

1. Einleitung

Populationsgenetik und Evolution von Prokaryonten waren schon in den 40er und 50er Jahren interessant für die naturwissenschaftliche Forschung (Luria and Delbrück, 1943; Atwood *et al.*, 1951). Aber erst in den 70er und 80er Jahren bot sich den Populationsgenetikern die Möglichkeit, mit Hilfe neu entwickelter Techniken wie der Restriktionsanalyse (Roberts, 1989), der Multilocus-Enzymelektrophorese (MLEE) (Milkman, 1973; Selander *et al.*, 1986), der DNA-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977; Maxam and Gilbert, 1977) und der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986) viele Isolate aus einer bestimmten Population auf ihre Verwandtschaft zu untersuchen. Dabei standen und stehen pathogene Organismen seit jeher im besonderen Interesse der Wissenschaft, da es schon immer der Wunsch war, von Bakterien ausgelöste Krankheiten und deren Ausbreitung kontrollieren zu können. Hierzu sind populationsgenetische Daten notwendig, für die ein fundiertes Verständnis der Variabilität natürlicher bakteriellen Populationen notwendig ist. Als Beispielorganismus wird hier u.a. *Neisseria meningitidis* (der Meningokokkus) verwendet, für den große und gut charakterisierte Stammsammlungen zur Verfügung stehen.

N. meningitidis ist ein gram-negativer Diplokokkus, der den Nasen-Rachenraum im Menschen besiedelt. Diese Besiedlung erfolgt in den meisten Fällen unsymptomatisch, sie kann aber gelegentlich zu einer epidemischen cerebrospinalen Meningitis (Hirnhautentzündung) führen. Bei dieser Infektion können die Meningokokken nach einer Invasions des Körpers starke Entzündungsreaktionen hervorrufen, die zum septischen Schock und damit zum Tode des Patienten führen können. Eine Immunantwort des Körpers wird durch veränderliche Oberflächenproteine erschwert, die durch Sequenzvariationen und wechselnde Expressionsmuster eine wirkungsvolle und gezielte Antikörperproduktion verhindern. Außerdem sind Meningokokken natürlich Transformations-Kompetent, d.h. sie können fremde DNA aufnehmen und in ihr Genom einbauen, was zu weiteren Variationen führt.

1.1 Die Gattung *Neisseria*

Die Gattung *Neisseria* faßt eine Gruppe von eng verwandten unbeweglichen gram-negativen Diplokokken zusammen, deren hauptsächlicher natürlicher Wirt der Mensch ist (Vedros, 1987). Sie umfaßt die Kommensalen wie *Neisseria lactamica*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria flava*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria sicca* und *Neisseria polysaccharea*, die asymptomatisch die Schleimhäute besiedeln. Erkrankungen werden durch die Kommensalen nur äußerst selten verursacht. Hingegen

sind die humanpathogenen Spezies *N. meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae* (die Gonokokken) von weltweiter Bedeutung (Peltola, 1983; Anon., 1996). Auf DNA-Ebene sind *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* eng miteinander verwandt (Kingsbury, 1967; Guibourdenche *et al.*, 1996). Die Homologie zwischen ihren "housekeeping" Genen beträgt ungefähr 98% (Berish *et al.*, 1990; Zhou and Spratt, 1992; Feil *et al.*, 1996), so daß man sie normalerweise in einer Spezies zusammenfassen würde. Die stark unterschiedlichen klinischen Krankheitsbilder und verschiedenen Orte ihrer Besiedlung (siehe Kapitel 1.2) rechtfertigen aus medizinischer Sicht aber eine Unterteilung in zwei Spezies. Gonokokken werden im Gegensatz zu den den Nasen-Rachen-Raum besiedelnden Meningokokken meist im Urogenital-Trakt gefunden. Die Trennung wird auch von MLEE-Daten unterstützt, die Meningokokken und Gonokokken eindeutig unterscheiden (Vázquez *et al.*, 1993). Zusätzlich exprimiert *N. meningitidis* eine Polysaccharid-Kapsel, die RTX-Toxine und eine Rotamase, die alle nicht in *N. gonorrhoeae* gefunden wurden (Tinsley and Nassif, 1996).

1.2 Klinisches Krankheitsbild von *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis*

N. gonorrhoeae wurde 1879 von dem Arzt Dr. Albert Neisser als der Erreger der Gonorrhöe entdeckt (Neisser, 1879). Nach ihm wurde die Gattung als *Neisseria* benannt. Erste zuverlässige Beschreibungen über eine epidemische cerebrospinale Meningitis gab Vieusseux im Jahr 1806 (Vieusseux, 1806). Der dafür verantwortliche Erreger wurde erst 1887 von Anton Weichselbaum in Wien entdeckt (Weichselbaum, 1887). Er isolierte ein Bakterium aus dem Exudat der Hirnhäute und der Flüssigkeit der Hirnkammern von sechs an den Symptomen der cerebrospinalen Meningitis gestorbenen Patienten und nannte es *Diplokokkus intracellularis meningitidis*. Neun Jahre nach Weichselbaums Entdeckung wurde der Erreger aus der Cerebrospinalflüssigkeit von akut an Meningitis erkrankten Patienten (Heubner, 1896) und zeitgleich aus dem Nasenraum (Kiefer, 1896) isoliert. Aufgrund der engen Verwandtschaft mit der Spezies *N. gonorrhoeae* wurden Meningokokken wenig später in die Gattung *Neisseria* eingeordnet (Wollstein, 1907). Das Bakterium liegt ebenfalls wie *N. gonorrhoeae* meist gepaart kokkenförmig vor (Diplokokkus), hat einen Durchmesser von 0,6-1,0 µm, wächst optimal unter aeroben Bedingungen mit 5% CO₂ bei 37° C und ist Oxidase-positiv. Glukose wird von beiden pathogenen *Neisseria*-Spezies fermentiert, *N. meningitidis* kann zusätzlich Maltose verwerten.

Neuere Studien zeigen, daß je nach geographischer Lage 10-15% der Bevölkerung Meningokokken asymptomatisch in ihrem Nasen-Rachenraum tragen können (Cartwright *et al.*, 1987; Hassan-King *et al.*, 1988; Caugant *et al.*, 1994). Sehr hohe

Trägerraten (zwischen 40 und 86%) wurden unter Militärrekruten und 1992 unter Mekka-Pilgern beobachtet (Aycock and Mueller, 1950; Fraser *et al.*, 1973; al-Gahtani *et al.*, 1995). Dieser passive Trägerstatus kann mehrere Wochen oder Monate andauern (Cartwright, 1995), ohne daß es zu einer Erkrankung kommt. Aus ungeklärten Gründen kann es zum Ausbruch einer systemischen Infektion kommen, die bei einem ungünstigen Verlauf innerhalb von 24-48 Stunden zum Tode des Erkrankten führen kann (Steven and Wood, 1995). Die Todesrate beträgt zwischen 5-25% und steigt auf 40% bei der fulminanten perakuten Meningokokkämie, der schwersten Form der Erkrankung. Nach einem Eintritt in die Blutbahn kann der Meningokokkus die Blut-Hirnschranke überwinden und eine Entzündung der Hirnhäute verursachen. Häufig ist die Meningokokken-Meningitis durch ein plötzliches Auftreten von starken Kopfschmerzen, Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Lichtempfindlichkeit und Nackenstarre charakterisiert (Steven and Wood, 1995). Neurologische Anzeichen beinhalten Benommenheit, Delirium und schließlich das Koma. Eine bakterielle Meningitis kann auch von anderen Organismen wie *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes* und *Mycobacterium tuberculosis* verursacht werden. Keiner dieser Erreger verursacht jedoch epidemische Meningitis.

Durch Meningokokken verursachte Infektionen können schwer zu diagnostizieren sein, da es neben der Meningitis auch andere Formen des Krankheitsbildes gibt wie die fulminante Sepsis (Hautfäulnis), hämorrhagische Hautschädigungen von einigen Zentimetern Durchmesser, Pharyngitis, Urethritis, Vaginitis, Konjunktivitis, Arthritis oder Perikarditis.

1.3 Serologische Klassifizierung

Neben der medizinischen Relevanz ist *N. meningitidis* auch für das Studium biologischer Phänomene geeignet. *N. meningitidis* ist natürlich transformierbar (Catlin, 1960) und besitzt eine sogenannte epidemische Populationsstruktur (Maynard Smith *et al.*, 1993). Es wird eine hohe Variabilität der Oberflächenantigene der pathogenen *Neisseria* Spezies beobachtet (Griffiths *et al.*, 1990; Achtman *et al.*, 1992; Feavers *et al.*, 1992; Hobbs *et al.*, 1994; Lomholt *et al.*, 1995). Viele Antigene können an- oder ausgeschaltet werden (Stern *et al.*, 1986; Stern and Meyer, 1987; Aho *et al.*, 1991; Jonsson *et al.*, 1991; Jennings *et al.*, 1995; Seifert, 1996; Hammerschmidt *et al.*, 1996a; Hammerschmidt *et al.*, 1996b) oder in der Stärke der Expression reguliert werden (Sarkari *et al.*, 1994). Die serologische Klassifizierung von Meningokokken beruht auf der Variabilität von Oberflächenantigenen und ist bis heute eine der wichtigsten Methoden, Meningokokken zu unterscheiden. Insgesamt sind 13 Serogruppen bekannt, von denen nur fünf (A, B, C, Y und W-135) eine Erkrankung

verursachen. Innerhalb dieser Serogruppen gibt es aber eine beträchtliche Variabilität. Damit erwies sich diese Einteilung als unzureichend für epidemiologische Studien. Daher wurde eine feinere Differenzierung in Serotypen und Serosubtypen, basierend auf der serologischen Reaktion von Oberflächenantigenen mit monoklonalen Antikörpern angestrebt (Frasch *et al.*, 1985). Die Serotypisierung beruht auf der Erkennung von Klasse 2- und 3- und die Serosubtypisierung auf den Klasse 1-Außenmembranproteinen (Porine). Ein Stamm, der serologisch klassifiziert wurde, wird entsprechend der Reihenfolge Serogruppe:Serotyp:Serosubtyp zum Beispiel mit A:4:P1.20,9 bezeichnet (Frasch *et al.*, 1985). Andere Oberflächenantigene wie z. B. die Pili und die Opa-Proteine können innerhalb eines Stammes variieren und sind daher zur Typisierung nicht geeignet (Frasch *et al.*, 1985).

Die serologische Klassifizierung von Meningokokken ist bis heute eine nützliche Methode, epidemische Klone schnell zu identifizieren. Die Variabilität innerhalb einer natürlichen Population läßt sich mit der Serologie aber nicht untersuchen, da die Unterscheidung von Stämmen nur auf wenigen Epitopen in Oberflächenproteinen beruht. Oberflächenproteine können außerdem bezüglich des menschlichen Immunsystems unter Selektionsdruck stehen. Dies hat zur Folge, daß bestimmte Mutationen und Rekombinationsereignisse favorisiert werden können und es zu Widersprüchen zwischen der serologischen und genetischen Verwandtschaft der Isolate kommen kann (siehe auch Kapitel 1.5.).

1.4 Populationsstrukturen der Neisserien

Die ersten Untersuchungen von Populationsstrukturen wurden von Milkman und Selander Gruppen (Milkman, 1973; Selander and Levin, 1980; Caugant *et al.*, 1981; Ochman *et al.*, 1983; Ochman and Selander, 1984; Selander *et al.*, 1986) durchgeführt. Sie benutzten die MLEE, um chromosomale Variationen in mehreren unabhängigen genetischen Loci von vielen Stämmen einer Population zu erfassen. Bei der MLEE werden elektrophoretische Varianten (Allele) verschiedenerer zytoplasmatischer Enzyme mit spezifischen biochemischen Nachweisreaktionen auf nativen Stärkegelen detektiert. Wenn Variationen in Proteinen auftreten, sind diese häufig mit Ladungsänderungen verbunden, die dann in unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten in elektrischen Feld resultieren. Somit können die Varianten des gleichen Enzyms an verschiedenen Positionen des Gel detektiert werden. Bei allen untersuchten Enzymen werden dann die gefundenen Allele durchnummeriert. Die Stämme werden dann mit den für sie charakteristischen Allelkombinationen angegeben. So können die untersuchten Bakterien in Elektrophoretischen Typen (ET)

gruppiert werden. Zur MLEE werden ausschließlich "housekeeping" Proteine, d.h. solche Proteine, die am Metabolismus der Zelle beteiligt sind, ausgewählt. Diese Enzyme sind keinem Selektionsdruck durch das Immunsystem ausgesetzt, ihre Evolution wird daher als neutral angesehen.

Neben der wohl bis jetzt am häufigsten angewandten MLEE-Technik sind weitere auf DNA-Basis beruhende Methoden entwickelt worden, mit denen Meningokokken klassifiziert und epidemiologisch untersucht wurden. Hier sind Ribotypisierungen (Auriol *et al.*, 1995), RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*) (Woods *et al.*, 1994; Bart *et al.*, 1998), Pulsfeldgelelektrophorese-Typisierungen (Bygraves and Maiden, 1992; Yakubu *et al.*, 1994; Yakubu and Pennington, 1995) und die Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP)-Analysen verschiedener Gene (Fox *et al.*, 1991; Lomholt *et al.*, 1992; Peixuan *et al.*, 1995; Guibourdenche *et al.*, 1997) zu nennen. Die neueste und konservativste Methode der DNA-Typisierung ist der Multi-Locus-Sequence-Typing-Ansatz (MLST), bei dem aus sieben "housekeeping"-Genen ein jeweils ca. 550 bp langer Bereich sequenziert wird (Maiden *et al.*, 1998). Aufgrund der dabei gefundenen unterschiedlichen Allele lassen sich die untersuchten Stämme in einen genetischen Baum einordnen, der sich bei 107 untersuchten *N. meningitidis* Teststämmen sehr gut mit den zuvor erstellten MLEE- und RAPD-Bäumen deckt. Diese leicht anzuwendende und unproblematische Methode läßt sich auch sehr leicht auf andere Organismen wie z.B. *Streptococcus pneumoniae* (Enright and Spratt, 1998) übertragen.

Eine Gruppe von Bakterienstämmen, die bei einer MLEE- oder MLST-Bestimmung eine enge Verwandtschaft zeigen, wird als *Klon* oder *klonale Gruppe* bezeichnet. Im strengen Sinne ist ein Klon eigentlich eine Gruppe von identischen Bakterien. Während der Replikation dieser Bakterien kommt es gelegentlich zu Mutationen in den Genen. Diese Mutationen können ohne Einfluß auf die Funktion eines Proteins bleiben (neutrale Mutationen) oder die Funktion eines Proteins beeinflussen (adaptive Mutationen) (Moxon *et al.*, 1994; Foster, 1995; Shapiro, 1997). Da hier das genetische Material und damit die Mutationen nur von Mutter- zu Tochterzellen weitergegeben werden, nennt man diesen Prozeß *vertikalen Gentransfer* (Maiden, 1993). Neu entstandene und mutierte Stämme einer Population unterliegen der Selektion, bei der viele sich nicht durchsetzen, wenige aber favorisiert werden. Durch ihren Selektionsvorteil können sich diese Klone schnell verbreiten, was dadurch einen Verdrängung von anderen Klonen und damit eine Reduktion der genetischen Vielfalt zur Folge hat. Diesen von Atwood *et al.* erstmals untersuchten Prozeß nennt man *periodische Selektion* (Atwood *et al.*, 1951; Dykhuizen, 1992; Zambrano *et al.*, 1993). Dieses Prinzip führt zum Vorhandensein von nur wenigen Klonen in einer Population.

Eine solche Population wird als *klonal* bezeichnet und ist durch eine nicht zufällige Verteilung von Allelen charakterisiert. Stabile Klone existieren über eine lange Zeitspanne und können sich weltweit verbreiten.

In Bakterienpopulationen kommt es aber auch zum Austausch von genetischem Material zwischen Geschwisterzellen, dem *horizontaler Gentransfer*. Die klonale Struktur einer Population wird hier durch die Rekombinationsraten der DNA beeinflusst. Sind Rekombinationen im Vergleich zu Mutationen sehr häufig, so führt dies zum Zusammenbruch der klonalen Struktur. Solche Populationen werden *panmiktisch* genannt (Maynard Smith *et al.*, 1993). Einzelne Klone können hier nicht entstehen, da ein Bakterium einen durch eine Mutation erhaltenen Selektionsvorteil über Rekombinationen sofort an Geschwisterzellen weitergibt. Rekombinationen führen aber nicht notwendigerweise zur Unterbrechung einer klonalen Population, wenn nur kleine DNA Fragmente relativ selten übertragen werden (Milkman and Bridges, 1990; Maynard Smith *et al.*, 1993; Maiden, 1993). Je nach Häufigkeit von Rekombinationsereignissen findet man in der Natur unterschiedliche bakterielle Populationsstrukturen.

1.5 Populationsstrukturen von *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae*

N. meningitidis besitzt eine komplexe Populationsstruktur. Die hier untersuchten Meningokokken der Serogruppe A, Subgruppe IV-1 und Serogruppe C, ET-37 Komplex zeigen ein völlig verschiedenes Ausbreitungsverhalten. Man unterscheidet generell endemische, hyper-endemische, epidemische und pandemische Erkrankungen (Maiden and Feavers, 1995). Endemische Erkrankungen kommen vorzugsweise in industrialisierten Ländern vor und zeigen eine Inzidenzrate von 0,2 Fällen pro 100.000 Einwohner in einem bestimmten Gebiet über einen längeren Zeitraum. Bei hyper-endemischen Erkrankungen erfolgt ein Ausbruch in einem kleineren Gebiet mit Inzidenzraten von jährlich 10-50 Fällen pro 100.000 Einwohner und dauert meist über eine längere Periode an (Maiden and Feavers, 1995). Am schwerwiegendsten für die Bevölkerung sind Epidemien (Peltola, 1983). Sie betreffen große geographische Gebiete und die Ausbreitung der Infektionen erfolgt sehr schnell (Lapeyssonnie, 1963; Achtman, 1990; Wang *et al.*, 1992; Moore, 1992). Die Inzidenzraten können bis zu 1000 Fälle pro 100.000 Einwohner erreichen (Lapeyssonnie, 1963; Moore, 1992). Die Verbreitung einer Meningokokken-Gruppe über mehrere Kontinente durch fortlaufende Epidemien oder Ausbrüche in verschiedenen Ländern bezeichnet man als *Pandemie* (Olyhoek *et al.*, 1987; Achtman, 1991; Wang *et al.*, 1992).

Die Serogruppe A Meningokokken werden derzeit in die elf Subgruppen I, II, III, IV-1, IV-2, V, VI, VII, VIII (Wang *et al.*, 1992), IX (Bart *et al.*, 1998) und X (M. Achtman, pers. Mitteilung) eingeteilt. Die hier hauptsächlich untersuchten Stämme der Serogruppe A Subgruppe IV-1 verbreiteten sich zwischen 1981 und 1984 epidemisch in den westafrikanischen Ländern Gambia, Senegal, Mali und Burkina Faso (Olyhoek *et al.*, 1987; Crowe *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1992).

Meningokokken des ET-37 Komplexes sind häufig mit endemischen oder lokalisierten Ausbrüchen z.B. in Militärrekruten oder Studenten assoziiert (Wang *et al.*, 1993; Imrey *et al.*, 1995). Sie verursachten hauptsächlich endemische Erkrankungen in den 80er Jahren in den USA (Pinner *et al.*, 1991), Italien (Mastrantonio *et al.*, 1991), und Mali (Wang *et al.*, 1991). Sie gehören hauptsächlich der Serogruppe B oder C an (Caugant *et al.*, 1987).

Mehrere Stammsammlungen von *N. meningitidis* wurden mittels MLEE untersucht (Caugant *et al.*, 1986; Olyhoek *et al.*, 1987; Caugant *et al.*, 1987; Crowe *et al.*, 1989; Moore *et al.*, 1989; Caugant *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1992). Dabei wurden in Isolaten der Serogruppen B und C mehrere eng zusammenhängende Gruppen (Kluster) wie z.B. der ET-5 Komplex, der A4 Cluster, die *Lineage 3* und der ET-37 Komplex identifiziert (Caugant *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1993; Scholten *et al.*, 1994). Es sind aber auch Bakterien mit anderen Serotypen in diesen Klustern gefunden worden, was auf eine hohe Rekombinationsrate innerhalb der Cluster hinweist (Caugant *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1993; Scholten *et al.*, 1994). In der Serogruppe A wurden im Vergleich dazu wesentlich weniger Heterogenitäten gefunden. Sie bildet eine eigene phylogenetische Gruppe (Caugant *et al.*, 1987).

Ein genetischer Baum mit allen derzeit bekannten Subgruppen ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Hier ist ein Satz von 107 Referenz-Bakterien mittels MLST erneut auf ihre Zugehörigkeit zu den verschiedenen Klustern überprüft worden, um einen Vergleich der MLST mit den MLEE-Daten zu ermöglichen. Diese Abbildung ist als Überblick über die derzeit bekannten *N. meningitidis* Subgruppen gedacht.

Einleitung

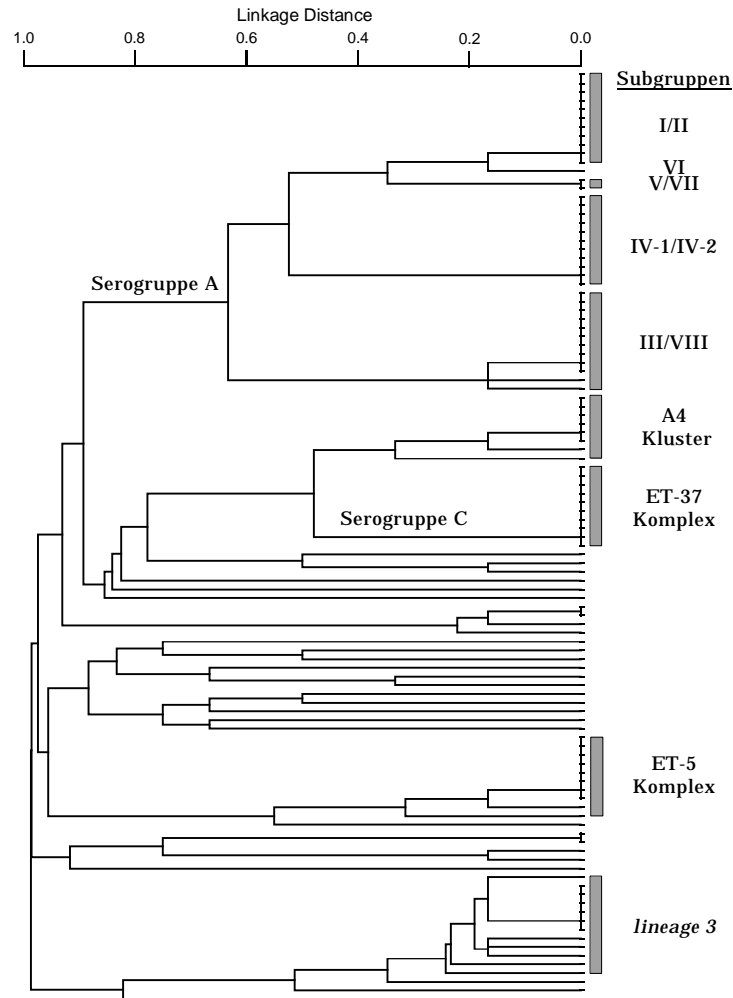


Abbildung 1.1: **Genetischer Abstand der bekannten Subgruppen aus *N. meningitidis*.**

Dieser Baum wurde nach MLST von 6 Genfragmenten erstellt. Die Skala oben entspricht der *Linkage distance*, die MLEE-Gruppen sind als graue Rechtecke dargestellt. (aus Maiden *et al.*, 1998).

Um die Klonalität einer Population zu bestimmen, analysierten Maynard Smith *et al.* die Populationsstruktur bei einer Reihe von Bakterienspezies mit einem statistischen Test, dem sog. Index der Assoziation (I_A). Dieses Verfahren berechnet die Varianz in der genetischen Entfernung zwischen allen Paaren der untersuchten Isolate. Dann wird die beobachtete Varianz mit der bei einer zufälligen Verteilung erwarteten Varianz von Allelen in verschiedenen Loci verglichen (Maynard Smith *et al.*, 1993). Als "*Linkage disequilibrium*" wird die nicht zufällige Verteilung von Allelen in einer Population bezeichnet. Kombinationen von bestimmten Allelen werden bei einem "*Linkage disequilibrium*" häufiger beobachtet als statistisch erwartet. Man kann nun den "*index of association*" (I_A) berechnen, dessen Größe einen Rückschluß auf ein "*Linkage disequilibrium*" erlaubt (Whittam *et al.*, 1983; Whittam, 1995). Je größer der Wert von I_A ist, desto unterschiedlicher ist die beobachtete von der erwarteten Varianz und spiegelt ein "*Linkage disequilibrium*", d.h. eine klonale Population wider. Maynard

Smith *et al.* beobachteten Werte für I_A zwischen 0,04 bei *N. gonorrhoeae* und 18,35 bei *Pseudomonas syringae* (Maynard Smith *et al.*, 1993). Der I_A von *N. meningitidis* betrug für den gesamten Datensatz von 688 klinischen Isolaten, die weltweit zwischen 1970 und 1984 isoliert wurden, $1,96 \pm 0,05$. Dieser Wert weist stark auf ein "Linkage disequilibrium" in der Population hin. Der Wert wurde aber stark reduziert, wenn pro ET nur ein Stamm in die Analyse einbezogen wurde ($I_A = 0,21 \pm 0,08$). Eine Analyse des Datensatzes von Caugant *et al.* (Caugant *et al.*, 1987) mit einem Vertreter aus jedem ET ergab sogar einen Wert von $-0,14 \pm 0,17$, ein klarer Beweis für eine nicht klonale Population. Im Gegensatz dazu betrug der I_A für den gesamten Datensatz der Serogruppe A Stämme von Wang *et al.* (Wang *et al.*, 1992) $2,40 \pm 0,08$ und bei Reduzierung auf einen Vertreter pro ET noch $1,35 \pm 0,14$ (Spratt *et al.*, 1995).

Wenn sich ein erfolgreicher Klon bei einem Ausbruch oder einer hyperendemischen Situation schnell verbreitet, können trotzdem klonale Strukturen temporär entstehen. Eine solche Überrepräsentation dieses Klons erweckt den Anschein, daß diese untersuchte Population klonal ist. Diese bei *N. meningitidis* gefundene Populationsstruktur wird daher als epidemisch klonal bezeichnet (Maynard Smith *et al.*, 1993). Eine Erklärung für die Klonalität von Serogruppe A im Gegensatz zu Serogruppe B und C Meningokokken könnte eine unterschiedliche Epidemiologie sein. Niedrigere Serogruppe A-Trägerraten in der Zeit zwischen Epidemien und die durchschnittlich kürzere Trägerdauer im Vergleich zu Serogruppe B und C (Blakebrough *et al.*, 1982; Hassan-King *et al.*, 1988; Cartwright, 1995) könnten die Chance der häufigen Rekombination und eine damit verbundene Auflösung der klonalen Struktur verringern. Eine andere mögliche Erklärung wäre ein genetischer Unterschied des Transformationssystem von Serogruppe A- im Vergleich mit Serogruppe B- oder C- Meningokokken.

Im Vergleich dazu besitzt *N. gonorrhoeae* eine nicht-klonale Populationsstruktur (Maynard Smith *et al.*, 1993; Vázquez *et al.*, 1993; O'Rourke and Stevens, 1993) mit einem I_A von $0,04 \pm 0,09$ (Maynard Smith *et al.*, 1993), was auf häufige Rekombination zwischen Gonokokken in der Natur hinweist. Diese nicht-klonale Struktur wird durch den Widerspruch zwischen den MLEE Daten oder der Serologie der Stämme bestätigt (De La Fuente and Vázquez, 1994).

1.6 Mikroevolution in *N. meningitidis*

Im Gegensatz zu normalen Evolutionsstudien in Prokaryonten, die die phylogenetische Veränderungen über Millionen von Jahren untersuchen, bezeichnet der Begriff Mikroevolution das Auftreten von genetischen Varianten, die in einer Population

innerhalb von Jahren oder Jahrzehnten auftreten (Achtman, 1994; Hobbs *et al.*, 1994). Um überhaupt Mikroevolution studieren zu können, müssen große und gut definierte Stammsammlungen zur Verfügung stehen. Die Analyse der Mikroevolution muß auf DNA-Basis geschehen, da viele der genetischen Veränderungen keine phänotypischen Unterschiede verursachen. Verschiedene Subgruppen von Meningokokken wie z.B. die Serogruppe A sind gut geeignet, um Mikroevolution zu studieren. Die klonale Ausbreitung der Serogruppe A erfolgt in Form von Epidemien, die größtenteils gut charakterisiert sind. Aufgrund des medizinischen Interesses gibt es aus den einzelnen Epidemien viele repräsentative Isolate, die in einer umfangreichen Stammsammlung am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin im Labor von Dr. Mark Achtman zusammengefaßt sind. Die Mikroevolution läßt sich gut an Außenmembranproteinen untersuchen, da diese als Virulenzfaktoren ständigen Veränderungen und Anpassungen an den Wirt unterworfen sind.

1.7 Außenmembranproteine, die für die Eisenaufnahme notwendig sind

Da Bakterien Eisen zum Wachstum benötigen, haben sie verschiedene Strategien zur Eisenaufnahme entwickelt (Guerinot, 1994). Die freie Konzentration an Eisen im Blut oder auf Schleimhäuten ist sehr gering, extrazelluläres Eisen liegt meist an den Glykoproteinen Transferrin (im Blut) oder Lactoferrin (auf Schleimhäuten) gebunden vor. Beide Proteine besitzen zwei Bindungsstellen mit einer hohen Affinität ($\sim 10^{20}$) zu den Fe^{3+} -Ionen und könnten über eine Genduplikation entstanden sein (Anderson *et al.*, 1989). Um nun an die für das Wachstum der Bakterien notwendigen Eisenionen zu gelangen, sind verschiedene Mechanismen der Eisenaufnahme etabliert worden.

Der am besten verstandene Mechanismus nutzt kleine ca. 400 Da große anorganische eisenspezifische Liganden, die Siderophore genannt werden (Guerinot, 1994). Diese werden über die Membran ausgeschleust, binden Eisenionen und können dann wieder über spezielle Rezeptoren aufgenommen werden. Diese Siderophore müssen dabei mit den Transferrin und Lactoferrin-Molekülen konkurrieren, dies setzt eine gleiche oder höhere Affinität der Siderophor-Bindungsstellen zu Fe^{3+} voraus.

Pathogene Neisserien produzieren keine Siderophore, sie haben die Fähigkeit entwickelt, menschliches Transferrin und Lactoferrin an Außenmembran-Rezeptorproteine zu binden und das in diesen Glykoproteinen gebundene Eisen freizusetzen und zu nutzen (Cornelissen and Sparling, 1994; Gray-Owen and Schryvers, 1996; Genco and Desai, 1996).

1.7.1 Die Transferrin-bindenden Proteine (TbpAB)

Der Rezeptor zur Eisenaufnahme ist ein Komplex aus den zwei Proteinen TbpA und TbpB. Sie werden von *tbpA* und *tbpB* kodiert, die in einem Operon lokalisiert sind (Cornelissen *et al.*, 1992; Wilton *et al.*, 1993; Legrain *et al.*, 1993). Der *tbpAB*-Komplex wird *in vivo* exprimiert, TbpA und B wirken im Menschen immunogen (Ferreirós *et al.*, 1994; Ala'Aldeen *et al.*, 1994). In Gegenwart von hohen Eisenkonzentrationen ist die Expression von *tbpA* und *tbpB* ausgeschaltet, dieser Vorgang wird wahrscheinlich über das Fur-Protein reguliert, das als Eisenkonzentrationssensor wirkt (Legrain *et al.*, 1993) und eine Bindungsstelle im *tbpAB*-Promotor besitzt (Cornelissen and Sparling, 1994).

TbpA ist ungefähr 100 kDa (Cornelissen *et al.*, 1992; Legrain *et al.*, 1993) und TbpB 65-88 kDa groß (Griffiths *et al.*, 1993; Rokbi *et al.*, 1993; Legrain *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1994). TbpA zeigt Homologie zu der Familie der integralen Außenmembran-Rezeptoren, die TonB abhängig sind (Cornelissen *et al.*, 1992; Legrain *et al.*, 1993). Es sind ein C-terminales Phenylalanin und typische amphipatische β -Stränge vorhanden, diese sind auch für andere Außenmembranproteine charakteristisch (Struyvé *et al.*, 1991; Tommassen *et al.*, 1994). TbpB ist ein Lipoprotein, in dem transmembrane Bereiche nicht identifiziert werden konnten (Legrain *et al.*, 1993). Bei der Eisenaufnahmen aus dem Medium soll TbpB für die Unterscheidung zwischen beladenem und unbeladenem Transferrin zuständig sein, während TbpA einen Kanal für das Eisenion bildet. Nach neuesten Untersuchungen kann TbpA vielleicht ein Dimer bilden, deren Poren mit dem Abstand der beiden Eisenbindungsstellen des humanen Transferrins übereinstimmen (Boulton *et al.*, 1998). Transferrin ist jedoch *in vivo* nur zu 30% mit Eisen beladen, so daß es unwahrscheinlich ist, daß beide Bindungsstellen mit Eisen besetzt sind (Welch, 1992). Somit ist bei einem TbpA-Dimer immer ein Eisenion des Transferrins direkt über einer Pore des TbpAs positioniert. An das TbpA-Dimer ist ein TbpB-Protein assoziiert, was in Abbildung 1.2 dargestellt ist (Cornelissen and Sparling, 1994). Die Bindung von Transferrin induziert eine Konformationsänderung im TbpAB-Komplex. Anschliessend wird der Komplex über TonB (Larsen *et al.*, 1999) aktiviert, was zu der Eisensfreisetzung aus Transferrin und der Öffnung der Poren in den TbpAs führt. Das Eisen wird über die Membran transportiert und das leere Transferrin freigesetzt. Im Periplasma wird das Eisen von FbpA, dem *ferric binding protein*, gebunden (Gomez *et al.*, 1998) und soll über eine postulierte Eisen-Permease in das Zytoplasma eingeschleust werden. Ein sehr ähnliches System ist für die Aufnahme von Eisen über Lactoferrin beschrieben (siehe Kapitel 1.7.2).

Die unterschiedlichen Molekulargewichtsgrößen der einzelnen TbpB-Proteine verschiedener Stämme deuten auf eine stark heterogene Struktur hin (Griffiths *et al.*, 1990). Bei Sequenzvergleichen zwischen *tbpB*-Genen zeigen sich Unterschiede von bis zu 53%. Basierend auf ihre antigenen und genetischen Eigenschaften wurden die *tbpBs* in zwei Klassen eingeteilt (Rokbi *et al.*, 1993; Rokbi *et al.*, 1995). Klasse I Stämme besitzen ein kleines (1,7 kb) *tbpB* Gen, während Klasse II Stämme ein großes (2,1 kb) *tbpB*-Gen haben. Sequenzvergleiche zeigen, daß der Größenunterschied durch eine sehr heterogene variable Region zustande kommt, die hypervariable Region genannt wird (Rokbi *et al.*, 1993; Rokbi *et al.*, 1995). Diese hypervariable Region selber offenbart bei einem Vergleich von mehreren Stämmen sechs konservierte und sieben variable Regionen, die Mosaikstrukturen zeigen (Rokbi *et al.*, 1995). Trotz der hohen Variabilität gibt es in den TbpBs eine konservierte funktionelle N-terminale Domäne (ca. 270-290 Aminosäuren lang), die an der Bindung von Transferrin beteiligt ist (Vonder Haar *et al.*, 1994; Cornelissen *et al.*, 1997). In Gonokokken wurden nur Klasse II *tbpB*-Gene gefunden. Ein Vergleich der TbpBs zwischen Gonokokken ergibt Identitäten auf Aminosäurebasis von 69 bis 84%. Bei Sequenzvergleichen zwischen *tbpB*-Genen aus *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* konnten sechs konservierte Regionen identifiziert werden, die durch variable Regionen unterbrochen sind (Cornelissen *et al.*, 1997).

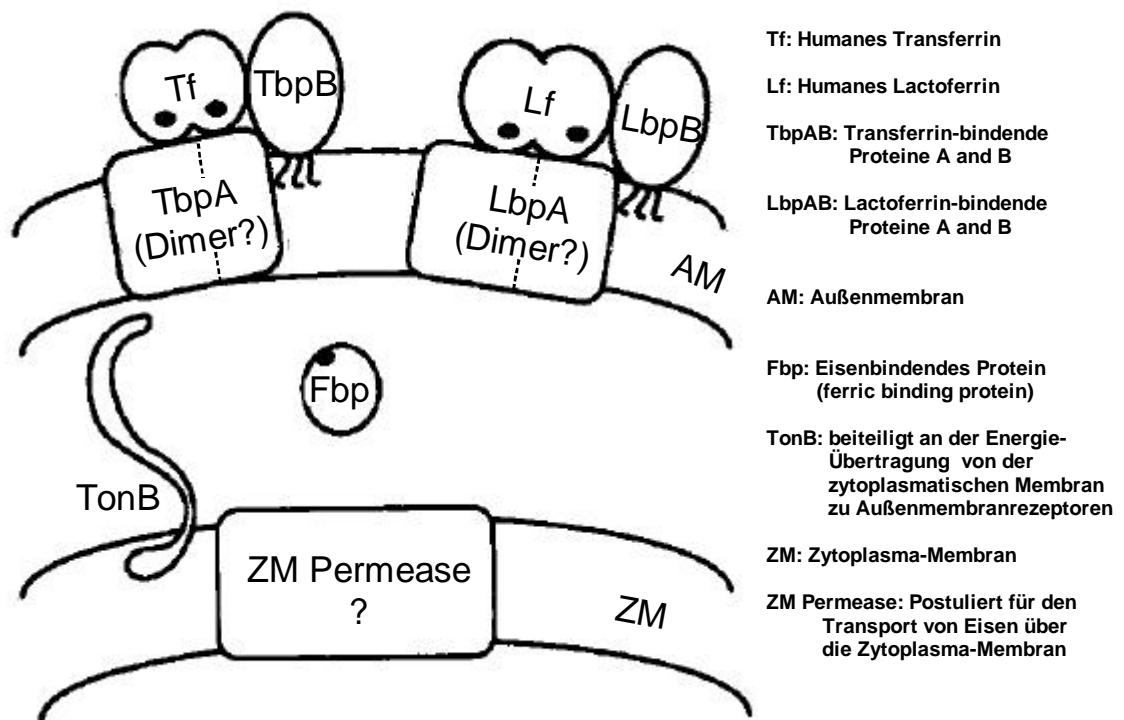


Abbildung 1.2: **Modell der Eisenaufnahme über TbpAB oder LbpAB bei Meningokokken.** Fe^{3+} -Ionen sind als schwarze Punkte dargestellt (verändert nach Cornelissen and Sparling, 1994).

1.7.2 Die Lactoferrin bindenen Proteine (LbpAB)

Das Lactoferrin bindene Protein LbpA bindet spezifisch humanes Lactoferrin (Schryvers and Morris, 1988; Pettersson *et al.*, 1994) und hat ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa (Pettersson *et al.*, 1994; Biswas and Sparling, 1995). Das kodierende Gen *lbpA* (früher *iroA*) wurde kloniert und sequenziert (Pettersson *et al.*, 1993; Biswas and Sparling, 1995). LbpA zeigt Homologie zu TbpA, ein zwei-dimensionales Strukturmodell weist 13 hydrophile Schleifen auf und durchquert die Membran 26 mal (Pettersson *et al.*, 1993). Ein Sequenzvergleich zwischen den zwei bekannten *lbpA* Genen aus Meningokokken (Serogruppe B Stämme) zeigte eine 95% Homologie auf Aminosäurebasis. 94% Homologie konnte bei LbpA Sequenzen zwischen *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* beobachtet werden (Biswas and Sparling, 1995). Variable Regionen konnten in den exponierten Schleifen und konservierte Regionen in den transmembranen Bereichen gefunden werden (Pettersson *et al.*, 1993). Neben *lbpA* liegt *lbpB*, das ein 77.5 kDa großes Protein kodiert, welches ähnlich zu *tbpB* ist (Pettersson *et al.*, 1998). Bei der Charakterisierung zeigte sich, daß der LbpAB-Komplex sehr ähnlich dem TbpAB-Komplex funktioniert. Auch hier sitzt LbpB auf der Aussenmembran und ist für die bevorzugte Bindung des eisenbeladenen Lactoferrins

zuständig. LbpA soll auch in diesem System einen Kanal für das Eisenion bilden und könnte analog zu TbpA *in vivo* als ein Dimer vorliegen.

1.8 Die Opa-Proteine

Die Opa-Proteine bilden eine Familie von eng verwandten Außenmembranproteinen. Ihren Namen erhielt diese Familie durch die Beobachtung, daß deren Expression milchige oder trübe (opaque) Gonokokken-Kolonien erzeugte (Swanson, 1978). Opaque Kolonien zeigen eine erhöhte Adhäsion zwischen den einzelnen Diplokokken, die durch proteolytische Enzyme aufgehoben werden kann. Der Grad der "Opaqueheit" der Kolonien korreliert mit der Anzahl der exprimierten Opa-Proteine (Swanson, 1990). Das Molekulargewicht von Opa-Proteinen kann von 26 bis 32 kDa variieren (Poolman *et al.*, 1980; Achtman *et al.*, 1988), was ein Zeichen für ihre Heterogenität ist. Der isoelektrischen Punkt der Opa-Proteine liegt zwischen pH 8,8 und 10 (Blake and Gotschlich, 1984; Achtman *et al.*, 1988). Sie sind hitzemodifizierbar, d.h. bei 100° C denaturierte Fraktionen wandern anders in der SDS-PAGE als die bei 37° C gelösten Fraktionen. Anhand ihres Verhaltens während der Gelfiltration läßt sich bei Opa-Proteinen eine trimere Struktur feststellen (Achtman *et al.*, 1988). Mehrere Opa-Proteine können von einem Stamm gleichzeitig exprimiert werden (Swanson, 1982; Aho *et al.*, 1991). Das Expressionsmuster der Opa-Proteine variiert bei Isolaten, die gleichzeitig bzw. konsekutiv von verschiedenen Stellen eines Erkrankten wie Blut, CSF usw. entnommen wurden (Tinsley and Heckels, 1986; Woods and Cannon, 1990). Dies zeigt die Bedeutung der Opa-Proteine während einer Infektion. Die Fähigkeit, die Expression von einzelnen Opa-Proteinen spontan an- und abzuschalten, nennt man *Phasenvariation* (Stern and Meyer, 1987). Die Grundlage für die Phasenvariation wurde in dem hydrophoben Bereich der Signalpeptidsequenz der *opa*-Gene gefunden. Dieses kodiert eine variable Anzahl von CTCTT-Pentamereinheiten. Ein Opa-Protein wird nur dann korrekt translatiert und exprimiert, wenn die Anzahl der CTCTT-Pentamereinheiten (7-18 bei sequenzierten Isolaten) zu dem richtigen Leserahmen führt (Stern *et al.*, 1986; Stern and Meyer, 1987; Aho *et al.*, 1991). Die variable Anzahl von Pentamereinheiten wird wahrscheinlich durch ein Gleiten der Polymerase auf den DNA-Strängen während der DNA-Replikation verursacht und wird als "*slipped strand mispairing*" bezeichnet (Murphy *et al.*, 1989; Belland *et al.*, 1989).

In Meningokokken wurden drei bis vier (Aho *et al.*, 1991; Hobbs *et al.*, 1994), in Gonokokken elf bis zwölf (Connell *et al.*, 1990; Bhat *et al.*, 1991; Bihlmaier *et al.*, 1991) über das Genom verstreute *opa* Loci identifiziert. *Southern*-Hybridisierungen zeigten ebenfalls zwei *opa* Loci in den Spezies *N. lactamica* und *N. flava* (Stern and

Meyer, 1987; Wolff and Stern, 1995), und einen *opa* Locus in *N. mucosa*, *N. subflava* und *N. sicca*. Je ein *opa* Gen wurde aus einem *N. sicca* und *N. flava* Stamm sequenziert, sie konnten auch mittels PCR in *N. lactamica*, *N. flavescens* und *N. polysaccharea* nachgewiesen werden (Wolff and Stern, 1995).

Die kodierende Region eines *opa* Gens ist zwischen 720 und 800 bp lang. Sequenzvergleiche der *opa* Gene ergaben am N-Terminus der kodierenden Region eine Signalpeptidsequenz. Der Genabschnitt, der für das reife Protein kodiert, zeigt viele polymorphe Stellen, die hauptsächlich in einer semivariablen (SV) und zwei hypervariablen Regionen (HV1 und HV2) auftreten (Aho *et al.*, 1991; Bhat *et al.*, 1991) (Abbildung 1.3). Diese Regionen können in ihrer Länge variieren, wodurch die unterschiedlichen Molekulargewichte zustande kommen. Die Bereiche zwischen diesen Regionen sind größtenteils konserviert und weisen hohe Homologie auf.

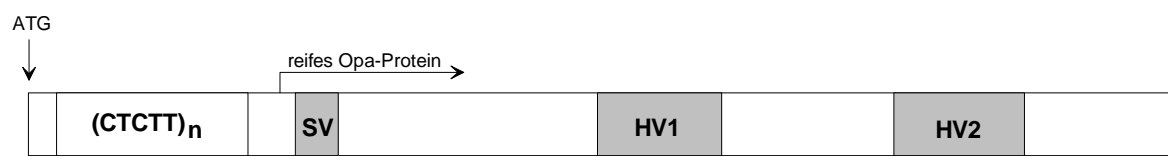


Abbildung 1.3: **Schematische Darstellung eines *opa* Gens.**

Die grauen Felder stellen die variablen Regionen im Gen dar, die weißen Bereiche die konservierten Regionen. Der unterstrichene Bereich kodiert das Signalpeptid des Opa Proteins, welches für den Transport des Proteins durch die innere Membran der Meningokokken verantwortlich ist. ATG ist das Anfangskodon des Gens. Der Bereich der repetitiven CTCTT-Pentamereinheiten gehört zum hydrophoben Teilstück der signalpeptidkodierenden Region. Die Anzahl der CTCTT-Einheiten entscheidet darüber, ob sich das Gen im Leserahmen befindet und es zu einer Expression des Opa Proteins kommen kann (nach Hobbs *et al.*, 1994).

Ein zwei-dimensionales Strukturmodell für Gonokokken Opa-Proteine sagt aufgrund von Hydrophobizitäts- und Sekundärstrukturanalysen acht transmembrane β -Stränge und vier oberflächenexponierten Schleifen voraus (Malorny *et al.*, 1998). Die drei variablen Regionen (SV, HV1 und HV2) befinden sich jeweils auf den Schleifen eins, zwei und drei. Die vierte Schleife ist stark konserviert. Die HV1- und HV2- Regionen sind für die Immunogenität der Opa-Proteine verantwortlich. Die Funktion von Opa-Proteinen während einer Infektion ist trotz Fortschritten in den letzten Jahren noch nicht vollständig aufgeklärt. Gonokokken, die Opa-Proteine exprimieren, zeigen eine erhöhte Adhäsion an viele verschiedene Epithelzelltypen (Lambden *et al.*, 1979; James *et al.*, 1980; Sugasawara *et al.*, 1983; Swanson, 1983; Bessen and Gotschlich, 1986) und an Leukozyten (Virji and Heckels, 1986; Rest and Shafer, 1989; Kupsch *et al.*, 1993; Dehio *et al.*, 1998). *E. coli* Zellen, die klonierte Opa-Proteine exprimierten, zeigten ebenfalls Adhäsion an menschliche Neutrophile (Belland *et al.*, 1992; Kupsch *et al.*, 1993). Eine an Endothel- und Epithelzellen vermittelte Adhäsion konnte bei den Meningokokken 5a, 5b und 5d Opa-Proteinen ebenfalls festgestellt werden (Virji *et al.*, 1993). Neben der Beobachtung, daß viele neisserielle Opa-Proteine eine Adhäsion an

menschliche Zellen verursachen, konnte für wenige andere Opa-Proteine die Fähigkeit, Invasion in Epithelzellen zu vermitteln, nachgewiesen werden (Makino *et al.*, 1991; Weel *et al.*, 1991; Kupsch *et al.*, 1993). Neuere Studien zeigten, daß die *N. gonorrhoeae* Opa-Proteine mit den Heparansulfat-Proteoglykan-Rezeptoren, den CD66-Rezeptoren und der Integrin-Rezeptor-Familie wechselwirken können (Meyer, 1999). Diese Interaktionen können neben der Internalisierung des Gonokokkus auch diverse Signalkaskaden in den Epithelzellen und Umordnungen im Zytoskellet stimulieren oder eine Zytokin/Chemokin-Freisetzung und Apoptose induzieren (Naumann *et al.*, 1999).

1.9 Genomische Organisation

Neue molekularbiologische Techniken ermöglichen es, ganze Chromosome von Bakterien sequenzieren zu können und damit die Dynamik von bakteriellen Genomen zu verstehen. Eine Reihe von Genomen wird zur Zeit sequenziert und analysiert (Tang *et al.*, 1998). Hier ist das Sanger-Center mit der Sequenzierung des Genoms von Z2491, dem Referenz-Stamm für die Serogruppe A, Subgruppe IV-1-Meningokokken (unter http://www.sanger.ac.uk/Projects/N_meningitidis/) zu nennen. Parallel dazu wird auch das Genom des Gonokokken-Stammes FA1090 von einer Gruppe um Bruce Roe (<http://dna1.chem.ou.edu/gono.html>) sequenziert. Beide Genome sind im Augenblick in der Phase der Komplettierung, wo die einzelnen großen Kontigs zusammengesetzt und annotiert werden. Für den neuesten Stand der Genomsequenzierungen ist die Web-Adresse <http://www.ebi.ac.uk/research/cgg/genomes.html> aufzusuchen.

Auch ohne vollständige Genomsequenzen zur Verfügung zu haben, erhält man aus physikalischen Restriktionskarten und Teilsequenzen von verschiedenen Stämmen und Spezies Einblicke in ihre Genomorganisation. Physikalische und genetische Karten gibt es von zwei *N. gonorrhoeae* Stämmen, FA1090 (Dempsey and Cannon, 1994) und MS11 (Bihlmaier *et al.*, 1991) und zwei *N. meningitidis* Stämmen, Z2491 (Serogruppe A, Subgruppe IV-1) (Dempsey *et al.*, 1995) und B1940 (Serogruppe B) (Gäher *et al.*, 1996). Die Genomgröße beträgt zwischen 2,2 und 2,3 Mb. Die genomische Organisation von pathogenen Neisserien unterscheidet sich beträchtlich von der von *E. coli* und *Salmonella*. Das *E. coli* Chromosom hat ein beträchtliches Maß an chromosomaler Organisation (Berlyn *et al.*, 1996). Funktionell verwandte Gene sind z.B. in einem Abschnitt lokalisiert, oft in Operons organisiert und die Transkription der Gene erfolgt in eine bestimmte Richtung. Vergleiche von genetischen Karten von *E. coli* K-12 und *Salmonella typhimurium* LT2 zeigen, daß ihre Chromosomen nach

der Aufspaltung aus einem gemeinsamen Vorfahren vor ca. 100 Millionen Jahren sehr ähnlich blieben (Sanderson, 1976; Riley and Krawiec, 1987). Eine Ausnahme bildet aber das Bakterium *Salmonella typhi*, das sich durch eine Neuordnung großer DNA Segmente aus dem ursprünglichen *E. coli* oder *Salmonella* Chromosom entwickelte (Liu and Sanderson, 1995). Bei pathogenen Neisserien läßt sich das Gegenteil beobachten. Funktionell ähnliche Gene und Gene, die bei enterischen Bakterien im Operon angeordnet sind, verteilen sich über das gesamte Chromosom (Bihlmaier *et al.*, 1991; Dempsey *et al.*, 1995). Genfamilien, die für Neisserien charakteristischen sind wie die *pil* (Pilin) oder *opa* Gene, liegen ebenfalls über das Chromosom verstreut vor (Dempsey *et al.*, 1995).

1.10 Repetitive Elemente in Genomen

Repetitive Elemente (*Repeats*) sind meist kurze, ca. 10 bis 200 bp lange DNA-Abschnitte, die sehr häufig entweder direkt aufeinander folgen oder aber mehrfach an verschiedenen Stellen im Genom vorliegen. Sie können durch Wiederholungen und Aneinanderreihungen ihrer Einzelemente Längen von mehreren tausend Basenpaaren erreichen. Repetitive Elemente kommen in allen Organismen vor. In Eukaryonten besteht die genomische Organisation aus vielen repetitiven Sequenzen, die nur hin und wieder von einzelnen Genen unterbrochen werden. Die am besten untersuchte Gruppe eukaryontischer *Repeats* ist die Alu-Familie mit einer Länge von ca. 300 bp. Nach einer Analyse von Schmid und Jelinek sollen die Alu-Sequenzen bis zu 3-6% der humanen Gesamt-DNA-Menge ausmachen (Schmid and Jelinek, 1982), was zu einer Zahl von mehr als 300.000 Kopien im menschlichen Genom führt.

In den Prokaryonten sind ebenfalls sehr viele repetitive Elemente entdeckt worden, hier sieht jedoch die genomische Organisation anders aus. Im Gegensatz zu den Eukaryonten werden hier lange kodierende Bereiche von einzelnen *Repeats* unterbrochen. Diese repetitiven Elemente sind aber auch über das gesamte Genom zufällig verteilt und können zur Evolution des Chromosoms über Rearrangements beitragen, die zu Deletionen, Duplikationen und Inversionen führen können. *Repeats* können in mehrere Klassen eingeteilt werden. Zu den kodierende Bereiche enthaltenden *Repeats* werden die Insertionselemente (IS-Elemente) gezählt, aber auch die mehrfach im Genom auftretenden *rRNA*-Operons und *tRNA*-Gene werden zu dieser Klasse zugeordnet. Eine zweite Klasse sind die nichtkodierenden *Repeats*. Hier gibt es eine Reihe speziesspezifischer *Repeats* wie z.B. die *repetitive extragenic palindromes* (REPs) oder die *palindromic units* (PU) aus *E. coli* und *S. typhimurium* (Higgins *et al.*, 1982; Gilson *et al.*, 1984). Diese kurzen (ca. 38bp) Elemente treten auch zusammen mit Elementen einer höheren Organisation, den sogenannten *BIMES*

(*bacterial interspersed mosaic elements*), auf. In den *BIMEs* sind mehrere Einzelemente zu einer komplizierteren Einheit zusammengesetzt. So gibt es flankierende Elemente, die eine variable Sequenz umschliessen, diese können als direkter oder als invertierter *Repeat* zueinander vorkommen, die gesamte Anordnung kann mehrfach aufeinander folgen oder aber auch nur als Teilstücke existieren. Die vorhergesagte Funktion der REP und PU-Elemente soll in der Regulation der differentiellen Translation von polycistronischen Operons liegen. Es konnte auch gezeigt werden, daß manche REP-Sequenzen auch DNA-Gyrase oder DNA-Polymerase I binden (Yang and Ames, 1988; Bachellier *et al.*, 1993). *BIMEs* wurden in vielen *E. coli* und einigen *Shigella*- und *Salmonella*-Stämmen gefunden, sie können zusammen mit IS-Elementen auftreten, die Längenvariationen in den REP-Elementen verursachen (Yang and Ames, 1988; Bachellier *et al.*, 1997).

1.11 Repetitive Strukturelemente in *N. meningitidis*

In den Neisserien sind ebenfalls viele repetitive Sequenzen bekannt. Zu den kodierenden *Repeats* zählen die IS-Elemente IS1016, IS1106 und IS1301. Alle wurden mehrmals pro Genom gefunden (Knight *et al.*, 1992; Hammerschmidt *et al.*, 1996a). Es gibt auch mehrere verschiedene Genfamilien, die zu den *Repeats* gezählt werden können. Dies sind die *opa* Gene (Aho *et al.*, 1991; Bhat *et al.*, 1991), die *pil* Gene (Meyer *et al.*, 1994), die *pilC* Gene (Jonsson *et al.*, 1995) und die *rrn* Operons (Liu *et al.*, 1993; Dempsey *et al.*, 1995). Die Expression von Aussenmembranproteinen wie der *opa*-Gene kann interessanterweise wieder durch sich in den Signalpeptidsequenzen befindende Nukleotidwiederholungen (auch als Tetra- oder Pentamereinheiten) reguliert werden (Stern and Meyer, 1987; Meyer *et al.*, 1990; Jonsson *et al.*, 1991; Peak *et al.*, 1996; Hammerschmidt *et al.*, 1996b). Die Expression wird aber auch durch IS-Elemente, wie es bei dem An- und Abschalten der Kapsel von *N. meningitidis* beschrieben wurde (Hammerschmidt *et al.*, 1996a), oder durch eine Wiederholung von Poly-Cytidinen im Promotorbereich wie beim Opc-Protein (Sarkari *et al.*, 1994) bestimmt. Es sind aber auch verschiedene repetitive Sequenzabfolgen innerhalb von reifen neisseriellen Proteinen beobachtet worden. So wurden z.B. Penta- oder Nonapeptidwiederholungen in dem H8-Antigen (Woods *et al.*, 1988) bzw. in FrpA (Thompson and Sparling, 1993) gefunden. Ebenso traten *Repeats* mit Längen von 10, 17, 23 und 40 bp in den *pilS*-Genen (Hill *et al.*, 1990) auf.

Besonders bemerkenswert sind bei den Neisserien die vielen und im Vergleich zu anderen Prokaryonten langen intergenischen repetitiven Sequenzen (Knight *et al.*, 1992; Lawson *et al.*, 1995; Seiler *et al.*, 1996). Am häufigsten kommt die sogenannte "*uptake sequence*" vor, die für die Aufnahme von extrazellulärer DNA notwendig ist

(Goodman and Scocca, 1988) (siehe Kapitel 1.12). Verschiedene repetitive Elemente mit einer Länge von 5 bis 200 bp, die sich sequentiell mehrmals wiederholen können, sind häufig um Gene herum gefunden worden (Haas and Meyer, 1986; Knight *et al.*, 1992; Lawson *et al.*, 1995; Seiler *et al.*, 1996)

Die bekanntesten davon sind die von Haas und Meyer definierten RS1 - RS4 Elemente, die erstmals um die *pilS* Genloci entdeckt wurden (Haas and Meyer, 1986; Haas *et al.*, 1992). Das RS1 Element ist ein 39-40 bp Fragment mit einer 33 bp langen Kernsequenz. Es ist möglicherweise an der ortsspezifischen Rekombination zwischen den *pilS* loci und dem *pilE* locus beteiligt (Haas and Meyer, 1986). Das RS2 Element ist ein 49 bp langes Fragment, das einzigartig in *pilS1* und *pilE* vorliegt. RS3 Elemente sind eine Familie von direkten und invertierten *Repeats*, die die 6 bp Kernsequenz ATTCCC besitzen (Haas and Meyer, 1986) und in nicht-kodierenden Regionen neben vielen neisseriellen Genen (*opa*, *tbpAB*, *lbpAB*, *porA*, *porB*, den *pilS*-loci, *pilC1*, *pilC2*, *pilE*, *hpuA*, *opc* und *frpB*) vorkommen (Connell *et al.*, 1988; Taha *et al.*, 1988; Murakami *et al.*, 1989; Seiler *et al.*, 1996). Diese RS3 Elemente sind jetzt in unserer Arbeitsgruppe von G. Morelli als 20 bp lange dRS3-Elemente neu definiert worden (siehe nächster Abschnitt). Das RS4-Element ist 32 bp lang und wurde direkt hinter den Stop-Kodons der *pilS5* und *pilS6*-Gene gefunden.

1.11.1 NIMES (*neisserial intergenic mosaic elements*)

Bei einer Analyse der *opa*-loci wurden von G. Morelli die dort aufgefundenen repetitiven Elemente in Analogie zu den enterobakteriellen *BIMES* als *NIMES* (*neisserial intergenic mosaic elements*) bezeichnet (Morelli *et al.*, 1998). Diese für Neisserien typischen *Repeats* sind bis zu 2 kb lang und bestehen wie die *BIMES* aus einzelnen frei miteinander kombinierbaren Einheiten, den dRS3- und rs-Elementen.

Ein dRS3-Element (dRS3) ist 20 bp lang und besitzt eine interne invertierte Sequenzstruktur (Abbildung 1.4). Sie ist gekennzeichnet durch die Sequenz ATTCCC-(N₈)-GGGAAT, die charakteristisch für alle bis jetzt in den Neisserien-Genomen (*N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae*) gefundenen *NIMES* ist.



Abbildung 1.4: Genereller Aufbau eines dRS3-Elements. (Nach Morelli *et al.*, 1998).

Diese dRS3-Elemente können nun als ein Grundbaustein der *NIMES* angesehen werden. Sie werden verbunden durch den zweiten Grundbaustein, den rs-Elementen

(rs-E) mit Längen zwischen 33 und 120 bp. Diese Werte entsprechen den bis jetzt beobachteten Längen, möglicherweise gibt es noch weitere Elemente anderer Längen im *N. meningitidis* Genom. Ähnliche rs-Elemente können zusätzlich sehr stark in ihrer Länge und auch in den Homologien zueinander variieren, so daß man hier eher von Familien von rs-Elementen sprechen sollte. Alle rs-E mit einer 80%igen Identität wurden jeweils als Element-Familie zusammengefaßt. Bis jetzt waren aus der Analyse von G. Morelli 21 rs-Elemente bekannt. Eine Einheit [dRS3 + rs-E + dRS3] wird als *NIME* definiert (Abbildung 1.5).



Abbildung 1.5: **Aufbau der NIMES.**

Ein *NIME* besteht aus 2 dRS3s, die ein internes rs-Element flankieren, wobei dessen Länge in dem angegebenen Bereich variieren kann (Nach Morelli *et al.*, 1998).

Diese *NIMES* sind über das gesamte Chromosom verteilt gefunden worden, oft um Außenmembranproteine wie den *opa*-Genen, *lbpAB*, *porA*, *porB*, *pilC1*, *pilC2*, *pilE*, *hpuA* und *frpB*. Aber auch andere Proteine sind von ihnen umgeben. Eine eindeutige Funktion ist ihnen noch nicht zuzuordnen. Ob es einen funktionellen Zusammenhang dieser *NIME-Repeats* mit Virulenzfaktoren gibt, bleibt offen.

1.11.2 Correia-Elemente

Das nach seinem Entdecker benannte Correia-Element hat Transposon-ähnliche Strukturen und soll 20-30 mal pro *Neisseria* Genom vorkommen (Correia *et al.*, 1988). Diese 71-155 bp langen Abschnitte besitzen einen charakteristischen invertierten Sequenzabschnitt an beiden Enden und eine variable interne Region (Abbildung 1.6), die eine Orientierung der Correia-Elemente erlaubt.

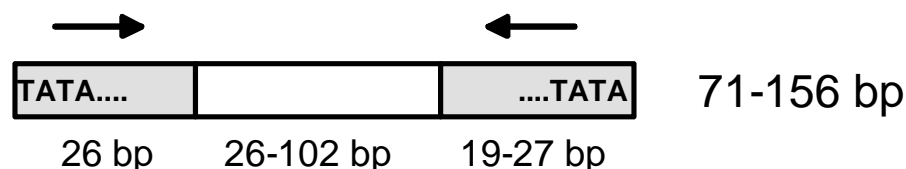


Abbildung 1.6: **Genereller Aufbau der Correia-Elemente.**

Die Pfeile deuten an, daß die Enden zueinander als invertierte *Repeats* stehen, wobei aber die Sequenz zwischen den grau unterlegten Enden eine eindeutigen Orientierung des gesamten Elements erlaubt.

Correia-Elemente zeigen untereinander eine Homologie zwischen 60 und 100%, sie kommen in *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* und *N. lactamica* vor (Klee, S., pers.

Mitteilung). Ob Correia-Elemente auch in weiteren Kommensalen auftreten, ist bis jetzt nicht untersucht. Es wird vermutet, daß Correia-Elemente an DNA-Neuanordnungen und horizontalem Gentransfer beteiligt sind (Correia *et al.*, 1988). Correia-Elemente können die Konsensussequenz einer *integration host factor* (IHF)-Bindungsstelle besitzen, ob dies aber *in vivo* relevant ist, bleibt zu untersuchen (G. Morelli, pers. Mitteilung).

Komplexe repetitive Strukturen wie z.B. die *NIMEs* und Correia-Elemente sind bisher recht unerforscht, da sie technisch sehr schwer zu sequenzieren sind und die Aufmerksamkeit im Allgemeinen kodierender DNA gilt. DNA bindende Proteine, die nur mit solcher extragenischen repetitiven DNA wechselwirken können, sind bisher nicht entdeckt worden. Eine Funktion der repetitiven Elemente in der Evolution ist bis jetzt noch nicht bekannt, es könnten in Analogie zu anderen repetitiven Elementen aus z.B. den *Enterobacteriaceae* Bindungsstellen für Proteine wie *IHF* oder Gyrasen in ihnen vorhanden sein. Welche Rollen die natürliche Transformation, die Populationsstruktur oder der durch den Wirt ausgeübte Selektionsdruck bei der Anhäufung und Ausbildung der *Repeats* spielen, bleibt bisher unklar.

1.12 Mechanismen des horizontalen Gentransfers

In der Natur gibt es drei wesentliche Mechanismen, die zu horizontalem Gentransfer führen:

- die Transduktion
- die Konjugation und
- die Transformation.

Die Übertragung bakterieller DNA von einer Donor- in eine Empfängerzelle durch Bakteriophagen bezeichnet man als Transduktion. Sie wurde erstmals 1952 von Zinder und Lederberg in Salmonellen entdeckt (Zinder and Lederberg, 1952). Bakteriophagen besitzen die Fähigkeit, chromosomale Abschnitte eines Bakteriengenoms aufzunehmen und diese durch Rekombination in eine andere Bakterienzelle zu übertragen (Masters, 1996). Die Größe dieser ausgetauschten genomischen Segmente reicht von nur einige Kilobasen bis >100 kb und ist wahrscheinlich durch unterschiedliche Restriktions-Modifikationssysteme der Donor- und Empfängerzellen begrenzt (DuBose *et al.*, 1988; McKane and Milkman, 1995).

Bei der erstmals 1946 von Lederberg und Tatum beschriebenen Konjugation wird DNA durch den direkten Kontakt einer Donor- und Empfängerzelle übertragen

(Lederberg and Tatum, 1946). Der Kontakt zwischen zwei konjugierenden Zellen wird zunächst über den F-(Fertilitäts-)Pilus hergestellt. Nur die Donorzelle besitzt den sog. F-Faktor, der zur Ausbildung eines F-Pilus befähigt und auf einem Plasmid von ca. 100 kb Größe kodiert ist. Bei Kontakt zwischen einer F⁺- und F⁻-Zelle kann eine Kopie des F-Plasmids in die Empfängerzelle übertragen werden, die damit selber F⁺ wird (Wilkins, 1995; Firth *et al.*, 1996). Wenn ein F-Plasmid stabil in das Chromosom einer Zelle eingebaut wurde, können auch Gene aus dem Bakterienchromosom der Donorzelle übertragen werden. Hier wird eine Kopie des Genoms der sog. Hfr-Donorzelle („high-frequency recombinant“) in die Empfängerzelle eingeschleust, über die homologe Rekombination können dann diese Genabschnitte in die Empfängerzelle eingebaut werden.

Das Prinzip der Konjugation kommt sowohl in gram-negativen wie gram-positiven Bakterien und Streptomycceten vor.

Konjugative Transposons sind weitere bekannte DNA Elemente, die die Fähigkeit besitzen, zwischen Chromosomen von verschiedenen Zellen zu translozieren (Clewell and Gawron-Burke, 1986). Diese Elemente kodieren meist Antibiotikaresistenzgene und die Funktionen zum Herausschneiden des Transposons aus dem Donorchromosom, sowie zum Transfer und Einbau in andere Zellen. Obwohl konjugative Transposons hauptsächlich in gram-positiven Bakterien beobachtet wurden, kommen sie auch in gram-negativen Bakterien natürlich vor (Craig, 1996).

Die Transformation wurde als erster der drei Mechanismen 1944 von Avery (Avery *et al.*, 1944) an Pneumokokken entdeckt. Frei in der Umgebung vorliegende DNA wird durch Zellen aufgenommen und mittels homologer Rekombination in das Genom integriert. Man unterscheidet eine im Labor künstlich erzeugte Kompetenz von Bakterien und die natürliche Kompetenz, bei der unter nativen Bedingungen DNA von Bakterien aufgenommen werden kann. Natürliche Kompetenz wurde bei einer Reihe von pathogenen Bakterien-Spezies wie *S. pneumoniae* oder *H. influenzae* in einer bestimmten Phase des Zellzyklus beobachtet (Stewart and Carlson, 1986; Lorenz and Wackernagel, 1994). *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* sind Spezies, in denen Kompetenz permanent, d.h. in jeder Phase des Zellzyklusses, vorliegt (Catlin, 1960; Sparling, 1966).

Die Fähigkeit, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen, wurde für *N. meningitidis* erstmals 1953 (Alexander and Redman, 1953) und später auch für *N. gonorrhoeae* gezeigt (Sparling, 1966). Bis heute ist kein anderer Mechanismus in *Neisseria* bestätigt, der für horizontalen Gentransfer in Frage kommen könnte, obwohl bei der Genomanalyse Prophagen in Neisserien gefunden wurden (Klee, S., pers. Mitteilung).

Konjugative Plasmide wurden in Neisserien beobachtet (Sox *et al.*, 1978; Cannon and Sparling, 1984; Knapp *et al.*, 1987), aber eine konjugative (Hfr-ähnliche) Übertragung von chromosomaler DNA ist unter natürlichen Bedingungen nicht bekannt. Natürlich vorkommende konjugative Transposons sind in Neisserien ebenfalls noch nicht bekannt.

Während des Transformationsprozesses in gram-negativen Bakterien muß die DNA zwei Membranen und die Peptidoglykanschicht überqueren, um in das Zytoplasma zu gelangen, wo sie in das Chromosom in einem RecA-abhängigen Prozeß integriert wird (Kooimey *et al.*, 1987). Der Mechanismus der natürlichen Transformation in Neisserien ist nur unvollständig aufgeklärt und ist dem von *H. influenzae* am ähnlichsten (Lorenz and Wackernagel, 1994). Die für die Rekombination verwendete DNA wird durch die Selbstlyse von Neisserien freigesetzt (Hebeler and Young, 1975) und kann aus der Umgebung von den natürlich transformierbaren intakten Bakterien aufgenommen werden (Frosch and Meyer, 1992). In Neisserien ist eine 10 bp lange "uptake sequence" (GCCGTCTGAA) identifiziert worden, die für die effektive Aufnahme von neisserieller Doppelstrang-DNA aus der Umgebung verantwortlich ist (Goodman and Scocca, 1988). Die Erkennungssequenz kommt im *Neisseria*-Genom durchschnittlich jede 1000 bp vor (Goodman and Scocca, 1991). Diese auch in *H. influenzae* (aber mit einer anderen Sequenzabfolge) identifizierten "uptake"-Sequenzen werden als Bestandteil von *rho*-unabhängigen Transkriptionsterminatoren (Goodman and Scocca, 1988) gefunden (Smith *et al.*, 1995). Es wurden erstaunlicherweise auch einige *H. influenzae* typische "uptake"-Sequenzen um das *sodC*-Gen, um den *bio*-Genkluster und um einen bisher unbekanntes ORF aus *N. meningitidis* gefunden, so daß es hier auch wieder zu einem genetischen Austausch zwischen diesen beiden Spezies kommen könnte (Kroll *et al.*, 1998).

Nur wenige Proteine sind bekannt, die einen Einfluß auf die Transformation von Neisserien haben. Frühe Arbeiten wiesen darauf hin, daß bei *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* Pili eine Rolle bei der Transformation spielen (Sparling, 1966; Froholm and Bovre, 1973; Biswas *et al.*, 1977). Später wurde gezeigt, daß wahrscheinlich nicht die Pili direkt, sondern die Pilus-Untereinheit Pile wichtig für die Kompetenz ist (Gibbs *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1992). Weitere für die Ausbildung der Pili notwendige und damit die Kompetenz in *Neisseria* beeinflussende Proteine sind PilC1 und PilC2.

Andere an dem Transformationssystem beteiligte Proteine könnten in den an der Zelloberfläche befindlichen Membranvesikeln, den „Blebs“, vorhanden sein (DeVoe and Gilchrist, 1973; Andersen *et al.*, 1979). In diesen wurden DNA-bindende Proteine

sowie zirkuläre und lineare DNA identifiziert (Dorward *et al.*, 1989a, 1989b). Eine direkte Beteiligung der Membranvesikel an der Aufnahme von DNA aus der Umgebung und dem Transport in das Zytoplasma konnte bei Neisserien zwar nicht nachgewiesen werden. In den Membranvesikeln enthaltene Plasmide konnten jedoch interzellulär transferiert werden (Dorward *et al.*, 1989b). Die Rolle der Membranvesikel hinsichtlich der Transformation von Neisserien sollte noch genauer untersucht werden. Ein in den Membranvesikeln von *N. gonorrhoeae* gefundenes 11 kDa Protein konnte die 10-Basenpaarerkenungssequenz effizient binden (Dorward *et al.*, 1989a).

Weitere für die natürliche Transformation wichtige Proteine sind ComA (Facijs and Meyer, 1993), ComL (Fussenegger *et al.*, 1996a) und Tpc (Facijs *et al.*, 1996; Fussenegger *et al.*, 1996b). Alle drei Proteine sind an Transport und Prozessierung der aufgenommenen DNA beteiligt (Facijs *et al.*, 1996; Fussenegger *et al.*, 1997). Tpc scheint lose mit der Zellwand assoziiert zu sein und könnte eine Rolle als Mureinhydrolase während der Teilung des Septums bei sich trennenden Diplokokken spielen (Fussenegger *et al.*, 1996b). Das Fehlen von Tpc beeinflusst nicht nur die Zellteilung und DNA-Transformation, sondern auch die Fähigkeit von Gonokokken, in menschliche Epithelzellen einzudringen (Fussenegger *et al.*, 1996b). Neuere Untersuchungen zeigten, daß auch die Proteine PilT und ComP notwendig für die DNA-Aufnahme in *N. gonorrhoeae* ist (Wolfgang *et al.*, 1998a; 1998b; 1999).

Der Einbau der aufgenommenen DNA in das Chromosom der Zelle erfolgt anschließend durch eine homologe Rekombination mit Hilfe des RecA Proteins (Kooimey *et al.*, 1987). Der Mechanismus der homologen Rekombination wurde besonders an *E. coli* studiert (Kowalczykowska *et al.*, 1994).

1.13 Homologe Rekombination

Homologe Rekombination benötigt als Substrat einzelsträngige DNA, die zur auszutauschenden DNA ähnlich (homeolog), fast identisch (homolog) oder identisch sein muß. Die minimale DNA-Länge für Rekombinationen wird MEPS („minimal efficient processing segment“) genannt, Segmente geringerer Länge rekombinieren ineffizient (Shen and Huang, 1986). MEPS variieren zwischen den Organismen. Sie sind in Säugetierzellen 200 bp lang (Rubnitz and Subramani, 1984; Liskay *et al.*, 1987), haben in *S. cerevisiae* eine Länge von 26 oder 89 bp (Ahn *et al.*, 1988; Sugawara and Haber, 1992) und in *E. coli* 20-27 bp (Watt *et al.*, 1985; Shen and Huang, 1986).

Schon geringe Sequenzunterschiede zwischen den DNAs reduzieren die Rekombinationsrate wesentlich. Watt *et al.* berichtete z.B., daß 16% Sequenzunterschiede zwischen zu rekombinierenden DNA-Abschnitten in *E. coli* die Rate um den Faktor 100 bei einer Phagen-Plasmid-Rekombination verringert (Watt *et al.*, 1985). Shen und Huang beobachteten 300 bis 888 mal geringere Rekombinationsraten je nach Rekombinationssystem bei einem ca. 400 bp langen DNA Abschnitt mit einer Homologie von 65% (Shen and Huang, 1986). Für *E. coli* und *Salmonella typhimurium* (80% DNA-Sequenzhomologie) wurde sogar ein Unterschied mit dem Faktor 1000 berichtet (Rayssiguier *et al.*, 1989; Rayssiguier *et al.*, 1991). 52%ige homeologe DNA rekombinierte wesentlich seltener und scheint die unterste Grenze zu sein, bei der homeologe Rekombinationsprozesse noch funktionieren (Mézard *et al.*, 1992). Reparatursysteme in den Organismen scheinen eine Barriere für den Erfolg homologer Rekombination darzustellen (Claverys and Lacks, 1986; Rayssiguier *et al.*, 1989; Mézard *et al.*, 1992). Es wird vermutet, daß bei einem zu großen Sequenzunterschied das Reparatursystem heteroduplexe Zwischenstufen während des Rekombinationsprozesses abbaut oder inaktiviert (Radman, 1989). Ein anderer limitierender Faktor ist das RecA Protein, für das *in vitro* gezeigt wurde, daß es maximal 30% Sequenzunterschied toleriert (DasGupta and Radding, 1982).

Ein ähnliches Mismatch-Reparationssystem, wie es für *S. pneumoniae* und *E. coli* beschrieben wurde, konnte noch nicht in *N. meningitidis* identifiziert werden. In *N. gonorrhoeae* ist nur ein Exzisionsreparatursystem bekannt (Campbell and Yasbin, 1984a). Photoreaktivierung (Campbell and Yasbin, 1979) und "Error-prone" Reparatursysteme konnten in Neisserien nicht nachgewiesen werden (Campbell and Yasbin, 1984b).

Bakterielle Restriktionsmodifikationssysteme (R-M Systeme) könnten eine weitere Barriere für Rekombination sein (Barcus and Murray, 1995), da sie fremde DNA erkennen und restringieren. Das Phänomen wurde erstmals von Arber und Dussoix (Dussoix and Arber, 1962; Arber and Dussoix, 1962) beschrieben. Ein solches System besteht im allgemeinen aus einer Methyltransferase, die bestimmte Basen einer Erkennungssequenz methylieren kann und einem Restriktionsenzym, das DNA ohne methylierte Erkennungssequenz zerschneidet (Wilson and Murray, 1991). R-M Systeme wurden in vielen verschiedenen Prokaryonten entdeckt (Roberts, 1989). Je nach Erkennungssequenz unterscheidet man im wesentlichen drei Typen von Systemen, Typ I, II und III (Wilson and Murray, 1991; Redaschi and Bickle, 1996). In *Neisseria* sind verschiedene Systeme bekannt, so wurden z.B. in einem *N. gonorrhoeae* Stamm bis zu 14 unterschiedliche Methyltransferasen gefunden (Stein *et al.*, 1995). Häufig

wurden in *Neisseria* Stämmen mehr Methyltransferasen als Restriktionsendonukleasen gefunden.

Die biologische Relevanz von R-M Systemen ist ungeklärt. Es wurde spekuliert, daß zelleigene DNA vor fremder DNA, wie Phagen DNA, geschützt werden soll (Price and Bickle, 1986). Neuere Theorien befürworten eher ein "selfish gene model", bei dem RM-Operons selbst den größten Vorteil ihrer Verbreitung durch die Integration im Chromosom besitzen (Naito *et al.*, 1995; Kobayashi and Nakayama, 1998). Wenn sie einmal erworben wurden, ist es für eine Zelle äußerst schwierig, wenn nicht gar unmöglich, sie wieder zu verlieren.

1.13.1 Die homologe Rekombination in Neisserien

Es wurde gezeigt, daß z.B. die *penA* Gene aus *N. meningitidis* mit den *penA* Genen aus kommensalen Spezies wie *N. cinerea* oder *N. flavescens* rekombinieren können (Spratt *et al.*, 1992; Bowler *et al.*, 1994). Die Mosaikbildung der Porine (Carbonetti *et al.*, 1988) und sogar ein Kapselaustausch (Frosch and Meyer, 1992) sind Ergebnisse von Ko-Kultivierungen pathogener Neisserien im Labor. Daß Kapselaustausche auch unter natürlichen Bedingungen erfolgen können, zeigte die Untersuchung von *N. meningitidis* Serogruppe B und Serogruppe C Isolaten (Swartley *et al.*, 1997).

Der Austausch einer ca. 5 kb großen Region (*synX,B,C,D* (Swartley *et al.*, 1996)) aus dem 24 kb (Frosch *et al.*, 1989) großen Kapseloperon in *N. meningitidis* (Swartley *et al.*, 1997) zeigt, daß durch natürliche Transformation auch größere DNA-Abschnitte als 1 kb rekombinieren können.

Mosaikgene, die durch homologe Rekombination kurzer Genabschnitten von verwandten Bakterien entstehen, wurden bei zahlreichen *Neisseria*-Genen gefunden. Sie wurden beschrieben für die Gene *porA* (Feavers *et al.*, 1992; Suker *et al.*, 1994), *porB* (Ward *et al.*, 1992; Vázquez *et al.*, 1995), *opa* (Bhat *et al.*, 1991; Hobbs *et al.*, 1994), *pilE* (Haas *et al.*, 1992), *penA* (Spratt, 1988; Spratt *et al.*, 1992), *iga* (Halter *et al.*, 1989; Lomholt *et al.*, 1995), *tbpB* (Legrain *et al.*, 1996), *frpB* (van der Ley *et al.*, 1996), *argF* (Zhou and Spratt, 1992), *adk* (Feil *et al.*, 1995, 1996), *glnA* und *aroE* (Zhou *et al.*, 1997). Mosaikgene entstehen aber auch durch homologe Rekombination von DNA innerhalb eines Chromosoms in einer Bakterienzelle, wie es für die *pil* Genfamilie gezeigt wurde (Swanson *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1992; Seifert, 1996).

1.13.2 Rekombinationen in und zwischen Bakteriengenomen

Rekombinationsereignisse wurden an vielen Beispielen bei den pathogenen Neisserien beschrieben und finden nahezu bei jedem variablen Oberflächenantigen statt. In den drei "housekeeping" Genen *adk*, *glnA* und *aroE* konnte bei Meningokokken ebenfalls eine Intraspezies-Rekombination beobachtet werden (Feil *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1997). Rekombinationen zwischen verschiedenen Spezies wurden hauptsächlich wie schon beschrieben zwischen kommensalen Neisserien und *N. meningitidis* in den Genen *penA*, *aroE*, *glnA*, *adk* und *argF* gezeigt. Trotz der hohen Homologie und nahen Verwandtschaft von *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* wurde nur ein eindeutiges Beispiel des horizontalen Gentransfers im *porB*-Locus und ein nicht so klares Beispiel des Transfers eines *tbpB*-Gens aus *N. gonorrhoeae* in einen *N. meningitidis* Stamm beschrieben (Vázquez *et al.*, 1995). Weitere Beispiele sind ein *opa* und ein *frpB* Gen aus Meningokokken, in denen die exponierten Schleifen hohe Homologie mit den entsprechenden Proteinen aus *N. gonorrhoeae* hatten (Hobbs *et al.*, 1994; van der Ley *et al.*, 1996). *N. gonorrhoeae* rekombiniert im Allgemeinen mit den übrigen *Neisseria*-Spezies nur selten, was höchstwahrscheinlich durch die unterschiedlichen Orte der Besiedlung der Spezies verursacht wird. Im Gegensatz dazu kommen die kommensalen Neisserien zusammen mit *N. meningitidis* im Nasen-Rachenraum vor und können daher eher miteinander rekombinieren (Vázquez *et al.*, 1993).

1.14 Das Modell des globalen Gen-Pools

Wie ist es zu erklären, dass solch eine Vielzahl an verschiedenen Allelen in doch sehr ähnlichen Bakterien auftreten können? Erste Ansätze für die Erklärung dieses Phänomens boten z.B. aus *S. pneumoniae* bekannten Mosaikgene, die meist wegen einer Resistenzbildung gegen bestimmte Antibiotika bekannt waren. Auch hier werden kürzere oder längere DNA-Stücke ausgetauscht, diese kommen meist aus verschiedenen bereits resistenten *S. pneumoniae*-Isolaten wie auch aus den Kommensalen *Streptococcus lactis* oder *Streptococcus oralis* (Hakenbeck, 1998). Eine ähnliche freie Austauschbarkeit verschiedenster Gene wird auch in *N. meningitidis* beobachtet. Hier sind die *opa*-Gene, das *tbpAB*-Operon, *porA*, *penA*, *iga*, *glnA*, *adk* sowie die verschiedenen Gene für die MLST-Analyse zu nennen (Maiden *et al.*, 1996). Dies führte zu dem Modell eines globalen Genpools für alle Neisserien, aus dem über diverse Rekombinationsereignisse auch nur sehr weitläufig verwandte Bakterien die gleichen Allele enthalten oder aber sehr nah verwandte Bakterien stark unterschiedliche Allele für bestimmte Gene besitzen können. Eine modellhafte Darstellung des globalen

Genpools mit seinen Verbreitungs- und Austauschmechanismen ist in der Abbildung 1.7 zu sehen.

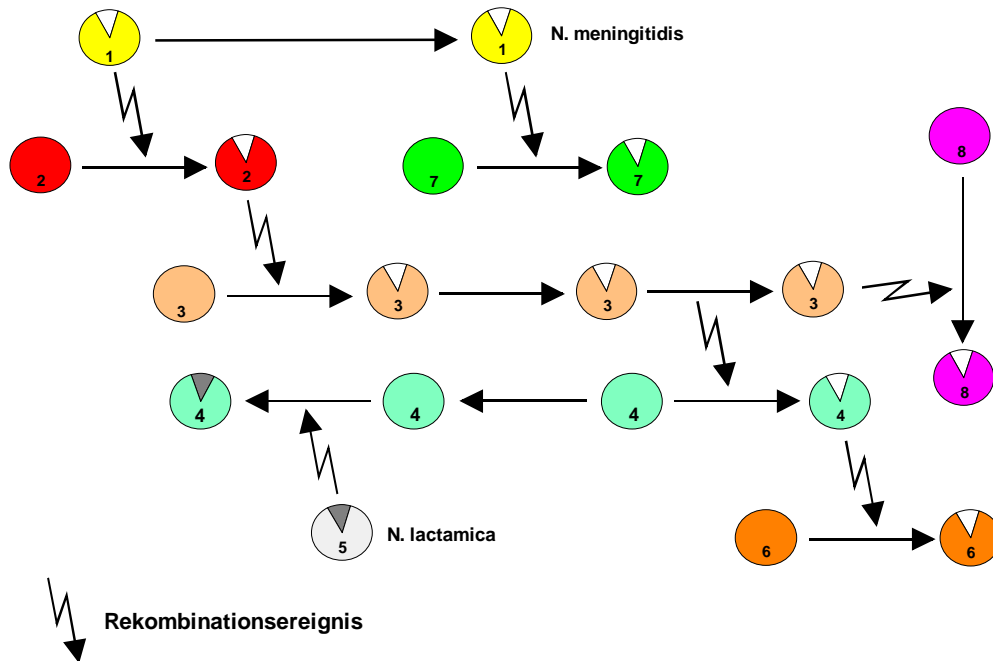


Abbildung 1.7: **Modell des globalen Gen-Pools.**

Jeder Kreis stellt ein Bakteriengenom dar, Kreisabschnitte davon in anderer Farbe repräsentieren neu erworbene Allele. Gleiche Farben und Nummern sollen klonale Gruppen darstellen (Aus Maiden *et al.*, 1996).

Dies bedeutet auch, daß Kommensalen als Träger bestimmter Allele für deren Verbreitung sorgen können (Maiden *et al.*, 1996). Wenn die aus den Rekombinationen resultierenden Klone effektiver als die Ursprungsklone in ihrer Verbreitung sind, kann dieses Allel in der entstehenden Population fixiert werden oder aber wieder über eine klonale Reduktion verloren gehen (Achtman, 1995). Der globale Genpool führt zu der Auflösung eines Donor-Rezipienten-Modells, da bei den hier vielfältigen Varianten der Übertragung und Rekombination von neuen Allelen deren eindeutige Zuordnung zu bestimmtem Ursprungsstämmen nicht mehr möglich ist. Vielleicht ist dies noch teilweise bei stark klonalen Epidemien mit einer hohen Probenanzahl möglich, bei breit gefächerten Untersuchungen wie der hier durchgeführten zeigt sich aber, daß eine Zuordnung und Bestimmung von Donoren der rekombinanten Allele nicht durchführbar ist. Dieses Modell scheint auch auf die Streptokokken anwendbar zu sein, sowie auf die meisten natürlich transformierbaren Bakterien wie z.B. auch *H. pylori*.

1.15 Ziele der Doktorarbeit

Um die Mikroevolution von *N. meningitidis*-Stämmen untersuchen zu können, ist es ein wichtiger Aspekt, die Mechanismen der Variabilität von Genen zu verstehen.

Die Region zwischen den Genen *opaA* und *tbpAB* ist auf der physikalischen Genkarte von Dempsey et al. (Dempsey *et al.*, 1995) mit einer Größe von ca. 25-30 kb angegeben. Damit ist sie für eine Untersuchung der Variabilität von Genen in *N. meningitidis* gut geeignet, da dieser Abschnitt mit verhältnismäßig wenig Aufwand sequenziert werden kann. Die Opa- und Tbp-Proteine sind wichtige Virulenzfaktoren mit hochvariablen Sequenzen. Von beiden sind bereits Allelvarianten in verschiedenen *N. meningitidis*-Stämmen beschrieben und sequenziert worden.

Es war unbekannt, welche Gene in der Region zwischen *tbpAB* und *opaA* Genen liegen und mit welcher Frequenz Variabilitäten in ihnen auftreten. Um dies zu klären, sollte die gesamte Region um *opaA* und *tbpAB* sequenziert werden. Hierfür war es notwendig, eine Lambda-Genbank der Serogruppe A, Subgruppe IV-1 Referenzstammes Z2491 zu erstellen, die diese Region betreffenden überlappenden λ -Klone zu identifizieren und die Nukleotidabfolge der gesamten Region zu bestimmen. Daraus folgt die Analyse der gefundenen offenen Leserahmen (ORFs) und deren Vergleich mit bereits bekannten Proteinen. Gleichzeitig sollte diese Analyse auf die Serogruppe C, ET-37 Komplex ausgedehnt werden, um einen Rahmen der möglichen Variationsbreite zu haben und zwei bereits bekannte IV-1 Varianten auf die Endpunkte der Rekombinationsereignisse getestet werden.

Die Rekombinationshäufigkeiten ausgewählter Gene sollten in je ca. 100 Stämmen zweier Subgruppen (IV-1 und ET-37 Komplex) aus zwei Ländern (Gambia und Mali) untersucht werden. Die Frage war, ob die in diesen Ländern unterschiedlichen Verbreitungsarten von Meningokokken (epidemisch in Gambia, endemisch in Mali) in Relation zu der Zahl der Variationen der sie verursachenden Meningokokken stehen.