

**Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. med. Matthias Frosch**

**Funktion des Transkriptionsregulators FarR in *Neisseria meningitidis***

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Carolin Julia Angelika Spatz  
aus Kleinostheim**

**Würzburg, August 2011**

**Referent: Prof. Dr. med. Oliver Kurzai**

**Koreferent: Prof. Dr. med. Hermann Einsele**

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

**Tag der mündlichen Prüfung:**

19.Juli 2012

**Die Promovendin ist Ärztin.**

## I Einleitung

1. Bedeutung und Epidemiologie von *Neisseria meningitidis*
2. Infektion, Pathogenese und Immunantwort
  - 2.1 Klinisches Bild der Meningokokken-Erkrankungen
  - 2.2 Pathogenese der Meningokokken-Meningitis
  - 2.3 Pathogenetisch wichtige Adhäsions-Moleküle in *Neisseria meningitidis*
    - 2.3.1 *Neisseria adhesin A* (nadA)
    - 2.3.2 *Opacity protein c* (Opc)
  - 2.4 Rolle der humanen Granulozyten in der Abwehr von *Neisseria meningitidis*
3. Regulation der Genexpression in Bakterien
  - 3.1 Prinzipien der Regulation
  - 3.2 Das *lac*-Operon in *Escherichia coli* als Modell der Transkriptionsregulation
4. Interaktion von DNA und Proteinen
  - 4.1 Struktur DNA-bindender Proteine: das *Helix-turn-Helix*-Motiv
  - 4.2 Bindung von Protein und Nukleinsäure
5. Der *Far*-Regulator in *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae*
  - 5.1 Das *mar*-Regulon und die MarR-Familie
  - 5.2 Struktureller Aufbau der Mar-Regulator-Proteine
  - 5.3 Der *Far*-Regulator in *Neisseria gonorrhoeae*
  - 5.4 Der *Far*-Regulator in *Neisseria meningitidis*
6. Das Zwei-Partner-Sekretions-System
  - 6.1 Einführung
  - 6.2 Allgemeiner Aufbau
  - 6.3 Aufbau und Funktion des TpsB-Transportproteins am Beispiel von *B. pertussis*
  - 6.4 Das Zwei-Partner-Sekretionssystem in *Neisseria meningitidis*
7. Ziele der Arbeit

## II Material und Methoden

1. Material
  - 1.1 Geräte
  - 1.2 Verbrauchsmaterial
  - 1.3 Reaktionskits
  - 1.4 Chemikalien
  - 1.5 Puffer und Lösungen
  - 1.6 Nährmedien und Zusätze
  - 1.7 *Neisseria gonorrhoeae*-Stämme
  - 1.8 *Neisseria meningitidis*-Stämme
  - 1.9 Oligonukleotid-Primer
  - 1.10 Software

## 2. Methoden

- 2.1 Kulturbedingungen für *Neisseria meningitidis*
- 2.2 Kulturbedingungen für *Neisseria gonorrhoeae*
- 2.3 Kryokonservierung von *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae*
- 2.4 Anlegen einer Flüssigkultur
- 2.5 Messung der Keimzahl mittels optischer Dichte
- 2.6 Bestimmen der Kolonienzahl einer Plattenkultur
- 2.7 Agarose-Gelelektrophorese
- 2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion
- 2.9 Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem *PCR-Purification-Kit*
- 2.10 Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem *Gel-Extraction-Kit*
- 2.11 Isolierung genomischer DNA aus *Neisseria meningitidis*
- 2.12 Verhalten von *Neisseria gonorrhoeae* bei Kontakt mit langkettigen Fettsäuren
  - 2.12.1 Präparation der Agarplatten
  - 2.12.2 Einstellen der Bakterienzahl
  - 2.12.3 Resistenz-Test
- 2.13 Wachstumskurve und Gewinnung von Lysaten
- 2.14 Bestimmung der Proteinkonzentration: *Bicinchoninicacid-Assay* (BCA-Assay)
- 2.15 *Sodiumdodecylsulfatpolyacrylamid-Gel-Elektrophoresis* (SDS-PAGE)
- 2.16 *Western Blot*
- 2.17 *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)
  - 2.17.1 Vorbereitung der DNA-Sonden
  - 2.17.2 Markierung der DNA-Sonden mit Digoxigenin
  - 2.17.3 *Kontrolle der Digoxigenin- Markierung*
  - 2.17.4 *Electrophoretic Mobility Shift-Reaktion*
  - 2.17.5 Southwestern-Blot und Digoxigenin-Nachweis
  - 2.17.6 Kompetitiver EMSA
  - 2.17.6 Antikörper-EMSA
- 2.18 Infektion humaner Granulozyten mit *Neisseria meningitidis*
  - 2.18.1 Isolierung humaner polymorphkerniger Leukozyten aus Vollblut
  - 2.18.2 Infektion der Granulozyten
- 2.19 Sequenzierung des *hrpB*-Gens in verschiedenen *Neisseria meningitidis*- Stämmen
  - 2.19.1 Gewinnung genomischer DNA als PCR-Template
  - 2.19.2 PCR zur Isolation und Amplifikation des Gens
  - 2.19.3 Reinigung der PCR-Produkte
  - 2.19.4. Bestimmung der DNA-Konzentration
  - 2.19.5 Sequenzierungsreaktion

### III Ergebnisse

1. Expression des Proteins FarR im Wachstumsverlauf
2. Verhalten von *Neisseria meningitidis* bei Kontakt mit Palmitinsäure
3. Verhalten von *Neisseria gonorrhoeae* bei Kontakt mit Palmitinsäure
4. *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA)
  - 4.1 *Electrophoretic Mobility Shift Assay* mit FarR und NMB0071, NMB0493, NMB1053, NMB1780, NMB1882 und NMB2053
  - 4.2 *Electrophoretic Mobility Shift Assay* mit NMB1053 und FarR-Gradient
  - 4.3 Antikörper-*Electrophoretic Mobility Shift Assay*
  - 4.4 Kompetitiver *Electrophoretic Mobility Shift Assay*
5. Infektion humaner Granulozyten mit *Neisseria meningitidis*
6. Sequenz-Analyse des *hemagglutinin/hemolysin-related protein B*-Gens (*hrpB*)
  - 6.1 Verwendete Stämme
  - 6.2 Analyse der putativen Bindestelle des Regulators FarR
  - 6.3 Alignment der *hrpB*-Nukleotid-Sequenzen mit den Referenzstämmen Z2491, MC58, FAM18 und  $\alpha$ 14
  - 7.4 Translation der *hrpB*-Nukleotid-Sequenz in die Aminosäure-Sequenz
  - 7.5 Phylogenetische Analyse
  - 7.6 Berechnung der dreidimensionalen Struktur von *hrpB*
    - 7.6.1 *Sequenz-Alignment des Neisseria meningitidis HrpB und B. pertussis FhaC*
    - 7.6.2 *Darstellung der dreidimensionalen Struktur von hrpB*

### IV Diskussion

1. Wachstumsabhängige Expression und Regulation von FarR
2. Fettsäure-Resistenz in *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae*
2. Wachstumsabhängige Expression und Regulation von FarR
3. Rolle von FarR bei der Infektion humaner Granulozyten
4. Interaktion des Transkriptionsregulators FarR mit der DNA
5. Sequenzanalyse des *hrpB*-Gens in *Neisseria meningitidis*-Isolaten
  - 5.1 Alignment der putativen FarR-Bindestelle
  - 5.2 Verteilung und phylogenetische Analyse der *hrpB*-Gene in *Neisseria meningitidis*
  - 5.3 Auswertung der Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen
  - 5.4 Dreidimensionale Struktur von HrpB
  - 5.5 Medizinische Bedeutung von HrpB

**V Zusammenfassung**

**VI Literaturnachweis**

**VII Anhang**

## I Einleitung

### 1. Bedeutung und Epidemiologie von *Neisseria meningitidis*

Auch heute noch erkranken jedes Jahr 500 000 Menschen an der epidemischen Meningitis. Verantwortlich dafür ist *Neisseria meningitidis*, ein Gram-negativer Diplococcus, dessen einziges Reservoir der Mensch darstellt. Die zu den  $\beta$ -Proteobakterien gehörende Gattung *Neisseria* umfasst 17 Arten. Davon gelten die meisten, wie *Neisseria lactamica*, als harmlose Umweltkeime oder Kommensalen, mit Ausnahme von *Neisseria gonorrhoeae* (Gonokokken), die obligate Krankheitserreger darstellen (Vogel & Frosch, 2002). Meningokokken besiedeln als Kommensale den Nasen-Rachen-Raum bei durchschnittlich 10% der europäischen Bevölkerung (Claus et al., 2005, Caugant et al., 1994). Jedoch können sie in seltenen Fällen zum Auslöser der epidemischen Meningitis und schweren Sepsis werden (Caugant & Maiden, 2009, Tzeng & Stephens, 2000). Von der Erkrankung betroffen sind vor allem Kinder unter fünf Jahren, Jugendliche im Alter von 15-19 Jahren und Personen mit Komplement-Defekten. Bei der Mehrzahl der Kontakte verbleiben die Meningokokken an der epithelialen Oberfläche der nasopharyngealen Schleimhaut ohne invasiv zu werden. Diesen Wochen bis Monate andauernden Zustand bezeichnet man als Trägertum. Dieses ist bei jungen Kindern eher selten zu finden, steigt aber ab der Pubertät stark an und ist am weitesten in der Altersgruppe der 20- bis 25-Jährigen verbreitet (Epidem. Bulletin des RKI Nr. 45/2009, Claus et al., 2005, Caugant et al., 1994, Cartwright et al., 1987, Petersen et al., 1979). Der asymptomatische Kontakt zu Meningokokken fördert die Ausbildung protektiver Antikörper gegen invasive Meningokokken. Ab einem Lebensalter von 24 Monaten steigt der Prozentsatz der Menschen mit protektiven Antikörpern rasch an. Eine Meningokokken-Meningitis im ersten Lebensmonat ist sehr selten, was auf die Anwesenheit maternaler IgG-Antikörper zurückzuführen ist, denn ab dem zweiten Lebensmonat steigen die Fallzahlen schnell an (Maximum 6. bis 24. Monat) (Goldschneider et al., 1969a & b, Gotschlich et al., 1969a & b). Ein entscheidender Pathogenitätsfaktor ist die Fähigkeit zur Kapselbildung. Nach der Polysaccharidstruktur der Kapsel unterteilt man *Neisseria meningitidis* in 13 Serogruppen (Cartwright, 1995). Die meisten Isolate invasiver Meningokokken-Erkrankungen gehören zu den Serogruppen A, B, C, W135, X und Y (Stephens et al., 2007, Boisier et al., 2007). Weltweit sind die Gruppen A, B, C und Y für über 90% der Meningokokken-Erkrankungen verantwortlich. Stämme der Serogruppen A, C, W135 und X sind vor allem für Meningokokken-Epidemien im subsaharischen Afrika, auch als Meningitis-Gürtel bekannt, verantwortlich. In Europa und Nordamerika kommt es meist nur zu sporadischen Infektionen, die hauptsächlich durch die Serogruppen B und C bedingt sind. In Asien herrschen Infektionen durch die Gruppen A und C vor, in Südamerika sind es B, C, Y und W135 (Harrison et al., 2009). Da die Einteilung in verschiedene Serogruppen die verwandtschaftlichen Beziehungen auf genetischer Ebene nur unzureichend widerspiegelt, wird eine weitere Einteilung der Meningokokken in Sequenz-Typen vorgenommen. Diese erfolgt durch Sequenzierung von sieben essentiellen *housekeeping*-Genen in einer Multilokus-Sequenz-Analyse (MLST), wodurch die Verwandtschaft von einzelnen Stämmen genauer abgebildet wird (Maiden et al., 1998). Dabei zeigen die

Trägerstämme eine hohe genetische Diversität, während sich die invasiven Meningokokken zu wenigen hypervirulenten klonalen Komplexen zusammenfassen lassen. (Claus et al. 2005, Jolley et al., 2000, Caugant, 1998). Subkapsuläre Strukturen bilden die Basis für eine weitere Unterteilung der Meningokokken: So wird der Serotyp durch Klasse 2/3 *outer membrane proteins* (Porin B2/3) bestimmt (Frasch et al., 1985, Frasch & Gotschlich 1974), der Serosubtyp durch Klasse 1 *omps* (Porin A) (Poolman & Abdillahi, 1988, Barlow et al., 1987) und der Immuntyp durch die Konfiguration der Lipooligosaccharide (LOS) (Scholten et al., 1994, Mandrell & Zollinger, 1977; Zollinger & Mandrell, 1977). Es besteht die Möglichkeit einer aktiven Impfung gegen Meningokokken-Erkrankungen durch Erreger der Serogruppen A, C, W-135 und Y. Dabei wird die Antikörper-induzierende Wirkung des Kapsel-Polysaccharids genutzt (Pace et al., 2009). Gegen die in Europa am weitesten verbreitete Serogruppe B ist es bisher nicht möglich zu impfen: Die Struktur des Kapsel-Polysaccharids der Serogruppe B ist identisch mit den humanen Antigenen verschiedener fetaler und adulter Gewebe, wie des neuronalen Zelladhäsions-Moleküls N-CAM (*neuronal cell adhesion molecule*) (Finne et al., 1987, Finne et al., 1983). Durch dieses molekulare Mimikry ist eine Antikörperbildung nur sehr schwer zu induzieren und hätte eventuell eine Autoimmunreaktion zur Folge (Finne et al., 1983). Aus diesen Gründen konnte bisher kein Impfstoff gegen Serogruppe B-Stämme entwickelt werden.

## **2. Infektion, Pathogenese und Immunantwort**

### **2.1 Klinisches Bild der Meningokokken-Erkrankungen**

Nach der Infektion eines Individuums mit *N. meningitidis* vergehen im Mittel zwischen zwei und zehn Tagen, bis die ersten Symptome auftreten. Im Prodromalstadium sind die Anzeichen der Erkrankung noch sehr unspezifisch. Die Hälfte der Patienten erkrankt aus voller Gesundheit heraus, die andere Hälfte entwickelt zunächst einen Infekt der oberen Luftwege (Pharyngitis), bevor es zu Grippe-ähnlichen Symptomen mit Abgeschlagenheit, Fieber, leichten Kopfschmerzen und geringer Nackensteife kommt. Dies steigert sich allerdings rasch zum Vollbild der Meningokokken-Meningitis, bei dem sich die Leitsymptome Fieber, Kopfschmerzen und Nackensteife heraus kristallisieren. Hinzu können Vigilanzstörungen, Eintrübung und epileptische Anfälle kommen. In fortgeschrittenem Stadium kann es durch Gerinnungsstörungen zu punktförmigen Einblutungen in die Haut kommen, sog. Petechien, die beim Fortschreiten der Krankheit konfluieren können. Unbehandelt beträgt die Letalität 85%. Die in 10-15% der Fälle fulminant verlaufende Form der Meningokokken-Erkrankung bezeichnet man als Waterhouse-Friderichsen-Syndrom, bei der es zu schwerem septischen Schock, hämorrhagischer Nekrose der Nebennieren und disseminierter intravasaler Gerinnung kommt. Durch den Verbrauch von Gerinnungsfaktoren kommt es zu weiteren Haut- und Organeinblutungen. Dieses Stadium geht trotz Intensivtherapie mit einer hohen Letalität einher. Wird eine Meningokokken-Meningitis überlebt, so bleiben durch die eitrige Entzündung und intrazerebrale Verklebungen oft neurologische oder kognitive Schäden zurück (Meyer & Hahn, 2005a, Tumani et al., 2008a).



## 2.2 Pathogenese der Meningokokken-Meningitis

Die Übertragung von Meningokokken findet durch Kontakt mit Atemwegsekreten oder Speichel direkt von Mensch zu Mensch statt. Begünstigende Faktoren sind Schleimhautschädigungen wie sie durch Zigarettenrauch, Trockenheit (v.a. in Afrika) und vorangegangene Virusinfekte (Influenza) ausgelöst werden (Cartwright, 1995). Erster Schritt in der Pathogenese ist die initiale Anlagerung (*initial attachment*) an die Cilien-losen Epithelzellen des Nasopharynx. Diese wird in bekapselten Stämmen hauptsächlich über Typ IV-Pili vermittelt (Nassif et al., 1997 & 1994). Der Kontakt zwischen Pili und zellulären Strukturen erfolgt unter anderem über den humanen CD46 Rezeptor (Kallstrom et al., 1997) und / oder die I-Domäne der Integrin- $\alpha$ -Ketten (Bourdoulous & Nassif, 2006). Nach Verlust der Pili wird die weitere Adhäsion (*intimate association*) über Außenmembranproteine wie die *opacity*-Proteine Opa und Opc vermittelt (Virji et al., 1992 & 1993). Als Rezeptoren für die *opacity*-Proteine dienen epitheliale Strukturen wie CD66, CEACAM-1 (*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*) und HSPG (*Heparan Sulfate Proteoglycan Receptors*) (Virji, 2009, Virji et al. 1999, Chen et al., 1997, Chen & Gotschlich, 1996). Des Weiteren gibt es noch zahlreiche untergeordnete Adhäsine (*minor adhesins*), wie NadA (Commanducci et al., 2002), HrpA (Schmitt et al., 2007), NhhA (Scarselli et al., 2006, Peak et al., 2000) oder MspA (Turner et al., 2006). Die Überwindung des einschichtigen, nasopharyngealen Epithels scheint auf verschiedenen Wegen zu gelingen: über Transzytose-Prozesse der Epithelzellen, durch Nutzung von Makrophagen als Transportvehikel und bei geschädigtem Epithel auch auf direktem Weg (Virji, 2009, Tzeng & Stephens, 2000, Stephens, 1989). In Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass es den Meningokokken möglich ist, innerhalb von Vakuolen in Epithelzellen zu überleben (Spinosa et al., 2007). Nach etwa 18 Stunden sollte dann mittels Transzytose der Weitertransport in subepitheliales Bindegewebe und von dort ins Blut erfolgen (Stephens et al., 1983, McGee et al., 1983). Dort schützen sich die Meningokokken durch die Expression einer Polysaccharidkapsel vor Phagozytose und Komplement-Opsonierung durch das menschliche Immunsystem (van Deuren & Brandtzaeg 2000, Klein et al., 1996). Zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke heften sich die Meningokokken mit Typ IV Pili an die Endothelzellen der zerebralen Blutgefäße. Dort bilden sie Mikrokolonien und erwirken wahrscheinlich über eine Änderung der Zytoskelettstruktur die Transzytose in den Subarachnoidalraum (Join-Lambert et al., 2009, Nassif et al., 1994 & 2002, Merz et al., 1996). Zudem ist *N. meningitidis* in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke auf parazellulärem Weg zu durchbrechen: mit Hilfe des humanen Polaritätskomplexes Par3/Par6/PKC $\zeta$ , der für die apikobasale Zellpolarität verantwortlich ist, werden die interzellulären Verbindungen so umstrukturiert, dass sie durchlässig für die Meningokokken werden (Coureuil et al., 2009). Auf der Oberfläche der Meningokokken ist Endotoxin (=Lipooligosaccharid, LOS) vorhanden (DeVoe & Gilchrist, 1973, Zollinger et al., 1972), welches den humanen LOS-Rezeptor (bestehend aus CD14 (*cluster of differentiation 14*), TLR4 (*toll-like receptor 4*) und MD2 (*myeloid differentiation protein 2*)) stimuliert. Das Endotoxin bewirkt damit über verschiedene Signalwege (u.a.NF $\kappa$ B) die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 (Zughaiet et al., 2004).

Daneben wurden auch TLR4-unabhängige Mechanismen der Immunaktivierung beschrieben, wie die Stimulation dendritischer Zellen über TLR2 und MyD88 durch Porine, wodurch ebenfalls eine proinflammatorische Reaktion hervorgerufen wird (Singleton et al., 2005).

## **2.3 Pathogenetisch wichtige Adhäsions-Moleküle in *Neisseria meningitidis***

### **2.3.1. *Neisseria adhesin A (nadA)***

Das *Neisseria meningitidis*-spezifische Adhäsion NadA (NMB1994) ist ein Protein auf der Oberfläche der äußeren Bakterienmembran, das wesentlich an wichtigen Schritten der Pathogenese der Meningokokken-Erkrankung beteiligt ist (Comanducci et al., 2002). Es ist im Durchschnitt in etwa 50% aller Meningokokken vorhanden, wobei es in den hypervirulenten Linien deutlich stärker vertreten ist: drei von vier hypervirulenten Linien enthalten eines der drei Allele für NadA. So weisen alle Stämme des Sequenztyps ST32 und fast alle des ST11 das *nadA*-Gen auf, jedoch nur 28% der untersuchten Träger-Stämme. Nicht vertreten ist *nadA* im ST41/44-Komplex, im Serogruppe A-Stamm Z2491, in *N. gonorrhoeae* und in den apathogenen *N. lactamica* und *N. cinerea*. In den Stämmen des ST11-Komplexes ist das *nadA*-Gen häufig inaktiviert (Elias et al., 2007). Da der GC-Gehalt von *nadA* mit 45% deutlich geringer ist, als der Durchschnitt des restlichen Genoms (51,5%), wird angenommen, dass das Gen über horizontalen Gentransfer akquiriert wurde. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang der hohe Grad an Konservierung der drei Allele. NadA spielt als Oberflächenprotein eine Rolle bei der Adhäsion an humane Epithelzellen wie Chang-, HeLa- und Hep2-Zellen, nicht jedoch an Endothelzellen. Des Weiteren ist NadA am Prozess der Invasion beteiligt. Die Struktur des NadA-Proteins weist es als Mitglied der *oca*-Familie (*oligomeric coiled coil adhesin*, Desvaux et al., 2004) aus, zu der auch andere Virulenzfaktoren wie UspA2 (*Ubiquitous surface protein A2* von *Moraxella catarrhalis*) und YadA (*Yersinia adhesin A* von enteropathogene *Yersinia spp.*) zählen. Am N-terminalen Ende besitzt NadA ein 23 Aminosäuren (AS) langes *leader peptide*, an das sich die globuläre *head domain* (AS 24-87) anschließt. Dann folgt ein  $\alpha$ -helikales Zwischenstück (AS 88-350), welches die *coiled-coil*-Struktur bildet, und am C-terminalen Ende ein hochkonserviertes Ankerprotein (AS 351-405), das NadA in der Bakterienmembran befestigt (Comanducci et al., 2004 & 2002, Capecchi et al., 2005).

### **2.3.2 *Opacity protein C (opc)***

Die *opacity associated proteins* zählen zu den Virulenz-assoziierten Außenmembranproteinen. Während Opa auch in *N. gonorrhoeae* zu finden ist, wird Opc nur in *N. meningitidis* exprimiert. Stämme, denen *opc* fehlt, scheinen häufiger Sepsis anstatt Meningitis zu verursachen (Virji, 2009, Unkmeir et al., 2002). Opc zählt zu den bedeutendsten Adhäsinen und ist vor allem in unbekapselten Stämmen wesentlich an den Prozessen der Adhäsion an Granulozyten, epitheliale und endotheliale Zellen, sowie an der Invasion beteiligt. Dazu interagiert Opc mit menschlichen Proteinen der extrazellulären Matrix wie Fibronektin und Vitronektin, wodurch schließlich die Adhäsion an den Fibronektin-Rezeptor ( $\alpha 5 \beta 1$ -*Integrin*) bzw. den Vitronektin-Rezeptor (Unkmeier

et al., 2002, Virji, 1994 & 1995) von Endothelzellen erfolgt. Intrazellulär bindet Opc an  $\alpha$ -Aktinin (Cunha et al., 2009). Da Opc nur durch ein einziges Gen codiert wird, ist seine Sequenz und damit auch seine Struktur nicht sonderlich variabel (Zhu et al., 1999, Achtmann, 1995). Allerdings kann der Expressionslevel durch Veränderung der Länge der Polycytidin-Region im Promotorbereich von *opc* stark variieren (Sarkari et al., 1994), wobei die Menge des synthetisierten Opc mit der Stärke der humanen Immunantwort korreliert. (Jolley et al., 2001). Als Außenmembran-Protein ist es über fünf extrazelluläre *loops* in Kontakt mit dem menschlichen Immunsystem (Merker et al., 1997) und induziert die Bildung von Antikörpern (Wedege et al., 2003, Rosenqvist et al., 1995).

#### **2.4 Rolle der humanen Granulozyten in der Abwehr von *Neisseria meningitidis***

In der stetigen Auseinandersetzung mit körperfremden Antigenen hat der menschliche Körper im Laufe der Evolution zahlreiche Abwehrmechanismen entwickelt. Ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind, neben Makrophagen, Mastzellen und dendritischen Zellen, auch die Granulozyten. Sie werden im Knochenmark aus myeloiden Vorläuferzellen gebildet, von dort ins Blut entlassen und stellen mit 50-70% den Hauptanteil aller Leukozyten dar. Nach dem Färbeverhalten der zytoplasmatischen Granula differenziert man drei Untergruppen: neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, die zusammenfassend auch als *polymorphonuclear leucocytes*, PMNL) bezeichnet werden. Für die Abwehr bakterieller Erreger sind vor allem die neutrophilen Granulozyten von essentieller Bedeutung. Sie sind in der Lage, in den Körper eingedrungene Mikroorganismen zu phagozytieren und sie mit Hilfe ihres Granula-Inhalts abzutöten (Murphy et al., 2009a und b). Dazu verschmelzen das die Erreger enthaltende Phagosom mit Granula-haltigen Lysosomen zu einem Phagolysosom. Dort werden die Erreger unter anderem mit Hilfe von Stickoxid (NO), Superoxidation ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), antimikrobiellen Peptiden (Hancock et al., 2001) und Proteasen wie neutrophiler Elastase oder Cathepsin G zerstört (Murphy et al., 2009b). Im Liquor von Meningitis-Patienten finden sich oft > 1000 Zellen/  $\mu$ l, von denen der überwiegende Teil aus PMNL besteht. Damit sind sie die wichtigsten Abwehrzellen bei einer bakteriellen Meningitis und gleichzeitig mit verantwortlich für die Entzündungsreaktion der Meningen und die Entstehung des vasogenen Hirnödems (Tumani et al., 2008a und b, Meyer & Hahn, 2005b).

#### **3. Regulation der Genexpression in Bakterien**

Bakterien sind, wie alle anderen Lebewesen auch, sich ständig verändernden Umweltbedingungen ausgesetzt. Um auf diese Veränderungen zu reagieren und sich so das Überleben zu sichern, beherrschen sie eine Vielzahl von chemischen Reaktionen, Stoffwechselwegen und Anpassungsmechanismen. Damit die jeweiligen Prozesse nur bei Bedarf ablaufen, ist eine genau abgestimmte Regulation notwendig. Wichtige Ansatzpunkte dafür sind: Transkription (DNA-Ebene), mRNA-Prozessierung (RNA-Ebene), Translation/Proteinsynthese, posttranslationale Protein-Modifikation oder Protein-Abbau (Protein-Ebene). Wird die

Transkription der DNA in mRNA kontrolliert, so spricht man von Regulation der Genexpression. Durch Bindung von regulatorischen Proteinen an die DNA kann die Menge der synthetisierten mRNA und damit die Proteinmenge gesteigert oder vermindert werden (Nelson & Cox, 2009a). Im Gegensatz zur Regulation der Enzymaktivität, die innerhalb von Sekunden erfolgt, ist die Regulation der Genexpression ein langsamer Mechanismus, der einige Minuten in Anspruch nimmt. (Parker, 2006a). Bei der negativen Regulation behindert ein Repressor die Wechselwirkung von RNA-Polymerase und Promotor, während bei der positiven Regulation ein Aktivator diese verstärkt. Häufig wird die Bindung von Regulator-Protein und DNA durch Effektor-Moleküle gesteuert. Dies sind (kleine) Signalmoleküle, die durch Bindung an Repressoren oder Aktivatoren deren Konformation ändern und dadurch deren Bindung an die DNA verstärken oder verringern. Dazu zählen sowohl Induktoren, die durch Bindung an einen Repressor diesen von der DNA lösen und damit die Protein-Expression induzieren, als auch Co-Repressoren, die durch ihre Bindung einen inaktiven Repressor aktivieren und seine Bindung an die DNA ermöglichen (Repression der Transkription) (Nelson & Cox, 2009b). Im Jahr 1961 entwickelten Jacob und Monod das Operon-Modell zur Regulation der Genexpression (Lewis, 2005, Jacob & Monod, 1961). Als Operon wird eine Gruppe von meist funktionell verwandten Strukturgenen bezeichnet, die gemeinsam transkribiert und reguliert werden. Die Transkription der Strukturgene startet am vorgeschalteten Promotor, der als Bindestelle für RNA-Polymerase bzw. Sigmafaktoren fungiert. Meist vor oder im Promotorbereich liegt der Operator (heute auch oft als *box* bezeichnet), eine DNA-Region, die als Bindungsstelle für Regulatorproteine fungiert. Durch Bindung des Regulator-Proteins (Repressor/ Aktivator) wird die Bindung der RNA-Polymerase behindert oder verbessert und somit die Transkription der nachgeschalteten Strukturgene kontrolliert. Als Regulon bezeichnet man auf dem gesamten Genom verteilte Gene, die durch einen gemeinsamen Regulator kontrolliert werden (Nelson & Cox, 2009c).

#### 4. Interaktion von DNA und Proteinen

Essentielle Vorgänge in der Zelle wie DNA-Replikation, Transkription oder Regulation der Genexpression sind nur möglich, wenn Proteine und Nukleinsäuren miteinander in Kontakt treten. Dafür sind spezielle DNA-bindende Proteine verantwortlich, die in der Lage sind, ihre jeweiligen Bindungssequenzen auf der DNA zu erkennen.

##### 4.1 Struktur DNA-bindender Proteine: Das *Helix-turn-Helix*-Motiv

Regulatorische Proteine besitzen spezielle DNA-bindende Motive, die es ihnen ermöglichen, in spezifischen Kontakt mit der DNA zu treten. Dazu gehören zum Beispiel Leucin-*zipper*, Zink-Finger oder *Helix-loop-Helix*-Motive. Stellvertretend soll hier der Aufbau des *Helix-turn-Helix*-Motivs dargestellt werden, welches in vielen bakteriellen Repressor-Proteinen, wie dem *lac*-Repressor, vorhanden ist: Eine erste  $\alpha$ -Helix (Erkennungshelix) ist über eine kurze Verbindungssequenz ( $\beta$ -*turn*) in einem  $120^\circ$ -Winkel mit einer zweiten, stabilisierenden  $\alpha$ -Helix

verbunden. Insgesamt besteht das Motiv aus etwa zwanzig Aminosäuren. Die Erkennungshelix bindet Sequenz-spezifisch an die große Furche der DNA. Die aus nur drei bis vier Aminosäuren bestehende *turn*-Sequenz enthält an erster Stelle fast immer ein Glycin-Molekül, welches die Drehung bewirkt. Die Interaktion mit der DNA erfolgt meist als Homodimer, d.h. zwei identischen Polypeptidketten erkennen jeweils ihre Bindungssequenz auf dem gegenläufigen DNA-Strang. (Parker, 2006b, Nelson & Cox, 2009d, Clark et al., 1993).

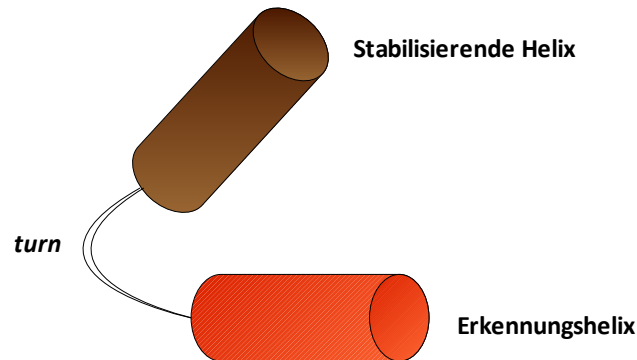


Abb. 1: Vereinfachtes Modell des *helix-turn-helix*-Motives; die beiden  $\alpha$ -Helices sind über das *turn*-Motiv im  $120^\circ$ -Winkel miteinander verbunden. Modifiziert nach: Brock Mikrobiologie, 11. Aufl., 2006, S.237

Eine Sonderform ist das **winged-Helix-turn-Helix-Motiv**: Es besteht aus zwei *wings* (W1 und W2), drei Helices (H1, H2, H3) und drei  $\beta$ -Strängen (S1, S2, S3), die in der Reihenfolge H1-S1-H2-H3-S2-W1-S3-W2 angeordnet sind. Im Vergleich zum normalen HTH-Motiv weist es eine längere *turn*-Sequenz zwischen H2 und der Erkennungshelix H3 auf. Oftmals ist der Winkel dazwischen spitzer als die typischen  $120^\circ$ , kann aber auch bis zu  $150^\circ$  betragen (Brennan & Matthews, 1989a und b). Zudem enthält die erste Helix ungewöhnliche Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -helikale Auswölbungen und Prolin-induzierte Schleifen (Clark et al., 1993, Brennan, 1993). Proteine mit w-HTH-Motiven können als Monomer, Homodimer oder Heterodimer an DNA binden, sind aber auch zu Protein-Protein-Interaktionen in der Lage (Gajiwala & Burley, 2000). *Helix-turn-Helix* und *winged-Helix-turn-Helix* sind unter bakteriellen Transkriptionsregulatoren die am weitesten verbreiteten DNA-Bindungsmotive (Parker, 2006c, Ouhammouch & Geiduschek, 2001, Aravind & Koonin, 1999, Pérez-Rueda et al., 2004).

#### 4.2 Bindung von Protein und Nukleinsäure

Proteine, die mit der DNA interagieren, besitzen normalerweise spezielle DNA-bindende Motive. Diese ragen aus dem Gesamtprotein hervor, so dass sie mit den Basen der großen Furche in Kontakt treten können. Prinzipiell kann ein solcher Kontakt auch in der kleinen Furche stattfinden (wie z.B. beim TATA-Bindungsprotein), jedoch ist hier aufgrund der Verteilung der Wasserstoffbrücken eine Diskriminierung der Basen nicht möglich und damit keine Spezifität der Bindung gegeben. In der großen Furche treten die Proteine über spezifische Aminosäure-Seitenketten mit den Nukleotiden über nicht-kovalente Wechselwirkungen wie van-der-Waals-

Kräfte, hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen und vor allem Wasserstoffbrücken in Kontakt. (Krauss, 1997a). Die Anordnung der Wasserstoff-Donatoren und -Akzeptoren ermöglicht eine genaue Zuordnung der Basenpaare A:T und G:C. Bestimmte Aminosäuren weisen dabei eine erhöhte Affinität für bestimmte Basen auf; so bindet Arginin bevorzugt an Guanin, während Asparagin und Glutamin vor allem an Adenin binden (Uetz & Pohl, 2004). Trotz dieser Ansätze ist eine einfache Zuordnung von Aminosäure und Base nicht ohne weiteres möglich. Häufig weisen solche Bindungsstellen auf der DNA Tandem-*repeats*, *inverted repeats*, palindromische oder pseudopalindromische Sequenzen auf. Die Symmetrie der Palindrom-Sequenzen ermöglicht es den beiden Polypeptidketten eines Homodimers an einen Einzelstrang zu binden, wodurch die Spezifität erhöht wird (kooperative Bindung) (Parker, 2006d, Krauss, 1997b).

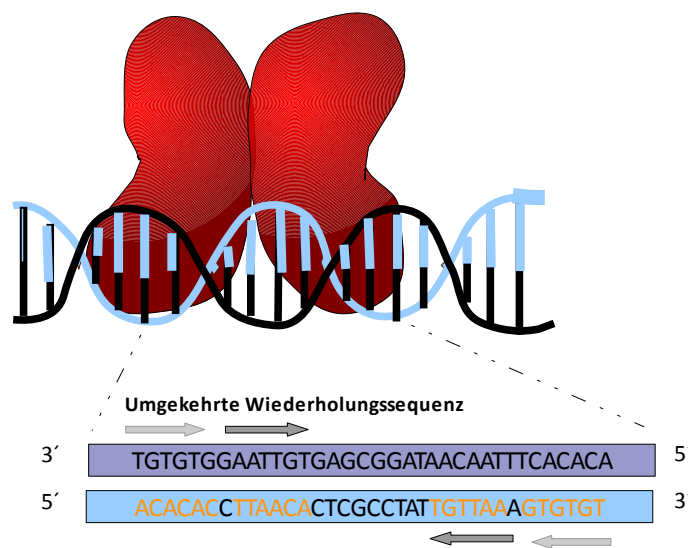


Abb. 2: Bindung eines Homodimer-Regulatorproteins an seine DNA-Bindesequenz. Die beiden identischen Polypeptidketten des Regulators erkennen jeweils eine umgekehrte Wiederholungssequenz auf der DNA. Modifiziert nach: Brock Mikrobiologie, 11. Aufl., 2006, S. 236.

## 5. Der Far-Regulator in *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae*

### 5.1 Das *mar*-Regulon und die MarR-Familie

Proteine aus der MarR-Familie (MarR = *Multiple antibiotic resistance Regulator*) (George & Levy, 1983a und b) sind unter Prokaryonten und Archaeen weit verbreitet (Perez-Rueda et al., 2004). Ihre Mitglieder sind zumeist Transkriptionsregulatoren, die die Expression der im sogenannten *mar*-Regulon codierten Gene kontrollieren. Diese Gene codieren häufig für Proteine, die mit Virulenz oder Schutz vor dem Immunsystem assoziiert sind, wie zum Beispiel Effluxpumpensysteme. Solche Transportsysteme sind verantwortlich für eine chromosomale, nicht-Plasmid-vermittelte Resistenz gegenüber für Bakterien schädliche Substanzen wie Antibiotika, organische Lösungsmittel oder hydrophobe Molekülen. Beispiele für solche Transkriptionsregulatoren sind MarR und EmR in *Escherichia coli* (Xiong et al., 2000, Lomovskaya et al., 1995, Martin & Rosner, 1995), MexR in *Pseudomonas aeruginosa* (Poole et al., 1996) oder MtrR in *Neisseria gonorrhoeae* (Lucas et al., 1997). Anhand des *mar*-Regulons

von *E. coli*, das als Modell für die *mar*-Familie gilt, sollen Aufbau und Funktion der einzelnen Komponenten dargestellt werden: Zwischen den beiden Transkriptionseinheiten *marC* und *marRAB* liegt die Promotor-Operator-Region. Darin befinden sich der Operator *marO* als Bindestelle für den Regulator MarR und die beiden gegenläufig orientierten Promotoren P<sub>marI</sub> und P<sub>marII</sub>, als unabhängige Startpunkte für die Expression von *marC* (P<sub>marI</sub>) und *marRAB* (P<sub>marII</sub>). Die Transkriptionseinheit *marRAB* codiert für das Regulator-Protein MarR, den Aktivator MarA und das kleine Protein MarB, dessen Funktion noch unbekannt ist. In Abwesenheit von induzierenden Substanzen bindet der Regulator MarR an den Operator *marO* und verhindert so die Transkription von *marRAB* (und möglicherweise *marC*). Wird MarR durch Einstrom von Salicylat, Antibiotika oder phenolischen Substanzen deaktiviert, erfolgt unter anderem die Expression von MarA. MarA greift an mehreren Stellen im Genom an und bewirkt eine vermehrte Produktion zytotoxischer Enzyme und Effluxpumpen, sowie eine Verminderung der Porin-Expression. Daneben wirkt MarR auch an der Regulation verschiedener anderer Proteine mit, die an der Resistenz gegenüber schädlichen Substanzen beteiligt sind, wie das AcrAB-TolC-Effluxsystem (Okusu et al., 1996; Ma et al., 1995). Mutationen im *marR*-Gen können somit zu Resistenzen gegen Antibiotika führen und spielen damit auch eine klinisch bedeutende Rolle (Chen et al., 2010, Suman et al., 2006, Bouteille et al., 2004, Maneewannakul & Levy, 1996).

## 5.2 Struktureller Aufbau der Mar-Regulator-Proteine

Mar-Regulatoren sind evolutionär konservierte Proteine mit einer *winged-Helix-turn-Helix*-Struktur. Der Vergleich zahlreicher Homologe zeigt, dass vor allem der für die DNA-Erkennung bedeutsame C-terminale Teil des *winged-Helix*-Motivs strukturell hoch konserviert ist (Wilkinson & Grove, 2006). Die Bindung an die DNA erfolgt, zumindest bei den bisher aufgeklärten Homologen, als (Homo-) Dimer an palindromische oder pseudopalindromische Sequenzen, wie Analysen von MarR (Martin & Rosner, 1995), MexR (Lim et al., 2002) oder OhrR (Hong et al., 2005) zeigen.

## 5.3 Der Far-Regulator in *Neisseria gonorrhoeae*

Zu den humanpathogenen Neisserien zählt neben *Neisseria meningitidis* auch *Neisseria gonorrhoeae*. Dieser sexuell übertragbare Erreger befällt vor allem die schleimbildenden Zellen des Zylinderepithels im Genitalbereich, kann aber auch im Bereich von Augen (Opthalmoblenorrhoe), Oropharynx (pharyngeale Gonorrhoe) und selten disseminiert Infektionen hervorrufen (Meyer & Hahn, 2005c). Diese Bereiche sind mit Schleimhaut ausgekleidet, die als Bestandteile der angeborenen Abwehr antimikrobiell wirksame langkettige Fettsäuren enthalten können. Vor allem im Bereich des Rektums befinden sich große Mengen an hydrophoben Molekülen, neben Fettsäuren auch Steroid-Hormone und Gallensäuren, etc. (McFarland et al., 1983). Fettsäuren bremsen in Gonokokken Wachstum und Sauerstoffverbrauch und hemmen Redoxreaktionen (Miller et al., 1977). Im Unterschied zu anderen Gram-negativen Bakterien sind Gonokokken nicht durch ihre Zellwand vor dem Eindringen hydrophober Moleküle geschützt, da

diese aufgrund von Phospholipid-reichen Bereichen in der äußeren Zellmembran relativ ungehindert ins Zellinnere gelangen (Lsyko & Morse, 1981). Dass Gonokokken dennoch im Anogenitalbereich überleben und sich vermehren können, liegt an speziellen Efflux-Pumpen, die die schädlichen Substanzen mithilfe eines Protonenstroms wieder nach außen transportieren. Ein solches Pumpen-System ist das FarAB-System (Abb. 4), bestehend aus dem Transporter-Protein FarB (in der inneren Membran zwischen Zytoplasma und Periplasma gelegen) und dem Membran-Fusions-Protein FarA (verbindet FarB mit MtrE). Zusätzlich wird das vom *mtrCDE*-Locus (Maness & Sparling, 1973) kodierte Protein MtrE benötigt, das als Tunnelprotein den Transport über die äußere Zellmembran bewerkstelligt (Lee & Shafer, 1999). Reguliert wird die Expression des *farAB*-Gens durch den Transkriptionsregulator FarR (*Fatty acid resistance Regulator*), der durch Bindung an den Promotorbereich von *farAB* die Expression dieses Operons reprimiert. Aktiviert wird *farAB* durch den ebenfalls aus der MarR-Familie stammenden Regulator MtrR, der den Repressor FarR hemmt. Gleichzeitig hemmt MtrR die Expression der *mtrCDE*-codierten Efflux-Pumpe. Dadurch wird eine bedarfsgerechte Synthese der energieverbrauchenden Efflux-Systeme gewährleistet (Shafer et al., 2001).

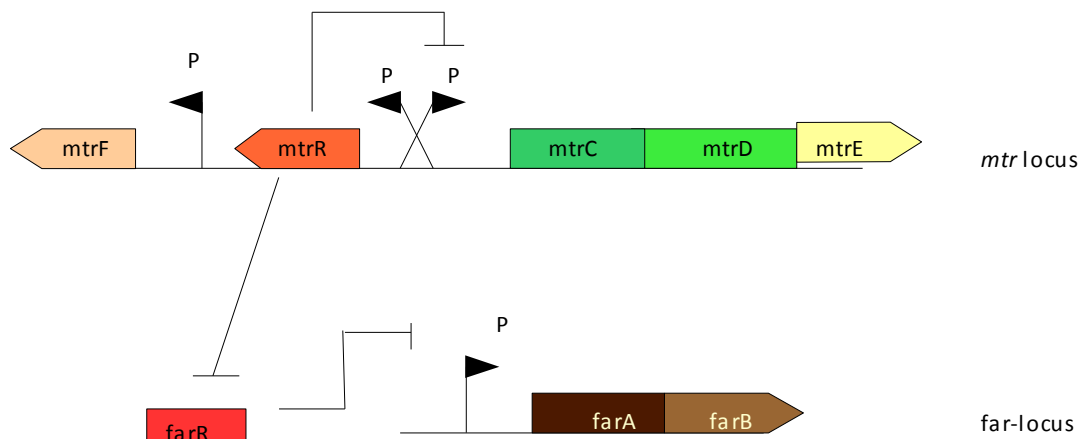
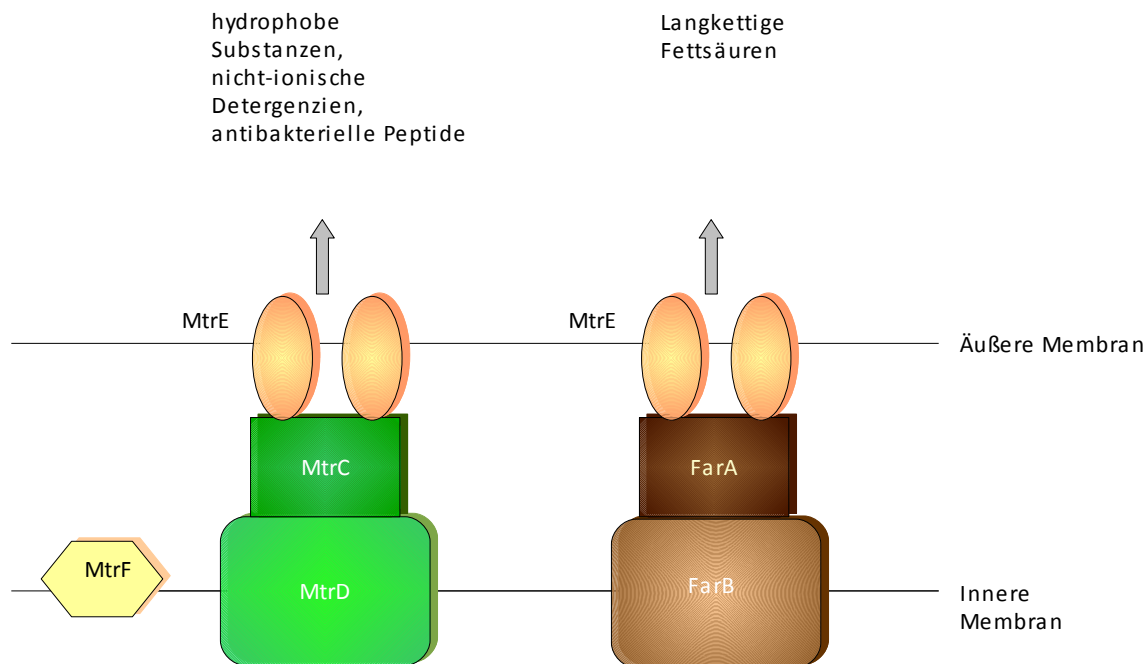


Abb. 3: Darstellung des *mtr*- und des *far*-Locus in *N. gonorrhoeae*. *mtrCDE* stellt eine Transkriptionseinheit dar, deren Promotor unter der negativen Kontrolle von MtrR steht. Die Promotoren vor *mtrR* und *mtrCDE* überlappen sich. In *N. meningitidis* liegt ein 155 bis 159 bp langes Insertionselement, das sog. Correia-Element, innerhalb der 250 bp langen *intervening region downstream* des *mtrCDE* Promotors. Dieses scheint die Transkription des Effluxpumpensystems zu verhindern. Modifiziert nach Shafer et al., 2001.





**Abb. 4:** Modell des MtrCDE- und des FarAB-Effluxpumpensystems in der Zellmembran. FarAB benötigt zusätzlich das MtrE-Protein in der äußeren Zellmembran um funktionsfähig zu sein. Während MtrCDE verschiedene Substanzen transportieren kann, ist FarAB auf Fettsäuren spezialisiert. Modifiziert nach Shafer et al., 2001.

### 5.3 Der Far-Regulator in *Neisseria meningitidis*

Mitglieder der MarR-Familie sind auch im Genom von *N. meningitidis* vertreten: In dem Serogruppe B-Stamm MC58 (Tettelin et al., 2000) wurden bisher zwei solcher Proteine beschrieben: NMB1585 (Nichols et al., 2009) und NMB1843 (Schielke et al., 2009). Analysen des von NMB1585 codierten Proteins ergaben, dass es sich dabei um einen Transkriptionsregulator mit einem *winged-Helix-turn-Helix*-Motiv handelt, der in der Lage ist, an seinen eigenen Promotor zu binden und die Transkription zu hemmen. Seine biologische Funktion konnte noch nicht geklärt werden (Nichols et al., 2009). Das Gen NMB1843 umfasst 441 bp und codiert für eine 146 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 16,583 kDa. Die Aminosäuresequenz zeigt eine 98,4%-ige Übereinstimmung mit der von *N. gonorrhoeae*-FarR (NgFarR) und deckt sich im Durchschnitt zu 25% mit anderen Regulatoren aus der MarR-Familie. Dieser eher geringen Ähnlichkeit auf Sequenz-Ebene, steht eine hohe strukturelle Homologie gegenüber. Deswegen wird das von NMB1843 codierte Protein in Meningokokken- entsprechend dem Gonokokken-Äquivalent NgFarR- ebenfalls als FarR (oder NmFarR) bezeichnet. Ein Screening von Trägerisolaten und invasiven Isolaten ergab, dass ORFs für *farR* ubiquitär in den getesteten Stämmen vorhanden sind, ebenso wie in den apathogenen *N. lactamica* (Schielke et al., 2009, Claus et al., 2005). Dabei zeigen die Aminosäure-Sequenzen eine Übereinstimmung von über 99% und überaus hochkonservierte DNA-Bindungsstellen. Als typischer Vertreter der MarR-Familie weist auch NmFarR ein *winged-Helix-turn-Helix*-Motiv auf (Schielke et al., 2010b

und 2011). In *N. meningitidis* bindet FarR spezifisch an eine 16 Basenpaare lange, palindromische Nukleotidsequenz (-148 bis -120 bp *upstream* des Transkriptionsstarts) im Promotorbereich des *Neisserien*-spezifischen Oberflächenadhäsins NadA (*Neisseria adhesin A*, NMB1994). Die Analyse des Expressionslevels von NadA in Wildtyp und *farR-knockout*-Mutanten zeigt, dass NadA in Abwesenheit von FarR signifikant stärker exprimiert wird. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Expression von *nadA* durch Bindung des Transkriptionsregulators FarR reprimiert wird (Schielke et al., 2009). Als zweiter Bindungspartner konnte der Promotorbereich von NMB0318/0319 identifiziert werden. Diese Gene codieren für ein Homolog der Effluxpumpe FarAB, wobei *farA* und *farB* wie in *N. gonorrhoeae* in einem Operon organisiert sind. In *N. meningitidis* ist FarR allerdings nicht an der Resistenz gegenüber langkettigen Fettsäuren beteiligt (Schielke et al., 2010a).

## 6. Das Zwei-Partner-Sekretionssystem

### 6.1 Einführung

Sekretionssysteme zählen zu den wichtigsten Virulenzfaktoren und sind weit verbreitet in gram-negativen Bakterien. In *Neisseriaceae* sind bislang 3 verschiedene Typen beschrieben worden: Typ I-Sekretion, Autotransporter und Zwei-Partner-Sekretionssysteme (engl. *Two-partner secretion*, TPS) (van Ulsen & Tommassen 2006). Über diese Systeme werden Proteine ins extrazelluläre Milieu sezerniert, die wesentlich an Prozessen wie Adhäsion, Kolonisierung, Eisen-Akquisition, Hämolyse, Zytotoxizität oder Modulation der Immunantwort beteiligt sind (Finlay & Falkow, 1997, Lee & Schneewind, 2001, Jacob-Dubuisson et al., 2001). Die zu den Typ V-Sekretionssystemen zählenden Zwei-Partner-Sekretionssysteme transportieren Virulenz-assoziierte Proteine in einem zweischrittigen Prozess in den Extrazellulärraum.

### 6.2 Allgemeiner Aufbau

Zwei-Partner-Sekretionssystemen haben einen gemeinsamen Grundbauplan aus den zwei Komponenten TpsA und TpsB: Dabei stellt TpsA (*Two partner secretion protein A*) das sezernierte Exoprotein dar. In den meisten Fällen sind TpsA-Proteine mit einer Länge von über 1000 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von über 200 kDa sehr große Proteine. An ihrem N-terminalen Ende tragen sie ein Signalpeptid für die Erkennung durch die *Sec-machinery* (Chevalier et al., 2004, de Keyser et al., 2003) und eine Sekretionsdomäne, die den Kontakt mit dem TpsB-Kanal vermittelt. TpsA spielt in vielen Bakterien-Spezies eine wichtige Rolle als Virulenzfaktor. TpsB (*Two partner secretion protein B*) bezeichnet das zugehörige Transporter-Protein in der äußeren Bakterienmembran (Jacob-Dubuisson et al. 2001). Auch TpsB besitzt ein Signalpeptid, anhand dessen es von der *Sec-machinery* erkannt und über die innere Membran transportiert wird. Die *Open Reading Frames* für *tpsA* und *tpsB* sind in der Regel im gleichen Operon organisiert oder befinden sich zumindest im gleichen genetischen Locus (Jacob-Dubuisson et al. 2001).

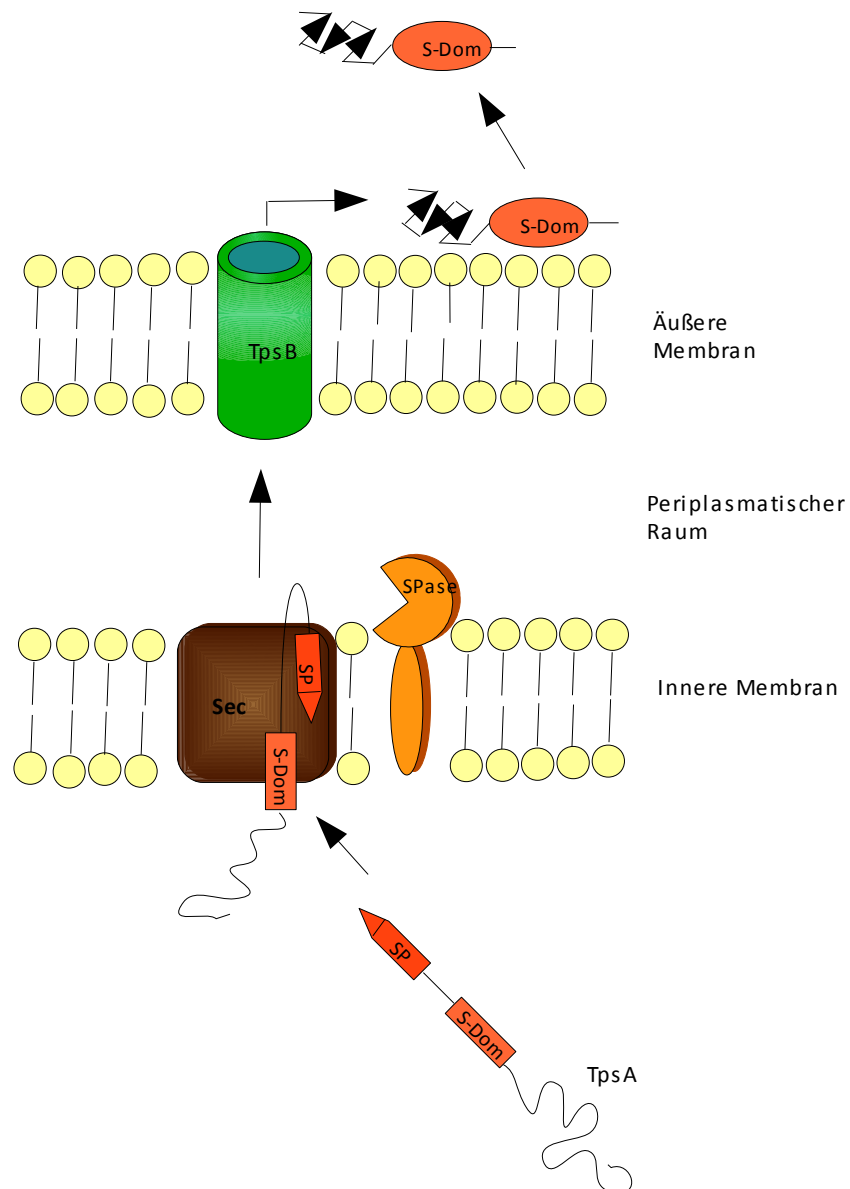


Abb. 5: Schematischer Aufbau des Zwei-Partner-Sekretionssystems. Den Transport von TpsA über die bakterielle Zellmembran vermitteln die beiden Transporter Sec-machinery und TpsB. Die Faltung in die fertige Tertiärstruktur erfolgt extrazellulär. Sec = Sec-machinery, SP = Signal-Peptid, S-Dom = Signaldomäne, SPase = Enzym, welches das Signalpeptid von der Sekretionsdomäne trennt. Modifiziert nach Jacob-Dubuisson et al., 2001

### 6.3 Aufbau und Funktion des TpsB-Transportproteins am Beispiel von *Bordetella pertussis*

Transporter-Proteine der Zwei-Partner-Sekretions-Systeme wurden bereits in zahlreichen Bakterien beschrieben, unter anderem FhaC in *Bordetella pertussis* (Locht et al., 1993), HMW1B von *Haemophilus influenzae* (Holland, 2004, Gemme & Grass, 1998), MchB in *Moraxella catharralis* (Plamondon et al., 2007), LspB in *Haemophilus ducreyi* (Ward et al., 2004), HpmB in *Proteus mirabilis* (Uphoff, Welch, 1990) oder ShIB in *Serratia marcescens* (Konninger et al., 1999). Ihre Funktion ist es, große Exoproteine in den Extrazellulärraum zu transportieren. Der Transport-Prozess soll am Beispiel des bereits gut erforschten TpsB-Transportproteins FhaC von *B. pertussis* erläutert werden: Der Transport über die innere Membran erfolgt über allgemeine

Transporter wie die *Sec-machinery* (de Keyzer et al., 2003) oder die *TAT-machinery* (Berks et al., 2003, Holland, 2004). Danach befindet sich das TpsA-Protein FhaB im periplasmatischen Raum, wo die N-terminale Signaldomäne Kontakt zum FhaC-Transporter aufnimmt. Es ist davon auszugehen, dass dort noch keine Faltung des FhaB-Proteins in die endgültige Tertiärstruktur erfolgt. Den Transport über die äußere Membran übernimmt das Transporterprotein FhaC des Zwei-Partner-Sekretionssystems. Auch bei dieser Passage liegt FHA in gestreckter *hairpin*-Konformation vor, da der schmale Innendurchmesser des FhaC-Kanals ein Passieren nur in gestreckter Form erlaubt (Clantin et al. 2007). An der Außenseite von *Bordetella* erfolgt die proteolytische Prozessierung und Faltung in die Tertiärstruktur, wonach man das reife FhaB-Protein als FHA bezeichnet. Treibende Kraft für den Energie-verbrauchenden Transport-Prozess könnte die Energie sein, die bei der Faltung der Proteine an der Bakterienoberfläche frei wird (Schiebel et al. 1989). Die TpsB-Proteine von *Bordetella pertussis* und *Neisseria meningitidis* gehören zur Omp85-TpsB-Transporter-Superfamilie (*outer membrane protein 85- two partner secretion B*) (Schmitt et al., 2007, Clantin et al., 2007). Ihr Aufbau soll anhand von FhaC aufgezeigt werden: Diese Proteine besitzen eine molekulare Masse von etwa 60 kDa (Konninger et al., 1999, Guedin et al 2000). Der C-terminale, transmembranöse Teil setzt sich aus 16 antiparallelen, hochkonservierten  $\beta$ -Zylindern zusammen, an deren N-terminalen Ende sich eine extrazelluläre Schleife und eine  $\alpha$ -Helix befinden, die durch den  $\beta$ -Zylinder-Kanal in den periplasmatischen Raum ziehen. Zudem ragen zwei POTRA-Domänen (*aligned polypeptide transport associated domains* POTRA 1 und 2) ins Periplasma, die zusammen das globuläre periplasmatische Modul bilden. POTRA1 dient zur Erkennung des N-terminalen Endes von FHA, wodurch der Kontakt zum transportiertem Protein hergestellt wird und der Transportprozess in Gang gesetzt werden kann (Clantin et al., 2007).

#### 6.4 Das Zwei-Partner-Sekretionssystem in *Neisseria meningitidis*

In *Neisseria meningitidis* bezeichnet man die Proteine TpsA als HrpA und TpsB als HrpB (*hemagglutinin hemolysin related protein A* und *B*), aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit dem *filamentous hemagglutinin* (FHA) von *Bordetella pertussis* (Schmitt et al., 2007). *Open reading frames* für Zwei-Partner-Sekretionssysteme sind in sowohl in invasiven, wie auch in Träger-Isolaten vorhanden, ungeachtet ob es sich dabei um hypervirulente oder nicht-hypervirulente klonale Komplexe handelt, wie die Analyse von 822 Stämmen aus der bayrischen Trägerstudie zeigt (Schmitt et al., 2007, Claus et al., 2005). Genomische Analysen der drei sequenzierten Meningokokken-Referenzstämmen Z2491 (Serogruppe A, Parkhill et al., 2000), MC58 (Serogruppe B, Tettelin et al., 2000) und FAM18 (Serogruppe C, [http://www.sanger.ac.uk/Projects/N\\_meningitidis](http://www.sanger.ac.uk/Projects/N_meningitidis)) zeigen eine große Varianz der *hrpA*-Gene und damit auch des exprimierten Proteins, während die Ergebnisse bei *hrpB* auf eine hohe evolutionäre Konservierung hindeuten. Z2491 und FAM18 tragen jeweils Gene für ein vollständiges Tps-System (NMA0687/0688 bzw. NMC0443/0444). MC58 besitzt zwei fast identische Kopien für komplette Tps-Systeme (NMB1779/1780 und NMB0496/0497), wobei

NMB0496 allerdings ein trunkiertes Signalpeptid besitzt. Diese beiden Kopien sind vermutlich durch Duplikation entstanden (van Ulsen & Tommassen, 2006). Außerdem codiert es drei zusätzliche *hrpA*-Gene (NMB0493, NMB1768, NMB1214) und ein weiteres *hrpB*-Gen (NMB1762), welches vermutlich NMB1768 transportiert (van Ulsen et al., 2008). Ein entsprechendes funktionales Tps-Korrelat gibt es in *N. gonorrhoeae* nicht (Schmitt et al., 2007, Klee et al., 2000). Die Gene für die beiden Komponenten befinden sich im Genom nahe beieinander und werden in eine gemeinsame mRNA transkribiert. Diese Organisation in einem Operon ist auch in den Tps-Systemen anderer Bakterien zu beobachten (Schmitt et al., 2007).

Stamm	<i>hrpA</i> -ORF	<i>hrpB</i> -ORF
<b>Z2491</b>	NMA0688	NMA0687
<b>MC58</b>	NMB0493	-
	NMB0497	NMB0496
	NMB1214	-
	NMB1768	NMB1762
	NMB1779	NMB1780
<b>FAM18</b>	NMC0444	NMC0443

Tab. 1: Zuordnungen der *Open Reading Frames* zu *hrpA* und *hrpB*-Genen in den sequenzierten *N. meningitidis*-Stämmen Z2491, MC58 und FAM18 (Schmitt et al., 2007).

TPS-Systeme der Gruppe 1 sind ubiquitär vorhanden, wohingegen TPS der Gruppen 2 und 3 in den Träger-Isolaten signifikant geringer vorhanden sind als in den hyperinvasiven Linien und daher mit Virulenz in Verbindung gebracht werden (Schmitt et al., 2007, van Ulsen et al., 2008). Der Aufbau entspricht im Wesentlichen dem von FHA in *B. pertussis*. Dabei lässt sich der Bereich der höchsten Übereinstimmung am N-terminalen Ende lokalisieren, an dem sich auch die für den Transport durch TpsB essentielle Sekretionsdomäne befindet. FHA und HrpA stimmen in diesem Bereich zu 22-25% in ihrer Sequenz überein. Das C-terminale Ende dagegen scheint über die Funktion des jeweiligen Exoproteins zu entscheiden, die je nach Bakterienart variiert. So weist der C-terminale Bereich keine relevanten Homologien auf. Ähnlich verhält es sich innerhalb der Meningokokken-Stämme, die N-terminal hoch konserviert erscheinen, C-terminal aber sehr variabel sind (van Ulsen et al., 2008, Schmitt et al., 2007). Dagegen weisen die *hrpB*-Gene der Referenzstämme Z2491, MC58 und FAM18 eine 95%-ige Übereinstimmung in ihrer Sequenz auf (van Ulsen & Tommassen, 2006). Bevor oder während HrpA in den Extrazellulärraum transportiert wird, scheint es einer proteolytischen Prozessierung zu unterlaufen. Der größte Teil des sezernierten HrpA wird in den Extrazellulärraum entlassen; ein kleiner Teil bleibt jedoch mit der Bakterien-Oberfläche assoziiert. Dieser Teil trägt bei bestimmten Stämmen und Immuntypen zur Adhäsion von unbekapselten Meningokokken an Epithelzellen bei (Schmitt et al., 2007).

## 7. Ziele der Arbeit

Gegen die Serogruppen A, C, W135 und Y existiert ein auf der Antigenität der Polysaccharidkapsel beruhender Impfstoff. Da aber Kapselstrukturen der Serogruppe B identisch sind mit humanen Antigenen, ist es bisher noch nicht gelungen, eine Vakzine gegen Meningokokken der Serogruppe B zu entwickeln. Das Interesse richtet sich daher besonders auf die Erforschung subkapsulärer Strukturen, wie zum Beispiel das Transporterprotein HrpB des Zwei-Partner-Sekretions-Systems. Aber auch Einblicke in Stoffwechsel- und Regulationsprozesse von *Neisseria meningitidis* ermöglichen ein besseres Verständnis für diese potentiell tödlichen Krankheitserreger und tragen somit dazu bei, Ansatzpunkte für effektive Medikamente und Impfstoffe zu identifizieren. In *Neisseria gonorrhoeae* ist der *Fatty acid resistance Regulator* FarR bereits seit langem bekannt und seine Funktion gut untersucht. Ein entsprechendes Korrelat in den nahe verwandten *Neisseria meningitidis* wurde dagegen erst kürzlich identifiziert. Ziel dieser Arbeit ist es, den Transkriptionsregulator FarR in *Neisseria meningitidis* in Bezug auf seine Expression, Regulation und Funktion näher zu charakterisieren. Im Einzelnen wurden Untersuchungen zu folgenden Fragestellungen durchgeführt:

- 1) Beeinflussung des Wachstumsverhaltens von *N. meningitidis* durch FarR.
- 2) Expression des Proteins FarR im Wachstumsverlauf und Regulation der Expression
- 3) Mitwirkung von FarR an der Resistenz gegenüber Fettsäuren in *N. meningitidis* im Vergleich zu *N. gonorrhoeae*
- 4) Bindung von FarR an ausgewählte Bindungssequenzen
- 5) Beeinflussung der Interaktion von *N. meningitidis* und humanen Granulozyten durch FarR
- 6) Regulation des Zwei-Partner-Sekretions-Systems durch FarR
- 7) Sequenzanalyse des *hrpB*-Gens in verschiedenen *N. meningitidis*-Isolaten

## II Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage ABT-120-5DM	Kern & Sohn
Blotkammer Mini Protean II	Bio-Rad, München
Brutschränke	Hera cell Heraeus, Hanau, Deutschland
Kolonienzählgerät ProtoCOL SR	Synbiosis, UK
Elektrophoresekammer MiniGel Twin	Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer für Agarose	VonKeutz, Reiskirchen
ELISA-Reader Multiscan EX	Thermo Scientific
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr
Heizblock	Liebisch
Kühlschrank, 4°C	Liebherr
Magnetrührer RCT	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikroskop Labo Vert	Leitz
Mikrowelle MWS 1820 Duo	Bauknecht
Netzgerät Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen, Deutschland
Schüttler Phero Shaker	BioTec Fischer
pH-Meter PH530	WTW, Weilheim
Photometer CO 8000 Cell Density Meter	WPA Bioware
Pipettierhilfe Accu Jet Pro	Brand
Schüttelinkubator Certomat H und U	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kühlzentrifuge Sorvall RC5B plus	Thermo Scientific
Vakuumzentrifuge SpeedVac Plus SC 110A	Thermo Scientific
Spektrophotometer ND-1000	PeqLab
SterilWerkbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
ThermoCycler T3000	Biometra, Göttingen, Deutschland
Tiefgefriertruhe Thermo Forma, -80°C	Genheimer, Hettstadt, Deutschland
Tischzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf
Vortex GLW M35	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Waage	Mettler, Weilheim, Deutschland
Wippe Duo Max 1030	Heidolph Instruments
Gel-Dokumentationssystem, Herolab UVT-28MP	Wiesloch, Deutschland
Röntgenkassette X-Omatic Kodak	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Röntgenfilm-Entwickler Curix 60	AGFA
Shaker Phero Shaker	Biotec-Fischer, Reiskirchen, Deutschland
Uv-Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Megafuge 1.0 R	Thermo Scientific
UV- Arbeitsblock UVT-20 LP	Herolab
Abzug	LabExcellenc

### 1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
96 well Zellkulturplatte	Sarstedt, Nürnberg
96 well Mikropipettierplatten F-Form	Sarstedt, Nürnberg
96 well Mikropipettierplatten U-Form	Sarstedt, Nürnberg
EDTA-Monovetten	Sarstedt, Nürnberg
Einmal-Spritzen 5-20 ml	Codan Medical ApS, Dänemark
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1ml, 2 ml	Eppendorff, Hamburg
Filterpapier, Whatman Paper	Biometra, Deutschland
Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Blutentnahmekanülen Multifly	Sarstedt, Nürnberg
Injektionskanülen	Becton & Dickinson, Spanien
Kryotubes	Nunc A/S, Dänemark
Nitrocellulose-Membran (Protran Transfer Membrane)	Whatman, Schleicher&Schuell, Deutschland
Nylonmembran porablot NY plus	Macherey-Nagel, Düren; Deutschland
Pipetenspitzen 10, 100, 1000 µl	Sarstedt, Nürnberg
Plastik-Küvetten	Sarstedt, Nürnberg
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnberg
Sterilfilter Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt, Nürnberg
Röntgenfilme Super RX Fuji Medical X-Ray Film 100 NIF	Fuji Film Europe, Deutschland

### 1.3 Reaktions-Kits

Material	Hersteller
BCA- Protein Assay	Thermo Scientific, Rockford, USA
DIG DNA Labeling Kit	Roche, Penzberg, Deutschland
Gel-Extraktions-Kit	Qiagen Hilden Deutschland
PCR-Purification-Kit	Qiagen Hilden Deutschland
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
Genom. DNA Präparation	Qiagen Hilden Deutschland

### 1.4 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
10 x Puffer	Invitrogen
Ethanol, 99%	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
Ethidiumbromid	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ )	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )	Merck
Agarose	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Magermilchpulver	Heirler
Bromphenolblau	Merck
Bovines Serum Albumin (BSA)	New England BioLabs
Coomassie-Blau	Serva



dNTPs	PeaLab
Fetal Calvine Serum (FCS)	Biochrom
Glycin	Roth
HBSS-Puffer	Gibco
Salzsäure (HCl)	Roth
ACK Lyse-Puffer	Lonza
Mercaptoethanol	Aplichem
Methanol	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Invitrogen
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Palmitinsäure	Sigma
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom
Platinum High Fidelity Taq DNA-Polymerase	Invitrogen
Polyacrylamid	Roth
Polymorphprep	Progen
Polyvitex	Biomerieux
Prestained Protein Marker	Biolabs
Saponin	Serva
Sodium-Dodecyl-Sulfate (SDS)	AppliChem
Smart Ladder DNA- Marker	Eurogentec
Taq DNA-Polymerase	Biolabs
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Thermopol-Puffer	Biolabs
Tris	Roth
Trypanblau	Biochrom
Tween20	Merck
Proteose Pepton	Becton Dickinson
PBS-Dulbecco	Biochrom
Glycerin	Roth

### 1.5 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen mit destilliertem Wasser angesetzt.

#### **10 x PBS (Phosphate Buffered Saline)**

1 Packung PBS Dulbecco auf 1000 ml H<sub>2</sub>O

Verwendet als 1 x PBS

#### **16 % APS (Ammoniumpersulfat)**

#### **10 x Lämmli-Puffer**

60 g Tris

288 g Glycerin

ad 2000 ml H<sub>2</sub>O

pH= 8,7

**10 x SDS-Elektrophorese-Puffer**

60,6 g Tris  
287,4 g Glycin  
50 ml 20% SDS  
ad 2000 ml H<sub>2</sub>O  
Verwendet als 1x Puffer

**1 x Western-Blotting-Puffer**

200 ml 10x Lämmli-Puffer  
400 ml Methanol  
1400 ml H<sub>2</sub>O

**20% SDS (Sodium-Dodecy-Sulfat)**

20 g SDS  
ad 100 ml H<sub>2</sub>O

**1,5 M Tris/ HCl**

gelöst in H<sub>2</sub>O  
pH= 8,8

**0,5 M Tris/ HCl**

gelöst in H<sub>2</sub>O  
pH= 6,8

**50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)**

242 g Tris  
37,2 g EDTA  
59,5 ml 96% Essigsäure  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

**0,2 M EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)**

**20 x SSC (Standard Saline Citrat)**

175,3 g NaCl  
88,2 g 0,3 M Na-Citrat  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O  
pH= 7,0

**10 x Blockierungslösung für EMSA**

10% (w/v) Blockierungsreagenz  
in Maleinsäurepuffer

Lösen in der Mikrowelle, dann Autoklavieren.

**Blockierungslösung für Western-Blot**

0,1 % (v/v) Tween20  
5% (w/v) Magermilchpulver  
in 1 x PBS

**CSPD-Arbeitslösung**

Stocklösung CSPD 1:250 in Detektionspuffer

**Detektionspuffer**

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

**Maleinsäurepuffer**

0,1 M Maleinsäure  
0,15 M NaCl  
pH = 7,5 (Einstellung mit festem NaOH)

**TEN-Puffer (Tris-EDTA-NaCl-Puffer)**

10 mM Tris  
1 mM EDTA  
0,1 M NaCl  
pH = 8,0

**Waschpuffer für EMSA**

0,3% (v/v) Tween20  
in Maleinsäurepuffer

**Waschpuffer für Western-Blot**

0,1% (v/v) Tween20  
in 1 x PBS

**10 x TBE-Puffer (Tris-Borsäure-EDTA-Puffer)**

890 mM Tris  
890 mM Borsäure  
20 mM EDTA  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O  
pH= 8,0

**5 x Sample Solution**

250 mM	Tris
50% (w/v)	Glycerin
10% (w/v)	SDS
25% (w/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
in	H <sub>2</sub> O

**8,4% Natriumbicarbonat**

in H<sub>2</sub>O

**2 M Magnesiumchlorid**

**Stammlösung**

5% (w/v)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-Kaliumhydrogenphosphat
20% (w/v)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
in H <sub>2</sub> O		

**GEBS**

50 mM	EDTA
20% (w/v)	Glycerin
0,05%	Bromphenolblau
0,5%	N-Lauroylsarkosin

**Puffer B1**

9,3 g	Na <sub>2</sub> -EDTA-2H <sub>2</sub> O
3,05 g	Tris
25 ml	10% Tween20
25 ml	10% Triton X-100
Ad 500 ml	H <sub>2</sub> O

**Puffer B2**

71,75 g	Guanidin-HCl
50 ml	100% Tween20
Ad 250 ml	H <sub>2</sub> O

## 1.6 Nährmedien und Zusätze

<b>GC-Agar</b>	1,5% Proteose-Pepton 0,1% Stärke 0,4% K-Phosphat 0,5% NaCl 1,0% Bacto-Agar pH = 7,2
<b>PPM</b>	1,5% Proteose-Pepton 0,5% NaCl 0,05% Stärke 0,4% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH = 7,8 (Einstellung mit KOH)
<b>PPM+</b>	50 ml PPM 250 µl NaHCO <sub>3</sub> 250 µl 2M MgCl <sub>2</sub> 500 µl Polyvitex
<b>COS-Agar</b>	Columbia-Agar mit 5% Hammelblut Biomerieux
<b>RPMI 1640</b>	2 g/L NaHCO <sub>3</sub> 2 mM L-Glutamin Biochrom

Zusätze zu den Nährmedien

Kanamycin	100 mg / l in GC-Agar
Erythromycin	7 mg / l in GC-Agar
Palmitinsäure	24 mg/ml abs. Ethanol, davon 100 µl in 15,9 ml GC-Agar
abs. Ethanol	100 µl in 15,9 ml GC-Agar
Fetales Kälber Serum (FCS)	5% (v/v) in RPMI

1.7 *Neisseria gonorrhoeae*-Stämme

Stamm-Nr.*	Isolations-Ort	Referenz
155/04	Blut	NRZM Würzburg
308/06	Cervix-Abstrich	NRZM Würzburg
452/06	Vaginal-Abstrich	NRZM Würzburg
489/06	-	NRZM Würzburg
522/06	-	NRZM Würzburg
38/07	-	NRZM Würzburg
114/07	-	NRZM Würzburg
245/07	-	NRZM Würzburg
1146	Rektal-Abstrich	NRZM Würzburg
1092	Urethral-Abstrich	NRZM Würzburg
154	-	Referenzstamm MS11
1225	Urethral-Abstrich	NRZM Würzburg
2498	-	NRZM Würzburg
2805	Oropharynx	NRZM Würzburg
441/05		NRZM Würzburg
458/05		NRZM Würzburg
359/05		NRZM Würzburg

\* Stamm-Nr. des Nationalen Referenz-Zentrums für Meningokokken (NRZM) Würzburg

1.8 *Neisseria meningitidis*-Stämme

Stamm	SG	Genotyp	Klonaler Komplex	Status	Merkmal	Referenz
MC58	B	Wildtyp	32	Invasiv	Referenzstamm	Tettelin et al., 2000
MC58 $\Delta$ siaD	-	DsiaD	32		CM-Resistenz	Unkmeir et al., 2002
MC58DfarR	B	DfarR	32		Kana-Resistenz	Schielke et al., 2009
MC58 $\Delta$ siaD $\Delta$ farR	-	DsiaDDfarR	32		Kana-Resistenz	Schielke et al., 2009
MC58 $\Delta$ farR(pAP1farR)	B	DfarR(pAP1farR)	32		Kana-/Ery-Resistenz	Schielke et al., 2009
FAM18	C	Wildtyp	11	Invasiv	Referenzstamm	Vogel et al., 1998
Z2491	A	Wildtyp	4	Invasiv	Referenzstamm	Parkhill et al., 2000
$\alpha$ 14	cnI	Wildtyp	53		Referenzstamm	Claus et al., 2002
2370	C	Wildtyp	11	Invasiv		Gift from Dr. Kriz
Y 172	Y	Wildtyp	11	Träger	hypervirulent*	NRZM Würzburg
$\alpha$ 219	B	Wildtyp	41/44	Träger	hypervirulent*	Claus et al., 2005
$\alpha$ 710	B	Wildtyp	136	Träger		Claus et al., 2005
$\alpha$ 580	cnI	Wildtyp	845	Träger		Claus et al., 2002
$\alpha$ 316	Z	Wildtyp	22	Träger		NRZM Würzburg
$\alpha$ 24	Y	Wildtyp	23	Träger		NRZM Würzburg
$\alpha$ 16	B	Wildtyp	41/44	Träger		NRZM Würzburg
$\alpha$ 42	cnI	Wildtyp	53	Träger		NRZM Würzburg
$\alpha$ 7	29 E	Wildtyp	60	Träger		NRZM Würzburg
DE 6790	B	Wildtyp	32	Invasiv	hypervirulent*	IHM Würzburg
DE 7100	W-135	Wildtyp	11	Invasiv	hypervirulent*	IHM Würzburg
DE 7080	C	Wildtyp	8	Invasiv	hypervirulent*	IHM Würzburg
DE 7510	B	Wildtyp	8	Invasiv	hypervirulent*	IHM Würzburg
DE 8640	B	Wildtyp	41	Invasiv	hypervirulent*	IHM Würzburg
DE 10173	B	Wildtyp	41/44	Invasiv	hypervirulent*	IHM Würzburg
A64	Y	Y: 5-2, 10-1 F4-1	60	Träger		NRZM Würzburg
B54	B	B: 7-2, 4 F1-3	41/44	Träger	hypervirulent*	NRZM Würzburg
P12	29 E	29E:5-1, 2-2 F4-3	254	Träger		NRZM Würzburg
P19	cnI	cnI: 7, 30-3 F3-9	53	Träger		NRZM Würzburg
P41	cnI	cnI: 7, 30 F1-15	53	Träger		NRZM Würzburg
P43	B	B: 19-29, 13-7 F3-3	41/44	Träger	hypervirulent*	NRZM Würzburg
P69	B	B: 22, 14 F4-1	213	Träger		NRZM Würzburg
P 82	C	C: 19, 15-1 F1-7	60	Träger		NRZM Würzburg
3671	cnI	Wildtyp	845	Träger		NRZM Würzburg
3887	B	Wildtyp	32	Träger	hypervirulent*	NRZM Würzburg

\* Das Merkmal ``hypervirulent`` bezieht sich auf die Zuordnung des jeweiligen Stammes zu einem hypervirulenten klonalen Komplex.

## 1.9 Oligonukleotid-Primer

Nr.	Name	Sequenz 5' - 3'	Position
539*	FhaC(NMC0443)Del fw	CATGCTGCTTCTTTATATGTTG	FAM18, NMC0443
540*	FhaC(NMC0443)Del rev	CCATTCGGAGTTTGGATATTC	FAM18, NMC0443
558*	hrpB rev	CTAAAGATAATGCGATGTAAAC	FAM18, NMC0443
559*	hrpB2 rev	GCTCCCCATCAAATCCGC	FAM18, NMC0443
560*	hrpB fw	TGGGAATTTTGGGGAATTTTG	FAM18, NMC0443
561*	hrpB2 fw	GCTACCTCACTTCCCAAG	FAM18, NMC0443
562*	hrpB3 rev	CCAAGTACGTAGGTAAAGTT	FAM18, NMC0443
563*	hrpB3 fw	TCAAAATACTGCCGAGAC	FAM18, NMC0443
564*	hrpB4 rev	GAAAGACCGTCTAAATATCAGTA	FAM18, NMC0443
565*	hrpB4 fw	TGCAAAATCCCCAAAATCC	FAM18, NMC0443
568*	hrpB5 rev	CGTAATTTCAGAATCCCGA	FAM18, NMC0443
569*	hrpB7fw	CTTTTAATCACAATGGACATC	FAM18, NMC0443
570*	hrpB8fw	GATAAATGTCAATCGGCAG	FAM18, NMC0443
571*	hrpB6 rev	AATAATGCACGCTGTAECTTC	FAM18, NMC0443
208**	shift_0493_fw	CTACGTCAGCCCCTAAAAAT	MC58 Genom 509521- 509540
209**	shift_0493_rev	GGCTATCATGCAGTTTCGAT	MC58 Genom 509624- 509643
210**	shift_2053_fw	CAGAGGTTTTCGGGTTGGAA	MC58 Genom 2176078-2176096
211**	shift_2053_rev	CCGAGCCATTAACGTTGCA	MC58 Genom 2176203-2176222
212**	shift_1053_fw	CGTCATTCCTAAAAAACAG	MC58 Genom 1071588-1071608
213**	shift_1053_rev	CGTTACGCTTACAATTATAT	MC58 Genom 1071705-1071724
216**	shift_1780_fw	GTCTTGGTGGGAATTTTGGG	MC58 Genom 1867751-1867770
217**	shift_1780_rev	CAGCCAGGATAACCAACAGA	MC58 Genom 1867902-1867921
221**	NMB0071 fw	GGAAAGTTGGAAAGAAGAATAC	MC58 Genom 80278- 80299
222**	NMB0071 rev	CTACAATTAAACTTCCACACAA	MC58 Genom 80424 -80445
223**	NMB1882 fw	TGCTGATTGAGTTGTCCCGAC	MC58 Genom 1986021-1986040
224**	NMB1882 rev	GAAGCGTGCATGGGATTTTC	MC58 Genom 1986164-1986183

\* Nummer der Oligonukleotid-Primer-Sammlung der AG Kurzai

\*\* Nummer der Oligonukleotid-Primer-Sammlung der AG Schubert-Unkmeir

## 1.10 Software

Artemis V10 (Rutherford et al., 2000)

Bio Edit Version v.7.0.5 (Tom Hall)

CAP3 (Huang & Madan, 1999)

Clustal W2 (Larkin et al., 2007)

End Note X3 (Thompson)

JalView (Waterhouse et al., 2009)

Sequence Scanner v 1.0, Applied Biosystems

Splits Tree4 (Huson & Bryant, 2006)

Microsoft Excel: Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen  
t-Test für ungepaarte Stichproben

## 2. Methoden

### 2.1 Kulturbedingungen für *Neisseria meningitidis*

*Neisseria meningitidis*-Stämme wurden aus dem Kryostock (-80°C) auf Columbia-Agar mit 5% Hammelblut (COS-Blutagar) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre angezüchtet. Ausnahmen bilden der Stamm MC58Δ*farR*, der auf GC-Agar mit Kanamycin (100 mg / l) ausplattiert wurde und der Stamm MC58Δ*farR*(*pAP-1farR*), der auf GC-Agar mit Kanamycin (100 mg / l) und Erythromycin (7 mg / l) angezüchtet wurde.

### 2.2 Kulturbedingungen für *Neisseria gonorrhoeae*

*Neisseria gonorrhoeae*-Stämme wurden aus dem Kryostock (-80°C) auf GC-Agar ausgestrichen und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre über Nacht angezüchtet.

### 2.3 Kryokonservierung von *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae*

In einem Kryokulturgefäß wurde 1 ml Einfriermedium vorgelegt und das Bakterienmaterial von einer Plattenkultur mit einem sterilen Wattetupfer abgenommen und eingepflegt. Die Kryokulturen wurden sofort auf Trockeneis gestellt und bei -80°C eingefroren.

### 2.4 Anlegen einer Flüssigkultur

Für eine Bakterien-Kultur in Flüssignährmedium wurde von der Übernacht-Kultur mit einem sterilen Wattestäbchen eine kleine Menge Bakterienmaterial abgenommen und in einem 50 ml Röhrchen mit 10 ml des entsprechenden Flüssigmediums angeimpft. Dieses wurde für 90 min auf dem Schüttelinkubator bei 37°C und 200 rpm inkubiert.

### 2.5 Messung der Keimzahl mittels optischer Dichte

Zur Bestimmung der Keimzahl in einer Flüssigkultur wurde von dieser eine 1:10 Verdünnung in einer Küvette angelegt und die optische Dichte im Photometer bei 600 nm gemessen. Dabei entsprach eine OD<sub>600</sub> von 1 einer Keimzahl von 10<sup>9</sup> Bakterien / ml.

### 2.6 Bestimmung der Kolonienzahl einer Plattenkultur

Die Anzahl der auf einer Agarplatte gewachsenen Kolonien wurde mit dem Kolonienzählgerät ProtoCOL SR (Synbiosis, UK) bestimmt.

### 2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Prinzip: Als Elektrophorese wird die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld bezeichnet. Die negative Ladung der DNA bewirkt, dass diese zur positiv geladenen Anode wandert. Dabei ordnen sich die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe im Agarose-Gel an, da größere Moleküle bei ihrer Wanderung durch die Poren der Agarose-Matrix stärker zurückgehalten werden als kleinere.

Durchführung: Für die Elektrophorese wurden 1%-ige Agarose-Gele (w/v in TAE) verwendet und



in einem TAE-Puffer-System wurde für 30-45 min eine Spannung von 170 Volt angelegt. Bei jedem Lauf wurden 10 µl *Smart Ladder* als Größenmarker mit aufgetragen. Zur Detektion der Nukleinsäuren wurden die Gele 20 min in Ethidiumbromid gefärbt, das sich in die DNA interkaliert und mittels UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden kann.

## 2.8 Polymerase-Kettenreaktion

Prinzip: Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ermöglicht es, gezielt Nukleinsäurebereiche zu vervielfältigen. Dabei dient ein DNA-Strang mit der gewünschten Sequenz als Matrize, von der das Enzym DNA-Polymerase nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung einen Gegenstrang synthetisieren kann. Dies geschieht in 3 Hauptschritten:

- 1) Durch thermische Denaturierung (*denaturation*) werden die Wasserstoffbrücken des DNA-Doppelstrang gespalten, wodurch er als Einzelstrang vorliegt.
- 2) In dieser Form ist er zugänglich für die Hybridisierung mit Oligonukleotid-Primern (*annealing*), die als Startpunkt für die Polymerase fungieren.
- 3) In der folgenden Elongationsphase (*elongation*) verknüpft die DNA-Polymerase freie Desoxynukleotide in 3' => 5'-Richtung zu einem komplementären Gegenstrang.

Diese drei Schritte werden zyklisch wiederholt.

Durchführung: Der PCR-Ansatz wurde in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert:

### Ansatz für Taq-DNA-Poymerase

x µl	Template DNA
1 µl	10 µM Primer fw
1 µl	10 µM Primer rev
2 µl	16 mM dNTPs
3 µl	Thermopol-Puffer
0,5 µl	Taq-DNA-Polymerase


Ad 30 µl H<sub>2</sub>O

### Ansatz für HiFi-Taq-DNA-Polymerase:

x µl	Template DNA
1 µl	10 µM Primer fw
1 µl	10 µM Primer rev
3 µl	16 mM dNTPs
2 µl	MgSO <sub>4</sub>
5 µl	10 x Puffer
0,3 µl	HiFi-Taq-DNA-Polymerase

Ad 50 µl H<sub>2</sub>O

### Thermo-Cycler-Program:

95°C	für	10 min		x 35
95°C	für	30 sek		
AT	für	x min		
ET	für	x min		
10°C		Pause		

AT = *annealing-temperature*, abhängig von Schmelztemperatur des Primerpaares

ET = *elongation-temperature*, Temperaturoptimum der DNA-Polymerase

68°C für HiFi-Taq-DNA-Polymerase

72°C für Taq-DNA-Polymerase

x µl = variable Menge Template-DNA, Angabe beim jeweiligen Versuch

x min = variable Dauer der AT oder ET, Angabe beim jeweiligen Versuch

### 2.9 Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem *PCR-Purification-Kit*

Die *PCR-Purification* dient zur Reinigung der PCR-Produkte von Primern, unverbrauchten dNTPs und Enzymen. Durchgeführt wurde die Reinigung mit dem *PCR-Purification-Kit* von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

### 2.10 Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem *Gel-Extraction-Kit*

Mit der Gel-Extraktion können DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarose-Gel aus der Gel-Matrix isoliert werden. Dadurch gelingt es, gezielt die gewünschte DNA aufzureinigen und von unspezifischen Reaktionsprodukten zu befreien. Die Durchführung erfolgte mit dem *Gel-Extraction-Kit* von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

### 2.11 Isolierung genomischer DNA aus *Neisseria meningitidis*

Die Isolation wurde mit den *Genomic Tips 100* (Qiagen) durchgeführt. *N. meningitidis* wurde auf zwei Blutagar-Platten angezüchtet und das komplette Kulturmaterial wurde in 5 ml 1 x PBS eingerieben. Mittels der OD<sub>600</sub> wurde eine Keimzahl von  $1,5 \times 10^5$  Bakterien in PBS-Puffer eingestellt. Nach dem Zentrifugieren dieser Lösung (10 min; 4000 rpm) wurde das Pellet in 7 ml Puffer B1 und 14 µl RNase (100 mg/ml) resuspendiert. Nach der Zugabe von 160 µl Lysozym (100 mg/ml) wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert und danach für 1 h bei -70°C eingefroren. Nach dieser Zeit wurde die Probe im 50°C warmen Wasserbad aufgetaut. Als nächstes wurden 200 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 2,4 ml Puffer B2 zugeben und vermischt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 50°C im Wasserbad. Während dieser Zeit wurden die Qiagen Genomic Tips 100 mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert. Zu der Probe wurden 10 ml Puffer QBT gegeben und die Lösung durch die Säule filtriert. Anschließend wurde die Säule zweimal mit dem Puffer QC gewaschen und die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde mit 3,5 ml Isopropanol gefällt und die Lösung in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Proben wurden für 30 min bei 10000 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 2 ml kaltem 70%-igem Ethanol gewaschen. Dann wurden die Proben erneut für 15 min bei 10000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde 10 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl TE-Puffer über Nacht bei 4°C durch kontinuierliches Schütteln resuspendiert.

### 2.12 Verhalten von *Neisseria gonorrhoeae* bei Kontakt mit Palmitinsäure

Prinzip: Verschiedene klinische Isolate von *N. gonorrhoeae* wurden mit Palmitinsäure (C<sub>16:0</sub>), als Stellvertreter für langkettige, gesättigte Fettsäuren, in Kontakt gebracht. Anhand der Anzahl der auf Palmitinsäure-Platten gewachsenen Kolonien im Vergleich zur Anzahl auf Kontroll-Platten, wurde die Resistenz bzw. Sensibilität der Gonokokken gegenüber Palmitinsäure bestimmt.

### **2.12.1 Präparation der Agarplatten**

Flüssiger, 55°C-warmer GC-Agar wurde unter kontinuierlichem Rühren über einen sterilen Schlauch zur Gießmaschine geleitet. Pro Versuchsplatte wurden in einem Röhrchen 2,4 mg Palmitinsäure in 100 µl absolutem Ethanol gelöst (24mg/ml). Für die Kontrollplatten wurde die gleiche Menge an reinem Alkohol bereitgestellt. In die Versuchsplatten wurden je 100 µl Palmitinsäure-Ethanol-Gemisch pipettiert und sofort 15,9 ml des flüssigen GC-Agars zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 150 µg/ml pro Platte erreicht wurde. Die Platten wurden kurz geschwenkt und der Agar aushärten gelassen. Zu den Kontrollplatten wurden 100 µl Ethanol gegeben.

### **2.12.2 Einstellen der Bakterienzahl**

Von den *N. gonorrhoeae*-Isolaten wurden Flüssigkulturen in 10 ml PPM+ angelegt und 90 min auf dem Schüttelinkubator kultiviert. Mit Hilfe der optischen Dichte OD<sub>600</sub> wurde in 1 x PBS eine Verdünnungsreihe angelegt, so dass eine Endkonzentration von 500 Keimen/100 µl erreicht wurde.

### **2.12.3 Resistenz-Test**

Von jedem Stamm wurden je 500 Bakterien auf drei Palmitinsäure-Platten und auf drei Ethanol-Platten ausplattiert. Am nächsten Tag wurde die Koloniezahl mit dem Koloniezählgerät ProtoCol bestimmt. Durch das Verhältnis der Koloniezahl auf Kontrollplatten und Palmitinsäure-Platten wurde die EOP (= Efficiency of plating) berechnet. Diese diente als Parameter für die Fähigkeit eines Stammes, auf den Palmitinsäure-Platten zu wachsen. Eine EOP von 1 bedeutet, dass kein Unterschied im Wachstum zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe festzustellen war.

## **2.13 Wachstumskurve und Gewinnung von Lysaten**

Prinzip: In einem geschlossenen System mit begrenzten Nährstoffen durchläuft eine Bakterien-Population charakteristische Phasen: In der Anlauf-Phase erfolgt die Anpassung an die neuen Umgebungsbedingungen, wie z.B. Induktion von Enzymen zur Verwertung Energie-liefernder Moleküle. Das Wachstum ist noch gering. In der exponentiellen Phase (logarithmische Phase) kommt es zu einer starken Vermehrung, bis durch Nährstoffverbrauch und Ansammlung toxischer Stoffwechselprodukte das Wachstum stagniert (stationäre Phase) und es schließlich zum Absterben (Absterbe-Phase) kommt (Parker, 2006e). Zur Untersuchung des Expressions-levels bestimmter Proteine im zeitlichen Verlauf wurden Proben aus der Flüssigkultur entnommen. Durch Lyse der Zellen in SDS-haltigem Probenpuffer wurden sämtliche Proteine freigesetzt und standen so für weitere Analysen zu Verfügung.

Durchführung: Die Meningokokken-Stämme MC58, MC58Δ*siaD* und MC58Δ*farR*(*pAP-1farR*) wurden in 10 ml PPM+ angeimpft und 90 min im Schüttelinkubator kultiviert. Mittels der optischen Dichte OD<sub>600</sub> wurde als Ausgangswert für die Wachstumskurve in 10 ml PPM+ eine Bakterienzahl

von  $1 \times 10^8$  ( $OD_{600} = 0,1$ ) eingestellt. Nun wurden die Kulturen aller drei Stämme im Schüttelinkubator ( $37^\circ\text{C}$ , 200 rpm) über einen Zeitraum von 4 Stunden wachsen gelassen. Dabei wurden zu den Zeitpunkten 1 h, 2,5 h und 4 h Proben für die Lysate entnommen. Diese Zeitpunkte entsprachen der frühen, mittleren und späten exponentiellen Wachstumsphase (*log*-Phase) der Meningokokken-Kultur im geschlossenen System. Es wurden jeweils  $4 \times 10^8$  Bakterien entnommen ( $OD_{600} = 0,4$ ). Die entsprechende Menge Flüssigkultur wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt und zentrifugiert (2 min,  $17900 \times g$ , Raumtemperatur). Das Pellet wurde in 50  $\mu\text{l}$  farblosem 5 x Probenpuffer resuspendiert und 10 min bei  $95^\circ\text{C}$  im Heizblock aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben für 1-2 min auf Eis abgekühlt und bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

#### **2.14 Bestimmung der Proteinkonzentration: *Bicinchoninicacid-Assay* (BCA-Assay)**

Prinzip: Zweiwertige Kupfer-Ionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) lagern sich an die Peptidbindungen von Proteinen an (= Biuret-Reaktion). Es erfolgt eine Farbreaktion (von Grün zu Violett), deren Intensität mit der Proteinkonzentration korreliert und kolorimetrisch bestimmt werden kann. Diese Reaktion erfolgt unspezifisch für alle Peptidbindungen. Somit kann der Gesamt-Proteingehalt einer Probe ermittelt werden.

Durchführung: Der Ansatz wurde in einer 96-well Zellkulturplatte pipettiert:

Von 2 unabhängigen 1:1000 Verdünnungen (in  $\text{H}_2\text{O}$ ) der Lysate aus den Wachstumskurven wurden je 2 x 25  $\mu\text{l}$  in ein well gegeben, so dass 4 Werte pro Lysat erhalten wurden. Eine Eichreihe mit BSA (= *Bovine Serum Albumin*) als Referenz-Protein wurde mit folgenden Konzentrationen in  $\text{H}_2\text{O}$  erstellt: 200, 400, 600, 800, 1000, 1200  $\mu\text{g/ml}$ . Als Referenzwert dienten 25  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Für die Arbeitslösung des BCA-Farbreagens wurden die beiden Komponenten nach Herstellerangaben (Thermo Scientific) im Verhältnis 1:50 gemischt. Von dieser Lösung wurden 200  $\mu\text{l}$  zu jeder Probe hinzugefügt und die Platte kurz geschwenkt. Anschließend wurde der Ansatz 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Stärke der Farbreaktion wurde bei 540 nm im ELISA-Reader gemessen. Über die Messwerte der Eichreihe wurde eine Eichgerade erstellt. Mittels der Geradengleichung  $y=m \cdot x+b$  konnte die Proteinkonzentration der Lysate berechnet werden.

#### **2.15 *Sodium-Dodecyl-Sulfat-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophoresis* (SDS-PAGE)**

Prinzip: Die SDS-PAGE dient dazu, ein bestimmtes Protein aus einem Proteingemisch zu isolieren. SDS (*Sodium-Dodecyl-Sulfat*) ist ein anionisches Tensid, welches die Tertiär- und Quartärstrukturen von Proteinen löst und eine gleichmäßige negative Ladung aller Proteine bewirkt. So präpariert, ordnen sich die Proteine in einem elektrischen Spannungsfeld nur entsprechend ihrem Molekulargewicht im Polyacrylamid-Gel an .

Die denaturierenden Polyacrylamid-Gele bestehen aus einer Sammel- und Trenngelschicht. Das Sammelgel besitzt eine wesentlich geringere Polyacrylamid-Konzentration (3%) und damit ein weitmaschigeres Gitternetz, das kleine und große Moleküle gleichermaßen ungehindert passieren können. Damit wird sichergestellt, dass alle Proben den gleichen Startpunkt und die

gleiche Laufgeschwindigkeit haben, wenn sie in die Trennschicht eintreten. Dort bewirkt die höhere Polyacrylamid-Konzentration (12,5%) und die damit feinere Gitterstruktur, eine Auftrennung der Proteine, da größere Moleküle entsprechend langsamer wandern.

Sammelgel		Trenngel	
2,5 ml	1,5 M Tris/HCl, pH = 8,8	1,25 ml	0,5 M Tris/HCl, pH = 6,8
4,17 ml	Polyacrylamid	0,7 ml	Polyacrylamid
3,23 ml	H <sub>2</sub> O	3 ml	H <sub>2</sub> O
50 µl	20% SDS	25 µl	20% SDS
60 µl	16% APS	30 µl	16% APS
10 µl	TEMED	5 µl	TEMED

APS (= Ammoniumpersulfat) initiiert durch Radikalbildung die Polymerisation von Polyacrylamid-Monomeren.

TEMED (=Tetramethylethyldiamin) wirkt dabei als Katalysator.

Tris/HCl dient als Puffersystem.

Durchführung: Zuerst wurde die Trennschicht im Glasplattensystem bis 2,5 cm unter dem Oberrand gegossen und sofort mit 70%-igem Ethanol überschichtet um einen glatten Gelrand zu erhalten. Nach einer Polymerisationsphase von 45-60 min wurde das Ethanol entfernt, das Sammelgel direkt auf das Trenngel geschichtet und ein Plastikkamm für die Taschen eingefügt. Aufbewahrt wurden die fertigen Gele, vor Austrocknung geschützt, im Kühlschrank bei 4°C.

Von jedem Lysat wurden 10 mg Gesamt-Protein in eine Gel-Tasche aufgetragen. Als Größenmarker liefen 10 µl *Prestained Protein-Marker* mit. Die Elektrophorese wurde in 1 x SDS-Elektrophorese-Puffer bei 160 Volt durchgeführt.

### 2.16 Western-Blot

Prinzip: Zur Detektion eines bestimmten Proteins wird ein spezifisch dagegen gerichteter Primär-Antikörper eingesetzt, der mit seinen F<sub>ab</sub>-Fragmenten an das Protein bindet. Ein Sekundär-Antikörper erkennt mit seinen F<sub>ab</sub>-Fragmenten das Spezies-spezifische F<sub>c</sub>-Fragment des Primär-Antikörpers. An das F<sub>c</sub>-Fragment des Sekundär-Antikörpers ist das Enzym HRP (*Horse-Raddish-Peroxidase*; Meerrettichperoxidase) gekoppelt, das die Chemilumineszenz-Reaktion (Oxidation) von Luminol zu einem optisch aktiven Endprodukt katalysiert. Dieses emittiert Photonen, die den aufgelegten Röntgenfilm belichten.

Durchführung: Um die Proteine für die immunologische Detektion zugänglich zu machen, wurden diese zunächst aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dieser Transfer erfolgte über eine horizontale elektrische Spannung von 300 mA für 60 min in einem *Tank-Blotting*-System, d.h. die Komponenten waren vollständig von Western-Blot-Puffer (nach Laemmli) umgeben. Danach wurde die Nitrocellulose-Membran mit folgenden Reagenzien unter konstanter Bewegung inkubiert:

Zeit	Inkubation mit:	
1 h	20 ml	Blockierungslösung
2 h	10 ml	Primär-Antikörper bei RT alternativ: über Nacht bei 4°C
3 x 10 min	je 20 ml	Waschpuffer
1 h	15 ml	Sekundär-Antikörper
3 x 10 min	je 20 ml	Waschpuffer
5 min	1 ml	ECL-Arbeitslösung

Blockierungslösung: 5% Magermilch in Waschpuffer

Waschpuffer: 1% Tween20 in 1xPBS (=PBS-T)

ECL-Arbeitslösung: 1:1 Mischung der Detektionsreagenzien 1 und 2 des Pierce ECL-Kits, enthält Luminol, Inkubation unter Lichtausschluss

Primär-Antikörper:  $\alpha$ -FarR 1:5000 in 5% Magermilch/PBS-T

$\alpha$ -PorinA 1:500 in 5% Magermilch/ PBS-T

Sekundär-Antikörper: gegen  $\alpha$ - FarR => goat- $\alpha$ -rabbit-IgG 1:5000 in PBS-T

gegen  $\alpha$ -PorinA => pox- $\alpha$ -mouse-IgG + IgM 1:5000 in PBS-T

Das ECL wurde möglichst restlos entfernt und die Membran in Frischhaltefolie eingewickelt, um sie vor dem Austrocknen zu schützen. Zur Visualisierung der Banden wurde in einer Röntgen-Kassette ein Röntgenfilm, je nach Intensität der Lichtreaktion, für etwa 30 sek bis 10 min aufgelegt.

## 2.17 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)


### 2.17.1 Vorbereitung der DNA-Sonden

Die Promotorbereiche von Genen mit einer putativen Bindestelle für das Regulatorprotein FarR wurden mittels PCR amplifiziert (Länge zwischen 118 und 171bp) und über *PCR-Purification* bzw. *Gel-Extraction* aufgereinigt. Die PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

10 $\mu$ l	genomische DNA von MC 58 (1:100 in H <sub>2</sub> O)
1 $\mu$ l	10 $\mu$ M Primer fw
1 $\mu$ l	10 $\mu$ M Primer rev
2 $\mu$ l	dNTPs
3 $\mu$ l	Thermopol-Puffer
0,5 $\mu$ l	Taq DNA-Polymerase
Ad 30 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O

#### Cycler-Program:

95°C für 10 min  
 95°C für 30 sek  
 AT für 1 min  
 72°C für 1 min  
 10°C Pause

 x35

#### Annealing-Temperatures:

AT= 53°C für NMB0493, NMB1053  
 AT= 55°C für NMB1780, NMB2053  
 AT= 58°C für NMB0071  
 AT= 60°C für NMB1882

Die Länge der amplifizierten DNA-Bereiche betrug:

<b>NMB0493</b>	<b>123 bp</b>	<b>NMB1780</b>	<b>171 bp</b>
<b>NMB1053</b>	<b>137 bp</b>	<b>NMB2053</b>	<b>146 bp</b>

### 2.17.2 Markierung der DNA-Sonden mit Digoxigenin

**Prinzip:** Zur Markierung der amplifizierten Oligonukleotide wird Digoxigenin, ein Steroid-Derivat des Glykosids Digoxin aus der Digitalis-Pflanze, verwendet. Dieses wird über einen dUTP-Anhang (Desoxy-Uridintriphosphat) von der terminalen Transferase an das 3'-Ende der DNA gekoppelt. Zur Detektion wird der Antikörper  $\alpha$ -DIG-AP verwendet, der gebundenes Digoxigenin erkennt und über das Enzym alkalische Phosphatase sichtbar macht.

**Durchführung:** Für die Herstellung einer DNA-Sonde wurden 100 ng des jeweiligen PCR-Produkts in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eingestellt. Als Kontrolle wurde 1  $\mu$ l des vom Hersteller mitgelieferten Kontroll-Oligonukleotids in 9  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gegeben. Die Proben wurden 10 min bei 95°C im Heizblock erhitzt und auf Eis abgekühlt. Auf Eis wurden die folgenden Reagenzien zugeben:

4 $\mu$ l	5x Labeling Buffer
4 $\mu$ l	CoCl <sub>2</sub> -Solution
1 $\mu$ l	DIG-ddUTP-Solution
1 $\mu$ l	Terminale Transferase

Der Ansatz wurde bei 37°C für 15 min inkubiert und dann auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 2  $\mu$ l 0,2 M EDTA wurde die Reaktion gestoppt. Durch Zugabe von 3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O wurde ein Endvolumen von 25  $\mu$ l und eine Endkonzentration von 4 ng/ $\mu$ l erreicht.

### 2.17.3 Kontrolle der Digoxigenin-Markierung

**Prinzip:** Um zu überprüfen, ob die Digoxigenin-Markierung der Sonden erfolgreich war, wurden die Sonden auf eine Nylonmembran aufgebracht und die Stärke der Chemilumineszenz mit der eines vormarkierten Kontroll-Oligonukleotids verglichen (direkter Detektionstest).

**Durchführung:** Zunächst wurde in TEN-Puffer eine Verdünnungsreihe der markierten Sonden und des neu markierten Kontroll-Oligonukleotids in den Stufen 1:10, 1:100 und 1:1000 erstellt. Als Kontrolle für diesen Schritt wurde ein bereits vom Hersteller markiertes Oligonukleotid verwendet. Jeweils 1 $\mu$ l der Lösungen wurde auf eine positiv geladenen Nylonmembran pipettiert. Die aufgetragenen Endkonzentrationen betragen: 4 ng, 0,4 ng, 0,04 ng. Zusätzlich wurde eine Negativ-Kontrolle bestehend aus reinem TEN-Puffer mitgeführt, um Kontaminationen des Puffers auszuschließen. Die Nylonmembran wurde auf ein mit 2 x SSC-Puffer getränktes Filterpapier gelegt und die Nucleinsäuren wurden durch *UV-Crosslinking* bei 120 mJ auf der Nylonmembran fixiert. Anschließend wurde die Membran in folgenden Lösungen unter konstanter Bewegung auf der Wippe inkubiert:

20 min	20 ml Waschpuffer
30 min	10 ml Blockierungslösung
30 min	10 ml Antikörperlösung
2 x 15 min	20 ml Waschpuffer
2-5 min	15 ml Detektionspuffer

Dann wurde die Membran mit 500  $\mu\text{l}$  CSPD-Arbeitslösung (CSPD 1:250 in Detektionspuffer) in Frischhaltefolie gewickelt und 5 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit so restlos wie möglich entfernt und die Membran in einer sauberen Frischhaltefolie 10 min bei 37°C inkubiert. In einer Röntgenkassette wurde für 1-3 h ein Röntgenfilm aufgelegt und anschließend entwickelt. Bei ausreichender Markierung sollte der 0,04 ng *Spot* noch sichtbar sein.

#### 2.17.4 Electrophoretic Mobility Shift-Reaktion

Prinzip: Mittels der Gel-*shift*-Reaktion ist es möglich zu überprüfen, ob ein Protein an bestimmte DNA-Bereiche bindet und damit potentiell ein Regulatorprotein darstellt. Dazu inkubiert man Protein und markierte DNA-Sonden miteinander, um eine Bindung zu ermöglichen. Die Trennung freier DNA von DNA-Protein-Komplexen geschieht durch Retardierung der höher molekularen Komplexe in einer nativen SDS-PAGE. Diese vertikale Verschiebung der Laufbande bezeichnet man als *shift*. Die Detektion erfolgt durch anschließenden Transfer auf eine Nylonmembran und Sichtbarmachen der DNA-Sonden mittels Chemilumineszenz.

Durchführung: In der Vorbereitung wurde ein nicht-denaturierendes, 6%-iges Polyacrylamid-Gel gegossen. Nach einer Polymerisations-Phase von 2 h erfolgte die Aufbewahrung für mindestens 1 Nacht in 0,5 x TBE- Puffer im Kühlschrank bei 4°C. Das Gel wurde in die mit 0,5 x TBE gefüllte Elektrophorese-Kammer eingespannt und die Taschen mit einer Spritze gespült. Bei diesen nicht denaturierenden Gelen ist eine Vorlaufzeit von 30 min bei 160 Volt erforderlich. Vor dem Auftragen der Proben sollten die Taschen erneut gespült werden um eventuelle Gel-Reste zu entfernen.

6% Polyacrylamid-Gel	
14,9 ml	H <sub>2</sub> O
1 ml	10 x TBE-Puffer
4 ml	Polyacrylamid
20 $\mu\text{l}$	TEMED
90 $\mu\text{l}$	16% APS

Die Proben werden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis nach folgendem Schema vorbereitet:

1 $\mu\text{l}$	markierte DNA-Sonden 1:10 in TEN-Puffer (DNA-Konz.= 0,4 ng/ml).
2 $\mu\text{l}$	Bindepuffer
0,5 $\mu\text{l}$	Poly (d(I-C))
0,5 $\mu\text{l}$	Poly-L-Lysine
1000 ng	Protein FarR
10 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O

Die Ansätze wurden gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um DNA und Protein die Möglichkeit zu geben aneinander zu binden. Für die weiteren Schritte wurden die Reaktionsgefäße wieder auf Eis gestellt. Zu jeder Probe wurden 2,5  $\mu\text{l}$  Ladepuffer hinzu gegeben und der komplette Ansatz (12,5  $\mu\text{l}$ ) in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 160 Volt durchgeführt, bis der Farbstoff ca. 1 cm über den unteren Gelrand gewandert war.



### 2.17.5 Southwestern-Blot und Digoxigenin-Nachweis

Prinzip: Die elektrophoretisch aufgetrennten Proben müssen aus dem Gel auf eine Trägermembran transferiert werden, um sie den folgenden Nachweisschritten zugänglich zu machen. In diesem als *South-Western-Blot* bezeichneten Verfahren werden sowohl DNA als auch Proteine auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen, die zuvor 5 min in vollentsalztem-Wasser equilibriert wurde. Das *blotting* erfolgte bei 300 mA für 60 min in 0,5 x TBE-Puffer. Die Arbeitsschritte Fixierung und Digoxigenin-Nachweis wurden wie in Kapitel 2.17.3 beschrieben durchgeführt.

### 2.17.6 Kompetitiver EMSA

Prinzip: Zur Überprüfung der Spezifität einer DNA-Protein-Bindung wird im Überschuss unmarkierte DNA zu den Proben hinzu gegeben. Diese konkurriert mit den DNA-Sonden um die Bindung des Proteins. Diese Konkurrenz kann unspezifisch sein, d.h. es wird ein beliebiger DNA-Bereich zugegeben. Ist die Bindung zwischen DNA-Sonde und Protein spezifisch, so wird sie durch einen unspezifischen Kompetitor nicht gelöst und die *shift*-Bande ist weiterhin sichtbar. Ist diese Bindung allerdings unspezifisch, so bindet das Protein vor allem an die im Überschuss vorhandene, unmarkierte DNA und verhindert so das Entstehen einer *shift*-Bande. Im Fall einer spezifischen Konkurrenz wird die unmarkierte DNA vom Protein spezifisch erkannt und verdrängt ebenfalls die in wesentlich geringerer Konzentration vorliegenden DNA-Sonden. In diesem Fall kommt zwar auch ein *band-shift* zustande, welcher aber nicht sichtbar ist, da die unmarkierten DNA-Proteinkomplexe nicht detektiert werden können. Der *shift* wird sozusagen ``rückgängig`` gemacht.

Durchführung: In einer PCR werden die Oligonukleotide vervielfältigt, über *PCR-Purification* bzw. *Gel-Extraction* gereinigt und die DNA-Konzentration im Spektrophotometer bestimmt. Die Durchführung erfolgt analog der Beschreibung unter 2.17.2/4/5, mit der Ausnahme, dass zum Probenansatz zusätzlich unmarkierte Oligonukleotide zugegeben werden.

1 µl	markierte DNA-Sonden 1:10 in TEN-Puffer (DNA-Konz.= 0,4 ng/ml).
2 µl	Bindepuffer
0,5 µl	Poly (d(I-C))
0,5 µl	Poly-L-Lysine
1000 ng	Protein FarR
<b>600 ng</b>	<b>unmarkiertes Oligonukleotid</b>
10 µl	H <sub>2</sub> O

### 2.17.6 Antikörper-EMSA

Prinzip: Dieser Versuch beruht auf der Tatsache, dass sich durch Zugabe eines gegen das Protein gerichteten Antikörpers höher molekulare DNA-Protein-Antikörper-Komplexe erzeugen lassen, die in der SDS-Gelelektrophorese noch stärker zurückgehalten werden. Die dadurch entstehenden Banden liegen noch über denen einer normalen *shift*-Reaktion.

**Durchführung:** Vorbereitungen wie Markierung der Sonden und Gießen der Gele wurden so wie oben beschrieben durchgeführt. Für die Proben der SDS-PAGE wurden zunächst folgende Reagenzien in 1,5 ml Reaktionsgefäßen und auf Eis gemischt:

1 µl	markierte DNA-Sonden 1:10 in TEN-Puffer (DNA-Konz.= 0,4 ng/ml).
2 µl	Bindepuffer
0,5 µl	Poly (d(I-C))
0,5 µl	Poly-L-Lysine
500 ng	Protein FarR
<b>2 µl</b>	<b>Antikörper α-FarR in der Verdünnung 1:1000 in H<sub>2</sub>O</b>
<b>4 µl</b>	<b>Antikörper α-FarR in der Verdünnung 1:1000 in H<sub>2</sub>O</b>
<b>2 µl</b>	<b>Antikörper α-FarR in der Verdünnung 1:10 in H<sub>2</sub>O</b>
10 µl	H <sub>2</sub> O

Dieser Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auf Eis wurde 1 µl der markierten DNA-Sonde (1:10 in TEN) zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Dann wurden 2,5 µl Ladepuffer zugeben und wie oben beschrieben weiter verfahren.

## 2.18 Infektion humaner Granulozyten mit *Neisseria meningitidis*

### 2.18.1 Isolierung humaner polymorphkerniger Leukozyten aus Vollblut

**Prinzip:** Neutrophile Granulozyten sind auf die Abwehr bakterieller Erreger spezialisierte Leukozyten im Blut. Bei der Präparation werden neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten isoliert, weswegen man von polymorphkernigen Leukozyten (PMNL) spricht. Das zur Auftrennung des Blutes in verwendete Polymorphprep<sup>®</sup> ist eine visköse Flüssigkeit, die bei Zentrifugation einen Dichtegradienten bildet, in dem sich die einzelnen Blutkomponenten entsprechend ihrer Dichte ausrichten.

**Durchführung:** Von freiwilligen Spendern wurde venöses Blut in 9 ml EDTA-Monovetten<sup>®</sup> entnommen und in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Das Blut wurde mit HBSS-Puffer im Verhältnis 3:1 (Blut:HBSS) verdünnt und davon je 6 ml in 15 ml Röhrchen auf je 5 ml Polymorphprep<sup>®</sup> aufgeschichtet. Durch Zentrifugieren (30 min, 1600 rpm, ohne Bremse) trennte sich das Blut in seine Bestandteile auf. Die oberste Zellschicht (Monozyten) wurde mit einer Einmal-Pasteur-Pipette entfernt, so dass die darunter liegende Granulozyten-Schicht abgenommen werden konnte. Die Granulozyten wurden in einem 50 ml Röhrchen gesammelt und das Volumen mit HBSS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Nach einem weiteren Zentrifugations-schritt (5 min, 1700 rpm) wurde das Pellet zur Lyse restlicher Erythrozyten in 5 ml 4°C kaltem ACK-Lyse-Puffer resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert (2 min, 1800 rpm) und das Pellet in 5 ml RPMI + 5% FCS gelöst. Zum Bestimmen der Zellzahl wurden 10 µl der Suspension mit 10 µl Trypanblau in einer 96 well-Platte gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop die Zellen gezählt. Die Zellzahl ließ sich nach folgender Formel berechnen:

**Gezählte Zellen x RPMI/FCS Volumen (ml) x Verdünnung x Kammerfaktor 10<sup>4</sup>**

Die Konzentration der Granulozyten wurde mit RPMI/ 5% FCS auf  $4 \times 10^6$  / ml eingestellt.

**2.18.2 Infektion der Granulozyten**

Prinzip: Bei diesem Versuch werden die PMNL mit Meningokokken verschiedenen Genotyps infiziert, wobei untersucht wird, ob bestimmte Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Meningokokken stärker oder schwächer abgetötet werden. Daraus lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion der ausgeschalteten Gene ziehen. Die Auswertung erfolgt durch Ausplattieren der verdünnten Ansätze und Auszählen der gewachsenen Kolonien.

Durchführung: Von den Stämmen MC58 und MC58 $\Delta$ farR wurden in einem 50 ml Röhrchen Flüssigkulturen in 10 ml RPMI angelegt und nach 90 min Kultivierung im Schüttelinkubator die optische Dichte bestimmt. Die OD<sub>600</sub> wurde auf 0,004 in 1ml RPMI eingestellt, was einer Zellzahl von  $4 \times 10^6$  / ml entspricht. Die Infektion der Granulozyten erfolgte in 2 ml Reaktionsgefäßen nach folgendem Schema:

<b>Kontrolle:</b>	<b>20 µl RPMI + 5% FCS + 20 µl Meningokokken-Suspension</b>
<b>Infektion:</b>	<b>20 µl Granulozyten + 20 µl Meningokokken-Suspension</b>
	<b>Dies entspricht einer MOI (<i>Multiplicity of Infection</i>) von 1.</b>

Jede Probe wurde jeweils 3 mal angesetzt für die Zeitpunkte t = 0 h und 3 h (Triplikate). Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden 2 ml 4°C kaltes H<sub>2</sub>O zugeben und damit die Zellen einem hypoosmolaren Schock ausgesetzt, wodurch die Granulozyten lysiert wurden. Zur Verdünnung wurden in einer 96 well-Zellkulturplatte eine 1:6 Verdünnung 1 x PBS angelegt, wovon je 90 µl auf COS-Blutagar ausplattiert wurden. Die Platten wurden über Nacht kultiviert und am nächsten Tag die gewachsenen Kolonien mit dem Kolonienzählgerät (ProtoCol) ausgezählt.

**2.19 Sequenzierung des *hrpB*-Gens in verschiedenen *Neisseria meningitidis*-Stämmen****2.19.1 Gewinnung genomischer DNA als PCR-Template**

Prinzip: Um ein Gen zu sequenzieren, muss es zunächst mittels PCR amplifiziert werden. Als *Template* wird genomische DNA der jeweiligen Stämme eingesetzt. Um die DNA von anderen Zellbestandteilen zu trennen, werden die Bakterien bei hohen Temperaturen lysiert, zentrifugiert und der Überstand mit der DNA abgenommen.


Durchführung: Die Meningokokken wurden über Nacht auf COS-Blutagar angezogen. Kulturmaterial der einzelnen Stämme wurde mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße mit je 100 µl H<sub>2</sub>O vermischt. Die Proben wurden 10 min bei 95°C im Heizblock aufgeköcht, anschließend 1-2 min auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (2 min, 7000 rpm). Der Überstand enthielt die *Template*-DNA.

### 2.19.2 PCR zur Amplifikation des *hrpB*-Gens

Durchführung: Als Matrize für die Oligonukleotid-Primer dienten hochkonservierte Bereiche aus den bereits vollständig sequenzierten Stämmen FAM18, MC58 und Z2491. Amplifiziert wurde ein Bereich von 2700 bp, was dem gesamten Gen NMC0443 mitsamt flankierender Bereiche entspricht. Die PCR wurde nach folgendem Protokoll angesetzt:

2 µl	Lysat als Template-DNA
1 µl	10 µM Primer fw
1 µl	10 µM Primer rev
3 µl	dNTPs
2 µl	MgSO <sub>4</sub>
5 µl	10 x Puffer
0,3 µl	Platinum HiFi Taq
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

#### Cycler-Programm:

95°C	für	10 min	 x 35
95°C	für	30 sec	
AT	für	30 sec	
68°C	für	4 min	
68°C	für	10 min	
10°C		Pause	

AT = *Annealing-Temperature* 54°C bzw. 58°C

### 2.19.3 Reinigung der PCR-Produkte

Durchführung: Mittels Gelelektrophorese (30 min, 170 Volt, in 1x TAE) in 1%-igem Agarose-Gel wurden die PCR-Produkte von Primern, überschüssigen dNTPs und unspezifischen Reaktionsprodukten getrennt. Als Ladepuffer diente GEBS (10% v/v). Die Nukleinsäuren wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Gereinigt wurden die PCR-Produkte mittels Gel-Extraktion mit dem Qiagen *Gel-Extraction-Kit* nach Angaben des Herstellers.

### 2.19.4. Bestimmung der DNA-Konzentration

Durchführung: Mit einem Spektrophotometer wurde die DNA-Konzentration der Eluate bestimmt. Als erfolgreich für die Sequenzierung erwies sich eine DNA-Menge von 40 - 50 ng pro Ansatz.

### 2.19.5 Sequenzierungsreaktion

Prinzip: Bei der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger wird der zu sequenzierende DNA-Strang thermisch in eine Einzelstrangform überführt, an den der Sequenzierungsprimer binden kann. Davon ausgehend wird mittels Polymerase-Ketten-Reaktion der komplementäre Doppelstrang synthetisiert. Als Bausteine werden sowohl Desoxynukleotide (dNTP) aller vier Basen mit einer freien 3'OH-Gruppe zur Kettenverlängerung zugegeben, als auch Didesoxynukleotide (ddNTP), die keine freie Hydroxylgruppe besitzen. Wird nun bei der Synthese

ein solches ddNTP eingebaut, kann die Polymerase keine weitere Verknüpfungsreaktion katalysieren und es erfolgt ein Kettenabbruch. Auf diese Weise entstehen viele unterschiedlich lange DNA-Stränge, die im Anschluss auf mittels Kapillar-Elektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Da die ddNTPs mit Fluorophoren markiert sind, die für die Basen Adenin, Cytosin, Thymin und Guanin ein unterschiedliches Absorptionsspektrum haben, können die Positionen der einzelnen Basen durch Laser-Anregung detektiert werden und zu einer Gesamtsequenz zusammengebaut werden.

Durchführung: Die eigentliche Sequenzierung erfolgte über die Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger mit dem Sequenzierungsgerät des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie.

Ansatz für Sequenzierung in 0,3 ml Sequenzierungsgefäßen:

2 µl	5 x Sequenzierungs-Puffer
1 µl	10 µM Sequenzierungs-Primer
40 ng/ µl	<i>N. meningitidis</i> -DNA
ad 9 µl	H <sub>2</sub> O

Für die Sequenzierung wurden 6 Primer verwendet, die in einem Abstand von je 500 bp im *hrpB*-Gen oder den flankierenden Bereichen liegen. Durch die Überlappung von *forward*- und *reverse*-Primern konnte eine doppelsträngige Sequenzierung durchgeführt werden.

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe folgender Programme: Die Qualität einer Sequenz wurde mit dem Chromatogramm von BioEdit und dem Programm Sequence Scanner überprüft. Das Zusammensetzen der einzelnen Sequenzen zu einer *Contig*-Sequenz wurde mit dem Programm CAP3 durchgeführt. Alignments wurden mit ClustalW2 und MegAlign berechnet und mit Jalview und HOMER graphisch dargestellt.

### III Ergebnisse

#### 1. Expression des Proteins FarR im Wachstumsverlauf

Die Expression eines Proteins kann konstitutiv sein oder aber im Wachstumsverlauf variieren. Deswegen wurde untersucht, ob die Menge des Proteins FarR im Bakterium vom Wachstum abhängt. Zunächst wurde das Wachstum von folgenden drei *N. meningitidis*-Stämmen über einen Zeitraum von 24 Stunden in PPM+ (supplementiertes Proteose Pepton Medium) gemessen: der bekapselte Serogruppe B Wildtyp-Stamm MC58, der komplementierte Stamm MC58 $\Delta$ farR(pAP-1farR), sowie die unbekapselte Version MC58 $\Delta$ siaD. Ausgehend von einer initialen Keimzahl von  $10^8$  Bakterien (entsprechend einer OD<sub>600</sub> von 0,1) wurde das Wachstum in den ersten acht Stunden in einstündigen Abständen mittels der optischen Dichte bestimmt, sowie der Wert nach 24 Stunden. Alle getesteten Stämme zeigen das typische Wachstumsmuster mit Anlaufphase (0-1 h), exponentieller Phase (1-3,5 h), Plateau-Phase (3,5-8 h) und Absterbe-Phase (Abb.6).

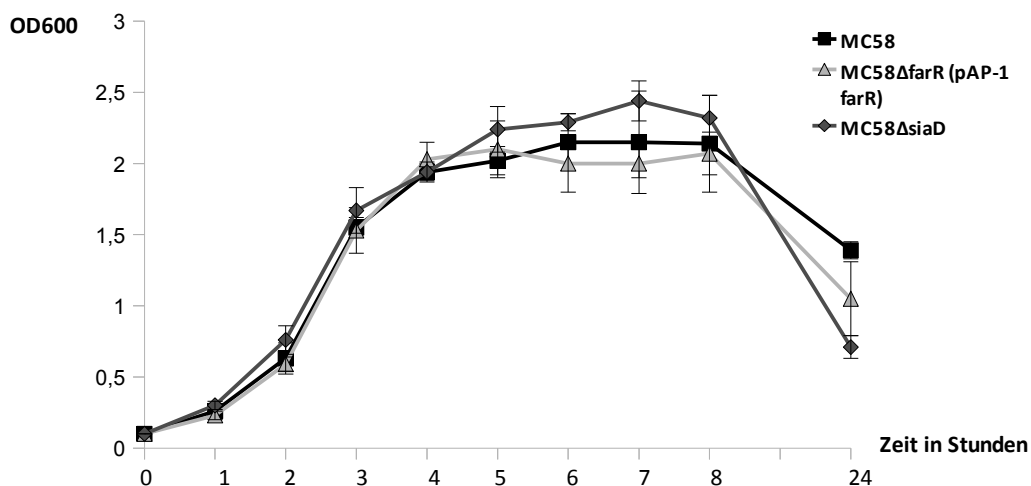


Abb. 6: Wachstumskurve der *N. meningitidis*-Stämme MC58, MC58 $\Delta$ siaD und MC58 $\Delta$ farR(pAP-1farR) in PPM+ über 24 Stunden.

Zeitpunkt/ Stamm	0	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	24 h
MC58	0,1	0,26	0,63	1,55	1,94	2,02	2,15	2,15	2,14	1,39
Standard-Abw.	0	0,04	0,11	0,07	0,06	0,1	0,2	0,36	0,34	0,06
MC58 $\Delta$ farR(pAP-1 farR)	0,1	0,23	0,59	1,53	2,03	2,1	2	2	2,07	1,05
Standard-Abw.	0	0,03	0,05	0,16	0,12	0,2	0,2	0,1	0,15	0,26
MC58 $\Delta$ siaD	0,1	0,3	0,76	1,67	1,94	2,24	2,29	2,44	2,32	0,71
Standard-Abw.	0	0,03	0,1	0,16	0,07	0,16	0,06	0,14	0,16	0,08

Tab. 2: Mittelwerte der optischen Dichte OD<sub>600</sub> der 24-stündigen Wachstumskurve der Stämme MC58, MC58 $\Delta$ siaD und MC58 $\Delta$ farR(pAP-1farR) mit Standardabweichung.

Als Vorbereitung für den Western Blot wurden Zell-Lysate mit dem Gesamtprotein aus der exponentiellen Wachstumsphase gewonnen. Diese lag, basierend auf den zuvor durchgeführten Wachstumskurven, im Zeitraum zwischen 1 und 4 Stunden. Somit wurde das Wachstum nach einer Anlaufphase von 1,5 Stunden über den vierstündigen Zeitraum der exponentiellen Wachstumsphase in PPM+ gemessen. Zu den Zeitpunkten 1 h, 2,5 h und 4 h wurden Proben mit einer Keimzahl von  $4 \times 10^8$  entnommen. Die Zeitpunkte repräsentieren die frühe, mittlere und späte exponentielle Wachstumsphase (Abb. 7).

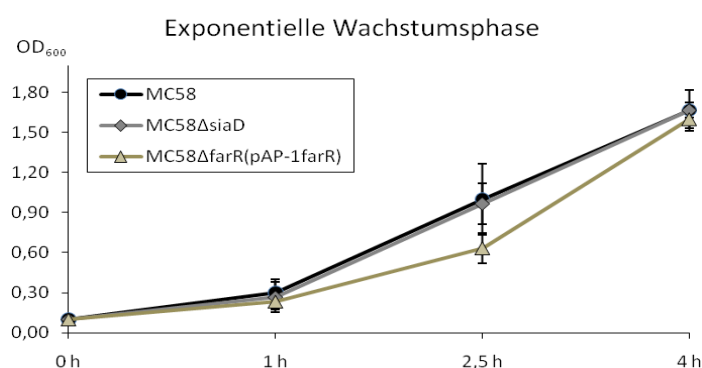


Abb. 7: Exponentielle Wachstumsphase der Stämme MC58, MC58 $\Delta$ siaD und MC58 $\Delta$ farR(pAP-1farR) in PPM+. Die Punkte 1 h, 2,5 h und 4 h markieren die Zeiten der Probenentnahmen zur Proteinbestimmung.

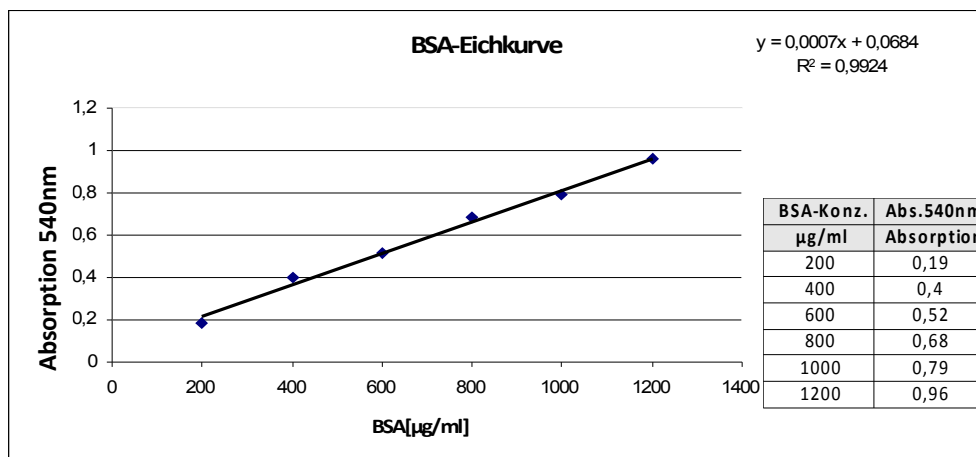
Stamm / Zeitpunkt	0 h	1 h	2,5 h	4 h
MC58	0,10	0,30	1,00	1,67
Standard-Abw.	0,00	0,10	0,26	0,15
MC58 $\Delta$ siaD	0,10	0,27	0,97	1,67
Standard-Abw.	0,00	0,12	0,15	0,06
MC58 $\Delta$ farR(pAP-1farR)	0,10	0,23	0,63	1,60
Standard-Abw.	0,00	0,06	0,12	0,10

Tab. 3: Mittelwerte der optischen Dichte OD<sub>600</sub> der Stämme MC58, MC58 $\Delta$ siaD und MC58 $\Delta$ farR(pAP-1farR) mit Standardabweichung.

Von jedem Lysat wurde in einem BCA-Assay die Gesamt-Protein-Konzentration bestimmt, so dass in der folgenden SDS-Elektrophorese die gleiche Proteinmenge (10 mg) aufgetragen werden konnte. Tabelle 4 zeigt die im BCA-Assay gemessenen Absorptionswerte der Lysate. Die für die Berechnung der Eichkurve nötigen Werte wurden durch die Messwerte der BSA-Eichreihe bestimmt. Mit Hilfe der erstellten Eichreihe und den gemessenen Absorptionswerten der Lysate konnte die Proteinkonzentration der Lysate berechnet werden.

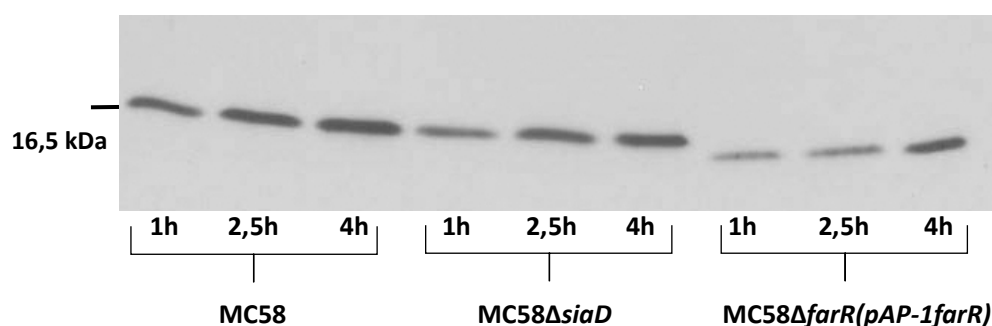
Stamm	Lysat nach	Messung	Messung	Mittelwert	MW	Konz. [ $\mu$ g/ml]	Dilution	Endkonz. [ $\mu$ g/ml]	Endkonz. [mg/ml]
MC58	1h	1,90	1,86	1,88	1,96	2701,21	1000	2701214,29	2701,2
		2,07	2,02	2,04					
MC58	2,5h	2,44	2,66	2,55	2,49	3454,79	1000	3454785,71	3454,8
		2,44	2,41	2,43					
MC58	4h	2,57	2,45	2,51	2,45	3397,64	1000	3397642,86	3397,6
		2,37	2,40	2,38					
MC58 $\Delta$ siaD	1h	2,00	1,97	1,99	1,87	2574,79	1000	2574785,71	2574,8
		1,72	1,79	1,75					
MC58 $\Delta$ siaD	2,5h	2,46	2,43	2,44	2,72	3780,86	1000	3780857,14	3780,9
		2,98	3,00	2,99					
MC58 $\Delta$ siaD	4h	2,28	2,25	2,26	2,35	3264,07	1000	3264071,43	3264,1
		2,32	2,56	2,44					
MC58 $\Delta$ farR(pAP-1farR)	1h	2,31	2,32	2,32	2,3	3180,86	1000	3180857,14	3180,9
		2,25	2,30	2,27					
MC58 $\Delta$ farR(pAP-1farR)	2,5h	2,73	2,67	2,70	2,59	3603	1000	3603000	3603,0
		2,47	2,50	2,48					
MC58 $\Delta$ farR(pAP-1farR)	4h	2,79	2,68	2,74	2,63	3663,36	1000	3663357,14	3663,4
		2,53	2,53	2,53					

Tab. 4: Exemplarische Darstellung der im Spektrophotometer gemessenen Absorptionswerte bei 540nm einer Messreihe. Die Absorptionswerte der Meningokokken-Lysate der Stämme MC58, MC58 $\Delta$ siaD und MC58 $\Delta$ farR(pAP-1farR) wurden pro Lysat vier mal gemessen. Für die weitere Berechnung der Endkonzentration wurde der Mittelwert verwendet.



**Abb. 8:** BSA-Eichkurve auf Basis der bei 540 nm gemessenen Absorptionenwerte der BSA-Verdünnungsreihe. Die Eichkurve wurde mit Hilfe der Geradengleichung  $y = m \cdot x + b$  berechnet werden.

Über SDS-Elektrophorese und Western Blot der Lysate konnte die Menge des Proteins FarR in den verschiedenen Phasen des exponentiellen Wachstums nachgewiesen werden. Dazu wurde von jedem Lysat 10 mg Gesamtprotein auf das SDS-Gel aufgetragen. Der Antikörper  $\alpha$ -FarR kam in einer 1:5000 Verdünnung zum Einsatz. Die Lysate von MC58, MC58 $\Delta$ *siaD* und MC58 $\Delta$ *farR*(*pAP-1farR*) aus der frühen (1 h), mittleren (2,5 h) und späten (4 h) exponentiellen Wachstumsphase zeigten mit zunehmender Wachstumsdauer eine ansteigende Menge des Proteins FarR im Bakterium.



**Abb. 9:** Western-Blot-Nachweis des Proteins FarR. Die Proben der Stämme MC58, MC58 $\Delta$ *siaD* und MC58 $\Delta$ *farR*(*pAP-1farR*) zeigen die konstante Zunahme des Proteins FarR im Bakterium zu den Zeitpunkten 1 h, 2,5 h und 4 h.

Die Expression von *farR* erfolgt in MC58 und MC58 $\Delta$ *siaD* über den natürlichen Promotor. In der Komplementante hingegen steht der transformierte Genabschnitt unter der Kontrolle des Porin-Promotors. Daher wurde zusätzlich ein Abgleich mit der Porin-Expression durchgeführt. Porin A ist ein Klasse 1-Außenmembranprotein, welches zu den *housekeeping*-Genen zählt, die



kontinuierlich synthetisiert werden, d.h. der Promotor von Porin A bewirkt eine gleichmäßige Expression des Proteins. Die Western Blot Detektion zeigte, dass die Menge des Porin A-Proteins in den drei Stämmen MC58, MC58 $\Delta$ siaD und MC58 $\Delta$ farR(pAP-1farR) im Verlauf der exponentiellen Phase konstant bleibt.

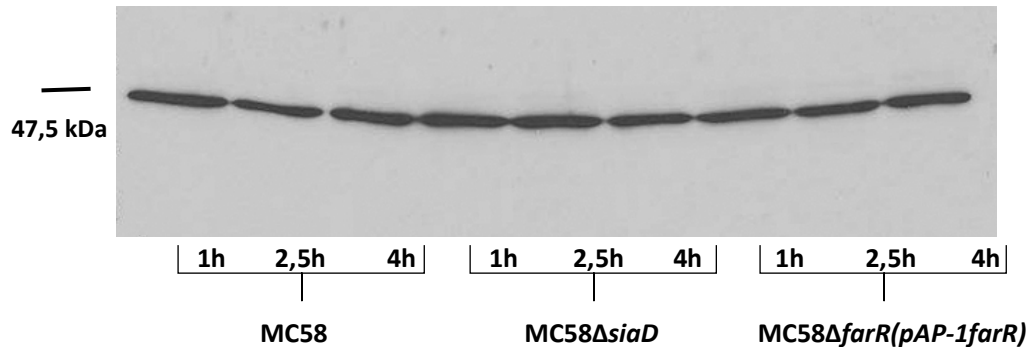


Abb. 10: Western-Blot-Nachweis des Proteins PorA. Die Proben der Stämme MC58, MC58 $\Delta$ siaD und MC58 $\Delta$ farR(pAP-1farR) zeigen eine konstante Menge des Proteins PorA im Bakterium zu den Zeitpunkten 1 h, 2,5 h und 4 h.

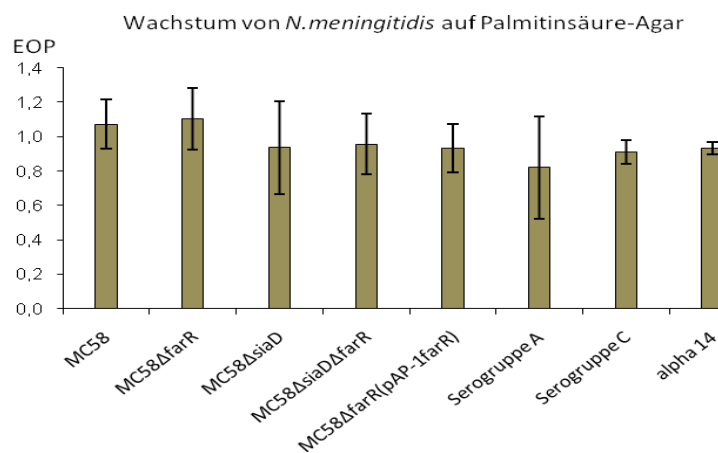
## 2. Verhalten von *Neisseria meningitidis* bei Kontakt mit Palmitinsäure

Palmitinsäure ist eine langkettige Fettsäure mit einem hydrophoben Fettsäurerest von 16 Kohlenstoff-Atomen. Frühere Studien zeigen, dass Palmitinsäure von allen getesteten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Fettsäuren die stärkste hemmende Wirkung auf das Wachstum von Gonokokken hat. (Miller et al., 1977). Schaltet man jedoch das *farR*-codierende Gen aus, so führt das zu einer Erhöhung der *farAB*-Expression und damit zu einer gesteigerten Fettsäureresistenz (Lee et al., 2003). Ob dies auch für die nahe verwandten Meningokokken zutrifft, wurde in folgendem Assay untersucht: Auf mit Palmitinsäure präparierten GC-Agarplatten wurde eine definierte Menge einer Meningokokken-Suspension ausplattiert. Nach einer Nacht Inkubation im Brutschrank wurde die Zahl der CFU (*Colony Forming Units*) auf den Palmitinsäureplatten (PS) mit denen auf den Kontrollplatten (K) verglichen. Setzt man diese beiden Werte in Relation zueinander ( $CFU_{PS}/CFU_K$ ) erhält man die EOP (= *Efficiency of Plating*). Sie ist ein Maß für die Fähigkeit eines Stamms in Fettsäure-reicher Umgebung zu wachsen. Eine EOP von 1 entspricht einem im Vergleich zur Kontrolle unveränderten Wachstum. Das bedeutet, je höher der EOP-Wert, desto ausgeprägter ist die Fettsäureresistenz eines Stammes.

Stamm	Serogruppe	EOP-MW	Stand.-Abw.
MC58	B	1,07	0,14
MC58 $\Delta$ siaD	B	0,94	0,27
MC58 $\Delta$ farR	B	1,10	0,18
MC58 $\Delta$ siaD $\Delta$ farR	B	0,96	0,18
MC58 $\Delta$ farR(pAP-1farR)	B	0,93	0,14
Z2491	A	0,82	0,30
FAM18	C	0,91	0,07
$\alpha$ 14	<i>cnI</i>	0,93	0,04

Tab. 5: Fettsäureresistenz-Versuch: *N. meningitidis*-Stämme mit den zugehörigen EOP-Mittelwerten aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

In diesem Assay wiesen alle getesteten Stämme EOP-Werte zwischen 0,82 und 1,10 auf, was eine hohe Resistenz gegenüber Palmitinsäure anzeigte. Die Fähigkeit in Palmitinsäure-reicher Umgebung zu wachsen war nicht abhängig von der Ausprägung einer Kapsel, da auch der *capsule null locus* Stamm  $\alpha$  14 und die Kapsel-*knockout*-Mutante MC58 $\Delta$ *siaD* das gleiche Verhalten wie die bekapselten Stämme zeigten. Des Weiteren konnte auch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Serogruppen A, B und C beobachtet werden. Die Fettsäure-Resistenz veränderte sich auch weder durch Ausschalten des Regulator-Proteins FarR, noch durch dessen Komplementierung.



**Abb. 11:** Mittelwerte der *Efficiency of Plating-Assays* (EOP) mit Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten der *N. meningitidis*-Stämme MC58, MC58 $\Delta$ farR, MC58 $\Delta$ siaD, MC58 $\Delta$ siaD $\Delta$ farR, MC58 $\Delta$ farR(pAP-1farR), sowie Z2491, FAM18 und alpha14. Die hohen EOP-Werte lassen auf eine hohe Resistenz gegenüber Palmitinsäure schließen.

### 3. Verhalten von *Neisseria gonorrhoeae* bei Kontakt mit Palmitinsäure

In *N. gonorrhoeae* ist die Resistenz gegenüber langkettigen Fettsäuren keine konstitutive Fähigkeit, sondern unter anderem abhängig von der Expression des Far-Regulators und den Umgebungsbedingungen (Lee and Shafer, 1999, Lee et al., 2003). Um nachzuweisen, wie sensibel Gonokokken-Wildtyp-Stämme auf die Anwesenheit von Palmitinsäure reagieren, wurden 16 klinische Isolate und der Laborstamm MS11 in dem gleichen Assay wie *N. meningitidis* (s.o.) getestet.

Stamm-Nr.*	Isolations-Ort	EOP-MW	Stand.-Abw.
MS 11	-	1,038	0,155
1146	Rektum	0,828	0,107
2805	Oropharynx	0,805	0,277
155	Blut	0,765	0,137
2498	-	0,647	0,145
1092	Urethra	0,590	0,055
308	Cervix	0,531	0,183
489	-	0,460	0,132
38	-	0,327	0,188
245	-	0,224	0,090
114	-	0,217	0,062
359	-	0,116	0,066
452	Vagina	0,065	0,049
522	nicht invasiv	0,045	0,041
1225	Urethra	0,019	0,014

Tab. 6: Fettsäure-Resistenz-Test: Stämme von *N. gonorrhoeae* mit ihrem Isolationsort und den jeweiligen EOP-Mittelwerten mit Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. \* gibt die Stamm-Nr. des NRZM Würzburg an.

Dabei stellte sich die Situation in *N. gonorrhoeae* völlig anders dar als in den intrinsisch resistenten *N. meningitidis*. Die getesteten Gonokokken zeigten ein breites Verhaltens-Spektrum. So erwiesen sich der Laborstamm MS11 und die Isolate aus Rektum, Oropharynx und Blut mit EOP-Werten zwischen 0,77 und 1,04 als besonders resistent gegenüber Palmitinsäure. Dagegen waren die anderen Stämme, z.B. aus Vaginal- und Urethral-Abstrichen nur mäßig bis gar nicht in der Lage auf Palmitinsäureplatten anzuwachsen (EOP zwischen 0,65 bis 0,0).

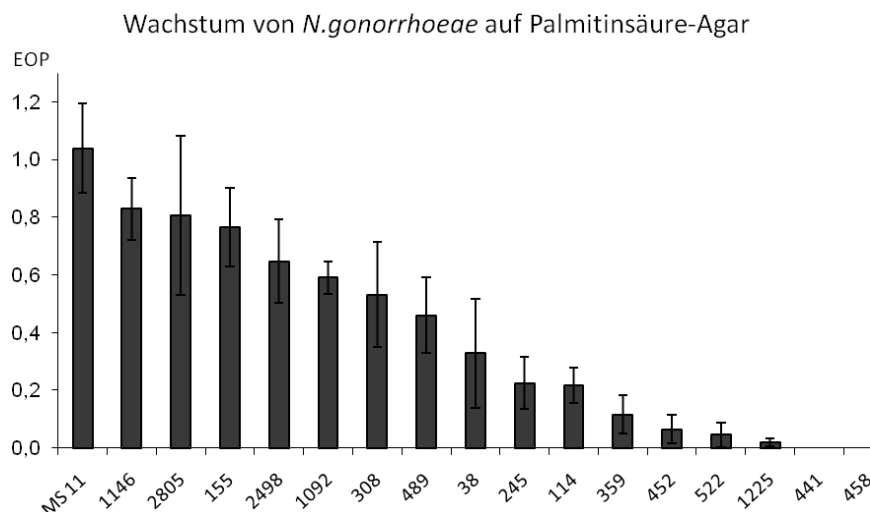


Abb. 12: Mittelwerte der *Efficiency of Plating* (EOP) mit Standardabweichung der Palmitinsäure-Resistenz-Testung klinischer Isolate von *N. gonorrhoeae* (Triplikate).

#### 4. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Im klassischen Modell der Transkriptionskontrolle bindet der Transkriptionsregulator direkt am Promotorbereich des regulierten Gens. In *N. meningitidis* bindet FarR an eine 16 bp lange Nukleotidsequenz im Promotorbereich vor *nadA* und bewirkt dadurch dessen Repression. Zudem bindet FarR, wie auch in *N. gonorrhoeae*, an eine Bindungssequenz in der Promotorregion von *farAB* (NMB0318/0319), allerdings ohne die Expression zu beeinflussen (Schielke et al., 2009). In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob weitere Gene unter der direkten Kontrolle von FarR stehen. Dazu wurde in *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSAs) überprüft, ob FarR direkt an eine ausgewählte DNA-Sequenz bindet. Um weitere potentielle Bindepartner im Genom des Serogruppe B- Stamms MC58 zu finden, wurde aus den beiden positiven Bindungs-Motiven von *nadA* und *farAB* eine minimale Bindungssequenz erstellt:

5`	TAA	TAT	GCA	CAT	ATT	A	3`	ATG NMB1994
5`	TTA	TAT	AAA	CGA	AAT	A	3`	ATG NMB0318
5`	NWN	TAT	NNN	NRW	ANT	N	3`	Minimale Bindungssequenz

Abb. 13: Erstellung einer minimalen Bindesequenz für den Regulator FarR aus den bereits bekannten Bindungspartnern *farAB* (NMB0318/0319) und *nadA* (NMB1994). A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, N = jede beliebige Base, W = A oder T, R = A oder G

Das Genom des sequenzierten Stammes MC58 wurde mit dem Programm Artemis V10 (Rutherford et al., 2000) auf mögliche Bindungsstellen für das Regulatorprotein FarR durchsucht. Dabei ergaben sich 83 mögliche Bindestellen im Promotorbereich transkribierter oder putativer Gene. Davon wurden sieben Gene ausgewählt und die jeweiligen Promotorabschnitte mit zentraler, putativer FarR-Bindestelle mittels PCR amplifiziert:

NMB0071	=> <i>capsule polysaccharide export outermembrane proteine (ctrA)</i>
NMB0493	=> <i>hemagglutinin/hemolysin related protein (hrpA)</i>
NMB1053	=> <i>opacity protein c (opc)</i>
NMB1780	=> <i>hemagglutinin/hemolysin related protein (hrpB)</i>
NMB1882	=> <i>TonB dependent receptor (tonB)</i>
NMB2053	=> <i>ubiquinol-cytochrom c reductase, iron-sulfur subunit (petA)</i>

Gen aus MC58	Putative Bindesequenz in 3' => 5'
NMB0071	ATT TAT AAT TAT ATT A
NMB0493	AAA TAT TGC TAA AAT A
NMB1053	TAA TAT ATG TAA AAT C
NMB1780	GAT TAT AAA AAT ATT A
NMB1882	CAA TAT GCC GAA AAT A
NMB2053	AAA TAT CAT AAA ACT T

Tab. 7: Putative Bindesequenz in der Promotorregion des jeweiligen Genes in MC58.

Zur Herstellung der DNA-Sonden wurden diese amplifizierte DNA-Abschnitte mit Digoxigenin markiert, um eine direkte Protein-DNA-Bindung zu untersuchen. Die folgende Abbildung zeigt den Nachweis, dass die Digoxigenin-Markierung der Sonden erfolgreich verlief:

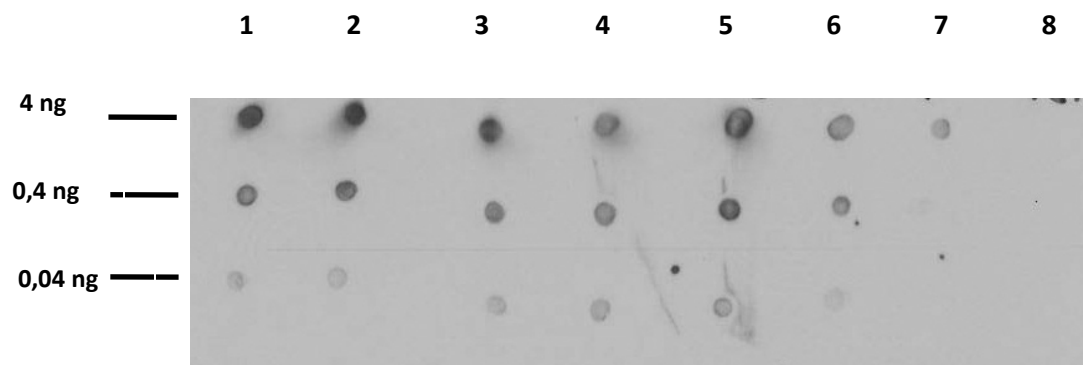


Abb. 14: Röntgen-Nachweis zur Kontrolle der Digoxigenin-Markierung der DNA-Sonden NMB0493(1), NMB1053 (2), NMB1780 (3), NMB1843 (4), NMB2053 (5), sowie die vom Hersteller mitgelieferten Kontroll-Oligonukleotide K6 (6) und K7 (7). Bei (8) wurde nur TEN-Puffer als Negativ-Kontrolle aufgetragen. Die Punkte zeigen vertikal eine Verdünnung der Sondenkonzentration von 4 ng, 0,4 ng und 4 pg.

#### 4.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay mit FarR und den putativen Bindesequenzen der Gene

##### NMB0071, NMB0493, NMB1053, NMB1780, NMB1882 und NMB2053

Mit den Sonden NMB0071, NMB0493, NMB1053, NMB1780, NMB1882 und NMB2053 wurden *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA), wie in Kapitel II 2.17 beschrieben, durchgeführt. Von den markierten Oligonukleotiden wurde standardmäßig eine Konzentration von 0,4 ng/  $\mu$ l eingesetzt und das Protein FarR in einer Menge von 150 ng. Als Positivkontrolle diente - auch in allen nachfolgenden EMSAs - ein Ausschnitt des Promotors von NMB1994 (*nadA*), der die 16 bp lange Bindungsstelle für FarR enthielt. Dieser Abschnitt wies eine spezifische und reproduzierbare Bindung an FarR auf. Ein solcher hochmolekularer DNA-Protein-Komplex wird aufgrund seiner größeren Molekularmasse in der nativen Gel-Elektrophorese retardiert, im Vergleich zu den markierten DNA-Sonden. In der Röntgendetektion ist dies als eine Verschiebung der Laufbande im Vergleich zur Bande der Sonden erkennbar (*shift*). Ein solcher *shift* ließ sich nur mit der Positivkontrolle NMB1994 nachweisen. Die Proben NMB0071, NMB0493, NMB1053, NMB1780, NMB1882 und NMB2053 zeigten, wie in Abbildung 10 dargestellt, keine *shift*-Reaktion, und damit keine Protein-DNA-Interaktion im Sinne einer direkten Bindung.

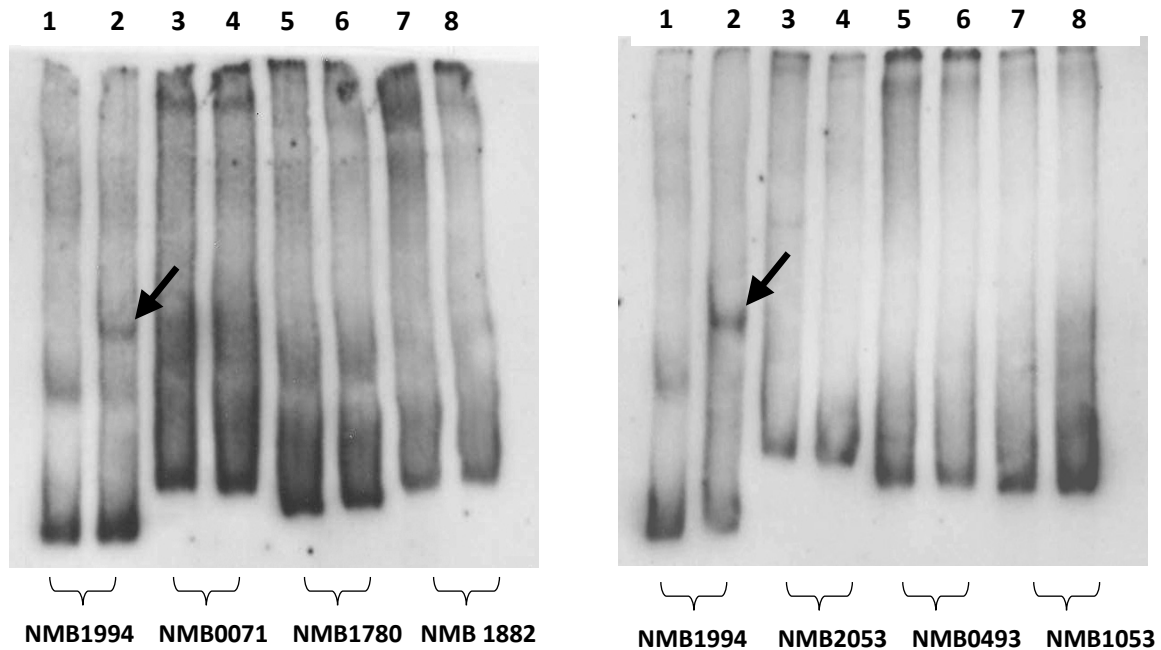


Abb. 15: Röntgenfilme der *Electrophoretic Mobility Shift Assays* mit dem Protein FarR und den Digoxigeninmarkierten DNA-Sonden NMB1994 (*nadA*), NMB0071 (*ctrA*), NMB0493 (*hrpA*), NMB1780 (*hrpB*) und NMB 1882 (*tonB*). NMB1994 diente als Positiv- Kontrolle. Die erste Spur stellt immer die Laufbande der Sonde ohne Protein dar, bei der zweiten Spur ist das Protein FarR zugegeben. In der Positivkontrolle NMB1994 zeigt sich in der zweiten Spur eine *shift*-Bande als Korrelat der Bindung zwischen *nadA* und FarR (Pfeil). Bei den übrigen Banden ist kein *shift* zu erkennen.

#### 4.2 *Electrophoretic Mobility Shift Assay* mit NMB1053 (*opc*) und FarR-Gradient

Für die EMSAs wurde bisher eine Proteinkonzentration von 150 ng FarR eingesetzt. Diese Menge ist ausreichend, um eine *shift*-Reaktion mit NMB1994 zu erreichen. Ob eine größere Menge an FarR zu einer Bindung an andere DNA-Fragmente führt, wurde in einem Gradienten-*shift* mit NMB1053 (*opc*) und ansteigenden Konzentrationen von FarR überprüft. Begonnen wurde mit einer Menge von 125 ng FarR, die sich über 250 ng, 500 ng, 1000 ng bis zu 2000 ng Protein steigerte. Die Konzentration der DNA-Sonden blieb unverändert bei 0,4 ng/  $\mu$ l. Auch bei größeren Mengen FarR zeigte sich in den NMB1053-Proben keine *shift*-Bande und damit keine direkte Bindung von FarR an die DNA. Als Positivkontrolle diente wieder *nadA*.

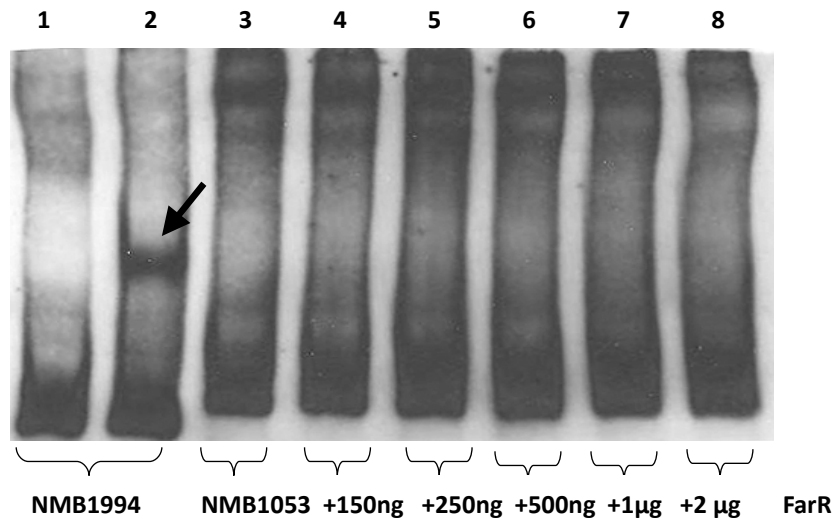


Abb. 16: Röntgenauswertung des Gradienten-*Electrophoretic Mobility Shift Assays*. Dabei wurden zu einer gleich bleibende Menge der DNA-Sonde NMB1053 (*opc*) ansteigende Konzentrationen des Proteins FarR zugegeben. Die Banden (1) und (2) zeigen die Positiv-Kontrolle NMB1994 (*nadA*) bei der mit 150 ng FarR eine *shift*-Reaktion erzielt wurde (Pfeil). Bande (3) ist die Laufbande des DIG-markierten NMB1053, bei den Banden (4) bis (8) ist FarR in den Konzentrationen 150 ng, 250 ng, 500 ng, 1µg und 2 µg zugegeben. Bei keiner der Banden (4) bis (8) war ein *shift* der Laufbande zu erkennen.

#### 4.3 Antikörper-*Electrophoretic Mobility Shift Assay*

In einem Antikörper-*shift*-Assay, auch *supershift* genannt, wird zusätzlich zur DNA-Sonde und zum Protein ein spezifischer, gegen das Protein gerichteter Antikörper hinzugefügt. Durch Bindung des Antikörpers an sein Protein entstehen hochmolekulare, vernetzte Komplexe aus DNA, Protein und Antikörper. Diese zeigen sich als Laufbande oberhalb der normalen *shift*-Bande. Ein solcher Antikörper-*shift* wurde mit der Sonde NMB1053 und einem affinitätsgereinigten  $\alpha$ -FarR-Antikörper durchgeführt. Der Antikörper wurde in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

2 µl	Antikörper $\alpha$ -FarR in der Verdünnung 1:1000 in H <sub>2</sub> O
4 µl	Antikörper $\alpha$ -FarR in der Verdünnung 1:1000 in H <sub>2</sub> O
2 µl	Antikörper $\alpha$ -FarR in der Verdünnung 1:10 in H <sub>2</sub> O

Von den DNA-Sonden wurden 0,4 ng und von FarR 1000 ng verwendet. In diesem Versuch konnte weder ein *shift* noch ein *supershift* beobachtet werden. Es bildeten sich also keine hochmolekularen Protein-DNA-Antikörper-Komplexe, so dass eine Interaktion der putativen Regulatorbindestelle vor dem *opc*-Gen und dem Protein FarR nicht nachgewiesen werden konnte.

#### 4.4 Kompetitiver *Electrophoretic Mobility Shift Assay*

Ein kompetitiver EMSA dient der Überprüfung der Spezifität einer DNA-Protein-Bindung. Als DIG-markiertes Oligonukleotid kam NMB1053 (*opc*) zum Einsatz. Als unspezifischer Kompetitor wurde ein Bereich aus der Regulator-Bindestelle des Gens NMB1994 (*nadA*) eingesetzt, der nachweislich nicht für die Protein-Bindung verantwortlich ist. Spezifischer Konkurrent war zum einen das unmarkierte DNA-Fragment der Positiv-Kontrolle *nadA*, welches im Überschuss zugegeben wurde. Zum anderen wurde unmarkiertes Oligonukleotid von NMB1053 zugegeben, das im Falle einer direkten Bindung von FarR und *opc* ebenfalls das markierte *opc* aus der Proteinbindung verdrängen würde und damit die Laufbande der der Kontrolle entspräche.

In den NMB1053-Proben zeigte sich keine Verschiebung der Laufbande, wie man es bei Zugabe von Kompetitoren im Falle einer spezifischen bzw. unspezifischen Bindung erwarten würde.

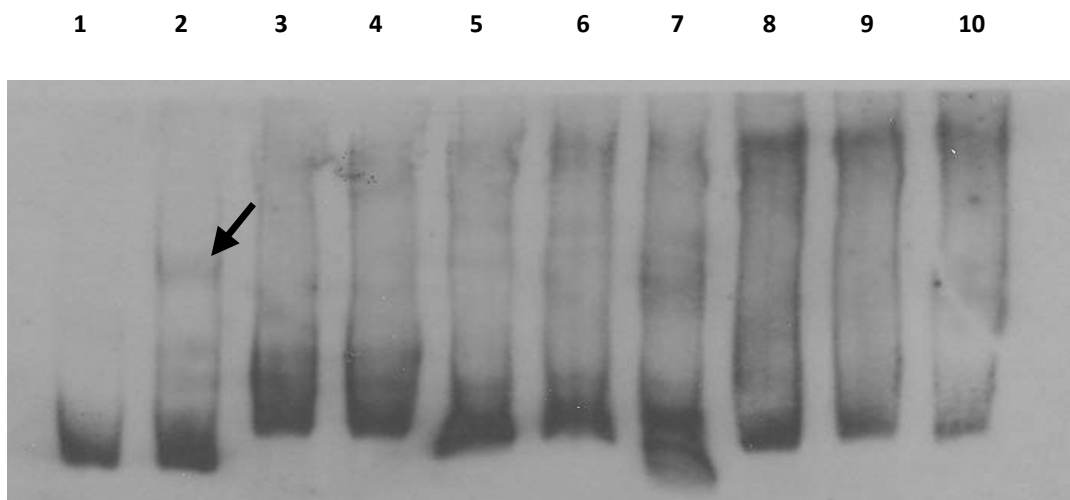


Abb. 17: Die Banden (1) und (2) zeigen die Positiv-Kontrolle NMB1994 (*nadA*) ohne und mit Protein FarR. Der Pfeil zeigt die *shift*-Bande an. Bande (3) ist die DIG-markierte Sonde NMB1053 (*opc*). Bei (4) sind nur 1000 ng des Proteins FarR zugegeben. Bei (5) sind zusätzlich 400 ng des unspezifischen Kompetitors zugesetzt. Bei (6) sind 400 ng spezifischer Kompetitor *nadA* zugegeben und bei (7) 400 ng des spezifischen Kompetitors *opc*. Die Banden Nr. (8)-(10) zeigen einen Antikörpershift. Zu der DNA-Sonde NMB1053 ist sowohl FarR mit 1000 ng zugegeben, als auch ein spezifischer  $\alpha$ -FarR-Antikörper in den Verdünnungen 2  $\mu$ l von 1:1000 (8), 4  $\mu$ l von 1:1000 (9) und 2  $\mu$ l von 1:1000 (10).

Im Genom von MC58 wurden zahlreiche putative Bindestellen für FarR gefunden, die auf der minimalen Bindesequenz zwischen *nadA* und *farAB* beruhen. Dennoch konnte in den durchgeführten Electrophoretic Mobility Shift Assays keine weitere direkte Bindung des Regulatorproteins FarR an einen der ausgewählten Promotorbereiche nachgewiesen werden.



## 6. Infektion humaner, polymorphkerniger Granulozyten mit *Neisseria meningitidis*

Granulozyten stellen einen bedeutenden Teil des menschlichen Immunsystems zur Abwehr bakterieller Erreger dar. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, dass die Abwehrzellen zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen differenzieren können. Für diese Unterscheidung sind Proteine auf der Zelloberfläche essentiell. Schaltet man in *N. meningitidis* den Regulator FarR aus, so kommt es zu einer Überexpression des Adhäsins NadA an der Oberfläche der Meningokokken (Schielke et al., 2009). Von NadA wurde bereits gezeigt, dass es mit verschiedenen Bestandteilen des Immunsystems interagiert (Capecchi et al., 2005). Ob und wie NadA auch in die Interaktion zwischen Meningokokken und polymorphkernigen Granulozyten eingreift, wurde in folgendem Infektions-Assay untersucht. Aus menschlichem Spenderblut wurden polymorphkernige Leukozyten (PMNL, Granulozyten) isoliert und mit den *N. meningitidis*-Stämmen MC58 (Wildtyp) und MC58 $\Delta$ *farR* (*farR*-Deletions-Mutante) infiziert. Das Ausmaß der Abtötung der Meningokokken durch die Granulozyten wurde nach drei Stunden mittels Ausplattieren und Zählen der Kolonien bestimmt.

Trotz der großen Schwankungen der Abtötung zwischen den einzelnen Versuchen, ließ sich eine konstant höhere Abtötung der *farR*-knockout-Mutante MC58 $\Delta$ *farR* im Vergleich zum Wildtyp MC58 in fünf der sechs durchgeführten Versuche feststellen (Abb.18). Der Mittelwert der Abtötung nach drei Stunden betrug bei MC58 57,4 %. Bei der Mutante MC58 $\Delta$ *farR* lag der Anteil mit 76,8% jedoch deutlich höher. Eine Berechnung der Signifikanz der Ergebnisse mit dem studentischen t-Test ergab, dass dieser Unterschied zwar deutlich zu beobachten, jedoch statistisch nicht signifikant war ( $p > 0,1$ ).

MC58						
Datum		MW 0h	MW 3h	Abtötung in %	MW Abtötung in %	Standard-Abweichung
04.06.2009	Infektion	65	75	56,8	57,4	28,1
	Kontrolle	83	174			
10.06.2009	Infektion	97	224	40,2		
	Kontrolle	109	374			
15.06.2009	Infektion	164	84	78,4		
	Kontrolle	162	391			
23.06.2009	Infektion	78	79	73,7		
	Kontrolle	89	301			
23.06.2009	Infektion	165	376	10,5		
	Kontrolle	160	421			
25.06.2009	Infektion	227	72	84,7		
	Kontrolle	217	469			

Tab. 8: Mittelwerte der gezählten Kolonien (Triplikate) von MC58 im direkten Vergleich Infektion vs. Kontrolle. Der 0 h-Wert dient als Ausgangsbasis; die Kontroll-Spalte zeigt das normale Wachstumsverhalten nach 3 h. Des Weiteren zeigt die Tabelle die prozentuale Abtötung von MC58 durch die polymorphkernigen Granulozyten in Einzelwerten und im Mittelwert mit Standardabweichung.

MC58 $\Delta$ farR						
Datum		MW 0h	MW 3h	Abtötung in %	MW Abtötung in %	Standard-Abweichung
04.06.2009	Infektion	123	158	50,8	76,8	19,39
	Kontrolle	129	321			
10.06.2009	Infektion	21	166	59,6		
	Kontrolle	39	410			
15.06.2009	Infektion	94	23	96,1		
	Kontrolle	95	599			
23.06.2009	Infektion	58	36	91,4		
	Kontrolle	82	415			
23.06.2009	Infektion	58	100	69,7		
	Kontrolle	50	331			
25.06.2009	Infektion	60	25	93,3		
	Kontrolle	61	375			

Tab. 9: Mittelwerte der gezählten Kolonien (Triplikate) von MC58 $\Delta$ farR im direkten Vergleich Infektion vs. Kontrolle. Der 0 h-Wert dient als Ausgangsbasis; die Kontroll-Spalte zeigt das normale Wachstumsverhalten nach 3 h. Des weiteren zeigt die Tabelle die prozentuale Abtötung von MC58 $\Delta$ farR durch die polymorphkernigen Granulozyten in Einzelwerten und im Mittelwert mit Standardabweichung.

Versuch Nr.	MC58	MC58 $\Delta$ farR	Differenz der MW	MW der Differenz	Differenz der Stand.-Abw.
1	56,8	50,8	-6	19,4	21,7
2	40,2	59,6	19,4		
3	78,4	96,1	17,7		
4	73,7	91,4	17,7		
5	10,5	69,7	59,2		
6	84,7	93,3	8,6		

Tab. 10: Vergleich der Mittelwerte (MW) der prozentualen Abtötung: Angegeben sind die Differenz bezogen auf den Einzelversuch und die Mittelwerte der Differenz, sowie die Differenz der Standardabweichung.

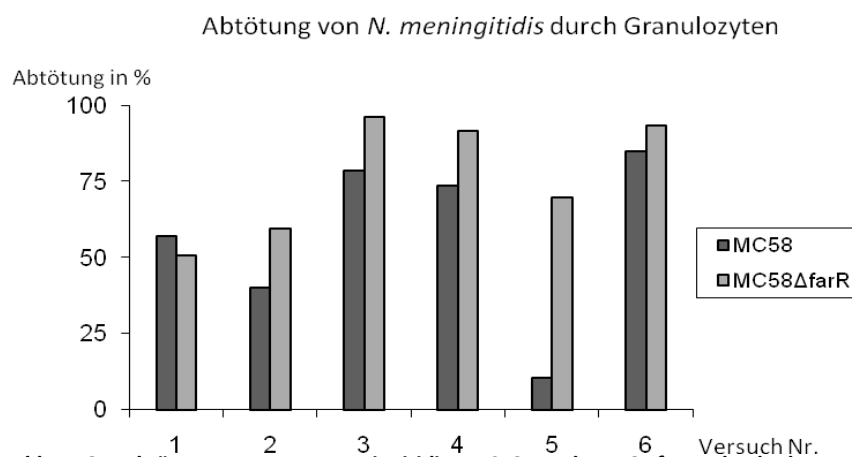


Abb. 18: Abtötung von *N. meningitidis* MC58 und M58 $\Delta$ farR durch humane polymorphkernige Granulozyten in der direkten Gegenüberstellung.

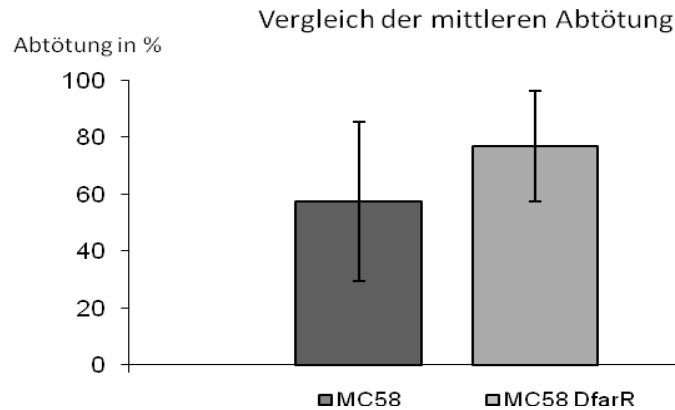


Abb. 19: Mittelwerte der prozentualen Abtötung von *N. meningitidis* Wildtyp MC58 und Mutante MC58 $\Delta$ farR in % mit Standardabweichung.

### 7. Sequenz-Analyse des *hemagglutinin/hemolysin-related protein B*-Gens in *Neisseria meningitidis*

Das durch das *hemagglutinin/hemolysin-related protein B*-Gen codierte Protein HrpB ist Bestandteil des Zwei-Partner-Sekretions-Systems in *N. meningitidis* (Schmitt et al., 2007). HrpB ist ein in der äußeren Bakterienmembran lokalisiertes Transport-Protein und ist dort verantwortlich für den Transport des Exoproteins HrpA ins extrazelluläre Milieu. Die Sequenzanalyse des *hrpB*-Gens wurde aus verschiedenen Gründen durchgeführt: Zum einen befindet sich in der Promotorregion des Serogruppe C Stamms FAM 18, sowie in MC58 (SG B) und Z2491 (SG A) eine putative Bindestelle für den Transkriptionsregulator FarR und *hrpB* zählt somit möglicherweise zu den von FarR regulierten Genen. Ein zweiter Grund war, dass HrpB als Außenmembran-Protein Kontakt mit dem menschlichen Immunsystem hat und somit einen potentiellen Vakzine-Bestandteil darstellt. Aus diesen Gründen sollte die Sequenz des *hrpB*-Gens und seiner Promotorregion in verschiedenen Meningokokken-Stämmen untersucht werden.

#### 7.1 Verwendete Stämme

Für die Sequenzanalyse des *hemagglutinin/hemolysin-related protein B*-Gens (*hrpB*) wurden 22 verschiedene *N. meningitidis*-Stämme ausgewählt. Darunter waren sowohl Stämme, die von gesunden Trägern isoliert wurden, als auch Stämme von Meningitis- und Sepsis-Patienten. Sie gehörten zu verschiedenen Serogruppen (B, C, W, Y, E29, *cnI*) und verschiedenen klonalen Komplexen, unter denen auch einige Vertreter der hypervirulenten Linien ST 8, 11, 32 und 41/44 waren. Die Stämme wurden im Rahmen der bayerischen Trägerstudie des NRZM Würzburg isoliert (Claus et al., 2005), oder vom IHM Würzburg zur Verfügung gestellt (Tab. 11). Zusätzlich wurden die bereits sequenzierten *hrpB*-Gene der Referenzstämme Z2491, MC58, FAM18 und  $\alpha$ 14 als Vergleich herangezogen (Tab. 12).

Stamm	Serogruppe	Klonaler Komplex	Isolat
DE 7080	C	8	invasiv
DE 7510	B	8	invasiv
DE 7100	W-135	11	invasiv
2370	C	11	invasiv
Y 172	Y	11	Träger
3887	B	32	Träger
DE 6790	B	32	invasiv
$\alpha$ 710	B	41/44	Träger
$\alpha$ 16	B	41/44	Träger
B54	B	41/44	Träger
P43	B	41/44	Träger
DE 10173	B	41/44	invasiv
$\alpha$ 219	B	41/44	Träger
$\alpha$ 42	cnl	53	Träger
P19	cnl	53	Träger
P41	cnl	53	Träger
$\alpha$ 7	29E	60	Träger
P 82	C	60	Träger
A64	Y	60	Träger
P69	B	213	Träger
P12	29E	254	Träger
3671	cnl	845	Träger

Tab. 11: *N. meningitidis*-Stämme, in denen die Sequenz des *hrpB*-Gens analysiert wurde. Die hellgrau markierten klonalen Komplexe gehören zu den hypervirulenten Linien.

Stamm	Serogruppe	Klonaler Komplex	Isolat	<i>hrpB</i> -Gen	Referenz
FAM18	C	11	invasiv	NMC0443	Vogel et al., 1998
MC58	B	32	invasiv	NMB1780	Tettelin et al., 2000
Z2491	A	4	invasiv	NMA0687	Parkhill et al., 2000
$\alpha$ 14	cnl	53	Träger	NMO0397	Claus et al., 2002

Tab. 12: Sequenzierte Referenzstämme, die in den Alignments als Vergleich dienen.

Mit Kulturmaterial dieser Stämme wurden Lysate in H<sub>2</sub>O erstellt. Mit einer PCR der Lysate wurde das *hrpB*-Gen mitsamt flankierender Bereiche (+527 bp *upstream*, +425 bp *downstream*, entsprechend der Position 460528 - 463223 im Genom) mit den Primern FhaC(NMC0443)Del fw und FhaC(NMC0443)Del rev amplifiziert. Dies entsprach einem Bereich von etwa 2700 bp. Zum Erstellen der Oligonukleotid-Primer dienten hochkonservierte Bereiche aus dem bereits vollständig sequenzierten Serogruppe C-Stamm FAM18. Die Konserviertheit der Bereiche wurde durch einen Vergleich der Referenzstämme FAM18, MC58 und Z2491 festgestellt. Die Qualität der Sequenzen wurde mit dem Programm *Sequence Scanner v 1.0* (Applied Biosystems) überprüft. Für die weiteren Analysen wurden die Sequenzbereiche verwendet, die eine eindeutige Nukleotid-Sequenz aufwiesen. Mit dem Programm *CAP3* (Huang & Madan, 1999) wurden aus den jeweiligen Einzelsequenzen *Contig*-Sequenzen erstellt. Diese wurden für das *Alignment* gleichmäßig auf die Länge des ORFs von 1743 bp geschnitten, was dem Bereich vom Startcodon

bis zum Stopcodon von NMC0443 im Referenzstamm FAM18 entsprach. Auch in allen anderen Stämmen entsprachen die 1743 bp dem vollständigen ORF.

## 7.2 Analyse der putativen Bindestelle des Regulators FarR

In der Promotorregion von NMC0443 (*hrpB*) in FAM18 wurde im Bereich –27 bis –11 bp vor dem Startcodon eine 16 bp lange putative Bindungsstelle für FarR gefunden, ebenso wie vor NMB1780 (*hrpB*) in MC58 und NMA0687 (*hrpB*) in Z2491. Das Alignment dieser möglichen Bindestelle mit den neu sequenzierten Stämmen ergab zum einen, dass diese putative Regulator-Bindestelle in allen Stämmen vorhanden war und zum anderen, dass die Nukleotidsequenzen komplett übereinstimmten (Abb. 15).

>Z2491	AAATATTGCTAAAATA
>DE7080	AAATATTGCTAAAATA
>DE7100	AAATATTGCTAAAATA
>FAM18	AAATATTGCTAAAATA
>2370	AAATATTGCTAAAATA
>MC58	AAATATTGCTAAAATA
>3887	AAATATTGCTAAAATA
>DE10173	AAATATTGCTAAAATA
>DE6790	AAATATTGCTAAAATA
> $\alpha$ 16	AAATATTGCTAAAATA
>B54	AAATATTGCTAAAATA
>P43	AAATATTGCTAAAATA
> $\alpha$ 219	AAATATTGCTAAAATA
> $\alpha$ 14	AAATATTGCTAAAATA
> $\alpha$ 42	AAATATTGCTAAAATA
>P19	AAATATTGCTAAAATA
>P41	AAATATTGCTAAAATA
> $\alpha$ 7	AAATATTGCTAAAATA
>P82	AAATATTGCTAAAATA
>A64	AAATATTGCTAAAATA
>DE7510	AAATATTGCTAAAATA
> $\alpha$ 710	AAATATTGCTAAAATA
>Y172	AAATATTGCTAAAATA
>P69	AAATATTGCTAAAATA
>P12	AAATATTGCTAAAATA
>3671	AAATATTGCTAAAATA

Abb. 20: Alignment der Nukleotidsequenzen der putativen Regulatorbindestelle in den Referenz-Stämmen MC58, FAM18, Z2491,  $\alpha$ 14 und den neu sequenzierten Stämmen DE7080, DE7100, 2370, 3887, DE10173, DE6790,  $\alpha$ 16,  $\alpha$ 219,  $\alpha$ 42,  $\alpha$ 7,  $\alpha$ 710, DE7510, Y172, 3671, B54, P43, P69, P82, A64, P12, P19 und P41 (BioEdit).

## 7.3 Alignment der *hrpB*-Nukleotid-Sequenzen mit den Referenzstämmen Z2491, MC58, FAM18 und $\alpha$ 14

Mit den kompletten ORFs (1743 bp) der *hrpB*-Sequenzen wurde mit dem Programm Clustal W2 (Larkin et al., 2007) ein Alignment durchgeführt. Als Referenzen dienten die *hrpB*-Gene aus den bereits sequenzierten Stämme Z2491 (NMA0687), MC58 (NMB1780), FAM18 (NMC0443) und

$\alpha$ 14(NMO0397). ORFs für ein *hrpB*-Gen waren in allen sequenzierten Stämmen vorhanden und hatten eine Länge von 1743 bp. Das Alignment der Nukleotid-Sequenzen ergab insgesamt eine hohe Übereinstimmung. Dabei fiel auf, dass die N-terminalen Bereiche durchweg fast identisch waren (Abb. 16a), während in den C-terminalen Nukleotid-Sequenzen die Übereinstimmung abnahm (Abb. 16b). Vor allem von Nukleotid 1182 bis 1527 fand sich ein sehr variabler Bereich. An folgenden Stellen waren Unterschiede in der Nukleotid-Sequenz zu finden (*die Angaben beziehen sich auf die Position der Base nach dem ATG-Startcodon; der \* markiert einzelne Punktmutationen, die nur in einem Stamm vorkommen*): 25, 39\*, 248, 348, 366, 501, 514, 601, 821, 863, 1012, 1044, 1045, 1123, 1182, 1188, 1191, 1203, 1215, 218, 1224, 1242, 1248, 1265, 1268, 1270, 1278, 1284, 1299, 1302, 1306\*, 1308, 1314, 1320, 1326, 1332, 1335, 1352, 1358, 1365, 1368, 1371, 1374, 1392, 1407, 1410, 1416, 1428\*, 1440, 1449, 1452, 1455, 1461, 1466, 1476, 1482\*, 1494, 1500, 1501, 1502, 1503, 1507, 1512, 1519, 1520, 1526, 1539\*, 1551\*, 1554\*, 1560\*, 1572, 1580\*, 1581\*, 1589, 1592\*, 1597\*, 1598\*, 1610\*, 1612\*, 1623\*, 1624\*, 1626\*, 1644\*, 1656\*, 1657\*, 1659\*, 1677, 1679, 1683, 1687, 1692, 1702, 1725\*.

Mithilfe des Programms Splits Tree4 (Huson & Bryant, 2006) liess sich zeigen, dass diese Variationen zumeist keine Punktmutationen sind, sondern auf Rekombinationsereignissen beruhen (C. Schoen, *unpublished data*). In den folgenden Abbildungen sind repräsentative Ausschnitte aus dem C-terminalen und N-terminalen Bereich der Nukleotid-Sequenzen abgebildet. Die kompletten Sequenzen aller analysierten Stämme befinden sich im Anhang.

Z2491	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
DE7080	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
DE7100	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
FAM18	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
2370	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
MC58	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
3887	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
DE10173	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
DE6790	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
$\alpha$ 16	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
B54	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
P43	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
$\alpha$ 219	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
$\alpha$ 14	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
$\alpha$ 42	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
P19	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
P41	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
$\alpha$ 7	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
P82	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
A64	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
DE7510	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
$\alpha$ 710	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
Y172	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
P69	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
P12	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
3671	TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA
	*****

Z2491	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
DE7080	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
DE7100	GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATIAC TGCCGGTTTGGACGCAGCC
FAM18	GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATIAC TGCCGGTTTGGACGCAGCC
2370	GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATIAC TGCCGGTTTGGACGCAGCC
MC58	GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATIAC TGCCGGTTTGGACGCAGCC
3887	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
DE10173	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
DE6790	GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATIAC TGCCGGTTTGGACGCAGCC
$\alpha$ 16	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
B54	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
P43	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
$\alpha$ 219	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
$\alpha$ 14	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
$\alpha$ 42	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
P19	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
P41	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
$\alpha$ 7	GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATIAC TGCCGGTTTGGACGCAGCC
P82	GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATIAC TGCCGGTTTGGACGCAGCC
A64	GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATIAC TGCCGGTTTGGACGCAGCC
DE7510	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
$\alpha$ 710	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
Y172	GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATIAC TGCCGGTTTGGACGCAGCC
P69	GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATIAC TGCCGGTTTGGACGCAGCC
P12	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
3671	GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG
	***** ** * ***** ***** ***** ***** ** ** * ***** *****

**Abb. 21:** Ausschnitt aus dem ClustalW2-Alignment der Nukleotidsequenzen des *hrpB*-Gens. Die Anordnung erfolgte nach klonalen Komplexen. Die Referenzstämme Z2491, MC58, FAM18 und  $\alpha$ 14 sind grau hinterlegt. Die Sternchen \* zeigen an, dass alle Sequenzen an dieser Stelle übereinstimmen. a) Ausschnitt aus dem N-terminalen Bereich des Gen mit den Nukleotiden 61 bis 120. b) Ausschnitt aus dem C-terminalen Bereich des Gens mit den Nukleotiden 1261 bis 1320. Die Unterschiede in der Basensequenz sind farbig hinterlegt.

#### 7.4 Translation der *hrpB*-Nukleotid-Sequenz in die Aminosäure-Sequenz

Die Nukleotid-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms BioEdit V 7.0.5 (Tom Hall) in Aminosäure-Sequenzen translatiert und die Aminosäure-Sequenzen mit ClustalW2 (Larkin et al., 2007) in einem Alignment miteinander verglichen (Abb. 17). Dabei stellte sich heraus, dass viele der Nukleotid-Variationen stumm waren, d.h. sie wirkten sich wegen der Degeneration des genetischen Codes nicht auf die Aminosäure-Sequenz aus. Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen mittels MegAlign (DNA-Star, Lasergene 8) zeigte folgende Resultate: Die geringste prozentuale Ähnlichkeit zu NMC0443 aus FAM18 betrug 96,0% bei P12 (ST254-Komplex), die höchste 100% bei den Stämmen 2370, DE7100 und Y172 (alle ST11-Komplex). Untereinander wiesen die Stämme Übereinstimmungen zwischen 95,7% und 100% auf (Tab. 13). Variabel in mehr als einem Stamm blieben folgende Stellen (*Position der AS*): 83, 172, 201, 274, 288, 349, 422, 423, 424, 444, 451, 453, 457, 489, 501, 503, 507, 530, 563 und 568. Der Stamm P12 wies zusätzlich am N-terminalen Ende an den Positionen 527, 531, 533, 537, 538, 542 und 548 einige einzelne veränderten Aminosäuren auf, die in keinem der anderen Stämme vorlagen.

Stamm	Übereinstimmung mit NMC0443 in %	Stamm	Übereinstimmung mit NMC0443 in %	Stamm	Übereinstimmung mit NMC0443 in %
2370	100,0	B54	99,0	P19	97,4
α7	99,3	DE6790	99,1	P41	97,1
α16	99,0	DE7080	98,3	P43	98,8
α42	97,4	DE7100	100,0	P69	99,8
A64	99,5	DE7510	98,3	P82	99,3
α219	98,8	DE10173	99,0	Y172	100
α580	97,6	3887	98,8	MC58	99,0
α710	99,0	P12	96,0	Z2491	98,6
3671	97,8				

Tab. 13: Prozentuale Übereinstimmung der jeweiligen Nukleotid-Sequenzen des *hrpB*-Gens mit der Sequenz von NMC0443 aus FAM18. Die Berechnung erfolgte mit MegAlign (DNASTAR Lasergene8).

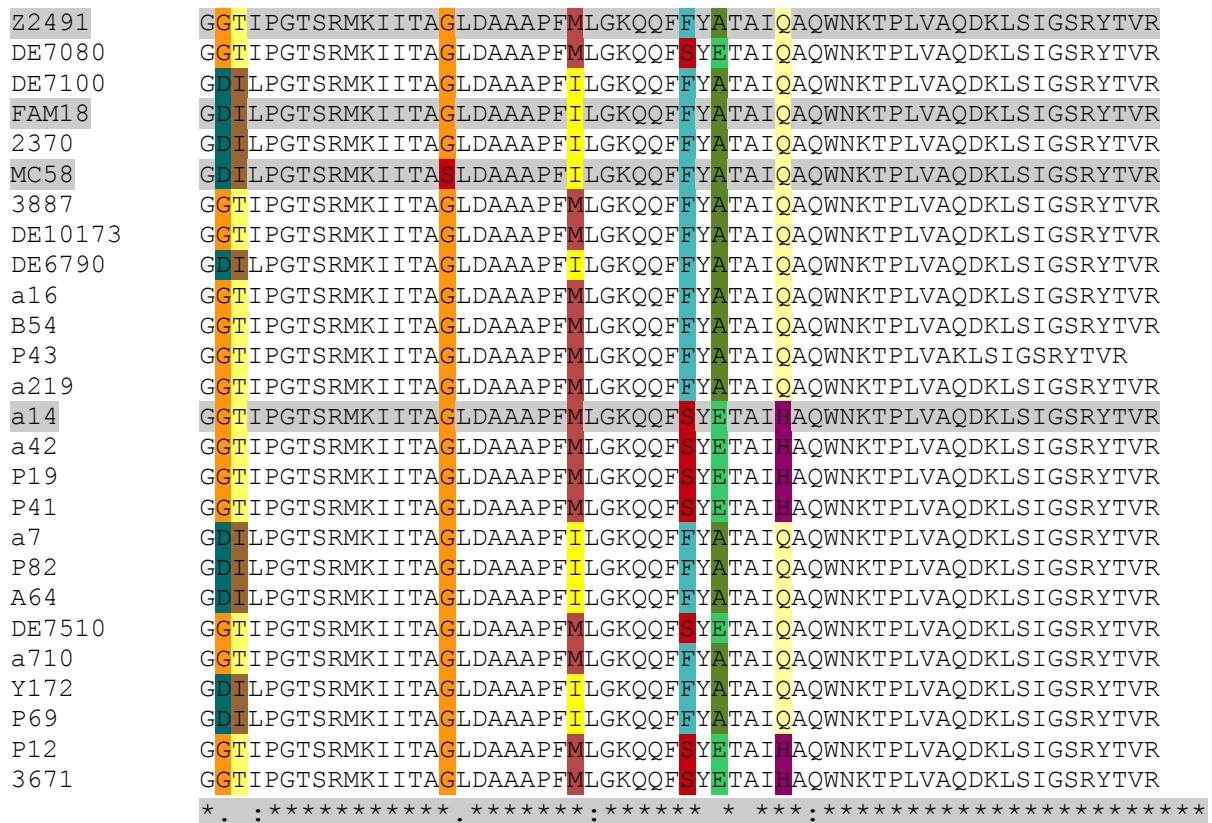


Abb. 22: Ausschnitt aus dem Alignment der Aminosäure-Sequenzen des *hrpB*-Gens mit ClustalW2. Die Anordnung erfolgte nach klonalen Komplexen. Dargestellt sind die AS 421 bis 480, was den Nukleotiden 1263 bis 1440 entspricht. Die Referenzstämme sind grau hinterlegt. Die Positionen mit Unterschieden in der AS-Sequenz sind bunt markiert.

Die essentiellen Aminosäuren werden nach den chemischen Eigenschaften ihrer Seitenketten und nach ihrer elektrischen Ladung in fünf Gruppen eingeteilt: 1) Aliphatische, neutrale Seitenkette, 2) Aromatische Seitenkette, 3) Polare, ungeladene Seitenkette, 4) Saure, negativ geladene Seitenkette und 5) Basische, positiv geladene Seitenkette. Auf dieser Basis wurden die



Aminosäuren an den variablen Positionen genauer bezüglich chemischer Struktur der Seitenkette und Ladung betrachtet. Dabei stellte sich heraus, dass die Aminosäuren nur an 3 von 20 Positionen aus der gleichen Gruppe stammen und somit ähnliche Eigenschaften aufweisen. An den meisten variablen Stellen unterscheiden sich die AS stark voneinander (Tab. 14).

AS-Position	Aminosäure-Varianten
83	Alanin und Valin
172	Alanin und Threonin
201	Prolin und Serin
274	Alanin und Valin
288	Alanin und Glutamat
349	Phenylalanin und Leucin
422	Aspartat und Glycin
423	Threonin und Isoleucin
424	Isoleucin und Leucin
444	Methionin und Isoleucin
451	Phenylalanin und Serin
453	Alanin und Glutamat
457	Glutamin und Histidin
489	Phenylalanin und Serin
501	Threonin und Glycin
503	Histidin und Tyrosin
507	Asparagin und Arginin
530	Lysin und Threonin
563	Glutamat und Lysin
568	Alanin und Threonin

Tab. 14: Positionen der variablen Aminosäuren und die jeweiligen AS-Möglichkeiten die an dieser Stelle vorkommen. Die grau hinterlegten Aminosäuren gehören chemisch zur gleichen Gruppe.

## 7.5 Phylogenetische Analyse

Als Phylogenese wird die genetische und morphologische Entwicklung und Veränderung der Arten im Laufe der Evolution bezeichnet. Mit Hilfe eines phylogenetischen Baumes können die verwandtschaftlichen Beziehungen von verschiedenen Lebewesen, allgemein als Taxa bezeichnet, dargestellt werden. Die Berechnung eines solcher Baumes beruht auf den Ähnlichkeiten und Unterschieden von Nukleotid- oder Aminosäure-Sequenzen der untersuchten Spezies, die in einem Sequenz-Alignment untersucht werden. Eine der Hauptmethoden ist die Berechnung eines *Neighbour-Joining Tree*. Dabei wird aufgrund eines Sequenz-Alignments die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass verschiedene Arten oder Gene miteinander verwandt sind.

Eine solche Analyse wurde auch mit den Aminosäure-Sequenzen der verschiedenen HrpBs durchgeführt, um herauszufinden, ob die Sequenz-Unterschiede der einzelnen Stämme sich einem bestimmten Muster zuordnen lassen. Dabei ist insbesondere relevant, ob bestimmte Sequenz-Varianten für die hypervirulenten oder invasiven Stämme charakteristisch sind und damit mit der Virulenz von *N. meningitidis* assoziiert sind. Dazu wurde mit einem ClustalW2-Alignment der Aminosäure-Sequenzen in Jalview (Waterhouse et al., 2009) ein phylogenetischer Baum nach der *Neighbour Joining Tree*-Methode berechnet (Abb. 18).

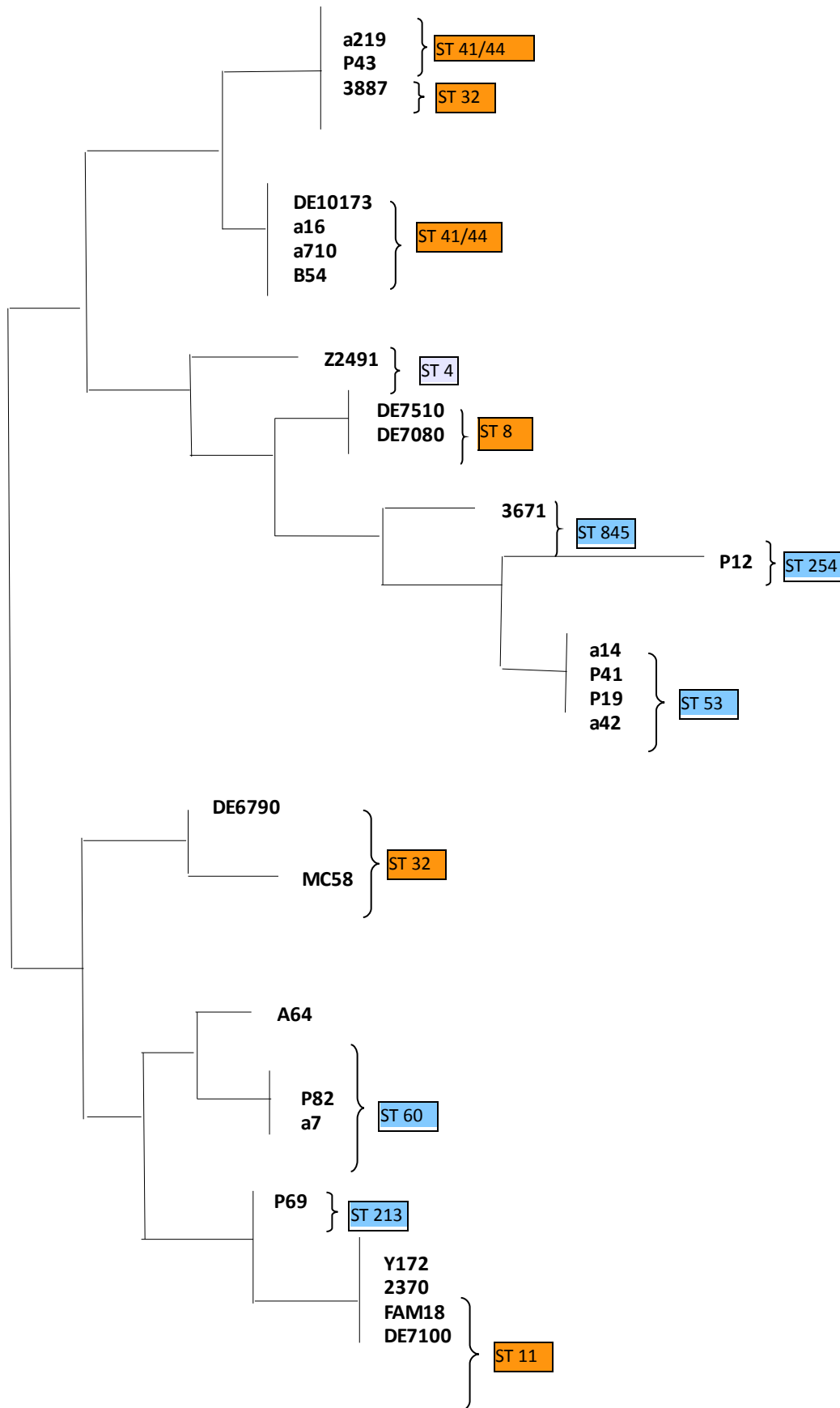


Abb. 23: Phylogenetischer Baum nach der *Neighbour Joining Tree*-PID-Methode (Jalview) auf Basis des ClustalW2-Alignments der Aminosäure-Sequenzen von HrpB. Die hypervirulenten Komplexe sind orange markiert. Blau zeigt an, dass es sich um ein Träger-Isolat handelt, grau markiert ein invasives Isolat.

Wie aus der Graphik hervorgeht, ordnen sich die Stämme entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den klonalen Komplexen an den Ästen des *Neighbour Joining Tree* an. Das bedeutet, dass die *hrpB*-Sequenzen der Stämme aus gleichen klonalen Komplexen die größte Ähnlichkeit aufweisen. Die Stämme DE10173,  $\alpha$ 16, B54 und  $\alpha$ 710, P43 und  $\alpha$ 219, die alle zum ST41/44 Komplex gehören, gruppierten sich an zwei Ästen, in der Nähe des ebenfalls hypervirulenten ST32-Stammes 3887. Alle sequenzierten Mitglieder von ST11, FAM18, DE7100, 2370 und Y172, standen zusammen, ebenso wie diejenigen von ST60 ( $\alpha$ 7, P82 und A64). Ebenso verhielt es sich mit  $\alpha$ 14,  $\alpha$ 42, P19 und P41 von ST53-Komplex. Eine Ausnahme bildete der Stamm 3887, der sich nicht bei den anderen Stämmen des ST32-Komplexes (MC58 und DE6790) einordnen ließ. Den weitesten Abstand zu den anderen Stämmen hat der ST254-Träger-Stamm P12, der sich auch schon beim Alignment der Nukleotid-Sequenzen durch mehrere Punktmutationen von den übrigen Stämmen abhob. Insgesamt betrachtet spiegelten also die Variationen in den *HrpB*-Sequenzen die verwandtschaftlichen Verhältnisse der ST-Typisierung und damit auch die evolutionäre Verwandtschaft wider.

## 7.6 Berechnung der dreidimensionalen Struktur von *hrpB*

### 7.6.1 Sequenz-Alignment des *Neisseria meningitidis HrpB* und *Bordetella pertussis FhaC*

Wie viele andere Gram-negative Bakterien besitzt auch *Bordetella pertussis* eine Zwei-Partner-Sekretions-System, bestehend aus FHA (TpsA) und FhaC (TpsB). Ein Alignment der Aminosäure-Sequenzen (Abb. 19) des *N. meningitidis HrpB* aus FAM18 (NMC0443) und des *B. pertussis FhaC* (BP1884) zeigte eine Homologie von 21,8%.

```

                                          H1
BP1884      MTDATNRFRLVGRALVVRAGLLFAVAACAQAQLLPGARDLNRIDDRQRKEQLQRDIERA 60
NMC0443    -----MKFFP-----APCLLVILAVIPLKTLAADENDAELIRSMQRQQHID---AEL 44
           : * *           . ** . : * . . * . . . * : * . ** : : : : .

                                          Transmembran-Domäne
BP1884      LTRPPVELNPQSEAAAPARKPDATSGHTVTVHAVDLDLDFGVEGRLFDPAPLVQDYLNLR--P 118
NMC0443    LTDANVRFEQPLEKNYYVLSSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMGC 104
           ** . * . : : * . . * * . * . : : * . . : : : . . : : : :

BP1884      LDNEQLFLLVKALSAALYDRGYATSIVTFVPPGVVDGVLKLVKVEWGRIGWGLIDGK-PLE 177
NMC0443    LGSNNLSRLQKAAQQILIVRGYLTSAIIQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGK 164
           * . . : : * * * . * * * * * . : * . : . : * * * * * . * * . : * :

BP1884      GTRDRMMVFS-AMPGWQDKVLNVFDIDQAIYNIN-NGGKTGNITIVPADEYGYSYLDLQL 235
NMC0443    SAEGSISFNNKFPLYRNKILNLRDVEQGLENLRRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKW 224
           . . . . : . * . : * : : * * * : * * * : * . . . : * * * * * * * * * : :

           loop 1                                loop 2
BP1884      QRRALPRVSLGMDNSGPGTPENGRYKYNASVTANDLLGLNDTLGLYIGN-----RYRDA 290
NMC0443    QQNKPIRFSIGIDDAG--GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDA 282
           * : . * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * . * *

           loop 3
BP1884      G----HDAERNYDLMSVPLGRTRLDLQGTGYSTYRNLLKTRYGOYQSAGNSRSFGLKATR 346
NMC0443    TGTETASGRSYSVHYSVPVKKWLFSFNHNGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSLAER 342
           . . * * . : * * * : : : : . * : : : * : : * * . . * * *

```

```

                                loop 4
BP1884      LLYRDTRSQFSVYGGLKLRQKNVLAGTRLDVSSKHYSVDVTVGMQYSTQRGANAYFGDLS 406
NMC0443    MLWRNRHKT SVGMKLTWRQTYKYIDDAEIEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLS 402
           :*: :  : **  *  **: : : : *  : : : .  : : : :  : .  *:**

                                loop 5
BP1884      FTFGVGVNNGKYAAYDERG----PQGNVSRFNGLAWTRYMALAGQPIQWASQLGFQYSR 462
NMC0443    YKRGTMGRQSMPEENGGDILPGTSRMKIITAGLDAAAPFLGKQFFYATAIQAQWNK 462
           :**.***: : .  *  : : *  . . . . : . . . *  : : *  *  : : * : : * : : * : :

                                loop 6
BP1884      QQLNSYQITVGDEYTVRGYNLRTSQSGDSGVYLSNLTLPVPVQFSLGKQASVAPFVGAD 522
NMC0443    TPLVAQDKLSIGSRYTVRGFDGEQSLFGERGFYWQNTLTVWFHP-----NHQFYLGAD 515
           * : .  : : : * . . . . . : : . *  * : * . * . . . . . : : .  : : * * *

                                loop 7                                loop 8
BP1884      VGALKSNHDPDART-IRMAGLAAGVRFDLPYARMSFTYSKPVG--AQPGGARAPVWLYI 578
NMC0443    YGRVSGESAQYVSGTQLMGAVVGRGGHKVGGM-FAYDLFAGKPLHKPKGFQTINTVYGF 574
           * : . . . : : : : * . . . * . . . * * : * . *  : * *  : .  :

BP1884      NAGLSF 584
NMC0443    NLNYSF 580
           * . **

```

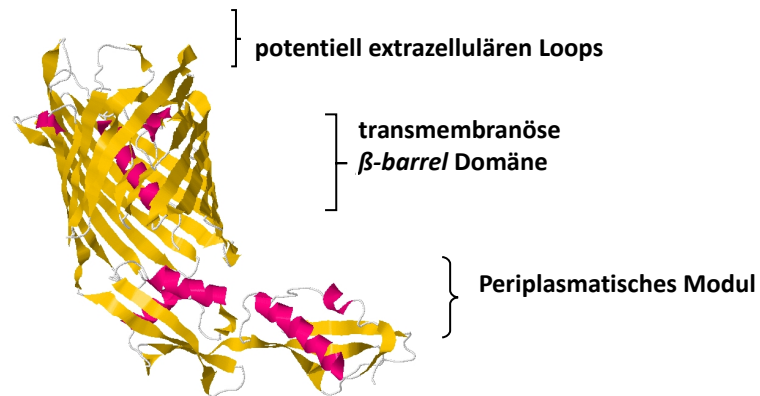
**Abb. 24:** Alignment der Aminosäure-Sequenzen von *N. meningitidis* *TpsB* (*hrpB*) mit dem *B. pertussis* *TpsB* (*FhaC*) (ClustalW2). Sternchen \* zeigt eine Übereinstimmung der AS an. In BP1884 ist die alpha-Helix H1 gelb markiert, die Transmembran-Domäne blau und die extrazellulären Loops L1 bis L8 sind in rot dargestellt. Die grün markierten AS in NMC0443 zeigen Stellen mit AS-Variationen.

FhaC von *B. pertussis* besitzt eine 19 AS lange  $\alpha$ -Helix (H1), eine 150 AS lange Transmembran-Domäne und acht *loops* (L1 bis L8) mit einer Länge zwischen 6 und 38 AS. Auf der Basis dieses Alignments ließen sich die einzelnen Bereiche der AS-Sequenz von NMC0443 den Domänen des *Bordetella*-Proteins zuordnen. Somit ermöglichte es dieser Sequenz-Vergleich außerdem, Rückschlüsse auf die Lage der variablen Aminosäure-Positionen im HrpB-Protein zu ziehen. Im Alignment sind die Aminosäuren markiert, die in mehr als einem Stamm Variationen aufweisen. Von den insgesamt 20 variablen Stellen lagen keine in der  $\alpha$ -Helix H1, drei lagen in der transmembranösen Domäne, sieben in den potentiell extrazellulären *loops* und zehn in Verbindungsteilen. Damit erwiesen sich die  $\alpha$ -helikalen und transmembranösen Strukturen als genetisch konservierte Bereiche, während die potentiellen *loops* eine größere Variabilität aufwiesen.

### 7.6.2 Darstellung der dreidimensionalen Struktur von *hrpB*

Die Kristallstruktur des FhaC-Transportproteins von *B. pertussis* wurde von Clantin et al. bereits beschrieben (Clantin et al., 2007). Da die AS-Sequenzen von *B. pertussis* FhaC und *N. meningitidis* HrpB zu 21,8% übereinstimmen, ließ sich mit Hilfe mit des durchgeführten ClustalW2-Alignments von HrpB und FhaC ein dreidimensionales Modell des Proteins HrpB berechnen. In dem in Abb. 19 dargestellten AS-Alignment sind die Bereiche von FhaC markiert,

die die Helix, den transmembranösen Bereich und die extrazellulären *loops* bilden. Daraus lassen sich Rückschlüsse auf die Lage dieser Domänen in der HrpB-Sequenz ziehen. Daraus wurde mit dem *Homology Modelling*-Programm HOMER ein dreidimensionales Modell der HrpB-Tertiärstruktur berechnet (Abb. 23).



**Abb. 25:** Tertiär- und Quartärstruktur des HrpB-Proteins. Die Berechnung<sup>lm</sup> der dreidimensionalen Struktur erfolgte durch das Alignment der Aminosäuresequenzen von *N. meningitidis* TpsB (HrpB) mit dem *B. pertussis* TpsB (FhaC), dessen Kristallstruktur bereits beschrieben wurde. Dafür wurde das Homology Modelling Programm HOMER verwendet.

Der C-terminale Teil bildete die transmembranöse Domäne aus  $\beta$ -barrels. Am N-terminalen Ende befanden sich *loops*, die vermutlich in den Extrazellulärraum hineinreichen. Das periplasmatische, globuläre Modul schließlich bestand aus einer  $\alpha$ -Helix und zwei POTRAS (*aligned polypeptide transport associated domains*). Somit präsentierte dieses Modell HrpB als typisches Kanal-Protein der TpsB-Familie.

## IV Diskussion

### 1. Wachstumsabhängige Expression und Regulation von FarR

Bakterien passen sich den Umweltbedingungen und Wachstumsphasen an, indem sie die Expression ihrer Gene variieren. Zu diesen variabel exprimierten Proteinen zählt in *N. meningitidis* auch der Transkriptionsregulator FarR. Schielke et al. konnten zeigen, dass die Deletion und Komplementierung von *farR* das normale Wachstumsverhalten der bekapselten und unbekapselten Stämmen nicht beeinflussen (Schielke et al., 2010a). Allerdings ist die Expression von FarR durchaus abhängig vom bakteriellen Wachstum. Die Expression der meisten Proteine erfolgt kontrolliert, d.h. ihre Synthese kann je nach Bedarf hinauf oder herunter reguliert werden. Mittels Western Blot-Analysen wurde die Proteinmenge des Transkriptionsregulators FarR in den Stämmen MC58, MC58 $\Delta$ *siaD* und MC58 $\Delta$ *farR*(*pAP1-farR*) im Wachstumsverlauf untersucht. Die von Schielke et al. durchgeführten Wachstumskurven zeigten, dass die exponentielle Wachstumsphase zwischen einer und vier Stunden lag. Dementsprechend wurden die Proben für den Western Blot zu den Zeitpunkten eine Stunde, zweieinhalb Stunden und vier Stunden entnommen, was der frühen, mittleren und späten exponentiellen Wachstumsphase entsprach. Im Western Blot Nachweis zeigte sich, dass die Menge des FarR-Proteins im Wildtyp MC58, der Kapsel-*knockout*-Mutante MC58 $\Delta$ *siaD* und der *farR*-Komplementante MC58 $\Delta$ *farR*(*pAP1-farR*) von der frühen zur späten exponentiellen Phase kontinuierlich zunahm. Als Abgleich wurde das Außenmembran-Protein Porin A ebenfalls mittels Western Blot detektiert. PorA wird in den Stämmen MC58, MC58 $\Delta$ *siaD* und MC58 $\Delta$ *farR*(*pAP1-farR*) in der frühen (t = 1 h), mittleren (t = 2,5 h) und späten (t = 4 h) logarithmischen Phase gleichmäßig exprimiert, wie es bei vielen Enzymen von essentiellen Stoffwechselwegen (sog. *housekeeping genes*) der Fall ist. Die Zunahme von FarR ist besonders in dem komplementierten Stamm MC58 $\Delta$ *farR*(*pAP1-farR*) interessant, da dort das natürlich regulierte *farR*-Gen ausgeschaltet wurde und das mit dem Plasmidvektor *pAP1* eingeführte *pAP1-farR* unter Kontrolle des PorA-Promotors steht. Da der Promotor von PorA aber eine konstitutive Expression bewirkt, muss die Regulation von FarR folglich auf posttranskriptionaler oder eventuell posttranslationaler Ebene erfolgen. Dies könnte durch regulatorische sRNAs geschehen, die die Stabilität der mRNA erhöhen. Posttranslational wäre auch eine Hemmung der Proteolyse denkbar (Schaechter et al., 2007). In Betracht gezogen werden muss allerdings noch die Alternative, dass FarR nur sehr langsam abgebaut wird und sich daher im Lauf der Zeit in der Zelle akkumuliert. Posttranskriptionale Kontrolle der Genexpression ist auch in anderen Bakterien zu finden: In *Yersinia pseudotuberculosis* aktiviert der Mar-Regulator RovA wichtige Virulenzfaktoren für Invasion und Resistenz gegen wirtsspezifische Abwehrreaktionen (Ellison & Miller, 2006, Revell & Miller, 2000). Die Synthese von RovA unterliegt einer Vielzahl regulatorischer Mechanismen, die durch Umweltfaktoren wie Temperatur und Nährstoffangebot beeinflusst werden (Herbst et al., 2009, Nagel et al., 2001). Auf posttranskriptionaler Ebene kontrolliert ein Netzwerk von *small non coding Csr-type* RNAs indirekt über RovM die Synthese von RovA (Heroven et al., 2008). In *N. meningitidis* wäre eine Aktivierung bzw. eine De-Repression eines hemmenden Faktors der *farR*-Expression ebenfalls

über andere, bisher unbekannte Faktoren wie Regulatorproteine, Enzyme oder sRNAs möglich. Ein Beispiel dafür, dass auch Enzyme in die Regulation eingreifen, findet sich in *E. coli*. Dort wird der FarR-homologe Regulator MarR durch die Gyrase GyrA deaktiviert (Domain & Levy, 2010). Welche Faktoren die Erhöhung von FarR triggern ist bisher nicht bekannt, ebenso wenig wie der genaue Mechanismus über den die Hochregulation geschieht. Bekannt ist aber die Tatsache, dass bestimmte Umweltbedingungen über regulatorische Netzwerke zur Aktivierung/Deaktivierung von Virulenzfaktoren führen: *Legionella pneumophila* initiiert beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase oder bei Mangel an Aminosäuren die Migration zu einer neuen Wirtszelle (Alveolar-Makrophagen im Menschen) (Bachman & Swanson, 2001). Dazu induziert der Sigma-Faktor RpoS, zusammen mit anderen Regulatoren, verschiedene Virulenzfaktoren, die die Zytotoxizität erhöhen, den Legionellen Beweglichkeit verleihen und ihnen so Zugang zu neuen Nährstoffen verschaffen (Bachman & Swanson, 2001). Ein weiteres Beispiel ist der Transkriptionsregulator FNR in *N. meningitidis*. FNR induziert unter Sauerstoffmangel-Bedingungen (wie sie im Blut herrschen) die vermehrte Produktion des *factor-H-binding proteins*, das an der Immunevasion und CAMP-Resistenz (LL37) beteiligt ist (Oriente et al., 2010). Warum FarR in der späten Phase hochreguliert wird, ist bisher noch unklar. Eine Möglichkeit ist, dass das Adhäsın NadA, welches unter der negativen Kontrolle von FarR steht (Schielke et al., 2009) zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion nicht mehr benötigt wird und deshalb herab reguliert wird. Allerdings ist diese Hypothese nicht für alle Stämme geeignet. So wird NadA in den Stämmen F6124 (Serogruppe A), MC58 (Serogruppe B), 2996 (Serogruppe B) und C11 (Serogruppe C) im Laufe der Zeit hochreguliert und erreicht in der stationären Wachstumsphase seine maximale Konzentration (Comanducci et al., 2002). Da in MC58 sowohl die Expression von FarR als auch von NadA im Laufe des Wachstums zunehmen, müssten noch andere Faktoren an der Regulation von *nadA* beteiligt sein. Beispielsweise könnte die Bindung von FarR an den Promotorbereich von *nadA* durch anionische, lipophile Liganden verhindert werden, indem diese allosterisch an FarR binden und dessen Bindungsaffinität ändern (Wilkinson & Grove, 2006). Dieser Mechanismus ist bei einigen anderen Mitgliedern der MarR-Familie vorzufinden, wie bei MarR in *E.coli*, welches sich durch Bindung von Salicylat nicht mehr an die DNA anlagern kann (Martin & Rosner, 1995). Dies zeigt, dass die Regulation der Genexpression *in vivo* sehr komplex abläuft und viele Faktoren beinhaltet, die noch nicht erforscht sind.

## **2. Fettsäure-Resistenz in *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae***

Fettsäuren kommen auf der menschlichen Hautoberfläche, im Speichel und in verschiedensten Sekreten vor und bilden dort als Bestandteil des Immunsystems eine Barriere gegen Bakterien und Viren (Drake et al., 2008, Zasloff, 2002, Bergsson et al., 1998 & 1999, Isaacs et al., 1994). So können einige Fettsäuren verschiedenster Länge die Zerstörung der bakteriellen Zellmembranen bewirken, indem sie die Permeabilität der äußeren Membran erhöhen und eine Depolarisation der inneren Membran bewirken (Shai, 1999, Matsuzaki, 1999). Andere verhindern die Aufnahme wichtiger Aminosäuren (Galbraith & Miller, 1973) oder führen zur Entkoppelung der oxidativen

Phosphorylierung und Blockade des Elektronen-Transports, indem sie eine über Drosselung des Sauerstoffverbrauchs die Glykolyse vermindern und die NADH<sub>2</sub>-Oxidase blockieren (Miller et al., 1977). Sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien reagieren sensibel auf kurzkettige Fettsäuren (C<sub>1</sub> bis C<sub>6</sub>) (Nieman, 1954, Kodicek, 1945), wohingegen das Lipopolysaccharid in der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien diesen eine gewisse Resistenz gegenüber länger-kettigen Fettsäuren verleiht (Sheu & Freese, 1973). Eine Ausnahme bildet *Neisseria gonorrhoeae*, deren äußere Membran durch Phospholipid-reiche Regionen für Gram-negative Bakterien ungewöhnlich durchlässig ist für hydrophobe Moleküle (Lysko & Morse, 1981), Steroidhormone (Miller et al., 1977), Antibiotika und Detergenzien (Sarubbi et al., 1975). Dennoch gelingt es einigen Gonokokken als Erreger der Gonorrhoe im Fettsäure-reichen Anogenitalbereich zu überleben. Allerdings ist diese Fähigkeit nicht bei allen Gonokokken gleich stark ausgeprägt. Um das Resistenz-Verhalten der Gonokokken gegenüber langkettigen Fettsäuren zu untersuchen, wurden verschiedene klinische *N. gonorrhoeae*-Isolate in Anwesenheit von Palmitinsäure (C<sub>16:0</sub>) kultiviert. Palmitinsäure wurde als Vertreter für langkettige Fettsäuren ausgewählt, da sie einen starken hemmenden Effekt auf das Wachstum ausübt (McFarland et al., 1983). Bei der Anzucht der von Gonorrhoe-Patienten isolierten Gonokokken auf Palmitinsäure-haltigen Agarplatten waren Isolate aus Rektum, Oropharynx und Blut sehr gut in der Lage unter diesen Bedingungen anzuwachsen. Dagegen ließen sich andere Stämme aus Urethra oder Vagina in Anwesenheit der C<sub>16</sub>-Fettsäure praktisch nicht kultivieren. Die übrigen Stämme nahmen Zwischenstellungen zwischen diesen beiden Extremwerten ein und zeigten mäßig bis deutlich reduziertes Wachstum.

Die Resistenz einiger Gonokokken-Isolate wird durch spezifische Effluxpumpen wie *FarAB* (Lee & Shafer, 1999) und *MtrCDE* (Maness & Sparling, 1973) vermittelt, die Fettsäuren und andere hydrophobe Moleküle aus dem Zellinneren heraus transportieren. Die Expression von *farAB* wird durch den Transkriptionsregulator *FarR* unterdrückt (Shafer et al., 2001). *FarR* kann seinerseits durch den Regulator *MtrR* reprimiert werden, der auch *mtrCDE* negativ kontrolliert (Shafer et al., 2001). Dies kann als ein Mechanismus zur Adaption an verschiedene Umweltbedingungen verstanden werden. McFarland et al., konnten zeigen, dass der Ort, von dem die Gonokokken isoliert wurden, eine entscheidende Rolle spielt. So wiesen klinische Isolate von *N. gonorrhoeae*, die von homosexuellen Männern und heterosexuellen Frauen isoliert wurden, generell eine deutlich höhere Resistenz gegenüber langkettigen Fettsäuren auf, als bei heterosexuellen Männern. Daneben kam der genauen Isolationsstelle eine große Bedeutung zu: Isolate aus Cervix und Urethra wiesen eine höhere Sensitivität gegenüber Lipiden und Fettsäuren auf, als Stämme, die aus dem Rektum isoliert wurden (McFarland et al., 1983). Diese Ergebnisse konnten durch die durchgeführten Untersuchungen weder bestätigt noch widerlegt werden, da zu wenige Informationen zu den Isolationsorten vorlagen. Da der Transport hydrophober Moleküle über Effluxpumpen aus dem Zellinneren heraus viel Energie benötigt, werden diese Pumpen nur exprimiert, wenn es die Umgebungsbedingungen erfordern. Dieser Prozess scheint allerdings einige Zeit in Anspruch zu nehmen, da innerhalb des Zeitrahmens der Versuche (etwa 24 h) das



ursprüngliche Verhalten beibehalten wurde. Auf welche Weise die Fettsäuren zu einer Deaktivierung des Regulators FarR führen, bleibt noch zu klären. Neben der Resistenz gegenüber Fettsäuren können Regulatorproteine in Gonokokken an der Entstehung von Antibiotika-Resistenzen beteiligt sein. So wurde bereits mehrfach beschrieben, dass Mutationen im *mtrR*-Gen eine Überexpression des *mtrCDE*-Effluxsystems bewirken, was zu einer gesteigerten Resistenz gegen Azithromycin (Zarantonelli et al., 1999), Penicillin (Veal et al., 2002) oder Erythromycin (Xia et al., 2000) führt. Somit sind solche regulatorischen Proteine durchaus auch von klinischem Interesse. In Rektum und Analbereich kommen neben gesättigten auch viele ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure oder Oleinsäure vor, die ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf das Gonokokken-Wachstum ausüben (Miller et al., 1977). Neben der gesättigten Palmitinsäure wurden die Gonokokken-Isolate zusätzlich auf Resistenz gegenüber der ungesättigten Linolsäure (*C*<sub>18:2</sub> $\Delta$ <sub>9</sub> $\Delta$ <sub>12</sub>) getestet (Schielke, *unpublished data*). In diesen Versuchen erwiesen sich die meisten Gonokokken als resistent gegenüber der Linolsäure. Dabei korrelierte die Linolsäure-Resistenz nicht mit der Ausprägung der Palmitinsäure-Resistenz, was darauf schließen lässt, dass diese Resistenzen auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen (Schielke, *unpublished data*).

*Neisseria meningitidis* sind mit *Neisseria gonorrhoeae* eng verwandte, ebenfalls humanpathogene *Neisserien*. Wie die Meningokokken-Stämme sich bei Kontakt mit langkettigen Fettsäuren verhalten, wurde in einem zu dem Gonokokken-Fettsäure-Resistenz-Test analogen Versuchsaufbau untersucht. Getestet wurden der Serogruppe B-Stamm MC58 und dessen *knockout*-Mutanten MC58 $\Delta$ *siaD*, MC58 $\Delta$ *farR* und MC58 $\Delta$ *siaD* $\Delta$ *farR*, sowie der komplementierte Stamm MC58 $\Delta$ *farR*(*pAP-1farR*). Stellvertretend für die Serogruppe A wurde Z2491, für Gruppe C FAM18 und für *capsule null locus*-Stämme  $\alpha$ 14 eingesetzt. Sie alle zeigten gleichermaßen eine hohe Resistenz gegenüber Palmitinsäure. Die Untersuchung weiterer Stämme bestätigte die Resistenz der Serogruppen A, B, C, *cnl* und zeigte dies zusätzlich für Stämme der Serogruppen 29E, W135, Y und Z (Schielke et al., 2010a). Zusätzlich wurde auch die Resistenz der Meningokokken gegenüber der ungesättigten Linolsäure bestimmt. Die Resistenz war weder bei Palmitinsäure noch bei Linolsäure abhängig von der Ausprägung einer Kapselstruktur, da auch *capsule null locus* Stämme wie  $\alpha$ 14 und die Kapsel-*knockout*-Mutante MC58 $\Delta$ *siaD* das gleiche Verhalten wie die bekapselten Stämme zeigten. Zusammen mit der Tatsache, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Serogruppen A, B, C, E29, W135 und Z beobachtet werden konnte, lässt dies den Schluss zu, dass die Fettsäure-Resistenz nicht von der Polysaccharidstruktur der Kapsel abhängt. Auch der Status invasives Isolat bzw. Träger-Isolat oder die Zugehörigkeit zu hypervirulenten Linien beeinflussten die Resistenz nicht.

In Gonokokken bewirkt die Deletion des Transkriptionsregulators FarR eine Erhöhung der Fettsäure-Resistenz durch eine Überexpression des Transportsystems FarAB, welches die eingedrungenen Fettsäuren ins extrazelluläre Milieu transportiert (Lee et al., 2003, Lee & Shafer, 1999). Die Ausschaltung der FarR-regulierten Effluxpumpe FarAB führt bei Gonokokken zu einer hohen Sensibilität gegenüber Fettsäuren (Shafer et al., 2001). In den nahe verwandten

Meningokokken dagegen veränderte sich die Fettsäure-Resistenz weder durch Ausschalten des Regulator-Proteins FarR (MC58 $\Delta$ farR), noch durch dessen Komplementierung (MC58D $\Delta$ farR(pAP-1farR)).

	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<b>Wildtyp</b>	Variable Resistenz	Intrinsische Resistenz
<b><math>\Delta</math>farR</b>	Fettsäureresistenz $\uparrow$	Fettsäureresistenz $\leftrightarrow$
<b><math>\Delta</math>farAB</b>	Fettsäureresistenz $\downarrow$	Fettsäureresistenz $\downarrow$

Tab. 15: Veränderung der Fettsäure-Resistenz in *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* bei Deletion der Gene *farR* und *farAB*.

Obwohl der Transkriptionsregulator FarR auch in *N. meningitidis* eine Bindung an den Promotorbereich des *farAB*-Effluxpumpen-Gens (NMB0318/0319) eingeht, wird dieses nicht durch FarR reguliert (Schielke et al., 2009). Dennoch spielt die Effluxpumpe FarAB auch in *N. meningitidis* eine entscheidende Rolle. So bewirkt die Deletion von *farAB*, dass der Serogruppe B-Stamm MC58 $\Delta$ farAB praktisch nicht mehr in Anwesenheit von Palmitinsäure kultiviert werden kann. Auf die Linolsäure-Resistenz hat der *farAB-knockout* hingegen keinen Einfluss (Schielke et al., 2010a). Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass zwar FarAB, nicht aber FarR an der Resistenz von Meningokokken gegenüber langkettigen Fettsäuren beteiligt ist. Neben der FarAB-Effluxpumpe ist zusätzlich die Anwesenheit des inneren Kern-Oligosaccharids und die Hexaacetylierung von Lipid A an der intrinsischen Fettsäure-Resistenz der Meningokokken beteiligt (Schielke et al., 2010a). Neben der intrinsischen Resistenz gegenüber Fettsäuren zeigt *N. meningitidis* auch eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber CAMPs (*cationic antimicrobial peptides*), wie Polymyxin B oder LL37. CAMPs kommen als Bestandteil der angeborenen Immunantwort in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen vor. Daneben können sie unter bestimmten Bedingungen, wie Infektion, Inflammation oder Trauma von Epithelzellen sezerniert werden (Hancock, 2001, Frohm et al, 1997, Schonwetter et al., 1995). Meningokokken besitzen, ebenso wie Gonokokken, ein funktionelles MtrCDE-Effluxsystem, welches verantwortlich ist für die Resistenz gegenüber diversen schädlichen Molekülen. Mutationen im *mtrCDE*-Gen führen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber antimikrobiellen Peptiden, da deren Export nicht mehr gewährleistet wird (Tzeng et al., 2005, Shafer et al., 1998). Daneben spielt auch bei der CAMP-Resistenz die äußere Bakterienmembran und das LPS eine entscheidende Rolle, wie Mutationen im Phosphoethanolamin-Transferase (PEA) -codierenden *lptA*-Gen zeigen. Werden funktionelle Gruppen des Lipid A oder ihm anhängende Strukturen wie das *core*-Protein durch eine veränderte PEA-Transferase modifiziert, so können die Meningokokken durch CAMPs wie Polymyxin B leichter eliminiert werden. Meningokokken sichern sich das Überleben im Nasopharynx also über verschiedenste aktive (Effluxpumpen) und passive Mechanismen (LPS-Struktur).

### 3. Rolle von FarR bei der Infektion humaner Granulozyten

Neutrophile Granulozyten zählen im menschlichen Immunsystem zu den wichtigsten Komponenten in der Abwehr bakterieller Erreger. Neben dendritischen Zellen und Makrophagen zählen sie zu den ersten Abwehr-Zellen, die Kontakt mit den eingedrungenen Meningokokken aufnehmen und eine Immunantwort in Gang setzen (Schlesinger et al., 1994, Mayer-Scholl et al., 2004). Wie bedeutend die Rolle der neutrophilen Granulozyten ist, zeigte der Versuch von Perez et al., die neutrophilendepletierte Ratten intraperitoneal mit *N. meningitidis* infizierten, was stets den Tod der Versuchstiere zur Folge hatte (Perez et al., 2001). Bei der Erkennung körperfremder Antigene spielen Oberflächenproteine von bakteriellen Erregern eine Schlüsselrolle. Das Adhäsins NadA wird von etwa der Hälfte aller Meningokokken-Stämme, vor allem von hypervirulenten Stämmen, exprimiert und tritt als Oberflächenprotein mit dem menschlichen Immunsystem in Kontakt. Reguliert wird seine Synthese unter anderem von dem Transkriptionsregulator FarR (Schielke et al., 2009). Da ein Ausschalten von *farR* eine gesteigerte Expression des Oberflächen-Adhäsins NadA zur Folge hat, wurden in einem Infektions-Assay untersucht, ob der *farR-knockout* Auswirkungen auf die Meningokokken-Granulozyten-Interaktion hat. Dazu wurden polymorphkernige Granulozyten aus menschlichem Blut isoliert und mit dem Wildtyp MC58 und der Deletions-Mutante MC58 $\Delta$ *farR* für drei Stunden inkubiert. Dabei lag nach drei Stunden die Abtötung der *knockout*-Mutante MC58 $\Delta$ *farR* mit 76,8% deutlich höher als bei dem Wildtyp MC58 mit 57,4%. Dieser Effekt war in fünf von sechs Versuchen zu beobachten, auch wenn das Ergebnis statistisch nicht signifikant war ( $p > 0,1$ ). Allerdings ist die Granulozyten-Funktion in hohem Maße von Spender-spezifischen Faktoren abhängig, wodurch sich die hohe Varianz zwischen den einzelnen Versuchen erklären lässt. Durch das Ausschalten des *farR*-Gens entfällt die Repression der *nadA*-Expression, wodurch es zu einer deutlich gesteigerten Expression des Adhäsins NadA auf der Oberfläche von *Neisseria meningitidis* kommt (Schielke et al., 2009). Da der Wildtyp MC58 und die *farR-knockout*-Mutante MC58 $\Delta$ *farR* sich in diesem Merkmal eindeutig voneinander unterscheiden, könnte dies die Ursache die vermehrte Abtötung von MC58 $\Delta$ *farR* sein. Bisher konnte gezeigt werden, dass NadA eine Adhäsion an Epithelzellen wie Chang- und Hep2-Zellen bewirkt (Capecchi et al., 2005). Außerdem aktiviert gereinigtes NadA-Protein Monozyten und Makrophagen, verhindert deren Apoptose und veranlasst sie zur Ausschüttung diverser Entzündungsmediatoren wie TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, MCP-1 und MIP-1 (Franzoso et al., 2008). Auch dendritische Zellen werden durch den Kontakt mit NadA zur Ausreifung gebracht, sezernieren zahlreiche Entzündungsmediatoren und stimulieren die Differenzierung von CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-T-Zellen (Mazzon et al., 2007). Diese Resultate lassen eine Interaktion von NadA mit polymorphkernigen Leukozyten durchaus wahrscheinlich erscheinen. Eine gesteigerte Expression von NadA könnte somit dazu führen, dass diese Meningokokken vermehrt durch die Granulozyten erkannt und abgetötet werden. Da die Expression des *nadA*-kontrollierenden Transkriptionsregulators FarR im normalen Wachstumsverlauf hoch reguliert wird, kommt es zu einer verminderten Synthese des NadA-Adhäsins. Dies könnte sich im Rahmen einer Meningokokken-Infektion als vorteilhaft erweisen. Nach dem Eindringen in den menschlichen

Körper könnte eine verminderte Expression in Blut oder Liquor bewirken, dass die Meningokokken nicht so leicht durch humane Abwehrzellen erkannt und abgetötet werden. Für andere Adhäsine, wie die *opacity proteins* Opa und Opc wurde bereits gezeigt, dass sie eine nicht-Opsonin-vermittelte Aufnahme in neutrophile Granulozyten bewirken können (Estabrook et al., 1998). Die Kontrolle des Virulenzfaktors *nadA* ist ein Merkmal, das FarR als typischen Vertreter der MarR-Familie kennzeichnet. Einige Mar-Regulatoren verleihen den Bakterien eine erhöhte Resistenz gegen Antibiotika oder antimikrobielle Substanzen, wie zum Beispiel MarR in *E. coli* (George & Levy 1983 a und b), MexR in *P. aeruginosa* (Srikumar et al., 1998) oder Rap in *S. marcescens* (Thomson et al., 1997). Andere kontrollieren Virulenzfaktoren, wie SlyA in *Salmonella typhimurium* (Libby et al., 1994) oder RovA in *Yersinia enterocolitica* (Revell & Miller, 2000). Auch wenn dies alles verschiedene Funktionen sind, so spielen die Mar-Regulatoren doch insgesamt eine wichtige Rolle in der Interaktion mit dem Wirtsorganismus.

#### 4. Interaktion des Transkriptionsregulators FarR mit der DNA

Zur Regulation der Transkription ist ein direkter oder indirekter Kontakt zwischen dem regulatorischen Protein und der DNA notwendig. Um dies zu ermöglichen, sind Proteinstruktur und DNA-Sequenz genau aufeinander abgestimmt.

Sequenz-Alignments von Mitgliedern der MarR-Familie zeigen regelmäßig eine hohe Divergenz auf Nukleotid- und Aminosäure-Ebene. Dies repräsentiert die hohe Spezifität mit der Mar-Regulatoren zum einen auf Signale reagieren und zum anderen diese über Bindung an ihre spezifischen DNA-Sequenzen weitergeben (Ellison & Miller, 2006). Vergleicht man jedoch die dreidimensionale Struktur dieser Regulatorproteine, so weisen sie untereinander große Ähnlichkeit auf. Als DNA-bindendes Motiv konnte bei den bisher aufgeklärten Strukturen ein *winged-Helix-turn-Helix*-Motiv identifiziert werden (Wilke et al., 2008, Bordelon et al., 2006, Hong et al., 2005, Wu et al., 2003). Auch FarR bildet hier keine Ausnahme. Ein dreidimensionales Modell, das auf der Homologie zwischen FarR und PA 4135 aus *Pseudomonas aeruginosa* (46,43% Übereinstimmung) beruht, zeigt, dass auch FarR eine *winged-Helix-turn-Helix*-Struktur als DNA-bindendes Motiv aufweist (Schielke et al., 2010b und 2011). Für gewöhnlich binden Mar-Regulatoren als Homo-Dimer an die DNA. Dabei erkennen die beiden identischen Polypeptidketten jeweils ihren Teil der palindromischen DNA-Sequenz. Die Bindesequenz im Promotorbereich von *nadA* weist ebenfalls ein palindromisches Motiv auf (Abb. 26). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass auch FarR als Homo-Dimer an die DNA bindet (Schielke et al., 2009 & 2010a/b und 2011).

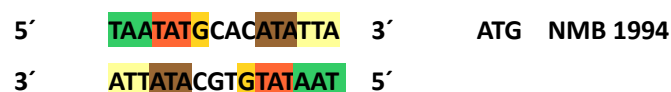


Abb. 26: Bindesequenz des Transkriptionsregulators FarR in der Promotorregion von *nadA*.

DNA-bindende Proteine wie Transkriptionsregulatoren können sehr differenziert ihre Bindesequenz auf der DNA erkennen. So auch FarR, der in *N. gonorrhoeae* mit Hilfe des *Integration Host Factors* (IHF) spezifisch die Expression der Effluxpumpe FarAB kontrolliert (Lee et al, 2006 & 2003). In den eng verwandten Meningokokken geht FarR ebenfalls eine Bindung mit dem Promotorbereich von *farAB* (NMB0318/0319) ein, ohne dass jedoch eine Auswirkung auf die Expression des Transportsystems beobachtet werden konnte. Stattdessen kontrolliert FarR hier das vermutlich über horizontalen Gentransfer akquirierte *nadA*-Gen (NMB1994) (Schielke et al., 2009). Mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assays* konnte die für die Bindung relevante Stelle auf eine 16 bp lange Nukleotidsequenz eingengt werden. Auf der Suche nach weiteren FarR-kontrollierten Genen wurde eine auf den FarR-Bindestellen von NMB0318/0319 und NMB1994 basierende, minimale Bindesequenz erstellt:

5`-- NWN TAT NNN NRW ANT N – 3`

Diese ließ bewusst einige *mismatches* in der Auswahl der Basen zu, um nicht vorzeitig potentielle Bindepartner auszuschließen. Mit dieser minimalen Bindesequenz wurde das Genom von *N. meningitidis* MC58 durchsucht. Aus den 83 gefundenen Übereinstimmungen wurden die Promotorbereiche der sechs folgenden Gene ausgewählt und in *Electrophoretic Mobility Shift Assays* wurde getestet, ob FarR daran bindet: NMB0071 (*ctrA*), NMB0493 (*hrpA*), NMB1053 (*opc*), NMB1780 (*hrpB*), NMB1882 (*tonB*), NMB2053 (*petA*). Jedoch konnte bei keinem der untersuchten DNA-Bereiche eine direkte Bindung des Regulatorproteines FarR beobachtet werden. Dies könnte darauf zurück geführt werden, dass FarR seine Bindungssequenzen außerordentlich selektiv erkennt. Die vielen *mismatches* der minimalen Bindesequenz zur *farAB*- und *nadA*-Promotorregion scheinen dieser Spezifität nicht gerecht zu werden. So führen auch Variationen in der Basen-Abfolge durch Transvertierung der NMB1994-Bindesequenz dazu, dass FarR diese nicht mehr erkennen kann (Schielke et al., 2009).

5`	NWN	TAT	NNN	NRW	ANT	N	3`	Minimale Bindungssequenz
5`	TAA	TAT	GCA	CAT	ATT	A	3`	ATG NMB 1994
5`	TTA	TAT	AAA	CGA	AAT	A	3`	ATG NMB 0318
5`	ATT	TAT	AAT	TAT	ATT	A	3`	ATG NMB 0071
5`	AAA	TAT	TGC	TAA	AAT	A	3`	ATG NMB 0493
5`	TAA	TAT	ATG	TAA	AAT	C	3`	ATG NMB 1053
5`	GAT	TAT	AAA	AAT	ATT	A	3`	ATG NMB 1780
5`	CAA	TAT	GCC	GAA	AAT	A	3`	ATG NMB 1882
5`	AAA	TAT	CAT	AAA	ACT	T	3`	ATG NMB 2053

Abb. 27: Alignment der FarR-Bindestellen von *nadA* und *farAB*, sowie der minimalen Bindesequenz mit den putativen FarR-Bindestellen in den Promotorregionen der angegebenen Gene.

Ein Alignment der putativen Bindesequenzen mit der minimalen Bindesequenz und den beiden verifizierten Bindestellen NMB0318/0319 und NMB1994 zeigt, dass die beiden von FarR erkannten Sequenzen an der 10. Stelle die Base Cytidin tragen (Abb. 21, grün markiert). Die minimale Bindesequenz erlaubt an dieser Position jede beliebige Base. Von den ausgewählten Gen-Abschnitten trägt jedoch keiner an dieser Stelle ein Cytidin, sondern entweder ein Adenin, Thymin oder Guanin. An den Positionen 4, 5, 6, 13 und 15 stimmen die Basen aller Abschnitte überein (Abb. 21, orange markiert). Für jede der anderen Positionen gibt es mindestens eine Übereinstimmung zwischen den gesicherten Bindestellen und den negativen Sequenzen. Somit könnte das Cytidin an der 10. Position wichtig für die Erkennung der DNA-Sequenz durch FarR sein.

Mittels Microarray-Analysen und quantitativer Real Time PCR konnten weitere FarR-regulierte Gene im Stamm MC58 identifiziert werden; allerdings ist das einzige signifikant regulierte, funktionelle Gen neben *nadA* das *gapA-1*-Gen (Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase), welches an der Glykolyse beteiligt ist (Schielke et al., 2011).

Ein Vergleich der Bindesequenz von *nadA*, *farAB* und *gapA-1* zeigt überraschenderweise keine signifikante Übereinstimmung. Möglicherweise sind für die Regulation eines Gens durch FarR weitere Faktoren von Bedeutung, wie sie nur unter *in vivo* Bedingungen vorkommen. In den verwandten Gonokokken ist der *Integration Host Factor* (IHF) notwendig, um die Bindung zwischen FarR und der Promotorregion von *farAB* zu etablieren (Lee et al., 2006). Ein weiteres Beispiel für den Einfluss anderer Faktoren findet sich in *Escherichia coli*: hier kontrolliert der Regulator RpoS in der stationären Wachstumsphase Gene, die in der exponentiellen Wachstumsphase nicht unter RpoS-Kontrolle stehen (Dong et al., 2008). Somit könnte auch FarR unter anderen Bedingungen durchaus noch mehr Gene regulieren.

Um zu testen, ob die Konzentration von FarR einen Einfluss auf die Protein-DNA-Bindung ausübt, wurden FarR-Konzentrationsgradienten-*Electrophoretic Mobility Shift Assays* durchgeführt. Hierfür wurde exemplarisch der Promotor von NMB1053 (*opc*) eingesetzt. Das *opacity protein c* (*Opc*) ist ein Außenmembranprotein, das vor allem in unbekapselten Stämmen wesentlich an der Adhäsion an humane Epithel- und Endothelzellen sowie an der Invasion beteiligt ist (Virji et al., 1992 & 1993). In den bisherigen EMSAs konnte bereits mit 150 ng des gereinigten Proteins FarR eine Bindung an *nadA* erzielt werden. Von dem gereinigten FarR-Protein wurden 125 ng, 250 ng, 500 ng, 1000 ng und 2000 ng eingesetzt, wobei die Menge des zugegebenen *opc*-Promotors konstant blieb. Dabei konnte bei keiner der eingesetzten FarR-Mengen eine Bindung nachgewiesen werden. Somit scheint die Erkennung einer Bindesequenz, zumindest *opc* betreffend, nicht von der Menge des FarR-Proteins abhängig zu sein. Des Weiteren wurde versucht, in sogenannten Supershift-EMSAs mit Hilfe eines spezifisch gegen FarR gerichteten Antikörpers eine Komplexbildung zwischen FarR,  $\alpha$ -FarR und der DNA zu erzielen. Allerdings konnte weder eine normale *shift*-Bande beobachtet werden, noch eine höher laufende Super-*shift*-Bande. Zusammenfassend konnte keine Interaktion von FarR mit der *opc*-

Promotorregion detektiert werden. Dies schließt FarR als Regulator von *opc* aber nicht völlig aus: Das Opc-Protein ist nicht in allen Stämmen gleichermaßen vorhanden, sondern sein Expressionslevel kann stark variieren. Im Promotorbereich von *opc* befindet sich eine Polycytidin-Region, deren Länge den Grad der Proteinsynthese beeinflusst.

```

5`   GTT AAT TTT TAT TAA TAT ATG TAA AAT CCC CCC CCC CGA AAG CTT   3` Serogruppe A
5`           TAA TAT ATG TAA AAT C                               3` NMB1053

```

**Abb. 28:** Alignment der putativen FarR-Bindestelle von *opc* (NMB1053) mit einem Ausschnitt der Promotorregion eines Serogruppe A-Stamms (Sarkari et al., 1994).

So bewirkt eine Anzahl von 12 und 13 Cytidin-Basen, dass eine große Menge Opc synthetisiert wird, während 10 oder weniger bzw. 15 oder mehr Cytidin-Basen die Opc-Synthese verhindern. Da aber auch Stämme existieren, die trotz 12 oder 13 Cytidinen nur wenig Opc produzieren, wird vermutet, dass noch andere Faktoren an der Regulation beteiligt sind, die die Opc-Expression herunter regulieren können. Eine Möglichkeit wäre die Bindung von FarR. Folgendes Alignment zeigt die Lage der putativen FarR-Bindestelle in Bezug auf die Polycytidin-Region. DNA, die Polypurin oder Poly-Pyrimidin-Regionen enthält, nimmt teilweise andere Konformationen an als die klassische B-DNA (Kohwi & Kohwi-Shigermatsu, 1991, Wells et al., 1988). Dies könnte die Bindung des dimeren Transkriptionsregulators verhindern, da er nicht mehr an der großen Furche der DNA andocken und seine Bindesequenz erkennen kann. Die räumliche Nähe der möglichen FarR-Bindestelle zur Polycytidin-Region lässt es denkbar erscheinen, dass die FarR-Bindung durch Variationen der Länge oder der DNA-Konformation beeinflusst wird.

### 5. Sequenzanalyse des *hrpB*-Gens in *Neisseria meningitidis*-Isolaten

Die äußere Bakterienmembran schirmt zwar gut von den äußeren Einflüssen ab, macht aber auch spezielle Mechanismen notwendig, um synthetisierte Proteine, Lipide, Siderophore, Polysaccharide oder DNA in externe Milieu zu schaffen. Die Sekretion von großen, oftmals Virulenz-assoziierten Proteinen ins extrazelluläre Milieu wird in Gram-negativen Bakterien häufig über Zwei-Partner-Sekretions-Systeme bewerkstelligt. Bei diesem Mechanismus wird das Exoprotein TpsA, das in *N. meningitidis* als HrpA bezeichnet wird, mittels der allgemeinen *Sec-machinery* über die innere Bakterienmembran transportiert. Die zweite Komponente eines solchen Zwei-Partner-Sekretions-Systems ist das Transportprotein TpsB, in Meningokokken HrpB genannt, dessen spezifische Funktion es ist, TpsA zu erkennen und über die äußere Membran zu transportieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden das TpsB-Transportprotein codierende *hrpB*-Gen in 22 *N. meningitidis*-Isolaten sequenziert und analysiert. Die Untersuchung dieses Querschnitts durch verschiedene Serogruppen, klonalen Komplexe, sowie invasive und nicht-invasive Stämme gibt Einblicke in die Verteilung, Homologie und Struktur der HrpB-Proteine und zeigt ihre mögliche medizinische Bedeutung auf.

### 5.1 Alignment der putativen FarR-Bindestelle

Auf der Suche nach weiteren Genen, die in *N. meningitidis* durch den *Fatty acid resistance Regulator* FarR kontrolliert werden, wurde man auch in der Promotorregion der *hrpB*-Gene der Referenzstämme Z2491 (NMA0687), MC58 (NMB1780), FAM18 (NMC0443) und  $\alpha$ 14 (NMO0397) fündig. Dort fand sich eine 16 bp lange Sequenz, die der minimalen Bindesequenz des Transkriptionsregulators FarR entspricht. Ein Alignment der Promotorbereiche der sequenzierten Stämme und der Referenzstämme zeigte, dass diese Sequenz ubiquitär vorhanden war und in allen Stämmen exakt übereinstimmte. In *Electrophoretic Mobility Shift Assays* konnte gezeigt werden, dass FarR nicht direkt an die Sequenz von MC58 (NMB1780) bindet. Da die putative Bindesequenz in allen untersuchten Stämmen identisch war, kann daraus geschlossen werden, dass FarR auch in den anderen Stämmen nicht direkt an die Promotorregion von *hrpB* bindet. Damit ist anzunehmen, dass die Expression von *hrpB* in *N. meningitidis* nicht unter direkter Kontrolle des Transkriptionsregulators FarR steht. Daneben bestehen noch zahlreiche Möglichkeiten der indirekten Regulation, die denkbar wären, die in Kapitel IV.1 bereits diskutiert wurden.

### 5.2 Verteilung und phylogenetische Analyse der *hrpB*-Gene in *N. meningitidis*

Analysen des Genoms verschiedener Isolate von *N. meningitidis* zeigten, dass funktionsfähige Zwei-Partner-Sekretions-Systeme in allen invasiven und nicht-invasiven (Träger) Isolaten vorhanden sind. Diese unterteilt man nach ihrer genetischen Übereinstimmung in die Typen 1-3. Typ 1 ist ein ubiquitär vorhandenes System. Die Typen 2 und 3 sind in den invasiven Isolaten und hypervirulenten Linien häufiger vertreten und werden daher mit Virulenz in Verbindung gebracht. Zusätzlich findet sich in *N. lactamica* ein Typ 4 Tps-System (van Ulsen et al., 2008, Schmitt et al., 2007). Eine Sequenzierung des zu NMC0443 (*hrpB*) homologen Locus in 22 *N. meningitidis*-Isolationen von Meningitis-Patienten und Trägern bestätigte das ubiquitäre Vorhandensein von Zwei-Partner-Sekretions-Systemen in Meningokokken. Alle untersuchten Stämme enthielten einen 1743 bp langen *Open Reading Frame* für ein *hrpB*-Homolog, was auch den *hrpB*-Genen in den bereits vollständig sequenzierten Referenzstämmen Z2491 (Serogruppe A), MC58 (Serogruppe B), FAM18 (Serogruppe C) und  $\alpha$ 14 (*cnI*) entspricht. Der GC-Gehalt des *hrp*-Locus entspricht dem des restlichen Genoms. Zudem finden sich in den flankierenden Bereichen keine *repeating sequences*, was zusammengenommen darauf hindeutet, dass der *hrp*-Locus nicht durch horizontalen Gentransfer erworben wurde. Das *hrpB*-Gen, welches für den Transporter des Zwei-Partner-Sekretions-System kodiert, ist also ein zum ursprünglichen Meningokokken-Genom gehörendes Gen, dessen Vorkommen nicht an die Serogruppe, den klonalen Komplex oder den Status invasiv/Träger gebunden ist. Die 26 untersuchten Stämme lassen sich zehn verschiedenen klonalen Komplexen zuordnen. Die Zuteilung zu einem klonalen Komplex beruht auf der Sequenzierung mehrere essentieller *housekeeping*-Gene und zeigt den Grad der Verwandtschaft zwischen den jeweiligen Stämmen an (Maiden et al., 1998). Mit dem Programm



Jalview (Waterhouse et al., 2009) wurde eine auf dem Aminosäure-Alignment basierender *Neighbour-Joining Tree* erstellt. Ein solcher phylogenetischer Baum zeigt den Verwandtschaftsgrad der einzelnen Isolate, beruhend auf der Ähnlichkeit des *hrpB*-Gens, an. Dabei bilden sich in dem Baum zwei große Hauptgruppen: zur ersten gehören die klonalen Komplexe ST11, ST32, ST60 und ST213, zur zweiten zählen ST4, ST8, (ST32), ST41/44, ST53, ST254 und ST845. In diesen Hauptästen gruppieren sich die einzelnen Stämme entsprechend ihres klonalen Komplexes um die kleineren Zweige. Zusammenfassend betrachtet scheint das *hrpB*-Gen keine spezifischen Merkmale aufzuweisen, die die hypervirulenten von den nicht-hypervirulenten Isolaten oder die invasiven von den Trägerstämmen unterscheiden. Die Serogruppe spielt bei der genetischen Ähnlichkeit *hrpB* keine Rolle, da diese Zuordnung auf der Polysaccharid-Struktur der Kapsel beruht und andere Merkmale des Genoms nicht berücksichtigt.

### 5.3 Auswertung der Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen

Ein Alignment der 26 Nukleotid-Sequenzen von *hrpB* zeigt durchweg eine überaus hohe Übereinstimmung, vor allem im Anfangsbereich des Gens von den Basen 1-1181. Die Region zwischen bp 1182 und 1527 weist einige Basen-Variationen auf. Dabei scheinen dies zumeist keine zufälligen Punktmutationen zu sein. Vielmehr ist es so, dass die Sequenz an einer solchen variablen Position stets nur zwischen zwei Basen variiert. In den allermeisten Fällen ist diese Position nicht nur in einem Stamm verändert, sondern in mehreren ist die gleiche Abweichung zu finden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Veränderungen vermutlich auf Rekombinationsereignissen beruhen und nicht auf Mutationen (Schoen, *unpublished data*). Einzige Ausnahme bildet der Trägerstamm P12, der im C-terminalen Bereich zusätzlich einige Punktmutationen aufweist, die nur er besitzt und daher die geringste Übereinstimmung mit den anderen Stämmen hat. Bei der Translation der Nukleotid-Sequenz in die Aminosäure-Sequenz fällt auf, dass viele der Basen-Variationen stumm sind. Durch die Degeneration des genetischen Codes wird trotz eines veränderten Basen-Triplets die gleiche Aminosäure synthetisiert. Der Beginn des *hrpB*-Gens codiert für das N-terminale Ende der AS-Sequenz. Dieses weist eine besonders hohe Übereinstimmung der Sequenz auf und ist damit der hoch konservierte Teil des HrpB-Proteins. Im C-terminalen Bereich findet sich immer noch eine deutliche Variabilität. Für jede der 20 variablen Positionen finden sich aber maximal zwei AS-Varianten. Hinzu kommen noch sieben Aminosäuren, die nur in dem Träger-Stamm P12 von der Konsensus-Sequenz abweichen. Da 17 von den 20 variablen Aminosäuren sich in Ladung und funktioneller Gruppe unterscheiden, könnte sich die Tertiärstruktur des HrpB von Stamm zu Stamm leicht unterscheiden. Ein weiteres Außenmembranprotein in *N. meningitidis* ist der Enterbactin-Rezeptor FetA, welcher in der Mehrzahl der Meningokokken und in Gonokokken vorhanden ist (Beucher & Sparling, 1995, Gotschlich et al., 1994). Obwohl *fetA* in vitro nur gering exprimiert wird, spielt es unter in vivo Eisenmangel-Bedingungen eine wichtige Rolle. Wie die meisten anderen Außenmembranproteine weist FetA eine hohe genetische Diversität auf. Phylogenetische

Analysen zeigten, dass diese Variabilität durch Punkt-Mutation und horizontalen Genaustausch entstanden sind. Dabei sind die Nukleotid-Variationen nicht gleichmäßig über das Gen verteilt, sondern es gibt, wie bei HrpB auch, variable und konservierte Bereiche. Die am höchsten konservierte Region befindet sich am N-terminalen Ende. Die Region mit den meisten Unterschieden wird als VR (*variabel region*) bezeichnet und ist die Region des Proteins, die in Kontakt mit dem menschlichen Immunsystem steht. Die von Thompson et al. untersuchten Stämme stammten von invasiven Meningokokken-Isolaten; daher ist es anzunehmen, dass die genetische Diversität bei Träger-Isolaten noch höher ist (Thompson et al., 2003). Auch bei PorA, einem weiteren Außenmembranprotein, finden sich zahlreiche Sequenz-Unterschiede, die sich in besonders variable Bereichen sammeln (Urwin et al., 2004). Somit ist die Verteilung der variablen und konservierten Bereiche, die bei der *hrpB*-Sequenzierung festgestellt wurde durchaus typisch für Proteine, die mit der Außenwelt in Kontakt sind. Im Unterschied zu FetA und PorA ist HrpB aber ein hoch konserviertes Protein, wenn man bedenkt, dass die Übereinstimmung zwischen den einzelnen Aminosäure-Sequenzen selbst in Trägerstämmen bei 96 bis 100% liegt. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass TPS-Systeme keine für Wachstum und Vermehrung unter *in vitro*-Bedingungen essentiellen Proteine darstellen. Da sie stattdessen als Virulenzfaktoren an der Interaktion mit dem Wirtsorganismus Mensch mitwirken, wäre zu erwarten, dass der Selektionsdruck des Immunsystems die Entstehung variabler Proteine begünstigt.

#### 5.4 Dreidimensionale Struktur von HrpB

Die Tertiär-Struktur des Proteins HrpB von *N. meningitidis* wurde bisher nicht bestimmt. Um trotzdem eine Vorstellung von der dreidimensionalen Struktur zu bekommen, wurde ein Alignment der Aminosäure-Sequenz von HrpB aus FAM18 (NMC0443) mit der des TpsB-Transporters FhaC von *B. pertussis* (BP1884) mit dem Programm ClustalW2 (Larkin et al., 2007) durchgeführt. Obwohl HrpB und FhaC zur gleichen Familie der *omp85-tpsB*-Familie (*outer membrane proteine 85 two partner secretion B*) gehören, zeigt ein Vergleich der jeweiligen Korrelate nur eine Homologie von 21,8%. Dies ist jedoch noch ausreichend, um die Bereiche der HrpB-Sequenz den entsprechenden tertiären Strukturen von FhaC zuzuordnen. Aufgrund der Übereinstimmungen lässt sich schlussfolgern, dass auch HrpB eine Transmembran-Domäne am C-terminalen Ende, ein periplasmatisches Modul mit einer  $\alpha$ -Helix H1 und POTRA-Domänen, sowie acht potentiell extrazelluläre *loops* (L1-L8) besitzt. Damit entspräche HrpB dem Grundbauplan der TpsB-Proteine mit einem C-terminalen  $\beta$ -barrel-Zylinder aus 12 bis 16 transmembranen Strängen und ein bis fünf POTRAs. Die N-terminale  $\alpha$ -Helix scheint keine TpsB-definierende Struktur darzustellen, da sie zum Beispiel in HMW1B von *Haemophilus influenzae* fehlt (Duret et al., 2008). Essentiell für Struktur und Funktion der TpsB-Proteine sind dagegen die POTRA-Domänen. Sie unterscheiden sich zwar in ihrer Oberfläche, sind aber strukturell hoch konservierte Bestandteile (Moslavac et al., 2005). Ihre Funktion ist es, das zugehörige TpsA-Protein im periplasmatischen Raum anhand seiner TPS-Domäne zu erkennen und die Sekretion zu initiieren. Die Funktion der *loops* konnte bisher nicht umfassend aufgeklärt werden. Im *B.*

*pertussis* FhaC bindet der *loop* L6 die beiden  $\beta$ -strands 11 und 12. L6 faltet sich in eine *hairpin*-Formation und reicht in dieser Form durch den  $\beta$ -barrel-Kanal hindurch bis ins Periplasma. Zusätzlich zu L6 ragt die  $\alpha$ -Helix H1 in den hydrophilen Tunnelinnenraum hinein. Dadurch wird der Kanal in einen inaktiven Zustand versetzt und verschlossen. Erst wenn die TPS-Domäne des TpsA-Proteins FhaB Kontakt mit den POTRA-Domänen des FhaC aufnimmt, werden L6 und H1 aus dem Kanal heraus verlagert. Dadurch wird die Öffnung freigegeben, so dass das Exoprotein den Kanal passieren kann. Darüber hinaus scheint L6 noch weitere Aufgaben beim Transportvorgang zu haben, denn wenn L6 deletiert wird, kann FhaB nicht mehr sezerniert werden (Clantin et al., 2007, Jacob Dubiusson et al., 2004). In *Haemophilus influenzae* finde sich ebenfalls ein TpsB-Transportprotein, HMW1B, bei welchem elektrophysiologische Vorgänge beim Transportprozess näher untersucht wurden. So konnten Duret et al. nachweisen, dass der HMW1B-Kanal sich überwiegend in geschlossenem Zustand befindet (Duret et al., 2008). In *H. influenzae* scheint aber der Kontakt der TPS-Domäne von HMW1 mit den POTRAs von HMW1B alleine nicht auszureichen um den Kanal zu öffnen (Duret et al., 2008). Erkennung des TpsA und Öffnung des TpsB-Kanals müssen also nicht unbedingt gekoppelt verlaufen; vielmehr scheinen noch weitere Faktoren am Transport beteiligt zu sein, die bisher noch nicht identifiziert wurden. Dass die Kanäle überwiegend geschlossen sind und nur gezielt für den Transport geöffnet werden, hat vermutlich den Grund, dass sich die Bakterien so vor dem Eindringen schädlicher Substanzen schützen. Entfernt man beispielsweise den nach innen gefalteten *loop* L6 des FhaC-Kanals, so ändert das vermutlich die Struktur des FhaC und erhöht dadurch die Empfindlichkeit von *B. pertussis* gegenüber Antibiotika (Clantin et al., 2007). Bei Betrachtung der variablen Positionen in den Aminosäure-Sequenzen von HrpB in *N. meningitidis*, zeigt sich, dass sieben von zwanzig variablen AS-Stellen in den *loop*-Regionen liegen, aber nur zwei in der Transmembran-Domäne und keine in der  $\alpha$ -Helix. Dies zeigt, dass die für den Transport-Prozess essentiellen Bereiche besonders gut konserviert sind. Außerdem deutet es darauf hin, dass die *loops* mit dem menschlichen Immunsystem interagieren könnten, da dies einen Selektionsdruck ausübt und die Entstehung von Variabilität begünstigt.

### 5.5 Medizinische Bedeutung von HrpB

Bisher wurde dem sezernierten Exoprotein HrpA viel Beachtung geschenkt, da das Homolog FHA in *B. pertussis* der Hauptbestandteil der Keuchhusten-Impfung ist (Sato et al., 1984; Sato et al., 1981). Allerdings scheint HrpA sich nur wenig als Bestandteil einer Serogruppe B-Impfung zu eignen. Die sezernierten Proteine sind wahrscheinlich sehr variabel, da vermutet wird, dass sie zum Beispiel mit anderen Fragmenten wie den zusätzlichen *hrpA*-Kassetten rekombinieren können. Ähnlichkeiten beschränken sich vor allem auf den N-terminalen Bereich mit Signalpeptid und Sekretionsdomäne (Schmitt et al. 2007). Die große Variabilität vieler Außenmembran-Proteine ist ein Problem, das viele potentielle Vakzine-Kandidaten in *N. meningitidis* ungeeignet erscheinen lässt. Denn wenn ein durch Impfung induzierter Antikörper nur die Epitope bestimmter Stämme erkennen kann, bietet die Impfung nur begrenzten Schutz. Auf der Suche nach

immunisierenden Komponenten für eine Impfung gegen Serogruppe B-Meningokokken wurden auch Porin A und das *opacity protein* Opc genauer untersucht. Beide Proteine liegen in der äußeren Bakterienmembran, sind an der Pathogenese der Meningokokken-Meningitis beteiligt und induzieren die Bildung von protektiven Antikörpern. Allerdings variiert die Aminosäure-Sequenz und damit die antigene Struktur dieser beiden Proteine von Stamm zu Stamm zu sehr, so dass eine Impfung keinen vollständigen Schutz bietet (Vermont & van den Dobbelsteen, 2003, Vermont et al., 2002, Pollard & Frasch, 2001). Das hier untersuchte HrpB weist einige gute Eigenschaften auf, die Voraussetzung für einen Vakzine-Bestandteil sind: Es ist ein Protein in der äußeren Bakterienmembran, das über extrazelluläre *loops* mit dem Immunsystem in Kontakt sein könnte. Zudem ist es, trotz einer gewissen Variabilität der *loops*, ein hoch konserviertes Protein. Dadurch könnten Antikörper gegen HrpB aus einem Stamm auch mit dem HrpB aus anderen Stämmen reagieren. Ob HrpB eine Antikörper-Bildung induziert und diese Antikörper sich dann als effektiv auch gegen bekapselte Bakterien erweisen, muss allerdings erst in weiterführenden Untersuchungen erforscht werden. In *Serratia spp.* konnte bereits gezeigt werden, dass das TpsB-Protein ShIB an der Oberfläche der Bakterien liegt und durch Antikörpern erkannt werden kann (Konninger et al., 1999). Prinzipiell eignen sich Transport-Proteine gut als Bestandteile von Impfungen. So wird zum Beispiel das *Neisseria adhesin A* (NadA), das ein Autotransporter der *oca*-Familie ist, als Vakzine-Kandidat getestet, mit durchaus viel versprechenden Ergebnissen. Auch in der Impfung gegen den Erreger des Keuchhustens, *B. pertussis*, wird neben dem filamentösen Hämagglutinin FHA der Autotransporter Pertactin als Antigen eingesetzt (Poolman & Hallander, 2007). Somit könnte sich auch das Transport-Protein HrpB des Zwei-Partner-Sekretions-Systems von *N. meningitidis* als möglicher Kandidat für einen Vakzine-Bestandteil gegen Serogruppe B-Meningokokken erweisen.

## V Zusammenfassung

*Neisseria meningitidis*, Auslöser der Meningokokken-Meningitis und Sepsis, trägt auch heute noch zur hohen Kindersterblichkeit in Entwicklungsländern bei und sorgt, vor allem im afrikanischen Meningitis-Gürtel, immer wieder für Epidemien mit gravierenden Folgen für die Betroffenen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei an der Pathogenität von *N. meningitidis* beteiligte Proteine, der Transkriptionsregulator FarR und der Transportkanal HrpB, näher charakterisiert, um weitere Einblicke in die immer noch nicht vollständig entschlüsselte Pathogenese der Meningokokken-Meningitis zu erhalten. Das *Neisseria adhesin A* NadA ist Bestandteil der sich aktuell in der Entwicklung befindenden Impfung gegen Meningokokken der Serogruppe B. Im dem bekapselten B-Stamm MC58 wurde gezeigt, dass *nadA* unter der negativen Kontrolle des Transkriptionsregulators FarR steht (Schielke et al., 2009). In den ebenfalls zur Gattung *Neisseria* gehörenden *Neisseria gonorrhoeae* (Ng) wurde bereits 2001 ein FarR-Homolog beschrieben (Shafer et al., 2001). NgFarR ist an der Resistenz gegenüber antimikrobiellen, langkettigen Fettsäuren beteiligt, indem es die Expression des FarAB-Effluxpumpen-Systems reguliert, welches eingedrungene Fettsäuren wieder nach extrazellulär befördert. Dagegen zeigten Palmitinsäure-Resistenztests, dass FarR nicht an der intrinsischen Fettsäure-Resistenz der Meningokokken beteiligt ist. Die Deletion und die Komplementierung von *farR* hatten weder in bekapselten noch in unbekapselten Meningokokken Einfluss auf das normale Wachstumsverhalten. Ein Western Blot- Nachweis des FarR-Proteins in der frühen, mittleren und späten exponentiellen Wachstumsphase von Wildtyp, Kapsel-Deletionsmutante und *farR*-Komplementante zeigte, dass die Menge an FarR im zeitlichen Verlauf kontinuierlich zunimmt und FarR damit Wachstumsphasen-abhängig exprimiert wird. Dabei scheint es einer posttranskriptionalen oder posttranslationalen Regulation zu unterliegen, da auch in dem *farR*-komplementierten Stamm unabhängig vom *farR*-Promotor eine entsprechende Hochregulation stattfindet. In Infektionsversuchen wurde die Interaktion zwischen Meningokokken und humanen polymorphkernigen Granulozyten untersucht. In den Infektionsassays wurde die *farR*-Deletionsmutante innerhalb des dreistündigen Versuchsrahmens deutlich stärker durch die Granulozyten abgetötet als der Serogruppe B-Wildtyp. Als Mitglied der in Bakterien und Archaeen weit verbreiteten Familie der MarR-Transkriptionsregulatoren (*Multiple antibiotic resistance Regulator*, MarR) bindet FarR mit hoher Wahrscheinlichkeit auch als Homodimer an seine Bindesequenz auf der DNA. FarR erkennt eine 16 bp lange, palindromische Sequenz in der Promotorregion von *nadA* (NMB1994), wodurch die *nadA*-Expression verhindert wird. Außerdem erkennt FarR eine ähnliche Bindesequenz im Promotorbereich von *farAB* (NMB0318/0319), wobei es aber keinen regulatorischen Einfluss ausübt. Mit einer aus diesen beiden Bindestellen berechneten minimalen Bindesequenz wurde im Genom von MC58 weitere mögliche Bindepertner detektiert. Eine Auswahl dieser möglichen Bindestellen wurde in *Electrophoretic Mobility Shift Assays* auf eine direkte Interaktion mit dem FarR-Protein hin untersucht, wobei sich allerdings keine direkte Bindung nachweisen ließ. Diese Ergebnisse darauf hin, dass der Transkriptionsregulator FarR hoch spezifisch bestimmte DNA-Bindesequenzen erkennt und die

entsprechenden Gene reguliert.

In der Promotorregion des TpsB-Proteins HrpB wurde in den sequenzierten Referenzstämmen Z2491, MC58, FAM18 und  $\alpha$ 14 eine mit der minimalen FarR-Bindesequenz kompatible Sequenz gefunden. In *Electrophoretic Mobility Shift Assays* konnte allerdings gezeigt werden, dass FarR nicht direkt daran bindet. Um das Transport-Protein HrpB näher zu charakterisieren, wurde das entsprechende Gen in 22 *N. meningitidis*-Isolaten sequenziert. Dabei zeigte sich, dass das Transportprotein *hrpB* in allen untersuchten invasiven und nicht-invasiven Stämmen vorhanden ist. Dieses äußerst konservierte Protein weist nur im seinem C-terminalen Bereich eine relativ variable Region auf, was vermutlich auf Rekombinationsereignisse zurückzuführen ist. Ein Alignment der Aminosäure-Sequenz des Serogruppe C-Stamms FAM18 mit der des homologen *Bordetella pertussis* TpsB-Proteins FhaC zeigte, dass die dreidimensionale Struktur des HrpB ebenfalls eine  $\alpha$ -Helix, eine transmembranöse Domäne und variable extrazelluläre *Loops* enthält. Zusammengenommen erfüllt HrpB somit wichtige Bedingungen, um als Vakzine-Bestandteil in Betracht gezogen zu werden.

## VI Literaturnachweis

- Achtman, M. (1995). "Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*." *Trends Microbiol* 3(5): 186-192.
- Aravind, L. and E. V. Koonin (1999). "DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea." *Nucleic Acids Res* 27(23): 4658-4670.
- Bachman, M. A. and M. S. Swanson (2001). "RpoS co-operates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase." *Mol Microbiol* 40(5): 1201-1214.
- Barlow, A. K., J. E. Heckels, et al. (1987). "Molecular cloning and expression of *Neisseria meningitidis* class 1 outer membrane protein in *Escherichia coli* K-12." *Infect Immun* 55(11): 2734-2740.
- Bergsson, G., J. Arnfinnsson, et al. (1998). "In vitro inactivation of *Chlamydia trachomatis* by fatty acids and monoglycerides." *Antimicrob Agents Chemother* 42(9): 2290-2294.
- Bergsson, G., O. Steingrímsson, et al. (1999). "In vitro susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to fatty acids and monoglycerides." *Antimicrob Agents Chemother* 43(11): 2790-2792.
- Berks, B. C., T. Palmer, et al. (2003). "The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology." *Adv Microb Physiol* 47: 187-254.
- Beucher, M. and P. F. Sparling (1995). "Cloning, sequencing, and characterization of the gene encoding FrpB, a major iron-regulated, outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*." *J Bacteriol* 177(8): 2041-2049.
- Boisier, P., P. Nicolas, et al. (2007). "Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger." *Clin Infect Dis* 44(5): 657-663.
- Bordelon, T., S. P. Wilkinson, et al. (2006). "The crystal structure of the transcriptional regulator HucR from *Deinococcus radiodurans* reveals a repressor preconfigured for DNA binding." *J Mol Biol* 360(1): 168-177.
- Bourdoulous, S. & Nassif, X., S 257ff in M. Frosch, M. C. J. M., Ed. (2006). *Handbook of Meningococcal Disease*. Weinheim, Germany, Wiley-VCH.
- Boutoille, D., S. Corvec, et al. (2004). "Detection of an IS21 insertion sequence in the *mexR* gene of *Pseudomonas aeruginosa* increasing beta-lactam resistance." *FEMS Microbiol Lett* 230(1): 143-146.
- Brennan, R. G. (1993). "The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff." *Cell* 74(5): 773-776.
- Brennan, R. G. and B. W. Matthews (1989). "The helix-turn-helix DNA binding motif." *J Biol Chem* 264(4): 1903-1906.
- Brennan, R. G. and B. W. Matthews (1989). "Structural basis of DNA-protein recognition." *Trends Biochem Sci* 14(7): 286-290.
- Capecchi, B., J. Adu-Bobie, et al. (2005). "*Neisseria meningitidis* NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells." *Mol Microbiol* 55(3): 687-698.
- Cartwright, K. A., J. M. Stuart, et al. (1987). "The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*." *Epidemiol Infect* 99(3): 591-601.

Cartwright K. Meningococcal Carriage and Disease. In: Meningococcal disease.  
Edited by Cartwright K, John Wiley & Sons Ltd 1995

Caugant, D. A., E. A. Hoiby, et al. (1994). "Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population." *J Clin Microbiol* 32(2): 323-330.

Caugant, D. A. (1998). "Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*." *APMIS* 106(5): 505-525.

Caugant, D. A. and M. C. Maiden (2009). "Meningococcal carriage and disease--population biology and evolution." *Vaccine* 27 Suppl 2: B64-70.

Chen, T. and E. C. Gotschlich (1996). "CGM1a antigen of neutrophils, a receptor of gonococcal opacity proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14851-14856.

Chen, T., F. Grunert, et al. (1997). "Several carcinoembryonic antigens (CD66) serve as receptors for gonococcal opacity proteins." *J Exp Med* 185(9): 1557-1564.

Chen, P. L., H. C. Lee, et al. (2010). "High prevalence of mutations in quinolone-resistance-determining regions and *mtrR* loci in polyclonal *Neisseria gonorrhoeae* isolates at a tertiary hospital in Southern Taiwan." *J Formos Med Assoc* 109(2): 120-127.

Chevalier, N., M. Moser, et al. (2004). "Membrane targeting of a bacterial virulence factor harbouring an extended signal peptide." *J Mol Microbiol Biotechnol* 8(1): 7-18.

Clantin, B., A. S. Delattre, et al. (2007). "Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily." *Science* 317(5840): 957-961.

Clark, K. L., E. D. Halay, et al. (1993). "Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5." *Nature* 364(6436): 412-420.

Claus, H., M. C. Maiden, et al. (2002). "Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport." *Microbiology* 148(Pt 6): 1813-1819.

Claus, H., M. C. Maiden, et al. (2005). "Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults." *J Infect Dis* 191(8): 1263-1271.

Comanducci, M., S. Bambini, et al. (2002). "NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*." *J Exp Med* 195(11): 1445-1454.

Comanducci, M., S. Bambini, et al. (2004). "NadA diversity and carriage in *Neisseria meningitidis*." *Infect Immun* 72(7): 4217-4223.

Coureuril, M., G. Mikaty, et al. (2009). "Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium." *Science* 325(5936): 83-87.

Cunha, C. S., N. J. Griffiths, et al. (2009). "*Neisseria meningitidis* Opc invasin binds to the cytoskeletal protein alpha-actinin." *Cell Microbiol* 11(3): 389-405.

de Keyzer, J., C. van der Does, et al. (2003). "The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex." *Cell Mol Life Sci* 60(10): 2034-2052.

Desvaux, M., N. J. Parham, et al. (2004). "Type V protein secretion: simplicity gone awry?" *Curr Issues Mol Biol* 6(2): 111-124.



- Devoe, I. W. and J. E. Gilchrist (1973). "Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*." *J Exp Med* 138(5): 1156-1167.
- Domain, F. and S. B. Levy (2010). "GyrA interacts with MarR to reduce repression of the marRAB operon in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 192(4): 942-948.
- Dong, T., M. G. Kirchhof, et al. (2008). "RpoS regulation of gene expression during exponential growth of *Escherichia coli* K12." *Mol Genet Genomics* 279(3): 267-277.
- Drake, D. R., K. A. Brogden, et al. (2008). "Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface." *J Lipid Res* 49(1): 4-11.
- Duret, G., M. Szymanski, et al. (2008). "The TpsB translocator HMW1B of *Haemophilus influenzae* forms a large conductance channel." *J Biol Chem* 283(23): 15771-15778.
- Elias, J. and U. Vogel (2007). "IS1301 fingerprint analysis of *Neisseria meningitidis* strains belonging to the ET-15 clone." *J Clin Microbiol* 45(1): 159-167.
- Ellison, D. W. and V. L. Miller (2006). "Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family." *Curr Opin Microbiol* 9(2): 153-159.
- Epidemiologisches Bulletin des Robert-Koch Instituts Nr. 45/2009
- Estabrook, M. M., D. Zhou, et al. (1998). "Nonopsonic phagocytosis of group C *Neisseria meningitidis* by human neutrophils." *Infect Immun* 66(3): 1028-1036.
- Finlay, B. B. and S. Falkow (1997). "Common themes in microbial pathogenicity revisited." *Microbiol Mol Biol Rev* 61(2): 136-169.
- Finne, J., D. Bitter-Suermann, et al. (1987). "An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues." *J Immunol* 138(12): 4402-4407.
- Finne, J., M. Leinonen, et al. (1983). "Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis." *Lancet* 2(8346): 355-357.
- Franzoso, S., C. Mazzon, et al. (2008). "Human monocytes/macrophages are a target of *Neisseria meningitidis* Adhesin A (NadA)." *J Leukoc Biol* 83(5): 1100-1110.
- Frasch, C. E. and E. C. Gotschlich (1974). "An outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* group B responsible for serotype specificity." *J Exp Med* 140(1): 87-104.
- Frasch, C. E., W. D. Zollinger, et al. (1985). "Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes." *Rev Infect Dis* 7(4): 504-510.
- Frohm, M., B. Agerberth, et al. (1997). "The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders." *J Biol Chem* 272(24): 15258-15263.
- Gajiwala, K. S. and S. K. Burley (2000). "Winged helix proteins." *Curr Opin Struct Biol* 10(1): 110-116.
- Galbraith, H. and T. B. Miller (1973). "Physicochemical effects of long chain fatty acids on bacterial cells and their protoplasts." *J Appl Bacteriol* 36(4): 647-658.
- George, A. M. and S. B. Levy (1983). "Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline." *J Bacteriol* 155(2): 531-540.

- George, A. M. and S. B. Levy (1983). "Gene in the major cotransduction gap of the Escherichia coli K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics." *J Bacteriol* 155(2): 541-548.
- Goldschneider, I., E. C. Gotschlich, et al. (1969)(a). "Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies." *J Exp Med* 129(6): 1307-1326.
- Goldschneider, I., E. C. Gotschlich, et al. (1969)(b). "Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity." *J Exp Med* 129(6): 1327-1348.
- Gotschlich, E. C., I. Goldschneider, et al. (1969)(a). "Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers." *J Exp Med* 129(6): 1367-1384.
- Gotschlich, E. C., I. Goldschneider, et al. (1969)(b). "Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state." *J Exp Med* 129(6): 1385-1395.
- Gotschlich, E. C. (1994). "Genetic locus for the biosynthesis of the variable portion of Neisseria gonorrhoeae lipooligosaccharide." *J Exp Med* 180(6): 2181-2190.
- Guedin, S., E. Willery, et al. (2000). "Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin." *J Biol Chem* 275(39): 30202-30210.
- Hancock, R. E. (2001). "Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials." *Lancet Infect Dis* 1(3): 156-164.
- Harrison, L. H., C. L. Trotter, et al. (2009). "Global epidemiology of meningococcal disease." *Vaccine* 27 Suppl 2: B51-63.
- Herbst, K., M. Bujara, et al. (2009). "Intrinsic thermal sensing controls proteolysis of Yersinia virulence regulator RovA." *PLoS Pathog* 5(5): e1000435.
- Heroven, A. K., K. Bohme, et al. (2008). "A Csr-type regulatory system, including small non-coding RNAs, regulates the global virulence regulator RovA of Yersinia pseudotuberculosis through RovM." *Mol Microbiol* 68(5): 1179-1195.
- Holland, I. B. (2004). "Translocation of bacterial proteins--an overview." *Biochim Biophys Acta* 1694(1-3): 5-16.
- Hong, M., M. Fuangthong, et al. (2005). "Structure of an OhrR-ohrA operator complex reveals the DNA binding mechanism of the MarR family." *Mol Cell* 20(1): 131-141.
- Huang, X. and A. Madan (1999). "CAP3: A DNA sequence assembly program." *Genome Res* 9(9): 868-877.
- Huson, D. H. and D. Bryant (2006). "Application of phylogenetic networks in evolutionary studies." *Mol Biol Evol* 23(2): 254-267.
- Isaacs, C. E., K. S. Kim, et al. (1994). "Inactivation of enveloped viruses in human bodily fluids by purified lipids." *Ann N Y Acad Sci* 724: 457-464.
- Jacob, F. and J. Monod (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins." *J Mol Biol* 3: 318-356.

- Jacob-Dubuisson, F., C. Loch, et al. (2001). "Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins." *Mol Microbiol* 40(2): 306-313.
- Jacob-Dubuisson, F., R. Fernandez, et al. (2004). "Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways." *Biochim Biophys Acta* 1694(1-3): 235-257.
- Join-Lambert, O., P. C. Morand, et al. (2009). "Mechanisms of meningeal invasion by a bacterial extracellular pathogen, the example of *Neisseria meningitidis*." *Prog Neurobiol*.
- Jolley, K. A., L. Appleby, et al. (2001). "Immunization with recombinant Opc outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*: influence of sequence variation and levels of expression on the bactericidal immune response against meningococci." *Infect Immun* 69(6): 3809-3816.
- Jolley, K. A., J. Kalmusova, et al. (2000). "Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population." *J Clin Microbiol* 38(12): 4492-4498.
- Kallstrom, H., M. K. Liszewski, et al. (1997). "Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*." *Mol Microbiol* 25(4): 639-647.
- Klee, S. R., X. Nassif, et al. (2000). "Molecular and biological analysis of eight genetic islands that distinguish *Neisseria meningitidis* from the closely related pathogen *Neisseria gonorrhoeae*." *Infect Immun* 68(4): 2082-2095.
- Klein, N. J., C. A. Ison, et al. (1996). "The influence of capsulation and lipooligosaccharide structure on neutrophil adhesion molecule expression and endothelial injury by *Neisseria meningitidis*." *J Infect Dis* 173(1): 172-179.
- Kodicek, E. (1945). "The effect of unsaturated fatty acids on *Lactobacillus helveticus* and other Gram-positive micro-organisms." *Biochem J* 39(1): 78-85.
- Kohwi, Y. and T. Kohwi-Shigematsu (1991). "Altered gene expression correlates with DNA structure." *Genes Dev* 5(12B): 2547-2554.
- Konninger, U. W., S. Hobbie, et al. (1999). "The haemolysin-secreting ShlB protein of the outer membrane of *Serratia marcescens*: determination of surface-exposed residues and formation of ion-permeable pores by ShlB mutants in artificial lipid bilayer membranes." *Mol Microbiol* 32(6): 1212-1225.
- Krauss, G. (1997a). *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*, S.13 ff, Weinheim, Wiley-VCH.
- Krauss, G. (1997b). *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*, S. 22 f, Weinheim, Wiley-VCH.
- Lee, V. T. and O. Schneewind (2001). "Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections." *Genes Dev* 15(14): 1725-1752.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, et al. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
- Lee, E. H., S. A. Hill, et al. (2006). "Integration Host Factor is required for FarR repression of the farAB-encoded efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae*." *Mol Microbiol* 60(6): 1381-1400.
- Lee, E. H., C. Rouquette-Loughlin, et al. (2003). "FarR regulates the farAB-encoded efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* via an MtrR regulatory mechanism." *J Bacteriol* 185(24): 7145-7152.
- Lee, E. H. and W. M. Shafer (1999). "The farAB-encoded efflux pump mediates resistance of gonococci to long-chained antibacterial fatty acids." *Mol Microbiol* 33(4): 839-845.

- Lewis, M. (2005). "The lac repressor." *C R Biol* 328(6): 521-548.
- Libby, S. J., W. Goebel, et al. (1994). "A cytolysin encoded by Salmonella is required for survival within macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(2): 489-493.
- Lim, D., K. Poole, et al. (2002). "Crystal structure of the MexR repressor of the mexRAB-oprM multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Biol Chem* 277(32): 29253-29259.
- Locht, C., P. Bertin, et al. (1993). "The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp." *Mol Microbiol* 9(4): 653-660.
- Lomovskaya, O., K. Lewis, et al. (1995). "EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB." *J Bacteriol* 177(9): 2328-2334.
- Lucas, C. E., J. T. Balthazar, et al. (1997). "The MtrR repressor binds the DNA sequence between the mtrR and mtrC genes of *Neisseria gonorrhoeae*." *J Bacteriol* 179(13): 4123-4128.
- Lysko, P. G. and S. A. Morse (1981). "*Neisseria gonorrhoeae* cell envelope: permeability to hydrophobic molecules." *J Bacteriol* 145(2): 946-952.
- Ma, D., D. N. Cook, et al. (1995). "Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 16(1): 45-55.
- Maiden, M. C., J. A. Bygraves, et al. (1998). "Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 3140-3145.
- Mandrell, R. E. and W. D. Zollinger (1977). "Lipopolysaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by hemagglutination inhibition." *Infect Immun* 16(2): 471-475.
- Maneewannakul, K. and S. B. Levy (1996). "Identification for *mar* mutants among quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*." *Antimicrob Agents Chemother* 40(7): 1695-1698.
- Maness, M. J. and P. F. Sparling (1973). "Multiple antibiotic resistance due to a single mutation in *Neisseria gonorrhoeae*." *J Infect Dis* 128(3): 321-330.
- Martin, R. G. and J. L. Rosner (1995). "Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12): 5456-5460.
- Matsuzaki, K. (1999). "Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes." *Biochim Biophys Acta* 1462(1-2): 1-10.
- Mayer & Hahn, 2005 (a), S.231 f in H. Hahn, D. F., S.H.E. Kaufmann, U.Ullmann (2005). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Verlag.
- Mayer & Hahn, 2005 (b), S.231f in H. Hahn, D. F., S.H.E. Kaufmann, U.Ullmann (2005). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Verlag.
- Mayer & Hahn, 2005 (c), S.226 ff in H. Hahn, D. F., S.H.E. Kaufmann, U.Ullmann (2005). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Verlag.
- Mayer-Scholl, A., P. Averhoff, et al. (2004). "How do neutrophils and pathogens interact?" *Curr Opin Microbiol* 7(1): 62-66.
- Mazzon, C., B. Baldani-Guerra, et al. (2007). "IFN-gamma and R-848 dependent activation of human monocyte-derived dendritic cells by *Neisseria meningitidis* adhesin A." *J Immunol* 179(6): 3904-3916.

- McFarland, L., T. A. Mietzner, et al. (1983). "Gonococcal sensitivity to fecal lipids can be mediated by an Mtr-independent mechanism." *J Clin Microbiol* 18(1): 121-127.
- McGee, Z. A., D. S. Stephens, et al. (1983). "Mechanisms of mucosal invasion by pathogenic *Neisseria*." *Rev Infect Dis* 5 Suppl 4: S708-714.
- Merker, P., J. Tommassen, et al. (1997). "Two-dimensional structure of the Opc invasin from *Neisseria meningitidis*." *Mol Microbiol* 23(2): 281-293.
- Merz, A. J., D. B. Rifken, et al. (1996). "Traversal of a polarized epithelium by pathogenic *Neisseriae*: facilitation by type IV pili and maintenance of epithelial barrier function." *Mol Med* 2(6): 745-754.
- Miller, R. D., K. E. Brown, et al. (1977). "Inhibitory action of fatty acids on the growth of *Neisseria gonorrhoeae*." *Infect Immun* 17(2): 303-312.
- Moslavac, S., O. Mirus, et al. (2005). "Conserved pore-forming regions in polypeptide-transporting proteins." *FEBS J* 272(6): 1367-1378.
- Murphy, K., Walport, M., (2009a). *Janeways Immunologie*. S. 7ff, Heidelberg, Spektrum Akadem. Verlag.
- Murphy, K., Walport, M., (2009b). *Janeways Immunologie*. S. 66, Heidelberg, Spektrum Akadem. Verlag.
- Nagel, G., A. Lahrz, et al. (2001). "Environmental control of invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family." *Mol Microbiol* 41(6): 1249-1269.
- Nassif, X., J. L. Beretti, et al. (1994). "Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9): 3769-3773.
- Nassif, X., S. Bourdoulous, et al. (2002). "How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier?" *Trends Microbiol* 10(5): 227-232.
- Nassif, X., M. Marceau, et al. (1997). "Type-4 pili and meningococcal adhesiveness." *Gene* 192(1): 149-153.
- Nelson, M. & Cox, D. (2009) (a) S. 1473 f in Nelson, M. & Cox, D., *Lehninger Biochemie*. Berlin, Springer Verlag.
- Nelson, M. & Cox, D. (2009) (b) S. 1476 ff in Nelson, M. & Cox, D., *Lehninger Biochemie*. Berlin, Springer Verlag.
- Nelson, M. & Cox, D. (2009) (c) S. 1478 ff in Nelson, M. & Cox, D., *Lehninger Biochemie*. Berlin, Springer Verlag.
- Nelson, M. & Cox, D. (2009) (d) S. 1482 ff in Nelson, M. & Cox, D., *Lehninger Biochemie*. Berlin, Springer Verlag.
- Nichols, C. E., S. Sainsbury, et al. (2009). "The structure of NMB1585, a MarR-family regulator from *Neisseria meningitidis*." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 65(Pt 3): 204-209.
- Nieman, C. (1954). "Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms." *Bacteriol Rev* 18(2): 147-163.
- Okusu, H., D. Ma, et al. (1996). "AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants." *J Bacteriol* 178(1): 306-308.

- Oriente, F., V. Scarlato, et al. (2010). "Expression of factor H binding protein of meningococcus responds to oxygen limitation through a dedicated FNR-regulated promoter." *J Bacteriol* 192(3): 691-701.
- Ouhammouch, M. and E. P. Geiduschek (2001). "A thermostable platform for transcriptional regulation: the DNA-binding properties of two Lrp homologs from the hyperthermophilic archaeon *Methanococcus jannaschii*." *EMBO J* 20(1-2): 146-156.
- Pace, D. (2009). "MenACWY-CRM, a novel quadrivalent glycoconjugate vaccine against *Neisseria meningitidis* for the prevention of meningococcal infection." *Curr Opin Mol Ther* 11(6): 692-706.
- Parker, J. (2006) (a) S. 231, in Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., Ed., *Brocks Mikrobiologie*, (2006) Spektrum, Akademischer Verlag, Gustav Fischer.
- Parker, J. (2006) (b) S. 235 ff, in Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., Ed., *Brocks Mikrobiologie*, (2006) Spektrum, Akademischer Verlag, Gustav Fischer.
- Parker, J. (2006) (c) S. 236, in Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., Ed., *Brocks Mikrobiologie*, (2006) Spektrum, Akademischer Verlag, Gustav Fischer.
- Parker, J. (2006) (d) S. 236 f, in Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., Ed., *Brocks Mikrobiologie*, (2006) Spektrum, Akademischer Verlag, Gustav Fischer.
- Parker, J. (2006) (e) S. 155f, in Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., Ed., *Brocks Mikrobiologie*, (2006) Spektrum, Akademischer Verlag, Gustav Fischer.
- Parkhill, J., M. Achtman, et al. (2000). "Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491." *Nature* 404(6777): 502-506.
- Peak, I. R., Y. Srikhanta, et al. (2000). "Identification and characterisation of a novel conserved outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*." *FEMS Immunol Med Microbiol* 28(4): 329-334.
- Perez, O., M. Lastre, et al. (2001). "Immune response induction and new effector mechanisms possibly involved in protection conferred by the Cuban anti-meningococcal BC vaccine." *Infect Immun* 69(7): 4502-4508.
- Perez-Rueda, E., J. Collado-Vides, et al. (2004). "Phylogenetic distribution of DNA-binding transcription factors in bacteria and archaea." *Comput Biol Chem* 28(5-6): 341-350.
- Petersen, B. H., T. J. Lee, et al. (1979). "*Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* bacteremia associated with C6, C7, or C8 deficiency." *Ann Intern Med* 90(6): 917-920.
- Plamondon, P., N. R. Luke, et al. (2007). "Identification of a novel two-partner secretion locus in *Moraxella catarrhalis*." *Infect Immun* 75(6): 2929-2936.
- Pollard, A. J. and C. Frasch (2001). "Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*." *Vaccine* 19(11-12): 1327-1346.
- Poole, K., K. Tetro, et al. (1996). "Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression." *Antimicrob Agents Chemother* 40(9): 2021-2028.
- Poolman, J. T. and H. Abdillahi (1988). "Outer membrane protein serosubtyping of *Neisseria meningitidis*." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7(2): 291-292.
- Poolman, J. T. and H. O. Hallander (2007). "Acellular pertussis vaccines and the role of pertactin and fimbriae." *Expert Rev Vaccines* 6(1): 47-56.

- Revell, P. A. and V. L. Miller (2000). "A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* inv gene and for virulence." *Mol Microbiol* 35(3): 677-685.
- Rosenqvist, E., E. A. Hoiby, et al. (1995). "Human antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine." *Infect Immun* 63(12): 4642-4652.
- Rutherford, K., J. Parkhill, et al. (2000). "Artemis: sequence visualization and annotation." *Bioinformatics* 16(10): 944-945.
- Sarkari, J., N. Pandit, et al. (1994). "Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine." *Mol Microbiol* 13(2): 207-217.
- Sarubbi, F. A., Jr., P. F. Sparling, et al. (1975). "Loss of low-level antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* due to env mutations." *J Bacteriol* 124(2): 750-756.
- Sato, Y., K. Izumiya, et al. (1981). "Role of antibody to leukocytosis-promoting factor hemagglutinin and to filamentous hemagglutinin in immunity to pertussis." *Infect Immun* 31(3): 1223-1231.
- Sato, Y., M. Kimura, et al. (1984). "Development of a pertussis component vaccine in Japan." *Lancet* 1(8369): 122-126.
- Scarselli, M., D. Serruto, et al. (2006). "*Neisseria meningitidis* NhhA is a multifunctional trimeric autotransporter adhesin." *Mol Microbiol* 61(3): 631-644.
- Schaechter M., J. L. I., F.C. Neidhardt (2007). *Microbe- Das Original mit Übersetzungshilfen*, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag.
- Schiebel, E., H. Schwarz, et al. (1989). "Subcellular location and unique secretion of the hemolysin of *Serratia marcescens*." *J Biol Chem* 264(27): 16311-16320.
- Schielke, S., C. Huebner, et al. (2009). "Expression of the meningococcal adhesin NadA is controlled by a transcriptional regulator of the MarR family." *Mol Microbiol* 72(4): 1054-1067.
- Schielke, S., M. Frosch, et al. (2010). "Virulence determinants involved in differential host niche adaptation of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*." *Med Microbiol Immunol* 199(3): 185-196.
- Schielke, S., C. Schmitt, et al. (2010). "The transcriptional repressor FarR is not involved in meningococcal fatty acid resistance mediated by the FarAB efflux pump and dependent on LPS structure." *Appl Environ Microbiol*.
- Schielke, S., C. Spatz, et al. (2011). "Characterization of FarR as a highly specialized, growth phase-dependent transcriptional regulator in *Neisseria meningitidis*." *Int J Med Microbiol* 301(4): 325-333.
- Schlesinger, M., R. Greenberg, et al. (1994). "Killing of meningococci by neutrophils: effect of vaccination on patients with complement deficiency." *J Infect Dis* 170(2): 449-453.
- Schmitt, C., D. Turner, et al. (2007). "A functional two-partner secretion system contributes to adhesion of *Neisseria meningitidis* to epithelial cells." *J Bacteriol* 189(22): 7968-7976.
- Scholten, R. J., B. Kuipers, et al. (1994). "Lipo-oligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies." *J Med Microbiol* 41(4): 236-243.
- Schonwetter, B. S., E. D. Stolzenberg, et al. (1995). "Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation." *Science* 267(5204): 1645-1648.

- Shafer, W. M., W. L. Veal, et al. (2001). "Genetic organization and regulation of antimicrobial efflux systems possessed by *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*." *J Mol Microbiol Biotechnol* 3(2): 219-224.
- Shafer, W. M., X. Qu, et al. (1998). "Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(4): 1829-1833.
- Shai, Y. (1999). "Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides." *Biochim Biophys Acta* 1462(1-2): 55-70.
- Sheu, C. W. and E. Freese (1973). "Lipopolysaccharide layer protection of gram-negative bacteria against inhibition by long-chain fatty acids." *J Bacteriol* 115(3): 869-875.
- Singleton, T. E., P. Massari, et al. (2005). "Neisserial porin-induced dendritic cell activation is MyD88 and TLR2 dependent." *J Immunol* 174(6): 3545-3550.
- Spinosa, M. R., C. Progida, et al. (2007). "The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells." *Infect Immun* 75(7): 3594-3603.
- Srikumar, R., T. Kon, et al. (1998). "Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain." *Antimicrob Agents Chemother* 42(1): 65-71.
- Stephens, D. S. (1989). "Gonococcal and meningococcal pathogenesis as defined by human cell, cell culture, and organ culture assays." *Clin Microbiol Rev* 2 Suppl: S104-111.
- Stephens, D. S., B. Greenwood, et al. (2007). "Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*." *Lancet* 369(9580): 2196-2210.
- Stephens, D. S., L. H. Hoffman, et al. (1983). "Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells." *J Infect Dis* 148(3): 369-376.
- St Geme, J. W., 3rd and S. Grass (1998). "Secretion of the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesins involves a periplasmic intermediate and requires the HMWB and HMWC proteins." *Mol Microbiol* 27(3): 617-630.
- Suman, G., M. Khan, et al. (2006). "Mutation in *mexR*-gene leading to drug resistance in corneal keratitis in human." *Indian J Exp Biol* 44(11): 929-936.
- Tettelin, H., N. J. Saunders, et al. (2000). "Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58." *Science* 287(5459): 1809-1815.
- Thompson, E. A., I. M. Feavers, et al. (2003). "Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component." *Microbiology* 149(Pt 7): 1849-1858.
- Thomson, N. R., A. Cox, et al. (1997). "The rap and hor proteins of *Erwinia*, *Serratia* and *Yersinia*: a novel subgroup in a growing superfamily of proteins regulating diverse physiological processes in bacterial pathogens." *Mol Microbiol* 26(3): 531-544.
- Tumani, H., Marre R., Korn K., S. 226 in R. Marre, T. M., M. Trautmann, W. Zimmerli, Ed. (2008). *Klinische Infektiologie*, Urban & Fischer.



- Turner, D. P., A. G. Marietou, et al. (2006). "Characterization of MspA, an immunogenic autotransporter protein that mediates adhesion to epithelial and endothelial cells in *Neisseria meningitidis*." *Infect Immun* 74(5): 2957-2964.
- Tzeng, Y. L., K. D. Ambrose, et al. (2005). "Cationic antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*." *J Bacteriol* 187(15): 5387-5396.
- Tzeng, Y. L. and D. S. Stephens (2000). "Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*." *Microbes Infect* 2(6): 687-700.
- Uetz, P. and E. Pohl (2004). *Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen. Molekulare Biotechnologie*. W. e. al, Wiley-VCH.
- Unkmeir, A., K. Latsch, et al. (2002). "Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells." *Mol Microbiol* 46(4): 933-946.
- Uphoff, T. S. and R. A. Welch (1990). "Nucleotide sequencing of the *Proteus mirabilis* calcium-independent hemolysin genes (hpmA and hpmB) reveals sequence similarity with the *Serratia marcescens* hemolysin genes (shlA and shlB)." *J Bacteriol* 172(3): 1206-1216.
- Urwin, R., J. E. Russell, et al. (2004). "Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococci: implications for vaccine design." *Infect Immun* 72(10): 5955-5962.
- van Deuren, M., P. Brandtzaeg, et al. (2000). "Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management." *Clin Microbiol Rev* 13(1): 144-166, table of contents.
- van Deuren, M. and P. Brandtzaeg (2000). "Parents' and GPs' key role in diagnosis of meningococcal septicaemia." *Lancet* 356(9234): 954-955.
- van Ulsen, P., L. Rutten, et al. (2008). "Two-partner secretion systems of *Neisseria meningitidis* associated with invasive clonal complexes." *Infect Immun* 76(10): 4649-4658.
- van Ulsen, P. and J. Tommassen (2006). "Protein secretion and secreted proteins in pathogenic *Neisseriaceae*." *FEMS Microbiol Rev* 30(2): 292-319.
- Veal, W. L., R. A. Nicholas, et al. (2002). "Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE efflux pump due to an mtrR mutation is required for chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*." *J Bacteriol* 184(20): 5619-5624.
- Vermont, C. L. and G. P. van den Dobbelen (2003). "Meningococcal serogroup B infections: a search for a broadly protective vaccine." *Expert Rev Vaccines* 2(5): 673-681.
- Vermont, C. L., H. H. van Dijken, et al. (2002). "Antibody avidity and immunoglobulin G isotype distribution following immunization with a monovalent meningococcal B outer membrane vesicle vaccine." *Infect Immun* 70(2): 584-590.
- Virji, M., K. Makepeace, et al. (1992). "Expression of the Opc protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*." *Mol Microbiol* 6(19): 2785-2795.
- Virji, M., K. Makepeace, et al. (1993). "Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells." *Mol Microbiol* 10(3): 499-510.
- Virji, M., K. Makepeace, et al. (1994). "Distinct mechanisms of interactions of Opc-expressing meningococci at apical and basolateral surfaces of human endothelial cells; the role of integrins in apical interactions." *Mol Microbiol* 14(1): 173-184.

- Virji, M., K. Makepeace, et al. (1995). "Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides." *Mol Microbiol* 18(4): 741-754.
- Virji, M., D. Evans, et al. (1999). "Critical determinants of host receptor targeting by *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: identification of Opa adhesin topes on the N-domain of CD66 molecules." *Mol Microbiol* 34(3): 538-551.
- Virji, M. (2009). "Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control." *Nat Rev Microbiol* 7(4): 274-286.
- Vogel, U., G. Morelli, et al. (1998). "Necessity of molecular techniques to distinguish between *Neisseria meningitidis* strains isolated from patients with meningococcal disease and from their healthy contacts." *J Clin Microbiol* 36(9): 2465-2470.
- Vogel, U. and M. Frosch (2002). "The genus *Neisseria*: population structure, genome plasticity, and evolution of pathogenicity." *Curr Top Microbiol Immunol* 264(2): 23-45.
- Ward, C. K., J. R. Mock, et al. (2004). "The LspB protein is involved in the secretion of the LspA1 and LspA2 proteins by *Haemophilus ducreyi*." *Infect Immun* 72(4): 1874-1884.
- Waterhouse, A. M., J. B. Procter, et al. (2009). "Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench." *Bioinformatics* 25(9): 1189-1191.
- Wedge, E., B. Kuipers, et al. (2003). "Antibody specificities and effect of meningococcal carriage in icelandic teenagers receiving the Norwegian serogroup B outer membrane vesicle vaccine." *Infect Immun* 71(7): 3775-3781.
- Wells, R. D., D. A. Collier, et al. (1988). "The chemistry and biology of unusual DNA structures adopted by oligopurine.oligopyrimidine sequences." *FASEB J* 2(14): 2939-2949.
- Wilke, M. S., M. Heller, et al. (2008). "The crystal structure of MexR from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with its antirepressor ArmR." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39): 14832-14837.
- Wilkinson, S. P. and A. Grove (2006). "Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins." *Curr Issues Mol Biol* 8(1): 51-62.
- Wu, R. Y., R. G. Zhang, et al. (2003). "Crystal structure of *Enterococcus faecalis* SlyA-like transcriptional factor." *J Biol Chem* 278(22): 20240-20244.
- Xia, M., W. L. Whittington, et al. (2000). "Gonorrhoea among men who have sex with men: outbreak caused by a single genotype of erythromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* with a single-base pair deletion in the mtrR promoter region." *J Infect Dis* 181(6): 2080-2082.
- Xiong, A., A. Gottman, et al. (2000). "The EmrR protein represses the *Escherichia coli* emrRAB multidrug resistance operon by directly binding to its promoter region." *Antimicrob Agents Chemother* 44(10): 2905-2907.
- Zarantonelli, L., G. Borthagaray, et al. (1999). "Decreased azithromycin susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* due to mtrR mutations." *Antimicrob Agents Chemother* 43(10): 2468-2472.
- Zasloff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." *Nature* 415(6870): 389-395.
- Zhu, P., G. Morelli, et al. (1999). "The opcA and (psi)opcB regions in *Neisseria*: genes, pseudogenes, deletions, insertion elements and DNA islands." *Mol Microbiol* 33(3): 635-650.

Zollinger, W. D., D. L. Kasper, et al. (1972). "Isolation and characterization of a native cell wall complex from *Neisseria meningitidis*." *Infect Immun* 6(5): 835-851.

Zollinger, W. D. and R. E. Mandrell (1977). "Outer-membrane protein and lipopolysaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by inhibition of a solid-phase radioimmunoassay." *Infect Immun* 18(2): 424-433

Zughaier, S. M., Y. L. Tzeng, et al. (2004). "*Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide structure-dependent activation of the macrophage CD14/Toll-like receptor 4 pathway." *Infect Immun* 72(1): 371-380.

## VI Anhang

1. Vollständige Nukleotid-Sequenz des *hrpB*-Gens in *Neisseria meningitidis*

Das Alignment der jeweils 1743 bp umfassenden *Open Reading Frames* wurde mit ClustalW2 erstellt.

Die *hrpB*-Gene der Referenzstämme Z2491 (NMA0688), MC58 (NMB1780), FAM18 (NMC0443) und  $\alpha$ 14 (NMO0397) dienen als Vergleich.

```

Z2491      ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
DE7080     ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
DE7100     ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
FAM18      ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
2370       ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
MC58       ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
3887       ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTTTGGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
DE10173    ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
DE6790     ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
a16        ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
B54        ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
P43        ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTTTGGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
a219       ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTTTGGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
a14        ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
a42        ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
P19        ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
P41        ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
a7         ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTAGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
P82        ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
A64        ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
DE7510     ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
a710       ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTTTGGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
Y172       ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
P69        ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
P12        ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
3671       ATGAAATTTTTTCCTGCTCCATGTCTGTTGGTTATCCTGGCTGTCATACCCCTTAAAACC 60
*****

Z2491      TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
DE7080     TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
DE7100     TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
FAM18      TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
2370       TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
MC58       TAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
3887       TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
DE10173    TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
DE6790     TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
a16        TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
B54        TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
P43        TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
a219       TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
a14        TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
a42        TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
P19        TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
P41        TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
a7         TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
P82        TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
A64        TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
DE7510     TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
a710       TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
Y172       TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
P69        TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
P12        TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120
3671       TTAGCTGCCGATGAAAACGATGCAGAACTTATCCGTTCCATGCAGCGTCAGCAGCACATA 120

```

\*\*\*\*\*

Z2491 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
DE7080 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
DE7100 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
FAM18 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
2370 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
MC58 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
3887 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
DE10173 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
DE6790 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
a16 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
B54 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
P43 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
a219 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
a14 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
a42 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
P19 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
P41 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
a7 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
P82 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
A64 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
DE7510 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
a710 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
Y172 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
P69 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
P12 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180  
3671 GATGCTGAATTGTTAACTGATGCAAATGTCCGTTTCGAGCAACCATTGGAGAAGAACAAT 180

\*\*\*\*\*

Z2491 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
DE7080 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
DE7100 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
FAM18 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
2370 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
MC58 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
3887 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
DE10173 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
DE6790 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
a16 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
B54 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
P43 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
a219 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
a14 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
a42 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
P19 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
P41 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
a7 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
P82 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
A64 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
DE7510 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
a710 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
Y172 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
P69 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
P12 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240  
3671 TATGTCCTGAGTGAAGATGAAACACCGTGTACTCGGGTAAATTACATTAGTTT TAGATGAT 240

\*\*\*\*\*

Z2491 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
DE7080 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
DE7100 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
FAM18 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
2370 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300

MC58 AAGACGGTGCACAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 3887 AAGACGGTGCACAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 DE10173 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 DE6790 AAGACGGTGCACAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 a16 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 B54 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 P43 AAGACGGTGCACAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 a219 AAGACGGTGCACAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 a14 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 a42 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 P19 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 P41 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 a7 AAGACGGTGCACAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 P82 AAGACGGTGCACAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 A64 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 DE7510 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 a710 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 Y172 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 P69 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 P12 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 3671 AAGACGGCGCGCAAATTTTCTTTTCTTCCTTCTGTGCTCATGAAAGAAACAGCTTTTAAA 300  
 \*\*\*\*\*

Z2491 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 DE7080 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCTGCGCAACAGATA 360  
 DE7100 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCTGCGCAACAGATA 360  
 FAM18 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCTGCGCAACAGATA 360  
 2370 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCTGCGCAACAGATA 360  
 MC58 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 3887 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 DE10173 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 DE6790 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 a16 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 B54 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 P43 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 a219 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 a14 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 a42 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 P19 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 P41 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 a7 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCTGCGCAACAGATA 360  
 P82 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCTGCGCAACAGATA 360  
 A64 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 DE7510 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCTGCGCAACAGATA 360  
 a710 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 Y172 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCTGCGCAACAGATA 360  
 P69 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 P12 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 3671 ACTGGGATGTGTTTAGGTTCCAATAATTTGAGCAGGCTACAAAAAGCCGCGCAACAGATA 360  
 \*\*\*\*\*

Z2491 CTGATTGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG 420  
 DE7080 CTGATCGTGCCTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG 420  
 DE7100 CTGATCGTGCCTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG 420  
 FAM18 CTGATCGTGCCTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG 420  
 2370 CTGATCGTGCCTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG 420  
 MC58 CTGATCGTGCCTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG 420  
 3887 CTGATCGTGCCTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG 420  
 DE10173 CTGATTGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG 420  
 DE6790 CTGATCGTGCCTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG 420  
 a16 CTGATTGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG 420  
 B54 CTGATTGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG 420  
 P43 CTGATCGTGCCTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG 420

a219	CTGATCGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG	420
a14	CTGATTGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG	420
a42	CTGATTGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG	420
P19	CTGATTGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG	420
P41	CTGATTGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG	420
a7	CTGATCGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG	420
P82	CTGATCGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG	420
A64	CTGATCGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG	420
DE7510	CTGATCGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG	420
a710	CTGATTGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG	420
Y172	CTGATCGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG	420
P69	CTGATTGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG	420
P12	CTGATTGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG	420
3671	CTGATTGTGCGTGGCTACCTCACTTCCCAAGCTATTATCCAACCACAGAATATGGATTTCG	420
	*****	
Z2491	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
DE7080	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
DE7100	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
FAM18	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
2370	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
MC58	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
3887	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
DE10173	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
DE6790	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
a16	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
B54	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
P43	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
a219	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
a14	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
a42	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
P19	GAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
P41	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
a7	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
P82	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
A64	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
DE7510	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
a710	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
Y172	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
P69	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
P12	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
3671	GGAATTCTGAAATTACGGGTATCAGCAGGCGAAATAGGGGATATCCGCTATGAAGAAAAA	480
	*****	
Z2491	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
DE7080	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
DE7100	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
FAM18	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
2370	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
MC58	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
3887	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
DE10173	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
DE6790	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
a16	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
B54	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
P43	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
a219	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
a14	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
a42	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
P19	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
P41	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
a7	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540
P82	CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT	540

A64 CGGGATGGGAAGTCTGCCGAAGGCAGTATTAGTACATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT 540  
 DE7510 CGGGATGGGAAGTCTGCCGAAGGCAGTATTAGTACATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT 540  
 a710 CGGGATGGGAAGTCTGCCGAAGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT 540  
 Y172 CGGGATGGGAAGTCTGCCGAAGGCAGTATTAGTACATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT 540  
 P69 CGGGATGGGAAGTCTGCCGAAGGCAGTATTAGTACATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT 540  
 P12 CGGGATGGGAAGTCTGCCGAGGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT 540  
 3671 CGGGATGGGAAGTCTGCCGAAGGCAGTATTAGTGCATTCAATAACAAATTTCCCTTATAT 540  
 \*\*\*\*\*

Z2491 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 DE7080 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 DE7100 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 FAM18 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 2370 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 MC58 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 3887 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 DE10173 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 DE6790 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 a16 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 B54 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 P43 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 a219 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 a14 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 a42 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 P19 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 P41 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 a7 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 P82 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 A64 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 DE7510 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 a710 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 Y172 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 P69 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 P12 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 3671 AGGAACAAAATTCTCAATCTTCGCGATGTAGAGCAGGGCTTGAAAAACCTGCGTCGTTTG 600  
 \*\*\*\*\*

Z2491 CCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 DE7080 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 DE7100 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 FAM18 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 2370 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 MC58 CCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 3887 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 DE10173 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 DE6790 CCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 a16 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 B54 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 P43 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 a219 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 a14 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 a42 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 P19 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 P41 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 a7 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 P82 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 A64 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 DE7510 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 a710 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 Y172 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 P69 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 P12 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660  
 3671 TCGAGTGTTAAAACAGATATTCAGATTATACCGTCCGAAGAAGAAGGCAAAAAGCGATTTA 660



\*\*\*\*\*

Z2491 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
DE7080 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
DE7100 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
FAM18 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
2370 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
MC58 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
3887 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
DE10173 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
DE6790 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
a16 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
B54 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
P43 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
a219 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
a14 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
a42 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
P19 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
P41 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
a7 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
P82 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
A64 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
DE7510 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
a710 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
Y172 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
P69 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
P12 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720  
3671 CAGATCAAATGGCAGCAGAATAAACCCATACGGTTCAGTATCGGTATAGATGATGCGGGC 720

\*\*\*\*\*

Z2491 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
DE7080 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
DE7100 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
FAM18 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
2370 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
MC58 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
3887 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
DE10173 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
DE6790 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
a16 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
B54 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
P43 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
a219 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
a14 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
a42 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
P19 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
P41 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
a7 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
P82 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
A64 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
DE7510 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
a710 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
Y172 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
P69 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
P12 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780  
3671 GGCAAACGACCGGCAAATATCAAGGAAATGTCGCTTTATCGTTCGATAAACCCCTTTGGGC 780

\*\*\*\*\*

Z2491 TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTTATATGGACGCGGTTTGGTGCACAAAACGGACTTGACT 840  
DE7080 TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTTATATGGACGCGGTTTGGTGCACAAAACGGACTTGACT 840  
DE7100 TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTTATATGGACGCGGTTTGGTGCACAAAACGGACTTGACT 840  
FAM18 TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTTATATGGACGCGGTTTGGTGCACAAAACGGACTTGACT 840  
2370 TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTTATATGGACGCGGTTTGGTGCACAAAACGGACTTGACT 840

MC58	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGCGCACAAAACGGACTTGACT	840
3887	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGCGCACAAAACGGACTTGACT	840
DE10173	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGCGCACAAAACGGACTTGACT	840
DE6790	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGCGCACAAAACGGACTTGACT	840
a16	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGCGCACAAAACGGACTTGACT	840
B54	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGCGCACAAAACGGACTTGACT	840
P43	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGCGCACAAAACGGACTTGACT	840
a219	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGCGCACAAAACGGACTTGACT	840
a14	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGTGCACAAAACGGACTTGACT	840
a42	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGTGCACAAAACGGACTTGACT	840
P19	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGTGCACAAAACGGACTTGACT	840
P41	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGTGCACAAAACGGACTTGACT	840
a7	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGTGCACAAAACGGACTTGACT	840
P82	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGTGCACAAAACGGACTTGACT	840
A64	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGTGCACAAAACGGACTTGACT	840
DE7510	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGTGCACAAAACGGACTTGACT	840
a710	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGCGCACAAAACGGACTTGACT	840
Y172	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGCGCACAAAACGGACTTGACT	840
P69	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGCGCACAAAACGGACTTGACT	840
P12	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGCGCACAAAACGGACTTGACT	840
3671	TTAAGCGATTTGTTTTATGTTTCATATGGACGCGGTTTGGCGCACAAAACGGACTTGACT	840
	*****	
Z2491	GATGCCACCGGTACGGAAACTGAAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
DE7080	GATGCCACCGGTACGGAAACTGAAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
DE7100	GATGCCACCGGTACGGAAACTGCAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
FAM18	GATGCCACCGGTACGGAAACTGCAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
2370	GATGCCACCGGTACGGAAACTGCAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
MC58	GATGCCACCGGTACGGAAACTGAAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
3887	GATGCCACCGGTACGGAAACTGCAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
DE10173	GATGCCACCGGTACGGAAACTGCAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
DE6790	GATGCCACCGGTACGGAAACTGAAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
a16	GATGCCACCGGTACGGAAACTGCAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
B54	GATGCCACCGGTACGGAAACTGCAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
P43	GATGCCACCGGTACGGAAACTGCAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
a219	GATGCCACCGGTACGGAAACTGCAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
a14	GATGCCACCGGTACGGAAACTGAAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
a42	GATGCCACCGGTACGGAAACTGAAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
P19	GATGCCACCGGTACGGAAACTGAAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
P41	GATGCCACCGGTACGGAAACTGAAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
a7	GATGCCACCGGTACGGAAACTGAAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
P82	GATGCCACCGGTACGGAAACTGAAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
A64	GATGCCACCGGTACGGAAACTGAAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
DE7510	GATGCCACCGGTACGGAAACTGAAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
a710	GATGCCACCGGTACGGAAACTGCAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
Y172	GATGCCACCGGTACGGAAACTGCAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
P69	GATGCCACCGGTACGGAAACTGCAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
P12	GATGCCACCGGTACGGAAACTGCAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
3671	GATGCCACCGGTACGGAAACTGAAAGCGGATCCAGAAGTTACAGCGTGCATTATTCGGTG	900
	*****	
Z2491	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTTAAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
DE7080	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTTAAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
DE7100	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTTAAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
FAM18	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTTAAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
2370	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTTAAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
MC58	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTTAAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
3887	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTTAAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
DE10173	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTTAAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
DE6790	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTTAAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
a16	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTTAAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
B54	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTTAAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
P43	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTTAAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960

a219	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
a14	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
a42	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
P19	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
P41	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
a7	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
P82	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
A64	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
DE7510	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
a710	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
Y172	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
P69	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
P12	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
3671	CCCGTAAAAAATGGCTGTTTTCTTTAATCACAATGGACATCGTTACCACGAAGCAACC	960
	*****	
Z2491	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
DE7080	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
DE7100	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
FAM18	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
2370	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
MC58	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
3887	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
DE10173	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
DE6790	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
a16	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
B54	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
P43	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
a219	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
a14	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
a42	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
P19	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
P41	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
a7	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
P82	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
A64	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
DE7510	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
a710	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
Y172	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
P69	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
P12	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
3671	GAAGGCTATTCCGTCAATTACGATTACAACGGCAAACAATATCAGAGCAGCCTGGCCGCC	1020
	*****	
Z2491	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
DE7080	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
DE7100	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
FAM18	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
2370	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
MC58	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
3887	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
DE10173	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
DE6790	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
a16	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
B54	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
P43	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
a219	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
a14	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
a42	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
P19	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
P41	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
a7	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
P82	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAACTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080

A64	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAAACCTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
DE7510	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGGTTTCATAAAAACCTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
a710	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAAACCTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
Y172	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAAACCTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
P69	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGACTTCATAAAAACCTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
P12	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGGTTTCATAAAAACCTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
3671	GAGCGCATGCTTTGGCGTAACAGGTTTCATAAAAACCTTCAGTCGGAATGAAATTATGGACA	1080
*****		
Z2491	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
DE7080	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
DE7100	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
FAM18	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
2370	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
MC58	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTACAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
3887	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
DE10173	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
DE6790	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTACAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
a16	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
B54	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
P43	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
a219	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
a14	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
a42	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
P19	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
P41	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
a7	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
P82	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
A64	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
DE7510	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
a710	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
Y172	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
P69	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
P12	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
3671	CGCCAAACCTATAAATACATCGACGATGCCGAAATCGAAGTGCAACGCCGCCGCTCTGCA	1140
*****		
Z2491	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
DE7080	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
DE7100	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
FAM18	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
2370	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
MC58	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
3887	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
DE10173	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
DE6790	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
a16	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
B54	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
P43	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
a219	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
a14	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
a42	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
P19	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
P41	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
a7	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
P82	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
A64	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
DE7510	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
a710	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
Y172	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
P69	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
P12	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200
3671	GGCTGGGAAGCCGAATTGCGCCACCGTGCTTACCTCAACCGTTGGCAGCTTGACGGCAAG	1200

\*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

Z2491 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 DE7080 TTATCTTACAAACGCGGGTACCGGTATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 DE7100 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCCAAAGTATGCCTGCACCGGAAGAAAACGGC 1260  
 FAM18 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCCAAAGTATGCCTGCACCGGAAGAAAACGGC 1260  
 2370 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCCAAAGTATGCCTGCACCGGAAGAAAACGGC 1260  
 MC58 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCCAAAGTATGCCTGCACCGGAAGAAAACGGC 1260  
 3887 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGTATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 DE10173 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGTATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 DE6790 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCCAAAGTATGCCTGCACCGGAAGAAAACGGC 1260  
 a16 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGTATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 B54 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGTATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 P43 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGTATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 a219 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGTATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 a14 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 a42 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 P19 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 P41 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 a7 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCCAAAGTATGCCTGCACCGGAAGAAAACGGC 1260  
 P82 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCCAAAGTATGCCTGCACCGGAAGAAAACGGC 1260  
 A64 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCCAAAGTATGCCTGCACCGGAAGAAAACGGC 1260  
 DE7510 TTATCTTACAAACGCGGGTACCGGTATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 a710 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGTATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 Y172 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCCAAAGTATGCCTGCACCGGAAGAAAACGGC 1260  
 P69 TTGTCTTACAAACGCGGGACCGGCATGCGCCAAAGTATGCCTGCACCGGAAGAAAACGGC 1260  
 P12 TTATCTTACAAACGCGGGTACCGGTATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 3671 TTATCTTACAAACGCGGGTACCGGTATGCGCCAAAGTATGCCCGCACCTGAAGAAAACGGC 1260  
 \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

Z2491 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 DE7080 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 DE7100 GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATTACTGCCGGTTTGGACGCAGCC 1320  
 FAM18 GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATTACTGCCGGTTTGGACGCAGCC 1320  
 2370 GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATTACTGCCGGTTTGGACGCAGCC 1320  
 MC58 GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATTACTGCCGGTTTGGACGCAGCC 1320  
 3887 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 DE10173 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 DE6790 GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATTACTGCCGGTTTGGACGCAGCC 1320  
 a16 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 B54 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 P43 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 a219 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 a14 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 a42 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 P19 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 P41 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 a7 GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATTACTGCCGGTTTGGACGCAGCC 1320  
 P82 GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATTACTGCCGGTTTGGACGCAGCC 1320  
 A64 GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATTACTGCCGGTTTGGACGCAGCC 1320  
 DE7510 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 a710 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 Y172 GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATTACTGCCGGTTTGGACGCAGCC 1320  
 P69 GGCGATATTCTTCCAGGTACATCTCGTATGAAAATCATTACTGCCGGTTTGGACGCAGCC 1320  
 P12 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 3671 GGCGGTACTATTCCAGGCACATCCCGTATGAAAATCATAACCGCCGGATTGGATGCAGCG 1320  
 \*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

Z2491 GCCCGTTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 DE7080 GCCCGTTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGAAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 DE7100 GCCCCATTTATTTTAGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 FAM18 GCCCCATTTATTTTAGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 2370 GCCCCATTTATTTTAGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380

MC58 GCCCCATTTATTTTAGGCCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 3887 GCCCCGTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 DE10173 GCCCCGTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 DE6790 GCCCCATTTATTTTAGGCCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 a16 GCCCCGTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 B54 GCCCCGTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 P43 GCCCCGTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 a219 GCCCCGTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 a14 GCCCCGTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGAAACCGCTATCCATGCACAATGG 1380  
 a42 GCCCCGTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGAAACCGCTATCCATGCACAATGG 1380  
 P19 GCCCCGTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGAAACCGCTATCCATGCACAATGG 1380  
 P41 GCCCCGTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGAAACCGCTATCCATGCACAATGG 1380  
 a7 GCCCCATTTATTTTAGGCCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 P82 GCCCCATTTATTTTAGGCCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 A64 GCCCCATTTATTTTAGGCCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 DE7510 GCCCCGTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGAAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 a710 GCCCCGTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 Y172 GCCCCATTTATTTTAGGCCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 P69 GCCCCATTTATTTTAGGCCAAACAGCAGTTTTTCTACGCAACCGCCATTCAAGCTCAATGG 1380  
 P12 GCCCCGTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGAAACCGCTATCCATGCACAATGG 1380  
 3671 GCCCCGTTTATGTTGGGCAAACAGCAGTTTTTCTACGAAACCGCTATCCATGCACAATGG 1380

\*\*\*\*\* \*\*

Z2491 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGACAAGTTGTCTATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 DE7080 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGACAAGTTGTCTATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 DE7100 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCAATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 FAM18 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCAATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 2370 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCAATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 MC58 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCAATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 3887 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCTATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 DE10173 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCAATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 DE6790 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCAATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 a16 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCAATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 B54 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCAATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 P43 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGACAAGTTGTCTATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 a219 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGACAAGTTGTCTATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 a14 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGACAAGTTGTCTATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGA 1440  
 a42 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGACAAGTTGTCTATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGA 1440  
 P19 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGACAAGTTGTCTATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGA 1440  
 P41 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGACAAGTTGTCTATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGA 1440  
 a7 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCAATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 P82 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCAATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 A64 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCAATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 DE7510 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGACAAGTTGTCTATCGGCAGCCGTTACACCGTTTCGC 1440  
 a710 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCAATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 Y172 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCAATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 P69 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCAATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440  
 P12 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGACAAGTTGTCTATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGA 1440  
 3671 AACAAAACGCCTTTGGTTGCCCAAGATAAAATTGTCAATCGGCAGCCGCTACACCGTTTCGC 1440

\*\*\*\*\* \*\*

Z2491 GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA 1500  
 DE7080 GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA 1500  
 DE7100 GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA 1500  
 FAM18 GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA 1500  
 2370 GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA 1500  
 MC58 GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA 1500  
 3887 GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA 1500  
 DE10173 GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA 1500  
 DE6790 GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA 1500  
 a16 GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA 1500  
 B54 GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA 1500  
 P43 GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA 1500

a219	GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA	1500
a14	GGATTTGACGGTGAACAGAGCCTTTCCGGAGAGCGTGGTTTCTACTGGCAGAACACTTTG	1500
a42	GGATTTGACGGTGAACAGAGCCTTTCCGGAGAGCGTGGTTTCTACTGGCAGAACACTTTG	1500
P19	GGATTTGACGGTGAACAGAGCCTTTCCGGAGAGCGTGGTTTCTACTGGCAGAACACTTTG	1500
P41	GGATTTGACGGTGAACAGAGCCTTTCCGGAGAGCGTGGTTTCTACTGGCAGAACACTTTG	1500
a7	GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA	1500
P82	GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA	1500
A64	GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA	1500
DE7510	GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA	1500
a710	GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA	1500
Y172	GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA	1500
P69	GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA	1500
P12	GGATTTGACGGTGAACAGAGCCTTTCCGGAGAGCGTGGTTTCTACTGGCAGAACACTTTG	1500
3671	GGATTTGATGGGGAGCAGAGTCTTTTCGGAGAGCGAGGTTTCTACTGGCAGAATACTTTA	1500
	***** ** ** ***** ***** ***** ***** ***** *****	
Z2491	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
DE7080	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
DE7100	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
FAM18	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
2370	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
MC58	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
3887	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
DE10173	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
DE6790	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
a16	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
B54	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
P43	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
a219	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
a14	GGCTGGCATTTCATCCGCGCCATCAATTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
a42	GGCTGGCATTTCATCCGCGCCATCAATTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
P19	GGCTGGCATTTCATCCGCGCCATCAATTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
P41	GGCTGGCATTTCATCCGCGCCATCAATTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
a7	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
P82	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
A64	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
DE7510	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
a710	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
Y172	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
P69	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
P12	GGCTGGCATTTCATCCGCGCCATCAATTCTATCTCGGCGCGGACTATGGTCGGGTATCG	1560
3671	ACTTGGTATTTTTATCCGAACCATCAGTTCTATCTCGGTGCGGACTATGGCCGCGTATCT	1560
	*** ** * ***** ***** ***** ***** ***** ** *****	
Z2491	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
DE7080	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
DE7100	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCACGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
FAM18	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCACGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
2370	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCACGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
MC58	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
3887	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
DE10173	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
DE6790	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
a16	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
B54	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
P43	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
a219	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
a14	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
a42	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
P19	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
P41	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
a7	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620
P82	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTTCGGCTTCAGA	1620

A64	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTCGGCTTCAGA	1620
DE7510	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTCGGCTTCAGA	1620
a710	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTCGGCTTCAGA	1620
Y172	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCACGAGCTGATGGGTGCAGTGGTCGGCTTCAGA	1620
P69	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTCGGCTTCAGA	1620
P12	GGCGAAAGTGCCCAATATGCCTCGGGCAAGCGGCTGGCGGGTGCAGTGGCCAGCTTCAGA	1620
3671	GGCGAAAGTGCACAATATGTATCGGGCAAGCAGCTGATGGGTGCAGTGGTCGGCTTCAGA	1620
	*****	
Z2491	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
DE7080	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
DE7100	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
FAM18	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
2370	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
MC58	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
3887	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
DE10173	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
DE6790	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
a16	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
B54	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
P43	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
a219	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
a14	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
a42	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
P19	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
P41	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
a7	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
P82	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
A64	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
DE7510	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
a710	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
Y172	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
P69	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTTCAT	1680
P12	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGACTTATTTGCCGGCAAGCCGCTGCAC	1680
3671	GGAGGGCATAAAGTAGGCGGTATGTTTGCTTATGATCTGTTTGCCGGCAAGCCGCTGCAC	1680
	** * *****	
Z2491	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
DE7080	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
DE7100	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
FAM18	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
2370	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
MC58	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
3887	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
DE10173	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
DE6790	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
a16	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
B54	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
P43	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
a219	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
a14	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
a42	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
P19	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
P41	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
a7	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
P82	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
A64	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
DE7510	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
a710	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740
Y172	AAACCCAAAGGCTTTCAGACGACCAACACCGTTTACGGCTTCAACTTGAATTACAGTTTC	1740





P19	MKFFPAPCLLVILAVIPLKTLAADENDAELIRSMQRQQHIDAELLTDANVRFEQPLEKNN	60
P41	MKFFPAPCLLVILAVIPLKTLAADENDAELIRSMQRQQHIDAELLTDANVRFEQPLEKNN	60
a7	MKFFPAPCLLVILAVIPLKTLAADENDAELIRSMQRQQHIDAELLTDANVRFEQPLEKNN	60
P82	MKFFPAPCLLVILAVIPLKTLAADENDAELIRSMQRQQHIDAELLTDANVRFEQPLEKNN	60
A64	MKFFPAPCLLVILAVIPLKTLAADENDAELIRSMQRQQHIDAELLTDANVRFEQPLEKNN	60
DE7510	MKFFPAPCLLVILAVIPLKTLAADENDAELIRSMQRQQHIDAELLTDANVRFEQPLEKNN	60
a710	MKFFPAPCLLVILAVIPLKTLAADENDAELIRSMQRQQHIDAELLTDANVRFEQPLEKNN	60
Y172	MKFFPAPCLLVILAVIPLKTLAADENDAELIRSMQRQQHIDAELLTDANVRFEQPLEKNN	60
P69	MKFFPAPCLLVILAVIPLKTLAADENDAELIRSMQRQQHIDAELLTDANVRFEQPLEKNN	60
P12	MKFFPAPCLLVILAVIPLKTLAADENDAELIRSMQRQQHIDAELLTDANVRFEQPLEKNN	60
3671	MKFFPAPCLLVILAVIPLKTLAADENDAELIRSMQRQQHIDAELLTDANVRFEQPLEKNN	60
	*****	
Z2491	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
DE7080	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
DE7100	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
FAM18	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
2370	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
MC58	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
3887	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
DE10173	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
DE6790	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
a16	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
B54	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
P43	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
a219	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
a14	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
a42	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
P19	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
P41	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
a7	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
P82	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
A64	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
DE7510	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
a710	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
Y172	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
P69	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
P12	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
3671	YVLSEDETPCTRVNYISLDDKTARKFSFLPSVLMKETAFKTMCLGSNNLSRLQKAAQQI	120
	*****	
Z2491	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
DE7080	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
DE7100	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
FAM18	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
2370	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
MC58	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
3887	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
DE10173	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
DE6790	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
a16	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
B54	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
P43	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
a219	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
a14	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
a42	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
P19	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
P41	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
a7	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
P82	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
A64	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
DE7510	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
a710	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180

Y172	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISTFNNKFPLY	180
P69	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISTFNNKFPLY	180
P12	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
3671	LIVRGYLTSQAI IQPQNMDSGILKLRVSAGEIGDIRYEEKRDGKSAEGSISAFNNKFPLY	180
	*****.*****	
Z2491	RNKILNLRDVEQGLENLRLSPVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
DE7080	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
DE7100	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
FAM18	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
2370	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
MC58	RNKILNLRDVEQGLENLRLSPVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
3887	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
DE10173	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
DE6790	RNKILNLRDVEQGLENLRLSPVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
a16	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
B54	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
P43	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
a219	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
a14	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
a42	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
P19	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
P41	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
a7	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
P82	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
A64	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
DE7510	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
a710	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
Y172	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
P69	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
P12	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
3671	RNKILNLRDVEQGLENLRLSSVKTDIQIIPSEEEGKSDLQIKWQONKPIRFSIGIDDAG	240
	*****.*****	
Z2491	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLVHKTDLTDATGTETESGSRYSVHYSV	300
DE7080	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLVHKTDLTDATGTETESGSRYSVHYSV	300
DE7100	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETASGSRYSVHYSV	300
FAM18	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETASGSRYSVHYSV	300
2370	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETASGSRYSVHYSV	300
MC58	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETESGSRYSVHYSV	300
3887	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETASGSRYSVHYSV	300
DE10173	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETASGSRYSVHYSV	300
DE6790	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETESGSRYSVHYSV	300
a16	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETASGSRYSVHYSV	300
B54	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETASGSRYSVHYSV	300
P43	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETASGSRYSVHYSV	300
a219	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETASGSRYSVHYSV	300
a14	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLVHKTDLTDATGTETESGSRYSVHYSV	300
a42	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLVHKTDLTDATGTETESGSRYSVHYSV	300
P19	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLVHKTDLTDATGTETESGSRYSVHYSV	300
P41	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLVHKTDLTDATGTETESGSRYSVHYSV	300
a7	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLVHKTDLTDATGTETESGSRYSVHYSV	300
P82	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLVHKTDLTDATGTETESGSRYSVHYSV	300
A64	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLVHKTDLTDATGTETESGSRYSVHYSV	300
DE7510	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLVHKTDLTDATGTETESGSRYSVHYSV	300
a710	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETASGSRYSVHYSV	300
Y172	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETASGSRYSVHYSV	300
P69	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETASGSRYSVHYSV	300
P12	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETASGSRYSVHYSV	300
3671	GKTTGKYQGNVALSFDNPLGLSDLFYVSYGRGLAHKTDLTDATGTETESGSRYSVHYSV	300
	*****.*****	
Z2491	PVKKWLFNFHNHGRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSLAERMLWRNRFHKTSVGMKLWT	360

DE7080	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRFHKT	SVGMKLWT	360
DE7100	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
FAM18	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
2370	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
MC58	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
3887	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
DE10173	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
DE6790	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
a16	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
B54	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
P43	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
a219	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
a14	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
a42	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
P19	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
P41	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
a7	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
P82	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
A64	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
DE7510	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRFHKT	SVGMKLWT	360
a710	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
Y172	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
P69	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRLHKT	SVGMKLWT	360
P12	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRFHKT	SVGMKLWT	360
3671	PVKKWLF	SVNHNHGHRYHEATEGYSVNYDYNGKQYQSSSLAAERMLWRNRFHKT	SVGMKLWT	360
*****:*****				

Z2491	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
DE7080	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
DE7100	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
FAM18	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
2370	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
MC58	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
3887	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
DE10173	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
DE6790	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
a16	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
B54	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
P43	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
a219	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
a14	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
a42	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
P19	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
P41	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
a7	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
P82	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
A64	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
DE7510	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
a710	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
Y172	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
P69	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
P12	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
3671	RQTYKYIDDAE	IEVQRRRSAGWEAELRHAYLNRWQLDGKLSYKRGTGMRQ	SMPAPEENG	420
*****				

Z2491	GGTIPGTSRMKI	IITAGLDAAAPFMLGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLS	IGSRYTVR	480
DE7080	GGTIPGTSRMKI	IITAGLDAAAPFMLGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLS	IGSRYTVR	480
DE7100	GDILPGTSRMKI	IITAGLDAAAPFILGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLS	IGSRYTVR	480
FAM18	GDILPGTSRMKI	IITAGLDAAAPFILGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLS	IGSRYTVR	480
2370	GDILPGTSRMKI	IITAGLDAAAPFILGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLS	IGSRYTVR	480
MC58	GDILPGTSRMKI	IITASLDAAAPFILGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLS	IGSRYTVR	480
3887	GGTIPGTSRMKI	IITAGLDAAAPFMLGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLS	IGSRYTVR	480
DE10173	GGTIPGTSRMKI	IITAGLDAAAPFMLGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLS	IGSRYTVR	480

DE6790 GDILPGTSRMKIIITAGLDAAAPFILGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
a16 GGTIPGTSRMKIIITAGLDAAAPFMLGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
B54 GGTIPGTSRMKIIITAGLDAAAPFMLGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
P43 GGTIPGTSRMKIIITAGLDAAAPFMLGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
a219 GGTIPGTSRMKIIITAGLDAAAPFMLGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
a14 GGTIPGTSRMKIIITAGLDAAAPFMLGKQQFFSYETAIHAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
a42 GGTIPGTSRMKIIITAGLDAAAPFMLGKQQFFSYETAIHAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
P19 GGTIPGTSRMKIIITAGLDAAAPFMLGKQQFFSYETAIHAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
P41 GGTIPGTSRMKIIITAGLDAAAPFMLGKQQFFSYETAIHAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
a7 GDILPGTSRMKIIITAGLDAAAPFILGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
P82 GDILPGTSRMKIIITAGLDAAAPFILGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
A64 GDILPGTSRMKIIITAGLDAAAPFILGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
DE7510 GGTIPGTSRMKIIITAGLDAAAPFMLGKQQFFSYETAIQAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
a710 GGTIPGTSRMKIIITAGLDAAAPFMLGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
Y172 GDILPGTSRMKIIITAGLDAAAPFILGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
P69 GDILPGTSRMKIIITAGLDAAAPFILGKQQFFYATAIQAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
P12 GGTIPGTSRMKIIITAGLDAAAPFMLGKQQFFSYETAIHAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
3671 GGTIPGTSRMKIIITAGLDAAAPFMLGKQQFFSYETAIHAQWNKTPLVAQDKLSIGSRYTVR 480  
\* . :\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \* \*\*\*:\*\*\*\*\*

Z2491 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
DE7080 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
DE7100 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGTQLMGAVVGFR 540  
FAM18 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGTQLMGAVVGFR 540  
2370 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGTQLMGAVVGFR 540  
MC58 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
3887 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
DE10173 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
DE6790 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
a16 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
B54 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
P43 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
a219 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
a14 GFDGEQSLSGERGFYWQNTLGWHFHPRHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
a42 GFDGEQSLSGERGFYWQNTLGWHFHPRHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
P19 GFDGEQSLSGERGFYWQNTLGWHFHPRHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
P41 GFDGEQSLSGERGFYWQNTLGWHFHPRHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
a7 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
P82 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
A64 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
DE7510 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
a710 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
Y172 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGTQLMGAVVGFR 540  
P69 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
P12 GFDGEQSLSGERGFYWQNTLGWHFHPRHQFYLGDYGRVSGESAQYASGKRLAGAVASFR 540  
3671 GFDGEQSLFGERGFYWQNTLTWYFHPNHQFYLGDYGRVSGESAQYVSGKQLMGAVVGFR 540  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*:\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*:\*\*\*.\*\*\*

Z2491 GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF 580  
DE7080 GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF 580  
DE7100 GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF 580  
FAM18 GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF 580  
2370 GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF 580  
MC58 GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF 580  
3887 GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF 580  
DE10173 GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF 580  
DE6790 GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF 580  
a16 GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF 580  
B54 GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF 580  
P43 GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF 580  
a219 GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF 580  
a14 GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF 580

---

a42	GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF	580
P19	GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF	580
P41	GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF	580
a7	GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF	580
P82	GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF	580
A64	GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF	580
DE7510	GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF	580
a710	GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF	580
Y172	GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF	580
P69	GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPKGFQTTNTVYGFNLNYSF	580
P12	GSHKVGGIFAYDLFAGKPLHKPEGFQTANTVYGFNLNYSF	580
3671	GGHKVGGMFAYDLFAGKPLHKPEGFQTANTVYGFNLNYSF	580

\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die Dissertation eigenständig angefertigt habe und übernommene Inhalte eindeutig gekennzeichnet habe.

Zudem versichere ich, dass ich die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben nicht kommerziell vermittelt bekommen habe und nicht eine Person oder Organisation eingeschaltet habe, die gegen Entgelt Betreuer/-innen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Ich erkläre weiterhin, dass ich die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten habe.

Die Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise an einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erwerben, vorgelegt. Ich habe bisher weder einen akademischen Grad erworben, noch habe ich zuvor einen Versuch unternommen.

Ich erkläre hiermit, dass gegen mich kein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder Disziplinarverfahren eingeleitet wurde.