

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

Identifizierung und Charakterisierung von Plasmiden verschiedener klonaler Gruppierungen in *Neisseria meningitidis*

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

vorgelegt von
Johanna Stoevesandt
aus Rinteln

Würzburg, Dezember 2002

Referent: Professor Dr. med. U. Vogel
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. M. Leverkus
Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2003

Die Promovendin ist Ärztin.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>Neisseria meningitidis</i>	1
1.1.1	Historische Einführung	1
1.1.2	Grundlagen und Serologie	3
1.1.3	Klinik.....	5
1.1.4	Epidemiologie und Populationsstruktur	7
1.2	Plasmide	13
1.2.1	Grundlagen.....	13
1.2.2	Replikation von Plasmiden	14
1.2.3	Erwerb und Weitergabe von Plasmid-DNA	15
1.2.4	Plasmide als Informationsträger	16
1.2.5	Plasmide als epidemiologische Marker	18
1.3	Plasmide in Neisserien	18
1.3.1	Plasmide in <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	19
1.3.2	Plasmide in <i>Neisseria meningitidis</i>	20
1.3.3	Plasmide in Neisserien als Träger der Tetrazyklin- Resistenzdeterminante <i>tetM</i>	21
1.4	Zielsetzungen dieser Arbeit.....	23
2	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Material	24
2.1.1	Geräte	24
2.1.2	Verbrauchsmaterial	26
2.1.3	Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme	26
2.1.4	Puffer und Lösungen	28
2.1.5	Kultur von Bakterien	29
2.1.6	Plasmidvektoren.....	31
2.1.7	Oligonukleotide.....	31
2.1.8	DIG-markierte Sonden für DNA-Nachweisreaktionen	33
2.2	Methoden	34
2.2.1	DNA-Präparationen	34
2.2.2	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen.....	39
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	40

2.2.4 Klonierungsmethoden	41
2.2.5 Transformation von <i>Escherichia coli</i> durch Elektroporation	43
2.2.6 Automatisierte DNA-Sequenzierung.....	46
2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
2.2.8 DNA-Hybridisierungen.....	49
2.2.9 Sequenz- und Stammanalysen	55
3 ERGEBNISSE	56
3.1 Plasmid-DNA in verschiedenen klonalen Linien von <i>Neisseria meningitidis</i>	56
3.2 Das Plasmid pJS-A.....	58
3.2.1 pJS-A in Stämmen der Subgruppe VI, Assoziation mit IS1301.....	59
3.2.2 Informationen zu Sequenz und Leserastern.....	60
3.2.3 Versuche zur Mobilisierung von pJS-A.....	61
3.3 Das Plasmid pJS-B.....	63
3.3.1 pJS-B im ET-37 Komplex und im <i>Cluster A4</i>	63
3.3.2 Informationen zu Sequenz und Leserastern.....	64
3.3.3 pJS-B als chromosomale Kopie	66
4 DISKUSSION	72
4.1 pJS-A und pJS-B als genetische Elemente mit spezifischer klonaler Verteilung.....	72
4.2 pJS-B in chromosomaler Integration, Überlegungen zur Integrationsstelle	76
4.3 Kritische Gedanken zur Natur der DNA-Elemente pJS-A und pJS-B	78
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	82
6 LITERATURVERZEICHNIS	83
6.1 Bücher.....	83
6.2 Originalarbeiten.....	83
7 ANHANG	92
7.1 Anhang A. Plasmidverteilung in Meningokokken verschiedener klonaler Linien	92
7.2 Anhang B. Abkürzungsverzeichnis	97

1 EINLEITUNG

1.1 *Neisseria meningitidis*

1.1.1 Historische Einführung

Berichte von Meningitis-Erkrankungen ziehen sich durch die Geschichte der Menschheit. Schon der griechische Arzt Hippokrates beschrieb Fälle von Kopfschmerz und *Tinnitus aurium* im Zusammenhang mit einer Entzündung des Gehirns und wies auf die hohe Mortalität dieser Erkrankung hin. Als eigenständiges Krankheitsbild beschrieb Vieusseux die *Meningitis epidemica* 1806 anlässlich eines Ausbruchs in Genf und Umgebung [Vieusseux 1806]. In der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts häuften sich weitere Berichte über Ausbrüche sowohl in Europa als auch in Amerika. Die Klinik der Meningokokken-Erkrankung wurde klar gegen symptomatisch ähnliche Fleckfieber- und Meningitis-Erkrankungen abgegrenzt und auch die infektiöse Natur der Krankheit richtig erkannt. Das eigentliche infektiöse Agens wurde allerdings zunächst nicht identifiziert, wirksame therapeutische Ansätze fehlten. Frustrane Heilungsversuche bestanden darin, Kopf, Hals und Rücken der Patienten mit kalter Luft zu beblasen oder den Kranken Alkohol, Quecksilber, Kochsalz, Opiate und andere Mittel zu verabreichen, denen pharmakologische Wirksamkeit nachgesagt wurde. Die hohe Mortalität der Meningokokken-Infektion vermochte man damit nicht zu senken [Cartwright 1995].

Ein Durchbruch in der Meningokokken-Forschung ereignete sich 1887, als Weichselbaum den Erreger, welchen er *Diplococcus intracellularis* nannte, in meningealem Exsudat von Patienten mit eitriger Meningitis nachwies [Weichselbaum 1887]. Waterhouse beschrieb 1911 einen Fall von hämorrhagischer Nekrose beider Nebennieren im Rahmen einer Meningokokken-Sepsis in Bath [Waterhouse 1911]. 1918 berichtete Friderichsen über ähnliche Fälle in Kopenhagen [Friderichsen 1918]. Der Begriff des Waterhouse-Friderichsen-Syndroms wurde so geprägt. Er wird gelegentlich noch heute in erweitertem Sinne für besonders foudroyante Verläufe von Meningokokken-Sepsis mit massiven Symptomen und Kreislaufversagen verwendet. Im englischen Sprachgebrauch hat sich jedoch die Bezeichnung *Severe Meningococcal Disease* (SMD) durchgesetzt.

In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts richteten sich therapeutische Bestrebungen vorwiegend auf eine Immuntherapie mit der Entwicklung von Antiseren in immunisierten Tieren. Ein erstmals 1906 eingesetztes Pferdeserum, das subkutan und intraspinal appliziert wurde, führte zu einer signifikanten Reduktion der Mortalität [Kolle *et al.* 1906]. Derartige Methoden zeichneten sich allerdings durch eine hohe Rate an Komplikationen besonders im Sinne allergischer Reaktionen aus [Jochmann 1906]. Als sich im Ersten Weltkrieg durch Serogruppe A Meningokokken verursachte Ausbrüche in den Armeen der beteiligten Länder häuften, stellten derartige Antiseren den einzig erfolgversprechenden Therapieansatz dar. Mit dem Beginn der antibiotischen Ära und der Einführung der ersten Sulfonamide in den 30er-Jahren eröffneten sich neue Therapiemöglichkeiten. Im Zweiten Weltkrieg kam es erneut zu Epidemien durch Serogruppe A Stämme, die diesmal auch die Zivilbevölkerung betrafen [Cartwright 1995]. Erstmals kam nun Penizillin im Kampf gegen Meningokokken-Erkrankungen zum Einsatz, wurde zum Standardtherapeutikum und ist es neben den Cephalosporinen bis heute geblieben. Nach dem Zweiten Weltkrieg fand das epidemische Auftreten von Serogruppe A Infektionen in Europa ein unverhofftes Ende (von einzelnen Ausbrüchen in skandinavischen Ländern wird jedoch berichtet [Hjetland *et al.* 1990, Peltola 1983]), während in tropischen und subtropischen Regionen, besonders im sogenannten Meningokokkengürtel Afrikas, weiterhin große Epidemien zyklisch im Abstand von fünf bis zehn Jahren auftreten [Achtman 1995].

In Epidemiesituationen werden heute Impfstoffe gegen Meningokokken der Gruppen A und C eingesetzt [Fairly *et al.* 1994]. Es handelt sich um hochmolekulare Impfstoffe aus gereinigten Kapsel-Polysacchariden, die gegen Ende der 60er-Jahre von Gotschlich *et al.* in dieser Form entwickelt wurden [Gotschlich *et al.* 1969]. Bereits in den 40er-Jahren hatte es Versuche zur Präparation von Kapsel-Polysacchariden gegeben [Kabat *et al.* 1945]. Diese erwiesen sich jedoch als nicht immunogen, was auf die geringe Länge der einzelnen Saccharid-Moleküle zurückgeführt werden konnte [Kabat *et al.* 1958]. Jedoch sind auch die heute handelsüblichen A/C- beziehungsweise A/C/W-135/Y-Impfstoffe nicht geeignet, eine Population langfristig zu schützen [Frosch 1999]. Wie viele bakterielle Polysaccharide führen die Kapselantigene der Meningokokken zu einer T-Zell-unabhängigen Immunantwort. Diese ist nur von kurzer Dauer und lässt nach Sekundärimmunisierung keinen Booster-Effekt erkennen. Bei Kindern unter

achtzehn Monaten, einer bedeutenden Risikogruppe für Meningokokken-Erkrankungen, bleibt eine Immunantwort gegen das Serogruppe C Polysaccharid sogar vollständig aus [Frasch 1995]. Die schwache Immunogenität gilt besonders und in allen Altersgruppen für das Kapsel-Polysaccharid der in Europa am häufigsten vorkommenden Serogruppe B, das derzeit in keinem der handelsüblichen Impfstoffe enthalten ist. Konjugat-Impfstoffe, welche zu einer T-Zell-abhängigen Immunantwort führen sollen, wurden durch Kopplung der A/C-Polysaccharide an Trägerproteine entwickelt und klinisch getestet [Costantino *et al.* 1992, Richmond *et al.* 1999]. Seit November 1999 wird das C-Polysaccharid-Konjugat in Großbritannien zur systematischen Impfung von Kindern und Jugendlichen bis achtzehn Jahren eingesetzt [Miller 2000].

Ein weiterer Meilenstein in der Erforschung von *Neisseria meningitidis* sei an dieser Stelle erwähnt: Im Jahr 2000 wurden die vollständigen DNA-Sequenzen des Serogruppe B Stammes MC58 [Tettelin *et al.* 2000] und des Serogruppe A Stammes Z2491 [Parkhill *et al.* 2000] veröffentlicht. Sequenzvergleiche mit der DNA-Sequenz des Serogruppe A Stammes Z2491 können heute über den BLAST-Server des Meningokokkengenom-Sequenzierungsprojektes am *Sanger Center* (Universität Cambridge, UK, http://www.sanger.ac.uk/Projects/N_meningitidis) durchgeführt werden, Vergleiche mit dem Serogruppe B Stamm MC58 über das *Institute for Genomic Research* (Rockville, USA, <http://www.tigr.org>). Der Serogruppe C Stamm FAM18 wird derzeit ebenfalls sequenziert. Meningokokken zählen somit zu den Mikroorganismen, von denen bereits die Genome mehrerer Stämme verschiedener Serogruppen vollständig sequenziert werden konnten.

1.1.2 Grundlagen und Serologie

Meningokokken sind Erreger eitriger Meningitiden und fulminant verlaufender Septikämien. Sie sind wie auch die nahe verwandten Gonokokken gramnegative, unbewegliche Kokken aus der Familie der *Neisseriaceae*. Sie treten meist paarweise als Diplokokken auf und sind bei Erkrankten im Liquorsediment intra- und extrazellulär zu finden. Wie die Gonokokken sind sie streng an den humanen Wirt adaptiert. Im Gegensatz zu ihren kapsellosen Verwandten können die meisten Meningokokken eine Polysaccharidkapsel exprimieren, eine Voraussetzung für das Überleben im Blutstrom und somit Grundlage für systemische Erkrankungen. Es ist jedoch zu betonen, dass die Infektion mit Meningokokken keineswegs immer zu

schwerwiegenden Krankheitsbildern führt. Die Mehrzahl der Meningokokken, welche den menschlichen Nasen-Rachenraum besiedeln, gilt als avirulent [Caugant *et al.* 1986].

Entsprechend der antigenetischen Zusammensetzung ihrer Polysaccharid-Kapsel werden Meningokokken dreizehn verschiedenen Serogruppen zugeordnet. Als Erreger von Meningitis und Sepsis sind im Wesentlichen die Serogruppen A, B und C sowie W-135 und Y von Bedeutung. Die Kapsel der Serogruppe A Meningokokken besteht aus Mannosaminphosphat [Davis *et al.* 1980]. In den Serogruppen B und C setzt sie sich aus Sialinsäure-Homopolymeren zusammen, in W-135 und Y aus Sialinsäure-Copolymeren mit Galaktose beziehungsweise Glukose [Poolman *et al.* 1995]. Mit der Klonierung des Kapsel-Genkomplexes *cps* aus Serogruppe B Meningokokken trugen Frosch *et al.* entscheidend zum Verständnis der Kapselsynthese bei [Frosch *et al.* 1989]. Der *cps*-Genkomplex hat eine Größe von 24 kb und ist aus den fünf Regionen A - E zusammengesetzt. In der Region A befinden sich innerhalb eines Operons vier Gene für die Kapselbiosynthese. In der benachbarten Region C werden Proteine kodiert, welche für den Transport der Sialinsäure-Polymere über die innere und äußere Bakterienmembran verantwortlich sind.

Die äußere Membran der Meningokokken enthält äußere Membranproteine (OMP), die nach ihrem elektrophoretischen Wanderungsverhalten in fünf Klassen eingeteilt werden. Anhand der äußeren Membranproteine der Klassen 2 und 3 (Porin B) und der Klasse 1 (Porin A) werden Meningokokken unter Einsatz monoklonaler Antikörper serotypisiert bzw. -subtypisiert. Da das Klasse-1-OMP über zwei variable Regionen verfügt, können bei der Serosubtypisierung zwei separate Epitope angegeben werden [Poolman *et al.* 1995]. Die serologischen Eigenschaften von Meningokokken-Stämmen dienen ihrer Klassifikation und werden in einer antigenetischen Formel zusammengefasst, welche zunächst die Serogruppe (z.B. C), dann Serotyp (z.B. 2a) und -subtyp (z.B. P1.5) angibt [Frasch *et al.* 1985]. Im Beispiel ergibt sich die Formel C:2a:P1.5. Durch die serologische Klassifizierung der Lipopolysaccharide (LPS) in der äußeren Membran erhält man den Meningokokken-Immunityp [Jones *et al.* 1992].

1.1.3 Klinik

Meningokokken werden durch Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch übertragen. Sie besiedeln den menschlichen Nasen-Rachenraum zumeist als Kommensalen. Nur in seltenen Fällen kommt es zur Ausbreitung auf dem Blutweg und zu systemischer Erkrankung in Form von Meningitis oder Sepsis. Als Risikofaktoren für die manifeste Meningokokken-Erkrankung gelten männliches Geschlecht [Cartwright 1995], passives Rauchen [Stanwell-Smith *et al.* 1994, Stuart *et al.* 1988] und ein niedriger Sozialstatus bzw. das Zusammenleben mit vielen Personen in räumlicher Enge [Stuart *et al.* 1988]. Als besonders gefährdet gelten Individuen mit Defekten im Komplement-System, nach Splenektomie und unmittelbar nach durchgemachter Infektion mit dem Influenza-A-Virus [Cartwright 1995]. Der enge und unmittelbare Kontakt mit einem Erkrankungsfall erhöht das Risiko, selbst manifest zu erkranken, um ein Vielfaches [De Wals *et al.* 1981, Cartwright 1995].

Die Meningokokken-Meningitis zeichnet sich durch einen plötzlichen und heftigen Beginn mit starkem Kopfschmerz, Erbrechen und hohem Fieber aus, dem in ungefähr der Hälfte der Fälle Prodromi, häufig in Form milder grippaler Erscheinungen, vorausgehen [Olcén *et al.* 1979]. Die Meningitis-Zeichen nach Kernig und Brudzinski sind zumeist positiv, fehlen aber häufig bei Kindern im ersten Lebensjahr. Hier überwiegen unspezifische Symptome. Eine vorgewölbte und prall gespannte Fontanelle kann Hinweis auf die Meningitis sein. Der Liquor erscheint in der Regel trüb und ist reich an Leukozyten. Meningokokken sind in 72% der Fälle mikroskopisch direkt nachweisbar [Olcén *et al.* 1979].

Im Fall einer fulminanten Meningokokken-Sepsis können meningitische Symptome völlig fehlen, hier dominiert der septische Schock mit Gerinnungsstörungen, Kreislauf- und Multiorganversagen das klinische Bild. Allerdings können auch hier in der Mehrzahl der Fälle Meningokokken aus dem Liquor isoliert werden.

Die Letalität systemischer Meningokokken-Erkrankungen wird insgesamt mit etwa 10% angegeben. Sie liegt für septische Verlaufsformen wesentlich höher (etwa 20%) als für reine Meningitiden (etwa 7%).

Schwere klinische Verlaufsformen sind mit hohen Plasmaspiegeln von Lipopolysacchariden (LPS) assoziiert [Brandtzaeg *et al.* 1989]. Gelangt LPS-haltiges Material in den menschlichen Blutkreislauf, so werden Entzündungsreaktionen

induziert, welche Organfunktionen des Wirts beeinträchtigen [Morrison *et al.* 1987]. Unter anderem kommt es zur hämorrhagischen Diathese bei disseminierter intravasaler Gerinnung und zur Gefäßschädigung [Brandtzaeg 1995]. Daraus resultiert der für septische Meningokokken-Infektionen charakteristische, mit dem Glasspatel nicht wegdrückbare, hämorrhagische Ausschlag, der auf wenige und unscheinbare Petechien beschränkt sein oder im Rahmen einer *Purpura fulminans* zu massiven Einblutungen und Nekrosen führen kann. Typisch sind ferner zentral erhabene makulopapulöse Effloreszenzen von rötlicher Farbe, die unter dem Glasspateldruck verschwinden [Steven *et al.* 1995]. Fulminante Hautblutungen weisen auf schwere Gerinnungsstörungen hin und gelten als prognostisch schlechtes Zeichen [Toews *et al.* 1974]. Sie sind in der Regel mit besonders hohen LPS-Spiegeln assoziiert.

Disseminierte Meningokokken-Erkrankungen können von einem breiten Spektrum an Symptomen begleitet werden, die den systemischen Krankheitszeichen manchmal vorausgehen und in sehr seltenen Fällen einzige Manifestation der Infektion bleiben. Hierzu zählen Arthritis, Perikarditis, Endokarditis, Konjunktivitis, Hirnnervenausfälle, gastrointestinale Störungen und Atemwegserkrankungen [Steven *et al.* 1995]. Insbesondere Infektionen mit Meningokokken der Serogruppe Y manifestieren sich häufig zunächst als Pneumonie [Hoppes *et al.* 1977, Rosenstein *et al.* 1999].

Wird die Meningitis oder Sepsis überlebt, bleiben in etwa 10% der Fälle dauerhafte Schäden zurück: Tiefe Nekrosen führen oft zu Hautnarben und Strikturen und können sogar Amputationen erforderlich machen. Auch bleibende Gehör- und Nierenschäden sind nach Meningokokken-Erkrankung häufig.

1.1.4 Epidemiologie und Populationsstruktur

1.1.4.1 Epidemiologie

Meningokokken-Erkrankungen kommen in Europa mit einer jährlichen Inzidenz von etwa 1-2 pro 100000 der Bevölkerung vor. Einige Länder, zumeist in tropischen und subtropischen Regionen, sind in Abständen von fünf bis zehn Jahren von Epidemien betroffen. In gemäßigten Klimazonen dominiert das endemische Auftreten mit einer Häufung in den ersten drei Monaten des Jahres [Jones 1995, Achtman 1995]. Bemerkenswert ist, dass die Rate asymptomatischer Träger von Meningokokken dieser jahreszeitlichen Schwankung nicht unterliegt [Gold *et al.* 1978]. In der Bevölkerung gemäßigter Klimazonen liegt die Keimträgerquote das ganze Jahr über bei etwa 15% [Caugant *et al.* 1988], ist jedoch altersabhängig. Sie ist bei Säuglingen und Kleinkindern niedrig und zeigt einen Gipfel im Jugend- und frühen Erwachsenenalter.

Erkrankungen an *Neisseria meningitidis* sind in jedem Alter möglich, betreffen in Europa aber in der Mehrzahl der Fälle Säuglinge und Kinder. Ein erster Erkrankungsgipfel tritt im Alter von sechs Monaten auf, wenn die plazentar vermittelte passive Immunität keinen ausreichenden Schutz mehr gegen die Infektion vermittelt, während das eigene Immunsystem noch nicht hinreichend entwickelt ist. In den folgenden Lebensmonaten und -jahren sinkt das Erkrankungsrisiko, um bei den 13- bis 20-jährigen ein zweites, wenngleich weniger stark ausgeprägtes Maximum zu erreichen, das den erweiterten sozialen Aktivitäten und somit Übertragungsmöglichkeiten unter Jugendlichen zugeschrieben wird [Jones 1995].

Es ist bemerkenswert, dass die Prävalenz von bakteriziden Antikörpern im Kleinkindesalter deutlich ansteigt, obwohl kleine Kinder nur selten Träger von Meningokokken sind. Dafür wird die Besiedlung mit *Neisseria lactamica* verantwortlich gemacht, einem Kommensalen im Nasen-Rachenraum, der den Meningokokken nahe verwandt ist. Als eigene Art wurde *Neisseria lactamica* erst 1969 von den Meningokokken abgegrenzt. Von anderen Neisserien-Spezies unterscheidet sie sich durch ihre Fähigkeit, Laktose zu fermentieren [Hollis *et al.* 1969]. Bei Kontakt mit *Neisseria lactamica* kommt es zur Entwicklung von Antikörpern gegen Oberflächen-Epitope von Meningokokken verschiedener

Serogruppen [Cartwright 1995, Coen *et al.* 2000, Gold *et al.* 1978]. Es handelt sich hierbei nicht um Antikörper gegen Kapsel-Polysaccharide, da *Neisseria lactamica* unbekapselt ist. Im Jugendalter, in zeitlicher Beziehung zum zweiten Erkrankungsgipfel also, kommt es bei nunmehr häufiger Besiedlung mit Meningokokken zu einem Rückgang der Prävalenz von *Neisseria lactamica* [Cartwright *et al.* 1987, Cartwright 1995].

1.1.4.2 Aufklärung epidemiologischer und populationsgenetischer Zusammenhänge

Bei Ausbrüchen von Meningokokken-Erkrankungen werden in der Regel Blut-, Liquor- und Rachenisolate von Erkrankten gewonnen, und auch bei gesunden Kontaktpersonen werden Rachenabstriche vorgenommen. Die Isolate werden häufig nur mit serologischen Verfahren untersucht, um Übertragungsvorgänge aufzudecken. Jedoch können einzelne Stämme durch Phasenvariation ihre Polysaccharidkapsel verlieren [Borrow *et al.* 1997, Hammerschmidt, Hilse *et al.* 1996, Hammerschmidt, Müller *et al.* 1996, Vogel *et al.* 1998], so dass eine serologische Kapseltypenbestimmung nicht mehr möglich ist. Vogel *et al.* beschrieben in diesem Zusammenhang ein zweiseitiges PCR-Verfahren, mit dem nach Phasenvariation unbekapselte Varianten ihren ursprünglichen Serogruppen zugeordnet werden können. Die Methode erfasst Vertreter der Serogruppen B, C, W-135 und Y über spezifische PCR-*Primer* innerhalb der Region A des Kapsel-Lokus *cps* [Vogel *et al.* 1998]. Im horizontalen Gentransfer können Meningokokken auch einen neuen Kapseltyp erwerben. So wurden von Swartley *et al.* genetisch identische Stämme aus dem ET-5 Komplex (s.u.) beschrieben, welche der Serogruppe B bzw. der Serogruppe C angehörten [Swartley *et al.* 1997]. Nach dem Serogruppenwechsel eines Stammes ist seine Verwandtschaft zu einem Index-Stamm der ursprünglichen Serogruppe nicht mehr ersichtlich, wenn zur Klassifikation ausschließlich die Serogruppenzugehörigkeit herangezogen wird. Der Serogruppen-*Switch* von der Serogruppe B eines Index-Stammes zur Serogruppe C bei dem ansonsten genetisch identischen Isolat einer direkten Kontaktperson wurde von Vogel *et al.* an einem klinischen Beispiel belegt [Vogel *et al.* 2000]. Um epidemiologische Zusammenhänge erfassen und verfolgen zu können, sind daher Methoden, welche Rückschlüsse über den genetischen Verwandtheitsgrad isolierter

Stämme zulassen, geeigneter als serologische Klassifizierungsverfahren [Vogel *et al.* 1998].

Grundsätzlich ist zu unterscheiden, ob kurzfristige und lokale epidemiologische Zusammenhänge betrachtet werden sollen, beispielsweise im Rahmen eines Ausbruchs, oder ob Populationsstrukturen über einen längeren Zeitraum weltweit zu erfassen sind [Maiden *et al.* 1998]. Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ist besonders sensitiv für minimale genetische Veränderungen im Rahmen der Mikroevolution. Sie zeigt bei der Aufklärung von Ausbrüchen, ob zeitlich assoziierte Fälle durch denselben Stamm verursacht wurden oder lediglich durch verwandte Stämme. Popovic *et al.* zeigten für Stämme der Serogruppe C eine hohe Korrelation bestimmter Bandenmuster mit dem Auftreten im Rahmen von Ausbrüchen [Popovic *et al.* 2001]. Die PFGE ist jedoch zeitaufwändig, und ihre Ergebnisse sind bei Durchführung in verschiedenen Laboren nur bedingt vergleichbar.

Zur längerfristigen Erfassung von Populationsstrukturen eignen sich Methoden, die genetische Varianten erfassen, welche sich langsam herausbilden und keiner Immunselektion unterliegen [Maiden *et al.* 1998]. Prototyp ist die Multilokus-Enzymelektrophorese (MLEE), welche von Caugant *et al.* für Meningokokken etabliert wurde [Caugant *et al.* 1986, Caugant *et al.* 1987]. Das Verfahren beruht auf der Erfassung von Unterschieden im elektrophoretischen Wanderungsverhalten von Isoenzymen. Es handelt sich dabei im Wesentlichen um zytoplasmatische Stoffwechsellzyme, die keiner Immunselektion unterliegen und sich durch Mikroevolution beständig weiterverändern. Afunktionelle Varianten dieser *Housekeeping*-Enzyme werden aus einer Population eliminiert, da entsprechende Stämme nicht lebensfähig sind. Die untersuchten Enzyme sind genetisch nicht gekoppelt. Ein identisches Isoenzymmuster von Stämmen erlaubt den Rückschluss auf einen hohen Grad genetischer Verwandtschaft. Sie gehören demselben Klon an und werden als elektrophoretischer Typ (ET) zusammengefasst. Gruppen verwandter ETs, die sich in der MLEE nur in wenigen Allelen unterscheiden, werden klonalen Linien (genannt Komplexe, *Cluster* oder Subgruppen) zugeordnet [Achtman 1995].

Die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) erfasst Unterschiede zwischen allelen *Housekeeping*-Genen [Maiden *et al.* 1998]. Sie wurde von Maiden *et al.* für Meningokokken etabliert und wird mittlerweile auch für eine Vielzahl anderer Spezies eingesetzt, darunter *Campylobacter jejuni* und *Staphylococcus aureus*. Es

werden innerhalb von sieben *Housekeeping*-Genen Abschnitte von 450 bis 500 bp durch PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Klone mit einem identischen Sequenzprofil der sieben untersuchten Gene gehören einem gemeinsamen Sequenztyp (ST) an. Obwohl weniger Genloci analysiert werden als in der MLEE, erlaubt die MLST eine feinere Trennung von Klonen, da auch Sequenzunterschiede erkannt werden, die sich auf das elektrophoretische Laufverhalten der Genprodukte nicht auswirken. Sie ist zudem weniger zeitaufwändig und in den meisten Laboren leicht durchführbar. Der entscheidende Vorteil der MLST liegt jedoch in der objektiven Vergleichbarkeit der Ergebnisse [Maiden *et al.* 1998]. Eine über das Internet abrufbare Datenbank liegt vor ([http:// www.mlst.net](http://www.mlst.net)).

1.1.4.3 Populationsstruktur

Meningokokken sind natürlich kompetente Bakterien, d.h. sie können freie DNA aus ihrer Umgebung aufnehmen (siehe auch Abschnitt 1.2.3). Horizontaler Gentransfer und Rekombinationsereignisse sind Grundlage einer ausgesprochen heterogenen Populationsstruktur mit einer großen Zahl unterschiedlicher Klone und verwandter Gruppierungen, die sich durch die oben besprochenen Verfahren differenzieren lassen. So wurden mittels MLST bislang über 2000 verschiedene Sequenztypen identifiziert (<http://www.mlst.net>). Meningokokken-Isolate aus Rachenabstrichen gesunder Träger zeichnen sich durch große Vielfalt aus und repräsentieren ein breites Spektrum verschiedener Sequenztypen [Jolley *et al.* 2000]. Isolate im Rahmen eines Ausbruchs gehören hingegen meist dem gleichen Klon an, und nur wenige hypervirulente Linien werden mit endemischen oder epidemischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht [Achtman 1995, Caugant *et al.* 1987, Jolley *et al.* 2000]. Die Subgruppen I, III, IV-1 und V spielen als Erreger von Serogruppe A Erkrankungen in tropischen und subtropischen Epidemiegebieten eine Rolle, während man in Europa Serogruppe B Meningokokken aus dem ET-5 Komplex und der Linie III sowie Serogruppe C Stämme aus dem ET-37 Komplex und dem nahe verwandten *Cluster* A4 für die Mehrzahl der Erkrankungen verantwortlich macht [Achtman 1995].

Vertreter einer klonalen Linie weisen in der Regel ähnliche Serogruppen, Serotypen und -subtypen auf. Wie oben erwähnt, ist es jedoch möglich, dass einzelne Stämme im horizontalen Gentransfer neue antigenetische Eigenschaften erwerben, um der

Immenselektion zu entgehen. Auf diese Weise können Meningokokken auch ihren Kapseltyp wechseln [Swartley *et al.* 1997, Vogel *et al.* 2000].

Meningokokken der Serogruppe A sind genetisch einheitlicher als Isolate anderer Serogruppen [Caugant *et al.* 1987, Maiden *et al.* 1998]. Auch der Wechsel zu anderen Kapsel-Typen ist hier eine seltene Ausnahme. Isolate der Subgruppe VI (in Subgruppen werden in der Regel nur Serogruppe A Meningokokken zusammengefasst) können jedoch die Serogruppen A, B und C aufweisen [Grahlow *et al.* 1990]. Ferner sind Subgruppe VI Stämme neben drei schottischen Isolaten, welche neu identifizierten klonalen Linien angehören, die einzigen Serogruppe A Meningokokken, die als Träger von IS1301 bekannt sind, einem für *Neisseria meningitidis* spezifischen Insertionselement von 844 bp [Hilse *et al.* 2000]. Dies mag als Hinweis auf ihre Sonderstellung innerhalb der Serogruppe A gedeutet werden.

Innerhalb einer klonalen Gruppierung können immer wieder neue Varianten mit hoher Fitness und gegebenenfalls Virulenz entstehen. So ist der ET-15 Klon dem ET-37 Komplex zuzuordnen. ET-15 Meningokokken wurden erstmals bei Ausbrüchen im Winter 1988/89 in Kanada isoliert [Ashton *et al.* 1991] und haben seitdem weltweite Verbreitung gefunden. In der Tschechischen Republik führten sie im Jahr 1993 zu Ausbrüchen und zu einer deutlichen Steigerung der Inzidenz von Meningokokken-Erkrankungen [Krizova *et al.* 1995, Krizova *et al.* 1997]. Sie zeichnen sich durch eine erhöhte Inzidenz unter Jugendlichen sowie durch besondere Virulenz aus, die sich in einer fünffachen Erhöhung der Rate an Defektheilungen und einer Verdopplung der Letalität im Vergleich zu anderen elektrophoretischen Typen niederschlägt [Erickson *et al.* 1998]. In Anbetracht dieser Tatsachen wurden sowohl in Kanada als auch in der Tschechischen Republik Massenvakzinierungskampagnen durchgeführt [De Wals *et al.* 1996, Kriz *et al.* 1995]. Nachdem ET-15 Stämme in der Tschechischen Republik ursprünglich ausschließlich der Serogruppe C angehörten, wurden in den Jahren 1995 und 1996, also im Anschluss an die Massenvakzinierungen mit Serogruppe C Polysacchariden, zunehmend auch ET-15 Meningokokken der Serogruppe B isoliert, die sich wie die Serogruppe C Isolate durch eine hohe Virulenz, verbunden mit einer Letalität von 20% auszeichneten [Krizova *et al.* 1997]. Es ist anzunehmen, dass Selektionsdruck, aufgebaut durch die Immunisierungsmaßnahmen, zum Wechsel der Serogruppe durch Kapsel-*Switching* [Swartley *et al.* 1997] führte.

In der MLEE zeichnen sich ET-15 Stämme durch eine seltene Variante des *FumC*-Allels aus, die im ET-37 Komplex sonst nicht vorkommt. Der in der MLST sequenzierte Abschnitt des *fumC*-Gens (Position 776-1230) zeigt keinen Unterschied zwischen ET-15 und ET-37. Vogel *et al.* beschrieben jedoch eine nicht-synonyme Punktmutation an Position 640 des *fumC*-Gens im ET-15 Klon [Vogel *et al.* 2000]. Auch durch Pulsfeld-Gelelektrophorese lassen sich Angehörige des ET-15 Klons als eigene Gruppe innerhalb des ET-37 Komplexes abgrenzen. Sie können darüber hinaus lokalen Untergruppen mit spezifischen Bandenmustern zugeordnet werden [Jelfs *et al.* 2000].

1.2 Plasmide

1.2.1 Grundlagen

Der Begriff „Plasmid“ wurde 1952 durch Joshua Lederberg geprägt [Lederberg 1952]. Dieser hatte bereits in den 40er-Jahren in Experimenten nachgewiesen, dass bakterielle DNA unter Vertretern des *Escherichia coli* Stammes K-12 durch Konjugation übertragen werden kann. Die Bezeichnung „Plasmid“ sowie das Interesse für extrachromosomale genetische Elemente fanden jedoch erst in den 70er-Jahren mit dem vermehrten Auftreten plasmidgebundener Antibiotikaresistenzen weite Verbreitung.

Plasmide sind extrachromosomale DNA-Elemente unterschiedlicher Größe im Bereich von 1 kb bis zu über 1000 kb, welche unabhängig vom Bakterienchromosom replizieren. Vom eigentlichen Chromosom lassen sie sich nicht nur durch ihre geringere Größe abgrenzen, sondern definitionsgemäß auch dadurch, dass sie keine für den Wirt unter allen Umständen lebensnotwendigen Gene, keine *Housekeeping*-Gene, tragen. Der weitaus größte Teil aller Plasmide besteht aus doppelsträngiger DNA. Die meisten Plasmide liegen zirkulär vor, jedoch sind auch lineare Plasmide bekannt, beispielsweise in den verwandten Gattungen *Streptomyces* und *Rhodococcus* sowie in Borrelien [Helinski *et al.* 1996].

Die Anzahl der Plasmide in einer Zelle, genannt Kopienzahl, variiert zwischen verschiedenen Plasmiden beträchtlich. So können unterschiedliche Plasmide in ihrem Wirt einfach oder als *Multicopy*-Plasmide in hundertfacher Kopie vorliegen. Unter gegebenen Wachstumsbedingungen ist die Kopienzahl des einzelnen Plasmids eine konstante Größe, die negativ reguliert wird. Gelangt ein Plasmid in einen bislang plasmidfreien Stamm, so ist die zytoplasmatische Konzentration negativer Regulatoren zunächst vernachlässigbar klein, und es kommt zur ungehemmten Replikation. Ist die für das Plasmid charakteristische Kopienzahl erreicht, stellt sich ein Gleichgewicht ein, und das einzelne Plasmid repliziert mit jedem Zellzyklus durchschnittlich einmal. Gelangt nun, da bereits ein Plasmid in charakteristischer Kopienzahl etabliert ist, ein weiteres, nahe verwandtes Plasmid, dessen Replikation durch den gleichen oder einen ähnlichen Regulator inhibiert wird, in den Wirt, so wird es nicht in ausreichendem Maße replizieren können und im Zuge der nächsten Zellteilungen wieder verlorengehen. Die beiden verwandten

Plasmide gehören derselben Inkompatibilitätsgruppe an. Sie können nicht gleichzeitig in einem Wirt bestehen [Helinski *et al.* 1996, Del Solar *et al.* 1998]. Die Einordnung von Plasmiden in Inkompatibilitätsgruppen ist ein gängiges Klassifikationsverfahren.

Ein einzelnes Plasmid kann auf eine ganz bestimmte Bakterienart beschränkt sein und selbst in verwandten Arten nicht replizieren oder aber ein breites Wirtsspektrum aufweisen. Letzteres gilt häufig für Plasmide grampositiver Bakterien, während Plasmide aus gramnegativen Spezies meist eng an diese gebunden sind. Natürlich vorkommende Plasmide replizieren selbst bei breitem Wirtsspektrum, von ganz wenigen Ausnahmen abgesehen [Helinski *et al.* 1996], entweder in grampositiven oder in gramnegativen Bakterien, aber niemals gleichermaßen in beiden.

1.2.2 Replikation von Plasmiden

Plasmide sind *Replicons*. Sie besitzen einen eigenen Replikationsursprung und replizieren autonom, jedoch unter Nutzung wirtseigener Replikationsenzyme. Plasmidkodierte Proteine haben im Replikationsprozess Kontrollfunktion; sie regulieren dessen Initialisierung und den zeitlichen Ablauf. Ihre Gene liegen auf dem Plasmid zumeist als *Cluster* in jenem Bereich organisiert, der auch den eigentlichen Replikationsursprung enthält. Für große Plasmide werden gelegentlich mehrere Replikationsursprünge beschrieben [Helinski *et al.* 1996, Inuzuka *et al.* 1980].

Plasmide gramnegativer Bakterien replizieren meist in ähnlicher Weise wie das bakterielle Chromosom nach dem *Theta*-Mechanismus [Del Solar *et al.* 1998]. Die Replikation wird häufig durch sogenannte *Rep*-Proteine initiiert. Diese binden spezifisch an multipel hintereinander angeordnete *Direct Repeats*, genannt *Iterons*, am Replikationsursprung. Dabei kommt es zur Ausbildung eines Nukleoprotein-Komplexes, zu Strukturänderungen und zum Aufschmelzen einer angrenzenden AT-reichen Region. Andere *Rep*-Proteine binden nicht an *Iterons*, sondern erkennen spezifisch nicht-repetitive Sequenzen [Del Solar *et al.* 1998].

Große Plasmide grampositiver Bakterien replizieren ebenfalls häufig nach dem *Theta*-Mechanismus, kleinere *Multicopy*-Plasmide bis zu 10 kb eher nach Art der *Rolling-Circle*-Replikation, welche auch bei Phagen eine Rolle spielt. Auch für einzelne Plasmide gramnegativer Spezies wurde der *Rolling-Circle*-Mechanismus beschrieben [Del Solar *et al.* 1998]. Der wesentliche Unterschied zur klassischen Replikation nach dem *Theta*-Mechanismus besteht darin, dass zunächst nur *ein*

Strang eines doppelsträngig und zirkulär vorliegenden DNA-Moleküls neu synthetisiert wird. Durch ein plasmidkodiertes *Rep*-Protein wird ein einzelner Strang am Replikationsursprung (*DSO*, *double-strand origin*), bestehend aus einem oder mehreren *Inverted Repeats*, gespalten. An seinem nun freien 3'-Ende wird neue DNA synthetisiert. Dabei wird der ursprüngliche Doppelstrang vom Replikationsursprung ausgehend getrennt. Der wachsende DNA-Strang verdrängt im Prinzip sein eigenes 5'-Ende. Sobald die Replikation den DSO wieder erreicht, wird der verdrängte Strang zirkulär geschlossen und abgespalten. Ausgehend von einem eigenen Replikationsursprung (*SSO*, *single-strand origin*) wird er zum Doppelstrang ergänzt [Del Solar *et al.* 1998].

Manche Plasmide vermögen in das Bakterienchromosom zu integrieren. Ihre Replikation steht dann unter chromosomaler Kontrolle. Chromosomale Integration ist nicht selten und wurde für unterschiedliche Plasmide beschrieben. Beispielhaft seien zwei der weiter unten in dieser Arbeit besprochenen Plasmide angeführt: das 100 kb-Virulenzplasmid aus *Yersinia pestis* [Protsenko *et al.* 1991] sowie vermutlich das kryptische Plasmid aus *Neisseria gonorrhoeae* [Hagblom *et al.* 1986].

1.2.3 Erwerb und Weitergabe von Plasmid-DNA

Plasmide können auf verschiedene Arten in Zellen gelangen. Im einfachsten Fall erhält eine Tochterzelle die Plasmide von der sich teilenden Mutterzelle im vertikalen Transfer.

Natürlich kompetente Bakterien wie Neisserien können freie DNA aus ihrer Umgebung aufnehmen, somit also auch Plasmide. Dieser Vorgang wird als Transformation bezeichnet. Natürliche Kompetenz wurde für grampositive und gramnegative Spezies untersucht und beschrieben: Während die grampositiven Arten *Bacillus subtilis* und *Streptococcus pneumoniae* Fremd-DNA aus verschiedenen Quellen gleichermaßen aufnehmen, ist in den gramnegativen Spezies *Haemophilus influenzae* und *Neisseria gonorrhoeae* die Transformation artgleicher DNA wesentlich effektiver [Smith *et al.* 1999]. Die selektive Aufnahme von DNA der gleichen Art ist an die Präsenz bestimmter DNA-*Uptake*-Sequenzen (DUS) auf dem zu transformierenden Fragment gebunden [Elkins *et al.* 1991, Goodman *et al.* 1988, Smith *et al.* 1999]. Auch Meningokokken nehmen bevorzugt DNA mit einer DUS von 10 bp auf. Diese ist mit der für *Neisseria gonorrhoeae* beschriebenen Sequenz (5'-GCCGTCTGAA) identisch. Sie ist auf dem Genom des

sequenzierten Serogruppe B Stammes MC58 in 1910-facher Kopie zu finden [Tettelin *et al.* 2000]. Der sequenzierte Serogruppe A Stamm Z2491 trägt sie in 1891-facher Ausführung [Parkhill *et al.* 2000, Smith *et al.* 1999]. Daraus ergibt sich hier ein durchschnittlicher Abstand von 1152 bp zwischen zwei DUS auf dem Genom. Viele DUS sind palindromisch angeordnet und dienen als Terminatoren der Transkription [Smith 1999, Tettelin *et al.* 2000]. Tatsächlich spielen DUS auch bei der Transformation von Plasmiden eine Rolle, wie Untersuchungen an dem kryptischen Plasmid aus *Neisseria gonorrhoeae* zeigten [Goodman *et al.* 1988].

Der klassische Weg zur horizontalen Weitergabe von Plasmiden ist jedoch die Konjugation, bei der ein Donor, welcher Träger eines konjugativen Plasmids ist, dieses als Einzelstrang an einen Rezipienten weitergibt. Der Vorgang ähnelt der *Rolling-Circle*-Replikation, ist aber nicht mit ihr identisch [Helinski *et al.* 1996]. Für Neisserien sind nur wenige konjugative Plasmide bekannt. Ein bedeutsames Beispiel sind konjugative Resistenzplasmide in Gonokokken und Meningokokken, welche Träger der Tetrazyklin-Resistenzdeterminante *tetM* sind. Sie werden weiter unten im Detail besprochen [Gascoyne-Binzi *et al.* 1993, Gascoyne-Binzi *et al.* 1994, Knapp *et al.* 1987, Morse *et al.* 1986, Roberts *et al.* 1988].

1.2.4 Plasmide als Informationsträger

Wie oben erwähnt, sind Plasmide für ihren Wirt nicht unter allen Umständen lebensnotwendig. Sie tragen vielmehr Gene, welche ihm in bestimmten ökologischen Nischen von Nutzen sind. Plasmide, denen keine bestimmte Funktion zugeordnet werden kann, bezeichnet man als kryptisch. Ein Beispiel ist das unten beschriebene kryptische Gonokokkenplasmid [Aalen *et al.* 1985, Engelkirk *et al.* 1972, Roberts *et al.* 1979, Sparling *et al.* 1981].

1.2.4.1 Resistenzplasmide

Resistenzplasmide (R-Plasmide) verleihen ihrem Wirt Resistenzeigenschaften gegen Antibiotika. Insbesondere konjugative R-Plasmide verbreiten sich unter dem Selektionsdruck angewandter Antibiotika außerordentlich schnell und sind maßgeblich für das weltweite Auftreten resistenter Stämme verantwortlich. Auch aus humanpathogenen Neisserien, aus Gonokokken und Meningokokken, wurden Resistenzplasmide isoliert. Konjugative Plasmide mit der Resistenzdeterminante *tetM* vermitteln Resistenz gegen Tetrazykline [Gascoyne-Binzi *et al.* 1993,

Gascoyne-Binzi *et al.* 1994, Knapp *et al.* 1987, Morse *et al.* 1986, Roberts *et al.* 1988]. Andere Resistenzplasmide kodieren für eine β -Laktamase [Bäckmann *et al.* 2000, Brett 1989, Dillon *et al.* 1983, Elwell *et al.* 1977, Ikeda *et al.* 1986, Roberts *et al.* 1977, Roberts *et al.* 1979, Sparling *et al.* 1978, Sparling *et al.* 1981]. Sie sind selbst nicht konjugativ, können jedoch durch konjugative Plasmide mobilisiert werden. Für Meningokokken wurden zudem Plasmide beschrieben, welche Resistenz gegen Trimethoprim und Sulfamethoxazol vermitteln [Facinelli *et al.* 1987]. Diese und andere Plasmide in Neisserien werden im Abschnitt 1.3 im Detail besprochen.

Multiresistenz-Plasmide beherbergen eine Vielzahl von Resistenzgenen. Resistenzdeterminanten sind dabei oft an transposable Elemente gebunden, was ihren horizontalen Transfer und ihre Akkumulation auf einzelnen Plasmiden ermöglicht. Von klinischer Relevanz sind beispielsweise verschiedene Gruppen von Multiresistenzplasmiden aus *Staphylococcus aureus*. Sie vermitteln Resistenz gegen verschiedene Antibiotika, Desinfektionsmittel und Schwermetalle, kodiert auf Transposons und Insertionselementen [Berg *et al.* 1998, Firth *et al.* 2000, Lyon *et al.* 1987, Shalita *et al.* 1980]. Sogar kleine Plasmide wie das Aminoglykosid-Resistenzplasmid pUB110 können vollständig in die Plasmidsequenz der großen Multiresistenz-Plasmide integriert sein [Byrne *et al.* 1991].

1.2.4.2 Plasmide als Träger von Virulenzeigenschaften

Plasmide können ihrem Wirt Virulenzeigenschaften vermitteln. Ein eindrucksvolles Beispiel dafür stellen Virulenzplasmide der humanpathogenen Yersinien-Spezies *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* und insbesondere *Yersinia pestis* dar. *Yersinia pestis*, Erreger der Pest, beherbergt drei Virulenzplasmide von 70 kb, 100 kb und 9,6 kb. Die beiden letzteren sind für *Yersinia pestis* spezifisch.

Allen drei humanpathogenen *Yersinia*-Spezies gemeinsam ist eine Gruppe nahe verwandter Virulenzplasmide von etwa 70 kb Größe, welche für hochkonservierte Virulenzeigenschaften kodieren [Perry *et al.* 1997, Cornelis *et al.* 1998]. Das 9,6 kb große Plasmid aus *Yersinia pestis* trägt das *pla*-Gen. Es kodiert für einen Plasminogenaktivator, der möglicherweise die Ausbreitung des Pesterregers im Gewebe begünstigt [Sodeinde *et al.* 1988]. Schließlich beherbergt *Yersinia pestis* ein Virulenzplasmid von etwa 100 kb [Filippov *et al.* 1990]. Es kann an unterschiedlichen Stellen in das Bakterienchromosom integrieren [Protsenko *et al.*

1991] und kodiert für eine Vielzahl von Proteinen [Lindler *et al.* 1998]. Darunter wurden das murine Toxin MT und das Fraktion-1-Kapselprotein als klassische Virulenzfaktoren beschrieben. Das Fraktion-1-Kapselprotein umgibt den Pesterreger bei Körpertemperatur als gelatinöse Kapsel und vermittelt wahrscheinlich Schutz gegen Phagozytose. Das murine Toxin erwies sich als toxisch in Mäusen und Ratten [Perry *et al.* 1997].

1.2.5 Plasmide als epidemiologische Marker

Innerhalb einer Bakterienart können unterschiedliche Plasmide vorkommen, die jeweils in nur einem Teil der Stämme enthalten sind. Muster der Plasmidverteilung sind darum immer wieder zu epidemiologischen Zusammenhängen in Bezug gesetzt worden, so zum Beispiel in der Gattung *Salmonella* [Critchton *et al.* 1996, Ridley *et al.* 1998, Wray *et al.* 1998]. Die Bestimmung von Plasmid-Verteilungsmustern wurde bei Salmonellen unter anderem zur feineren Differenzierung von Stämmen innerhalb eines Phagovars angewandt [Wray *et al.* 1998] und spielt eine Rolle bei der Analyse epidemiologischer Zusammenhänge und Infektionsketten [Critchton *et al.* 1996]. Nicht jeder Salmonellen-Stamm enthält jedoch Plasmide, zudem können diese aus ihrem Wirt eliminiert werden oder sich durch Konjugation schnell weiterverbreiten. Der epidemiologischen Aussagefähigkeit von Plasmid-Verteilungsmustern sind darum Grenzen gesetzt [Critchton *et al.* 1996], und anderen Verfahren wie der Pulsfeld-Gelelektrophorese wird in der epidemiologischen Erfassung von *Salmonella*-Spezies eine größere Bedeutung beigemessen [Ridley *et al.* 1998].

1.3 Plasmide in Neisserien

In den 70er-Jahren bestand ein reges Interesse an Plasmid-DNA in verschiedenen Bakterien. Die Charakterisierung von Plasmiden übte aufgrund ihrer begrenzten Größe und somit Überschaubarkeit einen besonderen Reiz aus. Im Rahmen dieser Bestrebungen wurden auch Plasmide in Neisserien untersucht. Während aus Gonokokken verschiedene Plasmide, z.T. Träger von Resistenzeigenschaften, z.T. kryptischer Natur, isoliert und beschrieben wurden, schenkte man Plasmiden in *Neisseria meningitidis* zunächst wenig Beachtung.

1.3.1 Plasmide in *Neisseria gonorrhoeae*

Über 90% der klinischen Isolate von *Neisseria gonorrhoeae* beherbergen ein 4,2 kb großes kryptisches Plasmid [Engelkirk *et al.* 1972, Roberts *et al.* 1979, Sparling *et al.* 1981], das für mehrere Proteine unbekannter Funktion kodiert [Aalen *et al.* 1985]. Die Sequenz des kryptischen Gonokokkenplasmids kann zwischen verschiedenen Isolaten geringfügig variieren [Aalen *et al.* 1985]. Sowohl einzelne Plasmidabschnitte als auch das gesamte kryptische Plasmid können chromosomal in das Gonokokkengenom integriert vorliegen [Hagblom *et al.* 1986]. Dies gilt sowohl für plasmidlose Stämme als auch für Stämme, welche das vollständige zirkuläre Plasmid tragen. Integrationsstellen auf dem Chromosom wurden nicht charakterisiert, jedoch scheint die gleichzeitige Integration des kompletten linearisierten Plasmids und inkompletter Plasmidfragmente an verschiedenen Stellen des Chromosoms möglich. Das kryptische Plasmid ist, wenn es in seiner gesamten Länge integriert, vermutlich an definierter Stelle linearisiert. Diese beinhaltet zwei *Direct Repeats* und liegt innerhalb des plasmidkodierten *cpp*-Gens [Hagblom *et al.* 1986]. Im gleichen Bereich kann aus dem freien Plasmid unter Erhalt der *Direct Repeats* ein 54 bp großes Fragment deletiert werden, was einer Verkürzung des *cpp*-Genprodukts um 18 Aminosäuren entspricht. Diese Deletion wird in 20% der natürlichen Isolate gefunden und gilt als reversibel [Foster *et al.* 1976]. Rekombinante Plasmide, bestehend aus dem kryptischen Plasmid und Resistenzdeterminanten, wurden von Graves *et al.* beschrieben [Graves *et al.* 1982]. Integrationspunkt auf dem kryptischen Plasmid ist auch hier die oben beschriebene *Repeat*-Region. Homologien von einzelnen Abschnitten des kryptischen Plasmids zum Meningokokkenchromosom sind durch Hybridisierungsverfahren aufgezeigt worden [Grimholt *et al.* 1993].

In den 70er-Jahren wurden auch Resistenzplasmide in *Neisseria gonorrhoeae* beschrieben. So wurden 1976 in Großbritannien und Südostasien Plasmide von 5,6 und 7,4 kb aus klinischen Isolaten extrahiert, die eine β -Laktamase kodierten [Elwell *et al.* 1977]. In DNA-DNA-Hybridisierungsverfahren zeigte sich ihre Homologie zu einem 6,2 kb großen β -Laktamase-Plasmid aus *Haemophilus influenzae* [Roberts *et al.* 1977, Elwell *et al.* 1977], und Vermutungen über ihre Herkunft aus *Haemophilus*-Spezies wurden geäußert. Für diese These sprach auch der mit 59% für Gonokokken ungewöhnlich hohe, für *Haemophilus* aber charakteristische AT-Gehalt

der Plasmide: Der AT-Gehalt für Gonokokken-DNA wird in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* mit 50-53% angegeben. Ein 7,4 kb großes und mit dem entsprechenden Gonokokken-Isolat identisches Plasmid wurde wenig später aus *Haemophilus influenzae* isoliert, sein Transfer in Gonokokken nachgewiesen [Sparling *et al.* 1978]. Es stellte sich heraus, dass viele Gonokokkenstämme als Träger des 5,6 beziehungsweise 7,4 kb großen Penizillinase-Plasmids ihrerseits in der Lage waren, dieses durch Konjugation an andere Gonokokken, *Escherichia coli* und *Neisseria flava* weiterzugeben. Diese Fähigkeit erwies sich als an die Anwesenheit eines weiteren, 37 kb großen, konjugativen Plasmids gebunden. Dieses trägt selbst keinerlei Resistenzeigenschaften, ist aber in der Lage, sich selbst und das kleinere nicht-konjugative Penizillinase-Plasmid in geeignete Rezipienten zu mobilisieren [Sox *et al.* 1978]. Der konjugative Transfer von Penizillinase-Plasmiden in Meningokokken wurde 1986 experimentell nachgewiesen [Ikeda *et al.* 1986]. Wenig später wurde gezeigt, dass das 5,6 kb große Resistenzplasmid gemeinsam mit dem 37 kb großen konjugativen Plasmid in Meningokokken der Serogruppe A gebracht werden konnte, wo sich beide über mehrere Generationen stabil hielten. Aus dem neuen Wirt heraus waren Konjugationen in weitere Meningokokkenstämme möglich [Brett 1989]. Die Isolation plasmidtragender und β -Laktamase produzierender Meningokokken ließ vermuten, dass derartige Konjugationsereignisse auch natürlich vorkommen [Dillon *et al.* 1983]. Die Sequenzierung eines solchen Plasmids bestätigte seine Verwandtschaft zu Penizillinase-Plasmiden in *Neisseria gonorrhoeae* [Bäckmann *et al.* 2000].

1.3.2 Plasmide in *Neisseria meningitidis*

1981, knapp zehn Jahre nach der Entdeckung des kryptischen Gonokokkenplasmids, wurden erstmals Plasmide in *Neisseria meningitidis* beschrieben [Bhatti *et al.* 1981]. In den folgenden Jahren berichteten verschiedene Autoren über Plasmid-DNA in Meningokokken [Bäckmann *et al.* 1993, Dekegel *et al.* 1983, Facinelli *et al.* 1987, Ison *et al.* 1984, Verschueren *et al.* 1982]. Fast immer handelte es sich um kryptische Plasmide. Bemerkenswert ist, wie unterschiedlich die Rate an plasmidtragenden Meningokokken bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Stämme von den verschiedenen Autoren angegeben wird. So identifizierten Dekegel *et al.* durch Plasmid-Präparation und Elektronenmikroskopie die meisten ihrer Stämme als Plasmidträger [Dekegel *et al.* 1983], während

Bäckmann *et al.* nur aus 4 von insgesamt 188 Stämmen Plasmide isolieren konnten [Bäckmann *et al.* 1993]. Diese extremen Abweichungen sind am ehesten durch Unterschiede in Methodik und Stammauswahl zu erklären.

Plasmidgebundene Resistenz gegen β -Laktam-Antibiotika in Meningokokken wird seit den 80er-Jahren beobachtet. Die Herkunft dieser Resistenzplasmide aus der verwandten Art *Neisseria gonorrhoeae* wurde vermutet [Dillon *et al.* 1983] und der konjugative Transfer von β -Laktamase-Plasmiden aus Gonokokken in Meningokokken experimentell nachgewiesen [Brett 1989, Ikeda *et al.* 1986]. Dass Rekombinationsereignisse zwischen den beiden verwandten Arten in der Natur stattfinden, wurde in der Literatur beschrieben [Vásquez *et al.* 1995]. Denkbar ist auch ein indirekter Austausch von DNA-Material über den großen *Pool* apathogener Neisserien-Arten, welche im menschlichen Wirt neben den pathogenen Arten siedeln [Maiden *et al.* 1996, Linz *et al.* 2000]. Bäckmann *et al.* bestätigten durch die vollständige Sequenzierung eines aus Meningokokken isolierten Resistenzplasmids dessen Herkunft aus *Neisseria gonorrhoeae*. Es erwies sich als praktisch identisch mit einem aus penizillinresistenten Gonokokken bekannten Plasmid von 5,6 kb Größe [Bäckmann *et al.* 2000].

1987 isolierten Facinelli *et al.* aus Meningokokken der Serogruppe C ein 13 kb großes Plasmid, das Resistenz gegen Trimethoprim und Sulfamethoxazol vermittelte [Facinelli *et al.* 1987]. Plasmid-*Curing*-Experimente mit Ethidiumbromid ergaben plasmidlose Derivate, die sich als sensibel gegenüber diesen Antibiotika erwiesen. Umgekehrt erwarben die so erhaltenen plasmidfreien Stämme in Transformationsexperimenten das präparierte Plasmid und die damit verbundenen Resistenzeigenschaften zurück. Ebenso gelang die Transformation von *Escherichia coli* mit daraus resultierender Resistenz gegen Sulfamethoxazol.

1.3.3 Plasmide in Neisserien als Träger der Tetrazyklin-Resistenzdeterminante *tetM*

Plasmide, welche als Träger des *tetM*-Gens Resistenz gegen Tetrazyklin-Antibiotika vermitteln, kommen in Gonokokken und Meningokokken vor. Sie wurden in beiden Arten im Detail untersucht und beschrieben. In den 80er-Jahren wurden erstmals Gonokokken mit ausgeprägter Resistenz gegen Tetrazykline isoliert. Aus den entsprechenden Stämmen konnte ein 39 kb großes konjugatives Plasmid isoliert werden, welches Träger der Tetrazyklin-Resistenzdeterminante *tetM* war [Knapp *et*

al. 1987]. Der restliche Anteil der Plasmidsequenz zeichnete sich durch einen hohen Grad an Homologie zu dem oben erwähnten konjugativen Gonokokken-Plasmid von 37 kb aus. Es lag also nahe zu vermuten, dass dieses das 1,9 kb große *tetM*-Gen in einem Rekombinationsereignis erworben hatte [Morse *et al.* 1986]. Die Resistenzdeterminante *tetM* wurde im Zusammenhang mit dem Transposon Tn916 beschrieben [Clewell *et al.* 1986, Caparon *et al.* 1989]. Auf Tetrazyklin-Resistenzplasmiden aus *Neisseria gonorrhoeae* befinden sich die *tetM*-Determinante und ihr mutmaßlicher Promotor, flankiert von wenigen hundert Basenpaaren, deren Sequenz entsprechenden Abschnitten auf Tn916 in hohem Grad homolog ist [Swartley *et al.* 1993]. In der vergleichenden Restriktionsanalyse verschiedener Plasmide aus Gonokokken und später auch Meningokokken, jeweils Träger des *tetM*-Gens, ergaben sich deutlich unterschiedliche Bandenmuster, und auch für das *tetM*-Gen selbst wurden abweichende Sequenzen ermittelt [Gascoyne-Binzi 1993, Gascoyne-Binzi *et al.* 1994]. Es müssen daher, so Gascoyne-Binzi, mehrere unabhängige Rekombinationsereignisse stattgefunden haben. *tetM*-Gene unterschiedlicher Herkunft integrierten in verwandte, aber deutlich unterscheidbare konjugative Plasmide. Oggioni *et al.* beschrieben zwei allele Formen von *tetM* aus *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae*. Homologe Rekombination zwischen beiden Allelen führte zu Mosaikstrukturen. Auch in Meningokokken, Gonokokken und apathogenen Neisserien finden sich derartige Mosaik des *tetM*-Gens [Oggioni *et al.* 1996]. *tetM* ist häufig plasmidkodiert, kann jedoch auch in das Bakterienchromosom integriert vorliegen [Roberts *et al.* 1988].

Rekombinante Plasmide, bestehend aus dem Tetrazyklin-Resistenzplasmid *ptetM25.5* und einem *Replicon* aus *Escherichia coli*, sind Grundlage von Hermes-*Shuttle*-Vektor-Systemen [Kupsch *et al.* 1996]. Diese dienen dem Transfer klonierter Gene in Neisserien.

1.4 Zielsetzungen dieser Arbeit

Wie oben erwähnt, wurden Plasmide in *Neisseria meningitidis* von verschiedenen Autoren beschrieben [Bäckmann *et al.* 1993, Bhatti *et al.* 1981, Dekegel *et al.* 1983, Facinelli *et al.* 1987, Ison *et al.* 1984, Verschueren *et al.* 1982], wobei widersprüchliche Angaben über ihre Häufigkeit gemacht wurden. Auch fehlen bislang Aussagen über ihre Verteilung innerhalb der verschiedenen klonalen Linien von *Neisseria meningitidis*. Schließlich sind nur von wenigen Meningokokken-Plasmiden DNA-Sequenzen bekannt. Sequenzinformationen existieren lediglich zu solchen Plasmiden, welche mit Antibiotika-Resistenzen in Verbindung gebracht werden, so zu dem oben beschriebenen β -Laktamase-Plasmid [Bäckmann *et al.* 2000] und zu Tetrazyklin-Resistenz-Plasmiden [Oggioni *et al.* 1996]. Die Sequenz der beschriebenen kryptischen Meningokokken-Plasmide ist völlig unbekannt.

Im Zentrum dieser Arbeit standen daher folgende Fragen und Zielsetzungen:

- 1) Wie häufig sind Plasmide in *Neisseria meningitidis* vorhanden? Genaue Zahlenangaben sollen gemacht werden.
- 2) Sind Plasmide innerhalb der Art *Neisseria meningitidis* klonal verteilt? Sind sie möglicherweise als epidemiologische Marker zur Analyse von Populationsstrukturen einsetzbar?
- 3) Einzelne Plasmide sollen vollständig sequenziert werden. Lassen sich aus ihrer DNA-Sequenz Erkenntnisse über kodierte Proteine oder über Replikationsstrategien herleiten?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschränke

KB 500 (Heraeus, Hanau)

B5060 E-CO₂ (Heraeus, Hanau)

Elektrophoresekammern

DNA Subcell™ (BioRad, München)

Wide Mini-Subcell™ (BioRad, München)

Gel-Dokumentationssystem

MidiDoc (Herolab, Wiesloch)

Geräte zur Elektroporation

Gene Pulser™ (BioRad, München)

Pulse Controller™ (BioRad, München)

Heizblöcke

BT1 und BT3 (Grant Instruments, Cambridge, UK)

Hybridisierungsöfen

DUO-Therm OV5 (Biometra, Göttingen)

Schüttelinkubatoren

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

KS 10 (Bühler, Tübingen)

Sequenziergerät

ABI Prism™ Sequencer 377 (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Spannungsgeräte

Gene Power Supply GPS 200/400 (Pharmacia, Freiburg)

Power Supply 3000Xi (BioRad, München)

Vakuumpzentrifuge

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

Spektrophotometer

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

Thermocycler für PCR

TRIO (Biometra, Göttingen)

Personal Cycler (Biometra, Göttingen)

UV Crosslinker

Stratalinker[®] 1800 (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande)

Waagen

SAC 62 (Sartorius, Göttingen)

Research (Sartorius, Göttingen)

Wasserbäder verschiedener Hersteller

Zentrifugen

Biofuge 15 (Heraeus, Hanau)

Biofuge 15R (Heraeus, Hanau)

Omnifuge 2.0 RS (Heraeus, Hanau)

Kühlzentrifuge RC-5B (Sorvall[®] Heraeus, Hanau)

Rotoren: Sorvall[®] GS-3, HB-6, SA-600, SS 34

Ultrazentrifuge L7 (Beckman, München)

Rotor: 70.1 Ti

2.1.2 Verbrauchsmaterial

50 ml-Corex-Glasröhrchen

Dialyseschläuche 3/4" (Life Technologies, Karlsruhe)

Dickes und dünnes *Blotting*-Papier, 58 cm x 58 cm (Schleicher & Schüll, Dassel)

Elektroporationsküvetten, 0,2 cm (Eurogentec, Seraing, Belgien)

Positiv geladene Nylonmembran Parablot NY plus (Macherey & Nagel, Düren)

0,5 ml-, 1,5 ml- und 2,0 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht)

15 ml-Röhrchen, steril (Greiner, Nürtingen)

Röntgenfilm HyperfilmTM-MP (Amersham, Braunschweig)

Spritzen und Kanülen (Braun Melsungen AG, Melsungen)

15 ml- und 50 ml-Zentrifugengefäße (Falcon, Heidelberg)

QuicksealTM-Zentrifugengefäße, 16 x 76 mm (Beckman, München)

2.1.3 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme

AppliChem, Heidelberg

Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG)

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

X-Gal

BioMérieux, Marcy l'Étoile, Frankreich

PolyVitex (Vitaminlösung für Flüssigmedien)

Difco Laboratories, Augsburg

GC-Medium Base

Proteose-Pepton

Eurogentec, Seraing, Belgien

Smart-Ladder

Life Technologies, Karlsruhe

*Cla*I-Restriktionsendonuklease

Cäsiumchlorid ultraPURETM

LB Agar (Lennox L Agar)

LB Broth Base (Lennox L Broth Base)

NEB, Schwalbach

Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme

Perkin Elmer, Weiterstadt

Ampli*Taq*[®] DNA-Polymerase

QIAGEN, Hilden

DNeasy Tissue Kit

QIAGEN Plasmid Midi Kit

QIAprep Spin Miniprep Kit

QIAquick PCR Purification Kit

QIAquick Gel Extraction Kit

Roche, Mannheim

DIG DNA Labeling Kit

DIG Luminescent Detection Kit

DNA-Molekulargewichtsmarker II und III, DIG-markiert

Lysozym

Roth, Karlsruhe

Agarose NEE0

dNTPs, lyophilisiert

Serva, Heidelberg

Triton[®] X 100

Sigma, Deisenhofen

Antibiotika

DMF

N-Lauroylsarkosin

Paraffin-Mineralöl

RNase A aus Rinderpankreas

Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande

pCR-Script™ Cam SK (+) Cloning Kit

pBC™ SK (+) Cloning Kit

Weitere Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt und Serva, Heidelberg bezogen.

2.1.4 Puffer und LösungenGEBS

20 % Glycerin

50 mM EDTA

0,05 % Bromphenolblau

0,5 % N-Lauroylsarkosin

NTE

100 mM NaCl

20 mM Tris-HCl, pH 8,0

10 mM EDTA, pH 8,0

PBS

10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4

140 mM NaCl

20 x SSC, pH 7,0

3 M NaCl

0,3 M Na-Citrat

1 x TBE, pH 8,3

100 mM Tris-HCl

100 mM Borsäure

2,5 mM EDTA

TE (10/1)

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

2.1.5 Kultur von Bakterien

2.1.5.1 Bakterienstämme

- DH5 α *Escherichia coli* für Elektroporation
#536 *Neisseria meningitidis*, Serogruppe C, ET-37 Komplex
#1134 *Neisseria meningitidis*, Serogruppe A, Subgruppe VI
#2375 *Neisseria meningitidis*, Serogruppe C, ET-37 Komplex

Zum *Screening* auf Plasmide wurde ein breites Spektrum von Stämmen verschiedener klonaler Linien aus der Stammsammlung des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg untersucht (siehe hierzu Tabelle A1 im Anhang). Die Klassifizierung der untersuchten Meningokokkenstämme wurde durch Multilokus-Enzymelektrophorese (MLEE) [Caugant *et al.* 1986] bzw. Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) [Maiden *et al.* 1998] vorgenommen. Sequenztypen können auf der MLST-Website des *Wellcome Trust Centre for the Epidemiology of Infectious Disease*, Universität Oxford, eingesehen werden ([http:// www.mlst.net](http://www.mlst.net)).

2.1.5.2 Nährmedien

GC-Agar, pH 7,2

- 1,5 % Proteose-Pepton
0,1 % Stärke
0,4 % Kalium-Phosphat
0,5 % NaCl
1,0 % Bacto-Agar

Luria-Broth-Medium (LB-Medium), pH 7,5

- 1,0 % Bacto-Trypton
0,5 % Hefeextrakt
1,0 % NaCl

LB-Agar

LB-Medium plus 1,5% Bacto-Agar

PPM-Medium, pH 7,8

1,5 % Proteose-Pepton
0,5 % NaCl
0,05 % Stärke
0,4 % KH_2PO_4
0,1 % K_2HPO_4

PPM-Medium, supplementiert

PPM-Medium plus:

0,01 M MgCl_2
0,042 % NaHCO_3
1 % (v/v) PolyVitex

SOB-Medium

2 % Bacto-Trypton
0,5 % Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl

SOC-Medium

SOB-Medium plus:

20 mM Glucose
10 mM MgCl_2
10 mM MgSO_4

2.1.5.3 Kulturbedingungen

Inkubationen wurden bei 37°C durchgeführt, die Inkubation von Neisserien bei einem CO_2 -Partialdruck von 5%. Neisserien wurden über Nacht auf GC-Agar bzw. in PPM-Medium, jeweils mit Polyvitex supplementiert, kultiviert. Kulturen von *Escherichia coli* wurden auf LB-Agar oder in LB-Medium angelegt und ebenfalls über Nacht inkubiert. Bei rekombinanten Bakterienstämmen wurde dem jeweiligen Medium das für die Selektion notwendige Antibiotikum zugesetzt.

2.1.5.4 Zusatz von Antibiotika

Antibiotika wurden den jeweiligen Nährmedien in folgenden Konzentrationen zugesetzt.

Tabelle 2.1: Antibiotika-Konzentrationen in Nährmedien

Antibiotikum	Konzentration im Nährmedium in mg/l	
	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ampicillin	-	100
Chloramphenicol	7	30
Kanamycin	100	30
Tetracyclin	10	12

2.1.6 Plasmidvektoren

pBCTM SK (+) (Stratagene Europe, Amsterdam)

3399 bp, Derivat des pUC19, f1 *ori*, ColE1 *ori*, *lacZ*, Multiple Cloning Site (MCS), flankiert von T3 und T7-RNA-Promotoren, Chloramphenicol-Resistenz.

pCR-ScriptTM Cam SK (+) (Stratagene Europe, Amsterdam)

3399 bp, Derivat des pBCTM SK (+) mit zusätzlicher *SrfI*-Schnittstelle zur Klonierung von PCR-Produkten mit glatten Enden.

2.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von ARK Scientific, Darmstadt, bezogen.

Tabelle 2.2: Oligonukleotide

<i>Walking-Primer</i> auf pJS-A (EMBL Accession Number AJ238491)				
<i>Primer</i>	Sequenz von 5' nach 3'	n ¹	Position auf pJS-A	Tm ²
JS1	TGATATGCACTGCGACTGG	19	991-1009	58°C
JS2	CACGTCATAATCAGCCTGC	19	606-588	58°C
JS3	TGCTCGTTTAGTATCAATCGC	21	1327-1347	60°C
JS4	CTCCGAGGGCGTTTCGCC	17	450-434	60°C
JS5	AGAAACTTTTGGGGCTATGC	21	1612-1632	60°C
JS6	GATAGGAGACTTAGTAGAGCC	21	1450-1430	62°C
JS7	GCAAATTTGAGCCTTTAATGC	21	253-273	58°C

¹ Länge des Oligonukleotids in Basen

² Die Schmelztemperatur Tm wird nach der 4+2-Regel in Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung bestimmt: A/T entsprechen 2°C, G/C 4°C.

JS8	CGATTAACCACCCTCCATAC	21	1776-1756	62°C
JS9	TAAGCGGCTAAAGGCGCG	19	1848-1866	60°C
JS11	TACCATGCAATTCACATCTCT	22	1-22	60°C
JS12	CAACTCCTGTAAGGTTAATAAC	22	1986-1965	60°C
JS13	GACCACAATCAAAAAACGTAAG	22	107-128	60°C
JS14	GGGTTATTGACTGAACAGCA	20	106-87	58°C
JS15	GGAGGATGTCCAGAAAATTTTG	22	299-320	62°C
JS16	CCTTGACTTGTGCAAAGGTTA	21	298-278	60°C
JS17	TTTTGATAGCATCACTTTTATTTTT	25	510-534	60°C
JS18	GTGCATCACTTTATCAAGATTG	22	509-488	60°C
JS19	CAAATCCCCGTGGCTGCG	19	1949-1931	60°C
JS20	TGTGGTTCCTGCTGGGTTAT	20	1950-1969	60°C

<i>Walking-Primer auf pJS-B (EMBL Accession Number AJ277475)</i>				
<i>Primer</i>	Sequenz von 5' nach 3'	n	Position auf pJS-B	Tm
JS33	CGGATCTATATCCATCACGTC	21	498-518	62°C
JS34	CGCGGTTGCAGTTGCATAAC	20	5346 -5327	62°C
JS35	GCGATACCAGACTGAGACAC	20	80-61	62°C
JS36	GTGCCTTCATTTTTTCAATTTCC	23	1257-1279	62°C
JS37	GGGGGTTAACTGCTAGAATG	20	26-45	60°C
JS38	CCCAAATCATCGGCATCCTG	20	4607-4588	62°C
JS39	GGTTGTTATGGATGCAAAGGG	21	1785-1805	62°C
JS40	GGAGCATTGCGGGAAAGAC	19	4067-4049	60°C
JS41	GGGATGACTGGCTTAACCC	19	2340-2358	60°C
JS42	TCATCGTCAAATGAAATTAAGT	23	3558-3536	60°C
JS43	CCGGTTGCGGTTTCCTTTTG	20	558-539	62°C
JS44	GCTCGTACTCTTGAGGTTGA	20	1774-1755	60°C
JS45	GCAAAAAATCCAATAAGAAAATAG	24	4217-4194	60°C
JS46	GGGAGATTTAAATGATTAGGGT	22	2878-2899	60°C
JS47	CTCAATAAAGAGCTTCGTAGAA	22	3269-3248	60°C
JS48	GTAAGGGTTTTGCCTTTTTTCAG	22	2382-2361	62°C
JS49	CTGTTGTAAAAGTGCAAATGGG	22	1400-1421	62°C
JS50	GAAAAAATGCCCGATGTTCCC	21	5254-5274	62°C
JS51	GAAGTTTTGCAAATGATGGTTG	22	4168-4189	60°C
JS52	CATTACGGAAAAGGGTCAATC	21	3221-3241	60°C
JS53	CACTGGCAGGCATTCCCG	18	5722-5739	60°C
JS54	CCGGTATTGAAAAACAGTTCAG	22	220-199	62°C
JS55	TGGATAAAAAGGCGTTCGGG	20	6326-6345	60°C

JS56	GGCGGTTATAGTTCGTGGG	19	6954-6972	60°C
JS57	TGAGCGGAGTGAAGGGGG	18	13-30	60°C
JS58	CGGCATTCCGTTATCGACG	19	6837-6819	62°C

Vektor-Primer für pBC TM SK (+) und pCR-Script TM Cam SK (+)				
Primer	Sequenz von 5' nach 3'	n	Position	Tm
329	ACCATGATTACGCCAAGC	18	813-796	54°C
KB9	AATACGACTCACTATAGGGC	20	617-646	58°C

Oligonukleotide, welche die DNA-Uptake-Sequenz GCCGTCTGAA enthalten			
Name	Sequenz von 5' nach 3'	n	Tm
SacBam1	GGAGCCGTCTGAACCCCGTTTCAGACGGCAG	31	102°C
SacBam2	GATCCTGCCGTCTGAAACCGGGTTCAGACGGCTCCGC	37	122°C

2.1.8 DIG-markierte Sonden für DNA-Nachweisreaktionen

Tabelle 2.3: DIG-markierte Sonden (geordnet nach ihrer Lage auf pJS-B)

Sonde	Größe	Position auf pJS-B (EMBL Accession Nr. AJ277475)
JS 33/44	1277 bp	498 - 1774
JS 48/49	983 bp	1400 - 2382
JS 41/47	930 bp	2340 - 3269
JS 45/52	997 bp	3221 - 4217
JS 34/51	1179 bp	4168 - 5346
JS 43/50	2550 bp	5254 - 558
JS 43/56	850 bp	6954 - 558

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Präparationen

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Meningokokken

Plasmid-DNA aus Meningokokken wurde durch alkalische Extraktion gewonnen. Um auch bei niedriger Ausbeute (insbesondere im Fall des Plasmids pJS-B) ausreichende DNA-Mengen extrahieren zu können, wurde die Methode nach Doly und Birnboim [Birnboim *et al.* 1979] geringfügig modifiziert.

Lösung A, pH 8,0 (Resuspension der Bakterien)

50 mM Glucose

10 mM EDTA

25 mM Tris-HCl

Unmittelbar vor Anwendung mit einer Spatelspitze Lysozym versetzen.

Lösung B (alkalische Lyse)

200 mM NaOH

1 % SDS

Lösung C (Neutralisation sowie Präzipitation von chromosomaler DNA, Proteinen, Membranfragmenten und hochmolekularer RNA)

3 M Kaliumacetat

2 M Essigsäure

Die Meningokokken werden über Nacht auf GC-Agar angezogen. Bakterien von jeweils einer dicht bewachsenen Petrischale werden in 1 ml PBS eingerieben, so dass die Suspension eine OD_{600} von etwa 10 aufweist. Diese wird dann 2 min bei $8000 \times g$ abzentrifugiert (Biofuge 15), der Überstand wird vollständig entfernt. Das Pellet wird in 200 μ l mit Lysozym versetzter Lösung A durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 400 μ l Lösung B wird die Lösung durch Schwenken vorsichtig gemischt. Sie sollte dabei klar und leicht viskös werden. Kräftiges Durchmischen oder Vortexen sind aber zu

vermeiden, da sie zum Scheren der DNA führen können. Nach 5 min Inkubation auf Eis und Hinzufügen von 300 µl Lösung C, wieder unter vorsichtigem Schwenken, fällt ein weißer Niederschlag aus. Nach weiteren 5 min Inkubation auf Eis wird 5 min bei 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dort mit 500 µl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) gemischt, um proteinhaltige Verunreinigungen zu beseitigen. Nach neuerlicher Zentrifugation von 5 min wird die obere Phase abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, wo sie wieder mit 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch versetzt wird. Die untere Phase und die weiße Interphase werden im Phenolabfall entsorgt. Nach erneuter Zentrifugation und Abtrennung der oberen Phase wird diese auf zwei neue Reaktionsgefäße (1,5 ml) verteilt, mit dem doppelten Volumen 100%igem Ethanol (-20°C) gemischt, 30 min bei -70°C gefällt und 15 min bei 4°C in der Kühlzentrifuge (Biofuge 15R) zentrifugiert. Das Sediment wird mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach weiteren 15 min Zentrifugation wird der Alkohol vorsichtig abgegossen, das Pellet in der *Speedvac* getrocknet und in 7,5 µl TE (90 µg/ml RNase) aufgenommen. Menge und Qualität der Plasmid-DNA werden auf einem Agarosegel überprüft.

2.2.1.2 Schnellmethode zur Plasmid-Isolierung aus *Escherichia coli*

Diese Methode wurde zur schnellen Überprüfung einer Vielzahl rekombinanter *Escherichia coli*-Kolonien im Anschluss an eine Transformation eingesetzt. Sie entspricht der alkalischen Extraktion nach Doly und Birnboim [Birnboim *et al.* 1979]. 1,5 ml einer Übernacht-Kultur werden 2 min bei 15000 x g abzentrifugiert (Biofuge 15) und in 100 µl mit Lysozym versetzter Lösung A resuspendiert. 200 µl frisch angesetzte Lösung B werden zugegeben und die Bakteriensuspension geschwenkt, bis sie klar wird. Nach 5 min Inkubation auf Eis, Zugabe von 150 µl Lösung C, bei der ein weißer Niederschlag ausfällt, und weiteren 5 min auf Eis wird die Lösung 5 min bei 15000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird in einem neuem Reaktionsgefäß mit 250 µl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) gemischt und nochmals 5 min zentrifugiert. Die obere Phase wird, wie unter 2.2.1.1 beschrieben, mit 100% Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und abschließend in 20 µl TE (30 µg/ml RNase) aufgenommen. Menge und Qualität der Plasmid-DNA werden auf einem Agarosegel überprüft.

2.2.1.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)

Für Sequenzierungen und präparative Arbeiten ist die Qualität der DNA aus der Schnellpräparation nach Doly und Birnboim nicht ausreichend. Um kleine Mengen reiner DNA zu gewinnen, wurde daher der *QIAprep Spin Miniprep Kit* verwendet. 1-5 ml einer Übernachtkultur des plasmidtragenden Bakterienklons wurden den Angaben des Herstellers entsprechend behandelt.

Der *QIAprep Spin Miniprep Kit* basiert wie die oben beschriebene Schnellmethode auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die Puffer P1 (Resuspensionspuffer), P2 (Lysepuffer) und P3 (Neutralisationspuffer) sind den unter 2.2.1.1 aufgeführten Lösungen A-C vergleichbar. Die DNA wird im Anschluss an die Extraktion an ein Silikagel-Säulchen gebunden, mit dem Puffer PE (beigefügter Waschpuffer) gewaschen und mit destilliertem Wasser oder dem beigefügten Puffer EB eluiert.

2.2.1.4 Präparation hochreiner Plasmid-DNA durch Zentrifugation im CsCl-Gradienten

Plasmid-DNA, die mit der unter 2.2.1.1 und 2.2.1.2 beschriebenen Schnellmethode gewonnen wird, ist in ihrer Qualität für Sequenzierungen nicht ausreichend. Um größere Mengen hochreiner DNA zu gewinnen, wurde die Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Gradienten eingesetzt. Dieses Verfahren beruht auf dem oben beschriebenen Prinzip der alkalischen Lyse unter Verwendung der Lösungen A-C und anschließender Zentrifugation in der Ultrazentrifuge. Für pJS-A wurde das Protokoll mit Erfolg angewandt. Bei pJS-B, welches auch mit der Schnellmethode nur in geringen Mengen isoliert werden konnte, blieb die Ausbeute an Plasmid-DNA unbefriedigend.

700 ml einer Übernachtkultur von Meningokokken in supplementiertem PPM-Medium werden bei 4°C und 3000 UpM in der Kühlzentrifuge RC-5B (Rotor: GS-3) 20 min abzentrifugiert, der Überstand sorgfältig dekantiert. Das Pellet wird in 5 ml mit Lysozym versetzter Lösung A aufgenommen, die Suspension 10 min auf Eis inkubiert. 11 ml Lösung B werden unter Schwenken hinzugegeben, wobei sich die Lösung klären muss. Nach weiteren 10 min auf Eis werden 5,5 ml Lösung C hinzugefügt, ein weißer Niederschlag fällt aus. Es folgen 15 min Inkubation auf Eis, dann 25 min Zentrifugation bei 18000 UpM und 4°C (Kühlzentrifuge RC-5B, Rotor SS34). Der Überstand wird in ein 50 ml-Falcon-Gefäß überführt, dort mit 10 ml

Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (24 : 25 : 1) versetzt und geschüttelt. Nach 10 min Zentrifugation bei 4°C und 5000 UpM in der Omnifuge 2.0 RS wird die obere Phase in ein neues Falcon-Gefäß überführt, Phenolisierung und Zentrifugation wiederholt. Der Überstand wird nun auf zwei 50 ml-Corex-Röhrchen verteilt, mit dem 0,6-fachen Volumen Isopropanol gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei erfolgt die Ausfällung der Plasmid-DNA. Es folgen 30 min Zentrifugation bei 13000 UpM und 4°C in der Kühlzentrifuge RC-5B (Rotor: HB-6). Der Überstand wird dekantiert, das Pellet an der Luft getrocknet und in 10 ml TE gelöst. Jeder Probe werden nun 10,3 g CsCl zugegeben und bei 50°C gelöst. Das Gemisch wird mit Hilfe einer 20 ml-Spritze mit großlumiger Kanüle (19 G) in ein *Quickseal*-Zentrifugengefäß überführt. 600 µl Ethidiumbromidlösung (1%) werden mit einer Tuberkulinspritze vorsichtig dazugegeben. Die *Quickseals* werden sorgfältig austariert, die Gewichts Differenz an der *Research*-Analysenwaage auf weniger als 0,01 g eingestellt. Die *Quickseals* werden versiegelt, der Inhalt vorsichtig durchmischt. Die Zentrifugation erfolgt in der Ultrazentrifuge L7 bei 186000 x g (Rotor 70.1 Ti, 45000 UpM) und 20°C für 36 Stunden. Die Plasmidbande im CsCl-Gradienten färbt sich durch interkaliertes Ethidiumbromid rot. Sie wird im abgedunkelten Raum unter UV-Licht deutlich sichtbar und kann so mit einer Spritze aus dem Röhrchen entnommen werden. Der restliche Inhalt des Röhrchens wird im Ethidiumbromidabfall entsorgt. Die Plasmid-DNA wird nun mit dem gleichen Volumen Isoamylalkohol versetzt, das Gemisch 30 min geschwenkt. Das Ethidiumbromid geht dabei in die alkoholische Phase über und färbt diese rot. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt, bis die DNA-Lösung völlig frei von Ethidiumbromid ist und sich neu zugegebener Isoamylalkohol nicht mehr rot verfärbt. Abschließend erfolgt eine ausgiebige Dialyse der DNA-Lösung gegen TE über drei Tage zur Entfernung des CsCl. 5 l TE Puffer sind täglich zu wechseln.

2.2.1.5 Präparation chromosomaler DNA aus Meningokokken

Die DNA-Präparation über die Zentrifugation im CsCl-Gradienten diente der Gewinnung größerer Mengen hochreiner chromosomaler DNA aus Bakterien und wurde mit Erfolg an Meningokokken angewandt.

Bakterien einer dicht gewachsenen Übernachtskultur auf GC-Agar werden in 10 ml NTE-Lösung suspendiert, eine Spatelspitze Lysozym zugesetzt und das Gemisch 10 min auf Eis inkubiert. 500 µl 20% Triton[®] X 100 werden zugegeben und vorsichtig

durch Schwenken untergemischt. Nach erneuter Inkubation auf Eis von 10 min erfolgt die Zugabe von 1 ml 10% N-Lauroylsarkosin. Während der folgenden 10 min Inkubation bei Raumtemperatur klärt sich die Lösung. Um eine vollständige Zellyse zu gewährleisten, wird sie für eine Stunde bei -70°C tiefgefroren und anschließend bei 50°C aufgetaut. Eine Spatelspitze Proteinase K wird zugegeben und die Lösung für weitere zwei Stunden bei 50°C inkubiert. In der Zwischenzeit werden 10 g CsCl in ein 50 ml Falcon-Gefäß eingewogen. Die mit Proteinase K behandelte DNA-Suspension wird mit dem Salz gemischt. Damit sich das CsCl vollständig löst, kann eine erneute Inkubation bei 50°C notwendig sein. Die klare Lösung wird vollständig mit einer Spritze in ein *Quickseal*-Röhrchen überführt und dort mit 400 µl Ethidiumbromidlösung (1%) versetzt. Die *Quickseals* werden sorgfältig austariert, versiegelt und ihr Inhalt vorsichtig durchmischt. Die Zentrifugation erfolgt in der Ultrazentrifuge L7 bei 186000 x g (Rotor 70.1 Ti, 45000 UpM) und 20°C für 36 Stunden. Die bakterielle DNA bildet im Gleichgewichtsgradienten eine Bande, diese ist durch interkaliertes Ethidiumbromid rot gefärbt und deutlich sichtbar. Sie wird mit einer Spritze aus dem Röhrchen entnommen. Das Ethidiumbromid wird durch mehrmalige Extraktion mit Isoamylalkohol entfernt. Das hochkonzentrierte CsCl wird aus der DNA-Lösung durch dreitägige Dialyse gegen TE entfernt. Es folgt die Konzentrationsbestimmung der extrahierten DNA am Spektralphotometer und im Agarosegel.

2.2.1.6 Präparation chromosomaler DNA aus Meningokokken mit dem *DNeasy Tissue Kit* (QIAGEN)

Mit dem *DNeasy Tissue Kit* kann in wenigen Stunden chromosomale bakterielle DNA gewonnen werden. Qualität und Ausbeute reichen jedoch nicht an die oben beschriebene DNA-Präparation über Zentrifugation im CsCl-Gradienten heran. Eingesetzt wurden Übernachtskulturen von GC-Agar, die in 1 ml PBS suspendiert und anschließend auf eine optische Dichte von 2 bei 600 nm eingestellt wurden. 1 ml der Suspension wurde 2 min bei 8000 x g abzentrifugiert (Biofuge 15) und der Überstand vollständig entfernt. Puffer und Lösungen wurden nach den Angaben des Herstellers zur Extraktion chromosomaler DNA aus gramnegativen Bakterien eingesetzt:

Das Bakterien-Pellet wird zunächst in 180 µl des Puffers ATL gelöst. 20 µl Proteinase K werden zugegeben, die Lösung bei 50°C für 3 h inkubiert und dabei

regelmäßig kräftig durchmischt. 200 µl des Puffers AL werden zugegeben, mit dem Vortexer untergemischt und die Probe 10 min bei 70°C inkubiert. Es folgt die Zugabe von 200 µl reinem Ethanol, das ebenfalls kräftig untergemischt wird. Die DNA wird nun an ein Silikagel-Säulchen gebunden, mit den Puffern AW1 und AW2 gewaschen und schließlich mit 200 µl des Puffers AE eluiert.

2.2.1.7 Phenolisierung und Ethanolfällung von DNA

Proteinhaltige Verunreinigungen von DNA-Präparationen wurden durch Ausschütteln mit Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol-Gemisch beseitigt.

Das Ausgangsvolumen wird mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt und gründlich mit dem doppelten bis dreifachen Volumen Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) vermischt. Nach 2 min Zentrifugation bei 15000 x g (Biofuge 15) wird die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dort mit 6 µl 5 M NaCl versetzt. Das doppelte Volumen 100% Ethanol wird zugegeben und die Lösung 30 min bei -70°C gefällt. Nach 15 min Zentrifugation bei 4°C und 15000 x g (Biofuge 15R) wird das Sediment mit 70% Ethanol gewaschen, dann in der *Speedvac* getrocknet und in ddH₂O oder TE aufgenommen.

2.2.1.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen

Aus Agarosegelen wurde DNA mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) extrahiert. Die gewünschte DNA-Bande wurde zu diesem Zweck unter UV-Licht im Block aus dem Gel ausgeschnitten und nach den Angaben des Herstellers verarbeitet. Das Verfahren beruht auf der selektiven Bindung von DNA an ein Silikagel-Säulchen in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Auf dem selben Prinzip basiert das *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) zur Aufreinigung amplifizierter DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen.

2.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen wurden Messungen mit dem Spektralphotometer bei 260 nm durchgeführt. Eine optische Dichte von 1 bei dieser Wellenlänge (OD₂₆₀) entspricht bei doppelsträngiger DNA 50 µg/ml. Um Verunreinigungen durch Proteine beurteilen zu können, wird zusätzlich die OD₂₈₀ bestimmt. Mit dem Proteingehalt einer DNA-Lösung steigt die OD₂₈₀. Der

Quotient OD_{260} / OD_{280} wird bei wachsender Protein-Verunreinigung kleiner. Er sollte nicht unterhalb von 1,8-2,0 liegen.

Eine weitere Möglichkeit zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben besteht in der Elektrophorese im Agarosegel. Hier kann die DNA-Konzentration im visuellen Vergleich mit definierten Marker-Banden abgeschätzt werden.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer, doppelsträngiger DNA-Fragmente ist von deren Größe abhängig. Der Einschätzung der Fragmentgröße dient der Vergleich mit Größenstandards wie der *Smart-Ladder* oder mit *HindIII* geschnittener DNA des Phagen λ . Um Fragmente unterschiedlicher Größe im Gel auftrennen zu können, wird die Agarosekonzentration entsprechend gewählt. Für Fragmente zwischen 0,8 und 12 kb eignet sich eine Konzentration von 0,8%; für kleinere Fragmente werden höhere Konzentrationen eingesetzt. Zirkuläre Plasmid-DNA wandert im Gegensatz zu linearen Fragmenten nicht innerhalb einer einzigen Bande, sondern in Abhängigkeit von ihrem Vorliegen in der superhelikalen oder in der offenen Form mit unterschiedlicher Geschwindigkeit.

Die jeweilige Agarosemenge wird in 1 x TBE in der Mikrowelle erhitzt und aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst ist. Im Wasserbad wird das flüssige Gel auf etwa 60°C abgekühlt und dann in horizontale Gelschlitten gegossen. DNA-Lösungen, die im Gel aufgetrennt werden sollen, werden zunächst mit GEBS versetzt und neben den Größenstandards auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei Raumtemperatur und 150-200 Volt. Laufpuffer ist 1x TBE. Nach abgeschlossener Elektrophorese wird das Agarosegel in Ethidiumbromidlösung (2 mg/l) gelegt und 10 min gefärbt. Anschließend kann es unter UV-Licht (302 nm) betrachtet werden. DNA-Banden mit interkaliertem Ethidiumbromid leuchten rot auf. Mit dem Gel-Dokumentationssystem werden Fotos des Gels angefertigt.

2.2.4 Klonierungsmethoden

2.2.4.1 Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die enzymatische Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen von NEB und Life Technologies (nur *ClaI*) bezogen. Die Restriktionsenzyme wurden den Angaben der Hersteller entsprechend in den jeweils mitgelieferten Puffern eingesetzt, bei Bedarf wurde dem Reaktionsgemisch BSA (Bovines Serum-Albumin) beigegeben.

Pro µg DNA werden mindestens 1-2 Units Enzym eingesetzt, niemals aber mehr als 1 µl Enzym auf 10 µl Reaktionsansatz, damit das Glycerin der Enzymlösung die Reaktion nicht inhibitorisch beeinträchtigt. Der Reaktionsansatz wird in einem Volumen von 10-30 µl im Heizblock bei 37° mindestens 90 min inkubiert. Bei bestimmten Restriktionsenzymen sind andere Temperaturen für die Reaktion erforderlich, so hat das Enzym *ApaI* sein Wirkungsoptimum bei 25°C. Bei der Spaltung chromosomaler DNA für *Southern-Blots* wird der Reaktionsansatz über Nacht im Brutschrank inkubiert, um eine vollständige Spaltung der großen DNA-Menge von 2-3 µg zu gewährleisten. Die enzymatische Reaktion wird anschließend durch Zugabe von GEBS zum Stillstand gebracht.

2.2.4.2 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren

DNA-Restriktionsfragmente werden zur Transformation von *Escherichia coli* DH5α in linearisierte Vektoren wie pBCTM SK (+) ligiert. Um Religationen des linearisierten Vektors mit sich selbst sowie intermolekulare Reaktionen mit anderen Vektormolekülen zu vermeiden, werden Phosphatgruppen am 5'-Ende des Vektors mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestine phosphatase*, CIP) abgespalten. Durch diese Maßnahme sind Verknüpfungen nur noch zwischen 3'-Enden des Vektors und 5'-Enden des zu inserierenden DNA-Fragments mit vorhandenen Phosphatgruppen möglich. Die CIP des Herstellers NEB ist im mitgelieferten Spezialpuffer sowie in den Puffern 1-4 für Restriktionsreaktionen aktiv. Ein erster Dephosphorylierungsschritt kann darum bereits während der Linearisierung des Vektors durch Restriktionsendonukleasen vorgenommen werden, indem dem Reaktionsgemisch 1 µl CIP hinzugefügt wird. Im Anschluss daran wird das Restriktionsenzym hitzeinaktiviert und das Reaktionsgemisch mit einem weiteren µl CIP 60 min bei 37°C inkubiert. Auch hier gilt zu beachten, dass die

Gesamtzymmenge nicht mehr als 1 µl pro 10 µl Reaktionsgemisch betragen darf, um enzymatische Reaktionen nicht durch den hohen Glyceringehalt im Enzympuffer zu behindern.

2.2.4.3 Auffüllen überhängender 5'-DNA-Enden und Abbauen überhängender 3'-Enden mit T4-DNA-Polymerase zur Generation stumpfendiger DNA-Fragmente

Die Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten in linearisierte Vektoren erfolgt über komplementäre kohäsive (*sticky*) Enden oder durch stumpfendige (*blunt-end*) Ligation. Soll ein im Restriktionsverdau entstandenes DNA-Fragment mit 5'-Überhang stumpfendig in eine Vektorschnittstelle kloniert werden, sind die einzelsträngigen DNA-Abschnitte zunächst aufzufüllen. Beim 3'-Überhang werden einzelsträngige Abschnitte abgespalten. Die T4-DNA-Polymerase bewirkt mit Aktivität als 5'→3'-Polymerase und als 3'→5'-Exonuklease die Überführung beider Arten von Überhängen in stumpfe DNA-Enden.

1 µl T4-DNA-Polymerase wird dem Reaktionsgemisch zugegeben und bei 12°C 20 min inkubiert. Erforderlich sind die Gegenwart aller vier Desoxynukleotide (jeweilige Endkonzentration 100 µM) sowie die Zugabe von BSA (50 µg/ml) und dem mitgelieferten T4-DNA-Polymerasepuffer. Im Anschluss an die Reaktion wird die Polymerase 10 min bei 75°C inaktiviert.

2.2.4.4 Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten in linearisierte Vektoren

DNA-Restriktionsfragmente werden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase in linearisierte und dephosphorylierte Vektoren ligiert. Das Enzym katalysiert die Verknüpfung zwischen einer 3'-Hydroxyl- und einer 5'-Phosphatgruppe zu einer Phosphodiesterbindung. Voraussetzung für diese Reaktion sind kohäsive komplementäre (*sticky-end-Ligation*) oder aber stumpfe (*blunt-end-Ligation*) Enden beider Reaktionspartner.

Die Ligation wird über Nacht bei 16°C in 1 x Ligasepuffer durchgeführt. Sie erfolgt in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl, dem 1 µl (400 U) DNA-Ligase zugefügt wird. Vektor und Insert stehen in einem molaren Verhältnis von 1:3. Der Vektor wird mit ungefähr 50 ng in die Reaktion eingesetzt, das Insert entsprechend dosiert.

2.2.4.5 Ligation von PCR-Produkten in den Vektor pCR-Script™ Cam SK (+)

PCR-Produkte wurden unter anderem auch mit dem pCR-Script™ Cam SK (+) *Cloning-Kit* kloniert. Der Vektor pCR-Script™ Cam SK (+) entspricht dem Plasmidvektor pBC™ SK (+). Seine *Multiple Cloning Site (MCS)* ist modifiziert und durch eine *SrfI*-Schnittstelle erweitert. Für die Klonierung sind stumpfendige PCR-Produkte erforderlich. Das aufgereinigte PCR-Produkt wird darum vor der eigentlichen Klonierungsreaktion mit der mitgelieferten *pfu*-Polymerase behandelt, welche 3'→5' Exonuklease-Aktivität hat und so die Bildung stumpfer Enden katalysiert. Das PCR-Produkt wird auf diese Weise behandelt (*polishing*) und kann nun in den Vektor ligiert werden. Dieser liegt an der *SrfI*-Schnittstelle linearisiert vor. Im Ligationsansatz befinden sich neben dem linearisierten Vektor und dem PCR-Insert der mitgelieferte Reaktionspuffer, rATP und sowohl T4-DNA-Ligase als auch das Restriktionsenzym *SrfI*. Die Ligase katalysiert sowohl die gewünschte Ligation von Vektor und Insert als auch die Religation des Vektors mit sich selbst. Im zweiten Fall entsteht im zirkulär geschlossenen Vektor die intakte *SrfI*-Schnittstelle und kann durch das Restriktionsenzym erneut gespalten werden, steht also für weitere Ligationen zur Verfügung. Wird wunschgemäß das Insert in den Vektor eingebaut, kommt es in der Regel nicht zur Bildung einer *SrfI*-Schnittstelle. Das Reaktionsprodukt bleibt stabil erhalten. Das Gleichgewicht wird so effizient in Richtung der Ligation von Vektor und Insert verschoben.

2.2.5 Transformation von *Escherichia coli* durch Elektroporation

2.2.5.1 Grundlagen

Transformationskompetenz ist die Fähigkeit von Bakterien, freie DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Im Gegensatz zu den natürlich kompetenten Neisserien, die dazu unter normalen Wachstumsbedingungen in der Lage sind, gilt *Escherichia coli* als inkompetent. Um dennoch Fremd-DNA in die Bakterienzelle einbringen zu können, bedient man sich unter anderem der Methode der Elektroporation. Suspendierte *Escherichia coli* (DH5α) werden in einem speziellen Elektroporationsgerät in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen elektrischen Pulsen hoher Feldstärke ausgesetzt. Dabei entstehen kurzzeitig Poren in der Plasmamembran, durch die DNA-Moleküle in die Zelle diffundieren können. Die

Elektroporation zeichnet sich durch eine hohe Transformationseffizienz aus (bis 10^{10} cfu/ μ g DNA).

2.2.5.2 Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli* (DH5a)

100 ml LB-Flüssigmedium werden mit einer einzelnen Bakterien-Kolonie von LB-Agar beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur werden 700 ml LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt, die Suspension anschließend bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Sobald eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht ist, wird die Kultur 10 min auf Eis abgekühlt und dann 15 min bei 2700 x g und 4°C (RC-5B, Rotor GS-3, 4000 UpM) zentrifugiert. Die pelletierten Bakterien werden in 500 ml eiskaltem ddH₂O aufgenommen, wie oben abzentrifugiert, in 200 ml ddH₂O resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Das Pellet wird nun in 20 ml kaltem 10% Glycerin gelöst, erneut wie oben zentrifugiert und schließlich in 1,5 ml kaltem 10% Glycerin aufgenommen. Portionen von 40 μ l werden nach kurzer Inkubation auf Eis in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.5.3 Vorbereitung von DNA-Proben für die Elektroporation

Ligationsansätze müssen vor der Elektroporation in ddH₂O überführt werden, da die Gegenwart von Salz-Ionen im Hochspannungsfeld zu Kurzschlüssen führen würde. Sie werden zu diesem Zweck mit ddH₂O auf 100 μ l aufgefüllt, mit 250 μ l Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) versetzt, kräftig durchmischt und zur Phasentrennung 2 min bei 15000 x g in der Biofuge 15 zentrifugiert. Die Phenolphase wird anschließend erneut mit 50 μ l ddH₂O versetzt, um darin gelöste DNA möglichst quantitativ zu extrahieren. Die beiden wässrigen Phasen werden vereint, mit 150 μ l Diethylether gemischt und 5 min bei 15000 x g in der Biofuge 15 zentrifugiert. Die obere Phase wird daraufhin vollständig entfernt und verworfen, die untere wässrige Phase 15 min bei 37°C im Heizblock inkubiert, um Etherreste zu verflüchtigen. Der DNA-Lösung werden jeweils 15 μ l 5 M NaCl und 15 μ l Acrylamid-Lösung (200 μ g/ml) zugesetzt. Acrylamid dient als Träger für DNA-Moleküle und somit als Fällhilfe. Nach Zugabe von 540 μ l eiskaltem 100% Ethanol folgt eine 30minütige Fällung der DNA bei -70°C. Es schließt sich eine Zentrifugation von 15 min in der Biofuge 15R bei 4°C und 15000 x g an. Das Sediment wird mit 70% Ethanol gewaschen, in der *Speedvac* getrocknet und anschließend in 5 μ l ddH₂O

aufgenommen. Der nun salzfreie Ligationsansatz wird entweder sofort für die Elektroporation eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5.4 Durchführung der Elektroporation

Elektroporationen wurden mit den Geräten *Gene Pulser*TM und *Pulse Controller*TM (BioRad, München) durchgeführt. Folgende Einstellungen sind vorzunehmen:

Widerstand: 400 Ω
Kapazität: 25 μFD
Spannung: 2,5 kV
Zeit: automatisch

40 μl elektrokompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf 2 μl der vorbereiteten DNA-Lösung gegeben. Die Bakteriensuspension wird 2 min auf Eis inkubiert und luftblasenfrei in eine saubere und vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm) pipettiert. Im Elektroporationsgerät wird die Mischung durch Knopfdruck elektrischen Pulsen ausgesetzt, die angezeigte Zeitkonstante notiert. Sie sollte zwischen 8,6 und 9,2 liegen. Die elektroporierten Bakterien werden sofort in 1 ml SOC-Medium überführt und darin 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Der Elektroporationsansatz wird dann in Portionen von 10, 100 und 890 μl auf LB-Agar ausplattiert, der das zur Selektion transformierter Klone notwendige Antibiotikum enthält, und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.5.5 Selektion transformierter Klone mit rekombinanten DNA-Molekülen

Trotz Dephosphorylierung linearisierter Vektoren am 5'-Ende (siehe Abschnitt 2.2.4.2) bleibt es nicht aus, dass ein Teil der Vektormoleküle im Ligationsansatz mit sich selbst ligiert. Bakterien, die mit religierten Vektoren transformiert werden, wachsen auf dem entsprechenden Selektivmedium, enthalten aber nicht das gewünschte Insert. Es gilt daher, sie von Kolonien mit rekombinantem DNA-Fragment zu unterscheiden. Dazu bedient man sich einer Farbreaktion, in der das Enzym β -Galaktosidase das farblose Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid (Xgal) in ein blaues Produkt umwandelt. Für die effiziente Expression des *lacZ*-Gens, das die β -Galaktosidase kodiert, wird Isopropylthiogalaktosid (IPTG) als Induktor benötigt. Der aktive Teil des *lacZ*-Gens, das α -Peptid, ist in den im Rahmen

dieser Arbeit eingesetzten Vektoren direkt anschließend an die Multiple-Cloning-Site eingebaut. Bakterien, die einen solchen Vektor aufgenommen haben, färben sich auf Nährböden mit Xgal und IPTG blau. Insetierte DNA-Fragmente im Bereich der Multiple-Cloning-Site unterbrechen die Expression des α -Peptids. Somit bleiben Bakterien mit einem Insert im Vektor weiß und können leicht von blauen Kolonien, transformiert mit dem reinen Vektor, unterschieden werden.

Transformierte *Escherichia coli* werden auf LB-Agar ausplattiert, auf dem zuvor 50 μ l der *Blue and White* Lösung mit Xgal und dem Induktor IPTG ausgestrichen wurde. Der 50 μ l-Ansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

- 36 μ l Dimethylformamid (DMF) als Lösungsmittel
- 6 μ l IPTG, 1M in H₂O
- 8 μ l Xgal, 250 mg/ml in DMF

2.2.6 Automatisierte DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen erfolgten mit einem automatischen Sequenzierungsgerät nach der Didesoxy-Methode.

Die DNA-Probe wird hierbei zunächst denaturiert. Ausgehend von einer bekannten Startersequenz wird durch die Zugabe eines Sequenzierungs-Primers (Oligonukleotid von ungefähr 20 bp), eines Nukleotidgemisches und der *Taq*-DNA-Polymerase die Synthese eines komplementären Stranges initiiert. Der Reaktionsansatz enthält neben den vier Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) auch geringe Mengen 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs), welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Diese werden ebenfalls von der Polymerase als Substrate verwendet und in den wachsenden DNA-Strang eingebaut. Sie machen eine weitere Kettenverlängerung unmöglich, weil ihnen die Phosphatgruppe am 5'-Ende fehlt. Da der Einbau von ddNTPs in den wachsenden DNA-Strang zufällig erfolgt, entstehen Kettenabbrüche an unterschiedlichen Stellen. Es resultiert eine Mischung partiell doppelsträngiger DNA-Moleküle, die alle das gleiche 5'-Ende besitzen, am 3'-Ende aber in der Länge variieren und durch den jeweils basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind.

Sequenzieransatz

0,4 µg Plasmid-DNA oder
0,1 µg PCR-Produkt
5 pmol *Primer*
2 µl Sequenziermix
ddH₂O ad 10 µl

Die *Taq-Cycle*-DNA-Sequenzierung erfolgt in mehreren Schritten

- Denaturierung: 10 sec bei 96°C
- *Primer*-Hybridisierung: 5 sec, Temperatur entsprechend der nach der 4+2-Regel berechneten *Primer*-Schmelztemperatur minus 5°C
- DNA-Synthese mit gleichzeitigem Kettenabbruch und Fluoreszenzmarkierung

Im Anschluss an die Markierungsreaktion werden die Reaktionsansätze gefällt, in Probenpuffer aufgenommen und für 2 min bei 90°C denaturiert. Die Reaktionsprodukte werden dann in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Das basenspezifisch emittierte Fluoreszenzlicht der eingebauten Didesoxynukleotide kann mit einem in das Sequenziergerät integrierten Laserscanner detektiert werden. Die Basenabfolge wird so ermittelt.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.7.1 Grundlagen der PCR

Die PCR ist ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäureabschnitten. Sie macht sich die Eigenschaft der hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* zunutze, DNA entlang eines Matrizenstranges zu synthetisieren. Oligonukleotide, sogenannte *Primer*, von ca. 20 Nukleotiden Länge binden an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang (*Annealing*). Die *Primer* werden dann an ihren freien 3'-OH-Enden zum Matrizenstrang komplementär verlängert (*Extension*). Denaturiert man anschließend die neu synthetisierte DNA durch eine Temperaturerhöhung in Einzelstränge, so können neue *Primer*-Moleküle binden und der Prozess wiederholt werden. Zwei PCR-*Primer* werden so gewählt, dass sie antiparallel zueinander an beiden Strängen der DNA ansetzen. Man erhält

so mit jedem Zyklus eine Verdopplung des DNA-Abschnittes zwischen den *Primern*. Die PCR führt also zu einer exponentiellen Amplifikation von DNA. Sie wird im Thermocycler durchgeführt. *Annealing*-Temperatur und Extensions-Zeit müssen abhängig von den verwendeten *Primern* und der Länge des zu amplifizierenden Abschnittes gewählt werden. Die *Annealing*-Temperatur wird auf 4°C unterhalb der nach der 2+4-Regel berechneten (2°C pro AT-bp, 4°C pro GC-bp) Schmelztemperatur eingestellt. Die Extensions-Zeit sollte pro 1000 einzubauende Nukleotide 1 min betragen.

Reaktionsablauf im Thermocycler

1. Denaturierung 10 min bei 94°C
2. *Annealing* 60 sec bei der *Annealing*-Temperatur
3. Extension ... sec bei 72°C (1 min pro 1000 Nukleotide)
4. Denaturierung 60 sec bei 94°C
5. *Annealing* 60 sec bei der *Annealing*-Temperatur
6. Extension 10 min bei 72°C

Die Schritte 2-4 werden 36 mal durchlaufen.

Die Überprüfung von Qualität und Quantität der PCR-Produkte erfolgt auf einem Agarosegel. Sollen amplifizierte DNA-Fragmente zur Sequenzierung, als Klonierungsfragmente oder als Hybridisierungssonden eingesetzt werden, so sind sie von *Primern* und Enzymresten zu trennen. Hierzu dient die Aufreinigung mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (siehe Abschnitt 2.2.1.8).

2.2.7.2 PCR mit der AmpliTaq[®]DNA-Polymerase (Perkin Elmer)

Tabelle 2.4 Reaktionsansatz

Reagenz	Eingesetzte Menge im 100 µl-Ansatz	Endkonzentration in 100 µl
Ampli Taq [®] DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	2 units
10 x Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3)	10 µl	1 x
dNTP-Mix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	10 µl	jeweils 200 µM
MgCl ₂ (25 mM)	6 µl	1,5 mM
Primer A (20 µM)	1 µl	0,2 µM
Primer B (20 µM)	1 µl	0,2 µM
Template	variabel	10 ng
ddH ₂ O	ad 100 µl	

Zum Schutz vor Verdunstung wird der Reaktionsansatz mit Mineralöl überschichtet.

2.2.8 DNA-Hybridisierungen

2.2.8.1 Grundlagen

Die komplementären Basen der DNA, A und T sowie C und G, sind in doppelsträngiger DNA über Wasserstoffbrücken spezifisch miteinander verbunden. Ein Gemisch aus komplementären Einzelsträngen kann unter Ausbildung dieser Bindungen zu Doppelsträngen hybridisieren. Dieses Prinzip liegt DNA-Hybridisierungsverfahren zugrunde. Hier erfolgt die Detektion von DNA-Target-Molekülen über die sequenzspezifische Anlagerung von komplementären, markierten DNA-Sonden. Durch die hohe Sensitivität und Spezifität der Hybridisierung ist es möglich, DNA-Moleküle in sehr geringer Konzentration nachzuweisen. Für die verschiedenen Hybridisierungsverfahren wird die DNA entweder aus Zellen isoliert und aufgereinigt (*Southern-Blot*) oder direkt in Zellmaterial nachgewiesen (*Colony-Blot*).

2.2.8.2 Markierung spezifischer DNA-Sonden mit Digoxigenin

Zur nicht-radioaktiven Markierung von DNA-Sonden wird Digoxigenin (DIG) eingesetzt. Die Reaktion wird mit dem *DIG-DNA Labeling Kit* nach dem *Random-Priming*-Verfahren durchgeführt. Doppelstrang-DNA wird zunächst denaturiert und

dann mit einem Gemisch von zufälligen Hexanukleotiden versetzt. Aufgrund der Sequenzvielfalt dieser *Primer* kann die Hybridisierung an jeder beliebigen Target-Stelle erfolgen. Durch das Klenow-Enzym werden die Hexanukleotide anschließend matrizenabhängig verlängert, wobei ein Teil des einzubauenden dTTP durch DIG-markiertes DIG-11-dUTP ersetzt ist.

Folgende Reagenzien sind Bestandteil des *DIG-DNA Labeling Kit*.

- 10 x Hexanukleotidgemisch
- 10 x dNTP-Markierungsgemisch
 - 1 mM dATP
 - 1 mM dCTP
 - 1 mM dGTO
 - 0,65 mM dTTP
 - 0,35 mM DIG-11-dUTP
- Klenow-Enzym (2 U/μl)

Pro Standardreaktion können 10 ng bis 3 μg lineare DNA markiert werden. Die DNA-Probe wird zunächst in einem Volumen von 15 μl durch zehnmütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert. Durch anschließendes schnelles Abkühlen im Eisbad wird ihre Rehybridisierung verhindert. Nach Zugabe von jeweils 2 μl Hexanukleotid- und dNTP-Markierungsgemisch sowie 1 μl Klenow-Enzym wird die Mischung über Nacht bei 37°C inkubiert, DIG-11-UTP wird dabei in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Um die Reaktion zu unterbrechen, wird der Ansatz mit 2 μl EDTA (0,2 M, pH 8,0) gemischt. Die DNA wird anschließend durch Zugabe von 3 μl 3 M Na-Acetat und 75 μl eiskaltem 100% Ethanol 30 min bei -70°C gefällt und 30 min bei 4°C und 15000 x g in der Biofuge 15R zentrifugiert. Das Sediment wird mit 70% Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 50 μl TE aufgenommen. Um die Ausbeute der Markierungsreaktion zu quantifizieren, wird von der Sonde eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten angelegt und als *Dot-Blot* neben definierten Mengen einer Kontroll-DNA auf eine Nylonmembran aufgetropft. Die Signalintensität von Sonde und Kontroll-DNA wird nach dem DIG-Nachweis mit CSPD[®] (s.u.) visuell gegeneinander abgeschätzt. Die DIG-markierte DNA wird bei -20°C aufbewahrt und kann bis zu sechsmal verwendet werden.

2.2.8.3 Southern-Blot

Im *Southern-Blot*-Verfahren wird durch Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran transferiert.

2 µg chromosomale DNA werden mit der entsprechenden Endonuklease bei 37°C über Nacht inkubiert, um eine möglichst vollständige Spaltung zu gewährleisten. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in einem 0,8%igen Agarosegel neben den DIG-markierten DNA-Größenstandards II und III (Roche). Durch 20minütige Inkubation des Gels in 0,25 M HCl wird die DNA depuriniert (die Effizienz des Transfers wird durch diese partielle Abspaltung von Purinen wesentlich erhöht). Bei der anschließenden Denaturierung durch 20minütige Inkubation in 0,4 M NaOH kommt es zur Spaltung der apurinischen Stellen des DNA-Rückgrats, also zu einer Fragmentierung der DNA. Auch durch diesen Schritt wird der DNA-Transfer verbessert. Das eigentliche *Blotting*, die Übertragung der DNA aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran, findet als Kapillar-Transfer statt. Im sogenannten *Transfer-Sandwich* werden Gel und Membran auf einer dicken Schicht von Papiertüchern und Filtern angeordnet, mit einer weiteren Lage von mit 0,4 M NaOH durchtränkten Filtern überschichtet und unter einer Glasplatte mit einem Gewicht von 2 kg beschwert. Die Nukleinsäuren werden nun innerhalb von 2,5 h bei Raumtemperatur durch Kapillarkräfte auf die Membran transferiert, indem die Flüssigkeit durch Gel und Membran in die Papiertücher gesaugt wird. Danach wird die Membran zweimal 10 min in 2x SSC gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die DNA wird durch UV-Vernetzung (100 mJ) auf die Membran fixiert.

2.2.8.4 Colony-Blot und Dot-Blot

Der *Colony-Blot* ist als *Screening*-Verfahren besonders geeignet, eine Vielzahl von Kolonien auf ein bestimmtes DNA-Fragment zu untersuchen. Bakterien-Kolonien werden hier im Abklatschverfahren von der Agarplatte direkt auf den Nylon-Filter übertragen, die DNA erst im Anschluss, also auf der Membran selbst, isoliert und fixiert. Folgende Lösungen werden eingesetzt:

10 % SDS

2 x SSPE

Lösung 1

0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

Lösung 2

1,5 M NaCl

0,5 M Tris-HCl pH 7,5

Lösung 3

5 x SSC

0,5 % SDS

1 mM EDTA

Auf Übernachtkulturen von transformierten Bakterien auf LB-Agar werden amphotere Nylon-Membranen in der Größe der Petrischalen gelegt, um Replika der Kolonien abzuziehen. Wichtig ist, dass Platten und Membran-Abzüge dabei exakt markiert werden, um später positive Kolonien eindeutig identifizieren zu können. Die Agarplatten werden anschließend bei Raumtemperatur inkubiert, damit die Kolonien nachwachsen können. In einer Variante des *Colony-Blots*, dem *Dot-Blot-Verfahren*, werden 2 x 10 µl einer Suspension aus abgetöteten Bakterien ($OD_{600} = 10$) auf die Nylonmembran aufgetropft. Nachdem die Membranen an der Luft getrocknet sind, erfolgt die Lyse der Bakterien durch Auflegen der Membran für 3 min auf ein mit 10% SDS getränktes, dickes Filterpapier. Die Kolonien müssen dabei dem Filter abgewandt liegen. 5 min Inkubation auf einem Filter mit Lösung 1 führen zur Denaturierung der freigesetzten DNA, 5 min in Lösung 2 zur Neutralisierung. Die Nylonmembranen werden anschließend 5 min auf mit 2 x SSPE getränktem Filterpapier gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wird durch UV-Vernetzung (100 mJ) auf die Membran fixiert. Die Membranen werden nun unter Schütteln bei 57°C für 20 min in Lösung 3 inkubiert und im Anschluss mit Papiertaschentüchern gründlich abgewischt. Hierbei werden Zellreste entfernt, um unspezifischen Reaktionen vorzubeugen. Die Membranen werden bei Raumtemperatur getrocknet und einer weiteren UV-Vernetzung unterzogen. Die Hybridisierung kann sich nun anschließen.

2.2.8.5 Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden

Auf Nylon-Membranen immobilisierte DNA-Fragmente werden über Nacht mit einer Lösung inkubiert, die eine für die Zielsequenz spezifische DIG-markierte Sonde enthält. Diese Sonde hybridisiert im Verlauf der Inkubation mit der komplementären Zielsequenz. Unspezifisch adsorbierte Sonden werden nach Beendigung der Inkubation unter Einhaltung stringenter Bedingungen abgewaschen.

High SDS-Hybridisierungspuffer

50 %	Formamid, deionisiert
7 %	SDS
2 %	Blockierungsreagenz
0,1 %	N-Lauroylsarkosin
50 mM	Na-Phosphat, pH 7,0
5 x	SSC

Die auf Nylonmembranen durch UV-Vernetzung fixierte DNA wird für 30-60 min bei 42°C in 10 ml Prähybridisierungslösung (*high* SDS-Puffer) im Hybridisierungssofen inkubiert, um freie Bindungsstellen der Membranen abzusättigen. Zur eigentlichen Hybridisierung wird die Vorhybridisierungslösung durch 10 ml *high* SDS-Puffer ersetzt, der ca. 100 nmol der hitzedenaturierten DIG-markierten DNA-Sonde enthält. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 42°C. Es folgen zwei 5minütige niedrigstringente Waschschrte in 2 x SSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur und zwei hochstringente Waschungen in 0,1 x SSC, 0,1% SDS bei 68°C. Der immunologische Nachweis der hybridisierten DIG-markierten Sonde schließt sich direkt an.

2.2.8.6 Immunologischer Nachweis von Digoxigenin mit CSPD[®]

DIG-markierte DNA-Sonden, die mit einer spezifischen Zielsequenz hybridisiert haben, werden mit Hilfe des *DIG Luminescent Detection Kit* (Roche) nachgewiesen. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran werden zunächst blockiert. Anschließend erfolgt die spezifische Detektion DIG-markierter DNA durch einen hochspezifischen Antikörper gegen Digoxigenin. Dieser ist kovalent mit einem Reporterenzym, der Alkalischen Phosphatase (AP) verbunden. Die AP katalysiert die Dephosphorylierung des Chemilumineszenz-Substrates CSPD[®] unter

Lichtemission mit einem Maximum bei 477 nm, detektierbar durch einen Röntgenfilm. Die Filmexpositionszeit variiert mit der Stärke der Lichtemission. Das Chemilumineszenzsignal erreicht sein Maximum sechs Stunden nach Zugabe des Substrates und bleibt mehrere Tage auf der Membran erhalten. Mehrfache Filmexpositionen sind daher möglich. Folgende Reagenzien kommen zum Einsatz:

Maleinsäurepuffer

0,1 M Maleinsäure, pH 7,5

0,15 M NaCl

Waschpuffer

Maleinsäurepuffer mit 0,3% Tween[®]20

Blockierungslösung

1% Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer

Nachweispuffer

0,1 M Tris-HCl, pH 9,5

0,1 M NaCl

Nach der Hybridisierung mit DIG-markierter Sonde und stringentem Waschen wird die Membran kurz im Waschpuffer und anschließend für 30 min in der Blockierungslösung schüttelnd inkubiert. Es folgen weitere 30 min Inkubation in Blockierungslösung, welche den Anti-DIG-AP-Antikörper 1:10000 verdünnt enthält. Die Membran wird anschließend 2 x 15 min mit dem Waschpuffer geschüttelt, dann kurz im Nachweispuffer und 5 min mit der CSPD[®]-Lösung (im Nachweispuffer 1:100 verdünnt) inkubiert. Abschließend wird die Membran in Frischhaltefolie gewickelt, 15 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und unter Ausschluss von Tageslicht bei Raumtemperatur auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Die Expositionszeit beträgt zunächst etwa 20 min, abhängig vom Ergebnis können mehrfache Filmexpositionen unterschiedlicher Zeitdauer durchgeführt werden.

2.2.8.7 Nylon-Stripping

Ein DNA-*Blot* kann nach erfolgter Hybridisierung und Nachweisreaktion von der Sonde gereinigt und in Hybridisierungen mit weiteren Sonden eingesetzt werden. Zum sogenannten *Stripping* werden Nylonmembranen zweimal für 15 min bei 37°C in 0,2 M NaOH, 0,1% SDS schüttelnd inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur in 2 x SSC gewaschen. Bereits benutzte *Blots* dürfen nicht austrocknen und werden deshalb in 2 x SSC gelagert.

2.2.9 Sequenz- und Stammanalysen

Die ermittelten DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit der *Lasergene-Sequenzanalyse-Software* (Dnastar, Madison, USA) analysiert. Sequenzvergleiche erfolgten mit der *Clustal V-Methode* des *MegAlign*-Programms, Vergleiche mit der GenBank und SWISSPROT-Datenbank über den Server des *National Center for Biotechnology Information* (Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Sequenzvergleiche mit der DNA-Sequenz des Serogruppe A Stammes Z2491 wurden über den BLAST-Server des Meningokokkengenom-Sequenzierungsprojektes am *Sanger Center* (Universität Cambridge, UK, http://www.sanger.ac.uk/Projects/N_meningitidis) durchgeführt, Vergleiche mit dem Serogruppe B Stamm MC58 über das *Institute for Genomic Research* (Rockville, USA, <http://www.tigr.org>).

3 ERGEBNISSE

3.1 Plasmid-DNA in verschiedenen klonalen Linien von *Neisseria meningitidis*

Im Zentrum dieser Arbeit stand die Untersuchung von Plasmid-DNA aus *Neisseria meningitidis*. Plasmid-Verteilungsmuster in verschiedenen klonalen Gruppierungen wurden bestimmt. Anschließend wurden die Plasmide pJS-A und pJS-B, welche jeweils nur in bestimmten klonalen Linien identifiziert werden konnten, im Detail analysiert.

Zunächst wurden umfangreiche Plasmidpräparationen durchgeführt. Aufgrund der niedrigen Ausbeute bei der Präparation der meisten gefundenen Plasmide war eine Modifikation der Methode zur Plasmidpräparation durch alkalische Lyse nach Birnboim und Doly erforderlich [Birnboim *et al.* 1979] (siehe Abschnitt 2.2.1.1), um Plasmid-Mengen zu gewinnen, welche im Agarosegel darstellbar waren. Insgesamt 128 Vertreter verschiedener klonaler Linien und Angehörige der Serogruppen A, B, C, W-135 und Y, isoliert in unterschiedlichen Ländern, wurden dem Plasmid-Screening unterzogen (Tabelle 3.1. und Tabelle A1 im Anhang). Hauptsächlich gingen Stämme hypervirulenter Linien in diese Zahl ein, welche im Zusammenhang mit Ausbrüchen von Erkrankten und gesunden Kontaktpersonen isoliert wurden, insbesondere Angehörige des ET-37 Komplexes (einschließlich ET-15), des Cluster A4 und des ET-5 Komplexes. Vertreter der Linie 3 wurden nicht untersucht, und nur einzelne Angehörige der hypervirulenten Subgruppen von Serogruppe A Meningokokken (Subgruppe I, III, IV-1 und V) konnten in die Studie einbezogen werden. Exemplarisch wurden auch einzelne Stämme der folgenden apathogenen Neisserien-Arten auf ihren Plasmid-Gehalt untersucht: *Neisseria cinerea*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria sicca* und *Neisseria subflava*.

Aus 66% der 128 untersuchten Stämme konnten Plasmide isoliert werden. Da Vertreter einzelner klonaler Linien (insbesondere des ET-37 Komplexes), welche mit großer Regelmäßigkeit Plasmide enthalten, überrepräsentiert waren, ist der tatsächliche Prozentsatz an Plasmidträgern in der Gesamtheit der Meningokokken jedoch niedriger als 66% anzusetzen. Die Verteilung von Plasmiden innerhalb des genetischen Spektrums der Meningokokken erwies sich als klonal gebunden (Tabelle 3.1).

Das Plasmid pJS-A konnte nur aus Serogruppe A Stämmen der Subgruppe VI isoliert werden. Es war in vier von 14 durch Plasmid-Präparation untersuchten Subgruppe VI Stämmen enthalten. Es handelte sich bei den Plasmid-Trägern um Stämme aus der ehemaligen DDR, welche in den 80er-Jahren isoliert wurden, sowie um ein Isolat aus der Bundesrepublik aus dem Jahr 1998. Aus einem weiteren Stamm der Subgruppe VI wurde ein Plasmid isoliert, das ein eigenes elektrophoretisches Laufverhalten im Agarosegel zeigte, also nicht mit pJS-A identisch war. Es wurde nicht näher charakterisiert.

Das Plasmid pJS-B wurde ausschließlich im ET-37 Komplex und dem verwandten *Cluster A4* gefunden, dort aber mit großer Regelmäßigkeit. Von 70 untersuchten ET-37 Stämmen gehörten 30 dem ET-15 Klon an. Alle ET-15 Stämme und insgesamt 91% der ET-37 Stämme trugen pJS-B. Das Plasmid konnte aus 67% der zwölf untersuchten *Cluster A4* Stämme isoliert werden.

Aus einem ET-37 Stamm (Stamm #2120 der Stammsammlung des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg [Vogel *et al.* 1998]) wurde ein Plasmid isoliert, welches in der Gelelektrophorese ein individuelles Laufverhalten aufwies und nicht mit DIG-markierten Sonden aus pJS-B-DNA hybridisierte. Es wurde nicht näher charakterisiert.

In den acht untersuchten Stämmen des ET-5 Komplexes wurden keine Plasmide gefunden. Aus 25% der 24 untersuchten Stämme verschiedener klonaler Gruppierungen außerhalb von ET-37 Komplex, *Cluster A4*, ET-5 Komplex und Subgruppe VI wurden Plasmide isoliert. Diese sind weder mit pJS-A, noch mit pJS-B identisch. Es handelt sich offenbar um verschiedenartige Plasmide, die sich in ihrem elektrophoretischen Laufverhalten unterscheiden. Sie wurden nicht näher charakterisiert. Gleiches gilt für die Plasmide aus apathogenen Neisserien-Arten: Aus drei von acht untersuchten Stämmen konnte Plasmid-DNA isoliert werden.

Tabelle 3.1 Plasmid-Screening im Überblick. In 84 von 128 untersuchten Stämmen verschiedener klonaler Linien wurden Plasmide gefunden, entsprechend einer Rate von 66% Plasmidträgern. Bei den apathogenen Neisserien wurden aus 3 von 8 untersuchten Stämmen Plasmide isoliert (38% Prozent Plasmidträger).

Klonale Linie	N ³	Serogruppen	Plasmidträger
ET-37 Komplex	70	B, C, W-135, Y	91% (n=64) pJS-B 7% (n=5) kein Plasmid 1% (n=1) anderes Plasmid als pJS-B
ET-15 Klon	30	C	100% (n=30) pJS-B
Cluster A4	12	B, C	67% (n=8) pJS-B
Subgruppe VI	14	A, C	29% (n=4) pJS-A 7% (n=1) anderes Plasmid als pJS-A
ET-5 Komplex	8	B	0% (n=0)
Andere	24	A, B, C, W-135, Y	25% (n=6) verschiedene Plasmide
Apathogene Neisserien	8		38% (n=3) verschiedene Plasmide

3.2 Das Plasmid pJS-A

Im Rahmen der *Screening*-Untersuchungen fiel ein 1,986 kb großes Plasmid auf, welches ausschließlich in einigen Stämmen der Subgruppe VI zu finden war (Abbildung 3.1). Es zeichnete sich im Vergleich zu den anderen isolierten Plasmiden durch eine geringere Größe aus, insbesondere aber durch eine deutlich bessere Ausbeute in der Plasmidpräparation, wahrscheinlich bedingt durch eine höhere Kopienzahl. Das Plasmid wurde pJS-A genannt und soll in diesem Kapitel ausführlich besprochen werden.

³ N = Anzahl der untersuchten Stämme einer klonalen Gruppierung

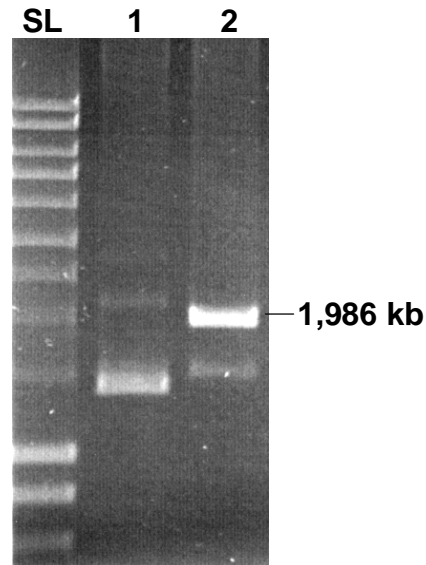


Abbildung 3.1: Plasmidpräparation des Plasmids pJS-A aus dem Stamm #1134 durch alkalische Lyse. (SL) *Smart Ladder* (DNA-Größenstandard); (1) Natives Plasmid; (2) *HincII*-Verdau mit charakteristischer Plasmidbande bei 1,986 kb

3.2.1 pJS-A in Stämmen der Subgruppe VI, Assoziation mit IS1301

Aus dem Stamm #1134, einem Serogruppe A Stamm der Subgruppe VI aus der Stammsammlung des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg (isoliert 1985 in der damaligen DDR, originale Stammbezeichnung: 323/85 [Grahlow *et al.* 1990]), wurde das kleine Plasmid pJS-A erstmals isoliert. Es wurde durch Plasmidpräparationen auch in weiteren Stämmen der Subgruppe VI nachgewiesen (Tabellen 3.1 und A1). Aus vier von 14 untersuchten Stämmen konnte pJS-A isoliert werden. DNA von weiteren Subgruppe VI Stämmen wurde von Dominique Caugant, National Institute of Public Health, Oslo, zur Verfügung gestellt und wurde mit den Plasmid-*Primern* JS11 und JS12 auf die Präsenz von pJS-A überprüft. Die meisten Träger von pJS-A wurden in den 80er-Jahren in der ehemaligen DDR isoliert. Das jüngste Isolat, der Stamm #2599 (Stammsammlung des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg), stammt aus dem Jahr 1998 aus der Bundesrepublik Deutschland.

Für einen Teil der untersuchten Subgruppe VI Stämme war bekannt, dass sie das Insertionselement IS1301 enthalten. Subgruppe VI Stämme sind, von drei schottischen Isolaten anderer Klonalität abgesehen, die einzigen Vertreter von Serogruppe A Meningokokken, die als Träger des Insertionselementes IS1301 beschrieben wurden [Hilse *et al.* 2000].

17 Subgruppe VI Stämme wurden mit spezifischen PCRs auf pJS-A und IS1301 untersucht⁴ (Tabelle 3.2). Es handelte sich ausschließlich um Stämme aus den 80er-Jahren, isoliert in damaligen Ostblockstaaten. Acht Stämme aus den Jahren 1985 und 1986, isoliert in der DDR, waren für beide Merkmale positiv. Sieben Stämme aus der Tschechoslowakei trugen weder pJSA, noch IS1301. Ein Stamm aus der Sowjetunion trug ausschließlich pJS-A, ein anderer ausschließlich IS1301 (jeweils ohne das andere Merkmal). In den 80er-Jahren fand also in der damaligen DDR eine klonale Expansion von Subgruppe VI Stämmen mit den Merkmalen IS1301 und pJS-A statt.

Tabelle 3.2 Verteilung von pJS-A und IS1301 in 17 Stämmen der Subgruppe VI

pJS-A	IS1301	n	Länder (Jahre)
+	+	8	ehem. DDR (1985/86)
+	-	1	ehem. UdSSR
-	+	1	ehem. UdSSR
-	-	7	ehem. Tschechoslowakei (1980-85)

3.2.2 Informationen zu Sequenz und Leserastern

3.2.2.1 Klonierung und Sequenzierung von pJS-A

Das Plasmid pJS-A ist mit einer Größe von 1,986 kb vergleichsweise klein. Die Klonierung des gesamten Plasmids in den Plasmidvektor pBCTM SK (+) bereitete daher keine Schwierigkeiten. Plasmid-DNA wurde zunächst mit gängigen Restriktionsenzymen inkubiert. Dabei zeigte sich, dass das Enzym *HincII* pJS-A genau einmal schnitt (an Position 773). Das Plasmid konnte so über die *HincII*-Schnittstelle in die *Multiple Cloning Site* (MCS) des Vektors kloniert werden. Mit den Vektor-Primern KB9 und 329 und weiter mit den unter 2.1.7 aufgeführten *Walking-Primern* wurde pJS-A vollständig sequenziert.

3.2.2.2 Die Sequenz von pJS-A, Homologien zu Datenbankeinträgen

Das Plasmid pJS-A (EMBL *Accession Number* AJ238491) ist 1,986 kb groß. Sein AT-Gehalt beträgt insgesamt 55,4% und liegt damit über dem für Meningokokken

⁴ Die Präsenz von pJS-A wurde mit den Plasmid-Primern JS11 und JS12 nachgewiesen. Angaben zum Vorkommen von IS1301 wurden von Hilse *et al.* [Hilse *et al.* 2000] übernommen.

charakteristischen Wert. Dieser wird für die sequenzierten Stämme MC58 [Tettelin *et al.* 2000] und Z2491 [Parkhill *et al.* 2000] mit 51,5% beziehungsweise 51,8% angegeben. In umschriebenen Abschnitten von pJS-A (Abbildung 3.2) beträgt der AT-Gehalt über 70%. An Position 302 bis 436 befinden sich hintereinander drei *Inverted Repeats*. Zwei offene Leseraster (*open reading frame*, *Orf*) konnten mit der *Lasergene*-Sequenzanalyse-Software (Dnastar, Madison, USA) identifiziert werden. Die Größe der Orfs beträgt 444 bp (Orf I) und 1011bp (Orf II). Beide Orfs sind überlappend angeordnet. Vor Orf I befindet sich ein mutmaßlicher Promotor mit einer -10- und einer -35-Sequenz. Die -10-Sequenz (TGCACT) hat nur entfernte Ähnlichkeit zu der Consensus-Sequenz TATAAT, bei der -35-Sequenz (TTGATA) jedoch ist im Vergleich mit der Consensus-Sequenz TTGACA nur eine Base ausgetauscht. Direkt im Anschluss an Orf II befindet sich eine palindromisch angeordnete *Repeat*-Region (Position 1920-1951), die als Terminator-Sequenz gedeutet werden kann. Sequenzvergleiche mit der GenBank und SWISSPROT-Datenbank ergaben keine signifikanten Homologien zu Einträgen in den Datenbanken — weder für die Nukleotidsequenzen der Orfs, noch für die abgeleiteten Aminosäuresequenzen (Stand: April 2001). Unter Berücksichtigung der Sequenzanalyse ist pJS-A als kryptisches Plasmid zu werten. Seine Funktion und Replikationsweise sind unklar.

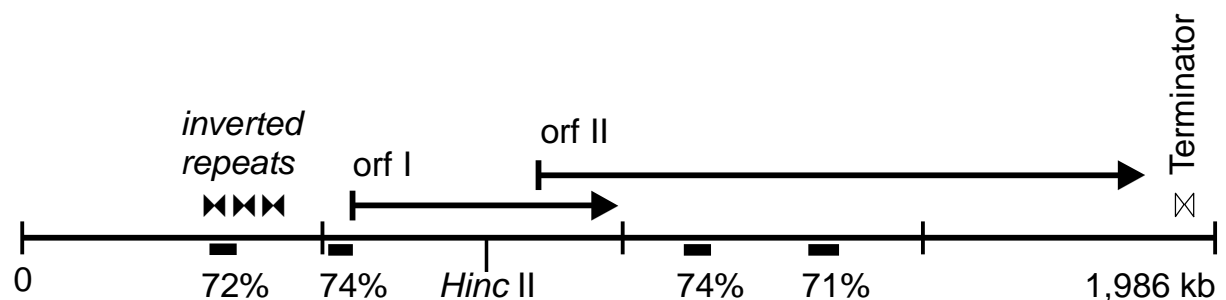


Abbildung 3.2: Das Plasmid pJS-A (EMBL Accession Number AJ238491). Die Gesamtlänge beträgt 1,986 kb. Lange Pfeile stehen für offene Leseraster, kurze Pfeilspitzen kennzeichnen repetitive Sequenzen. Plasmidabschnitte mit einem AT-Gehalt von über 70% sind durch Blockstreifen markiert und mit dem genauen AT-Gehalt versehen. Die *HincII*-Schnittstelle ist an Position 773 eingezeichnet.

3.2.3 Versuche zur Mobilisierung von pJS-A

Das Plasmid pJS-A ist relativ klein und lässt sich aus entsprechenden Stämmen der Subgruppe VI mit gängigen Präparationsmethoden in großen Mengen isolieren. Diese Eigenschaften lassen es als möglichen Plasmidvektor zur Klonierung und

Expression von DNA-Fragmenten in Meningokokken geeignet erscheinen. Ein solcher Vektor muss als Selektions-Marker eine Antibiotika-Resistenzkassette enthalten, um transformierte Stämme erkennbar zu machen. Eine Reihe von Versuchen hatte darum zum Ziel, eine Resistenzkassette in pJS-A einzubringen und das daraus resultierende Plasmidkonstrukt anschließend in plasmidfreie Meningokokkenstämme zu mobilisieren.

- 1) pJS-A wurde mit *HincII* an Position 773 linearisiert und über die *HincII*-Schnittstelle der *Multiple Cloning Site* (MCS) in den Chloramphenicol-resistenten Vektor pBCTM SK (+) ligiert.
- 2) Zusätzlich wurde das doppelsträngige Hybrid der Oligonukleotide SacBam1+2 (siehe Abschnitt 2.1.7) mit der für Meningokokken spezifischen DNA-*Uptake*-Sequenz (DUS) 5'-GCCGTCTGAA in die MCS kloniert. Der korrekte Einbau der DUS wurde durch die Sequenzierung des Konstruktes bestätigt.
- 3) Mit folgenden *Primer*-Paaren wurde pJS-A jeweils vollständig amplifiziert und dabei an unterschiedlichen Positionen linearisiert: JS11/JS12 (Pos. 1), JS13/JS14 (Pos. 107), JS15/16 (Pos. 299), JS17/18 (Pos. 510), JS19/20 (Pos. 1950). Die linearen Fragmente wurden jeweils in den Chloramphenicol-resistenten Vektor pCR-ScriptTMCam SK (+) kloniert. Entsprechende Konstrukte mit der spezifischen DUS wurden zusätzlich erstellt.
- 4) Zwei vollständige Kopien von pJS-A wurden direkt hintereinander in den Vektor pCR-ScriptTMCam SK (+) kloniert, um jeden Punkt auf dem Plasmid mindestens einmal in seiner Kontinuität zu erhalten.
- 5) Eine Kanamyzin-Resistenzkassette mit Promotor wurde direkt vor die mutmaßliche Terminator-Sequenz in pJS-A eingebracht.
- 6) Eine Kanamyzin-Resistenzkassette ohne Promotor wurde vor Orf I im Anschluss an seinen mutmaßlichen Promotor in pJS-A eingebracht.

Keines der unter 1 - 6 aufgeführten Konstrukte konnte in plasmidfreie Meningokokken mobilisiert werden. Die Versuche zur Konstruktion eines Plasmidvektors aus pJS-A wurden daher eingestellt.

3.3 Das Plasmid pJS-B

pJS-B ist ein Plasmid von 7,245 kb Größe. Es wird im enzymatischen Verdau mit dem Restriktions-Enzym *Clal* an Position 6811 linearisiert und ist im Agarosegel als charakteristische Bande bei 7,2 kb darstellbar (Abbildung 3.5). pJS-B befindet sich ausschließlich in Stämmen des ET-37 Komplexes und des *Cluster A4*. Es wird in diesem Kapitel im Detail beschrieben.

3.3.1 pJS-B im ET-37 Komplex und im *Cluster A4*

Mit repräsentativen Stämmen verschiedener klonaler Gruppierungen wurden Plasmidpräparationen durchgeführt (Abschnitt 3.1). Die durch Plasmidpräparation untersuchten ET-37 Stämme wurden im *Dot-Blot*-Verfahren nochmals überprüft. Hierzu wurden die DIG-markierten Sonden JS41/47, JS48/49, JS44/33, JS43/50, JS43/56, JS34/51 und JS45/52 verwendet, welche jeweils etwa 1kb auf pJS-B überspannen und insgesamt die vollständige Plasmidsequenz abdecken (Abbildung 3.3). Chromosomale DNA von 17 weiteren ET-37 und *Cluster A4* Stämmen (zur Verfügung gestellt von Mark Achtman, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin) war ausschließlich auf *Dot-Blots* vorhanden und wurde ebenfalls durch die Hybridisierung mit den spezifischen Sonden auf die Präsenz von pJS-B untersucht (Tabelle A2 im Anhang).

Folgende Prozentzahlen ergaben sich aus den Ergebnissen von Plasmidpräparationen und Hybridisierungsverfahren: 91% der 70 untersuchten Isolate aus dem ET-37 Komplex erwiesen sich als Träger von pJS-B. Ausgenommen war beispielsweise der Stamm FAM18, dessen Genom derzeit sequenziert wird. Alle 30 untersuchten Stämme des ET-15 Klon des ET-37 Komplexes enthielten pJS-B. Im nahe verwandten *Cluster A4* befanden sich 67% Träger, entsprechend 8 von 12 untersuchten Isolaten. In anderen klonalen Linien konnte pJS-B nicht nachgewiesen werden. Nach dem derzeitigen Untersuchungsstand beträgt daher seine Spezifität für die nahe verwandten Linien *Cluster A4* und ET-37 Komplex 100%. Dies konnte in bislang unveröffentlichten Untersuchungen der Arbeitsgruppe Vogel (Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg) bestätigt werden, welche 333 Sequenztypen von Isolaten bei bayerischen Trägern und Erkrankten einschlossen.

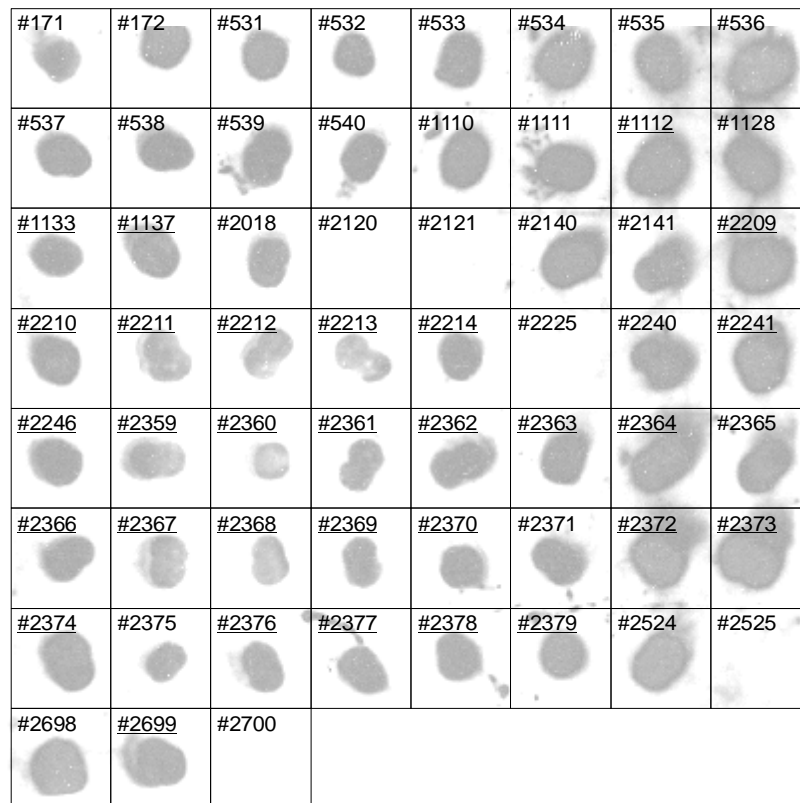


Abbildung 3.3: Nachweis von pJS-B im *Dot-Blot* durch Hybridisierung mit der DIG-markierten Sonde JS48/49. Alle dargestellten Stämme gehören dem ET-37 Komplex an. Angehörige des ET-15 Klonen tragen unterstrichene Stammsnummern. Die Stämme #2120, #2121, #2225, #2525 und #2700 hybridisierten nicht mit der spezifischen Sonde.

3.3.2 Informationen zu Sequenz und Leserastern

Das Plasmid pJS-B konnte in der Regel nur mit geringer Ausbeute isoliert werden, was wahrscheinlich auf eine niedrige Kopienzahl zurückzuführen ist. Aus noch unbekanntem Gründen enthält jedoch der ET-37 Stamm #537 (Stammsammlung des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg) größere Mengen von pJS-B. Die Plasmid-DNA für alle weiterführenden Experimente im Rahmen der Sequenzierung von pJS-B wurde daher aus dem Stamm #537 isoliert.

3.3.2.1 Sequenzierung von pJS-B

pJSB-DNA aus dem Stamm #537 wurde mit dem Restriktionsenzym *DraI* (21 Schnittstellen auf pJS-B) inkubiert. Das aufgereinigte Fragmentgemisch wurde in den mit *HincII* verdauten und dephosphorylierten Vektor pBCTM SK (+) ligiert, der aufgereinigte Ligationsansatz in *Escherichia coli DH5 α* elektroporiert. So gelang die Klonierung zweier Plasmidfragmente von 1,1 kb und 1,5 kb in den Plasmidvektor

pBCTM SK (+). Sie wurden zunächst mit den Vektor-*Primern* KB9 und 329 und im Anschluss mittels *Primer-Walking* vollständig sequenziert. Anhand der Sequenz der klonierten Fragmente konnten Oligonukleotid-*Primer* erstellt werden, mit denen die Amplifikation der Sequenzabschnitte zwischen beiden Fragmenten gelang. So konnte durch PCR-Reaktionen und *Primer-Walking* die gesamte Plasmidsequenz über 7,245 kb ermittelt werden.

3.3.2.2 Sequenz von pJS-B, Homologien zu Datenbankeinträgen

Das Plasmid pJS-B (EMBL *Accession Number* AJ277475) ist 7,245 kb groß. Sein AT-Gehalt liegt mit insgesamt 57,9% deutlich über dem für Meningokokken charakteristischen Wert. Dieser wird für die sequenzierten Stämme MC58 [Tettelin *et al.* 2000] und Z2491 [Parkhill *et al.* 2000] mit 51,5% beziehungsweise 51,8% angegeben. Vier Abschnitte auf pJS-B von jeweils 100 bp weisen über 70% A und T auf (Abbildung 3.4). Acht offene Leseraster (Orf) konnten mit der *Lasergene-Sequenzanalyse-Software* (Dnastar, Madison, USA) identifiziert werden. Die Größe der acht Orfs liegt zwischen 303 bp (Orf IV und Orf V) und 990 bp (Orf VI). Sequenzvergleiche mit der GenBank und SWISSPROT-Datenbank ergaben keine signifikanten Homologien zu Einträgen — weder für die Nukleotidsequenzen der Orfs, noch für die abgeleiteten Aminosäuresequenzen (Stand: April 2001).

Der Vergleich der gesamten Plasmidsequenz mit der GenBank ergab an Position 20 bis 307 eine Identität von 93% zu einer von Carrick *et al.* beschriebenen *Repeat-Region*, welche sich im Genom des Gonokokkenstammes MS11-A stromaufwärts des *piVNG* Gens befindet. Dieses kodiert für eine mutmaßliche Rekombinase, die eine Rolle bei genomischen Umlagerungen im Rahmen der Pilin-Expression spielen könnte [Carrick *et al.* 1998, EMBL *Accession Number* U65994]. Wie im Gonokokkengenom enthält die Region auf pJS-B zwei absolut spiegelbildlich angeordnete *Inverted Repeats*, IR1 und IR2. Beide Anteile von IR1 sind 20 Basenpaare lang und werden durch 47 Basenpaare getrennt. Sie schließen in ihrer Mitte das IR2 ein, welches zweimal 13 Basenpaare umfasst, getrennt durch neun Basenpaare. Carrick *et al.* diskutieren eine mögliche Funktion der *Repeat-Region* als Rekombinationsstelle der Rekombinase *PiVNG*. Homologe *Repeats* sind auch in den Genomsequenzen der vollständig sequenzierten Meningokokkenstämme MC58 und Z2491 zu finden [Parkhill *et al.* 2000; Tettelin *et al.* 2000]. Sie befinden sich

jeweils etwa 300 bp stromaufwärts der Gene der mutmaßlichen Rekombinasen *PivNM2* beziehungsweise *NMA0772*.

An Position 5070-5079 konnte auf pJS-B die spezifische DNA-*Uptake*-Sequenz (DUS) 5'-GCCGTCTGAA identifiziert werden. Im Meningokokkengenom sind DUS in relativ hoher Dichte vorhanden. Der durchschnittliche Abstand zwischen zwei DUS auf dem Genom des sequenzierten Serogruppe A Stammes Z2491 beträgt 1152 bp [Parkhill *et al.* 2000, Smith *et al.* 1999]. Eine einzelne DUS auf 7245 bp ist darum weniger, als bei einer entsprechenden Häufigkeit von DUS auf pJS-B zu erwarten wäre. Jedoch gilt auch eine einzelne Kopie als ausreichend für die effiziente Transformation eines DNA-Fragmentes [Elkins *et al.* 1991, Goodman *et al.* 1988].

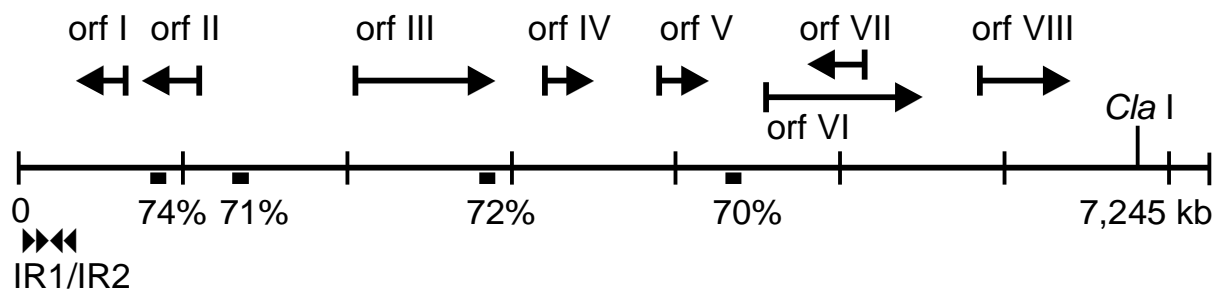


Abbildung 3.4: Das Plasmid pJS-B (EMBL Accession Number AJ277475). Die Gesamtlänge beträgt 7,245 kb. Lange Pfeile stehen für offene Leseraster, kurze Pfeilspitzen kennzeichnen die *Inverted Repeats* IR1 und IR2 zwischen Position 20 und 307. Plasmidabschnitte mit einem AT-Gehalt von 70% und mehr sind durch Blockstreifen markiert und mit dem genauen AT-Gehalt versehen. Die *ClaI*-Schnittstelle ist an Position 6811 eingezeichnet.

3.3.3 pJS-B als chromosomale Kopie

3.3.3.1 Hinweis auf die chromosomale Integration von pJS-B in dem plasmidfreien Stamm #2375

Wie im Abschnitt 3.3.1 beschrieben, wurden Vertreter des ET-37 Komplexes und des *Cluster A4* mit zwei verschiedenen Methoden auf die Anwesenheit von pJS-B überprüft. Zum einen wurde Plasmid-DNA präpariert. Zum anderen wurden *Dot-Blots* von ET-37 und *Cluster A4* Stämmen mit sieben spezifischen Sonden von jeweils etwa 1 kb Größe, welche insgesamt die vollständige Plasmidsequenz abdecken, auf die Präsenz von pJS-B untersucht (Abbildung 3.3). Die Hybridisierungen mit den verschiedenen Sonden ergaben im *Dot-Blot* jeweils ein identisches Muster. Daraus lässt sich für die einzelnen Meningokokkenstämme

ableiten, dass sie pJS-B entweder gar nicht (keine Hybridisierung) oder in voller Länge (positive Reaktion mit allen Sonden) enthalten. Bei der Interpretation dieser Versuche fiel der Stamm #2375 (Stammsammlung des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg) auf, ein ET-37 Stamm, der in den 90er-Jahren in der Tschechischen Republik isoliert wurde. Während aus 27 anderen tschechischen ET-37 Isolaten aus den 90er-Jahren [Krizova *et al.* 1995, Krizova *et al.* 1997] pJS-B in Präparation und *Dot-Blot* zuverlässig nachweisbar war, konnte das Plasmid aus #2375 nicht isoliert werden (Abbildung 3.5). Der Nachweis im *Dot-Blot* fiel hingegen mit allen eingesetzten Sonden deutlich positiv aus. Dieser Befund deutete darauf hin, dass pJS-B hier nicht als Plasmid, sondern chromosomal integriert vorlag.

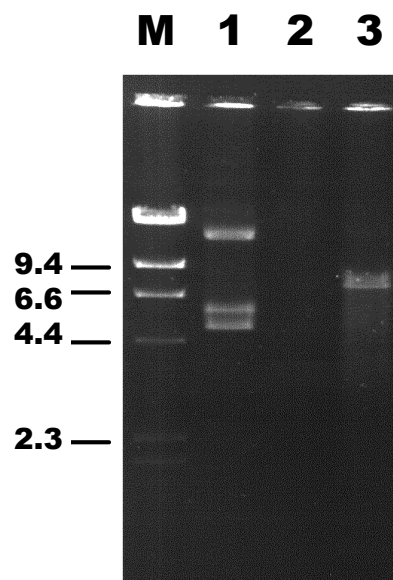


Abbildung 3.5: Plasmidpräparation durch alkalische Lyse aus den Stämmen #537 (beherbergt das Plasmid pJS-B) und #2375 (enthält kein zirkuläres Plasmid). (M) Marker (DNA-Größenstandard); (1) Natives Plasmid pJS-B aus dem Stamm #537; (2) Plasmidpräparation aus #2375 (keine Plasmid-DNA darstellbar); (3) pJS-B aus #537 nach *Clal*-Spaltung mit charakteristischer Plasmidbande bei 7,245 kb

3.3.3.2 Darstellung von pJS-B in den Stämmen #537 und #2375 durch *Southern-Blot*-Analyse

In den ET-37 Stämmen #537 und #2375 konnte pJS-B im *Dot-Blot*-Verfahren nachgewiesen werden. Es war jedoch nur aus #537 als freies Plasmid isolierbar. Dieser Befund legte nahe, dass der Stamm #2375 pJS-B als chromosomale Kopie

enthält. Hinweisgebend für die chromosomale Integration von pJS-B war auch folgendes Experiment:

Chromosomale DNA beider Stämme wurde jeweils mit *Clal* und *BamHI* beziehungsweise mit *Clal* und *EcoRV* geschnitten, elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und im *Southern-Blot*-Verfahren auf Nylonmembran übertragen. *Clal* schneidet pJS-B an Position 6811, während *BamHI* und *EcoRV* auf dem Plasmid keine Schnittstellen haben. Mit den spezifischen Sonden JS48/49 und JS43/50 wurde pJS-B-DNA auf dem *Southern-Blot* nachgewiesen (Abbildung 3.6). Die Sonde JS43/50 überspannt die *Clal*-Schnittstelle auf pJS-B.

Für den Stamm #537 konnte die charakteristische Plasmidbande bei 7,2 kb (linearisiert durch *Clal*) nachgewiesen werden. Sie fand sich nicht bei #2375, was das Ergebnis der Plasmidpräparation bestätigte. Der Stamm #2375 enthält demnach das Plasmid nicht in seiner freien, zirkulären Form. Für beide Stämme war jedoch pJS-B-spezifische DNA außerhalb der 7,2 kb Bande nachweisbar. Es handelte sich hierbei um das einfach chromosomal integrierte Plasmid. *Clal* schneidet auch auf dem chromosomal integrierten pJS-B, trennt es so in seiner Kontinuität. Mit der Sonde 43/50, welche die *Clal*-Schnittstelle überspannt, waren daher zwei Banden nachweisbar. Die Sonde JS48/49 kann nur eine dieser Banden detektieren, da sie auf pJS-B einen Sequenzbereich außerhalb der *Clal*-Schnittstelle abdeckt. pJS-B liegt also in #2375 nur als chromosomale Kopie, in #537 sowohl chromosomal integriert als auch als freies Plasmid vor.

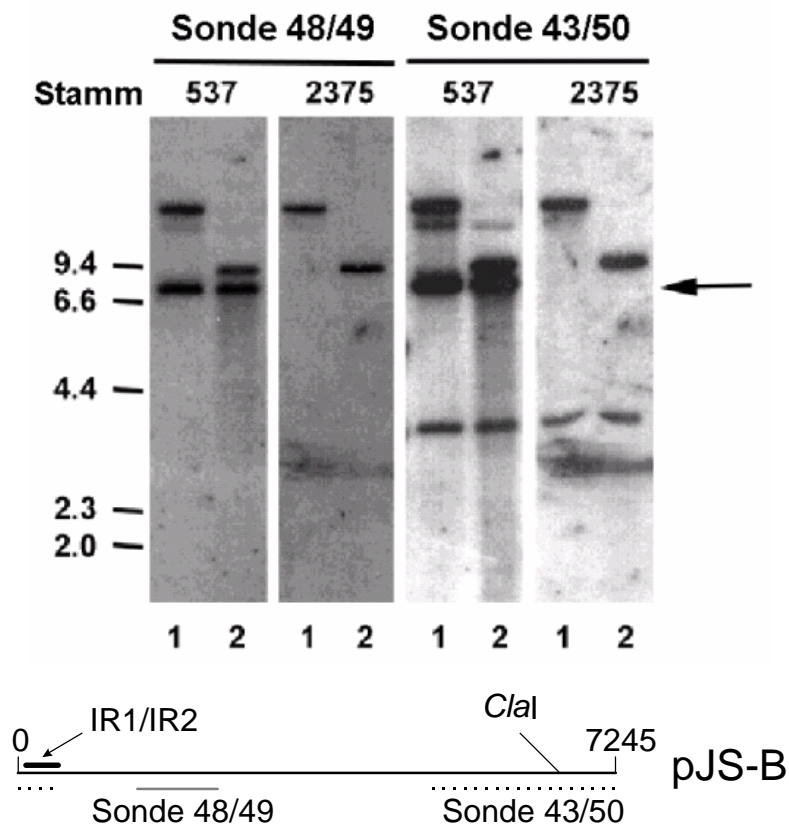


Abbildung 3.6: Darstellung von pJS-B in den Stämmen #537 und #2375 durch Southern-Blot-Analyse. Chromosomale DNA beider Stämme wurde mit *Clal* und *Bam*HI (1) beziehungsweise mit *Clal* und *Eco*RV (2) verdaut. Die Sonde JS48/49 entsprach Position 1400 bis 2382 auf dem Plasmid; JS43/50 entsprach Position 5252 bis 558 (siehe Skizze) und überspannte somit den Bereich der *Clal*-Schnittstelle (Position 6811). Nur bei #537 erschien die Bande des linearisierten Plasmids bei 7,245 kb (Pfeil). Die übrigen Banden waren in beiden Stämmen identisch. Sie entsprechen der Hybridisierung der Sonden mit dem chromosomal integrierten pJS-B. Die Lokalisation der *Inverted Repeats* IR1/IR2 auf pJS-B ist in der Skizze eingezeichnet.

3.3.3.3 pJS-B liegt in der chromosomalen Form im Bereich seiner Repeat-Region IR1/IR2 linearisiert vor

pJS-B liegt in ET-37 Stämmen nicht nur in zirkulärer Form, sondern als chromosomale Kopie auch linear vor. Ziel des folgenden Experimentes war es, den Ort der Linearisierung innerhalb der Plasmid-Sequenz zu lokalisieren.

JS41/47, JS48/49, JS44/33, JS43/50, JS43/56, JS34/51 und JS45/52 sind Paare von Oligonukleotid-Primern, die jeweils einen etwa 1kb großen Sequenzabschnitt auf dem zirkulären pJS-B einschließen (JS43 und JS50 begrenzen 2,55 kb), der in PCR-Reaktionen amplifiziert werden kann. Auf dem chromosomal integrierten pJS-B

sind PCR-Amplifikationen mit den jeweiligen *Primer*-Paaren ebenfalls möglich — mit Ausnahme des Paares, welches jenen Sequenzabschnitt einschließt, der durch die Linearisierung des Plasmids unterbrochen ist. In dem Stamm #2375 liegt pJS-B ausschließlich in seiner linearen, geöffneten Form im Chromosom vor. Dieser Stamm war daher zur Untersuchung der chromosomalen Integration von pJS-B besonders geeignet. PCRs mit den beschriebenen *Primer*-Paaren wurden durchgeführt. Als *Templates* dienten das zirkuläre Plasmid (als Positivkontrolle) bzw. chromosomale DNA des Stammes #2375. Wurde das zirkuläre Plasmid als *Template* benutzt, entstanden bei allen *Primer*-Paaren die zu erwartenden Amplifikationsprodukte. Bei Verwendung von chromosomaler DNA des Stammes #2375 konnte mit den *Primer*-Paaren JS41/47, JS48/49, JS44/33, JS34/51 und JS45/52 ebenfalls das entsprechende Produkt amplifiziert werden. Mit den *Primer*-Paaren 43/50 und 43/56 ergab sich jedoch kein Produkt (Abbildung 3.7). Beide schließen den gleichen Plasmidbereich ein (JS43 begrenzt mit JS56 einen 850 bp großen Abschnitt, mit JS50 2550 bp). Er beinhaltet die oben beschriebenen *Inverted Repeats* IR1 und IR2, was die Vermutung nahelegt, dass es sich hier um die gesuchte Integrations- beziehungsweise Linearisierungsstelle handelt. Versuche mit weiteren PCR-*Primern*, welche einen noch engeren Bereich einschließen, erwiesen sich als unergiebig: Mit *Primern* in direkter Nähe der *Repeat*-Region ließen sich, eventuell aufgrund von Tertiärformationen wie z.B. Haarnadelstrukturen zwischen *Repeat*-Abschnitten, auch auf dem zirkulären Plasmid keine PCR-Reaktionen durchführen.

Um die chromosomale Integrationsstelle von pJS-B zu charakterisieren, sollte diese kloniert werden. Ihre Klonierung erwies sich jedoch als experimentell nicht durchführbar. Die Gründe hierfür blieben unklar.

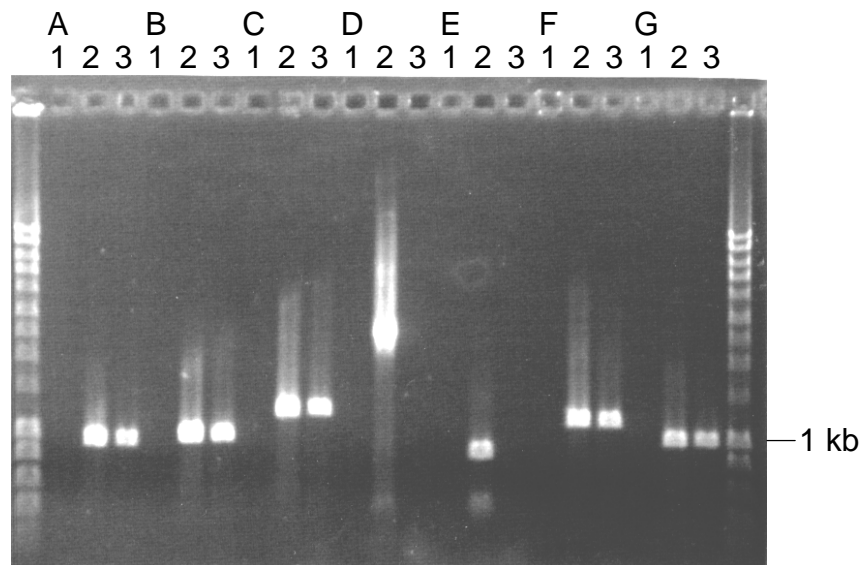


Abbildung 3.7: Ermittlung der Linearisierungsstelle des chromosomal integrierten pJS-B. Mit spezifischen *Primer*-Paaren wurde pJS-B abschnittsweise amplifiziert. DNA des Stammes #2375, welcher pJS-B nur in der chromosomal integrierten und somit linearisierten Form enthält, wurde als *Template* eingesetzt. Mit den *Primer*-Paaren JS43/50 und JS43/56 konnte kein PCR-Produkt amplifiziert werden. Sie fassen daher die mutmaßliche Öffnungsstelle von pJS-B ein. (1) Negativkontrolle ohne *Template*; (2) Positivkontrolle mit präpariertem Plasmid aus dem Stamm #537; (3) *Template* ist chromosomale DNA aus #2375; (A) *Primer* JS41/47; (B) *Primer* JS48/49; (C) *Primer* JS44/33; (D) *Primer* JS43/50; (E) *Primer* JS43/56; (F) *Primer* JS34/51; (G) *Primer* JS45/52

4 DISKUSSION

4.1 pJS-A und pJS-B als genetische Elemente mit spezifischer klonaler Verteilung

Die Art *Neisseria meningitidis* besitzt eine heterogene Populationsstruktur, innerhalb derer mit Klassifikationsverfahren wie der MLEE und MLST [Caugant *et al.* 1987, Maiden *et al.* 1998] klonale Gruppierungen definiert werden können. Meningokokken-Isolate aus Rachenabstrichen gesunder Träger zeichnen sich durch eine große Vielfalt aus und repräsentieren ein breites Spektrum verschiedener klonaler Linien [Jolley *et al.* 2000]. Isolate im Rahmen eines Ausbruchs gehören hingegen meist dem gleichen Klon an, und nur wenige hypervirulente Linien werden mit endemischen oder epidemischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht [Achtman 1995, Caugant *et al.* 1987, Jolley *et al.* 2000]. In Europa sind dies im Wesentlichen Serogruppe B Meningokokken aus dem ET-5 Komplex und der Linie 3 sowie Serogruppe C Stämme aus dem ET-37 Komplex und dem nahe verwandten *Cluster A4* [Achtman 1995]. Es war ein Ziel dieser Arbeit, das Verteilungsmuster von Plasmiden in Meningokokken verschiedener klonaler Gruppierungen zu analysieren. Die Plasmide pJS-A und pJS-B sind in ihrem Vorkommen jeweils streng auf bestimmte klonale Linien beschränkt. pJS-A konnte nur aus wenigen Angehörigen der Subgruppe VI isoliert werden, während pJS-B in den meisten Stämmen des ET-37 Komplexes und in vielen Vertretern des *Cluster A4* zu finden war. Beide gelangten vermutlich durch ein einzelnes Transformationsereignis in einen Vorfahren der jeweiligen klonalen Gruppierung. Für ihren Ursprung aus Bakterienarten außerhalb der Gattung *Neisseria* spricht in beiden Fällen der für Neisserien untypisch hohe AT-Gehalt. Bei pJS-A sind es 55,4%, bei pJS-B 57,9% bei einem für Meningokokken charakteristischen Gehalt von knapp 52% [Parkhill *et al.* 2000, Tettelin *et al.* 2000]. Die deutliche Abweichung lässt vermuten, dass beide Elemente erst seit einem begrenzten Zeitraum in Meningokokken vorkommen, denn man kann davon ausgehen, dass aufgenommene artfremde DNA im Laufe der Zeit den für ihren Wirt charakteristischen AT-Gehalt annimmt [Lawrence *et al.* 1997]. Gleiches gilt für die Dichte von DNA-*Uptake*-Sequenzen (DUS). Eine solche ist auf pJS-B zwar vorhanden, entsprechend der für Meningokokken charakteristischen genomischen Dichte von einer DUS auf etwa 1150 bp wären aber mindestens 6

Kopien zu erwarten gewesen [Parkhill *et al.* 2000, Smith *et al.* 1999]. pJS-A trägt keine DUS.

pJS-A und pJS-B breiteten sich innerhalb der Art *Neisseria meningitidis* nicht aus, sondern blieben offensichtlich auf die klonalen Nachkommen jenes Bakteriums beschränkt, in das sie ursprünglich gelangten. Im Fall von pJS-A kann dieses Transformationsereignis nicht lange zurückliegen. Nur Stämme der Subgruppe VI [Grahlow *et al.* 1990, Hilse *et al.* 2000], welche seit der Mitte der 80er-Jahre in einem geographisch begrenzten Areal isoliert wurden, sind Plasmidträger. Gleiches gilt für das Auftreten des Insertionselementes IS1301 innerhalb der Subgruppe VI, welches in der Mehrzahl der Fälle mit der Präsenz von pJS-A gekoppelt ist [Hilse *et al.* 2000]. IS1301 ist für Meningokokken spezifisch und tritt in den meisten klonalen Linien auf, jedoch nur selten in solchen, welche mit manifesten Erkrankungen und Epidemien assoziiert sind. In Meningokokken der Serogruppe A ist das Auftreten von IS1301 insgesamt eine seltene Ausnahme [Hilse *et al.* 2000]. In den 80er-Jahren fand im Gebiet der damaligen DDR eine klonale Expansion von Subgruppe VI Stämmen mit den Merkmalen IS1301 und pJS-A statt.

pJS-B gelangte wahrscheinlich ebenfalls durch ein einzelnes Transformationsereignis in einen gemeinsamen Vorfahren der verwandten Stämme aus ET-37 Komplex und *Cluster A4*. Einige der Nachkommen des ursprünglichen Trägers von pJS-B verloren das DNA-Segment jedoch wieder. pJS-B kommt daher nicht in allen Vertretern der betreffenden Linien vor. Im ET-37 Komplex war es in 91%, im *Cluster A4* in 67% der untersuchten Isolate enthalten.

Die strenge Beschränkung von pJS-A und pJS-B auf bestimmte klonale Linien erscheint in Anbetracht der heterogenen Populationsstruktur der natürlich kompetenten Art *Neisseria meningitidis* erstaunlich. Das Plasmid pJS-B besitzt mit seiner DNA-*Uptake*-Sequenz eigentlich die entscheidende Voraussetzung für seine Ausbreitung innerhalb des Meningokokken-Gen-Pools durch Transformation [Elkins *et al.* 1991, Goodman *et al.* 1988, Smith *et al.* 1999]. Wie lässt sich das so eng begrenzte Verteilungsmuster von pJS-B dennoch erklären?

Wie bereits erwähnt wurde, sind nur wenige hypervirulente Linien für Meningokokkenerkrankungen im Rahmen von Epidemien verantwortlich, während die meisten anderen Stämme als avirulent gelten und als harmlose Kommensalen im menschlichen Nasen-Rachen-Raum siedeln [Achtman 1995, Caugant *et al.* 1987,

Jolley *et al.* 2000]. Trotz der den Meningokokken eigenen natürlichen Kompetenz erscheinen Vertreter der epidemischen Linien bemerkenswert konserviert und können jeweils über bestimmte, ihnen eigene Gene charakterisiert werden [Claus *et al.* 2000, Claus *et al.* 2001]. So sind Angehörige des ET-5 Komplexes und der Linie 3 Träger des Klasse 3 *porB* Gens, während in ET-37 Komplex und *Cluster A4* das Klasse 2 Gen gefunden wird [Caugant *et al.* 1987, Wang *et al.* 1993]. Das spezifische Vorkommen von Restriktions-Modifikations-Systemen (RM-Systemen) in hypervirulenten Linien wurde von verschiedenen Autoren beschrieben. Das RM-System *NmeBI* kommt im ET-5 Komplex und in der Linie 3 vor. *NmeDI* und *NmeAI* werden im ET-37 Komplex und im *Cluster A4*, *NmeAI* auch in Serogruppe A Meningokokken gefunden [Claus *et al.* 2000]. Bart *et al.* beschrieben ein für die Linie 3 spezifisches RM-System [Bart *et al.* 2000]. DNA-Material, welches nur im ET-37 Komplex und dem nahe verwandten *Cluster A4* vorkommt, wurde von Claus *et al.* durch Repräsentative Differenzanalyse (RDA) identifiziert, einer PCR-basierten Methode zum Vergleich bakterieller Genome. Unter den für die beiden hypervirulenten Linien spezifischen Fragmenten befanden sich 37/1-7, ein bislang unbekanntes RM-System, sowie 37/1-26, das Fragment eines Prophagen [Claus *et al.* 2001]. Das Gen der mutmaßlichen Endonuklease des RM-Systems 37/1-7 wird im ET-37 Komplex, nicht jedoch im *Cluster A4*, durch das Insertionselement IS1655 unterbrochen. Die Insertion von IS1655 muss also nach der genetischen Trennung der beiden nahe verwandten Linien erfolgt sein und stellt ein Unterscheidungskriterium zwischen ET-37 Komplex und *Cluster A4* dar [Claus *et al.* 2001].

Wie kommt es in Anbetracht der durch horizontalen Gentransfer bedingten genetischen Vielfalt von Meningokokken zur Konservierung einzelner klonaler Linien? Dieser Tatsache müssen Tendenzen zugrunde liegen, welche der Aufnahme von genetischem Material und der Entwicklung neuartiger rekombinanter Klone entgegenwirken. Periodische Selektion mit der schnellen Ausbreitung einzelner Klone mit hoher Fitness stellt einen Erklärungsansatz dar [Levin 1981]. Gupta *et al.* näherten sich dem Phänomen genetisch stabiler Stämme bei gegebenen Rekombinationsmöglichkeiten mit mathematischen Modellen und erklärten es durch Immunselektion [Gupta *et al.* 1996, Gupta *et al.* 1999]. Ihre Ergebnisse fußen jedoch auf der Betrachtung immunogener Determinanten und

lassen sich nicht auf die oben erwähnten Beispiele übertragen, die keine immunogenen Eigenschaften haben. Claus *et al.* postulierten, die spezifisch verteilten RM-Systeme selbst könnten die Aufnahme von Fremd-DNA durch Transformation beschränken. In der Tat konnte eine Beeinträchtigung der Transformation von Meningokokken des ET-5 Komplexes durch das spezifische RM-System *NmeBI* nachgewiesen werden [Claus *et al.* 2000]. Ob entsprechende Mechanismen auch den ET-37 Komplex vor Fremd-DNA schützen, ist ungeklärt. Das neu entdeckte RM-System 37/1-7 hat hier aller Wahrscheinlichkeit nach keine Funktion, da das Gen seiner mutmaßlichen Endonuklease, wie oben erwähnt, durch Integration des Insertionselementes IS1655 unterbrochen ist [Claus *et al.* 2001].

Bemerkenswert ist, dass die genetische Konservierung der hypervirulenten Linien die sogenannten *Housekeeping*-Gene offensichtlich weniger betrifft als Gene, welche wie die oben erwähnten für das Überleben des Bakteriums nicht unter allen Umständen notwendig sind [Claus *et al.* 2001]. Analysen verschiedener Sequenztypen durch Claus *et al.* weisen darauf hin: Der ST-11(ET-37)-Komplex und der ST-32(ET-5)-Komplex unterscheiden sich in der MLST in allen zu untersuchenden *Housekeeping*-Genen. Nahe verwandte Sequenztypen, die sich von einer der beiden Linien in jeweils nur einem allelen Gen unterscheiden, können jedoch das für die jeweils andere Linie typische Allel aufweisen. Vertreter des ET-37 Komplexes können also *Housekeeping*-Gene aus dem ET-5 Komplex erwerben und umgekehrt. Claus *et al.* postulieren, dass der Austausch von *Housekeeping*-Genen über einen *Pool* verwandter Neisserien-Arten ermöglicht wird, welche alle entsprechende homologe Gene tragen [Claus *et al.* 2001]. So gelingt indirekt auch der Transfer zwischen den hypervirulenten Linien durch homologe Rekombination. Tatsächlich wurde der horizontale Gentransfer zwischen unterschiedlichen Neisserien-Arten von verschiedenen Autoren beschrieben [Bowler *et al.* 1994, Linz *et al.* 2000]. Der Begriff eines gemeinsamen Neisserien-Gen-Pools wurde von Maiden *et al.* eingeführt [Maiden *et al.* 1996]. Unter anderem zeichnet sich auch die den Meningokokken nahe verwandte Art *Neisseria lactamica* durch häufige Rekombinationsereignisse aus [Alber *et al.* 2001]. Für die auf bestimmte Linien beschränkten Gene bestehen keine Möglichkeiten zur homologen Rekombination innerhalb des Neisserien-Gen-Pools. Sie müssten daher als relativ große, nicht-

homologe DNA-Inseln direkt in einzelne Rezipienten transferiert werden, was ungleich seltener gelingt.

Es soll nochmals hervorgehoben werden, dass pJS-A und pJS-B beide in ihrem Vorkommen streng an bestimmte klonale Linien gebunden sind. In dieser Arbeit und in fortlaufenden Arbeiten der Arbeitsgruppe Vogel (Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg) konnte gezeigt werden, dass pJS-B eine Spezifität von 100% für den ET-37 Komplex und für den *Cluster A4* aufweist. Dies lässt die Frage aufkommen, ob der Nachweis von pJS-B in Stammtypisierungsverfahren genutzt werden kann. pJS-B ist jedoch nur in 91% beziehungsweise 67% der Vertreter beider Linien zu finden. Es ist daher ein zwar hochspezifischer, aber wenig sensitiver Marker für ET-37 und *Cluster A4*-Meningokokken.

4.2 pJS-B in chromosomaler Integration, Überlegungen zur Integrationsstelle

pJS-B wurde in Plasmidpräparationen aus Stämmen des ET-37 Komplexes und des *Cluster A4* isoliert. In *Southern-Blots* konnte mit spezifischen Sonden auch außerhalb der charakteristischen Plasmidbande pJS-B-DNA detektiert werden. Dieser Befund lässt auf die chromosomale Integration von pJS-B schließen. In dem Stamm #2375 befindet es sich ausschließlich in der linearisierten und chromosomal integrierten Form. Die *Repeat*-Region mit IR1 und IR2 ist dabei die mutmaßliche Öffnungsstelle des Plasmids. Homologe *Repeat*-Regionen wurden für das Gonokokkenchromosom [Carrick *et al.* 1998] sowie für das Genom der Meningokokkenstämme MC58 [Tettelin *et al.* 2000] und Z2491 [Parkhill *et al.* 2000] beschrieben. Somit besteht die Möglichkeit, dass pJS-B über entsprechend homologe *Inverted Repeats* in das Genom von Meningokokken aus ET-37 Komplex und *Cluster A4* integriert. Versuche, die chromosomale Integrationsstelle von pJS-B zu charakterisieren, schlugen bisher jedoch fehl, da es sich aus noch ungeklärten Gründen als unmöglich erwies, den entsprechenden Sequenzabschnitt zu klonieren, was Voraussetzung für die anschließende Sequenzierung der chromosomalen Integrationsstelle wäre. Auch die derzeit fortschreitende Sequenzierung des ET-37 Stammes FAM18 wird keinen Aufschluss über die Integration von pJS-B bringen, da FAM18 einer der wenigen Vertreter des ET-37 Komplexes ist, welche pJS-B weder als Plasmid noch als chromosomale Kopie enthalten.

Die Analyse der Sequenzbereiche, welche in MC58, Z2491 sowie im Gonokokkenstamm MS11-A an die homologen *Repeat*-Regionen angrenzen [Carrick *et al.* 1998, Parkhill *et al.* 2000, Tettelin *et al.* 2000], ergab deutliche Strukturähnlichkeiten. Die homologen *Repeats* befinden sich jeweils stromaufwärts von Genen für Invertasen oder Rekombinasen, Enzymen also, welche an chromosomalen Umlagerungen beteiligt sind (Abbildung 4.1). Die mutmaßliche Rekombinase *pivNG* im Genom des Gonokokkenstammes MS11-A spielt möglicherweise eine Rolle bei genomischen Umlagerungen im Rahmen der Pilin-Expression. Carrick *et al.* diskutieren eine mögliche Funktion der angrenzenden *Repeat*-Region IR1/IR2 als Rekombinationsstelle [Carrick *et al.* 1998]. Die homologe Rekombinase auf dem Genom des Serogruppe A Stammes Z2491 trägt die Bezeichnung *NMA0772* [Parkhill *et al.* 2000]. Das Gen *pivNM-2* entspricht einer von drei homologen Rekombinasen des Serogruppe B Stammes MC58 [Tettelin *et al.* 2000]. Die beiden anderen, *pivNM-1A* und *pivNM-1B* sind genetisch identisch. Sie zeigen eine Identität von 42,4% zu der von Carrick *et al.* für MS11-A beschriebenen Rekombinase *pivNG* [Carrick *et al.* 1998], sind jedoch nicht mit IR1/IR2 assoziiert. *pivNM-2* weist eine etwas geringere Identität (38,8%) zu *pivNG* auf. Das *pivNM-2*-Gen liegt 337 bp von IR1/IR2 entfernt innerhalb einer Region mit einer für Meningokokken untypischen Basenzusammensetzung, einer „Insel horizontal transferierter DNA“ (IHT) [Tettelin *et al.* 2000]. Wir vermuten, dass sich im Genom von ET-37 und *Cluster A4*-Stämmen entsprechende homologe *Repeats* mit benachbarten Rekombinasen befinden. Möglicherweise ist eine solche Rekombinase an der Integration von pJS-B über IR1/IR2 in das Chromosom beteiligt. Bisher ist unklar, ob es sich beim Vorliegen von pJS-B als Plasmid oder in chromosomaler Integration um einen phasenvariablen Prozess handelt.

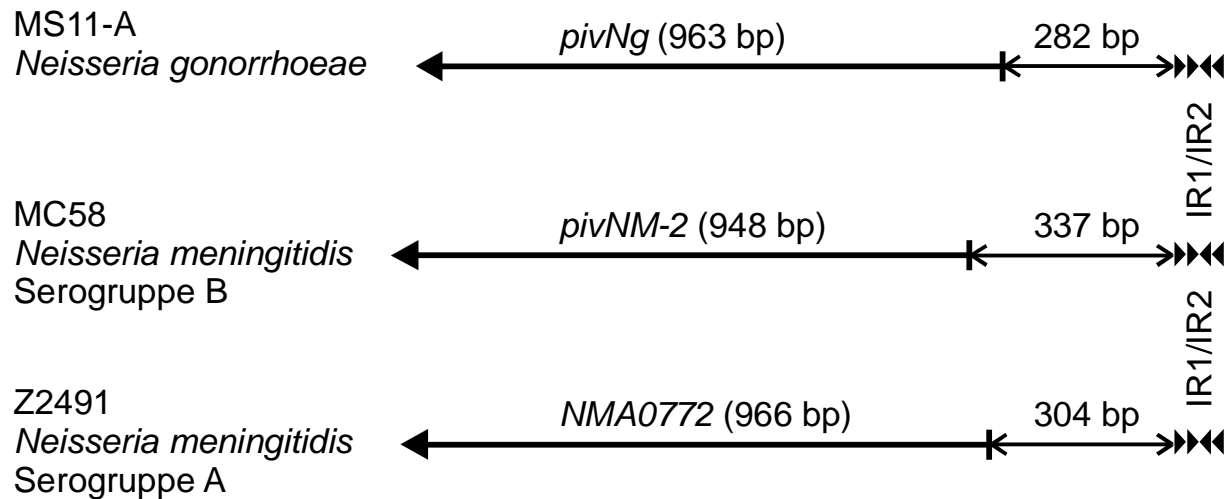


Abbildung 4.1: Vergleichende Darstellung homologer Abschnitte auf den Genomen der Stämme MS11-A [Carrick *et al.* 1998, EMBL Accession Number U65994], MC58 [Tettelin *et al.* 2000, <http://www.tigr.org>] und Z2491 [Parkhill *et al.* 2000 http://www.sanger.ac.uk/Projects/N_meningitidis]. Lange Pfeile kennzeichnen die homologen Rekombinasen. Für IR1/IR2 stehen kurze Pfeilspitzen. Doppelpfeile zwischen den Rekombinasen und IR1/IR2 sind mit dem genauen Abstand in Basenpaaren beschriftet.

4.3 Kritische Gedanken zur Natur der DNA-Elemente pJS-A und pJS-B

Die beiden Plasmide pJS-A und pJS-B wurden im Rahmen dieser Arbeit vollständig sequenziert. Ihre gesamte DNA-Sequenz sowie auch die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der kodierten Proteine wurden im Vergleich mit der GenBank bzw. SWISSPROT-Datenbank auf Homologien zu eingetragenen Sequenzen untersucht. Für beide Plasmide ergaben sich keine signifikanten Homologien zu Datenbankeinträgen (Stand: April 2001), von der oben beschriebenen *Repeat*-Region auf pJS-B abgesehen. Beide vermitteln keine Resistenzeigenschaften, was die Antibiogramme der jeweils plasmidtragenden Stämme im Vergleich mit denen plasmidloser Verwandter bestätigten (Daten nicht gezeigt).

Ob die Plasmide Träger von Virulenzgenen sind, lässt sich nicht mit Sicherheit ausschließen. Es wird jedoch im Fall von pJS-B durch die Tatsache unwahrscheinlich gemacht, dass einzelne Vertreter des ET-37 Komplexes und des *Cluster A4* das Plasmid nicht tragen, trotzdem aber von schwerkranken Patienten aus Blut oder Liquor isoliert wurden, so zum Beispiel der Stamm #2120 (Stammsammlung des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg [Vogel *et al.* 1998]). Bemerkenswert ist allenfalls, dass Angehörige des

außerordentlich virulenten und weltweit verbreiteten ET-15 Klons [Ashton *et al.* 1991, Erickson *et al.* 1998, De Wals *et al.* 1996, Kriz *et al.* 1995, Krizova *et al.* 1995, Krizova *et al.* 1997] ausnahmslos Träger von pJS-B sind. Da pJS-B bei der klonalen Expansion von *Cluster* A4, ET-37 und insbesondere ET-15 Meningokokken konserviert blieb, ist anzunehmen, dass das Plasmid mit Selektionsvorteilen für seinen Wirt verbunden ist: Die Replikation von Plasmiden kostet ihren Wirt Stoffwechselenergie. Sie bleiben daher in der Regel nur unter einem gewissen Selektionsdruck in einem Klon erhalten. Im Fall von pJS-A sind plasmidkodierte Virulenzeigenschaften ebenfalls unwahrscheinlich, zumal es nur aus einer kleinen Gruppe von Subgruppe VI Stämmen isoliert werden konnte, die in der Literatur nicht als besonders virulent hervorgehoben wird [Grahlow *et al.* 1990, Hilse *et al.* 2000]. Die Funktion der Plasmide pJS-A und pJS-B bleibt somit bis auf Weiteres ungeklärt. Beide sind kryptisch.

Auch Überlegungen zum Replikationsmechanismus von pJS-A und pJS-B wurden durch den Sequenzvergleich mit den Datenbanken nicht vorangebracht. Beide Plasmide kodieren nicht für Proteine, welche bekannten *Rep*-Proteinen homolog sind. Auch fehlen *Iterons*, *Direct Repeats*, die einem möglichen *Rep*-Protein als Erkennungsstelle dienen könnten [Del Solar *et al.* 1998, Helinski *et al.* 1996]. Wegen seiner geringen Größe — die kleinsten bekannten Plasmide liegen in einem Bereich von 1,2 kb [Helinski *et al.* 1996] — kann insbesondere für das kleinere pJS-A eine Replikation nach dem *Rolling-Circle*-Mechanismus in Erwägung gezogen werden: Plasmide von weniger als 10kb replizieren auch in gramnegativen Spezies gelegentlich nach dem *RC*-Mechanismus [Del Solar *et al.* 1998]. Ein möglicher Replikationsursprung für pJS-A ist die *Repeat*-Region an Position 302-436, welche drei *Inverted Repeats* beherbergt und einen hohen AT-Gehalt aufweist. Vergleichbare Konstellationen sind für die *RC*-Replikation charakteristisch [Del Solar *et al.* 1998]. Die Sequenzanalyse von pJS-A ergab jedoch keinen Hinweis auf Homologien zu Enzymen der *RC*-Replikation.

Nun bestehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten: Zum einen können beide Plasmide eigene Replikationsstrategien besitzen — unter Verwendung von neuartigen Replikationsenzymen ohne Homologien zu Datenbankeinträgen. Zum anderen stellt sich die Frage, ob sie überhaupt zur Replikation in der Lage sind. Im Fall von pJS-B spricht einiges gegen seine Fähigkeit zur eigenständigen Replikation. Zunächst

besteht mit der chromosomalen Integration von pJS-B eine Möglichkeit, gemeinsam mit dem Bakterienchromosom zu replizieren und so auch ohne selbständige Replikation zu bestehen. In Plasmidpräparationen konnte das zirkuläre pJS-B nur in sehr geringer Ausbeute gewonnen werden. Um Plasmidmengen zu gewinnen, die im Agarosegel sichtbar gemacht werden konnten, musste das Bakterienmaterial einer halben, dicht bewachsenen Agarplatte präpariert und vollständig analysiert werden. Zur Darstellung bekannter *Multicopy*-Plasmide wie beispielsweise pBCTM SK (+) wird nur ein Bruchteil dessen benötigt. Wir schlossen daher auf eine extrem niedrige Kopienzahl von pJS-B. Wir halten es sogar für möglich, dass pJS-B nicht in jeder Bakterienzelle als zirkuläres DNA-Element vorliegt und nur sporadisch aus dem Bakteriengenom exzidiert wird. In diesem Zusammenhang erscheint nochmals die Frage von Bedeutung, warum der Stamm #2375 pJS-B nur in der chromosomalen Integration enthält und es niemals zur Bildung der zirkulären Form kommt. Aus dem Stamm #537 lassen sich im Gegensatz dazu beständig höhere Plasmidmengen isolieren als aus anderen Trägern von pJS-B. Für beide Phänomene könnten Mutationen im Bereich der *Inverted Repeats* IR1/IR2 oder in Rekombinase-Genen verantwortlich sein, welche dazu führen, dass das zirkuläre DNA-Element nicht oder aber besonders häufig exzidiert wird.

Das Plasmid pJS-A existiert nicht als chromosomale Kopie und konnte aus allen plasmidtragenden Stämmen mit guter Ausbeute isoliert werden, was auf eine mittlere bis hohe Kopienzahl hinweist. Diese Befunde sprechen für die Replikationsfähigkeit des Plasmids. Wie im Abschnitt 3.2.3 beschrieben, gelang es jedoch nicht, Derivate von pJS-A in plasmidfreie Meningokokken zu mobilisieren. Sie replizierten dort nicht. Dies kann jedoch durch die methodischen Umstände plausibel erklärt werden, ohne die Replikationsfähigkeit von pJS-A grundsätzlich in Frage zu stellen. Als Selektionsmarker wurden Resistenzkassetten in pJS-A eingesetzt. Da das Plasmid mit 1,986 kb sehr klein ist, reagierte es wahrscheinlich empfindlich auf die Insertion, mit der replikationswichtige Strukturen in ihrer Kontinuität durchtrennt wurden. Für Transformationsversuche wurden Meningokokken als Rezipienten eingesetzt, die selbst nicht wie die Träger von pJS-A der Subgruppe VI angehören, sondern anderen klonalen Linien und Serogruppen, darunter der ET-37 Stamm #2120 und der ET-5 Stamm MC58. Es ist jedoch möglich, dass pJS-A nur innerhalb der Subgruppe VI bestehen und replizieren kann. Angehörige der Subgruppe VI sind aber, wie auch andere Serogruppe A Meningokokken, praktisch nicht natürlich

kompetent und daher für die Transformation ungeeignet. Transformationsversuche mit plasmidfreien Subgruppe VI Meningokokken blieben daher erwartungsgemäß ohne Erfolg.

Es kann zusammengefasst werden, dass insbesondere für das DNA-Element pJS-B eine eigenständige Replikation unwahrscheinlich ist. Nun definiert sich aber die Bezeichnung *Plasmid* gerade über die Fähigkeit extrachromosomaler DNA, autonom, vom bakteriellen Chromosom unabhängig zu replizieren [Del Solar *et al.* 1998, Helinski *et al.* 1996] und muss dem DNA-Element pJS-B konsequenterweise abgesprochen werden. Die eigenständige Replikation von pJS-A ist anzunehmen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

128 Meningokokkenstämme unterschiedlicher klonaler Linien und Serogruppen aus verschiedenen Ländern wurden im Rahmen eines *Screenings* auf die Präsenz von Plasmiden untersucht. Aus 66% der Stämme konnten Plasmide isoliert werden. Diese waren innerhalb der verschiedenen klonalen Linien spezifisch verteilt. Das 1,986 kb große Plasmid pJS-A (EMBL *Accession Number* AJ238491) fand sich ausschließlich in Serogruppe A Stämmen der Subgruppe VI. Das 7,245 kb große Plasmid pJS-B (EMBL *Accession Number* AJ277475) wurde in 91% der untersuchten ET-37 Stämme und in 67% der nahe verwandten *Cluster* A4 Stämme gefunden. Es ist ein hochspezifischer Marker für diese klonalen Linien. Aus Vertretern des ET-5 Komplexes konnten keine Plasmide isoliert werden.

Die Plasmide pJS-A und pJS-B wurden vollständig sequenziert. Beide zeichnen sich durch einen für Meningokokken untypisch hohen AT-Gehalt aus (pJS-A: 55,4%, pJS-B: 57,9%). Auf pJS-A befinden sich zwei, auf pJS-B acht offene Leseraster. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergab für beide Plasmide keine signifikanten Homologien zu Datenbankeinträgen. Für pJS-B wurde an Position 20 bis 307 eine 93%ige Identität mit einer für das Genom des Gonokokkenstammes MS11-A beschriebenen Region festgestellt, welche die beiden *Inverted Repeats* IR1 und IR2 enthält und dem Gen *pivNG* benachbart ist, das für eine Rekombinase kodiert. Bei der *Repeat*-Region auf dem Genom von MS11-A handelt es sich möglicherweise um eine Rekombinationsstelle [Carrick *et al.* 1998, EMBL *Accession Number* U65994]. Es konnte gezeigt werden, dass pJS-B über seine homologe *Repeat*-Region chromosomal integriert. Ob es jedoch als wirkliches Plasmid eigenständig replizieren kann, bleibt zweifelhaft.

pJS-A und pJS-B stellen Beispiele für die spezifische und stabile Verteilung von DNA-Elementen in einer Bakterienpopulation dar, die sich grundsätzlich durch genetische Vielfalt und regen Austausch von DNA auszeichnet. pJS-B ist eines von vielen DNA-Elementen, die für den ET-37 Komplex und den *Cluster* A4 spezifisch sind [Caugant *et al.* 1986, Claus *et al.* 2000, Claus *et al.* 2001, Wang *et al.* 1993]. Dies unterstützt das Konzept der genetischen Isolierung dieser hypervirulenten Linien.

6 LITERATURVERZEICHNIS

6.1 Bücher

- Brandis H, Köhler W, Eggers HJ, Pulverer G.** Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag 1994, 7. Auflage
- Cartwright K.** Meningococcal disease. John Wiley & Sons Ltd 1995
- Holt JG.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins 1984
- Lewin B.** Genes. Oxford University Press 1997, 6. Ausgabe
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock.** Biology of microorganisms. Prentice Hall 1997, 8. Ausgabe
- Stryer L.** Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag 1996, 4. deutsche Auflage

6.2 Originalarbeiten

- Aalen RB, Gunderson WB.** Polypeptides encoded by cryptic plasmids from *Neisseria gonorrhoeae*. Plasmid 1985; 14: 209-216
- Achtman M.** Global epidemiology of meningococcal disease. Meningococcal disease. Edited by Cartwright K, John Wiley & Sons Ltd 1995
- Alber D, Oberkötter M, Suerbaum S, Claus H, Frosch M, Vogel U.** Genetic diversity of *Neisseria lactamica* strains from epidemiologically defined carriers. J Clin Microbiol 2001; 39:1710-1715
- Ashton FE, Ryan JA, Borczyk A, Caugant DA, Mancino L, Huang D:** Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis* serotype 2a that is associated with meningococcal group C disease in Canada. J Clin Microbiol 1991; 39:2489-2493
- Bäckmann A, Danielson D, Olcén P.** Plasmid carriage and antibiotic susceptibility of *Neisseria meningitidis* strains isolated in Sweden 1981-1990. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993; 12:683-689
- Bäckmann A, Orvelid P, Vasquez JA, Sköld O, Olcén P.** Complete sequence of a β -lactamase-encoding plasmid in *Neisseria meningitidis*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:210-212
- Bart A, Dankert J, van Der Ende A.** Representational difference analysis of *Neisseria meningitidis* identifies sequences that are specific for the hyper-virulent Lineage III Clone. FEMS Microbiol Lett 2000; 188:111-114
- Berg T, Firth N, Apisiridej S, Hettiaratchi A, Leelaporn A, Skurray RA.** Complete nucleotide sequence of pSK41: Evolution of staphylococcal conjugative multiresistance plasmids. J Bac 1998; 180:4350-4359
- Bhatti AR, O'Hara K, White LA, Bryan LE.** Presence of plasmid deoxyribonucleic acid in *Neisseria meningitidis*. FEMS Microbiology Letters 1981; 10:175-177
- Birnboim HC, Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979; 7:1513-1523

- Borrow R, Claus H, Guiver M, Smart L, Jones DM, Kaczmarek EB, Frosch M, Fox AJ.** Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B and C infection by a sialyltransferase (*siaD*) PCR ELISA. *Epid Infect* 1997; 118:111-117
- Bowler LD, Zhang QY, Riou JY, Spratt BG.** Interspecies recombination between the *penA* genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species during the emergence of penicillin resistance in *N. meningitidis*: natural events and laboratory simulation. *J Bacteriol* 1994; 176:333-337
- Brandtzaeg P, Kierulf P, Gaustad P, Skulberg A, Bruun JN, Halvorsen S et al.** Plasma endotoxin as predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis* 1989; 159:195-204
- Brandtzaeg P.** Pathogenesis of meningococcal infections. Meningococcal disease. Edited by Cartwright K, John Wiley & Sons Ltd 1995
- Brett MSY.** Conjugal transfer of gonococcal β -lactamase and conjugative plasmids to *Neisseria meningitidis*, *J Antimicrob Chemother* 1989; 24: 875-879
- Byrne ME, Gillespie MT, Skurray RA.** 4',4'' adenylyltransferase activity on conjugative plasmids isolated from *Staphylococcus aureus* is encoded on an integrated copy of pUB110. *Plasmid* 1991; 25:70-75
- Caparon MG, Scott JR.** Excision and insertion of the conjugative transposon Tn916 involves a novel recombination mechanism. *Cell* 1989; 59:1027-1034
- Carrick CS, Fyfe JA, Davies JK.** *Neisseria gonorrhoeae* contains multiple copies of a gene that may encode a site specific recombinase and is associated with DNA arrangements. *Gene* 1998; 220:21-29
- Cartwright K, Stuart JM, Jones DM, Noah ND.** The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epid Infect* 1987; 99:591-601
- Cartwright K.** Introduction and historical aspects. In: Meningococcal disease. Edited by Cartwright K, John Wiley & Sons Ltd 1995
- Cartwright K.** Meningococcal Carriage and Disease. In: Meningococcal disease. Edited by Cartwright K, John Wiley & Sons Ltd 1995
- Caugant DA, Bovre K, Gaustad P, Bryn K, Holten E, Hoiby EA, Froholm LO.** Multilocus genotypes determined by enzyme electrophoresis of *Neisseria meningitidis* isolated from patients with systemic disease and from healthy carriers. *J Gen Microbiol* 1986; 132:641-652
- Caugant DA, Kristiansen BE, Froholm LO, Bovre K, Selander RK.** Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. *Infect Immun* 1988; 56:2060-2068
- Caugant DA, Mocca LF, Frasch CE, Froholm LO, Zollinger WD, Selander RK.** Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J Bac* 1987; 169:2781-2792
- Claus H, Friedrich A, Frosch M, Vogel U.** Differential distribution of two novel restriction-modification systems in clonal lineages of *Neisseria meningitidis*. *J Bac* 2000; 182:1296-1303

- Claus H, Stoevesandt J, Frosch M, Vogel U.** Genetic isolation of meningococci of the electrophoretic type 37 complex. *J Bacteriol* 2001; 183:2570-5
- Clewell DB, Gawron-Burke C.** Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. *Annu Rev Microbiol* 1986; 40:635-659
- Coen PG, Cartwright K, Stuart J.** Mathematical modelling of infection and disease due to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*. *Int J Epid* 2000; 29:180-188
- Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory MP, Stainier I.** The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62:1315-1352
- Costantino P, Viti S, Podda A, Velmonte MA, Nencioni L, Rappuoli R.** Development and phase 1 clinical testing of a conjugate vaccine against meningococcus A and C. *Vaccine* 1992; 10:691-698
- Critchton PB, Old DC, Taylor A, Rankin SC.** Characterisation of strains of *Salmonella* serotype Livingstone by multiple typing. *J Med Microbiol* 1996; 44:325
- Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS.** The *Neisseriae*. In: Gotschlich EC, ed. *Microbiology* (3rd edition). Harper 1980 635-644
- De Wals P, Dionne M, Douville Fradet M, Boulianne N, Drapeau J, De Serres G.** Impact of a mass immunisation campaign against serogroup C meningococcus in the province of Quebec, Canada. *Bull World Health Organ* 1996; 74:407-411
- De Wals P, Hertoghe L, Borlée-Grimée I, De Maeyer-Cleempoel S, Reginster-Haneuse G, Dachy A et al.** Meningococcal disease in Belgium. Secondary attack rate among household, day-care nursery and pre-elementary school contacts. *J Infect* 1981; 3(Suppl.1):53-61
- Dekegel M, Dekegel D.** Les plasmides chez *Neisseria meningitidis*. *Médecine Tropicale* 1983; 43:149-152
- Del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarría MJ, Espinosa M, Díaz-Orejaz R.** Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62:434-464
- Dillon JR, Pauzé M, Yeung KH.** Spread of penicillinase-producing and transfer plasmids from the gonococcus to *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 1983; i: 779-781
- Elkins C, Thomas CE, Seifert HS, Sparling PF.** Species-specific uptake of DNA by gonococci is mediated by a 10-base-pair sequence. *J Bacteriol.* 1991; 173:3911-3.
- Elwell LP, Roberts M, Mayer LW, Falkow S.** Plasmid-mediated β -lactamase production in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 11: 528-533
- Engelkirk PG, Schoenhard DE.** Physical evidence of a plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis* 1972; 127: 197-200
- Erickson L, De Wals P.** Complications and sequelae of meningococcal disease in Quebec, Canada, 1990-1994. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1159-1164

- Facinelli B, Montanari MP, Piermattei P.** Plasmid deoxyribonucleic acid in throat and cerebrospinal fluid isolates of *Neisseria meningitidis*. *Europ J Epidemiol* 1987; 3: 206-208
- Facinelli B, Varaldo PE.** Plasmid-mediated sulfonamide resistance in *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1642-1643
- Fairly C, White J, Begg N.** Fast-tracking meningococcal vaccination. *Lancet* 1994; 344: 1164-1165
- Filippov AA, Solodovnikov NS, Kookleva LM, Protsenko OA.** Plasmid content in *Yersinia pestis* strains of different origin. *FEMS Microbiol Lett* 1990. 67:45-48
- Firth N, Apisiridej S, Berg T, O'Rourke BA, Curnock S, Dyke KG, Skurray RA.** Replication of staphylococcal multiresistance plasmids. *J Bac* 2000; 182:2170-2178
- Flexner S.** Mode of infection, means of prevention and specific treatment of epidemic meningitis. New York: Rockefeller Institute for Medical Research 1917
- Foster RS, Foster GC.** Electrophoretic comparison of endonuclease-digested plasmids from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bac* 1976; 126: 1297-1304
- Frasch CE, Zollinger WD, Poolman JT.** Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis* 1985; 7: 504-510
- Frasch CE.** Meningococcal Vaccines: Past, Present and Future. Meningococcal disease. Edited by Cartwright K, John Wiley & Sons Ltd 1995
- Friderichsen C.** Nebennierenapoplexie bei kleinen Kindern. *Jb Kinderheilk* 1918; 87: 109-125
- Frosch M, Weisberger C, Meyer TF.** Molecular characterisation and expression in *Escherichia coli* of the gene complex encoding the polysaccharide capsule of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1669-1673
- Frosch M.** Meningokokken-Impfstoffe, aktueller Stand und zukünftige Entwicklungen. *Dt Ärzteblatt* 1999; Heft 51-52:34-36
- Gascoyne-Binzi DM, Heritage J, Hawkey PM, Sprott MS.** Characterisation of a *TetM*-carrying plasmid from *Neisseria meningitidis*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34:1015-1023
- Gascoyne-Binzi DM, Heritage J, Hawkey PM.** Nucleotide sequences of the *TetM* genes from the American and Dutch type tetracycline resistance plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32: 667-676
- Gold R, Goldschneider I, Lepow ML, Draper TF, Randolph M.** Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. *J Infect Dis* 1978; 137:112-121
- Goodman DS, Scocca JJ.** Identification and arrangement of the DNA sequence recognised in specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:6982-6986
- Gotschlich EC, Goldschneider I, Artenstein MS.** Human immunity to the meningococcus IV. Immunogenicity of serogroup A and serogroup C polysaccharides in human volunteers. *J Exp Med* 1969; 129:1367-1384

- Grahlow WD, Caugant DA, Hoiby EA, Selander RK.** Occurrence of clones of the ET-5 complex of *Neisseria meningitidis* in the German Democratic Republic. *Z Klin Med* 1990; 45: 947-950
- Graves JF, Biswas GD, Sparling PF.** Sequence specific DNA uptake in transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bac* 1982; 152: 1071-1077
- Grimholt U, Olsaker I, Aalen R, Gundersen WB.** Homology between cryptic plasmid from *Neisseria gonorrhoeae* and genomic DNA from *Neisseria meningitidis*. *APMIS* 1993; 101: 201-206
- Gupta S, Anderson RM.** Population structure of pathogens: the role of immune selection. *Parasitol Today* 1999; 15:497-501
- Gupta S, Maiden MC, Feavers IM, Nee S, May RM, Anderson RM.** The maintenance of strain structure in populations of recombining infectious agents. *Nat Med* 1996; 2:437-442
- Hagblom P, Korch C, Jonsson AB, Normark S.** Intragenetic variation by site-specific recombination in the cryptic plasmid of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bac* 1986; 167: 231-237
- Hammerschmidt S, Hilse R, van Putten JP, Gerardy-Schahn R, Unkmeir A, Frosch M.** Modulation of cell surface sialic acid expression sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO J* 1996; 15:192-198
- Hammerschmidt S, Müller A, Sillmann H, Mühlenhoff M, Borrow R, Fox A, van Putten JP, Zollinger WD, Gerardy-Schahn R, Frosch M.** 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* 1996; 20:1211-1220
- Helinski DR, Toukdarian AE, Novick RP.** Replication control and other stable maintenance mechanisms of plasmids. In: Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham J, Lin ECC, Brooks Low K, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE. *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and molecular biology. ASM Press 1996
- Hilse R, Stoevesandt J, Caugant DA, Claus H, Frosch M, Vogel U.** Distribution of the meningococcal insertion sequence IS1301 in clonal lineages of *Neisseria meningitidis*. *Epidemiol Infect* 2000; 124:337-340
- Hjetland R, Caugant DA, Hofstad T, Frøholm LO, Selander RK.** Serogroup A *Neisseria meningitidis* of clone III-1 in Western Norway, 1969-1973. *Scand J Infect Dis* 1990; 22:241-242
- Hollis DG, Wiggins GL, Weaver RE.** *Neisseria lactamicus* sp. n., a lactose-fermenting species resembling *Neisseria meningitidis*. *Appl Microbiol* 1969; 17:71-77
- Hoppes GM, Ellenbogen C, Gebhart RJ.** Group Y meningococcal disease in United States Air Force recruits. *Am J Med* 1977. 62:661-666
- Ikeda F, Tsujii A, Kaneko Y, Nishida M, Goto S.** Conjugal transfer of beta-lactamase-producing plasmids of *Neisseria gonorrhoeae* to *Neisseria meningitidis*. *Microb Immun* 1986; 30: 737-742

- Inuzuka N, Inuzuka M, Helinski.** Activity in vitro of three replication origins of the antibiotic resistance plasmid RSF1040. *J Biol Chem* 1980; 255:11041-11074
- Ison CA, Bellinger CM, Glynn AA.** Plasmids in throat and genital isolates of meningococci. *J Clin Pathol* 1984; 37: 1123-1128
- Jelfs J, Munro R, Ashton FE, Caugant DA.** Genetic characterisation of a new variant within the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis* associated with outbreaks in various parts of the world. *Epid Infect* 2000; 125:285-298
- Jochmann G.** Versuche zur Serodiagnostik und Serothérapie der epidemischen Genickstarre. *Dtsch Med Wschr* 1906; 32: 788-793
- Jolley KA, Kalmusova J, Feil EJ, Gupta S, Musilek M, Kriz P, Maiden MC.** Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4492-4498
- Jones DM, Borrow R, Fox AJ, Gray S, Cartwright KA, Poolman JT.** The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. *Microb Path* 1992; 13: 219-224
- Jones DM.** Epidemiology of meningococcal disease in Europe and the USA. *Meningococcal Disease*. Edited by Cartwright K, John Wiley & Sons Ltd 1995
- Kabat EA, Bezer AE.** The effect of variation on molecular weight on the antigenicity of dextran in man. *Arch Biochem* 1958; 78:306-313
- Kabat EA, Kaiser H, Sikorski H.** Preparation of the type-specific polysaccharide of the type I meningococcus and a study of its effectiveness as an antigen in human beings. *J Exp Med* 1945; 80:299-307
- Knapp JS, Zenilman JM, Biddle JW, Perkins GH, DeWitt WE, Thomas ML, Johnson SR, Morse SA.** Frequency and distribution in the United States of strains of *Neisseria gonorrhoeae* with plasmid-mediated, high-level resistance to tetracycline. *J Infect Dis* 1987; 155: 819-822
- Kolle W, Wassermann A.** Versuche zur Gewinnung und Wertbestimmung eines Meningokokkenserums. *Dtsch Med Wschr* 1906; 32:609-12
- Kriz P, Vlckova J, Bobak M.** Targeted vaccination with meningococcal polysaccharide vaccine in one district of the Czech Republic. *Epidemiol Infect* 1995; 115:411-418
- Krizova P, Musilek M, Kalmusova J.** Development of the epidemiological situation in invasive meningococcal disease in the Czech republic caused by emerging *Neisseria meningitidis* Clone ET-15/37. *Cent. Eur. J. Public Health* 1997; 5:214-218
- Krizova P, Musilek M.** Changing epidemiology of meningococcal invasive disease in the Czech republic caused by new clone *Neisseria meningitidis* C:2a:P1.2(P1.5), ET15-37. *Cent. Eur. J. Public Health* 1995; 3:189-194
- Kupsch EM, Aubel D, Gibbs CP, Kahrs AF, Rudel T, Meyer TF.** Construction of Hermes shuttle vectors: a versatile system for genetic complementation of transformable and non-transformable *Neisseria* mutants. *Mol Gen Genet* 1996; 250:558-569

- Lawrence JG, Ochmann H.** Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J Mol Evol* 1997; 44:383-397
- Lederberg J.** *Physiol Rev* 1952; 32:403-430
- Levin BR.** Periodic selection, infectious gene exchange and the genetic structure of *E. coli* populations. *Genetics* 1981; 99:1-23
- Lindler LE, Gregory VP, Burland V, Mayhew GF, Blattner FR.** Complete DNA sequence and detailed analysis of the *Yersinia pestis* KIM5 plasmid encoding murine toxin and capsular antigen. *Inf Immun* 1998; 66:5731-5742
- Linz B, Schenker M, Zhu P, Achtman M.** Frequent interspecific genetic exchange between commensal *Neisseriae* and *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 2000; 36:1049-1058.
- Lyon BR, Skurray R.** Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev* 1987; 52:88-134
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russel JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA et al.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1998; 95:3140-3145
- Maiden MC, Malorny B, Achtman M.** A global gene pool in the *Neisseriae*. *Mol Microbiol* 1996; 21:1297-1298
- McLeod Giffis J.** Mechanisms of host immunity. Meningococcal disease. Edited by Cartwright K, John Wiley & Sons Ltd 1995
- Miller E, Ramsay M, Rush M, Gungabissoon U, Borrow R, Mallard RH, Kaczmarski EB.** Impact of meningococcal C conjugate (MCC) vaccination programme in the UK. Abstr. 12th Int. pathog. *Neisseria* Conf., p.42, 2000
- Morrison DC, Ryan JL.** Endotoxins and disease mechanisms. *Ann Rev Med* 1987; 38:417-432
- Morse SA, Johnson SR, Biddle JW, Roberts MC.** High-Level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM determinant. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30: 664-670
- Oggioni MR, Dowson CG, Smith JM, Proveddi R, Pozzi G.** The tetracycline resistance gene *tetM* exhibits mosaic structure. *Plasmid* 1996; 35: 156-163
- Olcén P, Barr J, Kjellander J.** Meningitis and bacteraemia due to *Neisseria meningitidis*: clinical and laboratory findings in 69 cases from Orebro county, 1965 to 1977. *Scand J Infect Dis* 1979; 11: 111-119
- Parkhill J, Achtman M, James KD et al.** Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. *Nature* 2000; 404: 502-506
- Peltola H.** Meningococcal disease: still with us. *Rev Infect Dis* 1983; 5:71-91
- Perry PD, Fetherston JD.** *Yersinia pestis* — etiologic agent of plague. *Clin Microb Rev* 1997; 10:35-66
- Poolman JT, van der Ley PA, Tomassen J.** Surface Structures and Secreted Products of Meningococci. Meningococcal disease. Edited by Cartwright K, John Wiley & Sons Ltd 1995

- Popovic T, Schmink S, Rosenstein N, Ajello GW, Reeves MW, Plikaytis B, Hunter SB, Ribot EM, Boxrud D, Tondella ML, Kim C, Noble C, Mothershed E, Besser J, Perkins BA.** Evaluation of pulsed field gel electrophoresis in epidemiological investigations of meningococcal disease outbreaks caused by *Neisseria meningitidis* serogroup C. *J Clin Microbiol* 2001; 39:75-85
- Protsenko OA, Filippov AA, Kutyrev VV.** Integration of the plasmid encoding the synthesis of capsular antigen and murine toxin into the *Yersinia pestis* chromosome. *Microb Pathog* 1991; 11:123-128
- Richmond P, Borrow R, Miller E, Clark S, Sadler F, Fox A, Begg N, Morris R, Cartwright K.** Meningococcal serogroup C conjugate vaccine is immunogenic in infancy and primes for memory. *J Infect Dis* 1999; 179:1569-1572
- Ridley AM, Threlfall EJ, Rowe B.** Genotypic characterisation of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2314-2321
- Roberts M, Elwell LP, Falkow S.** Molecular characterisation of two β -lactamase-specifying plasmids isolated from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bac* 1977; 131:557-563
- Roberts M, Knapp J.** Host range of the conjugative 25.2-megadalton tetracycline resistance plasmid from *Neisseria gonorrhoeae* and related species. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:488-491
- Roberts M, Piot P, Falkow S.** The ecology of gonococcal plasmids. *J Gen Microbiol* 1979; 114: 491-494
- Rosenstein N, Perkins BA, Stephens DS, Lefkowitz L, Carrter ML, Danila R, Cieslak P, Shutt KA, Popovic T, Schuchat A, Harrison LH, Reingold AL.** The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States. *J Infect Dis* 1999; 180:1894-1901
- Shalita Z, Murphy E, Novick RP.** Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*: structural and evolutionary relationships. *Plasmid* 1980; 3:291-311
- Smith HO, Gwinn ML, Salzberg SL.** DNA uptake signal sequences in naturally transformable bacteria. *Res Microbiol* 1999; 150:603-616
- Sodeinde OA, Goguen JD.** Genetic analysis of the 9,6 kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. *Infect Immun* 1988; 56:2743-2748
- Sox TE, Mohammed W, Blackman E, Biswas G, Sparling PF.** Conjugative plasmids in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bac* 1978; 134: 278-286
- Sparling PF, Biwas G, Graves J, Blackman.** Plasmids of the gonococcus. In: *Molecular biology, pathogenicity and ecology of bacterial plasmids*. Edited by Levy SB, Clowes RC, Koenig EL. Plenum, 1981, pp 1293-1300
- Sparling PF, Sox TE, Mohammed W, Guymon LF.** Antibiotic resistance in the gonococcus: diverse mechanisms of coping with a hostile environment. In: *Immunobiology of Neisseria gonorrhoeae*. Edited by Brooks GF, Gotschlich EC, Holmes KK, Sawyer WD, Young FE. American Society for Microbiology, Washington DC 1978

Stanwell-Smith RE, Stuart JM, Hughes AO, Robinson P, Griffin MB, Cartwright K. Smoking, the environment and meningococcal disease: a case control study. *Epidemiol Infect* 1994; 112:315-328

Steven N, Wood M. The clinical spectrum of meningococcal disease. In: *Meningococcal disease*. Edited by Cartwright K. John Wiley & Sons Ltd 1995

Stuart JM, Cartwright K, Dawson JA, Rickard J, Noah ND. Risk factors for meningococcal disease: a case control study in south west England. *Commun Med* 1988; 10:139-146

Swartley JS, Marfin AA, Edupugant S, Liu LJ, Cieslak P, Perkins B, Wenger JD, Stephens DS. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 271-276

Swartley JS, McAllister CF, Hajjeh RA, Heinrich DW, Stephens DS. Deletions of Tn916-like transposons are implicated in *TetM*-mediated resistance in pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 1993; 10:299-310

Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J et al. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* 2000; 287: 1809-1815

Toews WH, Bass JW. Skin manifestations of meningococcal infection; an immediate indicator of prognosis. *Am J Dis Child* 1974; 127: 173-176

Vásquez JA, Berrón S, O'Rourke M, Carpenter, Feil E, Smith NH, Spratt BG. Interspecies recombination in nature: a meningococcus has acquired a gonococcal PIB porin. *Mol Microbiol* 1995; 15:1001-1007

Verschueren H, Dekegel M, Dekegel D, Gilquin D, DeMayer S. Plasmids in *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 1982; i: 851-852

Vieusseux M. Mémoire sur la maladie qui a régné à Genève au printemps de 1805. *J Méd Chir Pharmacol* 1806; 11: 163-182

Vogel U, Claus H, Frosch M. Molecular basis for distinction of the ET-15 clone within the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:941-942

Vogel U, Claus H, Frosch M. Rapid serogroup switching in *Neisseria meningitidis*. *NEJM* 2000; 342:219-220

Vogel U, Morelli G, Zurth K, Claus H, Kriener E, Achtman M, Frosch M. Necessity of molecular techniques to distinguish between *Neisseria meningitidis* strains isolated from patients with meningococcal disease and from their healthy contacts. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2465-2470

Wang JF, Caugant DA, Morelli G, Koumare B, Achtman M. Antigenic and epidemiologic properties of the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 1993; 167:1320-1329

Waterhouse R. A case of supra-renal apoplexy. *Lancet* 1911; i: 577-578

Weichselbaum A. Über die Ätiologie der akuten Meningitis cerebro-spinalis. *Fortschr Med* 1887; 5: 573-583, 620-626

Wray C, McLaren IM, Jones YE. The epidemiology of *Salmonella typhimurium* in cattle: plasmid profile analysis of definitive phage type (DT) 204c; *J Med Microbiol* 1998; 47:483-487

7 ANHANG

7.1 Anhang A. Plasmidverteilung in Meningokokken verschiedener klonaler Linien

Tabelle A1. Plasmid-Präparation aus 111 Meningokokkenstämmen verschiedener klonaler Linien und 8 apathogenen Neisserien-Stämmen. Plasmid-DNA wurde in einer modifizierten Form der alkalischen Lyse nach Birnboim [Birnboim 1979] extrahiert. Die Stämme sind entsprechend den Stammsammlungsnummern des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg geordnet.

Nr.	Externe Nummer ⁵	Sero-gruppe	Serotyp / Subserotyp ⁶	ET ⁷	ST	Land ⁸ (Jahr)	Plasmid ⁹
135			<i>N. lactamica</i>				-
136			<i>N. lactamica</i>				+
171		W-135	NT:P1.10	37c			pJS-B
172		Y	2a:P1.2	37c	166		-
517	PB24	B		5c	32	NOR (85)	-
531	P54	B		37c		NOR (70)	pJS-B
532	P139	B		37c		NOR (74)	pJS-B
533		B		37c		NOR	pJS-B
534	P20	B		37c	11	NOR (69)	pJS-B
535	P165	B		37c		NOR (74)	pJS-B
536	P179	C		37c		NOR	pJS-B
537	P114	C		37c			pJS-B
538	P200	C		37c			pJS-B
539	P233	C		37c			pJS-B
540		C		37c			pJS-B
939	S/H01052	B	15:P1.16	5c		UK	-

⁵ Angegeben ist die originale Stammbezeichnung bei Stämmen, welche dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg aus anderen Sammlungen zur Verfügung gestellt wurden.

⁶ Bei apathogenen Neisserien-Arten werden in dieser Spalte die Spezies-Namen angegeben. NT = nicht bestimmt.

⁷ Die Bezeichnungen der klonalen Linien ist abgekürzt: 5c = ET-5 Komplex, 37c = ET-37 Komplex, 37c (15) = ET-15 Klon des ET-37 Komplexes, IV-2 = Subgruppe IV-2, VI = Subgruppe VI. Arabische Ziffern bezeichnen einzelne elektrophoretische Typen. NT = nicht bestimmt.

⁸ Die Herkunftsländer der Isolate sind abgekürzt: ARG = Argentinien, AU = Österreich, AUS = Australien, CAN = Kanada, CHIN = China, CHILE = Chile, CZ = ehemalige Tschechoslowakei, D = Bundesrepublik Deutschland, DDR = ehemalige DDR, DK = Dänemark, F = Frankreich, ITAL = Italien, MALI = Mali, NED = Niederlande, NOR = Norwegen, SCO = Schottland, UK = Großbritannien, USA = Vereinigte Staaten von Amerika, USSR = ehemalige Sowietunion

⁹ Das Pluszeichen steht für andere Plasmide als pJS-A und pJS-B.

940	K00454	B	15:P1.16	5c		UK	-
1055	B1940	B	NT:P1.3,6,15			D	-
1110	344/94	C		37c		ARG (94)	pJS-B
1111	340/94	C		37c		ARG (94)	pJS-B
1112	94/N370	C		37c (15)		AUS (94)	pJS-B
1114	546	A	NT	VI		USSR (89)	+
1118	78/7115	A	NT	VI		SCO (78)	-
1124	B435	A	21:P1.3			SCO (83)	-
1125	83/4290	A	NT			SCO (83)	-
1126	B272	A	4,21:P1.10	IV-2		USA	+
1128	355	C		37c		AU (90)	pJS-B
1133	10/95	C		37c (15)		NOR (95)	pJS-B
1134	323/85	A	4:NT	VI		DDR (85)	pJS-A
1135	322/85	A		VI		DDR (85)	pJS-A
1137	401	C		37c (15)		AU (91)	pJS-B
1138	332/85	C	4,21:P1.10	VI		DDR (85)	pJS-A
1140	79/4196	A	NT			SCO (79)	+
2001	44/76-3	B	15:P1.16	5c	32	NOR	-
2002	BB333	C		A4		USA (84)	-
2003	J340/88	C		A4		UK (88)	pJS-B
2004	198/87	C		63		NOR (87)	+
2005	29026	C		66		CHIN (86)	-
2008	88/42008	C		42		SCO (88)	-
2009	61/76	C		33		DK (76)	-
2012	902/85	C		35		CZ (85)	-
2014	6756	C		34		F (87)	-
2018	500	C	2a	37c	11	ITAL (84)	pJS-B
2019	BZ10	B	2a:P1.2	A4	8	NED (67)	pJS-B
2020	BZ47	B	NT	164		NED (76)	-
2021	BZ83	B	NT	5c	34	NED (84)	-
2027	BZ163	B	2b:P1.2	A4	9	NED (79)	pJS-B
2035	329/85	B	15:P1.16	5c	32	DDR (85)	-
2042	H41	B	NT		27	NOR (88)	-
2058	Z4701	B		37c		NOR (69)	pJS-B
2062	Z4705	B	2a:P1.2	37c		NOR (74)	pJS-B
2063	8680	B	15:P1.3	5c		CHILE (87)	-
2101	DSM4630		<i>N. cinerea</i>				-
2103	DSM4631		<i>N. mucosa</i>				-
2110	LMG5313		<i>N. subflava</i>				-

2113	LMG5290		<i>N. sicca</i>				+
2114			<i>N. lactamica</i>				-
2119			<i>N. lactamica</i>			D (97)	+
2120		C	NT:P1.5,2	37c	11	D (97)	+
2135	MC58	B	15:P1.16,17	5c		UK (83)	-
2137		A					-
2138	250690	W-135	NT:P1.5		22	UK	-
2139	251634	W-135	NT:P1.3,6		22	UK	-
2140	251635	W-135	2a:P1.2	37c	11	UK	pJS-B
2141	252316	W-135		37c	11	UK	pJS-B
2144	254232	W-135	NT:P1.6		169	UK	+
2209	BK287	C	2a:P1.2,5	37c (15)		D (98)	pJS-B
2210	VA1189	C	2a:P1.2	37c (15)		D (98)	pJS-B
2211	BK314	C	2a:P1.2	37c (15)		D (98)	pJS-B
2212	BK277	C		37c (15)		D (98)	pJS-B
2213	BK301	C		37c (15)		D (98)	pJS-B
2214	BK301	C		37c (15)		D (98)	pJS-B
2221	HD3258	Y	4:P1.5		168	D (92)	-
2225	HD3651	Y	NT:P1.2,5	37c	11	D (94)	-
2233	HD3048	W-135	NT:P1.3,6		185	D (90)	-
2235	HD3704	W-135	NT:P1.10		189	D (94)	+
2237	HD3799	W-135	NT:P1.6		22	D (94)	+
2238	HD3811	W-135	NT:P1.5		173	D (94)	-
2240	88/048	C	2a:P1.2,5	37c	11	CAN	pJS-B
2241	259/93	C	2a:P1.2,5	37c (15)	11	CZ (93)	pJS-B
2246	C5443	C		37c (15)		D	pJS-B
2315	01175/98	B	4:P1.15			D	-
2359	264/93	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (93)	pJS-B
2360	284/93	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (93)	pJS-B
2361	351/93	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (93)	pJS-B
2362	500/93	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (93)	pJS-B
2363	263/94	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (94)	pJS-B
2364	264/94	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (94)	pJS-B
2365	290/94	C	2a:P1.2,5	37c		CZ (94)	pJS-B
2366	102/95	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (95)	pJS-B
2367	106/95	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (95)	pJS-B
2368	107/95	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (95)	pJS-B
2369	122/95	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (95)	pJS-B
2370	123/95	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (95)	pJS-B

2371	318/95	C	2a:P1.2,5	37c		CZ (95)	pJS-B
2372	364/95	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (95)	pJS-B
2373	19/96	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (96)	pJS-B
2374	20/96	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (96)	pJS-B
2375	39/96	C	2a:P1.2,5	37c		CZ (96)	(pJS-B)
2376	184/97	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (97)	pJS-B
2377	185/97	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (97)	pJS-B
2378	114/98	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (98)	pJS-B
2379	115/98	C	2a:P1.2,5	37c (15)		CZ (98)	pJS-B
2431		B				D (98)	-
2524	Z6350	C		37c		MALI (94)	pJS-B
2525	Z6351	W-135	2a:P1.2	37c	11	MALI (95)	-
2591		A	NT:P1.2,6	VI		D (89)	-
2592		A	4:P1.9	VI		D (91)	-
2593		A	NT:NST	VI		D (91)	-
2594		A	4:P1.9	VI		D (91)	-
2595		A	4:NST	VI		D (95)	-
2596		A	4:P1.10	VI		D (95)	-
2597		A	21:P1.10	VI		D (96)	-
2598		A	4/21:P1.5,10	VI		D (98)	-
2599		A	4/21:P1.9	VI		D (98)	pJS-A
2698	ID30			37c		D (99)	pJS-B
2699	ID32			37c (15)		D (99)	pJS-B
2700	ID36			37c		D (99)	-
2807	FAM18	C	2a:P1.2,5	37c	11	USA (83)	-

Tabelle A2. DNA von ET-37 und Cluster A4 Stämmen (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin), im *Dot blot*-Verfahren auf die Präsenz des Plasmids pJS-B überprüft. Die eingesetzten DNA-Proben wurden von Mark Achtman, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin, zur Verfügung gestellt. Sie sind entsprechend den Z-Nummern des Max-Planck-Institutes geordnet.

Z-Nummer	ET	pJS-B
Z4181	ET-37 Komplex	+
Z4242	ET-37 Komplex	+
Z4243	ET-37 Komplex	+
Z4262	ET-37 Komplex	+
Z4323	ET-37 Komplex	+
Z4631	ET-37 Komplex	+
Z4662	<i>Cluster A4</i>	+
Z4671	<i>Cluster A4</i>	+
Z4701	ET-37 Komplex	+
Z4765	ET-37 Komplex	+
Z5163	ET-37 Komplex	+
Z6411	<i>Cluster A4</i>	-
Z6412	<i>Cluster A4</i>	+
Z6413	<i>Cluster A4</i>	-
Z6415	<i>Cluster A4</i>	-
Z6416	<i>Cluster A4</i>	+
Z6417	<i>Cluster A4</i>	+

7.2 Anhang B. Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Celsius
cfu	<i>colony forming units</i>
CIP	Alkalische Phosphatase aus Rinderdarm (<i>calf intestine phosphatase</i>)
cps	Kapselgenkomplex von <i>Neisseria meningitidis</i>
CSPD [®]	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Mischung der Desoxyribonukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP, dTTP
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DUS	DNA- <i>Uptake</i> -Sequenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	elektrophoretischer Typ
g	Erdbeschleunigung (<i>gravity</i>)
GC-Agar	Gonokokken-Agar
GEBS	Glycerin / EDTA / Bromphenolblau / N-Lauroylsarkosin
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-1-thio β-D-galaktosid
kb	Kilobasenpaare
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
μ	mikro
m	milli
M	molar
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
MLEE	Multilokus-Enzymelektrophorese
MLST	Multilokus-Sequenztypisierung
n	nano
<i>N.</i>	<i>Neisseria</i>

NTE	Natriumchlorid-Tris-EDTA-Puffer
Od _x	optische Dichte bei x nm
Orf	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PPM	Proteose-Pepton-Medium
RC-Replikation	<i>Rolling-Circle</i> -Replikation
RDA	repräsentative Differenzanalyse (<i>representational difference analysis</i>)
Rep-Protein	Protein zur Regulation der Replikation von Plasmiden
RM-System	Restriktions-Modifikations-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
R-Plasmid	Resistenzplasmid
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
SSPE	<i>saline sodium phosphate EDTA</i>
ST	Sequenztyp
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
Tet	Tetrazyklin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> (Enzymeinheit)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt

DANKSAGUNG

Herzlich danken möchte ich Prof. Dr. Ulrich Vogel für die engagierte Betreuung meiner Arbeit. Er war immer für meine Fragen offen und stand mir stets mit Rat zur Seite. Ganz besonders bin ich Dr. Heike Claus zu Dank verpflichtet. Sie hat mich unter großem Zeitaufwand in die praktische Laborarbeit eingeführt und mir zu jedem Zeitpunkt unermüdlich praktische und theoretische Hilfestellung gegeben. Auch von Frau Gabriele Heinze erhielt ich immer wieder wertvolle praktische Anregungen. Dr. Ngo Viet Quynh Tram ging mit mir durch Höhen und Tiefen des Laboralltags und brachte mir ihre vietnamesische Heimat näher. Mein besonderer Dank gilt abschließend Prof. Dr. M. Frosch, der vor Jahren in seinen Vorlesungen mein Interesse für die medizinische Mikrobiologie weckte. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht entstanden.

LEBENS LAUF

Name Johanna Stoevesandt
Geburtsdatum 16. Januar 1975
Geburtsort Hannover

Schul Ausbildung

1981 - 1985 Grundschule Nord, Rinteln
1985 - 1987 Orientierungsstufe Nord, Rinteln
1987 - 1994 Gymnasium Ernestinum, Rinteln
08.06.1994 Abitur (Note 1,0)

Freiwilliges Soziales / Diakonisches Jahr

1994 - 1995 Krankenpflege in der Maison de Santé Protestante, Nîmes, Frankreich

Hochschulausbildung

10 / 1995 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Würzburg
18.09.1997 Physikum
27.08.1998 Erstes Staatsexamen
06.09.2001 Zweites Staatsexamen
23.10.2002 Drittes Staatsexamen
(Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: 1,16)

Praktische Erfahrung

03 - 04 / 1998 Famulatur, Anästhesie, Kreiskrankenhaus Rinteln
09 - 10 / 1998 Famulatur, Accident and Emergency, Monklands General District Hospital, Airdrie, Schottland
03 - 04 / 1999 Famulatur, Mikrobiologische Routinediagnostik, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg
09 / 1999 Famulatur, Innere Medizin, Schwerpunkt Gastro-Enterologie, Maison de Santé Protestante, Nîmes, Frankreich
08 - 10 / 2000 Famulatur, Pädiatrie und Gynäkologie, Hué University Hospital, Hué, Vietnam
10 / 2001 - 02 / 2002 1. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin, Leopoldina-Krankenhaus, Schweinfurt
02 - 06 / 2002 2. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie, Portiuncula Hospital, Ballinasloe, Irland
06 - 09 / 2002 3. Tertial des Praktischen Jahres, Dermatologie, Universitätsklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten, Würzburg