

Untersuchungen zur biologischen Funktion der
Zellwand-assoziierten Serinprotease PrtA
von *Streptococcus pneumoniae*

Vom Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte Dissertation

von

Anja Neuhaus

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 20.02.2004

Vorsitzender: Herr Prof. Dr. B. Brüne

Referentin: Frau Prof. Dr. R. Hakenbeck

Korreferent: Herr Prof. Dr. H.-P. Heinz

Kaiserslautern

2004

D386

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Streptococcus pneumoniae.....	3
1.1.1 Virulenzfaktoren.....	4
1.1.2 Phasenvariation	7
1.1.3 Pathogenese von Pneumokokken-Infektionen	8
1.1.4 Pneumokokken-Vakzine	9
1.2 Proteasen	10
1.2.1 Verankerung und Aktivierung von Proteinen	11
1.2.2 Autoprozessierung.....	12
1.3 Proteasen von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	13
1.3.1 Serinproteasen	14
1.4 PrtA (Pneumococcal protease A).....	15
1.4.1 Identifizierung	15
1.4.2 Variation in der <i>prtA</i> -Sequenz.....	15
1.4.3 Aufbau und Lokalisierung von PrtA	15
1.4.4 PrtA-Formen.....	17
1.4.5 Funktion	17
1.4.6 Virulenz.....	17
1.4.7 Homologien.....	17
1.5 Ziel dieser Arbeit.....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Bakterienstämme.....	20
2.2 Plasmide	20
2.3 Antikörper und Antiseren.....	21
2.4 Oligonukleotide (Primer)	21
2.5 Reagenzien	23

2.5.1	Chemikalien, Plastik- und Einwegartikel.....	23
2.5.2	Enzyme.....	24
2.5.3	Matrixproteine.....	24
2.5.4	Antibiotika.....	24
2.5.5	Molekularbiologische Kits.....	24
2.5.6	Puffer und Lösungen.....	25
2.5.7	Nährmedien.....	26
2.6	Mikrobiologische Methoden.....	30
2.6.1	Bakterienkultivierung.....	30
2.6.2	Stammhaltung und Stammkonservierung.....	30
2.6.3	Bestimmung von Keimzahl und Bakterienkonzentration.....	30
2.7	Methoden für das Arbeiten mit DNA.....	31
2.7.1	Isolierung von DNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i> R6.....	31
2.7.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren [123].....	31
2.7.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) [122].....	31
2.7.4	Ortsspezifische Mutagenese (site directed mutagenesis) [65].....	33
2.7.5	Kolonie-PCR.....	34
2.7.6	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	34
2.7.7	Agarosegel-Elektrophorese.....	34
2.7.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	34
2.7.9	Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	35
2.7.10	Ligation.....	35
2.7.11	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	36
2.7.12	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> nach der CaCl ₂ -Methode [43].....	36
2.7.13	Transformation CaCl ₂ -kompetenter <i>Escherichia coli</i> [61].....	36
2.7.14	Transformation von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	36
2.7.15	Herstellung von Mutanten.....	37
2.7.16	Sequenzierungen [126].....	40
2.8	Methoden für das Arbeiten mit RNA und cDNA.....	41
2.8.1	Isolierung von RNA aus Pneumokokken.....	41
2.8.2	Auftrennung der RNA durch Gelelektrophorese.....	41
2.8.3	Reverse Transkription.....	42
2.8.4	Real-Time PCR.....	42
2.9	Methoden für das Arbeiten mit Proteinen.....	44

2.9.1	Herstellung von bakteriellen Gesamtzelllysaten	44
2.9.2	TCA-Fällung	44
2.9.3	Einengung bakterieller Kulturüberstände mittels Centriplus®- Zentrifugenröhrchen	44
2.9.4	Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-Tag-Proteinen über Ni- NTA-Agarose	45
2.9.5	Dialyse.....	45
2.9.6	Trennung der Zellbestandteile durch Ultrazentrifugation.....	45
2.9.7	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford [20].....	46
2.9.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [86].....	46
2.9.9	Zweidimensionale-Gelelektrophorese [13].....	47
2.9.10	Zymogramme [87].....	48
2.9.11	Native Gele.....	49
2.9.12	Färbung und Kultivierung von Polyacrylamidgelen	49
2.9.13	Immunoblot [123]	50
2.9.14	Rechromatographie von Proteinen	52
2.9.15	Sequenzierung von Proteinen.....	52
2.10	Sequenzanalysen	52
2.11	Immunfluoreszenz-Analyse mit dem FACS (fluorescence-activated cell sorting)...	52
2.12	Herstellung FITC-markierter Pneumokokken.....	53
2.12.1	Bindungsassay	53
3	Ergebnisse	55
3.1	Überprüfung von PrtA-Mutanten.....	55
3.1.1	LPXTG-defiziente Mutante (SP-104).....	55
3.1.2	LPXTG-defiziente His-Tag tragende Mutante (SP-107)	55
3.1.3	Signalpeptidlose Mutante (SP-110)	56
3.1.4	PrtA-defiziente Mutante (SP-111)	57
3.2	Überprüfung der Mutanten auf die Oberflächenverankerung des PrtA	58
3.3	Wachstumsverhalten der verwendeten Stämme in BHI.....	61
3.4	Aufreinigung des nativen PrtA aus dem Kulturüberstand der Mutante SP-107	62
3.5	Analyse der Stabilität des aufgereinigten PrtA	65
3.5.1	Zweidimensionale Darstellung von aufgereinigtem PrtA.....	65

3.5.2	Darstellung von PrtA nach Gelextraktion	66
3.6	Untersuchung der Maturierungsstelle durch N-terminale Sequenzierung des 215 kDa Proteins	67
3.7	Vergleich von Autoprozessierungsstellen mit der PrtA-Sequenz.....	68
3.8	Einfluss von verschiedenen Kulturbedingungen auf die Expression von PrtA	70
3.8.1	Darstellung der Expression von PrtA mittels Westernblot-Analysen.....	70
3.8.2	Darstellung der Expression von PrtA mittels Real-Time-Analyse	73
3.9	Untersuchung der Enzymaktivität von PrtA	74
3.10	Bindungseigenschaften des PrtA an extrazelluläre Matrixbestandteile	77
3.11	Vergleich des Protein-Expressionsprofils von Wildtyp und PrtA-defizienter Mutante.....	81
3.12	Sequenzanalysen des PrtA-Proteins	83
4	Diskussion	88
5	Zusammenfassung.....	97
6	Literaturverzeichnis.....	98

Lebenslauf

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
C-terminal	Carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiotreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Glycin
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Leucin
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>

MG	Molekulargewicht
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
NBT	4-Nitro-blautetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
N-terminal	Aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Threonin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TIGR	The Institute of Genomic Research
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
X	Steht für eine beliebige Aminosäure

1 Einleitung

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Bakterien der Spezies *Streptococcus pneumoniae*, auch Pneumokokken genannt, sind gram-positive, lanzettförmige Bakterien, die meist als Diplokokken oder in kurzen Ketten vorkommen (Abb. 1). Pneumokokken sind sporenlos, Katalase negativ und fakultativ anaerob. *S. pneumoniae* gehört zur Gruppe der α -hämolyisierenden Streptokokken. Die Bakterien werden von einer charakteristischen Polysaccharidkapsel umgeben. Aufgrund der chemischen Feinstruktur der Kapselpolysaccharide werden die Pneumokokken in 90 verschiedene Serotypen unterteilt [64]. *S. pneumoniae* ist ein human-pathogenes Bakterium, dass beim gesunden Menschen im Nasen-Rachenraum gefunden wird.

Die DNA-Sequenz des Pneumokokken-Genoms des Typ 4-Stamms KNR. 7/87 und des Stammes R6 sind vollständig sequenziert (www.tigr.org) [69, 141].

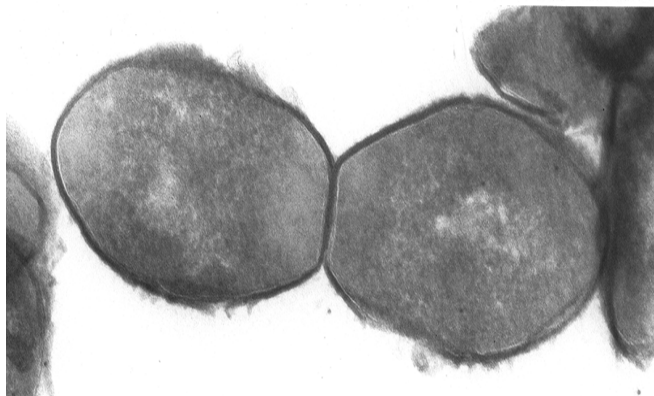


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *S. pneumoniae*.

Pneumokokken sind natürlich kompetente Bakterien, d.h. sie können DNA aufnehmen und über einen Rekombinationsprozess in ihr Genom integrieren. Das Pheromon CSP (competence stimulating peptide), bestehend aus 17 Aminosäuren, ist verantwortlich für die Kompetenzstimulierung. Durch die genetische Transformation kommt es zu einem spontanen genetischen Austausch, entweder zwischen einer Art (intraspezies Transformation) oder zwischen verwandten Arten (interspezies Transformation). Diese große genetische Flexibilität erleichtert eine Anpassung der Bakterien an veränderte Umweltbedingungen. Der horizontale

Genstransfer ist verantwortlich für die Vielzahl an Kapsel-Serotypen und die auftretenden Antibiotikaresistenzen.

1.1.1 Virulenzfaktoren

S. pneumoniae bildet einige Faktoren aus, die bei der Pathogenese von Infektionen eine Rolle spielen (Abb. 2). Die meisten dieser Faktoren sind an der Oberfläche der Zelle lokalisiert.

Eine **Polysaccharidkapsel** umgibt das Bakterium. Die Kapsel bietet den Bakterien Schutz vor der Phagozytose durch polymorphkernige Leukozyten und inhibiert die Aktivierung der alternativen Komplementkaskade [36]. Pneumokokken lassen sich in mehr als 90 serologisch verschiedene Kapseltypen unterscheiden [64].

Die **Zellwand** besteht hauptsächlich aus Peptidoglykan, in das Zellwandpolysaccharide, Teichonsäure und Lipoteichonsäure verankert sind. Phosphorylcholin, Bestandteil der Zellwandpolysaccharide, bildet den Anker für einige Oberflächenproteine und für PAF (platelet-activating factor). Die Zellwand und Zellwandpolysaccharide lösen entzündliche Reaktionen durch Aktivierung des alternativen Komplementweges aus [157].

Das **Pneumolysin** ist im Gegensatz zu den anderen Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* intrazellulär lokalisiert [77]. Bisher wurde angenommen, dass das Toxin durch die Aktivität des Autolysins freigesetzt wird. Neuere Untersuchungen konnten dies jedoch nicht bestätigen [7]. Das Pneumolysin ist Mitglied der Familie der Thiol-aktivierten Zytolysine [150]. Die Proteine binden an das Cholesterin in der Zytoplasmamembran der Wirtszelle. Durch Oligomerisierung werden transmembrane Poren gebildet, die das Ausbluten der Zelle verursachen [55, 120]. Neben der zytotoxischen Aktivität besitzt Pneumolysin die Eigenschaft, in Abwesenheit von spezifischen Antikörpern, den klassischen Komplementweg beim Menschen zu aktivieren [108]. In niedrigen Konzentrationen hemmt es die bakterielle Aktivität und Wanderung von Neutrophilen und die Fähigkeit opsonisierte Pneumokokken zu töten [107]. Weiterhin stimuliert Pneumolysin die Produktion von Zytokinen [70] und die NO-Produktion durch Makrophagen [21]. Pneumolysin unterdrückt ebenso das Schlagen der Zilien der humanen respiratorischen Epithelzellen [138], erhöht die alveolare Permeabilität [121] und hemmt die Lymphozytenproliferation [51]. Es ist eine bedeutende Komponente bei

der Zerstörung der Blut-Hirnschranke und trägt damit zum Eintritt der Pneumokokken in den zerebralen Bereich bei [163].

Das **Autolysin** N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase (LytA) ist ein 35 kDa großes [66], über Cholin [110] auf der Oberfläche der Pneumokokken lokalisiertes [45], die Zellwand degradierendes Enzym. Unter normalen Umweltbedingungen ist das Enzym inaktiv. Durch Nährstoffmangel oder Penicillinbehandlung kommt es zur Aktivierung von LytA und damit zur Autolyse der Pneumokokken [110], wodurch Zellwandbestandteile und zytoplasmatische Komponenten freigesetzt werden [92].

Es existieren mindestens zwei Enzyme mit **Neuraminidase**aktivität bei *S. pneumoniae* [28], NanA und NanB. NanA ist ein auf der Oberfläche der Pneumokokken lokalisiertes Protein [29], NanB fehlt ein LPXTG-Motiv [17]. Neuraminidasen schneiden N-Acetylmuraminsäure von Mucin, Glykoproteinen und Gangliosiden [127]. Dadurch kommt es zur Zerstörung von Wirtsgewebe und wahrscheinlich zur Freilegung von Oberflächenrezeptoren für die Interaktion mit Pneumokokken, was zu einer ansteigenden Adhärenz führen kann [3, 84]. Auch setzen Neuraminidasen die Viskosität von Schleim herab, wodurch eine erhöhte Kolonisierung durch Pneumokokken ermöglicht wird [127].

Die **Hyaluronidase** ist ein 107 kDa großes Enzym [15], das über ein LPXTG-Motiv in der Zellwand der Pneumokokken verankert ist [75]. Die Hyaluronidase degradiert Hyaluronsäure, einen Bestandteil der extrazellulären Matrix. Das Enzym spielt eine Rolle in der Pathogenese, denn es ermöglicht einen besseren Zugriff der Pneumokokken auf das Wirtsgewebe für die Kolonisierung. Es ist erforderlich für die Migration der Pneumokokken zwischen den Geweben [110]. Die Hyaluronidase spielt z.B. eine Rolle bei der Translokalisierung der Pneumokokken vom Blut in das Hirn über die Blut-Hirnschranke [99].

PspA (Pneumococcal surface protein A) ist ein auf der Zelloberfläche lokalisiertes Protein [98], das über eine Cholinbinde-Region am C-Terminus verankert ist [160]. Die Virulenz scheint darauf zu beruhen, dass PspA die Pneumokokken vor dem Komplementsystem schützt [41, 159, 160], indem es die Komplement-vermittelte Phagozytose von *S. pneumoniae* reduziert [22]. PspA fungiert weiterhin als Rezeptor für Laktoferrin [56, 59]. Es ist involviert in die Eisenaufnahme und trägt so zum Wachstum der Pneumokokken unter Eisen-limitierenden Bedingungen bei [59].

Bei **PsaA (Pneumococcal surface adhesin A)** handelt es sich um ein 37 kDa großes oberflächenverankertes Lipoprotein, das essentiell für die Virulenz der Pneumokokken ist [124]. Das *psaA*-Gen ist Teil des *psa*-Operons, das eine regulatorische Funktion bei der Adhäsion zu spielen scheint. Es beeinflusst die Expression von Cholinbinde-Proteinen auf der Zelloberfläche [102]. Das Protein ist eine Komponente eines ABC-Typ Manganese Permease Membran Transport-Systems [16]. Seine Funktion ist der Transport von Mn^{2+} und Zn^{2+} in das Zytoplasma der Bakterien [46].

CbpA, auch unter den Namen SpsA, PbcA und PspC beschrieben, ist ein auf der Oberfläche vorkommendes Protein von *S. pneumoniae*. Es bindet spezifisch an humanes sekretorisches Immunglobulin A (SIgA) über die sekretorische Komponente (SC) [58]. Das Bindungsmotiv für SIgA und SC entspricht dem Hexapeptid YRNYPT [60]. Neben der Bindung an SIgA geht das Protein eine Bindung über kurze Konsensus Repeats (SCRs) mit humanem Komplementfaktor H (FH) ein [44, 47]. Weiterhin bindet CbpA an Glykokonjugate, Sialinsäure und Laktotetraose auf der Zelloberfläche von aktivierten humanen Epithelzellen [119] und bindet an die C3-Komponente des Komplementsystems [132].

Immunglobulin A1 Protease, siehe unter Punkt 1.3 .

PcpA (Pneumococcal choline-binding protein A) ist ein über eine Cholin-Bindedomäne auf der Zelloberfläche lokalisiertes Protein mit der vorhergesagten Größe von 79 kDa. Die Funktion von PcpA ist noch nicht bekannt. Aufgrund des Vorkommens von leucinreichen Repeats (LRRs) in der N-terminalen Domäne könnte das Protein an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sein und damit bei der Adhäsion an die humane extrazelluläre Matrix eine Rolle spielen [125].

PpmA ist ein Protein, das auf der Oberfläche der Pneumokokken verankert ist. Overweg *et al.* haben gezeigt, dass nach Inaktivierung von PpmA die Virulenz von Stamm D39 in Mäusen reduziert war, und damit das Protein eine Rolle in der Virulenz der Pneumokokken spielt [106].

ZmpB, siehe unter Punkt 1.3 .

ZmpC, siehe unter Punkt 1.3 .

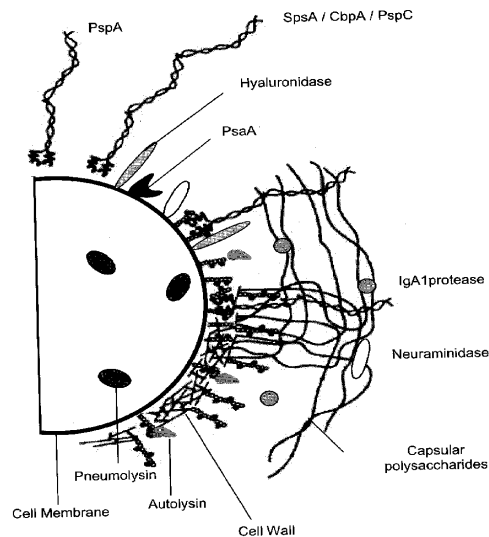


Abbildung 2: Hypothetische Darstellung von Virulenzfaktoren bei *S. pneumoniae*. Verändert nach Briles *et al.* [22].

1.1.2 Phasenvariation

Auf transparentem festem Medium lässt sich *S. pneumoniae* in verschiedene Populationen einteilen. *S. pneumoniae* besitzt die Fähigkeit zur spontanen und reversiblen Phasenvariation, d.h. Pneumokokken können sowohl in der opaken als auch in der transparenten Kolonieform auftreten. Die Organismen wechseln spontan zwischen den beiden Formen mit einer Rate von 10^{-3} und 10^{-6} [152]. Die Phasenvariation ist unabhängig von den Kulturbedingungen, wie dem pH, der Temperatur oder der Osmolarität.

Die phänotypische Variation ist ein bedeutender Mechanismus, der es den Bakterien ermöglicht, sich an verschiedene Wirtsumgebungen anzupassen. Opake und transparente Kolonien sind unterschiedlich virulent. Während transparente Formen eher den Nasopharynx besiedeln [152] und eine erhöhte Kapazität aufweisen die Blut-Hirnschranke zu überwinden [118], zeigen opake Formen eine steigende Virulenz bei systemischen Infektionen [105]. Dies resultiert aus dem Wechsel in der Expression von spezifischen Zelloberflächenkomponenten [154]. Die effizientere Kolonisierung des Nasopharynx durch transparente Pneumokokken korreliert mit der größeren Adhärenz an Lungenepithelzellen des Menschen [40, 119]. Einen Beitrag dazu liefert der größere Gehalt an Teichonsäure [82], in die Phosphorylcholin eingelagert ist. Phosphorylcholin kann direkt mit den Wirtsmolekülen interagieren. Auch CbpA [119], ein an der Adhärenz der Pneumokokken an Wirtszellen beteiligtes

Oberflächenprotein, sowie die Pyruvatoxidase SpxB und PpmA, vermutlich ein membrangebundenes Chaperon, werden in der transparenten Form verstärkt expremiert und tragen zu der ansteigenden Adhärenz und Kolonisierung der transparenten Variante bei [105, 119, 135]. Ebenfalls wurde eine stärkere Expression von *lytA* [153] in der transparenten Variante im Vergleich zur Opaken gefunden. Die opake Variante hingegen enthält mehr Kapselpolysaccharide als die Transparente und weniger Teichonsäure [82], das auf einen besseren Schutz gegen die Wirtsabwehr und damit die erhöhte Virulenz im Vergleich zur transparenten Form hindeutet. Weiterhin wird in der opaken Variante mehr PspA [82, 119] und EF-Ts [105] expremiert. EF-Ts scheint auf eine stärkere metabolische Aktivität hinzuweisen, das das schnelle invasive Wachstum der opaken Variante erklären kann [105].

1.1.3 Pathogenese von Pneumokokken-Infektionen

S. pneumoniae ist ein human-pathogenes Bakterium. Es ist ein Bewohner der normalen nasopharyngealen Flora. Bis zu 60 % der Bevölkerung sind Träger der Pneumokokken [5]. Pneumokokken können sich vom Nasopharynx in die Eustachische Röhre und von dort in die Ohrhöhle ausbreiten und Otitis media verursachen. Ein Ausbreiten in die Lungenalveolen führt zu einer Pneumonie. In 15 bis 30 % der Fälle der Lungenentzündung können die Bakterien in die Blutbahn gelangen und eine Bakteriämie verursachen. Meningitis tritt auf, wenn die Bakterien aus dem Blut die Blut-Hirnschranke überwinden und die Hirnhäute (Meningen) infizieren [134]. Vor allem Kinder, ältere und immunsupprimierte Menschen sind anfällig.

Das mukosale Epithel des Nasopharynx ist die erste Stelle der Kolonisierung. Es kann von mehreren Serotypen gleichzeitig bevölkert werden [5]. Eine Infektion geht von der Besiedlung des mukosalen Epithels des Nasopharynx aus, wobei die Morphologie der Bakterien bei der Anheftung an den Nasopharynx eine wichtige Rolle spielt. Nur die transparenten Varianten verbleiben im Nasopharynx [152]. Die Adhäsion von Pneumokokken an die Zellen des Wirtes wird als Zwei-Schritt-Prozess beschrieben [41]. Im ersten Schritt bindet das Bakterium an die Glykokonjugat-Rezeptoren auf der Oberfläche der respiratorischen Epithelzellen und Endothelzellen. Im folgenden Schritt kommt es zur Zytokinaktivierung und zur Expression von PAF-Rezeptoren, an die die transparenten Varianten über einen Phosphorylliganden binden [42]. Die Adhärenz der Pneumokokken an die Wirtszellen steigt. Diese beiden Schritte führen zur Invasion der Pneumokokken. Neben Glykokonjugat-Rezeptoren können auch extrazelluläre Matrixproteine, wie Kollagene, als

Substrat für die bakterielle Adhärenz dienen. Fibronektin ist ein Glykoprotein, das an Kollagen oder Bakterien binden kann und dadurch die Anheftung an Bindegewebszellen vermittelt [49]. Verantwortlich für die Bindung von Pneumokokken an Fibronektin ist das oberflächen-assoziierte Protein PavA [68]. Weit verbreitet sind Kollagene. Sie gelten mengenmäßig als die häufigsten tierischen Proteine [49]. Kollagene sind langfaserige, linearkolloide, hochmolekulare Skleroproteine. Man unterscheidet mehrere Kollagentypen voneinander, von Kollagen I bis X, je nach Häufigkeit und Vorkommen. Die bakteriellen Adhäsine, die die Bindung an Kollagen vermitteln, sind noch nicht bekannt.

1.1.4 Pneumokokken-Vakzine

Pneumokokken-Infektionen können mit Antibiotika behandelt werden. Trotz Antibiotika bleibt die Sterblichkeit jedoch hoch und zunehmend kommt es zu Antibiotikaresistenzen bei *S. pneumoniae*. Die Zahl der penicillinresistenten Stämme ist weltweit gestiegen [4]. Verantwortlich für die Resistenz von Pneumokokken gegen β -Laktam Antibiotika ist die Veränderung von Penicillin-Bindeproteinen (PBPs) [136], die durch Mosaikgene kodiert werden. Eine Veränderung der PBPs reduziert die Affinität für das Antibiotikum. Aber auch nicht-*pbp*-Gene sind in die β -Laktam Resistenz von Pneumokokken involviert [57]. Durch den horizontalen Gentransfer kann es leicht zu multiresistenten Stämmen kommen.

Ein Schutz vor Pneumokokken-Erkrankungen kann die Impfung bieten. Auf dem Markt befindet sich ein Impfstoff, der aus den aufgereinigten Kapselpolysacchariden der 23 am häufigsten in den USA und Europa vorkommenden Serotypen von *S. pneumoniae* hergestellt wurde. Die Polysaccharide des Impfstoffs induzieren die Bildung von Antikörpern gegen die Kapsel durch eine T-Zell-unabhängige Immunantwort [9]. Auf Grund der geringen Immunantwort auf die Polysaccharid-Vakzine bei Kindern unter zwei Jahren [27] und immungeschwächten Menschen war es nötig neue Impfstoffe zu finden. Eine Alternative zu der Polysaccharid-Vakzine stellt die kovalente Bindung von Polysacchariden an ein Peptid dar. Zur Zeit gibt es auf dem Markt eine Vakzine, bei der die Polysaccharide der sieben häufigsten Serotypen an ein Diphtherie-Toxoid gebunden sind [53]. Die Immunantwort auf diese Vakzine ist eine T-Zell-abhängige. Nachteil dieser Vakzine sind die höheren Kosten und die große Anzahl an Serotypen [129], die nicht alle an die Polysaccharide gleichzeitig gekoppelt werden können, so dass eine solche Vakzine nicht in allen Ländern gleichermaßen Schutz bietet. Um neue Vakzine zu finden, werden vor allem die Pneumokokken-Proteine auf ihre antigene Wirkung hin untersucht [24]. Ein Schutz gegen Pneumokokken-Infektionen

würde dann unabhängig vom Serotyp sein. Als potentielle Vakzine-Antigene werden Autolysin, Neuraminidase, Pneumolysinderivate mit reduzierter Toxizität [109], PspA, PsaA, PspC, CbpA und PpmA [14, 22, 23, 24, 78, 92, 105, 144] beschrieben. Eine weitere Möglichkeit kann die Bindung von Polysacchariden an Pneumokokken-Proteine darstellen [88]. Auch DNA-Vakzine bieten neue Möglichkeiten des Immunschutzes gegen Pneumokokken-Infektionen [156].

1.2 Proteasen

Proteasen sind Enzyme, die die Peptidbindungen von Proteinen hydrolysieren können. Dabei unterscheidet man zwei Gruppen voneinander, die Endo- und die Exopeptidasen. Die Exopeptidasen hydrolysieren endständige Peptidbindungen, während die Endopeptidasen interne Peptidbindungen spalten. Endopeptidasen werden weiter in vier Gruppen unterteilt, die Serinproteasen, die Cysteinproteasen, die Aspartatproteasen und die Metalloproteasen. Die Serinproteasen haben ein Serin als aktives Zentrum, das in den katalytischen Prozess involviert ist, Cysteinproteasen ein Cystein, Aspartatproteasen zwei Aspartatreste und Metalloproteasen benötigen ein Metallion im katalytischen Mechanismus [10].

Proteasen können diverse Funktionen übernehmen. Sie können der Nährstoffversorgung der Bakterien dienen, an Wirtsgewebe binden und damit die Kolonisierung und Invasion in Wirtsgewebe ermöglichen oder die Bakterien vor dem Immunsystem schützen. Die meisten Proteasen haben mehrere Funktionen.

Viele extrazelluläre Proteasen sind in der Lage Proteine zu spalten, die der Nährstoffaufnahme dienen. Vor allem Kasein ist ein beliebtes Substrat bei Milchsäurebakterien, die zur Herstellung von Milchprodukten wie Käse oder Joghurt eingesetzt werden. Durch Hydrolyse des Kaseins in Oligonukleotide [85], die über ein Oligopeptidtransportsystem [145] in die Zelle transportiert werden, können wichtige essentielle Aminosäuren gewonnen werden, die von den Bakterien nicht selbst synthetisiert werden können. Es gibt Proteasen, die α -Kasein hydrolysieren, wie die Serinprotease PrtH von *Lactobacillus helveticus* [111], PrtS von *Streptococcus thermophilus* [50] und Proteasen, die β -Kasein spalten, wie PrtB von *Lactococcus delbrueckii* [54]. Bei *Streptococcus mutans* wurden Metalloproteasen gefunden, die Gelatine und Kollagen-ähnliche Substrate degradieren können [62]. Eine extrazelluläre Protease von *Streptococcus gordonii* kann als

Substrat Rindergelatine verwenden [79]. Auch Albumine [90; 139] können von Proteasen degradiert werden.

Proteasen können aber auch Proteine aus der extrazellulären Matrix spalten. Zum einen werden dadurch Nährstoffe frei, die die Bakterien nutzen, zum anderen wird die Kolonisierung und Invasion der Bakterien in das Wirtsgewebe ermöglicht. Bei *Streptococcus pyogenes* ist unter anderem die Cysteinprotease SpeB an der Degradierung von Fibronectin und Vitronectin beteiligt. Es ermöglicht den Bakterien die Besiedlung des oberen Respirationstraktes. Diese Protease ist auch in der Lage humanen Interleukin 1 β -Vorläufer in aktives IL-1 β zu spalten [80]. Kollagen IV aus humaner Plazenta kann von einer extrazellulären Protease von *S. gordonii* degradiert werden [79].

Bakterien entwickeln Mechanismen zum Schutz vor dem Immunsystem. Pneumokokken z.B. schützen sich durch eine Polysaccharidkapsel vor der Phagozytose durch Makrophagen. Aber auch extrazelluläre Proteasen sind in der Lage mit dem Immunsystem zu interagieren, wie die IgA1-Protease, die Immunglobulin A1 (IgA1) spaltet [113, 151]. Eine andere Möglichkeit ist die Degradierung von dem Komplementfaktor C5a durch die C5a-Peptidase von Gruppe A und B Streptokokken [11, 37].

Proteasen können durch Umweltfaktoren beeinflusst werden. Manche Proteasen benötigen Kalzium oder Zinkionen, um aktiv und stabil zu sein [38] oder werden reguliert durch die Temperatur, den Sauerstoff-, CO₂- oder Stickstoffgehalt, Dipeptide, Glukose und andere Zucker oder Aminosäuren [97, 114, 128].

1.2.1 Verankerung und Aktivierung von Proteinen

Extrazelluläre Proteine werden oft als Prä-Pro-Proteine synthetisiert, die am N-terminalen Ende ein Signalpeptid (Prä-Protein) enthalten [1], das aus 15-20 hydrophoben Resten gebildet wird [95]. Bei der Translokation des Proteins durch die Zellmembran wird mit Hilfe der Signalpeptidase das Signalpeptid abgespalten [71, 82]. Am C-terminalen Ende des Proteins befindet sich das LPXTG-Motiv [52], gefolgt von einer hydrophoben Domäne [143]. Zwischen dem Treonyl- und dem Glycyl-Rest des LPXTG-Motivs schneidet eine Sortase und überträgt das Protein auf eine freie Aminosäure im Peptidoglykan (Abb. 3). Die Protease ist damit über das C-terminale LPXTG-Motiv in der Zellwand der Bakterien verankert [101]. Die Aktivierung der Protease wird in der Regel durch Abspalten des Pro-Peptids durch Maturaseproteine, die entweder in unmittelbarer Nähe zur Protease oder auch an anderer Stelle im Genom lokalisiert sind, ausgeführt.

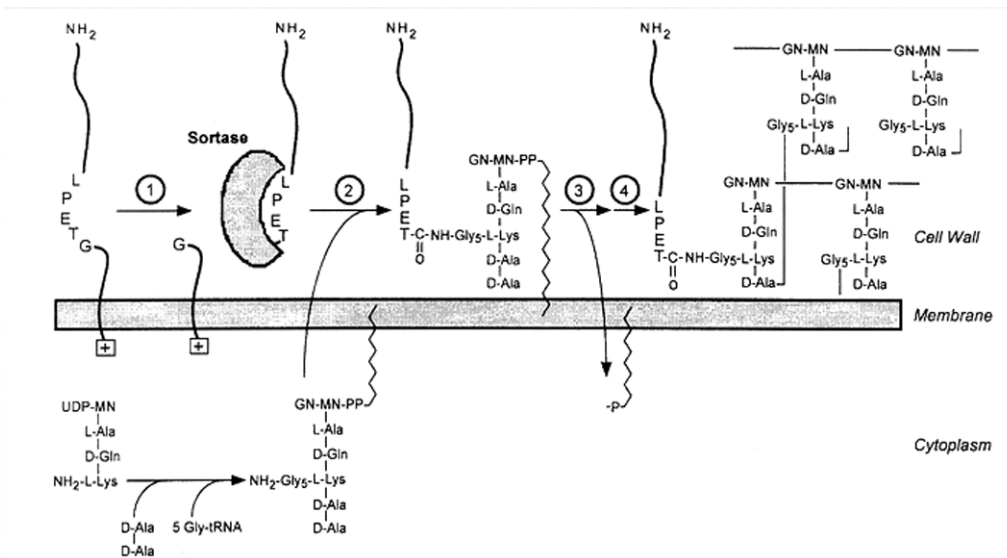


Abbildung 3: Vorgeschlagenes Modell der Zellwandverankerung eines Proteins bei gram-positiven Bakterien. 1, Das Vorläuferprotein wird über das N-terminale Signalpeptid aus dem Zytoplasma exportiert. 2, Das Protein wird vor dem Freilassen ins extrazelluläre Milieu geschützt. 3, Das Protein wird zwischen dem Threonyl- und Glycyl-Rest des LPXTG-Motivs geschnitten. 4, Übertragung auf eine Aminogruppe in der Zellwand [101].

1.2.2 Autoprozessierung

In vielen Fällen werden Proteine nicht nur als eine Bande auf Immunoblots identifiziert, sondern zeigen häufig eine Zerlegung in mehrere Stücke. Dieser Prozess wird Autoprozessierung genannt. Die Degradierung beruht auf einem intraspezifischen Prozess, der weder durch andere Proteine beeinflusst [112, 161], noch durch Serinproteasemhemmer wie das PMSF gehemmt werden kann [73, 112, 147].

Eine Autoprozessierung von Proteinen wurde unter anderem bei den folgenden Proteinen an den angegebenen Prozessierungs-Schnittstellen gefunden:

LexA aus *Escherichia coli*

LexA aus *Escherichia carotovara*

↓
RVAAGEP
RVAAGEP

	↓
ImpA aus <i>Streptococcus enterica</i> serovar Typhimurium	RCQAGFYP
UmuD aus <i>Escherichia coli</i>	LVQCGFP
SamA aus <i>Streptococcus enterica</i> serovar Typhimurium	RCPAGFP
MucA aus <i>Streptococcus enterica</i> serovar Typhimurium	RIS AGFP
DinR aus <i>Bacillus subtilis</i>	KVTAGSP
SpaseI aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	RVEGHSM
SpaseI aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	I VVAHEE
SpaseI aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	KAQAFTV
SpaseI aus <i>Escherichia coli</i>	AAQAARD
SpaseI aus <i>Bacillus subtilis</i>	DGESMEP

Wie beim LexA-Protein aus *E. coli* kann das Protein durch den Autoprozessierungs-Prozess inaktiviert werden [89].

1.3 Proteasen von *Streptococcus pneumoniae*

Extrazelluläre Proteasen, die bei *S. pneumoniae* vorkommen, sind z.B. Zink-Metalloproteasen, wie die IgA1-Protease, das ZmpB und ZmpC, und Serinproteasen [141].

Bei der **Immunglobulin A1 Protease (IgA1 Protease)** handelt es sich um eine Protease, die anders als andere Oberflächenproteine über ein N-terminal gelegenes LPXTG-Motiv in der Zellwand verankert wird [116]. Die IgA1 Protease schneidet die schwere Kette von humanem Immunglobulin A1 [115, 151] und scheint bedeutend für die Fähigkeit der Kolonisierung der Bakterien an mukosale Oberflächen zu sein [81, 116]. Fast alle klinischen Isolate zeigen IgA1 Protease-Aktivität [93].

Das **ZmpB (Zinc metalloproteinase B)** ist eine angenommene Protease mit Aminosäuresequenz-Homologie zu IgA1-Proteasen von gram-positiven Bakterien, jedoch ohne selbige Funktion. Die Protease scheint in der Translokalisierung von LytA und CbpA eine Rolle zu spielen. Anhand von ZmpB-Mutanten konnte gezeigt werden, dass CbpA innerhalb des Zytoplasmas lokalisiert blieb, und die Mutante bei Penicillingabe nicht lysiert war [103].

Das **ZmpC (Zinc metalloproteinase C)** ist eine Oberflächen-assoziierte Metalloprotease, die humane Metalloprotease 9 (MMP-9) schneidet. MMP-9 ist eine Typ IV Kollagenase, die in der extrazellulären Matrix vorkommt und in die Zellmigration sowie in das Öffnen der Blut-Hirnschranke während eines entzündlichen Prozesses involviert ist [100]. Es wird angenommen, dass die Pneumokokken durch Spalten von MMP-9 in die alveolaren Zwischenräume eindringen, das Endothel passieren können und somit die Invasion des Wirtsgewebes ermöglicht wird [104].

1.3.1 Serinproteasen

Die Serinproteasen werden in unterschiedliche Familien eingeteilt. Eine der größten Familien ist die der Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen (Subtilasen). Die Subtilasefamilie wird charakterisiert durch die katalytische Triade mit den Motiven Asp₃₂-His₆₄-Ser₂₂₁, was auf der Homologie zum Subtilisin beruht. Die Mehrzahl der Subtilasen werden als Prä-Pro-Protein synthetisiert, durch das Signal-Peptid durch die Zellmembran transloziert und anschließend durch Abspalten des Pro-Peptids aktiviert. Die katalytische Domäne ist hinter der Prä-Pro-Region lokalisiert. Die meisten Subtilasen kommen extrazellulär vor [131]. Disulfidbrücken und Kalziumionen stabilisieren die Proteasen [130]. Serinproteasen können durch bestimmte Reagentien gehemmt werden. Ein Serinproteasehemmer ist z.B. das PMSF, das gleichzeitig auch Cysteinproteasen hemmen kann [10].

Von Courtney (1991) wurde gezeigt, dass bei *S. pneumoniae* mindestens zwei Klassen von Serinproteasen vorkommen. Der eine Proteasentyp war sensitiv für Kalzium-Chelatoren, der andere war resistent. Die Proteasen aus dem Kulturüberstand degradierten Fibronectin, Laminin, Fibrinogen, Fibrin, Elastin und Gelatine [39].

Lock *et al.* (1988) beschrieben eine mögliche Modifizierung der Zellwand-gebundenen Neuraminidase A von *S. pneumoniae* durch eine Serinprotease [91].

Die Signal Peptidase I (SpaseI) gehört zu einer neuen Klasse von Serinproteasen, da sie keine katalytische Triade, sondern eine Dyade enthält. Nur die Motive Aspartat und Serin sind vorhanden. Das Protein ist verantwortlich für die Prozessierung von sekretierten Proteinen [161].

Im Genom des Typ 4-Stamms KNR. 7/87 findet man weiterhin die extrazelluläre Serinprotease [141] PrtA.

1.4 PrtA (Pneumococcal protease A)

1.4.1 Identifizierung

Durch Untersuchung einer Genexpressionsbank des Pneumokokken-Genoms von Serotyp 1 Stamm 3.B in *E. coli* mit dem Rekonvaleszentenserum eines Patienten nach systemischer Pneumokokken-Infektion konnten 23 immunogene Pneumokokken-Proteine identifiziert werden [162]. Neben bekannten Pneumokokken-Proteinen wurden unbekannte Proteine identifiziert. Das Gen eines dieser Proteine wurde als *prtA* (pneumococcal protease A) bezeichnet und unter der Accession-Number AF 127143 in der GenBank hinterlegt. In der vollständig sequenzierten DNA-Sequenz des Pneumokokken-Genoms des Typ 4-Stamms KNR. 7/87 (www.tigr.org) findet man den für PrtA kodierenden Bereich mit 6423 bp in contig 3836 an Position 497.585 - 504.006 [18, 19].

1.4.2 Variation in der *prtA*-Sequenz

Ein Vergleich der *prtA*-Sequenz von Stamm 3B mit dem Stamm KNR. 7/87 und 78 klinischen Isolaten zeigte, dass der Bereich um die katalytische Domäne (nt331 bis 1040) hochkonserviert vorliegt, wohingegen in einer zentralen Region (nt 3401 bis 4568) eine sehr hohe Diversität gefunden wurde [19].

1.4.3 Aufbau und Lokalisierung von PrtA

Das 6423 bp lange PrtA aus dem Stamm 3B besteht aus 2144 Aminosäuren. Dies entspricht einer Größe von 241 kDa. Das PrtA enthält die Motive Asp₂₃₇, His₃₀₄, Ser₆₉₅ (Abb. 4). Diese Motive sind typisch für die katalytische Triade von Proteasen der Subtilasefamilie [19]. Auch das PrtA weist die Merkmale eines Oberflächen-assoziierten Proteins auf. Neben einem N-terminal gelegenen Signalpeptid (aa 1 - 19), ist C-terminal ein LPXTG-Motiv (aa 2111 - 2115) zu finden [19] (Abb. 4).

Es wurde stromaufwärts des PrtA kein Maturaseprotein gefunden [19].

Durch Computeranalysen des Pneumokokken-Genoms und Immunozytometrie wurde die Oberflächenlokalisierung von PrtA durch Wizemann *et al.* 2001 bestätigt [158]. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *S. pneumoniae* mit goldmarkierten Antikörpern ist die Protease sowohl zellulär als auch extrazellulär zu finden (Abb. 5).

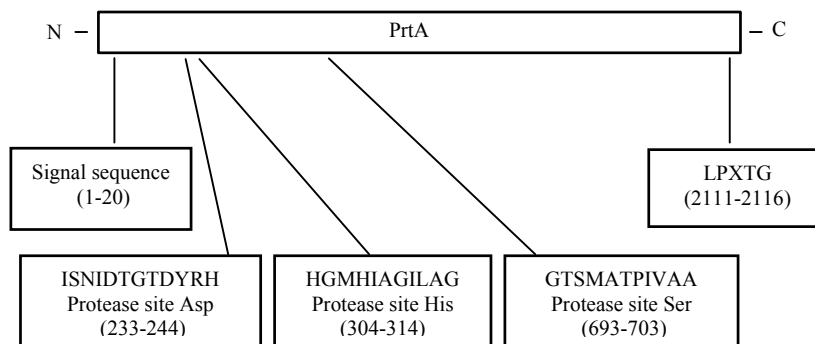


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Signalsequenz, der katalytischen Triade und des Zellwandankers im PrtA von Stamm 3.B.

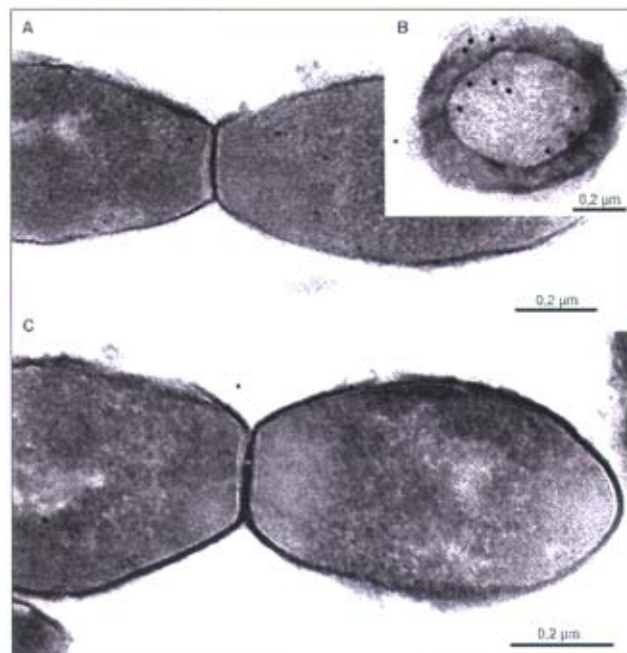


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des kapsellosen Pneumokokken-Stamms R6x (A, C) und des bekapselten Stamms D39 (B) unter Verwendung von goldmarkiertem unspezifischem Präimmenserum (C) und goldmarkiertem gegen PrtA-gerichteten Immunerum (A, B). [18].

1.4.4 PrtA-Formen

Zwei Formen von PrtA wurden durch Westernblot-Analyse gefunden. Ein vermutetes Vorläufermolekül mit einem Molekulargewicht von 240 kDa und ein maturiertes Protein mit 215 kDa. Beide Formen sind in Pneumokokken-Gesamtzelllysate nachweisbar, sowie die 215 kDa-Form im Kulturüberstand [19]. Bethe 2001 konnte an 78 klinischen Pneumokokken-Isolaten zeigen, dass das *prtA*-Gen in allen untersuchten Isolaten vorhanden ist. Bei Westernblot-Analysen zeigte sich, dass es keinen Unterschied in der Expression zwischen Pneumokokken-Isolaten, die aus dem Liquor stammen und denen, die aus dem Blut isoliert wurden, zu sehen war [18].

1.4.5 Funktion

Bethe (2001) konnte zeigen, dass der Kulturüberstand einer Pneumokokken-Kultur eine kaseinolytische Aktivität zeigt, die zum Teil auf das PrtA zurückzuführen ist. Die genaue Funktion des PrtA ist noch unbekannt [18].

1.4.6 Virulenz

Im Mausmodell zeigten PrtA-defiziente Mutanten eine geringere Virulenz als der Wildtyp-Stamm D39 [18]. PrtA scheint damit als Virulenzfaktor eine Rolle in der Pathogenese von Pneumokokken-Infektionen zu spielen.

1.4.7 Homologien

Die Analyse des Genoms des Typ-4 Stamms KNR. 7/87 hat ergeben, dass kein zweites Gen mit Homologien zu der Sequenz von *prtA* vorhanden ist.

Die größte Ähnlichkeit weist die katalytische Domäne des PrtA zum PrtP von *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (M83946), zum PrtP von *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (JO4962), zum PrtB von *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* (L48487), zum PrtH von *Lactobacillus helveticus* (AF133727), zum PrtS von *Streptococcus thermophilus* (AAG09771), zum ScpA von *Streptococcus pyogenes* (P15926) und zum ScpB von *Streptococcus agalactiae* (U56908) auf [18].

Bei den aufgeführten homologen Proteasen handelt es sich um große Proteasen. Das PrtP z.B. hat ein Molekulargewicht von 200 kDa [148], das PrtB von 212 kDa [54] und das ScpB von 120 kDa [33]. Alle aufgeführten homologen Proteine sind auf der Oberfläche der Bakterien lokalisierte Serinproteasen. Als Prä-Pro-Proteine synthetisiert, wird das Prä-Peptid (Signalpeptid) abgespalten und das Protein durch die Zellmembran transloziert. Bei Proteasen gram-positiver Proteine wird die Protease meist durch Schneiden des Pro-Peptids durch eine andere Protease aktiviert [101]. So auch das PrtP von *Lactococcus lactis*. Das 33 kDa große PrtM ist zur Aktivierung dieser Protease nötig. Das *prtM*-Gen liegt stromaufwärts und in entgegengesetzter Richtung des Proteasegens. Jedoch lassen sich die unterschiedlich großen auf einem Westernblot sichtbaren Banden von Vorläufer- und maturiertem Protein nicht durch das Entfernen des Pro-Peptids erklären. Es wird angenommen, dass ebenfalls eine Prozessierung am C-Terminus stattfinden muss [148]. Beim PrtB von *L. delbrueckii* liegt stromaufwärts des Proteasegens eine DNA-Region, die Ähnlichkeit zum *prtM* von *L. paracasei* subsp. *paracasei* zeigt. Das resultierende Protein scheint jedoch zu klein zu sein, um als Chaperon fungieren zu können [54]. Hingegen konnte beim PrtS von *S. thermophilus* kein PrtM-ähnliches Protein gefunden werden [50]. Die Proteasen sind über ein LPXTG-Motiv in der Zellwand der Bakterien verankert. Beim PrtB kommt nicht das klassische, sondern ein degeneriertes Zellwandankermotiv vor, mit der Sequenz LPKKT [54], beim ScpA von *S. pyogenes* und dem ScpB von *S. agalataiae* die Sequenz LPTTN [2, 33]. Im Gegensatz zu den anderen Proteasen ist PrtB nicht im Kulturüberstand zu finden [54]. PrtP, PrtB und PrtH sind Proteine von Laktobazillen und Laktokokken. Die Hauptfunktion dieser Proteasen liegt in der Bereitstellung von Kasein-Hydrolyseprodukten zur Versorgung der Bakterien mit Aminosäuren, die sie selbst nicht synthetisieren können. Die Proteasen unterscheiden sich in ihrer Spezifität für das Substrat. PrtP [26] und PrtB [54] spalten β -Kasein, während PrtS [50] und PrtH [111] α -Kasein degradieren. Das PrtP ist weiterhin in der Lage das auf der Zelloberfläche lokalisierte Autolysin AcmA zu degradieren, das verantwortlich ist für die Zellteilung und Autolyse während der stationären Phase des Wachstums der Bakterien. Der Grad der Degradierung hängt von der Spezifität, Lokalisation und der Menge des produzierten PrtP ab [26]. Das ScpA ist ein hitzestabiles Protein, dessen Aktivität durch Zinkionen gehemmt wird [137]. ScpA zeichnet sich durch eine ungewöhnliche Substratspezifität aus. Es handelt sich bei dem Protein um eine C5a-Peptidase, die den humanen Komplementfaktor C5a hydrolysiert [31]. Es wird angenommen, dass die Protease eine wichtige Rolle bei der Kolonisierung des Wirtes spielt [2]. Auch das ScpB von *S.*

agalactiae kann den Komplementfaktor C5a spalten, dient gleichzeitig aber noch als Adhäsion, indem es an das Fibronektin binden kann [11].

1.5 Ziel dieser Arbeit

Trotz Einsatz von Antibiotika liegt die Sterblichkeitsrate nach Infektion mit *S. pneumoniae* hoch. Die Zunahme multiresistenter Pneumokokken erhöht die Notwendigkeit des Schutzes vor Pneumokokken-Infektionen durch Immunisierung und Entwicklung neuer Antibiotika. Zahlreiche Oberflächenproteine von *S. pneumoniae* wurden auf ihre immunogene Wirkung hin untersucht. Ein Screening von Pneumokokken-Proteinen brachte neue Proteine zu Tage. Eines davon war das PrtA. Ebenso wie andere Virulenzfaktoren ist das PrtA ein Oberflächenprotein mit immunogener Wirkung und wird damit zu einem potentiellen Kandidaten für den Einsatz als Vakzine [18].

Ziel dieser Arbeit war die Aufreinigung des nativen Proteins aus dem Kulturüberstand, sowie Untersuchungen zur biologischen Funktion der Serinprotease PrtA von *S. pneumoniae*.

Für die Aufreinigung des Proteins sollten Mutanten hergestellt werden, bei denen das Protein direkt in den Überstand entlassen wird und eingefügte Histidine trägt. Aus dem Kulturüberstand war es angestrebt das Protein affinitätschromatographisch aufzureinigen. Für die Charakterisierungsversuche sollte weiterhin eine PrtA-defiziente Mutante erzeugt werden. Von Bethe *et al.* wurde gezeigt, dass Kulturüberstand der Pneumokokken eine kaseinolytische Aktivität zeigt, die zum Teil auf PrtA zurückzuführen ist [19]. Diese Aktivität sollte in der Arbeit reproduziert und der mögliche Abbau weiterer Substrate untersucht werden. Neben einer katalytischen Aktivität sind homologe Proteine zu PrtA in der Lage an extrazelluläre Matrixbestandteile zu binden. Um herauszufinden, ob PrtA ebenfalls befähigt ist eine Interaktion mit Proteinen der extrazellulären Matrix einzugehen, sollten Bindungsassays mit Wildtyp und PrtA-defizienter Mutante angefertigt werden. Innerhalb der Arbeit sollten weiterhin zweidimensionale Gelelektrophoresen durchgeführt werden, um die Modifikation von bakterieneigenen Proteinen durch PrtA zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

Tabelle 1: *Streptococcus pneumoniae*

Stamm	Charakteristika	Herkunft/ Referenz
D39	Kapseltyp 2, klinisches Isolat	[6]
R6	Unbekapselt	[6]
R6x	Unbekapselt	[143]
SP-91	PrtA-defizientes Derivat von R6x (R6xprtA::pJDC9)	Stammsammlung*
SP-103	LPXTG-defizientes Derivat von R6	diese Arbeit
SP-107	LPXTG-defizientes, His-Tag tragendes Derivat von R6	diese Arbeit
SP-110	Signalpeptidloses Derivat von R6	diese Arbeit
SP-111	PrtA-defizientes Derivat von R6	diese Arbeit

* des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universität Düsseldorf

Tabelle 2: *Escherichia coli*

Stamm	Charakteristika	Herkunft/ Referenz
cc118	$\Delta(\text{ara leu})7697 \Delta\text{lacX74 araD139 phoA20 galE galK thi rpsE rpoB argE recA1}$	[96]
EC-6, EC-13, EC-15, EC-40	Expressionsvektoren SP-6, SP-13, SP-15, SP-40 [2]	Stammsammlung*

* des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universität Düsseldorf

2.2 Plasmide

Tabelle 3: Plasmide

Plasmid	Charakteristika	Herkunft/ Referenz
pGEM [®] -T Easy	TA-Klonierungsvektor, Ap ^r	Promega, Madison, USA
pJDC9	Expressionsvektor, Erm ^r	[30]
pet-28b	Expressionsvektor, N- und C-terminales His-Tag	Novagen, Madison, USA

2.3 Antikörper und Antiseren

Markierte Antikörper

Alkalische Phosphatase markiertes Ziege-Anti-Kaninchen IgG (Promega, Madison, USA)

Alkalische Phosphatase markiertes Ziege-Anti-Human IgG (Promega, Madison, USA)

Tetra-His markiertes Maus IgG (Qiagen, Hilden)

Peroxidase markiertes Ziege-Anti-Maus IgG (Dianova, Hamburg)

Fluorescein (FITC) markiertes Schwein-Anti-Kaninchen IgG (DAKO, Dänemark)

Nicht kommerziell erhältliche Antiseren

Anti-PrtA6	Polyklonales Kaninchenserum nach Immunisierung mit einem rekombinant in <i>E. coli</i> hergestellten carboxyterminalen Fragment (AS 1572 bis 1877) der Serinprotease PrtA.
3.S.4-Serum	Serum eines Patienten nach systemischer Pneumokokken-Infektion, entnommen 282 Tage nach Isolation des Erregers aus dem Blut.

2.4 Oligonukleotide (Primer)

Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe bezogen. Die Lage im Gen bezieht sich auf die TIGR4-Sequenz (AE 005672) von *S. pneumoniae*. In Tabelle 4-10 sind die verwendeten Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung aufgeführt.

Tabelle 4: Primer für die Real-Time PCR

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Position ¹
PrtA-1	TGGTGGCAAATCACTGTAGAAA	840-863*
PrtA-2	GCAAGAATCCCTGCAATATGC	903-924*
LDH-1	AACGCGTTATCGGTTTCAGGTA	431-452**
LDH-2	TCCACATCCAATTTTTCAGCAA	485-507**
bgaA-1	AATGGACCTGAGCGTAATTATGAAC	1999-2024***
bgaA-2	TGAAGCGGTTGCTGTTTTCC	2057-2077***

¹ In Bezug auf das Startcodon des *prtA-Gens, des **ldh-Gens, des ***bgaA-Gens

Tabelle 5: PCR-Primer zur Amplifikation der Erythromycinkassette *ermB* aus dem pJDC9-Vektor

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Position
erm3	AGAGTGTGTTGATAGTGCAGTATC	<i>ermB</i>
erm4	TTATTTCTCCCGTTAAATAATAG	<i>ermB</i>

Tabelle 6: PCR- und Sequenzierungsprimer zur Herstellung der PrtA-Mutante SP-104

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Position ¹
AN-1	TTAAATAAAGATACGGGAGAG	5848-5869
AN-2	GTTGATTTACAATTGATATTGTTTTA ²	6273-6300
AN-3	TAAAACAATATCAATTGTAAATCAAC ²	6273-6300
AN-4	TAGCCTTTAAATTTTGATAGAC	221 bp stromabwärts des PrtA
AN-5	ATGGATTTCGATGGTGAGATTC	5693-5714

¹ In Bezug auf das Startcodon des *prtA*-Gens

² Die für die Klonierung verwendeten Restriktionsstellen sind unterstrichen

Tabelle 7: PCR- und Sequenzierungsprimer zur Herstellung der PrtA-Mutante SP-107

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Position
AN-1	TTAAATAAAGATACGGGAGAG	5848-5869 ¹
AN-4	TAGCCTTTAAATTTTGATAGAC	221 bp stromabwärts des <i>prtA</i> -Gens
erm4	TTATTTCTCCCGTTAAATAATAG	<i>ermB</i>
AN2-His	TTAGTGATGGTGATGGTGATGGATATTGTT TTTATC ²	6273-6300 ¹
erm3-His	<u>CATCACCATCACCATCACTAAAGAGTGTGT</u> TGATAGTGCAGTATC ²	<i>ermB</i> (+ His-Tag)

¹ In Bezug auf das Startcodon des *prtA*-Gens

² Die kodierenden Bereiche für die Histidine des His-Tags sind unterstrichen

Tabelle 8: PCR-und Sequenzierungsprimer zur Herstellung der PrtA-Mutante SP-110

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Position ¹
AN-16	TTTTTGATGGTATGAATGTGC	-477
AN-17	TTATGTTT <u>CAATTG</u> ATTTTCTGTTTC ²	145-171
AN-18	GAAACAGAAAAT <u>CAATTG</u> AAACATAA ²	145-171
AN-19	AACGGAGCATTGATAGACTTTAGGTA	625-651
GBE17	TCCCTTCCCTCGAGATATTTTCTACAGTG	852-882

¹ In Bezug auf das Startcodon des *prtA*-Gens

² Die für die Klonierung verwendeten Restriktionsstellen sind unterstrichen

Tabelle 9: PCR-und Sequenzierungsprimer zur Herstellung der PrtA-Mutante SP-111

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Position ¹
AN-24	GCGGTCGCTTCTGCTAAAAA	1312-1332
AN-25	GGCCTGCTCCCTGTTGTCTA	2274-2294
Gbe2	CTCTCGAGGGATCTGGGTTTGC	1013-1035

¹ In Bezug auf das Startcodon des *prtA*-Gens

Tabelle 10: PCR-Primer zum Erhalt des Gesamt-*prtA*

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Position ¹
AN-26	GCAGTCGACGCCCTAATGAG	49-70
AN-27	GTCTCGAGTCCGCTTGCTGTTC	6332-6354

¹ In Bezug auf das Startcodon des *prtA*-Gens

2.5 Reagenzien

2.5.1 Chemikalien, Plastik- und Einwegartikel

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Serva Feinbiochemika (Heidelberg), Oxoid (Wesel), Fluka (Neu-Ulm) und Merck (Darmstadt) bezogen. Plastik- und Einwegartikel stammten von den Firmen Greiner (Nürtingen), Becton Dickinson (Heidelberg) und Eppendorf (Hamburg).

2.5.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen (*EcoRI*, *MunI*, *SalI*, *XhoI*)

	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Lysozym	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Proteinase K	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
AMV-Reverse Transkriptase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
RNase freies DNase Set	Qiagen, Hilden
RNase A, Typ I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.5.3 Matrixproteine

Kollagen R, Typ I, aus Rattenschwanz	Serva, Heidelberg
Kollagen Typ III, aus humaner Placenta	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kollagen Typ IV, aus humaner Placenta	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fibronektin, aus Rinder-Plasma	GibcoBRL, Eggenstein
Gelatine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.5.4 Antibiotika

Carbenicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Erythromycin	Fluka, Neu-Ulm

2.5.5 Molekularbiologische Kits

Qiagen Genomic-tip 500/G	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Protect Bacteria Mini Kit	Qiagen, Hilden
pGEM [®] -T Easy-Vektor System I	Promega, Madison, USA
Silver Stain Plus Kit	Bio-Rad, München

2.5.6 Puffer und Lösungen

AP-Puffer:	100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂
PBS:	130 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , 7,5 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,3)
PBS-Tween:	PBS mit 0,5 % Tween-20
2 x SDS-Probenpuffer:	100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 20 % Glycerin, 4 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 200 mM DTT
5 x Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris, 250 mM Glycin (pH 8,3), 0,1 % SDS
Semidry-Blotting-Puffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol
Coomassie-Färbelsg.:	45 % Methanol, 10 % Eisessig, 0,25 % Coomassie® Brilliant Blue R-250
Entfärber:	30 % Ethanol, 10 % Eisessig
5 x TBE-Puffer:	445 mM Tris, 445 mM Borat, 10 mM EDTA
Ni-NTA-Lysispuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol
Ni-NTA-Waschpuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol
Ni-NTA-Elutionspuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol
5 x MOPS-Puffer:	0,1 M MOPS (pH 7,0), 40 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA (pH 8,0)
DEPC-dH ₂ O:	dH ₂ O wurde über Nacht mit 0,1 % DEPC versetzt und anschließend autoklaviert
Neutralisierungslsg.:	5 % gesättigtes Natriumacetat, 95 % Ethanol, Phenolrot
Rabilloud-Puffer:	0,5 % Triton x-100, 0,4 % Carrier Ampholyte (IPG-Puffer) pH 4-7, 65 mM DTT, 2 M Thioharnstoff, 7 M Harnstoff, 4 % CHAPS, Bromphenolblau (DTT und IPG frisch hinzugegeben)
Equilibrierungspuffer:	50 mM Tris, 2 % SDS, 30 % Glycerol, 6 M Harnstoff, Bromphenolblau
DNase/ RNase-Mix:	0,25 mg/ml RNase, 1 mg/ml DNase, 50 mM MgCl ₂ , in 0,5 M Tris pH 7,0
Carbonatpuffer:	0,23 g NaCl, 0,29 g NaHCO ₃ , 0,06 g Na ₂ CO ₃ , auf 40 ml mit dH ₂ O auffüllen, pH 9,2
FITC-Lösung:	1 mg/ml FITC in Carbonatpuffer
Blockierlösung:	1 % BSA, 5 % Skim Milk Powder, ad 100 ml mit PBS Tween

2.5.7 Nährmedien

Bis auf das Cden-Medium wurden alle Nährmedien durch Autoklavieren für 20 Minuten bei 121 °C und 1,2 bar sterilisiert.

LB (Luria Bertani-Bouillon) (Gibco BRL, Eggenstein)

LB-Medium wurde als Fertigpulver bezogen und enthält im Endansatz laut Hersteller:

	g/l
Bactotrypton	10,0
Hefeextrakt	5,0
NaCl	10,0
pH 7,5 ± 0,2	

LB-Agar (Luria Bertani-Agar) (Gibco BRL, Eggenstein)

Enthält zusätzlich zu den Komponenten des LB-Mediums 12 g/l Agar.

Zugabe von 5 % Schafsblut bei Kultivierung von Pneumokokken auf LB-Agar.

THY (Todd-Hewitt-Bouillon mit Hefe) (Difco, Detroit, USA)

Todd-Hewitt-Bouillon wurde als Fertigpulver bezogen und mit 0,5 % Hefeextrakt (Gibco BRL) versetzt. Im Endansatz lautet die Zusammensetzung des Mediums nach Angaben des Herstellers:

	g/l
Rinderherz-Abbauprodukte	9,0
Pankreatisch abgebautes	
Kasein	11,0
Sojapepton	3,0
Dextrose	2,0
Na ₂ CO ₃	2,5
NaH ₂ PO ₄	0,5
NaCl	2,0
pH 7,8 ± 0,2	

BHI (Brain-Heart-Infusion) (Difco, Detroit, USA)

BHI wurde als Fertigpulver bezogen und enthält laut Hersteller:

	g/l
Kalbshirn-Infusion	200
Rinderherzen-Infusion	250
Proteose Pepton	10
Dextrose	2
NaCl	5
Na ₂ HPO ₄	2,5

Cden-Medium

	ml
Cden base	200
His, Tyr, Arg (2)*	50
Glutamin (1 mg/ml)*	10
Vitamine (3)*	10
Pyruvat (2 %)*	5
SAC (4)	40
Supplement (5)*	13
K-Posphatpuffer 1 M pH 8 (6)	15
Leucin (10 mg/ml)	10
Phenylalanin (10 mg/ml)	5
Lysin (10 mg/ml)	9
Cholin (1 mg/ml)	2
Wasser	26

* Sterilfiltriert mit Membranfiltern, 0,2 µm (Pall Gelman Science, Dreieich),
der Rest wurde autoklaviert

(1) Cden base

	mg
Glycin	380
Alanin	700
Valin	1440
Isoleucin	1520
Prolin	2320
Serin	1180
Threonin	900
Methionin	620
Tryptophan	280
Asparaginsäure	1440
Glutaminsäure	4400
Cystein	300
	ad 4000 ml

pH 7, Autoklaviert

(2) His, Tyr, Arg

	mg
Histidin	640
Tyrosin	122
Arginin	800
	ad 1000 ml

Sterilfiltriert

(3) Vitamine

	ml
Adams I (7)	12,8
Asparagin (5 mg/ml)	32
Wasser	36
	Sterilfiltriert

(4) SAC

	g
Na-Acetat • 3 H ₂ O	2
NaCl	2
	ad 100 ml
	Autoklaviert

(5) Supplement

	ml
“3 in 1 Salz” (8)	60
Glukose (20 %)	120
Sukrose (50 %)	6
Adenosin (2 mg/ml)	120
Uridin (2 mg/ml)	120
	Sterilfiltriert

(6) K-Phosphatpuffer 1 M pH 8

	ml
1 M KH ₂ PO ₄	26,5
1 M K ₂ HPO ₄	473
	Autoklaviert

(7) Adams I

Biotin (0,5 mg/ml)	0,06 ml
Stock, 1 Tropfen	
1 N NaOH	
hinzugeben, damit	
in Lösung)	
Nicotinsäure	30 mg
(B ₆) Pyridoxin HCl	35 mg
Ca-Pantothenat	120 mg
Thiamin-HCl	32 mg
Riboflavin	14 mg
	ad 200 ml
	Sterilfiltriert

(5) „3 in 1 Salz“

MgCl ₂ • 3 H ₂ O	100 g
CaCl ₂ (anhydriert)	0,5 g
MnSO ₄ (0,1 M)	0,2 ml
	ad 1000 ml

Columbia-Agar + Blut:

Columbia-Agar	44,0 g/l
Hefeextrakt	3,0 g/l
L-Cysteiniumchlorid	0,1 g/l
Natriumpyruvat	0,5 g/l
Agar	3,0 g/l
Glutamin	0,1 g/l
Schafblut	100 ml
	(versetzt mit 0,6 g Glukose)

Zusätze zu den Medien sind in Tabelle 11 aufgelistet. Bei Zugabe von Antibiotika wurden die in Tabelle 12 aufgeführten Konzentrationen verwendet.

Tabelle 11: Zusätze

Zusatz	Konzentration im Ansatz
Glukose	0,1 %, 0,2 %, 0,5 %
Pyruvat	0,025 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,5 %
Hefeextrakt	0,1 %, 0,2 %, 0,5 %
Pepton	0,1 %, 0,2 %, 0,5 %
L-Aminosäuren	5 µM, 15 µM
PMSF	1 mM

Tabelle 12: Eingesetzte Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Endkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Carbenicillin	H ₂ O	50
Erythromycin	Ethanol	1 bzw. 5 (<i>S. pneumoniae</i>), 500 (<i>E. coli</i>)

2.6 Mikrobiologische Methoden

2.6.1 Bakterienkultivierung

Streptococcus pneumoniae

Die Pneumokokken wurden auf Columbia-Blut-Agarplatten über Nacht oder in flüssigem Komplexmedium (BHI, THY oder TSB) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Dem Medium der Stämme, die eine Erythromycinresistenz enthielten, wurde zuvor 5 $\mu\text{g/ml}$ Erythromycin zugesetzt. Angeimpft wurde aus einer Flüssigkultur oder einer Glycerinkultur. Für bestimmte Versuche wurden die Pneumokokken unter anaeroben Bedingungen oder bei Raumluft angezogen, oder dem Medium wurden verschiedene Substanzen (Tabelle 11) zugesetzt.

Escherichia coli

E. coli wurde in LB-Medium geschüttelt oder auf LB-Agarplatten mit Carbenicillin über Nacht bei 37 °C angezogen. Angeimpft wurde aus einer Flüssigkultur oder einer Glycerinkultur.

2.6.2 Stammhaltung und Stammkonservierung

Die Lagerung von *S. pneumoniae* fand in 10 % Glycerin bei –70 °C statt. Mit 25 % Glycerin wurde *E. coli* konserviert. Zum Teil wurden die Stämme als Microbank-Stammkultur (Pro-Lab Diagnostics, Ontario, Kanada) bei –70 °C eingefroren.

2.6.3 Bestimmung von Keimzahl und Bakterienkonzentration

Zur Keimzahlbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe einer Kultur angelegt und je 10 μl auf eine Columbia-Blut-Agarplatte getropft. Über Nacht erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ die

Bebrütung. Mittels der Anzahl der koloniebildenden Einheiten (colony forming units [cfu]) konnte auf die Anzahl der Bakterien pro ml in der Kultur hochgerechnet werden.

Zum Erfassen der Wachstumsphase einer Kultur wurde die optische Dichte bestimmt. Gemessen wurde die Trübung direkt im Reagenzglas mit einem Photometer (PM 620 R, Riele KG, Berlin) bei einer Wellenlänge von 623 nm. Bei Aufnahme von Wachstumskurven wurde die optische Dichte in regelmäßigen Abständen über mehrere Stunden gemessen. Zur Darstellung des Wachstums der Kultur wurde die Dichte graphisch gegen die Zeit aufgetragen.

2.7 Methoden für das Arbeiten mit DNA

2.7.1 Isolierung von DNA aus *Streptococcus pneumoniae* R6

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mit dem Qiagen Genomic-tip 500/G nach den Angaben des Herstellers. Isoliert wurde aus 500 ml einer Übernachtskultur von *S. pneumoniae* Stamm R6.

2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren [123]

Die Konzentration von DNA, sowie die Reinheit der Probe kann photometrisch bestimmt werden. Dazu wird die Extinktion der Probe in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm im Spectrophotometer (Pharmacia LKB Biotechnologie, Ultraspec Plus, Model 4054, Freiburg) bestimmt. Eine Extinktion von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA 50 $\mu\text{g/ml}$. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zu der Extinktion bei 280 nm zeigt die Reinheit der Präparation. Bei sauberer Präparation sollte das Verhältnis 1,8 bis 2,0 betragen. Bei Kontaminationen mit Proteinen ist das Verhältnis deutlich niedriger.

2.7.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) [122]

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) ist eine in-vitro Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von 2 bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, amplifizieren kann.

Für die PCR wurde das Expand High Fidelity PCR System verwendet. Durchgeführt wurde die PCR in dem Thermocycler (PCR Express, HYBAID, UK) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl. Nach Beendigung der Reaktion wurden 5 µl des PCR-Ansatzes mit 1 µl 10 x Ladepuffer (Eppendorf, Hamburg) in einem Agarosegel aufgetrennt und nach Ethidiumbromidfärbung dargestellt.

Der allgemeine Zyklus sieht wie folgt aus:

	Temperatur (°C)	Zeit (Min.)	Zyklenzahl
Denaturierung	94	5-15*	1
Denaturierung	94	1	
Annealing	45-60**	1	35-40
Extension	72	1-7***	
Endextension	72	5	1

* Die Denaturierungszeit richtet sich nach der Art der PCR. Bei Einsatz von aufgereinigter DNA wurde 5 Minuten, bei Einsatz von Pneumokokken 15 Minuten denaturiert.

** Die Annealingtemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur der Primer.

*** Die Extensionszeit richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes, als Richtwert gilt 1 Minute für 1 kb.

Standardansatz (50 µl):	10 x PCR-Puffer	5 µl
	dNTPs-Mix*	2 µl
	MgCl ₂ (25 mM)	7 µl
	Oligo 1 (10 pmol/µl)	5 µl
	Oligo 2 (10 pmol/µl)	5 µl
	DNA (2 µg/µl)	1 µl
	Tag-Polymerase (3,5 U/µl)	0,5 µl
	dH ₂ O	24,5 µl

* je 5 mM der Desoxynukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Quantum Appligene, Heidelberg)

2.7.4 Ortsspezifische Mutagenese (site directed mutagenesis) [65]

Für die Herstellung von Mutanten war es nötig, eine *MunI*-Schnittstelle an bestimmte Positionen in das *prtA*-Gen zu integrieren. Zu diesem Zweck wurden komplementäre Primer, die eine *MunI*-Schnittstelle enthielten, erzeugt. In einer PCR wurden anschließend 2 DNA-Fragmente mit je einem der komplementären Primer und einem Gegenprimer amplifiziert. Durch die Verwendung von komplementären Primern enthielten die PCR-Produkte überhängende, identische Enden. In einer folgenden PCR mit den beiden Amplifikaten und den jeweiligen Gegenprimern, lagerten sich die Amplifikate durch die komplementären überhängenden Enden aneinander, so dass das überhängende 3'-Ende des einen Stranges als Primer für die 3'-Extension des komplementären Stranges diente. Es entstand dabei ein Fusionsprodukt der 2 Amplifikate, das die in die komplementären Primer eingebaute *MunI*-Schnittstelle enthielt (Abb. 6).

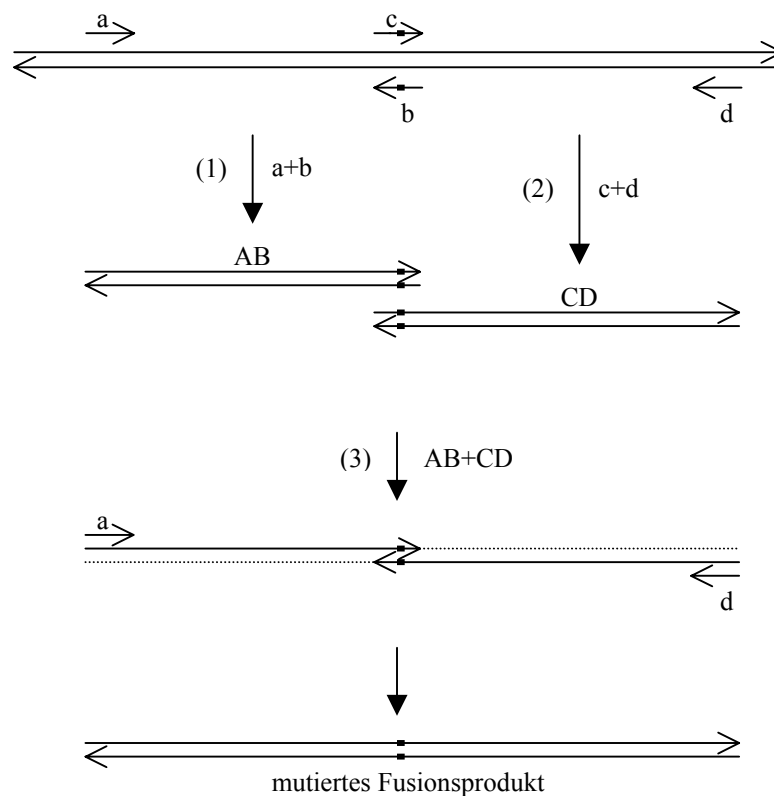


Abbildung 6: Schematische Abbildung der ortsspezifischen Mutagenese durch überlappende Extension. Die ds DNA und die Oligos sind durch Linien dargestellt. Die Pfeile geben die 5'-3'-Orientierung an. Das schwarze Kästchen steht für die Mutation. $a + b$ und $c + d$ sind die Primer der PCR (1) und (2). b und c sind komplementäre Primer, in die eine Mutation eingebaut ist. In Schritt (3) wird aus den zuvor erzeugten Amplifikaten (AB und CD) mit Hilfe von a und d ein Fusionsprodukt hergestellt (modifiziert nach Ho et al., 1989 [65]).

2.7.5 Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR wurde keine isolierte Bakterien-DNA eingesetzt. Als Template dienten etwa 10 Bakterien-Kolonien, die von dem Festnährboden mit einer Impföse abgenommen und in 100 µl dH₂O resuspendiert wurden. Es wurde 1 µl der Bakteriensuspension pro PCR-Ansatz eingesetzt. Um möglichst viel Pneumokokken-DNA als Template freizusetzen, wurde eine verlängerte initiale Denaturierungszeit von 15 Minuten gewählt.

2.7.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für manche Versuche war es nötig, die PCR-Produkte in aufgereinigter Form zu verwenden. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Qiaquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers.

2.7.7 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese wurde zur Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Es wurden 1 %ige Agarosegele verwendet. Agarose wurde mit 1 x TBE-Puffer aufgeköcht und auf einem Gelschieber erhärtet. 5 µl Probe wurden mit 1 µl 10 x Ladepuffer (Eppendorf, Hamburg) vermischt und davon 5 µl in die Taschen aufgetragen. Bei 100 mV erfolgte der Lauf für circa 1 Stunde. Das Gel wurde 20 Minuten in Ethidiumbromid (3 µg/ml) gefärbt. Durch Interkalierung des Fluoreszenz-Farbstoffs in die DNA lassen sich die DNA-Fragmente durch UV-Licht (254-366 nm) sichtbar machen. Die Gele wurden unter UV-Licht zur Dokumentation fotografiert. Als Längenstandard wurden 10 µl eines 100 bp-Markers (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus, 0,1 – 3,0 kb, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) zusätzlich aufgetragen.

2.7.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit nach Anleitung des Herstellers isoliert. Das Isolierungsergebnis wurde auf einem 1 %igen Agarosegel überprüft.

2.7.9 Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die an spezifische Zielsequenzen der DNA binden und die Phosphodiester-Bindungen in beiden Strängen eines DNA-Moleküls schneiden. Für die Versuche wurden Restriktionsendonukleasen von Typ II verwendet, bei denen Erkennungs- und Schnittsequenz identisch sind.

Es wurde das SuRE/Cut 5-Puffer System der Firma Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) für die Reaktionen verwendet. Für mindestens 3 Stunden wurde der Ansatz bei 37 °C inkubiert, anschließend das Enzym bei 65 °C für 10 Minuten inaktiviert und die Spaltprodukte auf einem in Ethidiumbromid inkubierten Agarosegel überprüft.

Ansatz (10 µl)	Probe	8 µl			
	10 x Puffer	1 µl			
	<i>EcoRI</i> (10 U/µl)	1 µl	oder	<i>MunI</i> (10 U/µl)	0,5 µl
				dH ₂ O	0,5 µl
Doppelverdau (10 µl)	Probe	7 µl			
	10 x Puffer	1 µl			
	<i>SaII</i> (10 U/µl)	1 µl			
	<i>XhoI</i> (10 U/µl)	1 µl			

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden an folgenden Sequenzen:

<i>MunI</i>	C/AATTG
<i>EcoRI</i>	G/AATTC
<i>SaII</i>	G/TCGAC
<i>XhoI</i>	C/TCGAG

2.7.10 Ligation

Bei der Ligation wird das 5'-Phosphat-Ende eines DNA-Fragmentes mit dem 3'-Hydroxy-Ende eines benachbarten Fragmentes unter Bildung einer Phosphodiester-Bindung miteinander verknüpft. Die Reaktion wird von der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert. Die Ligation von PCR-Produkten mit dem pGEM®-T Easy Vektor System I erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.7.11 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte aus 3 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit nach Herstellerangaben. Die isolierte DNA wurde in 50 µl dH₂O resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.7.12 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* nach der CaCl₂-Methode [43]

Zur Herstellung von kompetenten Zellen wurde 50 ml LB-Medium mit einer *E. coli* cc118 Übernachtskultur 1:50 angeimpft und für 2 Stunden bei 37 °C bei leichten Schüttelbewegungen inkubiert. Das nach Zentrifugation bei 2600 x g erzeugte Pellet wurde in 25 ml 0,1 M eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen, auf Eis für eine halbe Stunde inkubiert und nach erneuter Zentrifugation in 5 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert. Über Nacht erfolgte eine Inkubation auf Eis.

2.7.13 Transformation CaCl₂-kompetenter *Escherichia coli* [61]

2 bzw. 5 µl eines Ligationsansatzes wurden zu 200 µl kompetenten *E. coli* gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend für 2 Minuten bei 42 °C erhitzt und für weitere 3 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium erfolgte eine Regenerationsphase bei 37 °C für 1 Stunde. Die Kulturen wurden bei 5000 x g 5 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in 100 µl LB resuspendiert und je 50 µl auf LB-Platten mit 50 µg/ml Carbenicillin ausgespatelt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht.

2.7.14 Transformation von *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae ist ein Bakterium mit natürlicher Kompetenz. Durch Zugabe von CSP (competence stimulating peptide) zu einer Pneumokokken-Kultur wird die Kompetenz der Bakterien erhöht.

Zu 10 ml einer in THY bis OD₆₂₃ von 0,25 gewachsenen *S. pneumoniae*-Kultur wurden 10 µl CSP (10 µg/ml) (Biotrend, Köln) gegeben. Die Kultur wurde für weitere 20 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und auf Eis gestellt. Es wurden je 1 µl, 5 µl und 10 µl des aufgereinigten PCR-Produktes auf Eis zu 250 µl kompetenten Pneumokokken gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 30 °C für 30 Minuten, danach bei 37 °C für 60 Minuten.

Anschließend wurden die gesamten 250 µl auf Columbia-Agar-Blutplatten mit 1 µg/ml Erythromycin ausgespatelt und bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht inkubiert.

2.7.15 Herstellung von Mutanten

Die Herstellung von PrtA-Mutanten erfolgte mittels ortsspezifischer Mutagenese. Ausgangsmaterial war aus dem R6 aufgereinigte DNA (2.7.1). Auf Abbildung 7 sind die Schritte zur Erzeugung der Mutanten dargestellt. Ein aus zwei sich überlappenden PCR-Produkten mittels PCR amplifiziertes, eine *MunI*-Schnittstelle tragendes Fusionsprodukt (2.7.4), wurde mit dem pGEM-T Easy-Vektor ligiert (2.7.10) und in *E. coli* CC118 transformiert (2.7.13). Nach Aufreinigung des Plasmids (2.7.11) wurde das Pneumokokken-Genfragment mit *MunI* geschnitten (2.7.9) und die Erythromycinkassette *ermB* mit dem geöffneten Vektor ligiert (2.7.10). Die Erythromycinkassette *ermB* wurde durch Amplifikation mit den Primern *erm3* und *erm4* am pJDC9-Vektor erhalten (2.7.3). *E. coli* wurde erneut mit dem Vektor transformiert. Nach Aufreinigung des Plasmids wurde mit den jeweiligen Primern ein Amplifikat mittels PCR erzeugt (2.7.3). Mit dem Amplifikat wurde *S. pneumoniae* R6 transformiert (2.7.14). Durch homologe Rekombination wurde die Erythromycinkassette mit den flankierenden *prtA*-Fragmenten in das Genom integriert, wodurch eine Unterbrechung der Translation erzeugt wurde.

LPXTG-defiziente Mutante (SP-104)

Bei der LPXTG-defizienten Mutante wurde die Erythromycinkassette *ermB* unmittelbar vor dem LPXTG-Motiv an Position 6286 des *prtA*-Gens inseriert (Abb. 9). Zur Herstellung der Mutanten wurden die Primerpärchen AN-1/AN-2 und AN-3/AN-4 verwendet. Die Insertion wurde mittels PCR mit den Primern AN-5 und *erm4* als Gegenprimer überprüft. Es entstand ein Produkt mit einer Größe von 1428 bp, das zur Bestätigung der eingebauten Stopsequenz im *prtA*-Gen sequenziert wurde.

LPXTG-defiziente His-Tag tragende Mutante (SP-107)

Bei der LPXTG-defizienten His-Tag tragenden Mutante (SP-107) wurde die Erythromycinkassette *ermB* unmittelbar vor dem LPXTG-Motiv inseriert und gleichzeitig ein His-Tag vor das *ermB* platziert (Abb. 9). Anders als bei den anderen hergestellten Mutanten erfolgte keine Transformation in *E. coli*. Es wurden die Primerpärchen AN-1/AN-2-His und *erm3*-His/AN-4 verwendet. Als Ausgangs-DNA diente das zur Herstellung der LPXTG-

defizienten Mutante in *S. pneumoniae* transformierte PCR-Produkt. Um das fehlende His-Tag einzubauen, wurde die ortsspezifische Mutagenese angewendet (Abb. 8). Mit dem so entstandenen Fusions-PCR-Produkt wurde *S. pneumoniae* R6 transformiert. Zur Überprüfung des transformierten PCR-Produktes wurde das Fragment mit den Primern AN-1 und AN-4 amplifiziert und sequenziert.

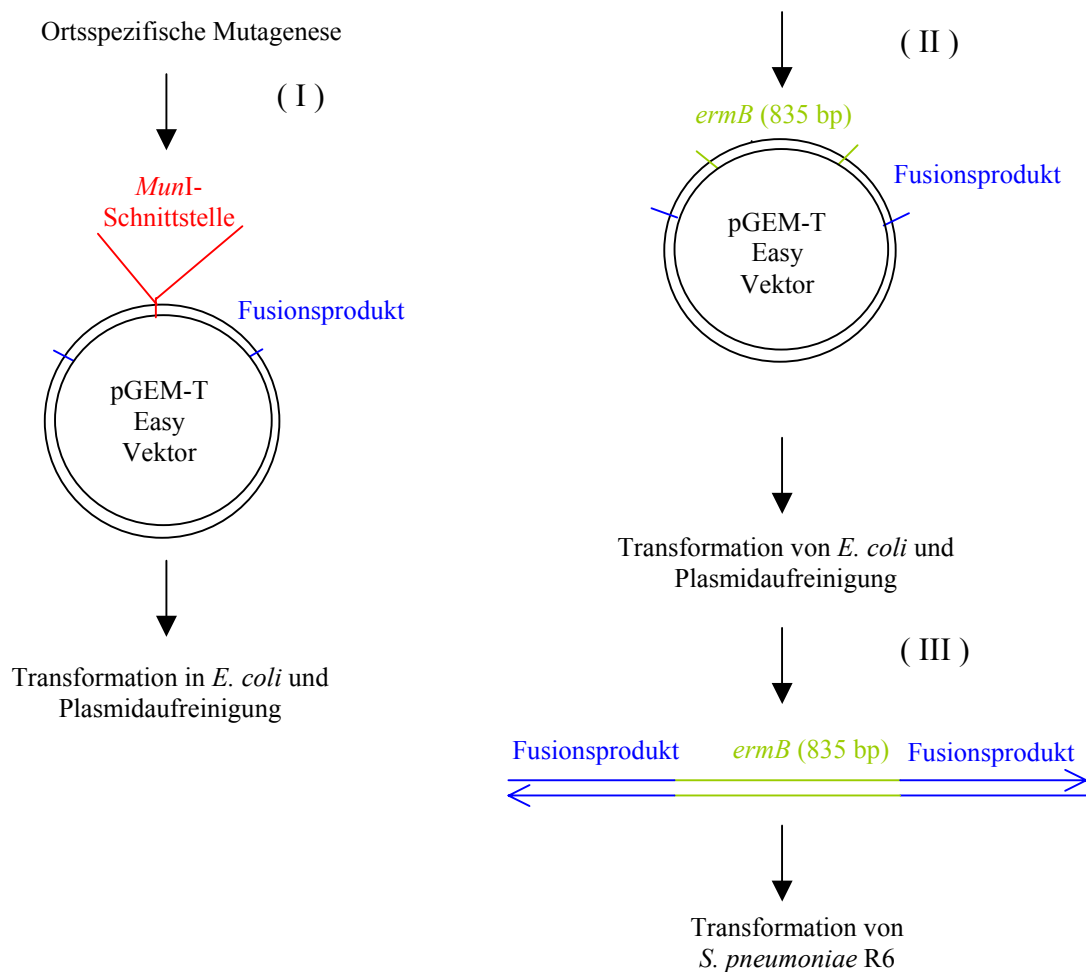


Abbildung 7: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zur Erzeugung der Mutanten. Ein mittels ortsspezifischer Mutagenese erzeugtes eine *MunI*-Schnittstelle tragendes Fusionsprodukt wurde mit dem pGEM-T Easy-Vektor ligiert (I). Nach Transformation von *E. coli* und Plasmidaufreinigung folgte die Ligation von *ermB* mit dem mit *MunI* geschnittenen Vektor (II). Nach erneuter Transformation und Plasmidaufreinigung wurde ein Amplifikat des gesamten einligierten Fragments mittels PCR hergestellt (III), mit welchem *S. pneumoniae* R6 transformiert wurde.

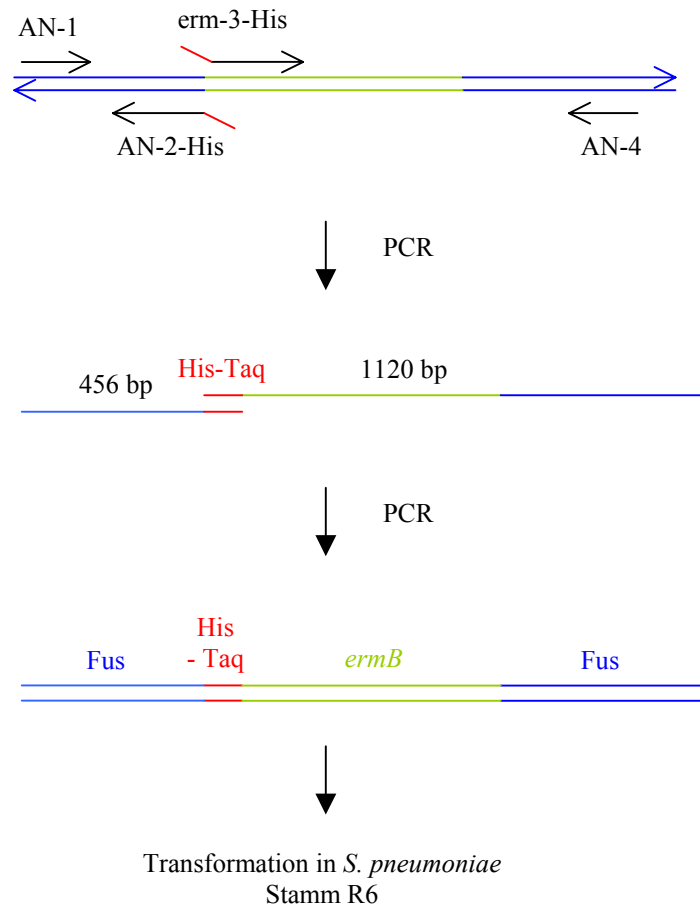


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Herstellung der LPXTG-defizienten His-Tag Mutante SP-107 mittels ortsspezifischer Mutagenese. Ausgangsprodukt ist das mit *S. pneumoniae* transformierte PCR-Fragment zur Erzeugung der LPXTG-defizienten Mutante SP-104. Über zwei PCR-Reaktionen erfolgt der Einbau des His-Tag in dieses DNA-Fragment. Fus, Fusionsprodukt.

Signalpeptidlose Mutante (SP-110)

Bei der signalpeptidlosen Mutante wurde die Erythromycinkassette vor der katalytischen Domäne an Position 158 im *prtA*-Gen inseriert (Abb. 9). Die Primer AN-16/17 und AN-18/AN-19 wurden zur Herstellung dieser Mutanten verwendet. Das Amplifikat, mit den Primern *erm3* und GBE17 hergestellt, wurde zur Überprüfung der Insertion sequenziert.

PrtA-defiziente Mutante (SP-111)

Bei der PrtA-defizienten Mutante wurde die Erythromycinkassette *ermB* in die katalytische Domäne vor die Serinsite inseriert (Abb. 9). Es wurden die Primer AN-24 und AN-25 verwendet. Primer mit eingebauter Restriktionsstelle waren nicht nötig, da das *prtA*-Gen an

Position 1818 eine *MunI*-Schnittstelle enthält, die zur Herstellung dieser Mutanten genutzt wurde. *E. coli* konnte direkt mit dem entstandenen PCR-Produkt transformiert werden. Die Insertion wurde mittels PCR mit den Primern Gbe2 und erm3 überprüft. Es entstand ein Produkt mit einer Größe von 1641 bp, das zur Bestätigung der Unterbrechung des *prtA*-Gens sequenziert wurde.

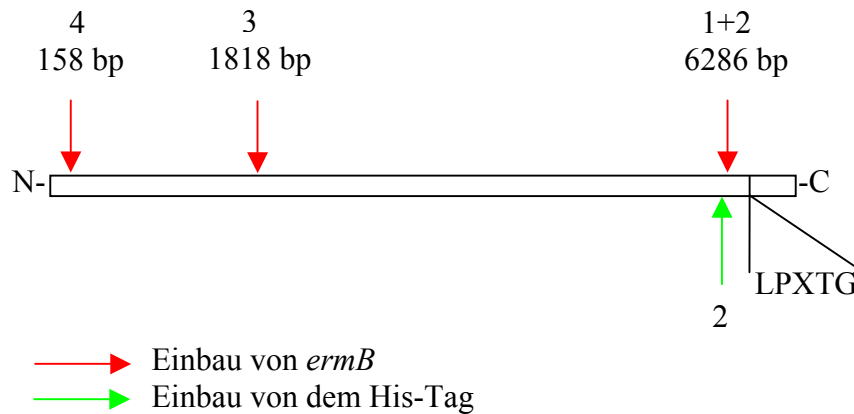


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Insertion der Erythromycinkassette und des His-Tags bei der LPXTG-defizienten Mutante SP-104 (1), der LPXTG-defizienten His-Tag Mutante SP-107 (2), der PrtA-defizienten Mutante SP-111(3) und der signalpeptidlosen Mutante SP-110 (4).

2.7.16 Sequenzierungen [126]

Die Sequenzierung von PCR-Produkten oder Plasmid-DNA erfolgte nach dem Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger. Das zu sequenzierende Fragment dient einer DNA-Polymerase als Matrize für die Synthese eines komplementären Stranges. Durch Einbau von markierten Nukleotid-Analoga (ddNTP) kommt es zum Kettenabbruch. Die erzeugten Bruchstücke enden jeweils spezifisch mit einem der Basenanaloga. Die so entstandenen Fragmente werden auf Sequenziergelen elektrophoretisch aufgetrennt. Es entsteht ein charakteristisches Muster von Banden. Durch Laser-Detektion der ddNTPs und Digitalisierung der Daten kann die Abfolge der Basen bestimmt werden.

Die Sequenzierungen wurden durch das Biomedizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf an einem ABI Prism 377™ Sequencer (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

2.8 Methoden für das Arbeiten mit RNA und cDNA

2.8.1 Isolierung von RNA aus Pneumokokken

Die Isolierung von RNA erfolgte aus 1 ml einer Pneumokokken-Kultur mit einer OD_{623} von 0,3 mit dem RNeasy Protect Bacteria Mini Kit nach Angaben des Herstellers. Die Lyse der Zellen erfolgte durch enzymatische Behandlung mit Lysozym (15 mg/ml), Proteinase K (20 mg/ml) sowie durch 15 Sekunden Ultraschallbehandlung. Während der Aufreinigung erfolgte ein DNA-Verdau auf den Säulen, ebenfalls nach Anleitung. Zur Kontrolle der isolierten RNA wurden 5 μ l der Probe auf ein Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen. Das Gel wurde in Ethidiumbromid gefärbt. Nicht degradierte RNA zeigt dabei 2 Banden. Die 16S RNA bei 1,5 kb und die 23S RNA bei 2 kb.

2.8.2 Auftrennung der RNA durch Gelelektrophorese

RNA besitzt einen hohen Grad an sekundären Strukturen, die eine Auftrennung auf einem gewöhnlichen Agarosegel erschweren. Daher wurden zur Auftrennung der RNA Formaldehyd-Agarosegele verwendet. Durch Erhitzen und Zugabe von Formamid werden die Wasserstoffbrückenbindungen der RNA aufgebrochen. Zugewetztes Formaldehyd verhindert dann die Zusammenlagerung der RNA indem es kovalent an die Aminogruppen von Adenin, Guanin und Cytosin bindet.

Es wurden 1 %ige Gele verwendet. 1 g Agarose wurde in 77 ml DEPC-dH₂O aufgeköcht und auf 60 °C abgekühlt. Anschließend wurden 20 ml 5x MOPS-Puffer und 3 ml Formaldehyd (37 %, Calbiochem, La Jolla, USA) zugegeben und das Gel gegossen.

Zu 5 μ l RNA wurden 3 μ l Formaldehyd, 4 μ l 5x MOPS-Puffer und 8 μ l Formamid gegeben und für 10 Minuten bei 60 °C denaturiert. Die Proben wurden mit je 5 μ l 10 x Probenpuffer (Eppendorf, Hamburg) gemischt. Von jeder Probe wurden 20 μ l auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x MOPS-Puffer für etwa 1,5 Stunden bei 80 V. Durch Inkubation für 20 Minuten in Ethidiumbromid konnten die Banden unter UV-Licht fotografiert werden. Als Größenstandard wurden 10 μ l eines 100 bp-Markers (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus, 0,1 – 3,0 kb, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen.

2.8.3 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription synthetisiert die reverse Transkriptase einen DNA-Strang komplementär zu einer RNA-Matrize, sofern ein Primer zur Verfügung steht, der durch Basenpaarung mit der RNA verbunden ist und eine freie 3'-OH-Gruppe besitzt. Die so erzeugte DNA wird cDNA (complementary DNA) genannt. Diese cDNA kann dann für die PCR eingesetzt werden.

Standardansatz (20 µl):	5x RT-Puffer	4 µl
	dNTPs-Mix*	4 µl
	Oligo PrtA-1 (30 pmol/µl)	0,6 µl
	Oligo PrtA-2 (30 pmol/µl)	0,6 µl
	Oligo LDH-1 (30 pmol/µl)	0,6 µl
	Oligo LDH-2 (30 pmol/µl)	0,6 µl
	RNase-Inhibitor (40 U/µl)	1 µl
	AMV-RT (25 U/µl)	2 µl
	Gesamt-RNA	5 µl
	DEPC-Wasser	1,4 µl

* je 5 mM der Desoxynukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Quantum Appligene, Heidelberg)

Die RNA wurde zunächst mit den Primern auf 70 °C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen, und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt, wobei die Primer an die RNA hybridisieren können. Anschließend wurden Puffer, dNTPs, RNase-Inhibitor und AMV-RT hinzugegeben, auf 20 µl mit DEPC-dH₂O aufgefüllt und für 1 h bei 42 °C erhitzt. Die Lagerung des Ansatzes erfolgte bei -70 °C.

2.8.4 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR ist eine Methode, mit der Nukleinsäuren quantifiziert werden können. Mit Hilfe der Real-Time PCR können genaue Aussagen über die Anzahl der Amplifikate gemacht werden. Gemessen wird die Zunahme der Fluoreszenz, die durch die Bindung von SYBR® Green I in doppelsträngige DNA entsteht.

Standardansatz (50 µl):	Master-Mix*	25 µl
	Oligo 1 (30 pmol/µl)	5 µl
	Oligo 2 (30 pmol/µl)	5 µl
	cDNA oder RNA	5 µl
	dH ₂ O	10 µl

* Der Master-Mix wurde von der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt bezogen.

Der allgemeine Zyklus sieht wie folgt aus:

Temperatur (°C)	Zeit (Min.)	Zyklenzahl
50	2	1
95	10	1
95	0,25	40
60	1	

Die kontinuierliche Fluoreszenzmessung wurde mit dem Computerprogramm GeneAmp® 5700 Sequence Detection System Software (Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgewertet. Bei einem Grenzwert von 0,1 wurden die cT-Werte ermittelt. Mit Hilfe eines internen Standards (LDH) ließ sich die relative Transkriptionsrate des *p_{rtA}*-Gens in Prozent berechnen. Die aufgereinigte RNA war nicht ganz frei von DNA. Um die Menge an cDNA in der Probe zu bestimmen, wurde die aufgereinigte RNA ebenfalls in der Real-Time PCR eingesetzt. Mit folgender Formel wurde die cDNA-Menge in Prozent (a) jeweils für die PrtA-Primer und die LDH-Primer pro Ansatz berechnet:

$$(a) = \frac{100}{2^{ct \text{ RNA} - ct \text{ RT}}}$$

Die relative Transkriptionsrate berechnet sich dann mit folgender Formel:

$$\text{Relative Transkriptionsrate [\%]} = \frac{100}{2^{ct(\text{cDNA PrtA})^{**} - ct(\text{cDNA LDH})^{***}}} * (a)$$

** ct (cDNA PrtA) : entspricht dem ct-Wert aus dem Ansatz mit cDNA und den PrtA-Primern.

*** ct (cDNA LDH) : entspricht dem ct-Wert aus dem Ansatz mit cDNA und den LDH-Primern.

2.9 Methoden für das Arbeiten mit Proteinen

2.9.1 Herstellung von bakteriellen Gesamtzelllysaten

Nährmedium wurde mit 1:10 eines Bakterienstocks beimpft und über Nacht im Wasserbad inkubiert. 100 µl der Übernachtskultur mit einer OD_{623} von ungefähr 0,4 wurde in 10 ml frisches Nährmedium gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2 . Bei Erreichen einer OD_{623} von 0,5 wurde die Kultur bei 2600 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 200 µl PBS aufgenommen. Für die SDS-PAGE wurde die Probe mit Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 100 °C im Wasserbad inkubiert. Es wurden 10 µl auf das Gel aufgetragen.

Das Pellet von 500 ml einer Kultur wurde durch dreimaliges Passagieren durch eine French Presse (SLM Aminco™, SLM Instrument Inc., Silver Springs, USA) aufgebrochen. Zelltrümmer und nicht zerstörte Zellen wurden durch Zentrifugation (10 Minuten, 4000 x g, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde bei -20 °C gelagert.

2.9.2 TCA-Fällung

Zur Konzentrierung wurden die Proteine durch Trichloressigsäure (TCA) aus einer Proteinlösung gefällt. Der Überstand einer bis zu einer OD_{623} von 0,7 gewachsenen Kultur wurde mit 95 %iger TCA versetzt, so dass eine Endkonzentration von 10 % TCA erreicht wurde. Die Fällung erfolgte über mindestens 3 Stunden auf Eis. Nach erfolgter Fällung wurden die Ansätze bei 10.000 x g für 20 Minuten zentrifugiert und anschließend das Pellet mit Neutralisationslösung so lange gewaschen bis das Pellet neutral war. Es folgte ein Waschschrift mit absolutem Ethanol. Das Pellet wurde anschließend getrocknet und in PBS resuspendiert.

2.9.3 Einengung bakterieller Kulturüberstände mittels Centriplus®-Zentrifugenröhrchen

Je 15 ml Kulturüberstand können mit Hilfe von 1 Centriplus-Zentrifugenröhrchen (YM-100, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) innerhalb von 1-3 Stunden durch Zentrifugation bei 3000 x g bei 4 °C eingengt werden. Während der Zentrifugation erfolgt die Konzentrierung der Probe durch eine Membran mit einer molaren Trenngrenze von 100 kDa. Vor Einsatz der Probe wurde diese zunächst filtriert, um ein Verstopfen der Membranen zu

verringern. Eingeengt wurde Kulturüberstand des Stammes SP-107 mit dieser Methode auf 1:15 (in einigen Fällen auf 1:44 oder 1: 63).

2.9.4 Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-Tag-Proteinen über Ni-NTA-Agarose

Proteine, die aufeinander folgende Histidine enthalten, können affinitätschromatographisch über Ni-NTA-Agarose-Säulen nativ aufgereinigt werden. Die Histidine werden über Ni^{2+} an die Agarose gebunden. Mit Imidazol erfolgt die Eluierung der Proteine. Imidazol weist eine ähnliche Struktur wie Histidin auf und verdrängt durch einen Konzentrationsüberschuss die Proteine von der Agarose.

4 ml eingeengter Überstand (2.9.3) einer SP-107 Kultur mit einer OD_{623} von 0,7 wurde mit 1 ml Ni-NTA-Agarose für 1 Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Über eine 5 ml Polypropylen-Säule (Qiagen, Hilden) erfolgte die Abtrennung des Überstandes von der Agarose. Mit 1 ml/ml Agarose wurde 2 x mit Waschpuffer gewaschen und anschließend die Proteine mit 0,5 ml/ml Agarose mit Elutionspuffer eluiert. 4 Elutionsschritte wurden durchgeführt. Mit Lysispuffer wurde die Agarose nach dem letzten Elutionsschritt zur Regeneration überlagert. Die Agarose ist so wieder verwendbar. Die einzelnen Schritte wurden auf einem Westernblot überprüft.

2.9.5 Dialyse

Die Dialyse wurde zur Aufreinigung von Proteinlösungen verwendet. Durch eine semipermeable Zellulosemembran können kleine Proteine hindurchtreten, während große von der Membran zurückgehalten werden. Es wurden Dialyseschläuche mit einer molaren Trenngrenze von 12-14 kDa (Spectra/Por Membranes, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA) verwendet. Die Dialyse einer Proteinlösung erfolgte gegen PBS bei 4 °C unter leichtem Rühren über Nacht.

2.9.6 Trennung der Zellbestandteile durch Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation wurde verwendet, um Bakterienmembran und Zytosol voneinander zu trennen. 500 ml einer Pneumokokken-Kultur des Stammes R6 und der Knock-out Mutante SP-91 mit einer OD_{623} von 0,5 wurden für 10 Minuten bei 2600 x g und 4 °C zentrifugiert.

Das Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und in 5 ml PBS resuspendiert. Nach dem Aufbrechen der Zellen mit der French® Pressure cell press erfolgte eine Zentrifugation bei 4000 x g und 4 °C für 10 Minuten, um größere zelluläre Elemente abzutrennen. Der Überstand wurde anschließend bei 100.000 x g bei 4 °C für 1 Stunde ultrazentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren im Überstand die zytosolischen Bestandteile und im Pellet die Membranbestandteile enthalten.

2.9.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford [20]

Zur Proteinbestimmung wurde die Methode nach Bradford verwendet. Bei der Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration einer Lösung wurden Dreifachbestimmungen in Mikrotiterplatten angesetzt. Zu 10 µl Probe wurden 200 µl Bradford-Reagenz (1:5 in dH₂O verdünnt, Bio-Rad, München) gegeben und nach einigen Minuten bei 620 nm im Elisa-Reader (Labsystems Multiskan MS, Labsystems, Frankfurt) gemessen. Die Proben wurden so verdünnt, dass die OD im Bereich einer mit BSA aufgenommenen Eichgeraden lag.

2.9.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [86]

Die SDS-Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteingemischen und ermöglicht die Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine. Das Prinzip beruht auf der Wanderung elektrisch geladener Teilchen im Gleichspannungsfeld, wobei deren Wanderungsgeschwindigkeit von ihrer Ladungsdichte abhängt. Die Proteine sind durch die Vorbehandlung mit SDS vollständig denaturiert und in ihre Untereinheiten zerlegt und liegen in Form von SDS-Protein-Komplexen vor, deren Ladung im Idealfall identisch ist. Folglich hängt ihre Wanderungsgeschwindigkeit im Gel nur noch von ihrem Molekulargewicht ab.

Es wurden 4,5-12 %ige oder 9,5-20 %ige Gradientengele mit einem Gelmischer, nach den Angaben in Tabelle 13 und 14, gegossen.

Tabelle 13: Herstellung eines Trenngels (je 10 ml)

	dH ₂ O [ml]	30 %iges Acrylamid* [ml]	1,5 M Tris.HCl/ pH 8,8 [ml]	10 %iges SDS [ml]	APS [μl]	TEMED** [μl]
4,5 %	6,0	1,5	2,5	0,1	90	10
9,5 %	4,25	3,15	2,5	0,1	65	10
12 %	3,0	4,0	2,5	0,1	45	10
20 %	0,75	6,75	2,5	0,1	20	10

Tabelle 14: Herstellung eines Sammelgels (4 ml)

	dH ₂ O [ml]	30 %iges Acrylamid* [ml]	0,5 M Tris.HCl/ pH 6,8 [ml]	10 %iges SDS [ml]	APS [ml]	TEMED** [ml]
4,5 %	3,25	0,5	1,25	0,05	0,05	0,005

* gebrauchsfertige Lösung der Firma Roth, Karlsruhe

** gebrauchsfertige Lösung der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Die aufzutrennende Proteinprobe wurde 1:2 mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten gekocht. Es wurden 10 μl der Proteinlösung pro Tasche aufgetragen. Als Größenstandard wurden je 10 μl eines Prestained Precision Protein StandardsTM von der Firma Bio-Rad verwendet.

Die SDS-Polyacrylamidelektrophorese ermöglicht 0,1 μg eines Proteins als erkennbare Bande bei einer Coomassie-Färbung zu erhalten. Mit einer Silberfärbung können noch geringere Mengen (0,02 μg) nachgewiesen werden.

2.9.9 Zweidimensionale-Gelelektrophorese [13]

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D-Elektrophorese) erlaubt die Analyse komplexer Proteingemische. Bei dieser Methode werden die Proteine im ersten Schritt, der Isoelektrischen Fokussierung (IEF), nach dem Isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt. Eine weitere Auftrennung erfolgt im zweiten Schritt, der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE), nach dem Molekulargewicht (MW) der Proteine. Tausende von Proteinen lassen sich auf diese Weise voneinander trennen. Jeder Spot auf dem Gel entspricht einem spezifischen Protein.

Das Pellet von 400 ml einer bis OD₆₂₃ von 0,5 in BHI gewachsenen Kultur von R6 oder SP-91 wurde mittels French-Press aufbrochen (2.9.1). Es wurde kein Erythromycin zur

SP-91-Kultur hinzugefügt. Nach Zentrifugation bei 2600 x g wurde die Gesamtproteinmenge im Überstand mit der Methode nach Bradford bestimmt (2.9.7). Je 200 µg Gesamtprotein wurden mit 0,1 x Volumen DNase/RNase-Mix für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nukleinsäure verhindert eine saubere Fokussierung der Proteine und muss daher vorher entfernt werden. 1 ml Rabilloud-Puffer wurde mit 10 mg DTT und 10 µl IPG-Puffer (pH 4-7) versetzt. Anschließend wurde soviel Rabilloud-Puffer-Gemisch zur Proteinlösung gegeben, dass ein Endvolumen von 125 µl (7 cm-Streifen) bzw. 250 µl (13 cm-Streifen) entstand. Die IPG-Streifen (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) wurden, mit Öl überschichtet, über Nacht in dem Proben-Puffer-Gemisch rehydriert. Es wurden IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von 4-7 verwendet.

Am folgenden Tag wurden die rehydrierten Streifen im Multiphor II (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) bei 20 °C bei einer maximalen Spannung von 3500 Volt für mindestens 16 kWh fokussiert. Nach erfolgter Fokussierung bei 25 °C wurden die IPG-Streifen für 15 Minuten in Equilibrierungspuffer mit DTT (10 mg/ml) geschwenkt, anschließend für 15 Minuten in Equilibrierungspuffer mit zugesetztem Iodacetamid (48 mg/ml).

Zur Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension wurde der Streifen auf ein 4,5-12 %iges oder 9,5-20 %iges SDS-Gel (Trenn- und Sammelgel fest) gelegt und mit 1 %iger Agarose überschichtet. Als Größenstandard wurden je 10 µl eines Prestained Precision Protein StandardsTM von der Firma Bio-Rad verwendet.

Bei 100 V wurde das Gel so lange laufen gelassen, bis die Lauffront das Sammelgel erreichte. Anschließend wurde der Streifen entfernt, um eine Veränderung der Lauffront durch mit dem Streifen aufgebrauchte Blasen zu vermeiden. Bei Elektrophoresen über Nacht wurde eine Spannung von 30 Volt angelegt. Die Färbung der im Gel aufgetrennten Proteine erfolgte mit Coomassie (2.9.12). Die Auswertung der Gelspots erfolgte mit der PDQuest 2-D Image Analysis Software der Firma Bio-Rad (München). Zum Teil wurden die Gele für Westernblot Analysen (2.9.13) eingesetzt.

2.9.10 Zymogramme [87]

Mit Hilfe von Zymogrammen lässt sich die Aktivität eines Proteins bestimmen. Bei Zymogrammen handelt es sich um Polyacrylamidgele mit eingegossenem Substrat. Entweder wurden native Polyacrylamidgele verwendet oder SDS-Polyacrylamidgele, bei denen nach erfolgtem Lauf das SDS entfernt und die Protease anschließend durch Wärmeeinwirkung und

eventuelle Zufuhr von Liganden aktiviert wurde. Der Abbau des Substrates wurde anschließend durch Färbung des unverdauten Substrates mit Coomassie dargestellt.

Bei der nativen Gelelektrophorese werden die Proteine nicht wie bei der SDS-PAGE denaturiert. Die Proteinlösung wird weder aufgekocht, noch mit reduzierenden Agenzien wie dem SDS oder DTT versetzt. Ebenso erhält auch der Elektrophoresepuffer kein SDS, um die Struktur der Proteine und damit auch ihre Aktivität zu erhalten. Das Laufverhalten von denaturierten und nativen Proteinen ist sehr unterschiedlich. Native Proteine zeigen durch ihre unterschiedlichen Ladungen ein sehr spezifisches Laufverhalten. Die Auftrennung benötigt mehr Zeit. Die Proteinlösungen wurden in Ladepuffer (ohne Zusätze) gemischt und auf kleine (7 x 10 cm) native Gele, die eingegossenes Kasein als Substrat enthielten, aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 100 V für mindestens 1,5 Stunden. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie gefärbt. Ein Abbau des Substrates stellt sich durch einen ungefärbten Bereich dar. Von den SDS-Polyacrylamidgelen wurden 4,5-12 %ige Gradientengele mit 1 mg/ml hinzugegebenem Kasein als Substrat gegossen. Die Proben wurden mit Ladepuffer ohne β -Mercaptoethanol oder DTT und ungekocht auf das Gel aufgetragen. Für 3-4 h betrug die angelegte Spannung 200 V. Es erfolgte ein Schwenken des Gels für zweimal 30 Minuten in verdünntem Triton X-100, um das SDS zu entfernen. Anschließend wurde das Gel über Nacht in Tris-HCl Puffer bei 37 °C inkubiert und am folgenden Tag in Coomassie geschwenkt. Der Abbau des Substrates zeigt sich durch Lysehöfe.

2.9.11 Native Gele

Zur Untersuchung der Proteaseaktivität wurden native 4,5 %ige Polyacrylamidgele gegossen, die 1 mg/ml Kasein enthielten. In die Gele wurden Löcher gestanzt und in jedes Loch je 10 μ l eingengter Überstand (Trypsin je 5 μ l einer 5 mg/ml Lösung) aufgetragen. Die Gele wurden in einer feuchten Kammer über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend in einer Coomassie-Färbelösung gefärbt. Ein Abbau des Kaseins durch die im Überstand vorhandenen Proteasen war an einem entstandenen Lysehof erkennbar.

2.9.12 Färbung und Kultivierung von Polyacrylamidgelen

Coomassie-Färbung

Mit Coomassie® Brilliant blue R-250 (Merck, Darmstadt) lassen sich Polypeptide auf SDS-Gelen sichtbar machen. Der Farbstoff bindet unspezifisch an Proteine. Zu diesem Zweck

wurden SDS-Gele für 30 Minuten in Färbelösung geschwenkt und anschließend mit Entfärber entfärbt. Proteine blieben blau gefärbt.

Silberfärbung

Eine Silberfärbung der Proteine auf einem Polyacrylamidgel wurde mit dem Silver Stain Plus Kit (Bio-Rad, München) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Kultivierung

Zur Kultivierung der Gele wurden diese zwischen Cellophanfolie oder auf Whatman-Papier in einem Gelrockner (Model 583, Bio-Rad, München) für 2 Stunden getrocknet.

2.9.13 Immunoblot [123]

Zur Detektion von Proteinen innerhalb eines Proteingemischs wurde der Immunoblot verwendet. Bei dem Immunoblot handelt es sich um eine Technik zum Nachweis eines bestimmten Proteins durch seine Reaktion mit einem spezifischen Antikörper.

Westernblot

Eine Proteinlösung wurde in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit Hilfe einer Semidry-Blotting-Apparatur (Bio-Rad, München) auf eine Nitrozellulose- (BioTrace® NT, 0,45 µm, Pall Gelman Science, Dreieich) oder PVDF-Membran (Immobilon™-P Transfer Membran, Millipore, Bedford) übertragen. Zuvor wurden Gel, Membran und Chromatographiepapier (3 mm, Whatman, Maidstone, UK) für einige Minuten in Blot-Puffer inkubiert. Anschließend wurde das Gel auf der Membran zwischen je 2 Lagen Chromatographiepapier gestapelt. Der Transfer der negativ geladenen Proteine erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 1 mA/cm² für 1 Stunde. Die restlichen Proteinbindungsstellen der Blotmembran wurden anschließend für 2 Stunden mit einer Blockierlösung (1 % BSA, 5 % Milchpulver in 100 ml PBS Tween) abgesättigt. Für 1 Stunde wurde der Blot in PBS Tween mit einem spezifischen Antiserum (1. AK) inkubiert. Nach einem Waschvorgang mit PBS-Tween erfolgte eine Inkubation mit einem Sekundärantikörper (2. AK) für 1 Stunde. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde der Blot mit Hilfe der an den Sekundärantikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase mit BCIP und NBT entwickelt. Die alkalische Phosphatase führt zur Bildung eines wasserunlöslichen Farbstoffs aus den chromogenen Substraten BCIP und NBT. Der Nachweis erfolgte in 20 ml AP-Puffer mit Zusatz von 66 µl NBT (50 mg/ml in 70 % DMF) und 132 µl BCIP (50 mg/ml in DMF). Die enzymatische Reaktion wurde in PBS mit 1 mM EDTA abgestoppt.

Neben einem Sekundärantikörper, der mit alkalischer Phosphatase markiert ist, wurde ein Antikörper verwendet, der mit einer Peroxidase gekoppelt ist. Der Blot wurde nach dem Blockieren in PBS Tween mit einem Primärantikörper, der spezifisch gegen 6 hintereinanderfolgende Histidine gerichtet ist, für zwei Stunden inkubiert. Nach einem Waschvorgang erfolgte die Inkubation für 2 Stunden in PBS Tween mit dem Sekundärantikörper. Nach wiederholtem Waschen wurde die Membran für 30 Sekunden bis 30 Minuten in Luminol (Pierce, Rockford, Illinois, USA) geschwenkt. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol und löst damit eine Chemilumineszenz aus, die auf einem Film dargestellt wurde.

Tabelle 15: Verwendete Antikörper

1. Antikörper	Anti-PrTA	Patientenserum 3.S.4	Tetra-His
Verdünnung	1:1000	1:7500	1:7500
Inkubationszeit	1 h	1 h	2 h
2. Antikörper	Anti-Rabbit IgG	Anti-Human IgG	Anti-Maus POX
Verdünnung	1:7500	1:7500	1 :7500
Inkubationszeit	1 h	1 h	2 h
Markierung des 2. AK	Alkalische Phosphatase	Alkalische Phosphatase	Peroxidase

Dot-Blot

Neben der Übertragung von Proteinen über ein SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran können Proteine auch direkt auf eine Membran getropft werden (Dot-Blot).

Auf eine Nitrozellulosemembran wurden je 10 µl einer Substanz aus der extrazellulären Matrix in verschiedenen Verdünnungen aufgetropft. Die Proteine wurden für 2 Stunden mit Blockierlösung blockiert, gewaschen und anschließend auf die Matrixproteine je 10 µl eingegatter Überstand aufgetragen. Für 1 Stunde erfolgte eine Inkubation der Membran in Anti-PrTA-Serum. Die Membran wurde in PBS Tween gewaschen und für 1 Stunde der Sekundärantikörper hinzugegeben. Nach weiterem Waschen erfolgte eine Entwicklung der Membran mit NBT und BCIP. Als Negativkontrolle diente ein Spot mit der höchsten aufgetragenen Konzentration an Matrixprotein, als Positivkontrolle wurde eingegatter Überstand verwendet, jeweils aufgetragen vor dem Blockieren der Membran.

2.9.14 Rechromatographie von Proteinen

Banden aus SDS-Polyacrylamidgelen wurden ausgeschnitten und erneut auf ein Gel aufgetragen. Entweder wurden die aus dem Gel ausgeschnittenen Stücke direkt in die Tasche der Gele gegeben oder die Gelstücke wurden zermörsert und erneut in Ladepuffer aufgenommen. Die Proteinbanden wurden nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, mit einem Tetra-His AK und mit einer Peroxidase markierten Sekundärantikörper inkubiert und auf einem Röntgenfilm dargestellt.

2.9.15 Sequenzierung von Proteinen

Die Sequenzierung der Aminosäuresequenz des PrtA erfolgte durch Edman-Abbau. Beim Edman-Abbau wird vom aminoterminalen Ende ein Aminosäurerest markiert und abgespalten. Die abgetrennte AS wird anschließend chromatographisch identifiziert. Die N-terminale Sequenzierung des Proteins wurde an einem ABI 494Aprocise HT-Sequencer an der Gesellschaft für biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig durchgeführt.

2.10 Sequenzanalysen

Die Sequenz- und Homologieanalysen wurden in den Datenbanken von NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) und MOTIF (www.motif.genome.ad.jp) durchgeführt. Sequenzen des Pneumokokken-Genoms wurden vom Institute of Genomic Research (TIGR) (www.tigr.org) erhalten. Für weitere Analysen von DNA- und Proteinsequenzen wurde DNASTAR 4.0 Software (DNASTAR Inc., USA) verwendet.

2.11 Immunfluoreszenz-Analyse mit dem FACS (fluorescence-activated cell sorting)

Die fluoreszenzaktivierte Zelltrennung (FACS, fluorescence-activated cell sorting) ist eine Methode zur Darstellung der zellulären Lokalisation von Proteinen. Oberflächenproteine werden von spezifischen Antikörpern gebunden, welche wiederum mit einem Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert werden können. Die zellgebundene Fluoreszenz wurde mit einem FACScan Flow Cytometer gemessen.

Über Nacht gewachsene Pneumokokken wurden bei OD₆₂₃ von 0,5 bei 2600 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde einmal in PBS gewaschen und

anschließend mit PBS in einem Photometer (Pharmacia LKB Biotechnologie, Ultraspec Plus, Model 4054, Freiburg) auf eine OD₆₃₀ von 0,7 bei 630 nm eingestellt. 2 ml dieser Suspension wurden erneut zentrifugiert. In 200 µl PBS mit 5 % hitzeinaktiviertem (bei 56 °C für 30 Minuten) Anti-PrtA-Serum oder Präimmunserum wurde das Pellet aufgenommen und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten bei 4 °C in 200 µl PBS mit 1:50 des Fluorescein-konjugierten Ziege-Anti-Kaninchen IgG. Das Pellet wurde anschließend zweimal gewaschen, in 1 ml 0,5 % Paraformaldehyd zur Fixierung aufgenommen und in einem FACScan Flow Cytometer (FACSCalibur, Becton Dickenson, Heidelberg) analysiert.

2.12 Herstellung FITC-markierter Pneumokokken

Der Wildtyp R6x und die entsprechende Knock-out Mutante SP-111 wurden in BHI bei 37 °C inkubiert bis zu einer OD₆₂₃ von 0,4 wachsen lassen. Die Zellen wurden bei 4 °C und 2600 x g für 10 Minuten zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit 0,5 ml FITC-Lösung (1 mg/ml in Carbonatpuffer) bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Nach Zentrifugation bei 2600 x g und 4 °C für 10 Minuten wurde das Pellet dreimal mit Carbonatpuffer gewaschen und bei 630 nm mit PBS auf eine OD von 1,0 eingestellt. Die Bakterien wurden höchstens 1 Tag bei 4 °C im Dunkeln bis zur Verwendung gelagert.

2.12.1 Bindungsassay

Zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit von Pneumokokken an bestimmte extrazelluläre Substanzen wurden Bindungsassays, sowohl mit dem Wildtyp als auch mit der Knock-out Mutanten SP-91, durchgeführt.

Auf Culture Chambers (Lab-Tek® Chamber Slide™, Nunc, Naperville, Illinois) wurden je 50 µl Fibronektin, Kollagen I, III, IV und Gelatine gegeben. Die Konzentration der Lösungen betrug 50 µg/ml. Als Negativkontrolle diente PBS. Die Platten wurden für 2 Stunden bei 37 °C im Brutraum inkubiert. Anschließend wurde mit 5 % BSA in PBS für 5 Stunden bei 37 °C blockiert. Mit PBS wurde viermal gewaschen und je 50 µl FITC-markierte Bakterien hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 Minuten. Es folgte fünfmaliges Waschen mit PBS, Inkubation für 3 Minuten mit 2,5 %igem Glutaraldehyd in PBS und zweimaliges Waschen mit PBS. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln. Die Bindung der

Bakterien wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop (Nikon, Düsseldorf) mit 40facher Vergrößerung ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Überprüfung von PrtA-Mutanten

Mehrere Mutanten wurden durch ortsspezifische Mutagenese von *S. pneumoniae* R6 hergestellt. Bei den LPXTG-defizienten Mutanten sollte PrtA nach Durchschleusung durch die Zellmembran und Zellwand nicht in der Zellwand verankert werden können, sondern müsste, wie ein sekretiertes Protein, direkt in die Zellumgebung abgegeben werden. Die LPXTG-defiziente His-Tag-Mutante wurde so konstruiert, dass PrtA an Stelle des Wandankers ein His-Tag-Motiv trägt, um das Protein affinitätschromatographisch über Ni-NTA-Agarose aufzureinigen zu können. Die beiden Mutanten dienen der Aufreinigung von PrtA und den Untersuchungen zur Aktivität und Bindungsfähigkeit des Proteins. Für die Charakterisierung von PrtA wurden zwei weitere Mutanten erzeugt: Eine PrtA-defiziente Mutante, die kein aktives PrtA mehr bilden sollte, sowie eine signalpeptidlose Mutante, die PrtA nicht mehr durch die Zellmembran transportieren kann. Diese Mutante sollte also das Protein weder in die Zellumgebung abgeben, noch PrtA in der Zellwand verankern können. Eine Überprüfung der Mutanten auf den fehlerfreien Einbau bei der homologen Rekombination ergab nach Sequenzierung korrekt eingebaute DNA-Fragmente.

3.1.1 LPXTG-defiziente Mutante (SP-104)

Beim Vergleich der PrtA-Expression von Wildtyp und Mutante (SP-104) mittels Westernblot war zu erkennen, dass im Gesamtzellysate des Wildtyps relativ mehr der 215 kDa-Form von PrtA nachzuweisen war als bei der Mutante. Im Überstand hingegen war weniger PrtA zu finden. Bei der Mutante war im Westernblot die 240 kDa-Form (die vermutete Vorläuferform von PrtA) deutlicher zu sehen als beim Wildtyp, sowohl im Gesamtzellysate als auch im Überstand (Abb. 10).

3.1.2 LPXTG-defiziente His-Tag tragende Mutante (SP-107)

Wie in Abbildung 10 zu erkennen, führte der Verlust des Zellwandankers zu einer erhöhten Konzentration des Proteins PrtA im Kulturüberstand. Um das Protein aufzureinigen zu können, wurde eine Mutante hergestellt, bei der das PrtA nicht in der Zellwand verankert wird und gleichzeitig über ein His-Tag aus dem Kulturüberstand aufgereinigt werden kann. Eine

Überprüfung der Expression des His-Tag erfolgte über eine Affinitätschromatographische Auftrennung des eingengten Kulturüberstandes der Mutanten, SDS-PAGE und anschließendem Westernblot (Abb. 19).

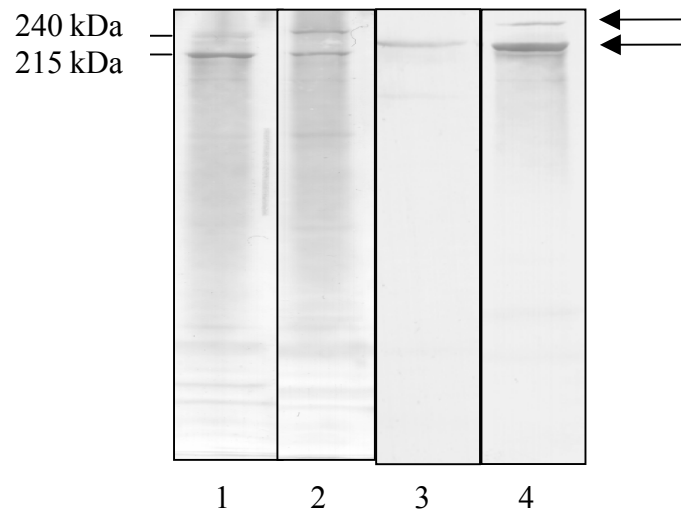


Abbildung 10: Westernblot-Analyse der Zellfraktionen von *S. pneumoniae* mit dem Anti-PrtA-Serum. Detektiert wurde PrtA im Gesamtzelllysat von *S. pneumoniae* R6 (Spur 1) und Sp-104 (Spur 2), sowie im Zellüberstand von R6 (Spur 3) und SP-104 (Spur 4). Aufgetragen wurden jeweils gleiche Gesamtproteinmengen. Die PrtA-Banden sind markiert.

3.1.3 Signalpeptidlose Mutante (SP-110)

Eine Überprüfung der Mutante mittels Westernblot zeigte, dass das Protein weiterhin expremiert wurde, jedoch offensichtlich auf Grund des fehlenden Signalpeptids nicht mehr durch die Zellmembran geschleust wurde: Das Protein trat im Kulturüberstand nicht mehr auf (Abb. 11). Auf dem Westernblot wurden durch das PrtA-Antiserum mehrere Banden zwischen 250 kDa und 150 kDa, sowie eine Bande zwischen 75 und 100 kDa im Zellüberstand bei R6 und der LPXTG-defizienten His-Tag Mutante (SP-107) detektiert, jedoch nicht bei der signalpeptidlosen Mutante. Es muss sich dabei um verschiedene PrtA-Formen handeln, eventuell um Abbauprodukte.

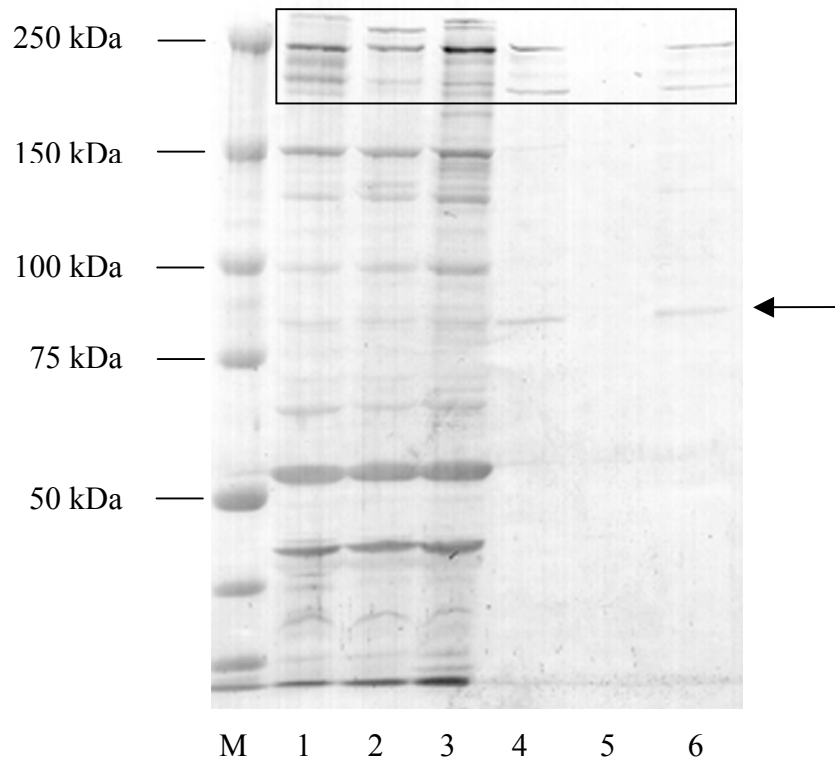


Abbildung 11: Westernblot-Analyse der Zellfraktionen von *S. pneumoniae* mit dem Anti-PrtA-Serum. Analysiert wurden Gesamtzelllysate von *S. pneumoniae* R6 (Spur 1), der signalpeptidlosen Mutante SP-110 (Spur 2) und der LPXTG-defizienten Mutante Sp-107 (Spur 3), sowie Zellüberstände von R6 (Spur 4), SP-110 (Spur 5) und SP-107 (Spur 6). Die vermuteten PrtA-Banden sind umrandet und markiert. M, Molekulargewichtsmarker.

3.1.4 PrtA-defiziente Mutante (SP-111)

Im Westernblot konnte gezeigt werden, dass bei der PrtA-defizienten Mutante (Knock-out Mutante) kein PrtA expremiert wird. Es ließ sich mittels polyklonalem PrtA-Antiserum weder im Gesamtzelllysat noch im Kulturüberstand eine reaktive Bande typischer Größe detektieren (Abb. 12). Weiterhin war zu erkennen, dass nicht nur die 240 kDa- und 215 kDa-Bande bei der PrtA-defizienten Mutante fehlten, sondern auch noch weitere Banden im Bereich zwischen 250 kDa und 150 kDa.

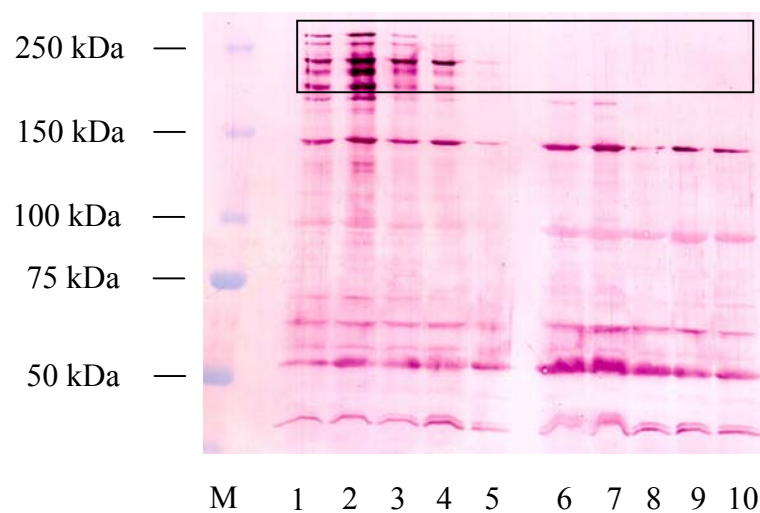


Abbildung 12: Westernblot-Analyse des Gesamtzelllysats von *S. pneumoniae* mit dem Anti-PrtA-Serum. Analysiert wurden Gesamtzelllysate gleicher Proteinkonzentration von *S. pneumoniae* R6 bei OD 0,6 (Spur 1), OD 0,5 (Spur 2), OD 0,4 (Spur 3), OD 0,3 (Spur 4), OD 0,2 (Spur 5) und der Knock-out-Mutante SP-111 bei OD 0,6 (Spur 6), OD 0,5 (Spur 7), OD 0,4 (Spur 8), OD 0,3 (Spur 9), OD 0,2 (Spur 10). Die vermuteten PrtA-Banden sind umrandet. M, Molekulargewichtsmarker.

3.2 Überprüfung der Mutanten auf die Oberflächenverankerung des PrtA

Die Expression von PrtA auf der Oberfläche der erzeugten Mutanten sowie der Wildtypen R6 und D39 wurde mittels Fluoreszenz-aktiviertem Zell-Sortierer (FACS) analysiert. Pneumokokken wurden mit dem Anti-PrtA-Serum inkubiert, so dass das Anti-Serum an das PrtA binden konnte, insofern das Protein auf der Oberfläche lokalisiert war. Durch Bindung eines Fluorescein-markierten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper konnte durch Messungen am FACScan Flow Cytometer die Lokalisierung von PrtA auf der Zelloberfläche der Pneumokokken gezeigt werden. Ein Vergleich des Wildtyps R6 mit den PrtA-defizienten Mutanten SP-91 (über Insertions-Duplikations-Mutagenese erzeugte Mutante) und SP-111 (über ortsspezifische Mutagenese erzeugte Mutante) zeigte eine deutlich stärkere Fluoreszenz beim Wildtyp (Abb. 13). Die Knock-out Mutanten sollen kein PrtA exprimieren, so dass auch kein PrtA auf der Oberfläche der Pneumokokken zu finden sein darf. Ein Vergleich von R6 mit der LPXTG-defizienten Mutante (SP-104) und der LPXTG-defizienten His-Tag Mutante (SP-107) zeigte bei den Mutanten eine geringere Fluoreszenz als bei dem Wildtyp, jedoch war die gemessene Fluoreszenz bei Stamm SP-104 höher als bei dem Stamm SP-107 (Abb. 14). Bei beiden Mutanten ist die Fluoreszenz größer als bei den PrtA-defizienten Mutanten. Die

signalpeptidlose Mutante (SP-110) zeigte hingegen das gleiche Ergebnis wie die Knock-out-Mutanten (Abb. 15). Auch bei dem bekapselten Wildtyp D39 (Abb. 16) ließ sich Oberflächen-lokalisiertes PrtA mit dieser Methode nicht nachweisen.

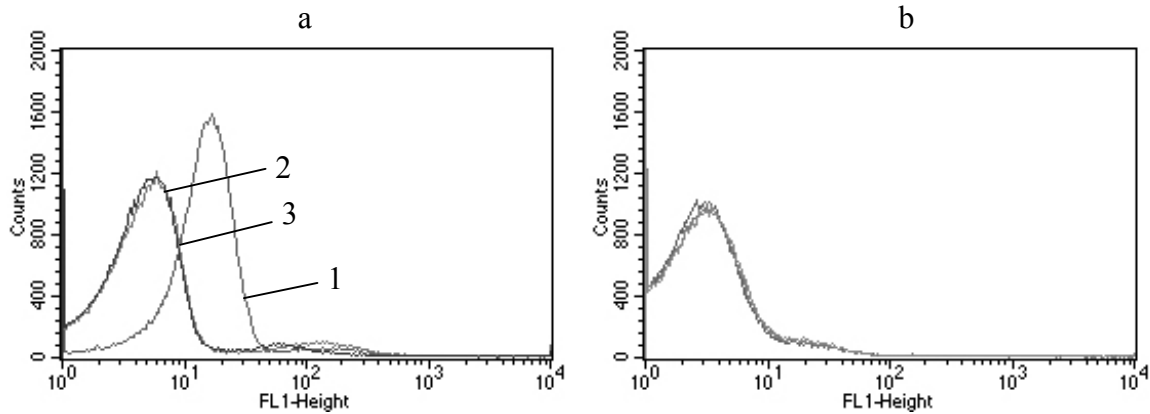


Abbildung 13: Immunzytometrische Messung der zellulären Lokalisation der Serinprotease PrtA bei dem Wildtyp R6 (1) und den PrtA-defizienten Mutanten SP-111 (2) und SP-91 (3). Die Messungen erfolgten mit dem spezifischen Antiserum (a) und als Kontrolle nur mit dem FITC-markierten Sekundärantikörper (b).

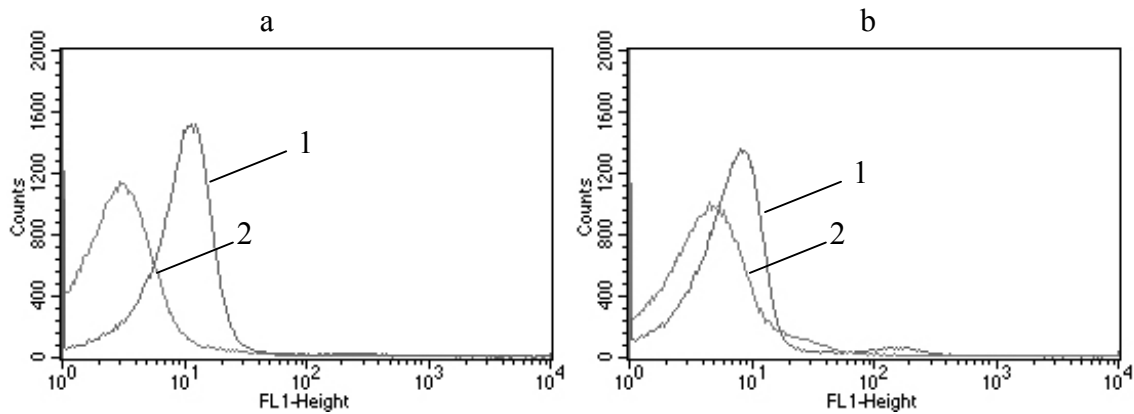


Abbildung 14: Immunzytometrische Messung der zellulären Lokalisation der Serinprotease PrtA bei der LPXTG-defizienten Mutante SP-104 (a) und der LPXTG-defizienten His-Tag Mutante SP-107 (b). Die Messungen erfolgten mit dem spezifischen Antiserum (1) und als Kontrolle nur mit dem FITC-markierten Sekundärantikörper (2).

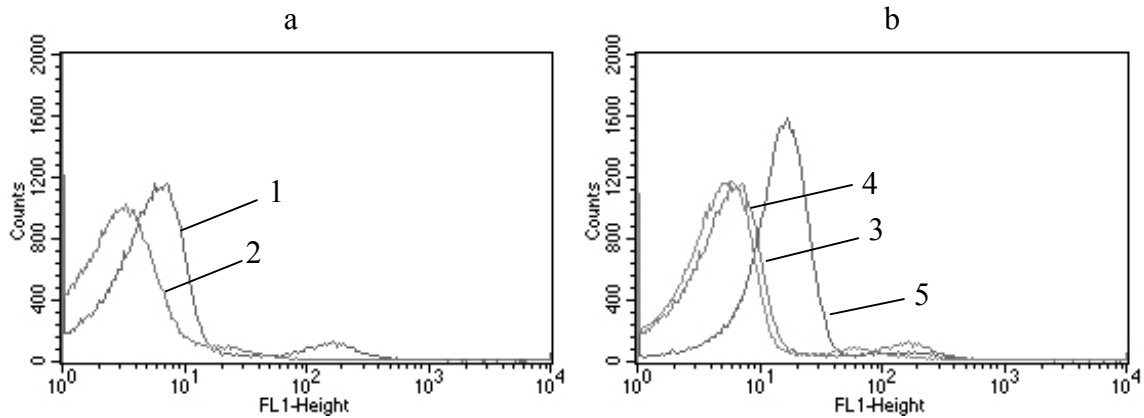


Abbildung 15: Immunzytometrische Messung der zellulären Lokalisation der Serinprotease PrtA bei der signalpeptidlosen Mutante SP-110 (a). Die Messungen erfolgten mit dem spezifischen Antiserum (1) und als Kontrolle nur mit dem FITC-markierten Sekundärantikörper (2). Den Vergleich der immunzytometrischen Messung der zellulären Lokalisation der Serinprotease PrtA bei SP-110 (3), der PrtA-defizienten Mutante SP-111 (4) und dem Wildtyp R6 (5) sind auf Abbildung (b) dargestellt. Die Messung erfolgte mit einem spezifischen Antiserum.

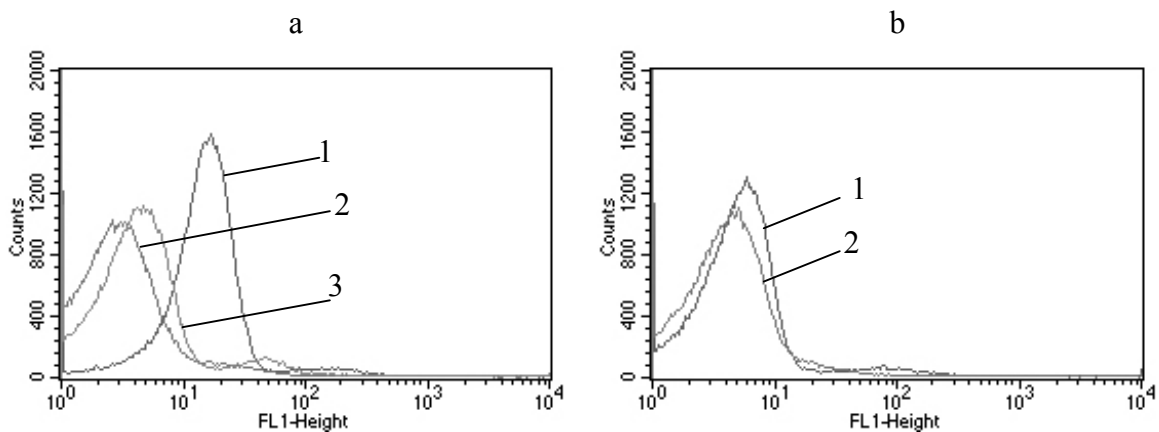


Abbildung 16: Immunzytometrische Messung der zellulären Lokalisation der Serinprotease PrtA bei dem Wildtyp R6 (a) und dem bekapselten Wildtyp-Stamm D39 (b). Die Messungen erfolgten mit dem spezifischen Antiserum (1), als Kontrolle nur mit dem FITC-markierten Sekundärantikörper (2) und mit einem Präimmunserum (3).

3.3 Wachstumsverhalten der verwendeten Stämme in BHI

Durch Aufnahme von Wachstumskurven der hergestellten Mutanten und der Wildtyp-Stämme R6 und D39 in BHI-Medium sollte festgestellt werden, ob es einen Unterschied im Wachstum zwischen den Wildtyp-Stämmen und den hergestellten Mutanten gibt.

Wachstumskurven der hergestellten Mutanten und der Wildtyp-Stämme R6 und D39 zeigten keine großen Unterschiede im Wachstumsverhalten der einzelnen Stämme (Abb. 17). Der unbekapselte Wildtyp-Stamm R6 erreichte schneller als die anderen Stämme die endlogarithmische Phase. Die Mutanten waren im Wachstum etwas langsamer als R6, erreichten aber die gleiche OD_{623} in der endlogarithmischen Phase. Der bekapselte Wildtyp-Stamm D39 ist auf eine etwas höhere maximale OD_{623} gewachsen, als alle anderen untersuchten Stämme.

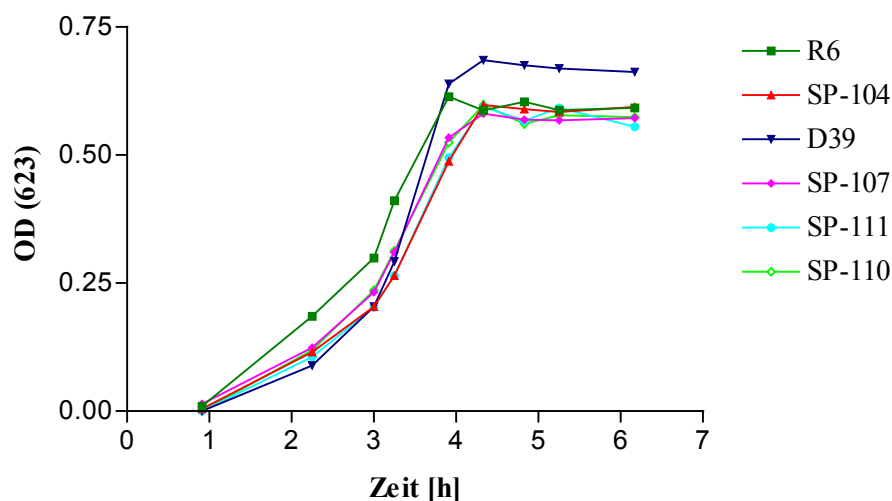


Abbildung 17: Wachstum der beiden Wildtyp-Stämme R6 und D39 sowie der hergestellten Mutanten SP-104 (LPXTG-defizient), SP-107 (LPXTG-defizient mit His-Tag), SP-110 (signalpeptidlos) und SP-111 (PrtA-defizient) in BHI über den Zeitraum von ungefähr 6 Stunden.

3.4 Aufreinigung des nativen PrtA aus dem Kulturüberstand der Mutante SP-107

Für Analysen zur weiteren Charakterisierung des PrtA sollte das Protein in aufgereinigter Form vorliegen. Um das Protein nativ aufzureinigen zu können, wurde die LPXTG-defiziente His-Tag Mutante SP-107 verwendet. Diese Mutante gibt das PrtA direkt in den Kulturüberstand ab. Zur schnellen Überprüfung der Konzentrierung des Proteins nach Aufreinigung über Ni-NTA-Säulen diente ein Dot-Blot (Abb. 18). Eine deutliche Konzentrierung des aufgereinigten Proteins war zu sehen.

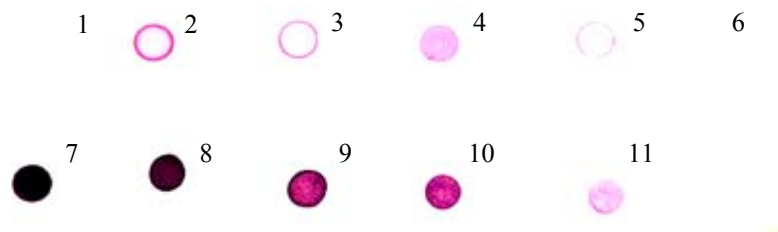


Abbildung 18: Dot-Blot der Fraktionen einer Aufreinigung des PrtA aus eingengtem BHI-Kulturüberstand von SP-107 über Ni-NTA-Agarose mit dem Anti-PrtA-Serum. Aufgetragen wurde eine Probe aus dem Filtrat (Spot 1), eingengtem Überstand (Spot 2), Kulturüberstand (Spot 3), nach dem Durchlaufen über eine Ni-NTA-Agarosesäule (Spot 4), nach dem 1. und 2. Waschen (Spot 5 und 6), nach dem 1. – 4. Eluieren (Spot 7 – 10) und nach Durchlauf von Lysispuffer (Spot 11).

Nach SDS-PAGE und anschließendem Westernblot der Fraktionen der Elutionsschritte war neben der vermuteten prozessierten 215 kDa-Form des PrtA auch eine Bande bei 240 kDa zu erkennen, das der Größe des angenommenen Vorläuferproteins entspricht (Abb. 19).

PrtA lag nach Aufreinigung in so großen Konzentrationen vor, dass das Protein nach Färbung mit Coomassie auf einem SDS-Polyacrylamidgel darstellbar war. Noch deutlicher war die Proteinbande nach Silberfärbung (Abb. 20). Nach Dialyse des aufgereinigten Proteins ging jedoch ein Großteil des Proteins verloren (Abb. 20, Spur 2 und 3).

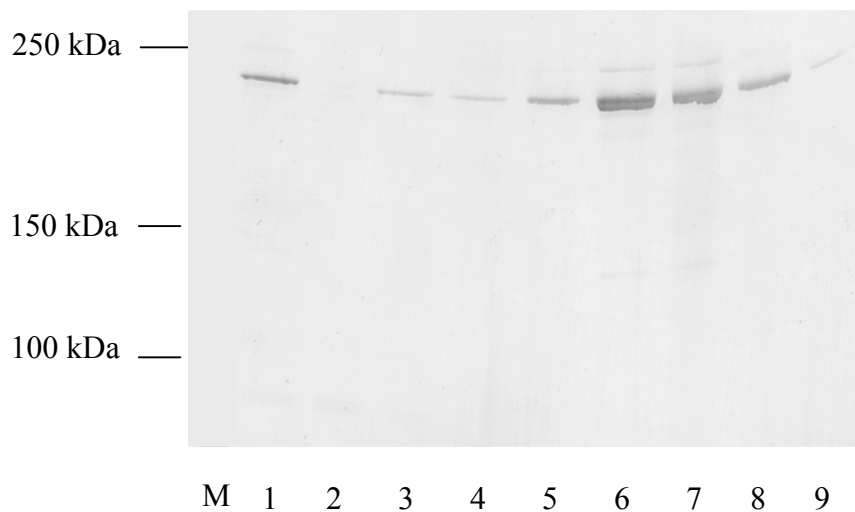


Abbildung 19: Westernblot-Analyse der Aufreinigungsfraktionen des Zellkulturüberstandes von *S. pneumoniae* SP-107 über Ni-NTA-Agarose mit dem Anti-PrtA-Serum. Detektiert wurde PrtA im Überstand nach dem Zentrifugieren bei 2600 x g für 5 Minuten (Spur 1), nach dem Durchlaufen über eine Ni-NTA-Agarosesäule (Spur 2), nach dem 1. und 2. Waschen (Spur 3 und 4), nach dem 1. – 4. Eluieren (Spur 5 – 8) und nach Durchlauf von Lysispuffer (Spur 9). M, Molekulargewichtsmarker.

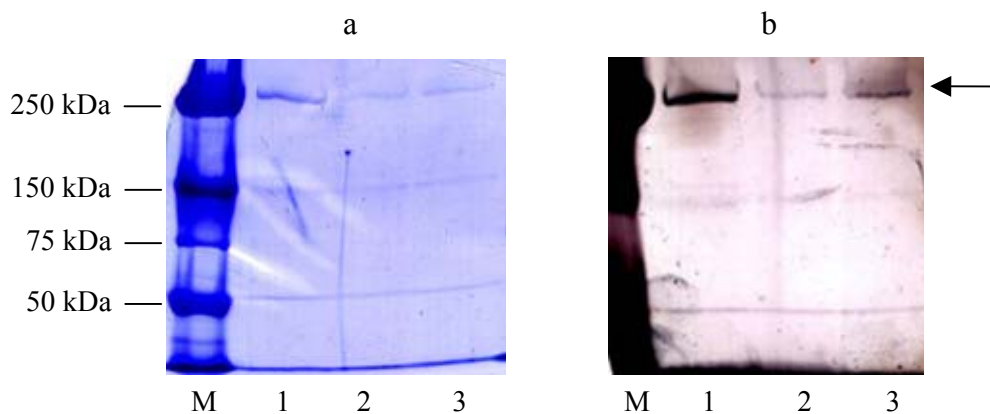


Abbildung 20: Darstellung des aufgereinigten PrtA auf einem 4,5 %igen (a) Coomassiegefärbten und (b) silbergefärbten Gel. Aufgetragen wurden 10 µl aufgereinigtes PrtA aus dem 1. Elutionsschritt (Spur 1), aus dem 2. und 3. Elutionsschritt dialysiert (Spur 2 und 3). M, Molekulargewichtsmarker.

Das Protein war nativ aus dem Kulturüberstand mit dieser Methode aufzureinigen. Auch wenn PrtA auf einem SDS-Polyacrylamidgel als Bande sichtbar war, lag das Protein dennoch

nur in relativ geringen Konzentrationen vor. Um größere Mengen an PrtA zu erhalten, wurden analog Großkulturen angesetzt, die Kulturüberstände stark eingeeengt und PrtA affinitätschromatographisch aufgereinigt. Erstaunlicherweise nahm trotz erhöhter Ausgangsmenge die aufgereinigte PrtA-Konzentration nicht zu. Die maximal erreichbare Konzentration lag bei ungefähr 500 µg/ml (Abb. 21).

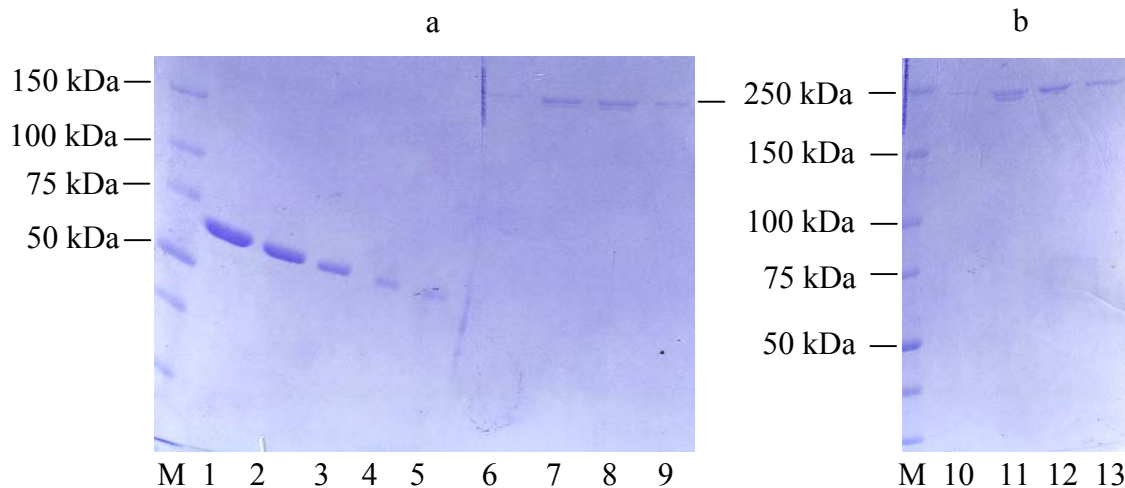


Abbildung 21: Darstellung von BSA in unterschiedlichen Konzentrationen und von dem aufgereinigten PrtA auf 4,5 - 12 %igen Gelen nach Färbung mit Coomassie. (a) Aufgetragen wurde BSA in den Konzentrationen 5 mg/ml (Spur 1), 2,5 mg/ml (Spur 2), 1 mg/ml (Spur 3), 0,5 mg/ml (Spur 4) und 0,1 mg/ml (Spur 5) sowie 15 µl aufgereinigtes PrtA der dialysierten Elutionsschritte 1 - 4 aus einer 63-fachen Einengung (Spur 6-9). (b) Aufgetragen wurden 10 µl aufgereinigtes PrtA der dialysierten Elutionsschritte 1 - 4 aus einer 44-fachen Einengung (Spur 10 - 13). M, Molekulargewichtsmarker.

Um größere Konzentrationen von PrtA durch die Herstellung von rekombinantem Protein zu erreichen, wurde versucht, das *prtA*-Gen in *E. coli* zu exprimieren. Das PCR-Produkt des Gesamt-*prtA*, hergestellt mit den Primern AN-26 und AN-27, wurde in den mit den Restriktionsendonukleasen *SalI* und *XhoI* geschnittenen 28b-Vektor ligiert. *E. coli* war jedoch mit dem Produkt der Ligationsreaktion nicht transformierbar.

3.5 Analyse der Stabilität des aufgereinigten PrtA

3.5.1 Zweidimensionale Darstellung von aufgereinigtem PrtA

Die maximal erreichbare PrtA-Konzentration überschreitet 0,5 mg/ml nicht. Das PrtA schien demnach einer Autolyse zu unterliegen. Um zu überprüfen, ob das PrtA-Protein tatsächlich autolysierte, wurde von dem aufgereinigten Protein eine zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt. Die Proteinkonzentration war niedriger als 50 µg/250 µl. Auf dem Blot des 2-D Gels mit fokussiertem aufgereinigtem PrtA waren mehrere Spots zu erkennen (Abb. 22). Neben einem stärker ausgeprägten Spot bei ungefähr 215 kDa, das der Größe des angenommenen maturierten Proteins entspricht, waren weitere vier Spots vorhanden. Ein Spot lag bei ungefähr 180 kDa. Zwei weitere Spots waren mit einer Größe zwischen 50 und 75 kDa einiges kleiner. Das kleinste, auf dem Blot dargestellte Protein, hatte eine Größe von ungefähr 40 kDa. Es konnten nur die Produkte dargestellt werden, die den C-terminalen Bereich (AS 1572-1877), gegen den das Antiserum gerichtet ist, enthielten. Die Autolyse des PrtA-Proteins ist auf einem Westernblot eines 2-D Gels mit aufgereinigtem Protein zu erkennen.

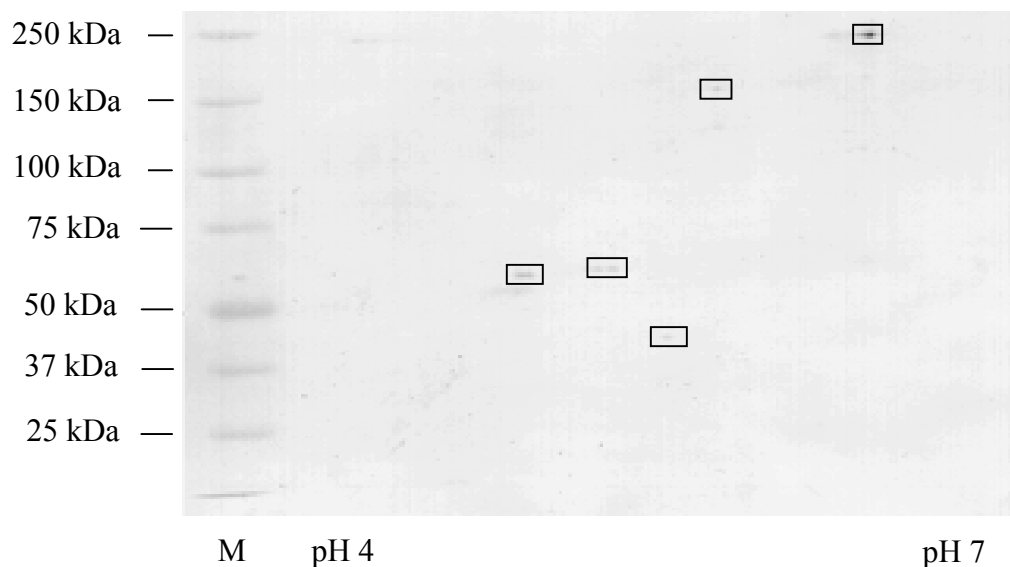


Abbildung 22: Westernblot eines 2-D Gels des über Ni-NTA Agarose aufgereinigten PrtA. Die eingerahmten Felder zeigen die auf dem Blot sichtbaren Spots an. Verwendet wurde ein polyklonales Antiserum, das gegen den C-Terminus des PrtA gerichtet ist. M, Molekulargewichtsmarker.

Bei Zusatz des Serinproteasehemmers PMSF zu aufgereinigtem PrtA, zeigten sich auf einem Blot nach erfolgter SDS-PAGE ebenfalls mehrere Banden.

3.5.2 Darstellung von PrtA nach Gelextraktion

Um festzustellen, in welchem Bereich PrtA zur Instabilität neigt, wurden vier rekombinant erzeugte Bereiche (Abb. 23), die eine gute Reaktivität mit einem Serum eines Patienten nach systemischer Pneumokokken-Infektion zeigten, nach SDS-PAGE und Blotten auf einem Röntgenfilm dargestellt. Eines dieser Einzelfragmente, Fragment Sp-15, zeigte sich ebenso wie das Gesamt-PrtA als instabil, während die anderen Fragmente stabil waren. Sp-15 hat eine Größe von 25 kDa und enthält zwei der katalytischen Domänen (Abb. 23). Das Autolyseverhalten dieses Fragmentes wurde mittels Rechromatographie analysiert. Die Bande bei 25 kDa wurde aus einem SDS-Polyacrylamidgel ausgestochen und erneut auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 24). Auf dem Röntgenfilm war bei der primären Chromatographie deutlich die Zerlegung von Fragment 15 zu sehen (Abb. 24, Spur 1). Nach der Rechromatographie des Fragmentes (Spur 2) war eine Zerlegung des Proteins kaum mehr sichtbar. Stattdessen waren größere Banden als die des ursprünglichen Proteins zu sehen. Sie entsprachen mit 50 kDa, 75 kDa und 150 kDa einem Vielfachen des Ausgangsproteins. Unter nativen Bedingungen könnte man vermuten, dass es sich um eine Komplexierung des Fragmentes handelt. Da der Versuch aber unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde, ist dieses Verhalten nicht zu erklären.

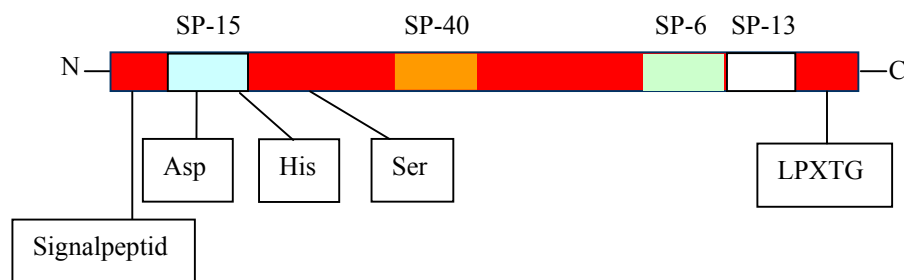


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Lage der Fragmente SP-15, SP-40, SP-6 und SP-13 im PrtA-Protein.

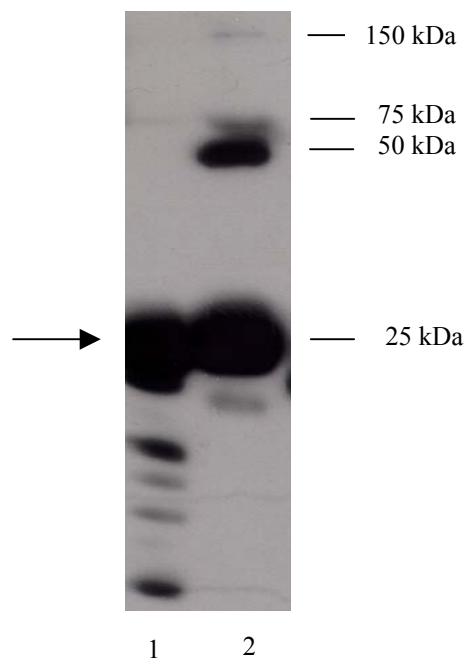


Abbildung 24: Darstellung des rechromatographierten Fragments Sp-15 (Spur 2) auf einem Röntgenfilm nach SDS-PAGE und Westernblot. Der Pfeil markiert die aus dem Gel ausgeschnittene Proteinbande.

3.6 Untersuchung der Maturierungsstelle durch N-terminale Sequenzierung des 215 kDa Proteins

Um herauszufinden, wie die Maturierung des PrtA erfolgt, wurde Kulturüberstand der LPXTG-defizienten His-Tag Mutante (SP-107), in Cden-Medium angezogen, eingengt (2.9.3) und das PrtA affinitätschromatographisch aufgereinigt (2.9.4). Nach Dialyse und erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurde die auf PVDF-Membran übertragene PrtA-Bande bei 215 kDa N-terminal sequenziert. Trotz mehrmaliger Versuche ließ sich vom PrtA keine auswertbare Sequenzfolge des N-Terminus des PrtA erhalten. In Abbildung 25 ist das Ergebnis einer Sequenzierung dargestellt. Der N-Terminus des Proteins schien blockiert zu sein.

Sequenz:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
?	P	L	E?	E?	?	S??	V	S??	?	
	1.7	0.8	+0.2	+0.3			0.1			pmol
							I			
							0.2			

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
?	?	?	?	?						
										pmol

Abbildung 25: Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung der 215 kDa-Bande des PrtA.

3.7 Vergleich von Autoprozessierungsstellen mit der PrtA-Sequenz

Da eine N-terminale Sequenzierung keinen Aufschluss über eine mögliche Prozessierungsstelle brachte, wurden die bei anderen Proteinen bekannten Prozessierungsschnittstellen (1.2.2) mit der PrtA-Sequenz der LPXTG-defizienten His-Tag Mutante (SP-107) über die DNASTAR 4.0 Software (DNASTAR Inc., USA) verglichen. Folgende theoretische Schnittstellen wurden bei PrtA gefunden: VAA, VVA, GES und VTA. Die Positionen der Schnittstellen in der Aminosäuresequenz des PrtA sind in Abbildung 26 dargestellt. 16 Fragmente sind insgesamt möglich (Tab. 16). Die Größenangaben beziehen sich auf die AS-Sequenz bis zu der Position an der die eingefügte Erythromycinkassette der LPXTG-defizienten His-Tag Mutante zum Translationsstop führt. In das Molekulargewicht und den pI der einzelnen Fragmente wurden die sechs angehängten Histidine mit einbezogen. Nicht alle der möglichen Fragmente würden auf einem Westernblot mit dem PrtA-Antiserum dargestellt werden können, da das Antiserum gegen einen C-terminalen Bereich gerichtet ist (Abb. 26). Es kommen sechs Fragmente in Frage, die auf einem Blot dargestellt werden könnten. Diese Fragmente haben Molekulargewichte von ungefähr 1 kDa, 148 kDa, 149 kDa, 158 kDa, 184 kDa und 185 kDa. Ein Vergleich dieser PrtA-Fragmente mit den Spots auf einem zweidimensional aufgetrennten aufgereinigten PrtA, lässt die Fragmente mit den Molekulargewichten um die 180 kDa möglich erscheinen. Nach Einbeziehen des pI-Wertes, scheinen die Schnittstellen GES und VTA im PrtA an einer Autoprozessierung beteiligt zu sein.

VVA		GES		VAA		VVA		SP-6		VTA	
AS	AS	AS	AS	AS	AS	1572 - 1877		AS		AS	
401-	461-	701-	781-							2089-	
403	463	703	783							2091	

Abbildung 26: Schematische Darstellung der Schnittmotive in der AS-Sequenz des PrtA und des Bereichs, gegen den das PrtA-Antiserum gerichtet ist (SP-6). Angegeben sind die Positionen, an denen die Motive zu finden sind.

Tabelle 16: Mögliche Fragmente nach dem Schneiden der PrtA-Sequenz von der LPXTG-defizienten His-Tag Mutante SP-107 an den Schnittmotiven VVA, VAA, GES und VTA.

Schnittmotiv	Position	Größe [kDa]	pI
VVA	AS 1-403	44,8	5,47
	AS 404-783	42,1	8,81
	AS 784-2101*	149,2	5,76
VAA	AS 1-703	78,0	5,67
	AS 704-2101*	158,1	6,0
GES	AS 1-463	51,0	5,39
	AS 464-2101*	185,1	6,12
VTA	AS 1-2091	234,9	5,78
	AS 2092-2101*	1,3	6,96
VVA / GES	AS 404-463	6,3	4,8
VVA / VAA	AS 404-703	33,2	6,44
VVA / VTA	AS 784-2091*	148,0	5,59
GES / VAA	AS 464- 703	27,0	8,52
GES / VTA	AS 464-2091*	183,8	5,59
VAA / VTA	AS 704-2091*	157,0	5,84
VAA / VVA	AS 704-783	8,8	9,91

* Mit dem PrtA-Antiserum auf einem Blot darstellbar.

3.8 Einfluss von verschiedenen Kulturbedingungen auf die Expression von PrtA

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Substanzen auf die PrtA-Expression wurden verschiedene Medien unterschiedlichen atmosphärischen Bedingungen ausgesetzt bzw. jeweils eine Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt und die PrtA-Expression von *S. pneumoniae* D39 im Gesamtzelllysat bestimmt. Die Analyse erfolgte auf translationaler Ebene mittels Westernblot wie auf transkriptionaler Ebene mittels Real-Time PCR.

3.8.1 Darstellung der Expression von PrtA mittels Westernblot-Analysen

Aufgetragen wurden gleiche Gesamtproteinmengen, abgeschätzt aufgrund von zuvor durchgeführter PAGE und anschließender Färbung mit Coomassie.

Zur Optimierung der Kulturbedingungen in bezug auf die PrtA-Expression wurde zunächst ein Vergleich der einzelnen Nährmedien (THY und BHI) bei unterschiedlichen atmosphärischen Bedingungen durchgeführt. Die PrtA-Expression war bei Wachstum der Kultur in BHI höher als in THY, sowie in mit 5 % CO₂-angereicherter Atmosphäre höher als unter anaeroben Bedingungen bzw. bei Raumluft. Abbildung 27 zeigt den Vergleich zwischen der PrtA-Expression in BHI und THY bei Kultivierung der Pneumokokken bei 5 % CO₂. Es war ein deutlicher Unterschied zu sehen. Für die weiteren Versuche wurde daher BHI verwendet und die Kulturen bei 5 % CO₂ kultiviert.

Bei Zusatz von Glukose, Hefeextrakt, Pepton oder Pyruvat zu BHI wurde bei Pyruvat- und Glukose-Zusatz zum Medium eine Herabsetzung der PrtA-Expression im Gesamtzelllysat festgestellt (Abb. 28 und 29).

Bei Zugabe verschiedener Aminosäuren zum Medium wurde bei einigen Aminosäuren eine veränderte PrtA-Expression ermittelt (Abb. 30). Bei höherer Konzentration von Isoleucin im Medium verringerte sich die PrtA-Expression, im Vergleich der beiden Ansätze mit unterschiedlichen Aminosäurekonzentrationen zueinander. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei Zugabe von Cystein und Alanin zum Medium. Die PrtA-Expression nahm bei hinzugefügter höherer Konzentration der Aminosäuren ab. Die Aminosäure Asparagin hingegen schien bei niedrigeren Konzentrationen der Aminosäure auch eine niedrigere PrtA-Expression zu haben.

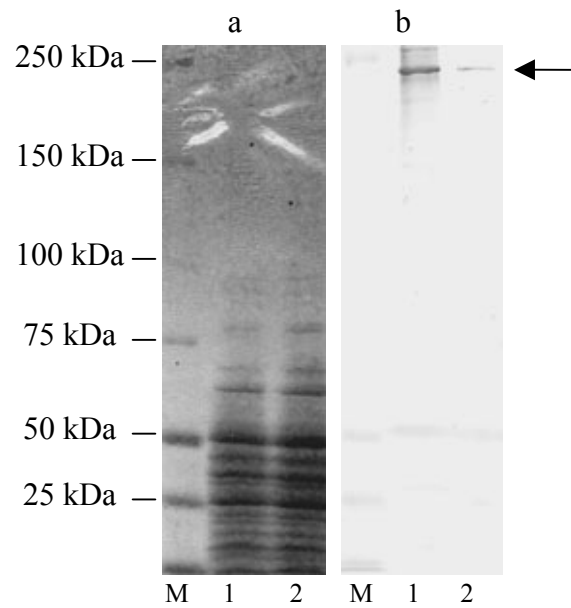


Abbildung 27: Vergleich eines Coomassiegefärbten SDS-Gels (a) mit einem Westernblot (b). Aufgetragen wurden 10 μ l Gesamtzelllysat einer Pneumokokken-Kultur gewachsen unter 5 % CO_2 in BHI (Spur 1) und in THY (Spur 2). Die PrtA-Banden sind auf dem Westernblot markiert. M, Molekulargewichtsmarker.

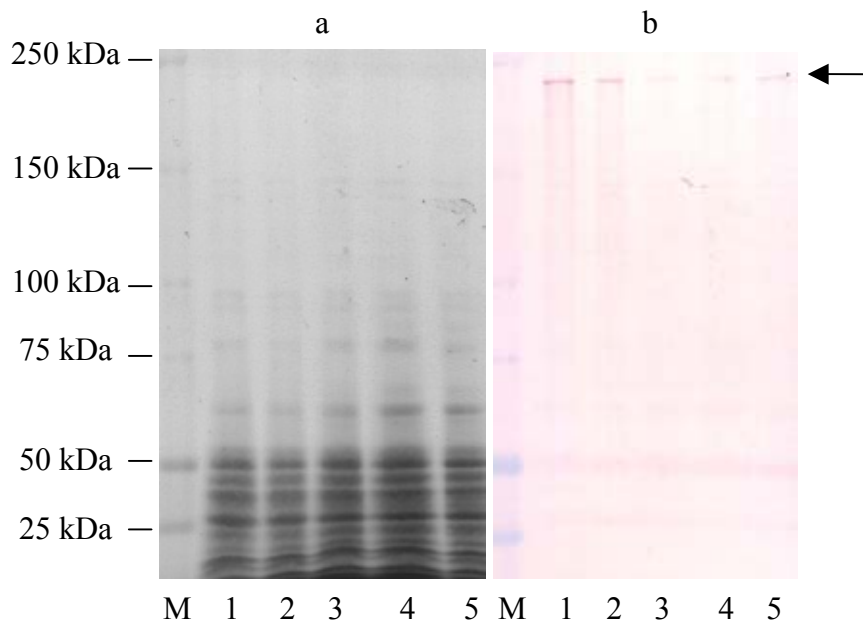


Abbildung 28: Vergleich Coomassiegefärbtes Gel (a) mit einem entsprechenden Westernblot (b). Aufgetragen wurden 10 μ l Gesamtzelllysat einer Kultur gewachsen in BHI unter 5 % CO_2 mit Zusatz von 0,025 % Pyruvat (Spur 1), 0,05 % Pyruvat (Spur 2), 0,1 % Pyruvat (Spur 3), 0,2 % Pyruvat (Spur 4) und 0,5 % Pyruvat (Spur 5). Die PrtA-Banden sind markiert. M, Molekulargewichtsmarker.

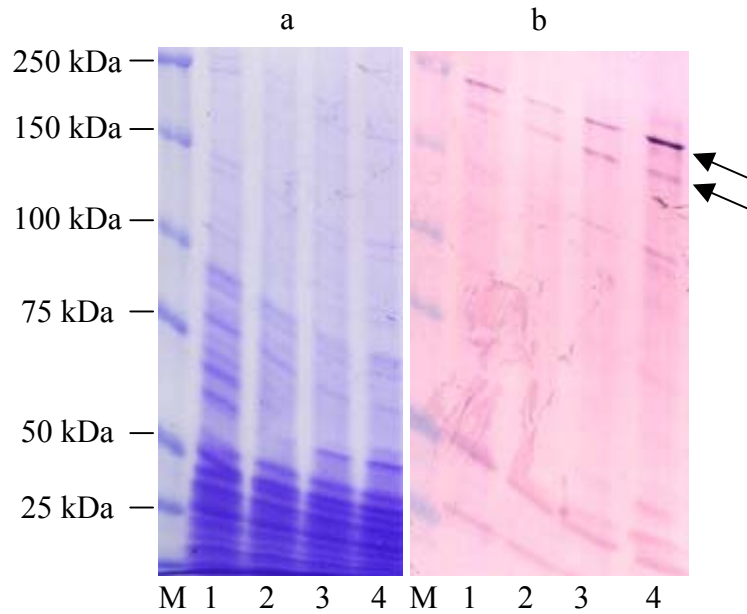


Abbildung 29: Vergleich Coomassie-gefärbtes Gel (a) mit einem entsprechenden Westernblot (b). Aufgetragen wurden 10 μ l Gesamtzelllysat einer Kultur gewachsen in BHI unter 5 % CO_2 mit Zusatz von 0,1 % Glukose (Spur 1), 0,2 % Glukose (Spur 2), 0,5 % Glukose (Spur 3) und ohne zusätzliche Glukose (Spur 4). Die PrtA-Banden sind markiert. M, Molekulargewichtsmarker.

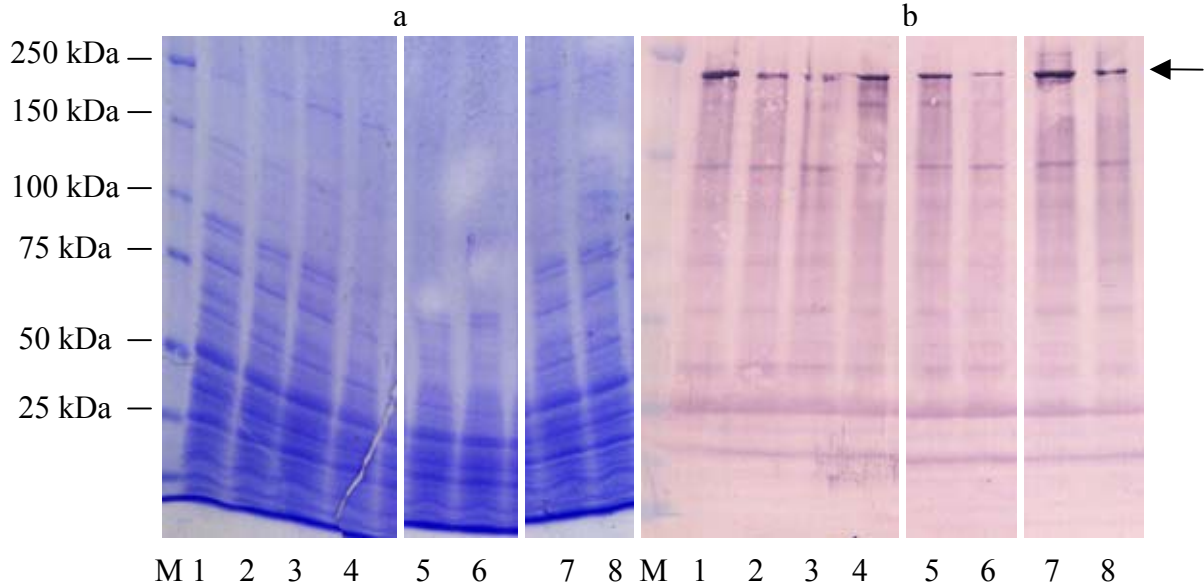


Abbildung 30: Vergleich Coomassie-gefärbtes Gel (a) mit einem entsprechenden Westernblot (b). Aufgetragen wurden 10 μ l Gesamtzelllysat einer Kultur gewachsen in BHI unter 5 % CO_2 mit Zusatz von 5 μ M Isoleucin (Spur 1), 15 μ M Isoleucin (Spur 2), 5 μ M Asparagin (Spur 3), 15 μ M Asparagin (Spur 4), 5 μ M Cystein (Spur 5), 15 μ M Cystein (Spur 6), 5 μ M Alanin (Spur 7) und 15 μ M Alanin (Spur 8). Die PrtA-Banden sind markiert. M, Molekulargewichtsmarker.

3.8.2 Darstellung der Expression von PrtA mittels Real-Time-Analyse

Durch RNA-Aufreinigung, reverse Transkription und Real-Time PCR ist es möglich ein gutes Gen-Expressionsprofil des Organismus zu erhalten. Mit Hilfe eines internen Standards (LDH) ließ sich bei einer Real-Time PCR die relative Transkriptionsrate des *prtA*-Gens bestimmen (Abb. 31 und Abb. 32). Die Transkriptionsrate war höher bei Inkubation der Bakterien in mit 5 % CO₂ angereicherter Atmosphäre, als bei Anzucht bei Raumluft oder anaerob (Abb. 31). Bei Zugabe von Glukose zum Medium ergab sich eine höhere Transkriptionsrate des *prtA*-Gens bei zusätzlichen 0,1 % und 0,2 % Glukose im Vergleich zu der Transkriptionsrate bei Wachstum von *S. pneumoniae* R6 in BHI-Medium ohne weiteren Zusatz (Standardbedingungen). Die Transkriptionsrate nahm jedoch erheblich bei dem Ansatz mit 0,5 % zugesetzter Glukose im Vergleich zu dem Ansatz unter Standardbedingungen ab (Abb. 32).

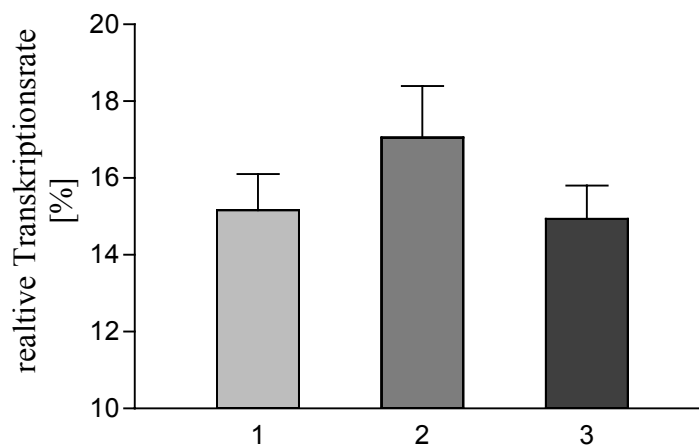


Abbildung 31: Relative Transkriptionsrate des *prtA*-Gens in Prozent nach Wachstum bei Raumluft (1), nach Wachstum unter Standardbedingungen (BHI, 5 % CO₂) (2) und nach Wachstum unter anaeroben Bedingungen (3).

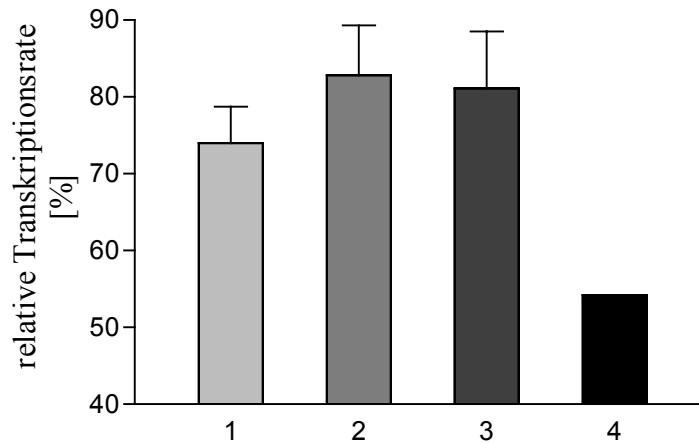


Abbildung 32: Relative Transkriptionsrate des *prtA*-Gens in Prozent unter Standardbedingungen (BHI, 5 % CO₂) (1), nach Wachstum mit zugesetzten 0,1 % Glukose zu BHI (2), nach Wachstum mit zugesetzten 0,2 % Glukose zu BHI (3) und nach Wachstum mit zugesetzten 0,5 % Glukose zu BHI (4).

3.9 Untersuchung der Enzymaktivität von PrtA

Bisherige Untersuchungen zur Proteaseaktivität von PrtA mit Kasein als Substrat ergaben zwar einen Abbau des Substrates, dieser war jedoch nur relativ gering und mit den gewählten Methoden schwierig darstellbar [18]. Es wurde zunächst versucht, die bisher beschriebene Proteaseaktivität zu reproduzieren, um den Abbau weiterer Substrate untersuchen zu können. Die Aktivität von PrtA wurde zunächst mit nativen Polyacrylamidgelen mit eingegossenem Kasein durch Auftropfen von eingengtem Überstand gegen eine Positiv-Kontrolle (Trypsin) untersucht. Nach Anfärbung der Proteine im Gel wurden die entstandenen Abbauhöfe ausgewertet. Sowohl Kasein als auch Gelatine wurden von Proteasen im Überstand abgebaut (Abb. 33). Bei Verwendung von Kollagen oder Fibronectin als Substrat, war keinerlei Abbau zu erkennen. Die Bestimmung der Proteaseaktivität mittels nativer Gele ließ sich zwar nicht immer, aber doch sehr oft reproduzieren.

Um die beobachtete Proteaseaktivität PrtA zuordnen zu können, wurden Zymogramme verwendet. Ein natives elektrophoretisch aufgetrenntes Polyacrylamidgel mit eingegossenem Kasein ließ, nach Färbung der Proteine mit Coomassie, am entstandenen Lysehof einen Abbau des Kaseins erkennen. Ein parallel angefertigter Westernblot mit einem Anti-PrtA-Serum zeigte, dass PrtA in dem Bereich des Lysehofes zu finden war und damit für den

Abbau des Kaseins in Frage kam (Abb. 34). Auf eine Positivkontrolle wurde in diesem Versuch verzichtet, da das PrtA so groß ist, dass es beim Lauf auf einem nativen Gel gerade in das Trenngel gelaufen wäre, wenn das Trypsin bereits kurz vor dem Verlassen des Gels gewesen wäre.

Da native Gele schwer zu handhaben sind, vor allem mit derartig großen Proteinen wie dem PrtA wurden weiterhin SDS-Polyacrylamidgele mit eingegossenem Substrat herangezogen, bei denen nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung der Proteine das SDS entfernt, und die Proteasen durch Wärmeeinwirkung aktiviert wurden. Der Abbau des Kaseins zeigte sich an einem entstandenen Abbauhof im Bereich von 240 kDa (Abb. 35). Die Höhe des Abbauhofes im Gel entspricht der Größe des PrtA. Das Zymogramm ließ sich nicht reproduzieren.

Die Aktivitätsbestimmungen wurden nur mit eingengtem Überstand durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt aufgereinigtes Protein oder eine über ortsspezifische Mutagenese hergestellte PrtA-defiziente Mutante fehlten. Nach Fertigstellung der Mutanten und Aufreinigung von PrtA wurden die Versuche wiederholt, blieben jedoch, auch mit eingengtem Überstand, erfolglos.

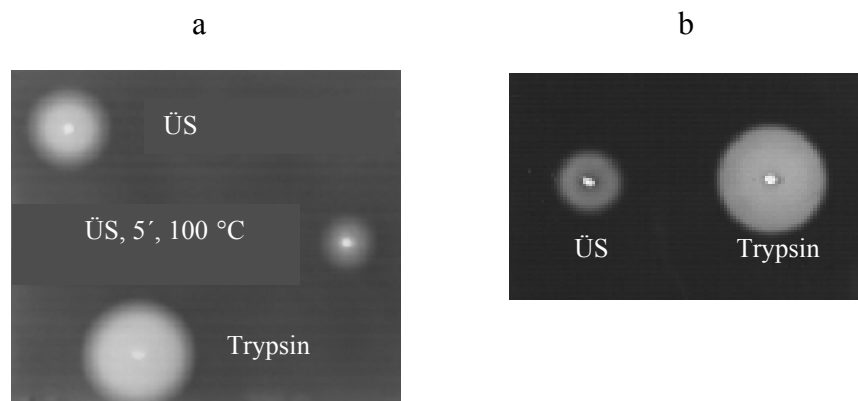


Abbildung 33: Native mit Coomassie gefärbte Gele mit durch Abbau von Kasein (a) und Gelatine (b) entstandenen Lysehöfen nach Auftropfen von je 10 µl des Überstandes (ÜS) bzw. einer Positivkontrolle (Trypsin).

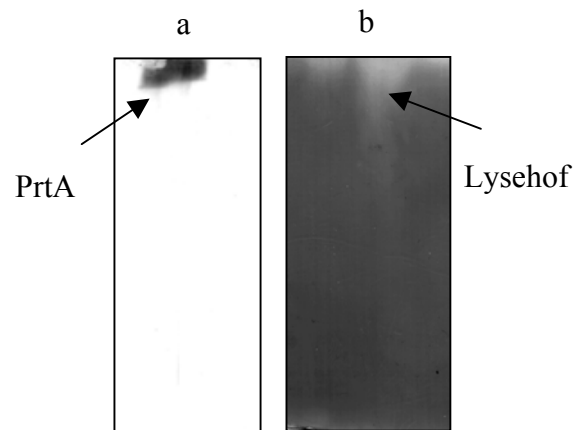


Abbildung 34: Westernblot mit polyklonalem Anti-PrtA-Serum von einem nativen Gel mit aufgetragenem eingengten Überstand und eingegossenem Kasein (a). Coomassiegefärbtes natives Gel mit Kasein als Substrat. Der Abbau des Substrates war an der verminderten Anfärbung mit Coomassie zu erkennen (b).

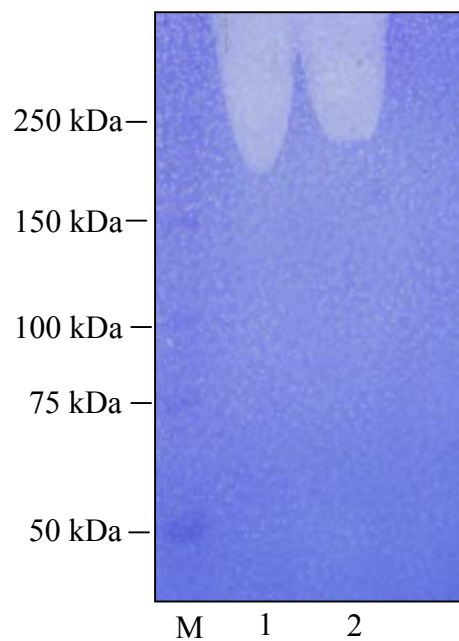


Abbildung 35: Zymogramm mit Kasein als Substrat. Aufgetragen wurde eingengter Überstand, 15 μ l (Spur 1) und 10 μ l (Spur 2). M, Molekulargewichtsmarker.

3.10 Bindungseigenschaften des PrtA an extrazelluläre Matrixbestandteile

Einige Pneumokokken-Stämme sind in der Lage an extrazelluläre Matrixproteine, wie Fibronectin und Kollagene zu binden. Um erste Hinweise zu erhalten, ob PrtA eine Rolle bei der Bindung an Matrixproteine spielt, wurde eingengter Überstand der LPXTG-defizienten Mutante (SP-104) für Dot-Blots eingesetzt. Zu dem Zeitpunkt dieser Versuche lag weder aufgereinigtes PrtA, noch eine über ortsspezifische Mutagenese hergestellte PrtA-defiziente Mutante vor. Nach Bindung von Matrixproteinen an eine Membran, Auftropfen von eingengtem Überstand und Entwicklung mit einem spezifischen PrtA-Antiserum, war eine leichte Bindung an Kollagen I zu erkennen. Je niedriger die Konzentration des Kollagens, desto geringer war die Bindung (Abb. 36). Bei Verwendung von Kollagen III und IV, Gelatine und Fibronectin wurde keine Bindung von PrtA an die jeweiligen Proteine nachgewiesen.

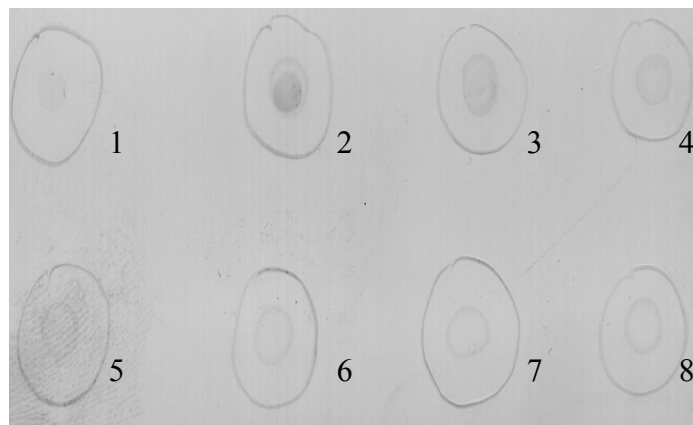


Abbildung 36: Dot-Blotanalyse von eingengtem Überstand von SP-107 mit dem Anti-PrtA-Serum. Aufgetragen wurden je 10 µl Lösungen von Kollagen I der Konzentrationen 10 mg/ml (Dot 1 und 2), 5 mg/ml (Dot 3), 0,2 mg/ml (Dot 4), 0,1 mg/ml (Dot 5), 0,02 mg/ml (Dot 6) und 0,01 mg/ml (Dot 7). Auf jedes der Felder (Dot 2 - 8) wurde die gleiche Menge aufgereinigtes PrtA aufgetragen. Dot 1 und 8 dienten als Negativkontrollen.

Nach Fertigstellung einer durch ortsspezifische Mutagenese hergestellten PrtA-defizienten Mutante (SP-111), wurden die durch Dot-Blots erhaltenen Ergebnisse durch Bindungsassays mit FITC-markierten Pneumokokken des Stammes R6 und SP-111 überprüft. Mit Matrixproteinen beschichtete Objektträger wurden mit FITC-markierten Pneumokokken behandelt und die Bindung unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Die Bindung der Pneumokokken an Fibronectin diente als Bindungskontrolle. Bekannt ist, dass Pneumokokken gut an Fibronectin binden [48]. Eine Bindung der Pneumokokken an Fibronectin erfolgte unabhängig vom PrtA, so dass sowohl der R6-Stamm als auch die PrtA-defiziente Mutante an Fibronectin gebunden hatte (Abb. 38). Im Vergleich zur Positivkontrolle (Fibronectin) und zur Negativkontrolle (PBS) (Abb. 37) zeigten die Stämme eine Bindung an Kollagen I (Abb. 40), III (Abb. 41) und Gelatine (Abb. 39). Es war kein Unterschied im Bindungsverhalten von Wildtyp und der PrtA-defizienten Mutante zu erkennen. Es gab damit keinen Hinweis auf eine Beteiligung von PrtA an der Bindung von Komponenten aus der extrazellulären Matrix. Bei Verwendung von Kollagen IV als Matrix zeigte sich bei einem von drei Versuchen ein Unterschied in der Bindung zwischen Wildtyp und PrtA-defizienter Mutante. Die Mutante hat in dem Fall stärker an Kollagen IV gebunden als der Wildtyp-Stamm R6, der so gut wie keine Bindung zeigte (Abb. 42).

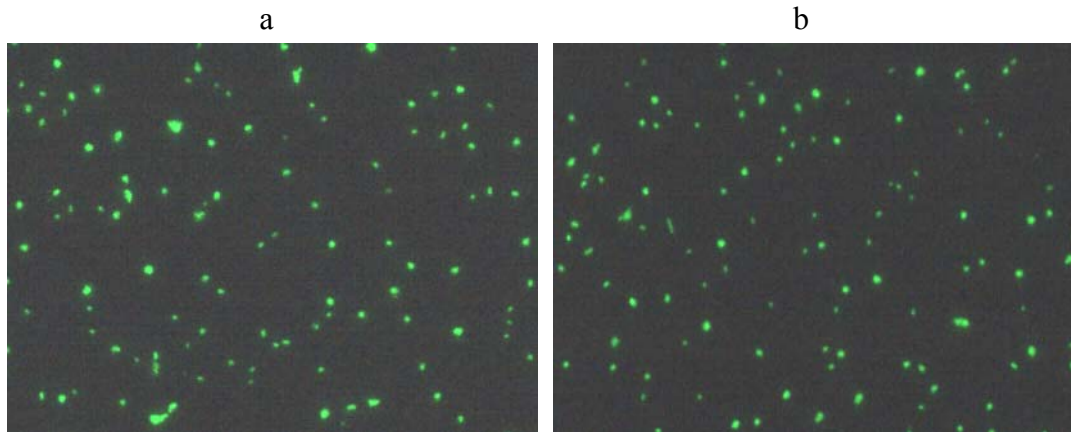


Abbildung 37: Immunfluoreszenzanalyse der Bindung von Stamm R6 (a) und der PrtA-defizienten Mutante SP-111 (b) bei Verwendung von PBS.

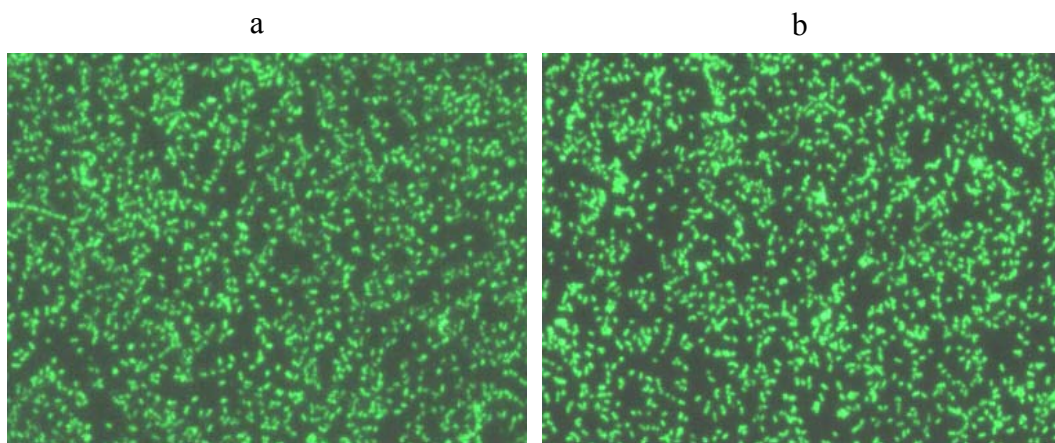


Abbildung 38: Immunfluoreszenzanalyse der Bindung von Stamm R6 (a) und der PrtA-defizienten Mutante SP-111 (b) an Fibronectin.

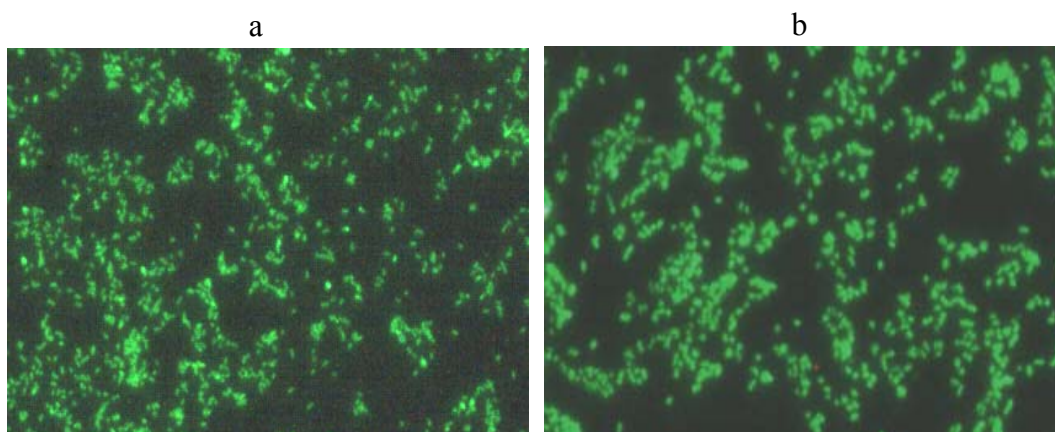


Abbildung 39: Immunfluoreszenzanalyse der Bindung von Stamm R6 (a) und der PrtA-defizienten Mutante SP-111 (b) an Gelatine.

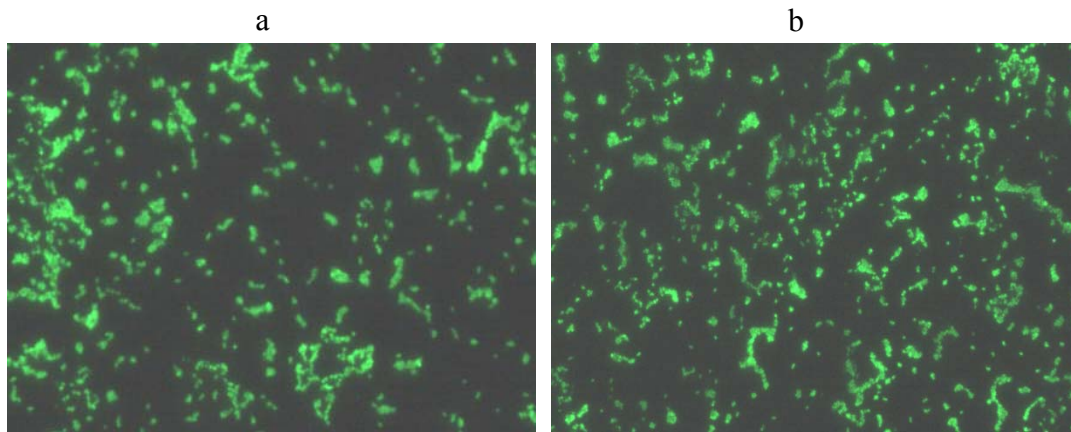


Abbildung 40: Immunfluoreszenzanalyse der Bindung von Stamm R6 (a) und der PrtA-defizienten Mutante SP-111 (b) an Kollagen I.

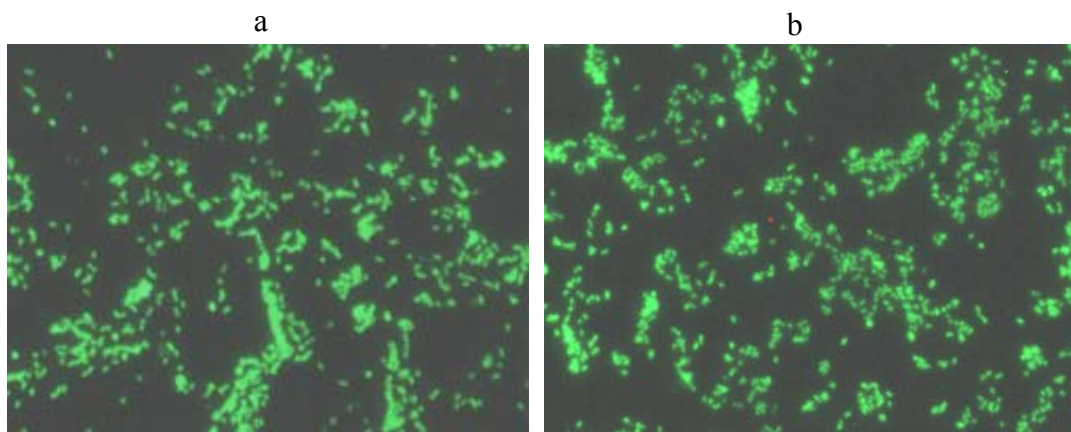


Abbildung 41: Immunfluoreszenzanalyse der Bindung von Stamm R6 (a) und der PrtA-defizienten Mutante SP-111 (b) an Kollagen III.

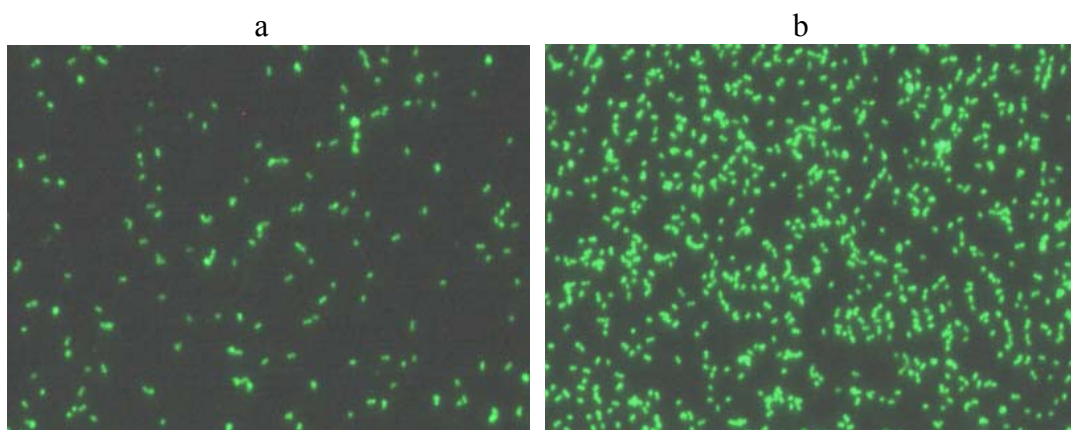


Abbildung 42: Immunfluoreszenzanalyse der Bindung von Stamm R6 (a) und der PrtA-defizienten Mutante SP-111 (b) an Kollagen IV.

3.11 Vergleich des Protein-Expressionsprofils von Wildtyp und PrtA-defizienter Mutante

Um herauszufinden, ob PrtA auf andere Proteine einen Einfluss ausübt, wurden zweidimensionale Gelelektrophoresen durchgeführt. Die Gele einer Fokussierung und anschließender elektrophoretischer Auftrennung des Gesamtzelllysats von dem Wildtyp R6 und der PrtA-defizienten Mutante SP-91 sind in Abbildung 43 dargestellt. Auswertungen der Gele mit dem Computerprogramm PDQuest (Bio-Rad, München) ergaben keine signifikanten Unterschiede in den Spotmustern der beiden Stämme. Bei der Fokussierung des Gesamtzelllysats waren nicht alle Proteine gut aufgetrennt, so dass eine Auswertung sehr schwierig war (Abb. 43). Von dem zweidimensional aufgetrennten Gesamtzelllysat wurde ein Westernblot angefertigt und die mit dem Patientenserum 3.S.4 dargestellten Spots miteinander verglichen (Abb. 44). Auf dem Blot ist eine leichte Verschiebung des umkreisten Spots bei der PrtA-defizienten Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu einem höheren isoelektrischen Punkt zu sehen. Auf dem entsprechenden Gel ist der Spot nicht zu erkennen, so dass eine Identifizierung des Proteins noch nicht möglich war. Um festzustellen, ob es sich bei dem durch PrtA modifizierten Protein um ein Membranprotein handelt, wurde Gesamtzelllysat ultrazentrifugiert und die Membranfraktion zweidimensional aufgetrennt. Das 2-D Gel wurde geblottet und mit dem Patientenserum 3.S.4 inkubiert (Abb. 45). Es ergab sich das gleiche Bild, wie bei der Auftrennung des Gesamtzelllysats. Der 29 kDa-Spot war bei der PrtA-defizienten Mutante zu einem höheren isoelektrischen Punkt verschoben. Es darf bei der Analyse der 2-D Gele jedoch nicht vergessen werden, dass diese mit der Knock-out Mutante SP-91, einer durch Insertions-Duplikations-Mutagenese hergestellten Mutante, durchgeführt wurde. Es können möglicherweise Sekundäreffekte auftreten. Die über ortsspezifische Mutagenese erzeugte PrtA-defiziente Mutante SP-111 lag zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor.

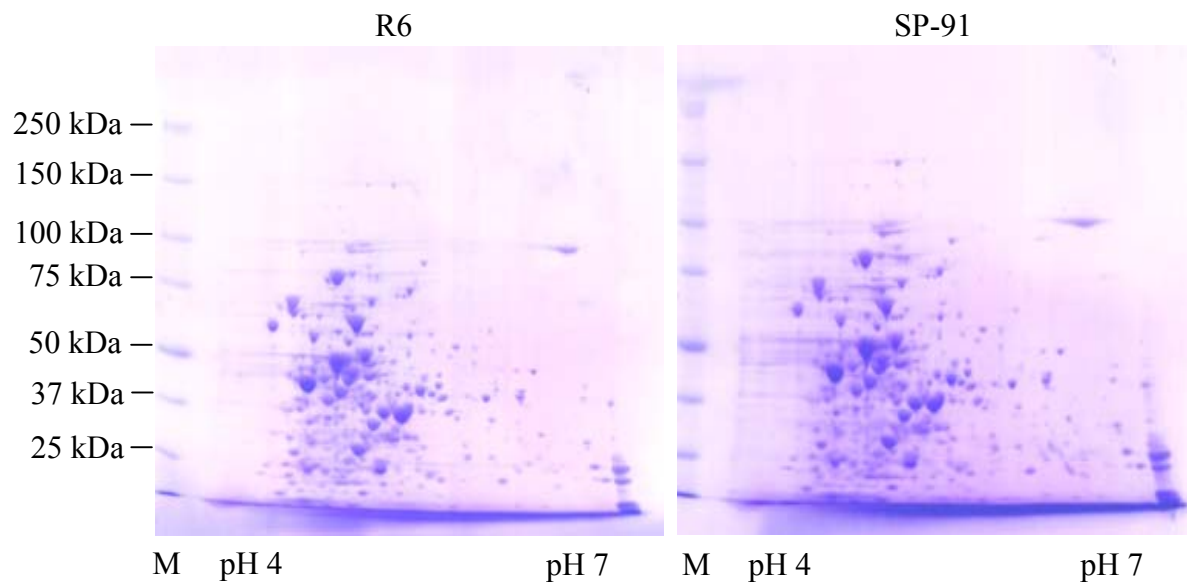


Abbildung 43: 2-D Gel-Vergleich von 4,5-12 %igen Gelen zwischen dem Wildtyp R6 und der PrtA-defizienten Mutanten SP-91. Fokussiert wurde Gesamtzelllysate auf 13 cm IPG-Streifen.

M, Molekulargewichtsmarker.

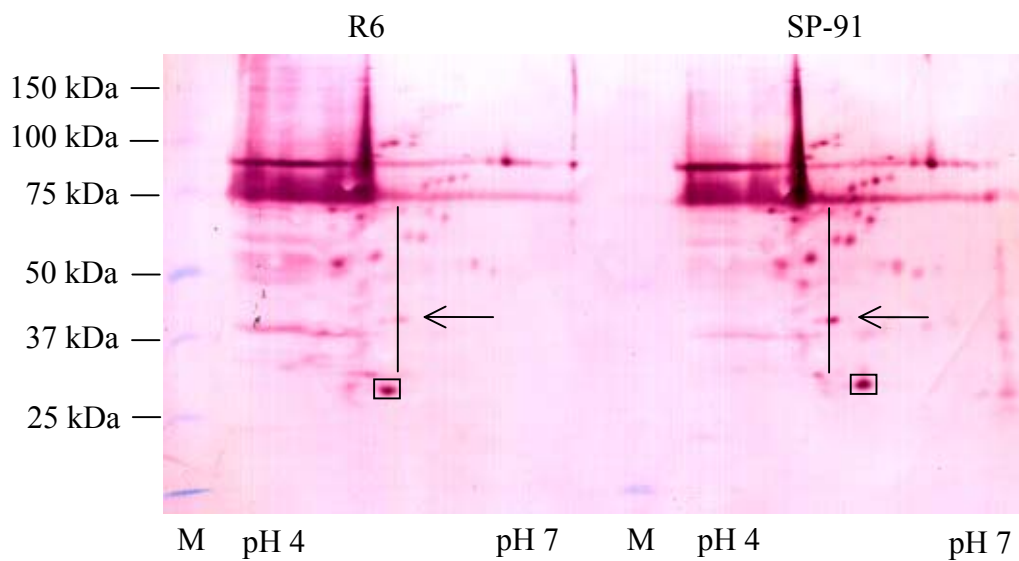


Abbildung 44: Westernblot-Analyse von zweidimensional aufgetrenntem Gesamtzelllysate von *S. pneumoniae* mit dem Patientenserum 3.S.4. Detektiert wurden Spots des Wildtyps R6 und der Knock-out Mutanten SP-91. Die gezogene Linie, ausgerichtet an dem durch den Pfeil markierten Spot, dient als Orientierungshilfe. Der verschobene Spot ist jeweils markiert. M, Molekulargewichtsmarker.

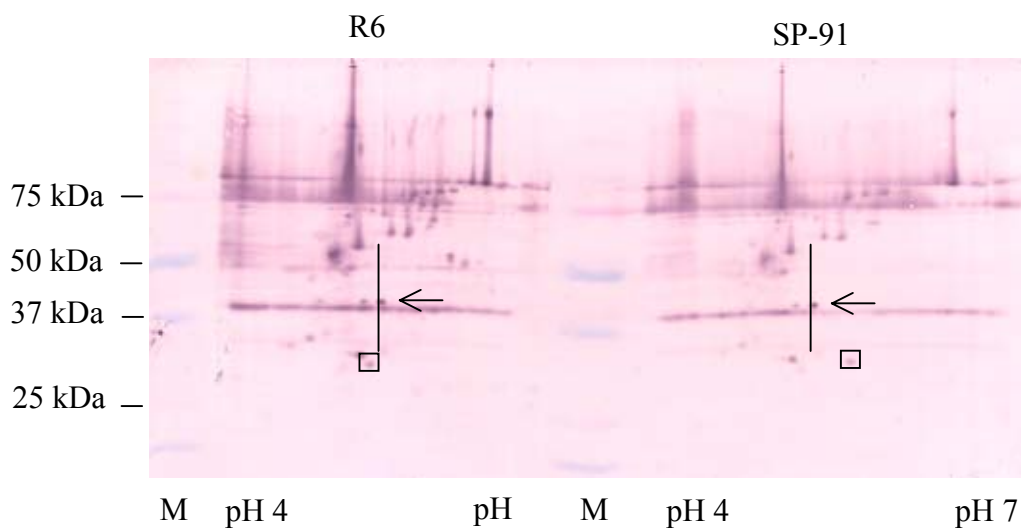


Abbildung 45: Westernblot-Analyse von einer zweidimensional aufgetrennten Membranfraktion von *S. pneumoniae* mit dem Patientenserum 3.S.4. Detektiert wurden Spots des Wildtyps R6 und der Knock-out Mutanten SP-91. Es handelt sich um ein 9,5-20 %iges SDS-Gel. Die gezogene Linie, ausgerichtet an dem durch den Pfeil markierten Spot, dient als Orientierungshilfe. Der verschobene Spot ist jeweils markiert. M, Molekulargewichtsmarker.

3.12 Sequenzanalysen des PrtA-Proteins

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von PrtA mit der anderer Proteine hat die in Tabelle 17 aufgeführten, zu dem gegenwärtigen Zeitpunkt, homologen Proteine ergeben. Neben homologen Proteinen von Streptokokken, Laktokokken und Laktobazillen zeigten auch Proteine von *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Oceanobacillus iheyensis* und *Bacillus*-Arten Ähnlichkeiten zu PrtA. Die Homologie von PrtA zu anderen Proteasen ist dabei auf den Bereich der katalytischen Domänen des Proteins beschränkt.

Eine phylogenetische Analyse zeigte keine näheren Verwandtschaftsverhältnisse von PrtA zu einem der homologen Proteine (Abb. 46).

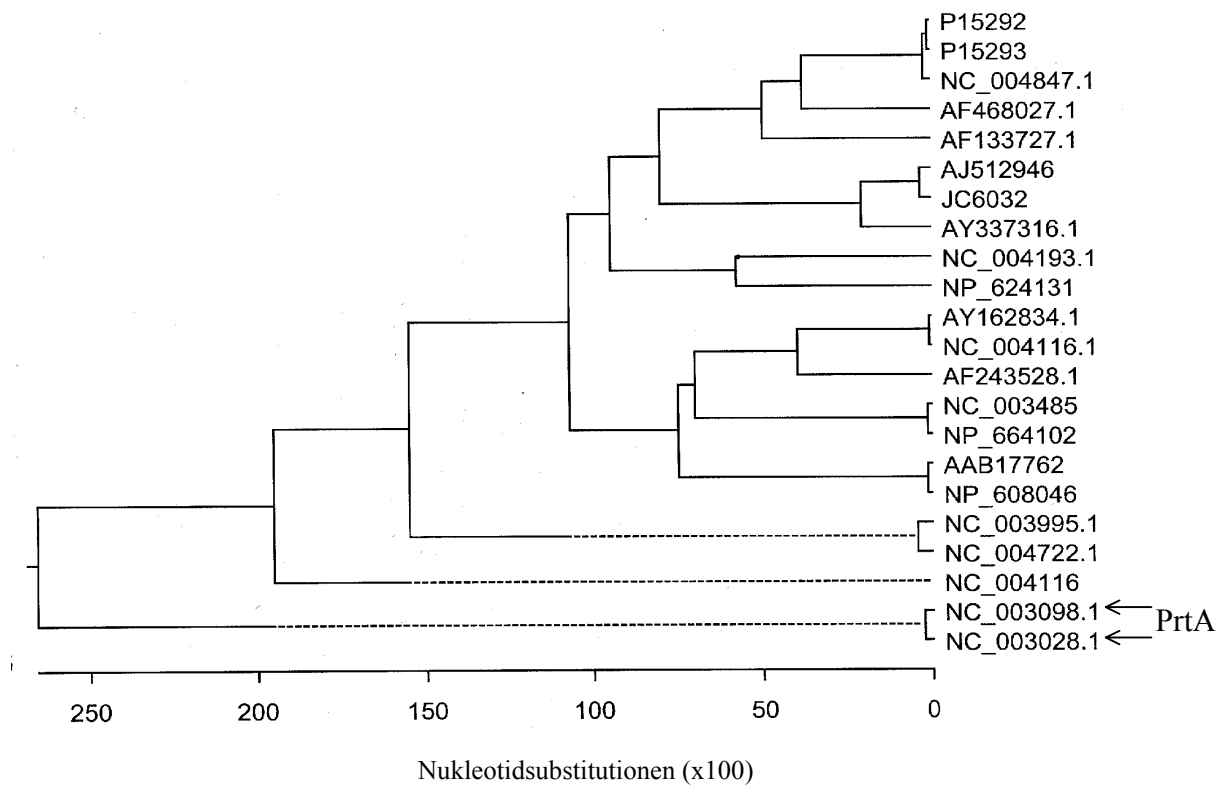


Abbildung 46: Stammbaum basierend auf dem Vergleich der AS-Sequenz von PrtA und den homologen Proteinen. Angegeben sind die Accession-Nummern der Proteine (Tab. 17).

NC_003098.1, PrtA von *S. pneumoniae* R6. NC_003028.1, PrtA von *S. pneumoniae* TIGR4.

Tabelle 17: Auswahl homologer Proteine zu PrtA

Accession-Nr	Protein	Organismus	Referenz
NP_624131	Subtilisin-ähnliche Serinprotease (AprE3),	<i>Thermoanaerobacter</i> <i>tengcongensis</i> MB4(T)	[8]
NC_004847.1	PrtP Vorläufer	<i>Lactococcus lactis</i> subspec. <i>cremoris</i>	[35]
P15292	PIII-Typ Proteinase (Lactocepin)	<i>Lactobacillus paracasei</i>	[149]
P15293	Lactocepin	<i>Lactococcus lactis</i> subspec. <i>cremoris</i> SK11	[149]
NC_004193.1	Lactocepin (zellwand- assoziierte Serinproteinase)	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	[94]
AY162834.1	CspA	<i>Streptococcus agalactiae</i>	[63]
NC_004116.1	Serinprotease	<i>Streptococcus agalactiae</i> 2603V/R	[142]
AY337316.1	Proteinase	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subspec. <i>lactis</i>	
AF133727.1	PrtH	<i>Lactobacillus helveticus</i>	[111]
NC_003995.1	Peptidase_S8	<i>Bacillus anthracis</i> Ames	[117]
AF468027.1	Proteinase	<i>Lactobacillus pentosus</i>	
AF243528.1	Proteinase	<i>Streptococcus thermophilus</i>	[50]
NC_004722.1	Extrazelluläre Protease	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	[74]
NP_664102	Proteinase	<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS315/ SSI	[12]
JC6032	Lactocepin	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	[54]
NC_003485	Proteinase	<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS8232	[133]
AJ512946	Proteinase B	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	
NC_004116	Proteinase	<i>Streptococcus agalactiae</i> 2603V/R	[142]
AAB17762	C5a-Peptidase (ScpB)	<i>Streptococcus agalactiae</i>	[33]
NP_608046	C5a-Peptidase (ScpA)	<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS8232	[12]

Das Genom zweier *S. pneumoniae*-Stämme ist durchsequenziert und unter www.tigr.org einsehbar. Es handelt sich um die Stämme TIGR4 und R6. Ein Vergleich der stromabwärts vom *prtA* gelegenen Region zeigte einen Unterschied zwischen den beiden Pneumokokken-Stämmen (Abb. 47). Im TIGR4-Genom befinden sich zwischen dem *prtA* und den Komponenten des Phosphotransferasesystems (PTS) drei eingeschobene Insertionssequenzen. Diese Insertionssequenzen fehlen im R6-Genom.

Ein Vergleich der stromabwärts gelegenen Regionen der homologen Proteine der von dem Institut of Genomic Research (TIGR) (www.tigr.org) sequenzierten Bakteriengenome und des PrtA ergab keinerlei Ähnlichkeiten der Genumgebung der jeweiligen Protease zu PrtA (Abb. 47 und 48).

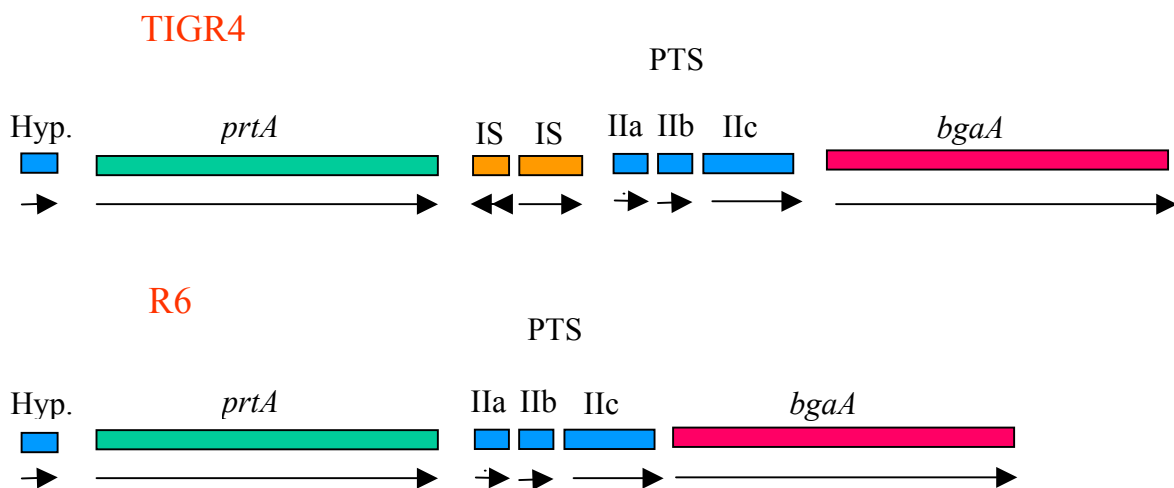


Abbildung 47: Vergleich des *prtA*-Genlocus von Stamm TIGR4 und R6. IS, Insertionssequenzen; PTS, Phosphotransferasesystem; *bgaA*, β -Galaktosidase-Gen.

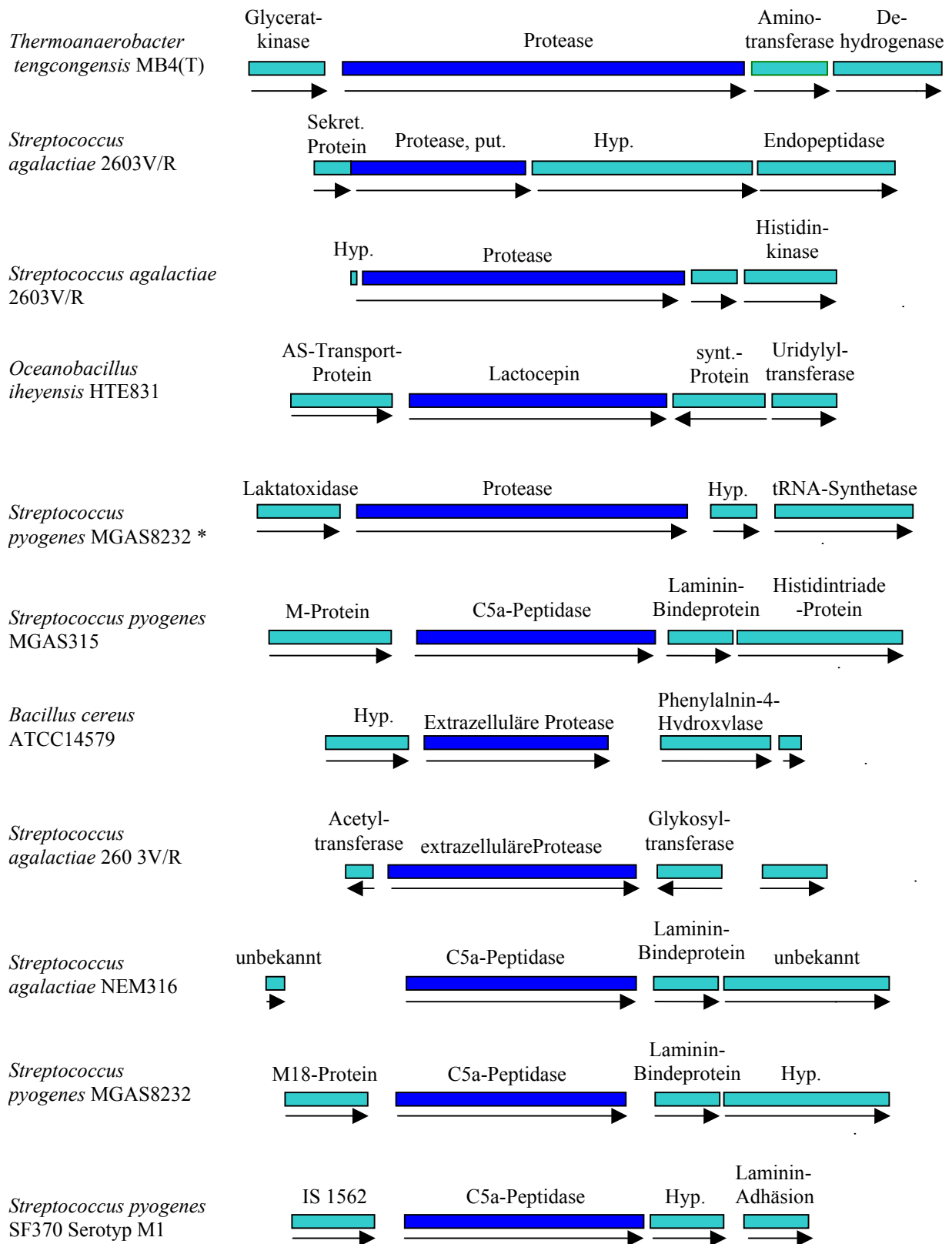


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Genumgebung einiger der zu PrtA homologen Proteasen. Hyp., hypothetisch; Put., putativ; Sekret., sekretiertes

* Stellvertretend für *S. pyogenes* MGAS315, *S. pyogenes* SF370 Serotyp M1 und *S. pyogenes* SSI-1

4 Diskussion

Streptococcus pneumoniae ist ein human-pathogenes Bakterium, das schwere Erkrankungen hervorrufen kann. Der genaue Mechanismus der Invasion und der Zerstörung von Gewebe des Wirtes ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene, vor allem oberflächenlokalisierte Proteine, spielen bei der Kolonisierung und Invasion des Wirtsgewebes eine Rolle.

Ein 2001 neu beschriebenes Protein von *S. pneumoniae* ist das PrtA. Es handelt sich um eine immunogene, oberflächenlokalisierte Serinprotease, die Homologien zu Proteasen in Laktokokken, Laktobazillen und Streptokokkenspezies aufweist [18]. Proteasen spielen eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von Nährstoffen, indem sie Proteine wie Albumin [90], Kollagen [62, 79], Komplementfaktoren [37], Speichelproteine [34] und Immunglobulin A1 [113] spalten. Auch sind sie an der Bindung an extrazelluläre Bestandteile beteiligt [63, 68].

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Serinprotease PrtA von *S. pneumoniae* aufgereinigt. Um eine Aufreinigung der zellwandverankerten Protease zu ermöglichen, wurde eine Mutante erzeugt, bei der die Protease ohne Verankerung in den Überstand abgegeben werden sollte. Erreicht wurde dies durch Insertion einer Erythromycinkassette 47 bp vor dem LPXTG-Motiv. Diese C-terminale Deletion sollte keinerlei Einfluss auf die Stabilität und Aktivität des Proteins haben. Bruinenberg *et al.* haben durch Deletionsversuche an der Serinprotease PrtP von *Lactococcus lactis* SK11 festgestellt, dass es bei zunehmender Deletion des C-Terminus zur Instabilität, Autoproteolyse und geringerer proteolytischer Aktivität des Proteins kommt. Bei Deletion lediglich des LPXTG-Ankers wurden jedoch keine Veränderungen des Proteins in Struktur oder Aktivität erhalten [25]. Mit Hilfe von Histidinen (His-Tag), die vor dem LPXTG-Motiv insertiert waren, konnte das Protein affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Bei einem Protein von 240 kDa Größe ist zu vermuten, dass dieses His-Tag kein Problem bei der Faltung darstellt, so dass Spezifität und Aktivität des Proteins nicht beeinträchtigt sein sollten. Das kann jedoch nur vermutet werden, da weder die Struktur noch die Funktion der Protease zum gegenwärtigen Zeitpunkt bekannt sind.

Eine Überprüfung der LPXTG-defizienten Mutante (SP-104) und der LPXTG-defizienten His-Tag Mutante (SP-107) auf die Oberflächenlokalisierung der Serinprotease PrtA mittels

FACScan Flow Cytometrie ergab, dass PrtA auf der Zelloberfläche der Pneumokokken vorhanden war, jedoch in geringerem Ausmaß, als beim Wildtyp. Aufgrund des fehlenden LPXTG-Motivs der Protease bei den Mutanten war zu vermuten, dass kein PrtA auf der Oberfläche detektiert werden kann. Wahrscheinlich wurde bei diesen Mutanten PrtA bei der Durchschleusung der Zellmembran auf der Oberfläche nachgewiesen. Auch war eine größere Proteinmenge auf der Zelloberfläche bei der LPXTG-defizienten Mutante SP-104 festzustellen als bei der LPXTG-defizienten His-Tag Mutante SP-107. Beide Mutanten unterscheiden sich lediglich durch die C-terminal angehängten Histidine. Vielleicht behindern die Histidine das Durchschleusen des Proteins durch die Zellmembran, so dass das Protein länger auf der Oberfläche verweilt und damit mehr Primärantikörper gebunden waren als bei Mutante SP-104.

Für die Herstellung der Mutanten wurde der kapsellose Stamm R6 verwendet. Ein Vergleich der FACS-Analysen zwischen dem unbekapselten R6 und dem bekapselten D39 zeigten interessanterweise einen deutlichen Unterschied in der Darstellbarkeit der Oberflächenlokalisierung von PrtA. Beim D39 war genauso viel PrtA auf der Oberfläche der Pneumokokken festzustellen, wie bei der PrtA-defizienten Mutante (SP-111). Der Stamm D39 ist jedoch ein Wildtyp, bei dem sowohl PrtA im Gesamtzelllysat als auch im Kulturüberstand detektiert wurde. Da der einzige Unterschied zwischen dem R6 und dem D39 in der Kapsel liegt [72], scheint die Kapsel das PrtA so zu verdecken, dass es vom Antiserum nicht erkannt wurde. Auch bei von Bethe durchgeführten Versuchen zur Opsonophagozytose zeigte sich bei Verwendung von Stamm R6 und Anti-PrtA-Serum eine Erhöhung der Opsonophagozytose, während keine Erhöhung der Opsonophagozytose des Stammes D39 beobachtet wurde [18]. Entweder wird das PrtA tatsächlich durch die Kapsel geschützt oder es wird nur der Bereich, gegen den das Antiserum gerichtet ist, abgeschirmt. Versuche mit einem gegen das Gesamt-PrtA gerichteten Antikörper würden über diese Frage Aufschluss geben. Weiser *et al.* haben gezeigt, dass die Kapselpolysaccharide einer Regulation unterliegen [155]. Daher wäre es weiterhin möglich, dass das PrtA nur in bestimmten Wachstumsphasen verdeckt wird.

Nach Affinitätschromatographischer Auftrennung ließ sich das PrtA aus dem Kulturüberstand der LPXTG-defizienten His-Tag Mutante SP-107 auf einem Gel darstellen. Bethe *et al.* (2001) haben zwei Formen von PrtA beschrieben, eine mit 240 kDa und eine mit 215 kDa, und sie haben angenommen, dass es sich bei der größeren Form um ein Vorläuferprotein von

PrtA und bei der kleineren Form um das maturierte Protein handeln könnte [19]. Bei Proteinen, die als Prä-Pro-Proteine synthetisiert werden, wird bei der Translokation durch die Membran das Signalpeptid abgespalten. Durch Abspaltung des Pro-Peptids erfolgt die Aktivierung der Protease. Dieser Aktivierungsschritt wird durch Maturaseproteine ausgeführt. Maturasen werden meist in der Nähe der Substratproteine kodiert. Für die zu PrtA homologen PrtPs von *Lactobacillus paracasei* und *Lactococcus lactis* wurden stromaufwärts der *prtP*-Gene Maturaseproteine gefunden [67, 148]. In der Nähe des *prtA*-Genlokus befand sich jedoch kein Gen, das für ein Maturaseprotein kodiert [19]. Overweg *et al.* haben aber ein Maturase-ähnliches Protein PpmA beschrieben, das Homologien zu der Maturase PrtM von *Lactococcus paracasei* aufweist [106]. Es konnte allerdings von Bethe (2001) gezeigt werden, dass es sich bei PpmA nicht um die Maturase handelt, die PrtA prozessiert [18].

Die Größe des aufgereinigten PrtA lässt sich auf einem 4,5 %igen Minigel nicht klar bestimmen. Auf dem Westernblot des aufgereinigten, elektrophoretisch aufgetrennten PrtA war eine dominante Bande zu erkennen. Da oberhalb dieser Bande zum Teil eine weitere Bande zu sehen war, ist anzunehmen, dass es sich bei der dominanten Bande um die 215 kDa-Form und bei der schwächeren oberen Bande um die 240 kDa-Form des PrtA handelte. Über die LPXTG-defiziente His-Tag Mutante konnte somit die 215 kDa-Form des PrtA, die angenommene maturierte Form des Proteins, aufgereinigt werden. Eine anschließende Dialyse des Proteins zeigte eine deutliche Verringerung der aufgereinigten Proteinmenge. Das Protein scheint nach der Aufreinigung degradiert zu sein, so dass die Proteasefragmente den Dialyseschlauch verlassen konnten. Um eine deutlich größere Menge an aufgereinigtem Protein zu erhalten, wurde der Kulturüberstand stärker als zuvor eingengt. Eine stärkere Einengung brachte jedoch keine größere Ausbeute. Das Protein scheint, neben der Maturierung, einem Autolyseverhalten zu unterliegen. Das gleiche Phänomen wurde 2001 von Peng *et al.* bei der Signal-Peptidase I beschrieben. Die Signal-Peptidase I ist wie das PrtA eine Serinprotease, die einer Selbstprozessierung (Autolyse) unterliegt. Durch Titrationsversuche konnte gezeigt werden, dass die Autolyse des Proteins ein konzentrationsabhängiges Ereignis ist. Bei zunehmender Enzymkonzentration nahm auch die Autolyse zu [112, 161]. Um dieses Autolyseverhalten bei PrtA genauer zu analysieren, wurde aufgereinigtes PrtA in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt und geblottet. Ein nicht autolysiertes Protein hätte einen Spot ergeben müssen. Es waren jedoch fünf Spots zu erkennen. Das PrtA scheint damit tatsächlich einer Auto-Prozessierung zu unterliegen. Ein vergleichbares Autolyseverhalten wurde auch bei der Signal-Peptidase I von *Streptococcus pneumoniae* [112], *Bacillus subtilis* [147] und *Escherichia coli* [140], dem PrtP von

Lactococcus lactis SK11 [25] oder bei dem LexA von *Escherichia coli* [89] beobachtet. Die Auto-Prozessierung ist ein spezifischer Prozess, der durch einen intramolekularen Mechanismus katalysiert wird. Er ist unabhängig von anderen Proteasen [112, 161], was durch die zweidimensionale Auftrennung des aufgereinigten PrtA auch für diese Protease bestätigt werden konnte. Proteaseinhibitoren wie PMSF können die Prozessierung der Proteasen nicht verhindern [73, 112, 147], was erklärt, dass das PrtA trotz Zugabe von PMSF sich in mehrere Produkte zerlegt hat.

Bei einer zweidimensionalen Auftrennung des aufgereinigten Proteins sind fünf Spots zu erkennen. Vergleicht man die Banden einer eindimensionalen Auftrennung des Gesamtzelllysats von R6 mit denen der PrtA-defizienten Mutante Sp-111, lassen sich 5 Banden dem PrtA zuordnen. Die Banden bei 215 kDa und bei 180 kDa stimmen mit den Spots auf dem Blot der zweidimensionalen Auftrennung des PrtA überein, während die dritte Bande mit einer Größe von ungefähr 88 kDa von den zwei anderen Spots abweicht. Das PrtA scheint wahrscheinlich bei fünf auf dem Blot sichtbaren Banden vier Schnittstellen für eine Auto-Prozessierung zu haben. Es konnten jedoch nur die Fragmente auf den Blots dargestellt werden, die den C-terminalen Bereich, gegen den das verwendete Antiserum gerichtet ist, besitzen. Daher können durchaus mehr Autoprozessierungsstellen vorkommen. Vergleicht man die Autoprozessierungsstellen anderer Proteasen aus *S. pneumoniae* [112, 161], *E. coli* [140] und *B. subtilis* [147] mit der Aminosäuresequenz des PrtA, findet man im PrtA die Schnittmotive VAA, VVA, GES und VTA wieder. Eine Überprüfung des PrtA mit der Proteinanalysesoftware DNASTAR auf die nach dem Schneiden an erwähnten Motiven entstehenden Fragmente auf Größe und pI, ergaben GES und VTA als mögliche Autoprozessierungsstellen. Das Motiv VTA befindet sich an Position 2089 im PrtA. Es liegt damit 19 Aminosäuren vor dem LPXTG-Anker. Es könnte sich hierbei um die Schnittstelle handeln, durch die das PrtA vom Zellwandanker gelöst wird, um in den Kulturüberstand entlassen zu werden. Durch diese beiden Motive kann allerdings nur ein Spot des zweidimensional aufgetrennten PrtA erklärt werden. Keines der anderen in Proteasen vorkommenden Schnittmotive scheint im PrtA eine Bedeutung für die Autoprozessierung zu haben. Allerdings ist die auf den Westernblots ermittelte Größe der PrtA-Fragmente nur sehr ungenau. Auch die pI-Werte lassen sich nur schlecht ermitteln.

Genauere Aussagen über Prozessierungsstellen können nur durch N-terminale Sequenzierung gemacht werden. Um einen Aufschluss über die 215 kDa-Form des PrtA zu erhalten, wurden Versuche unternommen, das aufgereinigte Protein N-terminal zu sequenzieren. Trotz

mehrmaliger Versuche, das Protein zu sequenzieren, ließ sich keine auswertbare Sequenz erhalten. Möglicherweise ist der N-Terminus blockiert.

Die Wildtyp-Stämme R6 und D39 sowie die Mutanten SP-111 (PrtA-defizient), SP-107 (LPXTG-defizient mit His-Tag) und SP-110 (signalpeptidlos) zeigten in ihrem Wachstumsverhalten in BHI keinerlei deutliche Unterschiede. Das PrtA scheint weder für das Wachstum der Pneumokokken in komplexem Medium nötig zu sein, noch scheint das PrtA eine toxische Wirkung auf die Bakterien zu haben, da die signalpeptidlose Mutante das PrtA auf Grund des fehlenden Signalpeptids in der Zelle akkumuliert.

PrtA ist nicht essentiell für *S. pneumoniae*, dennoch wäre es möglich, dass PrtA Substrate abbauen kann und damit den Pneumokokken als Nutritionsfaktor dient. Homologe Proteasen von Laktokokken, Laktobazillen und Streptokokkenspezies können verschiedene Substrate abbauen, unter anderem das Kasein [26, 50, 54, 111]. Von Bethe (2001) wurde gezeigt, dass der Kulturüberstand von *S. pneumoniae* kaseinolytische Aktivität hat [18]. In dieser Arbeit konnte die kaseinolytische Aktivität des Kulturüberstands reproduziert werden. Aufgrund der aufwendigen Herstellung der Mutanten und der Aufreinigung des Proteins lag zu diesem Zeitpunkt noch kein aufgereinigtes Protein vor, ebenso fehlte eine über ortsspezifische Mutagenese erzeugte PrtA-defiziente Mutante. Daher konnte die für PrtA beschriebene Beteiligung von PrtA am Abbau des Kaseins [18] nicht gezeigt werden. Es konnte lediglich über ein natives elektrophoretisch aufgetrenntes Gel mit eingegossenem Substrat und einem entsprechenden Westernblot gezeigt werden, dass das PrtA für den Abbau des Kaseins in Frage kommt. Mit nativen Gelen ließ sich die kaseinolytische Aktivität des Kulturüberstands nicht verlässlich reproduzieren, so dass ebenfalls halbdaturierende SDS-Polyacrylamidgelle mit eingegossenem Substrat, bei denen nach erfolgtem Lauf das SDS entfernt wurde, Verwendung fanden. Es ließ sich mit Kasein als Substrat leider keinerlei Aktivität des Kulturüberstands beobachten. Obgleich es sich dabei um eine anerkannte Methode handelt, ist es fraglich, ob diese Methode für alle Proteine geeignet ist. Bei derartigen Zymogrammen wird davon ausgegangen, dass sich das Protein aus dem denaturierten Zustand in den nativen rückfalten kann. Das PrtA hat ein Molekulargewicht von 240 kDa und ist damit ein sehr großes Protein, wodurch die Rückfaltungswahrscheinlichkeit in den nativen Zustand verringert wird. Die 47 kDa Protease von *Yersinia ruckeri* [128], die 50-52 kDa Metalloproteasen von *Streptococcus mutans* [62] sowie eine Protease von *Streptococcus oralis* mit einem MW von 146 kDa [90] konnten zymographisch ohne Probleme dargestellt

werden. Auch die Aktivität der 36 kDa Metalloprotease von *S. suis* konnte auf einem Zymogramm gezeigt werden, wohingegen die Serinprotease des gleichen Stammes irreversibel durch SDS gehemmt wurde [76]. Auch ein mit Guanidinhydrochlorid denaturiertes maturiertes Subtilisin konnte nicht renaturiert werden [73]. Auch ist fraglich, ob Proteine, die einer Autoprozessierung unterliegen, zu einer Renaturierung in der Lage sind.

Die Darstellung der Proteaseaktivität des PrtA im Kulturüberstand von *S. pneumoniae* war nur zum Teil möglich. Der Grund könnte zum einen darin liegen, dass das Protein andere Bedingungen für eine Aktivität benötigt als die in den Versuchen gewählten. Zum anderen könnte es sein, dass die von den Pneumokokken expremierte PrtA-Menge für die Analyse der Aktivität des Proteins zu gering war, oder die Gelmethode nicht sensitiv genug. Eine weitere Erklärung für die schlechte Darstellbarkeit der Aktivität des PrtA könnte in einem Verlust der Aktivität der Protease zu suchen sein. Manche Proteine werden durch eine Selbstprozessierung inaktiviert, z.B. das LexA Protein und die Signal-Peptidase I von *E. coli* [112].

Proteasen können mehrere Funktionen haben. Die zu PrtA homologe Protease C5a Peptidase, eine oberflächenlokalisierte Serinprotease der Gruppe B Streptokokken, ist z.B. sowohl eine spezifische Protease, indem sie den Komplementfaktor C5a schneidet, bindet aber auch an das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin und dient damit der bakteriellen Adhärenz [11, 32]. Extrazelluläre Matrixproteine können als Substrat für die bakterielle Adhärenz dienen. Diese Interaktionen tragen zur bakteriellen Kolonisierung von zerstörtem Gewebe bei. 1991 zeigte Courtney, dass im Kulturüberstand von *S. pneumoniae* Serinproteasen enthalten sind, die extrazelluläre Matrixbestandteile spalten können [39]. Auch wenn die von Courtney beschriebene Proteaseaktivität der Serinproteasen im Kulturüberstand in dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte, könnte eine Funktion der Protease in der Adhärenz an extrazelluläre Matrixproteine liegen. Als Bestandteile in der Matrix des Wirts kommen neben Fibronectin auch Kollagen I, III und IV in Frage. Es ist bekannt, dass eine große Anzahl von *S. pneumoniae*-Stämmen an Fibronectin binden kann [48]. Verantwortlich für die Bindung von Pneumokokken an Fibronectin ist die Aminosäuresequenz RGD (Arg-Gly-Asp), die sowohl in Fibronectin wie in Fibronectin-Bindeproteinen zu finden ist. Im PrtA kommt diese Aminosäuresequenz nicht vor. Jedoch kann auch ohne dieses Motiv eine Bindung an Fibronectin erfolgen [11]. Das 2001 neu identifizierte Protein PavA scheint für die Bindung von Pneumokokken an Fibronectin verantwortlich zu sein [68]. Bindungsversuche mit dieser extrazellulären Matrixkomponente zeigten tatsächlich keinen Unterschied in der Bindung

zwischen R6 und Stamm SP-111. Beide Stämme ließen dagegen eine starke Bindung an Fibronectin erkennen. Diese Bindung wurde nicht durch PrtA vermittelt. Einige Stämme von *S. pneumoniae* sind in der Lage an Kollagen zu binden [48, 83]. In Dot-Blots zeigte sich eine deutliche Steigerung der PrtA-Konzentration bei höheren Kollagenkonzentrationen, d.h. je mehr Kollagen an die Membran gebunden war, desto mehr PrtA konnte gebunden werden. Bindungsversuche mit fluoreszenzmarkierten Pneumokokken des Wildtyp-Stammes R6 und der PrtA-defizienten Mutante SP-111 zeigten jedoch keinen Unterschied in der Bindung an Kollagen I, so dass davon auszugehen ist, dass PrtA nicht in der Lage ist, an Kollagen I zu binden. Bei dem für die Dot-Blots verwendeten Antikörper handelte es sich um ein polyklonales Antiserum. Da für diesen Versuch eingengter Überstand verwendet wurde, könnte es sich um eine Kreuzreaktion mit einem anderen Protein handeln, das an Kollagen gebunden hat. Auch bei der Bindung an Kollagen III zeigte sich kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante. Das Ergebnis bei Verwendung von Kollagen IV hingegen war nicht immer reproduzierbar. In zwei von drei Ansätzen war keine Bindung an das extrazelluläre Matrixprotein festzustellen. In dem einen Ansatz hingegen kam es vor, dass der Wildtyp keine, die PrtA defiziente Mutante SP-111 jedoch eine deutliche Bindung an Kollagen IV zeigte. Die Serinprotease PrtA hat damit nicht an Kollagen IV gebunden, da von Mutante SP-111 nicht expremiert, scheint aber ein anderes Protein so modifiziert zu haben, dass dieses nicht mehr in der Lage war, an Kollagen IV zu binden. Eine vergleichbare Bindungsdifferenz zwischen Wildtyp und einer Mutante wurde bei einer C5a Peptidase-Mutante von B-Streptokokken bei der Bindung an A549 Zellen (respiratorische Epithelzellen, die Fibronectin auf der Oberfläche produzieren) beobachtet. Die C5a-Peptidase-negativ-Mutante hat signifikant besser an A549 Zellen gebunden als der Wildtyp [32]. Der Grund für das nicht immer eindeutige Bindungsergebnis an Kollagen IV konnte nicht geklärt werden. Als Adhärenzfaktor scheint PrtA ausgeschlossen werden zu können, wobei eine Bindung an Laminin und Vitronectin nicht untersucht wurde.

Bei der Serinprotease PrtA handelt es sich vermutlich um eine Protease, deren Expression durch die Umweltbedingungen reguliert wird. Bei Wachstum der Pneumokokken in CO₂-angereicherter Atmosphäre war die PrtA-Expression größer als bei Wachstum unter anaeroben oder aeroben Bedingungen. Mit der Regulierung der PrtA-Expression scheinen die Pneumokokken auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren. Von Weiser wurde gezeigt, dass Pneumokokken zwischen zwei Varianten wechseln können, der transparenten und der opaken Variante [152]. Einige Proteine werden je nach Variante stärker expremiert. Das

CbpA z.B. wird verstärkt in der transparenten Variante expremiert [119] und trägt damit zu einer besseren Kolonisierung der Pneumokokken bei. Auch die Kapselpolysaccharide werden reguliert. Die Regulation erfolgt abhängig von der Sauerstoffkonzentration in der Umgebung. Unter reduzierter Sauerstoffkonzentration werden mehr Kapselpolysaccharide produziert. Die Konzentration der Kapselpolysaccharide ist höher in der opaken Variante [155]. Damit kann vermutet werden, dass das PrtA ebenfalls abhängig vom Phänotyp expremiert wird und damit eine Funktion bei der Kolonisierung oder Invasion in Wirtsgewebe hat.

Auch durch verschiedene Substanzen wird das PrtA beeinflusst. Bei zusätzlicher Gabe von Glukose zum Medium wurde die Expression von PrtA reduziert. Einen hemmenden Effekt bei Zugabe von Glukose konnten auch Secades und Guijarro (1999) bei der extrazellulären Protease von *Yersinia ruckeri* beobachten. Die Protease zeigt kaseinolytische Aktivität [128]. Die Beeinflussung der PrtA-Expression durch atmosphärische Bedingungen sowie durch Glukose zeigte sich sowohl auf transkriptionaler wie auf translationaler Ebene.

Lock *et al.* (1988) beschrieben eine mögliche Modifizierung der Zellwand-gebundenen Neuraminidase A von *S. pneumoniae* durch eine Serinprotease [91]. Um die Modifizierung von bakterieneigenen Proteinen durch die Serinprotease PrtA zu untersuchen, wurden zweidimensionale Gelelektrophoresen durchgeführt. Ein Vergleich der 2-D-Proteingele von dem Wildtyp R6 und der PrtA-defizienten Mutante SP-91 hat keine auswertbaren Unterschiede ergeben. Alle Proteinspots, die eine geringe Proteinkonzentration aufwiesen, wie z.B. der von PrtA, konnten jedoch auf einem solchen Gel nicht erfasst werden. Da die Proteinkonzentration des PrtA in dem Gesamtzellysats so gering war, dass das PrtA auf einem Gel nicht dargestellt werden konnte, ist die Frage, ob eine mögliche Modifikation von Proteinen durch das PrtA überhaupt gezeigt werden kann. Aufgrund der starken Präsenz einiger Spots und der Akkumulierung der Spots auf einem Bereich des Gels, wäre eine Erhöhung der Gesamtzell-Proteinkonzentration jedoch nicht sehr effizient. Trotz größter Auftrennung auch kleiner Spots durch verwendete Gradientengele, waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Um eine Eingrenzung der Spotanzahl zu erhalten, wurden 2-D-Gele des Gesamtzellysats auf Nitrozellulose geblottet und mit einem Patientenserum inkubiert. Ein Spot mit der Größe von 29 kDa zeigte bei der Mutante SP-91 eine Verschiebung zu höheren pI-Werten. Bei unveränderter Größe, aber Verschiebung eines Spots, kann es sich um die Veränderung ein und desselben Proteins handeln, z.B. durch Phosphorylierung. Es wäre vorstellbar, dass das PrtA bei der Aktivierung oder Deaktivierung des Proteins eine Rolle spielt. Um noch weiter eingrenzen zu können, ob eine Veränderung

von Membranproteinen erfolgte, wurde eine Membranpräparation zweidimensional aufgetrennt. Ebenso wie bei dem Gesamtzelllysat war in einer Membranpräparation die Verschiebung des 29 kDa-Spots bei der PrtA-defizienten Mutante zu sehen. Das PrtA agiert auf der Oberfläche der Pneumokokken. Es scheint das 29 kDa-Protein in der Zellwand zu verändern. Vorstellbar wäre, dass über das PrtA die Konzentration des aktiven Proteins reguliert wird. Aufgrund der fehlenden Darstellbarkeit des durch PrtA veränderten Spots auf einem Coomassiegel, kann derzeit kein Protein dem Spot zugeordnet werden.

Diese Versuche wurden mit der Knock-out Mutante SP-91 durchgeführt, die durch Insertions-Duplikations-Mutagenese erzeugt wurde. Zu dem Zeitpunkt lag noch keine PrtA-defiziente Mutante, die durch Insertion einer Erythromycinkassette hergestellt wurde, vor. Es muss berücksichtigt werden, dass sekundäre Effekte entstehen konnten.

Die Homologie von Proteasen einiger Streptokokken oder Laktobazillen zu PrtA beschränkt sich auf den Bereich der katalytischen Domänen. Vor allem der carboxyterminale Bereich der Protease zeigte keinerlei Homologien zu anderen Proteasen. Die Versuche haben gezeigt, dass es nicht möglich ist aufgrund der bestehenden Homologien auch auf gleiche Funktionen zu schließen. Ebenso ist in der Genumgebung der homologen Proteasen keine Ähnlichkeit zu der des PrtA erkennbar. Serinproteasen können recht unterschiedliche Funktionen haben, so dass weitere Versuche nötig sind, um genauere Aussagen über die Funktion der Protease PrtA machen zu können.

Eine Beteiligung am Abbau von Substraten durch PrtA konnte mit den verwendeten Methoden nicht gezeigt werden. Sensiblere Methoden müssten angewendet werden, so dass neben der von Bethe gezeigten Beteiligung des PrtA am Kaseinabbau [18] weitere Substrate getestet werden können. An der Bindung der Pneumokokken an extrazelluläre Matrixbestandteile war PrtA nicht beteiligt. Die Expression von PrtA wurde durch Umweltbedingungen reguliert. Versuche mit transparenten und opaken Varianten würden Antwort darauf geben, ob die Regulation der Expression der Protease in Verbindung zur Phasenvarianz steht. Durch Identifizierung des durch PrtA modifizierten Proteins ließen sich weitere Einblicke in die Funktion der Protease erhalten. Das Protein war nativ aus dem Kulturüberstand aufzureinigen, unterlag aber einer Autoprozessierung. Versuche zur Stabilisierung der Protease nach Aufreinigung würden die weiteren Arbeiten mit der Protease wahrscheinlich erheblich erleichtern.

5 Zusammenfassung

Streptococcus pneumoniae ist ein human-pathogenes Bakterium, das den Nasopharynx gesunder Menschen besiedeln kann. Das Bakterium kann sich lokal ausbreiten und zu schweren invasiven Erkrankungen führen, wie der Pneumonie, der Meningitis und der Sepsis. Zahlreiche, vor allem oberflächenlokalisierte Proteine ermöglichen die Kolonisierung und Invasion der Pneumokokken. Von Zysk *et al.* (2000) wurden über ein Genbankscreening neue Proteine von *S. pneumoniae* gefunden. Eines davon ist die Serinprotease PrtA, die 2001 von Bethe näher untersucht wurde. PrtA ist eine in der Zellwand der Pneumokokken verankerte Protease, die als Prä-Pro-Protein synthetisiert wird. Im Mausmodell zeigte sich die Virulenz der Protease. Aufgrund der immunogenen Eigenschaften wird PrtA als potentieller Vakzine-Kandidat beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Serinprotease PrtA nativ aufgereinigt und Untersuchungen zur biologischen Funktion durchgeführt werden. Über eine durch ortsspezifische Mutagenese hergestellte Mutante konnte die Protease nativ aus dem Kulturüberstand als ein HisTag-Fusionsprotein aufgereinigt werden. Neben den zwei angenommenen Hauptformen von PrtA mit Molekulargewichten von 240 kDa und 215 kDa konnten weitere Formen des PrtA durch Westernblot-Analysen identifiziert werden. Mehrere PrtA-Fragmente sowie die Identifizierung mehrerer Proteinspots bei einer zweidimensionalen Auftrennung des aufgereinigten PrtA, legen den Schluss nahe, dass es sich bei der Protease um ein instabiles Protein handelt. Diese Autoprozessierung zeigte sich als konzentrationsabhängig. Die genauen Prozessierungsstellen konnten noch nicht geklärt werden. Die Expression der Protease unterliegt einer Regulation. Sowohl auf transkriptionaler wie auf translationaler Ebene zeigte sich eine Beeinflussung der Expression von PrtA durch atmosphärische Bedingungen, sowie durch Glukose. Eine Beteiligung von PrtA am Abbau der in der Arbeit erwähnten Substrate konnte mit den verwendeten Methoden nicht gezeigt werden. Bindungsversuche von Pneumokokken an Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie Fibronektin, Kollagen I, III und IV, ließen keine Beteiligung des PrtA an der Bindung an die jeweiligen Proteine erkennen. Einen Hinweis auf die Modifikation eines bakterieneigenen Proteins durch PrtA, ergaben zweidimensionale Untersuchungen des Protein-Expressionsprofils. Das modifizierte Protein konnte bislang noch nicht analysiert werden. Die Identifizierung dieses Proteins würde neue Einblicke in den Aufgabenbereich der Protease liefern.

6 Literaturverzeichnis

1. **AlonsoDeVelasco, E., A. F. M. Verheul, J. Verhoef and H. Snippe.** 1995. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines. *Microbiol Rev* 59:591-603
2. **Anderson, E. T., M. G. Wetherell, L. A. Winter, S. B. Olmsted, P. P. Cleary and Y. V. Matsuka.** 2002. Processing, stability, and kinetic parameters of C5a peptidase from *Streptococcus pyogenes*. *Eur J Biochem* 269:4839-4851
3. **Andersson, B., J. Dahmen, T. Frejd, H. Leffler, G. Magnusson, G. Noori and C. S. Eden.** 1983. Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J Exp Med* 158:559-570
4. **Appelbaum, P. C.** 1987. World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. *Eur J Clin Microbiol* 6:367-377
5. **Austrian, R.** 1986. Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J Antimicrob Chemother* 18:35-45
6. **Avery, O. T., C. M. MacLeod and M. McCarty.** 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* 79:137-158
7. **Balachandran, P., S. K. Hollingshead, J. C. Paton and D. E. Briles.** 2001. The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for Releasing pneumolysin. *J Bacteriol* 183:3108-3116
8. **Bao, Q., Y. Tian, W. Li, Z. Xu, Z. Xuan, S. Hu, W. Dong, J. Yang, Y. Chen, Y. Xue, Y. Xu, X. Lai, L. Huang, X. Dong, Y. Ma, L. Ling, H. Tan, R. Chen, J. Wang, J. Yu and H. Yang.** 2002. A complete sequence of the *T. tengcongensis* genome. *Genome Res* 12:689-700
9. **Barrett, D. J. and E. M. Ayoub.** 1986. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin Exp Immunol* 63:127-134
10. **Barrett, A. J.** 1990. Classification of Peptidases. *Methods Enzymol* 244:1-15
11. **Beckmann, C., J. D. Waggoner, T. O. Harris, G. S. Tamura and C. E. Rubens.** 2002. Identification of novel adhesins from Group B Streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates Fibronectin binding. *Infect Immun* 70:2869-2876
12. **Beres, S. B., G. L. Sylva, K. D. Barbian, B. Lei, J. S. Hoff, N. D. Mammarella, M-Y. Liu, J. C. Smoot, S. F. Porcella, L. D. Parkins, D. S. Campbell, T. M. Smith, J. K. McCormick, D. Y. M. Leung, P. M. Schlievert and J. M. Musser.** 2002. Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: Phage- encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10078-10083
13. **Berkelman, T. and T. Stenstedt.** 1998. 2-D Electrophoresis. Principles and methods. Handbook. Amersham Biosciences.

14. **Berry, A. M., R. A. Lock, D. Hansman and J. C. Paton.** 1989. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 57:2324-2330
15. **Berry, A. M., R. A. Lock, S. M. Thomas, D. P. Rajan, D. Hansman and J. C. Paton.** 1994. Cloning and nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *Infect Immun* 62:1101-1108
16. **Berry, A. M. and J. C. Paton.** Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. 1996. *Infect Immun* 64:5255-5362
17. **Berry, A. M., R. A. Lock and J. C. Paton.** Cloning and characterization of *nanB*, a second *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase gene, and purification of the NanB enzyme from recombinant *Escherichia coli*. 1996. *J Bacteriol* 178:4854-4860
18. **Bethe, G.** 2001. Charakterisierung der Zellwand-assoziierten Serinprotease PrtA von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation
19. **Bethe, G., R. Nau, A. Wellmer, R. Hakenbeck, R. R. Reinert, H.-P. Heinz and G. Zysk.** 2001. The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 205:99-104
20. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
21. **Braun, J. S., R. Novak, G. Gao, P. J. Murray and J. L. Shenep.** 1999. Pneumolysin, a protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*, induces nitric oxide production from macrophages. *Infect Immun* 67:3750-3756
22. **Briles, D. E., S. K. Hollingshead, E. Swiatlo, A. Brooks-Walter, A. Szalai, A. Virolainen, L. S. McDaniel, K. A. Benton, P. White, K. Prellner, A. Hermansson, P. C. Aerts, H. Van Dijk and M. J. Crain.** 1997. PspA and PspC: Their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb Drug Resist* 3:401-408
23. **Briles, D. E., R. Creech Tart, E. Swiatlo, J. P. Dillard, P. Smith, K. A. Benton, B. A. Ralph, A. Brooks-Walter, M. J. Crain, S. K. Hollingshead and L. S. McDaniel.** 1998. Pneumococcal diversity: Considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). *Clin Microbiol Rev* 11:645-657
24. **Briles, D. E., S. K. Hollingshead, A. Brooks-Walter, G. S. Nabors, L. M. Ferguson, M. Schilling, S. Gravenstein, P. Braun, J. King and A. Swift.** 2000. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. *Vaccine* 18:1707-1711
25. **Bruinenberg, P. G., W. M. de Vos and R. J. Siezen.** 2000. Deletion of various carboxy-terminal domains of *Lactococcus lactis* SK11 proteinase: Effects on activity, specificity, and stability of the truncated enzyme. *Appl Environ Microbiol* 66:2859-2865
26. **Buist, G., G. Venema and J. Kok.** 1998. Autolysis of *Lactococcus lactis* is influenced by proteolysis. *J Bacteriol* 180:5947-5953

27. **Butler, J. C., E. D. Shapiro and G. M. Carlone.** 1999. Pneumococcal vaccines: history, current status, and future directions. *Am J Med* 107:69-76
28. **Camara, M., T. J. Mitchell, P. W. Andrew and Graham J. Boulnois.** 1991. *Streptococcus pneumoniae* produces at least two distinct enzymes with neuraminidase activity: Cloning and expression of a second neuraminidase gene in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 59:2856-2858
29. **Cámara M., G. J. Boulnois, P. W. Andrew and T. J. Mitchell.** 1994. A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect Immun* 62:3688-3695
30. **Chen, J.-D. and D. A. Morrison.** 1988. Construction and properties of a new insertion vector, pJDC9, that is protected by transcriptional terminators and useful for cloning of DNA from *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* 64:155-164
31. **Chen, C. C. and P. P. Cleary.** 1990. Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* 265:3161-3167
32. **Cheng, Q., D. Staflieni, S. S. Purushothaman and P. Cleary.** 2002. The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin. *Infect Immun* 70:2408-2413
33. **Chmouryguina, I., A. Suvorov, P. Ferrieri and P. P. Cleary.** 1996. Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci. *Infect Immun* 64:2387-2390
34. **Choih, S.-J., Q. T. Smith and C. F. Schachtele.** 1979. Modification of human parotid saliva proteins by oral *Streptococcus sanguis*. *J Dent Res* 58:516-524
35. **Christensson, C., C. J. Pillidge, L. J. Ward and P. W. O'Toole.** 2001. Nucleotide sequence and characterization of the cell envelope proteinase plasmid in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP. *J Appl Microbiol* 91:334-343
36. **Chudwin, D. S., S. G. Artrip, A. Korenblit, G. Schiffman and S. Rao.** 1985. Correlation of serum opsonins with in vitro phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 50:213-217
37. **Cleary, P. P., U. Prahbu, J. B. Dale, D. E. Wexler and J. Handley.** 1992. Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase. *Infect Immun* 60:5219-5223
38. **Coolbear, T., J. M. Whittaker and R. M. Daniel.** 1992. The effect of metal ions on the activity and thermostability of the extracellular proteinase from a thermophilic *Bacillus*, strain EA.1. *Biochem J* 287:367-374
39. **Courtney, H. S.** 1991. Degradation of connective tissue proteins by serine proteases from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem Biophys Res Commun* 175:1023-1028
40. **Cundell, D. R., J. N. Weiser, J. Shen, A. Young and E. I. Tuomanen.** 1995. Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 63:757-761
41. **Cundell, D. R., B. J. Pearce, J. Sandros, A. M. Naughton and H. R. Masure.** 1995. Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eukaryotic cells. *Infect Immun* 63:2493-2498

42. **Cundell, D. R., N. P. Gerard, C. Gerard, I. Idanpaan-Heikkila and E. Tuomanen.** 1995. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377:435-438
43. **Dagert, M. and S. D. Ehrlich.** 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6:23-28
44. **Dave, S., A. Brooks-Walter, M. K. Pangburn and L. S. McDaniel.** 2001. PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect Immun* 69:3435-3437
45. **Díaz, E., E. García, C. Ascaso, E. Méndez, R. López and J. L. García.** 1989. Subcellular localization of the major pneumococcal autolysin: A peculiar mechanism of secretion in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264:1238-1244
46. **Dintilhac, A., G. Alloing, C. Granadel and J.-P. Claverys.** 1997. Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol* 25:727-739
47. **Duthy, T. G., R. J. Ormsby, E. Giannakis, A. D. Ogunniyi, U. H. Strocher, J. C. Paton and D. L. Gordon.** 2002. The human complement regulator factor H binds pneumococcal surface protein PspC via short consensus repeats 13 to 15. *Infect Immun* 70:5604-5611
48. **Eberhard, T., G. Kronvall and M. Ullberg.** 1999. Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. *Microb Pathog* 26:175-181
49. **Falbe, J and M. Regnitz.** Römpf, Chemie Lexikon. 9. Auflage, Thieme Verlag
50. **Fernandez-Espla, M. D., P. Garault, V. Monnet and F. Rul.** 2000. *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol* 66:4772-4778
51. **Ferrante, A., B. Rowan-Kelly and J. C. Paton.** 1984. Inhibition of in vitro human lymphocyte response by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect Immun* 46:585-589
52. **Fischetti, V. A., V. Pancholi and O. Schneewind.** 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Mol Microbiol* 4:1603-1605
53. **French, N.** 2003. Use of pneumococcal polysaccharide vaccines: No simple answers. *J Infect* 46:78-86
54. **Gilbert, C., D. Atlan, B. Blanc, R. Portalier, J. E. Germond, L. Lapierre and B. Mollet.** 1996. A new cell surface proteinase: Sequencing and analysis of the *prtB* gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J Bacteriol* 178:3059-3065
55. **Gilbert, R. J. C., J. Rossjohn, M. W. Parker, R. K. Tweten, P. J. Morgan, T. J. Mitchell, N. Errington, A. J. Rowe, P. W. Andrew and O. Byron.** 1998. Self-interaction of pneumolysin, the pore-forming protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* 284:1223-1237
56. **Hakansson, A., H. Roche, S. Mirza, L. S. McDaniel, A. Brooks-Walter and D. E. Briles.** 2001. Characterization of binding of human lactoferrin to pneumococcal surface protein A. *Infect Immun* 69:3372-3381

57. **Hakenbeck, R., T. Grebe, D. Zähler and J. B. Stock.** 1999. β -Lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol* 33:673-678
58. **Hammerschmidt, S., S. R. Talay, P. Brandtzaeg and G. S. Chhatwal.** 1997. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol* 25:1113-1124
59. **Hammerschmidt, S., G. Bethe, P. H. Remane and G. S. Chhatwal.** 1999. Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 67:1683-1687
60. **Hammerschmidt, S., M. P. Tillig, S. Wolff, J.-P. Vaerman and G. Chhatwal.** 2000. Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif. *Mol Microbiol* 36:726-736
61. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580
62. **Harrington, D. J. and R. R. B. Russell.** 1994. Identification and characterisation of two extracellular proteases of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 121:237-242
63. **Harris, T. O., D. W. Shelver, J. F. Bohnsack and C. E. Rubens.** 2003. A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. *J Clin Invest* 111:61-70
64. **Henrichsen, J.** 1995. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 33:2759-2762
65. **Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen and L. R. Pease.** 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59
66. **Höltje J. V. and A. Tomasz.** 1976. Purification of the pneumococcal N-acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. *J Biol Chem* 251:4199-4207
67. **Holck, A. and H. Naes.** 1992. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO151. *J Gen Microbiol* 138:1353-1364
68. **Holmes, A. R., R. McNab, K. W. Millsap, M. Rohde, S. Hammerschmidt, J. L. Mawdsley and H. F. Jenkinson.** 2001. The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol* 41:1395-1408
69. **Hoskins et al.** 2001. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* 183:5709-5717
70. **Houldsworth, S., P. W. Andrew and T. J. Mitchell.** 1994. Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin- 1β by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 62:1501-1503

71. **Hynes, W. L., L. Hancock and J. J. Ferretti.** 1995. Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes*: Evidence for a third Hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity. *Infect Immun* 63:3015-3020
72. **Iannelli, F., B. J. Pearce and G. Pozzi.** 1999. The type 2 capsule locus of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 181:2652-2654
73. **Ikemura, H. and M. Inouye.** 1988. *In vitro* processing of Pro-subtilisin produced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 263:12959-12963
74. **Ivanova, N. et al.** 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* 423:87-91
75. **Jedrzejewski, M. J.** 2001. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207
76. **Jobin, M.-C. and D. Grenier.** 2003. Identification and characterisation of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* 220:113-119
77. **Johnson, M. K.** 1977. Cellular location of pneumolysin. *FEMS Microbiol Lett* 2:243-245
78. **Johnson, S. E., J. K. Dykes, D. L. Jue, J. S. Sampson, G. M. Carlone and E. W. Ades.** 2002. Inhibition of pneumococcal carriage in mice by subcutaneous immunization with peptides from the common surface protein pneumococcal surface adhesin A. *J Infect Dis* 185:489-496
79. **Juarez, Z. E. and M. W. Stinson.** 1999. An extracellular protease of *Streptococcus gordonii* type IV collagen and collagen analogues. *Infect Immun* 67:271-278
80. **Kapur, V., S. Topouzis, M. W. Majesky, L.-L. Li, M. R. Hamrick, R. J. Hamill, J. M. Patti and J. M. Musser.** 1993. A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microb Pathog* 15:327-346
81. **Kilian, M., J. Reinholdt, H. Lomholt, K. Poulsen, and E. V. G. Frandsen.** 1996. Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: Critical evaluation of experimental evidence. *APMIS* 104:321-338
82. **Kim, J. O. and J. N. Weiser.** 1998. Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 177:368-377
83. **Kostrzynska, M. and T. Wadström.** 1992. Binding of Laminin, Type IV Collagen, and Vitronectin by *Streptococcus pneumoniae*. *Zbl Bakt* 277:80-83
84. **Krivan, H. C., D. D. Roberts and V. Ginsburg.** 1988. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc β 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6157-6161
85. **Kunji, E. R. S., I. Mierau, A. Hagting, B. Poolman and W. N. Konings.** 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:187-221

86. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
87. **Lantz, M. S. and P. Ciborowski.** 1994. Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. *Methods Enzymol* 235:563-594
88. **Lee, C.-J., T. R. Wang and Frasch C. E.** 2001. Immunogenicity in mice of pneumococcal glycoconjugate vaccines using pneumococcal protein carriers. *Vaccine* 19:3216-3225
89. **Little, J. W.** 1993. LexA cleavage and other self-processing reactions. *J Bacteriol* 175:4943-4950
90. **Lo, C. S. and C. V. Hughes.** 1996. Identification and characterisation of a protease from *Streptococcus oralis* C104. *Oral Microbiol Immunol* 11:181-187
91. **Lock, R. A., J. C. Paton and D. Hansman.** 1988. Purification and immunological characterization of neuraminidase produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* 4:33-43
92. **Lock, R. A., D. Hansman and J. C. Paton.** 1992. Comparative efficacy of autolysin and pneumolysin as immunogens protecting mice against infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* 12:137-143
93. **Lomholdt, H.** 1995. Evidence of recombination and an antigenically diverse immunoglobulin A1 protease among strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 63:4238-4243
94. **Lu, J., Y. Nogi and H. Takami.** 2001. *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on Iheya Ridge. *FEMS Microbiol Lett* 205:291-297
95. **Madsen, M., Y. Lebenthal, Q. Cheng, B. L. Smith and M. K. Hostetter.** 2000. A pneumococcal protein that elicits interleukin-8 from pulmonary epithelial cells. *J Infect Dis* 181:1330-1336
96. **Manoil and Beckwith.** 1985. TnpA: a transposon probe for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8129-8133
97. **Marugg, J. D., W. Meijer, R. van Kranenburg, P. Laverman, P. G. Bruinenberg and W. M. de Vos.** 1995. Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis*: Control of transcription initiation by specific dipeptides. *J Bacteriol* 177:2982-2989
98. **McDaniel, L. S., G. Scott, J. F. Kearney and D. E. Briles.** 1984. Monoclonal antibodies against protease-sensitive pneumococcal antigens can protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp Med* 160:386-397
99. **Mitchell, T. J., J. E. Alexander, P. J. Morgan and P. W. Andrew.** 1997. Molecular analysis of virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 26:62S-71S
100. **Mun-Bryce, S. and G. A. Rosenberg.** 1998. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1163-1172
101. **Navarre, W. W. and O. Schneewind.** 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:174-229

102. **Novak, R., J. S. Braun, E. Charpentier and E. Tuomanen.** 1998. Penicillin tolerance genes of *Streptococcus pneumoniae*: the ABC-type manganese permease complex Psa. *Mol Microbiol* 29:1285-1296
103. **Novak, R., E. Charpentier, J. S. Braun, E. Park, S. Murti, E. Tuomanen and R. Masure.** 2000. Extracellular targeting of choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* by a zinc metalloprotease. *Mol Microbiol* 36:366-376
104. **Oggioni, M. R., G. Memmi, T. Maggi, D. Chiavolini, F. Iannelli and G. Pozzi.** 2003. Pneumococcal zinc metalloproteinase ZmpC cleaves human matrix metalloproteinase 9 and is a virulence factor in experimental pneumonia. *Mol Microbiol* 49:795-805
105. **Overweg, K., C. D. Pericone, G. G. C. Verhoef, J. N. Weiser, H. D. Meiring, A. P. J. M. de Jong, R. de Groot and P. W. M. Hermans.** 2000. Differential protein expression in phenotypic variants of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68:4604-4610
106. **Overweg, K., A. Kerr, M. Sluijter, M. H. Jackson, T. J. Mitchell, A. P. J. M. De Jong, R. de Groot and P. W. M. Hermans.** 2000. The putative proteinase maturation protein A of *Streptococcus pneumoniae* is a conserved surface protein with potential to elicit protective immune responses. *Infect Immun* 68:4180-4188
107. **Paton, J. C. and A. Ferrante.** 1983. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect Immun* 41:1212-1216
108. **Paton, J. C., B. Rowan-Kelly and A. Ferrante.** 1984. Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect Immun* 43:1085-1087
109. **Paton, J. C., R. A. Lock, C.-J. Lee, J. P. Li, A. M. Berry, T. J. Mitchell, P. W. Andrew, D. Hansman and G. J. Boulnois.** 1991. Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to *Streptococcus pneumoniae* type 19F polysaccharide. *Infect Immun* 59:2297-2304
110. **Paton, J. C., P. W. Andrew, G. J. Boulnois and T. J. Mitchell.** 1993. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu Rev Microbiol* 47:89-115
111. **Pederson, J., G. J. Mileski, B. C. Weimer and J. L. Steele.** 1999. Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J Bacteriol* 181:4592-4597
112. **Peng, S.-B., L. Wang, J. Moomaw, R. B. Peery, P.-M. Sun, R. B. Johnson, J. Lu, P. Treadway, P. L. Skatrud and Q. M. Wang.** 2001. Biochemical characterization of signal peptidase I from gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 183:621-627
113. **Plaut, A. G., R. J. Genco and T. B. Tomasi.** 1974. Isolation of an enzyme from *Streptococcus sanguis* which specifically cleaves IgA. *J Immunol* 113:289-291

114. **Podbielski, A., M. Woischnik, B. Kreikemeyer, K. Bettenbrock and B. A. Buttaró.** 1999. Cysteine protease SpeB expression in group A streptococci is influenced by the nutritional environment but SpeB does not contribute to obtaining essential nutrients. *Med Microbiol Immunol* 188:99-109
115. **Poulsen, K., J. Reinholdt and M. Kilian.** 1996. Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* immunoglobulin A1 protease gene (*iga*) and its translation product. *Infect Immun* 64:3957-3966
116. **Poulsen, K., J. Reinholdt, C. Jespersgaard, K. Boye, T. A. Brown, M. Hauge and M. Kilian.** 1998. A comprehensive genetic study of streptococcal immunoglobulin A1 proteases: Evidence for recombination within and between species. *Infect Immun* 66:181-190
117. **Read, T. D., S. L. Salzberg, M. Pop, M. Shumway, L. Umayam, L. Jiang, E. Holtzapple, J. D. Busch, K. L. Smith, J. M. Schupp, D. Solomon, P. Keim and C. M. Fraser.** 2002. Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. *Science* 296:2028-2033
118. **Ring, A., J. N. Weiser and E. Tuomanen.** 1998. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 102:347-360
119. **Rosenow, C., P. Ryan, J. N. Weiser, S. Johnson, P. Fontan, A. Ortqvist and R. Masure.** 1997. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 25:819-829
120. **Rossjohn, J., R. J. C. Gilbert, D. Crane, P. J. Morgan, T. J. Mitchell, A. J. Rowe, P. W. Andrew, J. C. Paton, R. K. Tweten and M. W. Parker.** 1998. The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* 284:449-461
121. **Rubins, J. B., P. G. Duane, D. Clawson, D. Charboneau, J. Young and D. E. Niewoehner.** 1993. Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 61:1352-1358
122. **Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
123. **Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press
124. **Sampson, J. S., S. P. O'Connor, A. R. Stinson, J. A. Tharpe and H. Russell.** 1994. Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported *Streptococcus sp.* adhesins. *Infect Immun* 62:319-324
125. **Sánchez-Beato, A. R., L. Rubens and J. L. Garcia.** 1998. Molecular characterization of PcpA: a novel-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 164:207-214
126. **Sanger F., S. Nicklen and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
127. **Scanlon, L. K., W. F. Diven and R. H. Glew.** 1989. Purification and properties of *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase. *Enzyme* 41:143-150

128. **Secades, P. and J. A. Guijarro.** 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl Environ Microbiol* 65:3969-3975
129. **Siber, G. R.** 1994. Pneumococcal disease: Prospects for a new generation of vaccines. *Science* 265:1385-1387
130. **Siezen, R. J., W. M. de Vos, J. A. M. Leunissen and B. W. Dijkstra.** 1991. Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteases. *Protein Eng* 4:719-737
131. **Siezen, R. J. and J. A. M. Leunissen.** 1997. Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci* 6:501-523
132. **Smith, B. L. and M. K. Hostetter.** 2000. C3 as substrate for adhesin of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 182:497-508
133. **Smoot, J. C., K. D. Barbian, J. J. Van Gompel, L. M. Smoot, M. S. Chaussee, G. L. Sylva, D. E. Sturdevant, S. M. Ricklefs, S. F. Porcella, L. D. Parkins, S. B. Beres, D. S. Campbell, T. M. Smith, Q. Zhang, V. Kapur, J. A. Daly, L. G. Veasy and J. M. Musser.** 2002. Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4668-4673
134. **Spellerberg, B. and E. I. Tuomanen.** 1994. The pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Ann Med* 26:411-418
135. **Spellerberg, B., D. R. Cundell, J. Sandros, B. J. Pearce, I. Idänpään-Heikkilä, C. Rosenow and H. R. Masure.** 1996. Pyruvat oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 19:803-813
136. **Spratt, B. G.** 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264:388-393
137. **Stafslie, D. K. and P. P. Cleary.** 2000. Characterization of the streptococcal C5a peptidase using a C5a-green fluorescent protein fusion protein substrate. *J Bacteriol* 182:3254-3258
138. **Steinfort, C., R. Wilson, T. Mitchell, C. Feldman, A. Rutman, H. Todd, D. Sykes, J. Walker, K. Saunders, P. W. Andrew, G. J. Boulnois and P. J. Cole.** 1989. Effect of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium in vitro. *Infect Immun* 57:2006-2013
139. **Straus, D. C.** 1982. Protease production by *Streptococcus sanguis* associated with subacute bacterial endocarditis. *Infect Immun* 38:1037-1045
140. **Talarico, T. L., I. K. Dev., P. J. Bassford, Jr. and P. H. Ray.** 1991. Inter-molecular degradation of signal peptidase I *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 181:650-656
141. **Tettelin, H. et al.** 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293:498-506
142. **Tettelin, H. et al.** 2002. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12391-12396

143. **Tiraby, J.-G. and M. S. Fox.** 1973. Marker discrimination in transformation and mutation of pneumococcus. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3541-3545
144. **Tuomanen, E.** 1999. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Curr Opin Microbiol* 2:35-39
145. **Tynkkynen, S., G. Buist, E. Kunji, J. Kok, B. Poolman, G. Venema and A. Haandrikman.** 1993. Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 175:7523-7532
146. **Van der Flier, M., N. Chhun, T. M. Wizemann, J. Min, J. B. McCarthy and E. I. Tuomanen.** 1995. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to immobilized fibronectin. *Infect Immun* 63:4317-4322
147. **Van Roosmalen, M. L., J. D. H. Jongbloed, A. Kuipers, G. Venema, S. Bron and J. M. Van Dijk.** 2000. A truncated soluble *Bacillus* signal peptidase produced in *Escherichia coli* is subject to self-cleavage at its active site. *J Bacteriol* 182:5765-5770
148. **Vos, P., M. van Asseldonk, F. van Jeveren, R. Siezen, G. Simons and W. M. de Vos.** 1989. A maturation protein is essential for production of active forms of *Lactococcus lactis* SK11 serine proteinase located in or secreted from the cell envelope. *J Bacteriol* 171:2795-2802
149. **Vos, P., G. Simons, R. J. Siezen and W. M. de Vos.** 1989. Primary structure and organization of the gene for a procaryotic, cell envelope-located serine proteinase. *J Biol Chem* 264:13579-13585
150. **Walker, J. A., R. L. Allen, P. Falmagne, M. K. Johnson and G. J. Boulnois.** 1987. Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 55:1184-1189
151. **Wani, J. H., J. V. Gilbert, A. G. Plaut and J. N. Weiser.** 1996. Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 64:3967-3974
152. **Weiser, J. N., R. Austrian, P. K. Sreenivasan and H. R. Masure.** 1994. Phase variation in pneumococcal opacity: Relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* 62:2582-2589
153. **Weiser, J. N., Z. Markiewicz, E. I. Tuomanen and J. H. Wani.** 1996. Relationship between phase variation in colony morphology, intrastain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 64:2240-2245
154. **Weiser, J. N.** 1998. Phase variation in opacity by *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* 4:129-135
155. **Weiser, J. N., D. Bae, H. Epino, S. B. Gordon, M. Kapoor, L. A. Zenewicz and M. Shchepetov.** 2001. Changes in availability of oxygen accentuate differences in capsular polysaccharide expression by phenotypic variants and clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69:5430-5439
156. **Whalen, R. G.** 1996. DNA vaccines for emerging infectious diseases: What if? *Emerg Infect Dis* 2:168-175

157. **Winkelstein, J. A. and A. Tomasz.** 1978. Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal cell wall teichoic acid. *J Immunol* 120:174-178
158. **Wizemann, T. M., J. H. Heinrichs, J. E. Adamou, A. L. Erwin, C. Kunsch, G. H. Choi, S. C. Barash, C. A. Rosen, R. H. Masure, E. Tuomanen, A. Gayle, Y. A. Brewah, W. Walsh, P. Barren, R. Lathigra, M. Hanson, S. Langermann, S. Johnson and S. Koenig.** 2001. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* 69:1593-1598
159. **Yother, J. and D. E. Briles.** 1992. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. *J Bacteriol* 174:601-609
160. **Yother, J. and J. M. White.** 1994. Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. *J Bacteriol* 176:2976-2985
161. **Zheng, F., E. L. Angleton, J. L., and S.-B. Peng.** 2002. *In vitro* and *in vivo* self-cleavage of *Streptococcus pneumoniae* signal peptidase I. *Eur J Biochem* 269:3969-3977
162. **Zysk, G., R. J. M. Bongaerts, E. ten Thoren, G. Bethe, R. Hakenbeck, and H.-P. Heinz.** 2000. Detection of 23 immunogenic pneumococcal proteins using convalescent-phase serum. *Infect Immun* 68:3740-3743
163. **Zysk, G., B. K. Schneider-Wald, J. H. Hwang, L. Bejo, K. S. Kim, T. J. Mitchell, R. Hakenbeck and H.-P. Heinz.** 2001. Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69:845-852

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt. Herrn Prof. Dr. U. Hadding, Herrn Prof. Dr. K. Pfeffer und Herrn Prof. Dr. H.-P. Heinz danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit an diesem Institut durchzuführen. Herrn Prof. Dr. H.-P. Heinz gebührt außerdem mein Dank für die Bereitschaft der Begutachtung der Arbeit.

Bei Frau Prof. Dr. R. Hakenbeck und Dr. G. Zysk bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas sowie für die Betreuung dieser Arbeit. Frau Prof. Dr. R. Hakenbeck danke ich weiterhin für die Begutachtung der Arbeit so wie für die immer währende positive Sicht der Dinge, was mir Hoffnung und Zuversicht gegeben hat.

Bei Herrn Prof. Dr. B. Brüne möchte ich mich für die Bereitschaft den Vorsitz zu übernehmen bedanken.

Für die Hilfe bei allen theoretischen und praktischen Fragen, ebenso wie für die Organisation einer Verlängerung meines Vertrages, gilt mein Dank besonders Herrn Dr. G. Zysk.

Für die N-terminalen Sequenzierungen bedanke ich mich bei Dr. Sven Hammerschmidt und den Mitarbeitern der GBF Braunschweig.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. G. Bethe bedanken, die mich in das Labor eingewiesen und mir viele nützliche Tipps gegeben hat. Auch bedanke ich mich bei Winni Schwippert, der mir mit unermüdlichem Einsatz mit Rat und Tat im Labor zur Seite stand und Geduld aufgebracht hat, wenn es nötig war. Danke auch an Stefan Pietsch und Bernd Nietzgen so wie den Kursassistentinnen Renate Paatz und Antje Ragout für die gute Zusammenarbeit und angenehme Atmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Didier (Koku) gilt mein Dank für die zahlreichen Stunden, in denen er mich aufgebaut und mir zur Seite gestanden hat, wenn ich Hilfe brauchte. Anne, Gudrun und Marc möchte ich für die vielen langen Unterhaltungen im Denkerstübchen danken. Für die umfangreichen Berechnungen der Real-Time Ergebnisse danke ich Frau PD Dr. B. Henrich und für die schnelle Hilfe bei allen Computerproblemen Jan Würthner.

Allen Mitarbeitern am Institut für Medizinische Mikrobiologie gilt mein Dank für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Meiner Mutter, Kordula und Lübbi danke ich für die schnelle Korrektur der Arbeit. Meinen Eltern einen herzlichen Dank für die geistige und finanzielle Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anja Neuhaus
Geburtsdatum	15.04.1974
Geburtsort	Düsseldorf
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

2000 – 2004	Promotionsarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
1998 – 1999	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung mit dem Thema „Physiologische Charakterisierung von Oenokokken“
1994 – 1999	Studium der Biologie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, molekulare Biophysik, Physiologie und Botanik
1993	Praktikum im Umweltzentrum Schloß Türnich
1980 – 1993	Grundschule und Gymnasium in Köln, Abschluss: Abitur

Studiumbegleitende Arbeiten

1999	Tutorin und studentische Hilfskraft am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Universität Mainz
------	---