

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Genetische Variabilität und Expression der ADP-Ribosyltransferase NarE



Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Nina Hauer, geb. Lein
aus Bremen

Würzburg, November 2018

Referent: Professor Dr. med. Ulrich Vogel

Koreferentin: PD Dr. Wilma Ziebuhr

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.08.2019

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Gattung <i>Neisseria</i>	1
1.2 <i>Neisseria meningitidis</i>	1
1.2.1 Pathogenese und Klinik.....	1
1.2.2 Typisierung.....	3
1.2.3 Epidemiologie.....	5
1.3 Bakterielle ADP-Ribosyltransferasen	7
1.3.1 Die ADP-Ribosyltransferase NarE von <i>Neisseria meningitidis</i>	8
1.4 Fragestellung	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Geräte.....	12
2.2 Verbrauchsmaterialien	13
2.3 Chemikalien und Reaktionkits.....	14
2.4 Antikörper, Enzyme und Marker	16
2.5 Puffer und Lösungen	18
2.6 Kulturmedien	22
2.6 Oligonukleotide	23
2.7 Bakterienstämme.....	24
2.8 Verwendete Software.....	24
2.9 Methoden.....	25
2.9.1 Methoden zur Analyse für DNA und RNA	25
2.9.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	25
2.9.1.2 Aufreinigung von PCR-Produkten	26
2.9.1.3 RNA-Präparation, reverse Transkription und qRT-PCR.....	26
2.9.1.4 DNA-Isolierung, Southern Blot und Hybridisierung	28
2.9.2 Methoden zur Analyse von Protein	30
2.9.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
2.9.2.2 Western Blot	30
2.9.2.3 Silberfärbung.....	31
2.9.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Vorhandensein und DNA-Sequenzvariabilität von <i>narE</i> in <i>Neisseria spp.</i>	32
3.1.1 Stammauswahl.....	32

3.1.2	Nachweis von <i>narE</i>	33
3.1.3	Sequenzierung von <i>narE</i>	37
3.2	NarE-Expression.....	38
3.2.1	Proteinexpression von NarE in <i>Neisseria spp.</i>	38
3.2.2	Transkription von <i>narE</i> in Meningokokken	41
4.	Diskussion	44
5.	Zusammenfassung	48
6.	Verzeichnisse	50
6.1	Literaturverzeichnis.....	50
6.2	Abbildungsverzeichnis	60
6.3	Abkürzungsverzeichnis	61
7.	Anhang.....	63
	Danksagung.....	72

1. Einleitung

1.1 Gattung *Neisseria*

Neisseria ist eine Gattung gramnegativer Bakterien, die vor allem als Kokken und Diplokokken vorkommen. Daneben sind auch wenige stäbchenförmige Neisserien bekannt (Han et al. 2006). Es stehen vor allem zwei Arten - *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* - aufgrund ihrer Bedeutung als humane Krankheitserreger im Vordergrund.

Neisseria meningitidis (*N. meningitidis*, Meningokokken) ist ein weltweit verbreiteter Erreger, der immer noch zu den häufigsten Ursachen für bakterielle Meningitis bei Kindern und Jugendlichen zählt und außerdem zu schwerer Sepsis führen kann. Bereits im 19. Jahrhundert entdeckt, stellt der Keim trotz großer Fortschritte in der Impfstoffentwicklung auch heute noch eine präsente Infektionsgefahr dar (Rosenstein et al., 2001).

Neisseria gonorrhoeae (*N. gonorrhoeae*, Gonokokken) hingegen ist ein Erreger urogenitaler und anorektaler Infektionen sowie von Konjunktividen, Arthritiden und Pharyngitiden und auch systemischen Infektionen.

Des Weiteren gibt es eine Vielzahl an apathogenen Neisserienarten, die überwiegend als kommensale Bakterien Teil der humanen Rachenflora ist (Cartwright et al., 1987). Für *Neisseria lactamica* wird davon ausgegangen, dass Antikörper gegen diese Spezies eine protektive Kreuzimmunität gegen *Neisseria meningitidis* erzeugen können (Troncoso et al., 2000).

1.2 *Neisseria meningitidis*

1.2.1 Pathogenese und Klinik

N. meningitidis verfügt über verschiedene Mechanismen, die die Kolonisierung des menschlichen Nasopharynx ermöglichen und zu asymptomatischem Trägertum führen. Um eine invasive Meningokokkenerkrankung auszulösen, müssen Adhäsion an die Mukosa, die Invasion in die periphere Blutbahn und schließlich den cerebralen Liquorraum erfolgen. Dabei stehen vor allem Meningitis und Sepsis im Vordergrund. Fieber und Petechien sind ein Zeichen für Meningokokkämie und können unter anderem über massive

Komplementaktivierung und Zytokinrelease zu einem fulminanten Verlauf mit dem Bild des Waterhouse-Friedrichsen-Syndroms und Multiorganversagens führen, falls nicht schnellstmöglich eine antibiotische Therapie und intensivmedizinische Überwachung eingeleitet werden. (Stephens et al., 2007; ECDC, 2010; RKI, 2018)

Genom- und Transkriptomvergleiche ermöglichen auf Ebene von DNA, RNA und Proteinen einen Vergleich zwischen kommensalen und invasiven Meningokokkenisolaten (Schoen et al., 2008).

Im Rahmen der Pathogenese sind eine Reihe von Mechanismen bekannt oder Gegenstand der Forschung. Pili ermöglichen einen ersten Kontakt mit Epithelzellen zur Adhäsion an der Mukosa (Imhaus und Dumenil, 2014). Über die Proteine der äußeren Membran Opa und Opc gelingt mitunter eine Adhäsion an eukaryotische Zellen, zum Beispiel über CEACAM- Rezeptoren des Epi- und Endothels (Virji et al., 1996; Unkmeir et al., 2002). Im Rahmen des komplexen Geschehens der bakteriellen Adhäsion und Invasion spielen zahlreiche weitere Adhäsine und Rezeptoren eine Rolle. Das Neisserienantigen zur Adhäsion NadA hat auch im Rahmen der Impfstoffentwicklung Bedeutung als Antigen (Capecchi et al., 2005).

Bakterien müssen in der Meningokokkämie ihren Stoffwechsel anpassen. Die enzymatische Aktivität über bakterielle Lactoferrin- und Transferrinrezeptoren zur ausreichenden Eisenversorgung ist bereits bekannt. Transkriptomstudien sollen Aufschluss über die Regulation des Metabolismus während einer invasiven Erkrankung geben und zeigen, dass der Vergleich einzelner Gene oder Linien nicht ausreichend ist (Schoen et al., 2014).

Wichtiger Virulenzfaktor ist, wie bei anderen gramnegativen Bakterien auch, das Lipooligosaccharid (Kahler und Stephens, 1998; Brandtzaeg et al., 2001). Als Endotoxin ist es neben anderen Proteinen und Lipiden ein Bestandteil von Äußeren Membranvesikeln (OMV), der zu invasiven Meningokokken-erkrankungen beiträgt (Kahler et al., 1998). Äußere Membranvesikel sind Abschnürungen der äußeren Schicht der Zellmembran gramnegativer Bakterien inklusive Membranproteinen und periplasmatischer Bestandteile (Ellis und Kuehn, 2010). Nicht zuletzt spielen die Fähigkeit zur Kapselbildung und die

Expression von Porinen beim Ausbruch der Infektion eine entscheidende Rolle (Vogel und Frosch, 2002).

Kommensale und invasive Meningokokken unterscheiden sich durch die Produktion bestimmter Virulenzfaktoren. Die Proteinexpression kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. Neben genetischer Rekombination und Gentransfer bieten zahlreiche Mechanismen die Möglichkeit die Proteinbiosynthese bzw. den Stoffwechsel, aber auch Virulenzeigenschaften auf veränderte Umgebungsbedingungen anzupassen (Hubert et al., 2012; Joseph et al., 2011; Ampattu et al.; 2017). Eine hohe spontane Mutationsrate und eine reduzierte Reparatur dieser Fehler sorgen für zusätzliche genetische Veränderungen (Moxon et al., 1994; Schofield et al., 2003). Auch eine Methylierung der DNA führt zu einer veränderten Transkription (Sater et al., 2015). Für einige Oberflächenproteine (Alamro et al., 2014) oder zum Beispiel die Polysaccharidkapsel (Hammerschmidt et al., 1996) ist eine phasenvariable Expression der entsprechenden Proteine beschrieben. Hierbei ist die Mutationsrate weit höher als bei spontanen Mutationen, weshalb sich die Bakterieneigenschaften rasant verändern können. Die phasenvariable Kapselexpression von *Neisseria meningitidis* ist auf Slapped Strand Mismatching im entsprechenden *siaD*-Gen zurückzuführen. Bei diesem Mechanismus kommt es in Regionen mit repetitiven Basen leicht zu falschen Basenpaaren mit einer veränderten Anzahl der repetitiven Nukleoside und folglich einer Verschiebung im Leseraster und Beendigung der Translation (Hammerschmidt et al., 1996).

1.2.2 Typisierung

Anhand der Struktur der Polysaccharidkapsel wird zwischen 12 Serogruppen unterschieden, von denen die sechs Gruppen A, B, C, W, X und Y als Erreger invasiver Erkrankungen gelten (Harrison et al., 2013). Die Ausbildung einer Kapsel gilt als wichtiger Faktor für Invasivität. Trotzdem wurden auch Erkrankungen durch nichtbekapselte Meningokokken, welche genetisch hier den *capsule null locus* (*cnl*) besitzen, beobachtet.

Um epidemiologische Rückschlüsse und populationsbiologische Erkenntnisse ziehen zu können, werden molekulare Typisierungen durchgeführt, die

Aufschluss über verwandtschaftliche Beziehungen von Stämmen und Entwicklungen innerhalb der Bakterienpopulation geben. Da *Neisseria meningitidis* Infektionen unter Berücksichtigung der hohen Besiedelungsrate eher sporadisch auftreten, wird es durch Genomvergleiche ermöglicht, genauere Details über Pathogenese und Virulenz zu erhalten. Zusätzlich kann hierdurch eine bessere Überwachung und Kontrolle der Meningokokkenausbrüche gelingen. (Maiden und Harrison, 2016)

Eine weitere Unterteilung erfolgt durch Multi Locus Sequenz Typisierung (MLST), wobei anhand der DNA-Sequenzen von sieben Stoffwechselgenen so genannte Sequenztypen ermittelt werden (Urwin und Maiden, 2003). Die Nukleotidsequenzen werden mit einer frei zugänglichen Datenbank verglichen (PubMLST, 2018). Sequenzvarianten eines Genlocus werden als Allele bezeichnet. Diese Variationen können durch Mutationen oder genetische Rekombination entstehen und führen zu einem hohen Grad an Polymorphismen (Maiden, 1993). Die Nomenklatur ermöglicht es, die Diversität der Bakterienstämme zu charakterisieren und Bakterienstämme international einheitlich einzuteilen (Maiden, 2006). Verwandte Sequenztypen werden zu klonale Komplexen (cc) zusammengefasst (Maiden et al., 1998). Als hypervirulente Linien gelten vor allem die Komplexe ST-41/44, ST-32, ST-11 und ST-8 (früher entsprechend den Linien III, ET-5, ET 37 und dem A4 Cluster) (Caugant et al., 1998; Harrison et al.; 2009).

Die Typisierung mittels MLST reicht nicht aus, um Unterschiede eng verwandter Stämme zu erkennen (Achtman, 2008). Durch Next Generation Sequencing wird es ermöglicht, komplette Genome (*whole genome sequencing*) schneller und kosteneffizienter zu typisieren und somit einen neuen Schritt in der Vergleichbarkeit der Neisserienstämme zu gewährleisten (Chain et al., 2009). Kombiniert mit modernen Datenanalysetechniken werden Forschung sowie klinischem und epidemiologischem Monitoring mehr Optionen und Perspektiven, zum Beispiel in der Analyse bestimmter Pathogenitätsfaktoren, geboten (Harrison et al., 2017). Die Bacterial Isolate Genome Sequence Database (BIGSdb) bietet durch Gene-by-Gene Analyse eine entsprechende Software und Datenbank an (Maiden und Harrison, 2016).

Der Vergleich ribosomaler RNA ist vor allem für Phylogenetik und Taxonomie relevant. Als ribosomale MLST (rMLST) wird die Sequenzierung und bioinformatische Datenanalyse von 53 Genen bezeichnet, die für ribosomale Proteine kodieren. Hierüber lassen sich ergänzend zu MLST die verwandtschaftlichen Beziehungen und Abstammungen genauer klassifizieren. (Bennett et al., 2012)

1.2.3 Epidemiologie

Meningokokken sind Erreger schwerer Infektionen, aber auch Kommensale des Nasenrachenraums mit einer Trägerrate zwischen 5 und 25% (Claus et al., 2005; Christensen et al., 2010). Die Zahl der Infektionen steigt nach vergangenem Nestschutz an, das Maximum der Infektionen liegt bei Kindern unter einem Lebensjahr. Ein zweiter Erkrankungsgipfel ist zwischen 15-19 Lebensjahren zu verzeichnen (Cartwright et al., 1987). Während Meningokokkensepsis und –meningitis in den Industrienationen eher sporadisch vorkommen, traten Epidemien vor allem im afrikanischen Meningokokkengürtel auf.

Die Inzidenz invasiver Meningokokkenerkrankungen ist seit Jahren weiter rückläufig und reduzierte sich von 0,44 (2012) auf 0,36 (2015) pro 100.000 Einwohner in Deutschland, wobei die Mehrzahl der Erkrankungen durch Serogruppe B (69%) und C (20%) verursacht wird (RKI 2016).

Insgesamt herrschen in Europa, Amerika und Australien Serogruppe B, C, W und Y als Infektionsursache vor, während die endemischen Meningokokkenerkrankungen bis 2010 in Afrika und Asien vor allem durch Serogruppe A (80%) verursacht wurden (Whittaker et al., 2017; Halperin et al., 2012). Der afrikanische Meningokokkengürtel umfasst definitionsgemäß ein Gebiet von 26 Ländern in der Subsahara, in welchem es unterstützt durch klimatische und soziale Bedingungen immer wieder zu Meningokokkenepidemien kam (PATH, 2017). Ab 2010 wurde durch ein internationales Meningitis Impfprogramm und die Einführung eines bezahlbaren neuen monovalenten Impfstoffes gegen Serogruppe A Meningokokken in 20 der 26 Länder eine Impfkampagne zur Eindämmung der Ausbrüche gestartet. (La

Force et al., 2007; Frasch et al., 2012; Meningitis Vaccine Project, 2018). Mittlerweile wurden über 280 Millionen Impfdosen MenAfriVac verabreicht (WHO, 2018). Von 2010 bis 2016 konnte die Zahl der Infektionen um 57% reduziert werden (WHO, 2017). Im Rahmen des Programms wurde erreicht, eine möglichst hohe Zahl der jungen Bevölkerung (1-29 Jahre) zu impfen. Ergänzend wird verstärkt versucht als Antwort auf gehäufte Ausbrüche durch schnelle Chemoprophylaxe der Kontaktpersonen und Impfung, zum Beispiel mit dem Vierfach-Konjugatimpfstoff, eine Eindämmung der Krankheitsausbreitung zu vermeiden. Während Ausbrüche durch Serogruppen wie C und W weiterhin zu verzeichnen sind, führten die oben beschriebenen Maßnahmen dazu, dass aktuelle Epidemien durch Serogruppe A nicht mehr erwartet werden (Kristiansen et al., 2013).

Vor allem die Entwicklung neuer Impfstoffe hat in den letzten Jahren zu einem Durchbruch in der Bekämpfung von Meningokokkenausbrüchen geführt.

Grundsätzlich stehen für die Serogruppen A, C, W und Y sowohl mono- als auch quadrivalente Polysaccharid- und Konjugatimpfstoffe zur Verfügung (McCarthy et al., 2018). Hierbei bieten die Konjugatimpfstoffe aufgrund des T-Zell-Klassenwechsels einen längeren Immunschutz. Polysaccharidimpfstoffe werden vor allem zur Eindämmung bei Ausbrüchen genutzt (WHO, 2018). Insbesondere der durch eine Zusammenarbeit zwischen Regierung und Industrie entwickelte kostengünstige monovalente Konjugatimpfstoff MenAfriVac erzielte durch oben genannte Maßnahmen große Erfolge.

Die Immunogenität der Serogruppe B Kapsel ist aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu einem humanen neuronalen Protein gering, so dass andere antigene Oberflächenproteine als Impfkompontenten etabliert werden mussten (Vogel und Claus, 2011). Aktuell gibt es mit Bexsero und Trumenba zwei zugelassene Impfstoffe gegen Serogruppe B- Meningokokken.

Seit 2013 ist in Deutschland der Impfstoff Bexsero mit vier Impfkompontenten gegen NadA, fHbp, NHBA und PorA zugelassen, der etwa 78% der Serogruppe B Infektionen abdeckt (Vogel et al., 2013). Die Immunogenität ist jedoch abhängig von Alter und Meningokokkenstamm (Flacco et al., 2018). Der

Impfstoff Trumenba ist seit 2017 für Personen ab einem Alter von zehn Jahren zugelassen.

Die STIKO (RKI, 2018) empfiehlt in Deutschland eine Impfung mit einem Konjugatimpfstoff gegen Serogruppe C für Kinder ab 12 Monaten sowie Impfungen mit dem tetravalenten Glykokonjugatimpfstoff gegen die Serogruppen A, C, W und Y bei erhöhter Infektionsgefahr. Eine Empfehlung bezüglich des Serogruppe B Impfstoffes steht noch aus, kann jedoch nach individueller Risiko-Nutzen-Abwägung erfolgen.

1.3 Bakterielle ADP-Ribosyltransferasen

Die ADP-Ribosylierung von Proteinen ist eine post-translationale Modifikation, die sowohl bei Eukaryoten (Hassa et al., 2006), als auch bei Prokaryoten (Castagnini et al., 2012) beschrieben wurde. Der enzymatische Vorgang besteht darin, dass ein oder mehrere ADP-Gruppen auf eine Aminosäure des Zielproteins übertragen werden. Als Substrat für diese Modifikation dient das Coenzym NAD. Einige bakterielle ADP-Ribosyltransferasen (ADPRT) sind als Toxine und Virulenzfaktoren bekannt. Als erste ADPRT wurde 1968 das Diphtherietoxin bei *Corynebakterium diphtheriae* beschrieben (Honjo et al., 1968). Des Weiteren ist das Diphtherietoxin ein klassischer Vertreter der AB-Toxine (Gill und Pappenheimer, 1971). Dies ist eine Gruppe von Zweikomponentenenzymen. Teil A katalysiert die eigentlich toxische Reaktion im Zytosol der Wirtszelle, während Teil B zur spezifischen Bindung an die Zielzelle und somit zur Translokation des Toxins notwendig ist. Heute sind über 35 bakterielle ADP-Ribosyltransferasen bekannt, die sich zum Beispiel nach Art des Zielproteins und AB-Toxineigenschaften klassifizieren lassen (Simon et al., 2014). Das eukaryotische Zielprotein des Diphtherietoxins ist der Elongationsfaktor EF-2, der zur Translokation der Polypeptidkette am Ribosom beiträgt und durch Ribosylierung gehemmt wird (Collier, 1967). Ein gut beschriebener Vertreter, der ebenfalls an EF-2 angreift, ist Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa*. (Wick et al., 1990). Eine andere ADPRT-Gruppe bilden Toxine, die über die Ribosylierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors in die Signalkaskade der Zelle eingreifen. Der erste bekannte

Vertreter ist Cholera toxin (Van den Broeck et al., 2007). Hitzeempfindliches Toxin von *E. coli* und Pertussistoxin von *Bordetella pertussis* binden ebenso über Ganglioside und wirken über G-Proteine (Moss, 1978; Katada, 2012). Auch für CagL von *Helicobacter pylori* wurde eine dem Cholera toxin entsprechende Wirkweise nachgewiesen (Talluri et al., 2017). Zwei weitere Gruppen der ADPRTs werden nach den C2- und C3-Toxinen von *Clostridium botulinum* eingeteilt, deren Zielmoleküle ein breiteres Spektrum umfassen, neben G-Aktin einerseits (Aktories et al., 2011), werden vor allem Rho-GTPasen modifiziert (Vogelsgesang et al., 2007). Weitere Toxine der Clostridien wie das bekannte *Clostridium difficile*-Toxin bestehen aus zwei Komponenten (Gerding et al., 2014). Die bindende Einheit besitzt hierbei porenformende Eigenschaften, um die enzymatische Einheit in das Cytosol zu schleusen (Knapp et al., 2016).

In den letzten Jahren wurden neue ADP-Ribosyltransferasen wie NarE vor allem über bioinformatische Methoden identifiziert (Massignani et al., 2004; Fieldhouse et al., 2010). Hierzu gehören unter anderem ChxA bei *Vibrio cholerae*, dessen Zielprotein EF-2 ist (Purdy et al., 2010), und SpyA von *Streptococcus pyogenes*, das Zytoskelettproteine ribosyliert (Coye und Collins, 2004). Außerdem wurden verschiedene entsprechende Enzyme bei *Salmonella spp.* identifiziert, die als Toxine gewertet werden (Aktories et al., 2011). Für Einkomponenten-ADPRTs gibt es verschiedene Optionen ihre Zielstruktur zu erreichen. Über Sekretionssysteme wie zum Beispiel Typ III besteht die Möglichkeit in die Zielzelle zu gelangen (Deng und Barbieri, 2008). Auch die Assoziation mit *Outer membrane vesicles* wurde zum Beispiel für das *Cytolethal distending toxin* von *Salmonella enterica* beschrieben, dessen Untereinheit ADP-Ribosyltransferaseaktivität besitzt (Guidi et al., 2013). Für die Ribosyltransferasen ExoS und ExoT bei *Pseudomonas aeruginosa* ist bekannt, dass sie das bakterielle Überleben fördern, indem sie die Apoptose neutrophiler Granulozyten beeinflussen (Sun et al., 2012).

1.3.1 Die ADP-Ribosyltransferase NarE von *Neisseria meningitidis*

Im Zuge der Impfstoffentwicklung gegen Serogruppe B Meningokokken wurden *in silico* Analysen von Genomsequenzen auf das Vorhandensein von

Homologien zu bekannten Toxinen wie beispielsweise ADP-Ribosyltransferasen durchgeführt (Masignani et al., 2003; Masignani et al., 2004). Als putative ADP-Ribosyltransferase wurde NarE (Neisseria ADP-ribosylating enzyme, NMB1343) identifiziert. Das Gen konnte bei 25 von 43 untersuchten Meningokokkenstämmen nachgewiesen werden. Innerhalb des ST-32-Komplexes (n=12) und des ST-41/44-Komplexes (n=4) waren alle Stämme positiv. Bei allen Meningokokkenstämmen wurde für *narE* eine Sequenzübereinstimmung von 100% gefunden. Auch bei den getesteten Gonokokken (n=2) war das Gen vorhanden. Allerdings wiesen diese Stämme eine Insertion von vier Nukleotiden 12 Basen nach dem Startkodon auf, was zu einer Leserasterverschiebung und einem vorzeitigen Stoppcodon führte, so dass *narE* bei Gonokokken als Pseudogen angesehen wurde. Rodas et al. (2016) identifizierten ein alternatives Startcodon (GTG) im *narE*-Gen von Gonokokken, aus dem ein Gen mit 291 bp resultierte. Die Sequenz weist eine 100%ige Homologie zum entsprechenden Teil der kodierenden Meningokokkensequenz von *narE* auf. Ebenso wurde die Expression mittels RT-PCR nachgewiesen. Rekombinantes Gonokokken-NarE wies eine vergleichbare ADP-Ribosyltransferase-Aktivität wie Meningokokken-NarE auf. Das *narE*-Gen ist zwischen den Genen NMB1342 und NMB1344 lokalisiert, die für die Dihydrolipoyl Acetyltransferase (E2) und die Dihydrolipoyl Dehydrogenase (E3) des Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexes kodieren. Bei dem *narE*-negativen Serogruppe A Stamm Z2491 ist dieser Bereich durch einen 77 Basenpaare langen Genabschnitt ersetzt. *NarE* weist einen für Neisserien ungewöhnlich niedrigen GC Anteil von 35% auf, wobei die durchschnittliche Zusammensetzung bei *Neisseria meningitidis* bei 51,5% liegt (Masignani et al., 2003). Die 438 Basenpaare kodieren für ein 16 kD Protein, das im periplasmatischen Raum von *Neisseria meningitidis* nachgewiesen wurde. NarE wies Homologien zu katalytischen Untereinheiten und konservierten Abschnitten von Pertussis-, Cholera- und Hitze-labilem *E.coli* Toxin auf (Koehler et al., 2011; Masignani et al., 2003). Im Gegensatz zu AB-Toxinen, bei denen über die B-Domäne die Rezeptorbindung und Translokation der enzymatisch aktiven A-Einheit geregelt wird, fehlt bei NarE der Teil B

(Masignani et al., 2004). Es stellt sich also die Frage über welchen Mechanismus das Protein sezerniert werden könnte, um Interaktionen zu ermöglichen.

Die Proteinexpression von fünf *narE*-positiven Meningokokken, einer *narE*-negativen Meningokokke und einem *Neisseria gonorrhoeae* Stamm wurde im Western Blot getestet. Das Ergebnis zeigte eine Proteinexpression in den *narE*-positiven Stämmen, jedoch keine Proteinexpression in den *narE*-negativen Stämmen sowie dem Gonokokkenstamm.

Für NarE wurde sowohl eine Mono-ADP-Ribosyltransferase-Aktivität als auch eine NAD-Glycohydrolase-Aktivität in Abwesenheit eines ADP-Ribose-Akzeptors nachgewiesen (Masignani et al., 2003). Eine Möglichkeit, in die eukaryotische Immunantwort einzugreifen, wäre die Ribosylierung und folgende Inaktivierung humaner Proteine, die von Neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden. Die Ribosylierung für strukturell verwandte Enzyme wie für Cholera- und Hitzelabiles *E.coli* Toxin konnte eine Ribosylierung des antimikrobiellen Peptids HNP-1 gezeigt werden, die für NarE nur schwach nachweisbar war (Castagnini et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass der beobachtete Anstieg der Autoribosylierung von NarE zu einer Reduktion der ADP-Ribosyltransferase-Aktivität führt (Picchianti et al., 2013). Des Weiteren ist beschrieben, dass die ADP-Ribosyltransferase Aktivität von der Fe-S Konzentration abhängig ist, wofür NarE ein bindendes Zentrum besitzt (Del Vecchio et al., 2009; Koehler et al., 2011).

Valeri et al. (2015) erbrachten den Nachweis, dass NarE mittels Endozytose in das Zytoplasma humaner Epithelzellen gelangt und dort enzymatisch aktiv ist. Sie zeigten, dass NarE die Integrität der Epithelschicht über die Aktinpolymere des Zytoskeletts stört und die Apoptose über den Caspase-3-Weg einleitet.

1.4 Fragestellung

Masignani et al. haben in ihren Studien NarE beschrieben, das aufgrund seiner Enzymaktivität als ADP-Ribosyltransferase und Struktur einen Einfluss auf die Pathogenese von *Neisseria meningitidis* vermuten lässt. Dafür wurde eine kleine Auswahl an Stämmen untersucht (Masignani et al., 2003).

Um eine Antwort in Bezug auf das Vorkommen und die Bedeutung von *narE* in der *Neisseria*-/Meningokokkenpopulation zu bekommen, sollte eine umfangreiche *Neisserien*stammsammlung untersucht werden. In dieser Arbeit sollte darauf eingegangen werden, wie *narE* in dieser Auswahl verbreitet ist und ob es Unterschiede zwischen Trägerstämmen und Krankheitsisolaten gibt. Die Proteinexpression sollte unter dem Aspekt der Bedeutung als möglicher Virulenzfaktor beleuchtet werden. Dazu sollte die Expression in Meningokokkenstämmen unterschiedlicher klonaler Komplexe und darüber hinaus die Regulation der Expression untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Geräte	Modell und Hersteller
Agarosekammer für Gelelektrophorese	Subcell GT (Bio-Rad, München)
Brutschränke	BB 6200 und 6220 Cu (Heraeus, Hanau)
Durchflusszytometer	FACS Calibur™ (Becton Dickinson, Heidelberg)
Elektroporationsgerät	EPI 2500 (Fischer, Heidelberg)
ELISA-Reader	Multi Scan Ex (Thermo Labsystems, Waltham, USA)
Entwickler für Röntgenfilme	Curix 60 (AGFA, Morsel, Belgien)
Feinwaage	R160 P (Sartorius, Göttingen)
Geldokumentationsanlage	UVT-28 MP (Herolab, Wiesloch)
Gelkammer für SDS-Page	Mini Gel Twin (Biometra, Göttingen)
Gelscanner	GS-800 (Bio-Rad, München)
Heizblock	1Q (VLM, Bielefeld)
Hybridisierungsöfen	OV5 (Biometra, Göttingen)
Magnetrührer	IKAMAG® RH (Janke und Kunkel, Staufen)
Mikroskop	Wilovert (Wilhelm Will, Wetzlar)
Mikrowelle	MW 1820 Duo (Stuttgart); (Bauknecht,)
PCR Thermocycler	Personal Cycler; T3000 (Biometra, Göttingen) MWG Biotech, Primus 96 Plus Ebersberg
pH-Meter	pH530 (WTW, Weilheim)
Photometer	CO 8000 (Biochrom, Cambridge)
Power Supply	300Xi (Bio-Rad, München); Power Pack 25 (Biometra Göttingen)
Realtime-PCR System	StepOne Plus (Life Technologies, Darmstadt)
RNA-Elektrophorese System	2100 Bioanalyzer (Agilent, Böblingen)
Schüttler	Certomat H (Braun, Melsungen)
Spektrophotometer	Nanodrop 1000 (Peqlab, Erlangen)

Tischzentrifuge	Biofuge 15 (Heraeus, Hanau)
Ultraschallsystem	Soni 130 (HTU, Schwäbisch Gmünd)
UV Crosslinker	UV Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, USA)
Vakuumverdampfer	SpeedVac Plus SC110A (Thermo Scientific Savant, Waltham, USA)
Vortexer	Sa8 (Stuart, Staffordshire, UK)
Wasserbäder	1083 (GFL, Burgwedel); SW 20 (Julabo, Seelbach)
Western Blot Kammer	Mini Trans Blot Cell (Bio-Rad, München)
Zentrifugen	Biofuge 15R ; Megafuge 1.0 (Heraeus, Hanau)
Zentrifugen mit Kühlsystem	RC5B Plus (Thermo Scientific Sorvall, Waltham, USA); Megafuge 1.0 R (Heraeus, Hanau)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
BD Falcon Röhrchen, 15 und 50 ml	Becton Dickinson (Heidelberg)
Filterpapier, 3 mm	Whatman, GE Healthcare (Dassel)
Ni-NTA Säulen	Qiagen (Hilden)
Nitrozellulosemembran, Protran, 0,45 µM	Whatman, GE Healthcare (Dassel)
Nylonmembrane, Porablot NYplus, 0,45 µM	Macherey-Nagel (Düren)
RNA Nano Chips	Agilent (Böblingen)
RNAase und DNAase freie 1,5 ml Reaktionsgefäße	Ambion, Life Technologies (Darmstadt)
Röntgenfilm, Super RX	Fujifilm (Düsseldorf)
Spritzen, 50 ml	Braun (Melsungen)
Spritzenfilter, Filtropure S 0,2 µm	Sarstedt (Nümbrecht)
sterile Plastikröhrchen, 12ml	Greiner (Essen)
Vivaspin 2 Röhrchen	Sartorius (Göttingen)

2.3 Chemikalien und Reaktionkits

Chemikalien	Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Acrylamid	Carl Roth (Karlsruhe)
β -Merkaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Bacto™ Proteose Pepton	Becton Dickinson (Heidelberg)
Bacto™ Trypton	Becton Dickinson (Heidelberg)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Calcein AM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Coomassie Brilliant Blue	Merck (Darmstadt)
CSPD	Roche (Mannheim)
Difco™ LB agar Lennox	Becton Dickinson (Heidelberg)
Difco™ GC Medium Base	Becton Dickinson (Heidelberg)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
dNTPs	Invitrogen, Life Technologies (Darmstadt)
dNTP Markierungsgemisch	Roche (Mannheim)
EDTA	AppliChem (Darmstadt)
Fast SYBR Green Master Mix	Life Technologies (Darmstadt)
Hefeextrakt	Becton Dickinson (Heidelberg)
Hexanukleotidgemisch	Roche (Mannheim)
Imidazol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
IPTG	AppliChem (Darmstadt)
Kartoffelstärke	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Magermilchpulver	Heirler (Radolfzell)
Maleinsäure	Merck (Darmstadt)
N-Laurylsarkosin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nona Primer	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nuklease freies Wasser	Ambion, Life Technologies (Darmstadt)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	AppliChem (Darmstadt)
PBS	Invitrogen, Life Technologies (Darmstadt)

Polyacrylamid (PAA): Rotiphorese Gel 30	Roth (Karlsruhe)
Polymyxin B	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
PolyViteX	BioMerieux (Nürtingen)
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche (Mannheim)
RNAprotect Bacteria Reagent	Qiagen (Hilden)
RnaseOut	Invitrogen, Life Technologies (Darmstadt)
RNase Zap	Ambion, Life Technologies (Darmstadt)
Serdolit	Merck (Darmstadt)
Sodium-dodecyl-sulfat, ultra pure	AppliChem (Darmstadt)
SYBR Green	Applied Biosystems, Life Technologies (Darmstadt)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck (Darmstadt)
Tricin	Merck (Darmstadt)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tween 20	Merck (Darmstadt)

Weitere gängige Chemikalien wurden in p.A. Qualität von AppliChem, Merck, Roth, Roche und Sigma-Aldrich bezogen.

Kits	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Reagents	Agilent (Böblingen)
Genomic-tip 100/G	Qiagen (Hilden)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific (Waltham, USA)
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)

2.4 Antikörper, Enzyme und Marker

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Digoxigenin-AP		Roche (Mannheim)
Goat Anti-Human, IgG, IgA und IgM (H+L)	1:5000	Dianova (Hamburg)
Goat Anti-Mouse, IgG und IgM, Peroxidase-konjugiert	1:10000	Jackson, Immuno Research (Newmarket, GB)
Goat Anti-Rabbit, IgG F _{ab} -Fragment spezifisch, Peroxidase-konjugiert	1:5000	Jackson, Immuno Research (Newmarket, GB)
Polyklonales Rabbit-Anti NarE Serum		Bereitstellung des Antigens : AG Vogel; Herstellung des Antikörper: ImmunoGlobe (Himmelstadt)

Enzyme	Hersteller
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs (Frankfurt)
Exonuklease I	New England Biolabs (Frankfurt)
Klenow-Polymerase	Roche (Mannheim)
Lysozym	Biomol (Hamburg)
Phusion High Fidelity Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt)
Proteinase K	Carl Roth (Karlsruhe)
Rekombinante DNase I (RNase frei)	Invitrogen, Life Technologies (Darmstadt)
Restriktionsendonukleasen: EcoRI SpeI	New England Biolabs (Frankfurt)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Frankfurt)
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt)

Größenstandards	Hersteller
Color Plus Prestained Protein Marker	New England Biolabs (Frankfurt)
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Waltham, USA)
SmartLadder	Eurogentec (Köln)
DIG III-Marker	Roche (Mannheim)
DIG VII-Marker	Roche (Mannheim)

2.5 Puffer und Lösungen

10x PBS:

1 Päckchen Dulbecco PBS
ad 1000 ml Aqua dest.

1x PBS:

10x PBS 100 ml
ad 1000 ml Aqua dest.

TE:

Tris 10 mM
EDTA 1 mM
pH 8,0

Puffer B1:

Na₂EDTA x 2 H₂O 50 mM
Tris 50 mM
Tween 5 %
Triton X-100 5 %
pH 8,0

Puffer B2:

Guanidin-HCl 0,33 mM
Tween 20 %

Elektrophorese und Sequenzierung

GEBS:

Glycerin 20 %
EDTA 50 mM
N-Laurylsarkosin 0,5 %
Bromphenolblau 0,05 %
pH 8,0

TRIS:

Tris-HCl, pH 7,2 10 mM

1x TBE:

Tris-HCl 100 mM
Borsäure 100 mM
EDTA 2,5 mM
pH 8,3

RNA Präparation

TE-Lysozym-Prot. K-

Puffer:

TE	1 ml
Lysozym	15 mg
Proteinase K (20 mg/ml)	200 µl

Silberfärbung

Fixierungslösung:

Methanol	50 %
Essigsäure	10 %

Färbelösung:

Silbernitrat	0,1 %
Formaldehyd	0,03 %

Entwicklungslösung :

Natriumcarbonat	6 %
Formaldehyd	0,018 %
pH 10,9	

SDS-Page und Western Blot

PBS-Tween:

1x PBS	
Tween 20	0,1 %

1x Sample Solution:

β -Mercaptoethanol	5 %
SDS	2 %
Glycerol	12,5 %
Tris-HCl, pH 6,8	0,5 M
Bromphenolblau	

Upper Tris Puffer:

Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M
SDS	2 %

Lower Tris Puffer:

Tris-HCl, pH 6,8	0,5 M
SDS	2 %

Sammelgel:

Upper Tris	0,650 ml
dH ₂ O	1,650 ml
Acrylamid, 30%	0,375 ml
TEMED	10 μ l
10% APS	17,5 μ l

Trenngel 15%:

Lower Tris	1,5 ml
dH ₂ O	1,5 ml
Acrylamid, 30%	3 ml
TEMED	10 μ l
10% APS	30 μ l

Elektrophorese-Puffer:

Tris	0,25 M
Glycin	0,5 M
SDS	0,5 %

Blotpuffer:

Tris	0,3 %
Glycin	1,44 %
Methanol	20 %

Southern Blot

Denaturierungslösung:

NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M

Neutralisierungslösung:

Tris-HCl (pH 7)	1 M
NaCl	3 M

20x SSPE :

NaCl	3,6 M
NaH ₂ PO ₄	0,1 M
Na ₂ HPO ₄	0,1 M
EDTA	20 mM

20x SSC :

NaCl	3 M
Natriumcitrat	0,3 M
pH 7,0	

Puffer 1 :

Maleinsäure	0,1 M
NaCl	0,15 M
pH 7,5	

Puffer 2 :

Puffer 1	
Blockierungsreagenz	1 %

Puffer 3 :

Tris-HCl	0,1 M
NaCl	0,1 M

Waschpuffer :

Puffer 1	
Tween 20	0,3 %

High-SDS-

Hybridisierungslösung :

SDS	7 %
Formamid	50 %
SSC	5 x
Natriumphosphatpuffer, pH7	50 mM
N-Laurylsarkosin	0,1 %
Blockierungsreagenz	2 %

2.6 Kulturmedien

Columbia Agar, 5% Schafblut, Biomerieux (Nürtingen)

PPM:

ad 1000 ml entionisiertes
Wasser

Bacto™ Proteose Pepton	15 g
NaCl	5 g
Kartoffelstärke	0,5 g
KH ₂ PO ₄	4 g
K ₂ HPO ₄	1 g

PPM⁺:

pro 100 ml PPM

MgCl ₂ , 2 M	500 µl
NaHCO ₃ (8,4%)	500 µl
PolyViteX	1 ml

LB-Agar:

ad 1000 ml entionisiertes
Wasser

Difco™ LB Agar Lennox	32 g
-----------------------	------

GC-Agar:

ad 1000 ml entionisiertes
Wasser

Difco GC Medium Base	36 g
PolyViteX	10 ml

SOB:

Baktotrypton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM

SOC:

SOB	
Glucose	20 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

2.6 Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'-3'	Zielgen	Position*
FG11	CAACAAGATGAGCAAATAATG	NMB1343 (narE)	1363751 - 1363772
FG12	ATCTTCAGCTCTGATTGTTACTTC	NMB1343 (narE)	1364098 -1364075
FG13	AATCAAACCTGTTTGGAACG	NMB1342 (aceF)	1363468 - 1363487
FG16	CAGCTTCAACGACGAC	NMB1344 (lpdA)	1364407 - 1364392
FG17	TGGATCAAAAAGGCTTG	NMB1342 (aceF)	1363272 - 1363288
FG20	CAGCTTCAACGACGACGACAATC	NMB1344 (lpdA)	1364407 - 1364392
MP126	GGTATTCGACAGCAGCAAAGC	NMB1567 (Pawlik et al., 2012)	1626699 - 1626679
MP127	GTCCAACCCGGAATCACTTG	NMB1567 (Pawlik et al., 2012)	1626628 - 1626647
NL5	TGGTAAAGCTACACATGGTCCAA	NMB1343 (narE)	1363840 – 1363862
NL6	TAGCCATTTTCGATGCCGGA	NMB1343 (narE)	1363989 - 1363970

*Die Position bezieht sich auf die Sequenz des Stamms MC58 (NCBI Reference Sequence NC_003112.2).

2.7 Bakterienstämme

Die Tabelle der Neisserienstämme, die für das NarE-Screening verwendet wurden, befindet sich im Anhang.

2.8 Verwendete Software

Programm	Hersteller
Adobe Illustrator CS6	Adobe Systems (San Jose, USA)
Artemis 14.0	Wellcome Trust Sanger Institute (Hinxton, USA) (Rutherford et al., 2000)
BioEdit 5.0	Ibis Therapeutics (Carlsbad, USA)
ClustalW	The European Bioinformatics Institute (Hinxton, GB)
Image J 1.46	National Institute of Health (Bethesda, USA)
Jalview 2.0	University of Dundee (Dundee, GB), (Waterhouse et al., 2009)
MegAlign	DNASTAR (Madison, USA)
MEGA4	Center for Evolutionary Medicine and Informatics (Tempe, USA) (Tamura et al., 2007)
MS Excel 2010	Microsoft Deutschland (Unterschleißheim)
MS Word 2010	Microsoft Deutschland (Unterschleißheim)
SPSS Statistics 24	IBM (Armonk, USA)

2.9 Methoden

2.9.1 Methoden zur Analyse für DNA und RNA

2.9.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für den Nachweis und die Vervielfältigung bestimmter Genabschnitte wurde die Polymerasekettenreaktion nach unten angegebenen Protokollen durchgeführt. Dabei wurde für Klonierungsexperimente die Phusion-Polymerase verwendet, wohingegen in allen anderen Anwendungsbereichen die Taq-Polymerase (NEB) zum Einsatz kam. Einem 50 µl PCR Ansatz liegt folgendes Schema zu Grunde:

<u>Taq-Polymerase</u>		<u>Phusion-Polymerase</u>	
H ₂ O	36 µl	H ₂ O	31 µl
10x NEB-Puffer	5 µl	5x Phusion HF-Puffer	10 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl	dNTPs (2 mM)	5 µl
Primer 1 (20 µM)	1 µl	Primer 1 (20 µmol/l)	1,25 µl
Primer 2 (20 µM)	1 µl	Primer 2 (20 µmol/l)	1,25 µl
Taq-Polymerase	1 µl	Phusion HF Polymerase	0,5 µl
Template	1 µl	Template	1 µl
Gesamt	50 µl	Gesamt	50 µl

<u>Taq-Polymerase</u>			<u>Phusion-Polymerase</u>		
Temperatur	Zeit (min)		Temperatur	Zeit (min)	
94°C	10	Denaturierung	98°C	0,5	Denaturierung
59°C	1	Annealing	59°C	0,5	Annealing
72°C	1	Extention	72°C	0,5	Extention
94°C	1	Denaturierung 36 Zyklen	98°C	0,5	Denaturierung 36 Zyklen
59°C	1	Annealing	72°C	10	Final Extention
72°C	10	Final Extention	16°C	∞	
16°C	∞				

Als Template wurden entweder 20 ng chromosomale DNA, 10 ng Plasmid, 1 µl einer gekochten Bakteriensuspension ($OD_{600}=0,5$) oder direkt Koloniematerial eingesetzt.

Die Annealingtemperaturen der Primer wurden nach folgender Formel berechnet: $[4x(G+C)+2x(A+T)]-5$.

Die Amplifikate wurden je nach Größe über ein 0,8-, 1,5- oder 3,5-prozentiges Agarosegel in TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zu den Proben wurde Probenpuffer (GEBS) in einer Verdünnung von 1:5 hinzugegeben und die SmartLadder als Größen- und Mengenmarker zum Vergleich genutzt. Die Elektrophorese lief bei etwa 200 V ab. Die DNA wurden visualisiert, indem das Gel 15 min in 0,001%ige Ethidiumbromidlösung gelegt und die Interkalation in DNA mittels UV-Licht sichtbar gemacht wurde.

2.9.1.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte entweder mit dem QIAquick PCR Purification Kit, wobei die Proben mit 30 µl einer Mischung gleicher Teile EB und Wasser eluiert wurden, oder enzymatisch. Exonuklease I und Antarktische Phosphatase wurden mit Tris-Puffer (10 mM, pH 7,4) auf je 1U/µl verdünnt und je Enzym 1 µl pro 40 µl des PCR Produkts eingesetzt. Die Proben wurden 30 min bei 37°C inkubiert, und anschließend erfolgte für 20 min bei 80°C die Denaturierung der Enzyme. 5 µl des PCR-Produkts (20 – 80 ng / µl) und 5 µl des jeweiligen Primers (5 µM) wurden zur Sequenzierung an die Firma GATC geschickt.

2.9.1.3 RNA-Präparation, reverse Transkription und qRT-PCR

Für die RNA-Präparation wurden Bakteriensuspensionen aus Übernachtskulturen in 15 ml PPM⁺ ($OD_{600}= 0,2$) hergestellt und bis $OD_{600}= 0,5$ bei 37°C und 200 rpm inkubiert. 800 µl wurden mit 1 ml PBS gewaschen, das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert und zu 1 ml RNA-Protect gegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Bakterien bei 6000 rpm 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 200 µl TE-

Lysozym-Proteinase K-Puffer, 700 µl RLT-βME Puffer (1:100 βME in RLT Puffer aus dem RNeasy-Kit) und 500 µl 96% Ethanol hinzugefügt und durch Schwenken gemischt. Die Isolierung der RNA erfolgte nach Anweisung des Herstellers in 30 µl RNase-freiem Wasser.

Um verbliebene DNA zu entfernen, wurden zweimal je 43 µl des Eluats mit 5 µl 10x rDNase I Puffer und 2 µl rDNase I in RNase-freie Reaktionsgefäße pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Die zwei Ansätze wurden vereint, mit 350 µl RLT+βME-Puffer und 250 µl 96% Ethanol versetzt und erneut über die RNeasy-Säulen aufgereinigt wurde. Dabei wurde auf das Waschen mit Puffer RW1 verzichtet und die RNA mit zweimal 10 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Die RIN (RNA Integrity Number) dient als Maß der Qualität der RNA und wurde unter Verwendung des Agilent RNA 6000 Nano Kits im Bioanalyzer 2100 bestimmt. Dabei wird die RNA elektrophoretisch aufgetrennt und das 23S zu 16S Verhältnis der ribosomalen RNA genutzt, um Aussagen über die Integrität zu treffen. Nur RNA mit einem RIN-Wert von/über 8,0 wurde weiter verwendet. Anschließend erfolgte der Umschrieb in cDNA. Hierzu wurden 4 µg RNA (13 µl) mit 2 µl Random Nonamer Primer gemischt. Nach 5 min Inkubation bei 70°C und 5 min auf Eis wurden pro Ansatz 25 µl des folgenden Master Mixes dazu pipettiert:

RNase freies Wasser	10,6 µl
5x Superscript II-Puffer	8 µl
dATP (20mM)	1 µl
dTTP (20mM)	1 µl
dGTP (20mM)	1 µl
dCTP (20mM)	1 µl
DTT (0,1M)	0,4 µl
RNase Out (Inhibitor)	1 µl
Reverse Transkriptase Superscript II	1 µl
<hr/> Gesamt	<hr/> 25 µl

Die Ansätze wurden 2 h bei 42°C und 15 min bei 70°C inkubiert, 2 µl RNase hinzugegeben und noch einmal 45 min bei 37°C inkubiert.

Die cDNA wurde mit dem PCR Purification Kit aufgereinigt und die DNA-Konzentration spektralphotometrisch bestimmt.

Die quantitative Real-Time (qRT)-PCR erfolgte mit dem Fast SYBR Green Master Mix im StepOnePlus. Dabei werden die Signale des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green zur Detektion der doppelsträngigen DNA genutzt und der Eintritt in die exponentielle Phase der Amplifikation (ct-Wert) bestimmt. Die Primer NL5 und NL6 wurden zur Vervielfältigung des Gens nmb1343 (narE) genutzt und die Primer MP126 und MP127 (Zielgen nmb1567) als endogene Kontrolle (Pawlik et al., 2012).

2.9.1.4 DNA-Isolierung, Southern Blot und Hybridisierung

Für die Isolierung chromosomaler DNA wurden Meningokokken des entsprechenden Stamms von einer Übernachtskultur auf GC-Aggar in 5 ml PBS eingerieben, sodass eine Zellzahl von etwa $1,5 \times 10^{10}$ zur Verfügung stand. Diese wurden 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 7 ml Puffer B1 und 14 µl RNase resuspendiert. Anschließend wurden 160 µl Lysozymlösung hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurde die Suspension eine Stunde bei -70°C eingefroren und anschließend bei 50°C im Wasserbad aufgetaut. Es wurden 200 µl Proteinase K und 2,4 ml Puffer B2 hinzugefügt, eine Stunde bei 50°C im Wasserbad inkubiert und 15 ml QBT-Puffer zugefügt. Die DNA wurde dann mit QIAGEN Genomic-tip 100/G nach Herstellerangaben isoliert, in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4°C resuspendiert.

Anschließend wurde die chromosomale DNA der gewünschten Stämme in einem Verdau mit MfeI geschnitten. In einem Ansatz von 50 µl wurden etwa 2-3 µg DNA, 1 µl des Enzyms und 5 µl des zugehörigen 10x Puffers eingesetzt. Der Verdau lief über Nacht bei 37°C ab und wurde über ein 0,8-%iges Agarosegel aufgetrennt. Für die elektrophoretische Auftrennung wurden die DIG-III und -VII Marker zum Größenvergleich herangezogen.

Das Agarosegel wurde anschließend 20 min in 0,25 M HCl inkubiert, um die DNA zu depurinieren, und danach jeweils 30 min in Denaturierungs- und Neutralisierungslösung schüttelnd inkubiert.

Die DNA wurde in einem „Sandwich“ Aufbau mit 10x SSPE Puffer 4 h auf eine positiv geladene Nylonmembran geblottet und diese anschließend luftgetrocknet. Durch UV-cross linking wurde die DNA mit der Membran verbunden.

Sondenmarkierung und –quantifizierung

Für den Southern Blot wurde zuerst eine Digoxigenin-markierte *narE*-Sonde hergestellt. Mit den Primern FG11/FG12 wurde ein Abschnitt des *narE*-Gens mittels PCR amplifiziert und mit dem PCR Purification Kit aufgereinigt. Zur Markierung der DNA wurden 15 µl bei 95°C im Wasserbad denaturiert und nach Abkühlen auf Eis mit 2 µl Hexanukleotidgemisches, 2 µl DIG-dUTP-Markierungsgemisch und 1 µl Klenow-Enzym versetzt. Die Reaktion lief über Nacht bei 37°C ab, wurde am nächsten Tag mit 2 µl EDTA (0.2 M, pH 8.0) abgestoppt und die DNA mit 2,5 µl Na-Acetat (3 M, pH 4.5) und 75 µl eiskaltem Ethanol für mindestens 30 min bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugieren bei 4°C und einmaligem Waschen mit 70% kaltem Ethanol wurde die markierte DNA getrocknet, in 50 µl TE-Puffer gelöst und die Konzentration in einer Verdünnungsreihe im Vergleich zu einer Standardreihe im Dot-Blot bestimmt. Dabei wurde die DIG-Markierung mittels Enzym-Immunoassay nachgewiesen und mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

Hybridisierung

Der Blot wurde 1 h mit „High SDS“-Lösung bei 42°C vorhybridisiert. Um eine Hybridisierung zwischen der denaturierten DNA auf dem Blot und der Sonden-DNA (etwa 100 ng) zu ermöglichen, musste letztere in 10 ml „High SDS“-Lösung bei 95°C 10 min denaturiert werden. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde die Sonde zu dem Blot gegeben und anschließend über Nacht bei 42°C inkubiert. Damit unspezifische Anlagerungen der Sonde an den Blot gelöst werden, muss der Blot zunächst stringent gewaschen werden, zweimal 5 min mit zweimal SSC/ 0,1% SDS bei Raumtemperatur und zweimal 15 min 0,1x SSC/ 0,1 % SDS bei 68°C.

Daraufhin wurde bei Raumtemperatur 5 min mit Waschpuffer gewaschen, 30 min mit Puffer 2 blockiert, der mit alkalischer Phosphatase-konjugierte DIG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in Puffer 2 hinzugegeben und der Blot 30 min darin geschwenkt. Nachdem erneut zweimal 15 min mit Waschpuffer gewaschen wurde, inkubierte die Membran 5 min in Puffer 3 bevor das Substrat CSPD in einer Verdünnung von 1:100 in Puffer 3 für 5 min hinzugegeben wurde. In einer enzymatischen Reaktion wird das Substrat CSPD durch Dephosphorylierung in eine metastabile Zwischenform überführt, die zerfällt und dabei Licht emittiert. Der Blot wurde in Frischhaltefolie gewickelt, 15 min bei 37°C in den Brutschrank gelegt und anschließend ein Röntgenfilm aufgelegt.

2.9.2 Methoden zur Analyse von Protein

2.9.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Neisserienstämme wurden über Nacht auf GC Agar herangezogen und anschließend in Aqua dest. $OD_{600} = 0,5$ eingestellt. Davon wurde jeweils 1 ml entnommen, bei 13000 rpm für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet anschließend in 30 μ l 1x Sample Solution resuspendiert. Die Proben wurden bei 95°C 5 min im Wasserbad erhitzt und auf Eis abgekühlt. Für die Gelelektrophorese wurden je 10 μ l der Probe eingesetzt. Der Protein Prestained Marker diente als Größenstandard. Die Proteinauftrennung erfolgte bei 10 bzw. 20 mA für circa 1,5 h in Elektrophorese-Puffer.

2.9.2.2 Western Blot

Zum spezifischen Proteinnachweis mittels Antikörperbindung wurden die Proteine aus dem SDS-Gel in Blotpuffer bei 300 mA für 1h auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach dem Elektroblot wurde die Membran über Nacht mit 20 μ l polyklonalem anti-NarE-Kaninchenserum und 250 μ l Ziegenserum in 10 ml PBS-Tween inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Tween für 5 min folgte die Bindung des Peroxidase-konjugierter Ziegenantikörpers gegen Kaninchen IgG und IgM für 1h bei Raumtemperatur.

Nach erneutem Waschen wurde der Blot mit Hilfe des ECL Western Blotting Substrats nach Herstellerangaben entwickelt.

Die anschließende Analyse mittels densitometrischer Bandenmessung erfolgte anschließend mit dem Programm Image J.

2.9.2.3 Silberfärbung

Der Proteinnachweis im SDS-Gel erfolgte mittels Silberfärbung. Dazu wurde das Gel 30 min in Fixierlösung fixiert und anschließend je 10 min mit 50- und 10%igem Ethanol gewaschen. Nachdem 60 sec mit 0,02%igem Natriumthiosulfat blockiert wurde, folgten drei Waschschrte à 20 sec in Aqua dest. und der Färbevorgang in frisch angesetzter Silberfärbelösung. Nach 20 min folgte ein zweiter Waschvorgang à zweimal 20 sec. Das Gel wurde in Entwicklerlösung geschwenkt, bis die gewünschte Bandenstärke sichtbar wurde. Der Vorgang wurde für 15 min in 10%iger Essigsäure abgestoppt und das Gelbild gescannt.

2.9.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der für die NarE-Western Blots genutzten Proben wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit nach dem dazugehörigen Protokoll bestimmt. In eine 96 Well-Platte wurden jeweils 25 µl der Standards (BSA-Verdünnungsreihe) und der Proben pipettiert und 200 µl des Entwicklungsreagenzes hinzu gegeben. Die Platte wurde bei 37°C für 30 min inkubiert und bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Standardkurve bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Vorhandensein und DNA-Sequenzvariabilität von *narE* in *Neisseria* spp.

3.1.1 Stammauswahl

NarE von *Neisseria meningitidis* wurde 2003 erstmals von Masingani beschrieben (Masingani et al., 2003). Neben funktionellen Untersuchungen wurde eine Analyse des Vorhandenseins des Gens in 43 Stämmen verschiedener klonaler Linien durchgeführt. Diese war auf einige wenige klonale Linien begrenzt.

In dieser Arbeit wurden 148 Neisserienstämme untersucht, zu denen 109 Meningokokken, 29 Gonokokken und 10 apathogene Neisserienstämme (Tab. 2,3 und Anhang) gehörten. Bei den Meningokokken-Stämmen wurde zwischen Träger- und Erkrankungsisolaten unterschieden. Der Multilokussequenztyp (ST) und gegebenenfalls der klonale Komplex (cc) der Stämme waren bekannt. Stämme der ST-32- und ST-41/44-Komplexe verursachen einen Großteil der Serogruppe B-Erkrankungen weltweit, Stämme der ST-8- und ST-11-Komplexe sind für eine Mehrzahl der Serogruppe C-Erkrankungen verantwortlich.

Tab. 1: Charakterisierung und Herkunft der Meningokokken-Stämme

Klonaler Komplex	Sero-gruppe	Anzahl der Stämme		Herkunft
		Erkrankung	Trägerisolat	
ST-1	A	10	-	DE, SU/DD, CN, IN
ST-4	A	4	-	DE, USA, NO
ST-5	A	4	-	DE
ST-8	C	4	2	DE
ST-11	C	6	2	DE
ST-22	W, Y	4	3	DE
ST-23	Y	-	4	DE
ST-32	B	15	3	DE, UK, NO
ST-41/44	B	9	10	DE
ST-53	NSG	1	6	DE
ST-60	NSG	2	3	DE
ST-269	B	10	3	DE
ST-845	NSG	-	4	DE

3.1.2 Nachweis von *narE*

148 Neisserien-Stämme wurden mittels PCR mit den Primern FG11/FG12 auf das Vorhandensein des *narE*-Gens getestet. Das amplifizierte DNA-Fragment hatte eine Länge von 348 Basenpaaren.

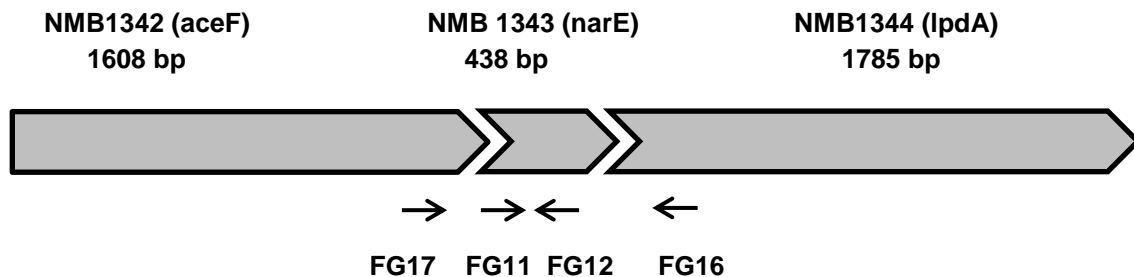


Abb. 1: Lokalisation der verwendeten Primer für die Amplifikation von *narE*

NarE besteht aus 438 Basenpaaren, die flankierenden Abschnitte bei der Verwendung der Primer FG 16/17 hatten eine Größe von rund 390 Basenpaaren downstream und circa 190 Basenpaaren upstream des Gens.

Von den 109 getesteten Meningokokkenstämmen zeigte die PCR bei 51 Stämmen (46,8%) ein positives Ergebnis. Nur für Meningokokken der klonalen Komplexe ST-1, ST-32 und ST-41/44 sowie des ST-845 konnte das *narE*-Gen nachgewiesen werden. Dabei war der Besitz des Gens nicht von der Herkunft des Isolats (Träger- oder Krankheitsisolat) abhängig. Die klonalen Komplexe 4, 5, 8, 11, 22, 23, 53, 60 und 269 besitzen das *narE* Gen nicht.

Um die Anzahl der Stämme auszuweiten, wurde das Vorhandensein von *narE* zusätzlich in den öffentlich zugänglichen Genomsequenzen von Stämmen der Meningococcus Research Foundation (MRF) Meningococcus Genome Library (PubMLST) untersucht. Im Rahmen eines Projektes der MRF wurden alle Meningokokken der epidemiologischen Jahre von Juli 2010 bis Juni 2013 aus England, Wales und Nordirland sequenziert und veröffentlicht. Für diese Arbeit wurden 467 Stämme des Zeitraums 2010-2011 analysiert (Stand 26.02.2013). Das Gen wurde in 190 der 467 Meningokokkenstämmen (40,7%) gefunden. Hierbei bestätigte sich das positive Ergebnis für die klonalen Komplexe ST-32cc

und ST-41/44cc. Die weiteren positiven Stämme gliedern sich in 8 Stämme des ST-35cc, 4 Stämme des ST-103cc, 6 Stämme des ST-62cc, 9 Stämme des ST-174cc und einen Stamm des ST-1157cc auf.

Tabelle 2 fasst das Ergebnis aller untersuchten Meningokokkenstämme der Würzburger Stammsammlung zusammen. Acht der untersuchten klonalen Komplexe kamen auch bei den MRF-Stämmen vor. Diese konnten das Ergebnis bestätigen. Hierunter befinden sich auch die Komplexe ST-32cc und ST-41/44cc.

Tab. 2: Nachweis von *narE* bei Meningokokken verschiedener klonaler Komplexe

Klonaler Komplex	Anzahl Stämme NRZM	Anzahl positiver <i>narE</i> Stämme	Anzahl Stämme MRF	Anzahl positiver <i>narE</i> Stämme
ST1cc (ST1, ST2, ST3, ST58, ST59)	10	10	0	-
ST4cc	4	0	0	-
ST5cc (ST5, ST7)	4	0	0	-
ST8cc (ST8, ST66)	6	0	0	-
ST11cc	8	0	21	0
ST22cc (ST22, ST903)	7	0	13	0
ST23cc	4	0	57	0
ST32cc (ST32, ST33, ST34, ST74, ST801, ST2264)	18	18	29	29
ST41/44cc (ST41, ST42, ST44)	20	19	136	133
ST53cc	7	0	0	-
ST60cc	5	0	15	0
ST269cc (ST269, ST283, ST797, ST798, ST1161, ST2768, ST5739)	13	0	100	0
ST845	4	4	0	-

In den bisher beschriebenen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass das Vorkommen des *narE*-Gens mit bestimmten klonalen Komplexen assoziiert ist. Das *narE*-Gen wurde auch in den Stämmen des ST845 gefunden, welcher sich keinem klonalen Komplex zuordnen lässt. Diese besitzen wie auch ST53 Stämme einen sogenannten capsule null locus und exprimieren keine Kapsel (Claus et al. 2005).

Zur Analyse, ob *narE* in phylogenetisch verwandten klonalen Komplexen vorkommt, wurde von den konkatenierten Sequenzen der MLST-Allele des jeweils zentralen Sequenztyps mit der Software MEGA ein Neighbour Joining Tree erstellt (Abb. 2) (Tamura et al., 2007). Die drei *narE*-positiven klonalen Komplexe sind auf unabhängigen Ästen des Baumes zu finden, so dass *narE* mutmaßlich mehrfach importiert oder verloren wurde.

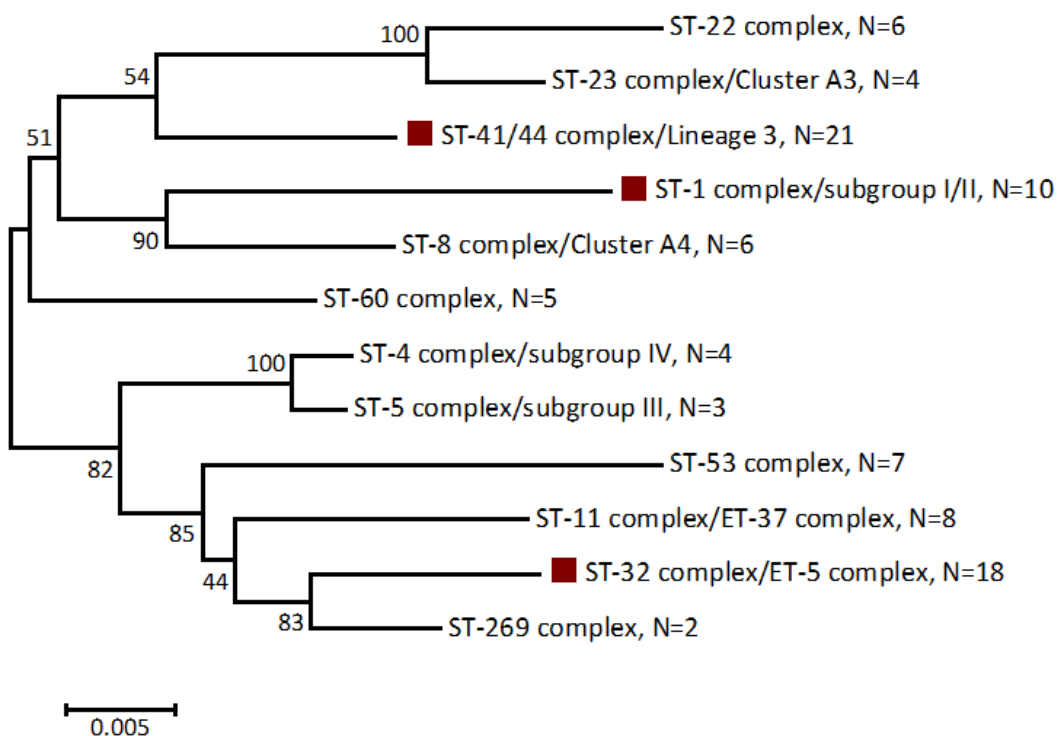


Abb. 2: Neighbor Joining Tree der konkatenierten MLST-Allele der untersuchten Stämme
Die Träger des *narE*-Gens sind rot gekennzeichnet. Das *narE*-Gen ist in klonalen Komplexen enthalten, die an unterschiedlichen Positionen des phylogenetischen Baumes zu finden sind.

Bei allen *Neisseria gonorrhoeae* Stämmen (29/29) und einem apathogenen Neisserienstamm (*Neisseria sicca*) (1/10) wurde das *narE*-Gen nachgewiesen. Bei negativem Ergebnis wurden die entsprechenden Stämme zusätzlich mittels Southern Blot untersucht (Abb. 3). Ich konnte zeigen, dass PCR-negative Stämme kein Hybridisierungssignal im Southern Blot aufweisen und ihnen somit das Gen fehlt.

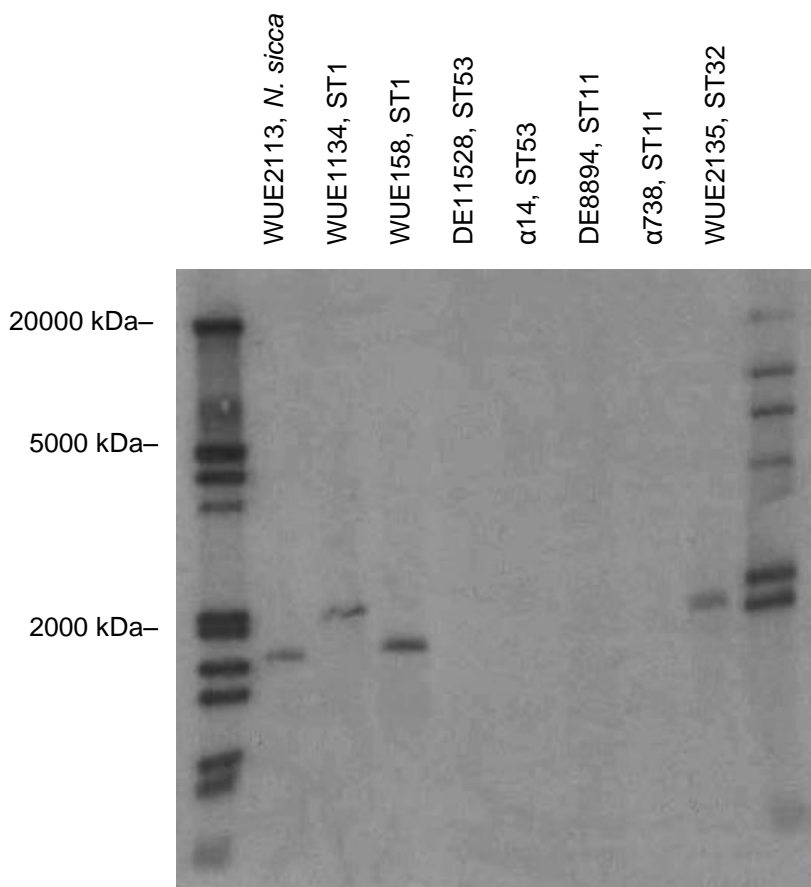


Abb. 3: *NarE*-Southern Blot

Die chromosomale DNA wurde mit MfeI verdaut und *narE* mit der Sonde FG11/FG12 nachgewiesen. Der Stamm WUE2135 diente als Positivkontrolle.

Die negativen PCR-Ergebnisse wurden mittels Southern Blot bestätigt. Diese Abbildung zeigt vier *narE*-negative Stämme sowie neben WUE2135 drei weitere *narE*-positive Stämme, wie aus PCR und Western Blot bekannt war.

3.1.3 Sequenzierung von *narE*

Zur Sequenzierung des kompletten Gens inklusive der umgebenden Regionen wurden die Primer FG11 mit FG16 und FG12 mit FG17 kombiniert, die in den umgebenden Regionen binden. Die Sequenzen der erhaltenen Amplifikate wurden anschließend verknüpft, um das komplette Gen zu erhalten. Für Gonokokken wurden die Primer FG20/13 verwendet.

Die meisten untersuchten Sequenzen (242/244), inklusive *Neisseria sicca*, stimmen zu hundert Prozent überein. Lediglich zwei Serogruppe B Stämme der MRF Datenbank wiesen eine Punktmutation mit Änderung der Aminosäure auf (Tab. 3). Ein Stamm des sonst *narE*-positiven klonalen Komplexes 41/44 der Würzburger Stammsammlung sowie drei Stämme des cc41/44 der MRF-Genomsequenzen besitzen das Gen nicht.

Tab. 3: Abweichungen der Sequenz

Stamm ID	Sequenz-typ	Klonaler Komplex	Sero-gruppe	Bezugs-quelle	Art der Mutation	Position
20304	ST1475	ST41/44	B	MRF	Punktmutation A → G Tyr → Cys	278
20445	ST41	ST41/44	B	MRF	Punktmutation G → A Gly → Ser	268

Wie von Massignani et al. (2003) beschrieben, liegt bei Gonokokken eine Mutation vor. Die untersuchten Gonokokken zeigten die Insertion von vier Nukleotiden, 5'-TTAT-3', 12 Basenpaare nach dem Startcodon (Abbildung 4). Diese hat eine Verschiebung des Leserasters und somit einen Abbruch der Transkription nach sieben Aminosäuren zur Folge. Dies konnte ausnahmslos für alle Gonokokkenstämme per Western Blot bestätigt werden.

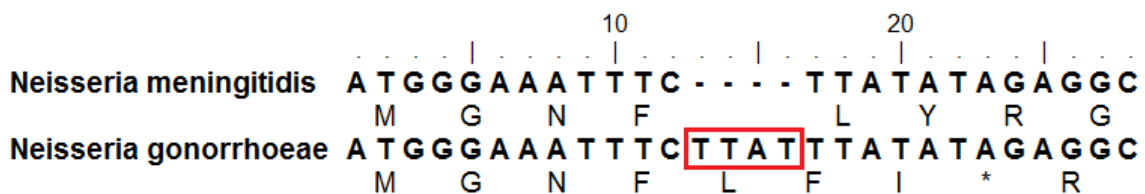


Abb. 4: Insertion von vier Basenpaaren im *narE*-Gen bei *Neisseria gonorrhoeae*
Neisseria gonorrhoeae hat eine Insertion von vier Basenpaaren, wodurch es zu einer Verschiebung im Leseraster und somit zu keiner Expression von NarE kommt.

3.2 NarE-Expression

3.2.1 Proteinexpression von NarE in *Neisseria spp.*

Zur Überprüfung, ob die *narE*-positiven Stämme das Enzym NarE exprimieren, wurden Western Blots dieser Stämme mit einem polyklonalen NarE-Kaninchenantikörper entwickelt. Im Western Blot erscheinen mehrere Banden aufgrund der mäßigen Spezifität des Antikörpers. Nichtsdestotrotz zeigten alle *narE*-positiven *Neisseria meningitidis* Stämme im Western Blot eine Bande bei etwa 16 kD (Abb. 5). *Neisseria gonorrhoeae* zeigte in den Western Blots keine NarE-Bande in diesem Bereich. Unter den 10 Stämmen apathogener Neisserienarten war das *narE*-Gen nur bei einem *N. sicca* Stamm nachgewiesen worden, welcher NarE auch exprimierte.

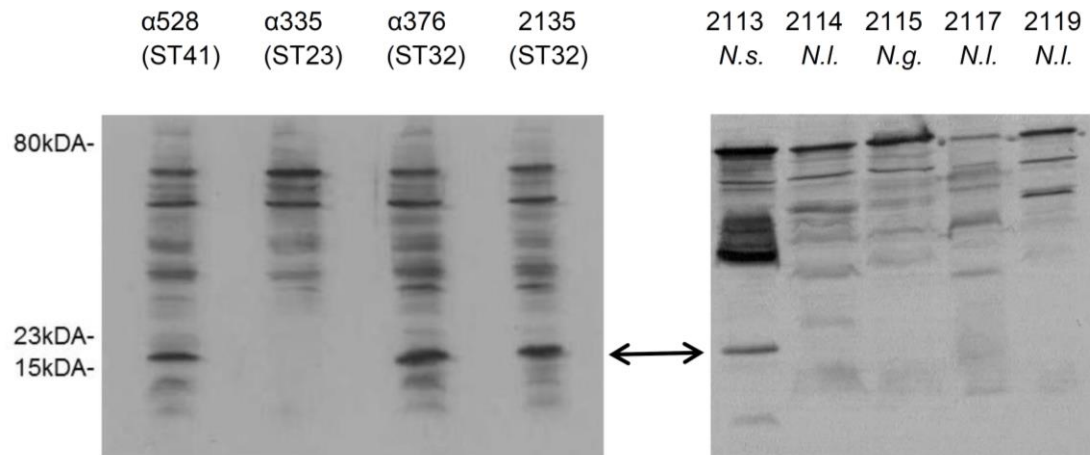


Abb. 5: Western Blot mit polyklonalen NarE-Antikörpern

Der Pfeil weist auf die 16 kD- Bande des NarE-Proteins hin. Der Stamm MC58 (WUE2135) diente als Positivkontrolle. α335 und die *N. lactamica*-Stämme besaßen kein *narE*-Gen. Der Gonokokkenstamm WUE2115 exprimiert aufgrund einer Insertion im *narE*-Gen, die zu einem vorzeitigen Stopp-Codon führt, kein NarE.

Die Bestimmung der Expressionsstärke der einzelnen Stämme erfolgte auf jedem Blot über das Signal der NarE-Bande in Referenz zu dem des Stammes MC58. Um eine Vergleichbarkeit der aufgetragenen Proteinmengen zu gewährleisten, wurde jeweils die Proteinkonzentration der Proben bestimmt. Die Western Blots wurden jeweils zweimal durchgeführt und die mittlere relative Expression ermittelt (Abb. 6).

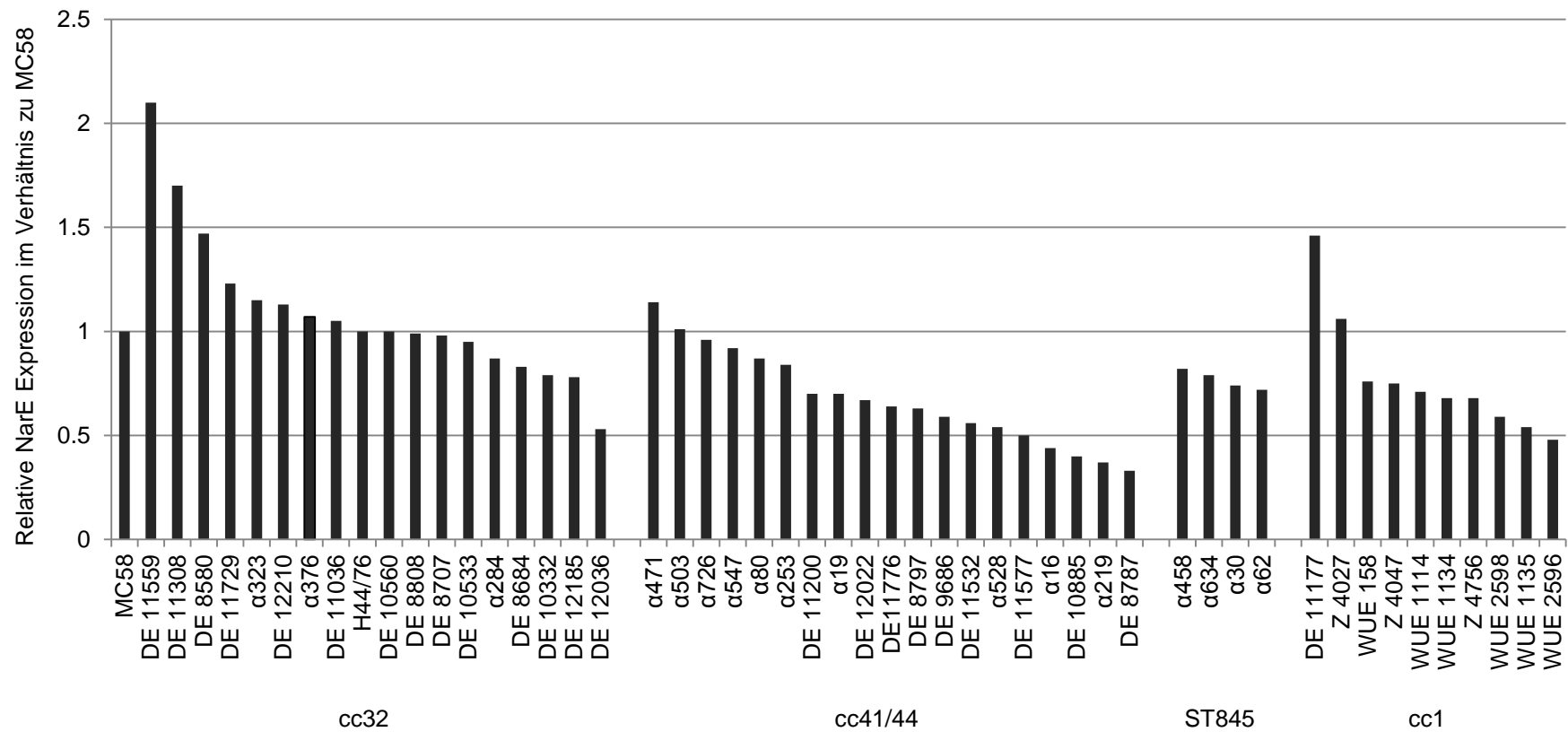


Abb. 6: Relative NarE-Expression aller *narE*-positiven Meningokokken in Bezug auf MC58

Die Signalstärke der NarE-Bande des Stammes MC58 wurde für alle untersuchten Stämme als Referenz ausgewählt. Die Stämme sind nach ihrem klonalen Komplex bzw. Sequenztyp geordnet.

Die durchschnittliche NarE-Expression war unterschiedlich zwischen klonalen Komplexen beziehungsweise Sequenztypen. So exprimierten die Stämme des cc32 signifikant mehr NarE als die Stämme des cc41/44 (Abb. 7).

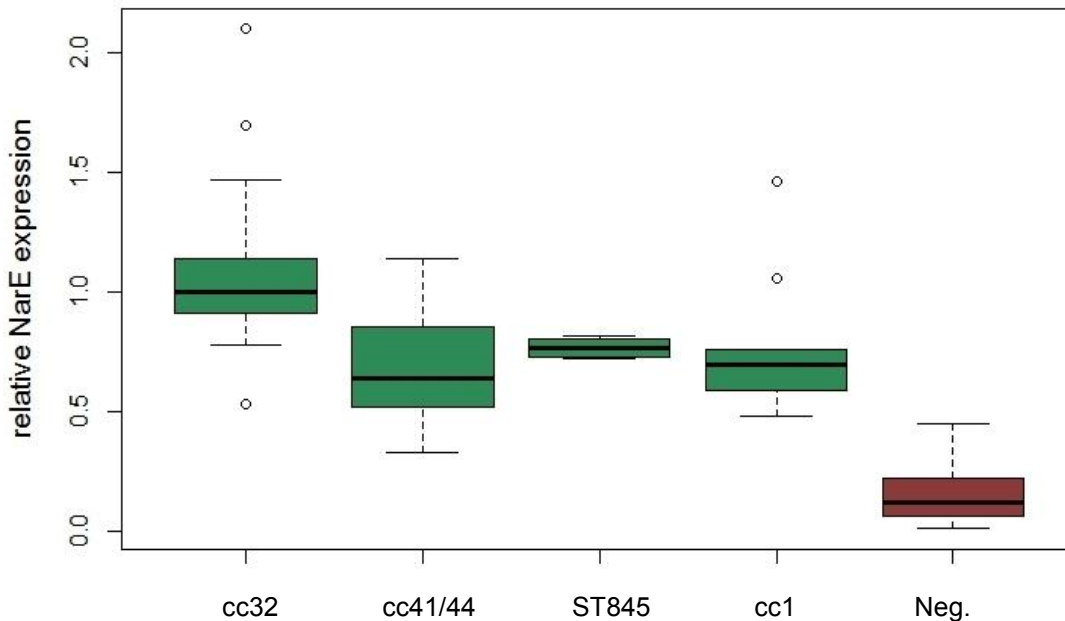


Abb. 7: Relative NarE-Expression von Meningokokken verschiedener klonaler Komplexe

Der Boxplot zeigt die Streuung und Verteilung der Ergebnisse der Proteinexpression. Hier bildet sich die deutliche höhere Expression bei Stämmen des cc32 ab. Ein Wilcoxon Rangfolgen Test bestätigte mit einem p-Wert kleiner 0,001 und einem Signifikanzniveau von 95% eine signifikant höhere Proteinmenge für diesen Komplex.

3.2.2 Transkription von *narE* in Meningokokken

Zur Untersuchung, ob die unterschiedliche Proteinexpression innerhalb der klonalen Komplexe auf einer unterschiedlichen Transkription beruht, wurde mit einer Auswahl von *narE*-positiven Stämmen (n=15; hiervon cc32: n=10, cc41/44: n=5) der klonalen Komplexe cc32 und cc41/44 sowie *narE*-negativen (n=2) Stämmen eine quantitative RT-PCR mit den Primern NL5/NL6 durchgeführt. Als endogene Kontrolle der PCR wurde das Gen NMB1567 (*macrophage infectivity potentiator*) verwendet (Pawlik et al., 2012). Beide PCR-

Ansätze wiesen eine ausreichend hohe Effizienz auf, um die Vergleichbarkeit zu garantieren. Abbildung 8 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines Experiments.

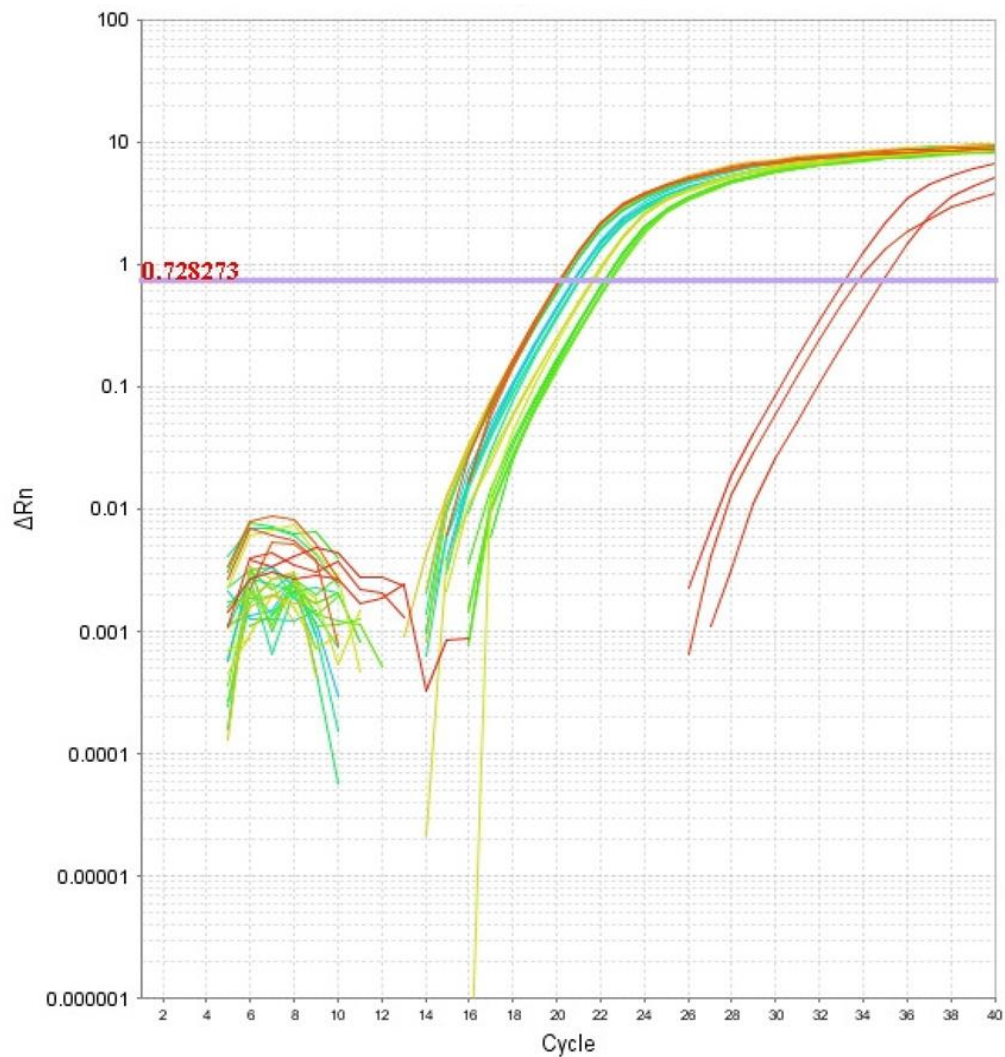


Abb. 8: qRT-PCR-Amplifikationsverlauf für NarE

Dargestellt ist das um die Basislinie korrigierte Fluoreszenzsignal (ΔR_n) in Abhängigkeit vom Amplifikationszyklus. Der Grenzwert dieses Experiments lag bei 0,729. Die positiven Proben ($n= 15$) überschritten diesen Grenzwert nach 20-22 Cyclen (Ct-Wert). Für die Negativkontrollen (Stämme ohne *narE*-Gen), die in rot dargestellt sind, ergab sich ein Ct-Wert über 30.

Die qRT-PCR wurde für jeden Stamm zweimal durchgeführt. Die Mittelwerte der Ct-Werte aller Stämme innerhalb der klonalen Komplexe sind in Abbildung 9 dargestellt. Die endogene Kontrolle weist vergleichbare Werte bei beiden klonalen Komplexen auf. Die durchschnittliche *narE*-Transkription der Stämme beider klonaler Komplexe unterscheidet sich kaum. Das Ergebnis kann daher nicht als Beleg für eine transkriptionelle Ursache der unterschiedlichen Proteinexpression gewertet werden.

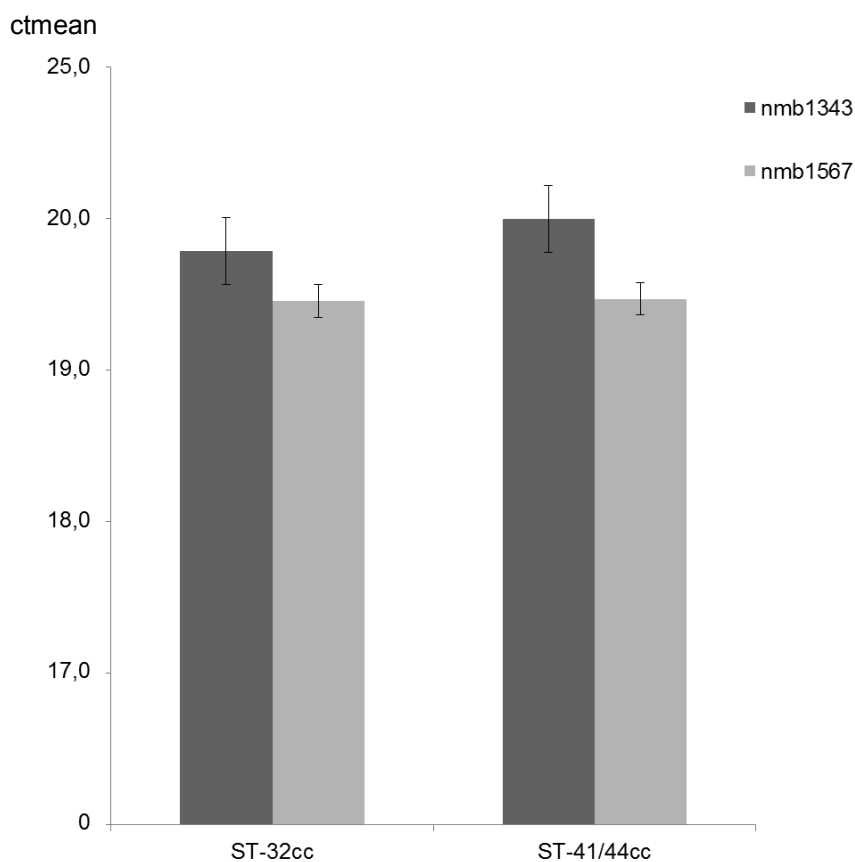


Abb. 9: Ct-Werte der *narE*-qRT-PCR von Stämmen des cc32 und das cc41/44

Von 10 Isolaten des cc32 und 5 Isolaten des cc41/44 wurde im 2-fachen Ansatz eine *narE*-qRT-PCR durchgeführt. Als endogene Kontrolle wurde das Gen NMB1567, ein MIP (macrophage infectivity potentiator), amplifiziert.

4. Diskussion

Basierend auf Consensus-Motiven bakterieller ADP-Ribosyltransferasen wurde mittels bioinformatischer Methoden das *narE*-Gen im Genom des Stammes MC58 identifiziert (Masignani et al., 2003). Um das *narE*-Gen näher zu untersuchen, wurden 41 Meningokokkenstämmen getestet, wobei das *narE*-Gen in 25 Stämmen nachgewiesen werden konnte. Unter den 25 Stämmen ließen sich 12 Stämme dem ST-32 Komplex, 4 Stämme dem ST-41/44 Komplex und 7 Stämme keinem Komplex zuordnen. Außerdem wurde eine Insertion von vier Basenpaaren im *narE*-Gen bei zwei getesteten Gonokokkenstämmen beschrieben. Es wurde die mögliche Rolle als Virulenzfaktor bei hypervirulenten Neisserienstämmen diskutiert. In weiteren Studien zu *narE* wurde vor allem auf die Struktur und Biochemie des Proteins eingegangen. Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen von *narE* in der Meningokokkenpopulation und die Proteinexpression von *narE* genauer zu untersuchen.

Die Prävalenz einer Kolonisation des Nasen-Rachen-Raums mit Meningokokken ist weit höher als die invasiver Meningokokkenerkrankungen. Die Mechanismen, die die Virulenz erhöhen und plötzlich von einem asymptomatischen Trägertum zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung führen, sind nicht vollständig geklärt. Untersuchungen zeigen, dass die Virulenz am ehesten durch multiple Gene und metabolische Rahmenbedingungen bedingt ist (Joseph et al., 2011). Die Kenntnis des Genpools verschiedener Meningokokken und des daraus resultierenden Proteoms sind für das Verständnis der Ökologie und Virulenz verschiedener Linien entscheidend, aber noch nicht ausreichend vorhanden.

ADP-Ribosyltransferase sind Enzyme, welche zu posttranslationalen Modifikationen führen. Zu ihnen gehören einige bakterielle Toxine wie Cholera- oder Pertussistoxin (Van der Broek et al., 2007; Katada 2012). Die ADP-Ribosyltransferaseaktivität von NarE konnte bereits nachgewiesen werden (Del Vecchio et al., 2009).

Die Kenntnis des Vorkommens und der Proteinexpression von *narE* lassen, in Kombination mit dem Wissen um pathogene Neisserienstämmen und

epidemiologische Zusammenhänge, Rückschlüsse auf Ursprung, Entwicklung und die mögliche Bedeutung als Virulenzfaktor zu.

Um dies genauer zu analysieren, wurde vorrangig untersucht, welche Neisserienstämme im Besitz des Gens sind. Eine Stammauswahl, die sowohl Träger- als auch Krankheitsisolate berücksichtigt, sollte genauer Aufschluss geben. Das Ergebnis zeigt vor allem, dass die Komplexe ST-32cc und ST-41/44cc das Gen bis auf wenige Ausnahmen durchgehend besitzen. Diese beiden Linien gehören überwiegend der Serogruppe B an und verursachen weltweit den größten Anteil invasiver Meningokokkenerkrankungen (Whittaker et al., 2017). Auch Meningokokken der Serogruppe A mit klonalem Komplex ST-1cc verursachen invasive Erkrankungen und haben sich hier als Träger des Gens gezeigt. Hypervirulente Komplexe verursachen überproportional viele Meningokokkenerkrankungen im Verhältnis zur asymptomatischen Kolonisation (Caugant, 1998). Weitere Vertreter dieser Gruppe sind die Serogruppe C Komplexe ST-11cc sowie ST-8cc (Claus et al., 2003). Bei diesen Stämmen konnte das Gen allerdings nicht identifiziert werden. Dies bedeutet, dass *NarE* keine Voraussetzung für die Virulenz eines Stammes ist.

Auch andere bekannte Virulenzfaktoren wie *OpcA* kommen in ST-11 nicht vor. *OpcA* ist ein Protein der äußeren Membran von Meningokokken, das für die Vermittlung der Adhäsion und Invasion von Epithelzellen eine entscheidende Rolle spielt. *OpcA* wird in mehreren hypervirulenten Komplexen wie cc32 oder cc41/44 weitgehend konserviert nachgewiesen. Aufgrund des niedrigen GC-Gehalts und der Genveränderungen wie Insertion und Verlust des Gens wird ein Import vor Expansion aus einem fremden Bakteriengenom als wahrscheinlich erachtet. (Seiler et al., 1996; Zhu et al. 1999)

Die Assoziation des *narE*-Gens mit mehreren klonalen Linien kann auf dessen Bedeutung für diese Linien hinweisen. Aufgrund der strengen Konservierung und geringen Variabilität wird ein Verlust des Gens offenbar nicht toleriert. Um das Auftreten bei kommensalen Stämmen zu vertiefen, wurde die Studie auf zehn apathogene Neisserienstämme ausgedehnt. Ein *Neisseria sicca* Stamm dieser Auswahl besitzt das identische *narE*-Gen. *Neisseria sicca* sind kommensale Bakterien, die den Nasenrachenraum kolonisieren. Über

Kreuzreaktivität können diese einen Schutz vor pathogenen Stämmen bilden (Oliver et al., 2002), sind allerdings auch Quelle eines horizontalen Gentransfers (Troncoso et al., 2000; Linz et al. 2000). Der Nachweis von *narE* in diesem Stamm ist allerdings nicht ungewöhnlich, da apathogene Neisserien einen Genpool mit Meningokokken teilen. Offenbar persistiert *narE* jedoch in den apathogenen Neisserien nicht. Eine genauere Antwort könnte der Vergleich der mittlerweile zahlreichen Genomanalysen liefern. Auch in Bezug auf NarE könnte genauer untersucht werden, inwieweit das Protein bei Infektion mit *narE*-positiven Meningokokken eine Immunreaktion im Sinne einer Antikörperproduktion hervorruft (McNaughton et al., 2009).

Die strikte Konservierung der Sequenz ist ungewöhnlich für pathogene Neisserien, welche einem hohen Selektionsdruck unterliegen. In der Regel zeigen Meningokokken ein hohes Maß an Diversität. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, erfolgte die zusätzliche Analyse von 467 Stämmen der MRF Meningococcus Genome Library. Diese konnte die bisherigen Untersuchungen bestätigen. Ergänzend zeigten wenige weitere klonale Komplexe ebenfalls das Gen.

Es ist bekannt, dass Meningokokken einer hohen Variabilität und großen Dynamik ihres Genoms unterliegen (Davidsen und Tonjum, 2006). Es wurde allerdings nur je eine Punktmutation bei zwei Stämmen des Komplexes ST-41/44cc gefunden. Die Konservierung von *narE* lässt also verschiedene Schlüsse zu. Einerseits ist vorstellbar, dass NarE keine Immunität erzeugt. Der folglich mangelnde Selektionsdruck könnte die fehlende Variabilität also erklären. Andererseits kann eine strenge Konservierung des Genabschnitts auch für einen erst kürzlich erfolgten Import des Gens sprechen. Unterstützt wird diese Theorie durch das exklusive Vorkommen bei den eng verwandten Meningokokken und Gonokokken im Vergleich zu anderen Neisserienarten mit Ausnahme von *Neisseria sicca*. Es könnte anhand dieser Ausnahme spekuliert werden, dass es vereinzelt zu einem artenübergreifenden Gentransfer gekommen ist. Ausgedehnte Analysen von Vertretern vieler Arten wären notwendig, um ein vollständiges Bild zu erhalten.

Der GC-Gehalt des Gens liegt mit 35% etwa 17% unter dem typischen Durchschnitt, was den Import des Gens aus einem neisserienfremden Genom erklären würde. Der Unterschied bezüglich des *narE*-Besitzes, wie zwischen cc269 und cc32, spricht für ein kürzliches Importereignis, da der GC-Gehalt noch nicht angepasst werden konnte. Allerdings war auffällig, dass alle Stämme, die einem klonalen Komplex zugehörig sind, auch im Besitz des Gens sind. Dies wiederum lässt vermuten, dass der Import vor dem Zeitpunkt der Expansion der Komplexe stattgefunden haben muss.

Aufgrund der Duplikation von vier Basen im *narE* von Gonokokken kommt es zu einem vorzeitiges Stoppcodon, weshalb es auch als Pseudogen gewertet wurde (Masignani et al., 2003). 2016 konnten Rodas et al. die Expression eines verkürzten NarE bei Gonokokken mittels Western Blot nachweisen. Die Western blots der in dieser Arbeit untersuchten 29 Gonokokkenisolate wiesen jedoch keine Expression von NarE auf.

Des Weiteren wurde die Proteinexpression der *narE*-positiven Meningokokkenstämme mittels Analyse der Western Blots quantifiziert. Hier fiel eine signifikant größere Proteinmenge bei ST-32cc im Gegensatz zu ST-41/44cc auf. Ein Unterschied der Proteinmenge lässt in erster Linie eine unterschiedliche Genexpression vermuten. Eine mit klonalen Komplexen assoziierte Stärke der Proteinexpression findet sich auch bei anderen Proteinen. Hervorgehoben sei das Antigen NHBA, das ein Bestandteil des Impfstoffes Bexsero ist. Auch hier variiert die Menge an exprimiertem Protein bei verschiedenen klonalen Komplexen, was in diesem Fall eine Auswirkung auf die Stammabdeckung des Impfstoffs hat (Vogel et al., 2013). Welche funktionellen Auswirkungen die Expressionsunterschiede auf die klonalen Komplexe haben, muss in Zukunft untersucht werden. Die Expressionsunterschiede zwischen klonalen Komplexen waren unabhängig von der RNA-Expression, wie RT-PCR-Untersuchungen zeigten.

5. Zusammenfassung

Neisseria meningitidis ist Auslöser invasiver Infektionen, die Sepsis und Meningitis hervorrufen. Bakterielle ADP-Ribosyltransferasen wurden als Toxine zahlreicher Bakterien wie *E.coli*, *V. cholerae* und *B. pertussis* beschrieben, die posttranslationale Modifikationen bei eukaryotischen Proteinen mit pathologischer Wirkung für den Menschen hervorrufen. Die ADP-Ribosyltransferase NarE von Neisserien ist auf der Basis von Sequenzhomologien identifiziert worden. Die enzymatische Aktivität des Proteins wurde bereits in Studien gezeigt. Ziel dieser Arbeit war, NarE aus epidemiologischem und populationsbiologischem Blickwinkel zu betrachten.

Insgesamt wurden 576 Meningokokkenisolate (109 Isolate aus der Stammsammlung des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg und 467 Isolate der Meningococcus Genome Library der Meningitis Research Foundation) auf das Vorhandensein von *narE* sowie auf Sequenzvariationen untersucht. Das Ergebnis zeigte den Besitz des Gens bei insgesamt 247 Stämmen. Bis auf zwei Punktmutationen waren alle untersuchten *narE*-Sequenzen identisch. Die *narE*-positiven Isolate konnten neun klonalen Komplexen zugeordnet werden.

Zusätzlich wurde veranschaulicht, dass das Gen in Komplexen vorkommt, die verwandtschaftlich nicht eng miteinander verbunden sind.

Mittels Western Blot konnte bei allen *narE*-positiven Meningokokken die Proteinexpression bestätigt werden, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen Stämmen des cc32 und cc41/44 festzustellen war. Auf Transkriptionsebene konnte mittels qRT-PCR kein Unterschied zwischen diesen Komplexen ermittelt werden, so dass der Expressionsunterschied auf einem posttranskriptionellen Mechanismus beruhen muss.

Neisseria gonorrhoeae ist ebenfalls im Besitz des Gens wie von Massignani et al. (2003) am Beispiel weniger Isolate beschrieben. In dieser Arbeit konnte für alle 29 getesteten Gonokokken die Insertion von vier Basenpaaren bestätigt werden, die zu einer Verschiebung im Leseraster führt, so dass NarE nicht exprimiert wird. Auch ein *Neisseria sicca* Stamm beinhaltet und exprimiert das *narE*-Gen.

Dass *narE* in verschiedenen klonalen Komplexen konserviert vorliegt, lässt zunächst auf den Import vor deren Expansion schließen. Denkbar ist, dass einige Linien im zeitlichen Verlauf das Gen verloren haben. Es ist allerdings untypisch für Neisserien, dass ein Virulenzfaktor so hoch konserviert vorliegt, da die Gene bei längerem Besitz einer höheren Variabilität unterliegen. Zum einen könnte dies für einen geringen Selektionsdruck sprechen. Andererseits wäre dies wiederum, passend zu dem niedrigeren GC-Gehalt, ein Indikator dafür, dass das Gen doch erst jüngst importiert wurde. Es lässt sich vermuten, dass *narE* zwar für einen möglichen Virulenzfaktor kodiert, dieser jedoch nicht notwendig für die Virulenz eines Stammes ist.

Die unterschiedliche Proteinexpression zwischen zwei großen klonalen Komplexen ST-32 und ST-42/44 entspricht der Variabilität, die auch für andere Proteine bei Meningokokken bekannt ist.

6. Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

Achtman M. 2008. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol.* 62, 53–70.

Aktories K, Lang AE, Schwan C, Mannherz HG. 2011. Actin as target for modification by bacterial protein toxins. *FEBS J.* 278(23):4526-43.

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. 2014. Phase variation mediates reductions in expression of surface proteins during persistent meningococcal carriage. *Infect Immun.* 82(6):2472-84.

Ampattu BJ, Hagmann L, Liang C, Dittrich M, Schlüter A, Blom J, Krol E, Goesmann A, Becker A, Dandekar T, Müller T, Schoen C. 2017. Transcriptomic buffering of cryptic genetic variation contributes to meningococcal virulence. *BMC Genomics.* 18(1):282.

Bennett JS, Jolley KA, Earle SG, Corton C, Bentley SD, Parkhill J, Maiden MC. 2012. A genomic approach to bacterial taxonomy: an examination and proposed reclassification of species within the genus *Neisseria*. *Microbiology.* 158(Pt 6):1570-80.

Brandtzaeg P, Bjerre A, Øvstebø R, Brusletto B, Joø GB, Kierulf P. 2001. *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharides in human pathology. *J Endotoxin Res.* 401-420.

Capecchi B, Adu-Bobie J, Di Marcello F et al.. 2005. *Neisseria meningitidis* NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells. *Mol Microbiol.* 55:687–98.

Cartwright KA, Stuart JM, Jones DM, Noah ND. 1987. The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect.* 99(3):591-601.

Castagnini M, Picchianti M, Talluri E, Biagini M, Del Vecchio M, Di Procolo P, Norais N, Nardi-Dei V, Balducci E. 2012. Arginine-specific mono ADP-ribosylation in vitro of antimicrobial peptides by ADP-ribosylating toxins. *PLoS One.* 7(8):e41417.

Caugant DA. 1998. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS.* 106(5):505-25.

Caugant DA, Kristiansen PA, Wang X, et al. 2012. Molecular characterization of invasive meningococcal isolates from countries in the African meningitis belt before introduction of a serogroup A conjugate vaccine. *PLoS One.* 7(9):e46019.

- Chain P. S., Grafham D. V., Fulton R. S., Fitzgerald M. G., Hostetler J., Muzny D., Ali J., Birren B., Bruce D. C. et al.** 2009. Genomics. Genome project standards in a new era of sequencing. *Science* 326, 236–237 10.
- Christensen H, May M, Bowen L, Hickman M, Trotter CL.** 2010. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 10(12): 853-861.
- Claus H., Vogel U., Swiderek H., Frosch M., Schoen C.** 2007. Microarray analyses of meningococcal genome composition and gene regulation: a review of the recent literature. *FEMS Microbiol Rev.* 31:43–51.
- Claus H, Maiden MC, Wilson DJ, McCarthy ND, Jolley KA, Urwin R, Hessler F, Frosch M, Vogel U.** 2005. Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis.* 191(8):1263-71.
- Claus H, Weinand H, Frosch M, Vogel U.** 2003. Identification of the hypervirulent lineages of *Neisseria meningitidis*, the ST-8 and ST-11 complexes, by using monoclonal antibodies specific to NmeDI. *J Clin Microbiol.* 41(8):3873-6.
- Collier RJ.** 1967. Effect of diphtheria toxin on protein synthesis: inactivation of one of the transfer factors *J. Mol. Biol.*, 25: 83–98.
- Coye LH, Collins CM.** Identification of SpyA, a novel ADP-ribosyltransferase of *Streptococcus pyogenes*. 2004. *Mol Microbiol.* 54(1):89-98.
- Davidson T, Tønjum T.** 2006. Meningococcal genome dynamics. *Nat Rev Microbiol.* 4(1):11-22.
- Del Vecchio M, Pogni R, Baratto MC, Nobbs A, Rappuoli R, Pizza M, Balducci E.** 2009. Identification of an Iron-Sulfur Cluster That Modulates the Enzymatic Activity in NarE, a *Neisseria meningitidis* ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem.* 284(48):33040-47.
- Deng Q, Barbieri JT.** 2008. Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins. *Annu Rev Microbiol.* 62:271-88.
- ECDC.** 2010. Public health management of sporadic cases of invasive meningococcal diseases and their contacts.
URL: https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/1010_GUI_Meningococcal_guidance.pdf [Stand 31.10.2018, 10.27 Uhr]
- ECDC.** 2016. Invasive meningococcal disease.
URL: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Invasive%20meningococcal%20disease%20AER.pdf> [Stand 31.10.2018, 10.45 Uhr]

- Ellis TN, Kuehn MJ.** 2010. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74(1):81-94.
- Fieldhouse RJ, Turgeon Z, White D, Merrill AR.** 2010. Cholera- and anthrax-like toxins are among several new ADP-ribosyltransferases. *PLoS Comput Biol.* 6(12):e1001029.
- Flacco ME, Manzoli L, Rosso A, Marzuillo C, Bergamini M, Stefanati A, Cultrera R, Villari P, Ricciardi W, Ioannidis JPA, Contopoulos-Ioannidis DG.** 2018. Immunogenicity and safety of the multicomponent meningococcal B vaccine (4CMenB) in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 1473-3099(18)30048-3.
- Frasch CE, Preziosi MP, LaForce FM.** 2012. Development of a group A meningococcal conjugate vaccine, MenAfriVac™. *Hum Vaccin Immunother* 8:715-24.
- Frosch M, Vogel U.** 2008. Chapter 8. Structure and Genetics of the Meningococcal Capsule. In: Frosch M, Maiden M, Editor. *Handbook of Meningococcal Disease: Infection Biology, Vaccination, Clinical Management.* Erste Auflage. Wiley-Blackwell: 145-164.
- Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K.** 2014. Clostridium difficile binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes.* 5(1):15-27.
- Gill DM, Pappenheimer AMJ.** 1971. Structure-activity relationships in diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.,* 246:1492–1495.
- Gold R.** 1987. Clinical aspects of meningococcal disease. In: Vedros NA, ed. *Evolution of meningococcal disease.* Vol. 2. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 69-97.
- Guidi R, Levi L, Rouf SF, Puiaac S, Rhen M, Frisan T.** 2013. Salmonella enterica delivers its genotoxin through outer membrane vesicles secreted from infected cells. *Cell Microbiol.* 15(12):2034-50.
- Halperin SA, Bettinger JA, Greenwood B, Harrison LH, Jelfs J, Ladhani SN, McIntyre P, Ramsay ME, Sáfadi MA.** 2012. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine:* 30;30 Suppl 2:B26-36.
- Han XY, Hong T, Falsen E.** 2006. Neisseria bacilliformis sp. nov. isolated from human infections. *J Clin Microbiol.* 44(2):474-9.
- Hammerschmidt S, Hilse R, van Putten JP, Gerardy-Schahn R, Unkmeir A, Frosch M.** 1996. Modulation of cell surface sialic acid expression in Neisseria meningitidis via a transposable genetic element. *EMBO J.* 15(1):192-8.

- Hammerschmidt S1, Müller A, Sillmann H, Mühlenhoff M, Borrow R, Fox A, van Putten J, Zollinger WD, Gerardy-Schahn R, Frosch M.** 1996. Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol.* 20(6):1211-20.
- Harrison OB, Claus H, Jiang Y, Bennett JS, Bratcher HB, Jolley KA, Corton C, Care R, Poolman JT, Zollinger WD, Frasch CE, Stephens DS, Feavers I, Frosch M, Parkhill J, Vogel U, Quail MA, Bentley SD, Maiden MC.** 2013. Description and nomenclature of *Neisseria meningitidis* capsule locus. *Emerg Infect Dis.*19(4):566-73.
- Harrison OB, Schoen C, Retchless AC, Wang X, Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ.** 2017. *Neisseria* genomics: current status and future perspectives. *Pathog Dis.* 31;75(6).
- Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME.** 2009. Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine.* 27 Suppl 2:B51-63.
- Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO.** 2006. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev.* 70(3):789-829. Review.
- Honjo T, Y Nishizuka, O Hayaishi.** 1968. Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem* 243(12), 3553-55.
- Hubert K, Pawlik MC, Claus H, Jarva H, Meri S, Vogel U.** 2012. *Opc* expression, LPS immunotype switch, and pilin conversion contribute to serum resistance of unencapsulated meningococci. *PLoS One* 7:e45132. 10.1371/journal.pone.
- Imhaus A.F., Dumenil G.** 2014. The number of *Neisseria meningitidis* Type IV pili determines host cell interaction. *EMBO J*, 33: 1767-1783.
- Irving TJ, Blyuss KB, Colijn C, Trotter CL.** 2012. Modelling meningococcal meningitis in the African meningitis belt. *Epidemiol Infect.* 140(5):897-905.
- Joseph B, Schwarz RF, Linke B, Blom J, Becker A, Claus H, Goesmann A, Frosch M, Müller T, Vogel U, Schoen C.** 2011. Virulence evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis* by recombination in the core and accessory genome. *PLoS One.* 6(4):e18441.
- Kahler CM, Stephens DS.** 1998. Genetic basis for biosynthesis, structure, and function of meningococcal lipooligosaccharide (endotoxin). *Crit Rev Microbiol.* 24(4):281-334.

- Katada T.** 2012. The inhibitory G protein G(i) identified as pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *Biol Pharm Bull.* 35(12):2103-11.
- Knapp O, Benz R, Popoff MR.** 2016. Pore-forming activity of clostridial binary toxins. *Biochim Biophys Acta.* 1858(3):512-25.
- Koehler C, Carlier L, Veggi D, Balducci E, Di Marcello F, Ferrer-Navarro M, Pizza M, Daura X, Soriani M, Boelens R, Bonvin AM.** 2011. Structural and biochemical characterization of NarE, an iron-containing ADP-ribosyltransferase from *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem.* 286(17):14842-51.
- Kristiansen PA, Diomandé F, Absatou KB, et al.** 2013. Impact of the serogroup A meningococcal conjugate vaccine, MenAfriVac, on carriage and herd immunity. *Clin Infect Dis.* 56:354-63.
- LaForce FM, Konde K, Viviani S, Préziosi MP.** 2007. The Meningitis Vaccine Project. *Vaccine.* 25 Suppl 1:A97-100.
- Linz, B., Schenker, M., Zhu, P. and Achtman, M.** 2000. Frequent interspecific genetic exchange between commensal neisseriae and *Neisseria meningitidis*. *Molecular Microbiology*, 36: 1049–1058.
- Maiden MC.** 1993. Population genetics of a transformable bacterium: the influence of horizontal genetic exchange on the biology of *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Lett.* 112(3):243-50. Review.
- Maiden MC, Malorny B, Achtman M.** 1996. A global gene pool in the neisseriae. *Mol Microbiol.* 21(6):1297-8.
- Maiden MC.** 2006. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 60:561-88.
- Maiden MC, Harrison OB.** 2016. Population and Functional Genomics of *Neisseria* Revealed with Gene-by-Gene Approaches. *J Clin Microbiol.* 54(8):1949-55.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17;95(6):3140-5.
- Masignani V, Balducci E, Di Marcello F, Savino S, Serruto D, Veggi D, Bambini S, Scarselli M, Aricò B, Comanducci M, Adu-Bobie J, Giuliani MM, Rappuoli R, Pizza M.** 2003. NarE: a novel ADP-ribosyltransferase from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 50(3):1055-67.

- Masignani V, Balducci E, Serruto D, Veggi D, Aricò B, Comanducci M, Pizza M, Rappuoli R.** 2004. In silico identification of novel bacterial ADP-ribosyltransferases. *Int J Med Microbiol.* 293(7-8):471-8.
- McCarthy PC, Sharyan A, Sheikhi Moghaddam L.** 2018. Meningococcal Vaccines: Current Status and Emerging Strategies. *Vaccines (Basel).* 2018 Feb 25;6(1).
- McNaughton A, Veggi D, Pizza M, Lavelle E.** 2009. NarE, a novel ADPRT from *Neisseria meningitidis* can modulate innate and antigen specific adaptive immune responses. Poster Meningitidis Research Foundation
URL: www.meningitis.org/assets/x/52306 [Stand 02.06.2015, 11.02 Uhr]
- Meningococcus Genome Library der Meningitis Research Foundation,** 2014.
URL: <https://www.meningitis.org/research-projects/mrf-meningococcus-genome-library> [Stand 31.10.18, 09.57 Uhr]
- Meningitis vaccine project.** 2018.
<http://www.meningvax.org> [Stand 31.10.2018, 11.28 Uhr]
- Moss J.** 1978. Activation of adenylate cyclase by heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin: evidence for ADP-ribosyl transferase activity similar to that of cholera toxin. *J. Clin. Invest.* 62:281–285.
- Moxon, E. R., Rainey, P. B., Nowak, M. A., Lenski, R. E.** 1994. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr. Biol.* 4, 24–33.
- Namork E, Brandtzaeg P.** 2002. Fatal meningococcal septicaemia with "blebbing" meningococcus. *Lancet.* 360(9347):1741.
- Oliver KJ, Reddin KM, Bracegirdle P, Hudson MJ, Borrow R, Feavers IM, Robinson A, Cartwright K, Gorrington AR.** 2002. *Neisseria lactamica* protects against experimental meningococcal infection. *Infect Immun.* 70(7):3621-6.
- PATH.** 2017. Putting an end to epidemic meningitis in Africa.
URL: https://path.azureedge.net/media/documents/CVIA_mena_fs_2017.pdf [Stand 31.10.2018, 10.47]
- Pawlik MC, Hubert K, Joseph B, Claus H, Schoen C, Vogel U.** 2012. The zinc-responsive regulon of *Neisseria meningitidis* comprises 17 genes under control of a Zur element. *J Bacteriol.* 194(23): 6594-603
- Picchianti M, Del Vecchio M, Di Marcello F, Biagini M, Veggi D, Norais N, Rappuoli R, Pizza M, Balducci E.** 2013. Auto ADP-ribosylation of NarE, a *Neisseria meningitidis* ADP-ribosyltransferase, regulates its catalytic activities. *FASEB* 27(12):4723-30.

- PubMLST.** 2013: Neisseria sequence Typing Home Page.
URL: <http://pubmlst.org/neisseria/> [Stand 26.02.2013]
- Purdy AE, Balch D, Lizárraga-Partida ML, Islam MS, Martinez-Urtaza J, Huq A, Colwell RR, Bartlett DH.** 2010. Diversity and distribution of cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from *Vibrio cholerae*. *Environ Microbiol Rep.* 2(1):198-207.
- RKI.** 2018. Epidemiologisches Bulletin 3/2018.
URL: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/03_18.pdf?__blob=publicationFile [Stand 31.10.2018, 11.02]
- RKI.** 2018. Epidemiologisches Bulletin 34/2018.
URL: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/34_18.pdf?__blob=publicationFile [Stand 01.11.2018, 12.18]
- RKI.** 2018. Ratgeber Meningokokkenerkrankungen.
URL: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Meningokokken.html [Stand 31.10.2018, 11.07 Uhr]
- Rodas PI, Álamos-Musre AS, Álvarez FP, Escobar A, Tapia CV, Osorio E, Otero C, Calderón IL, Fuentes JA, Gil F, Paredes-Sabja D, Christodoulides M.** 2016. The NarE protein of *Neisseria gonorrhoeae* catalyzes ADP-ribosylation of several ADP-ribose acceptors despite an N-terminal deletion. *FEMS Microbiol Lett.* 363(17).
- Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM.** 2001. Meningococcal disease. *N Engl J Med.* 344(18):1378-88.
- Sater MR, Lamelas A, Wang G, Clark TA, Röltgen K, Mane S, Korlach J, Pluschke G, Schmid CD.** 2015. DNA Methylation Assessed by SMRT Sequencing Is Linked to Mutations in *Neisseria meningitidis* Isolates. *PLoS One.* 10(12):e0144612.
- Schoen C, Blom J, Claus H, Schramm-Glück A, Brandt P, Müller T, Goesmann A, Joseph B, Konietzny S, Kurzai O, Schmitt C, Friedrich T, Linke B, Vogel U, Frosch M.** 2008. Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(9):3473-8.
- Schoen C, Kischkies L, Elias J, Ampattu BJ.** 2014. Metabolism and virulence in *Neisseria meningitidis*. *Front Cell Infect Microbiol.* 20;4:114.
- Schofield, M. J. & Hsieh, P.** 2003. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 579–608.

- Seiler A, Reinhardt R, Sarkari J, Caugant DA, Achtman M.** 1996. Allelic polymorphism and site-specific recombination in the *opc* locus of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 19(4):841-56.
- Simon NC, Aktories K, Barbieri JT.** 2014. Novel bacterial ADP-ribosylating toxins: structure and function. *Nat Rev Microbiol.* 12(9):599-611
- Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P.** 2007. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet.* 369(9580):2196-2210.
- Sun Y, Karmakar M, Taylor PR, Rietsch A, Pearlman E.** 2012. ExoS and ExoT ADP ribosyltransferase activities mediate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival. *J Immunol.* 188(4):1884-95.
- Talluri E, Pancotto L, Ruggiero P, Scarselli M, Balducci E.** 2017. CagL from *Helicobacter pylori* has ADP-ribosylation activity and exerts partial protective efficacy in mice. *Arch Biochem Biophys.* 635:102-109.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24(8):1596-9.
- Troncoso G, Sánchez S, Moreda M, Criado MT, Ferreirós CM.** 2000. Antigenic cross-reactivity between outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 27(2):103-9.
- Unkmeir A, Latsch K, Dietrich G et al.** 2002. Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol Microbiol.* 46:933–46.
- Urwin R, Maiden MC.** 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 11(10):479-87. Review.
- Valeri M, Zurli V, Ayala I, Colanzi A, Lapazio L, Corda D, Soriani M, Pizza M, Rossi Paccani S.** 2015. The *Neisseria meningitidis* ADP-Ribosyltransferase NarE Enters Human Epithelial Cells and Disrupts Epithelial Monolayer Integrity. *PLoS One.* 10(5):e0127614.
- Van den Broeck D, Horvath C, De Wolf MJ.** 2007. *Vibrio cholerae*: cholera toxin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39:1771–1775
- Virji M, Makepeace K, Ferguson DJ et al..** 1996. Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic neisseriae. *Mol Microbiol.* 22:941–50.
- Valeri M, Zurli V, Ayala I, Colanzi A, Lapazio L, Corda D, Soriani M, Pizza M, Rossi Paccani S.** 2015. The *Neisseria meningitidis* ADP-Ribosyltransferase NarE Enters

Human Epithelial Cells and Disrupts Epithelial Monolayer Integrity. PLoS One. 10(5):e0127614.

Vogel U, Taha MK, Vazquez JA, Findlow J, Claus H, Stefanelli P, Caugant DA, Kriz P, Abad R, Bambini S, Carannante A, Deghmane AE, Fazio C, Frosch M, Frosi G, Gilchrist S, Giuliani MM, Hong E, Ledroit M, Lovaglio PG, Lucidarme J, Musilek M, Muzzi A, Oksnes J, Rigat F, Orlandi L, Stella M, Thompson D, Pizza M, Rappuoli R, Serruto D, Comanducci M, Boccadifuoco G, Donnelly JJ, Medini D, Borrow R. 2013. Predicted strain coverage of a meningococcal multicomponent vaccine (4CMenB) in Europe: a qualitative and quantitative assessment. *Lancet Infect Dis.* 13(5):416-25.

Vogel U, Claus H. 2011. Vaccine development against *Neisseria meningitidis*. *Microb Biotechnol.*4(1):20-31.

Vogel U, Frosch M. 2002. The genus *Neisseria*: population structure, genome plasticity, and evolution of pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 264(2):23-45.

Vogelsgesang M, Pautsch A, Aktories K. 2007. C3 exoenzymes, novel insights into structure and action of Rho-ADP-ribosylating toxins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 374(5-6):347-60.

Whittaker R, Dias JG, Ramliden M, Ködmön C, Economopoulou A, Beer N, Pastore Celentano L; ECDC network members for invasive meningococcal disease. 2017. The epidemiology of invasive meningococcal disease in EU/EEA countries, 2004-2014. *Vaccine.* 35(16):2034-2041.

WHO, 2008. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections.

URL: http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/2008_STI_estimates.pdf [Stand 31.10.2018, 11.11 Uhr]

WHO. 2017. Weekly epidemiological record No 13, 92, 145–164.

URL: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254901/1/WER9213.pdf> [Stand 31.10.2018, 11.17 Uhr]

WHO. 2018: Meningococcal Meningitis Fact sheet.

URL: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/meningococcal-meningitis> [Stand 31.10.2018, 11.19 Uhr]

WHO, 2018. Meningococcal Meningitis: Emergency preparedness and response.

URL: <http://www.who.int/csr/disease/meningococcal/en/> [Stand 31.10.2018, 11.25 Uhr]

Wick MJ, Frank DW, Storey DG, Iglewski BH. 1990. Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Annu Rev Microbiol.* 44:335-63.

Zhou L, Srisatjaluk R, Justus DE, Doyle RJ. 1998. On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 163(2):223-8.

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

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lokalisation der verwendeten Primer für die Amplifikation von *narE*

Abb. 2: Neighbor Joining Tree der konkatenierten MLST-Allele der untersuchten Stämme

Abb. 3: *NarE*-Southern Blot

Abb. 4: Insertion von vier Basenpaaren im *narE*-Gen bei *Neisseria gonorrhoeae*

Abb. 5: Western Blot mit polyklonalen *NarE*-Antikörpern

Abb. 6: Relative *NarE*-Expression aller *narE*-positiven Meningokokken in Bezug auf MC58

Abb. 7: Relative *NarE* Expression von Meningokokken verschiedener klonaler Komplexe

Abb. 8: qRT-PCR-Amplifikationsverlauf für *NarE*

Abb. 9: Ct-Werte der *NarE*-qRT-PCR von Stämmen des cc32 und das cc41/44

6.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ADPRT	ADP-Ribosyltransferase
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basepairs
cc	Clonal Complex
Ct-Wert	Threshold cycle
CNL	Capsule Null Locus
DTT	Dithiothreitol
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
GEBS	Glycerin, EDTA, Bromphenolblau, Lauroylsarkosin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kD	Kilodalton
LOS	Lipooligosaccharid
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MRF	Meningococcus Research Foundation
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
OMV	Outer Membrane Vesicle
OPA	Opacity
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Phosphate buffered saline
PPM	Plant Preservative Mixture
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR
RIN	RNA Integrity Number
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite Repression
SSC	Standard Sodium Citrate

SSPE	Standard Sodium Phosphate EDTA
ST	Sequenztyp
STIKO	Ständige Impfkommision
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TE	TRIS und EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin

7. Anhang

Tab. 4: Vorhandensein des *narE*-Gens in 467 *Neisseria meningitidis*-Stämmen der MRF Meningococcus Genome Library

cc	<i>narE</i> vorhanden	<i>narE</i> nicht vorhanden
ST103cc	4	1
ST1136cc		1
ST1157cc	1	2
ST11cc		21
ST162cc	6	
ST167cc		4
ST174cc	9	
ST18cc		5
ST213cc		37
ST226cc		1
ST22cc		13
ST23cc		57
ST269cc		100
ST282		2
ST284		1
ST286		2
ST32cc	29	
ST35cc	8	
ST41/44cc		2
ST41/44cc	133	
ST461cc		10
ST5cc		1
ST60cc		15
ST865cc		1
ST92cc		1

Tab. 5: Analyisierte Stämme der MRF-Datenbank

Klonaler Komplex	Sequenztyp	Anzahl der Stämme	<i>narE</i> -Gen
ST5cc	ST4789	1	nicht vorhanden
ST11cc	ST11	20	nicht vorhanden
	ST3537	1	nicht vorhanden
ST18cc	ST18	3	nicht vorhanden
	ST858	1	nicht vorhanden
	ST4997	1	nicht vorhanden
ST22cc	ST22	1	nicht vorhanden

Klonaler Komplex	Sequenztyp	Anzahl der Stämme	<i>narE</i> -Gen
	ST184	5	nicht vorhanden
	ST1224	2	nicht vorhanden
	ST1281	1	nicht vorhanden
	ST1286	1	nicht vorhanden
	ST2114	1	nicht vorhanden
	ST6351	2	nicht vorhanden
ST23cc	ST23	16	nicht vorhanden
	ST183	1	nicht vorhanden
	ST1655	33	nicht vorhanden
	ST4183	1	nicht vorhanden
	ST6463	2	nicht vorhanden
	ST9813	1	nicht vorhanden
	ST9814	1	nicht vorhanden
	ST9831	1	nicht vorhanden
	ST9841	1	nicht vorhanden
ST32cc	ST32	7	vorhanden
	ST33	3	vorhanden
	ST34	7	vorhanden
	ST259	2	vorhanden
	ST290	2	vorhanden
	ST749	2	vorhanden
	ST1096	1	vorhanden
	ST2931	2	vorhanden
	ST6083	1	vorhanden
	ST8049	1	vorhanden
	ST9890	1	vorhanden
ST35cc	ST35	4	vorhanden
	ST278	1	vorhanden
	ST2380	1	vorhanden
	ST3077	1	vorhanden
	ST8063	1	vorhanden
ST41/44cc	ST40	1	vorhanden
	ST41	36	vorhanden
	ST42	2	vorhanden
	ST46	3	vorhanden
	ST136	1	vorhanden
	ST154	4	vorhanden
	ST180	1	vorhanden
	ST303	1	vorhanden
	ST318	1	vorhanden
	ST327	1	vorhanden
	ST340	6	vorhanden
	ST437	1	vorhanden
	ST477	1	vorhanden
	ST485	6	vorhanden
	ST833	1	vorhanden
	ST839	1	vorhanden
	ST1090	3	vorhanden
	ST1097	5	vorhanden
	ST1194	13	vorhanden

Klonaler Komplex	Sequenztyp	Anzahl der Stämme	<i>narE</i> -Gen
	ST1196	1	vorhanden
	ST1200	1	vorhanden
	ST1475	2	vorhanden
	ST1938	1	vorhanden
	ST1960	1	vorhanden
	ST1992	2	vorhanden
	ST2080	1	vorhanden
	ST2314	2	vorhanden
	ST2363	1	vorhanden
	ST2632	1	vorhanden
	ST2799	1	vorhanden
	ST3101	1	vorhanden
	ST3447	1	vorhanden
	ST3754	1	vorhanden
	ST3802	1	nicht vorhanden
	ST3818	1	vorhanden
	ST5357	1	vorhanden
	ST5551	1	nicht vorhanden
	ST5861	2	vorhanden
	ST5981	3	vorhanden
	ST6782	2	vorhanden
	ST8052	1	vorhanden
	ST8203	1	vorhanden
	ST8384	1	vorhanden
	ST9815	1	vorhanden
	ST9819	1	vorhanden
	ST9820	1	vorhanden
	ST9822	1	vorhanden
	ST9824	1	vorhanden
	ST9832	1	vorhanden
	ST9838	1	vorhanden
	ST9841	2	vorhanden
	ST9879	1	vorhanden
	ST9882	1	vorhanden
	ST9838	1	vorhanden
	ST9886	1	vorhanden
	ST9889	1	vorhanden
	ST9892	1	vorhanden
	ST9696	1	vorhanden
ST60cc	ST60	7	nicht vorhanden
	ST1430	2	nicht vorhanden
	ST2435	1	nicht vorhanden
	ST5103	1	nicht vorhanden
	ST9327	1	nicht vorhanden
	ST9818	1	nicht vorhanden
	ST9821	1	nicht vorhanden
	ST9885	1	nicht vorhanden
ST92cc	ST784	1	nicht vorhanden
ST103cc	ST5133	4	vorhanden
	ST9239	1	nicht vorhanden

Klonaler Komplex	Sequenztyp	Anzahl der Stämme	<i>narE</i> -Gen
ST162cc	ST162	6	vorhanden
ST167cc	ST168	3	nicht vorhanden
	ST767	1	nicht vorhanden
ST174cc	ST1466	7	vorhanden
	ST2977	1	vorhanden
	ST9893	1	vorhanden
ST213cc	ST213	28	nicht vorhanden
	ST2666	1	nicht vorhanden
	ST8955	1	nicht vorhanden
	ST9187	1	nicht vorhanden
	ST9812	1	nicht vorhanden
	ST9830	1	nicht vorhanden
	ST9833	1	nicht vorhanden
	ST9881	1	nicht vorhanden
	ST9884	1	nicht vorhanden
	ST9895	1	nicht vorhanden
ST226cc	ST9835	1	nicht vorhanden
ST269cc	ST269	22	nicht vorhanden
	ST275	17	nicht vorhanden
	ST283	2	nicht vorhanden
	ST467	2	nicht vorhanden
	ST479	5	nicht vorhanden
	ST1049	6	nicht vorhanden
	ST1092	1	nicht vorhanden
	ST1161	26	nicht vorhanden
	ST1163	3	nicht vorhanden
	ST1195	2	nicht vorhanden
	ST1774	1	nicht vorhanden
	ST2873	1	nicht vorhanden
	ST4401	1	nicht vorhanden
	ST6604	1	nicht vorhanden
	ST7789	1	nicht vorhanden
	ST7833	1	nicht vorhanden
	ST7939	1	nicht vorhanden
	ST9004	1	nicht vorhanden
	ST9823	1	nicht vorhanden
	ST9826	1	nicht vorhanden
ST9826	1	nicht vorhanden	
ST9836	1	nicht vorhanden	
ST9840	1	nicht vorhanden	
ST9843	1	nicht vorhanden	
ST282	ST282	2	nicht vorhanden
	ST1802	1	nicht vorhanden
	ST8068	2	nicht vorhanden
ST461cc	ST461	6	nicht vorhanden
	ST1946	3	nicht vorhanden
	ST9891	1	nicht vorhanden
ST865cc	ST9846	1	nicht vorhanden
ST1136cc	ST1136	1	nicht vorhanden

Klonaler Komplex	Sequenztyp	Anzahl der Stämme	<i>narE</i>-Gen
ST1157cc	ST1157	1	nicht vorhanden
	ST3737	1	vorhanden
	ST9888	1	nicht vorhanden

Tab. 6: Charakteristika der Meningokokkenstämme

Bezeichnung	Serogruppe	Sequenztyp	Klonaler Komplex	Epidemiologie
α14	cnI	53	53	Trägerisolat
α16	B	41	41/44	Trägerisolat
α19	B	44	41/44	Trägerisolat
α28	B	798	269	Trägerisolat
α30	cnI	845	845	Trägerisolat
α60	cnI	53	53	Trägerisolat
α62	cnI	845	845	Trägerisolat
α80	B	41	41/44	Trägerisolat
α106	cnI	53	53	Trägerisolat
α111	Y	23	23	Trägerisolat
α143	Y	23	23	Trägerisolat
α198	C	8	8	Trägerisolat
α219	B	44	41/44	Trägerisolat
α223	C	11	11	Trägerisolat
α225	cnI	53	53	Trägerisolat
α253	B	41	41/44	Trägerisolat
α275	W	22	22	Trägerisolat
α278	cnI	60	60	Trägerisolat
α284	B	32	32	Trägerisolat
α323	B	801	32	Trägerisolat
α335	Y	23	23	Trägerisolat
α376	B	32	32	Trägerisolat
α378	29E	60	60	Trägerisolat
α404	B	797	269	Trägerisolat
α444	W	22	22	Trägerisolat
α458	cnI	845	845	Trägerisolat
α471	B	44	41/44	Trägerisolat
α498	Y	23	23	Trägerisolat
α503	B	44	41/44	Trägerisolat
α511	W	903	22	Trägerisolat
α528	B	41	41/44	Trägerisolat
α547	B	41	41/44	Trägerisolat
α554	cnI	53	53	Trägerisolat
α634	cnI	845	845	Trägerisolat
α682	cnI	60	60	Trägerisolat
α726	B	41	41/44	Trägerisolat

Bezeichnung	Serogruppe	Sequenztyp	Klonaler Komplex	Epidemiologie
α738	C	11	11	Trägerisolat
α741	C	66	8	Trägerisolat
α834	cnI	53	53	Trägerisolat
DE6750	C	8	8	Erkrankung
DE8580	B	32	32	Erkrankung
DE8603	cnI	60	60	Erkrankung
DE8671	B	2768	269	Erkrankung
DE8684	B	2264	32	Erkrankung
DE8707	B	33	32	Erkrankung
DE8727	C	11	11	Erkrankung
DE8787	B	41	41/44	Erkrankung
DE8797	B	41	41/44	Erkrankung
DE8808	B	32	32	Erkrankung
DE8823	C	8	8	Erkrankung
DE8830	B	283	269	Erkrankung
DE8894	C	11	11	Erkrankung
DE8907	C	11	11	Erkrankung
DE9686	B	42	41/44	Erkrankung
DE9700	C	8	8	Erkrankung
DE9791	B	5739	269	Erkrankung
DE10182	B	283	269	Erkrankung
DE10332	B	32	32	Erkrankung
DE10427	C	66	8	Erkrankung
DE10533	B	34	32	Erkrankung
DE10539	B	283	269	Erkrankung
DE10547	W	22	22	Erkrankung
DE10560	B	32	32	Erkrankung
DE10715	B	5739	369	Erkrankung
DE10803	B	269	269	Erkrankung
DE10895	B	41	41/44	Erkrankung
DE11036	B	2264	32	Erkrankung
DE11177	A	1	2	Erkrankung
DE11200	B	42	41/44	Erkrankung
DE11308	B	32	32	Erkrankung
DE11507	cnI	60	60	Erkrankung
DE11528	cnI	53	53	Erkrankung
DE11532	B	42	41/44	Erkrankung

Bezeichnung	Serogruppe	Sequenztyp	Klonaler Komplex	Epidemiologie
DE11533	Y	22	22	Erkrankung
DE11559	B	32	32	Erkrankung
DE11570	B	283	269	Erkrankung
DE11577	B	44	41/44	Erkrankung
DE11692	W	22	22	Erkrankung
DE11729	B	2264	32	Erkrankung
DE11776	B	41	41/44	Erkrankung
DE11927	Y	23	23	Erkrankung
DE11953	W	22	22	Erkrankung
DE12022	B	41	41/44	Erkrankung
DE12203	B	41	41/44	Erkrankung
DE12036	B	8804	32	Erkrankung
DE12053	B	1161	269	Erkrankung
DE12185	B	32	32	Erkrankung
DE12210	B	32	32	Erkrankung
DE12250	B	269	269	Erkrankung
WUE158	A	1	1	Erkrankung
WUE925	A	4	4	Erkrankung
WUE1114	A	1	1	Erkrankung
WUE1126	A	4	4	Erkrankung
WUE1134	A	1	1	Erkrankung
WUE1135	A	1	1	Erkrankung
WUE2120	C	11	11	Erkrankung
WUE2135, MC58	B	74	32	Erkrankung
WUE2137, Z2491	A	4	4	Erkrankung
WUE2211	C	11	11	Erkrankung
WUE2246	C	11	11	Erkrankung
WUE2514, H44/76	B	15	32	Erkrankung
WUE2594	A	5	5	Erkrankung
WUE2596	A	1	1	Erkrankung
WUE2598	A	1	1	Erkrankung
WUE2599	A	7	5	Erkrankung
Z4027	A	58	1	Erkrankung
Z4047	A	59	1	Erkrankung
Z4064	A	3	1	Erkrankung

Bezeichnung	Serogruppe	Sequenztyp	Klonaler Komplex	Epidemiologie
Z4108	A	neu	1	Erkrankung
Z4756	A	1	1	Erkrankung
Z4930	A	5	5	Erkrankung
Z4943	A	5	5	Erkrankung

Tab. 7: *Neisseria gonorrhoeae*-Stämme für NarE-Screening

NRZMHi-Stammsammlung	Forschungsstammsammlung Würzburg, IHM	Diagnostikstammsammlung Würzburg
MZ189/10	WUE154	962
MZ190/09	WUE678	1146
MZ155/04	WUE687	1456
MZ359/05	WUE799	1378
MZ441/05	WUE920	1513
MZ308/06	WUE921	1702
MZ452/06	WUE1225	1973
MZ489/06	WUE2115	
MZ522/06	WUE2136 (FA1090)	
MZ38/07	WUE2805	
MZ114/07		
MZ245/07		

Tab. 8: Apathogene *Neisserienspezies* für NarE-Screening

Neisserienspezies	Bezeichnung
<i>N. ovis</i>	WUE2104
<i>N. canis</i>	WUE2105
<i>N. weaverii</i>	WUE2109
<i>N. subflava</i>	WUE2110
<i>N. flavescens</i>	WUE2111
<i>N. elongata</i>	WUE2112
<i>N. sicca</i>	WUE2113
<i>N. lactamica</i>	WUE2114
<i>N. lactamica</i>	WUE2117
<i>N. lactamica</i>	WUE2119

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Vogel für die freundliche Überlassung des Themas und die hervorragende fachliche, methodische und persönliche Betreuung. Herr Prof. Vogel stand stets für alle Fragestellungen und Probleme sofort zur Verfügung und ermöglichte mit seinen Ratschlägen und Anmerkungen eine stetige Weiterentwicklung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Frau PD Dr. rer. nat. Heike Claus bedanken, die mir mit ihrem großen fachlichen Wissen, Engagement und Zeitaufwand in allen formalen, fachlichen und experimentellen Belangen stets geduldig zur Seite stand.

Vielen Dank an den Dekan der Medizinischen Fakultät und Vorstand des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie, Prof. Dr. med. Matthias Frosch, für die Möglichkeit zur Promotion sowie die Unterstützung der experimentellen Arbeit durch die großzügige Förderung im Rahmen des Promotionsstipendiums.

Prof. Dr. med. Frank Günther, Dr. rer. nat. Martin Lappann und Dr. rer. nat. Kerstin Hubert danke ich für die umfassende Betreuung und Hilfestellung.

Ich bedanke mich bei Daniela Stanke für die große Unterstützung in der täglichen praktischen Umsetzung und das gute Arbeitsklima im Labor sowie bei allen Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg für die freundliche Aufnahme und schnelle Hilfe bei allen Fragen rund um die Doktorarbeit.