

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie  
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Vorkommen und Expression des *opcA* Gens in Meningokokkenstämmen  
von Erkrankten und asymptomatischen Trägern

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ralf Aumann

aus Potsdam

Würzburg, Januar 2018

**Referent: Prof. Dr. med. Ulrich Vogel**

**Koreferent/in: Prof. Dr. med. Martina Prelog, Prof. Dr. med. Carsten Scheller**

**Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 15. Januar 2018**

**Der Promovend ist Arzt.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Neisseria meningitidis . . . . .	1
1.1.1 Taxonomische Einordnung . . . . .	1
1.1.2 Typisierung von Meningokokken . . . . .	1
1.1.3 Genetische Variabilität . . . . .	2
1.1.4 Epidemiologie . . . . .	3
1.2 Das Opc-Protein . . . . .	4
1.3 Die untersuchten Stammsammlungen . . . . .	6
1.3.1 Invasive Stämme . . . . .	6
1.3.2 Trägerstämme . . . . .	6
1.4 Ziele dieser Arbeit . . . . .	6
<b>2 Materialien</b>	<b>8</b>
2.1 Geräte . . . . .	8
2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial . . . . .	9
<b>3 Methoden</b>	<b>14</b>
3.1 Bakterienkultivierung . . . . .	14
3.2 Polymerase-Chain-Reaction (PCR) . . . . .	14
3.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	15
3.4 Färben der SDS-Polyacrylamid-Gele . . . . .	15
3.5 Western Blot . . . . .	15
3.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) . . . . .	16
3.7 Proteinbestimmung . . . . .	16
3.8 Computer-Programme und statistische Auswertung . . . . .	16
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>18</b>
4.1 Charakterisierung der invasiven und Trägerstammsammlung . . . . .	18
4.2 Häufigkeit des opc-Gens . . . . .	21
4.3 Länge des Poly-C-Traktes im Promotor des opc-Gens bei opc-positiven Stämmen . . . . .	24
4.4 Opc-Expression bei opc-Gen positiven Stämmen . . . . .	26
4.4.1 Opc-Expression in Stämmen unterschiedlicher klonaler Komplexe	27
4.4.2 Vergleich invasive und Trägerstammkollektion . . . . .	29

4.5	Klinisches Bild bei opc-Gen positiven und negativen invasiven Stämmen .	31
4.5.1	Klinisches Bild und Letalität der durch die invasiven Stämme verursachten Infektionsfälle . . . . .	31
4.5.2	Zusammenhang opc-Gen, Opc-Expression und klinisches Bild . . .	32
4.5.3	Zusammenhang klonaler Komplex, Opc-Expression und klinisches Bild . . . . .	33
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>40</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>42</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 *Neisseria meningitidis*

### 1.1.1 Taxonomische Einordnung

*Neisseria meningitidis*, umgangssprachlich als Meningokokkus bezeichnet, gehört zu der Gattung *Neisseria* (Familie *Neisseriaceae*). Neisserien sind gramnegative Diplokokken. Die Spezies *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* sind für den Menschen pathogen, wobei es auch innerhalb der Spezies *Neisseria meningitidis* apathogene Kommensale gibt. Andere *Neisseria*-Arten wie zum Beispiel *N. lactamica*, *N. cinerea*, *N. mucosa* und *N. flavescens* imponieren ausschließlich als sogenannte Schleimhautkommensale im Nasopharynx und sind nur in sehr seltenen Fällen an Krankheiten beteiligt. Ihre medizinische Bedeutung besteht in der Fähigkeit, mit *N. meningitidis* oder *N. gonorrhoeae* genetisches Material über Transformation auszutauschen, was zur Erhöhung der Erregervariabilität führt (Bowler *et al.*, 1994). Meningokokken kommen ausschließlich beim Menschen vor. Circa 10 % der Bevölkerung sind symptomlose Meningokokkenträger. Dies wurde beispielsweise von Claus *et al.*, 2005 untersucht, die über Abstriche von 8000 Kindern und Jugendlichen in Bayern berichtete. Hierbei ergab sich eine ansteigende Trägerrate mit steigendem Alter der Probanden. In den ersten Lebensjahren betrug sie ca. 3%, um dann bis zum 15. – 19. Lebensjahr auf ihren höchsten Wert mit bis zu 35% anzusteigen (Cartwright *et al.*, 1987; Blackwell *et al.*, 1990; Caugant *et al.*, 1994; Stephens, 1999; Claus *et al.*, 2005). Von gesunden Trägern isolierte Meningokokken sind oft unkapselt (Claus *et al.*, 2002).

### 1.1.2 Typisierung von Meningokokken

In der äußeren Membran befindet sich eine Vielzahl von Proteinen (OMP = *outer membrane protein*). Anhand ihres Wanderungsverhaltens in der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Hauptaußenmembranproteine in fünf Klassen eingeteilt (Tsai *et al.*, 1981). Von Bedeutung sind dabei vor allem die Klassen 1, 2, 3 und 5. Die Proteine der Klassen 1 (Porin A), sowie 2 und 3 (Porin B) sind porenformende Transmembranproteine mit *Beta-Barrel*-Struktur, die dem Stoffaustausch durch die Membran hindurch dienen (Klebba, 2005). Sie wurden auf Grund ihrer antigenetischen Variabilität für die Typisierung und Einteilung der Meningokokken in Serotypen (Porin B) und Subserotypen (Porin A) verwendet (Maiden *et al.*, 1991; Frasch *et al.*, 1985). Zur Klasse 5 gehört neben den Opa-Proteinen das Opc-Protein (Achtman *et al.*, 1988), auf das im weiteren Verlauf der Arbeit noch näher eingegangen werden soll. Ein weiteres wichtiges Außenmembranprotein ist das Protein FetA. Es wird abhängig von der umgebenden

Eisenkonzentration (bei Eisenmangelzuständen) exprimiert und hat große Homologie zu einem Enterobactin-Rezeptor von *E. coli* (Ala'Aldeen *et al.*, 1990; van der Ley *et al.*, 1996; Carson *et al.*, 1999). Von Thompson *et al.*, 2003 wurde seine große genetische Variabilität festgestellt und die Möglichkeit zur Typisierung von Meningokokken auf der Basis von FetA ins Spiel gebracht. Ferner sind in der äußeren Membran Pili und Oberflächenadhäsine zu finden, die, genauso wie PorA, PorB und FetA einer sehr hohen Phasenvariation und Mutationsvielfalt unterliegen. Die Pili sind retraktile Typ-IV-Pili, die die „*twitching motility*“ der Erreger, sowie die initiale Verankerung an der Wirtszelle sicherstellen (Mattick, 2002; Källström, *et al.*, 1998), haben im Rahmen der Typisierung von Meningokokken jedoch keine Bedeutung. Die hochvariablen Opa- beziehungsweise Opc-Proteine vermitteln den direkten Kontakt der Meningokokken mit der Wirtszelle durch Bindung an bestimmte Rezeptoren auf deren Oberfläche und bereiten die Zellinvasion vor (Virji *et al.*, 1992; Vries *et al.*, 1998).

Meningokokken sind von einer Polysaccharidkapsel umgeben, die sie vor Phagozytose durch Abwehrzellen des Wirtes und vor Zerstörung durch Komplement schützt (Vogel *et al.*, 1997). Die chemische Zusammensetzung der Polysaccharide bestimmt die Serogruppe der Meningokokken. Insgesamt unterscheidet man 12 verschiedene Serogruppen: A, B, C, E, H, I, K, L, W, X, Y und Z (Abdillahi *et al.*, 1987; Vedros, 1987). Die weltweit am häufigsten bei Patienten mit invasiven Infektionen isolierten Serogruppen sind A, B, C, W, X und Y, die zusammen 90% aller invasiven Infektionen verursachen (Rosenstein *et al.*, 2001). Zusätzlich zu den Serogruppen untersucht man durch DNA-Sequenzierung der kodierenden Gene die weiteren subkapsulären Antigene PorA und FetA und kann so eine Feintypisierung vornehmen (Jolley *et al.*, 2007). Durch die Multilokus-Sequenztypisierung MLST erfolgt eine Charakterisierung der Stämme auf Genotyp-Basis (Maiden *et al.*, 1998). Dabei werden circa 450 bp lange interne DNA-Abschnitte von sieben Stoffwechselgenen sequenziert und ihnen Allelnummern zugeordnet. Das Allelprofil der sieben Gene wird einem Sequenztyp (ST) zugeordnet. Sequenztypen, die insgesamt vier oder mehr Allele miteinander teilen, werden zu einem klonalen Komplex (cc) zusammengefasst (Maiden *et al.*, 1998).

Zusammenfassend lassen sich Meningokokken nach folgenden Merkmalen typisieren (Jolley *et al.*, 2007): Die Serogruppe ergibt sich aus der Polysaccharid-Kapsel, der Feintyp aus der Genotypisierung der Außenmembranproteine PorA und FetA. Der Sequenztyp bzw. der klonale Komplex ist ein Ergebnis der MLST. Jolley *et al.*, 2007 schlagen für die Typisierung der Meningokokkenstämme eine Nomenklatur nach folgendem Schema vor: Serogruppe: PorA Typ: FetA Typ: Sequenztyp (klonaler Komplex), zum Beispiel: B: P1.19,15: F5-1: ST-33 (cc32). Dieses Schema kann mittlerweile durch die „*next generation sequencing*“ - Methode auf beliebig viele Loci erweitert werden (Jolley *et al.*, 2013; Harrison *et al.*, 2013).

### 1.1.3 Genetische Variabilität

Die Spezies *Neisseria meningitidis* zeichnet sich durch eine hohe genetische Variabilität aus. Diese hilft den Bakterien nicht nur, sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen, sondern sie unterstützt sie auch bei der Abwehr des menschlichen Im-

munsystems und der Ausbildung der Antibiotikaresistenz. Die genetische Variabilität wird durch die verschiedensten Mechanismen gewährleistet. Ein Mechanismus besteht in dem horizontalen Gentransfer durch Transformation. Hierbei können unterschiedliche Meningokokken-Stämme DNA miteinander austauschen; diese Fähigkeit wird als natürliche Kompetenz bezeichnet (Maiden *et al.*, 1996). Neben Mosaikgenen, die aus eigener und Fremd-DNA bestehen, ist auch ein Austausch von kompletten Genen oder ganzen Gen-Gruppen möglich (Lujan *et al.*, 1991; Bowler *et al.*, 1994). So zeigten Swartley *et al.*, 1997, beispielsweise, dass es durch horizontalen Gentransfer zu einem Austausch des Kapsel definierenden Gens und damit zu einem Wechsel der Serogruppe kommen kann. Voraussetzung für die Transformation sind bestimmte DNA-Sequenzen (DUS = *DNA uptake sequences*), deren spezifische Erkennung durch ein Typ IV Pilin vermittelt wird (Cehovin *et al.*, 2013).

Zu weiteren Mechanismen, die für Mikroevolution sorgen, zählen Punktmutationen, Deletionen, Insertionen und Translokationen von Genen innerhalb des Genoms (Bai *et al.*, 2010). Hier soll vor allem auf die Phasenvariation durch die variable Anzahl von Nukleotid-Wiederholungen, die sowohl in kodierenden, als auch in nicht-kodierenden Regionen des Genoms durch "*slipped strand mispairing*" vorkommen können, eingegangen werden. Hierbei entscheidet eine bestimmte Anzahl von Nukleotid-Wiederholungen darüber, ob das Protein exprimiert wird oder nicht, wenn die Phasenvariation innerhalb eines Gens stattfindet, oder in welcher Stärke das Gen exprimiert wird, wenn die Phasenvariation im Promotor stattfindet (Saunders *et al.*, 2000). Dieser Mechanismus ist nicht nur für das Opc-Protein (Sarkari *et al.*, 1994), sondern auch für die Variation der Pilin-Glykosylierung (Power *et al.*, 2003), die Variation des PorA-Proteins (Tauseef *et al.*, 2013) oder der Regulation der Expression des IgtG-Proteins (Bayliss *et al.*, 2008) bekannt. Saunders *et al.*, 2000 beschreiben 65 phasenvariable Gene im Genom des *Neisseria meningitidis* Stammes MC58, die zur Adaptation dieser Spezies an seine Umwelt beitragen.

Darüber hinaus tragen *slippage-like*-Mechanismen, stille Loci im Genom, sowie der C-terminale Austausch in bestimmten Genen zur hohen genetischen Variabilität von *Neisseria meningitidis* bei (Bentley *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 1990).

### 1.1.4 Epidemiologie

Die ersten Meningokokken-Infektionen mit charakteristischer Symptomatik wurden 1805 in Genf und 1806 in den USA beschrieben (Vieusseux, 1805, Danielson, 1806). Die erste Erregerisolation gelang Anton Weichselbaum 1887 aus einem Liquorpunktat eines an Meningitis erkrankten Patienten (Weichselbaum, 1887). In Deutschland ist die Serogruppe B die häufigste Serogruppe bei invasiven Infektionen (Hellenbrand *et al.*, 2012). Gehäuft treten Infektionen im ersten Quartal des Jahres auf. Es gibt zwei Altersgipfel der Erkrankungen: im Alter von 0,5 bis 4 Jahren mit der höchsten Anzahl von Infektionen und im Alter von 15 – 19 Jahren (Brehony *et al.*, 2014). Die Gesamtinzidenz schwankt europaweit zwischen 0,5 und 5 Infektionen pro 100000 Einwohner mit einer Letalität von 8% (Trotter *et al.*, 2007). Epidemisch treten Meningokokkenerkrankungen im sogenannten „Meningokokkengürtel“ auf, der sich von West- bis Ostafrika (Gambia

bis Äthiopien) erstreckt (Pollard, 2001). Die Übertragung erfolgt durch direkten Kontakt und durch Tröpfchen (Nelson, 1996).

## 1.2 Das Opc-Protein

Das Opc-Protein ist ein Protein der Klasse 5 mit *beta-barrel*-Struktur in der Außenmembran von *Neisseria meningitidis*. Es besteht aus 272 Aminosäuren mit 28 kDa (Achtman *et al.*, 1988) und hat zehn Transmembran-Domänen und fünf Loops an der Oberfläche (Merker *et al.*, 1997). Das *opc*-Gen umfasst 819 Basenpaare und ist zwischen den Genen *glyA* (kodiert eine Serin- Hydroxymethyltransferase) und *dedA* (kodiert ein Protein unbekannter Funktion) eingebettet (Zhu *et al.*, 1999).

Im intergenischen Bereich 5' von *opc* ist in manchen Stämmen eine 230 bp lange Insertion zu finden. Innerhalb des Gens zeigte sich eine begrenzte Sequenzvariabilität (Seiler *et al.*, 1996). Bestimmten *Neisseria meningitidis* Stämmen fehlt das ganze *opc*-Gen, wie zum Beispiel den Stämmen, die zum ST-8 und ST-11-Komplex gehören (Wang *et al.*, 1993).

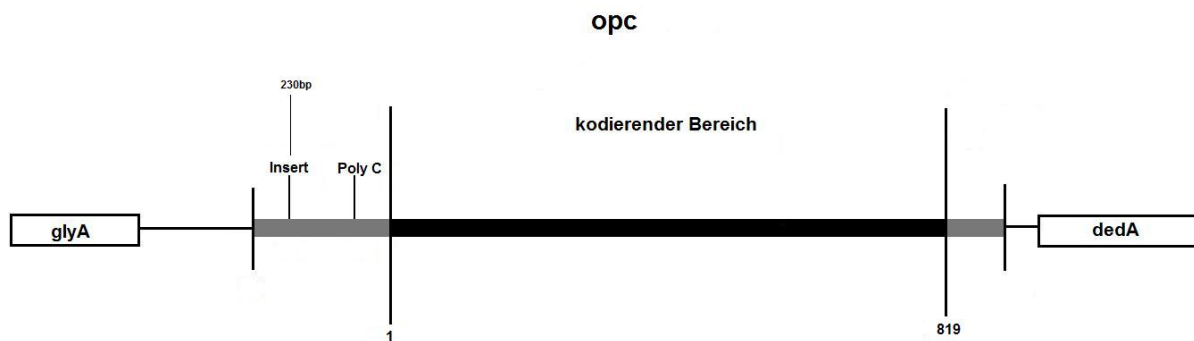


Abbildung 1.1: Genomische Umgebung des *opc*-Gens. Eingezeichnet sind die flankierenden Gene *glyA* und *dedA* sowie die Position der Insertion (ein 230bp langer Abschnitt, den bestimmte Stämme aufweisen) und des Poly-Cytidin-Bereiches in der 5' flankierenden Region

Zur Funktion des Opc-Proteins wurde 1992 ein Zusammenhang zwischen der Expression von Opc und der Invasion von Epithel- und Endothelzellen durch *Neisseria*



*meningitidis* festgestellt (Virji *et al.*, 1992). Später konnte man die molekularen Mechanismen der Interaktion von Opc mit den Wirtszellen aufklären. Opc bindet an sulfatierte Tyrosine von aktiviertem Vitronektin beziehungsweise Fibronektin, was über eine weitere Interaktion mit Integrinen der Wirtszelle zur Internalisation der Bakterien führt (Unkmeir *et al.*, 2002; Sa E Cunha *et al.*, 2010). Dementsprechend beobachtete man ein Fehlen dieser Internalisation bei Opc-negativen Stämmen wie ST-11 (Unkmeir *et al.*, 2002). Die Interaktion von Opc mit Vitronektin trägt ferner zur Inhibition der Bildung des *membrane attack complexes* (MAC) des humanen Komplementsystems und so zur Erhöhung der Serumresistenz Opc-positiver Meningokokken bei (Griffiths *et al.*, 2011). Die Opc-Expression wird auf transkriptionaler Ebene durch einen Polycytidin-Bereich im Promotor des Gens reguliert. Sarkari postulierte eine Expression bei 11-14 Cytidin-Wiederholungen und keine Expression bei Cytidin-Wiederholungen kleiner als 11 beziehungsweise größer als 14. Ferner unterschied sie zwischen einer „*intermediate expression*“ bei 11 und 14 Cs und einer „*high expression*“ bei 12 und 13 Cs (Sarkari *et al.*, 1994). Die phasenvariable Opc-Expression ist ein Mechanismus von *Neisseria meningitidis* zur Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen und zum Schutz vor dem humanen Immunsystem (Hubert *et al.*, 2012). Die Autoren untersuchten in dieser Studie die Widerstandsfähigkeit von unbekapselten Meningokokken-Stämmen des Sequenztyps ST-41/44 gegen das humane Komplementsystem. Der Stamm DE9686 wurde genetisch verändert, sodass er weder eine Kapsel, noch das Protein fHbp exprimiert und keine LPS Sialylierung zeigt. Ferner wurde durch Mutation das mutS-Gen, das für ein DNA-Reparaturprotein kodiert, außer Kraft gesetzt und die Frequenz der Phasenvariation erhöht. Die DE9686-Mutante wurde mit humanem Serum in Kontakt gebracht, wodurch 99,9 % der Bakterien eliminiert wurden. Innerhalb der serumresistenten Population zeigten 88 % eine erhöhte Expression des Opc-Proteins durch Phasenvariation im opc-Promotor. Da es gelang, die Bildung von bakteriziden Antikörpern gegen das Opc-Protein bei Menschen und Mäusen zu induzieren (Rosenqvist *et al.*, 1993; Merker *et al.*, 1997), wurde Opc als möglicher Impfantigenkandidat ins Spiel gebracht und von Keiser *et al.*, 2010 in einer Phase I Studie getestet. Die Autoren begründen dies zum einen mit der Beobachtung, dass Antikörper gegen das Opc-Protein in Seren von Meningokokken-Meningitis-Patienten nachgewiesen wurden (Norheim *et al.*, 2007) und zum anderen damit, dass diejenigen Probanden der Studie, die eine vierfach stärkere bakterizide Wirkung im Serum aufwiesen, sehr viel höhere Werte an Opc-Antikörpern zeigten als *non-responder*. Eine weitere Voraussetzung, die das Opc-Protein als Impfantigenkandidat erfüllt, ist die starke Konservierung seines Gens mit nur sehr geringen Sequenzvariationen, wie schon oben beschrieben (Zhu *et al.*, 1999). Untersuchungen zum Vorkommen von Opc in Stammsammlungen wurden unter anderem von Alamro *et al.* 2014 durchgeführt. Hierbei wurden die *Neisseria meningitidis* Stämme von 21 asymptomatischen Trägern auf die Expression von Opc und sieben anderen phasenvariablen Proteinen über einen Zeitverlauf von sechs Monaten untersucht. Zu Beginn der Untersuchung exprimierten 18 das Opc-Protein, wobei diese Expression im Zeitverlauf abnahm auf 7, was einer Reduktion um 61% entspricht. Die Autoren führten dieses Ergebnis auf die Anpassungsreaktion der *Neisseria meningitidis* Stämme zum Schutz vor dem humanen Immunsystem zurück.

## 1.3 Die untersuchten Stammsammlungen

### 1.3.1 Invasive Stämme

In dieser Arbeit wurden 1141 invasive Stämme aus der Stammsammlung des Nationalen Referenzzentrums für Meningokokken in Würzburg untersucht. Die Stämme wurden aus Blut oder Liquor von Patienten isoliert, die in den Jahren von 2001 – 2010 eine Meningokokkeninfektion erlitten. Zu jedem dieser Stämme ist ein Datensatz mitsamt dem klinischen Verlauf, gegliedert in Sepsis und/oder Meningitis und/oder Waterhouse-Friderichsen-Syndrom, sowie dem klinischen Outcome (Letalität ja oder nein) vorhanden. Diese Daten werden im Rahmen der gesetzlichen Meldepflicht nach Infektionsschutzgesetz erfasst und jährlich mit den Laborsurveillance-Daten verknüpft, um der Verpflichtung der Meldung an die europäische TESSy-Datenbank nachkommen zu können. Für die Stämme lag eine Feintypisierung sowie eine MLST-Sequenztypisierung vor. Die klinischen Daten wurden von Hellenbrand *et al.* am Robert-Koch-Institut, Berlin zur Verfügung gestellt (vgl. Hellenbrand *et al.*, 2012). Einschlusskriterium für die Stämme war das Vorliegen eines Sequenztypes. Die Zahlen variieren zwischen den Jahren, da unterschiedliche Anteile an Stämmen der MLST zugeführt werden konnten. Das Studiendesign verlangte nicht nach einer repräsentativen Auswahl der Stämme, da Genotypen mit Phänotypen assoziiert wurden. Dies gilt in gleicher Weise für die im Abschnitt 1.3.2 dargestellten Trägerstämme.

Nichtsdestotrotz sind beide Stammsammlungen als repräsentativ für die Stammpopulationen zu werten:

1. Bei den invasiven Stämmen wurden entweder alle Isolate eines Jahrganges oder jedes zweite, dritte oder vierte nach Eingang in die MLST einbezogen.
2. Bei den Trägerisolaten aus der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie (Claus *et al.*, 2005) wurden ca. 95% aller Stämme in die Analyse eingeschlossen.

Tabelle 1.1: Anzahl der untersuchten invasiven Stämme pro Kalenderjahr

2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
5	236	91	55	54	68	174	301	66	91

### 1.3.2 Trägerstämme

Es wurden 792 von insgesamt 830 Trägerstämmen untersucht, die 1999 und 2000 im Rahmen der Bayerischen Meningokokkenträgerstudie isoliert worden waren (Weber *et al.*, 2006; Claus *et al.*, 2005; Claus *et al.*, 2002). Auch von diesen Stämmen lag eine Feintypisierung und MLST-Sequenztypisierung vor.

## 1.4 Ziele dieser Arbeit

Das Opc-Protein wurde erstmals von Achtman *et al.*, 1988 als eines von acht Außenmembranproteinen der Klasse 5 beschrieben. Es ist ein gut konserviertes Außenmem-

branprotein mit phasenvariabler Expression auf transkriptionaler Ebene, das *Neisseria meningitidis* bei der Interaktion mit Endothel- beziehungsweise Epithelzellen und im Kampf gegen das humane Immunsystem unterstützt. Bei Infizierten wurden Antikörper gegen Opc isoliert und Opc damit als möglicher Impfantigenkandidat diskutiert. Bisherige Untersuchungen zum Vorkommen von Opc beschränkten sich auf eine vergleichsweise kleine Anzahl von Stämmen (Alamro *et al.*, 2014).

Die in dieser Arbeit vorliegenden Stammsammlungen zeichnen sich nicht nur durch die große Anzahl an Stämmen, sondern auch durch Informationen zum verursachten klinischen Bild (bei den invasiven Stämmen), sowie durch Sequenztypisierung mit Zuordnung zu klonalem Komplex und Serogruppen aus. Somit ist nicht nur eine vergleichende Untersuchung zwischen invasiven und Trägerstämmen möglich, sondern es kann auch die Assoziation von weiteren Faktoren wie beispielsweise klonalem Komplex oder Serogruppe mit Opc-Expression untersucht werden.

Zusammenfassend soll in dieser Arbeit folgenden vier Hauptfragestellungen nachgegangen werden:

- Wie viele invasive und Trägerstäme besitzen das *opc*-Gen und wie viele davon exprimieren es?
- Wie stellt sich der Zusammenhang zwischen Opc-Expression und Struktur des homopolymeren Trakts in der *upstream*-Region des Gens dar?
- Differiert die Opc-Expression zwischen invasiven und Trägerstämmen?
- Korreliert die Opc-Expression mit bestimmten Erkrankungsbildern?
- Ist die Opc-Expression möglicherweise von weiteren molekulargenetischen Einflussfaktoren abhängig?

## 2 Materialien

### 2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Agarosegel-Elektrophoresekammer	SubCell GT	Bio-Rad
Elektrophorese-Power Supply	3000Xi	Bio-Rad
ELISA-Reader	Multi Scan Ex	Thermo Labsystems
Gel-Dokumentationssystem	UVT 28 MP	Herolab
Gel-Scanner	GS-800	Bio-Rad
Heizblock	1Q	VLM
Brutschrank	BB G220 CU	Thermo Scientific Heraeus
Magnetrührer	RH IKAMAG	IKA
Mikrowelle	MW 1820 Duo	Bauknecht
PCR Thermocycler	Primus 96 plus	MWG-Biotech
PCR Thermocycler	Geneamp 2700	Life Tech
Röntgenfilm-Entwickler	Curix 60	AGFA
SDS-PAGE Kammer	Mini Gel Twin	Biometra
Tischzentrifuge	Biofuge 15	Heraeus
Vortex-Mischer	SA8	Stuart
Waage	R 160 P	Sartorius
Western Blot Kammer	Mini Trans Blot Cell	Bio-Rad

## 2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.2: Chemikalien und Verbrauchsmaterial

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
ABTS – Tabletten und Puffer	Roche
Agarose	Roth
Columbia-Blutagarplatten	Biomerieux
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Rinderserumalbumin (BSA)	AppliChem
Coomassie Brilliant Blue G-250	Merck
dNTPs	Peqlab
Phosphate-buffered saline (PBS Dulbecco, 10x)	Invitrogen
30% Acrylamid, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5:1	Roth
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma
Magermilchpulver	Heirler Cenovis
Sodium dodecyl sulfate (SDS), ultra pure	AppliChem
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
TRIS	Roth
Tween 20	Merck
<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
96 Well ELISA Platten (high bind)	Greiner bio-one
Nitrocellulosetransfermembran (Protran, 0,45 $\mu$ M), BA 85	Whatman
Röntgenfilm (Super RX)	Fujifilm
96 Well PCR Platten	Biozym
96 Well Microtest Platten	Sarstedt

Tabelle 2.3: Kits, Antikörper, Enzyme und Marker

<b>Kits</b>	<b>Hersteller</b>
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Pierce ECL Western Blot Kit	Thermo Scientific
<b>Antikörper</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Mouse Anti-Opc (B306)	Mark Achtman
Pox-Anti-Mouse-IgG	Jackson Immuno Research Laboratories
<b>Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>
Taq DNA Polymerase 5U/ $\mu$ l	New England Biolabs
Thermopol-Puffer	New England Biolabs
Exonuclease I 20U/ $\mu$ l	New England Biolabs
Antarktische Phosphatase 5U/ $\mu$ l	New England Biolabs
<b>Größenmarker</b>	<b>Hersteller</b>
Page Ruler prestained protein marker, 10-170 kDa	Thermo Scientific
Smart ladder 100 - 1000	Eurogentec

Tabelle 2.4: Oligonukleotide

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>	<b>Position MC58-Genom</b>
RA1	CAAAGCGCACATCACCGTC	1074487 - 1074505
RA2	CCATCAAATGAATATCCATACC	1071056 - 1071035
RA3	CATCTCAAGTCTCGTCATTCC	1072689 - 1072709
RA4	AGCCTGTGTAAGATCGATAC	1071885 - 1071905
RA4r	GTATCGATCTTTACACAGGCT	1071905 - 1071885
RA5	TTTTCAGGAACGCCGGTGG	1072703 - 1072689
HC376R	ATTGTAGTCGGATATGGTAAC	1072270 - 1072250
HC589	CGACTACAATCCAAATTTTAGAG	1072237 - 1072259
HC590	TCAGAATTTTATGCCGACGC	1071428 - 1071409
HC595	AACCGGACGAACCTAGATTC	1072765 - 1072784

Alle Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 2.5: Referenzstämme für ELISA und Westernblot

<b>Name</b>	<b>Serogruppe</b>	<b>klonaler Komplex</b>	<b>Opc-Expression</b>	<b>Referenz</b>
MC58	B	ST-32	Ja	Tettelin <i>et al.</i> , 2000
DE9686	B	ST-41/44	Ja	Elias <i>et al.</i> , 2010
DE8671	B	ST-269	Nein	Hellenbrand <i>et al.</i> , 2012

## Agarosegelelektrophorese

Elektrophoresepuffer (1xTBE (pH 8,30))

100 mM Tris

100 mM Borsäure

2,5 mM EDTA

Probenpuffer (GEBS (pH 8,00))

20% Glycerin

50 mM EDTA

0,05% Bromphenolblau

0,50% N-Lauroylsarcosin

## SDS-Page

“Lower Tris” Puffer

1,5 M Tris (pH 8,8)

2% SDS

“Upper Tris” Puffer

0,5 M Tris (pH 6,8)

2% SDS

Trenngel (12.5%)

2,5 ml 30% Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung

1,5 ml “Lower Tris”

2 ml dH<sub>2</sub>O

10  $\mu$ l TEMED

30  $\mu$ l 10% APS

Sammelgel

0,375 ml 30% 30% Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung

0,625 ml “Upper Tris”

1,625 ml dH<sub>2</sub>O

10  $\mu$ l TEMED

17,5  $\mu$ l 10% APS

Sample Solution (1x)

5%  $\beta$ -Mercaptoethanol

2% SDS

12,50% Glycerin

0,5 M Tris (pH 6.8)

(Spatelspitze) Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer  
25 mM Tris  
0,05% SDS  
50 mM Glycin

### **Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen**

Coomassie-Färbe-Lösung  
50% Methanol  
10% Essigsäure  
0,28% Coomassie Brilliant Blue G250

Entfärbelösung  
7,50% Essigsäure  
20% Methanol

### **Western Blot**

Blot Puffer  
0,30% Tris  
1,44% Glycin  
20% Methanol

PBS-T  
1x PBS  
0,10% Tween 20

Verwendete Abkürzungen:

APS = Ammoniumperoxodisulfat  
 $\beta$ -ME = 2-Mercaptoethanol  
EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure  
SDS = Natriumdodecylsulfat  
TEMED = Tetramethylethylendiamin  
TRIS = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

### **Stammsammlungen**

Invasive Stämme

Es wurden 1141 Stämme aus der Stammsammlung des Nationalen Referenzzentrums für Meningokokken in Würzburg verwendet, die im Rahmen der laufenden Laborsurveillance gesammelt, typisiert und mit den klinischen Daten des Robert-Koch-Instituts in



Berlin verknüpft worden waren.  
Siehe auch nähere Erläuterung in der Einleitung.

#### Trägerstämme

Es wurden 792 Trägerstämme untersucht, die 1999 und 2000 isoliert worden waren (Claus *et al.*, 2005; Claus *et al.*, 2002). Zu diesen Stämmen liegt auch eine Sequenztypisierung mitsamt Zuordnung zu klonalen Komplexen vor.

# 3 Methoden

## 3.1 Bakterienkultivierung

Für die Herstellung der Bakteriensuspensionen für die PCR, ELISA und SDS-Page-Untersuchungen wurden die Meningokokkenstämme über Nacht bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank auf einer Blutagarplatte kultiviert. Anschließend wurden die Stämme von der Platte abgestrichen und in 1 ml 1xPBS suspendiert, gekocht und dann bei -20°C eingefroren.

## 3.2 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) wurde verwendet, um einen Teil des *opc*-Gens mitsamt Promotor (Primerkombinationen RA3/RA4 und RA3/376R) zu amplifizieren, bzw. um das Nicht-Vorhandensein des Gens nachzuweisen (RA1/RA2). Dazu wurde die Taq-Polymerase mit ThermoPol-Puffer verwendet. Die PCR-Proben-Ansätze wurden in folgender Zusammensetzung hergestellt: 5 µl NEB-Puffer, 5 µl dNTPs [jeweils 2 mM], 0,5 µl Primer 1 [20 µM], 0,5 µl Primer 2 [20 µM], 38,8 µl destilliertes H<sub>2</sub>O, 0,5 µl DNA-Probe aus Bakteriensuspension, 0,2 µl NEB-Taq-Polymerase.

Anschließend wurden die PCR-Proben (der Master-Mix und die Bakteriensuspensionen) in eine 96-well-PCR-Platte pipettiert und entweder im Primus 96 plus oder im GeneAmp 2700 weiterprozessiert nach folgendem Ablauf: Initiale Denaturierung bei 94°C für 10 Minuten; anschließend folgt ein Zyklus, der 36x durchlaufen wird: Denaturierung bei 94°C für eine Minute, Annealing bei Annealing-Temperatur (Ta) für eine Minute, Polymerisation bei 72°C für eine Minute. Abschließend folgt die finale Polymerisation bei 72°C für 10 Minuten.

Die Annealing-Temperatur (Ta) der Primer erhielt man durch Berechnung der Schmelztemperatur jedes Primers mit Hilfe der Formel  $[4 \cdot (G + C) + 2 \cdot (A + T)]$  und Subtraktion von 4°C von der niedrigeren Schmelztemperatur.

10 µl der PCR-Ansätze wurden mit GEBS-Puffer versetzt und elektrophoretisch bei 170-200 V in 1,5% Agarosegel in 1xTBE-Puffer aufgetrennt. Als Marker wurde der *Smart Ladder* (siehe Materialien) verwendet. Nach der Gel-Elektrophorese wurde das Gel ca. 10-20 min in 0,001%ige Ethidiumbromidlösung gelegt und anschließend machte man die DNA-Banden mit Hilfe von UV-Licht auf Grund der Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA sichtbar.

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung wurden Antarktische Phosphatase und Exonuclease I verwendet. Die Aufreinigung erfolgte im Primus 96 plus mit

folgendem Ablauf: 30 Minuten bei 37°C und 20 Minuten bei 80°C.

Für die Sequenzierung wurden 7,5  $\mu\text{l}$  des aufgereinigten PCR-Produktes zu 2,5  $\mu\text{l}$  des Sequenzierprimers mit der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  gemischt und an die Firma GATC geschickt. Zum Sequenzieren wurden die Primer RA3 bzw. RA5 verwendet.

### 3.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gele bestanden aus einem Trenngel sowie darüber einer Sammelgelschicht von ca. 1 cm. Die Polyacrylamid-Konzentration des Trenngels betrug 12,5%. Zur Herstellung der Proben für die SDS-PAGE wurden die Bakterien über Nacht auf Blutagarplatten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde eine OD<sub>600</sub> 0,2 jeder Probe in 1xPBS eingestellt, 1 ml zentrifugiert und das Pellet dann in 50  $\mu\text{l}$  1x Sample Solution resuspendiert. Auf das Gel wurden 2,5  $\mu\text{l}$  jeder Probe aufgetragen, nachdem diese vorher für 10 min aufgeköcht worden waren. Als Marker diente der *pre-stained protein ladder*. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ca. 1,5 h, zunächst bei 10 mA/Gel bis die Lauffront die Sammelgelgrenze passiert hatte, anschließend bei 20 mA/Gel bis die Lauffront aus dem Gel herausgelaufen war.

### 3.4 Färben der SDS-Polyacrylamid-Gele

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele mit Coomassie-Lösung für ca. 20 min angefärbt. Anschließend tauschte man die Coomassie-Lösung durch Coomassie-Entfärbelösung aus und ließ die Gele über Nacht unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur entfärben.

### 3.5 Western Blot

Western Blots wurden zum Nachweis des Opc-Proteins mit Hilfe des Antikörpers B306 durchgeführt. Dazu wurden die Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran für eine Stunde bei 300 mA geblottet. Anschließend sättigte man die Membran für 1 h durch ständige Agitation in einer Lösung von 5%iger Magermilch in PBS-T ab, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Über Nacht wurde die Membran bei 4°C unter ständigem Schütteln mit dem Antikörper B306 inkubiert, der in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in einer 1%igen Magermilch-Lösung gelöst war. Danach wurde die Membran zweimal für jeweils 5 min in PBS-T gewaschen, bevor der *pox-anti-mouse*-Antikörper 1:5000 in PBS-T gelöst für 1 h bei Raumtemperatur dazugegeben wurde. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min wurde der Blot mit Hilfe des Pierce ECL-Kits entwickelt. Anschließend legte man einen Röntgenfilm für ca. 1 min auf die Membranen. Der Röntgenfilm wurde im Entwickler entwickelt. Als Positivkontrolle wurde der Referenzstamm

MC58 und als Negativkontrolle der Stamm DE8671, der Opc nicht exprimiert, verwendet.

### 3.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISAs wurden zum Nachweis der Expression des Opc-Proteins in den Stämmen verwendet. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 37°C in einem Brutschrank. Zunächst wurden Bakteriensuspensionen mit einer  $OD_{600}$  0.2 in 1xPBS hergestellt und 10 min gekocht. Eine 96 Well ELISA Microplate wurde mit 50  $\mu$ l Poly-D-Lysin (25 mg/l) für 30 min bei 37°C beschichtet, um die Adhäsion der Bakterien zu verbessern. Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS wurden 20  $\mu$ l pro Probe in jedes *well* gegeben. Die Adhäsion der Bakterien dauerte 1 h im Brutschrank. Anschließend erfolgte 3x Waschen mit 1xPBS, bevor man 150  $\mu$ l 1% BSA/PBS für 30 min in die *wells* gab, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 1xPBS gab man 20  $\mu$ l des Antikörpers B306 (1mg/ml) in einer Verdünnung von 1:1500 in 1%BSA/PBS in die *wells* und inkubierte 45 min. Danach 3x Waschen mit 1xPBS und 30 min Inkubation mit 20  $\mu$ l *pox-anti-mouse*-Antikörper 1:2500 in 1%BSA/PBS. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 1xPBS wurden 20  $\mu$ l ABTS [1 mg/ml] in jedes *well* pipettiert und jeweils nach 10 und 20 min Inkubation die Absorption bei 414 nm im ELISA-Reader gemessen. Als Positivkontrollen wurden die Stämme MC58 und DE9686 verwendet, die auf jeder ELISA-Platte mit aufgetragen wurden: MC58 als Positivkontrolle mit sehr starkem Signal und DE9686 mit weniger starkem Signal im Rahmen eines Normalisierungsprotokolls.

### 3.7 Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits bestimmt. Als Messstandard diente eine BSA-Verdünnungsreihe, die nach Herstellerangaben erstellt wurde. Es wurden jeweils 20  $\mu$ l des BSA-Standards und der gleichen Bakteriensuspensionen wie im ELISA in die *wells* einer 96-well Platte pipettiert, die mit 200  $\mu$ l des *working reagents* versetzt wurden. Nach Inkubation der Platte für 30 min bei 50°C wurde die Absorption im ELISA-reader bei 570 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde aus der BSA-Standard-Kurve errechnet.

### 3.8 Computer-Programme und statistische Auswertung

Microsoft Excel 2003 wurde für die allgemeine Datenanalyse sowie zur Auswertung des ELISAs und der Proteinbestimmung verwendet. Die Programme Chromas (Technelysium, Version 2.5.0) und Lasergene (DNA-Star, Version 12) wurden zur Auswertung der

Sequenzierungsergebnisse verwendet. Mit Hilfe der Programme MegAlign (DNA-Star, Version 12) und SeqMan (DNA-Star, Version 12) wurden Sequenzen einzelner Stämme verglichen und ausgewertet. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von [www.datenconsult.de](http://www.datenconsult.de) (Chi-square Tests) durchgeführt. Die Zuordnung zu klonalen Komplexen erfolgte mittels [pubMLST.org](http://pubMLST.org).

# 4 Ergebnisse

## 4.1 Charakterisierung der invasiven und Trägerstammsammlung

### Altersverteilung

Die Altersverteilung der beiden Stammsammlungen unterscheidet sich deutlich in Anzahl und Altersspanne.

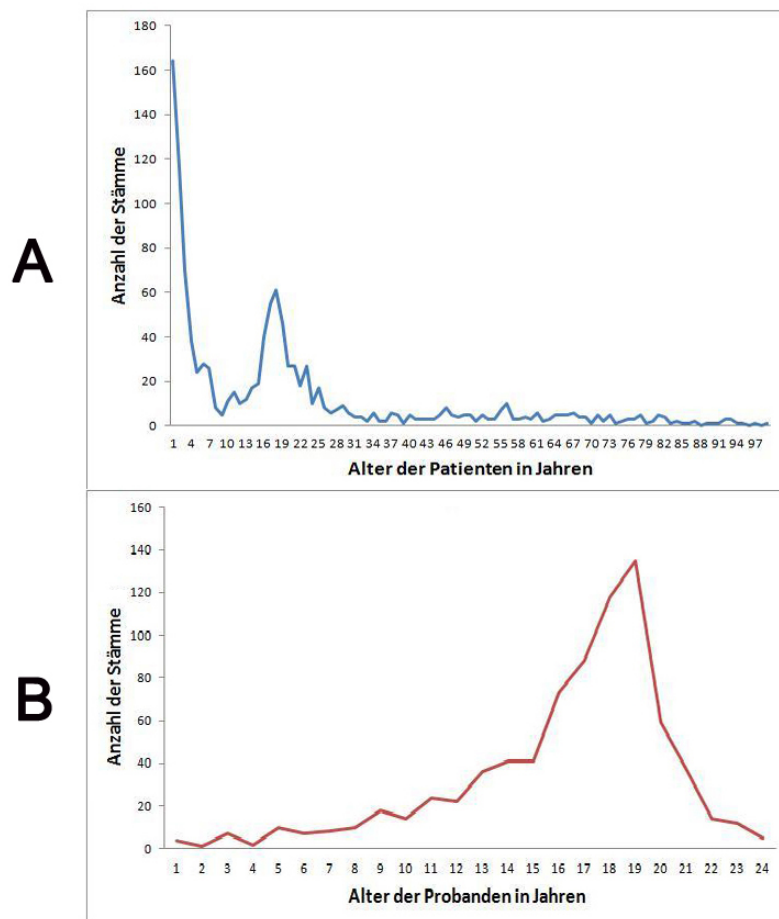


Abbildung 4.1: Anzahl der Stämme pro Alter der Patienten bzw. Probanden, A: invasive Stämme, B: Trägerstämme

Die Altersverteilung der invasiven Meningokokkenfälle spiegelt den klassisch zweigipfligen Verlauf, mit einer Häufung der Infektionen zwischen dem 1. - 4. Lebensjahr und dem 15. - 19. Lebensjahr wider (Brehony *et al.*, 2014). Danach fällt die Anzahl der Infektionen pro Lebensalter ab und bleibt auf einem niedrigeren Niveau einigermaßen konstant. Das höchste Lebensalter eines Patienten betrug 98 Jahre. Diese klassische Verteilung konnte in der Stammsammlung, die auf der Basis des Vorliegens eines STs zusammengestellt wurde, dennoch nachvollzogen werden.

Zur Isolierung der Trägerstämme wurden von Claus *et al.*, 2005 insgesamt 8000 Personen untersucht, von denen 830 *Neisseria meningitidis* als asymptomatischen Kommensale im Nasopharynx aufwiesen, was einer Trägerrate von 10,4 % entspricht. Von diesen 830 Stämmen wurden 792 in die Untersuchung einbezogen.

Die größte Anzahl der Trägerstammisolate (341, 43%) war von Probanden im Alter von 18 - 20 Jahren. Insgesamt erstreckte sich die Altersspanne entsprechend der Publikation von Claus *et al.*, 2005 vom 3. bis zum 25. Lebensjahr.

### Serogruppe

Die Verteilung der Serogruppen in den beiden Stammsammlungen unterscheidet sich vor allem im Hinblick auf die Serogruppe C und im Anteil der nicht gruppierbaren Stämme.

Tabelle 4.1: Prozentuale Verteilung der Serogruppen bei Träger- und invasiven Stämmen; "ohne Kapsel" steht für *capsule null locus* und "nicht gruppierbar" beinhaltet andere Serogruppen, auf die nicht getestet wurde

	A	B	C	E	W	Y	ohne Kapsel	Nicht gruppierbar
invasive Stämme	<1%	66%	23%	<1%	4%	6%	-	<1%
Trägerstämme	-	31%	2%	4%	3%	8%	16%	36%

Bei der Häufigkeitsverteilung der Serogruppen der invasiven Stämme dominiert die Serogruppe B klar mit 66% vor der Serogruppe C mit 23%. Die Serogruppen Y und W sind mit 6% und 4% vertreten, während der Anteil der Serogruppen A und E, genauso wie der Anteil der nicht gruppierbaren Stämme, jeweils unter einem Prozent lag.

Die Stammsammlung repräsentiert die über viele Jahre in Deutschland typische Serogruppenverteilung (Elias *et al.*, 2006).

Die bei weitem am häufigsten vertretene Serogruppe im Trägerstammkollektiv, die von Claus *et al.*, 2005 mittels ELISA und monoklonaler Antikörper bestimmt wurden, war die Serogruppe B mit 31%. Darauf folgten Y, E, W und C mit jeweils 8%, 4%, 3% und 2%.

Von 36% konnte die Serogruppe nicht bestimmt werden, einerseits, weil keine Antikörper verfügbar waren, und andererseits weil die Kapsel nicht exprimiert wurde. 16% der Trägerstämme waren konstitutiv unbekapselt, da ihnen das Kapselsynthese-Operon fehlte

(*capsule null locus*) (Claus *et al.*, 2002). Es gab 2 Stämme mit der Serogruppe X und 6 Stämme mit der Serogruppe Z.

### Molekulare Typisierung mittels MLST

Alle in die Untersuchung einbezogenen invasiven Meningokokkenisolate waren mittels MLST typisiert worden - ebenso die Trägerisolate. Genetisch verwandte STs werden zu klonalen Komplexen zusammengefasst (siehe Kapitel 1.1.2).

Die Population der Trägerisolate war mit 308 STs und 33 klonalen Komplexen im Vergleich zu 372 STs und 26 klonalen Komplexen bei den invasiven Isolaten genetisch deutlich diverser, obwohl weniger Stämme eingeschlossen worden waren.

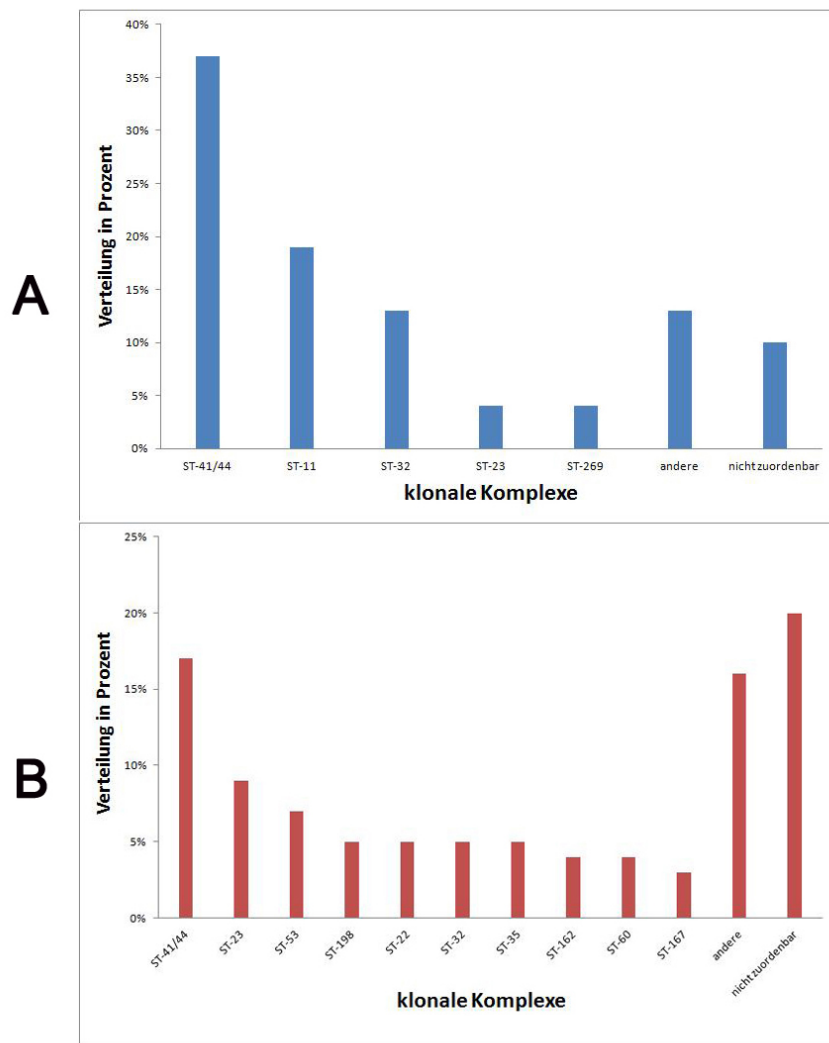


Abbildung 4.2: Prozentuale Verteilung der klonalen Komplexe, A: invasive Stämme, B: Trägerstämme



Die häufigsten in der invasiven Stammsammlung vertretenen klonalen Komplexe waren mit 37% der ST-41/44, mit 19% der ST-11 und mit 13% der ST-32-Komplex. Die restlichen klonalen Komplexe hatten eine Verteilung von 4% oder weniger mit 15 klonalen Komplexen mit einem Anteil von jeweils <1%. Insgesamt waren in der Stammsammlung 26 unterschiedliche klonale Komplexe vertreten, wobei 10% der 1141 Stämme keinem klonalen Komplex zuzuordnen waren.

Bei den Trägerstämmen waren 20% der Stämme keinem klonalen Komplex zuzuordnen. Die größte Anzahl an klonalen Komplexen ist durch ST41/44 mit 17%, ST-23 mit 9% und ST-53 mit 7% repräsentiert. Die restlichen klonalen Komplexe hatten einen Anteil von 5% oder weniger. Es gab 17 klonale Komplexe mit einem jeweiligen Anteil von unter einem Prozent. Insgesamt waren 33 unterschiedliche klonale Komplexe vertreten. Dies entspricht einer im Vergleich zu den invasiven Isolaten wesentlichen höheren Diversität an klonalen Komplexen.

## 4.2 Häufigkeit des *opc*-Gens

Die Bedeutung von *Opc* für die Pathogenese von Meningokokken ist intensiv untersucht worden, allerdings wurden bisher noch keine größeren Stammsammlungen auf das grundsätzliche Vorhandensein des Gens untersucht (vgl. Alamro *et al.*, 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden durch PCR-Ansätze 1141 invasive und 792 Trägerstämmen untersucht. Dazu wurden 3 verschiedene Primerkombinationen verwendet.

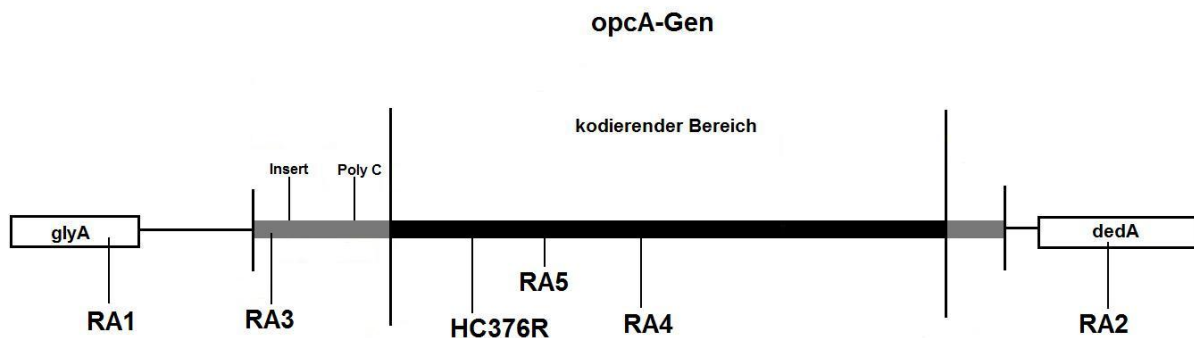


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des *opc*-Gens mit der Lokalisation der verwendeten Primer RA1, RA2, RA3, RA4, RA5, HC376R. Bei *opc*-negativen Stämmen liegt zwischen *glyA* und *dedA* eine intergenische Region von ca. 90bp Länge.

Zunächst wurde mit der Primerkombination RA3/RA4 eine PCR durchgeführt, die die 5' flankierende Region des *opc*-Gens und einen Teil der kodierenden Region des Gens umfasste. Das Resultat war entweder kein Produkt, ein ca. 800bp großes Stück oder ein um 230bp kleineres Stück, je nachdem, ob die Insertion an Position 184 in der 5' flankierenden Region vorhanden ist oder nicht (siehe Abbildung 3.1). Alle Stämme, die mit dieser Primerkombination kein Produkt in der PCR zeigten, wurden mit der Kombination RA1/RA2 untersucht. RA1 liegt im *glyA*-Gen und RA2 im *dedA*-Gen. Diejenigen Stämme ohne *opc*-Gen lieferten daraufhin ein 500bp großes PCR-Produkt. Bei Stämmen, die mit beiden Primerkombinationen keine Bande zeigten, konnte mit der Primerkombination RA3/HC376R ein ca. 460bp großes DNA-Fragment amplifiziert werden, das bei Vorhandensein der Insertion 230 bp größer war.

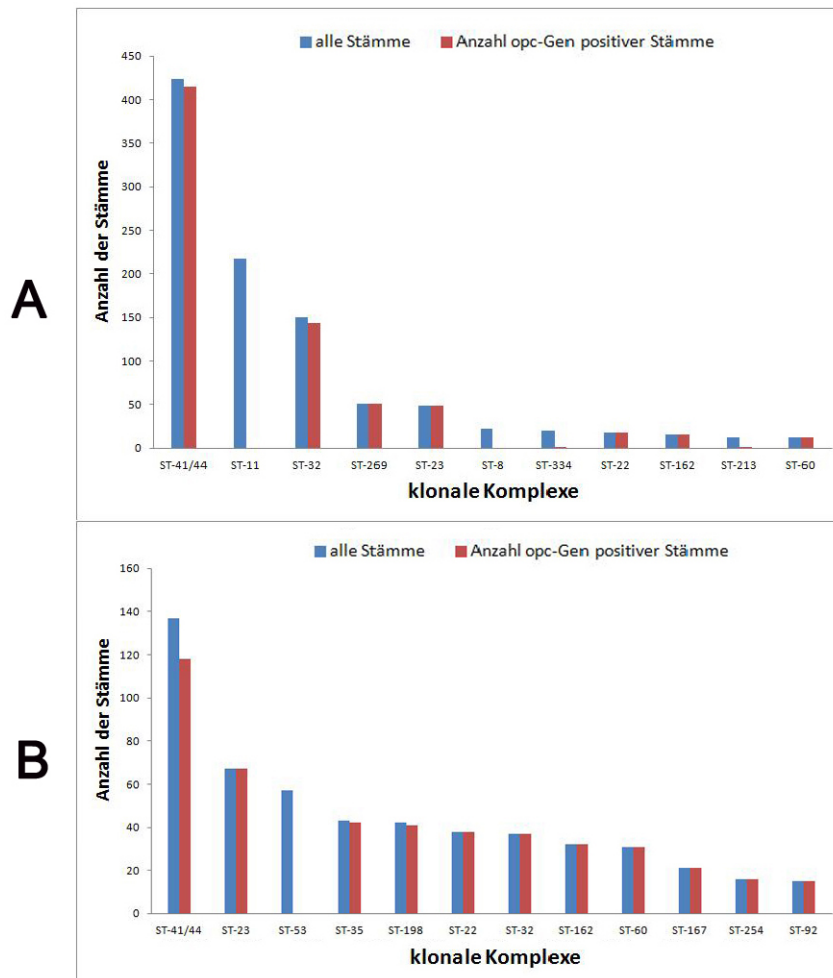


Abbildung 4.4: Anteil der opc-Gen positiven Stämme pro klonalem Komplex, A: invasive Stämme, B: Trägerstämme

Bei den invasiven Stämmen war das opc-Gen bei 812 Stämmen (71%) vorhanden, bei 329 Stämmen (29%) fehlte es.

Die zu dem klonalen Komplex ST-41/44 zugehörigen Stämme waren zu 97,8% opc-positiv. Die klonalen Komplexe ST-269, ST-23, ST-22, ST-162 und ST-60 waren Stämme mit einer opc-Gen-Trägerquote von 100%. Der klonale Komplex mit der zweitgrößten Anzahl an opc-Gen positiven Stämmen war ST-32 mit einer Rate von 96%.

Bei 100% aller ST-231, ST-8 und ST-11-Stämme, beziehungsweise bei 92,3% aller ST-213 und 95% aller ST-334-Stämme fehlte das opc-Gen.

Von den 792 untersuchten Trägerstämmen hatten 608 (77%) das opc-Gen in ihrem Genom, während 184 (23%) das opc-Gen fehlte.

Die zu dem am häufigsten vertretenen klonalen Komplex ST-41/44 zugehörigen Stämme zeigten eine opc-Gen Trägerrate von 86%. Auffallend war ferner die opc-Gen Trägerrate

von 100% bei den Stämmen der klonalen Komplexe ST-103, ST-162, ST-167, ST-175, ST-22, ST-23, ST-254, ST-32, ST-60 und ST-92.

ST-23 war der am zweithäufigsten vertretene klonale Komplex in der gesamten Stammsammlung. Der am dritthäufigsten vertretene klonale Komplex ST-53 war, genauso wie die klonalen Komplexe ST-11 und ST-178, zu 100% negativ für das *opc*-Gen.

### **4.3 Länge des Poly-C-Traktes im Promotor des *opc*-Gens bei *opc*-positiven Stämmen**

Es wurden diejenigen PCR-Produkte, die mit der Primerkombination RA3/RA4 amplifiziert wurden, mit dem Primer RA5 und diejenigen PCR-Produkte, die mit der Primerkombination RA3/376R erstellt wurden, mit dem Primer RA3 sequenziert. Dadurch erhielt man die Information über die Anzahl der Cytidine im Poly-C-Promotorbereich des *opc*-Gens.

Es wurde von allen 812 *opc*-positiven invasiven Stämmen und allen 608 *opc*-positiven Trägerstämmen der Bereich des Genoms, der den Poly-C-Trakt im Promotor und den Beginn des kodierenden Abschnittes beinhaltet, sequenziert.

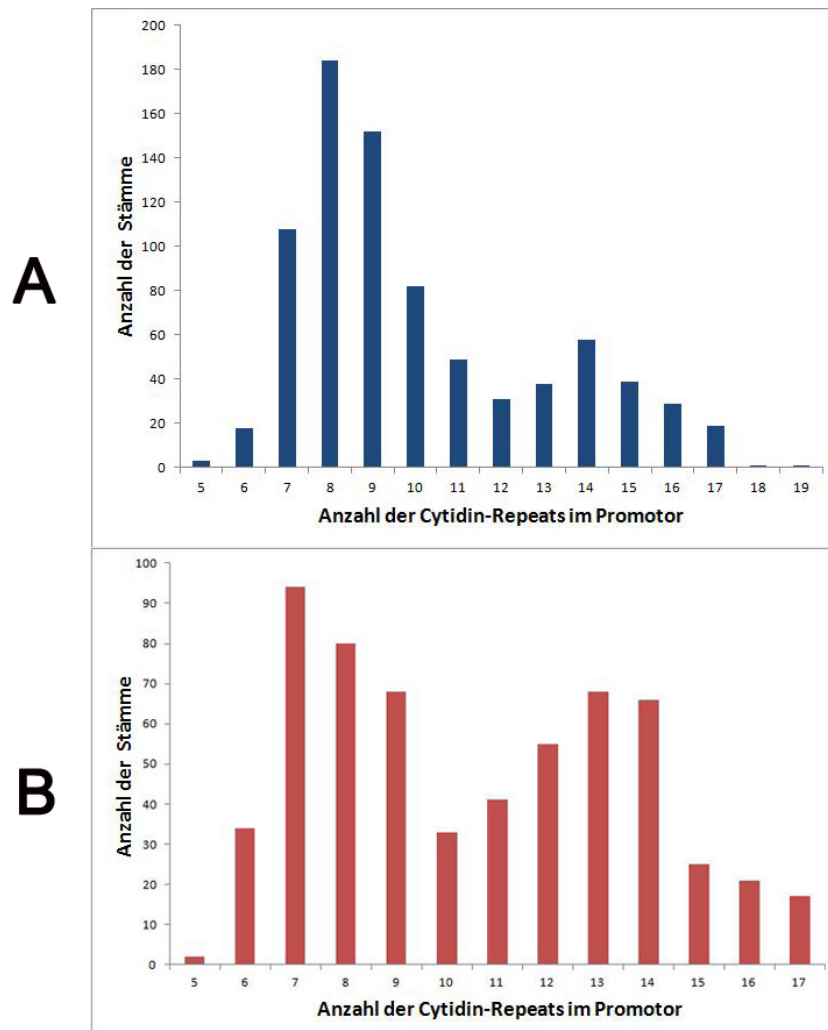


Abbildung 4.5: Anzahl der Stämme, die eine jeweilige Anzahl von Cytidin-Wiederholungen im Promotor des *opc*-Gens aufweisen, A: invasive Stämme, B: Trägerstämme

Die Spanne reichte von drei Stämmen mit 5 Cytidin-Wiederholungen bis hin zu einem Stamm mit 19 Cs im Promotor. Am häufigsten waren die C-Anzahlen 7 (108 Stämme), 8 (184 Stämme) und 9 (152 Stämme) vertreten. Insgesamt hatten 545 Stämme eine C-Anzahl kleiner als 11 und 176 Stämme eine C-Anzahl zwischen 11 und 14. Eine C-Anzahl von 15 und mehr war bei 91 Stämmen zu beobachten.

Zusammenfassend zeigten also 22% aller *opc*-positiven invasiven Stämme eine C-Anzahl zwischen 11 und 14.

Auch bei den 608 *opc*-positiven Trägerstämmen wurde die oben genannte Sequenzierung durchgeführt.

Hierbei reichte die Spanne von zwei Stämmen mit 5 Cytidin-Wiederholungen bis hin zu 21 Stämmen mit 17 Cs im Promotor. Am häufigsten waren hier die C-Anzahl 7 (94

Stämme ) und 8 (80 Stämme) vertreten. Jeweils 68 Stämme zeigten eine C-Anzahl von 9 beziehungsweise 13. Insgesamt hatten 311 Stämme eine C-Anzahl kleiner als 11 und 230 Stämme eine C-Anzahl zwischen 11 und 14. Eine C-Anzahl von 15 und mehr war bei 67 Stämmen zu beobachten.

Zusammenfassend zeigten also 38% aller opc-positiven Trägerstämme eine C-Anzahl zwischen 11 und 14.

## 4.4 Opc-Expression bei opc-Gen positiven Stämmen

Für alle 176 invasiven Stämme, die eine C-Anzahl zwischen 11 und 14 im Promotor aufwiesen, wurde ein ELISA mit dem opc-spezifischen monoklonalen Antikörper B306 durchgeführt.

Zur Validierung des Zusammenhangs der Anzahl der Cytidine im opc-Promotor zur Opc-Expression (Sarkari *et al.*, 1994) wurde für die C-Anzahlen 7 - 10 beziehungsweise 15 - 17 für jede C-Anzahl eine Stichprobe von 4 Stämmen ausgewählt und bei diesen insgesamt 28 Stämmen ein ELISA durchgeführt.

Weder bei Stämmen mit C-Anzahlen unter 11 noch bei solchen mit einer Länge von über 14 konnte eine Expression detektiert werden. Die mittlere Extinktion (414nm) bei einer C-Anzahl von 11 und 14 betrug 0,64 beziehungsweise 0,56; diejenige bei 12 und 13 1,28 beziehungsweise 1,80 (Tabelle 4.2).

Somit konnte das Ergebnis von Sarkari bestätigt werden, die eine schwache Opc-Expression bei 11 und 14 und eine ausgeprägte Expression bei 12 und 13, sowie keine Expression bei <11 beziehungsweise >14 postulierte (Sarkari *et al.*, 1994).

Tabelle 4.2: Expressionsstärke in Abhängigkeit von der Zahl der Cytidinreste im homopolymeren Trakt des Promotors von *opc*. Die Expressionsstärke wurde mittels ELISA unter Verwendung des spezifischen Antikörpers B306 gemessen.

Anzahl der Cytidinreste	<11	11	12	13	14	>14
OD 414 nm	0	0,64	1,28	1,80	0,56	0

### Keine Opc-Expression trotz 11-14 Cs im Promotor

Von den 176 invasiven Stämmen mit einer Poly-C-Anzahl zwischen 11 und 14 zeigten 24 weder eine Opc-Expression im ELISA noch im Western Blot, der für diese 24 Stämme durchgeführt wurde.

Daraufhin wurde eine Sequenzierung der kompletten opc-Gene dieser 24 Stämme durchgeführt, und es zeigte sich eine Phasenvariation im kodierenden Bereich des Gens 231 Basenpaare nach dem Startcodon. Hier befindet sich ein Poly-Adenin-Bereich, der in Stämmen, die das Opc-Protein exprimieren, aus 8 Adenin-Wiederholungen besteht. Bei 14 der 24 Stämme zeigten sich hier nur 7 As, was zu einer Leserasterverschiebung und damit zu einer fehlenden Expression des Opc-Proteins führt. Die restlichen 10 Stämme wiesen keine Sequenzpolymorphismen im opc-Gen auf, sodass der Mechanismus für die

ausbleibende Expression unbekannt blieb.

Von den 24 nicht exprimierenden Stämmen waren 14 dem klonalen Komplex ST-23 zuzuordnen, jeweils vier Stämme den klonalen Komplexen ST-32 und ST-269 und zwei Stämme dem klonalen Komplex ST-41/44. Die Phasenvariation im *opc*-Gen wiesen 13 der 14 ST-23-Stämme, sowie ein ST-41/44-Stamm auf.

Tabelle 4.3: Zuordnung der 24 trotz einer Anzahl von 11-14 C-Resten im homopolymeren Trakt des Promotors nicht exprimierenden Stämme zu ihren jeweiligen klonalen Komplexen. Ferner ist die Anzahl der Stämme, bei denen eine Leserasterverschiebung durch eine homopolymere A-Wiederholungssequenz im kodierenden Bereich als Ursache der Nicht-Expression identifiziert wurde, aufgetragen.

<b>klonaler Komplex</b>	<b>Anzahl Stämme</b>	<b>Anzahl mit Leserasterverschiebung</b>
ST-23	14	13
ST-41/44	2	1
ST-32	4	0
ST-269	4	0

#### **4.4.1 *Opc*-Expression in Stämmen unterschiedlicher klonaler Komplexe**

Die *Opc*-Expression der invasiven Isolate wurde mittels ELISA bestimmt, diejenige der Trägerisolate wurde von der Anzahl der Cytidin-Reste im Promotor abgeleitet.

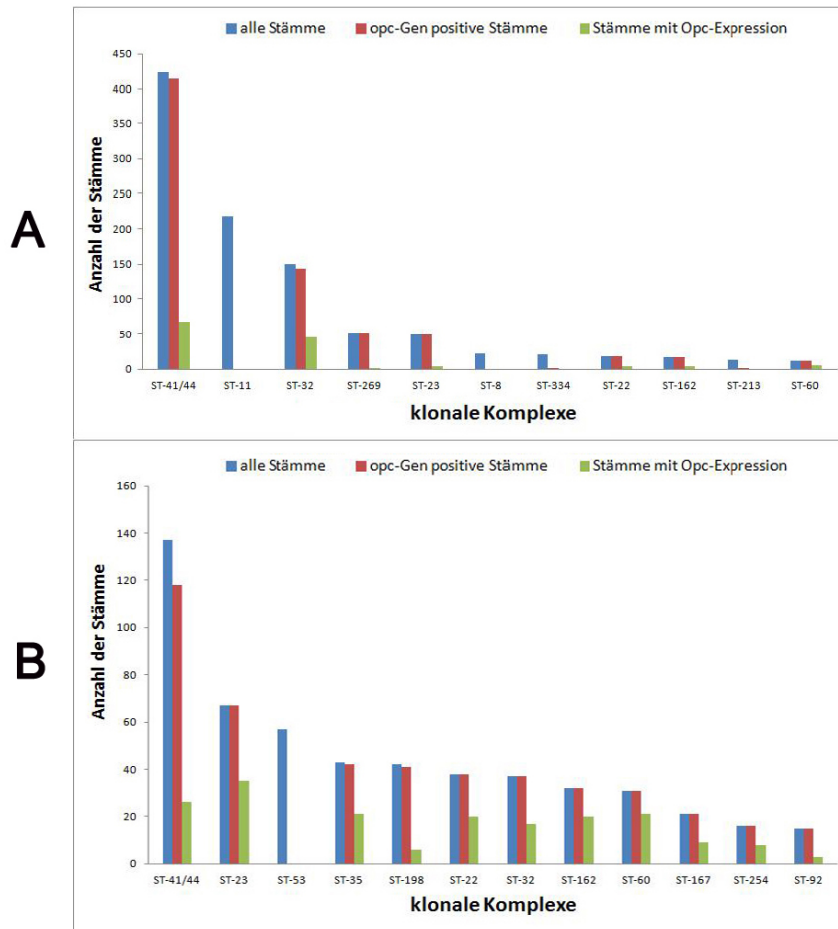


Abbildung 4.6: Gemessene bzw. anhand DNA-Sequenz vorhergesagte Opc-Expression bei invasiven bzw. Trägerisolaten. Die Stämme sind in klonalen Komplexen zusammengefasst. A: Invasive Stämme B: Trägerstämme

Der am häufigsten vertretene klonale Komplex ST-41/44 in der invasiven Stammsammlung zeigte eine Opc-Expressionsrate von 16% bezogen auf die Gesamtanzahl der ST-41/44-Stämme, was über der Opc-Expressionsrate (13%) in der gesamten invasiven Stammsammlung liegt.

Der klonale Komplex mit der höchsten Opc-Expressionsrate in der invasiven Stammsammlung war ST-60 (50%), der allerdings nur mit 12 Stämmen vertreten war. Der von den opc-Gen positiven klonalen Komplexen am zweithäufigsten vertretene klonale Komplex ST-32 zeigte eine Opc-Expressionsrate von 30%. Weitere klonale Komplexe mit überdurchschnittlichen Opc-Expressionsraten waren ST-162 (31%) und ST-22 (28%). Deren Gesamtanzahl in der Stammsammlung betrug jedoch nur 16 beziehungsweise 18 Stämme.

Wie in der Literatur beschrieben, waren alle ST-8 und ST-11-Stämme opc-negativ. Diese machten 21% aller invasiven Stämme aus.



Bei den Trägerstämmen zeigte der am häufigsten vertretene klonale Komplex ST-41/44 eine Opc-Expressionsrate von lediglich 19% bezogen auf die Gesamtanzahl der ST-41/44-Stämme, was der Hälfte der Opc-Expressionsrate (38%) in der opc-Gen positiven Trägerstammsammlung entspricht.

Klonale Komplexe mit einer hohen Opc-Expressionsrate in der Trägerstammsammlung waren ST-60 (68%) und ST-162 (63%). Der am zweithäufigsten vertretene klonale Komplex ST-23 zeigte eine Opc-Expressionsrate von 52%. Weitere klonale Komplexe mit überdurchschnittlich hohen Opc-Expressionsraten waren ST-22 (53%), ST-254 (50%), ST-35 (49%), ST-32 (45%) und ST-167 (43%).

#### 4.4.2 Vergleich invasive und Trägerstammkollektion

Bei den invasiven Stämmen hatten 71% das opc-Gen in ihrem Genom und 13% (aller invasiven Stämme) zeigten eine Expression des Opc-Proteins, wohingegen bei den Trägerstämmen 77% das opc-Gen in ihrem Genom hatten und 29% aller Trägerstämme eine (angenommene) Expression des Opc-Proteins zeigten. Somit war die Opc-Expression bei den Trägerstämmen signifikant (*Chi-Square-Test*:  $p < 0,001$ ) höher als die Opc-Expression bei den invasiven Stämmen. Einschränkend ist zu sagen, dass die tatsächliche Opc-Expression bei den Trägerstämmen nicht mittels ELISA überprüft, sondern ausschließlich auf der Basis der PolyC-Region im Promotor vorausgesagt wurde. Legt man die in Abb 4.5 dargelegten Zahlen zu Grunde, so lassen sich die über PolyC vorhergesagten Expressionsraten vergleichen. Sie liegen bei den invasiven Stämmen bei 86%. Somit kann auch unter Verwendung der Vorhersage der Opc-Expression anhand der DNA-Sequenz die Hypothese aufrecht erhalten werden, dass invasive Isolate deutlich seltener Opc exprimieren.

Die Trägerstämme wiesen im Vergleich zu den invasiven Stämmen somit sowohl eine höhere opc-Gen-Trägerrate (77% vs. 71%) als auch eine höhere Opc-Expressionsrate (29% vs. 13%) auf.

Hinsichtlich der Verteilung der klonalen Komplexe war beiden Stammsammlungen der hohe Anteil des klonalen Komplexes ST-41/44 (37% bei den invasiven beziehungsweise 17% bei den Trägerstämmen) gemeinsam. Der bei den Trägerstämmen nur verschwindend gering (<1%) vorkommende klonale Komplex ST-11 ist der zweithäufigste bei den invasiven Stämmen, er ist zu 100% negativ für das opc-Gen. Insgesamt zeigte die Trägerstammsammlung mit 33 verschiedenen klonalen Komplexen eine höhere Diversität als die invasive Stammsammlung (26 verschiedene klonale Komplexe) und das trotz der geringeren Gesamtanzahl an Stämmen (792 vs. 1141).

Die klonalen Komplexe ST-35, ST-60, ST-198 und ST-53 waren bei den Trägerstämmen sehr viel häufiger vertreten als bei den invasiven Stämmen, bei denen diese klonalen Komplexe nur in verschwindend geringer Anzahl repräsentiert waren. Dies ist insbesondere deswegen beachtlich, weil die bei den Trägerstämmen überrepräsentierten klonalen Komplexe durchwegs eine sehr hohe Rate an opc-Gen positiven Stämmen aufwiesen.

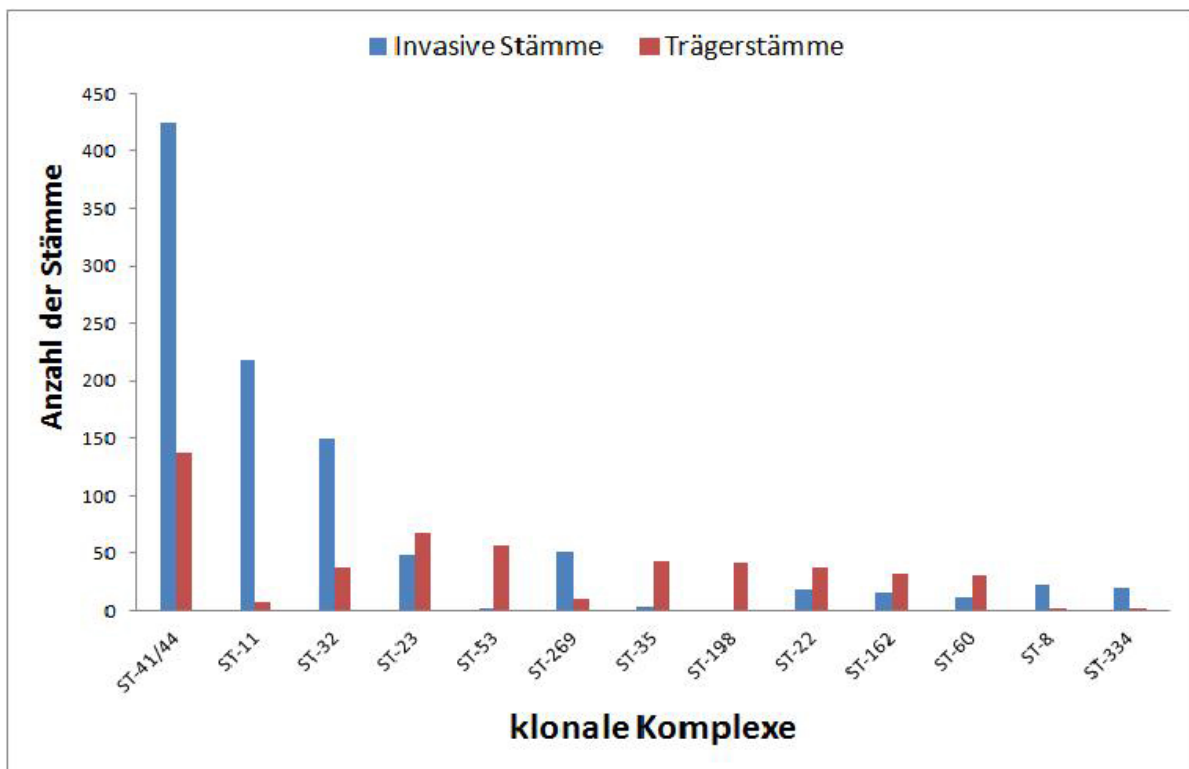


Abbildung 4.7: Anzahl der Stämme der jeweiligen klonalen Komplexe bei invasiven und Trägerstämmen

Vergleicht man die *Opc*-Expressionsraten der in beiden Stammsammlungen vertretenen klonalen Komplexe, so zeigten sich wesentlich höhere *Opc*-Expressionsraten bei den Trägerstämmen. Am deutlichsten war dieser Unterschied bei den Stämmen des ST-23-Komplex (8% *Opc*-Expressionsrate bei den invasiven Stämmen vs. 52% bei den Trägerstämmen), wobei 14 ST-23-Stämme bei den invasiven Stämmen *Opc* nicht exprimierten trotz einer Poly-C-Anzahl zwischen 11 und 14 (siehe oben).

Bei den klonalen Komplexen ST-162 und ST-22 zeigte sich eine doppelt so hohe *Opc*-Expressionsrate bei den Trägerstämmen als bei den invasiven Stämmen (62% vs. 31% bei ST-162 beziehungsweise 53% vs. 28% bei ST-22).

Der in beiden Stammsammlungen am zahlreichsten vertretene Komplex ST-41/44 zeigte vergleichbare *Opc*-Expressionsraten (16% bei den invasiven vs. 19% bei den Trägerstämmen).

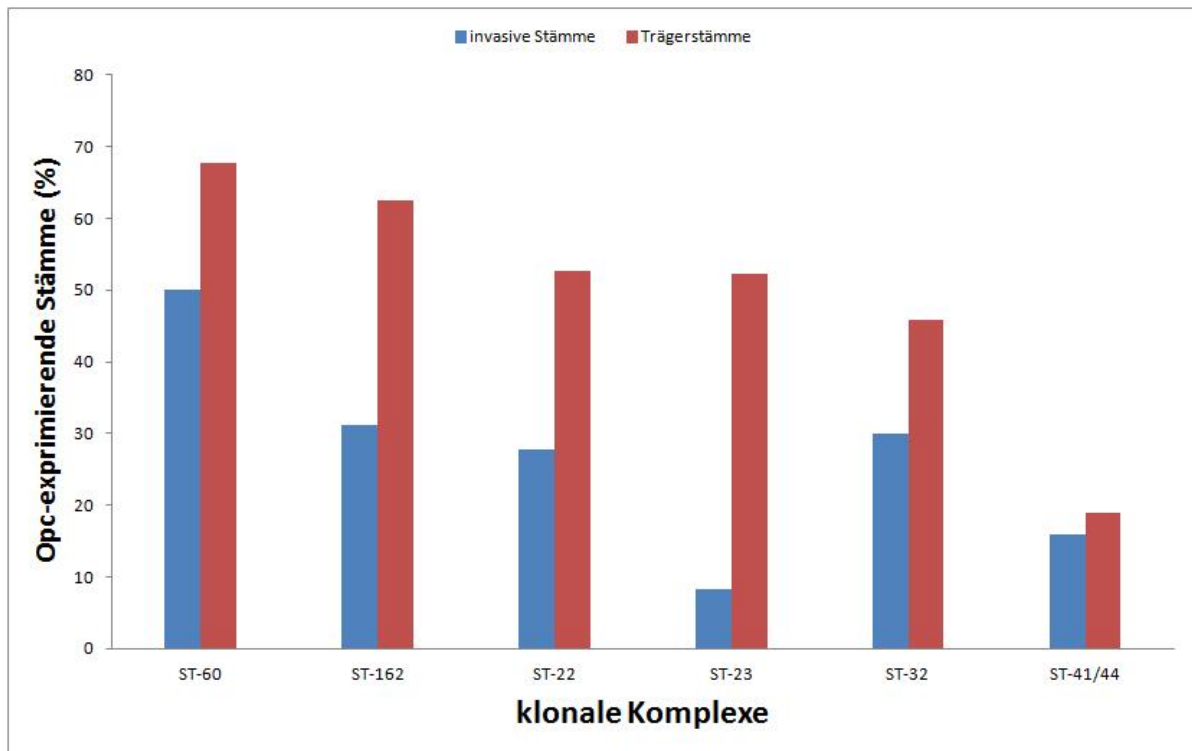


Abbildung 4.8: Darstellung der gemessenen bzw. anhand der DNA-Sequenz vorhergesagten Opc-Expressionsrate der einzelnen klonalen Komplexe bei invasiven und Trägerstämmen

## 4.5 Klinisches Bild bei opc-Gen positiven und negativen invasiven Stämmen

### 4.5.1 Klinisches Bild und Letalität der durch die invasiven Stämme verursachten Infektionsfälle

Wie in 1.3.1 beschrieben, wird mit der Meldung einer Meningokokkeninfektion nach Infektionsschutzgesetz auch die klinische Manifestation, sowie der Endpunkt der Infektion (letaler Ausgang oder nicht) an das RKI übermittelt. Diese Daten wurden vom Robert-Koch-Institut mit den invasiven Stämmen, die an das Nationale Referenzzentrum für Meningokokken geschickt wurden, gematcht (vgl. Hellenbrand *et al.*, 2012), so dass zu jedem der 1141 invasiven Stämme ein kompletter Datensatz vorlag.

Die klinische Manifestation der Infektion wurde in die vier Kategorien Meningitis, Sepsis, Waterhouse-Friderichsen-Syndrom (WFS) und keines dieser klinischen Bilder unterteilt.

In dem hier vorliegenden Datensatz trat in 38% der Fälle die Meningitis alleine auf, in 6,5% kombiniert mit Sepsis. Alle drei Krankheitsbilder zusammen wurden in 1,7%

der Fälle angegeben. Nach dem klinischen Bild der Meningitis trat die Sepsis mit 20% am zweithäufigsten als isoliertes Krankheitsbild auf. Von keinem der drei Krankheitsbilder wurde in 23,4% der Fälle berichtet. Das Waterhouse-Friderichsen-Syndrom war mit 6,3% am seltensten als isoliertes Krankheitsbild vertreten.

Tabelle 4.4: Prozentuale Verteilung des klinischen Bildes in der Patientenkohorte, von der die invasive Stammsammlung zusammengestellt wurde (WFS = Waterhouse-Friderichsen-Syndrom, Men = Meningitis, Sep = Sepsis)

Men	Sep	WFS	keines	WFS/Sep	WFS/Men	Men/Sep	WFS/Sep/Men
38%	20%	6%	23%	3%	1,7%	7%	2%

Insgesamt verliefen 116 (10,2%) von den insgesamt 1141 Infektionen letal. Bei 26 der 116 letalen Infektionen lag das klinische Bild der Meningitis vor, also in 22,4% der Fälle. In 52,6% der letalen Ausgänge lag ein Waterhouse-Friderichsen-Syndrom vor (insgesamt führten 44,5% aller WFS zum Tode). Das klinische Bild der Sepsis endete zu 19% tödlich. Bei 7% der letalen Ausgänge lag keines der drei Krankheitsbilder vor.

#### 4.5.2 Zusammenhang *opc*-Gen, *Opc*-Expression und klinisches Bild

Zur Untersuchung des Zusammenhangs der *Opc*-Expression mit dem klinischen Bild der Erkrankung wurden die Erkrankungsfälle in die Gruppen Meningitis und keine Meningitis eingeteilt. Es wurde davon ausgegangen, dass damit eine verlässliche Unterscheidung der Krankheitsbilder möglich war. 51% der *opc*-Gen positiven Stämme zeigten das klinische Bild der Meningitis, wohingegen es bei den *opc*-negativen Stämmen nur 37% waren. Das Vorhandensein des *opc*-Gens war also hochsignifikant (*Chi-square*-Test:  $p < 0,0001$ ) mit dem klinischen Bild der Meningitis assoziiert.

Tabelle 4.5: Vorhandensein des *opc*-Gens und klinisches Bild; der Ausdruck "keine Meningitis" fasst alle Fälle zusammen bei denen "Meningitis" als Diagnose nicht vorkam

<b><i>opc</i>-Gen</b>	<b>Stammanzahl</b>	<b>Meningitis</b>	<b>Keine Meningitis</b>
positiv	812	414	398
negativ	329	122	207

*Chi-square*-Test:  $p < 0,0001$

Betrachtete man jedoch die *Opc*-Expression, so trat das klinische Bild der Meningitis in 46% der Stämme mit *Opc*-Expression und in 47% der Stämme ohne *Opc*-Expression auf. Es ließ sich somit kein signifikanter Zusammenhang (*Chi-square*-Test:  $p < 0,911$ ) zwischen phänotypischer *Opc*-Expression und klinischem Bild der Meningitis erkennen.

Tabelle 4.6: Phänotypisch bestätigte in-vitro Opc-Expression und klinisches Bild; der Ausdruck “keine Meningitis“ fasst alle Fälle zusammen bei denen “Meningitis“ als Diagnose nicht vorkam

Opc-Expression	Anzahl Stämme	Meningitis	Keine Meningitis
Ja	152	70	82
Nein	989	466	523

*Chi-Square-Test: p<0,911*

### 4.5.3 Zusammenhang klonaler Komplex, Opc-Expression und klinisches Bild

Die beiden am häufigsten vertretenen klonalen Komplexe in der Stammsammlung ST-41/44 (37%) und ST-11 (19%) unterschieden sich grundlegend in Bezug auf das Vorhandensein von *opc*. ST-41/44 war zu 97,8% *opc*-positiv wohingegen ST-11 zu 100% *opc*-negativ war.

Im Hinblick auf das klinische Bild wiesen 50,7% der ST-41/44-Stämme und 36,7% der ST-11 Stämme eine Meningitis auf.

Die Meningitis-Rate der ST-41/44-Stämme, die das Opc-Protein tatsächlich exprimierten, lag bei 45,5%.

Eine ähnliche Verteilung wiesen auch die Stämme des klonalen Komplexes ST-32 auf, die zu 96% *opc*-positiv waren und eine Meningitis-Rate von 48,7% zeigten. Im Kollektiv der Opc-exprimierenden ST-32-Stämme lag die Meningitis-Häufigkeit bei 37,8%.

Auffallend war auch die überdurchschnittlich hohe Meningitis-Rate (58,8%) der zu 100% *opc*-positiven ST-269-Stämme, von denen jedoch nur 2% das Opc-Protein tatsächlich exprimierten.

Bezüglich des klonalen Komplexes zeigten strikt *opc*-negative Stämme (ST-11, ST-8) unterdurchschnittliche Meningitisraten (37,8%; 4,5%) und klonale Komplexe mit sehr hoher *opc*-Gen-Häufigkeit (ST-23: 100%, ST-269: 100%, ST-41/44: 97,8%) überdurchschnittlich viele Meningitis-Fälle (ST-23: 53%, ST-269: 58,8%, ST-41/44: 50,7%).

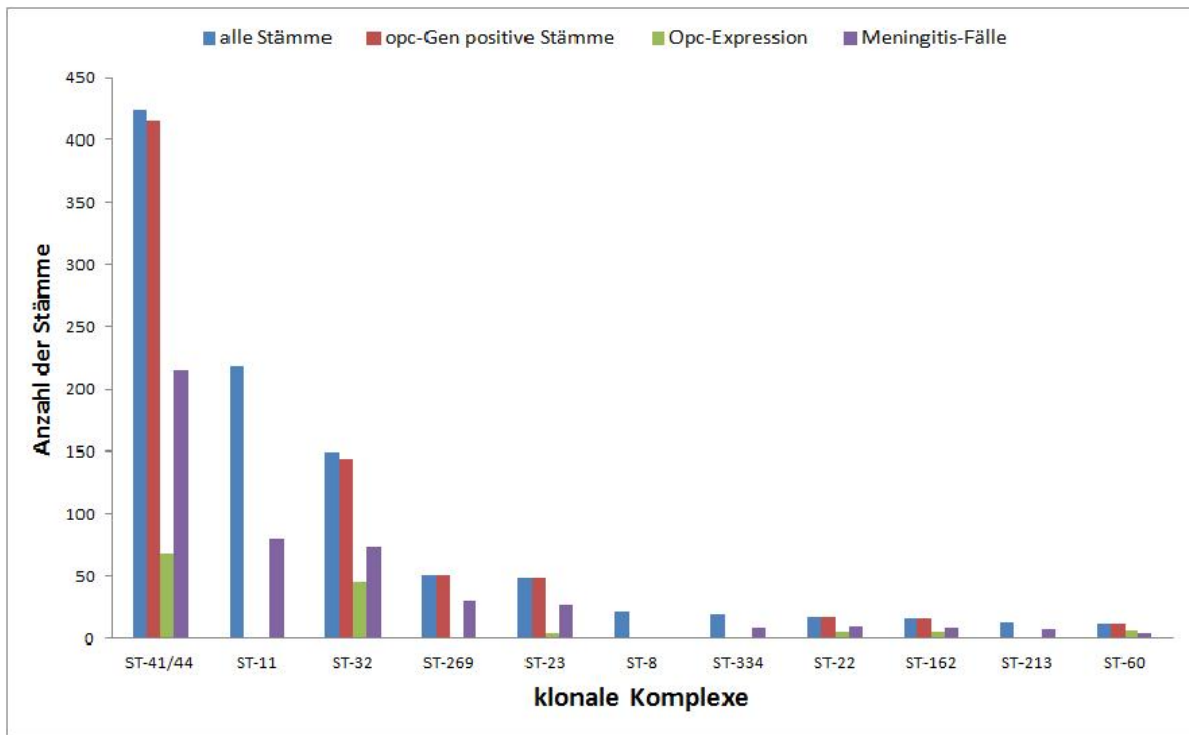


Abbildung 4.9: Anzahl der invasiven Stämme eines bestimmten klonalen Komplexes und die Anzahl der opc-Gen positiven Stämme innerhalb dieses klonalen Komplexes, dazu die Anzahl der Stämme mit Opc-Expression und die Anzahl der Meningitis-Fälle

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zwar das Vorhandensein des opc-Gens signifikant mit dem klinischen Bild der Meningitis verknüpft war, nicht jedoch die tatsächliche (in vitro) Opc-Expression. Hinsichtlich der Letalität wiesen 10% aller Stämme, die zu einer letalen Infektion führten, eine Opc-Expression auf.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Außenmembranproteins Opc in einem invasiven Meningokokken-Stammkollektiv von 1141 Stämmen und in einem Trägerstammkollektiv von 792 Stämmen untersucht. Die Funktion des Opc-Proteins wurde durch die Arbeit von Virji *et al.*, 1992 mit der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch Invasion von Endothel- und Epithelzellen in Verbindung gebracht und dadurch ein Zusammenhang zwischen dem klinischen Bild der Meningitis und der Opc-Expression postuliert. Den genauen molekularen Mechanismus der Invasion klärten Unkmeir *et al.*, 2002 und Sa E Cunha *et al.*, 2010 auf. Sie zeigten, dass Opc an sulphatierte Tyrosine von aktiviertem Vitronectin bindet, das wiederum an humane Endothelzellen im Gehirn bindet und durch diese Interaktion die Internalisation der Meningokokken in die Zelle begünstigt. In diesem Zusammenhang wurde auch ein Ausbleiben der Internalisation bei Stämmen des ST-11-Komplex festgestellt, denen das *opc*-Gen fehlte. Diese Erkenntnisse warfen die Vermutung auf, dass das Opc-Protein ein wesentlicher Faktor bei der Verursachung der Meningitis in Abgrenzung zu anderen durch Meningokokken verursachten Krankheitsbildern, wie beispielsweise Sepsis oder das Waterhouse-Friderichsen-Syndrom sein könnte. Wäre dies der Fall, so würde das Opc-Protein als Antigen in einem Kombinationsimpfstoff an Bedeutung gewinnen, wie Keiser *et al.*, 2010 es formulierten. Diese These wurde auch von Sa E Cunha *et al.*, 2010 unterstützt, die in ihrer Arbeit zeigten, dass der monoklonale Anti-Opc Antikörper B306 sowohl die indirekte als auch die direkte Interaktion von Opc mit Vitronectin verhindert und bakterizid wirkt.

Die bisherigen Untersuchungen zur Funktion von Opc wurden mit wenigen Meningokokkenstämmen durchgeführt, von denen nicht auszugehen ist, dass sie die Meningokokkenpopulation repräsentieren. Folglich verfolgte die vorliegende Arbeit u.a. die Klärung der Frage, wie viele invasive Meningokokkenstämme überhaupt *opc*-positiv sind und wie viele davon das Opc-Protein exprimieren. Ferner sollte die Frage geklärt werden, ob die Expression in Stämmen von Patienten mit, beziehungsweise ohne Meningitis, differiert. Zusätzlich sollte die Opc-Expression zwischen invasiven und Trägerstämmen verglichen werden, um weiteren Aufschluss über die Bedeutung des Opc-Proteins zu erhalten.

Die Stammsammlung der invasiven Stämme wurde auf ihre epidemiologischen Merkmale hin untersucht. Die Altersverteilung der erkrankten Patienten ergab zwei Inzidenzgipfel mit dem ersten, größeren Gipfel zwischen dem 1. und dem 4. Lebensjahr und dem zweiten Gipfel zwischen dem 15. und dem 19. Lebensjahr. Nach dem 20. Lebensjahr fiel die Inzidenz ab und blieb auf niedrigem Niveau konstant. Dieser Verlauf spiegelt die für Meningokokkeninfektionen bekannte Altersverteilung in Deutschland wider (Epidemiolo-

gisches Bulletin Nr. 39, 2012, Robert-Koch-Institut). In den USA ist ein ähnlicher Verlauf zu beobachten. Hier ist die Inzidenz bei unter Einjährigen am höchsten, es kommt zu einem Gipfel zwischen 15 und 20 und fällt dann linear mit fortschreitendem Alter ab, bis es mit über 65 Jahren wieder zu einem Anstieg kommt (Harrison, 2010).

Bei der Häufigkeitsverteilung der Serogruppen innerhalb der invasiven Stammsammlung zeigte sich ein Dominieren der Serogruppe B mit 66% und der Serogruppe C mit 23%. Die Serogruppen W und Y waren mit 4% bzw. 6% vertreten. Diese Verteilung ist seit einigen Jahren geographisch charakteristisch für Europa, in den USA beispielsweise dominiert die Serogruppe Y, wohingegen im Meningokokkengürtel in Afrika die Serogruppe A die am häufigsten vertretene Serogruppe ist (Harrison, 2010).

Bei der Verteilung der klonalen Komplexe im Datensatz der deutschen invasiven Isolate dominieren der ST-41/44-Komplex mit 37 % und der ST-11 beziehungsweise der ST-32 Komplex mit 19% beziehungsweise 13%. 10% der Stämme gehörten keinem klonalen Komplex an. Die Verteilung der klonalen Komplexe ist geographisch sehr unterschiedlich. Die Alters-, die Serogruppen- und die Verteilung der klonalen Komplexe legen nahe, dass die Stammauswahl der invasiven Isolate einen repräsentativen Querschnitt erfasst hat (Elias *et al.*, 2006). Auch wenn die Jahre heterogen verteilt waren, da in unterschiedlichen Jahren ein unterschiedlicher Anteil der Stämme einer MLST unterzogen wurde, war das Auswahlverfahren für die MLST so gehalten, dass die repräsentativen Verteilungen erzielt werden konnten.

Auf Grund der Meldedaten gemäß Infektionsschutzgesetz wurde das klinische Bild der verursachten Infektionen in die vier Rubriken Meningitis, Sepsis, Waterhouse-Friderichsen-Syndrom und anderes Krankheitsbild unterteilt. Auch Kombinationen aus mehreren Krankheitsbildern traten auf. Das häufigste Krankheitsbild war dasjenige der Meningitis, die in 38,1% der Fälle alleine und in 6,5% kombiniert mit Sepsis auftrat. Das Waterhouse-Friderichsen-Syndrom trat zu 12% auf. Diese prozentuale Verteilung ist ähnlich der im ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) Bericht von 2012 beschriebenen Verteilung in Europa. Dieser gibt die Meningitis in 40% und das Waterhouse-Friderichsen-Syndrom in 15% aller Fälle an. Kritisch zu hinterfragen ist hierbei die Validität der Angaben der klinischen Bilder, die mit der Meldung der Meningokokkeninfektion an das Robert-Koch-Institut gemäß des Infektionsschutzgesetzes übermittelt wurden: Wie zuverlässig wurden Waterhouse-Friderichsen-Syndrom und Sepsis voneinander abgegrenzt, wie wurde die Diagnose der Meningokokken-Meningitis gestellt, wurde bei Meningitis mit Sepsis auch die Sepsiskomponente übermittelt? Dies alles sind Punkte, die bei der Betrachtung der Daten zu berücksichtigen sind, die bei Meldedaten allerdings retrospektiv im einzelnen Fall schwer nachvollzogen werden können. Diese Gedanken werden so auch im Epidemiologischen Bulletin Nr. 39, 2012 formuliert. Der dichotome Endpunkt der Erkrankung in letal oder nicht ist im Gegensatz dazu ein verlässliches Resultat. Von den betrachteten 1141 invasiven Erkrankungen führten 116 zum Tod, was 10,2% entspricht. Die europaweit berichtete Letalität von Meningokokkeninfektionen beträgt 8% (Trotter *et al.*, 2007).



812 der 1141 invasiven Stämme wiesen das *opc*-Gen in ihrem Genom auf, was einem Anteil von 71,2% entspricht, den restlichen 329 Stämmen fehlte das *opc*-Gen.

Die Korrelation zwischen vorhandenem *opc*-Gen und dem klinischen Bild der Meningitis verglichen mit derjenigen bei *opc*-negativen Stämmen ergab einen hoch signifikant (*Chi-Square*-Test:  $p < 0.0001$ ) höheren Anteil von Meningitis-Fällen bei denjenigen Stämmen, die das *opc*-Gen in ihrem Genom aufwiesen (51%) im Gegensatz zu denjenigen Stämmen, denen das *opc*-Gen in ihrem Genom fehlte (37%). Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung von Keiser et al., 2010, dass ein Zusammenhang zwischen *Opc* und dem klinischen Bild der Meningitis besteht. Allerdings muss man auch der Tatsache Rechnung tragen, dass ein vorhandenes *opc*-Gen nicht gleichzeitig auch eine Expression des *Opc*-Proteins bedeutet. Sarkari *et al.* klärten 1994 die Regulation der Expression des Proteins auf. Maßgebliche Rolle spielt dabei ein Poly-Cytidin-Bereich im Promotor des *opc*-Gens. Je nach Anzahl der Cs wird durch diesen Mechanismus die Expression des *Opc*-Proteins beeinflusst. Sarkari wies nach, dass bei einer C-Anzahl von 10 oder weniger, beziehungsweise von 15 oder mehr, keine Expression des *Opc*-Proteins trotz vorhandenem *opc*-Gens stattfand. Bei einer C-Anzahl von 11 und 14 postulierte sie eine schwache *Opc*-Expression, bei einer C-Anzahl von 12 und 13 eine ausgeprägte *Opc*-Expression. Dieser Tatbestand wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Durchführung eines ELISA bei allen Stämmen mit einer C-Anzahl von 11-14 im Promotor und einer Stichprobe von jeweils vier Stämmen pro C-Anzahl von 6-13 und 15-18 bewiesen.

Legt man nun, basierend auf den vorhergehend erläuterten Gründen, eine C-Anzahl von 11-14 als Maßstab für eine *Opc*-Expression zu Grunde, so ergeben sich nur 176 Stämme, was einem Anteil von 21,7% der *opc*-Gen positiven und 15,4% aller 1141 Stämme entspricht. Jedoch zeigte sich keine *Opc*-Expression bei 24 dieser 176 Stämme (siehe unten).

Betrachtet man nun den Meningitis-Anteil innerhalb der 152 Stämme, die *Opc* tatsächlich exprimieren (46 %) und vergleicht man diesen mit dem Anteil innerhalb der restlichen 989 Stämme (47%), so ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen Meningitis und *Opc*-Expression (*Chi-Square*-Test:  $p < 0,9$ ).

Die meisten Meningitis-Isolate ( $n=242$ ) wiesen eine C-Anzahl von 7-9 im Promotor auf, was bezogen auf die Gesamtanzahl der Stämme, die eine C-Anzahl von 7-9 im Promotor haben ( $n=442$ ), einem Anteil von 54% entspricht.

Herauszuheben in der vorliegenden Stammsammlung ist dabei die große Anzahl von Stämmen (218), die zum ST-11-Komplex gehören und die alle - ohne Ausnahme - negativ für das *opc*-Gen sind und zu 36% das klinische Bild der Meningitis aufweisen, wohingegen nahezu alle ST-41/44-Komplexe (97%) das *opc*-Gen aufweisen und hier eine Meningitisrate von 50% zu beobachten ist. Diesen Zusammenhang stellte auch schon Virji *et al.*, 1992 her. Allerdings ergab sich dann bei der Analyse der tatsächlichen *Opc*-Expression in der hier vorliegenden Stammsammlung gegenüber den Stämmen mit *opc*-Gen aber ohne Expression plus der Stämme ohne *opc*-Gen kein signifikanter Unterschied (*Chi-Square*-Test:  $p < 0,9$ ) im Zusammenhang mit Meningitis.

Anzumerken ist an dieser Stelle, dass die *Opc*-Expression in Korrelation zur C-Anzahl im Promotor in dieser Arbeit *in vitro* gemessen wurde. Die Befunde, dass es eine Korrela-

tion von Meningitis mit *opc*-Gen, nicht jedoch mit *in vitro* gemessener *Opc*-Expression gibt, legen nahe dass weiterführende Untersuchungen zur Klärung der Frage, ob sich die *Opc*-Expression *in vitro* deutlich von derjenigen *in vivo* unterscheidet, durchgeführt werden sollten. Als Beispiel ist hier das Protein *NadA* zu nennen, dass *in vivo* deutlich abweichende Expressionsraten zeigt wie *in vitro* (Fagnocchi *et al.*, 2013).

Überraschenderweise waren 24 der 176 Stämme, die gemäß der Anzahl der Cs im *opc*-Promotor im ELISA eine *Opc*-Expression zeigen sollten, dies aber nicht taten. Das ELISA-Ergebnis wurde durch Westernblot bestätigt. Auf der Suche nach dem ursächlichen Mechanismus für dieses Ergebnis wurde das komplette *opc*-Gen dieser 24 Stämme sequenziert. Dabei zeigte sich, dass es 231 Basenpaare nach dem Startcodon im *opc*-Gen einen Poly-Adenin-Bereich gab, der bei Stämmen, die das *Opc*-Protein exprimierten, aus 8 A-Wiederholungen bestand, wohingegen bei 14 der 24 Stämme ohne Expression hier nur 7 A-Wiederholungen zu finden waren, was eine Leserasterverschiebung zur Folge hatte. 13 dieser 14 Stämme waren dem ST-23-Komplex zuzuordnen und ein Stamm dem ST-44/41-Komplex. Bei den restlichen 10 Stämmen konnte der Mechanismus für die ausbleibende Expression auf der Sequenzebene des *opc*-Gens nicht geklärt werden.

Außer den invasiven Stämmen wurden Meningokokken-Trägerstämme, die zwischen 1999 und 2000 in Kindergärten, Schulen und Kasernen in Bayern isoliert worden waren (Claus *et al.*, 2005), auf deren Serogruppen- und klonale Komplex-Verteilung sowie auf Merkmale, die *Opc*-Expression betreffend, hin untersucht.

Das Alter der Probanden bewegte sich hierbei in einem engeren Spektrum (3 bis 25 Jahre) als dasjenige der invasiven Stämme. So betrug das Alter des ältesten Probanden 25. 54% der Probanden hatten ein Alter von 17-20. Diese Gegebenheit ist vor allem der Tatsache geschuldet, dass die Trägerrate innerhalb dieser Altersgruppe am höchsten ist.

Die Verteilung der klonalen Komplexe ist bei der Trägerstammsammlung wesentlich diverser als bei der Sammlung der invasiven Stämme. 20% waren keinem klonalen Komplex zuzuordnen und damit doppelt so viele wie bei den invasiven Isolaten. Den größten Anteil hatte der klonale Komplex ST-41/44 mit 17%. Darauf folgten ST-23 mit 9% und ST-53 mit 7%. In einer Studie (Climent *et al.*, 2010) mit 127 apathogenen Trägern in Kuba, ergab sich über die Jahre 1993 - 2005 eine Verteilung von 44% ST-53, 27% ST-32 und 7% ST-41/44. Auch hier war eine wesentlich größere Diversität im Vergleich zu den in diesem Zeitraum erfassten invasiven Stämmen zu finden.

Bei den Serogruppen dominierte die Serogruppe B mit 31%, gefolgt von der Serogruppe Y mit 8%, sowie Serogruppe E, W und C mit 4%, 3% bzw. 2%. Bei 36% der Stämme war die Serogruppe nicht bestimmbar und 16% wiesen konstitutiv keine Kapsel auf. Andersen *et al.*, 1998, die Abstriche bei 670 dänischen Militärrekruten entnommen hatten, berichteten von einer Serogruppenverteilung von 31% B, 6,5% C und 4% Y. 44% wurden als “*non-groupable*“ klassifiziert.

Von den 792 Trägerstämmen hatten 608 das *opc*-Gen, was einem Anteil von 77%

entspricht. Dies ist ein signifikanter Unterschied (*Chi-Square*-Test:  $p < 0,003$ ) zu den invasiven Stämmen, die einen Anteil von 71% an *opc*-Gen positiven Stämmen hatten. Was die angenommene Expression von *Opc* betrifft, haben 230 der 608 Stämme mit *opc*-Gen eine C-Anzahl von 11-14, was einem Anteil von 38% aller *opc*-Gen positiver Stämme und 29% aller Trägerstämme entspricht. Auch dieser Anteil ist signifikant (*Chi-Square*-Test:  $p < 0,001$ ) höher als derjenige bei den invasiven Stämmen (18,7% aller *opc*-Gen positiver Stämme und 13,3% aller invasiver Stämme). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass das *Opc*-Protein auch bei der Adhäsion am Rachenepithel eine Rolle spielen könnte, was durch die molekulare Interaktion mit Integrinen, wie von Unkmeir *et al.*, 2002 beschrieben, ermöglicht wird (Hill *et al.*, 2010).

Vergleicht man die *Opc*-Expressionsraten des klonalen Komplexes ST-41/44 bei Träger- und invasiven Stämmen, so ergeben sich vergleichbare Ergebnisse ohne signifikanten Unterschied (*Chi-square*-Test:  $p < 0,501$ ) mit 16% *Opc*-Expressionsrate bei den invasiven ST-41/44-Stämmen gegenüber einer 19%igen *Opc*-Expressionsrate bei den ST-41/44-Trägerstämmen.

Die höhere *Opc*-Expressionsrate bei den Trägerstämmen basiert folglich auch auf einer Überrepräsentation bestimmter klonaler Komplexe (ST-23, ST-35, ST-198) mit sehr hoher Rate an *Opc*-Expression.

Limitationen der Studie:

1. Nur deutsche Stämme flossen in die Analyse ein. Somit standen z.B. Stämme aus den afrikanischen Serogruppe A Linien nicht zur Verfügung.
2. Die Trägerisolate sind alle in Bayern gesammelt worden und entstammen einer einzigen Abstrichkampagne.
3. Die phänotypische Expressionsanalyse musste sich auf die invasiven Isolate beschränken, sodass die Vergleiche schwierig waren.
4. Es konnte lediglich die *in vitro* Expression gemessen werden. Daten zur *in vivo* Expression wären von großem Interesse, da die Assoziation des homopolymeren C Traktes mit der Diagnose Meningitis nahelegt, dass auch *in vitro* nicht permissive Poly-C Trakte mit Expression assoziiert sind.
5. Die Qualität der klinischen Meldedaten kann durch das Robert Koch-Institut nur beschränkt validiert werden.

Zukünftiger Forschungsbedarf:

1. Mittels mittlerweile verfügbarer humanisierter Tiermodelle sollte die *in vivo* Expression von *Opc* analysiert werden.
2. Seroprävalenzstudien sollten die Auseinandersetzung des Immunsystems mit *Opc* während einer invasiven Infektion oder beim Trägertum analysieren lassen.
3. Die Effektivität von *Opc* als Impfstoffkomponente sollte mithilfe von repräsentativen Stammsammlungen wie den hier beschriebenen z.B. in humanisierten Tiermodellen untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung

Das Opc-Protein ist ein Außenmembranprotein von Meningokokken, das über extrazelluläre Matrixproteine mit Integrinen der Wirtszelle interagiert. Opc ist in Menschen immunogen und induziert bakterizide Antikörper. Das Opc-Protein wurde daher als aussichtsreicher Impfstoff-Kandidat angesehen, da es außerdem relativ gut konserviert ist. Allerdings wird das Opc-Protein nicht von allen Meningokokkenstämmen exprimiert. Einerseits fehlt das *opc*-Gen in einigen klonalen Komplexen (z.B. ST-8, ST-11, ST-53), andererseits ist die Opc-Expression nicht konstitutiv wegen einer phasenvariablen Transkription, die auf einem Poly-Cytidin-Bereich im Promotor des *opc*-Gens beruht. In dieser Arbeit wurde die Präsenz des *opc*-Gens und die Opc-Expression in zwei großen Sammlungen deutscher Meningokokkenisolate von invasiven Erkrankungen (n=1141) und gesunden Trägern (n=792) untersucht.

Das *opc*-Gen war bei 71% der invasiven und 77% der Trägerstämmen nachweisbar. Der größte Teil der *opc*-Gen negativen Stämme gehörte zu den klonalen Komplexen ST-8, ST-11, ST-213, ST-231, ST-334 und ST-53.

Der Anteil *opc*-positiver Stämme, die Opc *in vitro* exprimieren, war bei den invasiven Stämmen kleiner als bei den Trägerstämmen (13% vs. 29%,  $p < 0,001$ , *Chi-square*-Test). Der größere Anteil Opc-exprimierender Trägerstämmen ist u.a. am ehesten mit der Überrepräsentation von wenig pathogenen klonalen Komplexen (ST-23, ST-35, ST-198) mit einer hohen Opc-Expressionsrate zu erklären.

24 von den 176 invasiven Stämmen mit einer Anzahl von 11 - 14 Cs in der Promotor-Region, die die Opc-Expression begünstigt, zeigten weder im ELISA noch im Westernblot eine Opc-Expression. Bei 14 dieser 24 Stämme wurde als Ursache ein phasenvariabler, intragenischer Poly-Adenin-Bereich identifiziert, der zu einer Leserasterverschiebung führte.

Die Vermutung mehrerer Autoren, dass die Opc-Expression mit dem klinischen Bild der Meningitis verknüpft ist, konnte mit der hier genutzten großen Stammsammlung nicht bestätigt werden. Invasive Stämme, die das Opc-Protein exprimierten, wurden genauso häufig von Patienten mit dem klinischen Bild der Meningitis isoliert wie Stämme, die das Opc-Protein nicht exprimierten (46% vs. 47%, *Chi-square*-Test:  $p < 0,9$ ). Allerdings gibt es eine starke Assoziation der Gegenwart des *opc*-Gens mit dem klinischen Merkmal Meningitis. Dieser Befund gibt Anlass zu der Hypothese, dass *in vitro* und *in vivo* Expression von Opc sich unterscheiden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Opc-Protein nur in 19,8% aller Isolate (invasive und Trägerstämmen zusammengenommen) exprimiert wurde. Es zeigte sich eine Tendenz zu häufigerer Opc-Expression in apathogenen Trägerisolaten. Das Vorhandensein des *opc*-Gens, nicht aber die *in vitro* Expression konnten mit dem klinischen

Merkmal Meningitis assoziiert werden. Zusätzlich wurde ein weiterer Mechanismus der intragenischen Phasenvariation beschrieben.

# Literaturverzeichnis

**Abdullahi, H. and Poolman, J. T.:** *Whole-cell ELISA for typing. Neisseria meningitidis with monoclonal antibodies.*, FEMS Microbiol. Lett. 48 (1987): 367-371.

**Achtman M,** Neibert M, Crowe BA, Strittmatter W, Kusecek B, Weyse E, Walsh MJ, Slawig B, Morelli G, Moll A, et al.: *Purification and characterization of eight class 5 outer membrane protein variants from a clone of Neisseria meningitidis serogroup A.*, J Exp Med. 1988 Aug 1;168(2):507-25.

**Ala'Aldeen DA,** Wall RA, Borriello SP: *Immunogenicity and cross-reactivity of the 70-Kda iron-regulated protein of Neisseria meningitidis in man and animals.* (1990) J Med Microbiol 32: 275–281.

**Alamro M** Bidmos FA, Chan H, Oldfield NJ, Newton E, Bai X, Aidley J, Care R, Mattick C, Turner DP, Neal KR, Ala'aldeen DA, Feavers I, Borrow R, Bayliss CD: *Phase variation mediates reductions in expression of surface proteins during persistent meningococcal carriage.*, Infect Immun. 2014 Jun;82(6):2472-84. doi: 10.1128/IAI.01521-14. Epub 2014 Mar 31.

**Andersen J.,** L. Berthelsen, B. Bech Jensen, I. Lind, *Dynamics of the meningococcal carrier state and characteristics of the carrier strains: a longitudinal study within three cohorts of military recruits*, Epidemiol. Infect. (1998), 121, 85-94.

**Bai X,** Borrow R., *Genetic shifts of Neisseria meningitidis serogroup B antigens and the quest for a broadly cross-protective vaccine.*, Expert Rev Vaccines. 2010 Oct;9(10):1203-17.

**Bayliss** Christopher D, J. Claire Hoe, Katherine Makepeace, Patricia Martin, Derek W. Hood, E. Richard Moxon, *Neisseria meningitidis escape from the bactericidal activity of a monoclonal antibody is mediated by phase variation of lgtG and enhanced by a mutator phenotype.*, Infect Immun. Nov 2008; 76(11): 5038–5048.

**Bentley** Stephen D, George S Vernikos, Lori A. S Snyder, Carol Churcher, Claire Arrowsmith, Tracey Chillingworth, Ann Cronin, Paul H Davis, Nancy E Holroyd, Kay Jagels, Mark Maddison, Sharon Moule, Ester Rabinowitsch, Sarah Sharp, Louise Unwin, Sally Whitehead, Michael A Quail, Mark Achtman, Bart Barrell, Nigel J Saunders, and Julian Parkhill, *Meningococcal genetic variation mechanisms viewed through comparative analysis of serogroup C strain FAM18.*, PLoS Genet. Feb 2007; 3(2): e23.

**Blackwell**, C. C., D. M. Weir, V. S. James, W. T. Todd, N. Banatvala, A. K. Chaudhuri, H. G. Gray, E. J. Thomson & R. J. Fallon, *Secretor status, smoking and carriage of Neisseria meningitidis.*, Epidemiol Infect (1990) 104: 203-209.

**Bowler**, L. D., Q Y Zhang, J Y Riou, 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. (1994) vol. 176 no. 2, 333-337.

**Brehony C** Caroline L. Trotter, Mary E. Ramsay, Manosree Chandra, Keith A. Jolley, Arie van der Ende, Françoise Carion, Lene Berthelsen, Steen Hoffmann, Hjördís Harðardóttir, Julio A. Vazquez, Karen Murphy, Maija Toropainen, Manuela Caniça, Eugenia Ferreira, Mathew Diggle, Giles F. Edwards, Muhamed-Kheir Taha, Paola Stefanelli, Paula Kriz, Steve J. Gray, Andrew J. Fox, Susanne Jacobsson, Heike Claus, Ulrich Vogel, Georgina Tzanakaki, Sigrid Heuberger, Dominique A. Caugant, Matthias Frosch, and Martin C. J. Maiden., *Implications of Differential Age Distribution of Disease-Associated Meningococcal Lineages for Vaccine Development*, Clin Vaccine Immunol. 2014 Jun; 21(6): 847–853.

**Carson** SDB, Klebba PE, Newton SMC, Sparling PF, *Ferric enterobactin binding and utilization by Neisseria gonorrhoeae.*, (1999) J Bacteriol 181: 2895–2901.

**Cartwright**, K. A., J. M. Stuart, D. M. Jones & N. D. Noah, *The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and Neisseria lactamica.*, Epidemiol Infect (1987) 99: 591-601.

**Caugant**, D. A., Tzanakaki G, Kriz P., *Lessons from meningococcal carriage studies.*, FEMS Microbiol Rev. 2007 Jan;31(1):52-63.

**Caugant**, D. A., E. A. Hoiby, P. Magnus, O. Scheel, T. Hoel, G. Bjune, E. Wedege, J. Eng & L. O. Froholm, *Asymptomatic carriage of Neisseria meningitidis in a randomly sampled population.*, J Clin Microbiol (1994) 32: 323-330.

**Cehovin** A, Simpson PJ, McDowell MA, Brown DR, Noschese R, Pallett M, Brady J, Baldwin GS, Lea SM, Matthews SJ, Pelicic V, *Specific DNA recognition mediated by a type IV pilin.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Feb 19;110(8):3065-70.

**Claus H**, Maiden MC, Wilson DJ, McCarthy ND, Jolley KA, Urwin R, Hessler F, Frosch M, Vogel U., *Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults.*, J Infect Dis. 2005 Apr 15;191(8):1263-71. Epub 2005 Mar 15.

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

**Climent Y.**, D. Yero, I. Martinez, A. Martín, K. A. Jolley, F. Sotolongo, M. C. J. Maiden, R. Urwin, R. Pajón, *Clonal distribution of disease-associated and healthy carrier*

*isolates of Neisseria meningitidis between 1983 and 2005 in Cuba.*, J Clin Microbiol. 2010 March; 48(3): 802–810.

**Danielson**, L. & E. Mann, *Medical and Agricultural Register* (1806) 1: 65-69.

**Elias** J, Dag Harmsen, Heike Claus, Wiebke Hellenbrand, Matthias Frosch, Ulrich Vogel, *Spatiotemporal Analysis of Invasive Meningococcal Disease in Germany*, Emerg Infect Dis. 2006 Nov; 12(11): 1689–1695.

**Elias** J. & Schouls LM, van de Pol I, Keijzers WC, Martin DR, et al., *Vaccine preventability of meningococcal clone, Greater Aachen Region, Germany.*, Emerg Infect Dis (2010) 16: 465–472.

***Epidemiologisches Bulletin***, Nr.39, 2012, Robert-Koch-Institut

**Fagnocchi** L, Biolchi A, Ferlicca F, Boccadifuoco G, Brunelli B, Brier S, Norais N, Chiarot E, Bensi G, Kroll JS, Pizza M, Donnelly J, Giuliani MM, Delany I, *Transcriptional regulation of the nadA gene in Neisseria meningitidis impacts the prediction of coverage of a multicomponent meningococcal serogroup B vaccine.*, Infect Immun. 2013 Feb;81(2):560-9.

**Frasch**, C. E., Zollinger, W. D., Poolman, J. T., *Serotype antigens of Neisseria meningitidis and a proposed scheme for designation of serotypes.*, Rev. Infect. Dis. 7, 4 (1985), 504–10.

**Griffiths** NJ Hill DJ, Borodina E, Sessions RB, Devos NI, et al. (2011) *Meningococcal surface fibril (Msf) binds to activated vitronectin and inhibits the terminal complement pathway to increase serum resistance.* Mol Microbiol 82: 1129–1149

**Harrison**, L. H., C. L. Trotter & M. E. Ramsay, *Global epidemiology of meningococcal disease.*, Vaccine (2009) 27 Suppl 2: B51-63.

**Harrison**, L. H., *Epidemiological profile of meningococcal disease in the United States.*, Clin Infect Dis. 2010 March 1; 50(S2): S37.

**Harrison**, Claus H, Jiang Y, Bennett JS, Bratcher HB, Jolley KA, Corton C, Care R, Poolman JT, Zollinger WD, Frasn CE, Stephens DS, Feavers I, Frosch M, Parkhill J, Vogel U, Quail MA, Bentley SD, Maiden MC, *Description and nomenclature of Neisseria meningitidis capsule locus.*, Emerg Infect Dis. 2013 Apr;19(4):566-73. doi: 10.3201/eid1904.111799.

**Hellenbrand**, W., Elias J., Wichmann O., Dehnert M., Frosch M., Vogel U., *Epidemiology of invasive meningococcal disease in Germany, 2002-2010, and impact of vaccination with meningococcal C conjugate vaccine.*, Journal of Infection (2013) 66, 48-56.

**Hill**, Darryl J., N. J. Griffiths, E. Borodina, M. Virji, *Cellular and molecular biology of Neisseria meningitidis colonization and invasive disease.*, Clin Sci (Lond). 2010 February 9; 118(Pt 9): 547–564.



**Huang KC**, Mukhopadhyay R, Wen B, Gitai Z, Wingreen NS, *Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 9;105(49):19282-7. doi: 10.1073/pnas.0805309105. Epub 2008 Dec 2.

**Hubert, K.**, Pawlik, Claus, Jarva, Meri, Vogel, *Opc expression, LPS immunotype switch and pilin conversion contribute to serum resistance of unencapsulated meningococci.*, PLoS One. 2012; 7(9): e45132.

**Jolley, K. A.**, C. Brehony & M. C. Maiden, *Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature.*, FEMS Microbiol Rev (2007) 31: 89-96.

**Jolley KA**, Maiden MC, *Automated extraction of typing information for bacterial pathogens from whole genome sequence data: Neisseria meningitidis as an exemplar.*, Euro Surveill. 2013 Jan 24;18(4):20379.

**James, D., Cartwright, K. ( Ed. )**: *Meningococcal disease.* John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England (1995)144-158.

**Källström H**, Md. Shahidul Islam, Per-Olof Berggren, Ann-Beth Jonsson, *Cell Signaling by the Type IV Pili of Pathogenic Neisseria*, The Journal of Biological Chemistry,(1998), 273, 21777-21782.

**Keiser, PB**, Gibbs BT, Coster TS, Moran EE, Stoddard MB, Labrie JE 3rd, Schmiel DH, Pinto V, Chen P, Zollinger WD., *A phase 1 study of a group B meningococcal native outer membrane vesicle vaccine made from a strain with deleted lpxL2 and synX and stable expression of opcA.*, Vaccine. 2010 Oct 8;28(43):6970-6.

**Klebba, PE**, *The porinologist.*, J Bacteriol. 2005 December; 187(24): 8232–8236.

**Lujan, R.**, Q. Y. Zhang, J. A. Saez Nieto, D. M. Jones, 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., (1991) 35 (2):300-304.

**Maiden, M. C.**, J., Suker, J., McKenna, A. J., Bygraves, J. A., Feavers, I. M., *Comparison of the class 1 outer membrane proteins of eight serological reference strains of Neisseria meningitidis.*, Molecular Microbiology 5, 3 (1991), 727.

**Maiden, M. C.**, B. Malorny, M. Achtman, *A global gene pool in the neisseriae.*, Mol.Microbiol., (1996) 21 (6):1297-1298.

**Maiden, M. C.**, 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 & B. G. Spratt, *Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.*, Proc Natl Acad Sci USA (1998) 95: 3140-3145.

**Mattick JS**, *Type IV pili and twitching motility.*, Annu Rev Microbiol. 2002; 56: 289-314.

- Merker P**, Tommassen J, Kusecek B, Virji M, Sesardic D, Achtman M., *Two-dimensional structure of the Opc invasin from Neisseria meningitidis.*, Mol Microbiol. 1997 Jan;23(2):281-93.
- Meyer TF**, Gibbs CP, Haas R, *Variation and control of protein expression in Neisseria.*, Annu Rev Microbiol. 1990;44:451-77.
- Nelson K**, Watanakunakorn C, Watkins DA., *Acute epiglottitis due to serogroup Y Neisseria meningitidis in an audit.*, Clin Infect Dis. 1996 Nov;23(5):1192-3.
- Nicolas P.**, Norheim G., Garnotel E., Djibo S., Caugant D. A., *Molecular epidemiology of neisseria meningitidis isolated in the African Meningitis Belt between 1988 and 2003 shows dominance of sequence type 5 (ST-5) and ST-11 complexes.*, J. Clin. Microbiol. October 2005 vol. 43 no. 10 5129-5135
- Norheim G**, Aseffa A, Yassin MA, Mengistu G, Kassu A, Fikremariam D, Tamire W, Merid Y, Høiby EA, Caugant DA, Fritzsønn E, Tangen T, Alebel T, Berhanu D, Harboe M, Rosenqvist E., *Serum antibody responses in Ethiopian meningitis patients infected with Neisseria meningitidis serogroup A sequence type 7.*, Clin Vaccine Immunol. 2007 Apr;14(4):451-63. Epub 2007 Feb 14.
- Pollard**, A. J. & C. Frasch, *Development of natural immunity to Neisseria meningitidis.*, Vaccine (2001) 19: 1327-1346.
- Power PM**, Roddam LF, Rutter K, Fitzpatrick SZ, Srikhanta YN, Jennings MP, *Genetic characterization of pilin glycosylation and phase variation in Neisseria meningitidis.*, Mol Microbiol. 2003 Aug;49(3):833-47.
- Rosenqvist E**, Høiby EA, Wedege E, Kusecek B, Achtman M., *The 5C protein of Neisseria meningitidis is highly immunogenic in humans and induces bactericidal antibodies.*, J Infect Dis. 1993 May;167(5):1065-73.
- Rosenstein**, N. E., B. A. Perkins, D. S. Stephens, T. Popovic & J. M. Hughes, *Menin-gococcal disease.*, N Engl J Med (2001) 344: 1378-1388.
- Sa E Cunha C**, Griffiths NJ, Virji M., *Neisseria meningitidis Opc invasin binds to the sulphated tyrosines of activated vitronectin to attach to and invade human brain endothelial cells.*, PLoS Pathog. 2010 May 20;6(5):e1000911.
- Sarkari J**, Pandit N, Moxon ER, Achtman M., *Variable expression of the Opc outer membrane protein in Neisseria meningitidis is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine.*, Mol Microbiol. 1994 Jul;13(2):207-17.
- Saunders NJ**, Jeffries AC, Peden JF, Hood DW, Tettelin H, Rappuoli R, Moxon ER, *Repeat-associated phase variable genes in the complete genome sequence of Neisseria meningitidis strain MC58.*, Mol Microbiol. 2000 Jul;37(1):207-15.

- Schwartz, B:** *Chemoprophylaxis for bacterial infections: principles of and application to meningococcal infections.*, Rev. Infect. Dis. 13(Suppl.2) (1991) S170-S173.
- Seiler A,** Reinhardt R, Sarkari J, Caugant DA, Achtman M., *Allelic polymorphism and site-specific recombination in the *opc* locus of *Neisseria meningitidis*.*, Mol Microbiol. 1996 Feb;19(4):841-56.
- Stephens D. S.,** *Uncloaking the meningococcus: dynamics of carriage and disease.*, Lancet (1999) 353: 941-942.
- Swartley,** JS, Marfin AA, Edupugant S, Liu LJ, Cieslak P, Perkins B, Wenger JD, Stephens DS, *Capsule switching of *Neisseria meningitidis*.*, Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 271-276.
- Tauseef I,** Youssif M. Ali, Christopher D. Bayliss, *Phase variation of *PorA*, a major outer membrane protein, mediates escape of bactericidal antibodies by *Neisseria meningitidis*.*, Infect Immun. Apr 2013; 81(4): 1374–1380.
- Tettelin H.,** *Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58.*, Science (2000) 287:1809-15.
- Thompson E.A.,** Feavers IM, Maiden MC, *Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor *FetA*, a vaccine component.*, Microbiology. 2003 Jul;149(Pt 7):1849-58.
- Trotter,** C. L., M. Chandra, R. Cano, A. Larrauri, M. E. Ramsay, C. Brehony, K. A. Jolley, M. C. Maiden, S. Heuberger & M. Frosch, *A surveillance network for meningococcal disease in Europe.*, FEMS Microbiol Rev (2007) 31: 27-36.
- Tsai,** C. M., C E Frasch, L F Mocca, *Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*.*, J Bacteriol. 1981 April; 146(1): 69–78.
- Unkmeir A,** Latsch K, Dietrich G, Wintermeyer E, Schinke B, Schwender S, Kim KS, Eigenthaler M, Frosch M., *Fibronectin mediates *Opc*-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells.*, Mol Microbiol. 2002 Nov;46(4):933-46.
- Van der Ley P,** Heckels JE, Virji M, Hoogerhout P, Poolman JT, *Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria spp.**, (1991) Infect Immun 59: 2963–2971.
- Vedros, N. A.:** *Development of Meningococcal Serogroups.* In Vedros, N. A. *Evolution of meningococcal disease.* (1987) Boca Raton, Fla. USA
- Virji M.,** Alexandrescu, C., Ferguson, D. J. P., Saunders, J. R. and Moxon, E. R.: *Variations in the expression of pili: the effect on adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells.*, Mol. Microbiol. 6 (10) (1992) 1271-1279.
- Virji M.,** Makepeace K, Ferguson DJ, Achtman M, Sarkari J, Moxon ER., *Expression of the *Opc* protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*.*, Mol Microbiol. 1992 Oct;6(19):2785-95.

**Vieusseux M.**, *IX. Meningococcal Infections - Office of Medical History*, J Med Chem Pharm (1805) 11: 163-182.

**Vogel U.**, A. Weinberger, R. Frank, A. Muller, J. Kohl, J. P. Atkinson & M. Frosch, *Complement factor C3 deposition and serum resistance in isogenic capsule and lipooligosaccharide sialic acid mutants of serogroup B Neisseria meningitidis.*, Infect Immun (1997) 65: 4022-4029.

**Vries, F. P. De**, Cole, R., Dankert, J., Frosch, M. and Putten, J. P. M. van, *Neisseria meningitidis producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors.*, Mol. Microbiol. 27 (6) (1998) 1203-1212.

**Wang JF**, Caugant DA, Morelli G, Koumaré B, Achtman M., *Antigenic and epidemiologic properties of the ET-37 complex of Neisseria meningitidis.*, J Infect Dis. 1993 Jun;167(6):1320-9.

**Weber MV** Claus H, Maiden MC, Frosch M, Vogel U., *Genetic mechanisms for loss of encapsulation in polysialyltransferase-gene-positive meningococci isolated from healthy carriers.*, Int J Med Microbiol. 2006 Nov;296(7):475-84. Epub 2006 Jul 28.

**Weichselbaum A.**: *Ueber die aetiologie der akuten meningitis cerebrospinalis.*, Fortschr Med (1887) 5: 573-583.

**Yazdankhah SP**: *Neisseria meningitidis: an overview of the carriage state.* J Med Microbiol. 2004 Sep;53(Pt 9):821-32.

**Zhu P** Morelli G, Achtman M., *The opcA and (psi)opcB regions in Neisseria: genes, pseudogenes, deletions, insertion elements and DNA islands.* Mol Microbiol. 1999 Aug;33(3):635-50.

## **Tabellarischer Lebenslauf Ralf Aumann**

### **Persönliche Angaben**

Geburtsdatum/-ort: 13. August 1988 in Nürnberg

Nationalität: deutsch

### **Ausbildung**

04/09 – 12/15: Studium der Humanmedizin, Universität Würzburg

09/99 - 06/08: Abitur

09/95 - 08/99: Grundschule

### **Zivildienst**

12/08 – 03/09: Pflegedienst

07/08 – 11/08: Behinderten/Krankenfahrtdienst

### **Berufserfahrung**

Seit 01/16: Assistenzarzt für Innere Medizin

Ralf Aumann, Januar 2018