Probe 2), abzentrifugiert und die OD auf 0,5 eingestellt. Das Pellet wurde ebenfalls in 50µl 1x sample solution aufgenommen.

Die Kultur wurde 20 min bei 11000g und 4°C im SLA-Rotor abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 5ml 1xPBS resuspendiert und Lysozym mit einer Endkonzentration von 1mg/ml hinzugefügt.

Das Lysat wurde nun 30 min auf Eis inkubiert.

Anschliessend wurde das Lysat 3 x 30 Sekunden (sec) mit Ultraschall beschallt (Branson Sonifier, Cell Disrupter B15), wobei die Einstellungen output control 4-5 und duty cycle 40-50 betragen sollten. Nach jeder Beschallung wurde die Probe 1 min auf Eis inkubiert.

Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 30 min bei 4°C und 18000g im HB-6-Rotor. Der Überstand des nach der Induktion löslichen Proteins wurde abgenommen und in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt (Probe 3).

Das Pellet des nach der Induktion unlöslichen Proteins wurde in 5ml 1xPBS resuspendiert (Probe 4).

Von Probe 3 und 4 wurden je 5 µl entnommen und 5µl 2x sample solution hinzugefügt.

Zur Überprüfung der erfolgreichen IPTG-Induktion wurde ein 12,5 % SDS-Polyacrylamid-Gel der Proben 1-4 angefertigt und mit Coomassie -Blau gefärbt. Nachdem die Induktion erfolgreich war, wurde sie anschliessend in größerem Maßstab durchgeführt, da für die Immunisierung der Tiere eine größere Proteinmenge benötigt wurde (zu induzierende Menge von 1l).

2.13.2 Aufreinigung induzierter Proteine über Ni-NTA Agarose beads

Für die Aufreinigung des sich nach der Induktion im Überstand befindlichen 6xHis-tagged E.coli-Proteins wurden Nickel-NTA-Agarose-beads Säulen verwendet. Das Procedere wurde nach dem Protokoll „The QIAexpressionist“ der Firma Qiagen durchgeführt.

2.13.3 Aufreinigung des Proteins über Elektroelution aus präparativen SDS-Polyacrylamidgelen

Benötigte Materialien:

- Elutionspuffer
- Biotrap Elektrophoresekammer
- BT1 und BT2 –Membranen (mikroporöse Celluloseacetatfilter)

Die Aufreinigung eines Proteins erfolgt durch Elektroelution, wenn das Protein nach vorausgegangener Induktion und Beschallung nicht im Überstand vorhanden ist, sondern im Pellet. Die Induktion und Beschallung der Zellen

erfolgte wie oben beschrieben. Wir präparierten zunächst 20 SDS-Polyacrylamidgele, die mit einem präparativen Kamm versehen wurden. Jedes Gel wurde mit 200µl der aufgereinigten Proteinlösung bestückt. Es erfolgte eine Elektrophorese. Nach einer Färbung mit Coomassie Blau wurde die der Proteingröße entsprechende Bande ausgeschnitten und in circa 5mm große Stücke zerkleinert. Alle Gelstücke aus den 20 Gelen wurden gepoolt und in Elektroelutionspuffer gelegt.

Durchführung der Elution mittels der Biotrap Elektrophoresekammer:

Die gesamte Kammer wurde mit Elutionspuffer gefüllt. Die zurechtgeschnittenen Polyacrylamidstückchen wurden in den Raum zwischen 2 BT 2-Membranen eingefüllt, wobei die Gelstücke vollständig mit Elutionspuffer bedeckt sein müssen. Die Elektrophorese lief für ca. 4 Stunden bei 200V und dann über Nacht bei 100V. Die Probenentnahme aus der „Falle“ erfolgte vorsichtig mit Hilfe einer Glaspipette (Menge ca. 0,5ml).

Hiervon wurden nun 1,2 und 5 µl in 2x Sample Solution aufgenommen und auf ein 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, um den Erfolg der Elektroelution zu überprüfen. Parallel dazu führten wir auch hier zur Konzentrationsbestimmung verschiedene BSA-Konzentrationen mit.

2.13.4 Western-blot

Um einen Western-blot anzufertigen, wurde das SDS-Polyacrylamidgel nach dem Lauf auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran 1 Stunde in 1xPBS-0,1%Tween20 - 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur geblockt. Es erfolgte zunächst die Inkubation mit einem spezifischen Primärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschliessend erfolgte die Inkubation mit einem Sekundärantikörper (POX-anti-mouse IgG/M von Dianova) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Nitrocellulosemembran wurde luftblasenfrei auf eine Glasplatte aufgelegt und mit dem ECL-Detektionssystem der Firma Amersham für 1 Minuten entwickelt. Die Membran wurde mit Frischhaltefolie bedeckt und in der Dunkelkammer für mehrere Belichtungszeiten (zwischen 10 und 40

Sekunden) mit einem Hyperfilm bedeckt und schließlich in die Entwicklungsmaschine gegeben.

2.13.5 Dot-blot

Material:

- Lysate eines *NmeDI* positiven (#2120) und *NmeDI*-negativen (#2135) Meningokokkenstammes
- Primär-Antikörper: *NmeDI*-spezifischer monoklonaler Antikörper in 1xPBS - 0,1% Tween-20 - 1% Magermilchpulver
- Sekundär-Antikörper: Anti-Maus-Peroxidase (1:5000), verdünnt in Waschpuffer
- ECL- Detektionssystem
- Nitrocellulosemembran

Procedere:

Zunächst wurden die Suspensionen der benötigten Meningokokkenstämme hergestellt. Nach Messung der OD_{600nm} und Einstellung auf eine OD von 10 wurde die Bakteriensuspension in 1x Sample Solution aufgenommen. Je 10µl wurden auf die Nitrocellulosemembran getropft und getrocknet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran 1 Stunde in 1xPBS - 0,1% Tween-20 - 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur geblockt (Blockpuffer). Es erfolgte die Inkubation mit einem spezifischen Primärantikörper, der in 1x PBS - 0,1% Tween20 - 1% Magermilch verdünnt wurde. Die Inkubation erfolgte 1 Stunde bei Raumtemperatur. Bevor der Sekundärantikörper hinzugegeben wurde, wurde die Membran 3x mit Waschpuffer gewaschen.

Der Sekundärantikörper (POX-anti-mouse IgG/M von Dianova) wurde in 1x PBS- 0,1% Tween 20 verdünnt. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte zunächst wieder ein 3maliger Waschschrift. Die Nitrocellulosemembran wurde wie beim Western-blot luftblasenfrei auf eine Glasplatte aufgelegt und mit dem ECL-Detektionssystem der Firma Amersham für 1 Minuten entwickelt.

Die Membran wurde mit Frischhaltefolie bedeckt und in der Dunkelkammer für mehrere Belichtungszeiten (zwischen 10 und 40 Sekunden) mit einem Hyperfilm bedeckt und schließlich in die Entwicklungsmaschine gegeben.

2.14 Immunisierung der Mäuse und Fusion der Zellen

2.14.1 Immunisierung der Mäuse

Pro Protein wurden je zwei Mäuse im Zeitraum von 6 Wochen 7 mal immunisiert. Als Adjuvans wurde das Antibody-Multiplier-Adjuvans-System der Firma Linaris verwendet. Das ABM-System ist ein Immunisierungssystem auf der Basis von Trehalose-Dimycolat und 2% Öl (Squalene). Das jeweilige Antigen wurde mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml in die Emulsion eingebracht.

Die ersten fünf Immunisierungen wurden mit je 15µg intraperitoneal verabreicht (mit je einer Woche Abstand), die letzte Immunisierung erfolgte intravenös 2 Tage nach der letzten intraperitonealen Verabreichung (Abb. 1).

Tag 1	ip	
Tag 8	ip	
Tag 15	ip	
Tag 22	ip	
Tag 29	ip	→ Blutabnahme für Western Blot
Tag 36	iv	
Tag 39		Fusion von Milz-B-Zellen mit Myelomzellen

Abb. 1: Injektionsschema

2.14.2 Fusion der Zellen

Material:

- Milzzellen der Mäuse
- Myelomzellen X63-Ag8.653
- RPMI-Medium (warm und kalt)
- RPMI - 20%FCS - 1xHAT - 100Units/ml Interleukin-6
- Polyethylenglycol 1500 (50%)
- 10x Lyse-Puffer
 - 1,55M NH₄Cl
 - 2,7mM EDTA
 - 0,1M KHCO₃
- Trypanblau
- 70% Ethanol
- steriles Präparierbesteck
- Zählkammer
- Wasserbad
- 96well-Zellkulturplatten

Procedere:

Drei Tage nach der intravenösen Antigen-Injektion wurden die Mäuse durch CO₂ Inhalation getötet. Zunächst wurde den Mäusen Blut entnommen. Das Blut wurde 10 Minuten bei 18000g abgesert und dann weggefroren. Unter sterilen Bedingungen wurden die Mäuse splenektomiert.

Die Milzen wurden mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Sieb in eine Petrischale mit kaltem RPMI gerieben. Die Milzzellsuspension wurde in ein 50ml-Röhrchen überführt und 10 Minuten auf Eis gestellt. Die Organbestandteile sedimentierten ab, die Milzzellen verblieben im Überstand. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit kaltem RPMI auf 10 ml aufgefüllt. Die Milzzellsuspension wurde 10 Minuten bei 1800g und 4°C abzentrifugiert. Während des Zentrifugierens der Milzzellen wurden die Myelomzellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Der Überstand der abzentrifugierten

Material und Methoden

Milzzellen wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in 10ml RPMI resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt. Dazu wurden 50µl der Zellsuspension, 30µl RPMI und 20µl Lysepuffer benutzt. Nach 5 Minuten wurden 20µl dieser lysierten Zellen entnommen und 180µl Trypanblau hinzugefügt. Nachdem sowohl die Myelom- als auch die Milzzellen gezählt waren, wurden je 5×10^7 Zellen entnommen, zusammengefügt und mit RPMI auf 40 ml aufgefüllt. Nach vorsichtigem Mischen der Zellen wurden sie 10 Minuten bei 1800g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in warmes Wasser gehalten (Becherglas) und vorsichtig gegen den Rand des Becherglases geklopft, damit sich das Pellet etwas lockert. Um die Zellmembranen der jeweiligen Zellen permeabel zu machen, wurde nun 800µl Polyethylenglycol hinzugefügt. Die Zellen wurden ganz vorsichtig resuspendiert und 1 Minute bei 37°C stehen gelassen. Anschließend wurde innerhalb von 1 Minute 2x 1ml warmes RPMI den Zellen hinzugefügt, dann innerhalb der nächsten Minute 2x 4ml RPMI. Die Röhrchen wurden nun auf 10ml mit warmem RPMI aufgefüllt und 10 Minuten bei 1500g und 20°C abzentrifugiert.

Nachdem der Überstand abgesaugt worden war, wurde das Pellet in RPMI-20%FCS-HAT-IL6-Medium aufgenommen und resuspendiert. Das Gesamtvolumen betrug bei der eingesetzten Zellzahl (je 5×10^7 Zellen) 120 ml. Das Fusionsgemisch wurde auf 8 x 96-well-Platten mit 150µl/well verteilt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach circa 3-4 Tagen sollten die Myelomzellen abgestorben sein (aufgrund der Zugabe von HAT); nach circa 5 Tagen wurde das erste Hybridomwachstum erwartet.

Prinzip der Anwendung des HAT-Systems:

Bei der Fusion der Milzzellen und der Myelomzellen gehen nicht alle Myelomzellen in die Fusion ein. Daher mussten die nicht fusionierten Myelomzellen an ihrem weiteren Wachstum gehindert werden, da sie ansonsten in kürzester Zeit die gesamte Kultur überflutet hätten. Die Selektion dieser Zellen wurde mit Hilfe des Medienzusatzes HAT (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin) gesteuert. Für die dNTP-Synthese gibt es einen Haupt- und einen Reserveweg. Ein Defekt in einem der beiden Systeme ist für die Zelle

so lange nicht letal, wie der andere Weg zur Verfügung steht. Der Hauptstoffwechselweg wird allerdings durch Aminopterin vergiftet. Man bietet den Zellen die Vorstufen Hypoxanthin und Thymidin an, die sie für den Reserveweg benötigen.

Da nur die Myelomzellen im Reservestoffwechselweg eine Mutation in der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) haben, können die Myelomzellen den Reservestoffwechselweg nicht nutzen und somit keine dNTPs herstellen. Ihr Wachstum wird verhindert.

2.15 ELISA

Mittels ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) wurden die Überstände der Hybridomzellen auf die Produktion von spezifischen Antikörpern getestet. Zur Etablierung des ELISA wurden zunächst die aufgereinigten Proteine der Peptide HW 3/9 (N-Terminus) und HW 4/3 (C-Terminus) mit den verdünnten Zelllysaten der E.colis, die das rekombinante Protein exprimieren, verglichen. Der Vergleich zeigte, dass es keinen Unterschied macht, ob man aufgereinigtes Protein oder Lysate benutzt. Daher entschieden wir, für das Screening der Hybridomzellen die Lysate von HW 3/9 und HW 4/3 im ELISA einzusetzen. Diese Zelllysate wurden durch IPTG-Induktion (siehe oben) hergestellt.

Je 100µl wurden pro well in die ELISA-Platte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen und die Platte für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 200µl Blockierungslösung geblockt. Anschließend wurde die Platte 3x mit 100µl Waschpuffer gewaschen. Es erfolgte die Zugabe des 1. Antikörpers (je 25µl Überstände der Hybridomazellen) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Es erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschschrift mit Waschpuffer, bevor der 2. Antikörper (α -Maus-Peroxidase 1:4000 in 1xPBS - 1%BSA) für 1 Stunde bei Raumtemperatur hinzugefügt wurde.

Nachdem ein nochmaliger Waschschrift erfolgte, wurde pro well 100µl ABTS-Substratlösung hinzugefügt. Es erfolgte eine Farbreaktion, die bei 414nm im Photometer gemessen wurde.

2.16 Zellkultur

2.16.1 Expansion

Die Zellen der im ELISA als positiv getesteten Überstände wurden resuspendiert und in eine 24-well-Platte überführt. Es wurde 1ml RPMI-HT-II6-Medium hinzugefügt. Nach circa 10 Tagen wurden die Überstände getestet. Bei erneut positivem Signal wurden die Zellen in eine 12-well Platte überführt. Wenn die erneute ELISA-Testung nach einer weiteren Woche positiv war, erfolgte die Expansion in eine 6 well Platte und schließlich in eine 50ml Zellkulturflasche.

2.16.2 Klonierung und erneute Expansion

Zur Klonierung der Zellen der im ELISA positiv getesteten Überstände erfolgte zunächst eine Bestimmung der Zellzahl. Die Suspension wurde auf 2000 Zellen/ml mit RPMI verdünnt. 100µl der Suspension wurden mit 4ml RPMI-20%FCS-IL-6 vermischt (5 Zellen/100µl) und je 100µl pro well in die Reihen A und B der 96well-Platte gegeben. Die restlichen 1,6ml wurden mit 2,4ml Medium versetzt (2 Zellen/100µl) und je 100µl pro well in die Reihen C und D gegeben. Verbleibende 1,6ml wurden wieder mit 2,4ml Medium versetzt (0,8 Zellen/100µl) und je 100µl pro well in die Reihen E und F gegeben. Die letzten verbleibenden 1,6ml wurden nochmals mit 2,4ml Medium versetzt (0,32 Zellen/100µl) und je 100µl pro well in die Reihen G und H gegeben. Die Zellen wurden am 5. und am 12. Tag mit je 20µl Medium gefüttert. Das heisst, dass je 20µl Überstand der Zellen entnommen wurden (altes Medium) und durch 20µl frisches Medium ersetzt wurden. Nach jeweils einer Woche wurde den Zellen neues IL-6 zugeführt.

Die Zellkulturen wurden wöchentlich inspiziert. Nach circa 2 Wochen Wachstum wurden die Überstände im ELISA getestet. Die Zellen der als positiv getesteten Überstände wurden erneut expandiert und dann subkloniert (Procedere identisch zu Klonierung).

Bevor ein Klon als eindeutig monoklonal bezeichnet wurde, wurde dieser insgesamt 3x subkloniert. Nachdem die endgültigen monoklonalen Klone identifiziert waren, wurde von jedem dieser monoklonalen Antikörper je 1,5l

Überstand in Rollerflaschen produziert, um genügend Antikörpermenge zu erhalten. Die Aufreinigung erfolgte mittels FPLC.

2.16.3 Aufreinigung der monoklonalen Antikörper über Gradifrac

Die Säule wurde zunächst mit Starting-Puffer equilibriert. Anschliessend wurden die Antikörperüberstände auf die Säule aufgetragen.

Die Säule wurde mit Wasch-Puffer nachgespült, um das RPMI-Medium aus dem System zu entfernen.

Eluiert wurde der Antikörper durch Zugabe des sauren Elutionspuffers. Es wurden Portionen a 1ml aufgefangen, die anschliessend durch Zugabe von 50µl Neutralisations-Puffer neutralisiert wurden. Die Fraktionen, die Protein enthalten (peak im Photometer), wurden gepoolt. Es erfolgte eine Dialyse in 1xPBS, pH7,4 über Nacht bei 4°C.

Anschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung des Proteins bei OD280nm mit Hilfe des BCA - Protein Assay Reagent Kit der Firma Pierce.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung und Expression des Endonukleasegens von *NmeDI*

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen die Endonuklease des Meningokokken R-M-Systems *NmeDI* wurden der 5'- und 3'- Bereich des Endonukleasegens (ENase-Gen) des Stammes 2120 (Serogruppe C, ST-11) in den Expressionsvektor pQE-32 mit His-tag kloniert und das kodierte Protein exprimiert. Der N-terminale Bereich (Position 1-429 (429bp)) wurde mit den Oligonukleotiden HW1 und HW2, der C-terminale Bereich (Position 430-1056 (627bp)) mit den Oligonukleotiden HW3 und HW4 mittels PCR amplifiziert.

Daraus resultierten die Plasmide pHW 3/9 und pHW 4/3. Zur Überprüfung der korrekten Insertion der Expression wurde eine Sequenzkontrolle durchgeführt. Danach erfolgte die Induktion mit IPTG, die nach vier Stunden für beide Plasmide das optimale Signal zeigte. Nach der Induktion durch IPTG erfolgte die Prüfung der Löslichkeit der Proteine. Der exprimierte N-terminale Bereich der ENase (pHW 3/9) war im Überstand löslich, der exprimierte C-terminale Bereich der ENase (pHW 4/3) befand sich im Pellet (siehe Abb. 1 und 2). Da das Löslichkeitsverhalten die Methode der Aufreinigung des jeweiligen Proteins bestimmte, wurde der im Überstand gelöste N-terminale Bereich der ENase (pHW 3/9) aus einem Induktionsansatz von 200ml über Nickel-NTA-Agarose Beads aufgereinigt. Der exprimierte C-terminale Bereich der ENase (pHW 4/3) wurde mittels Elektroelution aus einem Induktionsansatz von 1,5 l und daraus resultierenden 40 präparativen SDS-Polyacrylamidgele aufgereinigt. Mittels einer Pierce-Proteinkonzentrationsbestimmung erhielten wir von dem Protein HW 3/9 eine Gesamtmenge von 3,6 mg, die Gesamtmenge des Proteins HW 4/3 betrug 2,1 mg.

Ergebnisse

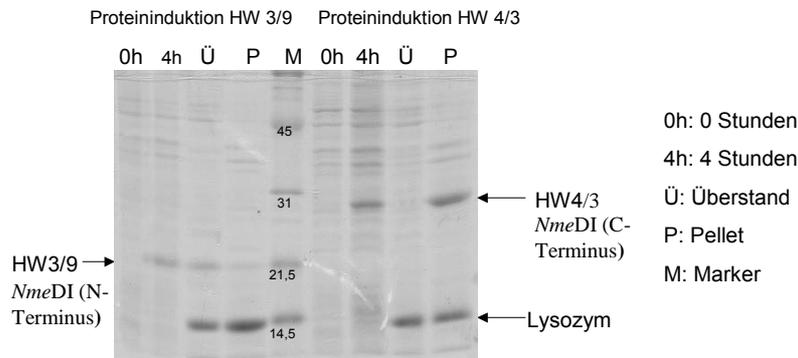


Abb. 1: Expression von *NmeDI*-Fragmenten

Zu sehen ist das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel der erfolgreichen Induktion der Proteine HW3/9 und HW4/3 mit IPTG nach 4 Stunden, verglichen zum Nullwert vor IPTG- Zugabe (0h).

HW3/9 befand sich nach Induktion im Überstand (Ü), HW4/3 befand sich nach Induktion im Pellet (P).

Die sowohl bei HW3/9 als auch bei HW4/3 auftretende 14kD-Bande stellt Lysozym dar.

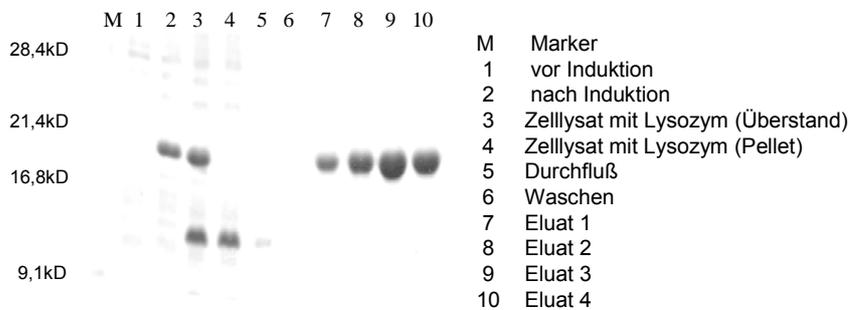


Abb.2: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE von HW3/9 nach Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose

Dargestellt ist das Peptid HW3/9 vor und nach der Induktion mit IPTG (1+2). HW3/9 war nach der Induktion im Überstand gelöst (3), im Pellet (4) war HW3/9 nicht zu sehen. Sowohl im Überstand als auch im Pellet ist Lysozym (14kD-Bande) zu erkennen. Desweiteren sieht man die Fraktionen der Aufreinigung von HW3/9 über die Ni-NTA-Agarose-Säulen (Eluate 1 bis 4). Durch die Aufreinigung konnte der Lysozym-Anteil entfernt werden.

Ergebnisse

3.2 Herstellung monoklonaler Antikörper

Nach erfolgreicher Immunisierungskontrolle mittels Western-Blot der Mäuseren nach der 5. intraperitonealen Injektion erfolgte eine Woche später die letzte und somit intravenöse Immunisierung der Mäuse. Weitere 3 Tage später erfolgte die Splenektomie und die Isolierung der Milzzellen für die Fusion mit den Myelomzellen.

Nach Isolierung der Milzzellen der Mäuse und Aufbereitung der Myelomzelllinie X63-Ag8.653 wurden die Zellen anhand des unten gezeigten Fusionschema fusioniert (Tab. 1).

Protein	Maus	Milz- zellen	Myelom- Zellen	Polyethylen- glycol	HAT- Medium	96well- Platten
HW 3/9	1	4×10^7	4×10^7	640 μ l	96 ml	7
HW 3/9	2	$2,8 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	448 μ l	67 ml	5
HW 4/3	3	2×10^7	2×10^7	320 μ l	48 ml	4
HW 4/3	4	$3,6 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$	576 μ l	86 ml	6

Tab. 1: Fusionschema der Milzzellen mit den Myelomzellen

Die Menge des zu verwendenden Polyethylenglycols und des HAT-Mediums richtete sich nach der Zellzahl der isolierten Milzzellen. Die Anzahl der Myelomzellen war äquivalent zu der Zahl der gewonnenen Milzzellen.

Das Fusionsgemisch wurde auf die entsprechende Anzahl von 96well-Platten mit je 150 μ l/well ausplattiert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach 4 Tagen waren die Myelomzellen aufgrund der HAT-Zugabe abgestorben. Am 5.Tag nach der Fusion wurde das erste Hybridomwachstum beobachtet.

3.3 Screening der Hybridomzellen

Mittels ELISA wurden die Überstände der Hybridomzellen auf die Produktion von spezifischen Antikörpern getestet. Zur Etablierung des ELISA wurden als Primärantikörper zunächst die Mausseren der splenektomierten Mäuse und als Sekundärantikörper ein Peroxidase-anti-Maus-AK in je einer Verdünnung von 1:4000 eingesetzt (siehe 2.16).

Nach Etablierung und Optimierung des ELISA wurden zwei Wochen nach Ausplattieren der fusionierten Zellen alle Zellkulturüberstände von 3/9 und 4/3 im ELISA getestet. Zum Ausschluß von Kreuzreaktivität wurde jeder Überstand sowohl mit dem 3/9,- als auch mit dem 4/3- E.coli-Zellysat getestet. Als positiv gewertet wurde der Überstand dann, wenn er mit dem eigenen, nicht aber mit dem jeweils anderen Zellysat reagierte.

Bei 3/9 waren 96 der 1152 Überstände positiv, das entspricht einem Prozentanteil von 8,33%. Bei 4/3 waren 37 von 963 Überständen positiv, entsprechend einem Prozentanteil von 3,84%.

3.4 Expansion und Klonierung der Hybridomzellen

Die Zellen der positiv getesteten Überstände wurden resuspendiert und in 24-well-Platten überführt. Ab jetzt konnte dem Medium HT zugesetzt werden, da die unfusionierten Myelomzellen nach Zugabe von HAT bereits abgestorben waren und eine weitere Gabe von Aminopterin nicht nötig war.

Nach einer Woche Wachstum wurden die Überstände erneut im ELISA getestet. Bei den Überständen von 3/9 waren 24 der 96 Überstände positiv (25%), bei den Überständen von 4/3 waren es 28 von 37 (75%).

Die Zellen der positiv getesteten Überstände wurden jeweils resuspendiert und dann in 12-well-Platten, später in 6-well-Platten und schließlich in 50ml-Zellkulturflaschen überführt. Von je 2 der positiv getesteten Kulturen wurde ein Teil der Zellen entnommen und kloniert. Die Zellzahl wurde auf 2000/ml eingestellt und in mehreren Stufen verdünnt, so daß eine theoretische Zellzahl von 5 Zellen/100µl, 2 Zellen/100µl, 0,8 Zellen/100µl und 0,32 Zellen/100µl

Ergebnisse

vorlag. Die Klonierungen wurden wöchentlich auf Zellwachstum durchgemustert. Nach 2 Wochen erfolgte eine ELISA-Kontrolle der Überstände. Die Zellen der positiv getesteten Überstände wurden weiter kultiviert (siehe oben) und subkloniert (gleiches Schema wie Klonierung). Als monoklonal wurde der Antikörper nach der 3. Subklonierung bezeichnet (siehe Abb. 3).

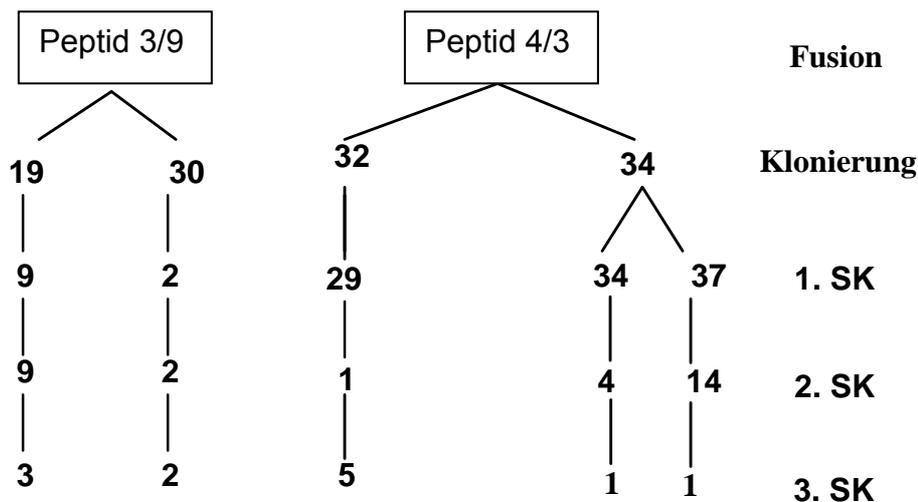


Abb.3: Klonierungsschema der Hybridomzellen

SK: Subklonierung
Zahlen: jeweilige Position des ELISA-positiven Überstandes auf der 96-well Platte

Ausgehend von der Fusion kam es zur Klonierung ausgewählter Zellen, deren Überstände im ELISA als positiv getestet wurden. Von 3/9 wurden die Zellen der Überstände 19 und 30, von 4/3 die Zellen der Überstände 32 und 34 kloniert.

Nach erfolgreicher Klonierung und erneuter positiver Testung der Überstände im ELISA wurden nun bei der Klonierung 3/9 die Zellen der Überstände 19-9 und 30-2 und bei der Klonierung 4/3 die Zellen der Überstände 32-29, 34-34 und 34-37 subkloniert.

Dieses Schema setzte sich bis zur 3.Subklonierung so fort.

3.4.1 ELISA-Ergebnisse

Die Überstände der Hybridomzellen wurden mittels ELISA auf die Produktion spezifischer Antikörper getestet. Nach Messung der Absorption im Photometer bei 414nm wurde entschieden, welche Überstände bzw. welche Zellen für eine weitere Subklonierung erfolgversprechend sein könnten. Diese wurden dann, wie in 2.17.1 und 2.17.2 beschrieben, expandiert und erneut kloniert.

In den folgenden Abbildungen 4 und 5 sind ELISA-Ergebnisse der 4/3 bzw. 3/9-Subklonierungen zu sehen.

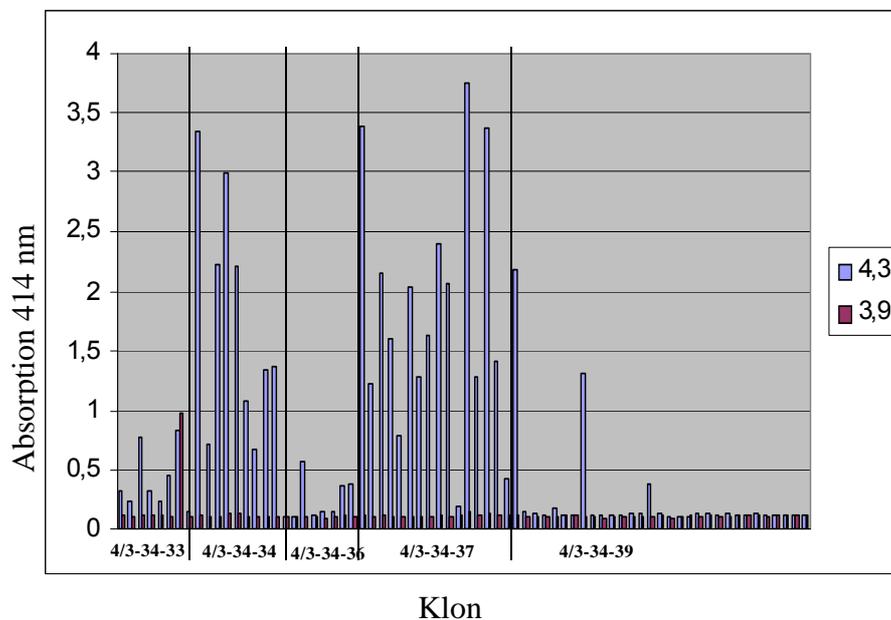


Abb 4: Beispiel eines ELISA-Ergebnisses nach der 1. Subklonierung von 4/3-34. Insgesamt erwiesen sich drei der fünf Subklone im ELISA als negativ. Es war zu erkennen, dass sowohl die 4/3-34-34 als auch 4/3-34-37-Subklone spezifisch reagierten. Bei der Beschichtung der Platte mit 3/9-Lysat erfolgte keine spezifische Bindung. Die Klone mit den besten ELISA-Ergebnissen wurden zur weiteren Subklonierung herangezogen. Ein spezifischer Cut-off wurde nicht definiert, allerdings lagen die als positiv getesteten Subklone immer mehr als 5fach so hoch wie die Werte der negativ getesteten Subklone.

Ergebnisse

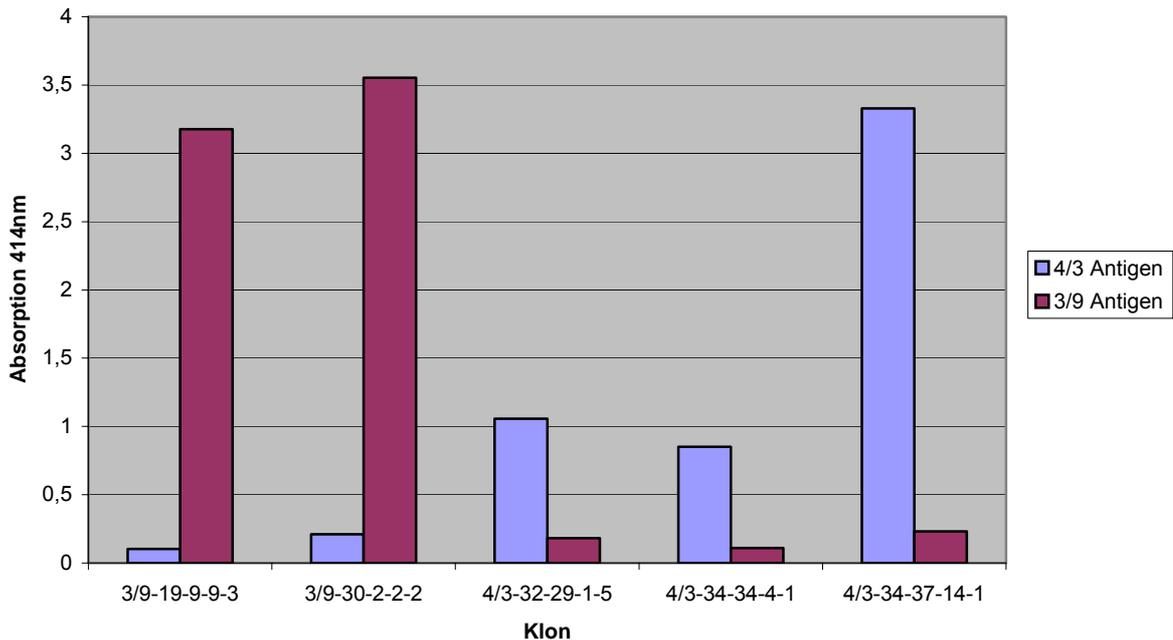


Abb.5: ELISA-Ergebnisse der Hybridoma- Klone nach der 3. Subklonierung
Bei Testung der monoklonalen Antikörper im ELISA sah man die Spezifität der Antikörper und den Ausschluß von Kreuzreaktivität.

3.5 Aufreinigung und Proteinbestimmung der Antikörper

Nach der 3. Subklonierung erfolgte nun die Expansion der Hybridomzellen in größerem Maßstab in Rollerflaschen. Pro AK wurden 1,5 l Überstand produziert, um genügend Material für den Einsatz in der Meningokokkendiagnostik zu haben. Die produzierten AK-Überstände wurden vor der weiteren Aufreinigung durch einen 0,2 µm-Sterilfilter gegeben.

Die Aufreinigung der Antikörper erfolgte mittels FPLC über eine Gradifrac-Säule (Pharmacia). Nach Equilibrierung der Säule wurde der Zellkulturüberstand auf die Säule gegeben und mittels Elutionspuffer eluiert. Die Fraktionen, die Protein enthalten (Peak im Photometer) wurden gepoolt und über Nacht gegen 1xPBS, pH 7,4 dialysiert. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgt mittels des BCA Protein Assay Reagent Kit der Firma Pierce.

Es konnten durchschnittlich 2,3mg Antikörper aufgereinigt werden (siehe Tab.2).

Ergebnisse

Tab. 2: Bezeichnung und Konzentrationsbestimmung der Antikörper

Alte Bezeichnung	Neue Bezeichnung	Proteinkonzentration (mg/ml)	Gesamtvolumen (ml)
3/9-19-9-9-3	mAK 3/9-1	2,6	550
3/9-30-2-2-2	mAK 3/9-2	2,26	800
4/3-32-29-1-5	mAK 4/3-1	2,1	650
4/3-34-34- 4-1	mAK 4/3-2	2,79	550
4/3-34-37-14-1	mAK 4/3-3	1,72	400

3.6 Testung des aufgereinigten Antikörpers 3/9-2 in ELISA, Western-Blot und Dot-Blot

Nach Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der Antikörper wurden diese sowohl im ELISA, als auch im Western-Blot und Dot-Blot getestet. Dazu wurden verschiedene *NmeDI*-positive und *NmeDI*-negative Meningokokkenstämme eingesetzt.

Im ELISA wurden der *NmeDI*-positive Stamm 2517 und der *NmeDI*-negative Stamm 2631 mit unterschiedlichen Methoden des Zellaufschlusses getestet. Aufgrund der Problematik, dass das durch den Antikörper zu erkennende Antigen cytosolisch vorliegt, wurden von unserer Arbeitsgruppe verschiedene Methoden des Zellaufschlusses durchgeführt, um so die Erkennung des Antigens zu ermöglichen (Abb. 6). Weder die Denaturierung der Zellen noch der Einsatz von Glutaraldehyd oder Methanol zum Zellaufschluss waren erfolgreich, sodass es uns nicht gelang, das Antigen detektieren zu können. Somit ist der Einsatz des mAK 3/9-2 im ELISA nicht geeignet.

Ergebnisse

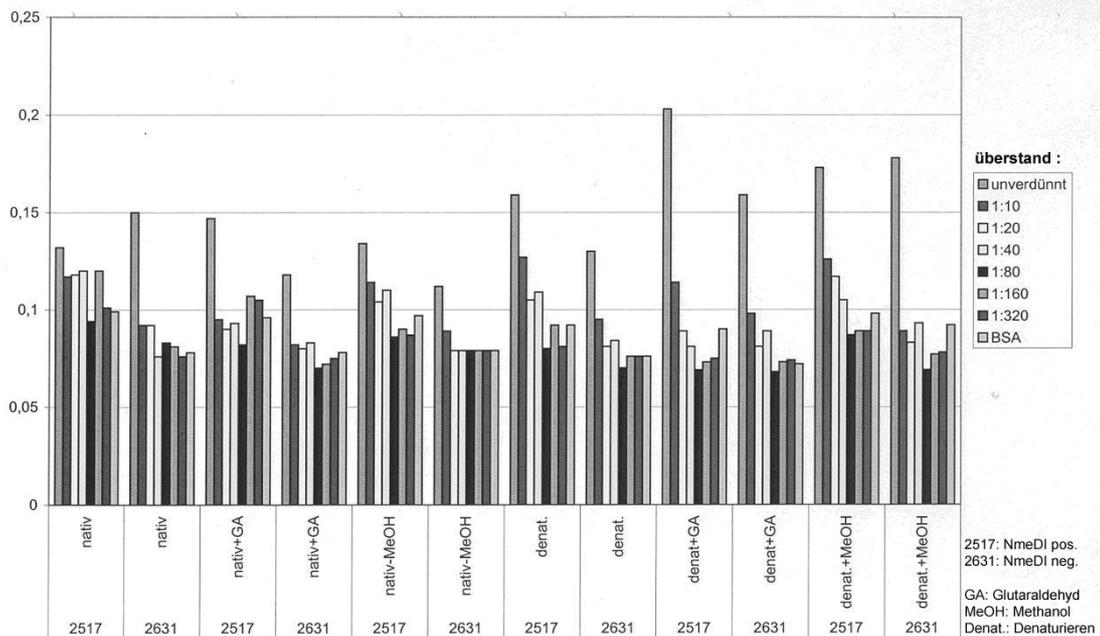


Abb. 6: ELISA mit dem *NmeDI*-positiven Stamm 2517 und dem *NmeDI*-negativen Stamm 2631 mit unterschiedlichen Methoden des Zellaufschlusses.

Weder die Denaturierung der Zellen noch der Einsatz von Glutaraldehyd oder Methanol zum Zellaufschluss verhalfen uns zur Erkennung des cytosolischen Antigen im ELISA.

Die aufgereinigten Antikörper wurden anschließend im Western-Blot und im Dot-Blot mit dem *NmeDI*-negativen Stamm 2135 (Serogruppe B, ST-32) und dem *NmeDI*-positiven Stamm 2120 (Serogruppe C, ST-11) getestet.

Im Western-Blot waren bei Benutzung des mAK 3/9-2 neben der ENase-spezifischen 40kD-Bande bei dem *NmeDI*-positiven Stamm 2120 zwei weitere Banden vorhanden, bei denen es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte handelte. Der *NmeDI*-negative Stamm 2135 reagierte mit dem mAb 3/9 nicht, was für die Spezifität des Antikörpers 3/9 spricht. Bei Anwendung von mAK 4/3 war neben der ENase-spezifischen 40kD-Bande bei dem *NmeDI*-positiven Stamm eine deutlich unspezifische Reaktion mit dem *NmeDI*-negativen Stamm 2135 zu sehen. Somit reagierte der mAK 4/3 nicht spezifisch (Abb. 7A).

Ergebnisse

Auf diese unspezifische Reaktivität sind vermutlich auch die Schwierigkeiten des Einsatzes von mAK 4/3 im Dot-Blot zurückzuführen (siehe unten). Eine auch bei dem mAK 3/9-2 vorhandene schwache kreuzreaktive Bande bei 20kD erwies sich hingegen für die weitere Anwendung im Dot-blot als unproblematisch.

Im Dot-blot reagieren der mAK 3/9 mit dem *NmeDI*-positiven Meningokokkenstamm 2120, nicht aber mit dem *NmeDI*-negativen Stamm 2135. Der mAK 4/3 reagierte auch im Dot-blot sowohl mit dem *NmeDI*-positiven als auch mit dem *NmeDI*-negativen Meningokokkenstamm und war somit unspezifisch.

Abb. 7A: Reaktivität von mAK 4/3-3 und 3/9-2 im Western-blot

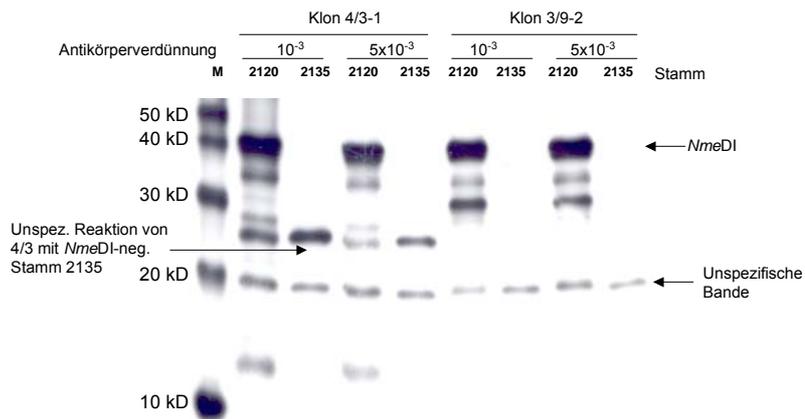


Abb. 7B: Reaktivität von mAb 4/3-3 und 3/9-2 im Dot-blot



Abb.7A +B: Western-Blot und Dot-Blot

Im Western-blot reagierte sowohl der mAK 3/9-2 als auch der mAK4/3-1 bei dem *NmeDI*-pos. Stamm 2120 (Serogruppe C, ST-11) spezifisch mit der 40kD-Bande der ENase. Bei beiden Stämmen war eine unspezifische Bande bei 20kD vorhanden. Zusätzlich reagierte der mAb 4/3-3 deutlich unspezifisch mit dem *NmeDI*-negativen Stamm 2135 (Serogruppe B, ST-32 Komplex), und ist somit für die Diagnostik nicht geeignet.

Beim Dot-Blot bestätigte sich das Western-blot Ergebnis. Der 3/9-1 Antikörper reagierte nur mit dem *NmeDI*-positiven Stamm 2120, nicht aber mit dem *NmeDI*-negativen Stamm 2135 und ist somit *NmeDI*-spezifisch. Alle 4/3-Antikörper hingegen reagierten sowohl mit dem *NmeDI*-positiven als auch mit dem *NmeDI*-negativen Stamm und waren daher *NmeDI*-unspezifisch. Somit bestätigt sich auch im Dot-Blot, dass die mAK 4/3 für die Diagnostik nicht geeignet sind.

3.7 Testung diverser Meningokokkenstämmen im Dot-Blot mit dem mAK 3/9-2

Aus den bisher erworbenen Daten aus Western-Blot und Dot-Blot ergab sich, dass der monoklonale Antikörper 3/9-2 im Gegensatz zu dem 4/3-mAK spezifisch mit den *NmeDI*-positiven Meningokokkenstämmen reagierte. Der Antikörper 3/9-2 wurde unter Verwendung von Isolaten der Bayerischen Meningokokkenträgersammlung validiert (Claus et al., 2003). Die 822 Isolate der Bayerischen Meningokokken sind vollständig durch MLST charakterisiert. Darüber hinaus liegt für jeden Stamm die Information vor, ob das *NmeDI*-R-Gen vorhanden ist.

Die von Claus et al. 2000 untersuchte MLST-Stammsammlung mit 103 pathogenen Isolaten zeigte eine Spezifität von *NmeDI* für ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken von 95%. Es handelt sich dabei um das *NmeDI*-R-Gen. Dieser Wert wurde mit der Bayerischen Meningokokkenstudie bestätigt. Von 822 Meningokokkenisolaten gehörten 10 Isolate zu den ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken, die in der DNA-DNA Hybridisierung alle *NmeDI*-positiv waren (Claus et al., 2000(a) Claus et al., 2002; Claus et al., 2005). Von den verbleibenden 812 Meningokokkenisolaten waren nur 5 (<1%) *NmeDI*-positiv, ohne zu den ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken zu gehören (4

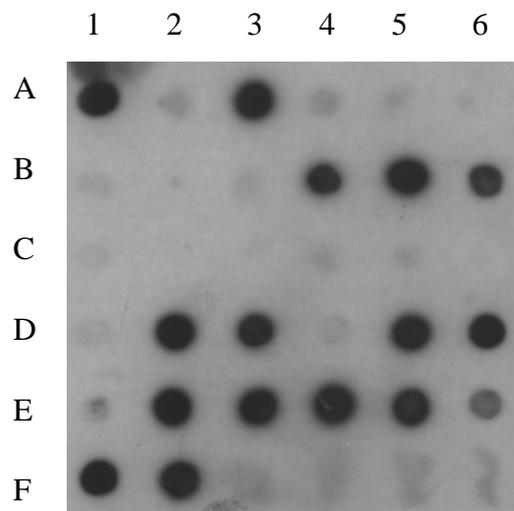
Ergebnisse

von 136 Isolaten gehörten zu den ST-44 Komplex Meningokokken, 1 Isolat zu den ST-914 Komplex Meningokokken)(Claus et al., 2003).

Es wurde gezeigt, dass fünfzehn ausgewählte *NmeDI*-positive Meningokokkenisolate der Bayerischen Stammsammlung mit dem mAK 3/9-2 im Dot-blot reagierten, während fünfzehn ausgewählte *NmeDI*-negative Isolate derselben Stammsammlung mit dem mAK 3/9-2 nicht reagierten.

Abb. 8: Validierung des mAK 3/9-2 im Dot-blot

Abb. 8A: Dot-blot von Meningokokken Lysaten mit mAK 3/9-2



Ergebnisse

Abb. 8B: Schema der im Dot-Blot getesteten *Neisseria meningitidis*-Stämme (*N.m.*)

	1	2	3	4	5	6
A	<i>N.m.</i> 2120 ST-11 Pos.kontr.	<i>N.m.</i> 2135 ST-74 Neg.kontr.	<i>N.m.</i> ST-11+ <i>NmeDIR+</i>			
B				<i>N.m.</i> ST-11+ <i>NmeDIR+</i>	<i>N.m.</i> ST-11+ <i>NmeDIR+</i>	<i>N.m.</i> ST-11+ <i>NmeDIR+</i>
C						
D		<i>N.m.</i> ST-11+ <i>NmeDIR+</i>	<i>N.m.</i> ST-11+ <i>NmeDIR+</i>	<i>N.l.</i>	<i>N.m.</i> ST-11+ <i>NmeDIR+</i>	<i>N.m.</i> ST-11+ <i>NmeDIR+</i>
E		<i>N.m.</i> ST-8+	<i>N.m.</i> ST-8+	<i>N.m.</i> ST-44+	<i>N.m.</i> ST-44+	<i>N.m.</i> ST-44+
F	<i>N.m.</i> ST-44+	<i>N.m.</i> ST-914+				

Abb. 8 A+B: Dot-blot von Meningokokken Lysaten mit mAK 3/9-2
 Testung repräsentativer Meningokokkenstämme der Bayerischen
 Trägerstudie. 10 der 822 Meningokokkenisolate gehörten den ST-11 und ST-8
 Komplex Meningokokken an. Die Spezifität von *NmeDI* für ST-11 und ST-8
 beträgt 95%.

4. Diskussion

4.1 Sensitivität und Spezifität des monoklonalen Antikörpers 3/9-2

Zur Identifikation der hypervirulenten Meningokokkenpopulationen ST-8 und ST-11 Komplex, die von besonderer Bedeutung für weltweite Serogruppe-C Erkrankungen sind, wurde ein monoklonaler Antikörper gegen die Endonuklease des R-M-Systems *NmeDI* erzeugt. Dieser stellt einen exzellenten epidemiologischen Marker dar, um in Meningokokkenpopulationen die ST-8 und ST-11 Komplexe zu identifizieren (Claus *et al.*, 2003).

Der Einsatzbereich eines mAK im Bereich von Diagnostik und Forschung hängt sowohl von der Sensitivität als auch von der Spezifität des Antikörpers ab. Die Sensitivität bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, mit der ein positiver Befund tatsächlich positiv getestet wird. Die Sensitivität eines Antikörpers steht in direktem Zusammenhang mit seiner Affinität. Die Spezifität eines z.B. in der Infektiologie verwendeten Antikörpers ist hingegen definiert als die Wahrscheinlichkeit, mit der ein diagnostisches Verfahren bei einem Nichtinfizierten negativ ausfällt. Bezüglich unseres mAK ist die Sensitivität zunächst nicht von Interesse, die Spezifität wurde wie folgt an diversen Stammsammlungen getestet.

Der Einsatz des *NmeDI*-spezifischen mAK 3/9-2 zur Identifikation der ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken erfolgte zunächst an Meningokokkenisolaten der diversen Stammsammlungen (Claus *et al.*, 2003). Die von Claus *et al.* 2000 untersuchte MLST-Stammsammlung mit 103 pathogenen Isolaten zeigte eine Spezifität von *NmeDI* für ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken von 95%. Diese wurde in der Bayerischen Meningokokkenstudie bestätigt. Von 822 Meningokokkenisolaten gehörten 10 Isolate zu den ST-8 und ST-11 Komplexen, die in der DNA-DNA Hybridisierung alle *NmeDI* positiv waren (Claus *et al.*, 2000 (a) und 2002). Aufgrund der niedrigen Anzahl von ST-8 und ST-11 Komplex positiven Stämmen war der positive Vorhersagewert ($\% \text{ positiver Vorhersagewert} = \text{Echt Positive} / (\text{Echt Positive} + \text{Falsch Positive})$) in der Bayerischen Meningokokkenstudie 67%. Der negative Vorhersagewert ($\% \text{ negativer Vorhersagewert} = \text{Echt Negative} / (\text{Echt Negative} + \text{Falsch Negative})$)

Diskussion

war 100% und die Spezifität 99,4% (Claus *et al.*, 2002). Desweiteren wurde gezeigt, dass fünfzehn ausgewählte *NmeDI*-positive Meningokokkenisolate der Bayerischen Stammsammlung mit dem mAK 3/9-2 im Dot-blot reagierten, während fünfzehn ausgewählte *NmeDI*-negative Isolate derselben Stammsammlung mit dem mAK 3/9-2 nicht reagierten. Der mAK 3/9-2 reagierte ebenfalls mit acht ausgewählten Stämmen der ST-8 Komplex Meningokokken und mit neun ausgewählten Stämmen der ST-11 Komplex Meningokokken, die zwischen 1967 und 2000 in verschiedenen Ländern isoliert wurden. Diese Untersuchungen bestätigten die Reaktivität von mAK 3/9-2 mit den *NmeDI*-positiven Stämmen (Claus *et al.*, 2003). Der *NmeDI*-spezifische mAK 3/9-2 reagierte ansonsten weder mit anderen Neisserienstämmen wie z.B. *N.animalis*, *N.canis*, *N.cinerea*, *N.elongata*, *N.gonorrhoeae*, *N.lactamica* noch mit anderen Bakterienspezies wie *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* (Claus *et al.*, 2003).

Diese Untersuchungen zeigen die Spezifität von mAK 3/9-2 für ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken. Der hohe negative prädiktive Wert von 100% ist somit auf den mAK 3/9-2 übertragbar.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in fortlaufenden Arbeiten zeigen, dass einige der getesteten *Staphylococcus aureus* Stämme auf den *NmeDI*-spezifischen mAK 3/9-2 positiv reagierten (Claus *et al.*, 2003). Diese Reaktion ist auf eine unspezifische Bindung des AK mit Protein A von Staphylokokken zurückzuführen, da diese *Staphylococcus aureus* Stämme auch mit Antikörpern gegen den humanen Komplementfaktor C3 und mit murinen mAK, die gegen die Kapsel der Serogruppe-B Meningokokken gerichtet sind, reagierten. Daher empfehlen wir zur Anwendung des mAK 3/9-2 in zukünftigen Studien zum Direktnachweis von ST-11 und ST-8 Meningokokken in klinischen Materialien die Elimination der Fc-Region des AK, da das Fc-Stück an Protein A bindet (Claus *et al.*, 2003). In der Testung des mAK 3/9-2 im ELISA mit einem *NmeDI*-positiven (Stamm 2517) und einem *NmeDI*-negativen C-Meningokokkenstamm (Stamm 2631) zeigte sich, dass das cytosolisch gelegene Antigen für unseren AK nicht frei zugänglich war. Das Meningokokkenprotein war im ELISA nicht detektierbar, obwohl das rekombinante Peptid, das in *Escherichia coli*

Diskussion

exprimiert wird, im ELISA detektierbar war. Wir vermuten, dass das Epitop in der korrekt gefalteten Proteinstruktur nicht zugänglich ist, und daher denaturierende Methoden nötig sind (Claus *et al.*, 2003). Allerdings gelang es uns nicht, durch denaturierende Vorbehandlung der Meningokokken eine Reaktivität im ELISA zu erzielen (siehe 3.6). Ein Grund dafür könnte eventuell eine zu geringe Sensitivität des ELISA sein.

Zur Bearbeitung bestimmter wissenschaftlicher Fragestellungen wäre ein Direktnachweis von ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken wünschenswert. So könnte man beispielsweise das ST-8 bzw. ST-11 Meningokokkenträgertum in Serogruppe C - vakzinierten Populationen untersuchen.

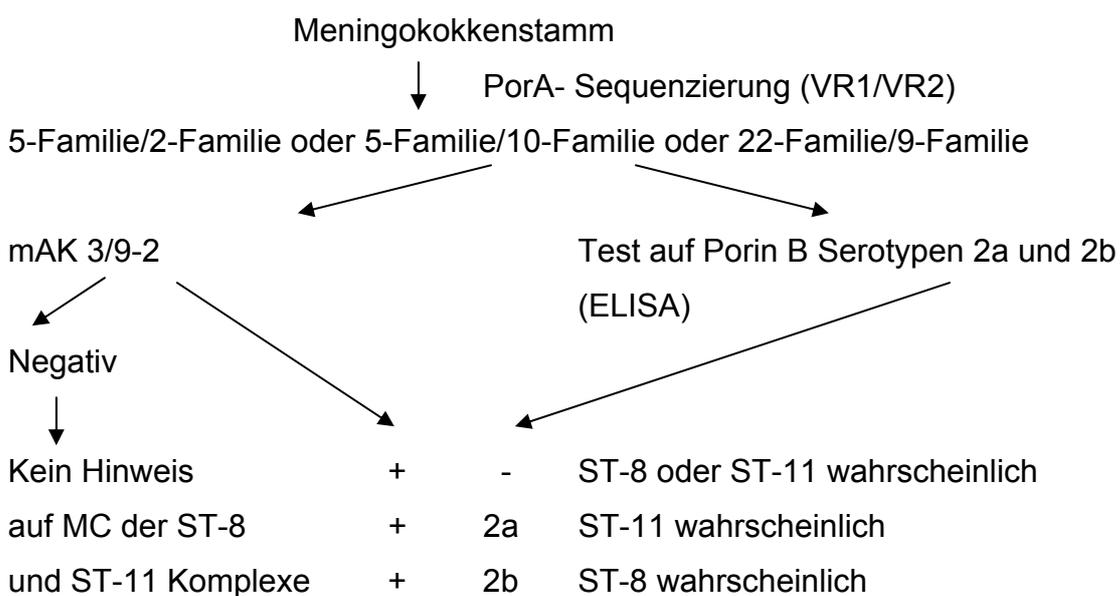
Für die Entwicklung eines Schnelltestes wäre zum Beispiel ein immunchromatographischer Test geeignet, wie er bereits zum Nachweis von *Plasmodium falciparum* und *Clostridium difficile* angewendet wird. Für dieses Testprinzip würde neben dem mAK 3/9-2, der den N-terminalen Bereich der ENase repräsentiert, noch ein zweiter mAK benötigt, der sich gegen den C-terminalen Bereich der ENase richtet. In der hier vorliegenden Arbeit wurde dieser AK bereits hergestellt und als 4/3 bezeichnet. Im ELISA nach der 1. Subklonierung erschien dieser AK spezifisch, wir sahen auch keine Kreuzreaktivität bei Testung mit dem Zelllysate 3/9 (siehe Abb.3.4). Leider stellte sich sowohl im Dot-Blot als auch im Western-Blot heraus, dass dieser mAK 4/3 nicht spezifisch war, da er sowohl mit dem *NmeDI*-positiven (Stamm 2120, Serogruppe C, St-11) als auch mit dem *NmeDI*-negativen (Stamm 2135, Serogruppe B, ST-32) Stamm reagierte. Neben der ENase-spezifischen 40kD-Bande bei dem *NmeDI*-positiven Stamm 2120 zeigte sich eine unspezifische Reaktion mit dem *NmeDI*-negativen Stamm 2135 (siehe 3.7). Gegebenenfalls ist also eine erneute Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen *NmeDI* notwendig, um eine höhere Sensitivität zu erreichen.

4.2 Anwendungsgebiete des *NmeDI* spezifischen mAK 3/9-2

Ein Einsatz des mAK 3/9-2 im Bereich der bakteriologischen Routinediagnostik ist nicht sinnvoll, da es sich um einen Antikörper zur Feintypisierung handelt, die in der Routinediagnostik nicht durchgeführt wird.

Empfohlen wird der Einsatz des *NmeDI*-spezifischen mAK 3/9-2 in Meningokokken-Referenzzentren. Hier kann der mAK im Dot-blot Verfahren als Bestätigungstest eingesetzt werden, wenn Meningokokkenstämme in der PorA-Typisierung variable Regionen (VR) aufweisen, die mit ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken assoziiert sind. Hierzu zählen folgende Kombinationen: 5-Familie/2-Familie, 5-Familie/10-Familie oder 22-Familie/9-Familie (<http://outbreak.ceid.ox.ac.uk/PorA-VR/vr1oder2.htm>). In diesem Fall wird am Nationalen Referenzzentrum für Meningokokken der getestete Stamm mit dem *NmeDI*-spezifischen mAK 3/9-2 in einem Dot-Blot detektiert. Man erhält so die Information, ob es sich um einen ST-8 oder ST-11 Komplex Stamm handelt, ohne eine kosten- und zeitintensive MLST durchführen zu müssen.

Abb. 9 zeigt den am Nationalen Referenzzentrum für Meningokokken (NRZM) verwendeten Algorithmus auf:



Diskussion

Der Einsatz des mAK 3/9-2 im Bereich der Forschung ist denkbar bei Trägerstudien zur gezielten Identifizierung von ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken bei Trägern, z.B. nach Vakzinierungskampagnen gegen die Serogruppe C. Von Ramsey et al. wurde eine Studie zur Wirksamkeit eines Serogruppe-C-Konjugatimpfstoffes bei Teenagern und Kleinkindern gezeigt (Übersicht in Ramsay *et al.*, 2001), der seit 1999 in Großbritannien zur systemischen Impfung von Kindern und Jugendlichen unter 18 Jahren eingesetzt wird. Die Wirksamkeit dieses Impfstoffes für Teenager lag bei 97% und für Kleinkinder bei 92%. Damit bestätigte sich die Überlegenheit des C-Konjugat-Impfstoffes gegenüber dem normalen C-Polysaccharid Impfstoff, der bei Kleinkindern aufgrund einer T-Zell-unabhängigen Immunantwort ineffektiv ist (Übersicht in Ramsay *et al.*, 2001). Die Einführung des C-Konjugat-Impfstoffes hatte eine signifikante Auswirkung auf die Epidemiologie der Meningokokken-Erkrankungen in Großbritannien. Im ersten Jahr wurden schätzungsweise 500 Krankheitsfälle und 50 Todesfälle verhindert (CDR Weekly, 2001; Frosch Uni-Med Science 2003). Die mit hohen Mortalitäts- und Morbiditätsraten einhergehende Erkrankung, die vor allem ST-11 Komplex assoziiert ist, unterstreichte die Impfeempfehlung mit einem solchen C-Konjugat-Impfstoff. Nach direktem Schutz der Geimpften zeichneten sich Hinweise für die Etablierung einer Herdimmunität in der nicht geimpften Bevölkerungsgruppe ab (Ramsay *et al.*, 2001). Die Elimination von C-Meningokokken unter geimpften Trägern unterbricht die Verbreitungskette in einer Population und führt zur Reduktion der Erkrankungsrate in der Bevölkerung unabhängig von deren Vakzinierungsstatus (Borrow *et al.*, 2000).

Eine weitere Einsatzmöglichkeit des mAK 3/9-2 für Forschungszwecke wäre die immunhistochemische Untersuchung von Tonsillengewebe zur Identifikation der ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken. Dazu wäre ein Schnelltest von Nativmaterial, wie Abstriche es Oropharynx, denkbar. Der dazu benötigte mAK müsste jedoch hochaffin sein. Ein besonderer Vorteil wäre, dass der Einsatz kulturunabhängig möglich wäre (Sim *et al.*, 2000).

Von R.J. Sim *et al.* wurde die Beziehung zwischen Trägertum von *Neisseria meningitidis* und Entwicklung einer invasiven Meningokokkenenerkrankung

untersucht, die nach wie vor nicht ganz verstanden ist. Sim *et al.*, verglich Abstriche des Nasopharynx von 32 Patienten im Alter von 2 bis 36 Jahren mit immunhistochemischen Untersuchungen der Tonsillen nach Tonsillektomie mittels eines mAK gegen PorA. Die Untersuchung legt nahe, dass die Besiedlung mit *Neisseria meningitidis* weit mehr verbreitet ist, als zuvor gedacht. Die Nasopharynxabstriche waren im Vergleich zu den immunhistochemischen Untersuchungen nach Tonsillektomie nur in einem Viertel der Fälle positiv. *Neisseria meningitidis* wurde bei 3 der 32 untersuchten Patienten durch die Nasopharynxabstriche diagnostiziert, was dem geschätzten Trägertum in der Bevölkerung von etwa 10% entspricht. Im Vergleich dazu waren in der PorA-Immunhistochemie 14 der 32 Patienten, also 45%, Träger von *Neisseria meningitidis* - Antigen. Diese Untersuchung lässt vermuten, dass das Trägertum in der Bevölkerung weit über 10% liegt. Ausserdem zeigte diese Untersuchung, dass *Neisseria meningitidis* sich bei 4 der 32 Patienten nicht auf der Oberfläche der Tonsillen aufhielt, sondern in der tiefer gelegenen Epithelzellschicht zu finden war, die durch Abstriche des Nasopharynx nicht erreichbar waren (Sim *et al.*, 2000). Es ist natürlich unklar, ob es sich bei diesen Antigennachweisen tatsächlich um einen Nachweis vermehrungsfähiger Meningokokken handelt. Bisher hat unsere Arbeitsgruppe noch keinen Hinweis auf die Möglichkeit der Verwendung der mAK zu Detektion von Meningokokken in Gewebeschnitten. Die Probleme des Nachweises mittels ELISA lassen die Anwendung des mAK 3/9-2 aufgrund der zu geringen Sensitivität eher unwahrscheinlich erscheinen.

4.3 Methodenvergleich

Herkömmliche serologische Typisierungsmethoden pathogener Mikroorganismen wie *Neisseria meningitidis* erlaubten in der Vergangenheit zwischen verschiedenen Laboren, in denen die Daten erhoben wurden, keinen zuverlässigen Datenvergleich. Um dieses Problem zu überwinden, wurde die Multilocus Sequenz Typisierung (MLST) zur DNA-Sequenz basierten Charakterisierung von Mikroorganismen entwickelt (Urwin and Maiden, 2003).

Diskussion

Die MLST basiert auf der Analyse der Allele verschiedener Stoffwechselgene. Es werden 400-500 bp lange interne DNA-Fragmente von sieben Stoffwechselgenen, die keiner Immunselektion unterliegen, untersucht (Maiden *et al.*, 1998). Typen-spezifische Sequenzunterschiede beruhen auf spontanen Mutationen oder horizontalem Gentransfer, die die Funktion der Bakterienzelle nicht negativ beeinflussen. So erhält man einen Einblick in die Populationsstruktur der bakteriellen Spezies (Maiden *et al.*, 1998). Bis heute wurden mittels MLST mehr als 3000 verschiedene Sequentypen von *Neisseria meningitidis* in mehr als 50 Ländern identifiziert (<http://bubmlst.org/neisseria>). Neben dem objektiven Vergleich der Daten ist mittels der MLST auch ein schneller globaler Vergleich von Daten via Internet möglich (<http://bubmlst.org/neisseria>). Vor allem im Hinblick auf die globale Epidemiologie von Infektionskrankheiten ist die MLST unerlässlich (Urwin and Maiden, 2003).

Vergleicht man die MLST und die Anwendung des mAk 3/9-2 bezüglich Kosten, Dauer, Arbeitsanfall und Genauigkeit, lässt sich folgendes feststellen:

Die MLST ist teurer und zeitaufwendiger als der Einsatz des mAk 3/9-2. Der zu untersuchende Stamm bedarf je einer PCR der 7 Stoffwechselgene mit anschließender Aufreinigung und Sequenzierung, das heisst 7 PCR-Reaktionen und 14 Sequenzreaktionen. 2 Arbeitstage bis zum Ergebnis sind als realistisch einzustufen, und auch nur dann, wenn in den ausführenden Laboren eine „high-throughput-facility“ und automatische Datenanalyse möglich ist. Die Genauigkeit der MLST ist allerdings bei 100% anzusetzen. Zudem werden ST-8 und ST-11 Meningokokken differenziert. Die Anwendung des mAK 3/9-2 ist kostengünstiger und innerhalb eines Arbeitstages gut zu bewältigen. Die Spezifität des mAK 3/9-2 für *NmeDI* liegt bei 95% und ist damit sehr genau (Claus *et al.*, 2003). Das Probenmaterial ist für die MLST leichter zu gewinnen. Die PCR kann direkt vom Transportmaterial, wie beispielsweise einem Tupfer, gemacht werden. Bei Anwendung des mAK im Dot-Blot ist dies nicht möglich, da Kulturmateriale vorliegen muss.

Diskussion

Tab. 3: Vergleich von MLST und mAK 3/9-2

	MLST	mAK 3/9-2 Dot-Blot
Dauer	> 2 Tage	1 Tag
Kosten	Hoch (Materialkosten ca.60 Euro)	Niedrig (Materialkosten < 10 Euro)
Kulturunabhängige Durchführung	Protokolle vorhanden (Kriz <i>et al.</i> ,2000)	Bisher nicht möglich
Diskriminierung	Alle Sequenztypen	Auf gemeinsame Erfassung der ST-8/ST-11 Komplexe beschränkt

4.4 Methodenkritik

Die Auswahl der Endonuklease des R-M-Systems *NmeDI* als Target für die Herstellung des mAK 3/9-2 beruhte auf folgenden Überlegungen: für Meningokokken wurden von unserer Arbeitsgruppe R-M-Systeme beschrieben, die als genetische Marker identifiziert wurden und spezifisch für verschiedene klonale Linien der Meningokokken sind (Claus *et al.*, 1999, 2000 (a) und 2001). Die Gene, die *NmeDI* kodieren, sind zwischen den Genen *pheS* und *pheT* inseriert, die die α - und β -Kette der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase kodieren. Der Locus in der Nähe der tRNA-Synthetase-Gene scheint ein bevorzugter Integrationsort für heterologe DNA-Fragmente der Meningokokken zu sein. Die *pheS/T*-Insertionen sind klonal stabil verteilt und die Insertionsvariabilität ist innerhalb klonaler Linien vermutlich gering. Dies könnte mit der Insertionsgröße und der dadurch reduzierten homologen Rekombinationsfrequenz über die flankierenden Gene *pheS* und *pheT* begründet sein. *NmeDI* kommt bei Meningokokken der klonalen Linien ST-8 und ST-11 Komplex vor. Unser mAK 3/9-2 richtet sich gegen die sequenzspezifische Endonuklease des R-M-

Diskussion

Systems *NmeDI* und somit gegen ein intrazelluläres Protein; dieses unterliegt keiner Immunselektion und ist epitopstabil. Dies wird zudem dadurch begünstigt, dass *NmeDI* nicht bei kommensalen Neisserien vorkommt und somit die Ausbildung eines Pools variabler Sequenzen von *NmeDI* wenig wahrscheinlich ist. Endonukleasen sind sehr heterogen und weisen nur eine geringgradige Verwandtschaft untereinander auf (Jeltsch et al., 1995). In den von uns durchgeführten Experimenten erwies sich der AK daher auch als spezifisch (Claus *et al.*, 2003).

Nachteile in der Benutzung des mAK 3/9-2 liegen darin, dass der AK nicht im routinegängigen ELISA angewendet werden kann, da wir mit den verwendeten Zellaufschlussmethoden das intrazelluläre Antigen nicht detektieren konnten (siehe 3.6 und 4.1). Zudem kann der Ak nicht zum Direktnachweis von ST-8 bzw. ST-11 Komplex Meningokokken eingesetzt werden, da sich eine Kreuzreaktivität mit Protein A diverser *Staphylococcus aureus*- Stämme herauskristallisiert hat, sodass vor Gebrauch des Ak die Fc-Region eliminiert werden muss, damit nur die Fab-Fragmente mit ihrer antigenbindenden Aktivität vorhanden sind (Claus *et al.*, 2003).

Fraglich ist der Einsatz unseres Ak auf histologischen Präparaten, wie es von Sim et al. zur Identifikation der ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken auf Tonsillengewebe durchgeführt wurde (Übersicht in Sim *et al.*, 2000). Hier stellt sich die Frage, ob der mAk 3/9-2 zum histologischen Nachweis der ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken sensitiv genug wäre.

Als Alternative zur Herstellung eines mAk nach konventioneller Methode wäre ein Phage-Display denkbar. Diese Methode erlaubt die Herstellung von Antikörpern hoher Spezifität und Affinität (Übersicht in Ohlin und Borrebaeck, 1996), und ist daher der konventionellen Methode der Herstellung monoklonaler Antikörper überlegen. Einen *NmeDI*-spezifischen mAk durch Phage-Display herzustellen, wäre bezüglich eines Schnelltestes zum Nachweis von ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken aufgrund der höheren Affinität in Erwägung zu ziehen. (http://www.immun.lth.se/TEXTER/MO/phage_display.html).

5. Zusammenfassung

Die Population der Meningokokken besteht aus einer heterogenen Mischung von Isolaten, die selten Erkrankungen hervorrufen und von Gruppen eng verwandter Stämme (klonale Linien), die zum Ausbruch der Erkrankung führen können. Diese klonalen Linien besitzen eine erhöhte Fähigkeit zur Verursachung der Erkrankung und werden daher als hypervirulente Linien bezeichnet (Maiden *et al.*, 1998). Klonale Linien kommen aber auch bei avirulenten Stämmen vor, was bedeutet, dass es viele Klone und klonale Linien gibt, aber nur wenige davon mit der Erkrankung assoziiert sind. Die beiden wichtigen hypervirulenten Meningokokkenlinien ST-8 und ST-11 Komplex sind von besonderer Bedeutung für weltweite Serogruppe-C Erkrankungen. Von Claus *et al.* wurde 2000 durch DNA-DNA-Hybridisierung gezeigt, dass das putative R-M-System *NmeDI* spezifisch für diese beiden Linien ist. Die untersuchte MLST-Stammsammlung wies eine Spezifität von *NmeDI* für die ST-8 und ST-11 Komplexe von 95% auf (Claus *et al.*, 2000). *NmeDI* stellt somit einen exzellenten epidemiologischen Marker zur Identifikation der ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken dar. Aufgrund dieser Ergebnisse kam unsere Arbeitsgruppe zu dem Entschluss, einen monoklonalen Antikörper gegen die Endonuklease des R-M-Systems *NmeDI* zu erzeugen, um ihn zur raschen Identifizierung von ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken in der Diagnostik des Nationalen Referenzzentrums für Meningokokken einzusetzen. Dazu wurden der 5'- und 3'- Bereich des Endonukleasegens des Stammes 2120 (Serogruppe C, ST-11) in den Expressionsvektor pQE-32 kloniert und das jeweilige kodierte Protein exprimiert. Die Herstellung der mAK erfolgte nach konventioneller Methode. Das jeweilige Protein wurde daher nach Aufbereitung und Konzentrationsbestimmung zur Immunisierung je zweier Mäuse verwendet. Nach mehrfacher Immunisierung der Tiere und Immunisierungskontrolle durch Western-Blot der Mausseren, wurden nach Splenektomie der Mäuse die Mausmilzzellen mit Myelomzellen fusioniert. Das Screening des Fusionserfolges wurde mittels ELISA durchgeführt. Zellen positiv getesteter Überstände wurden weiter kultiviert und kloniert, bis schliesslich nach der 3. Subklonierung je ein

Zusammenfassung

monoklonaler Antikörper vorlag. Die Bezeichnung des mAK des N-terminalen Bereiches lautet mAK3/9, die des mAK des C-terminalen Bereiches mAK4/3. Die mAK wurden dann sowohl im ELISA, als auch im Western-Blot und Dot-Blot an verschiedenen *NmeDI*-positiven und *NmeDI*-negativen Stämmen getestet. Aufgrund der Problematik, dass das durch den Antikörper zu erkennende Antigen cytosolisch vorliegt, konnte dieses im ELISA trotz verschiedener Zellaufschlussmethoden nicht detektiert werden. Im Western-blot und im Dot-Blot reagierte der mAK 3/9 *NmeDI*-spezifisch. Der mAK 4/3 erwies sich als *NmeDI*-unspezifisch, da er auch mit einem *NmeDI*-negativen Stamm reagierte. Der AK 3/9 wurde anschliessend unter Verwendung von Isolaten der Bayerischen Meningokokkenträgersammlung validiert (Claus *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass fünfzehn ausgewählte *NmeDI*-positive Meningokokken-isolate der Bayerischen Stammsammlung mit dem mAK 3/9 reagierten, derweil fünfzehn ausgewählte *NmeDI*-negative Isolate derselben Stammsammlung nicht mit dem mAK 3/9 reagierten. Der mAK 3/9 wird in der Diagnostik des Nationalen Referenzzentrums für Meningokokken am Institut für Hygiene und Mikrobiologie zur Identifikation der ST-8 und ST-11 Komplex Meningokokken nun routinemäßig eingesetzt.

6. Literaturverzeichnis

6.1 Bücher

Cartwright K. Meningococcal disease. John Wiley & Sons Ltd 1995

Frosch, Akute bakterielle Meningitis Uni-med SCIENCE 2003

6.2 Originalarbeiten

M. Achtman. Clonal spread of serogroup A meningococci: a paradigm for the analysis of microevolution in bacteria. *Mol.Microbiol.* 11 (1):15-22, 1994.

M. Achtman. Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*. *Trends Microbiol.* 3 (5):186-192, 1995.

M. Achtman. Microevolution and epidemic spread of serogroup A *Neisseria meningitidis*--a review. *Gene* 192 (1):135-140, 1997.

M. Achtman, K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule, and E. Carniel. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (24):14043-14048, 1999.

M. Achtman and S. Suerbaum. Sequence variation in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol.* 8 (2):57-58, 2000.

D. Alber, M. Oberkotter, S. Suerbaum, H. Claus, M. Frosch, and U. Vogel. Genetic diversity of *Neisseria lactamica* strains from epidemiologically defined carriers. *J.Clin.Microbiol.* 39 (5):1710-1715, 2001.

D. A. Ala'Aldeen, H. A. Davies, S. P. Borriello (1994). Vaccine potential of meningococcal FrpB: studies on surface exposure and functional attributes of common epitopes. *Vaccine* 12, 535- 541.

F. E. Ashton, J. A. Ryan, A. Borczyk, D. A. Caugant, L. Mancino, and D. Huang. Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis* serotype 2a that is associated with meningococcal group C disease in Canada. *J.Clin.Microbiol.* 29 (11):2489-2493, 1991(a).

F. E. Ashton, L. Mancino, A. J. Ryan, J. T. Poolman, H. Abdillahi, and W. D. Zollinger. Serotypes and subtypes of *Neisseria meningitidis* serogroup B strains associated with meningococcal disease in Canada, 1977-1989. *Can.J.Microbiol.* 37 (8):613-617, 1991(b).

- F. E. Ashton and D. A. Caugant.** The panmictic nature of *Neisseria meningitidis* serogroup B during a period of endemic disease in Canada. *Can.J.Microbiol.* 47 (4):283-289, 2001.
- S. Berrón, L. De La Fuente, E. Martin, J. A. Vázquez.** Increasing Incidence of Meningococcal Disease in Spain Associated with a New Variant of Serogroup C. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (1998) 17: 85-89-
- M. Beucher and P. F. Sparling.** Cloning, sequencing, and characterization of the gene encoding FrpB, a major iron-regulated, outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *J.Bacteriol.* 177 (8):2041-2049, 1995.
- J. R. Black, D. W. Dyer, M. K. Thompson, P. F. Sparling (1986).** Human immune response to iron-repressible outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 54, 710-13.
- E. C. Böttger,** Biogen Research Corporation. High-Efficiency Generation of Plasmid cDNA Libraries Using Electro-Transformation. *BioTechniques* Vol.6, No.9 (1988).
- R. Borrow, P. Richmond, E. B. Kaczmarek, A. Iverson, S. L. Martin, J. Findlow, M. Acuna, E. Longworth, R. O'Connor, J. Paul, and E. Miller.** Meningococcal serogroup C-specific IgG antibody responses and serum bactericidal titres in children following vaccination with a meningococcal A/C polysaccharide vaccine. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 28 (1):79-85, 2000.
- L. D. Bowler, Q. Y. Zhang, J. Y. Riou, and B. G. Spratt.** 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 (2):333-337, 1994.
- P. Brandtzaeg, R. Ovstebo, and P. Kierulf.** Bacteremia and compartmentalization of LPS in meningococcal disease. *Prog.Clin.Biol.Res.* 392:219-233, 1995.
- R. G. Bredius, C. A. Fijen, M. De Haas, E. J. Kuijper, R. S. Weening, J. G. Van de Winkel, and T. A. Out.** Role of neutrophil Fc gamma RIa (CD32) and Fc gamma RIIB (CD16) polymorphic forms in phagocytosis of human IgG1- and IgG3-opsonized bacteria and erythrocytes. *Immunology* 83 (4):624-630, 1994.

- R. G. Bredius, B. H. Derkx, C. A. Fijen, T. P. de Wit, M. De Haas, R. S. Weening, J. G. Van de Winkel, and T. A. Out.** Fc gamma receptor IIa (CD32) polymorphism in fulminant meningococcal septic shock in children. *J.Infect.Dis.* 170 (4):848-853, 1994.
- M. G. Bruce, N. E. Rosenstein, J. M. Capparella, K. A. Shutt, B. A. Perkins, and M. Collins.** Risk factors for meningococcal disease in college students. *JAMA* 286 (6):688-693, 2001.
- J. Brudzinski 1809.** Un signe nouveau sur les membres invérieures dans les méningites chez les enfants sigme de la nuque. *Arch. Méd. Enfant* 12 : 745-52.
- N. Cardenosa, A. Dominguez, A. Martinez, J. Alvarez, H. Panella, P. Godoy, S. Minguell, N. Camps, and J. A. Vazquez.** Meningococcal disease in catalonia 1 year after mass vaccination campaign with meningococcal group C polysaccharide vaccine. *Infection* 31 (6):392-397, 2003.
- K. A. Cartwright: Meningococcal carriage and disease.** In Cartwright, K. (Ed.), *Meningococcal disease*. John Wiley and Sons, Chichester, 1995, pp. 552-558.
- K. A. Cartwright, J. M. Stuart, D. M. Jones, and N. D. Noah.** The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol.Infect.* 99 (3):591-601, 1987.
- K. A. Cartwright, J. M. Stuart, and P. M. Robinson.** Meningococcal carriage in close contacts of cases. *Epidemiol.Infect.* 106 (1):133-141, 1991.
- D. A. Caugant, L. O. Froholm, K. Bovre, E. Holten, C. E. Frasch, L. F. Mocca, W. D. Zollinger, and R. K. Selander.** Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83 (13):4927-4931, 1986.
- D. A. Caugant, K. Bovre, P. Gaustad, K. Bryn, E. Holten, E. A. Hoiby, and L. O. Froholm.** Multilocus genotypes determined by enzyme electrophoresis of *Neisseria meningitidis* isolated from patients with systemic disease and from healthy carriers. *J.Gen.Microbiol.* 132 (Pt 3):641-652, 1986.
- D. A. Caugant, L. F. Mocca, C. E. Frasch, L. O. Froholm, W. D. Zollinger, and R. K. Selander.** Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in

relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J.Bacteriol.* 169 (6):2781-2792, 1987.

D. A. Caugant, W. D. Zollinger, L. F. Mocca, C. E. Frasch, T. S. Whittam, L. O. Froholm, and R. K. Selander. Genetic relationships and clonal population structure of serotype 2 strains of *Neisseria meningitidis*. *Infect.Immun.* 55 (6):1503-1512, 1987.

D. A. Caugant, L. O. Froholm, K. Bovre, E. Holten, C. E. Frasch, L. F. Mocca, W. D. Zollinger, and R. K. Selander. Intercontinental spread of *Neisseria meningitidis* clones of the ET-5 complex. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53 (6):389-394, 1987.

H. Claus, M. C. J. Maiden, D. J. Wilson, N. D. McCarthy, K. A. Jolly, R. Urwin, F. Hessler, M. Frosch, U. Vogel. Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J.Infect. Dis.*

H. Claus, A. Friedrich, M. Frosch, and U. Vogel. Differential distribution of novel restriction-modification systems in clonal lineages of *Neisseria meningitidis*. *J.Bacteriol.* 182 (5):1296-1303, 2000(a).

H. Claus, J. Stoevesandt, M. Frosch, and U. Vogel. Genetic isolation of meningococci of the electrophoretic type 37 complex. *J.Bacteriol.* 183 (8):2570-2575, 2000(b).

H. Claus, M. C. Maiden, R. Maag, M. Frosch, and U. Vogel. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology* 148 (Pt 6):1813-1819, 2002.

H. Claus, H. Weinand, M. Frosch, and U. Vogel. Identification of the hypervirulent lineages of *Neisseria meningitidis*, the ST-8 and ST-11 complexes, by using monoclonal antibodies specific to *NmeDI*. *J.Clin.Microbiol.* 41 (8):3873-3876, 2003.

P. G. Coen, K. Cartwright, and J. Stuart. Mathematical modelling of infection and disease due to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*. *Int.J.Epidemiol.* 29 (1):180-188, 2000.

M. Connolly and N. Noah. Is group C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993-6. European Meningitis Surveillance Group. *Epidemiol.Infect.* 122 (1):41-49, 1999.

- P. Costantino, S. Viti, A. Podda, M. A. Velmonte, L. Nencioni, and R. Rappuoli.** Development and phase 1 clinical testing of a conjugate vaccine against meningococcus A and C. *Vaccine* 10 (10):691-698, 1992.
- K. L. Davison, N. Andrews, J. M. White, M. E. Ramsay, N. S. Crowcroft, A. A. Rushdy, E. B. Kaczmarski, P. N. Monk, and J. M. Stuart.** Clusters of meningococcal disease in school and preschool settings in England and Wales: what is the risk? *Arch.Dis.Child* 89 (3):256-260, 2004.
- P. De Wals, M. Dionne, M. Douville-Fradet, N. Boulianne, J. Drapeau, and G. De Serres.** Impact of a mass immunization campaign against serogroup C meningococcus in the Province of Quebec, Canada. *Bull.World Health Organ* 74 (4):407-411, 1996.
- M. L. Durand, S. B. Calderwood, D. J. Weber, S. I. Miller, F. S. Southwick, V. S. Caviness, and M. N. Swartz. 1993.** Acute bacterial meningitis in adults: a review of 493 episodes. *N. Engl. J. Med.* 328:21-28.
- L. Erickson and P. De Wals.** Complications and sequelae of meningococcal disease in Quebec, Canada, 1990-1994. *Clin.Infect.Dis.* 26 (5):1159-1164, 1998.
- D. Falush, C. Kraft, N. S. Taylor, P. Correa, J. G. Fox, M. Achtman, and S. Suerbaum.** Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (26):15056-15061, 2001.
- E. J. Feil, M. C. Maiden, M. Achtman, and B. G. Spratt.** The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Mol.Biol.Evol.* 16 (11):1496-1502, 1999.
- J. E. Figueroa and P. Densen.** Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin.Microbiol.Rev.* 4 (3):359-395, 1991.
- C. E. Frasch,** Meningococcal Vaccines: Past, Present and Future. Meningococcal disease. Edited by Cartwright K., John Wiley and Sons Ltd. 1995.
- C. E. Frasch, W. D. Zollinger, and J. T. Poolman.** Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev.Infect.Dis.* 7 (4):504-510, 1985.

- M. Frosch, U. Edwards, K. Bousset, B. Krausse, and C. Weisgerber.** Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. *Mol.Microbiol.* 5 (5):1251-1263, 1991.
- R. Gold, I. Goldschneider, M. L. Lepow, T. F. Draper, and M. Randolph.** Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. *J.Infect.Dis.* 137 (2):112-121, 1978.
- E. C. Gotschlich, I. Goldschneider, and M. S. Artenstein.** Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *J.Exp.Med.* 129 (6):1367-1384, 1969.
- E. C. Gotschlich, C. Cornelissen, S. A. Hill & 9 other authors (1991).** The mechanism of genetic variation of gonococcal pili. Iron inducible proteins of *Neisseria*. A consensus.
- S. Greenfield, P. R. Sheehe, H. A. Feldman.** Meningococcal carriage in a population of "normal" families. *J. Infect. Dis.* 1971; 123:67-73
- K. Grimwood, P. Anderson, V. Anderson, L. Tan, and T. Nolan. 2000.** Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. *Arch. Dis. Child.* 83: 111-16.
- M. Guibourdenche, M. Y. Popoff, and J. Y. Riou.** Deoxyribonucleic acid relatedness among *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. cinerea* and "*Neisseria polysaccharea*". *Ann.Inst.Pasteur Microbiol.* 137B (2):177-185, 1986.
- L. H. Harrison, M. A. Pass, A. B. Mendelsohn, M. Egri, N. E. Rosenstein, A. Bustamante, J. Razeq, and J. C. Roche.** Invasive meningococcal disease in adolescents and young adults. *JAMA* 286 (6):694-699, 2001.
- A. M. Hauri, I. Ehrhard, U. Frank, J. Ammer, G. Fell, O. Hamouda, and L. Petersen.** Serogroup C meningococcal disease outbreak associated with discotheque attendance during carnival. *Epidemiol.Infect.* 124 (1):69-73, 2000.
- J. A. Hazelzet, R. de Groot, G. van Mierlo, K. F. Joosten, der van, V, A. Eerenberg, M. H. Suur, W. C. Hop, and C. E. Hack.** Complement activation in relation to capillary leakage in children with septic shock and purpura. *Infect.Immun.* 66 (11):5350-5356, 1998.

- P. W. Hermans, M. L. Hibberd, R. Booy, O. Daramola, J. A. Hazelzet, R. de Groot, M. Levin.** 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and outcome of meningococcal disease. Meningococcal Research Group. Lancet. 1999 Aug 14; 354 (9178): 556-60.
- M. L. Hibberd, M. Sumiya, J. A. Summerfield, R. Booy, M. Levin.** Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. Lancet. 1999 Mar 27; 353 (9158): 1049-53.
- M. M. Hobbs, A. Seiler, M. Achtman, and J. G. Cannon.** Microevolution within a clonal population of pathogenic bacteria: recombination, gene duplication and horizontal genetic exchange in the opa gene family of *Neisseria meningitidis*. Mol.Microbiol. 12 (2):171-180, 1994.
- G. M. Hoppes, C. Ellenbogen, and R. J. Gebhart.** Group Y meningococcal disease in United States Air Force recruits. Am.J.Med. 62 (5):661-666, 1977.
- L. A. Jackson, E. R. Alexander, C. A. DeBolt, et al.** Evaluation of the use of mass chemoprophylaxis during a school outbreak of enzyme type 5 serogroup B meningococcal disease. Pediatr. Infect. Dis. J. 1996; 15:992-8.
- J. Jelfs, R. Munro, F. E. Ashto, and D. A. Caugant.** Genetic characterization of a new variant within the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis* associated with outbreaks in various parts of the world. Epidemiol.Infect. 125 (2):285-298, 2000.
- J. Jelfs, R. Munro, E. Wedege, and D. A. Caugant.** Sequence variation in the porA gene of a clone of *Neisseria meningitidis* during epidemic spread. Clin.Diagn.Lab Immunol. 7 (3):390-395, 2000.
- A. Jeltsch, H. Maschke, U. Selent, C. Wenz, E. Kohler, B. A. Connolly, H. Thorogood, and A. Pingoud.** DNA binding specificity of the EcoRV restriction endonuclease is increased by Mg²⁺ binding to a metal ion binding site distinct from the catalytic center of the enzyme. Biochemistry 34 (18):6239-6246, 1995.
- H. J. Jennings, Apurba K. Bhattacharjee, David R. Bundle, C. Paul Kenny, Adele Martin, and Ian C. P. Smith.** Structures of the Capsular Polysaccharides of *Neisseria meningitidis* as Determined by ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. J.Infect.Dis. 136, 1977.

- K. A. Jolley, J. Kalmusova, E. J. Feil, S. Gupta, M. Musilek, P. Kriz, and M. C. Maiden.** Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. *J.Clin.Microbiol.* 38 (12):4492-4498, 2000.
- D. M. Jones, R. Borrow, A. J. Fox, S. Gray, K. A. Cartwright, and J. T. Poolman.** The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. *Microb.Pathog.* 13 (3):219-224, 1992.
- D. M. Jones and E. B. Kaczmarek.** Meningococcal infections in England and Wales: 1994. *Commun.Dis.Rep.CDR Rev.* 5 (9):R125-R130, 1995.
- C. M. Kahler and D. S. Stephens.** Genetic basis for biosynthesis, structure, and function of meningococcal lipooligosaccharide (endotoxin). *Crit Rev.Microbiol.* 24 (4):281-334, 1998.
- V. M. Kernig. 1882.** Über ein Krankheitssymptom der akuten Meningitis. *St. Petersburg Med. Wochenschr.* 7: 398.
- P. Kriz, J. Vlckova, and M. Bobak.** Targeted vaccination with meningococcal polysaccharide vaccine in one district of the Czech Republic. *Epidemiol.Infect.* 115 (3):411-418, 1995.
- P. Kriz, B. Kriz, E. Svandova, and M. Musilek.** Antimeningococcal herd immunity in the Czech Republic--influence of an emerging clone, *Neisseria meningitidis* ET-15/37. *Epidemiol.Infect.* 123 (2):193-200, 1999.
- P. Kriz, M. Musilek, A. Skoczynska, W. Hryniewicz.** Genetic and Antigenetic Characteristics of *Neisseria meningitidis* Strains Isolated in the Czech Republic in 1997-1998. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* (2000) 19: 452-459.
- P. Krizova and M. Musilek.** Changing epidemiology of meningococcal invasive disease in the Czech republic caused by new clone *Neisseria meningitidis* C:2a:P1.2(P1.5), ET-15/37. *Cent.Eur.J.Public Health* 3 (4):189-194, 1995.
- P. Krizova, M. Musilek, and J. Kalmusova.** Development of the epidemiological situation in invasive meningococcal disease in the Czech Republic caused by emerging *Neisseria meningitidis* clone ET-15/37. *Cent.Eur.J.Public Health* 5 (4):214-218, 1997.
- P. Kubes and P. A. Ward.** Leukocyte recruitment and the acute inflammatory response. *Brain Pathol.* 10 (1):127-135, 2000.

- B. Linz, M. Schenker, P. Zhu, and M. Achtman.** Frequent interspecific genetic exchange between commensal *Neisseriae* and *Neisseria meningitidis*. *Mol.Microbiol.* 36 (5):1049-1058, 2000.
- E. Loba-Jakubowska, J. Frasunkiewicz, and D. Chlebna-Sokol.** [Etiology and clinical course of meningitis in children]. *Przegl.Epidemiol.* 57 (4):613-618, 2003.
- R. Lujan, Q. Y. Zhang, J. A. Saez Nieto, D. M. Jones, and B. G. Spratt.** Penicillin-resistant isolates of *Neisseria lactamica* produce altered forms of penicillin-binding protein 2 that arose by interspecies horizontal gene transfer. *Antimicrob.Agents Chemother.* 35 (2):300-304, 1991.
- S. E. LURIA and M. L. HUMAN.** A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses. *J.Bacteriol.* 64 (4):557-569, 1952.
- M. C. Maiden, B. Malorny, and M. Achtman.** A global gene pool in the *neisseriae*. *Mol.Microbiol.* 21 (6):1297-1298, 1996.
- M. C. Maiden, J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 (6):3140-3145, 1998.
- J. Maynard-Smith, N. H. Smith, M. O'Rourke, and B. G. Spratt:** How clonal are bacteria? *J. Mol. Biol.* 114 (1993) 153-168.
- L. Masson and B. E. Holbein.** Role of lipid intermediate(s) in the synthesis of serogroup B *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide. *J.Bacteriol.* 161 (3):861-867, 1985.
- R. Milkman and M. M. Bridges.** Molecular evolution of the *Escherichia coli* chromosome. III. Clonal frames. *Genetics* 126 (3):505-517, 1990.
- P. S. Moore, J. Hierholzer, W. DeWitt, K. Gouan, D. Djore, T. Lippeveld, B. Plikaytis, and C. V. Broome.** Respiratory viruses and mycoplasma as cofactors for epidemic group A meningococcal meningitis. *JAMA* 264 (10):1271-1275, 1990.

- G. Morelli, B. Malorny, K. Muller, A. Seiler, J. F. Wang, J. del Valle, and M. Achtman.** Clonal descent and microevolution of *Neisseria meningitidis* during 30 years of epidemic spread. *Mol. Microbiol.* 25 (6):1047-1064, 1997.
- D. C. Morrison, J. L. Ryan.** Endotoxins and disease mechanisms. *Ann Rev. Med.* 1987; 38:417-432.
- D. M. Musher:** How Contagious Are Common Respiratory Tract Infections? *N. Engl. J. Med.* 2003, 348:1256-66.
- S. Nadel, M. J. Newport, R. Booy, M. Levin.** Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *J. Infect. Dis.* 1996 Oct.; 174 (4): 878-80.
- M. Ohlin, H. Owman, M. Mach, C. A. K. Borrbaeck (1996).** Characteristics of human antibody repertoires following active immune responses in vivo. *Mol. Immunol.* 33, 583-592.
- P. Olcén, J. Barr, and J. Kjellander.** Meningitis and bacteremia due to *Neisseria meningitidis*: clinical and laboratory findings in 69 cases from Orebro county, 1965 to 1977. *Scand. J. Infect. Dis.* 11 (2):111-119, 1979.
- A. Pettersson, B. Kuipers, M. Pelzer, E. Verhagen, R. H. Tiesjema, J. Tommassen & J. T. Poolman (1990).** Monoclonal antibodies against the 70-kilodalton iron-regulated protein of *Neisseria meningitidis* are bactericidal and strain specific. *Infect. Immun.* 58, 3036- 3041.
- H. W. Pfister, W. Feiden, and K. M. Einhäupl. 1993.** Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. *Arch. Neurol.* 505: 575-81.
- J. T. Poolman, P. A. van der Ley, J. Tomassen.** Surface Structures and Secreted Products of Meningococci. *Meningococcal disease.* Edited by Cartwright K., John Wiley and Sons Ltd. 1995
- A. J. Pollard, R. Galassini, Rouppe van der Voort EM, M. Hibberd, R. Booy, P. Langford, S. Nadel, C. Ison, J. S. Kroll, J. Poolman, and M. Levin.** Cellular immune responses to *Neisseria meningitidis* in children. *Infect. Immun.* 67 (5):2452-2463, 1999.
- M. E. Ramsay, N. Andrews, E.B. Kaczmarek, and E. Miller. 2001.** Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. *Lancet.* 357: 195-6.

- P. Richmond, D. Goldblatt, P. C. Fusco, J. D. Fusco, I. Heron, S. Clark, R. Borrow, and F. Michon.** Safety and immunogenicity of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C-tetanus toxoid conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine* 18 (7-8):641-646, 1999.
- L. Ringuette, M. Lorange, A. Ryan, F. Ashton:** Meningococcal Infections in the Province of Québec, Canada, during the period 1991 to 1992. *J. of Clin. Microbiol.*, Jan. 95, p 53-57.
- T. Ronne, L. Berthelsen, L.H. Buhl, I. Lind:** Comparative studies on pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* during a localized outbreak of serogroup C meningococcal disease. *Scand. J. Infect. Dis.* 1993; 25:331-9.
- N. E. Rosenstein, B. A. Perkins, D. S. Stephens, L. Lefkowitz, M. L. Cartter, R. Danila, P. Cieslak, K. A. Shutt, T. Popovic, A. Schuchat, L. H. Harrison, and A. L. Reingold.** The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992-1996. *J. Infect. Dis.* 180 (6):1894-1901, 1999.
- S. C. Ross and P. Densen.** Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine (Baltimore)* 63 (5):243-273, 1984.
- R. K. Selander, D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour and T. S. Whittam:** Population genetics of pathogenic bacteria. *Microb. Pathog.* 3 (1987) 1-7.
- R. J. Sim, M. M. Harrison, E. R. Moxon, C. M. Tang.** Underestimation in tonsillar tissue by nasopharyngeal swabbing. *The Lancet*, Vol 356, Nov. 11, 2000.
- M. Singer and P. Berg:** *Genes and Genomes.* University Science Books, Mill Valley, 1991.
- I. Smith, A.K. Lehmann, L. Lie, et al.** Outbreak of meningococcal disease in western Norway due to a new serogroup C variant of the ET-5 clone: effect of vaccination and selective carriage eradication. *Epidemiol. Infect.* 1999; 123: 373-82.
- R. Sparling and A. R. Bhatti:** *NmeI*, a restriction endonuclease from *Neisseria meningitidis*. *Microbios* 41 (1984) 73-79.

- E. Stackebrandt, R.G.E. Murray and H.G. Trüper:** Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38 (1988) 321-325.
- R. E. Stanwell-Smith, J. M. Stuart, A. O. Hughes, P. Robinson, M. B. Griffin, and K. Cartwright.** Smoking, the environment and meningococcal disease: a case control study. *Epidemiol.Infect.* 112 (2):315-328, 1994.
- N. Steven, M. Wood.** The clinical spectrum of meningococcal disease. In: *Meningococcal disease.* Edited by Cartwright K. John Wiley & Sons Ltd. 1995.
- J. M. Stuart, K. Cartwright, J. A. Dawson, J. Rickard, N. D. Noah.** Risk factors for meningococcal disease: a case control study in south west England. *Commun Med* 1988; 10: 139-146.
- J. M. Stuart, P. N. Monk, D. A. Lewis, C. Constantine, E. B. Kaczmarek, and K. A. Cartwright.** Management of clusters of meningococcal disease. PHIS Meningococcus Working Group and Public Health Medicine Environmental Group. *Commun.Dis.Rep.CDR Rev.* 7 (1):R3-R5, 1997.
- S. Suerbaum and Mark Achtman:** Population Genetics, *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, Edited by H. L. T. Mobley, G. L. Mendz, and S. L. Hazell. 2001 ASM Press, Washington, D. C.
- J. S. Swartley, A. A. Marfin, S. Edupuganti, L. J. Liu, P. Cieslak, B. Perkins, J. D. Wenger, and D. S. Stephens.** Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (1):271-276, 1997.
- E. A. Thompson, I. M. Feavers, and M. C. Maiden.** Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. *Microbiology* 149 (Pt 7):1849-1858, 2003.
- Ley P. van der, Biezen J. van der, and J. T. Poolman.** Construction of *Neisseria meningitidis* strains carrying multiple chromosomal copies of the porA gene for use in the production of a multivalent outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine* 13 (4):401-407, 1995.
- A. M. van Furth, J. J. Roord, and R. van Furth.** Roles of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathophysiology of bacterial meningitis and effect of adjunctive therapy. *Infect.Immun.* 64 (12):4883-4890, 1996.

- N. A. Vedros:** Development of meningococcal serogroups. In Vedros, N.A. (Ed.), Evolution of meningococcal disease. CRC Press, INC, Boca Raton, FL, 1987, pp. 33-38.
- M. Virji, K. Makepeace, I. R. Peak, D. J. Ferguson, and E. R. Moxon.** Pathogenic mechanisms of *Neisseria meningitidis*. Ann.N.Y.Acad.Sci. 797:273-276, 1996.
- U. Vogel, A. Weinberger, R. Frank, A. Muller, J. Kohl, J. P. Atkinson, and M. Frosch.** Complement factor C3 deposition and serum resistance in isogenic capsule and lipooligosaccharide sialic acid mutants of serogroup B *Neisseria meningitidis*. Infect.Immun. 65 (10):4022-4029, 1997.
- U. Vogel and M. Frosch.** Mechanisms of neisserial serum resistance. Mol.Microbiol. 32 (6):1133-1139, 1999.
- U. Vogel, H. Claus, M. Frosch, and D. A. Caugant.** Molecular basis for distinction of the ET-15 clone within the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. J.Clin.Microbiol. 38 (2):941-942, 2000(a).
- U. Vogel, H. Claus, and M. Frosch.** Rapid serogroup switching in *Neisseria meningitidis*. N.Engl.J.Med. 342 (3):219-220, 2000(b).
- U. Vogel and H. Claus.** Molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. Front Biosci. 8:e14-e22, 2003.
- U. Vogel, H. Claus, and M. Frosch.** Genetic lineages and their traits in *Neisseria meningitidis*. Int.J.Med.Microbiol. 294 (2-3):75-82, 2004.
- A. Waage, A. Halstensen, R. Shalaby, P. Brandtzaeg, P. Kierulf, and T. Espevik.** Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. J.Exp.Med. 170 (6):1859-1867, 1989.
- J. F. Wang, D. A. Caugant, X. Li, X. Hu, J. T. Poolman, B. A. Crowe, and M. Achtman.** Clonal and antigenic analysis of serogroup A *Neisseria meningitidis* with particular reference to epidemiological features of epidemic meningitis in the People's Republic of China. Infect.Immun. 60 (12):5267-5282, 1992.
- J. F. Wang, D. A. Caugant, G. Morelli, B. Koumare, and M. Achtman.** Antigenic and epidemiologic properties of the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. J.Infect.Dis. 167 (6):1320-1329, 1993.

G. G. Wilson and N. E. Murray. Restriction and modification systems. *Annu.Rev.Genet.* 25:585-627, 1991.

J. Zhou and B. G. Spratt. Sequence diversity within the *argF*, *fbp* and *recA* genes of natural isolates of *Neisseria meningitidis*: interspecies recombination within the *argF* gene. *Mol.Microbiol.* 6 (15):2135-2146, 1992.

P. Zhu, Ende A. van der, D. Falush, N. Brieske, G. Morelli, B. Linz, T. Popovic, I. G. Schuurman, R. A. Adegbola, K. Zurth, S. Gagneux, A. E. Platonov, J. Y. Riou, D. A. Caugant, P. Nicolas, and M. Achtman. Fit genotypes and escape variants of subgroup III *Neisseria meningitidis* during three pandemics of epidemic meningitis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (9):5234-5239, 2001.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp.	Ampicillin
Blot	Transfer von DNA oder Proteinen auf eine Membran
bp	Basenpaare
C	Celsius
cpm	Impulse (counts) pro Minute
cps	Kapselgenkomplex von <i>N. meningitidis</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Mischung der Desoxyribonukleintriphosphate dATP, dCTP, dGTP, dTTP
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ENase	Endonuklease
ET	Elektrophoretischer Typ
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (gravity)
h	Stunde
HAT	Hypoxanthin Aminopterin Thymidin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-1-thio β -D-Galaktosidase
kb	Kilobasenpaare
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium

Anhang

LPS	Lipopolysaccharid
μ	mikro
M	molar
mAK	monoklonaler Antikörper
MBL	Mannose-binding Lektin
MC	Meningokokken
MCC	Meningokokken-Serogruppe-C-Konjugat
Min	Minute
MLEE	Multilocus-Enzymelektrophorese
MLST	Multilocus-Sequenztypisierung
N.m.	<i>Neisseria meningitidis</i>
NmeDI	Putatives R-M-System
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
OMP	outer membrane protein
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
pH	neg. dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konz.
Primer	Oligonukleotid
RDA	Repräsentative Differenzanalyse
R-M-System	Restriktions-Modifikations-System
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylphosphat
sec	Sekunde
ST	Sequenztyp
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit(Enzymeinheit)

Anhang

UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
VR	Variable Region

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Ulrich Vogel für die Überlassung des interessanten Themas, die engagierte Betreuung der Arbeit und die wertvollen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Bei Prof. Dr. Matthias Frosch möchte ich mich bedanken, da er durch seine hervorragende Vorlesung meine Liebe zur Mikrobiologie reaktiviert hat und nur so die Idee einer mikrobiologischen Doktorarbeit zustande kam. Prof. Dr. Rethwilm danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Heike Claus, deren ständige Präsenz im Labor und unermüdliche Einsatzfreude diese Arbeit maßgeblich vorangetrieben haben. Herzlich bedanken möchte ich mich bei Gabi Heinze, die durch tatkräftige Unterstützung sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Nicht vergessen möchte ich Christian Konrad und Matthias Brandt, die mir in Sachen Computer sehr hilfreich zur Seite standen.

An dieser Stelle möchte ich es nicht versäumen, mich bei meinem Vater und Maria, Elwira und Anneliese und bei meinen Freunden zu bedanken, die mich durch das Studium und diese Arbeit stets begleitet haben und auch in weniger schönen Zeiten nicht aufgehört haben, mich zu unterstützen und zu ermutigen. Ganz lieben Dank!

Lebenslauf

Name: Hanne Weinand
Geburtsdatum: 06.04.1969
Geburtsort: Düren/ Nordrhein-Westfalen

Wohnort: Vierwindenhöhe 33
56170 Bendorf
Tel. 02622/ 907160
E-mail: HanneWeinand@web.de

Familienstand: ledig

Schulbesuch: 1976-1980: Katholische Grundschule Zülpich
1980-1986: Willi-Graf-Realschule Euskirchen
1989-1993: Städtisches Abendgymnasium für Berufstätige
der Stadt Würzburg (berufsbegleitend)
1993: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung: 1986-1988: Ausbildung zur staatlich anerkannten
Biologisch-technischen Assistentin (BTA)
Rheinische Akademie Köln,
Höhere Berufsfachschule für technische
Assistenten

Berufstätigkeit:
als BTA

1988-1991: Institut für Virologie und Immunologie der
Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. Volker ter Meulen
Arbeitsgruppe: Dr. Jonathon Sedgwick

1991-1993: Neurologische Universitätsklinik Würzburg,
Klinische Forschungsgruppe für Multiple
Sklerose
Direktor: Prof. Dr. Klaus Toyka

1994-1996: Lehrstuhl für Physiologische Chemie I,
Biozentrum der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. Manfred Scharl
Arbeitsgruppe: Dr. Christoph Winkler

1996-1998: Institut für Medizinische Strahlen- und
Zellforschung der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. Ulf Rapp
Arbeitsgruppe: Dr. Klaus-Dieter Fischer

Studium: 1998-2004: Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Examina: 8/2000: Ärztliche Vorprüfung
8/2001: 1.Ärztliche Prüfung
8/2003: 2.Ärztliche Prüfung
11/2004: 3.Ärztliche Prüfung und Erlangung der Approbation

Famulaturen: 3/2001: Innere Medizin ; Kreiskrankenhaus Kitzingen
Chefarzt: Dr. Peter Kneer
9/2001: Medizinische Mikrobiologie am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. Matthias Frosch
3/2002: Gemeinschaftspraxis Dres. Gatzemberger und Kollegen, Praxis für Anästhesie, Würzburg
8/2002: Gynäkologie und Geburtshilfe
Universitäts-Frauenklinik Würzburg
Direktor: Prof. Dr. Johannes Dietl

Praktisches Jahr: 10/2003 1.Tertial: Universitäts-Frauenklinik Würzburg
-9/2004 Direktor: Prof. Dr. Dietl
2.Tertial: Klinik für Innere Medizin der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. Ertl
3. Tertial: Zentrum für Operative Medizin der Universität Würzburg, Chirurgische Klinik
Direktor: Prof. Dr. Thiede

Dissertation: Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. Matthias Frosch
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Vogel

Thema: „Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen die Endonuklease *NmeDI* zur Typisierung von *Neisseria meningitidis*“
Publikation: H.Claus, H.Weinand, M.Frosch and U.Vogel. "Identification of the Hypervirulent Lineages of *Neisseria meningitidis*, the ST-8 and ST-11 Complexes, by Using Monoclonal Antibodies Specific to *NmeDI*". *Journal of Clinical Microbiology*, August 2003, p. 3873-3876

Berufstätigkeit :
als Ärztin

Seit 01.12.04:

Beginn der Facharztausbildung für
Gynäkologie und Geburtshilfe
Frauenklinik am Klinikum Kemperhof
Koblenz
Akademisches Lehrkrankenhaus der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Koblenzer Str. 115- 155
56073 Koblenz

Januar 2005