

4. Diskussion

4.1 Genetische Organisation der Region um *tpbAB-opaA* in Z2491

Der Bereich zwischen den Genen *potF* und *opaA* zeigt eine Anordnung von diversen "house-keeping"-Genen (das sind Gene, die für die Aufrechterhaltung der basalen Lebensvorgänge einer Zelle nötig sind) im Wechsel mit den Virulenzfaktoren *tpbAB* und *opaA*. Alle ORFs wurden mit Hilfe des Programms *CodonUse 3.5.5* unter Verwendung der für *N. meningitidis* typischen Verwendungshäufigkeit von Kodons (*codon usage bias*) übersetzt und mit Hilfe der Internet-Programme BLAST (Altschul *et al.*, 1990) und/oder PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997) gegen die Internet-Datenbanken verglichen. Das Programm PSI-BLAST versucht, den gesamten ORF mit einer Zielsequenz zur Deckung zu bringen, während BLAST nur die Teilbereiche mit der höchsten Übereinstimmung anzeigt. Den meisten der gefundenen ORFs konnten mit diesen Vergleichen eine mögliche Funktion zugeordnet werden. Ob diese ORFs aber wirklich die von Untersuchungen in *E. coli* abgeleiteten zellulären Funktionen in *N. meningitidis* besitzen, müßte erst durch Mutationsanalysen bestätigt werden.

Bei der Sequenzierung und Annotierung des *H. influenzae*-Genoms von Fleischman *et al.* (Fleischmann *et al.*, 1995) konnten nur ca. 60% der gefundenen ORFs Funktionen den 12 von Riley definierten funktionellen Kategorien zugeordnet werden (Krawiec and Riley, 1990). Meist geschah dies auch nur auf der Basis von Sequenzhomologien zu Genen anderer Organismen. Die restlichen 40% der gefundenen ORFs ließen sich nicht einordnen. Auch bei der Analyse des *tpbAB-opaA*-Abschnittes in *N. meningitidis* Z2491 gibt es einige ORFs, die nur sehr niedrige oder gar keine Homologien zu Datenbankeinträgen mit einer bekannten Funktion zeigten. Dazu zählen die ORFs *toy1* bis *toy6* (siehe Abbildung 3.3, Seite 66). Bei keinem ORF ist es bis jetzt bekannt, ob er überhaupt exprimiert wird. Hier wurde versucht, mittels des Internet-Programmes PSORT eine mögliche Lokalisation der Proteine in der Zelle zu bestimmen. PSORT untersucht die Proteinsequenzen auf mögliche Schnittstellen für Signalpeptide, Sortierungssequenzen und Transmembranbereiche. Es wird eine Wahrscheinlichkeit für die zugeordnete Lokalisation angegeben. Mit diesem Programm ist es somit möglich, eine grobe Einteilung von Proteinen in die Bereiche Zytosol, innere Membran, Periplasma und Außenmembran zu treffen, was bei unbekanntem ORFs ein Ansatzpunkt für deren Analyse sein kann.

	<i>toy1</i>	<i>toy2</i>	<i>toy3</i>	<i>toy4</i>	<i>toy5</i>	<i>toy6</i>
Zytoplasma	0.228	-	0.339	-	0.114	-
innere Membran	-	0.559	-	-	-	0.465
Periplasma	-	-	-	0.496	-	-
Außen-Membran	-	-	-	0.309	-	-
Signalpeptid	-	-	-	37 AS	-	17 AS

Tabelle 4.1: Lokalisation der ORFs *toy1*-*toy6* nach PSORT-Vorhersagen.

AS: Aminosäuren

Hier ergibt sich für *toy1* und *toy5* eine Lokalisation im Zytoplasma mit einer Wahrscheinlichkeit von 0.228 bzw. 0.114. Diese sehr niedrigen Werte sind für eine sichere Lokalisation nicht signifikant. Für *toy4* liegen die PSORT-Werte mit 0.496 (Periplasma) oder mit 0.306 (Außenmembran) etwas höher, hier könnte man eine Lokalisation im Periplasma vermuten, da *toy4* wahrscheinlich ein Signalpeptid mit einer Länge von 37 AS enthält. (Als Vergleich: *tbpA* als bereits bekanntes Außenmembranprotein wird mit 0.747 für die Außenmembran und mit 0.173 für das Periplasma gewertet, sein Signalpeptid ist 24 AS lang). Die nächsten beiden unbekannt ORFs sind *toy2* und *toy3*. In *E. coli* ist *dpj* in einem Operon mit *pdxJ* verbunden, hier in *N. meningitidis* liegen aber noch diese ORFs zwischen diesen beiden Genen. Beide Proteine sind in der Datenbank völlig unbekannt, so daß keine Homologien zu bekannten Einträgen zu finden waren. Nach den PSORT-Vorhersagen könnte *toy 2* an der inneren Membran (0.559), *toy3* dagegen im Zytosol (0.339) lokalisiert sein. Der nächste unbekannte ORF *toy6* könnte nach der PSORT-Vorhersage eine 17 AS lange Signalpeptidsequenz besitzen und an der inneren Membran lokalisiert sein (0.465).

Diese Analyse mit Hilfe des PSORT-Programms kann hier nur als Anhaltspunkt für weitere funktionelle Untersuchungen dienen, doch um eine endgültige Aussage über die Lokalisation zu treffen zu können, muß erst einmal die Expression der gefundenen ORFs nachgewiesen werden.

4.2 Analyse der repetitiven Elemente um *tbpAB*

Um das hier im Stamm Z2491 untersuchte *tbpAB*-Operon sind zwei je ca. 2 kb lange Bereiche mit hochrepetitiven DNA-Sequenzen vorhanden. Diese entsprechen den *NIME-Repeats*. Bei einem Vergleich mit den *NIMES* um *opaA*, *B*, *D* und *J* sind nur 2 der internen RS-Es gefunden worden (RS14 und RS15), die in beiden *Repeats* vorkommen. Somit scheinen die *NIMES* spezifisch für den Gentyp zu sein, welches sie umschließen, da bei allen *opa*-Genen die *NIMES* untereinander sehr ähnlich sind

(Morelli *et al.*, 1998). Der ca. 1650 bp lange *NIME* vor *tbpA* besteht aus 20 RS-Es, die jeweils von dRS3-Elementen unterbrochen werden. Nur das letzte RS-E (Nr. 20) endet ohne ein abschließendes dRS3-Element, seinen Abschluß bildet das Stop-Kodon des *tbpA*-Gens (siehe Abbildung 3.4, Seite 71). Auffällig ist, daß das RS-E Nr.16 (wie Nr. 20 auch Typ RS28) ebenfalls ein Stop-Kodon an der gleichen Stelle enthält. Hier könnte ein Import oder eine Duplikation des letzten Abschnittes diese *NIME-Repeats* stattgefunden haben. Zusätzlich ist abwärts von *potF* ein Correia-Element vorhanden. Dieses 156 bp lange Element ist aber durch einen ca. 230 bp langen nichtrepetitiven DNA-Abschnitt von den *NIMEs* getrennt. Somit hat der gesamte repetitive Abschnitt abwärts von *tbpA* eine Länge von ca. 2 kb.

Der *Repeat*-Bereich aufwärts von *tbpB* besteht nur aus *NIMEs* mit einer Länge von 2 kb. Hier sind 27 RS-Es zu finden, auch hier endet der *NIME* ohne ein dRS3-Element. Das Stop-Kodon des *murI*-Gens liegt aber außerhalb des letzten RS-Es mit der Nr. 47, obwohl auch hier die Möglichkeit einer stattgefundenen Duplikation des Endes (RS-E Nr.44 + 45 und Nr.46 + 47) bestünde (siehe Abbildung 3.4, Seite 71). In den beiden *NIMEs* um *tbpAB* sind die RS-Es vom Typ RS14 und RS26 am häufigsten vertreten (*tbpA-Repeats*: 4x RS14 und 5x RS26, *tbpB-Repeats*: 6x RS14 und 10x RS26). Alle anderen RS-Typen kommen nur 1 - 3 mal in beiden *Repeats* vor.

4.3 Vergleich der *tbpAB-opaA* Region zwischen den Subgruppen IV -1 und ET-37 Komplex

Bei dem Vergleich der Sequenzen der Stämme Z2491 (IV-1) und Z4400 (ET-37 Komplex) zeigte sich, daß die Abfolge der in dieser Region in Z2491 gefundenen ORFs identisch in Z4400 war. Es war bereits bekannt, daß sich das *tbpAB*-Operon und das *opaA*-Protein in beiden Subgruppen unterscheiden. Hier zeigen *tbpA* und *opaA* eine Ähnlichkeit von 80,9% bzw. 85,5% zueinander, während *tbpB* mit nur 57,6% stärker abweicht. Dieser Unterschied ist auch auf die stark variierende Länge der beiden *tbpB*-Gene zurückzuführen (*tbpB* in IV-1 Stämmen: 2,1 kb im Gegensatz dazu *tbpB* nur 1,7 kb im ET-37 Komplex). Alle anderen ORFs sind mehr als 96,6% (bis zu 99,5%) ähnlich (siehe Tabelle 3.6, Seite 75). Die einzige Ausnahme bildet hier das *recO*-Protein, das mit nur 89% Homologie etwas herausfällt. Warum dieser hohe Unterschied zustande kommt, ist unklar. Ob das *recO*-Homolog in beiden Subgruppen eine unterschiedliche Funktion oder unterschiedliche Partner bei der Einzelstrang-DNA-Bindung mit ebenfalls abweichenden Proteinsequenzen haben kann, bleibt abzuwarten bis beide Genome vollständig durchsequenziert sind. Dann sollten sich solche Phänomene besser erklären lassen.

Größere Abweichungen waren in den intergenischen Bereichen zu finden. Die *NIMEs* um das *tbpAB*-Operon sind stark unterschiedlich zwischen beiden Subgruppen, so daß die *NIMEs* des ET-37 Komplex Stammes nur ansequenziert werden konnten, da keine passenden Primer zur Verfügung standen. Auch sind die Correia-Elemente abwärts von *potF* zwischen beiden Subgruppen durch Variationen gekennzeichnet. Interessanterweise sind im ET-37 Komplex Stamm 2 zusätzliche Correia-Elemente vor den Start und in den *toy3*-ORF integriert. Diese Integration des Correia-Elements in *toy3* führt zu einer Unterbrechung des Leserahmens, so daß der ORF *toy3* im ET-37 Komplex wahrscheinlich nicht exprimiert werden kann. Dies ist aber der einzige größere Unterschied, der in den ORFs der beiden Subgruppen besteht.

4.4 Vergleich der *N. meningitidis* Sequenzen mit dem *N. gonorrhoeae* FA1090-Genom

Bei dem Vergleich der Sequenz zwischen *potF* und *toy6* aus *N. meningitidis* Serogruppe A, Subgruppe IV-1 mit dem bis jetzt nur partiell veröffentlichten Genom aus *N. gonorrhoeae* FA1090 konnte mittels einer BLAST-Suche ein ca. 68,3 kb langer Sequenzabschnitt (contig170, Stand 04.05.99) identifiziert werden, der eine sehr hohe Homologie zu dem gesamten Abschnitt zeigte. Nach der Analyse der ORFs auf diesem Kontig mittels *CodonUse* 3.5.5 und PSI-BLAST zeigte sich, daß auch in *N. gonorrhoeae* die generelle Abfolge der ORFs die gleiche ist wie in *N. meningitidis*, jedoch fehlen in *N. gonorrhoeae* die beiden ORFs *toy2* und *toy3*, so daß wie in *E. coli* ein Operon *pdxJ-dpj* vorhanden ist. In der Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4 sind die Vergleiche aller ORFs (soweit vorhanden) aus den IV-1- und ET-37 Komplex-Stämmen mit dem *N. gonorrhoeae*-Stamm FA1090 gezeigt. Die Tabelle 4.2 (Vergleich IV-1/ET-37 Komplex) ist als Vergleich hinzugefügt. Durch Sequenzberichtigungen im noch unvollständigen *N. gonorrhoeae* Genom können aber noch weitere Abweichungen oder Angleichungen auftreten. So z.B. befindet sich eine Leserahmenverschiebung in dem *opa*-Gen, welches nach *toy6* folgt. Somit ist ein direkter Vergleich zwischen den beiden *opa*-Proteinen nicht möglich, da entweder hier ein Fehler in der Nukleotidabfolge besteht oder aber dieses *opa*-Gen in *N. gonorrhoeae* nicht funktionell ist. Generell hat *N. gonorrhoeae* wesentlich mehr *opa*-Proteine (10-11) als *N. meningitidis* (3-4), so daß ein nicht funktionelles *N. gonorrhoeae opa*-Gen (Pseudo-Gen) durchaus denkbar ist. Pseudo-Gene können im Allgemeinen bei Rekombinationsereignissen als Quelle für neue Allele dienen (Haas *et al.*, 1992).

Diskussion

Vergleich IV-1/ ET37-Komplex	<i>potF</i>	<i>tbpA</i>	<i>tbpB</i>	<i>murI</i>	<i>amiC</i>	<i>toy1</i>	<i>toy5</i>	<i>toy4</i>	<i>mutT</i>	<i>dpj</i>	<i>pdxJ</i>	<i>recO</i>	<i>pheA</i>	<i>bcr</i>	<i>toy6</i>
% Ähnlichkeit (Protein)	99,2	80,9	57,6	99,3	98,3	98,2	98,4	100	96,6	96,8	98,3	89,0	98,7	99,5	98,8
% Identität (Protein)	99,2	77,1	48,8	99,3	98,0	98,2	97,6	100	96,3	96,0	96,7	88,6	98,1	99,5	98,8

Tabelle 4.2: Vergleich der gefundenen ORFs in *N. meningitidis* Serogruppe A, Subgruppe IV-1 und Serogruppe C, ET-37 Komplex.

(Aus **Error! Reference source not found.**, Seite **Error! Bookmark not defined.** übernommen), *toy2*, *toy3* und *opaA* wurden hier nicht berücksichtigt.

Vergleich IV-1/ <i>N. gonorrhoea</i>	<i>potF</i>	<i>tbpA</i>	<i>tbpB</i>	<i>murI</i>	<i>amiC</i>	<i>toy1</i>	<i>toy5</i>	<i>toy4</i>	<i>mutT</i>	<i>dpj</i>	<i>pdxJ</i>	<i>recO</i>	<i>pheA</i>	<i>bcr</i>	<i>toy6</i>
% Ähnlichkeit (Protein)	98.4	94.3	76.2	97.8	97.2	98.5	93.2	97.9	95.2	94.4	98.3	83.6	99.2	91.6	96.8
% Identität (Protein)	98.0	93.6	73.6	97.8	96.5	98.2	91.6	97.1	95.2	93.6	97.5	80.7	98.7	91.0	96.8

Tabelle 4.3: Vergleich der gefundenen ORFs in *N. meningitidis* Serogruppe A, Subgruppe IV-1 und *N. gonorrhoeae* FA1090.

(*N. gonorrhoea*-Sequenz contig170, Stand 04.05.99)

Vergleich ET37-Komplex/ <i>N. gono.</i>	<i>potF</i>	<i>tbpA</i>	<i>tbpB</i>	<i>murI</i>	<i>amiC</i>	<i>toy1</i>	<i>toy5</i>	<i>toy4</i>	<i>mutT</i>	<i>dpj</i>	<i>pdxJ</i>	<i>recO</i>	<i>pheA</i>	<i>bcr</i>	<i>toy6</i>
% Ähnlichkeit (Protein)	98.4	80.0	58.9	98.1	95.8	96.7	94.5	99.1	95.9	96.0	98.3	90.5	97.8	92.2	98.4
% Identität (Protein)	98.0	76.3	46.5	98.1	95.4	96.3	93.7	98.1	95.5	96.0	96.7	88.9	97.3	91.6	98.4

Tabelle 4.4: Vergleich der gefundenen ORFs in *N. meningitidis* Serogruppe C, ET-37 Komplex und *N. gonorrhoeae* FA1090.

(*N. gonorrhoea*-Sequenz contig170, Stand 04.05.99)

Erstaunlich ist hier eine wesentlich höhere Homologie des *tbpAB*-Operons des NG-Stammes mit dem IV-1 Stamm als der ET-37-Stamm mit IV-1 (siehe Abbildung 4.1). Es ist zu vermuten, daß der ET-37 Komplex ein *tbpAB*-Operon mit einem kürzerem TbpB-Protein durch homologe Rekombination aus einem unverwandten Organismus erworben hat.

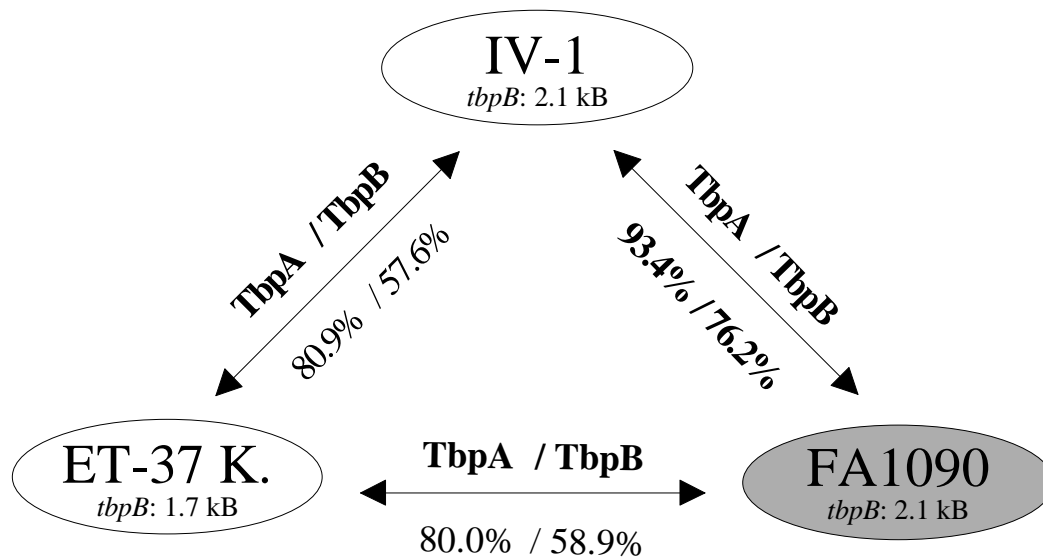


Abbildung 4.1: **Vergleich der TbpAB-Proteine.**

Gezeigt sind die Ähnlichkeiten der TbpAB-Proteine (Vergleiche Tabellen 4.2, 4.3 und 4.4). Die *N. meningitidis* Serogruppe A, Subgruppe IV-1 (**IV-1**) und Serogruppe C, ET-37 Komplex (**ET-37 K.**) Stämme sind als weiße Elipse und der *N. gonorrhoeae*-Stamm FA1090 (**FA1090**) als graue Elipse dargestellt. Zusätzlich ist die Länge der *tbpB*-Gene angegeben.

Um diese These zu untersuchen, wurden die Ks und Ka-Werte aller ORFs in diesem Abschnitt zwischen den drei Stämmen ermittelt. Als Vergleich für diese Analyse wurden die Genfragmente der MLST-Analyse verwendet. Hier wurde für jedes Gen in jedem Stamm die Ks und Ka-Werte berechnet und dann aus diesen Werten ein Durchschnitt gebildet. Diese Werte sind als Anhaltspunkte für die Unterschiede zwischen den beiden Subgruppen IV-1/ ET-37 Komplex und den beiden Spezies *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* zu sehen.

Proteine:	IV-1/ ET-37 K.		IV-1/ FA1090		ET-37 K./ FA1090	
	%Ks	%Ka	%Ks	%Ka	%Ks	%Ka
MLST:						
<i>abcZ</i>	28,7	0,9	26,3	0,9	30,3	1,8
<i>adk</i>	0	0	25,9	1,4	25,9	1,4
<i>aroE</i>	6,5	0,7	23,6	5,5	21,5	6,1
<i>fumC</i>	6,6	0	10,6	0,6	9,6	0,6
<i>gdh</i>	7,7	0,8	10,2	4,1	10,2	4,3
<i>pdhC</i>	14,9	0,8	22,3	0,8	28,6	2,0
<i>pgm</i>	14,8	2,1	25,0	1,2	30,5	3,3
MLST- \bar{E} :	11,3±9,3	0,8±0,7	20,6±7,1	2,1±1,9	22,4±9,1	2,8±1,9
Seq:						
<i>potF</i>	11,5	0,4	10,8	1,0	13,6	0,9
<i>tbpA</i>	98,2	16,4	7,1	3,2	101,2	17,3
<i>tbpB</i>	163,8	92,3	28,7	14,4	163,9	93,9
<i>murI</i>	15,9	0,5	10,7	0,9	13,5	1,4
<i>amiC</i>	6,5	0,9	15,3	1,7	17,8	2,2
<i>toy1</i>	1,6	0,8	7,7	1,6	6,0	0,8
<i>toy5</i>	13,4	1,0	24,7	4,5	13,3	3,5
<i>toy4</i>	1,4	0	1,4	0,8	2,8	0,8
<i>mutT</i>	9,2	1,8	12,7	2,5	12,7	2,2
<i>dpj</i>	20,4	1,8	31,4	3,5	19,1	2,4
<i>toy2</i>	2,3	0,9	-- ¹⁾	-- ¹⁾	-- ¹⁾	-- ¹⁾
<i>toy3</i>	1,5	1,4	-- ¹⁾	-- ¹⁾	-- ¹⁾	-- ¹⁾
<i>pdxJ</i>	14,7	1,9	15,5	1,4	16,4	2,0
<i>recO</i>	13,3	8,2	77,2	15,6	52,7	8,8
<i>pheA</i>	1,3	1,1	16,4	0,6	16,1	1,5
<i>bcr</i>	10,1	0,2	19,9	4,3	18,6	4,0
<i>toy6</i>	2,0	0,6	7,2	1,1	6,1	0,7
Seq- \bar{E} ²⁾ :	8,0±6,5	1,0±0,6	14,5±8,1	2,0±1,4	13,0±5,3	1,9±1,1

Tabelle 4.5: Berechnete Ks und Ka-Werte der untersuchten Stämme.

Bei der Berechnung der Ks und Ka-Werte nach Nei und Gojobori (Nei and Gojobori, 1986) im Program DNASP 3.0 (Rozas and Rozas, 1999) wurden alle Umwandlungen ignoriert, die ein Stop-Kodon erzeugen. Die Berechnungen wurden nach Jukes-Cantor ausgeführt.

MLST: multi-locus-sequence typing; **IV-1:** *N. meningitidis* Serogruppe A, Subgruppe IV-1; **ET-37 K.:** *N. meningitidis* Serogruppe C, ET-37 Komplex; **FA1090:** *N. gonorrhoeae* FA1090; **Ks:** Anzahl der synonymen Substitutionen pro synonymer Position (keine Änderung der Aminosäuresequenz); **Ka:** Anzahl der nichtsynonymen Substitutionen pro nichtsynonymer Position (Änderung der Aminosäuresequenz); --¹⁾: Gene an dieser Position nicht vorhanden in FA1090. ²⁾ Berechnung ohne *tbpAB* und *recO*. Diese Werte wurden aus der Berechnung der Durchschnitte herausgenommen und sind grau unterlegt (siehe Text).

Im Durchschnitt sind die beiden *N. meningitidis* Stämme weniger variabel untereinander als im Vergleich mit dem *N. gonorrhoeae* Stamm (Ks: 8,0%/ Ka 1,0% im Vergleich zu Ks: 14,5 bzw. 13,0%. und Ka: 2,0 bzw. 1,9%).

Ausgenommen von dieser Berechnung wurden *tbpA*, *tbpB* und *recO*, da diese Proteine sehr starke Abweichungen von den Durchschnittswerten zeigten. Die extreme Abweichungen der *tbpB*-Werte von Subgruppen IV-1 und ET-37 Komplex sind durch die unterschiedlichen Längen der Proteine zu erklären. Jedoch zeigt auch das *tbpA*-Protein im Vergleich zwischen IV-1 und ET-37 Komplex sehr große Abweichungen (98,2% synonyme, 16,4% nichtsynonyme Austausche) bei gleicher Länge, was nur mit einem Import eines fremden *tbpA*-Gens aus einer anderen Spezies in den ET-37 Komplex zu erklären ist. Wahrscheinlich sind die *tbpAB*-Gene als ein Operon transferiert worden.

Bei dem Vergleich der Subgruppe IV-1 mit *N. gonorrhoeae* FA1090 lagen die Werte der TbpA-Proteine (Ks: 7,1%, Ka: 3,2) erstaunlich niedrig. *tbpB* als ein bekannt variables Gen lag mit 28,7% synonymem und 14,4% nichtsynonem Austausch deutlich über dem Durchschnitt der *house-keeping*-Gene (Ks: 14,5%/ Ka: 2,0%), aber weit unter den *tbpAB*-Vergleichswerten der Subgruppen IV-1 mit dem ET-37 Komplex. Somit sind die TbpAB-Proteine aus FA1090 und Subgruppe IV-1 wesentlich näher verwandt als die der Subgruppe IV-1 und des ET-37 Komplex, wobei es sich mit den restlichen Proteinen genau anders herum verhält.

Das RecO-Protein zeigt relativ große Abweichungen schon bei dem Vergleich IV-1/ ET-37 Komplex. Mit 8,2% nichtsynonemen Austauschen liegt es weit über dem Durchschnitt von 1%. Wesentlich ausgeprägter ist der Unterschied bei den Vergleichen mit dem *N. gonorrhoeae* FA1090-Stamm. Hier liegen 77,2% bzw. 52,2% synonyme und 15,6% bzw. 8,8% nichtsynonyme Austausche vor (IV-1/ FA1090 bzw. ET-37 K./ FA1090), zusätzlich ist das FA1090-RecO-Protein etwas kürzer als das der *N. meningitidis* -Stämme (247 zu 264 Aminosäuren). Entweder ist das RecO-Protein besonders variabel oder es wurde ebenfalls aus einem unverwandten Bakterium importiert.

Um diese Ergebnisse zu veranschaulichen, wurden die oben errechneten Ks und Ka Werte in 3D-*Scatterplots* (Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3) dargestellt. Hier sieht man sehr gut die stark abweichenden Werte der Gene *tbpA*, *tbpB* und *recO* in dem Vergleich der drei Spezies untereinander. Alle anderen Gene liegen hingegen in einem Cluster zusammen. Das zeigt, daß auch die hier analysierten *house-keeping*-Gene dem bereits bekannten geringen unterschiedlichen Variations-Niveau zwischen *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* entsprechen.

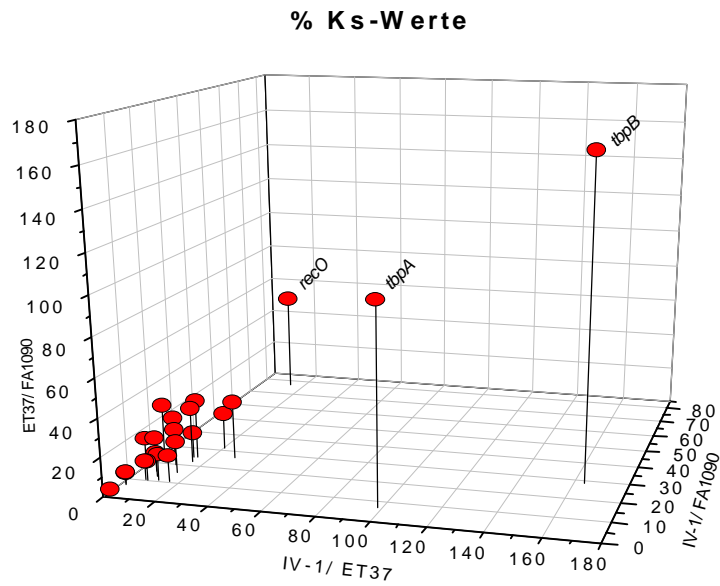


Abbildung 4.2: 3D-Scatterplot der Ks-Werte der IV-1, ET37 und FA1090 Stämme.

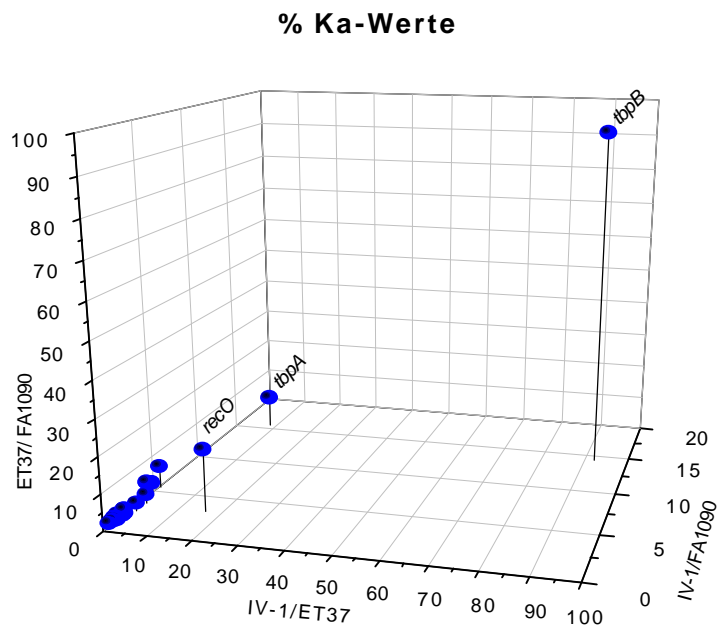


Abbildung 4.3: 3D-Scatterplot der Ka-Werte der IV-1, ET37 und FA1090 Stämme.

Dieser Vergleich zwischen den beiden Subgruppen und den beiden Spezies zeigt, daß im allgemeinen zwischen den einzelnen Proteinen eine sehr große Übereinstimmung besteht, bestimmte ORFs aber nicht in beiden Subgruppen/beiden Spezies vorhanden sein müssen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, die in unserer Arbeitsgruppe von S. Klee gemacht wurden (Klee et al., Manuskript in Vorbereitung). Ausgehend von einer subtraktiven Analyse der Genome von *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* (Tinsley and Nassif, 1996) wurde versucht, Regionen zu charakterisieren, die nur in *N. meningitidis* vorkommen und in *N. gonorrhoeae* abwesend sind. Dabei wurden 8 Bereiche zwischen 2 kb und 40 kb gefunden, die z.B. die Kapselgene, einen Prophagen, ein Leukotoxin-Sekretionssystem oder diverse Siderophor-Rezeptoren enthielten. Die hier beschriebenen Gene *toy2* und *toy3* sind in dieser Analyse nicht entdeckt worden. Ob diese beiden Gene aber etwas mit den unterschiedlichen Pathogenitäten der beiden Spezies zu tun haben können, bleibt zu untersuchen.

4.5 Sequenzvariationen in den gefundenen *potF*, *tbpB*, *amiC* und *opaA*-Allelen

Um einen Überblick über die verschiedenen Ereignisse innerhalb mehrerer Jahrzehnte und in verschiedenen Ländern zu erhalten, wurden frühe Isolate der Serogruppe A, Subgruppen III, IV-1 und IV-2 und Stämme der Subgruppe IV-1 aus einem anderen Land (Mali) im Vergleich zu den Isolaten der Gambia-Epidemie sequenziert.

Bei der Betrachtung der ältesten Isolate der Serogruppe A, Z3906 (Subgruppe III, 1966, China), Z1362 (Subgruppe IV-1, 1966, Kamerun) und Z1293 (Subgruppe IV-2, 1917, U.S.A.) zeigte sich, daß die Allele für *tbpB* und *opaA* in allen drei Subgruppen bis zu dieser Zeit nahezu identisch waren (Z1293: Punktmutation im *tbpB*-Allel), und nur das Subgruppe III Isolat Z3906 in den *potF* und *amiC*-Allelen abwich.

Bei der Analyse der aktuellen Subgruppe IV-1 Stämmen aus verschiedenen Ländern (hier Gambia und Mali, 1982-92) zeigte sich, daß in Gambia ein Austausch und eine vorläufige Fixierung eines neuen *potF*-Allels stattgefunden hat. Das ursprüngliche Allel taucht noch auf, aber in Kombination mit ebenfalls ausgetauschten *tbpB* und *amiC*-Allelen.

Bei den in den 90er Jahren in Mali isolierten Subgruppe IV-1 Stämmen zeigte sich bei einem Stamm wieder das ursprüngliche Muster *potF1-tbpB1-amiC1-opaA132*, die Mehrzahl der Stämme besitzt aber Variationen im *tbpB*-Allel. Die IV-1 Stämme in Mali sind damit genauso heterogen wie die gambianischen Stämme. Zusätzlich sind alle Allelvarianten über den "globalen Genpool" überall verfügbar.

Es zeigte sich, daß wesentlich mehr Rekombinationsereignisse in den Subgruppe IV-1-Stämmen aus Gambia stattgefunden haben als in den ET-37 Komplex Stämmen aus Mali. Zusätzlich waren die Ereignisse hauptsächlich um das *tbpB*-Gen herum lokalisiert. 45% der untersuchten IV-1 Stämme wurden als Varianten identifiziert. Es traten 20 verschiedene *tbpB*-Allele, 8 *amiC*-Allele und 3 *opaA*-Allele auf. Im Gegensatz dazu wurde in den untersuchten ET-37 Komplex Stämmen aus Mali nur eine nichtsynonyme Punktmutation (Arg -> Cys) in einem *opaA*-Allel gefunden.

Bei den in diesen Analysen gefundenen *potF* Allelen zeigten sich nur ein Unterschied von wenigen Nukleotiden, wobei keinerlei *potF*-Varianten im ET-37-Komplex zu beobachten waren (siehe Abbildung 3.7). Das vorherrschende Allel der IV-1 Stämme (Z2491) unterscheidet sich nur mit 4 Nukleotiden, das der Subgruppe III (Z3906) nur mit 3 Nukleotiden von dem ursprüngliches *potF*-Allel (Z1362). Diese geringe Bandbreite der Allele weist entweder auf eine starke Einschränkung der Variabilität bedingt durch die Proteinfunktion oder eine nur geringe Anzahl an möglichen Allelen in den zur Rekombination befähigten Neisserien hin. Alle Nukleotidaustausche in den IV-1 Varianten sind "stille" Mutationen, sie verursachen keinerlei Änderungen in der Proteinsequenz. Das Allel des ET-37-Komplex Stammes weicht mit einer Aminosäure (Asn -> Thr) von der IV-1 Sequenz ab. (siehe auch SPLITSTREE-Graphik in Abbildung 3.8)

In den 10 verschiedenen *amiC*-Allelen sind die Variationen wesentlich ausgeprägter (siehe Abbildung 3.7). Von der Verteilung der informellen Nukleotide gewinnt man den Eindruck, daß hier mosaikartige Blöcke auftreten. Dies wird von der SPLITSTREE-Darstellung in Abbildung 3.9 unterstützt, die klar zeigt, daß nur die Allele der Stämme G1411 und G1417 von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen, während alle anderen Allele durch Rekombinationen untereinander oder mit noch unbekanntem Allelen entstanden sein müssen. Diese hohe Variabilität im Kontext mit der Mosaikstruktur zeigt eine große Anzahl von funktionellen Kombinationsmöglichkeiten für das *amiC*-Protein ebenso wie eine hohe Anzahl von Allelen, die in der Population vorhanden sein müssen.

Die *tbpB*-Varianten ließen sich nicht als HAPLOT in einer auswertbaren Form darstellen, da hier extrem viele Nukleotidunterschiede zwischen den einzelnen Allelen auftraten. Dieses auf Mosaikgene oder Genfamilien hinweisende Phänomen läßt sich am besten durch einen phylogenetischen Baum darstellen. Hier wird der genetische Abstand aller aufgetretenen Varianten zueinander dargestellt, so daß evolutionäre Beziehungen über die Distanz zweier Varianten zueinander abzulesen sind. In dem in Abbildung 3.11 gezeigten SPLITSTREE-Baum sind klar drei Gruppen von *tbpB*-

Allelen zu identifizieren, die im Vergleich mit den anderen Allelen (*potF*, *amiC* und *opaA*) einen sehr großen genetischen Abstand zueinander aufweisen. Die erste Gruppe besteht aus den Varianten um den Standardstamm Z2491. Die zweite Gruppe bildet der Stamm G852 mit dem *tbpB* des ET-37 Komplex Stammes. Das *tbpB*-Allel von G852 steht also genetisch näher zu dem kleinen *tbpB* (1,7 kb, IV-1 sonst 2,1 kb) des ET-37 Komplex als zu denen der Subgruppe IV-1. Dies zeigt, dass auch genetisch weiter entfernte *tbpBs* durch Rekombination in *N. meningitidis* eingebracht werden können. Die dritte Gruppe beinhaltet die meisten der Varianten, die stärker von der Standardsequenz abweichen, u.a. die Varianten G396 und G765, bei denen die gesamte Sequenz zwischen *potF* und *opaA* ermittelt wurde.

Der Baum der *tbpB*-Verwandtschaft (Abbildung 3.11) läßt aufgrund der sehr unterschiedlichen Allele einen Import von DNA aus unverwandten Neisserien und auftretende Interspezies-Rekombinationen vermuten. Dies wird durch die Analyse der dritten *tbpB*-Allel-Gruppen in Abbildung 3.12 unterstützt. Hier zeigen sich vielfältige Rekombinationsmöglichkeiten zwischen den gefundenen Allelen, was durch die durchgehende Netzdarstellung der Graphik ausgedrückt wird. Ungeklärt ist, ob alle Varianten durch Rekombinationen mit unverwandten Bakterien entstanden (Import aller Allele) oder sich einzelne Allele wie z.B. G765/G1423/G361 durch sukzessive Mutationen/Rekombinationen in *N. meningitidis* entwickelten.

Selbst die mit je nur einem Nukleotid von der Standardsequenz abweichenden *tbpB*-Allele Z1293, G4, G223 und G372 zeigten Änderungen in der Aminosäuresequenz. Da der untersuchte Bereich mit nur 596 bp Länge aber relativ kurz ist, lassen sich keine Aussagen über den Rest des *tbpB*-Proteins treffen. Im Gegensatz zu TbpA (Pettersson *et al.*, 1993; Pajon *et al.*, 1997) ist bis jetzt noch kein Struktur-Modell für das TbpB-Proteins veröffentlicht worden. Somit lassen sich keine Rückschlüsse auf die Positionen der Aminosäure-Änderungen im reifen Protein ziehen.

4.6 Mechanismen des Austausches in der *tpbAB-opaA* Region

Man kann generell zwischen zwei Arten von Rekombinationsereignissen in dem untersuchten Bereich unterscheiden. In den meisten der gefundenen Varianten hat eine Rekombination um den *tbpAB*-Locus herum stattgefunden, während unabhängig davon die drei Rekombinationen um den *opaA*-Locus herum stattgefunden haben. Somit sind die beiden Bereiche auch getrennt voneinander zu betrachten. Die eingangs gestellte Frage, ob *tbpAB* und *opaA* zusammen oder getrennt voneinander variieren, ist somit geklärt. Warum aber nur eine so geringe Anzahl von *opaA*-Varianten gefunden wurde, läßt sich nicht erklären. Hier zeigte sich auch in der Analyse von Morelli *et al.*, daß der

opaA-Locus über Dekaden relativ stabil in den drei Subgruppen III, IV-1, IV-2 ist (Morelli *et al.*, 1998). Da die *opa*-Gene von ihrem Aufbau her alle sehr ähnlich sind (Variationen treten am häufigsten in den SV und HV1 und HV2-Bereichen auf), kann man Rekombinationen nur bei einem Austausch dieser Bereiche feststellen. So haben hier in den IV-1 Stämmen intramolekulare Rekombinationen stattgefunden, d.h. mit *opa*-Genen aus dem eigenen Genom und nicht mit Stämmen anderer Subgruppen. Zwei der drei Austausche sind durch Rekombination eines kompletten *opaB* bzw. *opaD*-Gens aus der Subgruppe IV-1 mit dem *opaA*-Locus zustande gekommen. Die dritte gefundene Variante ist möglicherweise durch eine Rekombination der HV2-Region des *opaD*-Gens aus IV-1 in die HV2-Region des *opaA*-Locus entstanden. Diese Art von Rekombinationen sind schon früher von Morelli *et al.* (Morelli *et al.*, 1997) beobachtet worden, sie scheinen eine häufige Art der Variation in den *opa*-Loci darzustellen.

Um zu klären, daß die Bevorzugung des Bereiches um *tbpAB* bei den Rekombinationsereignissen nicht auf andere Effekte, wie z.B. die bevorzugte Aufnahme dieses DNA-Abschnittes gegenüber dem Rest der untersuchten Sequenz zurückzuführen ist, wurde auch die Verteilung der sogenannten "uptake"-Sequenzen in dem 24,5kb langen Abschnitt von *potF* bis *toy6* untersucht. Diese 10 bp langen "uptake"-Sequenzen mit der Abfolge GCCGTCTGAA sind für die effektive Aufnahme extrazellulärer DNA in *Neisseriaceae* notwendig (Goodman and Scocca, 1988; Elkins *et al.*, 1991). Wenn der Bereich um *tbpAB* nun besonders viele dieser "uptake"-Sequenzen enthalten hätte, wäre ein bevorzugter Import dieser Region zu verstehen. Es lies sich aber keine Häufung dieser Elemente um das *tbpAB*-Operon feststellen, so daß es hier nicht aus diesem Grund zu einer bevorzugten Aufnahme des Abschnittes kommen sollte.

Ebenso sollten die repetitiven Elemente um *tbpAB* keine Rolle in diesem Ungleichgewicht spielen, da auch um *opaA*-Gen sehr ähnliche *Repeats* vorhanden sind. Wenn repetitive Elemente eine Rekombination bevorzugen würden, sollte man gehäuft diese Ereignisse um alle Gene finden, die mit *Repeats* umgeben sind. Da aber die Untersuchung aller *opa*-loci der *N. meningitidis* Subgruppen III, IV-1 und IV-2 (Morelli *et al.*, 1998) zeigte, das die *NIMEs* in diesem Bereich über Dekaden relativ stabil sind und in den *opa*-Loci (verglichen mit dem *tbpAB*-Operon) nicht besonders häufig Rekombinationen stattfinden, können die *NIMEs* eigentlich auch nicht für diese Häufung verantwortlich sein.

Bei den Variationen um *tbpAB* ist auffällig, daß ein sehr großer Bereich links und rechts neben dem Operon ebenfalls von Rekombinationen betroffen ist. Dies fiel auf,

als bei der Untersuchung Varianten der Gene *potF* und *amiC* immer in Kombination mit Varianten von *tbpB* gefunden wurden. Sowohl bei den Verdauungen der *lr*PCR-Fragmente als auch bei den Sequenzierungen der Varianten war zu beobachten, daß die Grenzen der Rekombinationsereignisse weit über das *tbpAB*-Operon hinausreichten (siehe Abbildung 3.15). Hier wurden ausgetauschte DNA-Fragmente mit Längen von ca. 1,4 kb bis 14,5 kb beobachtet, der Median der gefundenen Ereignisse lag bei 6,5 kb.

Diese Präferenz des Imports des *tbpAB*-Operons (oder Abschnitte daraus) in den gambianischen Isolaten deutet auf eine selektionsgetriebene Auswahl von verschiedenen *tbpAB*-Allelen während dieser Epidemie hin, was vielleicht dem Bakterium einen gewissen Vorteil bei der Adhäsion/Invasion bieten könnte. Da der TbpAB-Komplex an der Außenmembran verankert ist, wird er ständig dem Immunsystem des Wirtes präsentiert. Erstaunlicherweise wurden bei Meningokokkeninfektionen nur IgG-Antikörper gegen den TbpAB-Komplex der ET-37 Komplex Stämme induziert, während bei den IV-1 Stämmen kein signifikanter Anstieg der IgG-Konzentration zu beobachten war (Brieske *et al.*, 1999). Die gegen TbpAB des ET-37 Komplex erzeugten IgG-Antikörper boten keinen andauernden Schutz gegen eine erneute Infektion und ihre Konzentration nahm sehr schnell wieder ab. Dies zeigt, daß der TbpAB-Komplex nicht sehr immunogen ist, aber durchaus vom Immunsystem erkannt wird. Somit könnten neue Varianten des TbpAB-Komplexes, die noch nicht vom Immunsystem erkannt werden, durchaus einen Vorteil bei der Besiedlung des Nasen-Rachenraumes bieten.

Ob die neu aufgetretenen TbpAB-Varianten aber genauso effektiv wie die ursprünglichen Allele oder überhaupt funktionsfähig sind, bleibt zu untersuchen. Da aber über die Wechselwirkungen zwischen TbpB und TbpA bei der Transferrin-Bindung nur sehr wenig bekannt ist, läßt sich nichts über einen Zusammenhang verschiedener TbpB-Domänen mit der Assoziation an *tbpA* und der Funktion der gemeinsamen Transferrin-Bindung ableiten. Hier könnten die Kartierungen der funktionellen Regionen von TbpA (Pajon *et al.*, 1997) und das Strukturmodell für LbpA (Pettersen, A., persönliche Mitteilung) vielleicht weiterhelfen, da nach der Identifikation der extrazellulären Regionen des TbpA die Bindungsstellen des TbpBs durch gezielte Mutationen in diesen Bereichen zuzuweisen wären.

Wie können nun diese Rekombinationen vor sich gehen? Das für diese Art der Variationen im Frage kommende Funktionsprinzip ist die homologe Rekombination von DNA verwandter Neisserien, die bedingt durch die natürliche Transformations-Kompetenz aufgenommen und in das Genom integriert werden kann. Dabei wird bei

der Transformation in *N. gonorrhoeae* einzelsträngige DNA gebildet (Chaussee and Hill, 1998). Ob diese oder doppelsträngige DNA über die innere Zellwand geschleust wird, ist noch unklar. Es sieht aber so aus, daß einzelsträngige DNA erst im Periplasma gebildet wird, ob dies eine Vorstufe für Rekombinationen oder nur ein Abbauprodukt bei der DNA-Aufnahme ist, bleibt zu untersuchen. In den natürlich kompetenten Gram-positiven Bakterien *Bacillus subtilis* und *Streptococcus pneumoniae* wird ein DNA-Strang abgebaut, während der zweite über die zytosolische Membran transportiert wird (Lacks *et al.*, 1967; de Vos *et al.*, 1981; Lorenz and Wackernagel, 1994). Im Zytoplasma interagiert ein RecA-ähnlichen Protein mit der Einzelstrang-DNA, welches den Austausch der Donor-DNA mit dem homologen Abschnitt auf dem Chromosom bewerkstelligt. In den Gram-positiven Bakterien scheint die DNA-Aufnahme auch nicht Spezies-spezifisch zu sein (Lorenz and Wackernagel, 1994). Im Gegensatz dazu ist bei den Gram-negativen Bakterien wie *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* eine spezies-spezifische "uptake"-Sequenz vorhanden, um leichter Donor-DNA in die Zelle einzuschleusen (Danner *et al.*, 1980; Goodman and Scocca, 1988; Elkins *et al.*, 1991). In *E. coli* ist RecA generell bei DNA-Fragmenten länger als 1 kb an der Rekombination beteiligt, bei kleineren Stücken kann es auch RecA-unabhängige Rekombinationen geben. Es gibt bis jetzt drei anerkannte mögliche Mechanismen, um Heteroduplex-DNA-Stränge zu erzeugen (Lloyd and Brooks Low, 1996).

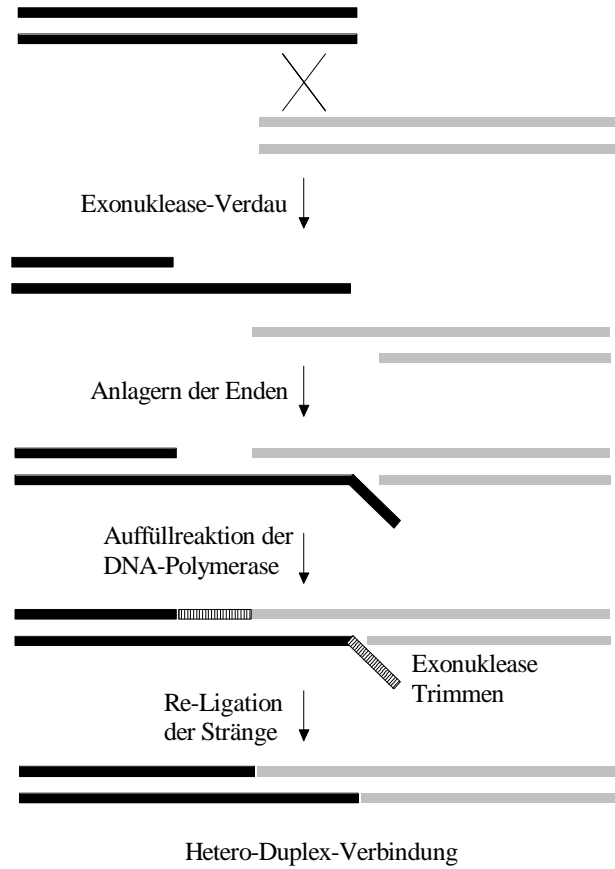
Bei dem ersten Mechanismus, dem "*end annealing*" werden zwei um einen gewissen Bereich überlappende doppelsträngige DNA-Fragmente nach einem Exonukleaseverdau über die dabei entstehenden einzelsträngigen Bereichen miteinander verbunden. Nach einer Polymerase-Auffüllreaktion und der Religation sind dann beide homologe Stränge miteinander verbunden. (Siehe Abbildung 4.4 a).

Der zweite Mechanismus läuft über die sogenannten "*Holliday junctions*" ab (Siehe Abbildung 4.4 b). Diese nach dem Holliday-Modell (Holliday, 1964) benannten Überkreuzungen der homologen Stränge nach dem jeweiligen Einzelstrangbruch bei der DNA-Strangaustausch führen je nach Auflösung des Komplexes zu einem dem "*end annealing*" ähnlichen Endstufe oder zu einem kürzeren Abschnitt "fremder" einzelsträngiger DNA in der ursprünglichen Umgebung.

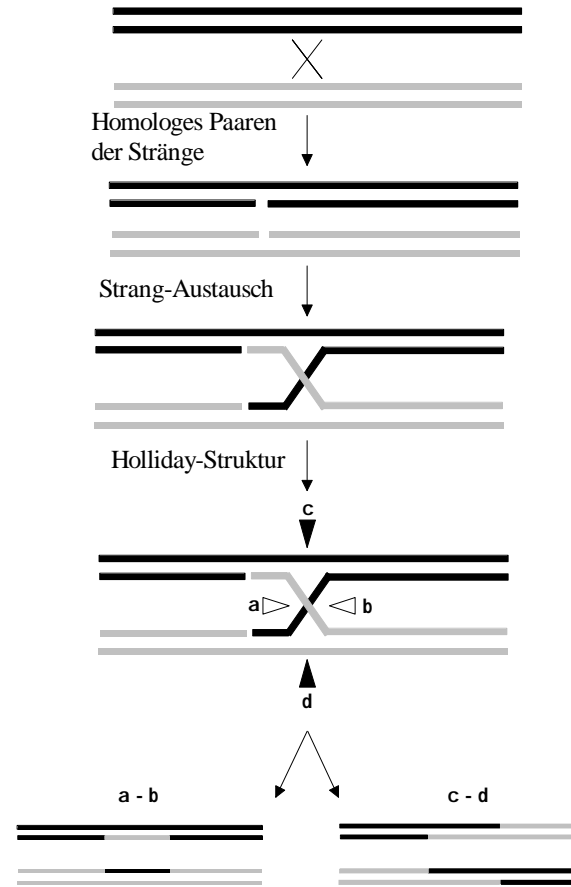
Der dritte und komplexeste Mechanismus ist die asymmetrische Initiierung durch Einzelstrang-Invasion (Siehe Abbildung 4.4 c). Hier gibt es zwei Ausgangspositionen, einmal von einem über einen doppelsträngigen Bereich hinausreichenden Einzelstrang und zweitens von einem Einzelstrangbereich in doppelsträngiger Umgebung.

Diskussion

a) "End annealing"



b) "Holliday" - Strukturen



c) asymmetrische Initiierung durch Einzelstrang-Invasion

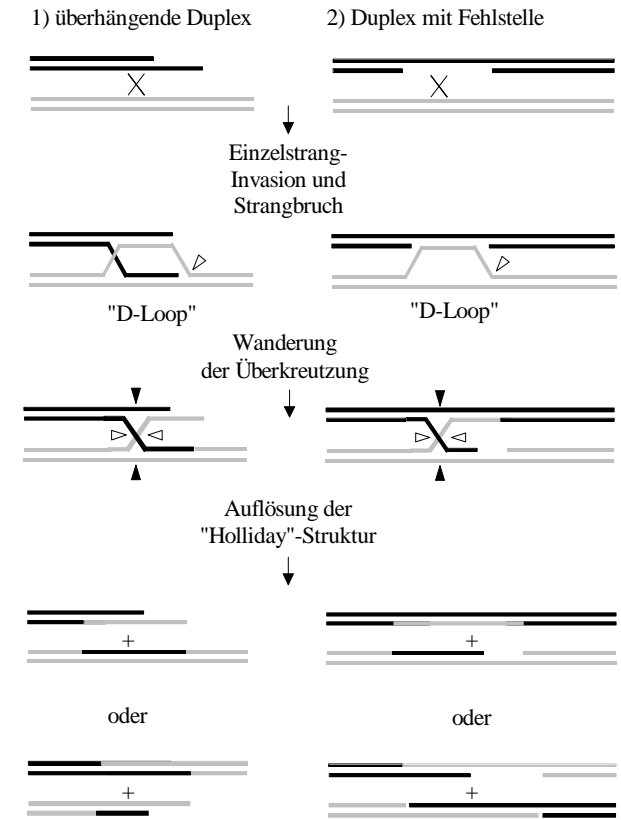


Abbildung 4.4: Modelle der homologen Rekombination (Aus Lloyd and Brooks Low, 1996).

Beide Versionen führen nach dem Eintreten des Einzelstranges über den sogenannten "D-Loop" mit anschließender "Holliday"-Struktur-Bildung zu den gleichen Ergebnissen wie die reinen Holliday-Komplexe aus doppelsträngiger DNA.

Bei allen Mechanismen werden nach einer Zellteilung mit der dabei nötigen DNA-Duplikation die beiden Tochter-Zellen unterschiedliche Rekombinationsendpunkte aufweisen, wenn informative Nukleotide in den Überlappungen vorhanden waren.

Alle diese Ereignisse sind in den gefundenen Rekombinanten möglich, ist die asymmetrische Initiierung durch Einzelstrand-DNA am wahrscheinlichsten, da nachgewiesenermaßen einzelsträngige DNA bei der Gonokokken-Transformation entsteht (Chaussee and Hill, 1998) und bei den Gram-positiven Bakterien ebenfalls nur einzelsträngige DNA verwendet wird.

Hier wurden DNA-Abschnitte von ca. 2 bis 14,5 kb Länge gefunden, die über die beschriebenen Mechanismen entstanden sein könnten. Ob die langen Fragmente das Ergebnis einer Rekombination eines einzelnen Fragments oder durch mehrere aufeinanderfolgende Ereignisse entstanden sind, läßt sich durch die Restriktionsanalyse der *lr*PCR-Fragmente nicht klären. Hier müßten durch Sequenzierung dieser Klone die genauen Rekombinationsendpunkte und der Grad der Varianz über den gesamten DNA-Abschnitt ermittelt werden, um genauere Aussagen zu treffen.

Bemerkenswert ist der große Unterschied zwischen den Rekombinationshäufigkeiten der Subgruppe IV-1 und dem ET-37-Komplex. Als Ursache läßt sich ein unterschiedliche Effektivität des Rekombinationsmechanismus in den Serogruppe C, ET-37 Komplex Stämmen im Vergleich mit den Serogruppe A, Subgruppe IV-1-Stämmen vermuten, der zu diesem beobachteten Unterschieden führt. Wodurch aber dieser Unterschied bedingt wird, ist noch völlig ungeklärt.

4.7 Repeats als funktionelle Einheit?

Die in *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* gefundenen repetitiven Elemente lassen die Vermutung aufkommen, daß ihr Vorhandensein auch mit einer Funktion zusammenhängen muß. Es ist nicht mit einem zufälligen Auftreten von "Müll-" oder unsinniger DNA zu erklären, daß hier eine Art von DNA-Elementen flankierend von Außenmembranproteinen mit sehr ähnlichen Sequenzen in den einzelnen Einheiten auftritt. Von 39 Repeat-Regionen, die in der vorläufigen Veröffentlichung des *N. meningitidis* Genoms der Sanger-Gruppe gefunden wurden, sind 14 Regionen um Außenmembranproteine lokalisiert (Morelli *et al.*, 1998). Diese sind neben den sechs

oben genannten *opc*, *pilC1*, *pilC2*, *pilE*, *porA*, *porB*, *hpuA*, *frpB*, weitere werden wahrscheinlich nach abschließender Annotierung des Genoms folgen. Lawson et al. fanden bei der Analyse der *carA* und *carB* Gene ebenfalls diverse *Repeats* in dieser Region (Lawson et al., 1995).

Interessanterweise scheinen in manchen Kommensalen die *Repeats* um *tbpAB* mit nur 300-500 bp wesentlich kürzer als die hier sequenzierten und amplifizierten Elemente zu sein (Daten nicht gezeigt, pers. Mitteilung B. Linz). Diese sehr kurzen *Repeats* könnten vielleicht mit der unterschiedlichen Pathogenität der kommensalen Neisserien zusammenhängen, wenn die *Repeats* einen Einfluss auf die Expression der Virulenzfaktoren wie TbpAB, OpaA usw. haben. Möglicherweise muß eine Mindestlänge der *Repeats* für eine ausreichende Expression der Gene vorhanden sein.

Die *Repeats* um *tbpAB* in den pathogenen Stämmen der Subgruppe IV-1 und aus dem ET-37 Komplex sind alle relativ gleich groß (ca. 2 bis 2,2 kb vor *tbpB* und 1,8 bis 2 kb hinter *tbpA*). Alle Varianten in den IV-1 Stämmen zeigten keine besonders auffälligen Abweichungen in den Längen der *lrPCR*-Produkte, die schon bei Unterschieden von ca. +/- 200 bp bei rund 6 kb Gesamtlänge sehr gut zu beobachten sind. Die abweichenden *lrPCR*-Fragmentlängen der gefundenen und sequenzierten Varianten waren gut auf den Agarose-Gelen zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Um mögliche Funktionen zu definieren, scheint es sinnvoll, bereits bekannte Funktionen von repetitiven Elementen im Hinblick auf die neisseriellen *Repeats* zu untersuchen.

Dabei wurde klar, daß die hier gefundenen *Repeats* keine Bindungsstellen für bekannte Proteine (IHF, Gyrasen, DNA Pol1) besitzen, keine Rekombinations-"hotspots" für den Austausch der Allelvarianten sind, wie die gefundenen Endpunkte der Rekombinationsereignisse gezeigt haben und über längere Zeiträume nicht besonders variabel sind.

Was aber ihre Funktion im genomischen Gesamtbild ist, kann bis jetzt nicht festgelegt werden. Mögliche Funktionen wären ein Schutz vor Abbau der eingeschlossenen Gene bei der Transformation, sie würden als "Puffer" wie die Poly-A-Schwänze der mRNA in Eukaryonten agieren und die Transformationseffizienz für komplette Pathogenitätsgene erhöhen. Auch wäre eine Regulation der Expression dieser Gene über die Ausbildung bestimmter Sekundärstrukturen in der DNA vielleicht möglich, nachdem die *Repeats* sich mit ihren Einzelementen zu komplexeren Gebilden umgelagert haben. Die *fur*-Bindungsstelle und der Promotor des *tbpAB*-Operons liegen aber innerhalb der *Repeats* kurz vor *tbpB*. Eine mögliche Ausbildung von Sekundärstrukturen durch die *Repeats* wird vielleicht auch von der Beobachtung unterstützt, das sich mit *Repeats* umgebene Gene nur sehr schwierig mittels PCR

amplifizieren lassen. Die Taq-Polymerase wird wahrscheinlich von den *Repeats* behindert, so daß sie nicht den Doppelstrang aufwinden kann, um den neuen DNA-Strang zu bilden. Eine wesentliche Verbesserung wurde durch die Verwendung von DNA-Sekundärstruktur aufbrechende Agenzien wie 5% DMSO oder auch 10% Betaine im PCR-Ansatz erreicht. Nach Zugabe dieser Chemikalien konnten die meisten Reaktionen ohne Probleme durchgeführt werden. Diese Beobachtung spricht für eine Ausbildung von komplexen Strukturen durch oder mit den *Repeats*. Nicht auszuschließen ist aber auch eine Bindung von noch nicht identifizierten Proteinen an die *Repeat*-Strukturen. Wenn deren Bindung durch Betain oder DMSO negativ beeinflußt würde, träte der gleiche Effekt wie oben beschrieben auf.

Es bleiben also leider die basalen Fragen nach einer Funktion der *Repeats* offen. Ob diese mittels Deletionsstudien und Mutationsanalysen zu klären sind, bleibt abzuwarten.